

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

**DERIVÁTY FERROCENU A TITANOCENU JAKO
POTENCIÁLNÍ PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA**

Tran Thi Thu Giang

Karlovy Vary 2014

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 06 Zdravotnictví

Deriváty ferrocenu a titanocenu jako potenciální protinádorová léčiva

Ferrocene and titanocene derivatives as potential anticancer drugs

Autor: Tran Thi Thu Giang

Škola: První české gymnázium v Karlových Varech
Národní 25, Karlovy Vary

Vedoucí práce: Mgr. Marta Nekulová, Ph.D.

Karlovy Vary 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Marty Nekulové, Ph.D., použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

V dne podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala Mgr. Martě Nekulové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a podnětné připomínky, nesmírnou vstřícnost, trpělivost a čas, který mi v průběhu zpracování práce věnovala.

Mé poděkování patří též paní profesorce Mgr. Kateřině Pavlasové, která mě podporovala v mé zálibě k biologii a pomohla zajistit spolupráci s Regionálním centrem aplikované molekulární onkologie (RECAMO) při Masarykově onkologickém ústavu v Brně.

Děkuji panu RNDr. Bořivoji Vojtěškovi, DrSc., který mi umožnil skvělou stáž a zapojení do výzkumu, Mgr. Lucii Koubkové za poskytnutí výsledků z předběžných testů cytotoxicity a výzkumnému týmu RECAMO za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych ráda poděkovala panu řediteli RNDr. Zdeňku Papežovi za podporu v mém studiu a svým profesorům za toleranci. Velice děkuji Karlovarskému kraji za finanční podporu.

Srdečné poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich nesmírnou podporu nejen při zpracování této práce, ale i během celého studia.

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpI - RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

Abstrakt

Výzkum a vývoj nových protinádorových léčiv je nezbytný pro pokrok v léčbě onkologických onemocnění. Pacientů s nádorovými onemocněními stále přibývá a stávající metody léčby mají svá omezení. Problémem je především rezistence nádorových buněk k chemoterapeutikům a množství nežádoucích účinků chemoterapie. Výzvou současného onkologického výzkumu je proto vývoj léčiv, která budou mít maximální kurativní účinek a minimální toxicitu pro lidský organismus.

Tato práce je zaměřena na studium protinádorových účinků nově syntetizovaných derivátů titanocenu a ferrocenu. Cílem práce je stanovení cytotoxicity těchto látek, charakterizace mechanismů jejich působení a srovnání jejich účinků s cisplatinou, která patří k nejpoužívanějším cytostatikům. Látky byly testovány na buněčných liniích odvozených od karcinomu ovaria rezistentních i citlivých vůči cisplatině - A2780, A2780cis a SKOV-3.

Byl sledován vliv nově syntetizovaných organokovových sloučenin na proliferaci nádorových buněk, buněčný cyklus a apoptózu. Byly studovány změny exprese vybraných genů zapojených do regulace buněčného cyklu a procesu apoptózy a byl měřen oxidativní stres v buňkách. Pro objasnění mechanismu účinku těchto látek byla využita metoda průtokové cytometrie, analýza buněčné proliferace v reálném čase, test cytotoxicity (MTT), stanovení oxidačního stresu a elektroforéza v polyakrylamidovém gelu ve spojení s western blottingem.

V MTT testu cytotoxicity vykazoval derivát ferrocenu výrazně vyšší účinek ve srovnání s cisplatinou a to na buňky citlivé k cisplatině i na buňky rezistentní k cisplatině, což bylo potvrzeno analýzou buněčné proliferace v reálném čase. Derivát titanocenu měl menší cytotoxický účinek než cisplatin. Průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že testované organokovové sloučeniny neměly na rozdíl od cisplatin významný vliv na regulaci buněčného cyklu. Pomocí elektroforézy a western blottingu byly detekovány změny hladiny proteinů zapojených do procesu apoptózy a regulace buněčného cyklu. Překvapivě na rozdíl od cisplatin nedošlo po působení testovaných látek k nárůstu hladiny p53, p21 ani štěpení proteinu PARP. Byl však zjištěn nárůst obsahu kyslíkových radikálů v buňkách.

Z uvedených výsledků vyplývá, že testovaný nově syntetizovaný derivát ferrocenu má výrazné cytotoxické účinky na nádorové buněčné linie odvozené od karcinomu ovaria a to včetně linií rezistentních k cisplatině. Mechanismus jeho účinku je odlišný od cisplatin, patrně nejde o vazbu na DNA, zato je spojen s nárůstem oxidačního stresu buněk. Tato práce přinesla nové podněty pro další výzkum organokovových sloučenin jako potenciálních protinádorových léčiv, získané poznatky mohou být využity především při syntéze další generace těchto sloučenin.

Klíčová slova: nádorová onemocnění, apoptóza, oxidační stres, chemoterapie, cisplatin, organokovové sloučeniny, derivát titanocenu, derivát ferrocenu

Abstract

Research into and development of new anticancer drugs is essential for progress in the treatment of oncological diseases. The number of patients diagnosed with cancer keeps growing and current treatment methods have their limitations. The main problem is resistance of cancer cells to chemotherapeutics and the large amount of adverse effects of chemotherapy. The challenge for current oncology research is the development of drugs, which will have a maximal curative effect and a minimal toxicity for human organism.

This work focuses on the study of antitumor effects of newly synthesized titanocene and ferrocene derivatives. The aim of this work is the cytotoxicity evaluation of these compounds, the characterization of their mechanisms of action and comparison of their effects with cisplatin, which is one of the most commonly used cytostatic drugs. The compounds were tested on cell lines derived from ovarian carcinoma, both resistant and sensitive to cisplatin- A2780, A2780cis and SKOV-3.

The effect of newly synthesized organometallic compounds on cancer cell proliferation, cell cycle and apoptosis was observed. Changes in the expression of the selected genes involved in cell cycle regulation and apoptosis were studied and the oxidative stress in the cells was measured. To clarify the mechanism of the effect of these compounds, flow cytometry, real time cell proliferation analysis, cytotoxicity assay (MTT), oxidative stress determination and polyacrylamide electrophoresis in combination with western blotting was used.

In MTT cytotoxicity assay, the ferrocene derivative showed a distinctly higher effect compared to the cisplatin on cells both sensitive to cisplatin and resistant to cisplatin, which was confirmed by the analysis of cell proliferation in real time. The titanocene derivative had a smaller effect on cell proliferation than cisplatin. Flow cytometry revealed that the tested organometallic compounds did not have a significant effect on cell cycle regulation in contrast with cisplatin. Changes in the levels of proteins involved in apoptosis and cell cycle regulation were detected by electrophoresis and western blotting. Surprisingly, unlike cisplatin, no increased p53 and p21 levels and PARP cleavage occurred after treatment with the tested compounds. However, an increase in the amount of reactive oxygen species in the cells was determined.

The stated results implicate that the tested newly synthesized ferrocene derivative has a significant cytotoxic effect on cancer cell lines derived from ovarian carcinoma including cell lines resistant to cisplatin. The mechanism of action is different from cisplatin; apparently it does not bind to DNA, but it is linked with increased oxidative stress. This work gave rise to further research of organometallic compounds as potential anticancer drugs; and the acquired knowledge could especially be used in the synthesis of the next generation of these compounds.

Keywords: oncological diseases, apoptosis, oxidative stress, chemotherapy, cisplatin, organometallic compounds, titanocene derivative, ferrocene derivative

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
ÚVOD	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 BIOLOGIE NÁDORŮ.....	12
1.2 BUNĚČNÝ CYKLUS A JEHO REGULACE.....	18
1.3 APOPTÓZA.....	23
1.4 OXIDAČNÍ STRES	27
1.5 MOŽNOSTI LÉČBY NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	30
1.5.1 <i>Chirurgická léčba</i>	30
1.5.2 <i>Radioterapie</i>	30
1.5.3 <i>Chemoterapie</i>	30
1.6 ORGANOKOVOVÉ SLOUČENINY JAKO PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA.....	34
1.6.1 <i>Cisplatin a její deriváty</i>	34
1.6.2 <i>Další organokovové sloučeniny a jejich protinádorový účinek</i>	36
1.6.3 <i>Charakteristika látek použitých v práci SOČ</i>	39
2 CÍLE PRÁCE	40
3 MATERIÁL A METODY	41
3.1 TKÁŇOVÉ KULTURY	41
3.1.1 <i>Buněčné linie (A2780, A2780 cis, SKOV-3)</i>	41
3.1.2 <i>Příprava kultivačního média a pasážování buněk</i>	42
3.1.3 <i>Kryokonzervace a rozmrazování buněčných linií</i>	43
3.2 POUŽITÁ CYTOSTATIKA A PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ	43
3.3 TEST CYTOTOXICITY	44
3.3.1 <i>Princip metody</i>	44
3.3.2 <i>Postup práce</i>	45
3.4 MĚŘENÍ FÁZÍ BUNĚČNÉHO CYKLU POMOCÍ PRŮTOKOVÉHO CYTOMETRU.....	46
3.4.1 <i>Princip metody</i>	46
3.4.2 <i>Postup práce</i>	48
3.5 SDS-PAGE A WESTERN BLOTTING	49
3.5.1 <i>Princip metody</i>	49
3.5.2 <i>Postup práce</i>	50
3.6 MĚŘENÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE V REÁLNÉM ČASE.....	54
3.6.1 <i>Princip metody</i>	54
3.6.2 <i>Postup práce</i>	55
3.7 STANOVENÍ OXIDAČNÍHO STRESU BUNĚK.....	55
3.7.1 <i>Princip metody</i>	55
3.7.2 <i>Postup práce</i>	56
4 VÝSLEDKY	57
4.1 POZOROVÁNÍ ÚČINKŮ TESTOVANÝCH LÁTEK NA BUNĚČNÉ LINIE POMOCÍ SVĚTELNÉHO MIKROSKOPU.....	57
4.2 STANOVENÍ CYTOTOXICITY POMOCÍ TESTU MTT.....	61
4.3 ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ.....	65
4.4 DETEKCE ZMĚN HLADINY PROTEINŮ ZAPOJENÝCH DO REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU A APOPTÓZY	70
4.5 MĚŘENÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE V REÁLNÉM ČASE.....	74
4.6 STANOVENÍ OXIDAČNÍHO STRESU BUNĚK.....	76

5	DISKUZE	78
6	SOUHRN	84
6	SUMMARY	85
7	SEZNAM LITERATURY	86
8	PŘÍLOHA 1: SLOŽENÍ POUŽITÝCH ČINIDEL	91
9	PŘÍLOHA 2: SEZNAM POUŽITÝCH PROTILÁTEK	92
10	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	93

Seznam použitých zkratek

Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APC	anaphase-promoting control (anafázi podporující komplex)
APS	amonium persulfate acid (peroxodisíran amonný)
ATM	ataxia telangiectasia mutated
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
CAK	Cdk-activating kinase (Cdk-aktivující kináza)
Cdc	cell division control protein
Cdk	cyclin-dependent kinase (cyklin-dependentní kináza)
cisPt	cis-diamminedichloridoplatinum, cisplatin, CDDP (cisplatina, cis-diamminodichloroplatnatý komplex)
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor protein (Cdk inhibiční protein)
CM	culture medium (kultivační médium)
CSB	complete sample buffer
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	dimethyl sulfoxide (dimethyl sulfoxid)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DTT	dithiothreitol, (2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butane-2,3-diol
ECL substrate	enhanced chemiluminescence substrate
EGTA	ethylene glykol tetraacetic acid
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fas ligand
FasR	Fas receptor

FBS	fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)
G _x phase	gap phase (G _x - fáze)
HRP	horseradish peroxidase (avidin-peroxidáza, křenová peroxidáza)
Chk	checkpoint kinase (checkpoint kináza)
LDS	lithium dodecyl sulfate (dodecylsírán lithný)
M phase	mitosis phase (M-fáze)
MOPS (running buffer)	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MW marker	molecular weight marker (marker molekulové hmotnosti)
Noxa	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase (poly(ADP-ribosa)polymeráza)
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
p-Chk	phosphorylated checkpoint kinase (fosforylované checkpoint kináza)
PI	propidium iodide (propidium jodid)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
pRb	retinoblastoma protein (retinoblastomový protein)
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis, BCL2 binding component 3
RAG Px	rabbit anti-goat immunoglobuline horseradish peroxidase conjugated (králičí sekundární protilátka proti kozím imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou)
RAM Px	rabbit anti-mouse immunoglobuline horseradish peroxidase conjugated (králičí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
RS	reactive species (reaktivní sloučeniny)
rpm	revolutions per minute (otáčky za minutu)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

RSV	Rous sarcoma virus (Rousův sarkoma virus)
RT	room temperature (pokojová teplota)
S phase	synthesis phase (S-fáze)
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný, sodiumdodecylsulfát)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného)
SWAR Px	swine anti-rabbit immunoglobuline horseradish peroxidase conjugated (prasečí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou)
TEMED	tetramethylethylenediamine, N, N, N', N'-tetramethylethane-1,2-diamine
TNF	tumor necrosis factor (faktor nádorové nekrózy, tumor nekrotizující faktor)
TNFR	tumor necrosis factor receptor (receptor faktoru nádorové nekrózy)
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulární endotelový růstový faktor)

Úvod

Již od pradávna se lidstvo potýkalo s různými nemocemi. K nejzávažnějším patřily epidemie pravých neštovic, moru, tuberkulózy, dětské obrny či cholery. Některé nemoci se s postupem času a rozvojem v medicínském oboru podařilo úspěšně vymýtit nebo alespoň výrazně omezit jejich výskyt a snížit úmrtnost.

Jednou z chorob, se kterou lidstvo stále bojuje, je rakovina. Již po dlouhou dobu je neústupným nepřítelem moderní medicíny, která se stále snaží najít způsob, jak ji vyléčit, či alespoň zpomalit její vývoj a tím prodloužit život nemocnému.

V posledních letech je problematika nádorových onemocnění stále aktuálnějším tématem. V důsledku rostoucí průměrné délky života, změn životního stylu a nárůstu obsahu karcinogenních látek v prostředí pacientů s nádorovým onemocněním rapidně přibývá, každý rok je v České republice diagnostikováno přes 80 000 nových případů.¹ Zhoubné novotvary jsou také druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice a v roce 2012 byly příčinou více než čtvrtiny všech úmrtí v ČR.^{2,3}

S tím úzce souvisí vědecký výzkum, který se zaměřuje na hledání nových léčebných postupů a látek s protinádorovým účinkem, které by mohly zlepšit účinnost stávajících metod léčby nebo je přímo nahradit, a tím pomoci snižovat úmrtnost pacientů s nádorovými onemocněními.

Významného pokroku dosáhl výzkum v oblasti organokovové chemie, jehož výsledky ukazují potenciál organokovových sloučenin v léčbě nádorových onemocnění. Mnohé z těchto sloučenin vykazují protinádorový účinek a prochází již preklinickými i klinickými testy. Studium mechanismů účinku těchto látek může přinést informace důležité pro vývoj dalších cytostatik.

1 Teoretická část

1.1 Biologie nádorů

Charakteristika a vlastnosti nádorové buňky

Nádorové buňky se v mnoha ohledech liší od normálních zdravých buněk. Hanahan a Weinberg ve své práci z roku 2011⁴ popsali charakteristické znaky nádoru a nádorových buněk (Obr. 1). Pochopení principů a mechanismů nádorové transformace je klíčové pro vývoj cílené léčby nádorových onemocnění.

Pro nádorovou buňku jsou typické tyto vlastnosti:

1. **Soběstačnost v produkci růstových signálů.**
2. **Necitlivost k signálům zastavující buněčný cyklus.**

Kombinace těchto vlastností má za následek neregulovaný buněčný růst, což souvisí také s narušením buněčného cyklu a jeho regulačních a kontrolních mechanismů (viz *Kapitola 1.2*).

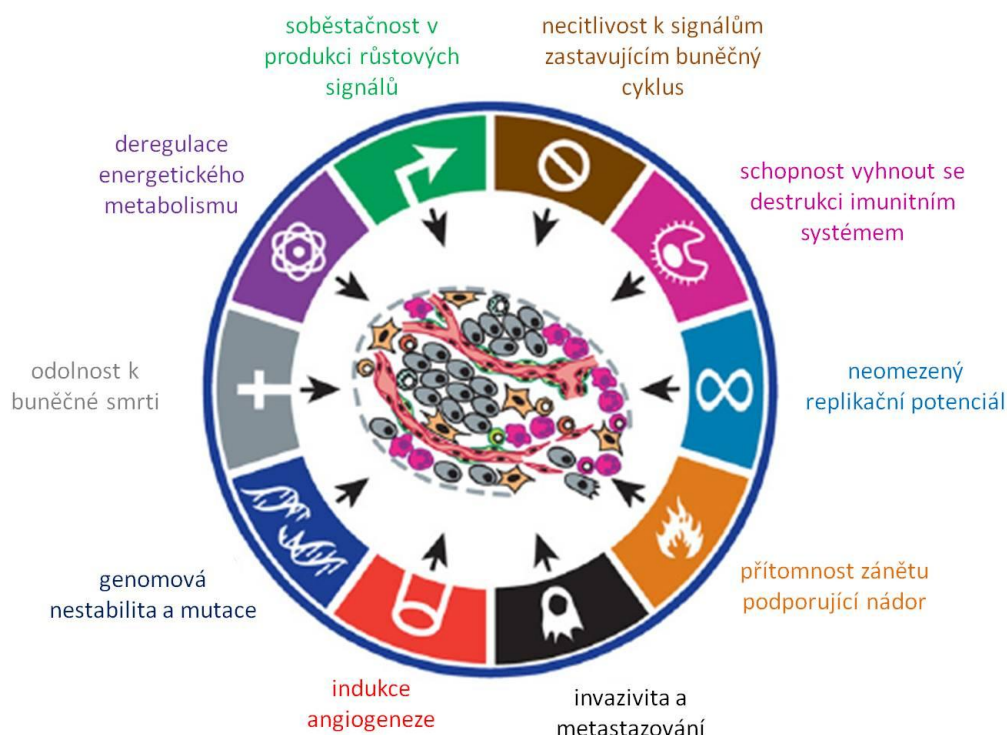
U normálních buněk je míra proliferace určena kombinací vnějších i vnitřních signálů. Nádorové buňky k růstu nepotřebují téměř žádné vnější podněty, protože jsou schopné si vytvářet autonomně vlastní růstové faktory (tzv. autokrinní stimulace). Geny, jejichž produkty regulují buněčnou proliferaci, jsou označovány jako protoonkogeny, onkogeny a tumor-supresorové geny.

