

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Efektivita vyhledávání sekundárních metabolitů sinic se  
specifickou aktivitou proti lidským nádorovým buňkám  
pomocí metod "highthroughput" screeningu**

Diplomová práce

**Ing. Dominika Tučková**

Školitel: RNDr. Pavel Hrouzek, Ph.D

Centrum Algatech, Mikrobiologický ústav AV ČR vědecké pracoviště Třeboň

Školitel specialista: Mgr. Jaroslava Liesková, Ph.D.

České Budějovice 2021

Tučková, D., 2021: Efektivita vyhledávání sekundárních metabolitů sinic se specifickou aktivitou proti lidským nádorovým buňkám pomocí metod "highthroughput" screeningu. [The effectivity of screening for cyanobacterial secondary metabolites with specific activity against human tumor cells using the method of "highthroughput" screening. Mgr. Thesis, in Czech.] – 116 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Rakovina patří v současné době mezi nejzávažnější civilizační onemocnění. Sekundární metabolity sinic jsou bohatým zdrojem aktivních látek s potencionálním využitím v protirakovinné léčbě. Cílem této práce bylo ověřit zda metoda velkokapacitního testování (HTS), která byla poprvé použita pro testování frakcí odvozených ze sinicových extraktů, je vhodným nástrojem pro vyhledávání látek se selektivním působením proti konkrétním rakovinným liniím. V této práci byla provedena HPLC-HRMS analýza frakcí vykazujících zvýšený efekt na nádorové linie a jejich biologický efekt byl testován a validován během manuálně provedených experimentů. Speciální zřetel byl věnován nádorové linii „triple-negativní“ rakovině prsu MDA-MB231. Následně byly v primárních frakcích vytipovány látky se selektivním účinkem na tuto rakovinou linii a byla ověřována jejich potence v čistém stavu.

## **Anotation**

Cancer is nowadays one of the most severe civilization diseases. Secondary metabolites of cyanobacteria are a rich source of active compounds with a potential use in anti-cancer treatment. The aim of this thesis was to verify whether the high-throughput screening method (HTS), used here for the first time to test effects of cyanobacterial extracts derived fraction, is suitable tool for the search of substances with selective activity against specific cancer lines. In this thesis the HPLC-HRMS analysis was used to analyze fractions showing increased effect on cancer lines and their biological effect was tested and validated in manually performed experiments. Special attention was paid to „triple-negative“ breast cancer cell line MDA-MB231. Subsequently, compounds isolated from primary fractions with specific effect on this cancer line were selected and their potency in pure state was verified.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2021

.....  
Ing. Dominika Tučková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Pavlu Hrouzkovi za ochotu, cenné rady a odborné vedení při psaní této diplomové práce. Současně mu patří můj obdiv za neutuchající optimismus i přesto, že často docházelo k drobným komplikacím.

Velký dík patří také všem z laboratoře řasových biotechnologií na Opatovickém mlýně za to, že mě přijali do svého týmu. Jmenovitě Honzíku Hájkovi za pomoc s HPLC-HRMS analýzou. Jindřišce Paichlové za pomoc s nevypočitatelnými buňkami. Kateřině Delawské za přímé, jasné a důležité rady. Petře Divoké za podporu, ochotu, rady a čas, který mi věnovala v každé potřebné chvíli. V neposlední řadě pak Ladě Samcové za pomoc s orientací v laboratoři.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu a pomoc během studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému psovi Maximovi za pomoc při zvládnání stresových situací.

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1 Nádorové onemocnění .....	1
1.1.1 Historie nádorového onemocnění.....	1
1.1.2 Rozdělení nádorů podle biologické povahy .....	2
1.1.3 Histologicko-histogenetická klasifikace nádorů .....	2
1.2 Teorie vzniku nádoru .....	4
1.3 Vznik nádoru – kancerogeneze.....	5
1.3.1 Protoonkogeny a onkogeny .....	7
1.3.2 Tumor supresorové geny .....	8
1.3.3 Telomery .....	8
1.3.4 Epigenetické změny .....	9
1.3.4.1 Methylace DNA.....	10
1.3.4.2 Remodelace chromatinu .....	11
1.3.4.3 RNA interference.....	11
1.4 Buněčné a molekulární základy nádorového onemocnění .....	11
1.4.1 Soběstačnost v produkci růstových signálů .....	13
1.4.2 Necitlivost na proti růstové signály.....	14
1.4.3 Schopnost vyhnout se buněčné smrti .....	15
1.4.4 Neomezený replikační potenciál .....	16
1.4.5 Trvalá angiogeneze .....	16
1.4.6 Invaze tkáně a metastázy .....	17
1.4.7 Inaktivace reparačních mechanismů .....	18
1.4.8 Podpora zánětu .....	18
1.4.9 Přeprogramování buněčného metabolismu .....	19
1.4.10 Nádorové bujení a imunitní systém .....	19
1.4.11 Mikroprostředí nádoru .....	20

1.5	Metabolismus rakovinné buňky.....	21
1.6	Apoptóza.....	23
1.6.1	Molekulární mechanismy apoptózy .....	24
1.6.1.1	Vnitřní dráha aktivace apoptózy.....	25
1.6.1.2	Vnější dráha aktivace apoptózy - „death receptros“ .....	26
1.6.1.3	Aktivace apoptózy pomocí perforinu/granzymu .....	26
1.6.1.4	Realizační cesta apoptózy.....	27
1.6.2	Rozdíly mezi apoptózou a nekrózou .....	28
1.7	Rizikové faktory vzniku rakoviny .....	29
1.8	Diagnostika nádorového onemocnění.....	30
1.9	Léčba nádorového onemocnění .....	31
1.9.1	Chirurgická léčba .....	31
1.9.2	Chemoterapie neboli cytostatická léčba.....	32
1.9.3	Radioterapie .....	33
1.9.4	Cílená biologická léčba .....	33
1.9.5	Hormonální a imunologická léčba .....	34
1.10	Rakovina prsu .....	35
1.10.1	Nádorové subtypy – biologie a klinické příznaky .....	36
1.10.1.1	„Luminal“ podtyp .....	37
1.10.1.2	„HER-2-enriched“ subtyp.....	37
1.10.1.3	„Basal-like“ podtyp .....	37
1.10.1.4	„Claudin-low“ podtyp.....	38
1.10.1.5	„Normal breast-like“ podtyp .....	38
1.10.2	Biologická léčba karcinomu prsu .....	39
1.11	Sinice a jejich sekundární metabolity .....	40
1.11.1	Příklady sekundárních metabolitů sinic s protirakovinnými účinky .....	41
1.11.1.1	Cryptophyciny .....	41

1.11.1.2	Dolastatiny .....	42
1.11.1.3	Apratoxiny .....	43
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>45</b>
3.1	Chemikálie .....	45
3.2	Přístrojové vybavení .....	45
3.3	„Highthroughput“ screening (HTS) – vysokokapacitní testovací systém .....	46
3.4	Analýza primárních frakcí – HPLC-HRMS .....	46
3.5	Buněčné linie .....	47
3.5.1	Kultivace .....	48
3.5.2	Pasážování buněčných linií .....	48
3.5.3	Nasazení buněk na experiment.....	49
3.6	Princip MTT testu.....	49
3.6.1	MTT test – provedení .....	50
3.7	Princip stanovení koncentrace ATP.....	51
3.7.1	Stanovení koncentrace ATP – provedení .....	51
3.8	Aktivita efektorových kaspáz 3/7 .....	52
3.8.1	Aktivita efektorové kaspáz 3/7 – provedení.....	52
3.8.2	Fluorescenční mikroskopie – barvení jader .....	53
3.9	Frakcionace primárních frakcí – HPLC-HRMS .....	53
3.10	Výroba extraktu z biomasy .....	54
3.11	Izolace vybraných látek ( <i>m/z</i> ) pro následnou analýzu HPLC.....	55
3.12	Příprava roztoků z izolovaných „látek“ ( <i>m/z</i> ).....	56
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>57</b>
4.1	Výběr frakcí pro primární analýzu .....	57
4.2	Výběr frakcí pro validaci .....	58
4.3	Výsledky validačních experimentů.....	59
4.3.1	Validační experimenty na buněčné linii BJ.....	61

4.3.2	Validační experimenty na buněčné linii RPE-1 .....	63
4.3.3	Komplexní porovnání dat HTS a MBU .....	64
4.4	Fracionace primárních frakcí .....	67
4.5	Izolace látek .....	69
4.6	Ověření inhibičního účinku „čistých látek“ .....	71
4.7	Ověření inhibičního účinku „látky“ 824,4 .....	71
4.8	Ověření inhibičního účinku „látky“ 393,3 .....	73
4.9	Ověření inhibičního účinku „látky“ 874,3 m/z .....	74
4.10	Ověření inhibičního účinku „látky“ 607,3 m/z .....	75
4.11	Výsledky aktivity efektorových kaspáz 3/7 .....	76
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>78</b>
5.1	Výběr frakcí pro validaci .....	78
5.2	Validace .....	79
5.3	Inhibiční účinek „čistých látek“ .....	81
5.4	Řešení komplexity frakcí .....	84
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>95</b>
9.1	„Highthroughput“ screening – buněčné linie .....	95
9.2	Validační výsledky MBU a HTS pro koncentraci 2,5 µg/ml .....	96
9.1	Validační výsledky MBU a HTS pro koncentraci 0,25 µg/ml .....	98
9.2	Výsledky fraccionace primárních frakcí .....	100
9.2.1	Výsledky fraccionace pro primární frakci 58-31 .....	100
9.2.2	Výsledky fraccionace pro primární frakci 69-29 .....	101
9.2.3	Výsledky fraccionace pro primární frakci 85-31 .....	102
9.2.4	Výsledky fraccionace pro primární frakci 119-30 .....	103
9.2.5	Výsledky fraccionace pro primární frakci CTII-10 .....	104



9.2.6	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-11 .....	105
9.2.7	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-12 .....	106
9.2.8	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-13 .....	107
9.2.9	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-16 .....	108
9.2.10	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-29 .....	109
9.2.11	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-30 .....	110
9.2.12	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-32 .....	111
9.2.13	Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-33 .....	112
9.3	Chromatogramy a MS spektra „čistých“ látek .....	113



# 1 ÚVOD

Rakovina patří v současné době mezi nejobávanější civilizační onemocnění. Od nepaměti obklopuje toto onemocnění představa nevyhléditelnosti a tím pádem nevyhnutelné smrti, které předcházejí ukrutné bolesti a utrpení. Vznik a růst zhoubných nádorů je předmětem zájmu mnoha lékařů a vědců z různých oblastí.

## 1.1 Nádorové onemocnění

Rakovina je definována jako soubor onemocnění vycházející ze závažného narušení fyziologických a biochemických charakteristik konkrétní buňky či populace buněk a jejich vztahů k okolní tkáni, kterému předchází namnožení poruch v genomu dané buňky. Mezi tyto poruchy patří různé typy mutací (např. delece, amplifikace), ale též poruchy v epigenetické regulaci. Vzniklé poškození vede ke špatné regulaci růstu a množení. Rakovinné buňky se dělí, když nemají a neumírají, když by měly. Za společný znak onemocnění je tudíž považován nekontrolovatelný růst buněk. Odborně tento stav označujeme jako zhoubné nádorové onemocnění [1].

Nádorové onemocnění je patologický stav, který se týká celého organismu [2]. Nejčastěji nádorové bujení propuká v tkáních, kde dochází k velkému množení buněk (trávicí, dýchací soustava) nebo dochází k buněčné stimulaci hormony (prostata, prsy, vaječníky). Klinické projevy a samotný průběh nemoci závisí na celkovém stavu organismu [3].

### 1.1.1 Historie nádorového onemocnění

Nádorové onemocnění lidstvo provází od nepaměti. Tuto skutečnost dokládají například archeologické nálezy egyptských záznamů a mumií. Léčba zhoubných nádorů se datuje od 19. století, kdy se problematikou začali podrobněji zabývat patologové, internisté a gynekologové. První léčebné postupy byly pouze chirurgické. Objev rentgenového záření a radia následně léčebné metody rozšířil [4].

V roce 1862 vznikl Spolek českých lékařů a v roce 1904 byl ustanoven Spolek pro protírání rakoviny v Praze, který v roce 1936 vybudoval Radioléčebný ústav v Praze na Bulovce (nynější Ústav radiační onkologie). Od roku 1928 v Brně existoval "Dům útěchy", jehož účel byl starat se o nevyhléditelně nemocné pacienty s nádorovým onemocněním. Ten byl následně přebudován (1933-1935) na nynější Masarykův onkologický ústav. V roce 1990 vznikala řada občanských iniciativ usilující o prohloubení nádorové prevence a zlepšení kvality života onkologických pacientů. Jednou z nejstarších a nejznámějších

organizací je Liga proti rakovině, která je řádným členem mezinárodních organizací UICC a ECL [4].

### **1.1.2 Rozdělení nádorů podle biologické povahy**

Dělení nádorů podle jejich biologické povahy se pro didaktické účely jeví jako jednoduché, ale v praxi často velmi obtížné až nemožné. Nádory se dělí na maligní a benigní, a to hlavně podle chování k hostitelskému organismu [5]. Klasifikace nádorů se řídí podle čtyř charakteristik: podle rychlosti růstu nádoru, podle schopnosti zakládat dceřiná ložiska (metastázy), podle chování okolních tkání, podle diferenciací nádorových buněk [6].

Nezhoubné (benigní) nádory rostou pomalu a pouze v místě vzniku, nešíří se do ostatních částí těla a jsou výrazně ohraničeny. Díky tomuto ohraničení se obvykle dají bez větších problémů chirurgicky odstranit. Současně jsou tyto nádory dobře diferencované (podobné buňkám výchozím). Většinou nejsou život ohrožující a po odstranění se znovu nevytvářejí [6], [7].

Zhoubné (maligní) nádory, někdy označované také jako malignity, prorůstají do okolních tkání a poškozují je. V pokročilejším stádiu se z vzniklých nádorů uvolňují buňky nebo skupiny buněk a rozšiřují se do dalších orgánů (krví nebo mízou). V dalších orgánech dochází k rozvoji druhotných rakovinných ložisek, tzv. metastáz, které mohou pro pacienta představovat několikanásobně větší riziko, než primární nádory [6], [7].

Pro tumory, které nelze jednoznačně zařadit do těchto dvou zmíněných kategorií, se používá označení potencionálně maligní/semimaligní. Příkladem je například nádor z buněk granulózy, feochromocytom či některé hraniční léze melanocytární. U těchto nádorů je důkazem maligního chování až vznik metastáz. Termín neoplasie se používá pro celý rozsah benigního i maligního chování buněk [6].

### **1.1.3 Histologicko-histogenetická klasifikace nádorů**

Klasifikace všech lidských nádorů vychází principálně z přiřazení nádorové tkáně k výchozí zdravé tkáni. V současné histogenetické klasifikaci nádorů jsou rozeznávány tyto skupiny [6]:

Epitelové nádory, které jsou odvozené od epiteliálních buněk. Současně se jedná o nejčastější typ nádorového onemocnění.

Mezenchymové nádory, které vznikají z buněk pojivových tkání (vazivových cévních, chrupavčitých, kostních, atd.).

Hematopoetické nádory jedná se o lymfomy, leukémie, myeloproliferativní a myelodysplastická onemocnění a nádory z histiocytárních a dendritických buněk. V

některých případech se tato skupina řadí k předchozí zmíněné, a to na podkladě společného původu z embryonálního mezenchymu.

Neuroektodermální nádory jsou odvozené od struktur derivovaných z crista neuralis. Patří jsem tumory z gangliových i gliálních buněk centrální nervové soustavy, z periferních nervů, paraganglií a melanocytární nádory.

Germinální nádory vznikají z teoreticky totipotentní buňky zárodečné, která je schopna diferencovat se v nádory podobné různým vývojovým stádiím jakékoliv lidské tkáně, somatické (teratomy, embryonální karcinom, seminom) nebo extrasomatické (nádor ze žloutkového váčku, choriokarcinom).

Smíšené nádory jsou uváděny jako samostatná skupina. Dnes jde spíše o matoucí skupinu. Ve většině případů jde o monoklonální nádor, kde vzniká více diferenciálních linií s příslušným morfologickým obrazem. Patří sem například teratomy a nádory označované jako karcinosarkomy (karcinom s parciální sarkomatoidní diferenciací - část nádoru morfologicky odpovídá karcinomu a část má mikroskopický vzhled sakromu). Dále se do této skupiny řadí léze, kde pouze jedna komponenta je klonálním nádorem, kdežto druhá je nenádorovou tkání (tzv. "pasivně vtaženou" do vznikajícího nádoru). V neposlední řadě rozeznáváme několik tumorů, které jsou nezařaditelné do předešlých kategorií. Jedním z těchto nádorů je mezoteliom, gestační choriokarcinom či nádory ze zbytků chorda dorsalis (chordom).

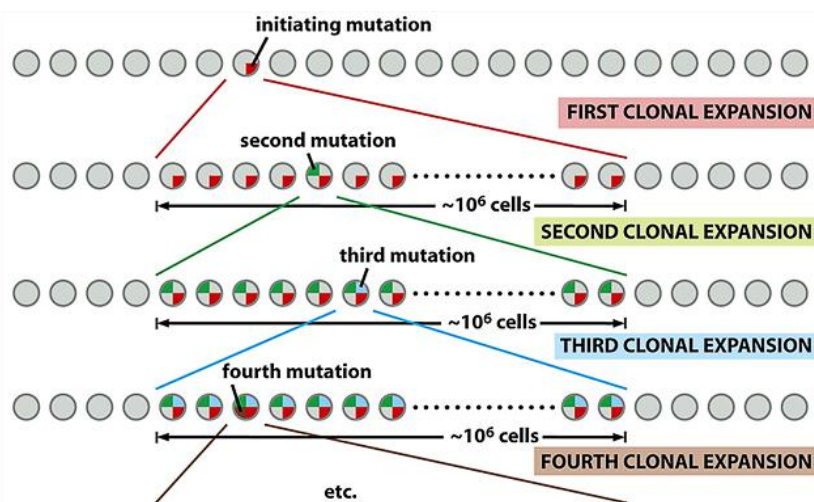
Pro přehlednost jsou základní typy nádorů vypsány v následující tabulce (Tabulka 1). Zde je přehledně uvedeno zařazení do kategorie maligní/benigní a typ výchozí tkáně.

*Tabulka 1: Základní klasifikace nádorů podle výchozí tkáně s rozdělením na benigní a maligní [8]*

Výchozí tkáň		Benigní buňky	Maligní buňky
Epitel	povrchový	papilom	karcinom
	žlázový	adenom	adenokarcinom
Pojivo	kolagenní	fibrom	fibrosarkom
	tukové	lipom	liposarkom
	chrupavka	chondrom	chondrosarkom
	kost	osteom	osteosarkom
	sval	myom	myosarkom
	cévní	angiom	angiosarkom
Krvetvorná lymfatická		mononukleóza	leukemie lymfom, myelom
Nervová	centrální	gliom	glioblastom
	periferní	ganglioneurom paragangliom	neuroblastom maligní paragangliom
Zárodečná		gonadoblastom	seminom dysgerminom
		teratom zralý	teratom nezralý

## 1.2 Teorie vzniku nádoru

V současné době je obecně přijímanou představou o kancerogenezi somatická mutační teorie (SMT). Tato teorie je jedním z hlavních proudů současné nádorové biologie. Kancerogeneze je zde popisována jako proces postupného hromadění mutací a epigenetických změn (ovlivňují expresi genů, především se jedná o metylaci DNA), a to převážně v somatických buňkách, v protoonkogenech a nádorových supresorech. Celý proces začíná jednou "odrodilou" buňkou, která se postupně přeměňuje z buňky zdravé do plně maligní. Proces SMT je znázorněn na přiloženém obrázku (Obrázek 1). SMT stojí na pevných základech nevyvratitelných poznatků nádorové biologie. Mezi některé z těchto poznatků patří například potvrzení, že řada karcinogenů způsobuje genetické mutace. Schopnost některých onkogenních virů vyvolat rakovinu souvisí s tím, že nesou aktivní onkogeny. V neposlední řadě pak byla prokázána souvislost vzniku nádorového bujení se zvýšenou nestabilitou genomu. Současně tato teorie představuje osm typických znaků nádorové buňky: 1. získání soběstačnosti v produkci růstových signálů, 2. necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus, 3. poškození apoptózy, 4. získání neomezeného replikačního potenciálu, 5. indukci angiogeneze, 6. získání metastatického potenciálu, 7. přeprogramování energetického metabolismu, 8. schopnost vyhnout se dohledu ze strany imunitního systému [9]. Tyto změny jsou více diskutovány v kapitole 1.3.4.



Obrázek 1: Somatická mutační teorie - kancerogeneze chápána jako proces postupné přeměny zdravé buňky v plně maligní na základě postupného hromadění genetických a epigenetických změn [8]

Naproti tomu existuje alternativní teorie, která se označuje jako Teorie pole tkáňové organizace (TOFT), která byla poprvé představena v roce 1999. Vůči teorii SMT se vymezuje dvěma hlavními tvrzeními. První tvrzení vychází z předpokladu, že přednastaveným stavem buněk, které jsou součástí mnohobuněčného organismu, je stav

proliferace, který je regulován a držen pod kontrolou prostřednictvím inhibičních signálů přicházejících z vnějšího mimobuněčného mikroprostředí. SMT naopak předpokládá, že buňky jsou celou dobu ve stavu klidu a stav neregulované proliferace je vyvolán důsledkem mutací. V druhém tvrzení vychází TOFT z předpokladu, že prvotní dopad působení karcinogenů na tkáň spočívá v narušení normální organizace tkání, narušení fyziologických interakcí mezi parenchymálními a stromálními buňkami. Tato ztráta adekvátní struktury a v tom důsledku i ztráta signalizace mezi buňkami uvnitř tkání vede k deregulaci, tedy ke ztrátě inhibice buněčné proliferace. Zatímco SMT se domnívá, že mutace v buňkách, které jsou způsobené karcinogeny, mají za důsledek ztrátu buněčné kontroly nad proliferací [9].

### **1.3 Vznik nádoru – kancerogeneze**

Vzhledem k různorodosti rakovinných typů nelze mluvit o jednotné příčině vzniku nádorového onemocnění. Zdravé buňky se chovají podle geneticky naprogramovaných pravidel, mají definovaný tvar, strukturu a prosperují mezi uspořádanými okolními buňkami. Nádorové buňky se však neřídí žádným regulačním mechanismem, jejich množení je nekontrolovatelné a šíření je abnormální [8].

Ke vzniku nádorového onemocnění v podstatě dochází při porušení homeostázy na buněčné úrovni. Tato homeostáza je v tkáních udržována pomocí integrovaného systému komunikačních mechanismů a reguluje schopnost buněčné diferenciaci, proliferaci, adaptivní odpovědi a apoptózy [1], [8].

Buněčný cyklus, ve kterém se každá buňka nachází, je řízen složitou vnitrobuněčnou signalizací. Pokud dojde k poruše regulace, buňka se začne nekontrolovaně dělit a postupně se tvoří nádor. Rozvoj rakoviny probíhá v několika krocích, i když to neplatí pro všechny druhy rakoviny úplně stejně [1], [10].

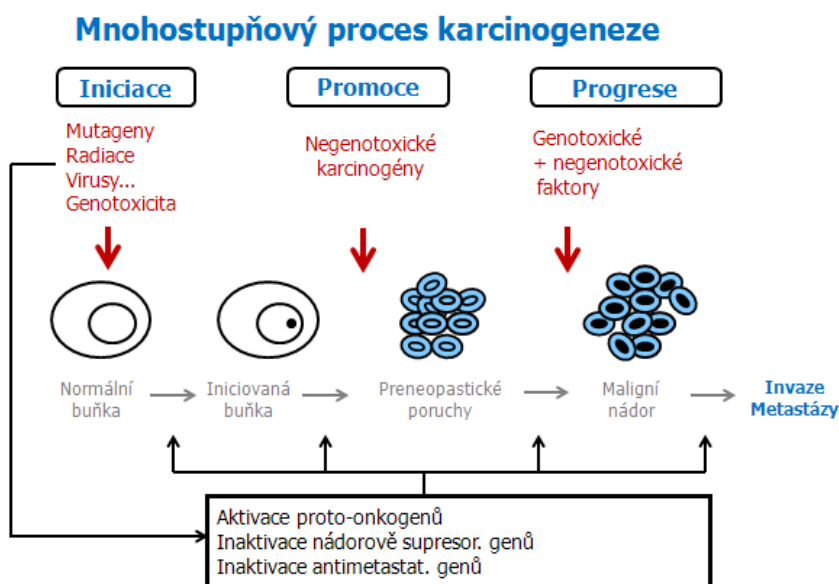
Proces vzniku a vývoje nádorů se označuje jako kancerogeneze (karcinogeneze, onkogeneze, tumorigeneze) [5]. Jedná se o složitý vícestupňový proces, který je možné zastavit hned na počátku, v průběhu nebo může vyvrcholit za vzniku nádoru [8]. Během kancerogeneze dochází k hromadění mutací v buňce, díky kterým se buňka stává abnormální, získává nové schopnosti (uvolňování růstových enzymů, atd.) a ovlivňuje okolní buňky [10]. Proces kancerogeneze se skládá ze tří hlavních částí: iniciace, promoce a progresu [11].

Stádium iniciace je krátké období, ve kterém dochází k mutaci genetického materiálu buňky a dochází k nevratné změně na buňku preneoplastickou. V tomto stádiu dochází k jednoduchým záměnám bazí nebo k malým delecím v kritických genech, a to zejména v

protoonkogenech. Buňky získávají selekční výhodu v růstu a přeměňují se na buňky nádorové. Toto stádium je nevratné [4], [8].

Ve stádiu promoce dochází k proliferaci preneoplastických nebo neoplastických buněk, která je dále podporovaná promočními faktory, tzv. promotory (např. zánět). Tyto faktory nejsou schopny vyvolat maligní nádorovou transformaci, ale pouze ji podpořit. Intenzita těchto mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby došlo k dostatečné buněčné stimulaci. Při jejich odstranění se může kancerogeneze zastavit nebo zpomalit. Během promoce dochází snadněji ke vzniku dalších genetických a epigenetických změn, které buňky nevratně stimulují do plně maligního typu. Stádium se odborně nazývá karcinom in situ [4], [8].

V posledním stádiu, označovaném jako progrese, dochází k další kumulaci genetických a epigenetických změn. Dochází k velkým změnám v genomu jako chromozomální translokace, delece, inzerce a amplifikace genů. Populace nádorových buněk se vymyká kontrole mezibuněčné signální sítě, která je zprostředkována cytokiny a membránovými interakcemi. Postupně se šíří do tkání v blízkém okolí a utlačují je, dále prorůstají do cévního a lymfatického oběhu a invadují do dalších zdravých tkání a orgánů. Dochází k morfologické a funkční přeměně funkční tkáně, narušení její celkové architektury [4], [8]. Postupný proces karcinogeneze je znázorněn na přiloženém obrázku (Obrázek 2).



Obrázek 2: Postupný proces karcinogeneze - normální buňka, iniciovaná buňka (mutovaná buňka se schopností stát se nádorovou nebo maligní), preneoplastické poruchy, maligní nádor s metastazováním do okolních tkání [8]



### 1.3.1 Protoonkogeny a onkogeny

V každé buňce jsou geny, které kontrolují proliferaci, délku života a apoptózu, migraci, stabilitu genomu. V dnešní době je již známá řada genů odpovědných za vývoj nádorového bujení. Na porozumění maligní transformaci má zásluhu široká škála prací s onkogenními viry [10]. Obecně platí, že mutací nebo nadměrnou aktivací protoonkogenů může dojít k vzniku onkogenů, které stimulují nebo chrání buňku před buněčnou smrtí, nebo k inaktivaci tumor supresorových genů, které inhibují proliferaci [11].

Protoonkogeny mají základní význam v buněčné fyziologii všech vyšších organismů. Jedná se především o geny kódující proteiny s klíčovou úlohou na různých úrovních integrace mitogenních signálů nesených růstovými faktory a hormony. Hrají důležitou roli v regulaci růstu, diferenciaci a apoptóze normálních buněk. Pokud jsou modifikovány na strukturální nebo kontrolní úrovni, začnou se chovat jako onkogeny podporující vývoj nádoru. Funkce protoonkogenů může být ovlivněna na úrovni sekvence jednotlivých nukleotidů nebo změnou transkripce a exprese. Buňka tedy produkuje protein se změněnými biochemickými vlastnostmi nebo syntetizuje abnormálně vysoké množství proteinu [1], [10].

Protoonkogeny lze dělit podle lokalizace jejich produktu na ty, které kódují sekreční proteiny, proteiny buněčného povrchu, jaderné proteiny nebo cytoplazmatické proteiny. Dále se dají dělit podle funkce jejich produktů na růstové faktory, receptory pro růstové faktory, jaderné proteiny, cytoplazmatické proteiny (protein kinázy a G-protein) [8].

Onkogeny jsou aktivované homology protoonkogenů, které existují v normálních buňkách. Mutace v onkogenu způsobuje deregulaci buněčného růstu, immortalizaci a transformaci v nádorovou buňku. K onkogenní aktivaci dochází nejčastěji bodovou mutací, chromozomální přestavbou nebo genovou amplifikací. Onkogeny se chovají jako dominantní geny aktivující řadu buněčných událostí obzvláště signálních cest. Aktivační působení onkogenů může být tak extrémní, že aktivuje až 15% genů organismu. Buňka může onkogeny umlčet pomocí methylace (buňky se tímto způsobem vyrovnává s cizorodou genetickou informací). Onkogeny stojí na počátku nádorového bujení, ale současně jsou potřebné i pro udržení tohoto stavu [10], [12].

Proteinové produkty protoonkogenů a onkogenů regulují replikaci DNA a přenosy signálů. Rozdělují se do několika funkčních skupin [8]:

- růstové faktory (sis, hst)
- cytoplazmatické serinové a treoninové kinázy (mil, mos, raf)
- jaderné proteiny fungující jako aktivátory transkripce (myb, myc, fos, jun)
- na membránu vázané analogy proteinů vážících guanidin trifosfát-GTP (ras)

- receptory pro růstové faktory (erb B, fms, kit) a tyrozin kinázy (src, frg, fcs)

### 1.3.2 Tumor supresorové geny

Tumor supresorové geny, antiproliferační, potlačují nádorové bujení a chrání buňku před nádorovou transformací. Působí proti onkogenům tím, že negativně ovlivňují proliferaci [1]. V normálních buňkách se tumor supresorové geny nacházejí ve dvou kopiích (alelách). Chovají se jako recesivní, což znamená, že stačí pouze jeden z dvojice, aby protinádorový účinek zůstal zachován. Obě formy musí podlehnout mutaci, aby došlo k neschopnosti regulovat buněčnou proliferaci. V některých případech je právě ztráta funkce těchto genů impulz pro vznik rakovinného bujení. Obecně je pro nádorové buňky typické, že dochází k poruše rovnováhy mezi protoonkogeny a tumorovými supresory [11].

Jedním z nejvýznamnějších tumor supresorových genů je p53, který má hlavní úlohu v kontrole buněčného cyklu a inhibici mezi fázemi G1 a S nebo v indukci apoptózy při výrazném poškození DNA. Gen p53 však velmi dobře mutuje a stává se onkogenem. To dokazuje i fakt, že původně byl tento gen popsán ve své onkogenní (mutované) formě [13]. Nejběžnějším a jedním z nejdříve epigeneticky ovlivněným tumor supresorovým genem u lidské rakoviny (prsu, tlustého střeva, plic a dalších) je p16INK4a [8].

Hlavní rozdíly v působení mezi tumor supresorovými geny a onkogeny jsou zapsány v následující tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Základní rozdíly mezi onkogeny a tumor supresorovými geny [14]

Onkogeny	Tumor supresorové geny
Mutace v jedné ze dvou alel je dostačující pro aktivitu (dominantní).	Mutace v obou alelách nebo v jedné s následnou ztrátou nebo redukcí homozygotnosti v druhé.
„Získání funkce“ u proteinu, který spouští buněčné dělení	Ztráta funkce proteinu.
Mutace vznikají v somatických tkáních, nejsou dědičné.	Mutace jsou přítomné v zárodečné buňce (mohou být dědičné) nebo v somatické buňce.
Preference některých tkání.	Silná tkáňová preference (např. vliv Rb1 genu v sítnici).

### 1.3.3 Telomery

Telomera je vysoce konzervovaná koncová oblast DNA chromozomů, která je tvořena padesátkrát až šedesátkrát se opakujícími sekvencemi šestice bází s vysokým obsahem guaninu (telomerový motiv u člověka - TTAGGG). Telomery ohraničují začátek a konec

každého chromozomu a tvoří "ochranou čepičku" kolem genomové DNA zabraňující chromozomálním ztrátám a aberantním fúzím během mitotického dělení. Během buněčného dělení, kdy buňka vytváří nové kopie genetického materiálu, se telomery vždy o něco zkrátí (přibližně o 25-200 pb) [8]. Jakoby docházelo k chybě a kopírování nebylo provedeno až do konce. Telomery jsou zkracovány tak dlouho, až se jejich délka dostane na kritickou mez, a ztrácí se její význam konce chromozomu. Ztráta telomerických konců může způsobit genomovou nestabilitu a změněnou genovou expresi. V této chvíli se buňka přestává dělit a spěje ke svému zániku mechanismy závislými nebo nezávislými na proteinu p53. Buňka má tedy ve svém chromozomu zakódovaný pouze omezený počet dělení a nemůže žít věčně, což slouží současně i jako přirozená pojistka proti nádorovému bujení [15].

Většina buněk, u kterých propukne nádorové bujení, si velmi rychle zkrátí telomery na kritickou mez a zahyne. Některým však neomezené dělení zajišťuje enzym telomeráza, který je schopen dostavět chybějící část telomery, blokovat stárnutí a zajistit buňce nekonečné dělení. Tento enzym není ve většině somatických buněk aktivní. Výjimkou jsou pouze buňky zárodečné linie a embryonální buňky, které tento enzym mají. Díky tomuto mechanismu získá nádorová buňka neomezený počet dělení a stává z tohoto pohledu prakticky nesmrtelnou [15].

Enzym telomeráza se skládá ze dvou hlavních podjednotek: z katalytické jednotky TP2 – lidská telomerázová reverzní transkriptáza (TERT) a RNA molekuly. Telomeráze se pomocí své RNA naváže na telomery a katalytická proteinová jednotka syntetizuje DNA přímo na koncích chromozomů reverzní transkripční templátu RNA [8].

Vztahy mezi telomerázovou aktivitou a nádorovým onemocněním jsou v současné době pouze částečně objasněny. Telomeráza může paradoxně buď podporovat, nebo inhibovat nádorové bujení, a to v závislosti na genetickém kontextu buňky [15].

#### **1.3.4 Epigenetické změny**

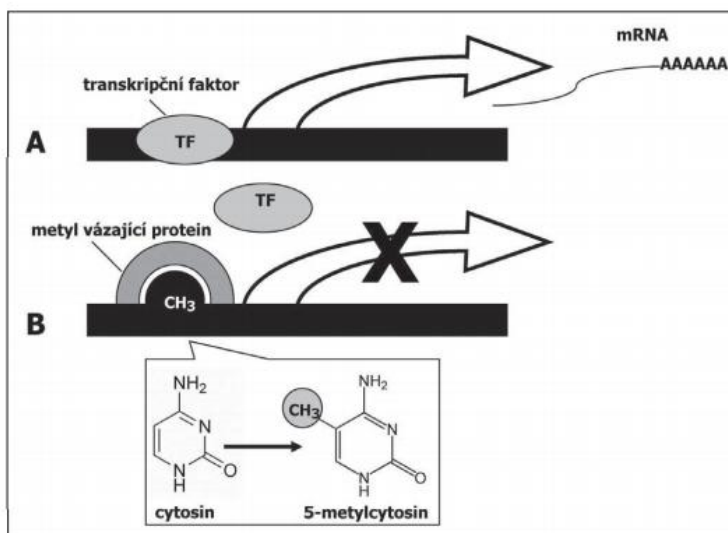
Termín epigenetické změny označuje chemické změny na molekule DNA nebo chromatinu bez vlivu na sekvenci nukleotidů ovlivňující především expresi určitých regionů DNA. Umlčení genů na úrovni chromatinu je nezbytné pro život eukaryotických organismů a zvláště důležité při organizaci klíčových biologických procesů. Z hlediska kancerogeneze mohou tyto změny způsobit podobný účinek jako mutace v těchto genech. Pokud se tyto změny dotknou tzv. "cancer-related" genů (klíčové regulační geny) výsledný efekt se podílí na procesu nádorové transformace nebo na změnách fenotypu nádoru. Epigenetické změny jsou dědičné, což je jeden z hlavních důvodů, proč jsou při vývoji rakoviny stejně důležité

jako genetické změny. Současně se tyto změny mohou v buňkách objevovat rychleji než mutace. Na rozdíl od změn genetických jsou epigenetické změny reverzibilní [16]. Modifikace vznikají dvěma hlavními mechanismy – metylací DNA a/nebo chemicky podmíněnou změnou uspořádání chromatinu (acetylací histonů) [8].

#### 1.3.4.1 Methylace DNA

Tento termín označuje proces, při němž dochází ke kovalentnímu navázání methylové skupiny na vybrané nukleotidové báze, a tím k inhibici vazby transkripčních faktorů (Obrázek 3). Cílovou molekulou pro metylaci je 5 pozice v cytosinovém kruhu v CpG dinukleotidech [8]. V somatických buňkách jsou nerovnoměrně (geny a jejich promotory, integrované oblasti) methylovány až 4% cytosinových bází. Jedná se o enzymatický proces, na kterém se podílí DNA metyltransferázy (DNMT1). DNA methylace se může uplatňovat v procesu nádorové transformace prostřednictvím několika mechanismů [16], [17]:

- DNA methylace jako příčina bodových mutací – Methylovaný cytosin podléhá spontánní deaminaci na thymin.
- DNA hypomethylace – Globální genomická hypomethylace je pro nádorové buňky typická. V mnoha nádorech je celková methylace snížena až na 70% normálního stavu, což může mít za následek genomickou nestabilitu v důsledku aktivace dříve umlčovaných genů.
- DNA hypermethylace. – Dochází k hypermethylaci dříve aktivních genů a jejich umlčení. V nádorových buňkách má největší význam inaktivace tumor supresorových genů.



Obrázek 3: DNA methylace a "umlčování" genů v důsledku inhibice vazby transkripčního faktoru, A – nemethylovaný promotor, B – methylovaný promotor [16]

#### 1.3.4.2 *Remodelace chromatinu*

Jedná se o epigenetické změny spočívající v chemické modifikaci (methylaci, acetylaci nebo fosforylaci) histonových proteinů a k ovlivnění kondenzace chromatinu. Důsledkem je změna přístupnosti transkripčních enzymů k promotorům genů, a tím dochází ke změnám genové exprese. Acetylace histonů vede k transkripční aktivaci chromatinu a deacetylace histonů naopak transkripční inaktivaci. Deacetylace na lysinu 16 a trimethylace na lysinu 20 histonu H4 je běžným znakem lidské rakoviny. Acetylace histonu a methylace DNA jsou úzce spojeny. Například globální hypomethylace vede ke změnám na úrovni acetylace histonu a naopak [16], [18].

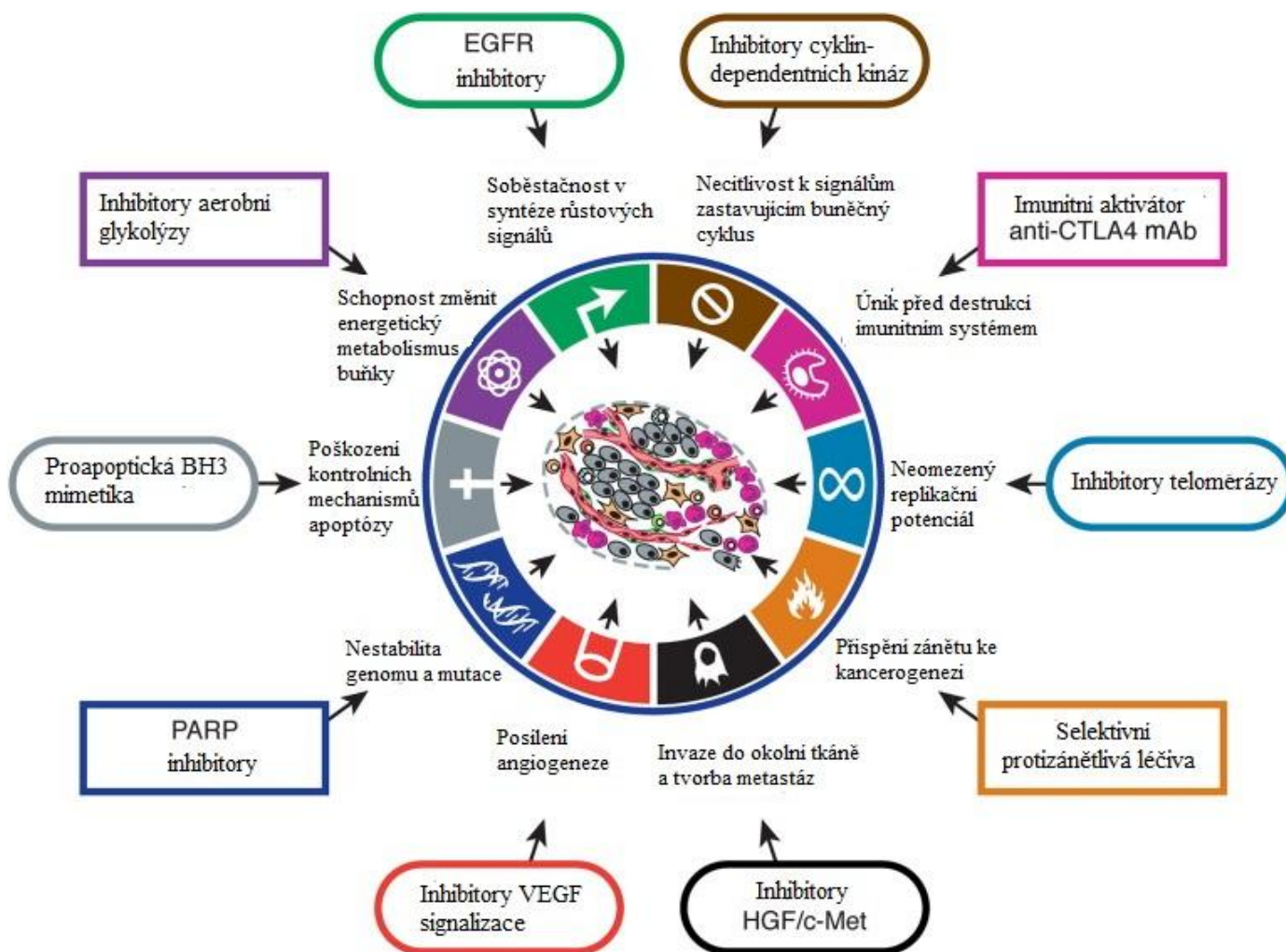
#### 1.3.4.3 *RNA interference*

RNA interference (RNAi) je významný regulátor genové exprese, který se může podílet na vzniku nádorového bujení. Základem pro interferenci jsou malé molekuly RNA (siRNA nebo miRNA), které se komplementárně vážou na mRNA a blokují tvorbu proteinů. Zdroje malých RNA molekul jsou exogenní (RNA virus) i endogenní (produkt vlastních specifických genů buňky). MiRNA inhibují translaci mRNA mnoha cílových genů, které se podílejí na rozvoji nádorového bujení [16].

### **1.4 Buněčné a molekulární základy nádorového onemocnění**







Genetické a epigenetické změny, které probíhají během karcinogeneze, dodávají nádorovým buňkám jedinečné fenotypové vlastnosti. Každá nádorová buňka se vyznačuje několika změnami své buněčné fyziologie. Tyto změny zahrnují udržování proliferativní signalizace, vyhýbání se tumor supresorovým genům, vzdorování buněčné smrti, buněčnou imortalizaci, angiogenezi, přeprogramování buněčného metabolismu, vyhýbání se imunitní odpovědi a aktivaci invaze do okolní tkáně a metastazování. Základem těchto charakteristických znaků je nestabilita genomu, která zapříčiňuje vysokou genetickou rozmanitost. Současně nádory obsahují repertoár rekrutovaných zdánlivě normálních buněk, které přispívají k získání charakteristických znaků vytvářením tzv. mikroprostředí nádoru. Obecně nádorové bujení narušuje homeostázu a hierarchii tkáně [19].