Vlivem mutací mohou být také poškozeny mechanismy oprav DNA. Buňka není schopná reagovat na poškození DNA nebo na chyby vzniklé při její replikaci, nedokáže zastavit buněčný cyklus a chyby opravit, což vede k postupné akumulaci mutací v genomu.

3. **Schopnost vyhnout se likvidaci imunitním systémem.** Imunitní systém je schopen rozpoznat abnormální a potencionálně nádorové buňky a zničit je. T-lymfocyty vylučují signální molekuly, které spouštějí sebedestrukční mechanismy těchto buněk. Nádorové buňky si ale mohou vyvinout schopnost těmto podnětům odolávat například zvýšením exprese antiapoptotických proteinů nebo inaktivací receptorů smrti.
4. **Neomezený replikační potenciál.** Při každém dělení buňky se zkracují telomery, což jsou nukleoproteinové koncové části chromozomů, které jsou důležité pro udržení celistvosti chromozomů a chrání chromozomy před degradací. Normální diploidní buňky tak mohou podstoupit pouze omezený počet dělení (Hayflickův limit), a mají tedy i omezenou životnost. Nádorové buňky se naopak mohou dělit téměř neomezeně. Většinou je to umožněno aktivací enzymu telomerázy, který telomery prodlužuje a podílí se tak na imortalizaci nádorových buněk.

5. **Přítomnost zánětu podporující nádor.** Přítomnost zánětu může ovlivnit vývoj nádoru přísunem bioaktivních molekul, které indukují angiogenezi, inhibují buněčnou smrt nebo zvyšují proliferaci nádorových buněk. Přítomnost zánětu je také spojena s nárůstem hladiny kyslíkových radikálů, které mohou poškodit DNA a tím urychlit maligní transformaci.
6. **Invazivita a metastazování.** Nádorové buňky mohou infiltrovat do okolních tkání nebo se přímo uvolnit z primárního nádoru a migrovat krevním či lymfatickým řečištěm a zakládat vzdálená sekundární nádorová ložiska označovaná jako metastázy.
7. **Indukce angiogeneze.** Pro zajištění přísunu kyslíku a živin mají nádorové buňky schopnost indukovat tvorbu cévního systému produkcí angiogenních faktorů, například VEGF (vascular endothelial growth factor).
8. **Genomová nestabilita a mutace.** Nestabilita genomu významně urychluje akumulaci mutací a proces maligní transformace buňky.
9. **Odolnost k buněčné smrti.** Nádorové buňky si vyvinuly mechanismus zabraňující spuštění apoptózy. Dokážou produkovat ve zvýšeném množství antiapoptotické proteiny, které inhibují funkci proteinů spouštějících apoptózu.
10. **Deregulace energetického metabolismu.** V normálních buňkách je v aerobním prostředí glukóza v cytosolu metabolizována glykolýzou na pyruvát, který se v mitochondriích přeměňuje za uvolnění CO_2 a ke tvorbě ATP dochází oxidativní fosforylací. V anaerobním prostředí dochází ke glykolýze. Nádorové buňky narozdíl od normálních buněk upřednostňují i v aerobním prostředí glykolýzu, která je sice méně efektivním způsobem získání energie než oxidativní fosforylace, zato mnohem rychlejším. Proto se vyznačují i vyšší spotřebou glukózy a vylučováním kyseliny mléčné. Tento jev se nazývá aerobní glykolýza neboli Warburgův efekt a buňky se díky němu mohou adaptovat na nedostatek kyslíku v nádorové tkáni.

Nádorové buňky se také vyznačují **odlišnou morfologií**. Mají nepravidelný tvar a velikost, jejich jádro je ve srovnání s normálními buňkami velké a má různý tvar. Poměr obsahu cytoplazmy vzhledem k jádru je proto menší než u normálních buněk.⁵



Obrázek 1 Schéma charakteristických rysů nádorových buněk (4)

Charakteristika procesu maligní transformace

„Sled vzácných událostí vedoucích ke vzniku nádoru u člověka vyžaduje řadu mutací, které postupně pozměňují genetickou výbavu buňky, a tím ji posouvají stále blíže k zahájení neomezeného množení.“ – Robert A. Weinberg⁶

Maligntní transformace buňky je vícestupňový proces. Zahrnuje **mutace** v klíčových genech kódujících proteiny regulující buněčný cyklus a apoptózu.^{5, 7-9} Spontánní mutace se mohou vyskytnout během replikace nebo oprav DNA, jejich četnost je však velmi nízká (jedna chyba na 10^7 zkopírovaných nukleotidů, po okamžitých opravách přesnost replikace DNA stoupá na jednu chybu na 10^9 zkopírovaných nukleotidů).¹⁰

Mutace, které vznikají působením zevních faktorů na DNA, se nazývají indukované. Akumulace těchto mutací může vést k maligní transformaci buňky.^{5,9}

Mutace se rozdělují na genové – týkají se jednotlivých genů, chromozomové – větší strukturální změny v chromozomech a genomové – změna počtu jednotlivých chromozomů nebo celých jejich sad. Mezi genové mutace se řadí převážně tzv. bodové mutace, kam patří *substituce* (záměna bázi), *inzerce* (přidání bázi), *inverze* (záměna pořadí bázi) a *delece* (odstranění bázi).⁷

Chromozomové mutace neboli strukturní aberace dělíme do několika skupin: ^{7,9}

1. *Translokace* je stav, kdy je část jednoho chromozomu přesunuta na jiný chromozom. Jsou časté u leukemií, kde se tvoří tzv. fúzní geny.
2. *Reciproká translokace* je vzájemná výměna genetického materiálu mezi dvěma různými chromozomy.
3. *Amplifikace* je zmnožení chromozomálních částí. Může podpořit růst nádorové buňky zvýšením počtu kopií genů podporujících proliferaci.
4. Část chromozomu může být také *invertovaná*, což ovlivňuje regulaci genové exprese.
5. *Intersticiální delece* neboli ztráta vnitřní části chromozomu může u nádorových buněk inaktivovat tumor-supresorové geny.

Onkogeny a protoonkogeny

Protoonkogeny kódují proteiny podporující buněčnou proliferaci, například růstové faktory a jejich receptory, antiapoptotické proteiny, faktory intercelulární signalizace (transdukční faktory) nebo transkripční faktory, které regulují genovou expresi. Mutací protoonkogenů vznikají **onkogeny**, které se podílejí na nádorové transformaci. Tyto mutace jsou dominantního charakteru, což znamená, že už mutace v jedné alele protoonkogenu iniciuje maligní transformaci buňky. Tyto mutace mají aktivující charakter, onkoproteiny si sice zachovávají svojí základní funkci, ale jsou produkovány v nadměrném množství či je u nich pozorována zvýšená aktivita. ^{5, 6, 8, 9}

Tumor-supresorové geny = antionkogeny

Tumor-supresorové geny regulují buněčnou proliferaci, čímž brání vzniku nádoru. Mutace těchto genů mají charakter inaktivační, vedou ke snížení hladiny proteinů nebo změně jejich funkce. Proteiny kódované tumor-supresorovými geny patří mezi regulátory buněčného cyklu, které potlačují buněčnou proliferaci. Mutace tumor-supresorových genů jsou recesivní, pro maligní transformaci je tedy nutná ztráta funkce obou alel. ^{5, 6, 8, 9}

Mezi významné tumor-supresorové geny patří *RB* a *TP53*. Jejich produkty, proteiny pRb a p53, mají významnou úlohu v regulaci buněčného cyklu.

Na onkogenezi se mohou podílet i mutace dalších genů, které mají za následek poškození vnitřních regulačních mechanismů buňky. Jsou to například **geny regulující apoptózu** nebo **mutátorové geny**, jejichž produkty udržují stabilitu genomu prostřednictvím oprav DNA. Poškození těchto genů vede k hromadění mutací, což zvyšuje pravděpodobnost nádorové transformace buňky. ^{5, 9, 11}

Etiologie nádorů

Faktorů, které se účastní vzniku a rozvoje nádorů, je nesčetné množství. Jsou za ně považované látky, které mají schopnost vyvolat změnu genetické informace nebo narušení vnitřních buněčných metabolických procesů vedoucí k maligní transformaci buňky-tzv. *kancerogeny*.^{8,9}

Mezi **chemické kancerogeny** jsou řazeny látky různého složení a původu. K anorganickým kancerogenům patří některé kovy a jejich sloučeniny, například zinek, hliník, nikl či platina. Expozice azbestům může vyvolat mezoteliomy, dlouhodobé vysoké dávky arzenu mohou způsobit vznik nádorů kůže nebo karcinomu močového měchýře. Vystavení radiu zvyšuje pravděpodobnost vzniku osteosarkomů. Aromatické kancerogeny, jako například benzen, zvyšují riziko akutní leukémie. Alifatickými kancerogeny jsou vinylchlorid nebo yperit (hořčičný plyn). K nejvíce kancerogenním látkám patří aflatoxin produkovaný plísněmi rodu *Aspergillus*. Význam v kancerogenezi mají také látky endogenního původu, například steroidní hormony, především estrogeny a androgeny, které hrají roli ve vzniku hormonálně závislých nádorů (karcinom ovaria, prsu). Hormony se však řadí spíše mezi kokancerogeny, protože u nich nebyl prokázán přímý mutagenní účinek.^{8,9}

Mezi **fyzikální mutageny** způsobující vznik nádorů patří ionizující záření nebo UV záření. Účinek záření může být buď přímý (vznik zlomů v DNA) nebo nepřímý (prostřednictvím volných radikálů). Intenzita kancerogenních účinků UV záření je závislá na vlnové délce, nejslabší účinek je v pásmu 320-400 nm a v rozmezí 240-320 nm dochází k přímému poškození DNA.⁹

Na vzniku nádorových onemocnění se mohou podílet také **biologické faktory**, kam bývají řazeny především viry. Jako první onkovirus byl popsán Rousův sarkoma virus (RSV), který vyvolává sarkomy u kuřat. Tento virus patří mezi retroviry, což jsou viry, které jsou pomocí reverzní transkriptázy schopné přepsat svou genetickou informaci v podobě RNA do DNA a tu integrovat do genomu hostitelské buňky. Další viry, které jsou patrně schopné vyvolat nádorové bujení, jsou DNA viry, kam patří například herpesviry nebo papilomaviry. U papilomavirů byla prokázána přímá souvislost se vznikem cervikálního karcinomu, u viru hepatitidy B pak souvislost se vznikem hepatocelulárního karcinomu.^{8,9}

Kancerogeneze

Proces vzniku a vývoje nádoru se nazývá **kancerogeneze**. Je to několikafázový proces, v průběhu kterého dochází k postupnému hromadění mutací a maligní transformaci buňky.^{5,8,9}

1. *Iniciace*. Dochází k zahájení procesu kancerogeneze vlivem vnějších i vnitřních faktorů. Důsledkem je ireverzibilní změna genotypu buňky, která však může zůstat bez funkčních následků.
2. *Promoce*. Vlivem dalších podnětů, kokancerogenních faktorů, dochází k maligní transformaci buněk. Jeho rozvoj závisí na délce a míře expozice mutagenním faktorům, protože vyšší počet mutací zvyšuje pravděpodobnost vzniku nádoru. Vysvětluje se tím stoupající incidence nádorových onemocnění s věkem. V důsledku poruch regulace proliferace a diferenciací buněk vzniká nejdříve prekanceróza a následně tzv. *carcinoma in situ*, což je karcinom lokalizovaný v místě svého vzniku bez přesahu do dalších vrstev tkáně. Při včasném zahájení léčby je v této fázi vyšší pravděpodobnost úplného uzdravení.
3. *Konverze = transformace*. Dochází ke změně fenotypu buněk a vzniká maligní klon buněk. K maligní transformaci nejčastěji dochází ve tkáních s rychle se dělicími buňkami (dýchací a trávicí soustava) nebo ve tkáních stimulovaných hormony (vaječníky, prsa, prostata).
4. *Progrese*. Transformované buňky mají porušené regulační mechanismy, což vede k jejich nekontrolované proliferaci. Dochází k infiltraci do okolní tkáně, lokálnímu růstu nádoru a stimulaci angiogeneze. Na počátku je růst nádoru exponenciální, následně dochází ke zpomalení růstu v důsledku nedostatečné výživy a působení faktorů zodpovědných za nekrózu či apoptózu.
5. *Metastázování*. Nádor se stane invazivním a šíří se mimo primární ložisko. Nádorové buňky nejdříve proniknou bazální membránou do krevního řečiště či mízní cévy (intravazace). Většina těchto buněk je však ihned eliminována imunitním systémem, mechanickými faktory (turbulence krevního proudu) nebo tzv. kyslíkovým efektem (zvýšená tenze kyslíku v arteriální krvi). Pouze zlomek jejich původního počtu (asi 0,1 %) přežije a putuje dál. V cílovém orgánu nádorové buňky proniknou stěnou kapiláry do tkáně (extravazace). Vznikají sekundární nádorová ložiska neboli metastázy.

Klasifikace nádorů

Nádor (= tumor, novotvar, neoplasie) je útvar tvořený nádorovými buňkami, nenádorovou pojivovou tkání, buňkami imunitního systému a cévním systémem.^{4, 5} Vytváří si vlastní mikroprostředí a výrazně narušuje tkáňovou homeostázu. Nádory rozdělujeme podle schopnosti infiltrovat do jiné tkáně na benigní a maligní.

Benigní neboli **nezhoubné nádory** rostou poměrně pomalu v místě svého vzniku a nemetastázuji. Nepronikají do ostatních tkání a lze je poměrně dobře odstranit chirurgickou cestou. Příkladem je *adenom*, což je benigní epiteliální nádor žlázového původu.^{5,9}

Maligní neboli **zhoubné nádory** představují pro pacienta větší nebezpečí, jejich růst je invazivní a mají schopnost metastázovat. Do okolních tkání pronikají nádorové

buňky pomocí krevního a lymfatického systému a zakládají sekundární nádorová ložiska-metastázy.

Maligní nádory se dále dělí podle typu tkání nebo buněk, ze kterých vznikají. *Karcinomy* jsou nádory původem z epitelálních buněk, tvoří asi 90 % lidských nádorů. *Sarkomy* jsou pevné nádory pojivových tkání (vaziva, kostí, chrupavky, kloubní výstelky a svaloviny). Dalším typem nádorových onemocnění jsou *leukémie a lymfomy*, které jsou odvozené od hematopoetických kmenových buněk a buněk imunitního systému. *Germinální nádory* vznikají ze zárodečných tkání, *gliomy* jsou nádory vycházející z buněk z nervové tkáně.^{5, 8, 9, 11}

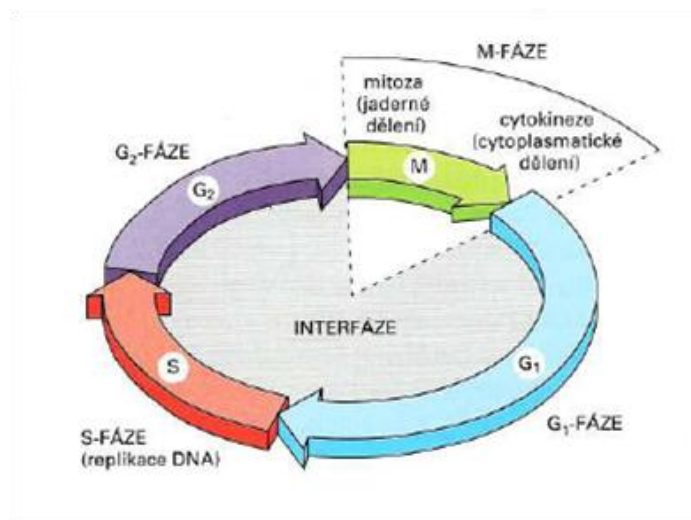
1.2 Buněčný cyklus a jeho regulace

U nádorových buněk dochází často k narušení buněčného cyklu a mechanismů jeho regulace.^{4, 5} Pro vysvětlení účinku chemoterapeutik a vývoj cílených léčebných metod je důležité pochopit, jak buněčný cyklus probíhá a jak je řízen.

Přehled buněčného cyklu

Buněčný cyklus je souhrn událostí, který vede ke zdvojení genetické informace a rozdělení mateřské buňky za vzniku buněk dceřiných. Buněčný cyklus se u eukaryontních buněk dělí do čtyř základních fází. Jeho délka se mění v závislosti na typu buněk a vnějších i vnitřních podmínkách. Cyklus středně rychle se dělící savčí buňky trvá přibližně 24 hodin.¹⁰ U nádorových buněk je tento generační čas delší, 30-150 hodin,⁹ čehož lze využít při léčbě nádorových onemocnění.¹²

Buněčný cyklus lze rozdělit na *interfázi*, kam patří G_1 -, S- a G_2 -fáze, a samotné *buněčné dělení* (M-fáze). (Obr. 2)^{10, 11, 13}



Obrázek 2 Fáze buněčného cyklu (10)

Většina buněk potřebuje více času pro růst a zdvojení svých organel než pro replikaci své genetické informace. Proto se v buněčném cyklu vymezily dvě G_x -fáze (G- z anglického *gap* neboli mezera). Po každém buněčném dělení přechází většina buněk do G_1 -fáze. Buňka má v této fázi diploidní ($2n$) počet chromozomů. **G_1 -fáze** je součástí období zvaného *interfáze* a vyplňuje mezeru mezi M-fází a syntetickou (S-) fází. Je zpravidla nejdéle trvajícím úsekem buněčného cyklu a dochází během ní k rapidnímu růstu buňky. Zvyšuje se počet organel, syntetizuje se mRNA a proteiny nutné pro replikaci DNA (např. DNA-polymerázy, topoizomerázy...).^{10, 11} G_1 -fáze je u nádorových buněk ve srovnání s normálními buňkami výrazně prodloužena.¹²

Pokud jsou vnější podmínky nepříznivé, buňka může přejít do takzvané **G_0 -** neboli **klidové fáze**. V této fázi se buňka nedělí, ale její funkce jsou zachovány. Může tu setrávat dny, měsíce i roky. Po navození příznivých podmínek (například vystavením dostatečnému množství růstových faktorů) mohou buňky po překonání kontrolního bodu G_1 vstoupit do S-fáze a opět pokračovat v cyklu. Do klidové fáze přechází také většina diferencovaných buněk a některé nádorové buňky, které se tak stávají obtížně dostupné pro léčebné postupy.^{10, 11}

Syntetická fáze neboli **S-fáze** je velmi důležitým obdobím buněčného cyklu. Dochází zde k replikaci DNA a duplikaci genetického materiálu ($2n \rightarrow 4n$). Vznikají sesterské chromatidy-výsledkem je 23 párů dvouchromatidových chromozomů. Aby se zabránilo mutacím v dalších generacích buněk, jaderná DNA musí být replikována s velkou přesností. Vznik mutací by mohl mít za následek nádorovou transformaci buňky.^{5, 16} Po úspěšném zdvojení genetické informace přechází buňka do **G_2 -fáze**, v průběhu které dále roste a připravuje se na dělicí proces. Probíhá syntéza proteinů nezbytných pro buněčné dělení.^{10, 11}

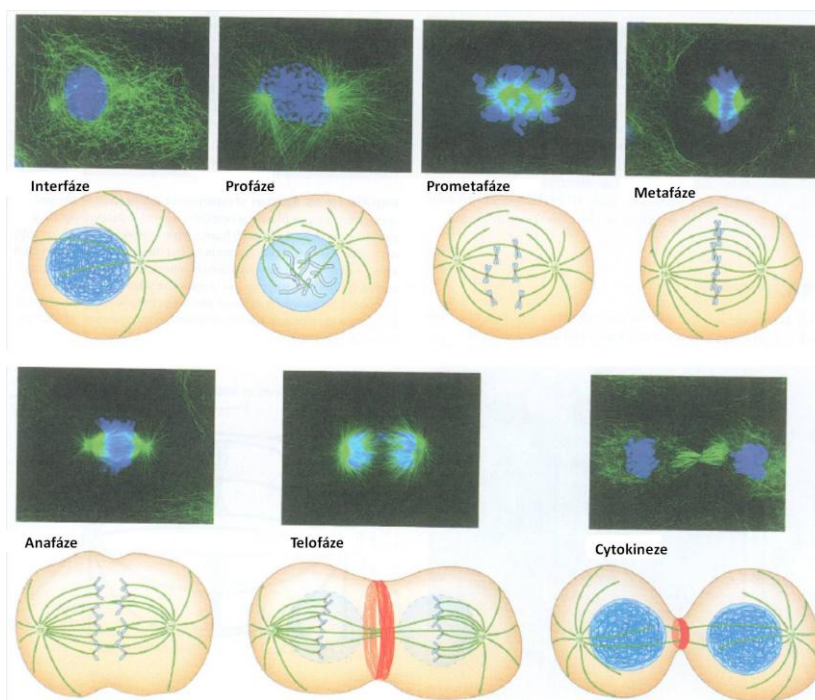
Následující **M-fáze** se skládá z jaderného dělení (karyogeneze) a samotného buněčného dělení (cytokineze). *Mitóza* je typ buněčného dělení, při němž je zachován počet chromozomů. Probíhá ve čtyřech fázích zvaných profáze, metafáze, anafáze a telofáze (Obr. 3).^{10, 11, 13}

- 1) Na začátku *profáze* probíhá kondenzace a spiralizace DNA. Jsou jasně pozorovatelné chromozomy složené ze dvou sesterských chromatid spojených v centromeře. Jadérko mizí a jaderný obal se postupně rozpadá. Duplikované centrozomy v cytoplazmě putují k pólům buňky a z nich vybíhající mikrotubuly začínají formovat dělicí (mitotické) vřeténko. Jeho základní kostru tvoří společně interagující mikrotubuly-polární mikrotubuly a póly vřeténka tvoří centrozomy. Astrální mikrotubuly mají funkci ukotvení a míří směrem k plazmatické membráně.
- 2) V *prometafázi* se jaderná membrána rozpadá úplně, tvorba dělicího vřeténka je dokončena. V *metafázi* se mikrotubuly vřeténka dostávají k chromozomům a navážou se na jejich kinetochory (proteinové komplexy) nacházející se v oblasti centromer. Pomocí mikrotubulů jsou poté chromozomy seřazeny do ekvatoriální roviny a vytváří metafázovou destičku. Před přechodem do anafáze je aktivován

APC (anafázi podporující komplex), který deaktivuje komplex cyklin-Cdk degradací cyklinu (ubikvitinací). Dochází k rozkladu proteinu sekurinu, což je inhibitor proteázy separázy. Separáza rozštěpí proteinový komplex kohezinu, který drží pohromadě sesterské chromatidy. Sesterské chromatidy se rozdělí a mitóza postupuje do anafáze.

- 3) V *anafázi* jsou chromatidy po oddělení taženy k opačným pólům. Tento pohyb se nazývá segregace a zahrnuje zkracování kinetochorových mikrotubulů a vzájemné vzdalování pólů vřeténka prodlužováním polárních mikrotubulů a zkracováním astrálních mikrotubulů.
- 4) Během *telofáze* se kolem obou sad dceřiných chromozomů začne formovat jaderný obal a vznikají dvě nová jádra. Dělicí vřeténko zaniká, znovu se skládají jaderné laminy a vytváří se jaderné póry. Chromozomy opět dekondenzují, obnovuje se jadérko a jádro postupně roste.

Poslední fází dělení buňky je *cytokineze*. V oblasti dělicí rýhy (kolem ekvatoriální roviny) se vytváří kontraktilní prstenec složený z aktinových a myosinových filament. Jeho zaškrcením se rozdělí cytoplazma a výsledkem je vznik dvou dceřiných buněk.^{10, 11, 13}



Obrázek 3 Fáze mitózy (13)

DNA je označena modře, tubulin zeleně. V interfázi se duplikuje genetický materiál a orgány. V profázi se rozvolněná DNA začíná kondenzovat, z centrozomů vybíhají mikrotubuly a začínají formovat dělicí vřeténko. V prometafázi se rozpadá jaderný obal, chromozomy se navážou na mikrotubuly. V metafázi se chromozomy seřadí do ekvatoriální roviny, při anafázi se sesterské chromatidy oddělují a jsou taženy k opačným pólům buňky. V telofázi začíná znovu vznikat jaderný obal a vytváří se kontraktilní prstenec, při cytokinezi dochází ke konečnému oddělení. Podrobnější popis v textu.

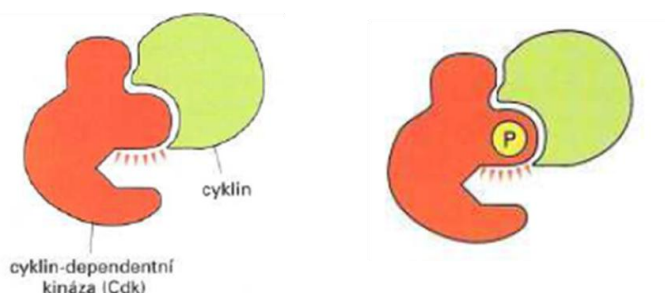
Regulace buněčného cyklu

Aby buněčný cyklus probíhal bezchybně, je zapotřebí komplexního systému zajišťujícího přesnost a precizní načasování. Tuto klíčovou úlohu zajišťuje skupina proteinů zvaných *cykliny* a na nich závislé *kinázy (Cdk)*.

Cyklin-dependentní kinázy (Cdk) jsou enzymy ze skupiny serin/threonin proteinkináz, které fosforylují a tím aktivují cílové proteiny.^{10, 11}

Společně s **cykliny**, které jsou jejich aktivátory, vytváří *cyklin-Cdk komplexy* (Obr. 4). Pro jejich plnou aktivaci je ještě zapotřebí fosforylace pomocí Cdk-aktivující kinázy (CAK). Činnost Cdk může být zablokována defosforylací nebo připojením inhibiční fosfátové skupiny. K aktivaci Cdk může tedy dojít také odstraněním inhibiční fosfátové skupiny pomocí Cdc (cell division control protein) fosfatáz.

Tyto **cyklin-Cdk komplexy** fosforylují proteiny, které iniciují a řídí mnoho dějů posouvajících buňku do dalších fází buněčného cyklu. Je to například replikace DNA, vstup do mitózy, duplikace centrozomů a exprese cyklinů.



Obrázek 4 Znárodnění cyklin-cdk komplexu a jeho fosforylované aktivní formy (10)

Hladina Cdk je během cyklu konstantní, přičemž jejich aktivita se cyklicky mění v závislosti na změnách koncentrace cyklinů. Koncentrace cyklinů jsou závislé na jejich degradaci řízené ubikvitin-dependentním proteolytickým systémem.

Pro každou fázi buněčného cyklu existují specifické cykliny a k nim přidružené Cdk (Tab. 1). Komplexy cyklin-Cdk jsou aktivní od konce G₁-fáze do první části M-fáze. Poté je jejich aktivita utlumena Cdk inhibitory.

<i>fáze buněčného cyklu</i>	<i>cyklin</i>	<i>Cdk</i>	<i>funkce</i>
G ₁	D	Cdk2-6	fosforylace pRb vstup do buněčného cyklu
G ₁ /S	E	Cdk2	fosforylace pRb přechod restriční bodem
S a G ₂	A	Cdk1, Cdk2	vstup do S-fáze iniciace replikace DNA
M	B	Cdk1	spuštění mitózy

Tabulka 1 Přehled hlavních cyklínů, příslušných Cdk a jejich funkce během buněčného cyklu

U nádorových buněk dochází často k nekontrolovatelné proliferaci, která může být způsobena mimo jiné nadměrnou expresí cyklínů a cyklín-dependentních kináz.

Mezi negativní regulátory Cdk, které snižují aktivitu cyklín-Cdk komplexů, patří inhibiční proteiny (CKI) p15, p16, p21 a p27. Jejich význam spočívá v tom, že v případě poškození DNA umožní pozastavit buněčný cyklus a tak získat čas k její opravě. Aktivace inhibitorů v nádorových buňkách by proto mohla zastavit jejich buněčný cyklus a buněčnou proliferaci, a tím zabránit progresi nádoru. Proto je aktivace těchto inhibitorů jedním z cílů protinádorové léčby.^{4,5,11}

Kontrolní body/uzly buněčného cyklu („cell cycle checkpoints“)

V těchto uzlech probíhá rozhodování, zda buňka vstoupí do další fáze buněčného cyklu či ne. Pokud jsou zaznamenány negativní signály, cyklus může být pozastaven.¹⁰

Restriční bod se nachází mezi G₁ a S-fází. Buňka se rozhoduje, zda přejde do klidového stádia (G₀) nebo vstoupí do buněčného cyklu. Pro přechod do další fáze musí být splněny vhodné podmínky pro růst (přítomnost živin a růstových faktorů), monitorovány jsou i signály od ostatních buněk. Tento klíčový kontrolní bod je řízen proteinem pRb.^{10,11} pRb je nádorový supresor, který reguluje aktivitu transkripčních faktorů z rodiny E2F tím, že s nimi tvoří komplex. Jeho fosforylací se komplex rozpadá, transkripční faktory jsou aktivovány a buňka vstoupí do další fáze cyklu. Není-li tento protein fosforylován, buněčný cyklus se v tomto bodě zastaví. Za fosforylací pRb zodpovídají cyklíny D a E a jejich odpovídající Cdk.^{5,10,11}

Překonání **kontrolního bodu G₂/M** je nezbytné pro přechod z G₂- do M-fáze. Probíhá zde kontrola replikace DNA, která musí být přesná a kompletní, a případná oprava poškozené DNA.^{10,11}

Na regulaci buněčného cyklu se podílí také serin/threoninové proteinkinázy, *Chk1* a *Chk2* („checkpoint kinase 1, 2“). Při poškození DNA jsou aktivovány a fosforylují různé cílové proteiny včetně p53, což vede k zastavení buněčného cyklu v bodě G₁/S.^{14, 15}

Třetím uzlem je **přechod z metafáze do anafáze**, kdy je kontrolováno správné napojení chromatid na mikrotubuly dělicího vřeténka a správné rozdělení sesterských chromatid, což je podmínkou pro dokončení mitózy a následující cytokinezi.¹¹

U nádorových buněk dochází často k deregulaci buněčného cyklu. Ta je způsobena mutacemi genů kódujících řídicí proteiny, které mají za následek jejich zvýšenou (stimulanty proliferace) nebo sníženou expresi, porušenou degradaci či až úplnou ztrátu jejich funkce (inhibitory proliferace).^{4, 5, 9, 11}

1.3 Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je jedním z velmi důležitých regulačních mechanismů každého organismu. Sestává ze série biochemických reakcí vedoucích k zániku buňky. Každý organismus potřebuje kontrolovat a udržovat v rovnováze buněčnou proliferaci a zánik buněk. Apoptóza hraje významnou roli v eliminaci nežádoucích buněk, jako jsou například buňky nefunkční, nepotřebné, abnormální, špatně umístěné či potenciálně nebezpečné.^{11, 16, 17} V průběhu embryogeneze díky ní vznikají například prsty končetin tak, že buňky v meziprstním prostoru podstoupí proces apoptózy a tím zformují jednotlivé oddělené prsty.¹⁰ Apoptóza je také důležitá pro správné fungování imunitního systému. Prekurzory T-lymfocytů vznikají nejdříve v kostní dřeni a poté se dostávají do thymu (brzlíku), kde probíhá jejich selekce. Ty buňky, které nesplňují funkční požadavky, jsou odstraněny apoptózou. Stejným způsobem jsou zlikvidovány i nepotřebné T- a B-lymfocyty, které vznikly jako imunitní odpověď na infekci.^{16, 17} Apoptóza tak umožňuje udržení rovnováhy imunitního systému a tím i celkové homeostázy.

Poruchy procesu programované buněčné smrti mohou vyústit v různé zdravotní problémy. Nadměrná apoptóza buněk může mít za následek vznik neurodegenerativních chorob (například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), ischemických poruch nebo autoimunních onemocnění.^{11, 16} Nádorové buňky jsou k apoptotickým signálům naopak často rezistentní.^{4, 5} Je to způsobeno mutacemi v genech, které kódují proteiny regulující apoptózu. Tyto mutace mají za následek zvýšenou expresi antiapoptotických proteinů nebo sníženou expresi či úplnou ztrátu proapoptotických proteinů. Důsledkem toho je nekontrolovaná proliferace buněk odolávajících sebedestrukčním mechanismům.^{4, 5, 9, 11}

Proto je indukce apoptózy jedním z hlavních cílů protinádorové terapie.

Nekróza

Nekróza, což je také typ buněčné smrti, se liší od apoptózy morfologickými změnami buněk. K nekróze dochází hlavně při akutním nedostatku živin a energie.⁵ Buňka začne bobtnat v důsledku narušení integrity cytoplazmatické membrány, zvětšují se i buněčné organely.¹⁶ Nakonec buňka praská a její obsah (včetně enzymů obsažených v cytoplazmě) se vylíje do okolí. Enzymy poškodí okolní tkáň, což vyvolá zánětlivou reakci.^{11, 16} Naopak při apoptóze se buňka postupně smršťuje, dochází k fragmentaci DNA, odbourání cytoskeletu a dalších buněčných struktur. Výsledkem je vznik apoptotických tělísek, které jsou pohlceny fagocyty.^{10, 11, 16}

Kaspázy

Pro apoptózu jsou nezbytné enzymy z rodiny proteáz označované jako kaspázy. Patří mezi cysteinové proteázy (neboli proteázy obsahující v aktivním místě cystein) a štěpí cílové proteiny v místě aspartátu (odtud jejich název cysteine-aspartic proteases). V buňkách jsou syntetizovány jako neaktivní prokaspázy (proenzymy) nacházející se v cytosolu. Ty se skládají ze tří částí: prodomény a velké a malé podjednotky. Prokaspázy se aktivují proteolytickým štěpením, kdy je prodoména odštěpena a vzniká heterodimer jedné malé a jedné velké podjednotky. Aktivní kaspázy jsou tetramery, které jsou tvořeny dvěma heterodimery.¹¹

Podle toho, jaké fáze apoptózy se účastní, se kaspázy dělí na iniciační a efektorové.¹¹ Iniciační kaspázy jsou v činnosti na začátku apoptotické proteolytické kaskády a jsou aktivovány proapoptotickými signály. Patří mezi ně kaspázy 2, 8, 9, a 10. Jejich funkcí je aktivace efektorových prokaspáz v kaspázy.^{11, 16}

Efaktorové kaspázy jsou skupinou kaspáz, které již přímo štěpí klíčové proteiny obsažené v buňce. Jde například o proteiny řídící opravy DNA a inhibitory endonukleáz, cytoskeletální proteiny či antiapoptotické proteiny. Štěpením mohou tyto kaspázy aktivovat další efektorové kaspázy. Mezi efektorové kaspázy patří kaspázy 3, 6 a 7.^{11, 16, 17}

Rodina proteinů Bcl-2

Proteiny z této skupiny patří mezi důležité vnitřní regulátory apoptózy. Dělí se na dvě podskupiny podle toho, zda regulují apoptózu pozitivně či negativně. Mezi antiapoptotické proteiny patří například proteiny Bcl-2 a Bcl-XL, mezi proapoptotické proteiny patří proteiny Bax, Bak, Bid, Bad, Puma, Noxa a další. Jejich funkce je regulována mimo jiné vzájemnými interakcemi.^{11, 16}

Průběh apoptózy

Apoptóza se dělí na tři různé fáze. První fází je iniciace (přijetí signálu a aktivace iniciačních kaspáz), poté následuje exekuce (v činnosti jsou efektorové kaspázy, probíhá štěpení buněčného substrátu) a konečnou fází je degradace (vytvoření apoptotických tělísek). Na závěr jsou apoptotická tělíska fagocytována. ^{11, 16, 18}

Podle způsobu iniciace se apoptotické dráhy dělí na vnější („extrinsic pathway“) a vnitřní („intrinsic pathway“). Liší se navzájem svými iniciačními prokaspázami a aktivačním komplexem. ¹¹ Byla popsána také perforin/granzymová dráha. ¹⁶

Vnější dráha apoptózy (extrinsic pathway of apoptosis)

Vnější apoptotická dráha je aktivována navázáním specifických signálních proteinů, ligandů, na takzvané receptory smrti („death receptors“) v cytoplazmatické membráně. Jde o transmembránové proteiny, které se skládají ze dvou částí, vnější domény vázající signální molekuly z okolí a vnitrobuněčné „smrtící“ domény („death domain“). Patří do rodiny receptorů TNF („tumor necrosis factor“), příkladem jsou receptory Fas a TNF α . ¹¹

Mezi ligandy těchto receptorů patří například Fas ligand nebo TNF α . Jsou to cytokiny, signální proteiny produkované buňkami imunitního systému patřící do skupiny tumor nekrotizujících faktorů (TNF). Po navázání těchto molekul na receptory smrti se vytvoří komplex - na death doménu se naváží adaptorové proteiny (FADD/TRADD, závislé na typu ligandu) a na ně iniciační prokaspázy 8. Vzniklý komplex, označovaný jako DISC („death-inducing signaling complex“), aktivuje štěpením prokaspázu 8. Kaspáza 8 poté aktivuje efektorovou kaspázu 3. Kaspáza 8 může také aktivovat protein Bid, což má za následek permeabilizaci mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c do cytoplazmy (Obr. 5). ^{11, 16}