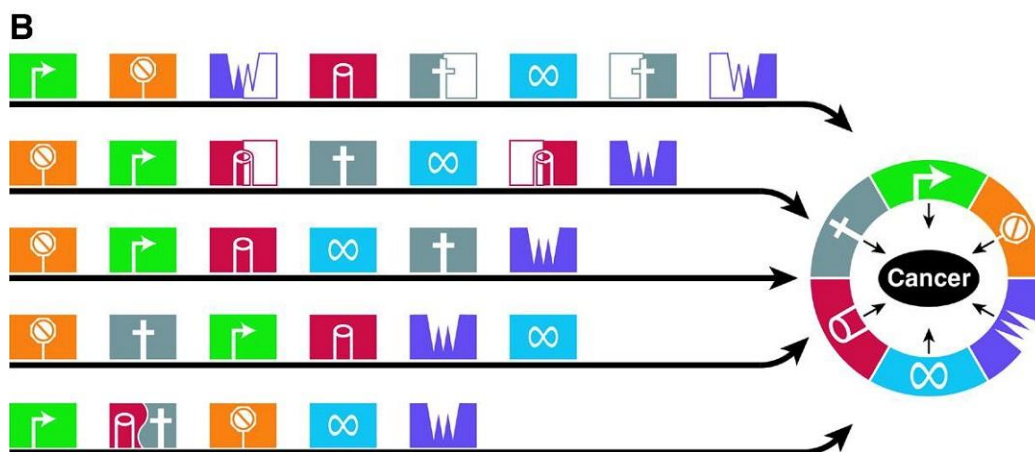
Pochopení molekulárně biologické podstaty těchto fyziologických změn v nádorových buňkách napomáhá v cílené léčbě nádorového onemocnění. Většina vyvinutých léků se snaží zaměřit na konkrétní molekulární cíle, které souvisí se změněnými vlastnostmi nádorových buněk. Díky tomu získává léčivá látka poměrně velkou toxicitou specifitu [20]. Následující obrázek shrnuje charakteristické znaky rakoviny a možné terapeutické cílení na ně (Obrázek 4).



Obrázek 4: Terapeutické cílení na charakteristické znaky rakoviny [20]

Cesty, kterými se buňky dostávají do stavu plné malignity, jsou velmi variabilní. Například mutace v onkogenech a tumor supresorových genech se mohou v některých drahách progresu nádoru objevit velmi brzy a u jiných později (Obrázek 5). V závislosti na této skutečnosti se mohou biologické vlastnosti nádorových buněk objevit v různou dobu. Konkrétní sekvence, ve které dochází k fyziologickým změnám, se může mezi nádory stejného i různého typu značně lišit. Současně u některých typů nádorů může určitá genetická událost přispět pouze k částečnému zisku selekční výhody, ale u jiného typu nádoru může tato genetická změna vést k získání několika odlišných nádorových schopností. Fyziologické změny, ke kterým nakonec nádorová buňka dospěje jsou společné všem typům rakoviny a mohou být označeny za charakteristické rysy rakoviny [19].

A	Získaná schopnost	Příklad mechanismu
	Soběstačnost v produkci růstových signálů	Aktivace H-ras
	Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus	Ztráta RB
	Poškození kontrolních mechanismů apoptózy	Produkce IGF
	Neomezený replikační potenciál	Aktivace telomerázy
	Posílení angiogeneze	Produkce VEGF
	Invaze do okolní tkáně a tvorba metastáz	Inaktivace E-Kadherinu



Obrázek 5: Chronologická a mechanická posloupnost získávání šesti charakteristických znaků. Pořadí získávání těchto schopností je velmi variabilní napříč spektrem různých typů rakovin. Zároveň u některých nádorů může určitá genetická změna propůjčovat hned několik "schopností" současně. [19]

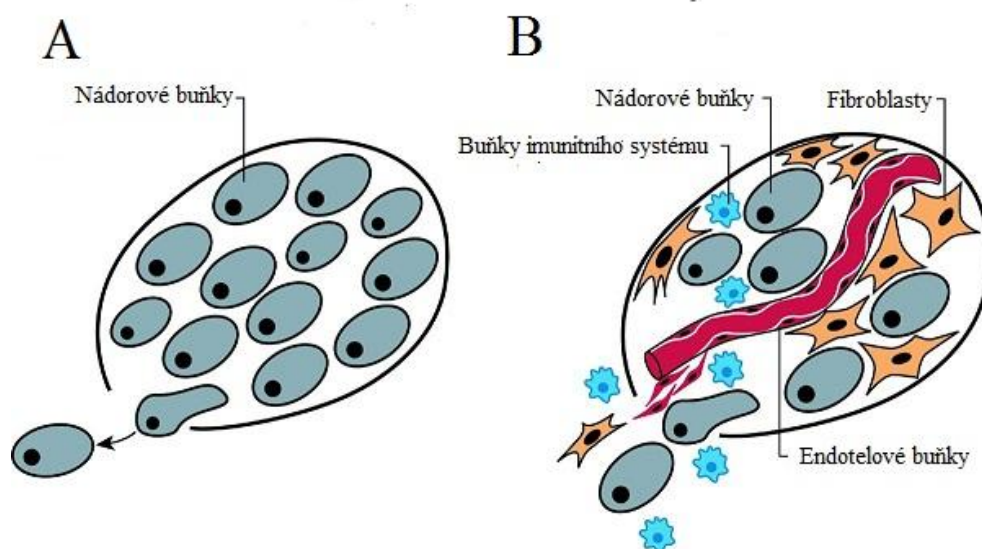
#### 1.4.1 Soběstačnost v produkci růstových signálů

Normální buňky potřebují pro přesun z klidového stavu do aktivního proliferativního stavu mitogení růstové signály, které jsou přenášeny do buňky transmembránovými receptory, které obvykle obsahují intracelulární domény tyrosinkinázy. Žádný typ normální buňky nemůže přejít do proliferativního stavu bez stimulačních signálů. Naproti tomu nádorové buňky vždy vykazují abnormálně nižší závislost na exogenní stimulaci. Tyto buňky generují velké množství svých vlastních růstových signálů (GF), čímž snižují svou závislost na stimulaci z normálního mikroprostředí tkáně. Jedná se o autokrinní stimulaci, kdy rakovinná buňka syntetizuje GF, na které sama reaguje a vytváří tak smyčku

signalizující pozitivní zpětnou vazbu. Díky této výhodě je narušen mechanismus, který normálně zajišťuje správné chování různých typů buněk v tkáni [19].

Současně mohou rakovinné buňky na svém povrchu exprimovat větší množství GF receptorů. Tato skutečnost umožňuje hyperreaktivitu rakovinných buněk na okolní hladinu GF, která by za normální situace proliferaci nespustila. Například HER2/neu receptor je nadměrně exprimován v karcinomech žaludku a mléčné žlázy. Rakovinné buňky mohou také přepínat mezi typy receptorů, které exprimují na svém povrchu [19].

Prakticky všechny typy nádorů jsou složeny z několika odlišných typů buněk (můžeme mluvit o nádorových buňkách a podpůrných buňkách), které mezi sebou komunikují a ovlivňují se prostřednictvím heterotypické signalizace [20]. Následující obrázek ukazuje pohled na nádory jako komplexní tkáně (Obrázek 6).



Obrázek 6: Nádory jako komplexní tkáně – A: pohled zaměřený pouze na rakovinné buňky a geny v nich, B: zaměřený na aktivní spolupráci nádorových buněk a okolních buněk [19]

#### 1.4.2 Necitlivost na proti růstové signály

V normální tkáni najdeme celou řadu signálů, které inhibují proliferaci, udržují klidový stav buněk a homeostázu tkáně. Kromě charakteristického znaku vyvolání a udržování pozitivního působení stimulačních signálů růstu musí tedy nádorové buňky obcházet programy, které negativně regulují buněčnou proliferaci. Buněčná proliferace je blokována dvěma možnými mechanismy. První z těchto mechanismů donutí buňku přejít z aktivního proliferativního stavu do stavu klidového ( $G_0$ ), ze kterého se opět může vrátit k proliferaci.



Druhou alternativou je trvalé zamezení proliferace vstupem do postmitotických stavů (např. neurony), které jsou obvykle spojené se získáním specifických znaků [19].

Rakovinná buňka se musí těmto antiproliferativním signálům vyhnout. Na molekulární úrovni jsou nejdůležitější antiproliferativní signály zajištěny rodinou retinoblastomových proteinů (zejména pRb, p107 a p130). pRb je transkripčním regulátorem celé škály enzymů účastnících se DNA replikace a buněčného cyklu (mimo jiné i další třídu transkripčních regulátorů E2F), a proto na transkripční úrovni inhibuje proliferaci. Narušením inaktivací pRb se aktivují E2F, které umožňují buněčnou proliferaci. Signální obvod pRb, který je řízen transformačním růstovým faktorem (TGFp) a dalšími vnějšími faktory, může být narušen různými způsoby u různých druhů rakoviny. Například dochází k snížení citlivosti na TGF- $\beta$  nebo mutací dochází k nefunkčnosti receptorů. Současně může dojít i k mutaci přímo genu pro funkční pRb [19].

Nádorové buňky musejí unikat i mechanismům kontaktní inhibice, která je in vitro náhradou mechanismu zajišťujícího in vivo normální tkáňovou homeostázu [8].

### **1.4.3 Schopnost vyhnout se buněčné smrti**

Rezistence vůči apoptóze (programovaná buněčná smrt) je charakteristickým znakem všech rakovinných buněk. Apoptóza je zakódovaná prakticky v každé buňce lidského těla. Jakmile dojde ke spuštění apoptózy řadou fyziologických signálů, odehrává se v přesném sledu postupných kroků v širokém časovém rozmezí od minut až po několik dní. Proces končí rozpadem buňky na apoptická tělíška, která jsou pohlcena okolními buňkami či buňkami imunitního systému a zmizí do 24 hodin [19]. Více je přesný průběh apoptózy diskutován v kapitole 1.6.

Rezistenci v oblasti apoptózy mohou rakovinné buňky získat různými strategiemi. Nejčastěji se jedná o mutaci v tumor supresorovém genu p53, kdy inaktivace jeho produktu (proteinu p53) je pozorována u více než 50% lidských rakovin. V podstatné části lidských nádorů hraje významnou roli v zmírňování apoptózy signální dráha PI3 kináza – AKT/PKB, která přenáší anti-apoptické signály. Tento signalizační obvod může být aktivován extracelulárními faktory (např. IGF-1/2 nebo IL-3) nebo intracelulárními signály vycházejícími z Ras signalizace [20].

V stresových případech, konkrétně například při léčbě rakoviny, může nádorová buňka využívat autofagie a přejít do stavu reverzibilního klidu. Tato odpověď nádorové buňky na stres jí umožňuje přežití a případný opětovný růst v pozdním stádiu po léčbě jinými protinádorovými látkami [8].

V některých případech, jako je začátek nádorového bujení nebo metastazování, tolerují nádorové buňky určitý stupeň nekrotické buněčné smrti. Tento druh buněčné smrti uvolňuje do okolního mikroprostředí prozánětlivé signály, které způsobují migraci imunitních buněk do místa poškození. Tyto buňky mohou aktivně podporovat nádor (podpora angiogeneze, proliferace a invazivita). Nekrotické buňky také produkují IL-1 $\alpha$ , který přímo stimuluje sousední životaschopné buňky k proliferaci [20].

#### **1.4.4 Neomezený replikační potenciál**

Všechny tři dosavadní diskutované „výhody“ vedou nádorové buňky směrem k jejímu vymanění z růstového programu a signálů prostředí. Výzkumy však dokazují, že narušení buněčné signalizace nezaručuje expanzivní buněčný růst nádoru. Prakticky všechny buňky v sobě mají zakódovaný vlastní autonomní program, který omezuje jejich množení a funguje nezávisle na výše zmíněných signálních mezibuněčných drahách [20].

První kritický bod v buněčném stárnutí obejdou nádorové buňky mutací v tumor supresorových genech pro p53 a pRb. Díky těmto mutacím pokračují buňky v množení až do stavu označovaného jako druhá krize, která se vyznačuje masivní buněčnou smrtí a karyotypickou heterogenitou související se zkracováním telomer. Buňky, které následně překonají tuto druhou krizi se stanou prakticky nesmrtelnými [20].

Oprava telomer je patrná prakticky u všech typů maligních buněk. U 85-90% buněk je patrná zvýšená exprese enzymu telomerázy [15]. Tento princip je podrobněji popsán v kapitole 1.3.3. Zbýlých 15-10% buněk využívá mechanismus označovaný jako ALT, kdy buňky udržují telomery prostřednictvím interchromozomální výměny sekvenčních informací na základě rekombinace. Každý z těchto mechanismů udržuje buněčné telomery nad kritickým prahem a buňky získávají schopnost neomezeného dělení [19].

#### **1.4.5 Trvalá angiogeneze**

Každá buňka potřebuje přijímat dostatečné množství živin a kyslíku a současně zbavovat se metabolického odpadu a oxidu uhličitého. Tato skutečnost je zjištěna během organogeneze koordinovaným růstem cévních kapilár tak, aby všechny buňky ve tkáni byly vzdálenostně do 100  $\mu$ m od těchto kapilár. Při tvorbě nové tkáně je proces angiogeneze (růst nových cév) vždy pečlivě regulován. U dospělých jedinců je angiogeneze fyziologicky aktivní kupříkladu v procesu hojení ran nebo v rámci ženského reprodukčního cyklu, ale pouze přechodně [19].

Proliferující nádorové buňky mají vlastní schopnost podporovat růst krevních kapilár, a to již ve stádiu středních lézí před plným rozvinutím nádoru. Nádorové buňky mohou s

využitím pozitivních (aktivátory) a negativních (inhibitory) signálů podporovat nebo naopak blokovat angiogenezi. Příkladem signálů vyvolávajících angiogenezi jsou vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a kyselé a bazické fibroblastové růstové faktory (FGF1/2). Naopak inhibítor angiogeneze je trombospondin-1 nebo p-interferon. Za zvýšenou expresi aktivátorů a sníženou produkci inhibitorů je odpovědná změna v transkripci genů [19].

Krevní cévy produkované v nádorech chronicky aktivovanou angiogenezí jsou obvykle aberantní, jsou poznamenané předčasným kapilárním pučením, spletítem a nadměrným větvením, zkreslením a zvětšením, nepravidelným průtokem krve, mikrohemoragií a netěsností [20].

#### **1.4.6 Invaze tkáně a metastázy**

Dříve či později se během vývoje většiny typů rakovin objeví nádorové buňky, které se oddělí od primárního nádoru a napadají sousední tkáně, odkud putují do vzdálenějších míst a zakládají nové kolonie. V těchto místech zpočátku nejsou omezovány množstvím dostupných živin a prostorem. Nové kolonie vznikají jako směs rakovinných buněk a normálních podpůrných buněk z hostitelské tkáně. Tyto nové kolonie se označují jako metastázy a jsou příčinou úmrtí u 90% pacientů s nádorovým onemocněním. Různé formy invaze mohou být základem různých typů rakovin [19].

Buněčné metastazování se dá rozdělit do dvou hlavních fází, kdy první z nich je fyzické šíření nádorových buněk z primárního nádoru do vzdálených tkání. Dalším krokem je následná adaptace těchto buněk na mikroprostředí tkáně cizí. Úspěšná invaze nádorových buněk z primárního nádoru závisí na již dříve zmíněných "výhodách" rakovinných buněk. Invaze a tvorba metastáz jsou z genetické a biochemické stránky velmi složité procesy, které do dnešního dne nebyly plně pochopeny [21].

Buňky, které mají invazivní schopnosti a tvoří metastázy, se vyznačují změnou funkce několika tříd proteinů podílejících se na vazbě buněk s jejich okolní tkání. Ke změně funkce dochází ve spojení s mutační inaktivací genů, represí transkripce nebo proteolýzou extracelulární domény. Mezi ovlivněné molekuly patří zejména členové rodiny imunoglobulinů (N-CAM) a kadherinů (E-kadherin), které zprostředkovávají interakce mezi buňkami. Dále pak integriny, které spojují buňky s extracelulární matrix (ECM). Nádorové buňky exprimují integriny, které neupřednostňují ECM přítomnou v normálním epitelu, prostřednictvím posunů ve spektru podjednotek  $\alpha$  nebo  $\beta$  [19], [21].

Druhé kritérium invazivních metastatických buněk je přítomnost extracelulárních proteáz na jejich povrchu, které jsou schopné za fyziologických podmínek trávit extracelulární matrix a komponenty bazální membrány. Zakotvení těchto aktivních proteáz na buněčný povrch usnadňuje invazi nádorových buněk do blízkého stroma, přes stěny krevních cév a přes normální vrstvy epiteliálních buněk. Podle „preferencí“ substrátu existují tři hlavní podskupiny: kolagenázy degradující fibrilární kolagen, stromelysiny preferující proteoglykany a glykoproteiny [22].

#### **1.4.7 Inaktivace reparačních mechanismů**

Všechny doposud vyjmenované vlastnosti, které nádorová buňka získává a jimiž se odlišuje od buněk normální lidské tkáně, jsou podle dostupných údajů získávány přímo nebo nepřímo prostřednictvím změn v genomu. V buňce však existuje velké množství opravných enzymů, které zajišťují nedotčenost sekvence DNA [20][19].

Nestabilita genomu nádorové buňky a její náchylnost k mutacím je spojena s mutací v těchto opravných či hlídacích systémech. Jedná se o geny, jejichž produkty se podílejí na detekci poškození DNA a aktivaci opravného aparátu, přímé opravě poškozené DNA a inaktivaci nebo zachycení mutagenních molekul před poškozením DNA. Nejvýznamnějším členem těchto systémů je tumor supresorový protein p53, který jako reakci na poškození DNA vyvolá zastavení buněčného cyklu nebo apoptózu v závislosti na míře poškození. Poškození genu pro protein p53 je dnes nalézáno skoro ve všech lidských nádorech [19].

#### **1.4.8 Podpora zánětu**

Zánět, který v normální tkáni pomáhá bojovat proti infekcím a přispívá k hojení ran, může neúmyslně nádorové bujení podporovat. Některé nádory jsou hustě infiltrovány buňkami imunitního systému [20].

Zánětlivá reakce na počátku nádorového bujení pomáhá nádorovým buňkám v získání jejich charakteristických rysů tím, že dodá bioaktivní molekuly do mikroprostředí nádoru. Mezi tyto bioaktivní molekuly patří růstové faktory (udržení proliferativní signalizace), faktory přežití (omezení buněčné smrti), proangiogenních faktory, enzymy modifikujících extracelulární matrix a další. Zánět může podpořit počínající nádorové bujení až do stavu plnohodnotné malignity [20].

Současně mohou zánětlivé buňky produkovat reaktivní formy kyslíku, které jsou aktivně mutagenní pro blízké rakovinné buňky. Tato skutečnost potom urychluje genetický vývoj směrem k zvýšené malignitě [20].

### 1.4.9 Přeprogramování buněčného metabolismu

Chronická nekontrolovaná buněčná proliferace nutí nádorovou buňku upravit svůj metabolismus, aby pokryla vzniklé energetické nároky. Za aerobních podmínek normální buňky zpracovávají glukózu nejprve v cytosolu glykolýzou na pyruvát a následně v mitochondriích oxidační fosforylací až na oxid uhličitý. Za nepřítomnosti kyslíku dochází ke konverzi pyruvátu na laktát za nižšího energetického zisku. Nádorové buňky dokáží přeprogramovat svůj metabolismus glukózy a využívat anaerobní glykolýzu i za přítomnosti kyslíku [20]. Více je tato problematika diskutována v kapitole 1.5.

Zajímavostí je, že u některých nádorů byly objeveny dvě subpopulace buněk fungující symbioticky. Hypoxická subpopulace využívá pro energetický zisk anaerobní glykolýzu a jako odpad produkuje laktát. Lépe okysličená subpopulace přednostně využívá jako hlavní zdroj energie laktát produkovaný sousedními buňkami. Tento stav není fyziologicky neobvyklý a můžeme ho nalézt například v pracujícím svalu [20].

### 1.4.10 Nádorové bujení a imunitní systém

Imunitní systém je schopný rozeznat neoplastické buňky a zničit je dříve, než se klinicky projeví jako závažné onemocnění. Nádorové buňky na svém povrchu exprimují některé antigeny, které nejsou normálním typům buněk vlastní. Nádorově specifické antigeny nemohou být prezentovány, protože sama rakovinná buňka nemůže fungovat jako antigen prezentující buňka (neexprimují kostimulační molekuly). Pro navození imunitní odpovědi musí být nádorová buňka pohlcena buňkou dendritickou, která na své povrchu vystaví fragmenty nádorově specifických antigenů [23].

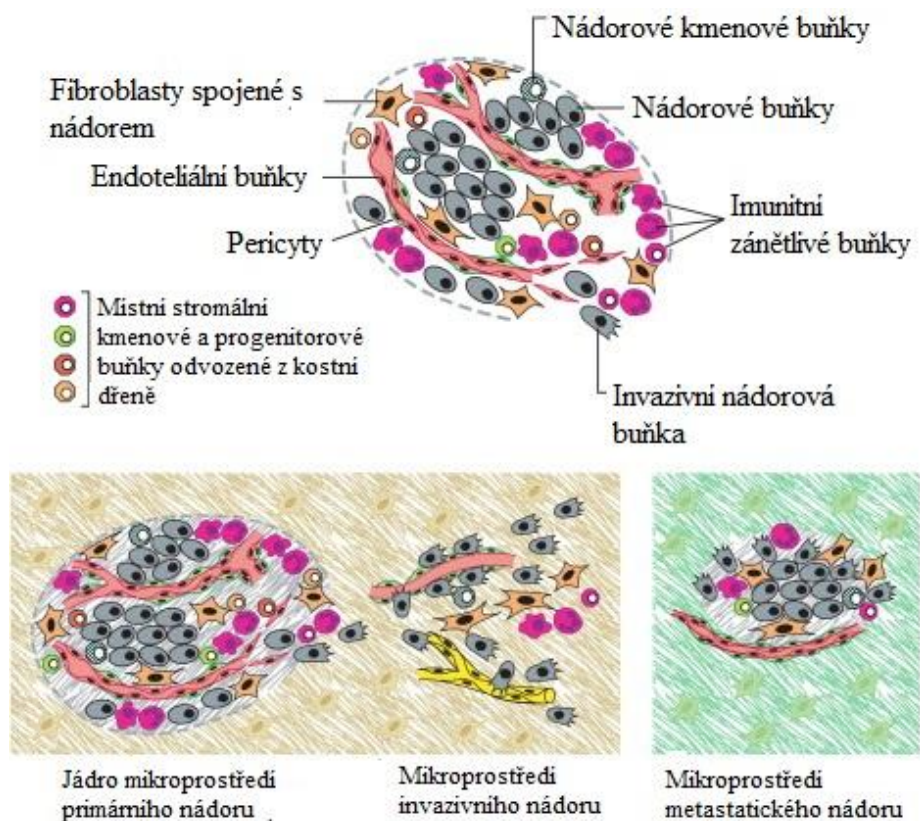
Imunitní systém vyvíjí na nádorové buňky neustálý selekční tlak, a to vede ke vzniku takových transformovaných buněk, které unikají efektorovým mechanismům imunitního systému. Ve většině případů imunitní systém nádorovou buňku rozpozná v časném stádiu a zničí ji. V některých případech je aktivní imunitní systém a vymezená populace nádorových buněk ve stavu dynamické rovnováhy, ale genetická nestabilita nádorových buněk dá nakonec vzniknout novým genotypům, které imunitnímu systému uniknou [23].

U nádorových buněk se uplatňuje několik strategií úniku před imunitním systémem. Nádorové buňky často produkují růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) a interleukin 10, což jsou cytokiny inhibující protinádorovou imunitní reakci. Dále se uplatňují časté mutace v genech kódující bílkoviny důležité pro prezentaci antigenů v antigen prezentujících buňkách (mutace v genech kódujících podjednotky proteazomu) [23].

### 1.4.11 Mikroprostředí nádoru

Dříve byly nádory chápány jako na soubor relativně homogenních nádorových buněk. V dnešní době se na nádory nahlíží z hlediska složitosti jako na orgány (Obrázek 7). Celkovou biologii nádoru lze pochopit pouze studiem jednotlivých specializovaných typů buněk v něm a také jeho mikroprostředím [19].

Normální buňky nacházející se kolem buněk rakovinných (fibroblasty a endotelové buňky) hrají také určitou roli v proliferaci rakovinných buněk, protože zde stále dochází k signalizaci růstu mezi buňkami (parakrinní a endokrinní signalizace). Nádorové buňky jsou schopny stimulovat sousední buňky uvolňovat velké množství signálů stimulujících růst. Například zánětlivé buňky migrující do místa nádorového bujení zvyšují potenciál nádorového růstu [20].

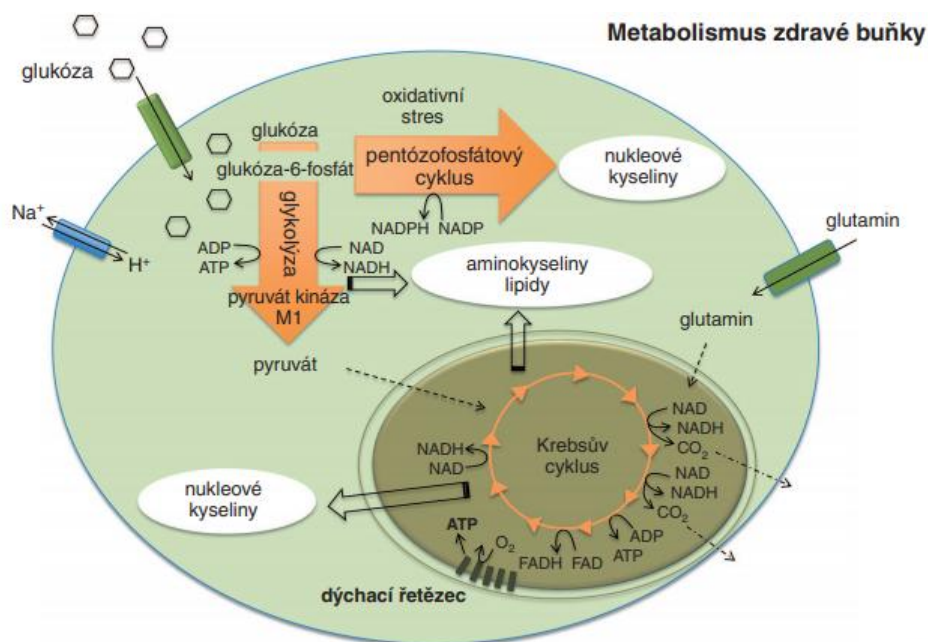


Obrázek 7: Mikroprostředí nádoru; Horní část zobrazuje souhrn odlišných typů buněk většiny nádorů. Nádor obsahuje odlišné buněčné typy, které společně umožňují růst a progresi nádoru. Dolní část ukazuje změny mikroprostředí od primárního nádoru až po metastázy. [19]

## 1.5 Metabolismus rakovinné buňky

Rakovinné buňky se nechovají a nevypadají jako buňky, ze kterých pocházejí. Tyto buňky naprosto změni úroveň svého metabolismu, aby uspokojily nároky na svůj rychlý buněčný růst a proliferaci [20].

Metabolismus zdravých buněk je neuvěřitelně komplexní a provázaný systém drah, které zajišťují dostatek energie a stavebního materiálu pro správnou funkci v organismu. Hlavním zdrojem buněčné energie jsou glukóza a glutamin. Glukóza je zdrojem uhlíku, kyslíku a vodíku, které jsou využity pro získání energie (ATP) a nových strukturních jednotek – zejména aminokyselin (AMK), mastných kyselin (MK) a nukleotidů (NK). Glutamin poskytuje hlavně dusík pro syntézu NK, AMK a také NADH a FADH<sub>2</sub>. Odbouráním glukózy přes glykolýzu, Krebsův cyklus a dýchací řetězec vznikne celkem 34 molekul ATP. Tento proces zpracování glukózy se označuje jako aerobní glykolýza a je podmíněn přítomností kyslíku v buňce jakožto konečného akceptoru elektronů [24]. Metabolismus zdravé buňky je zobrazen na následujícím obrázku (Obrázek 8).



Obrázek 8: Jednoduché schematické zobrazení metabolismu zdravé buňky [24]

Rakovinné buňky oproti normálním přijímají několikanásobně více glukózy a glutaminu. Glykolýza je zde využívána pro získání až 60% ATP, naproti tomu tvorba ATP v mitochondrii (Krebsův cyklus a dýchací řetězec) je potlačena. Rakovinné buňky využívají tzv. Warburgova efektu (Warburg provedl průkopnické práce na metabolismu rakoviny v roce 1929), kdy je zapnut mechanismus anaerobní glykolýzy, a to i v přítomnosti kyslíku. Tento

fakt je zobrazen v příložené tabulce (Tabulka 3). Toto uspořádání daleko lépe a efektivněji plní požadavky rakovinné buňky než klasický aerobní metabolismus, protože glykolýza je až 100krát rychlejší, pokud se oddělí od mitochondriálního metabolismu (nedochází k oxidační fosforylaci). Potlačení funkce mitochondrie není ve většině nádorů způsobeno jejím poškozením, ale regulací aktivity na úrovni exprese, nebo aktivity proteinů zapojených do Krebsova cyklu či dýchacího řetězce [25], [26].

*Tabulka 3: Energetický rozpočet pro normální a ascitické rakovinné buňky (myši), spotřeba kyslíku a produkce laktátu byly měřeny v manometrických nádobách za fyziologických podmínek pH a teploty [27]*

Buňky	Oxidační ATP ( $\mu\text{mol/h/mg/tkáň}$ )	Glykolytické ATP ( $\mu\text{mol/h/mg/tkáň}$ )	Celkové ATP	Příspěvek glykolytického ATP (%)
Játra	4,69	0,045	4,73	0,94
Ledviny	4,69	0,0452	4,73	0,94
Maligní ascites	2,19	2,68	4,87	55

Proliferující buňky mají vysoké nároky na energii i z toho důvodu, že potřebují zdvojnásobit svou biomasu. Rakovinná buňka využívá pentózofosfátový cyklus, který je přímo napojen na glykolýzu a produkuje NADPH pro syntézu MK a lipidů. Díky tomu jsou pokryty vysoké energetické nároky a potřeba stavebního materiálu pro proliferaci. Efektivní pentózofosfátový cyklus současně zajišťuje ochranu před oxidativním stresem, a to díky NADPH, který je důležitý pro funkci glutathionu [25], [26].

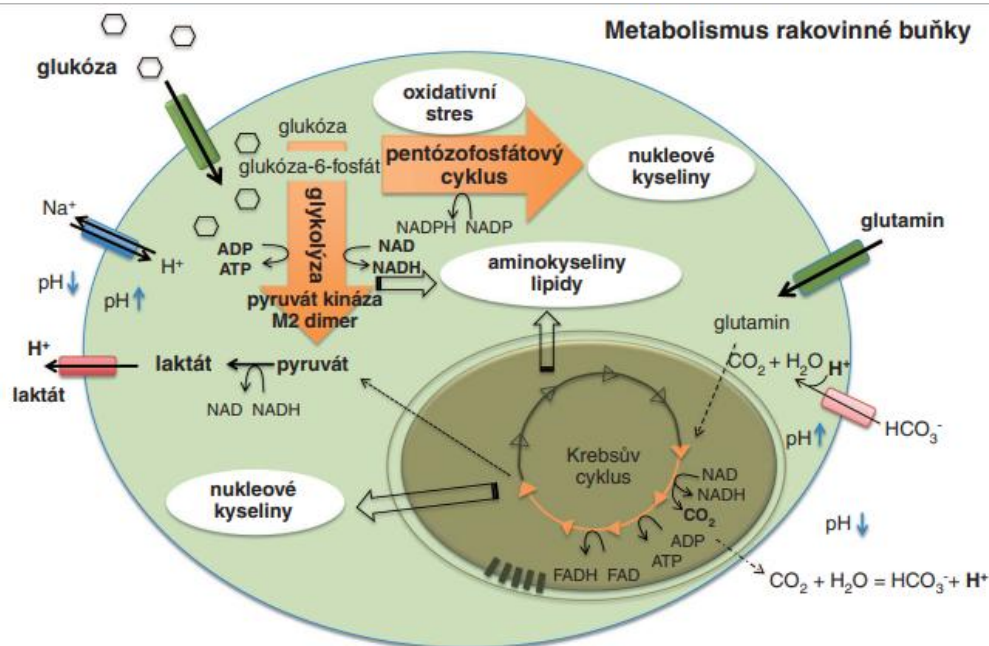
Rakovinné buňky produkují dimer izoformy pyruvátkinázy M2, který vykazuje nižší rychlost a zpomalý poslední krok glykolýzy. Změnou pyruvátkinázy, konvertující fosfoenolpyruvát na pyruvát, dosáhne buňka přesměrování části glykolytické dráhy do pentózofosfátového cyklu. Díky tomu je tvořena jakási regulační smyčka [25], [26].

Množství NAD<sup>+</sup> je zvyšováno díky nadměrné produkci laktátdehydrogenázy, která přeměňuje pyruvát na laktát a regeneruje NADH na NAD<sup>+</sup>. Laktát je posléze uvolňován do vnějšího prostředí, čímž rakovinná buňka získává další selekční výhody. Ve vnějším prostředí dochází ke snižování pH (okyseluje se). Toto je jeden ze způsobů jak může být rakovinná buňka chráněna před imunitním systémem (inhibice T lymfocytů). Také dochází k oslabení buněčné adheze, což přispívá k rozvoji metastáz [25], [26].

Glutamin rakovinná buňka využívá k alespoň částečné funkci Krebsova cyklu a s ním souvisejícího dýchacího řetězce, kvůli udržení membránového potenciálu a z důvodu zajištění dělení mitochondrií. Glutaminolýzou buňka velmi dobře vyřeší syntézu AMK,



lipidů a nedostatek meziproductů Krebsova cyklu, který je spjatý s Warburgovým efektem [28]. Zjednodušený metabolismus nádorové buňky je zobrazen na následujícím obrázku (Obrázek 9).



Obrázek 9: Jednoduché schematické zobrazení metabolismu rakovinné buňky [24]

## 1.6 Apoptóza

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, je pečlivě regulovaný buněčný proces odpovědný za celou řadu biologických procesů. Jedná se o hlavní metodu selektivního odstraňování buněk v organismu. K apoptóze dochází přirozeně během vývoje a stárnutí [29]. Charakterizují ji specifické morfologické rysy a biochemické kaskády [30].

Změny v regulačních drahách apoptotického procesu vedou k různým formám onemocnění. Pokud rovnováha mezi buněčnou smrtí a růstem není regulována, dochází k dysfunkci tkáně, která může vygradovat až v poruchu funkce celého orgánu. Mechanismy apoptózy nezajišťují pouze zachování správného počtu buněk a velikosti tkáně, ale i odstranění infikovaných, poškozených nebo stresovaných buněk z organismu [30].

Velká většina rakovinného bujení je spojena s rezistencí na iniciaci apoptózy. Díky tomu je apoptotická dráha cílem řady protinádorových léčiv [31]. Některé onkogenní mutace narušují apoptózu, což vede k iniciaci, progresi nebo metastázování nádoru [32].

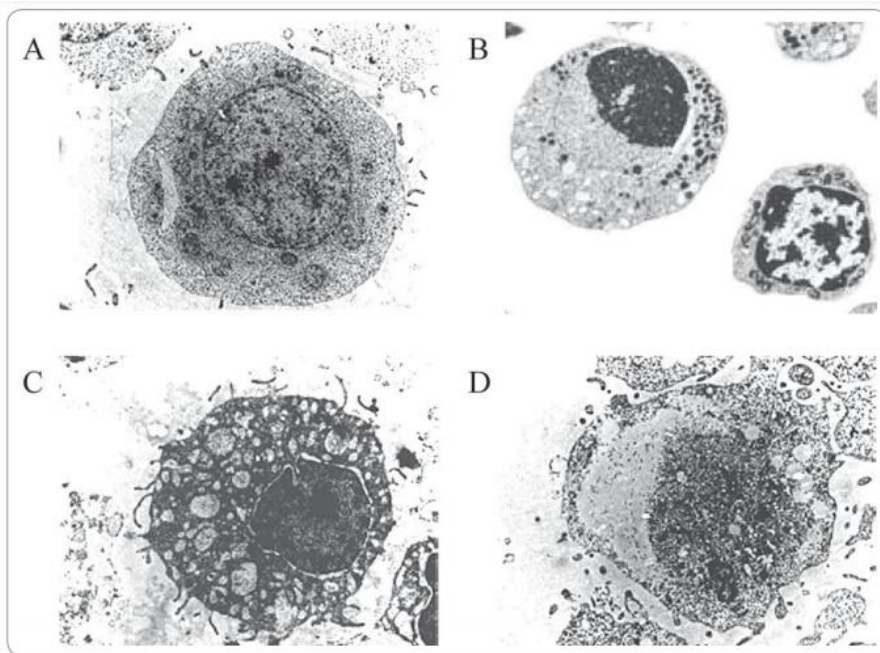
### 1.6.1 Molekulární mechanismy apoptózy

Apoptóza je koordinovaný a často energeticky závislý proces, který zahrnuje aktivaci skupiny cysteinových proteáz označovaných „kaspázy“ a následnou kaskádu událostí spojující iniciační podmínky s konečným zánikem buňky [30].

Během rané apoptózy dochází k smršťování buněk a kondenzaci cytoplazmy a chromatinu. Apoptická buňka je typicky kulatá nebo oválná. Dochází k odbourávání cytoskeletu, jaderného obalu a zesíťování proteinů. Dalším velmi typickým znakem pro apoptózu je fragmentace DNA na malé úseky. V konečné fázi apoptózy vznikají tzv. apoptická tělíška, která na svém povrchu exprimují znaky pro receptory fagocytujících buněk (zejména fosfatidylserin). Tato tělíška jsou následně fagocytována makrofágy nebo jinými buňkami a degradovány uvnitř fagolyzozomů [33]. Morfologické rozdíly mezi různými formami buněčné smrti ukazuje obrázek na konci kapitoly (Obrázek 10).

Díky takto nastavenému procesu apoptózy nedochází k žádné zánětlivé odpovědi, protože apoptické buňky nevolňují do okolí protizánětlivé stimuly, jako je tomu v případě nekrotické smrti. Následné sekundární nekróze předchází i rychlé pohlcení okolními buňkami. I toto je důvod proč se cílená léčba snaží navodit v rakovinných buňkách apoptózu jako proces odstranění buněk [33], [34].

Proces apoptózy zahrnuje působení dvou hlavních proteinových rodin, a to kaspáz a Bcl-2. Proteiny rodiny Bcl-2 řídí apoptotickou dráhu závislou na mitochondriích. Kaspázy jsou exprimovány v neaktivní formě jako tzv. prokaspázy. Jejich aktivní formy mají proteolytickou aktivitu a jsou schopné štěpit proteiny na zbytcích kyseliny asparagové. Základní dělení rozlišuje iniciační (kaspáza-2,-8,-9,-10), efektorové (kaspáza-3, -6, -7) a zánětlivé kaspázy (kaspáza-1, -4, -5) [33].



Obrázek 10: Nasnímáno elektronovým mikroskopem, zvětšení 4 400x, (A) zdravá buňka s obvyklým tvarem jádra, (B) apoptotická buňka s kondenzovaným chromatinem a zmenšeným objemem, (C) autofagie výrazně vakuolizovaná cytoplazma, (D) nekróza a ztráta integrity membrány [36]

#### 1.6.1.1 Vnitřní dráha aktivace apoptózy

Vnitřní aktivace apoptózy je zprostředkována rozmanitým spektrem nereceptorových stimulů, které se označují jako pozitivní a negativní aktivační stimuly. Negativní signály spočívají v nepřítomnosti určitých růstových faktorů, hormonů nebo cytokinů. Pozitivní signály jsou zánět, toxiny, hypoxie, hypertemie, virové infekce volné radikály nebo UV záření [34].

Všechny zmíněné podněty vedou ke změnám na mitochondriální membráně. Dochází k porušení mitochondriální permeability (díky tvorbě specifických pórů), ztrátě transmembránového potenciálu a v konečném důsledku uvolnění sekvestrovaných proapoptotických proteinů z intermembránového prostoru mitochondrie do mezibuněčného prostoru cytosolu [33].

Strukturní změny mitochondrie regulují členové proteinové rodiny Bcl-2. Řídí permeabilitu mitochondriální membrány a mohou být pro-apoptotické (Bcl-10, Bax, Bak, atd.) nebo anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, atd.). Klíčovou roli v indukci apoptózy hraje poměr pro- a anti-apoptotických proteinů. V případě, že je tato rovnováha nakloněna ve prospěch pro-apoptotických proteinů dojde k zamezení inhibice Bax a Bak proteinů, které vytvoří na mitochondriální membráně pór. Pokud proces dojde do tohoto stádia, stává se

apoptotický děj nevratným, jelikož následkem tvorby póru je řízené uvolňování dalších proapoptotických molekul [33].

První skupinu uvolněných proteinů tvoří cytochrom *c*, Smac/DIABLO a serinová proteáza HtrA2/Omi. Tyto proteiny aktivují mitochondriální dráhu závislou na kaspázách. Cytochrom *c* váže a aktivuje Apaf1 a společně vytváří apoptosom. Ten je schopný vázat prokaspázu-9 a aktivovat ji, což finálně vede k aktivaci efektorových kaspáz 3 a 7. Druhou skupinu tvoří AIF, endonukleáza C a CAD, uvolňují se až v pozdější fázi apoptózy a podporují apoptotické mechanismy [33].

#### 1.6.1.2 Vnější dráha aktivace apoptózy - „death receptors“

Vnější dráhy, které aktivují apoptózu, zahrnují interakce zprostředkované intermembránovými proteiny geneticky patřícími do rodiny TNF (tumor necrosis faktor) a signálními molekulami. Receptory se obecně označují jako tzv. „receptory smrti“. Sdílejí podobné extracelulární domény bohaté na cystein a cytoplazmatickou doménu o asi 80 AMK označovanou „doména smrti“. Doména hraje rozhodující roli v přenosu „signálu smrti“ z povrchu buňky do intracelulárních signálních drah. Mezi možné dvojice ligand/receptor, které mohou spouštět apoptózu patří: FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo2L/DR4 [33], [34].

Po navázání ligandu na extracelulární část receptoru dojde k vazbě proteinů na intracelulární doménu receptoru, která je umístěna v cytoplazmě. Zde se vážou proteiny jako TNF receptor-associated death domain (TRADD) a Fas-associated death domain (FADD), které se spojují s prokaspázou-8 (nebo -10). V tomto okamžiku vzniká signalizační komplex a dochází k autokatalytické aktivaci prokaspázy-8. Následné děje vedou k přenosu signálu na efektorové kaspázy 3/7, které provedou vlastní destrukci buňky [33].

Apoptóza vyvolaná „receptorem smrti“ může být inhibovaná proteinem c-FLIP, který se váže na protein FADD a kaspázu-8, což vede k jejich inaktivaci [33].

Dalším receptorem pro možnou aktivaci vnější dráhy apoptózy je tzv. „dependence receptors“. Tento způsob aktivace apoptózy byl popsán relativně nedávno. Je spojen s rychlou aktivací efektorových kaspáz, hlavně kaspázou-3. Signálem pro apoptózu je nepřítomnost ligandu vázajícího se na receptor. Některé „dependence receptors“, jako Patched nebo DCC při absenci ligandů interagují s cytoplazmatickým proteinem DRAL a aktivují kaspázu-9 [35].

#### 1.6.1.3 Aktivace apoptózy pomocí perforinu/granzymu

Cytotoxické T lymfocyty jsou schopné své cytotoxické účinky na infikované nebo nádorové buňky uplatnit i jinou cestou než vnější dráhou aktivace přes FasL/FasR. Tato jiná

cesta zahrnuje sekreci transmembránového proteinu tvořícího póry (perforinu) a následné uvolňování cytoplazmatických granulí do cílové buňky. Důležitou složkou těchto granulí jsou granzym A a granzym B [33].