Vnitřní dráha apoptózy (intrinsic pathway of apoptosis)

Vnitřní apoptotická dráha se také nazývá mitochondriální, protože je závislá na vyplavení mitochondriálních proteinů, které spouští kaspázovou kaskádu (Obr. 5). Je aktivována vysokými dávkami radiace či toxinů (např. cytostatik), dále působením hormonů, volných radikálů, vysokých teplot, může být také následkem virové infekce nebo nedostatku kyslíku (hypoxie). ^{11, 16}

V závislosti na účasti proteinu p53 můžeme rozlišit dráhu p53-dependentní a p53-independentní. Podnětem pro spuštění p53-dependentní vnitřní dráhy je poškození DNA. To vyvolá fosforylaci proteinu Mdm2 kinázou ATM a zesílení tohoto signálu fosforylací Chk 1/2, což má za následek aktivaci a stabilizaci tumor-supresorového proteinu p53. Aktivovaný protein p53 poté stimuluje transkripci dalších genů, jejichž

proteinové produkty zastavují buněčný cyklus a zprostředkovávají apoptózu (např. p21). p53 působí například na protein Bax, což má za následek zvýšenou propustnost mitochondriální membrány. p53-dependentní dráhy apoptózy se také účastní některé proapoptotické proteiny z rodiny Bcl-2 jako jsou Puma a Noxa.^{11, 16}

Vlivem otevření pórů v membráně mitochondrií se do cytoplazmy uvolní cytochrom c, součást mitochondriálního dýchacího řetězce. Společně s proteinem Apaf-1 a prokaspázou 9 vytvoří komplex zvaný apoptosom, který pak aktivuje kaspázu 3.¹¹

V exekutivní fázi apoptózy probíhá štěpení takzvaných „substrátů smrti“ za pomoci kaspázy 3. Mezi substráty smrti patří například cytoskeletální proteiny (mikrotubuly - tubulin; mikrofilamenta - aktin a intermediární filamenta - jaderná lamina), reparační enzymy opravující poškození DNA (např. PARP) a proteiny regulující dělení buněk.^{10, 11, 16}

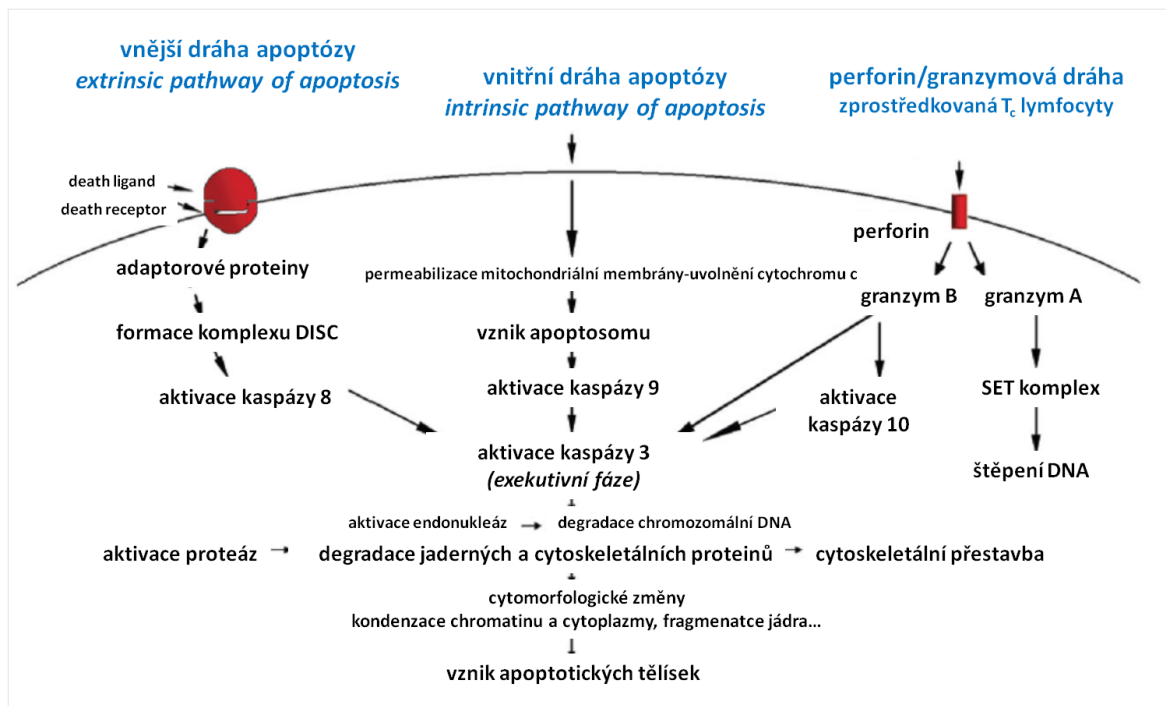
Následkem degradace těchto důležitých proteinů dochází k fragmentaci jádra, které probíhá ve třech krocích:^{11, 16}

- 1) nejdříve proběhne kondenzace chromatinu
- 2) aktivací endonukleáz přítomných v jádře je DNA štěpena mezi nukleosomy na fragmenty dlouhé zhruba 180 párů bází nebo jejich násobků
- 3) celé jádro se rozpadá a obsah je rozdělen do formujících se apoptotických tělísek.

Dále se začne zhušťovat cytoplazma, degradací cytoskeletálních bílkovin se rozvolní cytoskelet a vznikají nepravidelné záhyby cytoplazmatické membrány. Postupně se vytváří apoptotická tělíska, přičemž na svém povrchu vystaví specifické proteiny, které fungují jako signál pro fagocytující buňky. Tímto proteinem je například fosfatidylserin, který se v normální buňce vyskytuje na vnitřní straně buněčné membrány a při formaci apoptotických tělísek se přesune na vnější povrch. Tyto markery jsou rozpoznány fagocyty a tělíska jsou po pohlcení rozložena ve fagolysosomech.^{11, 16}

Perforin/granzymová dráha

Tato dráha (Obr. 5) může být aktivována cytotoxickými T-lymfocyty místo vnější apoptotické dráhy. Proces začíná sekrecí perforinu T-lymfocytem. Perforin je molekula formující transmembránové póry v cílové buňce. Vytvořenými póry jsou vyplaveny granzymy (serinové proteázy), které v buňce aktivují proteolytickou kaskádu spojenou s aktivací kaspázy 10. Granzym B může také aktivovat protein Bid, který naruší mitochondriální membránu a způsobí uvolnění cytochromu c, nebo může dokonce přímo aktivovat kaspázu 3 a tím spustit exekutivní fázi apoptózy. Granzym A zodpovídá za apoptotickou dráhu nezávislou na kaspázách. Aktivuje DNázy štěpením SET komplexu, který chrání chromatin, dochází proto ke vniknutí zlomů v DNA a její degradaci.¹⁶



Obrázek 5 Schéma apoptotických drah (16)

1.4 Oxidační stres

Oxidační stres buňky je stav, při kterém je narušena intracelulární oxidační a antioxidační rovnováha (redoxní stav). Důsledkem je nárůst hladiny vysoce reaktivních radikálů (sloučenin s oxidačním potenciálem), což může vést k poškození různých buněčných struktur a následně k degeneraci buňky.¹⁹ Oxidační stres je spojen s mnoha nemocemi, jako jsou například diabetes a neurodegenerativní choroby – Alzheimerova a Parkinsonova, účastní se procesu stárnutí a vysoká hladina oxidačního stresu byla prokázána také u nádorových onemocnění.^{20, 21}

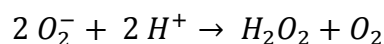
Mezi nejvýznamnější skupiny reaktivních sloučenin (radikálů, RS - „reactive species“) patří *reaktivní formy kyslíku* (ROS - „reactive oxygen species“) a *reaktivní formy dusíku* (RNS - „reactive nitrogen species“).

Reaktivní formy kyslíku

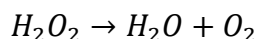
Mezi reaktivní kyslíkové formy patří:^{22, 23}

- radikály - superoxidové anionty O_2^- , hydroxylové radikály $OH\cdot$, alkoxylové ($RO\cdot$) či peroxylové ($ROO\cdot$) radikály
- tzv. „neradikály“, jako je například peroxid vodíku H_2O_2

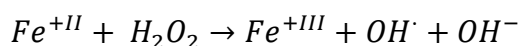
Hlavním místem vzniku ROS jsou mitochondrie, kde se nachází dýchací řetězec. Superoxidový aniont O_2^- vzniká během oxidativní fosforylace následkem částečné redukce kyslíku v elektronovém transportním řetězci.²³ Ve zdravých mitochondriích je superoxidový aniont ihned přeměněn pomocí superoxid dismutázy na peroxid vodíku.^{19, 23}



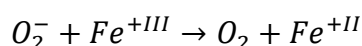
H_2O_2 je za normálních podmínek přeměněn enzymem katalázou nebo glutathion peroxidázou na vodu a kyslík.²³



V přítomnosti přechodného kovu (například železa) se však peroxid vodíku může přeměnit na vysoce reaktivní hydroxylový radikál. Železo zde působí jako katalyzátor (tzv. Fentonova reakce).¹⁹



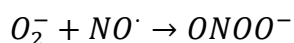
Železo se může v buňce nacházet ve dvou oxidačních stavech Fe^{+II} a Fe^{+III} . Mezi těmito stavy přechází v průběhu redoxních reakcí. Pomocí superoxidového aniontu může být železitý iont (Fe^{+III}) opět redukován na železnatý iont (Fe^{+II}), který opět může vstoupit do reakce s peroxidem vodíku.¹⁹



Hydroxylové radikály $OH\cdot$ jsou velmi reaktivní sloučeniny s nízkou stabilitou,²² které v buňkách poškozují nukleové kyseliny, lipidové membrány i proteiny a zodpovídají tak za většinu poškození způsobených ROS.^{21, 23}

Reaktivní formy dusíku

RNS jsou reaktivní sloučeniny dusíku, mezi které patří například peroxynitrit $ONOO^-$ a oxid dusnatý $NO\cdot$. Reakcí oxidu dusnatého se superoxidem vznikají vysoce reaktivní peroxynitritové radikály, které podobně jako ROS poškozují různé buněčné struktury.²³



$NO\cdot$ může také narušit dýchací řetězec vazbou na elektronové přenašeče (např. cytochrom c), což opět vyvolá nadměrnou tvorbu ROS/ RNS a oxidační stres.²³

Příčiny a důsledky oxidačního stresu v buňkách

V normální buňce dochází v menší míře ke vzniku RS jako vedlejších produktů enzymatických reakcí buněčných metabolických a signálních drah. V cytoplasmě je

nízký redoxní potenciál, a tedy i nízký obsah reaktivních kyslíkových forem.^{19, 23} Reaktivní sloučeniny mají důležitou roli ve vnitrobuněčné signalizaci a při nízkých koncentracích mohou také podporovat buněčnou proliferaci a přežití buňky (např. oxid dusnatý NO). U nádorových buněk mohou podporovat tvorbu nádoru. Hladina RS je kontrolována prostřednictvím antioxidantů, což jsou látky, které zpomalují a/nebo zabraňují oxidačnímu poškození cílových molekul.²² Antioxidanty jsou většinou enzymy, například kataláza, superoxid dismutáza či glutathion peroxidáza, dále také glutathion (GSH) a různé vitamíny (A, C, E).^{19, 23}

Zvýšení hladiny reaktivních radikálů může být vyvoláno vnějšími vlivy, jako je ionizující záření nebo působení toxických látek.¹⁹ Zvýšená míra oxidačního stresu vyvolává poškození buněk a buněčnou smrt narušením důležitých buněčných komponent,²² proto se stala indukce oxidačního stresu jedním z možných mechanismů účinku protinádorové terapie.^{19, 21, 24}

Důsledkem nadměrného množství ROS/ RNS v buňkách jsou zejména:¹⁹⁻²³

- a) *zlomy v DNA*, jejichž důsledkem je narušení stability genomu (a potenciálně maligní transformace buňky), pozastavení buněčného cyklu, případně buněčná smrt apoptózou (předchází jí aktivace ATM, checkpoint kináz a p53)
- b) *narušení vnější mitochondriální membrány*, které má za následek dysfunkci mitochondrií, únik cytochromu c do cytoplazmy a následné spuštění vnitřní mitochondriální apoptotické dráhy
- c) *peroxidace (oxidační degradace) lipidů* v membránách, čímž je narušena jejich funkce
- d) *oxidaci aminokyselin* (především cysteinu), která vede ke změně sekundární struktury proteinů
- e) *stres endoplazmatického retikula* („ER stress“), který je způsoben přítomností velkého množství nesprávně složených proteinů (viz. d) a může mít za následek nadměrnou proteolýzu i apoptózu buňky

1.5 Možnosti léčby nádorových onemocnění

Mezi základní metody léčby nádorových onemocnění patří chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie, které vytvářejí komplexní systém léčebných postupů. V menší míře je pak využívána hormonální terapie, imunoterapie a biologická terapie.^{8,9}

1.5.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba spočívá v operativním odstranění pokud možno celého nádoru či alespoň jeho části z těla pacienta. Primární volbou je u benigních nádorů a lokalizovaných solidních nádorů v časném stádiu („*in situ*“), kde má kurativní účinek. Kromě nádorové tkáně je preventivně odstraněna i část okolní zdravé tkáně. U maligních nádorů se chirurgická léčba využívá v kombinaci s chemoterapií a/nebo radioterapií, které jsou součástí neoadjuvantní nebo adjuvantní léčby (viz *Chemoterapie*). Paliativní chirurgická léčba se využívá u nádorů v pokročilejším stádiu, které již mohou zakládat sekundární ložiska a není možné je spolehlivě odstranit pouze chirurgickým výkonem. Vede ke zmírnění příznaků nemoci a přispívá ke zlepšení života pacienta.^{8,9}

1.5.2 Radioterapie

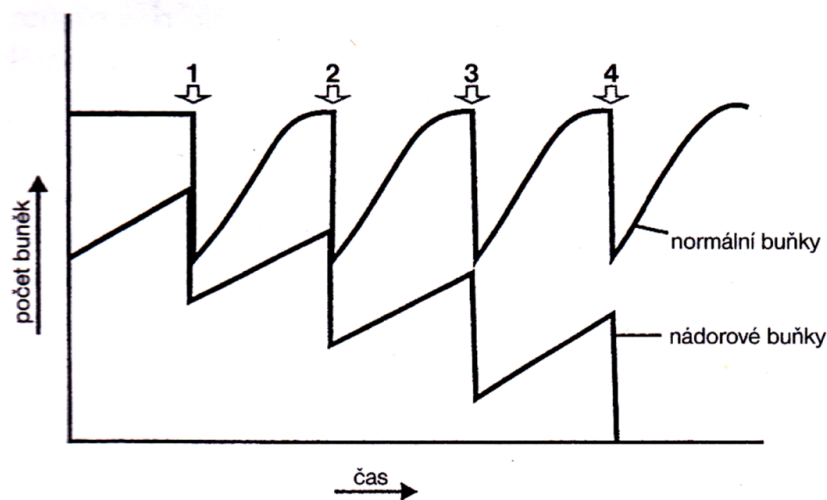
Radioterapie využívá ke zničení nádorových buněk ionizující záření. Jeho účinkem dochází k ionizaci molekul vně i uvnitř buněk, což má za následek poškození DNA a dalších buněčných struktur. Záření může působit na DNA přímo, tak vznikají převážně dvouřetězcové zlomy, nebo nepřímo, kdy ionizací molekul vody vznikají reaktivní kyslíkové radikály, které dále poškozují DNA a další struktury v buňce. Akumulace neopravitelných poškození DNA vede ke smrti buňky. Nejcitlivější na ozáření jsou buňky v G₁/S a G₂/M-fázi, tedy buňky intenzivně proliferující včetně buněk nádorových.^{8,9} Moderní zobrazovací metody jako je výpočetní tomografie nebo magnetická rezonance umožňují zacílit ozáření s velkou přesností a minimalizovat tak poškození okolních zdravých tkání.

1.5.3 Chemoterapie

Chemoterapie (cytostatická/cytotoxická léčba) má velmi významné postavení v komplexní léčbě nádorových onemocnění. Jejím principem je inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy nádorových buněk.²⁴

Primární chemoterapeutická léčba s kurativním záměrem má za cíl úplné vyléčení nádorového onemocnění. Jejím předpokladem je citlivost nádoru k cytostatikům. Řídí se obecnými zásadami cytostatické léčby, mezi které patří:^{12,24}

- 1) co nejdříve zahájit léčbu, aby se zabránilo další expanzi nádoru
- 2) pro zvýšení účinku léčby je vhodné použít kombinaci dvou a více cytostatik s různými mechanismy účinku a také různým spektrem nežádoucích účinků
- 3) léčba musí být cyklická a přerušovaná, což umožní obnovu a regeneraci zdravých tkání (Obr. 6)
- 4) je nutné dodržovat časové intervaly mezi léčebnými cykly, protože přílišné zkrácení intervalu by mělo za následek nedostatečnou obnovu krvetvorby a naopak prodloužení intervalů by mohlo vést k doplnění populace nádorových buněk na původní počet
- 5) je důležité pokračovat v léčbě i po dosažení klinické remise, aby byly odstraněny i zbytkové nádorové populace, které byly na původní kombinace cytostatik málo citlivé (konsolidační/komplementární cytodestrukční léčba)



Obrázek 6 Grafické znázornění principu cyklické chemoterapie (12)

Normální buňky se v přestávce mezi cykly chemoterapie doplní, počet nádorových buněk se s každým dalším cyklem snižuje, což je dáno jejich delším generačním časem.

Chemoterapie má také význam při paliativní léčbě, která je nasazována pacientům s nádorovým onemocněním v pokročilém stádiu s minimální šancí na vyléčení. Jejím cílem je alespoň prodloužit život nemocnému, zlepšit kvalitu jeho života a zmírnit obtíže způsobené nádorem. Používají se kombinace různých cytostatik a léčba se řídí stejnými pravidly jako primární léčba s kurativním záměrem. ^{12, 24}

Neoadjuvantní chemoterapie je léčba aplikovaná před chirurgickým výkonem. Cílem neoadjuvantní léčby je především zmenšení nádoru a změna povahy nádoru z primárně inoperabilního na operabilní. Adjuvantní (podpůrná, doplňující) léčba je aplikovaná po chirurgickém výkonu nebo radioterapii a má za cíl zničit zbytkovou potenciálně nádorovou tkáň, prodloužit bezpříznakový interval a snížit pravděpodobnost lokálních recidiv. ^{12, 24}

Existuje mnoho způsobů podání cytostatik, mezi nejčastější aplikační cesty patří intravenózní aplikace, perorální podání, intramuskulární nebo intrakavitární aplikace, jejímž příkladem je intraperitoneální aplikace cytostatik využívaná jako doplňková léčba u karcinomu ovaria.²⁴

Problémem chemoterapeutické léčby je rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům. Může být dána samotným typem nádoru (přirozená rezistence) nebo se může vyvinout během léčby (získaná rezistence).^{12, 24, 25} Přirozená rezistence například u karcinomu ovaria vůči cisplatině může být zapříčiněna mutací v tumor-supresorovém genu *TP53* způsobující jeho inaktivaci, která má za následek sníženou citlivost k indukci apoptózy. Získaná rezistence může být důsledkem selekce rezistentních buněk v průběhu chemoterapie či důsledkem mutagenního vlivu cytostatik.^{24, 25}

Mechanismy vzniku chemorezistence jsou:²⁵

- a) *změna farmakokinetiky* - snížená resorpce, urychlené vylučování nebo inaktivace cytostatika
- b) *změna cytokinetiky buněčné populace* - s rostoucím počtem buněk dochází k zpomalování růstu nádoru, nádorové buňky přecházejí do G_0 -fáze a z původně homogenní populace nádorových buněk vzniká populace heterogenní s klony rezistentními vůči cytostatikům
- c) *strukturální a metabolické funkční změny v buňce* - porušení intracelulární distribuce cytostatika, ovlivnění jeho transportu přes buněčnou membránu, zvýšená intenzita oprav DNA.

Reakcí na tento komplexní problém je snaha o vývoj nových léčiv, která by umožnila překonat i křížovou či mnohočetnou lékovou rezistenci nádorových buněk.^{12, 24, 25}

Účinky cytostatik jsou neselektivní, postihují všechny rychle se dělící buňky. To má za následek výskyt nežádoucích účinků v průběhu léčby. Kromě nádorových buněk patří mezi nejvíce zasažené typy buněk například buňky kostní dřeně zajišťující krvetvorbu, buňky sliznic zažívacího traktu, zárodečné buňky v reprodukčních orgánech nebo buňky vlasových váčků. Typickými nežádoucími účinky chemoterapie jsou proto nevolnost a zvracení, alopecie (vypadávání vlasů), chudokrevnost (která vede k únavě a poruchám soustředění), krvácivé a infekční komplikace vlivem snížené imunity, neurotoxicita či ototoxicita, orgánová poškození, kožní a slizniční změny nebo nevratná poškození gonád.^{8, 9, 12, 24}

Cytostatika využívají typických znaků nádorových buněk k jejich likvidaci.

Podle mechanismu působení se dělí na:^{12, 24}

1. *Alkylační látky* obsahují ve své struktuře alkylovou skupinu, kterou mohou přenést na nukleofilní část molekuly DNA. Mimo adeninu a cytosinu alkylují především guanin. Mohou se také vázat kovalentní vazbou na purinové báze DNA a vytvořit tak pevné vazby mezi sousedními guaniny téhož řetězce nebo sousedních řetězců, popř. mezi dvěma molekulami DNA. Tyto pevné vazby brání

replikaci DNA a tím i buněčnému dělení. Mezi alkylační cytostatika patří například cyklofosfamid a ifosfamid, které se používají v kombinované chemoterapii ovariálních nádorů. Podobný účinek jako alkylační látky mají i platinové deriváty, které sice neobsahují alkylovou skupinu, ale jsou také schopny vytvářet vazby mezi molekulami DNA (o cisplatině a jejích derivátech pojednává *Kapitola 1.6.1*).

2. *Antimetabolity* jsou odvozeny od endogenních látek důležitých pro syntézu nukleových kyselin. Účinkují na základě podobnosti s těmito sloučeninami, vlivem níž je vytlačují a způsobují tak jejich nedostatek nebo vedou k syntéze nefunkčního produktu. Mezi antimetabolity patří například antifolika (analoga kyseliny listové, např. metrohexát), nebo analogy purinů a pyrimidinů, například 5-fluorouracil (analog uracilu).
3. *Interkalační látky* mají schopnost vmezeřit se do molekuly DNA, kde vytváří nekovalentní vazby pomocí vodíkových můstků, což vede k zablokování procesů replikace a transkripce. Mezi interkalující cytostatika jsou řazena některá antibiotika (aktinomycin D) a další látky jako například doxorubicin (adriamycin) a epirubicin, které se často používají při léčbě karcinomu ovaria.
4. *Inhibitory mikrotubulů* brání polymeraci a depolymeraci mikrotubulárních vláken a poškozují jejich strukturu. Následkem je porušení buněčného cytoskeletu, intracelulární komunikace, průběhu mitózy (nefunkční dělicí vřeténko) a buněčné proliferace. Mezi inhibitory mikrotubulů (tzv. „vřeténkové jedy“) patří kolchicin, alkaloidy z vinca rosea nebo taxany (paklitaxel, docetaxel) používané v léčbě gynekologických nádorů.
5. *Inhibitory topoizomeráz* brání normálnímu průběhu replikace DNA. Topoizomerázy jsou enzymy, které se během replikace vážou na molekulu DNA, kterou rozštěpují a opět spojují a mění tak její terciární strukturu (nadšroubovicové vinutí, superhelicitu). Jejich inhibicí je narušen proces replikace a mohou vznikat zlomy v DNA. Mezi inhibitory topoizomeráz patří například topotekan nebo etopozid.
6. *Radiomimetika* mají podobný účinek jako ionizující záření při radioterapii, tj. způsobují jednoduché i dvojité zlomy v DNA. Do této skupiny je řazen bleomycin a jeho deriváty.
7. *Inhibitory proteosyntézy* katalyzují rozklad aminokyselin. Následný nedostatek aminokyselin brání syntéze proteinů, což vede k zastavení růstu nádorových buněk. Kromě L-asparaginázy se inhibitory proteosyntézy příliš nepoužívají z důvodu vysoké toxicity.

1.6 Organokovové sloučeniny jako protinádorová léčiva

Organokovové sloučeniny jsou chemické látky, které obsahují silně polární nebo iontovou vazbu mezi atomem uhlíku a atomem přechodného kovu. Atom kovu zde získává parciální kladný náboj. Jsou to velmi reaktivní látky, jejich reaktivita stoupá s polaritou vazby mezi kovem a uhlíkem.²⁶ Mají široké využití v průmyslové chemii, například při organických syntézách a při výrobě plastů, kde slouží jako katalyzátory, nebo jako přísada do paliv.^{26, 27} Využití nacházejí také v lékařství, kde se například organotinaté sloučeniny používají jako antiseptika²⁶ a platinové deriváty jako cytostatika.²⁴ Širšímu využití brání mimo jiné nízká stabilita těchto látek ve fyziologických podmínkách. V posledním desetiletí však došlo k významnému rozvoji v oblasti organokovové chemie a byly syntetizovány nové sloučeniny stabilní i ve fyziologickém prostředí,²⁸ které nacházejí uplatnění například při léčbě zánětlivých onemocnění, diabetu či neurologických poruch.²⁹ Některé nově syntetizované organokovové sloučeniny také vykazovaly v preklinickém testování protinádorový účinek.^{28, 29} Variabilita interakcí jednotlivých částí těchto sloučenin (vytváření vodíkových můstků, nekovalentních interakcí mezi aromatickými kruhy, koordinačně-kovalentních vazeb), strukturální variabilita a flexibilita ligandů poskytuje široké možnosti pro navrhování nových struktur sloučenin s potenciálním protinádorovým účinkem.^{28, 31}

1.6.1 Cisplatina a její deriváty

Cisplatina společně s jejími deriváty patří do skupiny komplexních (koordinačních) sloučenin dvojmocné platiny (Pt^{II}) s různými ligandy, pro které je typická poloha *cis*.

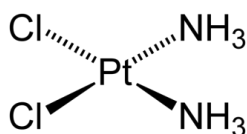
Cisplatina

Cisplatina (CDDP, *cis*-diamminodichloroplatinatý komplex) patří k nejvýznamnějším a nejpoužívanějším cytostatikům současnosti. Její molekula se skládá z centrálního atomu Pt^{II} , na kterém jsou v poloze *cis* navázány dvě molekuly amoniaku (NH_3) a dva chloridové (Cl^-) ligandy (Obr. 7). Vazba $Pt-Cl$ ve vodném roztoku snadno podléhá hydrolyze. Mechanismus účinku cisplatiny je podobný jako u alkylačních látek, vytváří křížové vazby mezi molekulami DNA, čímž brání jejich replikaci a transkripci.²⁴ Poškození DNA má za následek spuštění opravných mechanismů a případně apoptózu buňky. Je aktivována kináza ATM a checkpoint kinázy 1 a 2, které dále aktivují transkripční faktory p53 a p73. Aktivace těchto proteinů spouští transkripci genů, jejichž produkty zastavují buněčný cyklus (např. p21, p27) nebo jsou zapojeny v procesu apoptózy (např. Bax).^{11, 30} Zvýšenou hladinou proapoptotických proteinů je inhibována funkce antiapoptotických proteinů, dochází k narušení vnější mitochondriální membrány, úniku cytochromu c z mitochondriálního

mezimembránového prostoru a spuštění vnitřní apoptotické dráhy, což má za následek smrt buňky.¹¹

Cisplatina má široké využití při chemoterapeutické léčbě nejen ovariálních nádorů, ale také například karcinomů varlat, prsu, děložního čípku, močového měchýře, bronchogenního karcinomu, nádorů ORL oblasti, nehodgkinských lymfomů a osteosarkomů. Využívá se především v kombinované chemoterapii, kde dosahuje velmi dobrých léčebných výsledků.^{9, 24}

Její použití je však limitováno velkým množstvím nežádoucích účinků jako jsou nefrotoxicita, neurotoxicita či ototoxicita, které jsou způsobené akumulací cisplatin v určitých tkáních. Problémem je také častý vznik rezistence nádorových buněk v průběhu léčby.^{9, 25, 28} Tyto skutečnosti jsou příčinou hledání nových organokovových sloučenin, které by měly nižší toxicitu pro lidský organismus, umožňovaly by léčbu pacientů, u kterých se vyvinula rezistence vůči cisplatině a dalším cytostatikům, a také léčbu nádorů, pro něž je cisplatina téměř neúčinná (například karcinom prsu nebo tlustého střeva).³²



Obrázek 7 Strukturální vzorec cisplatin (24)

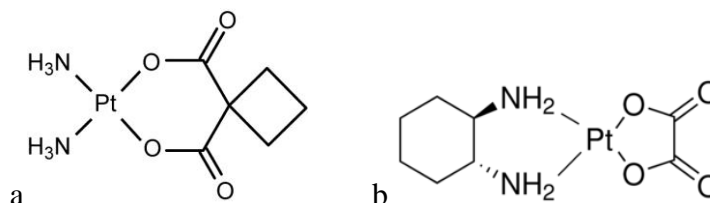
Karboplatina, oxaliplatina

Důsledkem vysoké toxicity cisplatin byla snaha syntetizovat další platinové deriváty, které by měly mírnější nežádoucí účinky, širší spektrum účinku a vyšší stabilitu.²⁴

Karboplatina neboli cis-diamin-(1-cyklobutandikarboxylato)platnatý komplex (Obr. 8a) náleží do druhé generace sloučenin odvozených od cisplatin. Má podobný mechanismus účinku jako cisplatina, ve srovnání s cisplatinou však má nižší toxicitu pro lidský organismus (je méně nefrotoxická), delší dobu účinku a vykazuje větší stabilitu.^{24, 32}

Oxaliplatina (diamminocyklohexanový platinový komplex (Obr. 8b) se substitucí atomů chloru oxalátem) patří do třetí generace platinových derivátů. Její hlavní předností je menší množství nežádoucích účinků a širokospektrální účinek zasahující i některé nádory rezistentní k cisplatině. Podstatou jejího silnějšího účinku je tvorba

většího množství aduktů s DNA, které způsobí apoptózu buňky.³² Oxaliplatina také může vyvolat oxidační stres a tím snížit buněčnou proliferaci.¹⁹ Oxaliplatina se používá ve většině případů v kombinaci s dalšími cytostatiky (např. 5-fluorouracilem) a to zejména při léčbě karcinomu tlustého střeva.^{24,32}



Obrázek 8 Strukturální vzorec karboplatiny (a) oxaliplatiny (b) Převzato z: (24)

1.6.2 Další organokovové sloučeniny a jejich protinádorový účinek

Kromě platinových derivátů byly protinádorové účinky popsány i u dalších organokovových sloučenin. V 70. letech 20. století byly zjištěny účinky komplexů **ruthenia** na buňky nádoru nosohltanu *in vitro*, inhibovaly zde syntézu DNA a proteinů. V následujících letech byly vyvinuty další koordinační sloučeniny ruthenia Ru^{II} , které vykazovaly cytotoxický účinek prostřednictvím interakcí s DNA. U komplexů ruthenia (Ru^{II}) a **osmia** (Os^{II}) byl popsán cytotoxický účinek na buňky karcinomu ovaria. Tyto molekuly mají také možné využití jako nosné molekuly pro inhibitory kináz.²⁸ Organokovové sloučeniny **kobaltu** mají antiproliferativní účinek a zvyšují citlivost nádorových buněk k dalším cytostatikům. U hormonálně závislých nádorů (jako například u karcinomu prsu) mohou **železnaté** komplexy (ferrocen a jeho deriváty) zablokovat receptory hormonů a tím inhibovat buněčný růst.^{19,28}

Komplexy s centrálním atomem **železa, kobaltu a zlata** vykazují v preklinických testech nadějně výsledky, některé komplexy s centrálním atomem **titanu, ruthenia či gallia** již postoupily do prvních a druhých fází klinických testů.²⁸ Mechanismus účinku těchto sloučenin je založen na vazbách na DNA (vytváření aduktů), popřípadě zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku či dusíku (ROS/RNS), které vedou k nárůstu oxidačního stresu a posléze k apoptóze nádorové buňky.^{19,28}

Aktivita a cytotoxicita organokovových sloučenin závisí na jejich:

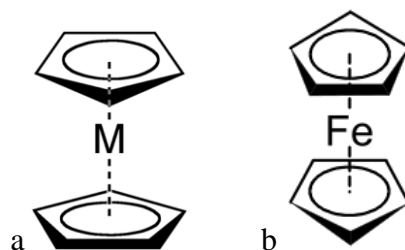
- struktura* – konformaci, velikosti a typu ligandů; může mít vliv na farmakokinetické vlastnosti látky, její stabilitu, reaktivitu nebo rozpustnost^{28,32}
- schopnosti hydrolýzy vazeb* – bylo prokázáno, že snadná hydrolýza vazby mezi kovem a ligandem zvyšuje toxicitu látky²⁸

Cytotoxicita organokovových sloučenin může být mimo jiné zesílena oxidačně-redukčními vlastnostmi kovů, které mohou vstupovat do redoxních dějů a narušit tak vnitřní buněčnou homeostázu zvýšením hladiny reaktivních forem kyslíku a dusíku, které vyvolávají oxidační stres.^{19, 31}

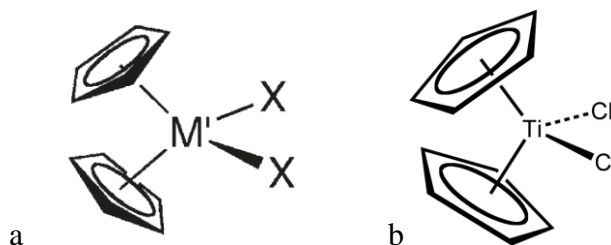
Ferroceny, titanoceny a jejich deriváty jsou organokovové sloučeniny, které patří do skupiny metalocenů. **Metaloceny** jsou sloučeniny dvou cyklopentadienylových aromatických kruhů, které jsou kovalentně navázány na atom kovu v oxidačním stavu +II. Jejich sumární vzorec je $M(C_5H_5)_2$, kde $(C_5H_5)-$ je cyklopentadienylový (Cp) kruh a M je centrální atom kovu (Ti, Fe, Co, Cr, Ni, V atd.).²⁷ Pro svou symetrickou strukturu bývají také označovány jako sendvičové komplexy.^{28, 31}

Metaloceny mohou mít dvě různé struktury:³¹

- 1) klasické metaloceny mají paralelní Cp ligandy a centrálním atomem kovu je typicky železo, ruthenium nebo kobalt (Obr. 9a)
- 2) u „ohnutých“ metalocenů („bent metallocenes“) jsou kromě Cp ligandů k centrálnímu atomu kovu (především Ti, Zr, V, Nb, Mo...) navíc navázány další ligandy (Obr. 10a)



Obrázek 9 Strukturální vzorec klasického metalocenu s paralelními Cp ligandy (a) a ferrocenu (b)
Převzato z (31).



Obrázek 10 Strukturální vzorec „ohnutého“ metalocenu (a) a titanocenu dichloridu (b)
Převzato z (21) a (27).

Titanoceny

Titanocen dichlorid (Obr. 10b) byl objeven týmem Kopf-Maier v roce 1979 jako první organokovová sloučenina s protinádorovým účinkem.²⁸ Ve srovnání s cisplatinou, která v té době úspěšně prošla všemi klinickými testy a stala se významným cytostatikem, vykazoval nový derivát titanocenu mírnější vedlejší účinky.²⁷ Mechanismus účinku titanocenu dichloridu je podobný cisplatině. Vazba mezi Ti—Cl snadno podléhá hydrolyze a vzniklá hydrolyzovaná forma titanocenu dichloridu se váže na DNA.²⁸ Poškození DNA vede ke zvýšení hladiny p53, zastavení buněčného cyklu v G₂/S-fázi a indukci apoptózy.³⁰ Vzhledem k nestabilitě způsobené rapidní hydrolyzou a špatným výsledkům v druhé fázi klinického testování se od dalšího použití této sloučeniny upustilo.³³ Objev protinádorových účinků titanocenu dichloridu však dal podnět pro výzkum a syntézu nových derivátů titanocenu a dalších organokovových sloučenin s potenciálním protinádorovým účinkem.²⁸

Ferroceny

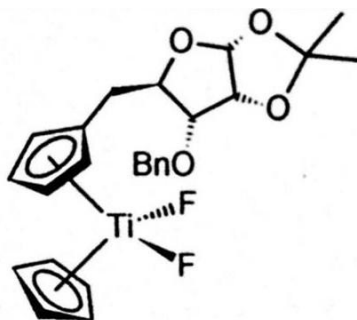
Ferrocen (Obr. 9b) byl objeven v roce 1951³⁴ a díky svým vlastnostem (elektrochemické vlastnosti železa) našel využití především v chemickém průmyslu jako katalyzátor, součást elektroaktivních materiálů či jako antidetonační přísada do motorových benzínů nahrazující tetraethylolovo, které se přestalo používat kvůli jeho toxicitě a škodlivosti pro životní prostředí.^{26, 34} Ferrocen je světle oranžový prášek nerozpustný ve vodě a rozpustný v organických rozpouštědlech. Protože může snadno podléhat elektrofilní aromatické substituci,²⁷ bylo vytvořeno mnoho ferrocenových derivátů, z nichž některé vykazovaly protinádorový účinek. Mechanismus účinku těchto látek zatím není jednoznačně určen, jednou z možností je tvorba elektrofilních částic či reaktivních forem kyslíku v buňce.³³

1.6.3 Charakteristika látek použitých v práci SOČ

V práci byly použity deriváty titanocenu a ferrocenu. Jsou to nově syntetizované organokovové sloučeniny, které byly poskytnuty Ústavem chemických procesů AV ČR (Mgr. Jindřich Karban, Ph.D., prof. RNDr. Jiří Pinkas, Ph.D.)