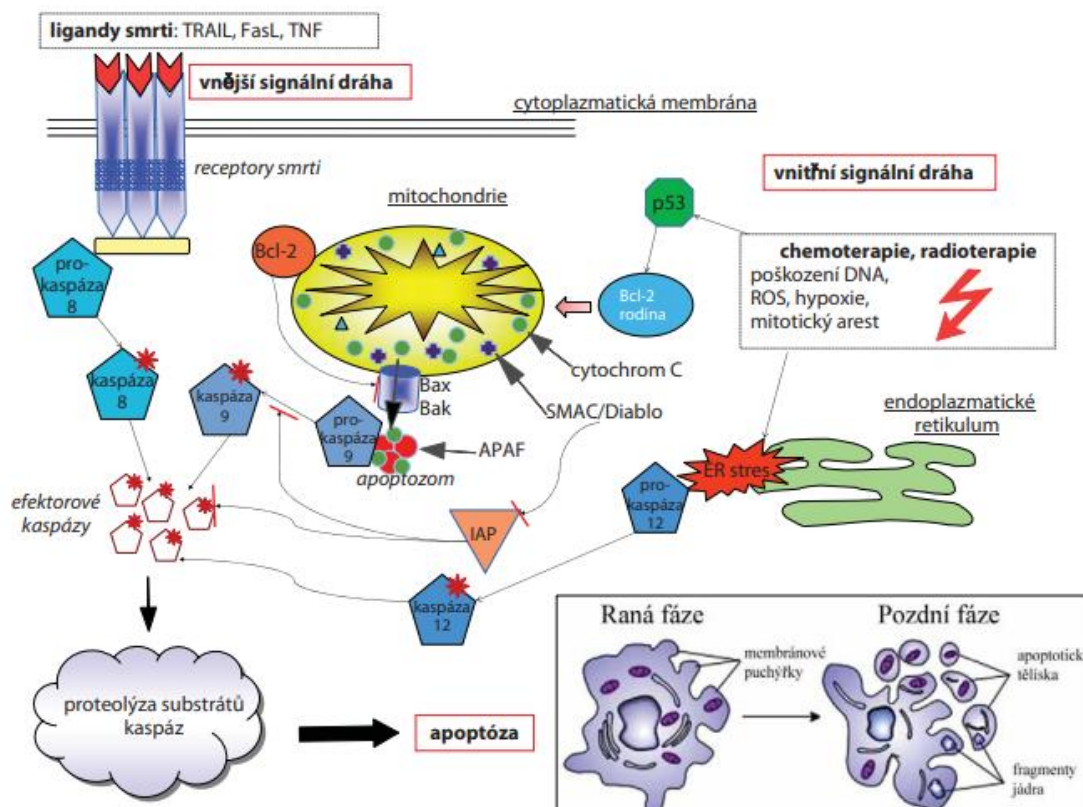
Granzym A v buňce aktivuje apoptotické dráhy nezávislé na kaspázách. Proteáza granzym A štěpí komplex SET, čímž uvolňuje inhibici NM23-H1 (DNAsa štěpící DNA).

Granzym B štěpí proteiny na aspartátových zbytcích, a díky tomu aktivuje kaspázu-10. Stejně tak může aktivovat mitochondriální cestu apoptózy. Nejzajímavější je však jeho schopnost přímo aktivovat kaspázu-3, což znamená přímou indukci apoptózy [33].

#### *1.6.1.4 Realizační cesta apoptózy*

Vnější a vnitřní cesty končí v okamžiku aktivace efektorových kaspáz. V tomto okamžiku je buněčná smrt již nevyhnutelná. Nejčastěji dochází k aktivaci efektorové kaspázy-3, a to kteroukoliv z iniciačních kaspáz. Efektorová kaspáza-3 aktivuje cytoplazmatickou endonukleázu CAD, která degraduje chromozomální DNA v jádrech způsobuje kondenzaci chromatinu. Dále indukuje cytoskeletální reorganizaci a dezintegraci buňky do apoptotických těl [33].

Fagocytóza vzniklých apoptotických tělísek je poslední fází apoptózy. Externalizace fosfatidylserinu na povrch usnadňuje nezánnětlivé fagocytární rozpoznání a likvidaci [33]. Následující obrázek schematicky ukazuje spojení vnitřní a vnější dráhy aktivace apoptózy (Obrázek 11).

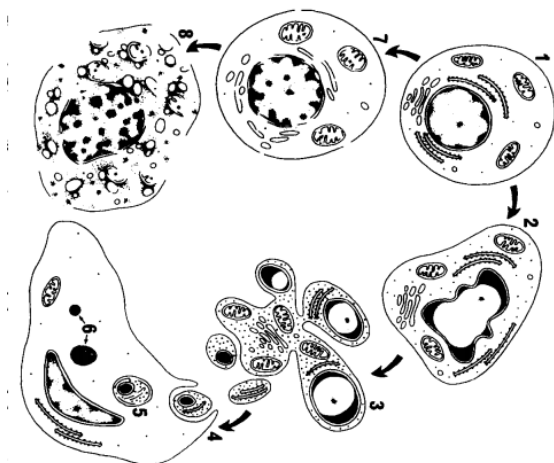


Obrázek 11: Schematické spojení vnější a vnitřní dráhy apoptózy [36]

### 1.6.2 Rozdíly mezi apoptózou a nekrózou

Jednou z možných alternativ buněčné smrti je nekróza, která je považována za toxický proces, který ovšem není energeticky závislý. Probíhá nekontrolovaně a pasivně. Obvykle se nekróza týká většího množství buněk. Zprostředkovávají ji dva hlavní mechanismy, a to přerušení dodávky energie a přímé poškození buněčné membrány [33].

Mezi hlavní morfologické změny nekrotických buněk patří zvětšení jejich objemu, tvorba cytoplazmatických vakuol a kondenzace, prasknutí nebo zvětšení objemu mitochondrie. V poslední fázi nekrózy dochází k narušení buněčné membrány a vylití cytoplazmatického obsahu do okolí, což způsobí lokální zánětlivou odpověď [33], [37]. Obrázek ukazuje rozdíly schematicky (Obrázek 12).



Obrázek 12: Schematicky znázorněná cesta apoptózy (2-6) a nekrózy (7 a 8)

„Volba“ buněčné smrti závisí částečně na povaze signálu buněčné smrti, typu tkáně, vývojovém stádiu tkáně a fyziologickém prostředí. Mechanismy apoptózy a nekrózy mohou v některých případech probíhat současně [33]. Tabulka pro větší přehlednost shrnuje hlavní morfologické rozdíly mezi apoptózou a nekrózou (Tabulka 4).

Tabulka 4: Porovnání morfologických znaků apoptózy a nekrózy [33]

Apoptóza	Nekróza
jednotlivé buňky nebo malé shluky buněk	často sousedící buňky
smršťování buněk	otok buněk
neporušená buněčná membrána	porušená buněčná membrána
cytoplazma zadržena v apoptických těleších	uvolnění cytoplazmy
bez zánětu	obvykle výskyt zánětu

## 1.7 Rizikové faktory vzniku rakoviny

Obecně nejde přesně říci, kdo rakovinou onemocní a komu se nemoc vyhne. Vzhledem k faktu, že jednotlivé typy rakoviny se od sebe liší na molekulární úrovni a následně i svým chováním, nelze mluvit o jednotné příčině vzniku rakoviny. Známé jsou však rizikové faktory, které zvyšují pravděpodobnost vzniku rakovinného onemocnění. Mezi důležité rizikové faktory patří [7]:

- Věk zvyšuje pravděpodobnost výskytu většiny nádorových chorob. Se zvyšujícím se věkem, zejména osoby starší 50 let, dochází k častějšímu výskytu rakoviny než u mladších jedinců.
- Genetické vlivy lze očekávat zejména v rodinách se zvýšeným výskytem rakovinného onemocnění nebo u osob, kterým bylo onemocnění diagnostikováno

již v dětském věku. U některých hereditárních malignit se vysoké riziko jejich vzniku dědí z generace na generaci. Předpokládaná "genetická dědičnost" v rámci rodiny však může být způsobena špatným životním stylem, který je typický pro celou rodinu.

- Vliv prostředí je v dnešní době jeden z nepopiratelných faktorů pro vznik rakovinného bujení. Jedná se o celkový způsob života, stravování a kontakt s potencionálně škodlivými látkami. Člověk se dnes během svého života setkává s poměrně velkým množstvím karcinogenních látek jako například: aromatické uhlovodíky (cigarety), aflatoxiny (potraviny napadené plísněmi), sloučeniny určitých kovů nebo určité fyzikální faktory (UV záření).

Věk ani genetické dispozice není člověk schopen ovlivnit. Rizika vyplývající z vlivů prostředí se dají v rámci prevence omezit, a tak výrazně snížit riziko vzniku rakoviny. Lékaři obecně doporučují například: nekouřit a výrazně omezit alkohol. Zvýšit množství vlákniny a naopak omezit hovězí, vepřové maso, smažená, pečená a grilovaná jídla. V žádném případě nejíst zkažené potraviny, které byly napadené plísněmi. Vyhnout se stresu. Dodržováním správné životosprávy lze předejít i mnoha dalším civilizačním nemocem [7].

## **1.8 Diagnostika nádorového onemocnění**

Pro nádorové onemocnění neexistují žádné specifické obtíže, které by jí plně charakterizovaly. Tento fakt podporuje i skutečnost, že malignity mohou postihnout téměř jakoukoliv tkáň a současně nádorová onemocnění jsou značně různorodá. Mezi příznaky evokující toto onemocnění mohou být počítány: únava, malátnost, nechutenství a s ním spojené hubnutí, dušnost, kašel, poruchy močení, průjemy, trvale zvýšené teploty nad 37 °C, horečka opakující se ve vlnách nebo krvácení za stolice. Všechny tyto problémy ať už jednotlivě nebo kombinovaně, dlouhodobě přetrvávající, a to hlavně v období mimo probíhající infekci nebo po její léčbě, by měly člověka přivést k lékaři [4].

Neexistuje žádná univerzální metoda, která by odhalila všechny typy nádorů. Diagnostika musí být vždy směřována na konkrétní typ onemocnění a pro jeho potvrzení nebo vyloučení je třeba vždy využít kombinaci metod. Důležitá je hlavně důkladné prohlídka (některé nádory lze objevit právě při vnější prohlídce) a záznam obtíží pacienta. Současně u různých nádorů existují metody samovyšetření, které může pacient provádět sám doma [4].

Nejběžnějším a nejvýznamnějším laboratorním vyšetřením je analýza krve, která je zaměřená na přítomnost nádorových buněk (hlavně u leukémií) nebo specifických proteinů, které nádorové buňky produkují (nádorové markery). Tyto nádorové markery jsou užívány pro odhalení časného stádia nádoru, pro sledování aktivity nádoru během léčby a ověřování



trvalé účinnosti léčby. V rámci laboratorního vyšetření se využívají biochemické, genetické a cytologické metody [4], [7].

Velmi spolehlivé údaje poskytuje histologické vyšetření postižené tkáně [7]. Histologická diagnóza vzorku tkáně zkušeným morfologem slouží v konečném procesu k rozhodnutí, zda se jedná o nádorovou tkáň či nikoliv. Tento typ vyšetření se provádí před zahájením konkrétní léčby (pokud je to možné). Provádí se pomocí biopsie (puknce ložiska pomocí silné jehly), excisi ložiska při vyšetření (např. gynekologické vyšetření) nebo při chirurgickém výkonu. Tkáň je vždy vyšetřena v parafinovém řezu, kdy jsou vyšetřovány i další parametry pro optimální léčbu pacienta [4].

Velký význam v diagnostice nádorových onemocnění mají zobrazovací metody, které dovolují lokalizovat nádor přímo v těle pacienta. Mezi nejstarší avšak stále hojně používané patří rentgenové vyšetření. Moderní modifikací je tzv. počítačová tomografie, která spojuje rentgenové vyšetření s počítačovým systémem. Tělo pacienta je tak zobrazeno ve formě tenkých řezů. Další používané jsou nukleárně medicínské techniky, které sledují průchod nebo uložení radiofarmaka ve sledované tkáni nebo orgánu. K těmto technikám se řadí i pozitronová emisní tomografie (PET). V oblasti diagnostiky měkkých tkání, nádorů v oblasti břicha, prostaty a ženských orgánů včetně prsu se hojně uplatňuje ultrazvuková diagnostika. Jedna z nejcitlivějších vyšetřovacích metod je nukleární magnetická rezonance (NMR), díky které je možné získat informace o funkčních vlastnostech zobrazené tkáně [7].

## **1.9 Léčba nádorového onemocnění**

Metody léčby nádorového onemocnění závisí na jeho typu, rozsahu a lokalizaci. V současnosti se léčebné postupy stále zdokonalují [4].

### **1.9.1 Chirurgická léčba**

Zejména u rozvinutých nádorů je nutnou součástí léčby chirurgický zákrok, který spočívá v mechanickém odstranění nádoru. Společně se odstraňuje i okolní "zdravá" tkáň, ve které již mohou být metastázy. Tato metoda je v onkologické terapii stále ještě nenahraditelná. Léčebná chirurgie se využívá hlavně u lokalizovaných forem nádorů nebo u nádorů "in situ" (v samém počátku vzniku). Paliativní chirurgie se používá k odstranění primárního pokročilého nádoru, aby došlo ke zmenšení objemu nádorových buněk v organismu a zvýšila se účinnost dalších léčebných metod. K rekonstrukční chirurgii se přistupuje při tvarové a funkční obnově poškozených orgánů a tkáně (např. náhrada prsu). Dnes se často využívají endoskopické a miniinvazivní přístupy, pokud to lokalizace nádoru a jeho velikost dovolují [4].

## 1.9.2 Chemoterapie neboli cytostatická léčba

Další možností léčby nádorového onemocnění je chemoterapie, kdy se používají léky se schopností zničit nádorové buňky. Tato léčba se začala intenzivně rozvíjet až od 60 let 20. století. Souborně tyto látky způsobují zástavu buněčného cyklu, a proto se označují jako cytostatika. V léčbě se zpravidla využívají nízkomolekulární látky, jejichž účinek lze rozdělit podle mechanismu [38]:

- Přímé poškození strukturu nukleonových kyselin, což vede k poruše jejich funkce a následně k inhibici proliferace.
- Inhibice důležitých enzymů metabolismu, díky čemuž dochází k poruše biosyntézy.
- Poškození mikrotubulárního proteinu, které způsobí abnormální průběh mitózy až její zastavení v metafázi.
- Mechanismy poškozující buněčnou stěnu nebo způsobující poruchy syntézy proteinů.
- Současně může docházet ke kombinaci mechanismů.

K nejvyužívanějším chemoterapeutickým látkám patří: platinové deriváty, antimetabolity (látky odvozené od látek těla vlastních – metotrexat, fluorouracil), inhibitory topoizomeráz zabraňující syntéze DNA (doxorubicin, etoposid), alkylační činidla (cyklofosfamid), rostlinné alkaloidy se schopností ovlivňovat dynamiku tubulinu jenž jsou schopné ovlivnit dynamiku tubulinu (vinblastin, paclitaxel) a některá antibiotika [8].

Cytostatika působí na nádor selekčním tlakem, který podporuje růst nádorových buněk rezistentních k léčivu. I tento fakt koresponduje s obrovským množstvím a pestrostí konvenčních cytostatik [39].

Běžně se aplikují infuzí do žíly a poté jsou distribuovány krví do celého těla. Díky tomu působí nejen na primární nádor, ale i na případná další nádorová ložiska buněk v celém organismu. Tento fakt je jednou z výhod a současně i nevýhod této terapie, protože cytostatika současně působí i na normální (především proliferující) buňky v těle, pro které je charakteristické rychle dělení (především buňky slizniční a krevetvorné). Nežádoucí účinky se snižují podáváním kortikoidů, diuretik, antiemetik a růstových faktorů, které podporují činnost krevetvorných buněk [39].

Metodou se léčí pacienti s málo rozvinutými primárními nádory, ale i pacienti s pokročilým onemocněním a metastázami. Jak už z uvedených informací vyplývá, cílem léčby je zastavit progres nádorového bujení, omezení rozsahu nemoci a obtíží pacienta. V některých případech se léčba aplikuje před chirurgickým zákrokem z důvodu zmenšení nádoru před samotnou operací (neoadjuvantní chemoterapie). Chemoterapie se také využívá

po chirurgickém zákroku, aby byly zničeny i nádorové buňky kolující v organismu (adjuvantní chemoterapie). Paliativní chemoterapie je předepsána pacientům s četným výskytem metastáz, které nemohou být odstraněny chirurgickým výkonem. Tento druh terapie si klade za cíl zlepšit život pacientům s velmi nízkou šancí na vyléčení [4].

### **1.9.3 Radioterapie**

Radioterapie využívá k ničení rakovinných buněk záření. Léčba může být podávána předoperačně pro zmenšení nádoru (neoadjuvantní radioterapie) nebo naopak po operaci pro zničení možných zbytkových nádorových buněk v operované oblasti (adjuvantní radioterapie). Často dochází ke kombinaci s chemoterapií nebo biologickou léčbou (konkomitantní chemoradioterapie). Paliativní radioterapie se používá tam, kde již není možno pacienta vyléčit (vzdálené metastázy). Radioterapie se využívá ke zmírnění obtíží a zlepšení kvality života [4].

### **1.9.4 Cílená biologická léčba**

Cílená biologická léčba je moderní metoda, která se snaží cílit pouze na nádorové buňky a jejich metabolické procesy. Účinnost pouze na nádorové buňky vede k nižší toxicitě a umožňuje účinnější zásah. Používají se dvě poměrně odlišné skupiny léčiv, a to monoklonální protilátky (speciálně připravené protiátky) a malé molekuly tzv. „small drugs“ [4], [39].

Monoklonální protilátky jsou velké proteinové molekuly namířené proti receptorům, které exprimují na svém povrchu nádorové buňky. V organismu vyhledají nádorové buňky a specificky se naváží na jejich povrch, tím dochází k zastavení jejich růstu a posléze k jejich zničení. Monoklonálních protilátek lze též využít k cílenému dopravení nízkomolekulárních látek do buněk nádoru. Následné uvolnění látky po dopravení do buňky a její biologický efekt uvnitř (např. inhibice buněčného dělení skrze interferenci s DNA či tubulinem) zajistí výsledné zničení buňky. Mechanismy účinku jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 5). Dochází zde k částečně selektivnímu působení. Monoklonální protilátky jsou připraveny pomocí genového inženýrství proti konkrétním receptorům a jejich účinek je proto podmíněn přítomností těchto receptorů na nádorových buňkách pacienta. Pozitivní účinek léčby je velmi často podmíněn i konkrétními mutacemi dalších proteinů. Musejí být podávány intravenózně. Mezi jejich nežádoucí účinky patří alergické reakce. Mezi registrované přípravky na principu monoklonálních protilátek patří například: Cetuximab, Rituximab, Trastuzumab, Bevacizumab nebo Denosumab [39].

Tabulka 5: Mechanismy účinku monoklonálních protilátek [40]

Přímé protinádorové účinky	interference s vazbou na receptor (zabránění přenosu signálu) indukce apoptózy blok tvorby proteinů nezbytných pro zachování maligního fenotypu buňky
Účinek zprostředkovaný komplementem	cytotoxicita aktivace imunitní odpovědi
Imunitními buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátce	cytotoxicita fagocytóza aktivace imunitní odpovědi

„Small drugs“ jsou malé molekuly, jejichž molekulová hmotnost je řádově nižší než proteinů. Mechanismem účinku se řadí mezi kinázové inhibitory, látky působící na regulační procesy v nádorových buňkách. Vhodnost léčby pro konkrétní nádor je hodnocena na základě rozborů konkrétních genů rakovinných buněk, samozřejmě i s ohledem na mutace. Značnou nevýhodou je schopnost buněk aktivovat alternativní dráhu ke dráze zablokované. Mohou být podávány perorálně, což zvyšuje komfort pacienta. Mezi registrované přípravky na principu „Small drugs“ patří například: Trametinib, Sorafenib, Bosutinib, Afatinib, Dasatinib nebo Regorafenib [37].

Do klinické praxe se pomalu dostává další skupina látek založená na kombinaci protilátek a cytostatik, které se využívají pro cílenou léčbu nádorů. Protilátka váže receptor na povrchu nádorové buňky a in situ uvolní navázanou cytotoxickou látku (toxin nebo chelatovaný radioaktivní atom). Díky protilátce cytostatikum působí selektivně pouze na jednom místě v organismu, a proto mohou být použity i látky příliš toxické pro systémové podání. Příkladem je kombinace protilátky proti buněčné determinantě CD30 a toxinu působícímu proti mikrotubulům, který se od protilátky oddělí až uvnitř nádorové buňky (brentuximab vedotin). Dále pak trastuzumab emtansin kombinuje protilátku proti HER2 receptoru a antimitoticky působící toxin [39].

### 1.9.5 Hormonální a imunologická léčba

Hormonální léčbou jsou léčeny hormonálně závislé nádory (např. karcinomy prsu a prostaty), a to již od 30. let minulého století. U karcinomu prsu je zjištěna hormonální závislost u 70-80% případů. Tyto ženy jsou léčeny přípravky, které snižují hladiny ženských pohlavních hormonů nebo snižují vazbu ženských pohlavních hormonů na nádorové buňky. Léčba je velmi účinná a má mnohem menší vedlejší účinky. Naopak v případě karcinomu prostaty léčba snižuje hladinu testosteronu [4], [41].

Imunologická léčba se podává většinou po chirurgickém odstranění nádoru nebo u generalizovaného onemocnění v kombinaci s jinou léčebnou strategií (chemoterapie, biologická léčba). Jedná se o preparáty zlepšující imunitní odpověď organismu, který následně dokáže nádor zmenšit nebo v lepší případě naprosto eliminovat [4].

## 1.10 Rakovina prsu

Vzhledem k tomu, že tato práce byla do jisté míry zaměřena na vyhledávání aktivních látek proti rakovinné linii MDA-MB231, je následující kapitola věnována problematice nádorového onemocnění prsu.

Nádorové onemocnění prsu se z hlediska histologie a terapeutické odpovědi řadí mezi heterogenní onemocnění. Zahrnuje klinické, morfologické a molekulárně velmi odlišné subtypy [42]. Naprostá většina nádorového onemocnění prsu není dědičná, ale vzniká tzv. sporadicky bez rozhodující dědičné příčiny (75-85% případů). Nádory které jsou naopak výsledkem dědičných genetických vad se označují jako hereditární karcinomy (5-7%). Nejpočetnější jsou v tomto případě karcinomy vyvinuté na základě mutace suproserových genů BRCA1 a BRCA2 s autozomálně dominantní dědičností. Další příklady mutovaných genů, které stojí za vznikem rakoviny prsu, jsou shrnuty v přiložené tabulce (Tabulka 6).

Tento druh nádoru je hormonálně závislý, tzv. hormon dependentní. Nevýznamnější roli mají v tomto případě ženské pohlavní hormony (estrogeny), které indukují expresi růstových faktorů a onkogenů a podněcují proliferaci [41].

Tabulka 6: Mutace genů spojené s vyšším výskytem maligních nádorů včetně prsu [41]

Mutovaný gen	Chromozom	Syndrom	Nádory
p53	17p13	Li-Fraumeni	prs, CNS, sarkomy, lymfomy, leukemie, adrenokortikální karcinomy
BRCA1	17q21	–	prs, vaječníky, tlusté střevo, prostata
BRCA2	13q12	–	prs, vaječníky, melanom, pankreas
PTEN	10q	Cowdenův	prs, tlusté střevo, štítná žláza, sarkomy
Reparační gen	2p, 3p, 7p	Lynchův II.	prs, tlusté střevo, děloha
STK 11	–	Peutzův-Jeghersův	prs, nádory GIT, děložní čípek, vaječníky, varlata
ATM	–	Ataxia telangiectatica	prs, žaludek, mozek, děloha, lymfomy, leukemie

Pro klasifikaci prsního nádoru, stanovení prognózy onemocnění a výběr léčiva se dnes kromě klinického vyšetření využívají zobrazovací metody, laboratorní vyšetření, histopatologické vyšetření včetně imunohistochemické charakteristiky onemocnění. Na základě jmenovaných diagnostických metod je stanovováno několik prognostických a

prediktivních parametrů. Mezi tyto parametry patří například věk pacienta, velikost nádoru, histologický stupeň a patologické markery jako je přítomnost estrogenního receptoru (ER), progesteronového receptoru (PR) a receptoru pro lidský epidermální růstový faktor (HER-2) [42], [43], [44].

Hormonální receptory (estrogenní a progesteronový) se stanovují v cytosolu a imunohistochemicky v tkáňovém řezu. Zjišťuje se procento buněk s receptorem pro estrogenu či progesteronu. Jako pozitivní se označují nádory s více než 10% buněk u nich se daný receptor nachází. Nádory, které jsou pozitivní na hormonální receptory, jsou hormonálně dependentní. Pozitivita současně předurčuje možnost léčby hormonální manipulací [41].

Dále diagnostika cílí na ukazatele buněčné proliferace Ki-67 (jaderný proliferační marker, exprimovaný v G1,S, G2 a M fázi, ale ne v G0) a PCNA (přítomný v jádrech buněk v S fázi) [41].

Diagnosticky velmi významné je stanovení zvýšené exprese onkogenu c-erb-B2 (ERBB2, HER-2/neu) na membránách nádorových buněk. Zvýšená exprese znamená vyšší agresivitu nádoru a vyšší proliferační aktivitu. Zvýšená exprese HER-2 představuje důležitý prognostický faktor, který výrazně ovlivňuje strategii léčby. Diagnostika se provádí imunohistochemicky pomocí protilátek proti HER-2 proteinu (Herceptest). Pokud je výsledek hraniční nebo nejasný využívá se metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace). Tato zvýšená exprese je prokazatelná u 25-30% nádorů, které jsou díky tomu vhodné pro terapii protilátkou trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup> – humanizovaná monoklonální protilátka) [41].

### **1.10.1 Nádorové subtypy – biologie a klinické příznaky**

Nádorové onemocnění prsu vyžaduje propojení několika signálních drah a mikroprostředí nádoru. Podle biologie prsního nádoru se dnes rozlišují čtyři „vnitřní“ podtypy tohoto nádorového onemocnění, a to „luminal“, „HER2- enriched“, „basal-like“, „claudin low“ a pátou skupinu „normal breast-like“. Důležité je, že tyto „vnitřní“ podtypy od sebe oddělují nádory z pohledu exprese hormonálních receptorů (ER a PR) a genů, které regulují a exprese onkoproteinu receptoru skupiny epidermálních růstových faktorů HER-2. Díky této klasifikaci nádorového onemocnění prsu, která je založená na celkových expresních profilech buněk, lze předpovědět reakci na léčbu a vhodně ji upravit pro větší šanci na přežití pacienta a zamezení relapsu onemocnění [43], [44].

Obecně bývá nejhorší prognóza u tzv. „triple-negativních“ nádorů, kdy u těchto nádorů nalézáme negativní expresi receptoru pro lidský epidermální růstový faktor (HER2-) i

progesteronového (PR-) a estrogenního (ER-) receptoru. Tyto nádory jsou nejagresivnější a mají velkou schopnost metastazovat do dalších tkání [44].

#### 1.10.1.1 „Luminal“ podtyp

Luminální podtyp je nejčastějším podtypem nádorového onemocnění prsu, představuje asi 50-60% z celkového počtu onemocnění. Jedná se o ER-pozitivní nádory, které vzorem genové exprese připomínají luminální epiteliální složku prsu (odtud název podtypu). Tyto nádory jsou charakterizovány expresí ER, PR a genů spojených s aktivací ER, jako jsou LIV1, TFF1/pS2, Cyclin D1 a expresí luminálních cytokeratinů 8 a 18 [44].

Existují dva podtypy, A a B, které mezi sebou mají mnoho relevantních rozdílů, i když není vždy snadné je odlišit. V populaci se více objevuje podtyp A (až 40%). Naproti tomu podtyp B se vyskytuje pouze u 10% případů [43].

Typ A má obecně vysokou expresi genů regulovaných ER a ER, naopak nízkou expresi HER-2. Pacienti s tímto typem nádoru mají velmi dobrou prognózu. Léčba je založena hlavně na inhibitech hormonální aromatázy třetí generace (AI), selektivních modulátorech estrogenových receptorů (tamoxifen) a selektivních regulátorech ER (fulvestrant) [44].

Nádory s luminálním molekulárním podtypem B mají agresivnější fenotyp, vyšší histologický stupeň a proliferativní index. Současně mají daleko horší prognózu. Vykazují nižší expresi ER a RE regulovaných genů, exprese HER-2 je variabilní. Tyto nádory lépe reagují na neoadjuvantní chemoterapii [43].

#### 1.10.1.2 „HER-2-enriched“ subtyp

HER2-obohacený podtyp tvoří až 20% všech typů nádorového onemocnění prsu. Tyto nádory jsou charakteristické vysokou expresí genu HER2 a dalších genů spojených s dráhou HER2 a nebo HER2 amplikonem nacházejícím se v chromozomu 17q12. Současně jsou tyto nádory negativní na hormonální receptory. Morfologicky jsou nádory vysoce proliferativní, 75% má vysoký histologický stupeň a 40% má mutaci v p53 [44].

Tyto nádory nemají velmi dobrou prognózu. Tento podtyp vykazuje poměrně vysokou chemosenzibilitu. Současně se v dnešní době vyvíjí velké množství anti-HER-2 terapií [43].

#### 1.10.1.3 „Basal-like“ podtyp

Bazální podtyp představuje 10-20% nádorového onemocnění prsu. Tyto nádory jsou z klinického hlediska označovány jako tzv. „triple-negativní“ nádory, a to díky jejich imunohistochemickému profilu – ER, PR a HER-2 negativní. Tato klasifikace však není konečná, protože 25% z těchto tumorů není „triple-negativní“ [44].

Jedná se o duktální karcinomy s vysokým mitotickým indexem, nekrózou tumoru, rozšiřujícími se okraji a stromální lymfocytární odpovědí. Bazální podtyp je velmi agresivní s metastazováním do viscerálních orgánů (zejména plíce), centrálního nervového systému a lymfatických uzlin. Klinicky se vyskytují u velmi mladých pacientů. Při diagnostikování bývá nádor již větší velikosti, a vysokým histologickým stupněm a vysokou frekvencí postižení lymfatických uzlin. Vyskytuje se převážně u mladých žen afroamerického původu [43].

Bylo identifikováno několik rizikových faktorů pro rozvoj bazálního nádoru. Nejzajímavější je spojení mezi bazálním podtypem a nosiči mutace v BRCA1. Ženy s touto mutací mají až v 80% případů bazální typ karcinomu prsu. BRCA1 a BRCA2 zajišťují mechanismus správné homologní rekombinační opravy DNA. Pokud dojde ke ztrátě funkčnosti homologní rekombinační dráhy, dojde k opravě DNA způsobem, který zahrnuje poly(ADP-ribóza)polymerázu (PARP) náchylnější k chybám. Popsaný fakt se již dnes využívá k léčbě u nádorů s mutací v BRCA1/2 pomocí inhibitorů PARP, což zvyšuje míru přežití u pacientů s „triple-negativními“ nádory [44].

#### 1.10.1.4 „Claudin-low“ podtyp

„Claudin-low“ podtyp je relativně vzácnou podskupinou nádorů, pouze 12-14%. Vyznačuje se nízkou expresí genů, které jsou zapojené do těsných spojů a mezibuněčné adheze, včetně claudinu-3, 4, 7 (odtud název) a E-kadherinu. Nedostatek vlastností epiteliálních buněk a exprese mezenchymálních znaků připomíná vlastnosti spojené s kmenovými buňkami. Současně „claudin-low“ podtyp exprimuje velké množství genů souvisejících s imunitní odpovědí, což dokazuje vysokou infiltraci buněk imunitního systému do nádoru [42].

Onemocnění má špatnou prognózu i přesto, že nádory se vyznačují nízkou proliferací. Vykazují nízkou odpověď na neoadjuvantní chemoterapii. Imunohistochemicky se nádory řadí mezi tzv. „triple-negativní“ nádory, ale pouze v 80% případů. Zbýlých 20% je pozitivní na hormonální receptory [44].

#### 1.10.1.5 „Normal breast-like“ podtyp

Podtyp tvoří asi 5-10% nádorových onemocnění prsu. Vzhledem k jeho relativní vzácnosti existuje pouze malé množství studií o tomto podtypu a z toho důvodu jsou poměrně špatně charakterizovány. Nádor exprimuje geny charakteristické pro normální tukovou tkáň. Není zde patrná exprese ER, PR a HER2, díky čemuž mohou řazeny mezi tzv. „triple-negativní“ nádory ne však mezi bazální nádory, protože jsou negativní na CK5 a EGFR [43].



Obvykle nereagují na neoadjuvantní chemoterapii. Tyto nádory se z hlediska prognózy řadí mezi luminální a bazální podtyp [43].

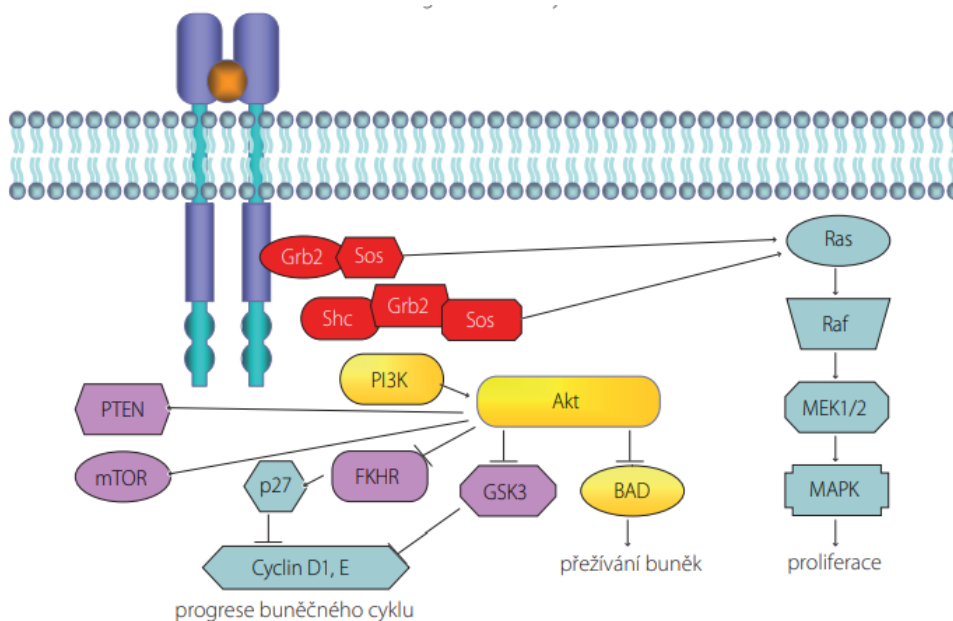
### 1.10.2 Biologická léčba karcinomu prsu

Možnost cílené léčby karcinomu prsu umožnil objev hormonálních receptorů. Hormonální léčba je první volbou v případě hormonálně dependentního onemocnění. První klinické použití trastuzumabu v kombinaci s chemoterapií u metastazujícího karcinomu prsu započalo éru bioregulační nehormonální léčby karcinomu prsu [40]. Léčebné možnosti u jednotlivých podskupin metastazujícího onemocnění prsu přehledně ukazuje následující tabulka (Tabulka 7).

Tabulka 7: Léčebné možnosti u jednotlivých podskupin metastazujícího onemocnění; HT: hormonální léčba, CT: chemoterapie, BIOCT: biochemoterapie, BIOHT: biohormonoterapie [40]

Podtyp	Molekulární charakteristika	Léčebné možnosti	Bioterapie
Hormonálně dependentní HER-2 independentní	ER+/PR+/HER-2- ER+/PR-/HER-2- ER-/PR+/HER-2-	HT,CT BIOCT BIOHT	bevacizumab
Hormonálně dependentní HER-2 dependentní	ER+/PR+/HER-2+ ER+/PR-/HER-2+ ER-/PR+/HER-2+	HT, BIOHT BIOCT	trastuzumab lapatinib bevacizumab
Hormonálně independentní HER-2 dependentní	ER-/PR-/HER-2+	BIOCT, BIO	trastuzumab lapatinib bevacizumab
Hormonálně independentní HER-2 independentní	ER-/PR-/HER-2- „Triple-negativní“	CT, BIOCT	bevacizumab

Nejdůležitější signální dráha karcinomu prsu je aktivována prostřednictvím rodiny receptorů pro epidermální růstové faktory (EGFR), kam patří transmembránové glykoproteinové receptory s označení HER-1 až HER-4. Pro přenos maligního signálu má pro nádorovou buňku největší význam receptor HER-2, který má hlavní úlohu na začátku signální dráhy (Obrázek 13) a je zvýšeně exprimován asi u 20% všech nádorových onemocnění prsu [40].



Obrázek 13: Signalizační cesty EGFR rodiny tyrosinkinázových receptorů [40]

Extracelulární doména receptoru HER-2 jako prognosticky významná je známá z druhé poloviny osmdesátých let minulého století a je cílovou strukturou pro monoklonální protilátky nebo konjugáty s cytostatiky. Herceptin<sup>®</sup> (trastuzumab) byl první schválenou cílenou monoklonální protilátkou pro léčbu nádorového onemocnění prsu s cílením proti HER-2 receptoru. Lapatinib (Tyverb) je malá molekula, která působí jako intracelulární duální inhibitor ErbB1 a Erb2. Používá se pro léčbu pokročilých karcinomů prsů pokud selže terapie trastuzumabem. Podmínkou je opět vysoká exprese HER-2 receptoru. Bevacizumab (Avastin) je monoklonální protilátka inhibující VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) [41].

### 1.11 Sinice a jejich sekundární metabolity

Sinice jsou jednoduché autotrofní prokaryotické organismy, které obývají celou řadu různorodých ekosystémů (sladkovodní, mořské, půdní, ale i extrémní prostředí horkých pravenů). Představují skupinu velmi morfologicky a geneticky rozmanitých organismů. Mají potenciál produkovat velké množství sekundárních metabolitů různorodých chemických struktur a bioaktivit, kdy některé z nich představují svou toxicitou hrobu a jiné mohou být využity jako léčivé látky. Mezi sekundárními metabolity sinic najdeme látky s toxickým, antibakteriálním, antimykotickým, antivirotickým, antikoagulačním, antimalarickým, protizánětlivým, protinádorovým účinkem a další. Většinou se jedná o látky s malou molekulovou hmotností (přibližně 150-2000 Da). Většina sekundárních metabolitů sinic jsou

produkty neribozomálních peptidových syntetáz (NRPS), polyketid syntetáz (PKS) nebo jejich kombinací (NRPS/PKS) [45], [46].

NRPS je multidoménný enzymatický komplex nacházející se na cytoplazmatické membráně. Pro enzymatický komplex NRPS je charakteristické modulární uspořádání. Každý modul odpovídá za správné zařazení specifické podjednotky do rostoucího peptidového řetězce. Tento komplex je schopný aktivovat široké spektrum prekurzorů a spojovat je za vzniku peptidové vazby, což znamená, že pro syntézu nového peptidu není vyžadován templát ve formě m-RNA. Struktura vzniklého sekundárního metabolitu závisí na typu a pořadí modulů, které jsou součástí NRPS dráhy. V každém modulu je několik domén s určitou enzymatickou aktivitou – adenylační (A), thiolační (T), kondenzační (C) a thioesterázová (TE) doména [47].

PKS jsou enzymatické komplexy, které se účastní produkce sekundárních metabolitů polyketidového charakteru. Podle složení a struktury rozlišujeme celkem 3 typy bakteriálních PKS, kdy pro tvorbu sekundárních metabolitů sinic ve spojení s NRPS je nejdůležitější typ I. PKS typu I jsou multifunkční enzymy organizované do modulů, které v sobě ukrývají řadu různých domén zodpovědných za připojení jedné jednotky polyketidového řetězce [48].

Hybridním propojením drah NRPS/PKS je syntetizována převážná většina doposud známých sekundárních metabolitů sinic. Mezi tyto látky patří například anatoxin-a, homoanatoxin-a, cylindrospermopsiny, aeruginosiny, cryptophyciny, microcystiny a nodulariny [47].

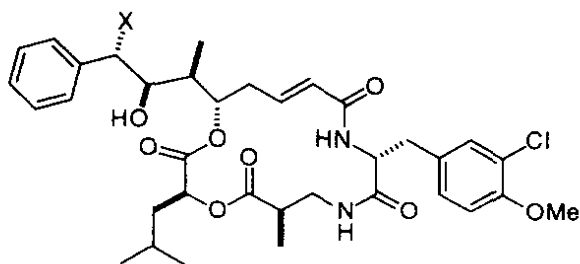
### **1.11.1 Příklady sekundárních metabolitů sinic s protirakovinnými účinky**

Sinice produkují řadu sekundárních metabolitů, které byly evolučně selektovány tak, aby sinice obstály v konkurenčním boji mikroorganismů a současně dokázaly co nejlépe využít prostředí. Díky této skutečnosti jsou sekundární metabolity sinic svou chemickou strukturou předurčené k interakci se širokou škálou enzymů. Není tedy neobvyklé, že se mezi těmito metabolity najdou i takové, které mají zajímavý vliv na biochemické procesy v savčích buňkách. Z tohoto pohledu se sinice jeví jako slibný zdroj látek s ambicemi farmakologického využití [49].

#### *1.11.1.1 Cryptophyciny*

Cryptophyciny jsou antimitotické sloučeniny izolované ze sinic rodu *Nostoc* na počátku roku 1990. Jedná se o účinné inhibitory polymerace tubulinu a následně tak skrze ovlivnění dynamiky mikrotubulů způsobují zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi [50].

Hlavním představitelem této skupiny je Cryptophycin-1 (Obrázek 14). Vykazuje se neobvykle vysokou cytotoxicitou proti nádorovým liniím, ve kterých indukuje apoptózu. Jendá se o jednu z nejúčinnějších látek destabilizujících tubulin která byla kdy nalezena. Nepopíratelnou výhodou této látky je vysoká protinádorová aktivita i proti taxol-rezistentním a vinblastin-rezistentním nádorovým buňkám. Od této látky bylo připraveno více než 25 strukturních analogů [51].

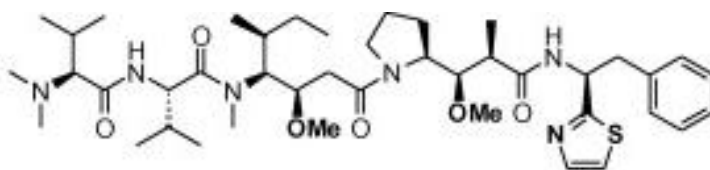


Obrázek 14: Chemická struktura Cryptophycin-1 [50]

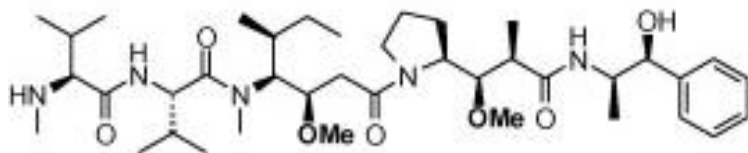
#### 1.11.1.2 Dolastatiny

Dolastatin 10 je cytostatický peptid obsahující několik aminokyselinových podjednotek neribosomálního původu, který byl poprvé v malém množství izolován z mořského měkkýše *Dolabella auricularia*. Následně bylo objasněno, že primárním producentem této sloučeniny je vláknitá sinice rodu *Symploca* [52].

Látka dosahuje velmi silné antiproliferační aktivity u řady nádorových buněk. Svým účinkem blokuje polymeraci tubulinu a tím zastavuje proliferaci buněk. Dolastatin-10 (Obrázek 15) sloužil jako předloha syntézy analogů pro cílenou léčbu. Nejznámějším syntetickým analogem je monomethyl auristatin E (Obrázek 16), který je součástí konjugátu protilátka – léčivo (komerční název brentuximab vedotin) [53].



Obrázek 15: Chemická struktura Dolastatin 10 [54]

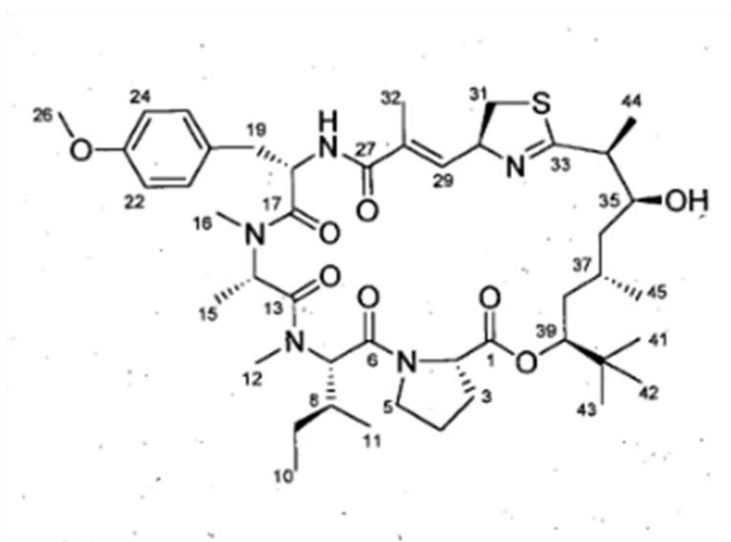


Obrázek 16: Chemická struktura monomethyl auristatin E [54]

### 1.11.1.3 Apratoxiny

První apratoxin, označený jako apratoxin A (Obrázek 17), byl izolován z mořské sinice *Lyngbya* sp. V současné době jsou známy další čtyři přírodní strukturní analogy, označeny písmeny B-E [55].

Jedná se o cyklický depsipeptid, u kterého je známá jedna z nejvyšších aktivit na rakovinné buňky mezi sinicovými cytotoxiny. Apratoxin A v buňkách zastavuje buněčný cyklus v G1 fázi a následně indukují apoptózu. Přesný mechanismus účinku však dosud nebyl objasněn [55], [56].



Obrázek 17: Chemická struktura apratoxin A [56]

## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Na frakcích vykazující výrazný inhibiční efekt vůči lidským rakovinným liniím provést HPLC-HRMS/MS analýzu a na základě distribuce detekovaných peaků se pokusit určit látku zodpovědnou za detekovaný efekt.
2. U chromatografických frakcí vykazujících selektivní působení proti určité linii/liniím stanovit typ buněčné smrti indukovaných frakcí.
3. U sinicového kmene obsahujícího frakci se selektivním působením a indukující řízenou buněčnou smrt provést izolaci aktivní látky a ověřit její potenci v čistém stavu.

## 3 METODIKA

### 3.1 Chemikálie

- DMEM – kultivační médium (Gibco® média, Life Technologies)
- RPMI – kultivační médium (Gibco® média, Life Technologies)
- FBS – fetální bovinní sérum (Gibco®, Life Technologies)
- Antibiotika – antimykotika (Gibco®, Life Technologies)
- L-glutamin (Gibco®, Life Technologies)
- PBS - fosfátový pufr (připravený v laboratoři)
- Trypsin-EDTA bez fenolové červeně (Gibco®, Life Technologies)
- MTT - 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Invitrogen Molecular Probes®, Life Technologies)
- Caspase-Glo® 3/7 Assay kit (Promega)
- CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Promega)
- NucBlue™ Live Cell Stain ReadyProbes™ (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)
- DMSO - dimethylsulfoxid (Scharlau)
- Methanol (Scharlau)
- Acetonitril (Scharlau)
- Kyselina mravenčí (Lachema, národní podnik Brno)
- Mořský písek (VWR)
- Dusík 4.0 Linde gas a. s.

### 3.2 Přístrojové vybavení

- Vysokoučinný kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 UHPL+ (Thermo Scientific) s DAD detekcí ve spojení s hmotnostním spektrometrem Impact HD (Bruker) s elektroprejovou ionizací (ESI) a TOF analyzátozem
- Vysokoučinný kapalinový chromatograf Agilent HP 1100 Series s DAD detekcí
- Inkubátor Sanyo MCO-15AC
- Vertikální laminární flow box BIO BAN 48 (STERIL)
- Optický mikroskop (MERCY s.r.o)
- Laboratorní váha (Sartorius laboratory)
- Analytické váhy (Sartorius research)
- Minispin mini centrifuga (Eppendorf)
- Centrifuga 5804 R (Eppendorf)
- Stolní centrifuga UNIVERSAL 320 (Schoeller, Hettich)
- Centrifuga Sigma 8KS (Sigma)
- Centrifuga Z 32 HK (HERMLE)
- FLUOstar Omega (BMG LABTECH)
- TECAN SUNRISE (Schoeller instruments s.r.o.)
- Vodní lázeň (Thermo Scientific)

- Invertovaný mikroskop Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) s kamerou AxioCam MRm
- Vakuový koncentrátor miVac QUATTRO Genelac (BIOTRADE s.r.o.)
- Lyofilizátor CoolSafe™ (SCANVAC)
- Vakuová odparka Laborota 4002-digital (Heidolph)
- Sterilní transparentní 96jamkové platíčko (SASTEDT)
- Sterilní bílé 96jamkové platíčko (BRANDplates®)
- Běžné laboratorní vybavení

### **3.3 „Highthroughput“ screening (HTS) – vysokokapacitní testovací systém**

Příprava vzorků pro účely HTS ani samotné provedení HTS nebylo součástí této magisterské práce, a proto je níže zmíněn pouze stručný postup jímž byly HTS výsledky získány, a to zejména z důvodu návazností na výsledky získané touto prací. Na mikrobiologickém ústavu AV ČR bylo připraveno přibližně 1 570 chromatografických frakcí z 50 sinicový kmenů, kdy každý kmen byl rozdělen pomocí preparativní HPLC na přibližně 35 frakcí jímáním v 1,5 minutových časových oknech. Následně byly tyto frakce testovány na HTS pracovišti OpenScreen CZ (MGÚ Praha).

Hlavním cílem HTS je identifikovat aktivní látky tzv. „hity“ z velkého množství sloučenin, které pak slouží k dalšímu testování. V současné době se pomocí metody HTS může otestovat 10 000 až 100 000 sloučenin denně [57].

Do testování bylo zahrnuto 21 lidských buněčných linií, z toho 3 primární buněčné linie (BJ, RPE1 a HEK293T) a 18 rakovinných linií. Přehled všech linií, na kterých byly chromatografické frakce testovány jsou uvedeny v tabulce v přílohách (9.1) této práce (Tabulka 16).

Schéma testování zahrnovalo tři koncentrace každé chromatografické frakce (25 µg/ml, 2,5 µg/ml a 0,25 µg/ml) v duplikátu při hustotě 1 000 buněk/jamku v 1 536 jamkových destičkách. Vyhodnocení probíhalo pomocí CellTiter-Glo® 2.0 po inkubační době 72 hodin.

### **3.4 Analýza primárních frakcí – HPLC-HRMS**

V prvním kroku byly z výsledků HTS screeningu vybrány frakce, které vykazovaly účinek na rakovinné buněčné linie, ale žádný nebo minimální efekt na linie primární. V tomto případě nerozhodoval konkrétní typ rakovinné buněčné linie.

Chromatografické frakce byly naředěny (2,5 µl frakce a 97,5 µl methanolu). Přičemž procento methanolu, které sloužilo k naředění konkrétních frakcí shrnuje přiložená tabulka (Tabulka 8).



Tabulka 8: Naředění konkrétních frakcí

Označení frakce	Methanol
0 – 10	30%
10 – 20	60%
20 – 35	100%

Následně byly vybrané frakce analyzovány na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 UHPL+ (Thermo Scientific) s DAD detekcí ve spojení s hmotnostním spektrometrem Impact HD (Bruker) s elektroprejovou ionizací (ESI) a TOF analyzátozem. Pro separaci sloučenin byla použita kolona Phenomenex Kinetex (150×4,6 mm, 2,6 μm, C18). Použitá mobilní fáze byla kombinace vody a acetonitrilu obojí s obsahem kys. mravenčí (FA, 0,1%). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,6 ml/min s gradientem uvedeným v tabulce (Tabulka 9). Zvolený nástřik byl 10 μl a celkový čas analýzy 33 minut. Kvůli obsahu DMSO byl autosampler vyhříván na teplotu 20 °C.

Tabulka 9: Gradient použitý pro primární analýzu chromatografických frakcí, Fa (kyselina mravenčí)

Čas [min]	Acetonitril+FA [%]	Voda+Fa [%]
0	15	85
1	15	85
20	100	0
25	100	0
30	15	85

Hmotnostní spektrometr byl nastaven následovně: teplota sušícího plynu 250 °C, průtok sušícího plynu 11,2 l/min, tlak zmlžovače 3,0 Bar, napětí na kapiláře 4 200 V, koncové napětí 500 V.

### 3.5 Buněčné linie

Pro účely této práce bylo použito pět typů lidských buněčných linií. Tři rakovinné buněčné linie: MDA-MB231, K562 a U-937. Dvě primární buněčné linie: BJ a RPE1.

MDA-MB231 je rakovinná linie lidského prsního adenokarcinomu, která je odvozená z metastáz pleurálního výpotku 51leté ženy. Jde o adherentní typ buněk bez kontaktní inhibice. Tento typ nádorových buněk je charakteristický nízkou expresí ER, PR a HER-2 receptoru a označuje se jako „triple-negativní“ [58]. Více o nádorových onemocněních prsu pojednává kapitola 1.10.

K562 jsou buňky chronické myeloidní leukémie. Jedná se o neadherentní buňky. Tyto buňky byly první buněčnou linií z lidské imortalizované myeloidní leukémie.

Charakteristicky se vyskytují u tzv. Filadelfského chromosomu, který je příčinou chronické myeloidní leukémie [59].

Buněčné linie U937 byla izolovaná z histiocytického lymfomu 37letého pacienta v roce 1976. Jedná se o neadherentní buňky, které mají některé charakteristické znaky nezralých monocytů. Na jejich povrchu se vyskytují vysoce specifické inzulinové receptory, které mají podobné vazebné vlastnosti jako u dospělých monocytů z lidské krve. Buňky jsou neadherentní [60].

BJ je označení pro adherentní lidskou primární buněčnou linii fibroblastů, které byly odebrané z předkožky novorozence. Tyto buňky podléhají velké kontaktní inhibici [61].

RPE1 jsou lidskou telomerázou imortalizované retinální buňky pigmentované epiteliální vrstvy. Buňky jsou adherentní a mají sníženou kontaktní inhibici růstu [62].

### **3.5.1 Kultivace**

Všechny buňky byly kultivovány v inkubátoru (Sanyo MCO-15AC) při teplotě 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>, aby byly co nejlépe napodobeny podmínky v extracelulární tekutině. Pro kultivaci buněk byla použita média DMEM (BJ, RPE1, MDA-MB231, K562) a RPMI (U937), která obsahují látky nezbytné pro buněčný růst. Médium (500 ml) bylo před použitím doplněno o FBS (25 ml), L-glutamin (5 ml) a antibiotika (5 ml). Antibiotika se do média přidávají k zabránění infekce. Aminokyselina L-glutamin je nezbytná pro syntézu proteinů. FBS (fetální bovinní sérum) je zdroj růstových faktorů pro buněčnou proliferaci.

### **3.5.2 Pasážování buněčných linií**

Buňky rostoucí v kultivačních lahvích mají pouze omezené zdroje živin a prostor k růstu. Z tohoto důvodu je nutné po nějaké době provést tzv. pasážování. Informaci o stavu buněk a nutném pasážování může poskytnout změna barvy média (fenolová červeň), které díky poklesu pH mění barvu postupně z růžové na oranžovou až žlutou.

Práce s buněčnými liniemi byla vždy prováděna sterilně, a to nejlépe v laminárním boxu. Otevírané nádoby a zkumavky byly pokaždé opáleny nad kahanem, aby se snížila možnost kontaminace. Všechny používané roztoky bylo vždy nutné před použitím vyhřát na teplotu 37 °C.

Při práci s adherentními buněčnými liniemi bylo nejprve vylito médium s vyčerpanými živinami. Následně byly adherované buňky několikrát opláchnuty PBS (pufrovaný fyziologický roztok). V dalším kroku bylo k buňkám přidáno 400 – 700 µl trypsinu, který slouží k uvolnění buněk ze dna kultivační nádoby. Buňky byly umístěny na 5 minut do inkubátoru. Po uvolnění buněk musel být účinek trypsinu zastaven přidáním 9 ml média, aby nedošlo k jejich poškození. Vzniklá suspenze buněk byla rozmíchána automatickou

serologickou pipetou. Přibližně 3/4 objemu byly vylity do odpadu a ke zbylému objemu buněk byl přidán potřebný objem nového média. Buňky se vrátily zpět do inkubátoru.

V případě neadherentních buněčných linií (K562 A U937) byl vyřazen krok s PBS a trypsinem. Kultivační lahve byly pouze otevřeny a odlila se potřebná část vyčerpaného média i s buňkami do odpadu. Zbylý objem by poté opět doplněn čerstvým médiem.

### **3.5.3 Nasazení buněk na experiment**

Pro nasazení experimentu byly použity zmíněné 3/4 buněk, které tak v tomto případě nebyly vylity do odpadu. Tyto „sklizené“ buňky bylo nutné nejprve spočítat v Bürkerově komůrce, aby došlo k naředění suspenze na kýženou koncentraci a nasazení rovnoměrného počtu buněk. V této práci byly buňky nasazovány v počtu 5 000 nebo 13 000 buněk/ 200  $\mu$ ml média a 5 000 buněk/ 50  $\mu$ l média v případě neadherentních buněk.

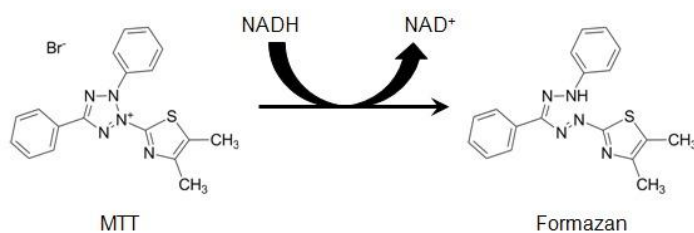
Vzniklá suspenze buněk byla napipetována do 96-jamkové transparentní/bílé (podle typu experimentu) destičky. Do všech okrajových jamek destičky byla napipetována voda, aby bylo zabráněno vysychání experimentálních jamek. V případě adherentních buněk byly nasazené buňky ponechány 24 hodin v inkubátoru adherovat. Druhý den bylo naadherovaným buňkám odsáto médium a byl k nim přidán roztok s aktivní látkou o určité koncentraci (vždy triplikát jamek pro jednu látku/koncentraci) – treatment. Jeden triplikát v každém experimentu sloužil jako kontrola, kdy bylo buňkám pouze vyměněno médium. Buňky byly ponechány v inkubátoru 72 hodin. Po uplynutí této doby byly vyhodnoceny buněčné viability.

Neaderentním buňkám bylo nutné před nasazením vyměnit médium. Část z celkového objemu (3/4) kultivační nádoby byla převedena do 50 ml zkumavky a následně stočena (5 min., 1 000 rpm). Došlo k usazení buněk na dně zkumavky a médium mohlo být bezpečně vyměněno. Buňky pak byly protřepáním znovu rozsuspendovány v médiu a mohly být dále počítány. Ten samý den bylo k buňkám přidáno 50  $\mu$ l roztoku s aktivní látkou o určité koncentraci (vždy triplikát jamek pro jednu koncentraci). Buňky byly ponechány v inkubátoru 72 hodin.

### **3.6 Princip MTT testu**

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) test, tetrazoliový redukční test byl prvním homogenním testem životaschopnosti buněk pro 96 jamkový formát, který byl vhodný pro vysokokapacitní testovací systém [63].

Jedná se o kolorimetrický test. Životoschopné buňky s aktivním metabolismem přeměňují ve vodě rozpustný žlutý MTT na ve vodě nerozpustný fialový formazan (Obrázek 18). Mrtvé buňky bez aktivního metabolismu nemají schopnost přeměnit MTT na formazan. Přesný buněčný mechanismus redukce MTT na formazan není dosud dobře znám. Pravděpodobně zahrnuje reakci s NADH a podobnými redukujícími molekulami přenášejícími elektrony na MTT. Formazan je rozpustný v DMSO a následně je možné ho stanovovat spektrofotometricky (maximum absorpce formazanu blízko 570 nm) [63].



Obrázek 18: Zjednodušené reakční schéma redukce MTT na formazan [63]

Množství generovaného signálu je závislé na několik parametrech: koncentrace MTT, délka inkubační doby, počet životoschopných buněk a jejich metabolická aktivita.

### 3.6.1 MTT test – provedení

MTT roztok byl připraven rozpuštěním MTT v PSB (poměr: 4 mg MTT na 1 ml PBS). Kádinka se vzniklým roztokem byla následně několik vteřin sonifikována. Roztok byl přefiltrován přes bakteriologický filtr (velikost pórů 0,2  $\mu\text{m}$ ).

Po uplynutí inkubační doby experimentu (72 hodin) bylo do každé jamky napipetováno 10  $\mu\text{l}$  připraveného roztoku MTT na 200  $\mu\text{l}$  média. Transparentní destička byla ponechána 4 hodiny v inkubátoru (37  $^{\circ}\text{C}$ ). Po uběhnutí této doby bylo z každé jamky pipetou odebráno 190  $\mu\text{l}$ . V dalším kroku bylo do každé jamky přidáno 190  $\mu\text{l}$  DMSO. Před měřením bylo nutné 96 jamkovou destičku nechat 20 minut inkubovat.

V posledním kroku bylo provedeno spektrofotometrické měření na spektrofotometru Tecan Sunrise. Destička byla před samotným měřením 3 minuty promíchávána. Měření probíhalo při vlnové délce 590 nm (referenční hodnota 640 nm).

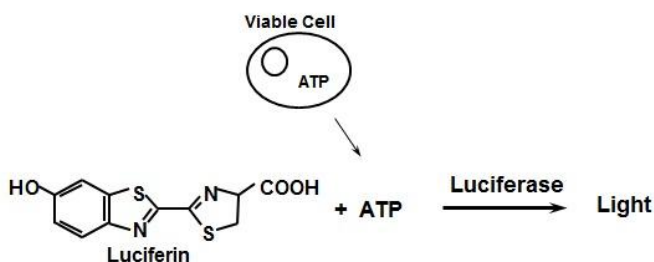
Při vyhodnocování výsledků byl vždy zprůměrován triplikát jamek s přidanou aktivní látkou. Tato hodnota pak byla vztažena k průměrné hodnotě kontroly (pouze buňky v médiu, 100% viabilita). Díky tomu byla získána procentuální viabilita.

### 3.7 Princip stanovení koncentrace ATP

Cell-Tier Glo test je rychlá a citlivá homogenní luminiscenční metoda používaná pro stanovení počtu životaschopných buněk v kultuře pomocí kvantifikace přítomného ATP, které signalizuje přítomnost metabolicky aktivních buněk. Tato metoda se nejčastěji používá v aplikacích HTS [63].

Pokud buňky ztrácejí integritu vnějších a vnitřních membrán, ztrácí současně schopnost syntetizovat ATP a endogenní ATPázy rychle vyčerpají veškeré zbývající ATP z cytoplazmy. Buňka si nedělá dlouhodobé zásoby ATP [63].

Pro kvantifikaci ATP pomocí zmíněného testu se využívá schopnosti luciferázy generovat světlo za přítomnosti luciferinu (obsaženého v detekčním kitu) a ATP. Následně je tedy vygenerovaný luminiscenční signál přímo úměrný koncentraci ATP a počtu živých buněk (Obrázek 19). ATP test je méně náchylný k artefaktům než jiné metody. Luminiscenční signál dosáhne ustáleného stavu do 10 minut po přidání činidla a je stabilní až 5 hodin [63].



Obrázek 19: Zjednodušené reakční schéma ukazující ATP a luciferin jako substráty pro luciferázu pro generování světelného signálu [63]

#### 3.7.1 Stanovení koncentrace ATP – provedení

Po uplynutí expoziční doby experimentu 72 hodin byl komerční kit CellTite-Glo<sup>®</sup> společně s bílou 96 jamkovou destičkou (obsahující experimentálně ošetřené buňky a kontroly) inkubován 30 minut při laboratorní teplotě.

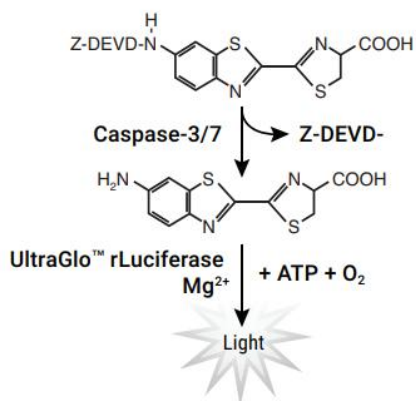
V případě adherentních buněk bylo z každé jamky odpipetováno 120  $\mu$ l kultivačního média a následně přidáno 80  $\mu$ l CellTite-Glo<sup>®</sup> (přídavek v poměru 1:1 v/v). Destička byla inkubována 10 minut za nepřístupu světla. V posledním kroku bylo provedeno měření na multifunkčním readeru FLUOstar Omega (v luminiscenčním modu s automatickým nastavením hodnoty „gain“). Destička byla před samotným měřením 3 minuty promíchávána. Změřeny byly jamky obsahující buňky s aktivní látkou (treatment), médium s buňkami (kontrola) a pouze médium (pozadí) vše v triplikátech.

Pokud se jednalo o adherentní buňky bylo po 72 hodinách k 100  $\mu$ l, které byly v jamce po nasazení buněk a treatmentu, přidáno 100  $\mu$ l CellTite-Glo<sup>®</sup>. Další postup byl stejný jako v případě adherentních buněk.

Při vyhodnocení byl nejprve od všech hodnot odečten průměr intenzity pozadí. Následně byl vždy zprůměrován triplikát jamek s přidanou aktivní látkou. Tato hodnota pak byla vztažena k průměrné hodnotě kontroly (pouze buňky v médiu, 100% viabilita). Díky tomu byla získána procentuální viabilita.

### 3.8 Aktivita efektorových kaspáz 3/7

Test Caspase-Glo<sup>®</sup>3/7 je homogenní luminiscenční test měřící aktivitu kaspáz 3/7. Součástí kitu je termostabilní luciferáza v pufru a proluminiscenční substrát. Pokud jsou kaspázy 3/7 ve vzorku aktivní specificky štěpí proluminiscenční substrát (specifická peptidová sekvence DEVD navázaná na luciferin). Díky štěpení se uvolňuje substrát pro luciferázu a její aktivitou vzniká měřitelný luminiscenční signál (Obrázek 20). Luminiscence je úměrná aktivitě kaspáz. Aktivita efektorových kaspáz 3/7 se využívá u hodnocení apoptózy [64].



Obrázek 20: Zjednodušené reakční schéma. Po odštěpení substrátu proluciferinu DEVD kaspázou se uvolní substrát pro luciferázu (aminoluciferin), který v přítomnosti luciferázy a ATP vede k luciferázové reakci a produkci světla. [65]

#### 3.8.1 Aktivita efektorové kaspáz 3/7 – provedení

Po 24, 48 a 72 hodinách byly bílá 96 jamková destičky (obsahující experimentálně ošetřené buňky a kontroly) a Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay kit nechány 30 minut inkubovat za laboratorní teploty. V dalším kroku bylo z každé jamky odpipetováno 150  $\mu$ l média a přidáno 50  $\mu$ l Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 (přídavek v poměru 1:1 v/v). Destička byla inkubována 30 minut za nepřístupu světla. Poté byla intenzita luminiscence změřena pomocí multifunkčního readeru FLUOstar Omega (v luminiscenčním modu s automatickým nastavením hodnoty

„gain“). Před samotným měřením byla destička míchána 3 minuty. Změřeny byly jamky obsahující buňky s aktivní látkou (treatment) a pouze médium s buňkami (kontrola) vše v triplikátech.

### **3.8.2 Fluorescenční mikroskopie – barvení jader**

Buňky MDA-MB231 a RPE byly nasazeny v počtu 5 000 buněk/jamku v růstovém médiu DMEM (Biovest) do 96jamkového sterilního transparentního plastového platíčka (SASTEDT). Buňky byly takto kultivovány 24 hodin v inkubátoru (Sanyo MCO-15AC) při teplotě 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Po plném adherování (24 hodin) byly všechny buňky treatovány izolovanými látkami o koncentracích 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 μM/ml v triplikátech. Platíčka pro 24, 48 a 72 hodin treatmentu byly obarveny pomocí jaderného barvení NucBlue™ Live Cell Stain ReadyProbes™ (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) bez nutnosti předchozí fixace, a to v koncentraci 2 kapky/1 ml kultivačního média. Z každé jamky bylo opatrně odebráno 100 μl média a přidáno opět 100 μl této barvicí směsi. Takto byla platíčka kultivována 5 minut při pokojové teplotě za nepřístupu světla.

Jednotlivé jamky byly nasnímány pomocí invertovaného mikroskopu Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) s fluorescenční lampou HXP 120 C s použitím A-Plan 10×/0,25 Ph1 objektivu a kamery AxioCam MRm 0,63× v plné velikosti jamky. Snímání vzorků probíhalo za využití excitačního filtru 335-383 nm a emisního filtru v rozmezí 420-470 nm při expozičním čase 1,9 sekund za dodržení absence vnějšího světla.

Překryvy jednotlivých fotografií byly zpracovány softwarem ZenBlue2.5, aby společně vytvořily jednu fotografii ve velikosti jedné jamky. Po vyexportování snímků do tiff formátu byly fotografie dále analyzovány pomocí volně dostupného programu Fiji (ImageJ) [66] s macrem upraveným na počítání obarvených buněčných jader. Jednotlivé triplikáty byly zprůměrovány a tato data byla použita na korelaci dat získaných analýzou Caspase-Glo® 3/7.

### **3.9 Frakcionace primárních frakcí – HPLC-HRMS**

Na základě prvních výsledků byly vybrány frakce se selektivním účinkem na rakovinou linii MDA-MB231, které byly podrobené další frakcionaci. Pro analýzu a refrakcionaci byl použit kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 UHPL+ (Thermo Scientific) s DAD detekcí ve spojení s hmotnostním spektrometrem Impact HD (Bruker) s elektroprejovou ionizací (ESI) a TOF analyzátozem. Použitá mobilní fáze byla kombinací vody a acetonitrilu obojí s přídavkem kys. mravenčí (FA, 0,1%). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,6 ml/min s gradienty uvedenými v tabulce (Tabulka 10). Gradienty byly

nastaveny, aby došlo k co nejlepšímu oddělení jednotlivých látek. Kvůli obsahu DMSO byl autosampler vyhříván na teplotu 20 °C. Hmotnostní spektrometr byl nastaven následovně: teplota sušícího plynu 250 °C, průtok sušícího plynu 112 l/min, tlak zmlžovače 3,0 Bar, napětí na kapiláře 4 200 V, koncové napětí 500 V.

*Tabulka 10: Gradienty pro refrakcionaci jednotlivých primárních frakcí podle jejich číselného označení reflektující polaritu obsažených látek (na základě jejich předešlého chromatografického dělení pro účely HTS)*

Čas [min]	Frakce s označením 10-18		Frakce s označením 19-27		Frakce s označením 28-35	
	A [%]	B [%]	A [%]	B [%]	A [%]	B [%]
0	15	85	15	85	15	85
2	15	85	15	85	15	85
7	28	72	56	44	80	20
37	66	34	96	4	100	0
38	100	0	100	0	100	0
43	100	0	100	0	100	0
44	15	85	15	85	15	85
48	15	85	15	85	15	85

První analýza (nástřík 10 µl) vždy sloužila k navržení frakcionace podle profilu chromatogramu a hmotnostního spektra. Jednotlivé frakce byly následně během další analýzy (nástřík 25 µl) jímány do zkumavek podle retenčního času.

Zkumavky s frakcemi byly umístěny do vakuového koncentrátoru miVac QUATTRO, kde byly odpařovány za sníženého tlaku až do úplného vysušení. Před testováním bylo k zakonzentrovaným frakcím přidáno 17,5 µl DMSO a 1 732,5 µl DMEM, aby bylo dosaženo přibližně stejné koncentrace látek, v jakých se získané konstituenty nalézaly v primární frakci při koncentraci frakce 25 µg/ml. Po prvním přidavku DMSO byly zkumavky na 18 minut umístěny na třepačku. Po přidavku DMEM byly opět zkumavky umístěny na třepačku (10 minut). Tento krok probíhal až těsně před teatmentem buněk, aby nedošlo k vyvázání aktivních složek ve frakcích proteiny obsaženými v médiu. „Refrakce“ byly testovány na buněčných liniích MDA-MB231 a BJ při nasazení 5 000 buněk/jamku. Inkubační čas byl 72 hodin a po jeho uplynutí byly výsledky vyhodnoceny pomocí MTT testu.

### 3.10 Výroba extraktu z biomasy

Pro přípravu extraktu byla použita lyofilizovaná sinicová biomasa kmene s označením Brasilonema z let 2018 (1,750 g) a 2020 (4,285 g). Přibližně 6 g lyofilizované biomasy bylo



extrahováno pomocí 300 ml 70% methanolu a tato směs byla společně s mořským pískem homogenizována v třecí misce. Methanol (70%) byl použit jako univerzální rozpouštědlo, díky kterému byl zajištěn relativně nízký obsah pigmentů a vysoký obsah sekundárních metabolitů. Následně byla vzniklá směs převedena do skleněné kyvety, 5 minut sonifikována a poté centrifugována (15 min., 5 000 RPM).

Supernatant byl převeden do baňky s kulatým dnem a umístěn do vakuové rotační odparky (vakuum 30 Pa, teplota 37 °C). Po odpaření bylo do baňky přidáno 25 ml 70% methanolu a obsah byl 5 minut sonifikován. Obsah baňky byl převeden do centrifugační zkumavky a poté centrifugován (10 min., 8 000 RPM).

Supernatant byl převeden do zkumavky a jeho část byla analyzována pomocí HPLC-HRMS analýzy. Tento krok sloužil k ověření, že studované látky se skutečně v nově připraveném extraktu nacházejí.

Nově připravený extrakt po ověření přítomnosti látek byl v dalším kroku použit pro izolaci těchto látek.

### 3.11 Izolace vybraných látek ( $m/z$ ) pro následnou analýzu HPLC

Pro izolaci vybraných látek se selektivním účinkem na rakovinné linie ze sinicového extraktu byla vybrána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v semipreparativním provedení. Konkrétně byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent HP 1100 Series s DAD detekcí. K separaci byla využita kolona Agilent Eclipse XDB-C18 (9,4×250 mm, 5 $\mu$ m). Použitá mobilní fáze byla kombinací vody a acetonitrilu obojí s přidavkem kys. mravenčí (FA, 0,1%). Nastavený gradient shrnuje přiložená tabulka (Tabulka 11). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 2,5 ml/min, nástřik 900  $\mu$ l.

Tabulka 11: Nastavený gradient pro metodu Agilent HP 1100 s DAD detekcí

Čas [min]	Acetonitril+FA [%]	Voda+Fa [%]
0	15	85
10	25	75
30	45	55
32	100	0
47	100	0
50	15	85
55	15	85

DAD detektor zaznamenával signál pro čtyři vlnové délky, a to 275, 282, 400 a 660 nm. Tyto vlnové délky byly nastaveny dle absorpce vybraných látek stanovených v předešlé analýze. První analýzy sloužily pouze k upravení gradientu, aby bylo docíleno optimálního

profilu. V dalších separacích byly do zkumavek jímány všechny frakce, které byly následně analyzovány na HPLC-HRMS (nastavení stejné jako v kapitole 3.4). Díky této analýze byly posléze jímány jenom frakce obsahující konkrétní látku ( $m/z$ ).

### 3.12 Příprava roztoků z izolovaných „látek“ ( $m/z$ )

Frakce, které byly získány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie Agilent HP 1100 Series s DAD detekcí, byly lyofilizovány (CoolSafe<sup>TM</sup>, SCANVAC). Lyofilizované látky byly opatrně přeneseny do 5 ml vialek za současného postupného rozpuštění a sonifikace v celkovém objemu 1 200  $\mu$ l methanolu.

Látky byly odpařeny pod dusíkem do sucha a následně opět rozpuštěny v acetonitrilu (sonifikace 10 minut). Získaný objem byl převeden do 1,5 ml vialek, která byly předtím na 30 minut umístěny do exsikátoru a zváženy na analytických vahách. Z celkového objemu bylo odepráno 50  $\mu$ l pro ověření čistoty látek pomocí HPLC-HRMS analýzy (nastavení stejné jako v kapitole 3.4). Rozpouštědlo bylo opět odpařeno pod dusíkem a vialky byly znovu na 30 minut umístěny do exsikátoru. Po této době byly vialky obsahující vyizolované látky zváženy.

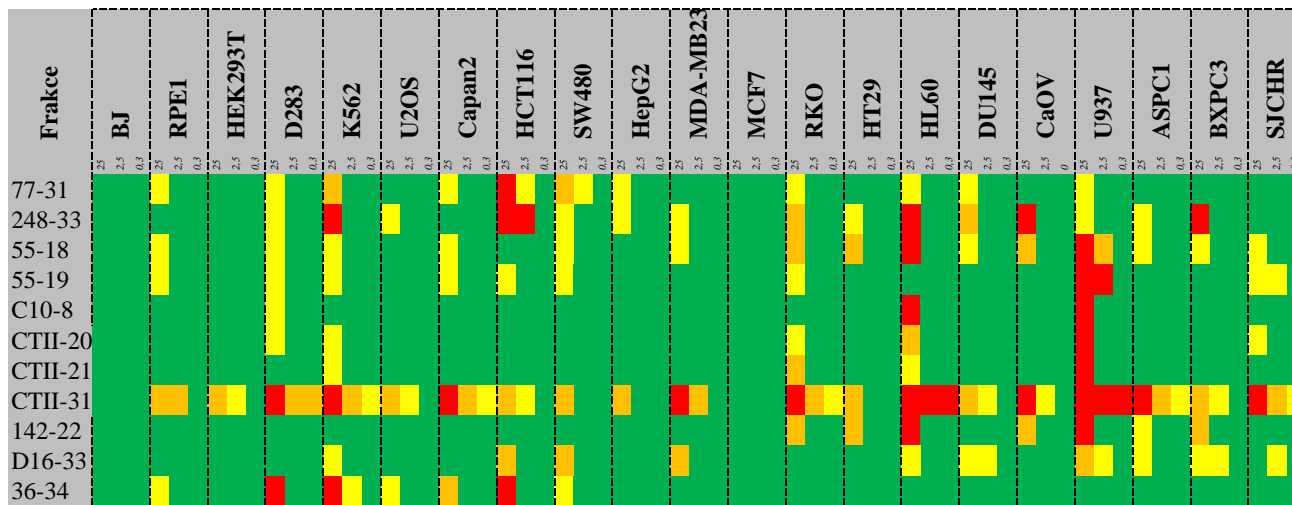
Kvůli předchozím problémům s rozpouštěním látek (neoptimální rozpustnost v methanolu a acetonitrilu) bylo jako finální rozpouštědlo zvoleno DMSO. Do každé vialky byl přidán odpovídající objem DMSO, aby finální roztok odpovídal koncentraci 4 mM (Tabulka 12).

*Tabulka 12: Získané množství izolovaných látek a objem potřebný k získání 4 mM roztoku těchto látek*

Látka [ $m/z$ ]	Navážka [g]	mg/ml pro koncentraci 4 mM	Objem pro dosažení 4 mM koncentrace [ $\mu$ l]
393,3	0,59	1,5732	375,0
824,4	1,09	3,2976	330,5
874,3	0,77	3,4972	220,2
607,3	4,02	2,4292	1654,9



hmotnostními spektry poskytly další informace pro výběr konkrétních frakcí, se kterými byly dále prováděny testy na buněčných liniích.



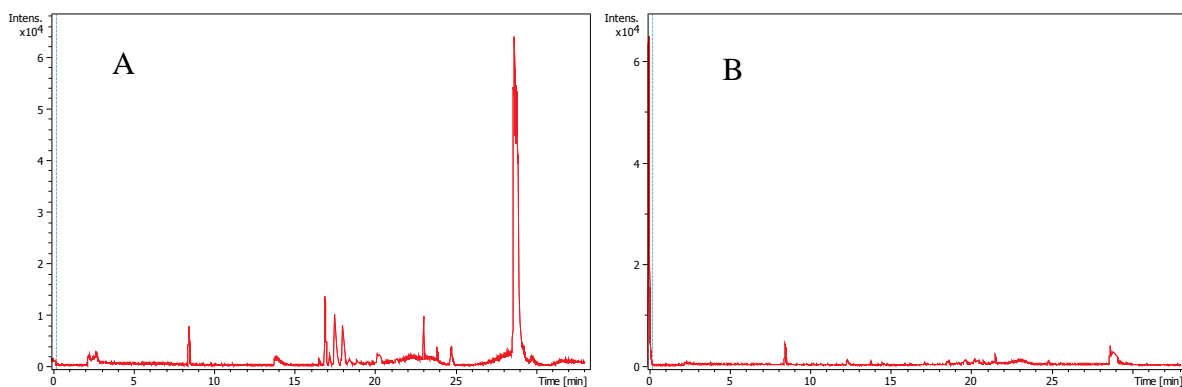
Obrázek 22: Ukázka výběru frakcí pro následnou HPLC-HRMS analýzu. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–80% a zelená 80–100%

## 4.2 Výběr frakcí pro validaci

Výběr konkrétních frakcí pro další analýzu na vybraných buněčných liniích byl podmíněn splněním tří stanovených priorit:

1. Vysoká bioaktivita v rakovinné buněčné linii a nízká v primární buněčné linii, jedinečná sloučenina viditelná v MS spektru.
2. Dobrá bioaktivita, přijatelná pro primární buněčnou linii, unikátní sloučenina v MS spektru.
3. Určitá bioaktivita, ale žádné sloučeniny viditelné v MS spektru.

Chromatogramy frakce CTII-22 a c10-7 (Obrázek 23) ukazují rozdílnost analyzovaných primárních frakcí a důležitost přítomnosti unikátních peaků s konkrétním MS spektrem (zahrnuto v každém kritériu). Během chromatografické analýzy primárních frakcí byla jejich část z dalšího postupu vyřazena, právě kvůli HPLC-HRMS profilu. Ne každá látka je schopná ionizovat v nastavených podmínkách. Zároveň mohl být profil v malé míře ovlivněn i řaděním primárních frakcí před nástřikem na chromatografickou kolonu. Tato analýza vyřadila poměrně velké množství zajímavých „hitů“.



Obrázek 23: Ukázkové chromatogramy dokazující rozdílnost „viditelného množství“ přítomných peaků, oba chromatogramy jsou ve stejné intenzitě; A primární frakce CTII-22; B primární frakce c10-7

Na základě těchto kritérií bylo pro validační experimenty vybráno celkem 56 frakcí, které nejlépe splňovaly uvedená kritéria, a to vůči rakovinné linii MDA-MB231 řadící do skupiny tzv. „triple-negativních“ karcinomů prsu (1.10.1). Z důvodu obtížné léčby tohoto typu nádorového bujení byla pro diplomovou práci zvolena „hlavní“ nádorovou linií.

Přiložená tabulky ukazují komplexnost jednotlivých frakcí z pohledu nalezených peaků a současně prioritu jakou měla frakce pro analýzu (Tabulka 13).

Tabulka 13: Seznam všech 56 vybraných primárních frakcí pro validaci s počtem nalezených peaků a stanovenou prioritou

Označení primární frakce	Počet nalezených peaků	Priorita	Označení primární frakce	Počet nalezených peaků	Priorita	Označení primární frakce	Počet nalezených peaků	Priorita	Označení primární frakce	Počet nalezených peaků	Priorita
114-12	6	1	112-30	5	2	68-33	1	1	183-29	9	2
114-19	5	2	112-31	6	1	68-35	2	1	183-30	8	1
114-25	5	1	5-18	11	1	69-25	11	2	183-31	9	2
221-28	5	1	85-31	10	1	69-29	11	1	183-32	9	1
221-29	5	2	85-34	7	1	69-30	8	1	44-25	6	2
221-32	4	2	111-28	13	2	CTII-10	5	1	44-27	5	2
221-34	3	1	119-28	9	1	CTII-11	11	1	44-33	4	2
221-35	4	1	119-30	7	1	CTII-16	7	1	44-35	4	1
32-31	2	2	119-32	8	1	CTII-19	10	2	58-31	2	1
32-32	1	3	119-35	6	2	CTII-22	12	1	58-32	3	1
32-33	1	3	26-12	4	1	CTII-29	10	1	58-33	2	1
252-15	4	1	26-25	6	1	CTII-30	11	2			
249-29	10	2	26-28	7	2	CTII-31	9	2			
249-31	10	1	68-29	2	1	CTII-32	7	2			
249-32	4	1	68-32	1	1	183-27	12	1			

### 4.3 Výsledky validačních experimentů

Všechny vybrané primární frakce byly znovu testovány na buněčných liniích. V prvním fázi probíhalo testování na rakovinné linii MDA-MB231 a primární linii BJ. Celkem bylo testováno 56 primárních frakcí. Experimenty probíhaly ve schématu: nasazení

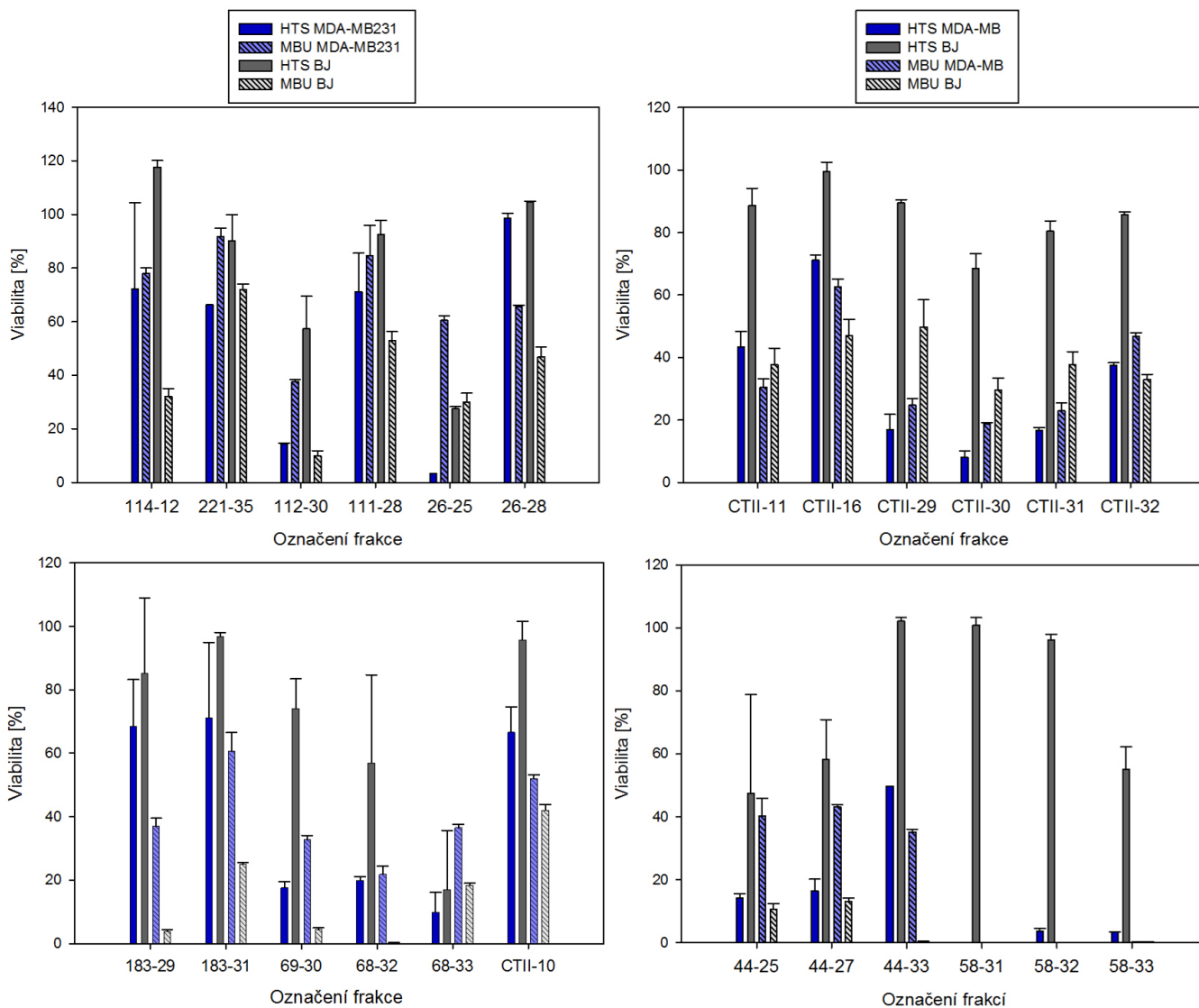
5 000 buněk/jamku, po 24 hodinách treatment třemi koncentracemi (25; 2,5 a 0,25 µg/ml) v triplikátech, inkubační doba 72 hodin, vyhodnocení CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0.