Derivát titanocenu difluoridu JP-596-1

Tato organokovová sloučenina je odvozena od titanocenu dichloridu nahrazením chloridových ligandů fluoridovými anionty a navázáním dalšího ligandu na cyklopentadienylový kruh (Obr. 11). Molární hmotnost tohoto derivátu titanocenu je $M = 478$ g/mol. Má podobu světle žlutého prášku, který je poměrně špatně rozpustný ve vodě a lépe rozpustný v DMSO.

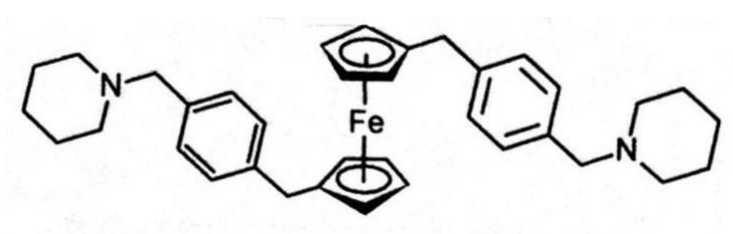


Obrázek 11 Strukturální vzorec látky JP-596-1

Bn = benzylová funkční skupina ($C_6H_5CH_2-$)

Derivát ferrocenu JP-582-2

Tato organokovová sloučenina je odvozena od ferrocenu a to vazbou dvou stejných ligandů na cyklopentadienylové kruhy (Obr. 12). Molární hmotnost této sloučeniny je $M = 561$ g/mol. Je to žlutý prášek, který má rozpustnost podobnou derivátu titanocenu.



Obrázek 12 Strukturální vzorec látky JP-582-2

2 Cíle práce

Tato práce se zabývá studiem protinádorových účinků nově syntetizovaných organokovových sloučenin - derivátů titanocenu a ferrocenu ve srovnání s cisplatinou u buněčných linií odvozených od karcinomu ovaria A2780, A2780cis a SKOV-3.

Cílem práce je ověření cytotoxického účinku dvou nových organokovových sloučenin, jejich schopnosti indukovat apoptózu nádorových buněk a charakterizace mechanismu jejich působení.

- pro zhodnocení cytotoxicity bude využit test MTT
- vliv látek na regulaci buněčného cyklu bude analyzován průtokovou cytometrií
- pomocí polyakrylamidové elektroforézy ve spojení s western blottingem budou monitorovány změny exprese vybraných genů zapojených do regulace buněčného cyklu a procesu apoptózy
- vliv látek na proliferaci buněk bude sledován v reálném čase
- oxidační stres vyvolaný působením organokovových sloučenin bude stanoven fluorescenční metodou

3 Materiál a metody

Praktická část této práce byla provedena na pracovišti Regionálního centra aplikované molekulární onkologie (RECAMO) při Masarykově onkologickém ústavu v Brně.

3.1 Tkáňové kultury

3.1.1 Buněčné linie (A2780, A2780 cis, SKOV-3)

V práci byly použity buněčné linie poskytnuté od Sigma Aldrich, USA [A2780 a A2780cis] a American Type Culture Collection (ATCC), USA [SKOV-3].

A2780

odvozena od lidského karcinomu ovaria
epiteliální buňky
adherentní linie
kultivační médium: RPMI

A2780cis

odvozena od lidského karcinomu ovaria, epitheliální buňky, adherentní linie
získaná rezistence vůči cisplatině (dlouhodobé vystavení parentální linie A2780 zvyšujícím se koncentracím cisplatiny)
křížová rezistence na melphalan, adriamycin a iradiaci (vystavení ionizujícímu záření)
zvýšená schopnost opravovat poškození DNA, cytogenetické odlišnosti
pro udržení rezistence je v každé 2. – 3. pasáži do média přidána cisplatina (1 μ M)
kultivační médium: RPMI

SKOV-3

odvozena od lidského adenokarcinomu ovaria, adherentní linie
mutace genu TP53 → přirozená rezistence k cisplatině
rezistentní k TNF („tumor necrosis factor“, tumor nekrotizující faktor) a k některým cytotoxickým látkám, například diphtheria toxinu a adriamycinu
kultivační médium: McCoy's 5A medium

3.1.2 Příprava kultivačního média a pasážování buněk

Buňky jsou kultivovány v médiu, které napodobuje svým složením extracelulární tekutinu a je zdrojem energie a živin. Obsahuje různé anorganické ionty, glukosu (případně jiný zdroj energie), růstové faktory, pufrující složky, mastné kyseliny a lipidy, některé peptidy a bílkoviny, vitamíny. Může také obsahovat acidobazický indikátor (nejčastěji fenolová červeň). Do základního kultivačního média se dále může přidávat sérum, které je zdrojem mnoha biologicky významných látek, které mají vliv na buněčnou proliferaci, jako například růstové faktory, inhibitory proteáz, některé látky významné pro adhezi buněk a stopové prvky. Do kultivačních médií se také často přidávají antibiotika pro zabránění kontaminaci buněčných kultur bakteriemi.

Médium je připraveno rozpuštěním všech látek, sterilně přefiltrováno přes filtr s póry o velikosti 0,22 μm a je uchováváno v lednici při 4°C.

RPMI médium (Roswell Park Memorial Institute medium)

na 100 ml RPMI je potřeba:

88 ml zásobní roztok kultivačního média RPMI 1640 (Sigma Aldrich, USA)

10% (v/v) fetální bovinní sérum (FBS) (10 ml) (Biochrom, Německo)

1% (v/v) pyruvát (1 ml) (Sigma Aldrich, USA)

1% (v/v) antibiotika (Penicillin-Streptomycin) (1 ml) (PAA, GE Healthcare, USA)

McCoy's 5A medium

na 100 ml McCoy's medium je potřeba:

89 ml zásobní roztok kultivačního média McCoy's medium (Sigma Aldrich, USA)

10% (v/v) fetální bovinní sérum (FBS) (10 ml)

1% (v/v) antibiotika (Penicillin-Streptomycin) (1 ml)

Pasážování buněk

Pasážování buněk je proces, při kterém je část buněk přenesena do nové kultivační nádoby z důvodu vyčerpání živin z média a příliš vysoké hustoty buněk. Pasážování se provádí v závislosti na typu buněčné linie po 2-4 dnech při dosažení zhruba 80% pokrytí dna kultivační nádoby buňkami, což je kontrolováno pomocí inverzního mikroskopu.

Z misky bylo odsáto médium pomocí sterilní Pasteurovy pipety. Buňky byly opláchnuty 0,5% EGTA v PBS (1 ml na Ø6cm misku). Pufr PBS (a nikoli voda) je použit proto, aby nedošlo k osmotickému šoku. Opláchnutím jsou odstraněny nežádoucí bílkoviny z fetálního séra, které by blokovaly působení trypsinu. EGTA vychytává dvojmocné ionty (tzv. chelatace), jako například Ca^{2+} nebo Mg^{2+} , které jsou důležité pro

adhezi buněk. Poté byl přidán roztok trypsinu (0,5 ml na Ø6 cm misku), který štěpí spoje mezi buňkami a podkladem. Trypsin má největší účinnost v prostředí, které se svou teplotou blíží tělesné teplotě (37°C), proto byly buňky s trypsinem ponechány inkubovat 1-2 minuty v termostatu. Po uvolnění buněk bylo působení trypsinu zastaveno přidáním 3,5 ml kultivačního média. Buňky byly rozsuspendovány v médiu a na novou misku se 4 ml čerstvého kultivačního média bylo přeneseno 1 ml buněčné suspenze. Buňky byly kultivovány při 37°C v inkubátoru s 5% CO₂ v atmosféře a relativní vlhkostí přibližně 95 %. Oxid uhličitý se podílí na udržení stálého pH kultivačního média a jeho koncentrace v médiu odpovídá poměrům v extracelulární tekutině.

S buněčnými kulturami bylo vždy pracováno ve sterilním prostředí v laminárním („flow“) boxu s UV světlem. Byly použity sterilní skleněné pipety a plastik určený pro práci s buněčnými kulturami.

3.1.3 Kryokonzervace a rozmrazování buněčných linií

Buňky byly opláchnuty 0,5% EGTA v PBS a uvolněny trypsinem. Po zastavení účinku trypsinu byla suspenze buněk centrifugována 5 minut/1050 rpm. Po odsátí supernatantu byly buňky rozsuspendovány ve směsi 900 µl vychlazeného FBS a 100 µl DMSO (Sigma Aldrich, USA), která byla přefiltrována přes filtr s póry 0,22 µm, a poté přeneseny do kryoampulí. DMSO je kryoprotektant, který zabraňuje vytváření krystalů, které by mohly poškodit buněčné struktury. Buňky mohou být uchovávány v parách kapalného dusíku po velmi dlouhou dobu. Pro rozmrazení byla ampule s buňkami vytažena z kapalného dusíku, rozmrazena při 37 °C a k buňkám bylo postupně přidáváno kultivační médium (aby nedošlo k osmotickému šoku). Po centrifugaci bylo médium obsahující DMSO odstraněno a buňky byly přeneseny na misku do čerstvého média.

3.2 Použitá cytostatika a příprava zásobních roztoků

Nově syntetizované organokovové sloučeniny s cytotoxickým účinkem byly poskytnuty Ústavem chemických procesů AV ČR. Jedná se o deriváty titanocenu (JP-596-1) a ferrocenu (JP-582-2). Tyto dvě látky byly vybrány z širšího spektra nově syntetizovaných sloučenin na základě předběžných testů cytotoxicity provedených na pracovišti RECAMO. Dále byla použita cisplatina (Ebewe, Rakousko).

Zásobní roztoky o koncentraci 10 mM byly připraveny rozpuštěním všech látek v DMSO. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě -20°C bez přístupu světla.

Roztoky látek byly pro dosažení pracovních koncentrací vždy připravovány čerstvé zředěním zásobního roztoku cytostatika v kultivačním médiu v odpovídajícím poměru.

3.3 Test cytotoxicity

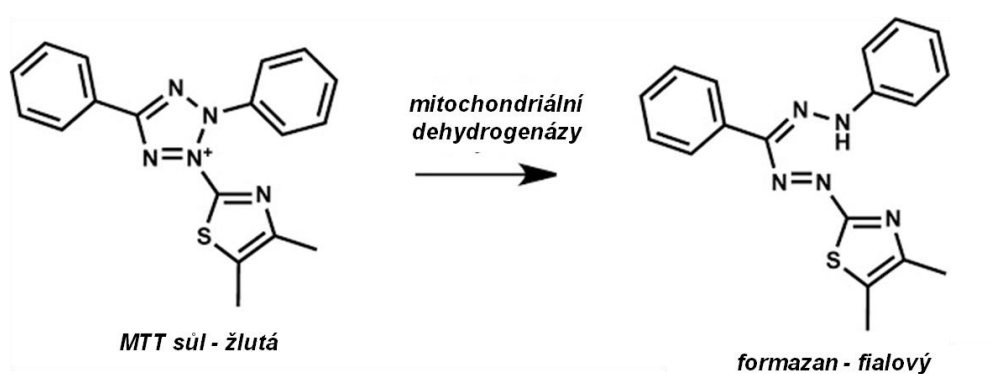
3.3.1 Princip metody

Test cytotoxicity (test metabolické mitochondriální aktivity, test MTT, „MTT assay“) je kolorimetrický test používaný *in vitro* pro zjištění reakce populace buněk na externí faktory a jejich viability.

V živých buňkách je žlutá tetrazoliová sůl MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) redukována na fialový formazan působením dehydrogenáz přítomných v mitochondriích (Obr. 13). Mitochondriální dehydrogenázy rozštěpí tetrazoliový kruh za vzniku formazanových krystalů hvězdicovitého tvaru nerozpustných ve vodných roztocích. Vzniklý intracelulární formazan může být rozpuštěn pomocí silného detergentu (např. dodecylsulfátu sodného) nebo jiného rozpouštědla (např. dimethylsulfoxidu, DMSO) a absorbance je změřena spektrofotometrem při vlnové délce 500-600 nm.

Míra konverze MTT soli na formazan je přímo úměrná aktivitě mitochondriálních dehydrogenáz a tím i počtu živých buněk.

Tato metoda má svá omezení, která mohou být dána různou aktivitou mitochondriálních dehydrogenáz v různých typech buněk nebo různým fyziologickým stavem buněk. Nicméně je užitečná pro měření závislosti růstu buněk na různých faktorech podporujících růst, pro studium křížové rezistence mezi léky a hlavně pro testy cytotoxicity, které umožňují stanovit citlivost nádorových buněk k cytostatikům a dalším látkám.

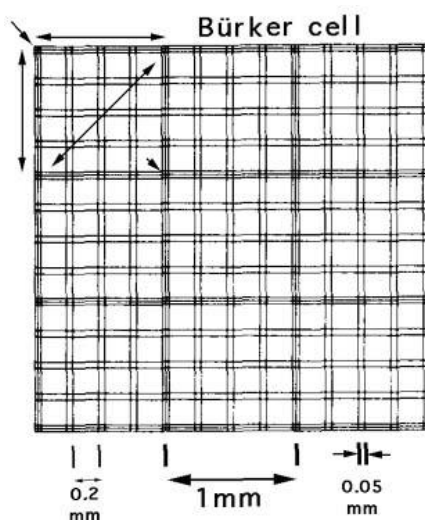


Obrázek 13 Schéma redukce MTT soli na formazan (35)

3.3.2 Postup práce

Buňky byly vysety na 96-jamkovou destičku o dané koncentraci podle typu buněčné linie. Ideální koncentrace buněk na jamku závisí na rychlosti proliferace a velikosti buněk, a byla určena experimentálně. U buněčné linie A2780 je to 5000 buněk/100 μl , u linie A2780cis 6000 buněk/100 μl a u linie SKOV-3 3000 buněk/100 μl .

Buňky byly počítány pomocí Bürkerovy komůrky (Obr. 14). Ta obsahuje mřížku 3x3 čtverců o velikosti 1 mm² a hloubce 0,1 mm, kde je každý čtverec dále rozdělen na 16 menších čtverců. Řídíme se tzv. pravidlem dvou stran, což znamená, že započítáváme buňky dotýkající se nebo ležící v okraji mřížky velkých čtverců pouze na dvou zvolených stranách. Buňky byly spočítány v pěti velkých čtvercích, ze kterých byl vypočten průměr a následně koncentrace buněk v suspenzi.



Obrázek 14 Schéma Bürkerovy (cytometrické) komůrky (36)

Multikanálovou pipetou byly poté do 96-jamkové desky pipetováno 100 μl buněčné suspenze o požadované koncentraci.

Testované látky byly přidány po 24 hodinách v množství také 100 μl /jamku v koncentrační řadě podle *Tabulky 2*.

Inkubace s cytotoxickými látkami probíhala 24 - 48 hodin v termostatu (37 °C, 5 % CO₂).

Před měřením byl připraven roztok MTT (Sigma Aldrich, USA) v koncentraci 2,5 mg/ml v PBS. Do každé jamky bylo přidáno 20 μl roztoku MTT a deska byla poté ponechána 3 hodiny v termostatu.

Po odstranění média bylo do jamek pipetováno 50 μl 100% DMSO, který rozpustil fialový formazan. Absorbance byla změřena spektrofotometrem Tecan Infinite M1000 PRO (Tecan, Švýcarsko) při 595 nm.

	médium		0,1 μ M		1 μ M		5 μ M		10 μ M		50 μ M	
JP-596-1												
JP-582-2												
cis Pt												
DMSO												

Tabulka 2 Schéma destičky pro MTT assay

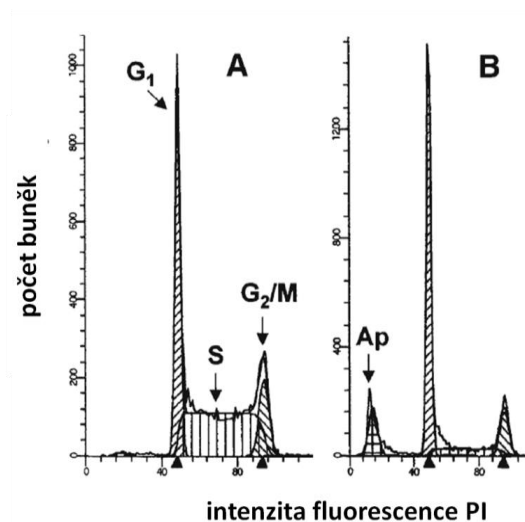
3.4 Měření fází buněčného cyklu pomocí průtokového cytometru

3.4.1 Princip metody

Průtoková cytometrie („flow cytometrie“) je bioanalytická metoda, která má široké uplatnění v biologickém a medicínském výzkumu. Umožňuje získat komplexní údaje o populaci buněk, jako jsou například počet a velikost buněk, jejich granularita (densita vnitřního obsahu), umožňuje analýzu různých buněčných komponent (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny), organel (mitochondrie, lysozomy) či funkcí (enzymatická aktivita, životaschopnost). Tato metoda se využívá také v *in vitro* testech nových léčiv, v onkologii pak především pro diagnostiku a monitorování průběhu a léčby hematologických onemocnění.