Analýza HTS dat poskytla následující výsledky, které byly validací ověřovány. Z celkového počtu mělo 39 primárních frakcí inhibiční efekt na rakovinnou linii MDA-MB231 pouze v jedné koncentraci (převážná většina v koncentraci 25 µg/ml). Přes dvě koncentrace (2,5 a 25 µg/ml) vykazovalo inhibiční efekt 14 primárních frakcí. Pouze 3 primární frakce vykazovaly efekt táhnoucí se přes všechny tři koncentrace (0,25; 2,5 a 25 µg/ml). Naproti tomu pouze 17 vybraných primárních frakcí mělo inhibiční efekt na buněčnou linii BJ, a to převážně v nejvyšší koncentraci (25 µg/ml).

Při validaci docházelo k získávání naprosto odlišných výsledků viabilit u buněčné linie BJ v porovnání s daty z HTS. Všechny primární frakce vykazovaly inhibiční účinek proti této linii. Aktivitu v nejvyšší koncentraci (25 µg/ml) vykazovalo 24 primárních frakcí, ve dvou koncentracích (2,5 a 25 µg/ml) 18 primárních frakcí a ve všech třech koncentracích (0,25; 2,5 a 25 µg/ml) vykazovalo inhibiční efekt dokonce 14 frakcí.

U nádorové linie MDA-MB docházelo naopak převážně ke ztrátám původního inhibičního efektu. Úplná ztráta byla pozorována u 14 primárních frakcí. Aktivita v nejvyšší koncentraci (25 µg/ml) byla stále pozorována u 34 primárních frakcí (původně 39). Inhibiční efekt ve dvou frakcích (2,5 a 25 µg/ml) byl zachován u 5 primárních frakcí (původně 14). Avšak 3 primární frakce si ponechaly svůj efekt přes všechny tři koncentrace (0,25; 2,5 a 25 µg/ml). Jednalo se o primární frakce s označením CTII-29, CTII-30 a CTII-31. Tyto 3 frakce ovšem nyní vykazovaly stejný efekt i na primární buněčnou linii BJ.

Z procentuálního hlediska u 45% primárních frakcí stoupla viabilita u MDA-MB231 o 10–20%. Pouze u 21% primárních frakcí zůstala hodnota viability u MDA-MB231 při porovnání HTS a MBU (označení experimentů provedených na mikrobiologickém ústavu) zachována. Ve zbylých případech hodnoty viability vzrostly o více než 20%. Příklady výsledků, které dokazují výše uvedená tvrzení jsou demonstrovány na grafech uvedených níže (Obrázek 24).



Obrázek 24: Srovnání výsledků viabilit HTS a MBU pro buněčné linie BJ a MDA-MB231, při koncentraci primárních frakcí 25  $\mu\text{g/ml}$

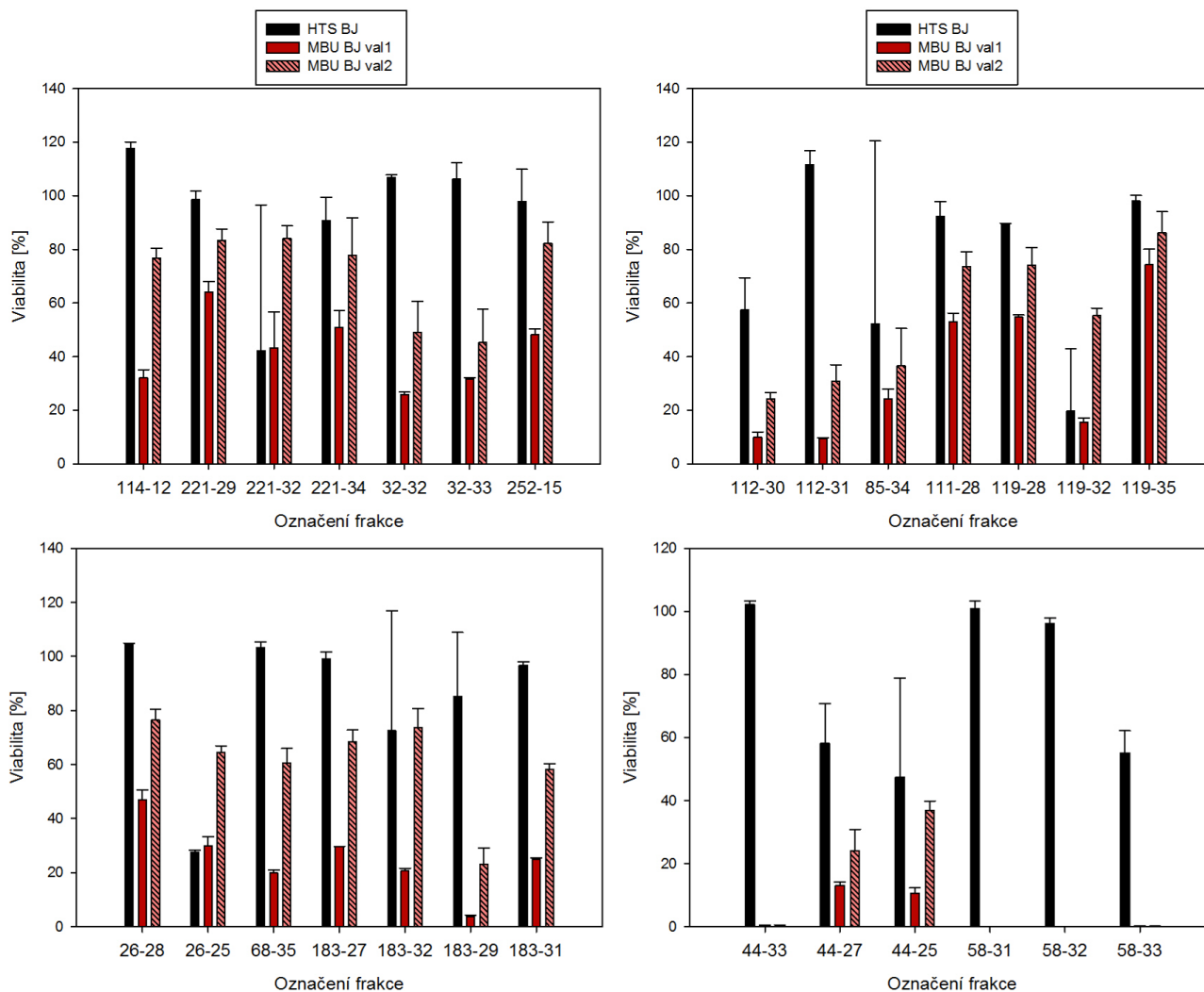
#### 4.3.1 Validační experimenty na buněčné linii BJ

Výsledky, které byly získány po prvních validačních experimentech, evokovaly problém v práci s buněčnou linií BJ. Z logického předpokladu, pokud docházelo ke ztrátě inhibičního efektu primárních frakcí na rakovinnou linii MDA-MB231, nemělo by současně docházet ke zvyšování efektu na buněčnou linii BJ. Samozřejmě při zanedbání možnosti, že by rozpadem látek účinných na MDA-MB231 vznikly látky s efektivním a selektivním účinkem na BJ. Tato možnost se zdá nepravděpodobná s ohledem na delší dobu skladování frakcí v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hlavním problémem byl tedy nově se objevující efekt na primární linii BJ u primárních chromatografických frakcí, které tento efekt původně nevykazovaly.

Celkem 27 (z původních 56) primárních frakcí bylo opětovně testováno na buněčné linii BJ. Schéma experimentu se lišilo pouze v počtu nasazení buněk. Nasazeno bylo

13 000 buněk/jamku (přesně odpovídající densitě nasazení během HTS), které byly po 24 hodinách treatovány v triplikátech primárními frakcemi v koncentraci 25 µg/ml. Inkubační doba byla opět 72 hodin s vyhodnocením pomocí CellTiter-Glo® 2.0.

Následně byly porovnávány data z HTS (13 000 buněk/jamku), první validace MBU (5 000 buněk/jamku) a druhé validace MBU (13 000 buněk/jamku). Všechna data jsou pro přehledné porovnání graficky zobrazena níže (Obrázek 25).



Obrázek 25: Srovnání výsledků viabilit HTS, MBU val1 a MBU val2 pro buněčné linie BJ při koncentraci primárních frakcí 25 µg/ml

Z grafů je jednoznačně viditelný rozdíl viabilit v závislosti na množství nasazených buněk. Skoro ve všech experimentech s nasazením 13 000 buněk/jamku došlo ke zvýšení viability v porovnání s experimenty při nasazení 5 000 buněk/jamku. U nadpoloviční většiny došlo k navýšení viability o 20–40% oproti původním testům s nižším počtem buněk. Dokonce u primárních frakcí s označením 26-25 a 119-32 bylo dosaženo vyšší viability než v případě HTS.



U 9 testovaných primárních frakcí byla zjištěna buněčná viabilita pouze o 10–20% nižší než ta, která byla detekována pomocí HTS. O více než 50% nižší viabilitu v porovnání s výsledky HTS však stále vykazovalo 11 primárních frakcí z celkového počtu 27 testovaných frakcí.

Pouze u čtyř primárních frakcí (44-33, 58-31, 58-32, 58-33) byla při validačních experimentech detekována nulová viabilita. U těchto primárních frakcí nebyla mezi MBU validacemi zaznamenána žádná změna i přesto, že v rámci HTS validace dosahovaly hodnoty viabilit až 100%. Zřejmě zde došlo k rozpadu látek, který způsobil zvýšení toxicity frakcí.

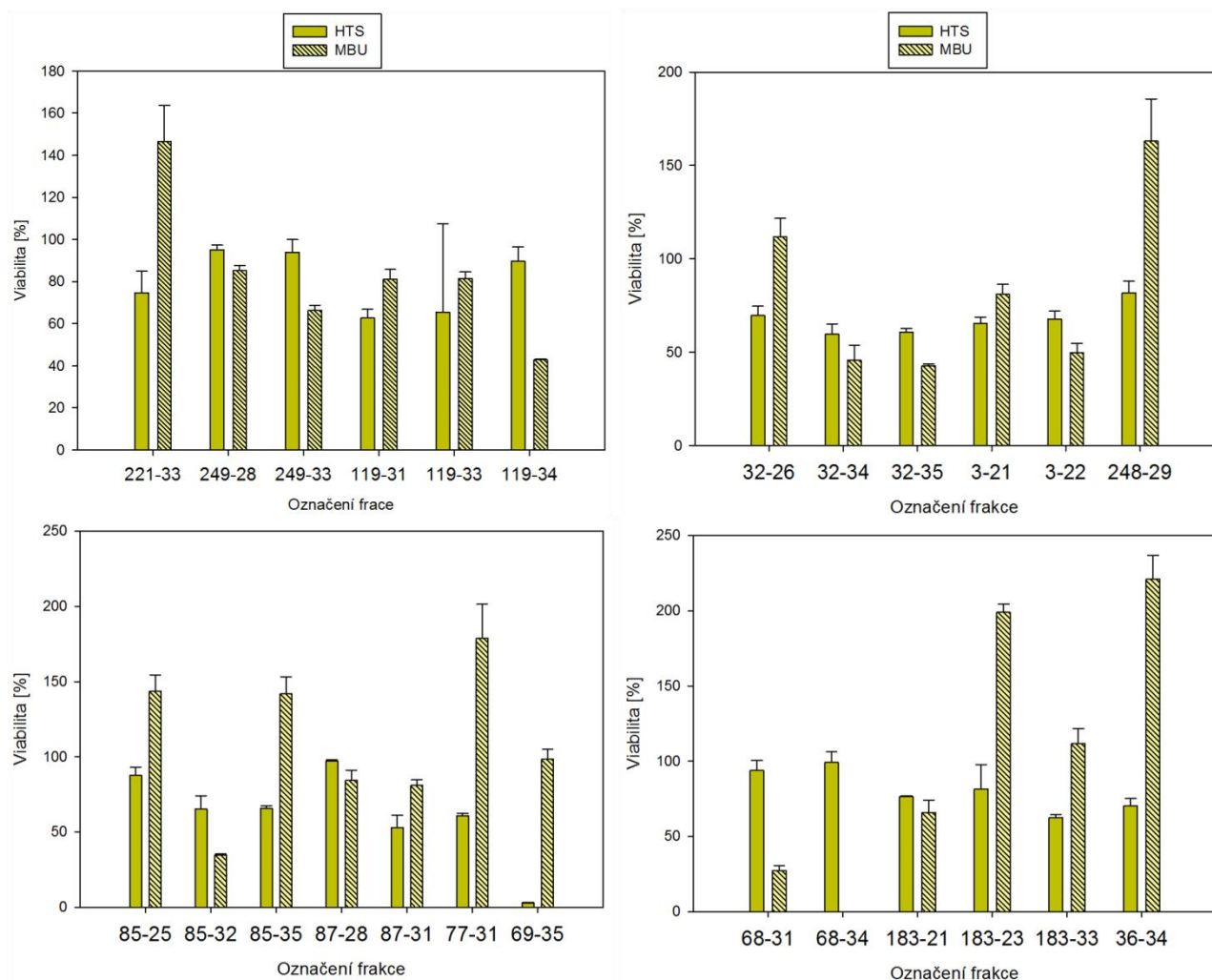
#### **4.3.2 Validační experimenty na buněčné linii RPE-1**

Buněčná linie RPE-1 byla použita jako druhá primární linie pro ověření možných inhibičních efektů. Experiment byl prováděn s nasazením 5 000 buněk/jamku (otestování ve vyšší densitě nebylo možné z časových důvodů). Treatment primárními frakcemi byl proveden opět po 24 hodinách. V inkubačním čase 72 hodin následovalo vyhodnocení pomocí CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0. Pro testování byla použita pouze nejvyšší koncentrace (25 µg/ml), a to z důvodu pozorované ztráty efektu ve dvou nižších koncentracích prakticky u všech testovaných frakcí v rámci prvních pokusů validace na MDA-MB231 a BJ (přílohy 9.2 a 9.1). Současně nebyl dostupný dostatečný objem některých frakcí.

V tomto pilotním experimentu, který byl zacílen na ověření porovnání odpovědi PRE-1 v HTS a během validace, bylo na buněčné linii RPE-1 25 primárních frakcí, které se neřadí do zmiňovaných 56 vybraných primárních frakcí. Všechny výsledky byly graficky zpracovány (Obrázek 26).

Výsledky prokázaly naprosto opačný trend než při validačních experimentech na primární buněčné linii BJ. Buňky RPE-1 dosahují ve většině případů stejné, ne-li vyšší viability než při HTS testování. Dohromady u 13 primárních frakcí bylo v rámci MBU experimentů na této buněčné linii dosaženo vyšší viability než u HTS. U pěti primárních frakcí překročila hodnota viability 150%.

Frakce s označením 68-34 se při validačním experimentu MBU projevila naprostým inhibičním efektem (viabilita pouze 7%). Naopak v případě HTS tato primární frakce vykazovala skoro 100% buněčnou viabilitu. Prakticky opačný efekt byl sledovaný u primární frakce s označením 69-35.



Obrázek 26: Srovnání výsledků viabilit HTS a MBU pro buněčnou linii RPE-1 při koncentraci primárních frakcí 25 µg/ml

#### 4.3.3 Komplexní porovnání dat HTS a MBU

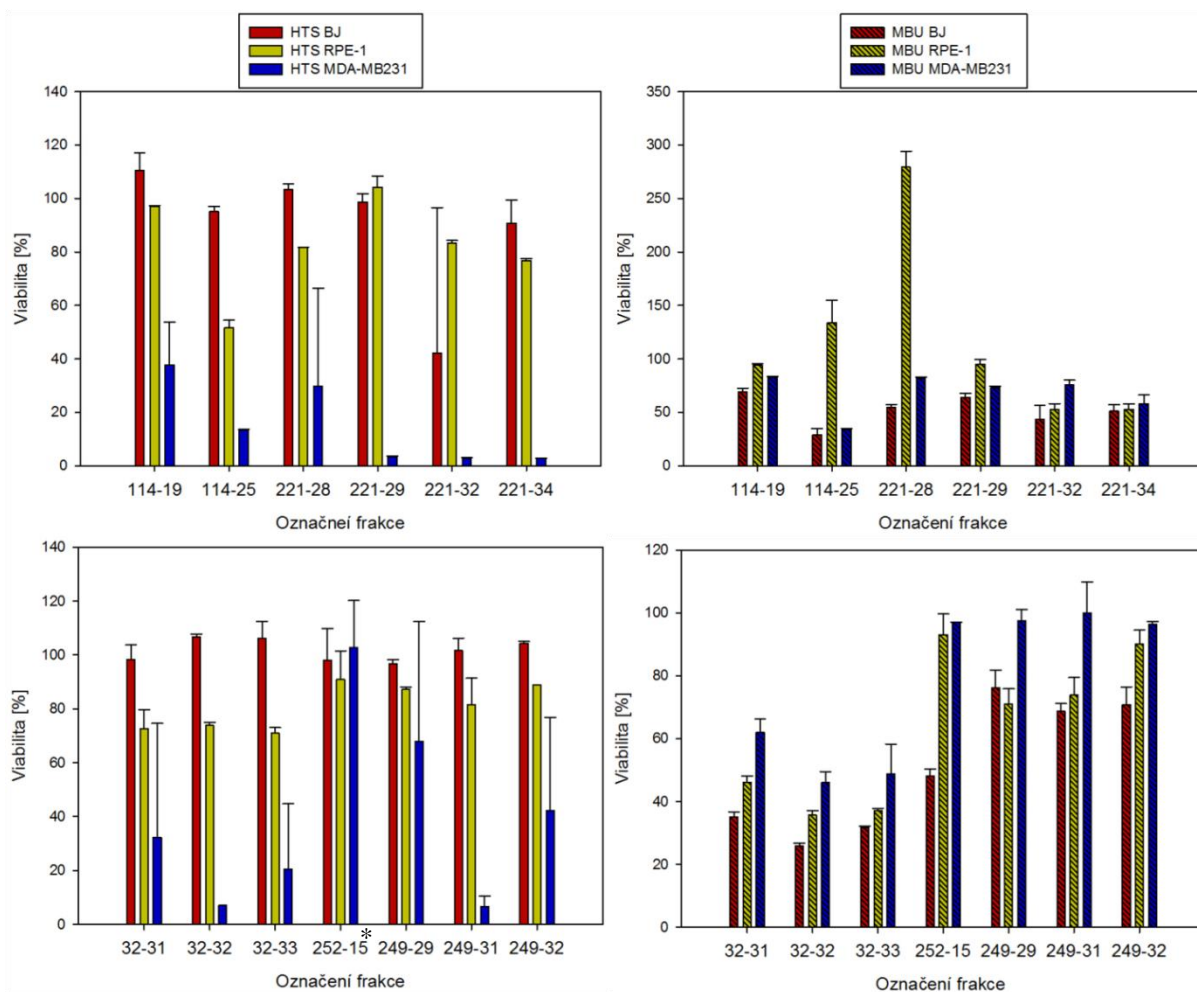
Inhibiční efekt primárních chromatografických frakcí byl testován na rakovinné linii MDA-MB231 a dvou kontrolních primárních liniích BJ a RPE-1. Počet provedených experimentů byl limitován frakčním objemem, který byl dostupný na MBU. Z tohoto důvodu nebyly všechny vybrané primární frakce (celkem 56) testovány na primární linii REP-1. Data pro všechny tři zmíněné buněčné linie byla získána pouze u 32 primárních frakcí, a to pouze pro nejvyšší koncentraci 25 µg/ml. U zbylých 23 frakcí byly získány výsledky pouze pro MDA-MB231 a BJ v prvním validačním kroku (viz. 4.3).

Komplexní soubor dat byl získán testování na buněčných liniích při nasazení 5 000 buněk/jamku. Treatment probíhal po 24 hodinách. Po uplynutí inkubační doby 72 hodin proběhlo vyhodnocení pomocí CellTiter-Glo® 2.0.

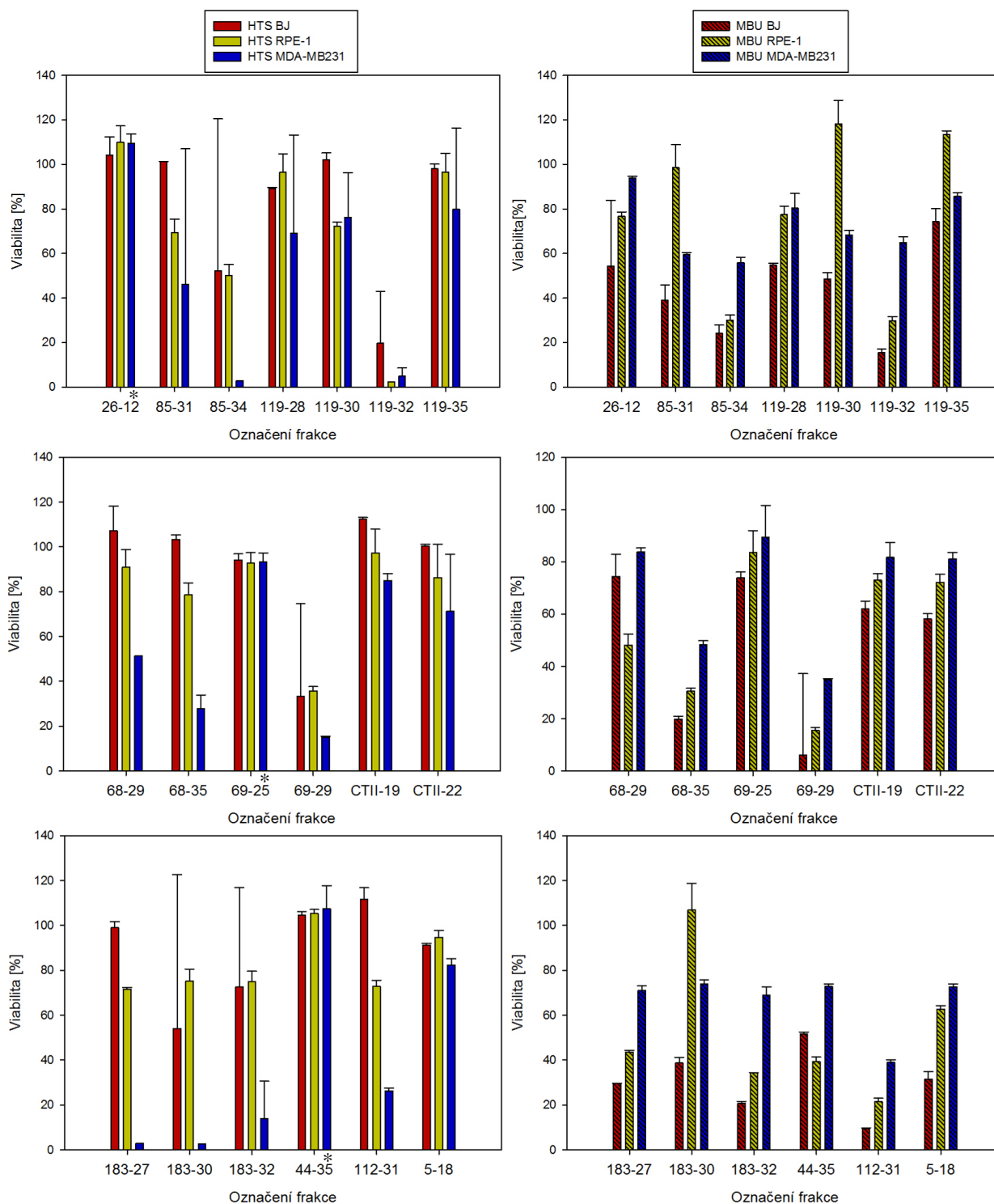
Zajímavá je hlavně rozdílnost získaných dat. V celém data setu se nenachází ani jedna primární frakce, která by vykazovala totožné výsledky pro HTS a MBU pro všechny tři buněčné linie.

Přesto, že validační výsledky na buněčné linii RPE-1 korespondovaly poměrně lépe než pro buněčnou linii BJ, což u některých frakcí vizuálně způsobilo vyšší viabilitu primární buněčné linie v porovnání s rakovinovou buněčnou linií MDA-MB231, nemůže být přehlédnut trend nárůstu viability u této nádorové linie. Za zmínku stojí absolutně obrácený „schodovitý“ efekt u některých primárních frakcí (např. 33-31, 33-32, 33-33, 183-32, CTII-19, CTII-22, atd.).

Následující data graficky prezentují porovnání viabilit získaných HTS a MBU experimenty u tří zmíněných buněčných linií (Obrázek 27, Obrázek 28). Levý graf vždy prezentuje výsledky HTS. Pravý graf představuje inhibiční efekt stejných frakcí při testování na MBU.



Obrázek 27: Grafické porovnání viabilit u tří buněčných linií MDA-MB231, BJ a RPE-1. Graf vlevo znázorňuje výsledky HTS a graf vpravo výsledky získané MBU experimenty. Frakce označené hvězdičkou byly testovány kvůli inhibičnímu efektu v nižší koncentraci při HTS.



Obrázek 28: Grafické porovnání viabilit u tří buněčných linií MDA-MB231, BJ a RPE-1. Graf vlevo znázorňuje výsledky HTS a graf vpravo výsledky získané MBU experimenty. Frakce označené hvězdičkou byly testovány kvůli inhibičnímu efektu v nižší koncentraci při HTS.

#### 4.4 Frakcionace primárních frakcí

Pro frakcionaci bylo vybráno 14 primárních frakcí (Tabulka 14), které v předchozích testech vykazovaly stabilní významný efekt na nádorovou linii MDA-MB321. Nově získané frakce z primárních frakcí byly testovány na buněčných liniích MDA-MB231 a BJ při nasazení 5 000 buněk/jamku a treatmentu po 24 hodinách v koncentraci 25 µg/ml. Inkubační čas experimentu byl 72 hodin. Vyhodnocení probíhalo pomocí MTT.

Tabulka 14: Výběr 14 primárních frakcí pro „refrakcionaci“ a počet nově vzniklých frakcí

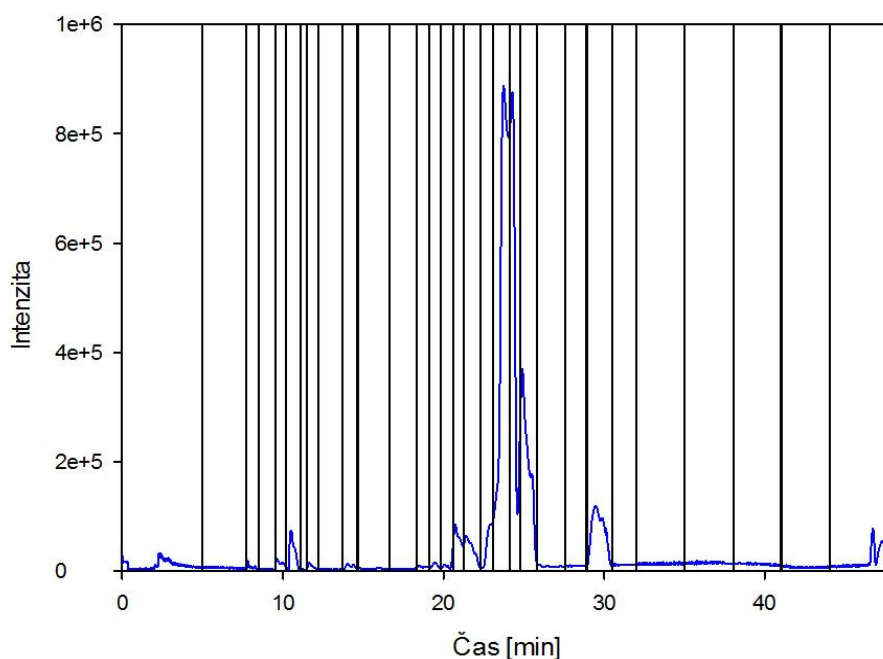
Označení primární frakce	Počet „refrakcí“ z primární frakce	Označení primární frakce	Počet „refrakcí“ z primární frakce
69-29	18	CTII-13	34
85-31	24	CTII-16	26
58-31	16	CTII-29	32
119-30	27	CTII-30	29
CTII-10	26	CTII-31	28
CTII-11	29	CTII-32	22
CTII-12	26	CTII-33	28

Celkem čtyři primární frakce po „refrakcionaci“ již nevykazovaly žádný významný účinek vůči rakovinné linii MDA-MB231, a to v žádné z nově získaných frakcí. V pěti primárních frakcích byl patrný určitý účinek proti rakovinné linii MDA-MB231 v některé z nově získaných frakcí. V posledních pěti primárních frakcích byly po „rekrakcionaci“ objeveny „hity“ s náznakem selektivního účinku proti rakovinné linii MDA-MB231 a přijatelným efektem na primární buněčnou linii BJ. Nejlepší výsledky byly zaznamenány u sinicového kmene Brasilonema (CTII), ze kterého byly všechny zřejmé „hity“.

Výsledky MTT testů (příklad uveden na Obrázek 29) byly spárovány s chromatogramy (na příkladu Obrázek 30) a hmotnostními spektry získanými během frakcionace. Tyto informace umožnily ke každému „hиту“ přiřadit peak o určitém retenčním čase a  $m/z$  (Tabulka 15).



Obrázek 29: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-31. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%. Hvězdička označuje frakce, kde došlo k poklesu viability u MDA-MB231 o minimálně 15% v porovnání s BJ.



Obrázek 30: Chromatogram frakce CTII-31 a přesné označení frakcionace

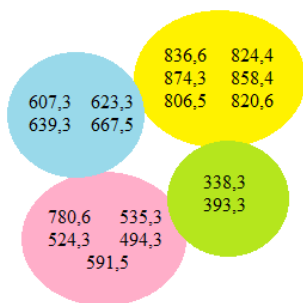
Tabulka 15: Přehled nalezených „látek“ ( $m/z$ ) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-31, křížky označují frakci bez přítomného  $m/z$

CTII-31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Čas [min]	5-7,7	8,5	9,5	10,2	11,0	11,5	12,2	13,7	14,6	16,6	18,3	19,0	19,8	20,5
$m/z$	×	229,1	×	387,2	258,3	×	286,3	×	625,3	×	×	609,3	836,6	535,3
CTII-31	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Čas [min]	21,2	22,3	23,1	24,0	24,7	25,8	27,6	28,9	30,5	32,0	35,0	38,0	41,0	44,0
$m/z$	639,3	623,3	820,6	607,3	607,3	607,3	×	×	338,3	×	×	×	×	×

Na uvedených ukázkových datech v této kapitole můžeme pozorovat, že nová frakce získaná refrakcionací primární frakce CTII-31 (označena číslem 18) má významný inhibiční efekt. V této frakci byla viabilita rakovinné linie MDA-MB231 snížena na rozmezí hodnot 0–30%, zatímco viabilita u BJ byla snížena pouze na rozmezí 50–70% (Obrázek 29). Frakci 18 odpovídá nejvyšší peak chromatogramu primární frakce CTII-31. Současně si můžeme všimnout, že „látka“ o konkrétním  $m/z$  ve frakci 18 byla detekována i ve dvou následujících fracích. Tomu odpovídá rozložení peaku v chromatogramu (Obrázek 30), ale i postupná snižující se viabilita (Obrázek 29). Stejně bylo uvažováno u všech výsledků, které byly získány frakcionací původních frakcí. Všechny výsledky (tabulky a chromatogramy) jsou k nahlédnutí v přílohách (9.2).

Díky těmto komplexním informacím bylo vytipováno několik „látek“ o konkrétním  $m/z$ , které by mohly být vhodné pro izolaci a následující testy v čistém stavu. Všechny vytipované látky zodpovědné za inhibiční efekt byly rozděleny do čtyř skupin (Obrázek 31).

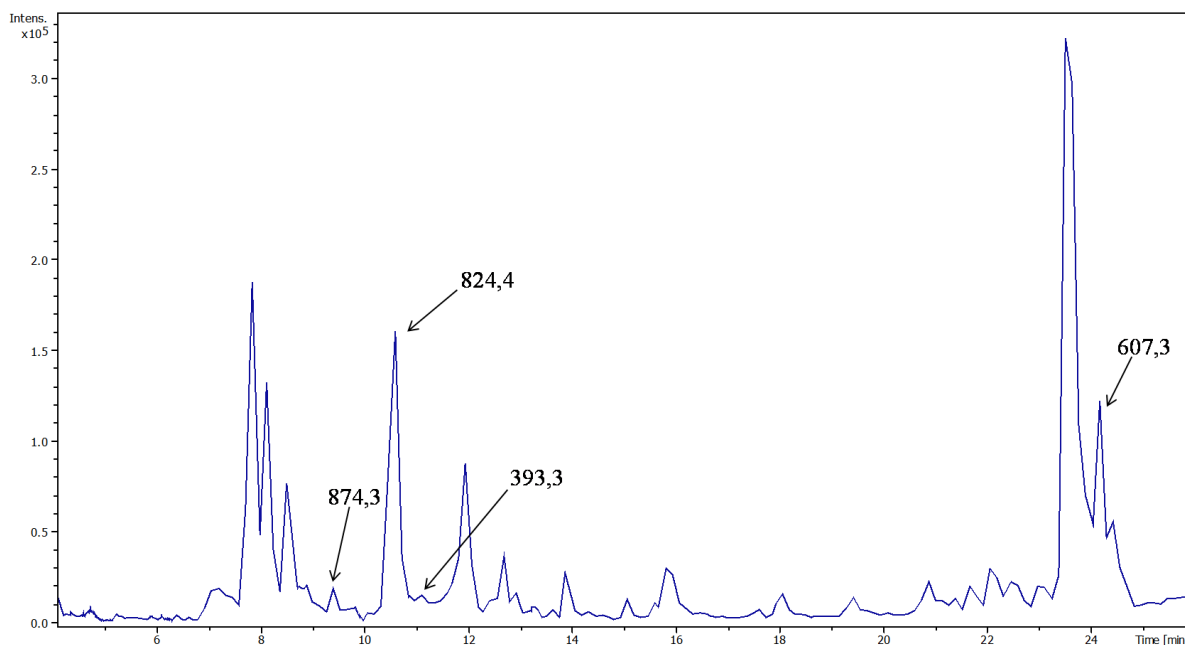
Celkem čtyři z těchto „látek“ ( $m/z$ ) byly vybrány pro další práci: 607,3; 393,3; 874,3 a 824,4.



Obrázek 31: Rozdělení „látek“ ( $m/z$ ), které se jeví jako zodpovědné za inhibiční efekt, do čtyř skupin, podle jejich molekulové hmotnosti.

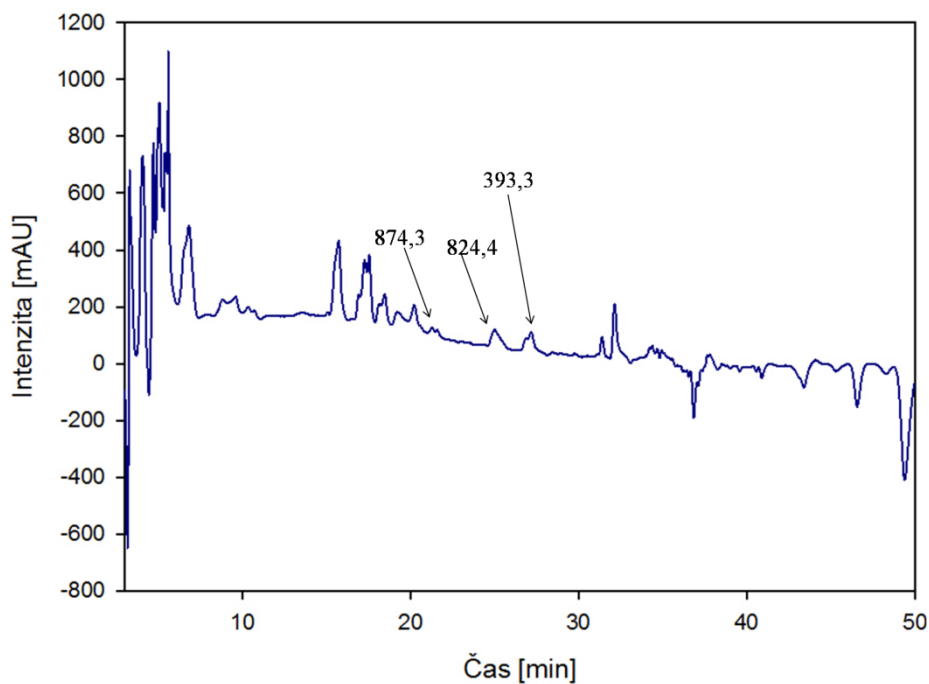
#### 4.5 Izolace látek

Nejprve bylo nutné ověřit přítomnost vybraných „látek“ ( $m/z$ ) v nově připraveném extraktu z lyofilizované biomasy sinicového kmene *Brasilonema*. Pokud by se jednalo o produkty rozpadu jiné látky nemusely by být vybrané „látky“ ( $m/z$ ) v novém extraktu přítomné. Stejně tak, jako nebylo jisté, že použitá lyofilizovaná biomasa bude obsahovat stejné „látky“ ( $m/z$ ). Přiložený chromatogram (Obrázek 32) dokazuje přítomnost všech výtípaných „látek“ ( $m/z$ ).

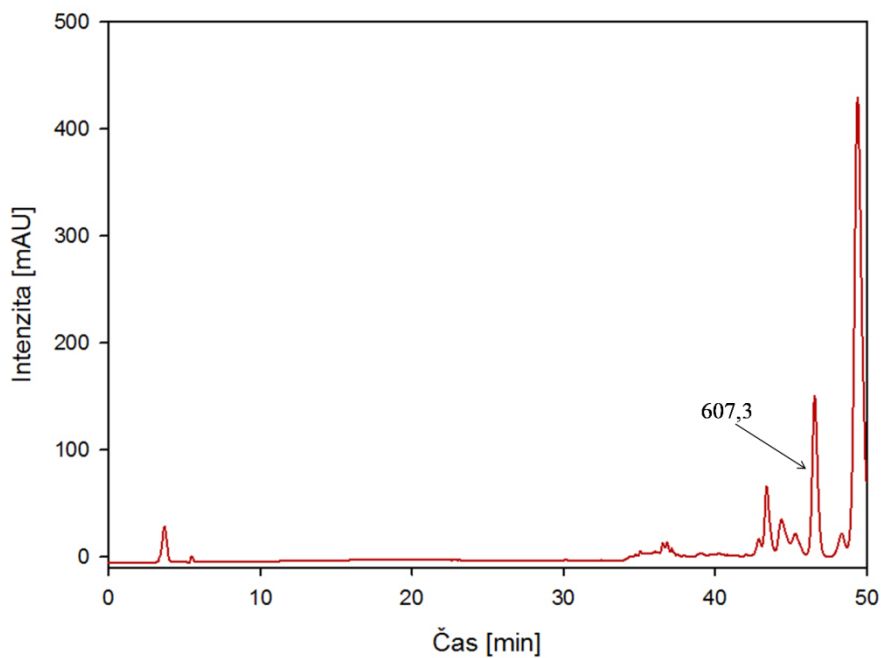


Obrázek 32: HPLC-HRMS chromatogram nového extraktu s označenými „látkami“ ( $m/z$ ), nejedná se o celkový chromatografický profil, ale o přibližnou část, kde se nachází hledané „látky“ ( $m/z$ )

Po ověření byly vybrané „látky“ ( $m/z$ ) izolovány pomocí semipreparativní kapalinové chromatografie s DAD detekcí. Na přiložených chromatogramech (Obrázek 33, Obrázek 34) jsou označeny peaky, které byly ze účelem izolace jímány. Až později při ověřování čistoty se ukázalo, že „látka“ 393,3 ( $m/z$ ) nemá žádnou absorpci, přesto se však podařila vyizolovat ve směsi (viz. níže).



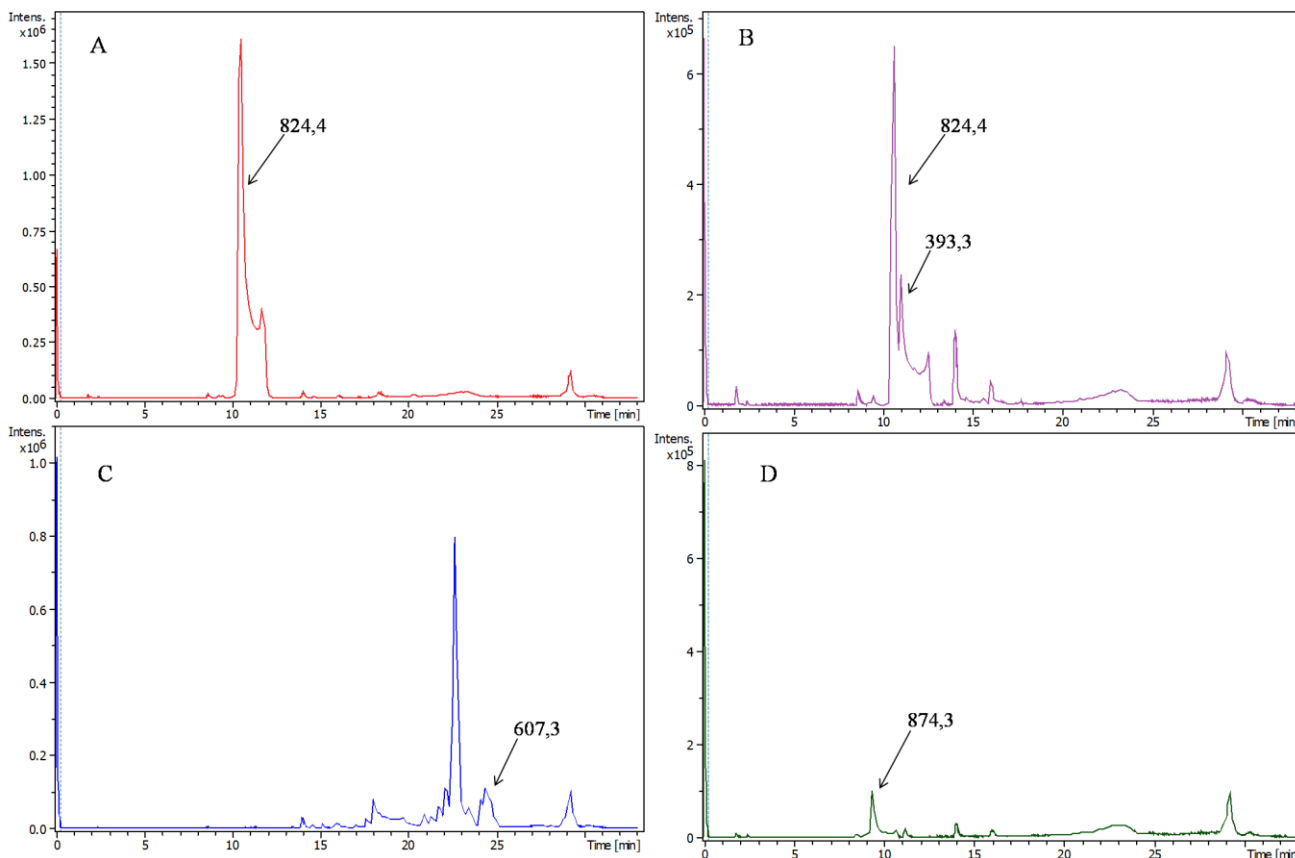
Obrázek 33: Chromatogram pro vlnovou délku 282 nm



Obrázek 34: Chromatogram pro vlnovou délku 660 nm



Čistota vyizolovaných látek byla ověřena za pomoci HPLC-HRMS analýzy (Obrázek 35). „Látky“ 824,4 a 874,3 ( $m/z$ ) byly vyizolovány v přijatelné čistotě. U „látky“ 607,3 bylo patrné výrazné znečištění několika dalšími sloučeninami a výsledná čistota byla <10%. „Látku“ 393,3 ( $m/z$ ) se podařilo vyizolovat pouze ve směsi společně s „látkou“ 824,4.



Obrázek 35: Ověření čistoty „látek“ ( $m/z$ ). A: 824,4; B: směs 824,4 a 393,3; C: 607,3; D: 874,3

#### 4.6 Ověření inhibičního účinku „čistých látek“

Experimenty probíhaly na třech rakovinných liniích (MDA-MB231, K562 a U937) a dvou kontrolních primárních liniích (BJ a RPE-1). Vždy se nasazovalo 5 000 buněk/jamku. V případě adherentních buněčných linií byly buňky ošetřeny látkami po 24 hodinách. Neadherentní buněčné linie se treatovaly okamžitě po nasazení. Koncentrační rozmezí bylo zvoleno následovně: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1563  $\mu\text{g/ml}$ . Inkubační doba byla o pět 72 hodin s vyhodnocením pomocí CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0.

#### 4.7 Ověření inhibičního účinku „látky“ 824,4

„Látka“ 824,4 byla vybrána z výsledků refrakcionace primární frakce s označením CTII-11, kdy byl u této refrakce viditelný pokles viability u nádorové linie MNA-MB231 na 0–30%. Současně „látka“ vykazovala efekt v refrakci primární frakce CTII-10, kde došlo k poklesu

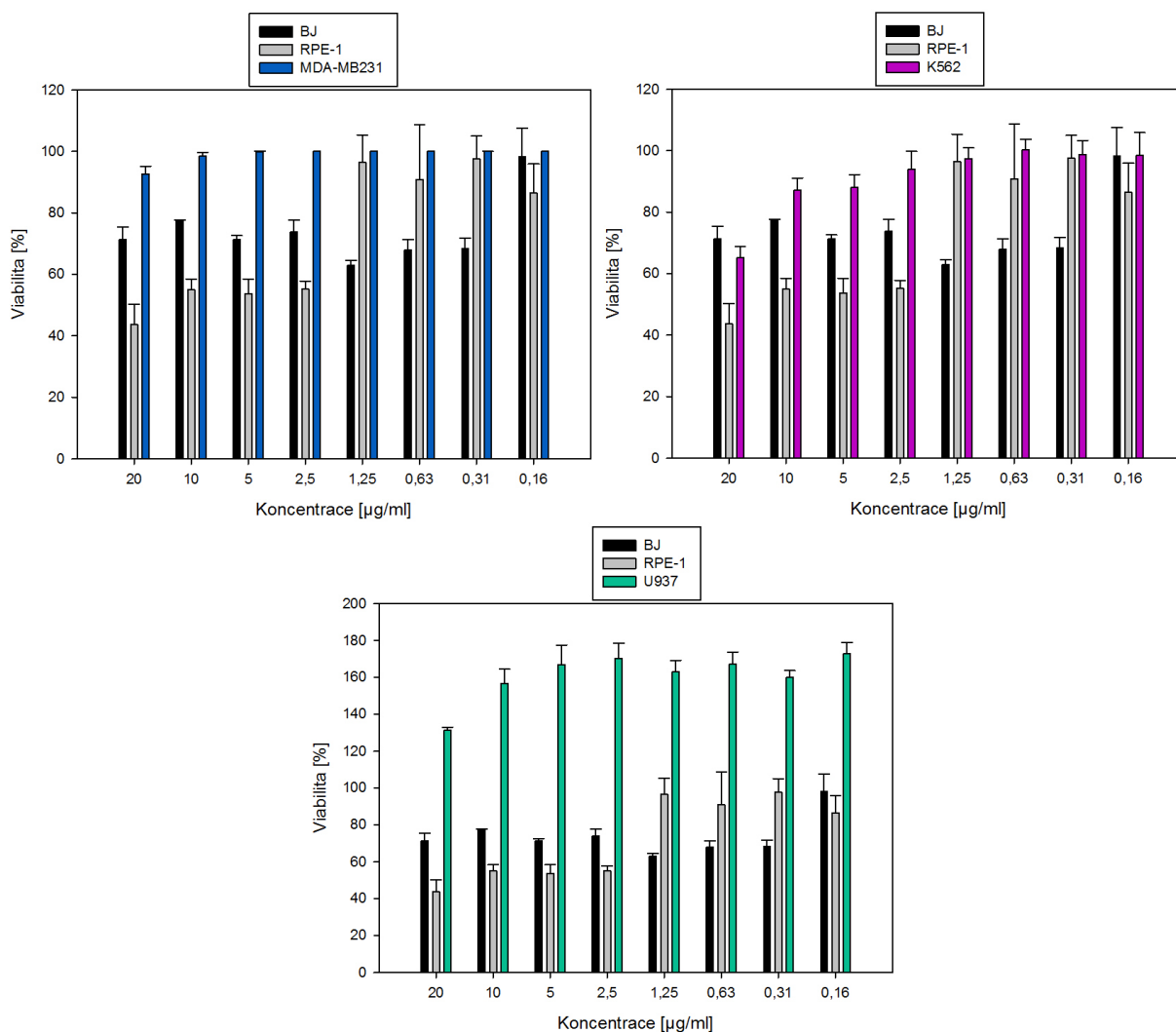
buněčné viability rakovinné linie MDA-MB231 na rozmezí 50–70%. Při následném testování „čisté látky“ došlo k naprosté ztrátě efektu (Obrázek 36).

U nádorové linie MDA-MB231 byla viabilita v nejvyšší koncentraci (20  $\mu\text{g/ml}$ ) snížena na 76%. Následně se snižující se koncentrací „látky“ docházelo k ustálení viability okolo 100%.

Největší negativní efekt byl pozorován u nádorové buněčné linie K562. V nejvyšší koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  došlo k poklesu viability na hodnotu 65%. Se snižující koncentrací docházelo opět k nárůstu viability.

Nádorová linie U937 nebyla negativně ovlivněna. Docházelo spíše k podpoře buněčné proliferace (hodnoty buněčné viability až 170 %).

U primární buněčné linie BJ byl pozorován inhibiční efekt táhnoucí se přes všechny koncentrace až na nejnižší (0,1563  $\mu\text{g/ml}$ ). Druhá testovaná primární linie RPE-1 vykazovala snížení viability okolo 50% u čtyř nejnižších koncentrací (20; 10; 5 a 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ).



Obrázek 36: Porovnání viabilit nádorových linií MDA-MB231, K562 a U937 s primárními liniemi BJ a RPE-1 pro „látku“ 824,4

#### 4.8 Ověření inhibičního účinku „látky“ 393,3

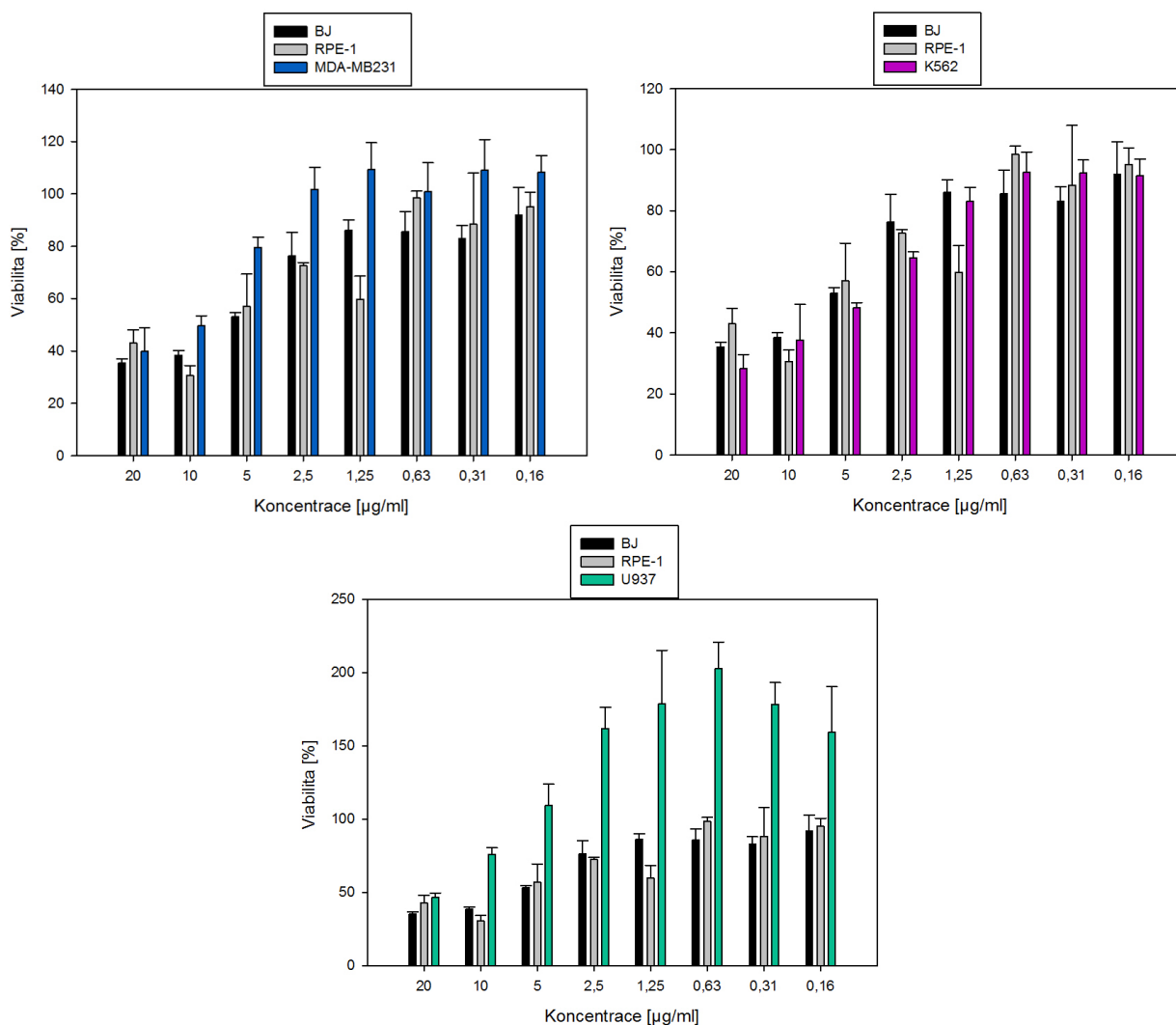
„Látka“ 393,3 byla jednoznačným „hitem“ z výsledků refrakcionace primární frakce CTII-12. Viabilita rakovinné buněčné linie MDA-MB231 byla v tomto případě snížena na hodnotu 0–30%. Při testování „čisté látky“ však takových výsledků dosaženo nebylo (Obrázek 37).

Rakovinná linie MDA-MB231 vykazovala sníženou buněčnou viabilitu ve třech nejvyšších koncentracích (20; 10 a 5  $\mu\text{g/ml}$ ). Nicméně prakticky vždy dosahovala vyšších viabilit než primární buněčné linie.

U nádorové linie K562 byl pozorovaný velmi dobrý inhibiční efekt u nejvyšší koncentrace (20  $\mu\text{g/ml}$ ), a to dokonce větší než na primární buněčné linie. Tento efekt byl pozorovatelný přes čtyři nejvyšší koncentrace (20; 10; 5 a 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ). V koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  byla viabilita rakovinné linie K562 o 10% nižší než u kontrolní primární linie BJ.

U nádorové linie U937 byl inhibiční efekt viditelný pouze v nejvyšší koncentraci (20  $\mu\text{g/ml}$ ). V druhé nejvyšší koncentraci již byl inhibiční efekt velmi slabý a bylo dosaženo znatelně nižší inhibice než u primárních buněčných linií. Následně docházelo k nárůstům buněčné viability až k hodnotám okolo 200%. Získaná data ukazují v nižších koncentracích tedy spíše podporu této rakovinné buněčné linie.

„Látka“ 393,3 měla v čistém stavu větší nebo srovnatelný inhibiční efekt na obě testované primární buněčné linie v porovnání s nádorovými buněčnými liniemi. U obou primárních linií byl inhibiční efekt obdobný, a to prakticky ve všech koncentracích až na nejnižší. Docházelo zde k poklesu buněčné viability o 10–60%.



Obrázek 37: Porovnání viabilit nádorových linií MDA-MB231, K562 a U937 s primárními liniemi BJ a RPE-1 pro „látku“ 393,3

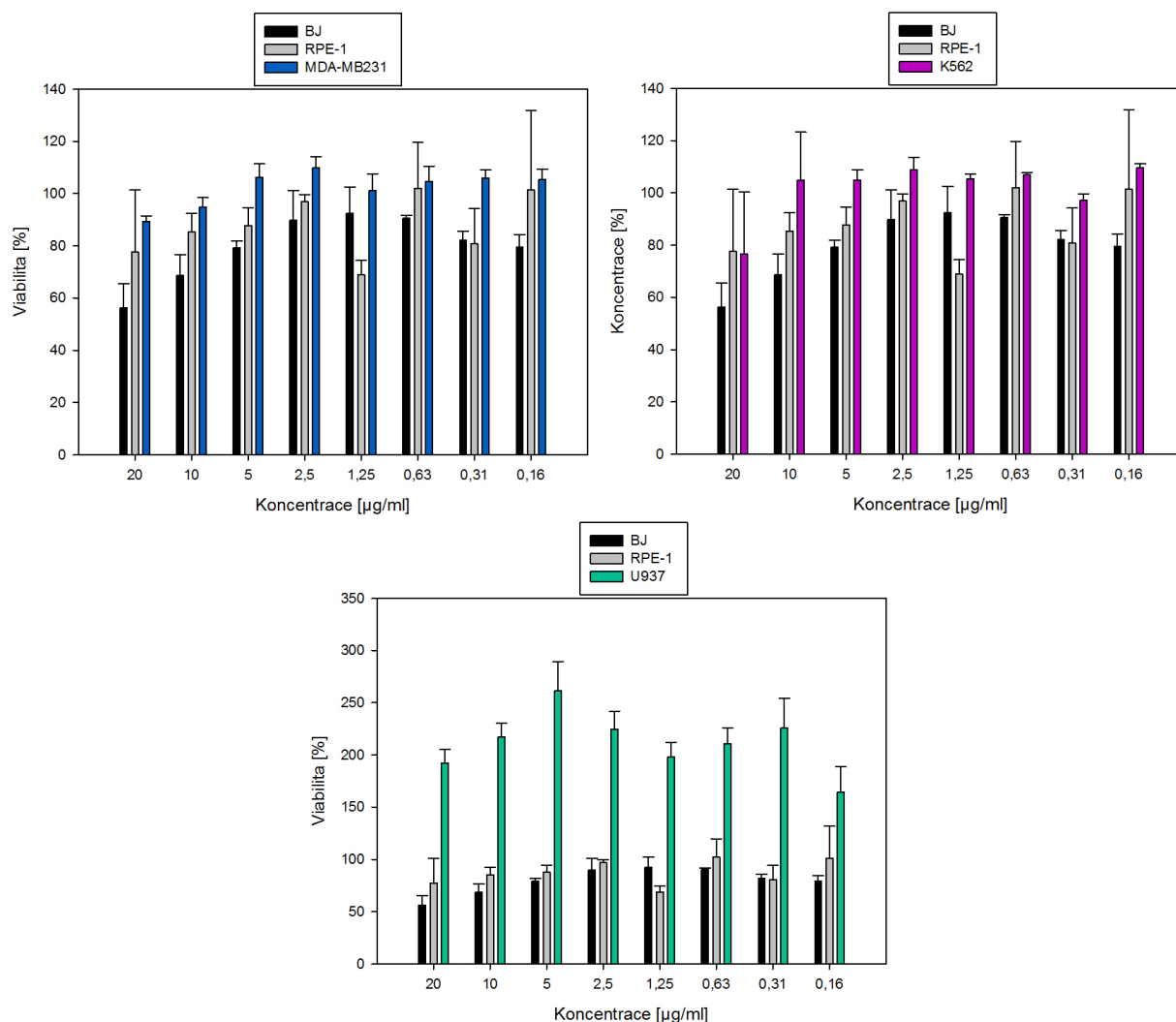
#### 4.9 Ověření inhibičního účinku „látky“ 874,3 m/z

„Látka“ 874,3 nebyla při refrakcionaci jednoznačným „hitem“. Byla označena za účinnou látku v refrakci primárních frakcí CTII-10 a CTII-11. Získané výsledky u „čisté látky“ však neprokázaly žádný výjimečný efekt na rakovinné linie (Obrázek 38).

U nádorových linií MDA-MB231 a K562 byl pozorován inhibiční efekt výhradně v nejvyšší koncentraci (20 µg/ml), a to pouze snížením buněčné viability o 20%.

Nádorová linie U937 vykazovala po ošetření touto „látkou“ nárůsty viability až nad 200%. V tomto případě tedy docházelo spíše k podpoře nádorové linie.

Primární linie BJ a RPE-1 vykazovaly mírný pokles viability napříč koncentracemi (viabilita 70–80%), který byl nejpatrnější v koncentraci 20 µg/ml (viabilita 60–70%).



Obrázek 38: Porovnání viabilit nádorových linií MDA-MB231, K562 a U937 s primárními liniemi BJ a RPE-1 pro „látku“ 874,3

#### 4.10 Ověření inhibičního účinku „látky“ 607,3 m/z

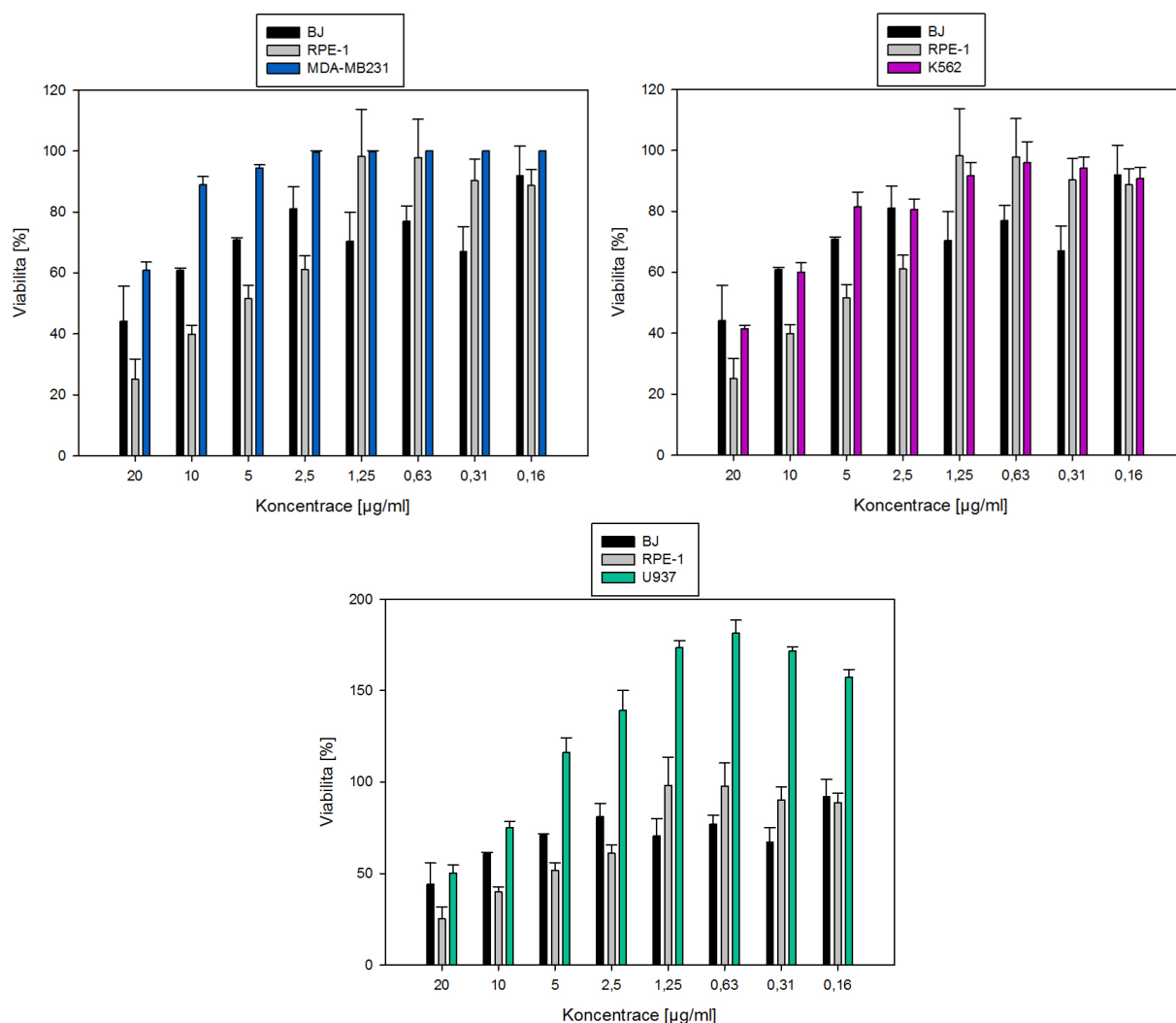
„Látce“ 607,3 byl při testování přikládán největší význam. Tato látka byla identifikována jako odpovědná ze inhibiční efekt u celkem čtyř primárních frakcí během refrakcionace (CTII-30, CTII-31, CTII-32 a CTII-33). Přičemž jako absolutní „hit“ byl označen v refrakci primární frakce CTII-31. Viabilita rakovinné linie MDA-MB231 byla v tomto případě snížena na hodnotu 0–30%. Při testování „čisté látky“ však nebylo dosaženo očekávaných výsledků (Obrázek 39).

U nádorové linie MDA-MB231 byl jediný významný inhibiční efekt (pokles viability o 40%) pozorovatelný v nejvyšší koncentraci (20 µg/ml). Následně docházelo k zvyšování buněčné viability.

Nádorová linie K562 byla zajímavě ovlivněna pouze ve dvou nejvyšších koncentracích (20 a 10 µg/ml). V nižších koncentracích pak docházelo ke zvyšování viability.

Nádorová linie U937 byla touto „čistou látkou“ ovlivněna pouze ve dvou nejvyšších koncentracích, a to poklesem buněčné viability o 30–50%. V nižších koncentracích docházelo k zvyšování viability až nad hodnotu 100%.

Primární buněčné linie byly i v tomto případě mnohem více ovlivněny, než linie nádorové. V případě RPE-1 byla viabilita v nejvyšší koncentraci (20 µg/ml) snížena až na hodnotu 25%. Inhibiční efekt byl v tomto případě sice zvyšující, ale však stále patrný až do hodnoty koncentrace 2,5 µg/ml. U primární linie BJ byl inhibiční efekt sice nižší, ale zato rovnoměrně se táhnoucí přes více koncentrací.

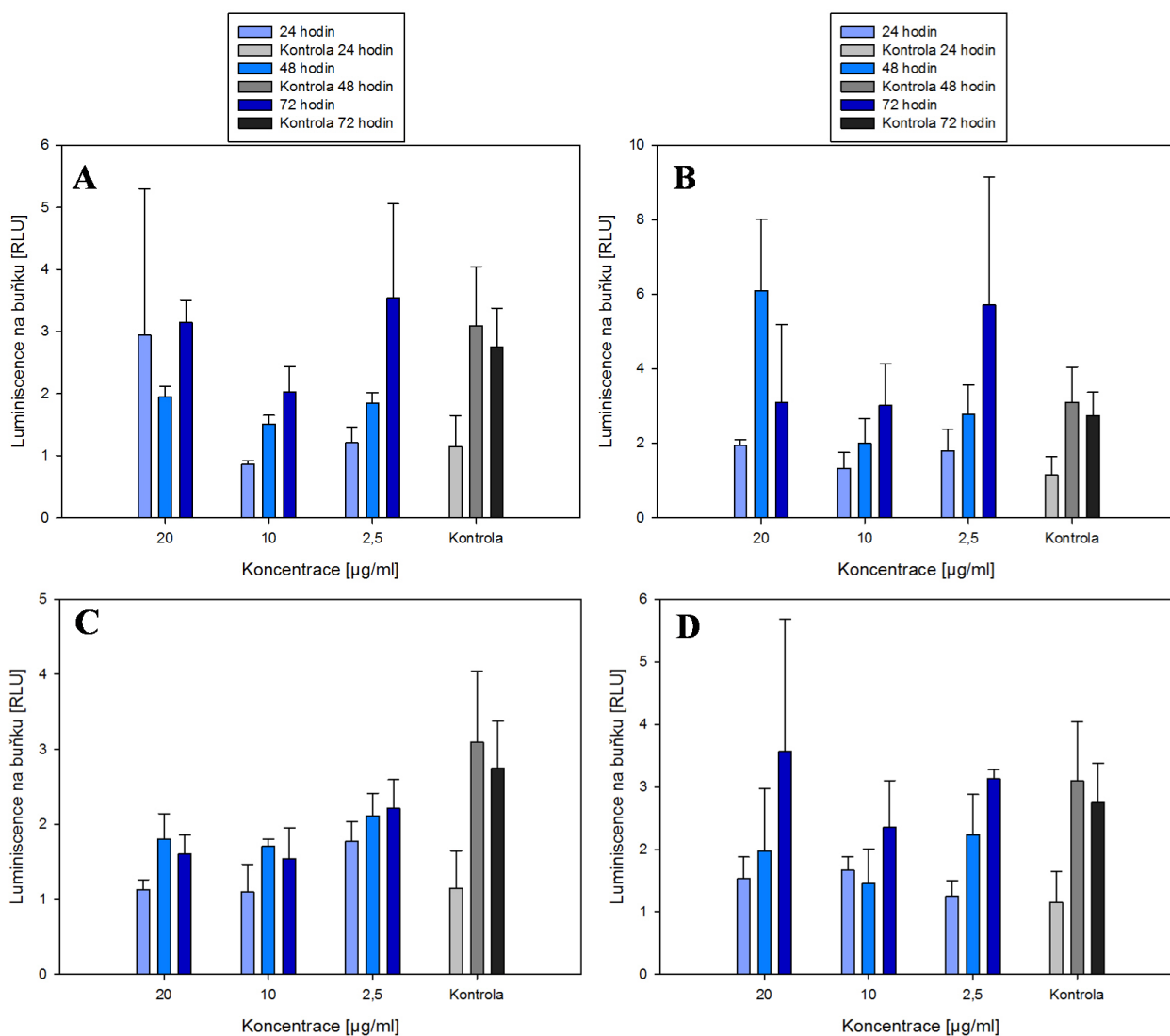


Obrázek 39: Porovnání viabilit nádorových linií MDA-MB231, K562 a U937 s primárními liniemi BJ a RPE-1 pro „látku“ 607,3

#### 4.11 Výsledky aktivity efektorových kaspáz 3/7

V prvním řadě je nutné zmínit, že následující experiment byl prováděn pouze jednou a z neznámých důvodů došlo k velkému rozptylu získaných hodnot. V buňkách nebyla prokázána zvýšená aktivita kaspáz signalizující apoptózu (Obrázek 40).

Jediné zajímavé navýšení signálu bylo sledováno u „látky“ 874,3 ( $m/z$ ) v čase 48 a 72 hodin. V čase 48 hodin dochází k nárůstu signálu v nejvyšší koncentraci (20  $\mu\text{g/ml}$ ). S tím může být spojeno viditelné avšak pouze lehké zvýšení signálu ve 24 hodinách. V čase 72 hodin dochází ke zvýšení signálu v koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , kdy mohly buňky „opozděně“ reagovat na nižší koncentraci látky. Z důvodu zvýšení signálu kaspáz na buňku lze usuzovat, že aktivita enzymů byla v tomto případě zvýšena. Ačkoliv data vykazovala velkou variabilitu a buňky se nacházely ve stavu proliferace. Zvýšená hodnota kaspáz může naznačovat, že buňka byla vystavena krátkodobému stresu. Došlo ke zvýšení apoptotických markerů, ale apoptóza neprobíhala.



Obrázek 40: Aktivita efektorových kaspáz 3/7 na buněčné linii MDA-MB231; A: 393,3  $m/z$ ; B: 874,3  $m/z$ ; C: 824,4  $m/z$ ; D: 607,3  $m/z$

## 5 DISKUZE

Tato práce si kladla za cíl ověřit, zda zvolený přístup vyhledávání látek se selektivním účinkem na rakovinné linie pomocí HTS vede k efektivnímu získávání primárních „hitů“ pro následující práci. Ze široké palety nádorových linií byla jako terapeuticky zajímavá vybrána linie „triple-negativní“ rakoviny prsu MDA-MB231 [44].

Cílem bylo též provést izolaci potencionálně aktivních látek ze sinicového kmene a ověřit jejich potenci v čistém stavu.

Metoda HTS se běžně používá k testování rozsáhlých knihoven aktivních látek, a to hlavně ve farmacii, ale pouze velmi omezeně pro přírodní extrakty [67]. Podle dostupných publikací je zřejmé, že v této práci byla tato platforma použita poprvé pro testování sinicových extraktů a z nich odvozených frakcí. Během práce bylo zaznamenáno několik zajímavých faktů, jejichž vyřešení by bylo vhodné před další prací s komplexními extrakty a současně i pro metodickou modifikaci metody HTS.

### 5.1 Výběr frakcí pro validaci

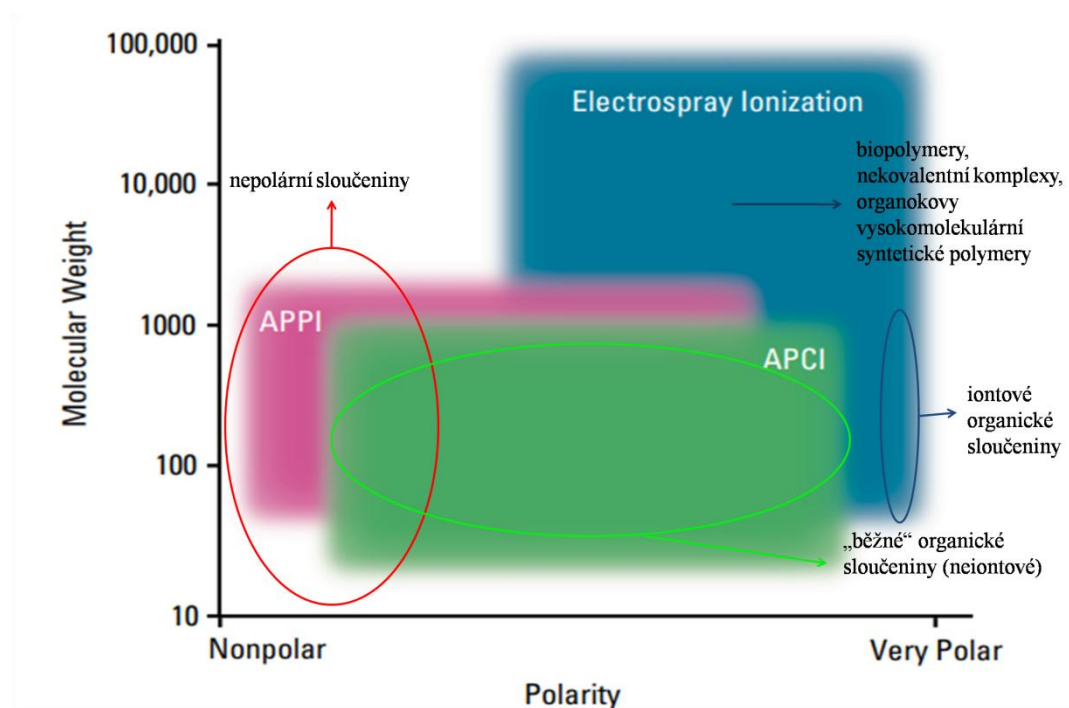
Z původních 293 primárních chromatografických frakcí, které byly vybrány díky svému efektu na některou z rakovinných linií v testovaném setu, vykazovalo efekt proti vybrané rakovinné linii MDA-MB231 94 frakcí. Pouze 56 z těchto primárních frakcí prošlo druhým kolem výběru. Tato skutečnost byla podmíněna hlavně výsledky HPLC-HRMS analýzy, která vyřadila všechny frakce bez přítomnosti unikátního peaku. Nebyly tak dále testovány frakce, které mohly obsahovat selektivní látky s velmi zajímavým efektem. Z tohoto důvodu by bylo tedy vhodné použít pro analýzu aktivních frakcí metody se širším záběrem detekovaných látek a nebo jejich kombinaci.

Ačkoliv se separace látek nejevila jako hlavní problém analýzy, můžeme uvažovat nad úpravou gradientu mobilní fáze popřípadě její úplnou změnu. S tím souvisí i změna kolony jako například rozměry nebo stacionární fáze. Metoda HPLC se dá do jisté míry nahradit elektromigračními technikami [68]. V dnešní době se začíná čím dál více uplatňovat kombinace kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií [69], [70].

Jako daleko důležitější se ukázala otázka detekce s využitím hmotnostní spektrometrie. Samozřejmě ne všechny látky jsou schopné ionizovat za všech podmínek. Obecně závisí volba ionizační techniky na povaze analytu – Mr, polarita (Obrázek 41). V této práci byl pro ionizaci použit elektrosprej (ESI) [71],[72], který umožňuje ionizaci širokého spektra středně polárních látek. Při tomto druhu ionizace hraje poměrně důležitou roli i použité rozpouštědlo. Alternativou by bylo použití jiných ionizačních technik, které by umožnily



ionizaci jiného typu látek obsažených v primárních frakcích. Těmito technikami může být APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku) nebo APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku) [73].



Obrázek 41: Volba ionizační techniky v závislosti na analytu [73][69][68]

Místo hmotnostní spektrometrie by mohla být k identifikaci nebo určení struktury použita technika NMR (nukleární magnetická rezonance). Protože se jedná o komplexní směsi, musely by být vzorky před analýzou separovány. V tomto případě by bylo vhodné spojení LC-NMR, kde ovšem dochází k limitaci z hlediska množství potřebného vzorku [74], [75].

## 5.2 Validace

Prvotní validační výsledky na primární buněčné linii BJ se naprosto lišily od výsledků získaných metodou HTS. Při validačních experimentech docházelo k velkému ovlivnění této primární buněčné linie primárními chromatografickými frakcemi, které však při HTS neměly na tuto buněčnou linii žádný efekt.

S tímto faktem mohlo souviset rozdílné množství buněk nasazených na experiment (HTS×MBU). Při HTS bylo nasazováno 1 000 buněk/jamku v 1536-jamkových destičkách (43 000 buněk/cm<sup>2</sup>) a při takovýchto denzitách může docházet k plnému pokrytí jamky a následné kontaktní inhibici. V experimentech MBU bylo pracováno s 5 000 buňkami/jamku v 96-jamkových destičkách (16 000 buněk/cm<sup>2</sup>) a buňky byly během experimentu udržovány v proliferujícím stavu.

Po zhodnocení získaných dat byla stanovena hypotéza, že buňky v proliferujícím stavu jsou mnohem více ovlivňovány primárními frakcemi. Tato hypotéza byla následně ověřována dalšími experimenty s nasazením 13 000 buněk/jamku v 96-jamkové destičce (přesně odpovídající denzitě nasazení během HTS). Z výsledků jednoznačně vyplynula závislost buněčné viability na počtu nasazených buněk. Prakticky u všech testovaných primárních frakcí byl pozorován nárůst viability, a to o 20–40%. V lidském těle se samozřejmě proliferující buňky vyskytují, a proto se jeví jako smysluplnější použít jako referenční viability, ty které byly získané na primárních liniích v proliferativním stavu (tj. při nižší nasazené denzitě). Získaná data by pak pravděpodobně více reflektovala opravdovou selektivitu daných látek/frakcí vůči rakovinné linii.

Dalším krokem pro ověření zmíněné hypotézy byly testy provedené na primární buněčné linii RPE-1, protože tato linie podléhá snížené kontaktní inhibici. S ohledem na tuto skutečnost by se některé buňky měly nacházet v proliferativním stavu i při nasazení 13 000 buněk/jamku v HTS a nižší počet nasazených buněk by neměl tak výrazně ovlivnit získané viabilitní výsledky. Předpoklad byl potvrzen získáním relativně porovnatelných výsledků s HTS, kdy docházelo ve většině případů k porovnatelné a někdy dokonce vyšší buněčné viabilitě. Vzhledem k této realitě reprodukovatelnosti výsledků se primární buněčná linie RPE-1 jeví jako robustnější a lepší pro porovnávání komplexní dat z HTS.

Nádorové buněčné linie by neměly být ovlivněny žádnou kontaktní inhibicí a stále by se měly nacházet v proliferativním stavu, což jednoznačně vyplývá z definice nádorových buněk. Ztráta selektivního inhibičního účinku na rakovinou linii MDA-MB231 je poměrně závažná [76]. Diferenciální účinnost protinádorových léků však souvisí s proliferujícím a neproliferujícím stavem buněk, jak vyplývá z dostupných zdrojů. Tento neproliferující stav souvisí s vyčerpáním média [77], [78]. Mnoho v současné době používaných protinádorových léčiv je účinných při zabíjení proliferujících rakovinných buněk, ale vykazují nižší účinnost proti neproliferujícím buňkám, které se vyskytují převážně ve středu nádoru [79].

Částečně by mohl být uvažován i fakt, že po přípravě primárních chromatografických frakcí byla jejich část odebrána (200  $\mu$ l) a odeslána na pracoviště HTS. Zbylé části byly skladovány při -80 °C na MBU. Série experimentů HTS a MBU byla prováděny každá s jinou částí primární frakce, jinak skladovanou a za odlišných podmínek. U primárních frakcí MBU mohlo dojít k degradaci některých látek a vzniklé produkty mohly působit inhibičně spíše na primární buněčné linie a tím změnit původní selektivitu. Tato hypotéza bohužel nemůže být ověřena, protože nejsou k dispozici LC-MS profily rozdělených frakcí.

Na závěr je třeba zmínit, že zmíněné hypotézy se navzájem nevylučují a mohou být uvažovány vzájemně.

### 5.3 Inhibiční účinek „čistých látek“

Samotná refrakcionace primárních chromatografických frakcí přinesla zajímavé výsledky, a to i z pohledu výše diskutovaného „problému nasazení“ buněčných linií. Některé získané refrakční profily původně účinných primárních chromatografických frakcí nevykazovaly žádnou potenci ani proti rakovinné linii MDA-MB231, ani proti primární linii BJ. Původně viditelný efekt u většiny primárních chromatografických frakcí musel být podmíněn synergií několika látek, kdy po jejich vzájemné oddělení došlo ke ztrátě tohoto efektu.

„Hity“ se zajímavou relativně selektivní potenci proti MDA-MB231 byly identifikovány pouze u 5 primárních chromatografických frakcí z celkových 14. V jednom případě refrakce vykazující velmi silnou potenci nemohla být spárována s konkrétní „látkou“ ( $m/z$ ), a to z důvodu absence peaku v LC-MS spektru.

Ještě zajímavějších výsledků podporujících tvrzení o komplexnosti účinku bylo dosaženo testováním „čistých látek“, na buněčných liniích. Prakticky ani jedna „čistá látka“ nesplnila očekávání vzhledem k jejich selektivitě proti rakovinné linii. Ve všech případech byl zaznamenán velice nízký inhibiční efekt na nádorovou linii MDA-MB231.

Nádorové buněčné linie K562 a U937 byly testovány v souvislosti se ztrátou efektu „čistých látek“ na nádorovou linii MDA-MB231, ale se zachováním efektu na linii primární. Tyto nádorové linie byly vybrány, protože na ně selektivně působily primární chromatografické frakce, kde byly vybrané látky detekovány při refrakcionaci. Ani u těchto nádorových linií však nebyl prokázán selektivní inhibiční účinek „čistých látek“. Výsledky těchto pokusů nebyly úplným překvapením, protože „čisté látky“ byly primárně vybrány pro svou účinnost na rakovinnou linii MDA-MB231. Skutečnost, že se tato látka vyskytovala v určité chromatografické frakci stejného sinicového kmene neznamena, že se jedná o látku zodpovědnou za inhibiční efekt vůči této rakovinné linii.

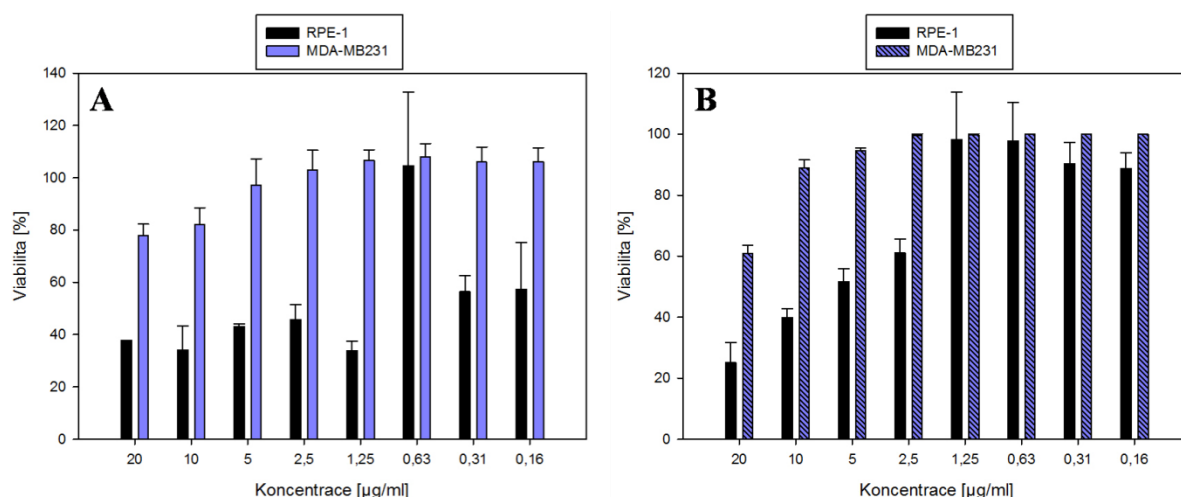
Látka „874,3“ ztratila v čistém stavu prakticky všechnu efektivitu. Tato látka byla pro izolaci vybrána i přesto, že nebyla přímo „hitem“ (pokles viability na rozmezí 0–30%). Zajímavé je, že tato látka se vyskytuje ve všech primárních frakcích, ve kterých byla v rámci refrakcionace detekovaná i účinná látka „824,4“ (CTII-10 a CTII-12). Prakticky jediný kvalitativní rozdíl mezi těmito primárními frakcemi v této oblasti je přítomnost dalšího peaku mezi peaky odpovídajícími těmito „látkám“. Přičemž přítomnost tohoto peaku zesiluje

inhibiční efekt. Tento fakt podporuje tvrzení, že inhibiční efekt může být podmíněn synergií několika látek.

Další potvrzení „hypotézy komplexního účinku“ je jednoznačně vidět u látek „824,4“ a „393,3“, kdy druhá zmíněná látka se nepodařilo získat v přijatelné čistotě a byla testována jako směs („824,4+393,3“). Nutno zdůraznit, že tato směs zaznamenala nejlepší inhibiční výsledky. Podle hmotnostního spektra, které odpovídá chromatografickému peaku látky „393,3“, by mohlo být diskutováno, že se jedná o kombinaci dvou látek. Otázkou k dalšímu testování je, zda by u látky „393,3“ zůstal inhibiční efekt zachován i po oddělení od látky „824,4“. Naproti tomu látka „824,4“ neprokázala praktický žádný účinek.

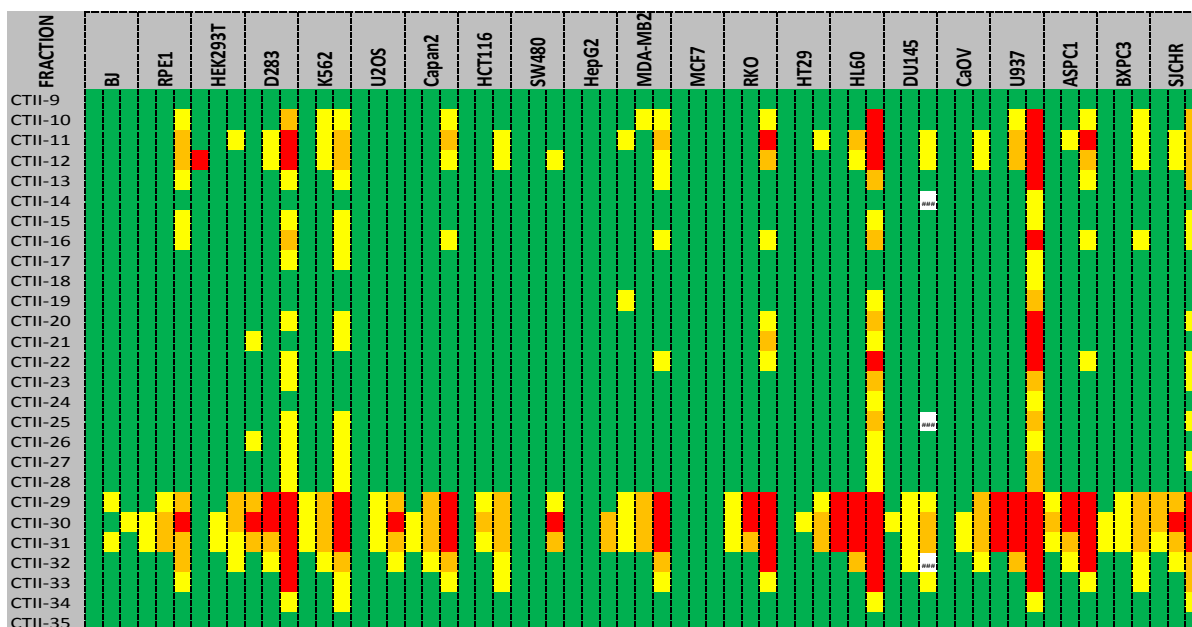
Látka „607,3“ jednoznačně nebyla vyizolována v přijatelné čistotě. Výsledky prokázaly jednu z nejlepších potencií v rámci izolovaných látek, ne však odpovídající HTS datům z hlediska potence ani selektivity. Tento fakt mohl souviset s čistotou látky. Molekulová hmotnost 607,3 a absorpční spektrum látky potvrzují, že látka je analogem pheophorbidu a, který je produktem štěpení chlorofylu. Pheophorbide a se používá jako fotosenzibilizátor při fotodynamické terapii rakoviny [80]. V rámci práce byl jako referenční testován též inhibiční účinek standardu pheoforbidu a na nádorovou linii MDA-MB231 a primární linii RPE-1 (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

Při porovnání získaných dat bylo zřejmé, že látka „607,3“ má, v porovnání s pheophorbidem a silnější inhibiční účinek v nejvyšší koncentraci (20 µg/ml) na rakovinnou linii MDA-MB231, ale i na primární linii RPE-1. U rakovinné linie MDA-MB byl tento efekt pozorovatelný pouze v nejvyšší koncentraci. U primární linie RPE-1 inhibice přetrvávala až do koncentrace 2,5 µg/ml. Naproti tomu pheophorbide a působil na primární linii RPE-1 efektivně prakticky v celém koncentračním rozmezí. U nádorové linie docházelo ke snížení viability ve dvou nejvyšších koncentracích (20 a 10 µg/ml), ale pouze o 20%. Z tohoto pohledu by látka „607,3“ mohla představovat účinnější alternativu, pokud by bylo docíleno inhibičního efektu i v nižších koncentracích. Tato možnost může stále nastat po dostatečném přečištění látky.