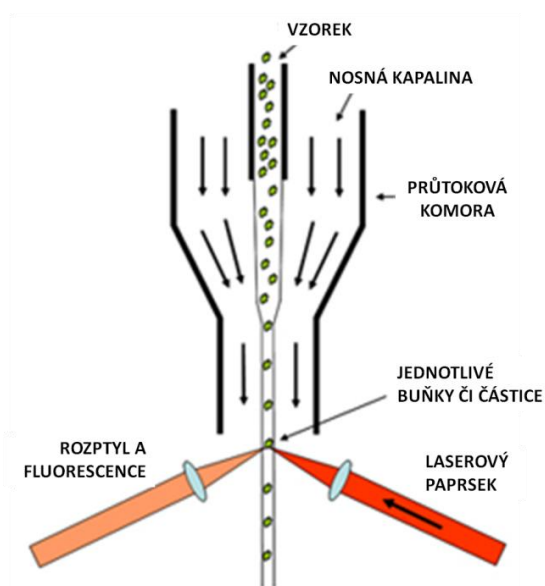
Analýza buněčného cyklu probíhá na principu měření obsahu značené DNA v buňce. DNA je značena pomocí propidium jodidu (PI), což je fluorescenční látka, která má schopnost interkalovat („vmezeřovat“) se do DNA. Protože se PI váže i na RNA, je nezbytné přidat k buňkám ribonukleázu A („RNázu A“). Platí přímá úměra mezi intenzitou fluorescence a obsahem DNA v buňce.

Na základě množství DNA v buňce lze určit, v jaké fázi buněčného cyklu se buňka právě nachází. Buňky v G_0 - či G_1 -fázi buněčného cyklu mají diploidní počet chromozomů ($2n$), zatímco buňky v G_2 -fázi těsně před mitózou (M) obsahují chromozomů přesně dvojnásobek ($4n$). V průběhu syntézy DNA v S-fázi se obsah DNA pohybuje mezi $2n$ a $4n$. Výstupem měření je histogram znázorňující buňky v různých fázích buněčného cyklu. (Obr. 15)



Obrázek 15 Vztah mezi fázemi buněčného cyklu a obsahem DNA vyjádřený pomocí histogramu (37)
A- histogram normální buňky **B-** nádorové buňky po indukci apoptózy (Ap-apoptická tělíska)

Měření probíhá na průtokovém cytometru následujícím způsobem: vzorek je transportován pomocí nosné kapaliny systémem fluidiky a jednotlivé buňky protékají za sebou tenkou kapilárou do měřicí komory. Měření fyzikálních vlastností buněk je umožněno průchodem laserového paprsku (Obr. 16). Na základě jeho odklonu určíme velikost (přímý rozptyl – „forward scatter“) a granularitu buněk (boční rozptyl – „side scatter“). Emitovaná fluorescence je pomocí sestavy filtrů a čoček rozdělena podle vlnové délky do kanálů. Na koncových detektorech je v každém z nich vyhodnocena intenzita fluorescence, informace jsou následně zpracovány pomocí počítačového programu.



Obrázek 16 Schéma měřicí části průtokového cytometru (38)

3.4.2 Postup práce

Sklízení buněk a fixace v ethanolu

Médium s plovoucími buňkami bylo přeneseno do zkumavky. Buňky na misce byly opláchnuty 0,5% EGTA v PBS (1 ml na Ø6cm misku) a trypsinizovány (uvolněny pomocí trypsinu) (0,5 ml trypsinu na Ø6 cm misku). Po krátké inkubaci při 37 °C bylo působení trypsinu zastaveno přidáním média a buňky byly opláchnuty ze dna misky. Suspenze buněk byla poté přenesena do zkumavky a stočena na 5 minut/ 1040 rpm. Po odsání supernatantu bylo přidáno 3 ml PBS a suspenze byla opět stočena (5 minut/ 1040 rpm). Po opláchnutí v PBS byl pelet buněk rozsuspendován v 0,5 ml PBS a bylo k němu přidáno 4,5 ml vychlazeného 70% ethanolu. Buňky byly fixovány v ethanolu 2 hodiny/ 4°C.

Barvení buněk pomocí PI

Fixované buňky byly opět stočeny a ethanol byl opatrně odsán. Po opláchnutí v 5 ml PBS byl pelet buněk rozsuspendován v 1 ml roztoku PI a byl ponechán inkubovat 30 minut ve tmě při RT.

Barvicí roztok PI

0,1% (v/v) Triton X-100 (slouží k permeabilizaci membrány)
10 µg/ml PI (Molecular Probes, USA)
100 µg/ml DNase-free RNase A
v PBS

Analýza buněčného cyklu

Fluorescence byla změřena na průtokovém cytometru BD FACSVersé™ a data byla následně zpracována pomocí software BD FACSuite™ (BD Biosciences, USA).

3.5 SDS-PAGE a western blotting

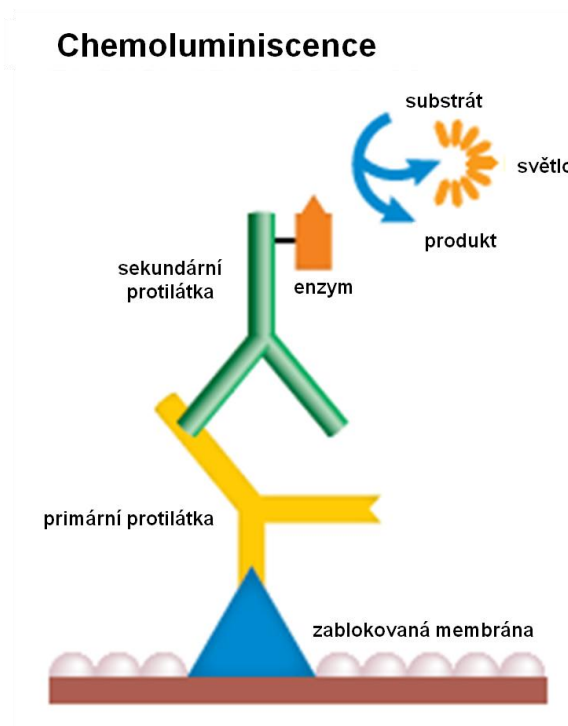
3.5.1 Princip metody

SDS-PAGE a western blotting je kombinace analytických metod, která se používá k detekci specifického proteinu ve směsi proteinů. Využívá elektroforézu pro rozdělení proteinů, které jsou následně přeneseny na membránu, kde jsou detekovány specifickou protilátkou.

SDS-PAGE, tj. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), je metoda sloužící k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti principem molekulového síta v gelu. Proteiny se v přítomnosti SDS denaturují a je jim dodán záporný náboj. Po nanesení vzorku (směsi proteinů) na gel a umístění do elektrického pole dochází k migraci proteinů směrem k anodě. V praxi je často využívána tzv. diskontinuální elektroforéza, kde se gel skládá ze dvou gelů s různým pH a koncentrací akrylamidu. Zaostřovací „*stacking*“ gel má nižší pH, nižší koncentraci akrylamidu a tedy i nižší hustotu a slouží k zaostření vzorku. Rozdělovací „*running*“ gel má vyšší hustotu a slouží k separaci proteinů podle jejich molekulových hmotností.

Při western blottingu je použito elektrické pole pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu (katoda -) na nitrocelulóзовou membránu (anoda +).

Analýza proteinů probíhá pomocí specifických protilátek. Membránu je třeba nejdříve zablokovat v 5% roztoku odtučněného sušeného mléka, aby se zabránilo vytváření nespecifických vazeb protilátek na membránu. Poté se aplikují primární protilátky, které se naváží na konkrétní protein. Po inkubaci a následném promytí se primární protilátky detekují sekundárními protilátkami, které jsou konjugovány s reportérovým enzymem umožňujícím vizualizaci (běžně se používá HRP, tj. křenová peroxidáza). Pro detekci signálu lze využít chemoluminiscenční metodu, kdy je na membránu aplikován substrát ECL („enhanced chemiluminescence“), který je peroxidázou oxidován, přičemž dochází k emisi světelného záření, které je přímo úměrné množství daného proteinu (Obr. 17). Světlo je detekováno přiložením filmu na membránu nebo pomocí kamery.



Obrázek 17 Schéma chemoluminiscenční metody analýzy proteinů (39)
Při chemoluminiscenci je výsledkem enzymatické reakce světlo.

3.5.2 Postup práce

Příprava vzorků

- 1) Buňky byly sklizeny stejným postupem jako pro *průtokovou cytometrii*.
- 2) Po posledním stočení (5 minut/ 1040 rpm) a odsátí zbytku PBS byl pelet buněk resuspendován v lyzačním (NET) pufru (*složení v Příloze 1*) s přidavkem PMSF a směsi inhibitorů proteáz (v poměru 1 : 100) přibližně v pětinásobku svého objemu. Od tohoto okamžiku byly vzorky stále chlazeny na ledu.
- 3) Buňky byly lyzovány 30 minut na ledu, po 5 minutách byly protřepávány na vortexu.
- 4) Po centrifugaci 30 minut/ 14 000 rpm/ 4 °C byl supernatant přenesen do nové eppendorfky ⇒ lyzát.
- 5) Koncentrace proteinů v lyzátu byla změřena metodou dle Bradfordové:
 - a. 200 µl činidla bylo smícháno s 800 µl redestilované vody a 1 µl lyzátu
 - b. Po vortexování a inkubaci 15 minut při RT byla na spektrofotometru změřena absorbance při 595 nm
 - c. Koncentrace proteinů byla stanovena výpočtem $c = \frac{A_{595}}{0,07}$, kde 0,07 je konstanta zjištěná dříve z kalibrační křivky.

- 6) Lyzáty byly naředěny na stejnou koncentraci lyzačním pufrům a smíchány s NuPAGE LDS Sample Buffer 4x (Life Technologies, USA) a dithiothreitem (DTT) v poměru 13:5:2. DTT působí jako redukční činidlo a štěpí disulfidické můstky, což napomáhá denaturaci proteinu.
- 7) Pro konečnou denaturaci byly vzorky povařeny 5 minut ve vodní lázni.

Příprava polyakrylamidového gelu, elektroforéza a přenos proteinů

- 1) Skla pro gel o tloušťce 1 mm byla po očištění 96% etanolem sestavena do aparatury na nalévání gelů (Bio-Rad Laboratories, USA).
- 2) Byla připravena směs na 10% „running“ gel, viz *Tabulka 3*.

<i>poměr látek na 4 gely</i>	<i>RUNNING gel 10%</i>	<i>STACKING gel 5%</i>
Acrylamide 30%	6 ml	1 ml
1M Tris pH 6,8	6,7 ml	0,75 ml
redestilovaná H₂O	5,2 ml	4,22 ml
<i>APS</i>	48 µl	6 µl
<i>TEMED</i>	12 µl	6 µl
celkový objem	18,5 ml	6,19 ml

Tabulka 3 Poměr komponent na přípravu 4 polyakrylamidových gelů

Směs byla pipetována 2-3 cm pod okraj sklíček. Pro vyrovnání povrchu gelu byla nahoru pipetována tenká vrstva redestilované vody. Gel byl ponechán tuhnout 45 minut.

- 3) Stejným způsobem byl připraven 5% „stacking“ gel.
- 4) „Stacking“ gel byl pipetován až po okraj sklíčka, poté byl mezi skla vložen hřebínek, který určuje počet jamek. Gel byl ponechán tuhnout 45 minut. Takto připravený gel byl buď přímo použit, nebo skladován v lednici při 4 °C v TRIS pufru.
- 5) Skla s gelem byla přenesena do aparatury pro elektroforézu a z gelu byl vytažen hřebínek. Jako pufr byl použit MOPS Running buffer 1X (*složení v Příloze 1*).

- 6) Do jamek byly pipetovány vzorky v objemu podle počtu jamek a šířky gelu – u 1mm gelu s 15 jamkami: 15-18 μl , u 1mm gelu s 10 jamkami: 25 μl , a MW marker v objemu 5-7 μl .
- 7) Aparatura byla připojena do zdroje elektrického proudu a hodnota napětí byla nastavena na 80 V. Po zaostření vzorků ve „stacking“ gelu byla hodnota napětí zvýšena na 120 V.
- 8) Po proběhnutí elektroforézy byl gel z aparatury vyjmut, „stacking“ gel byl odstraněn a „running gel“ byl vložen do misky s blotovacím pufrům.
- 9) Při metodě wet blottingu byly na kazetu (anodická strana +) naskládány:

houba

2 Whatmany (filtrační papíry)

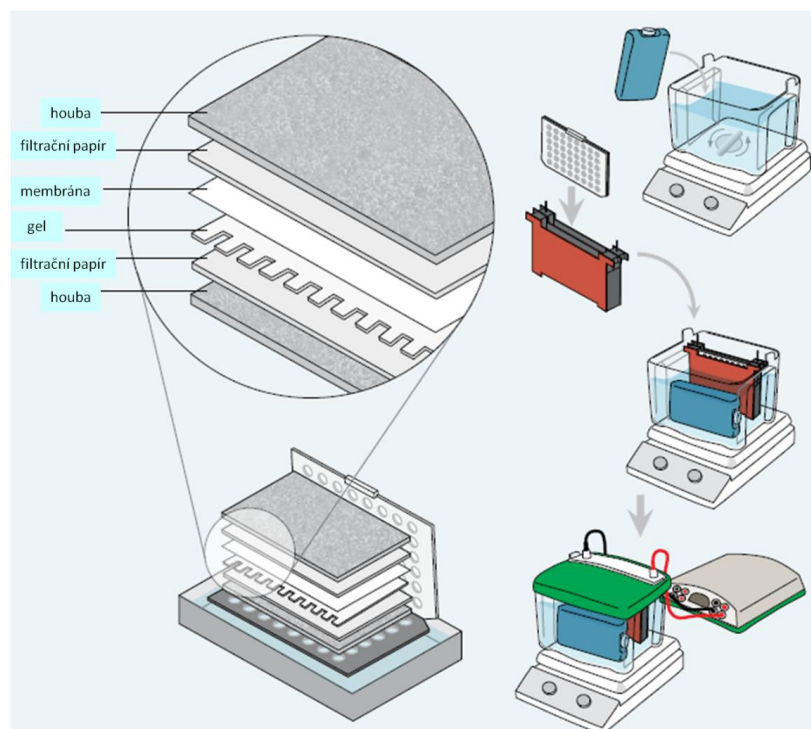
membrána (Trans-Blot, pure Nitrocellulose, 0,22 μm , Bio-Rad Laboratories, USA)

gel

2 Whatmany

houba,

předem namočené v blotovacím pufru. Byly odstraněny vzduchové bubliny a sestava byla vložena společně s chladítkem do blotovací aparatury (Obr. 18). Jako blotovací pufr byl použit Blotting buffer 1X (*složení v Příloze 1*). Aparatura (Bio-Rad Laboratories, USA) byla připojena ke zdroji elektrického proudu a hodnota napětí byla nastavena na 100 V. Přenos proteinů z gelu o tloušťce 1 mm probíhal 90 minut.



**Obrázek 18 Schéma aparatury při wet blottingu (39)
Vlevo schéma kazety, vpravo ELFO-aparatura.**

Detekce proteinů

- 1) Bylo připraveno 5% odtučněné sušené mléko v PBS + 0,1% Tween 20 (Sigma Aldrich, USA)
- 2) Pro zhodnocení přenosu proteinů byly membrány obarveny v roztoku Ponceau S a následně opláchnuty v PBS. Membrány byly poté nařezány podle potřeby pro aplikaci protilátek.
- 3) Membrány byly blokovány v 5% roztoku odtučněného mléka v PBS + 0,1% Tween 20 (Sigma Aldrich, USA) 1 hodinu při pokojové teplotě (RT) na třepačce.
- 4) Primární protilátky ředěné v mléku byly aplikovány na membránu, kde byly ponechány přes noc při 4 °C. Ředění protilátek viz *Tabulka 4*.
- 5) Membrány byly promyty v miskách při RT na třepačce: 1x10 min v PBS, 2x10 min v PBS + 0,1% Tween 20, 1x10 min v PBS.
- 6) Sekundární protilátky byly naředěny v mléku v poměru 1 : 1000 a aplikovány na membrány podle *Tabulky 4*, a ponechány inkubovat 1 hodinu při RT.
- 7) Po promytí (viz krok 6) byl na membrány aplikován substrát ECL (Detection reagent 1 a 2 v poměru 1:1, Amersham Biosciences, UK).
- 8) Po 5 minutách byl substrát odsán a chemiluminiscence byla detekována na film, který byl vyvolán pomocí vyvolávacího stroje.

protein	hmotnost	ředění primární protilátky (protilátka:mléko)	sekundární protilátka
PARP 1	113-116 kDa, 89 kDa	1:100	RAM Px
p73	70-80 kDa	1:500	SWAR Px
p-Chk 2	62-66 kDa	1:250	SWAR Px
p-Chk 1	56 kDa	1:250	SWAR Px
p53	53 kDa	1:10	RAM Px
aktin	42 kDa	1:100	RAM Px
caspase 3	35 kDa, 17 kDa	1:500	RAM Px
Bid	22 kDa, 15 kDa	1:250	RAG Px
p21	21 kDa	1:1	RAM Px
cytochrome c	12-15 kDa	1:250	SWAR Px

Tabulka 4 Seznam zkoumaných proteinů, jejich hmotností a poměr ředění protilátek

RAM Px- králičí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou

RAG Px-králičí sekundární protilátka proti kozím imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou

SWAR Px-prasečí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou

3.6 Měření buněčné proliferace v reálném čase

3.6.1 Princip metody

Analýza buněk v reálném čase je důležitá metoda pro studium účinků sledovaných látek na buněčné linie. Hlavní předností je možnost analyzovat viabilitu a průběh buněčné proliferace v reálném čase, aniž by bylo nutné zasahovat do buněk barvením či značením. Jedná se tedy o neinvazivní metodu. Další výhodou je poměrně jednoduchý postup a možnost analýzy po libovolnou dobu - od několika minut až po dlouhodobá několikadenní sledování.

K měření bylo využito systému xCELLigence - RTCA DP (ACEA Biosciences, USA), který se skládá ze tří částí. RTCA DP Analyzer je zařízení, které zaznamenává signály a odesílá je do řídicí jednotky. Je uložen uvnitř inkubátoru k zajištění optimálních podmínek pro buňky a jsou na něm integrovány tři stanice pro „E-Plates“ (E-destičky). RTCA Control Unit neboli řídicí jednotka se skládá z přenosného počítače a zařízení na připojení analyzátoru (Obr. 19).



Obrázek 19 Schéma systému RTCA („real time cell analysis“) (40)

Pro analýzu proliferace se používají speciální 16-jamkové desky označované jako E-Plates (Obr. 20). Každá z jamek má na dně zlaté elektrody, které pokrývají přibližně 80 % dna jamky. RTCA analyzátor vysílá a přijímá elektrické signály a měří elektrickou impedanci snímače elektrod. Impedance je chápána jako elektrický odpor proti průchodu střídavého proudu při dané frekvenci. Impedance je vyjádřena jako buněčný index (CI, „cell index“), který se mění v závislosti na růstu buněk přisedlých na elektrodě. Platí přímá úměra mezi hodnotou buněčného indexu a množstvím přisedlých buněk, index proto roste s proliferací buněk. Při odumírání buněk se schopnost adheze buněk na podklad snižuje a buněčný index naopak klesá.