Obrázek 42: Porovnání viabilit buněčných linií RPE-1 a MDA-MB231; A: účinek pheophorbidu a; B: účinek „čistě látky“ 607,3

I přesto, že dosavadní výsledky ani jedné „čisté látky“ nepřinesly kýžený efekt. Bylo by vhodné otestovat jejich potenci vůči celému rakovinnému panelu. Všechny „čisté látky“ byly izolovány ze sinicového kmene *Brasilonema*, jehož frakce vykazovaly prakticky nejlepší potenci celým průřezem testovaných rakovinných linií při HTS (Obrázek 43). Je poměrně pravděpodobné, že se v tomto spektru najde rakovinná linie, na kterou bude mít některá „čistá látka“ selektivní inhibiční účinek.



Obrázek 43: Potence primárních frakcí ze sinicového kmene *Brasilonema* na kompletním panelu rakovinných linií

Do budoucna se jako možná cesta jeví testování skupinového účinku látek. To prakticky probíhalo při testování primárních chromatografických frakcí, protože byly připraveny pouze

jímáním 1,5 minutových oken. Tím, že neproběhlo žádné rozdělení podle původního profilu před refrakcí, mohly primární frakce obsahovat komplexní složení, i když některé látky mohly být zastoupeny v nízkých koncentracích. Současně by bylo vhodné neředit frakce před chemickou analýzou a zaměřit se na detekční techniku těchto látek, protože velké množství frakcí bylo vyřazeno kvůli „prázdnému“ LC-MS profilu.

Pro další práci s komplexními daty získanými metodou HTS by bylo nutné provést opakovanou HPLC-HRMS analýzu primárních frakcí bez předchozího ředění. Následně by bylo vhodné zaměřit se na frakce vykazující nižší komplexitu, tedy frakce obsahující nižší počet peaků ve svém spektru.

#### **5.4 Řešení komplexity frakcí**

Řešení komplexity primárních frakcí pro další frakční knihovnu HTS by mohlo spočívat v menších časových oknech pro jímání primárních chromatografických frakcí. Z analytického hlediska je možné omezit komplexitu frakce za pomoci dvourozměrné kapalinové chromatografie (2D HPLC), která zvyšuje počet analytů separovaných v rámci jednoho nástřiku. Metoda kombinuje více než jeden retenční mechanismus, a proto je pro separaci komplexních vzorků velmi výhodná [81], [82]. Zajímavou možností by bylo i použití tří různých rozpouštědel, kdy by docházelo k postupné separaci látek od polárních až po nepolární [83].

## 6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo najít primární frakci se zajímavým selektivním účinkem proti nádorové linii MDA-MB231 a ověřit její potenci v porovnání s výsledky získanými metodou HTS. Výběr byl podmíněn výsledky HPLC-HRMS analýzy, která bude vyžadovat modifikaci, aby mohlo být detekováno širší spektrum látek. Současně se ukázalo jako důležité sledovat LC-MS profil frakcí v reálném čase při práci s nimi, aby mohly být zaznamenány a spárovány změny potencií frakcí se změnou jejich LC-MS spektra.

Při práci na buněčných liniích bylo při porovnání s HTS dosaženo naprosto neodpovídajících výsledků. I díky tomuto faktu byla v rámci práce ověřena hypotéza, že primární buňky v proliferujícím stavu jsou mnohem více ovlivňovány primárními frakcemi. Aby získaná data více reflektovala opravdovou selektivitu daných látek/frakcí vůči rakovinné linii bylo by vhodné jako referenční viability použít data získaná na primárních liniích v proliferativním stavu. Z tohoto hlediska se jako robustnější ukázala primární linie RPE-1.

V závěru práce byly izolovány čtyři potencionálně selektivní látky vůči rakovinné linii MDA-MB231. Bohužel, ani jedna nevykazovala zajímavou potenci v „čistém“ stavu. Inhibiční účinek těchto látek nebyl prokázán ani při testech na nádorových liniích U937 a K562. Tyto látky však vykazovaly určitou potenci proti primárním buněčným liniím, a proto se jeví jako vhodné otestovat jejich potenci na celém rakovinném panelu.

I přesto, že nebyla objevena látka se selektivním inhibičním účinkem na rakovinnou linii MDA-MB231, přináší práce souhrn zajímavých poznatků pro další modifikaci metodiky přípravy vzorků pro HTS a vlastní provedení HTS. Jednoznačným příspěvkem práce je též modifikace schématu následných analýz frakcí. Hlavní problém HTS přístupu při použití frakcí odvozených ze surových přírodních extraktů spočívá v komplexnosti primárních frakcí a synergii v působení obsažených látek.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-x..
- [2] MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-649-x.
- [3] KOČÁREK, Eduard. Od buněčného dělení k nádorovým chorobám. *Biologie člověka 1*. Praha: Scientia, 2010, s. 30-33. ISBN 978-80-8690-47-0.
- [4] DIENSTBIER, Zdeněk a Vladimíra STÁHALOVÁ. *Onkologie pro laiky*. Vyd. 2., aktualiz. Praha: Liga proti rakovině, 2012. ISBN 978-80-86031-65-1.
- [5] ALTANER, Čestmír. *Buněčná a molekulární biologie rakoviny*. Praha: Liga proti rakovině, 2008. ISBN 978-80-86031-85-9.
- [6] TOMÁŠEK, Jiří. *Onkologie: minimum pro praxi*. Praha: Axonite CZ, 2015. Asclepius. ISBN 978-80-88046-01-1.
- [7] KOČÁREK, Eduard. Mitóza, buněčný cyklus, nádorové choroby a jejich prevence. *Biologie člověka 2*. Praha: Scientia, 2010, s. 21-24. ISBN 978-80-86960-48-7.
- [8] HOFMANOVÁ, Jiřina. *Genotoxicita a karcinogeneze*. Brno: © Masarykova univerzita, 2013.
- [9] ŠMARDOVÁ, Jana a Jana KOPTÍKOVÁ. Dva přístupy k rozvoji rakoviny. *Klinická onkologie*. 2016, **29**(4), 259-266. Dostupné z: doi:10,14735 / amko2016259.
- [10] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [11] NEČAS, Emanuel. *Obecná patologická fyziologie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1688-9.
- [12] BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. *Molecular aspect of medicine*. 2000, **21**(6), 167-223. Dostupné z: doi:10.1016 / s0098-2997 (00) 00007-8
- [13] SVOBODA, Jan. Genetika a nádory: Co víme po čtyřiceti letech. *Vesmír*. 2009, **88**(191), 191-193.
- [14] RODWELL, Victor W., David A. BENDER, Kathleen M. BOTHAM, Peter J. KENNELLY a P. Anthony WEIL. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 30. vydání. McGraw Hill, 2015. ISBN 978-1-25-925286-0.
- [15] PATOČKA, Jiří a Zdeněk HON. Proč rakovinná buňka nestárne? *Kontakt*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007, **2**, 425-426.
- [16] LUDVÍKOVÁ, M., M. PEŠTA, L. jr. HOLUBEC a D. KALFEŘT. Nové aspekty patobiologie nádoru. *Česko-slovenská patologie*. 2009, **45**(4), 94-99.
- [17] BROWN, Robert a Gordon STRATHDEE. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2002, **8**(4), S43-S48 [cit. 2021-04-12]. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/S1471-4914(02)02314-6



- [18] JONES, Peter A. a Stephen B. BAYLIN. The Epigenomics of Cancer. *Cell* [online]. 2007, **128**(4), 683-692 [cit. 2021-04-12]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.01.029
- [19] HANAHAN, Douglas a Robert A WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 2000, **100**(1), 57-70 [cit. 2021-04-12]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- [20] HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, **144**(5), 646-674 [cit. 2021-04-12]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- [21] SEYFRIED, Thomas N. a Leanne C. HUYSENTRUYT. On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis* [online]. 2013, **18**(1 - 2), 43-73 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0893-9675. Dostupné z: doi:10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40
- [22] CHAMBERS, A. F. a L. M. MATRISIAN. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1997, **89**(17), 1260-1270 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/89.17.1260
- [23] ŠPÍŠEK, Radek. Imunitní systém a kontrola nádorového bujení: Mechanismy zahájení imunitní odpovědi a role imunitního systému v obraně proti nádorům. In: *Zdraví.euro.cz* [online]. 2009, 17.2.2009 [cit. 2021-04-12]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/imunitni-system-a-kontrola-nadoroveho-bujeni-413556>
- [24] SLANINOVÁ, Věra a Alena KREJČÍ. Rakovinná buňka a změny jejího metabolismu: cesta k přežití i nástroj k destrukci. *Živa*. 2013, (5), 202-205.
- [25] FERREIRA, Leonardo M.R. Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology* [online]. 2010, **89**(3), 372-380 [cit. 2021-04-12]. ISSN 00144800. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexmp.2010.08.006
- [26] Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr*. 2007 Jun;39(3):267-74. doi: 10.1007/s10863-007-9086-x. PMID: 17551814.
- [27] ZU, Xin Lin a Michael GUPPY. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2004, **313**(3), 459-465 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.136
- [28] VRZÁČKOVÁ, Nikola, Tomáš RUML a Jaroslav ŽELENKA. Metabolismus glutaminu a jeho role v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2020, (114), 430-436.
- [29] KERR F. R., John, Clay M. WINTERFORD a Brian V. HARMON. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *CANCER*. 1994, **8**(73), 2013-2026. Dostupné z: doi:10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J
- [30] MARTINEZ, Michelle M., Randall D. REIF a Dimitri PAPPAS. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical*

- Methods* [online]. 2010, **2**(8), 996-1004 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/c0ay00247j
- [31] DENICOURT, C. MEDICINE: Targeting Apoptotic Pathways in Cancer Cells. *Science* [online]. 2004, **305**(5689), 1411-1413 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1102974
- [32] LOWE, Scott W. a Athena W. LIN. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* [online]. 2000, **21**(3), 485-495 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1460-2180. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/21.3.485
- [33] ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. 2007, **35**(4), 495-516 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337
- [34] REED, John C. Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology* [online]. 2000, **157**(5), 1415-1430 [cit. 2021-04-12]. ISSN 00029440. Dostupné z: doi:10.1016/S0002-9440(10)64779-7
- [35] MILLE, Frédéric, Chantal THIBERT, Joanna FOMBONNE, et al. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL–caspase-9 complex. *Nature Cell Biology* [online]. 2009, **11**(6), 739-746 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1880
- [36] ONDROUŠKOVÁ, E. a B. VOJTĚŠEK. Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách. *Klinická onkologie*. 2014, (27), S7-S14.
- [37] BALVAN, Jan. *Buněčná smrt: její význam ve fyziologii a patologické fyziologii*. Praha: Grada Publishing, 2021. ISBN 978-80-271-1260-9.
- [38] KOUTECKÝ, Josef. *Klinická onkologie*. [Praha]: Riopress, 2004-. ISBN 80-86221-77-6.
- [39] GONĚC, Roman a Šárka KOZÁKOVÁ. Cílená léčba versus klasická cytostatika. *Onkologie*. 2014, **8**(5), 231-233.
- [40] PETRŽELKA, Luboš. Biologická léčba karcinomu prsu. *Onkologie*. 2009, **3**(1), 19-27.
- [41] PRAUSOVÁ, Jana. Karcinom prsu – problém i v 21. století. *Interní medicína*. 2010, **12**(1), 26-32.
- [42] PRAT, Aleix a Charles M. PEROU. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* [online]. 2011, **5**(1), 5-23 [cit. 2021-04-12]. ISSN 15747891. Dostupné z: doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003
- [43] EROLES, Pilar, Ana BOSCH, J. ALEJANDRO PÉREZ-FIDALGO a Ana LLUCH. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* [online]. 2012, **38**(6), 698-707 [cit. 2021-04-12]. ISSN 03057372. Dostupné z: doi:10.1016/j.ctrv.2011.11.005
- [44] PEROU, C. M. a A.-L. BORRESEN-DALE. Systems Biology and Genomics of Breast Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, **3**(2), a003293-a003293 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a003293

- [45] KULTSCHAR, Bethan a Carole LLEWELLYN. Secondary Metabolites in Cyanobacteria. VIJAYAKUMAR, Ramasamy a Suresh S.S. RAJA, ed. *Secondary Metabolites - Sources and Applications* [online]. InTech, 2018, 2018-09-05 [cit. 2021-04-12]. ISBN 978-1-78923-642-2. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.75648
- [46] YADAV, Shweta, Rajeshwar P SINHA, Madhu TYAGI a Ashok KUMAR. Cyanobacterial secondary metabolites. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011, **2**(2), 144-167. Dostupné také z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.642.8504&rep=rep1&type=pdf>
- [47] MÉJEAN, Annick a Olivier PLOUX. A Genomic View of Secondary Metabolite Production in Cyanobacteria. *Genomics of Cyanobacteria* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 189-234 [cit. 2021-04-12]. Advances in Botanical Research. ISBN 9780123943132. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394313-2.00006-8
- [48] WENG, Jing-Ke a Joseph P. NOEL. Structure–Function Analyses of Plant Type III Polyketide Synthases. *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part A* [online]. Elsevier, 2012, 2012, s. 317-335 [cit. 2021-04-12]. Methods in Enzymology. ISBN 9780123942906. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394290-6.00014-8
- [49] SALVADOR-REYES, Lilibeth A. a Hendrik LUESCH. Biological targets and mechanisms of action of natural products from marine cyanobacteria. *Natural Product Reports* [online]. 2015, **32**(3), 478-503 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0265-0568. Dostupné z: doi:10.1039/C4NP00104D
- [50] KERKSIEK, Kristen, Marisan R. MEJILLANO, Robert E. SCHWARTZ, Gunda I. GEORG a Richard H. HIMES. Interaction of cryptophycin 1 with tubulin and microtubules. *FEBS Letters* [online]. 1995, **377**(1), 59-61 [cit. 2021-4-27]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(95)01271-0
- [51] ROHR, Jürgen. Cryptophycin Anticancer Drugs Revisited. *ACS Chemical Biology* [online]. 2006, **1**(12), 747-750 [cit. 2021-4-27]. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/cb6004678
- [52] BAI, Ruoli, George R. PETIT a Ernest HAMEL. Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1990, **39**(12), 1941-1949 [cit. 2021-4-27]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(90)90613-P
- [53] Madden T, Tran HT, Beck D, Huie R, Newman RA, Pusztai L, Wright JJ, Abbruzzese JL. Novel marine-derived anticancer agents: a phase I clinical, pharmacological, and pharmacodynamic study of dolastatin 10 (NSC 376128) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2000 Apr;**6**(4):1293-301. PMID: 10778954.
- [54] BOUCHARD, Hervé, Christian VISKOV a Carlos GARCIA-ECHEVERRIA. Antibody–drug conjugates—A new wave of cancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2014, **24**(23), 5357-5363 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2014.10.021

- [55] LUESCH, Hendrik, Wesley Y. YOSHIDA, George G. HARRIGAN, James P. DOOM, Richard E. MOORE a Valerie J. PAUL. Lyngbyalioside B, a New Glycoside Macrolide from a Palauan Marine Cyanobacterium, *Lyngbya* sp. 1. *Journal of Natural Products* [online]. 2002, **65**(12), 1945-1948 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0163-3864. Dostupné z: doi:10.1021/np0202879
- [56] LUESCH, Hendrik, Wesley Y. YOSHIDA, Richard E. MOORE, Valerie J. PAUL a Thomas H. CORBETT. Total Structure Determination of Apratoxin A, a Potent Novel Cytotoxin from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2001, **123**(23), 5418-5423 [cit. 2021-4-27]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja010453j
- [57] SHUN, Tong Ying, John S. LAZO, Elizabeth R. SHARLOW a Paul A. JOHNSTON. Identifying Actives from HTS Data Sets. *Journal of Biomolecular Screening* [online]. 2011, **16**(1), 1-14 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1087-0571. Dostupné z: doi:10.1177/1087057110389039
- [58] NEVE, Richard M., Kwei CHIN, Jane FRIDLAND, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* [online]. 2006, **10**(6), 515-527 [cit. 2021-04-16]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
- [59] Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3): 321-334. *Blood* [online]. 2016, **128**(16), 1995-1995 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-08-736025
- [60] ABITA, Jean Pierre, Christiane GAUVILLE, Nicole BALITRAND, Christian GESPACH a Jean CANIVET. Binding of 125I-insulin to the human histiocytic lymphoma cell line U-937: Effect of differentiation with retinoic acid. *Leukemia Research* [online]. 1984, **8**(2), 213-221 [cit. 2021-04-16]. ISSN 01452126. Dostupné z: doi:10.1016/0145-2126(84)90145-0
- [61] SEGER, Yvette R., Marta GARCÍA -CAO, Sara PICCININ, Crocifissa Lo CUNSOLO, Claudio DOGLIONI, María A. BLASCO, Gregory J. HANNON a Roberta MAESTRO. Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell* [online]. 2002, **2**(5), 401-413 [cit. 2021-04-16]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/S1535-6108(02)00183-6
- [62] SPALLUTO, Cosma, David I. WILSON a Tom HEARN. Evidence for reciliation of RPE1 cells in late G1 phase, and ciliary localisation of cyclin B1. *FEBS Open Bio* [online]. 2013, **3**(1), 334-340 [cit. 2021-04-16]. ISSN 22115463. Dostupné z: doi:10.1016/j.fob.2013.08.002
- [63] RISS, Terry L, Richard A MORAVEC, Andrew L NILES, Sarah DUELLMAN, Hélène A BENINK, Tracy J. WORZELLA a Lisa MINOR. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* [online]. Eli Lilly & Company a National Center for Advancing Translational Sciences, 2016 [cit. 2021-04-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

- [64] ROTH, Carina, Sabine KASIMIR-BAUER, Klaus PANTEL a Heidi SCHWARZENBACH. Screening for circulating nucleic acids and caspase activity in the peripheral blood as potential diagnostic tools in lung cancer. *Molecular Oncology* [online]. 2011, **5**(3), 281-291 [cit. 2021-04-17]. ISSN 15747891. Dostupné z: doi:10.1016/j.molonc.2011.02.002
- [65] *Caspase-Glo® 3/7 Assay* [online]. In: . Promega Corporation, 2018, s. 1-19 [cit. 2021-04-17]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf?la=en>
- [66] Rueden, C. T.; Schindelin, J. & Hiner, M. C. et al. (2017), "ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data", *BMC Bioinformatics* **18:529**, PMID 29187165, doi:10.1186/s12859-017-1934-z (on Google Scholar).
- [67] HASSIG, Christian A., Fu-Yue ZENG, Paul KUNG, et al. Ultra-High-Throughput Screening of Natural Product Extracts to Identify Proapoptotic Inhibitors of Bcl-2 Family Proteins. *Journal of Biomolecular Screening* [online]. 2014, **19**(8), 1201-1211 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1087-0571. Dostupné z: doi:10.1177/1087057114536227
- [68] NAIDU, R., S. NAIDU, P. JACKSON, R.G. MCLAREN a M.E. SUMNER. Application of Capillary Electrophoresis to Anion Speciation in Soil Water Extracts. *Advances in Agronomy Volume 65* [online]. Elsevier, 1999, 1999, s. 131-150 [cit. 2021-4-28]. Advances in Agronomy. ISBN 9780120007653. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2113(08)60912-8
- [69] CAI, Jianyi a Jack HENION. Capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 1995, **703**(1-2), 667-692 [cit. 2021-4-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(94)01178-H
- [70] BATEMAN, K.P, P THIBAUT, D.J DOUGLAS a R.L WHITE. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. *Journal of Chromatography A* [online]. 1995, **712**(1), 253-268 [cit. 2021-4-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(95)00438-S
- [71] OEHRLE, Stuart A., Ben SOUTHWELL a Judy WESTRICK. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon* [online]. 2010, **55**(5), 965-972 [cit. 2021-4-28]. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2009.10.001
- [72] BAUERSACHS, Thorsten, Ellen C. HOPMANS, Justine COMPAORÉ, Lucas J. STAL, Stefan SCHOUTEN a Jaap S. Sinninghe DAMSTÉ. Rapid analysis of long-chain glycolipids in heterocystous cyanobacteria using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2009, **23**(9), 1387-1394 [cit. 2021-4-28]. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.4009

- [73] Basics of LC/MS. In: *Agilent Technologies: Innovating the HP Way* [online]. Printed in the U.S.A.: Agilent Technologies, c2001, s. 4-34 [cit. 2021-4-27]. ISSN 5988-2045EN. Dostupné z: <https://www.agilent.com/chem>
- [74] LIN, Yiqing, Susan SCHIAVO, Jimmy ORJALA, Paul VOUIROS a Roger KAUTZ. Microscale LC-MS-NMR Platform Applied to the Identification of Active Cyanobacterial Metabolites. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(21), 8045-8054 [cit. 2021-4-28]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac801049k
- [75] BRKLJAČA, Robert a Sylvia URBAN. RECENT ADVANCEMENTS IN HPLC-NMR AND APPLICATIONS FOR NATURAL PRODUCT PROFILING AND IDENTIFICATION. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2011, **34**(13), 1063-1076 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2011.587748
- [76] DUBOIS, Clémence, Robin DUFOUR, Pierre DAUMAR, et al. Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(56), 95316-95331 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.20517
- [77] DREWINKO, Benjamin, Myra PATCHEN, Barthel BARLOGIE a Li-Ying YANG. Differential Killing Efficacy of Twenty Antitumor Drugs on Proliferating and Nonproliferating Human Tumor Cells1. *CANCER RESEARCH* [online]. 1981, **41**, 2328-2333 [cit. 2021-4-28]. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/41/6/2328.full.pdf>
- [78] VALERIOTE, Frederick a Luke VAN PUTTEN. Proliferation-dependent Cytotoxicity of Anticancer Agents: A Review. *CANCER RESEARCH* [online]. 1975, **35**, 2619-2630 [cit. 2021-4-28]. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/35/10/2619.full-text.pdf>
- [79] BURGESS, Andrew, Astrid RUEFLI, Heather BEAMISH, Robyn WARRENER, Nicholas SAUNDERS, Ricky JOHNSTONE a Brian GABRIELLI. Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene* [online]. 2004, **23**(40), 6693-6701 [cit. 2021-4-28]. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1207893
- [80] GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, Anllely G., Claudia JUÁREZ-PORTILLA, Tatiana OLIVARES-BAÑUELOS a Rossana C. ZEPEDA. Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discovery Today* [online]. 2018, **23**(2), 434-447 [cit. 2021-4-24]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2017.10.019
- [81] BARNETT, James P., David J. SCANLAN a Claudia A. BLINDAUER. Fractionation and identification of metalloproteins from a marine cyanobacterium. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(10), 3371-3377 [cit. 2021-4-29]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5708-6
- [82] SHAN, Yabing, Yiqun LIU, Li YANG, et al. Lipid profiling of cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 using two-dimensional liquid chromatography with

quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science* [online]. 2016, **39**(19), 3745-3753 [cit. 2021-4-29]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201600315

- [83] METCALF, J.S, K.A BEATTIE, M.L SAKER a G.A CODD. Effects of organic solvents on the high performance liquid chromatographic analysis of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin and its recovery from environmental eutrophic waters by solid phase extraction. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2002, **216**(2), 159-164 [cit. 2021-4-29]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11430.x

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HTS	velkokapacitního testování – "highthroughput" screening
SMT	somatická mutační teorie
TOFT	teorie pole tkáňové organizace
ATP	adenosintrofosfát
AMK	aminokyseliny
MK	mastné kyseliny
NK	nukleové kyseliny
UICC	International Union Against Cancer – Mezinárodní unie proti rakovině
ECL	Association of European Cancer Leagues – Asociace evropských lig proti rakovině
MBU	Mikrobiologický ústav AV ČR vědecké pracoviště Třeboň



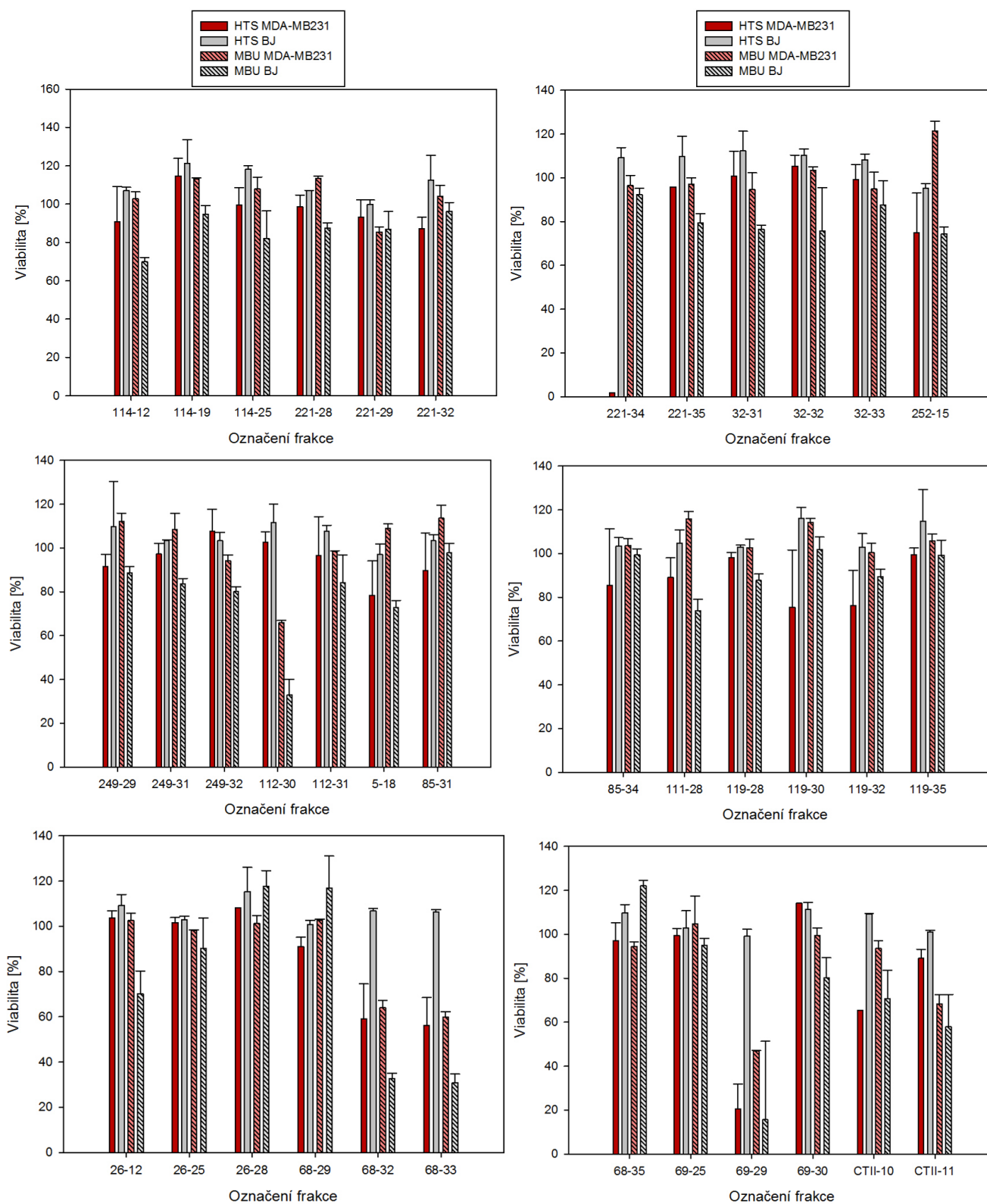
## 9 PŘÍLOHY

### 9.1 „Highthroughput“ screening – buněčné linie

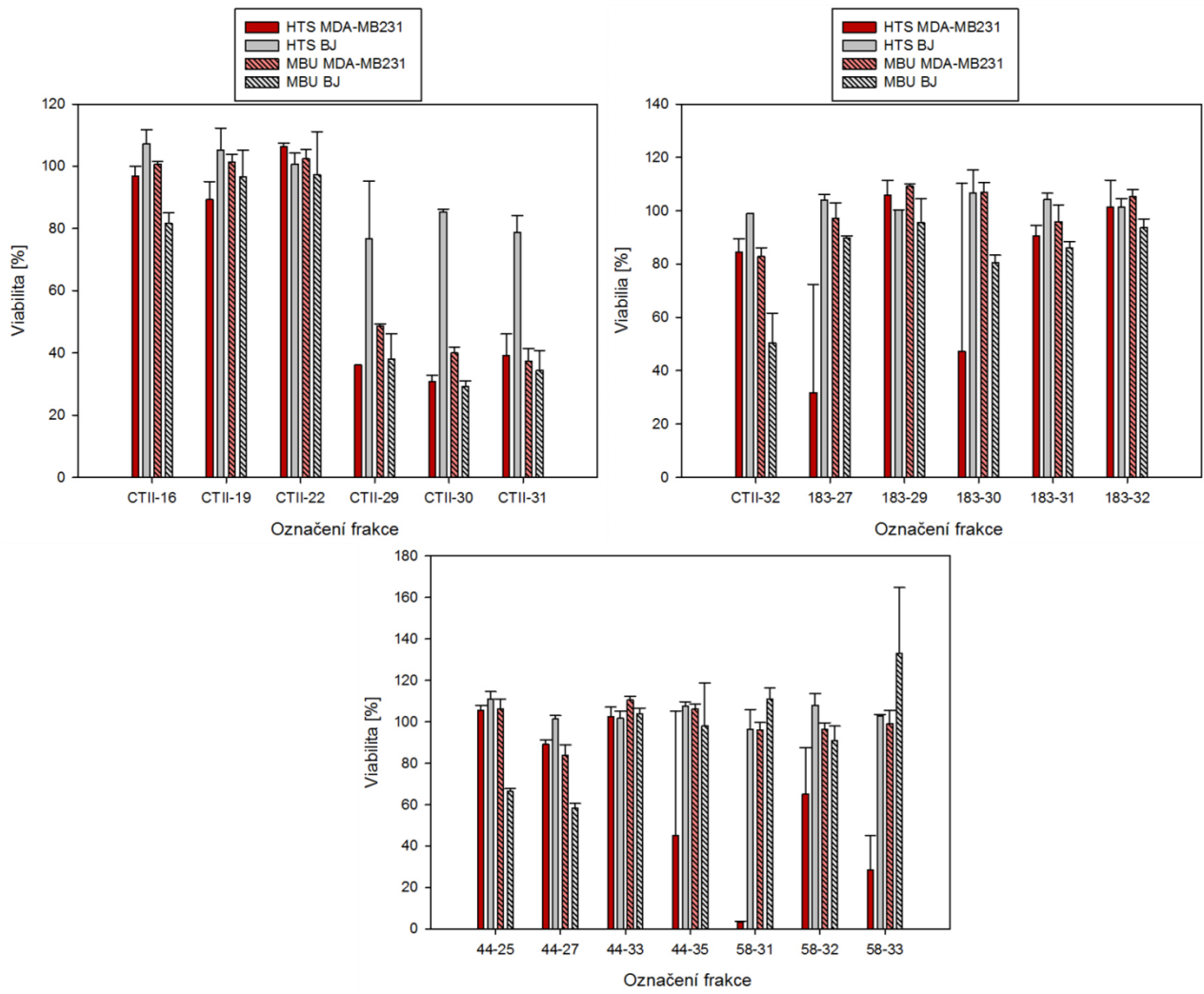
Tabulka 16: Výčet buněčných linií, na kterých byly v rámci „highthroughput“ screeningu testovány všechny chromatografické frakce

Buněčné linie	Primárně tkáň	Typ	Primární buněčná linie	Popis
AsPC-1	slinivka břišní	rakovina	transformovaná	karcinom slinivky břišní
BJ	kůže	normální	primární	fibroblasty
BxPc-3	slinivka břišní	rakovina	transformovaná	karcinom slinivky břišní
C32	kůže	rakovina	transformovaná	kožní melanom
Caov-3	vaječníky	rakovina	transformovaná	adenokarcinom vaječníků
Capan-2	slinivka břišní	rakovina	transformovaná	karcinom slinivky břišní
D283 Med	CNS	rakovina	transformovaná	medulloblastom
DU 145	prostata	rakovina	transformovaná	adenokarcinom prostaty
HCT116	tlusté střevo a rektum	rakovina	transformovaná	kolorektální adenokarcinom
HEK-293	ledviny	normální	normální, imortalizovaná	embryonální ledvinové buňky
Hep G2	játra	rakovina	transformovaná	hepatocelulární karcinom
HL-60	krev	rakovina	transformovaná	akutní myeloidní leukémie
HT-29	tlusté střevo a rektum	rakovina	transformovaná	kolorektální karcinom
K562	krev	rakovina	transformovaná	chronická myeloidní leukémie
LNCaP	prostata	rakovina	transformovaná	adenokarcinom prostaty
LS174T	tlusté střevo a rektum	rakovina	transformovaná	kolorektální karcinom
MCF7	prsa	rakovina	transformovaná	prsní adenokarcinom
MDA-MB-231	prsa	rakovina	transformovaná	prsní adenokarcinom
MiaPaCa-2	slinivka břišní	rakovina	transformovaná	karcinom slinivky břišní
PANC-1	slinivka břišní	rakovina	transformovaná	karcinom slinivky břišní
PaTu-8902	slinivka břišní	rakovina	transformovaná	karcinom slinivky břišní
PC-3	prostata	rakovina	transformovaná	adenokarcinom protstaty
RD	sval	rakovina	transformovaná	rhabdomyosarkom
RKO	tlusté střevo a rektum	rakovina	transformovaná	kolorektální adenokarcinom
RPE1	retina	normální	normální, imortalizovaná	imortalizované buňky z pigmentového epitelu sítnice
SJCRH30	sval	rakovina	transformovaná	rhabdomyosarkom
SK-OV-3	vaječníky	rakovina	transformovaná	adenokarcinom vaječníků
SW480	tlusté střevo a rektum	rakovina	transformovaná	kolorektální adenokarcinom
T47D	prsa	rakovina	transformovaná	prsní adenokarcinom
U2OS	kosti	rakovina	transformovaná	osteokarcinom
U-937	krev	rakovina	transformovaná	difúzní velkobuněčný B-lymfom
ZR-75-1	prsa	rakovina	transformovaná	prsní adenokarcinom

## 9.2 Validační výsledky MBU a HTS pro koncentraci 2,5 µg/ml

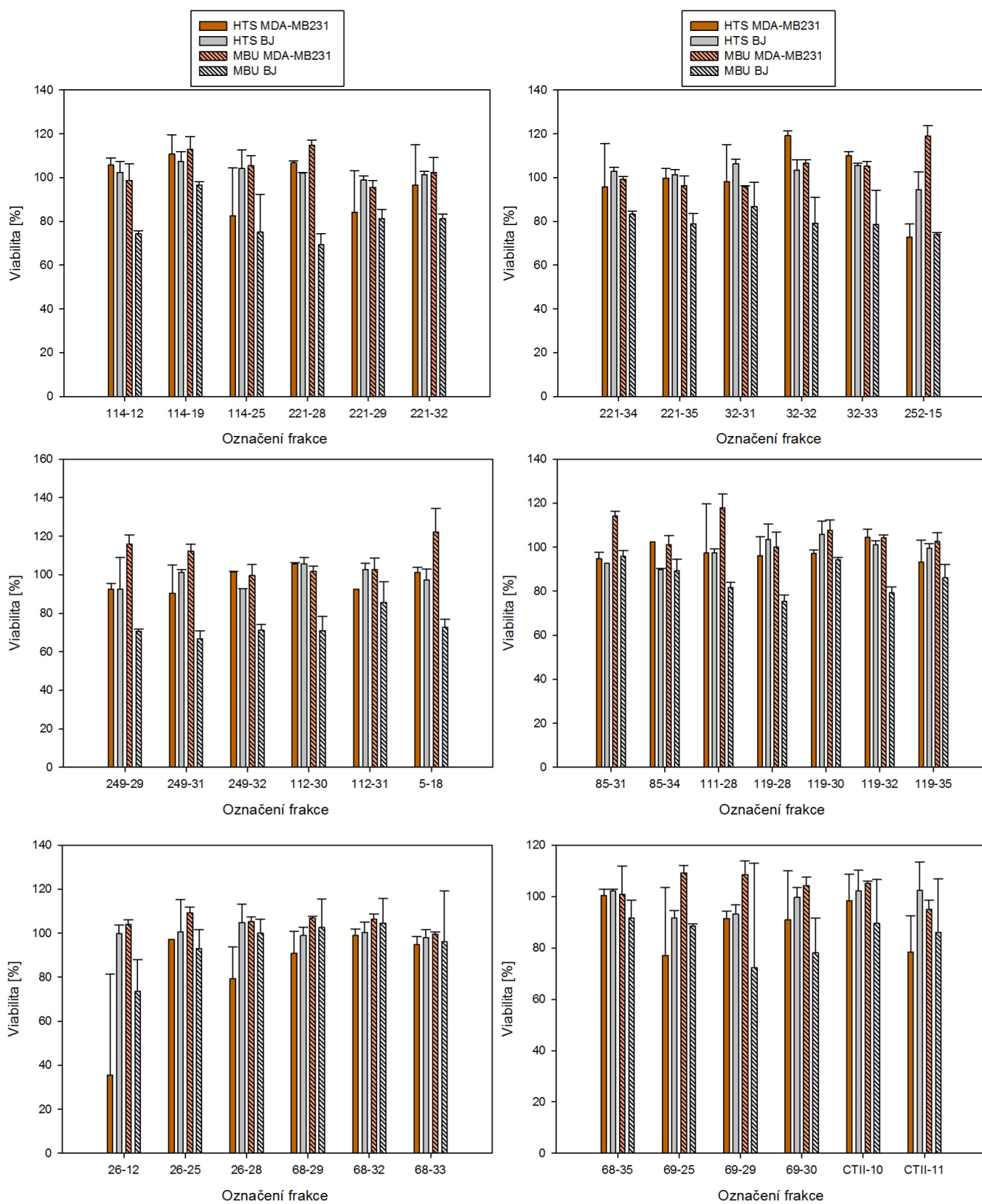


Obrázek 44: Validační výsledky MDA-MB231 a BJ pro koncentraci 2,5 µg/ml

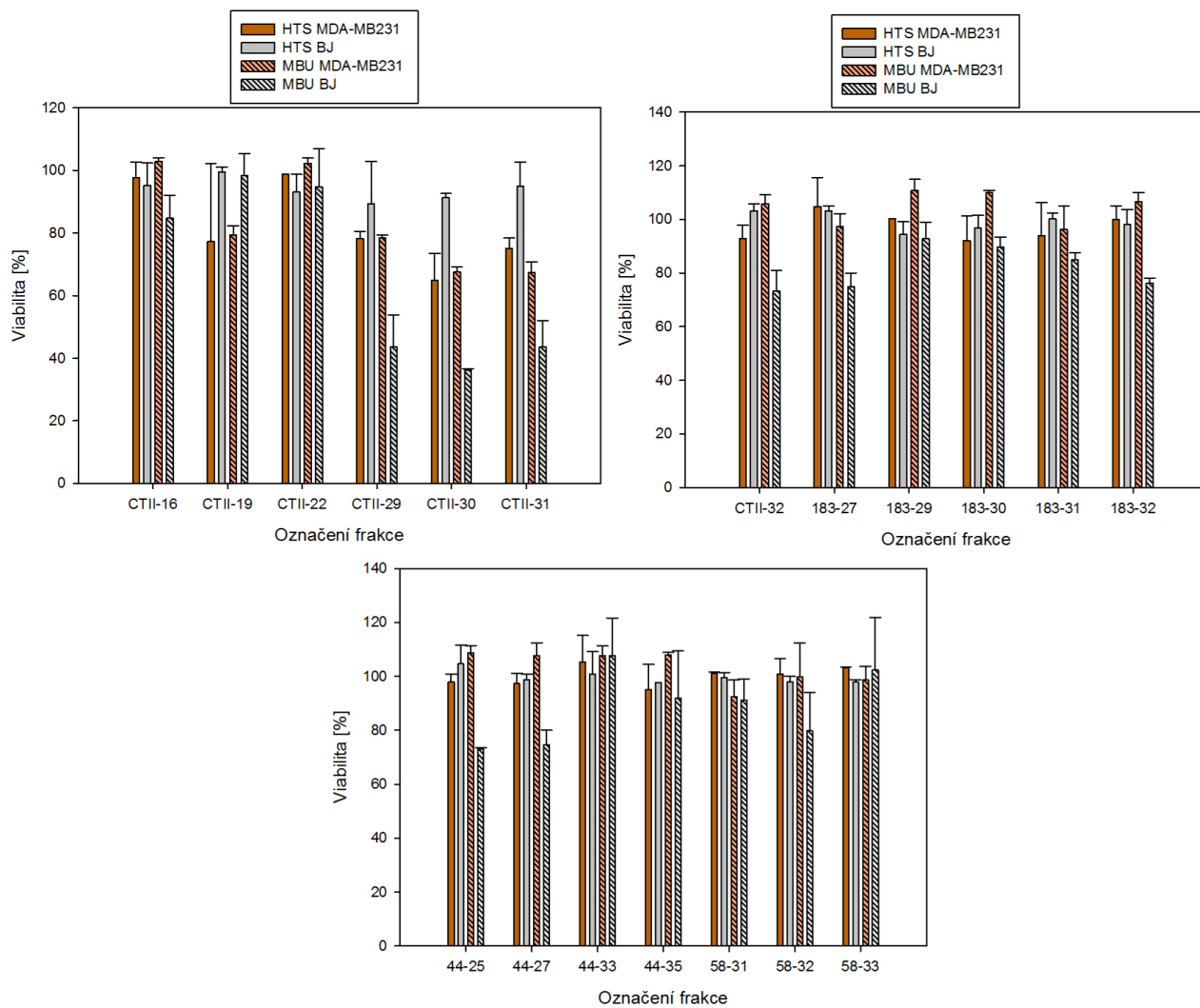


Obrázek 45: Validační výsledky MDA-MB231 a BJ pro koncentraci 2,5 µg/ml

## 9.1 Validační výsledky MBU a HTS pro koncentraci 0,25 µg/ml



Obrázek 46: Validační výsledky MDA-MB231 a BJ pro koncentraci 0,25 µg/ml



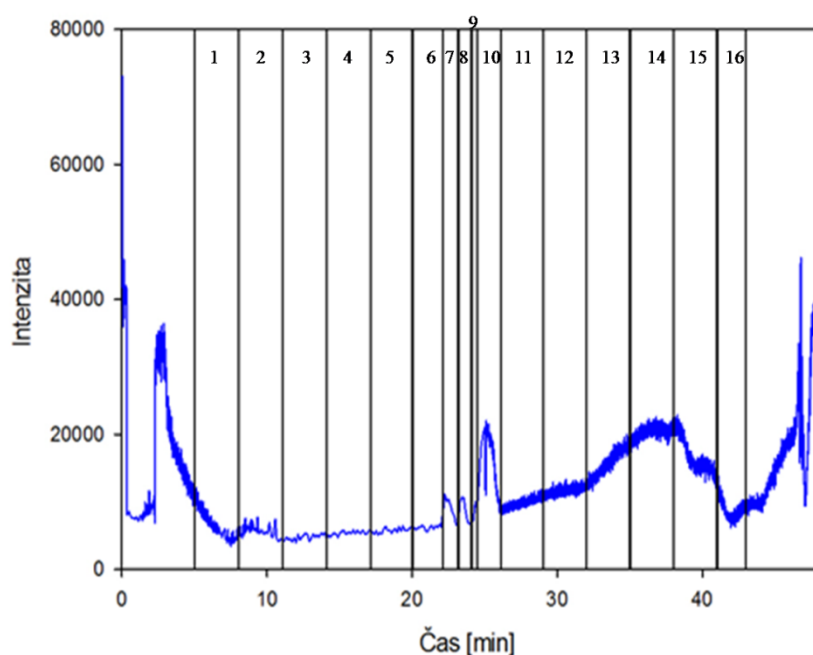
Obrázek 47: Validační výsledky MDA-MB231 a BJ pro koncentraci 0,25 µg/ml

## 9.2 Výsledky frakcionace primárních frakcí

### 9.2.1 Výsledky frakcionace pro primární frakci 58-31

58-31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
BJ	žlutá	žlutá	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená	zelená
MDA-MB231	zelená	zelená	zelená	zelená	žlutá	zelená	zelená	zelená	zelená	žlutá	zelená	žlutá	žlutá	žlutá	žlutá	žlutá

Obrázek 48: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci 58-31. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.



Obrázek 49: Chromatogram frakce 58-31 a přesné označení frakcionace

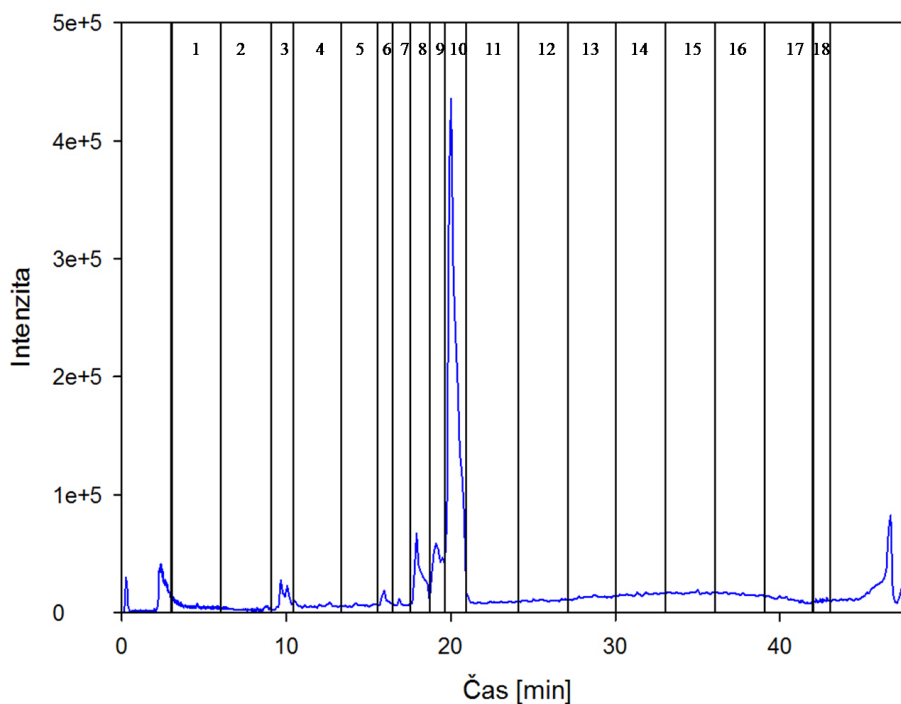
Tabulka 17: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci 58-31, křížky označují frakci bez přítomného m/z

58-31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Čas [min]	5-8	11,0	14,0	17,0	20,0	22,0	23,1	24,0	24,5	26,1	29,0	32,0	35,0	38,0	41,0	43,0
m/z	×	×	×	×	×	×	589,5	809,5	807,5	791,5	×	×	×	×	×	×

## 9.2.2 Výsledky frakcionace pro primární frakci 69-29

69-29	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
BJ																		
MDA-MB231																		

Obrázek 50: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci 69-29. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.



Obrázek 51: Chromatogram frakce 69-29 a přesné označení frakcionace

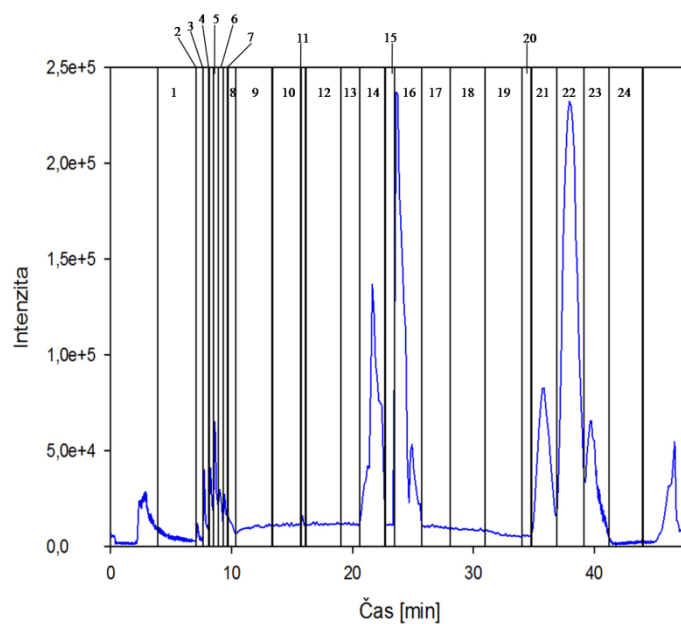
Tabulka 18: Přehled nalezených „látek“ ( $m/z$ ) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci 69-29, křížky označují frakci bez přítomného  $m/z$

69-29	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Čas [min]	3-6	9,0	10,4	13,3	15,5	16,4	17,5	18,7	19,6	20,9	24,0	27,0	30,0	33,0	36,0	39,0	42,0	43,0
$m/z$	×	×	409,2 387,2	×	×	637,3	609,3	593,3	807,5	742,5	×	×	×	×	×	×	×	×

### 9.2.3 Výsledky frakcionace pro primární frakci 85-31

85-31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
BJ	[Color-coded viability data]																							
MDA-MB231	[Color-coded viability data]																							

Obrázek 52: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci 85-31. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.



Obrázek 53: Chromatogram frakce 85-31 a přesné označení frakcionace

Tabulka 19: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci 85-31, křížky označují frakci bez přítomného m/z

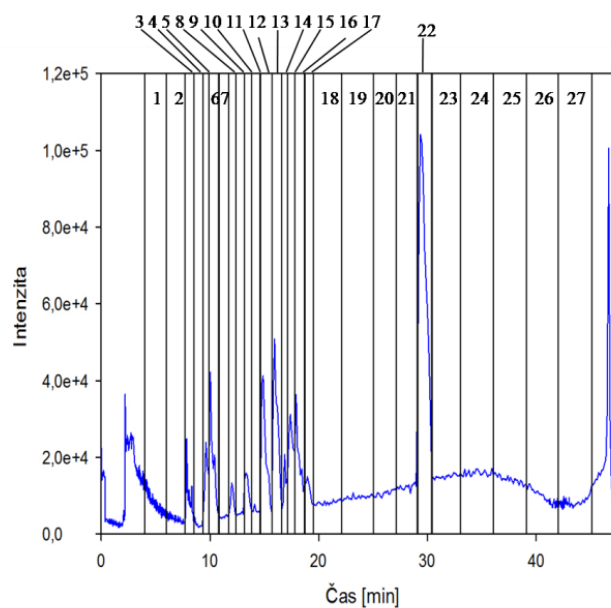
85-31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Čas [min]	3,9-7	7,6	8,1	8,5	8,9	9,3	9,7	10,3	13,3	15,7	16,0	19,0	20,6	22,7	23,4	25,7	28,0	31,0	34,0	34,8	36,8	39,1	41,2	44,0
m/z	×	273,2	331,2	389,3	447,3	505,4	563,4	563,4	×	×	637,3	×	×	443,4	×	607,3	×	×	×	×	643,5	701,6	759,6	×



## 9.2.4 Výsledky frakcionace pro primární frakci 119-30

119-30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
BJ																												
MDA-MB231																												

Obrázek 54: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci 119-30. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.

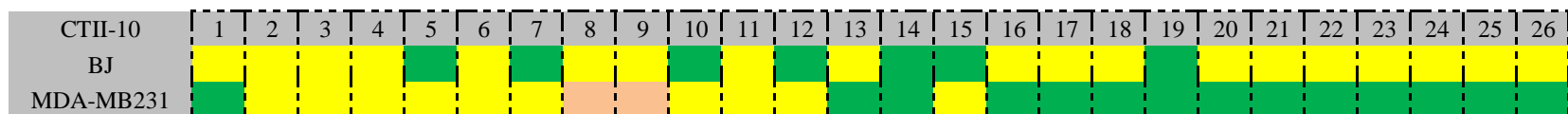


Obrázek 55: Chromatogram frakce 119-30 a přesné označení frakcionace

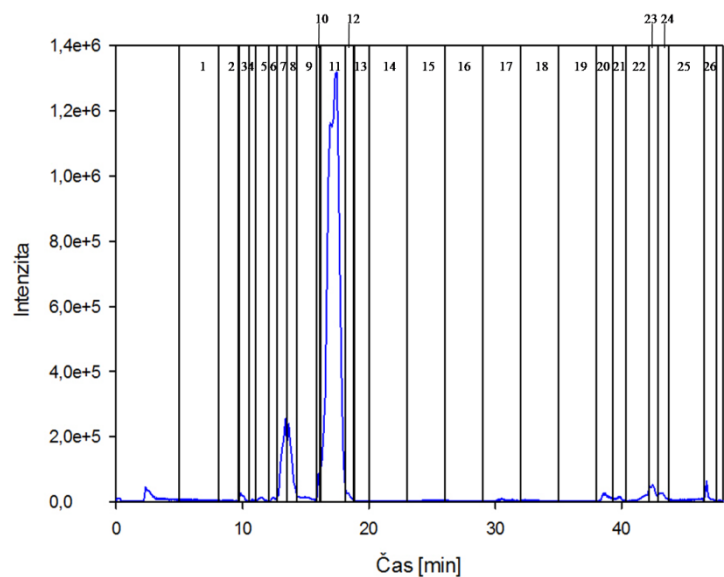
Tabulka 20: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci 85-31, křížky označují frakci bez přítomného m/z

119-30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Čas [min]	4-6	7,7	8,5	9,3	9,9	10,8	11,7	12,4	13,1	13,8	14,6	15,7	16,6	17,0	17,8	18,6	19,4	22,0	25,0	27,0	29,0	30,4	33,0	36,0	39,0	42,0	45,0
m/z	×	×	229,2	×	409,2	387,2	×	440,4	×	825,6	×	415,4	637,3	609,3	805,5	593,3	813,5	×	×	×	×	338,4	×	×	×	×	×

## 9.2.5 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-10



Obrázek 56: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-10. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.



Obrázek 57: Chromatogram frakce CTII-10 a přesné označení frakcionace

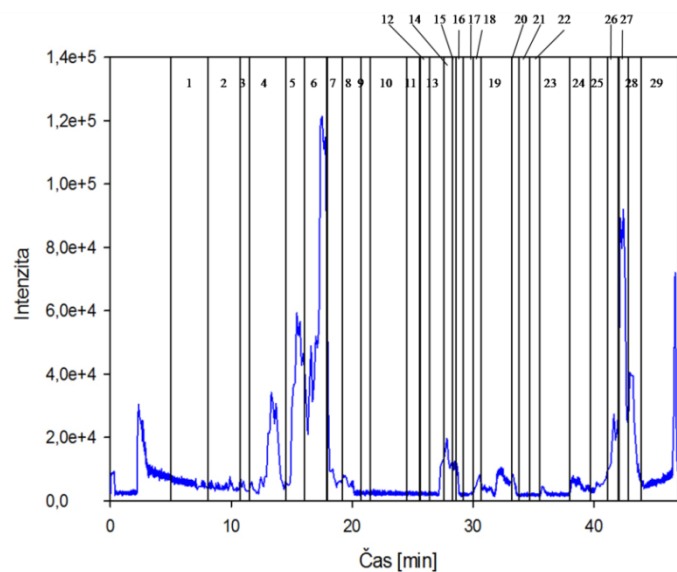
Tabulka 21: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-10, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Čas [min]	5-8	9,7	10,4	11,0	12,1	12,7	13,5	14,3	15,9	16,1	18,1	18,8	20,0	23,0	26,0	29,0	32,0	35,0	38,0	39,2	40,3	42,1	42,8	43,7	46,5	47,5
m/z	×	×	456,3	478,3	771,1	171,2	874,3	874,3	×	810,4	824,4	822,4	×	×	×	×	×	×	×	284,3	284,3	×	443,3	457,3	×	×

## 9.2.6 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-11

CTII-11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
BJ	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Orange	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
MDA-MB231	Green	Green	Yellow	Orange	Orange	Red	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

Obrázek 58: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-11. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.

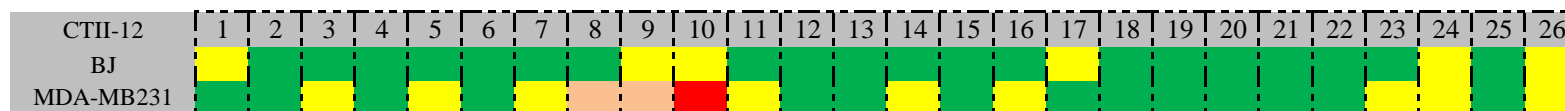


Obrázek 59: Chromatogram frakce CTII-11 a přesné označení frakcionace

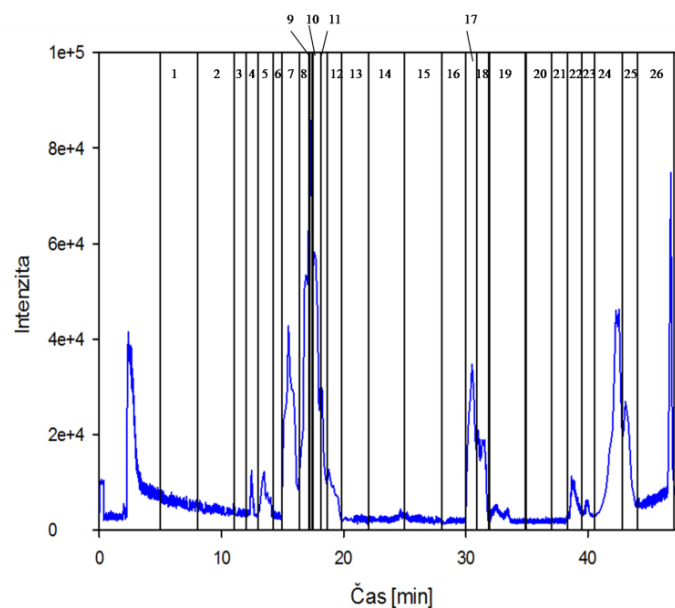
Tabulka 22: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-11, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Čas [min]	5-8	10,7	11,4	14,4	16,0	17,9	19,2	20,7	21,5	24,5	25,6	26,4	27,5	28,2	28,6	29,2	30,0	30,6	33,2	33,8	34,7	35,5	38,0	39,7	41,1	42,0	42,8	43,9	46,9
m/z	×	456,3	476,0	874,3	524,3 858,4	824,4	824,4	538,3	×	×	×	×	506,3	506,3	506,3	506,3	×	476,3	258,3	258,3	×	×	347,2	286,3	429,3	429,3	443,3	457,3	×

## 9.2.7 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-12



Obrázek 60: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-12. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.

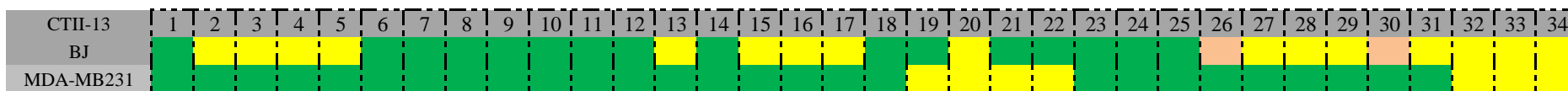


Obrázek 61: Chromatogram frakce CTII-12 a přesné označení frakcionace

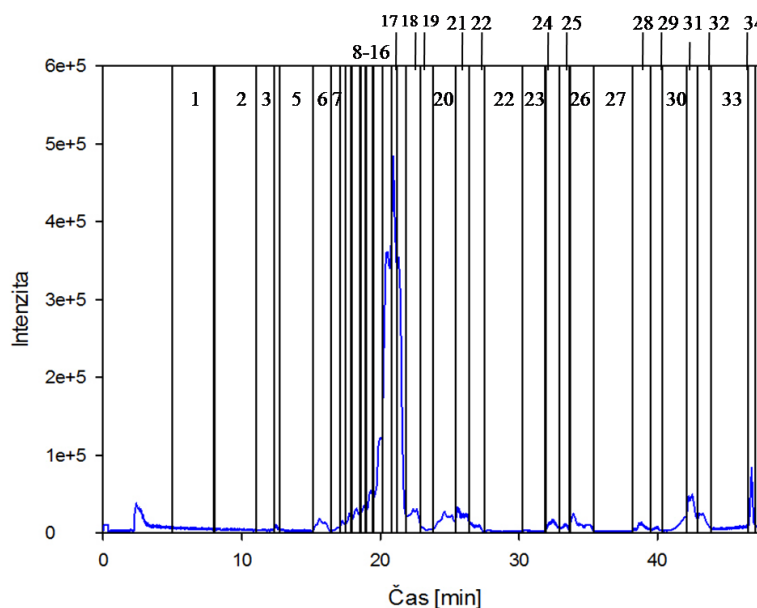
Tabulka 23: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-12, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Čas [min]	5-8	11,0	12,0	12,9	14,2	14,9	16,3	17,1	17,4	18,0	18,6	19,8	22,0	25,0	28,0	30,0	30,8	31,9	34,9	37,0	38,3	39,5	40,5	42,8	44,0	47,0
m/z	×	×	×	171,2	317,2	×	858,4	494,3	393,3	393,3	858,4	858,4 525,3	×	×	×	×	476,3	476,3	258,3	×	×	284,3	284,3	443,3	457,4	×

## 9.2.8 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-13



Obrázek 62: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-13. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.

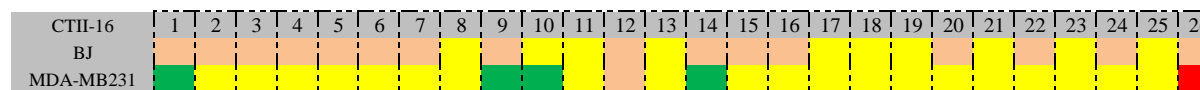


Obrázek 63: Chromatogram frakce CTII-13 a přesné označení frakcionace

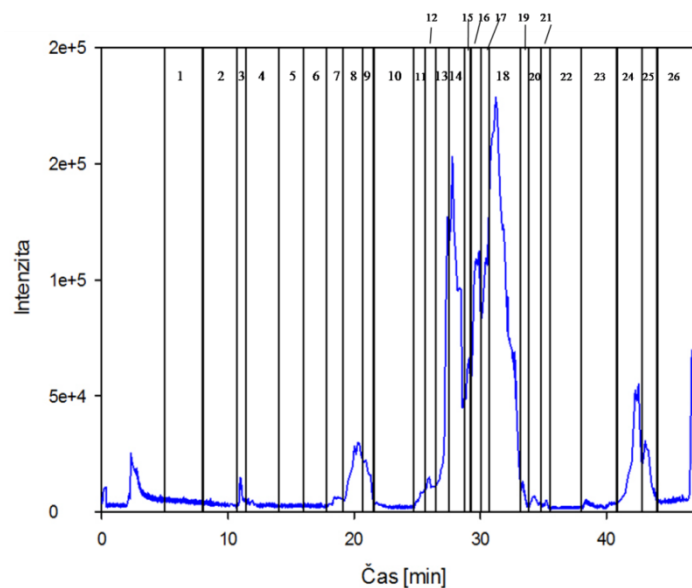
Tabulka 24: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-13, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
Čas [min]	5-8	11,0	12,3	12,7	15,1	16,4	17,1	17,5	17,9	18,5	18,9	19,5	20,1	20,7	21,2	21,8	22,9	23,8	25,4	26,4	27,5	30,2	31,9	32,9	33,6	35,4	38,2	39,5	40,3	42,1	42,9	43,8	46,5	47,0
m/z	×	×	×	171,2	×	524,3	494,3	494,3	858,4	858,4	858,4	789,4	803,4	803,4	803,4	803,4	833,4	835,4	200,2	214,3	230,2	×	×	258,3	258,3	490,3	×	284,3	284,3	147,1	443,3	457,3	×	×

## 9.2.9 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-16



Obrázek 64: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-16. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.



Obrázek 65: Chromatogram frakce CTII-16 a přesné označení frakcionace

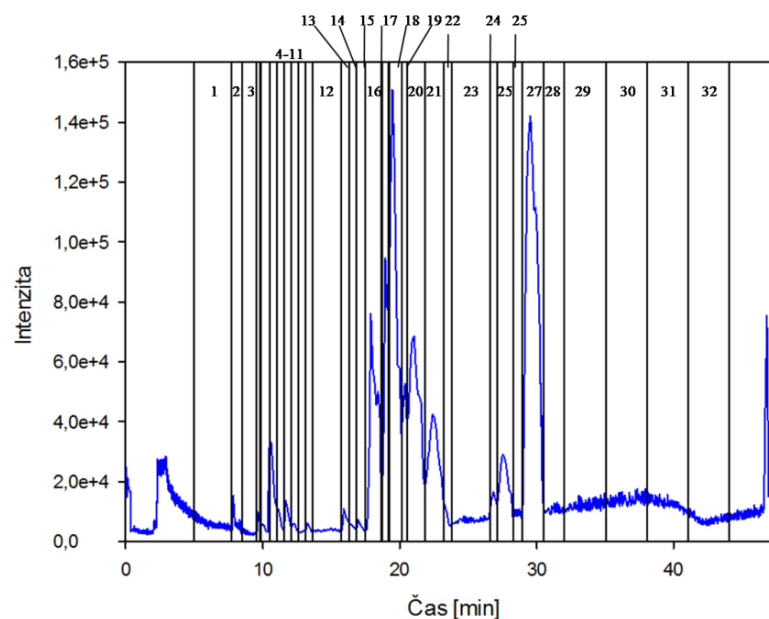
Tabulka 25: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-16, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-16	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Čas [min]	5-8	10,7	11,4	14,0	16,0	17,8	19,1	20,7	21,5	24,7	25,6	26,4	27,5	28,6	29,2	30,0	30,6	33,2	33,8	34,8	35,5	38,1	40,8	42,8	44,0	47,0
m/z	×	×	229,1	×	×	×	525,3	541,3	541,3	×	321,2	522,3	325,2	325,2	311,3	452,3	494,3	494,3	258,3	330,3	330,3	×	286,3	443,3	457,4	×

## 9.2.10 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-29

CTII-29	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
BJ																																
MDA-MB231																																

Obrázek 66: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-29. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.

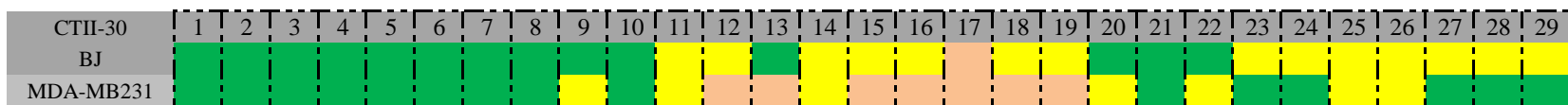


Obrázek 67: Chromatogram frakce CTII-29 a přesné označení frakcionace

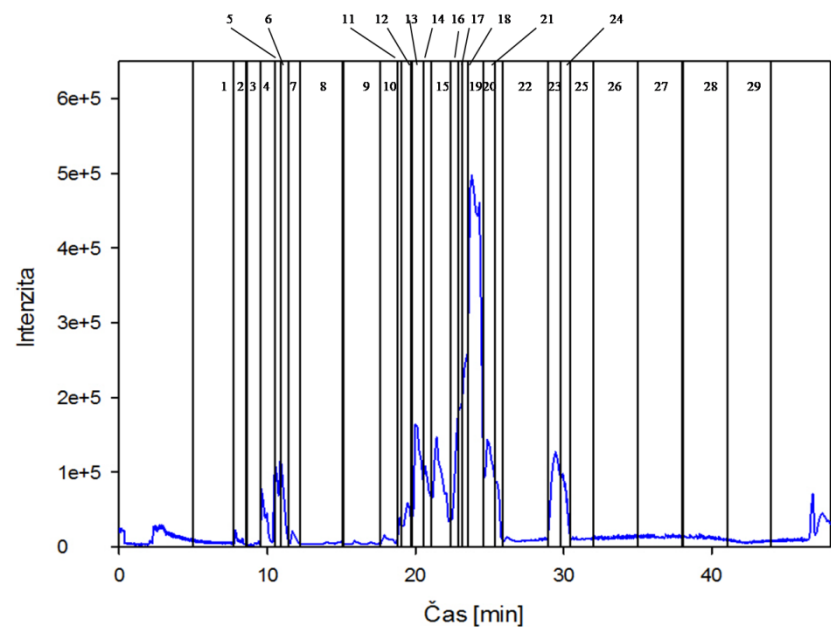
Tabulka 26: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-29, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-29	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Čas [min]	5-7,7	8,5	9,5	9,8	10,4	10,9	11,5	12,1	12,6	13,1	13,6	15,7	16,3	16,8	17,5	18,7	19,2	20,1	20,5	21,8	23,1	23,7	26,5	27,1	28,3	28,9	30,5	32,0	35,0	38,0	41,0	44,0
m/z	×	229,1	×	230,2	230,1	258,3	539,3	286,3	540,4	×	841,6	×	637,3	683,5	669,5	593,3	836,6	836,5	806,5	806,5	806,5	310,3	×	818,5	818,5	×	338,3	×	×	×	×	×

### 9.2.11 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-30



Obrázek 68: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-30. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.



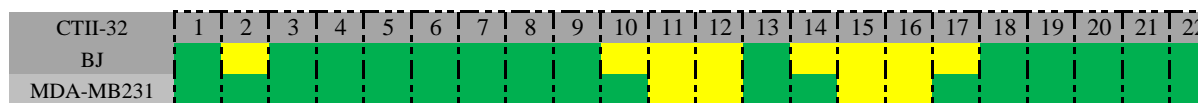
Obrázek 69: Chromatogram frakce CTII-30 a přesné označení frakcionace

Tabulka 27: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-30, křížky označují frakci bez přítomného m/z

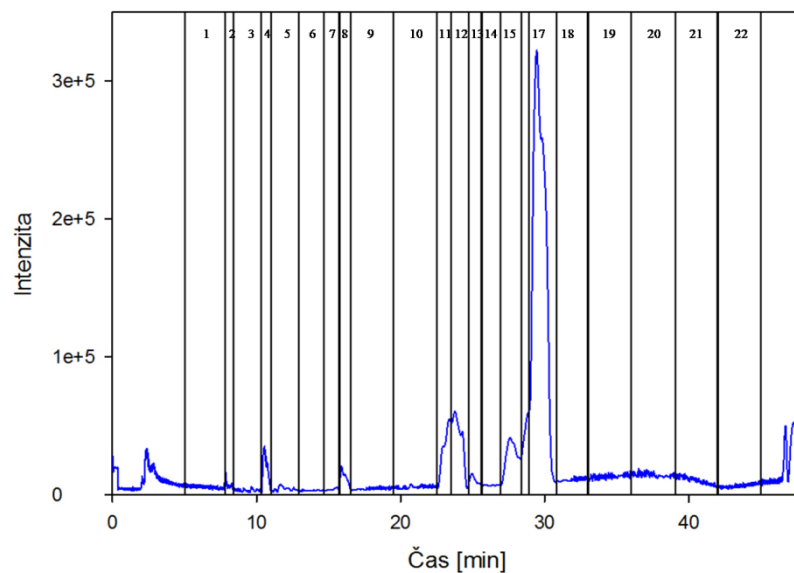
CTII-30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Čas [min]	5-7,7	8,5	9,5	10,4	10,8	11,5	12,2	15,0	17,5	18,7	19,1	19,7	20,5	21,0	22,3	22,9	23,1	23,5	24,6	25,4	25,9	28,9	29,8	30,4	32,0	35,0	38,0	41,0	44,0
m/z	×	229,1	×	230,2	258,3	372,3	286,3	×	×	593,3	836,6	836,6	535,3	535,3	623,3	780,6	780,6	780,6	607,3	607,3	607,3	×	338,3	338,3	×	×	×	×	×



## 9.2.12 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-32



Obrázek 70: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-32. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.

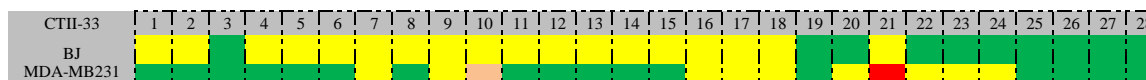


Obrázek 71: Chromatogram frakce CTII-32 a přesné označení frakcionace

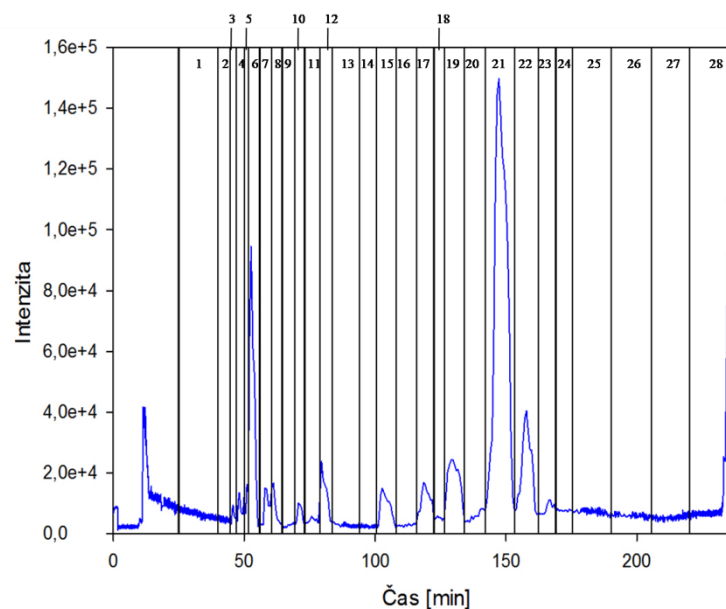
Tabulka 28: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-32, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-32	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Čas [min]	5-7,8	8,4	10,3	11,0	12,9	14,6	15,7	16,5	19,5	22,5	23,5	24,6	25,6	26,9	28,3	28,9	30,8	33,0	36,0	39,0	42,0	45,0
m/z	×	229,1	×	258,3	286,3	×	×	637,3	×	×	820,6	607,3	607,3	×	733,5	848,6	338,3	×	×	×	×	×

### 9.2.13 Výsledky frakcionace pro primární frakci CTII-33



Obrázek 72: Viabilita buněčných linií MDA-MB231 a BJ pro refrakci CTII-33. Čísla odpovídají jednotlivým frakcím. Použité barevné kódování viability: červená 0–30%, oranžová 30–50%, žlutá 50–70% a zelená 70–100%.

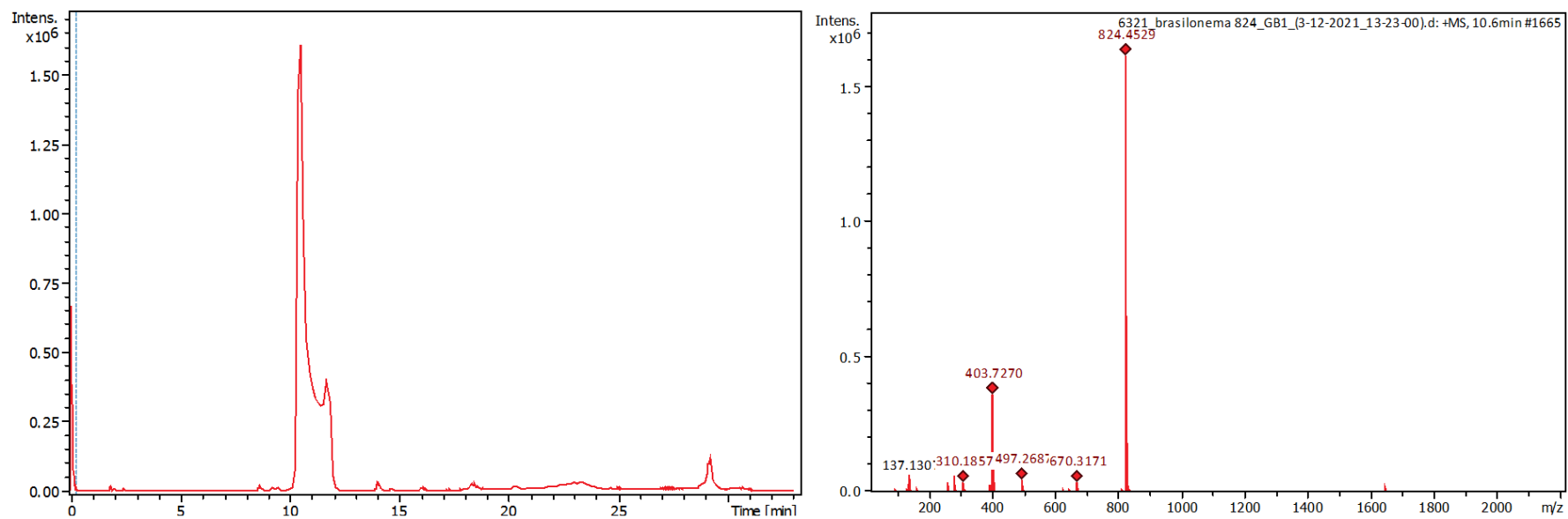


Obrázek 73: Chromatogram frakce CTII-33 a přesné označení frakcionace

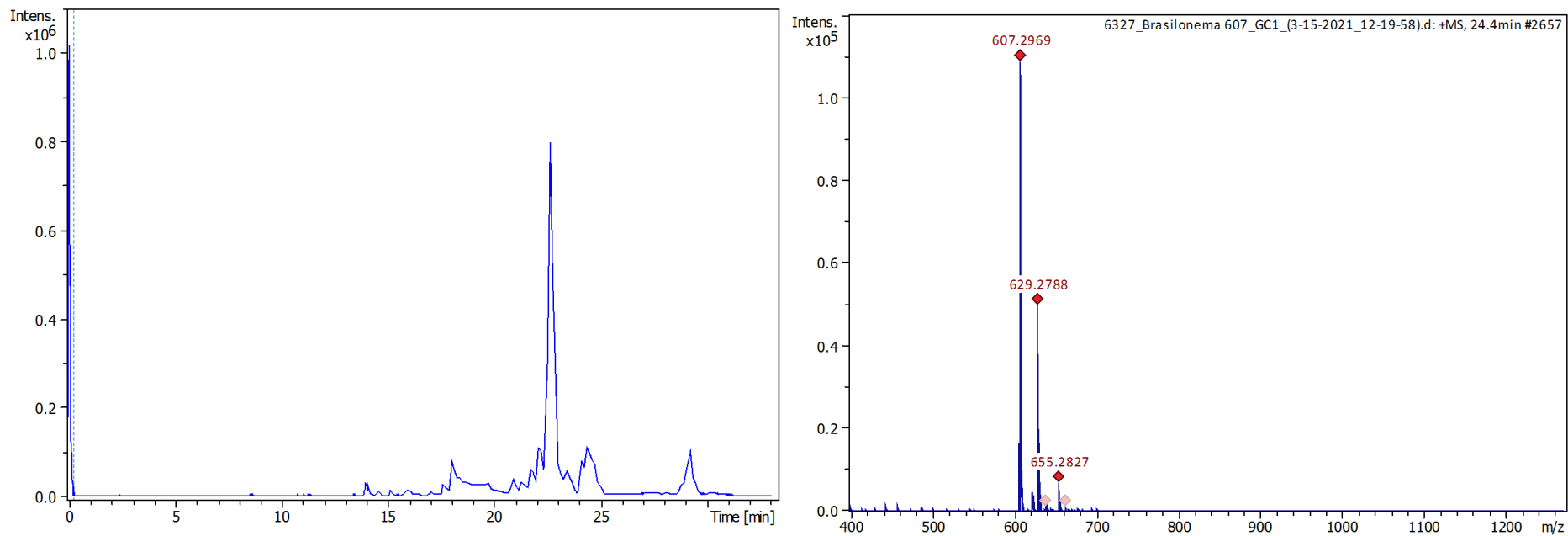
Tabulka 29: Přehled nalezených „látek“ (m/z) v každé frakci v určitém retenčním čase pro primární frakci CTII-33, křížky označují frakci bez přítomného m/z

CTII-33	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Čas [min]	5-8	8,9	9,4	9,9	10,3	11,1	12,0	12,9	13,9	14,6	15,7	16,6	18,8	20,1	21,6	23,1	24,5	25,2	26,8	28,4	30,6	32,4	33,8	35,0	38,0	41,0	44,0	47,0
m/z	×	×	415,2	387,2	387,2 228,3	258,3	286,3	540,4	×	568,5	195,1	715,3 637,3	×	×	1066,6	×	607,3	×	563,5 904,9	591,5	338,3	667,5	565,4	×	×	×	×	×

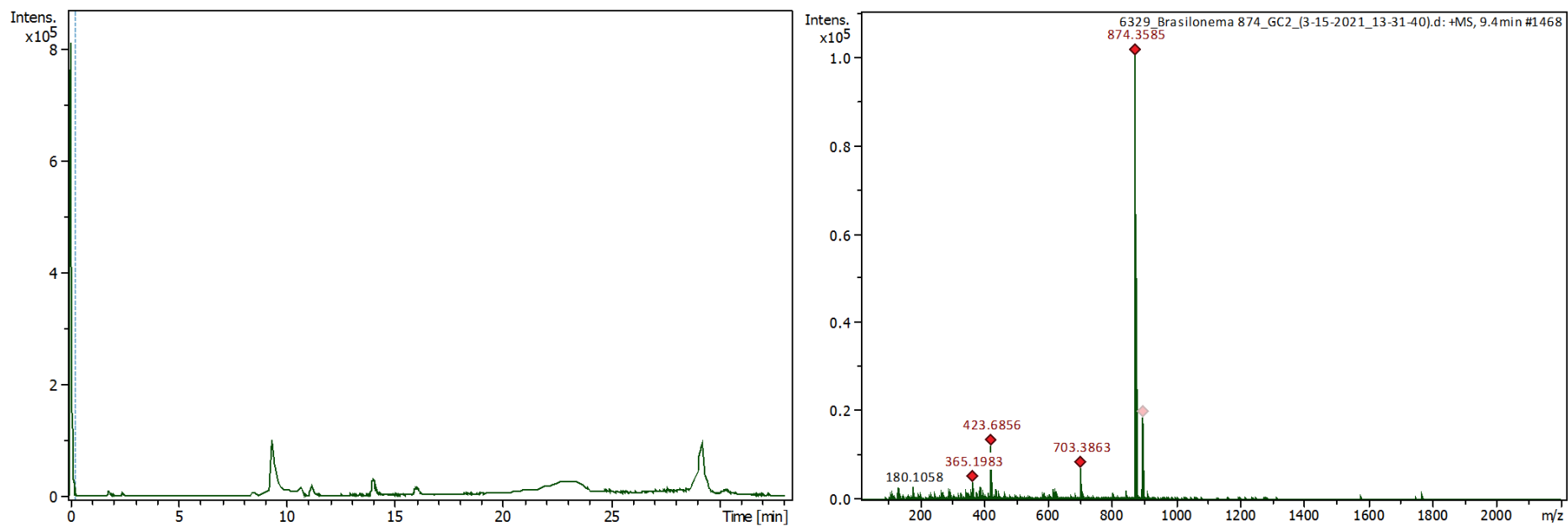
### 9.3 Chromatogramy a MS spektra „čistých“ látek



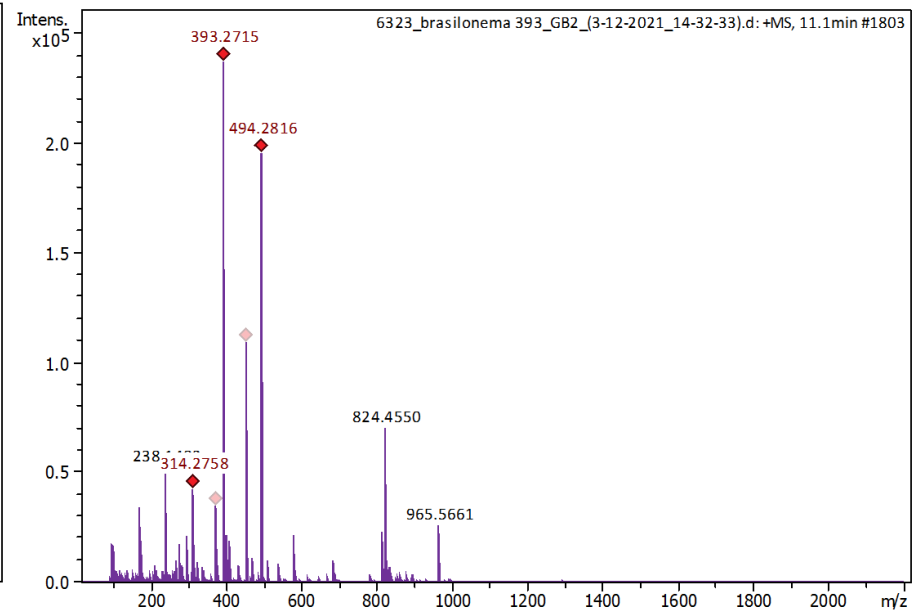
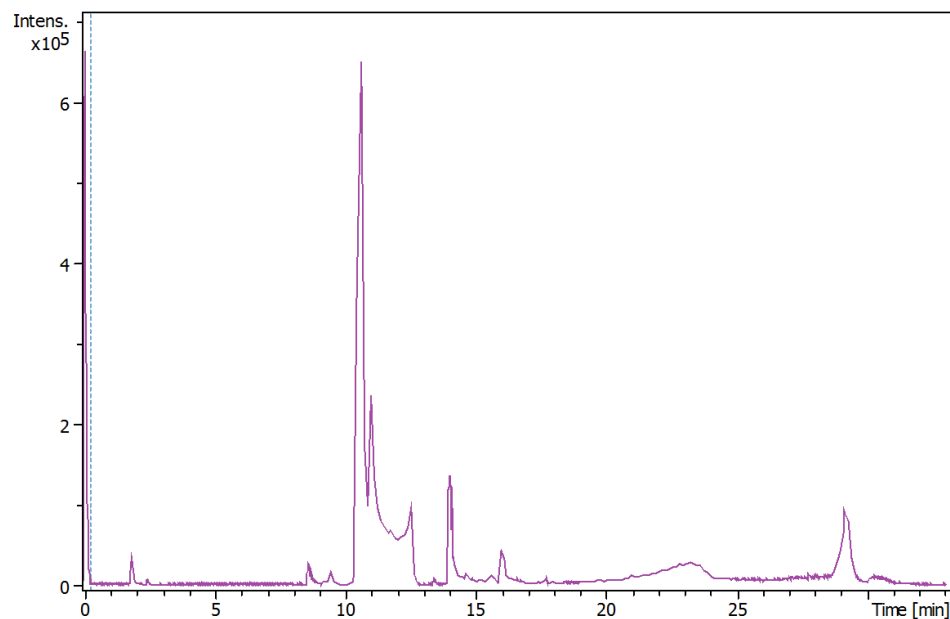
Obrázek 74: Chromatograf a MS spektrum „čisté“ látky 824,4



Obrázek 75: Chromatograf a MS spektrum „čisté“ látky 607,3



Obrázek 76: Chromatograf a MS spektrum „čisté“ látky 874,3



Obrázek 77: Chromatograf a MS spektrum „čisté“ látky 393,3