Obrázek 20 16-jamková E-destička určená k real time analýze buněk (41)

3.6.2 Postup práce

Buňky byly trypsinizovány a jejich počet v 1 ml média byl zjištěn pomocí Bürkerovy komůrky.

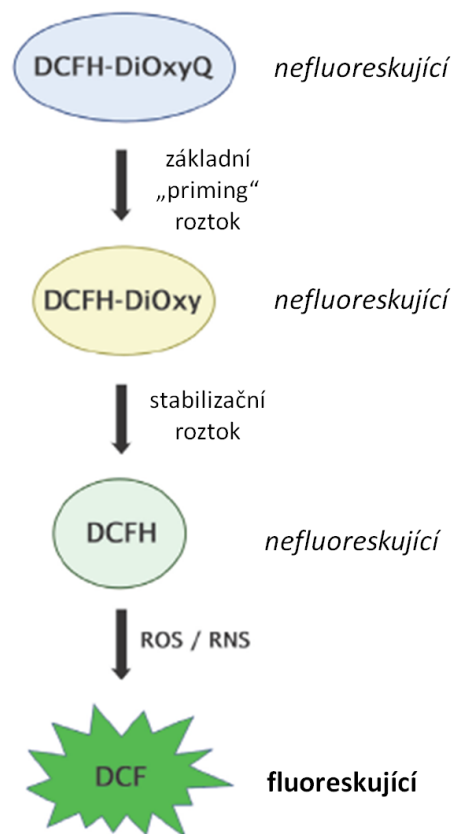
Do jamek E-destičky bylo pipetováno 50 μ l média. Destička byla poté vložena na 30 minut do RTCA stanice za účelem ekvibrace. Bylo změřeno pozadí a následně přidáno 50 μ l buněčné suspenze o požadované koncentraci (stejně jako při testu MTT) a následně byla spuštěna vlastní analýza. Po 24 hodinách, kdy už buňky přisedly na dno jamky a zahájily proliferaci, bylo do jamek přidáno 100 μ l testované látky (cytostatika). Měření pak probíhalo dalších 48 hodin. Výsledky byly zpracovány pomocí RTCA software.

3.7 Stanovení oxidačního stresu buněk

Pro stanovení obsahu volných radikálů v buněčném lyzátu byl použit OxiSelect™ *In Vitro* ROS/RNS Assay Kit od Cell Biolabs, USA.

3.7.1 Princip metody

Tato fluorescenční metoda slouží ke stanovení celkového množství a aktivity reaktivních forem kyslíku (ROS-„reactive oxygen species“) a dusíku (RNS-„reactive nitrogen species“). Principem je oxidace nefluoreskujícího DCFH („2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate“) v přítomnosti ROS/RNS za vzniku fluoreskujícího DCF („2', 7'-dichlorodihydrofluorescein“) (Obr. 21). Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství ROS/RNS ve vzorku a to odpovídá míře oxidačního stresu buněk.



Obrázek 21 Schéma metody stanovení ROS/RNS (42)

3.7.2 Postup práce

Buňky byly sklizeny stejným postupem jako pro *průtokovou cytometrii*.

Pelet buněk byl rozsuspendován v poměru $1-2 \cdot 10^7$ buněk / ml v PBS a sonikován na ledu. Po centrifugaci 10 000 g /5 minut byl supernatant přenesen do nové eppendorfky, koncentrace proteinů ve vzorcích byla změřena metodou dle Bradfordové (*viz Kapitola 3.5 SDS-PAGE a western blotting*) a vzorky byly naředěny PBS na stejnou koncentraci.

Do každé jamky černé mikrotitrační desky určené pro měření fluorescence bylo pipetováno 50 μ l vzorku a 50 μ l katalyzátoru (*složení v Příloze 1*), směs byla promíchána a ponechána inkubovat 5 minut při RT. Poté bylo přidáno 100 μ l roztoku DCFH (*složení v Příloze 1*) a vzorky byly inkubovány 15-45 minut ve tmě při RT. Intenzita fluorescence byla změřena na přístroji Tecan Infinite M1000 PRO (Tecan, Švýcarsko), excitace při 480 nm a emise při 530 nm.

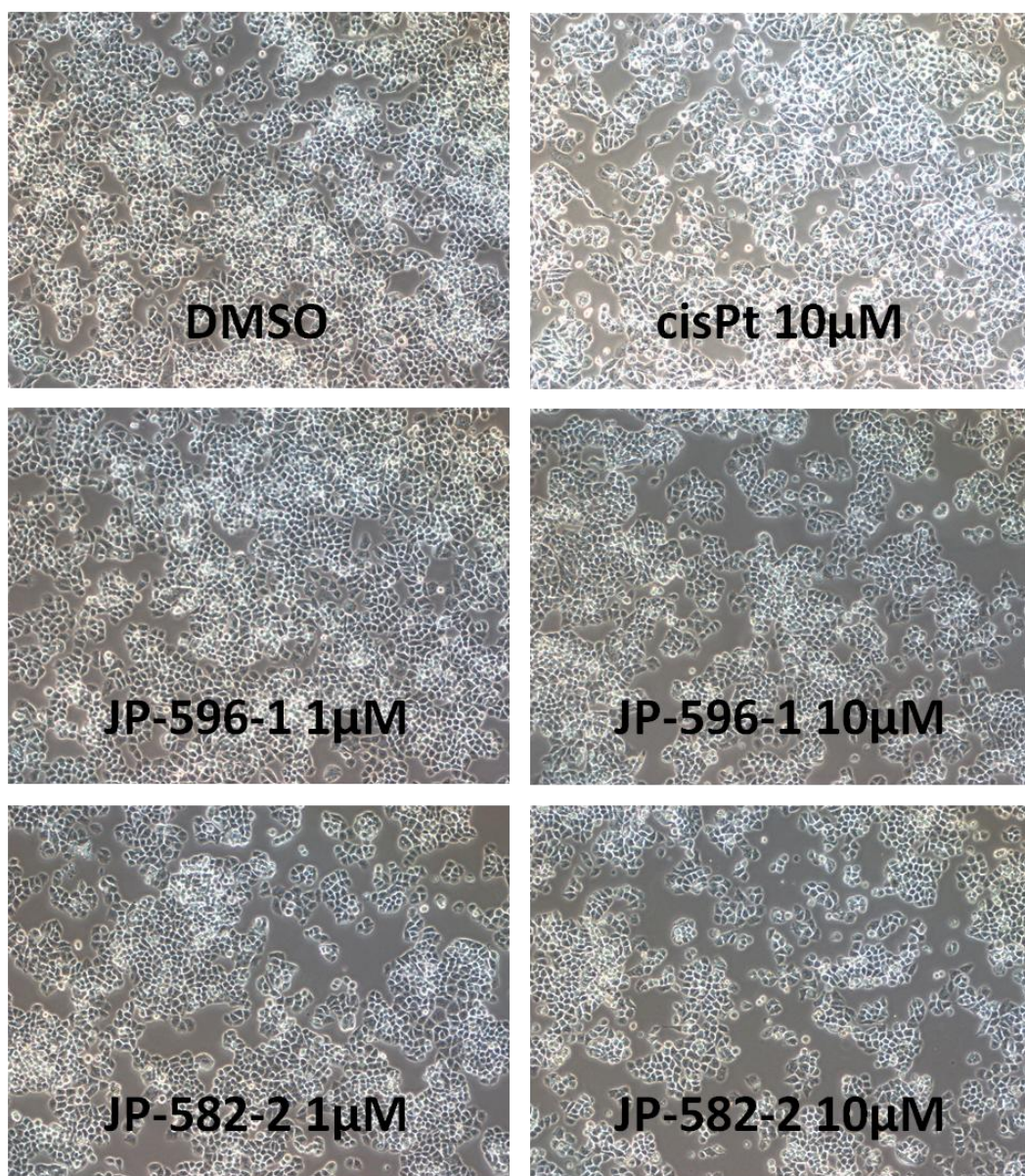
4 Výsledky

4.1 Pozorování účinků testovaných látek na buněčné linie pomocí světelného mikroskopu

Buňky A2780, A2780cis a SKOV3 byly vysety na 6-jamkovou destičku, po 24 hodinách byly přidány testované látky v koncentracích 1 a 10 μM a cisplatina v koncentraci 10 μM . Jako negativní kontrola byl použit DMSO v množství odpovídajícím 10 μM koncentraci testovaných látek. Po 24 hodinách byly buňky pozorovány pomocí světelného mikroskopu (Nikon, Japonsko).

Buněčná linie A2780

U buněk karcinomu ovaria linie A2780 byl zaznamenán menší nárůst buněk po působení cisplatiny, derivátu titanocenu (JP-596-1) i derivátu ferrocenu (JP-582-2) ve srovnání s kontrolou (DMSO) (Obr. 22). Největší účinek vykazoval derivát ferrocenu, který výrazně snížil konfluenci buněk (pokrytí dna jamek buňkami) už v koncentraci 1 μM . Účinek derivátu titanocenu byl pozorovatelný až v koncentraci 10 μM . Po 24 hodinách od přidání látek nebyly zaznamenány žádné výrazné morfologické změny buněk.

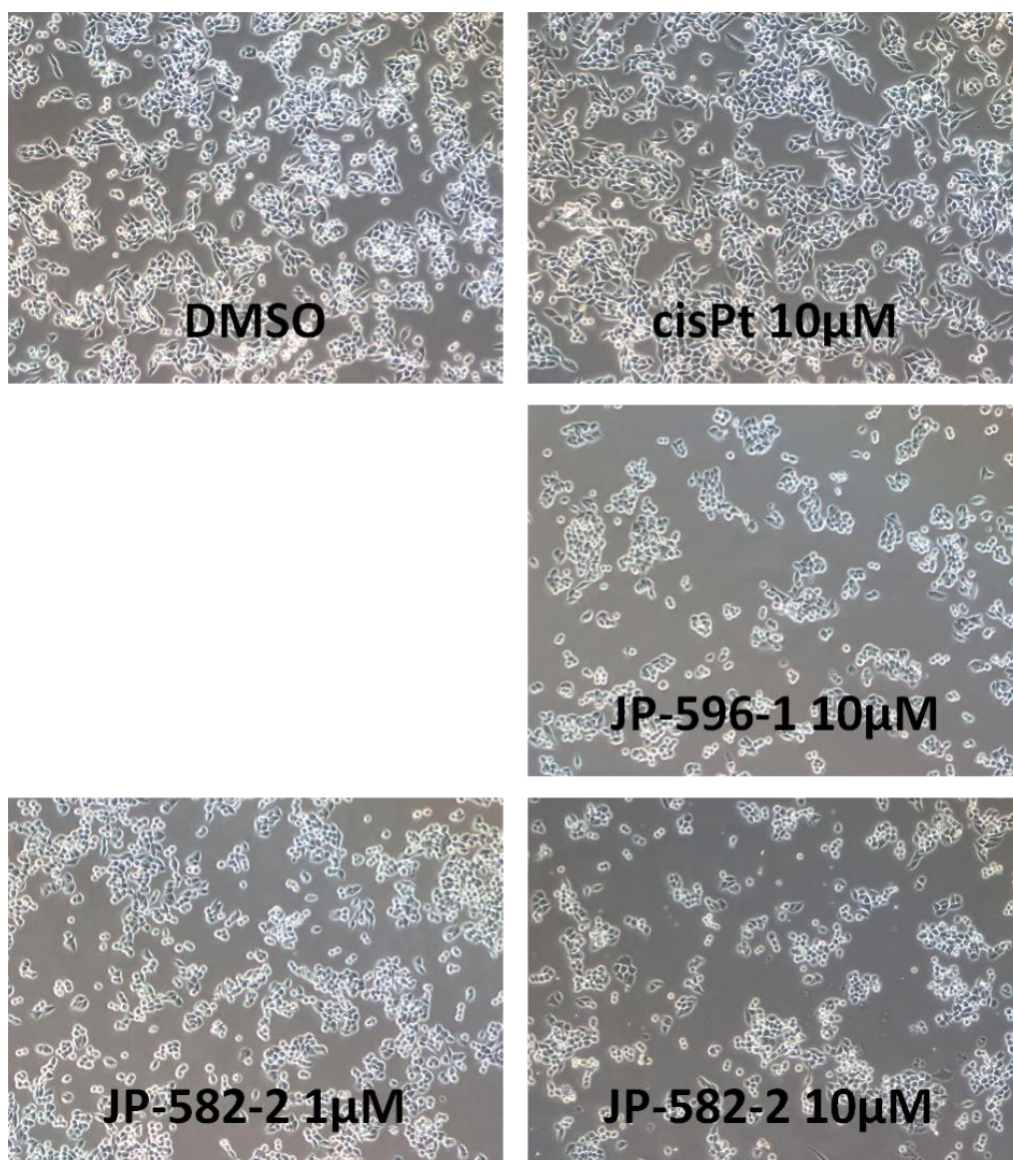


Obrázek 22 Buňky A2780 po 24 hodinách působení testovaných látek v koncentracích 1 a 10 μM a 10 μM cisplatiny

Použité zvětšení: 100x, cisPt=cisplatina, JP-596-1= derivát titanocenu, JP-582-2= derivát ferrocenu

Buněčná linie A2780cis

Účinkem cisplatiny se počet buněk A2780cis ve srovnání s kontrolou (DMSO) výrazně nezměnil, což souhlasí s předpokladem rezistence této linie k cisplatině (Obr. 23). Po působení derivátů ferrocenu a titanocenu byl naopak pozorován výrazně nižší počet buněk ve srovnání s kontrolou. Nebyla zaznamenána výrazná změna morfologie buněk, účinkem testovaných látek došlo k částečné změně tvaru buněk z vřetenovitého na kulovitý, což může souviset se sníženou adhezí buněk následkem cytotoxického účinku použitých látek.

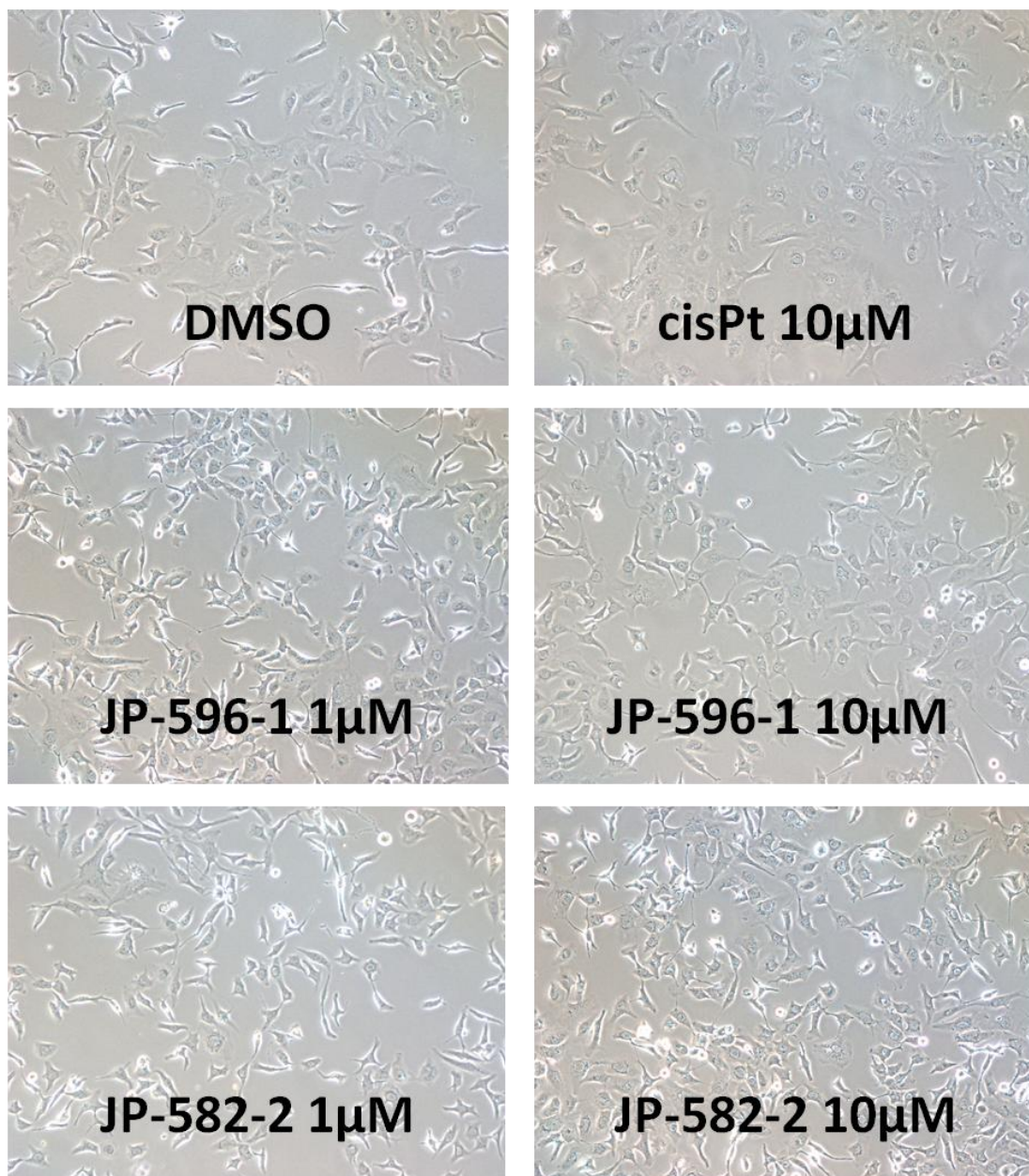


Obrázek 23 Buňky A2780cis po 24 hodinách působení testovaných látek v koncentracích 1 a 10 µM a 10µM cisplatiny

Použité zvětšení: 100x, cisPt=cisplatin, JP-596-1= derivát titanocenu, JP-582-2= derivát ferrocenu

Buněčná linie SKOV-3

Buňky SKOV-3 nebyly 10 μM cisplatinou výrazně ovlivněny, což souhlasí se známou přirozenou rezistencí těchto buněk k cisplatině (Obr. 24). Účinkem derivátů titanocenu a ferrocenu došlo k nárůstu počtu plovoucích buněk, výraznější pokles počtu přisedlých buněk byl zaznamenán pouze po působení 10 μM derivátu ferrocenu (JP-582-2). Nebyla pozorována výrazná změna buněčné morfologie.



Obrázek 24 Buňky SKOV-3 po 24 hodinách působení testovaných látek v koncentracích 1 a 10 μM a 10 μM cisplatinu

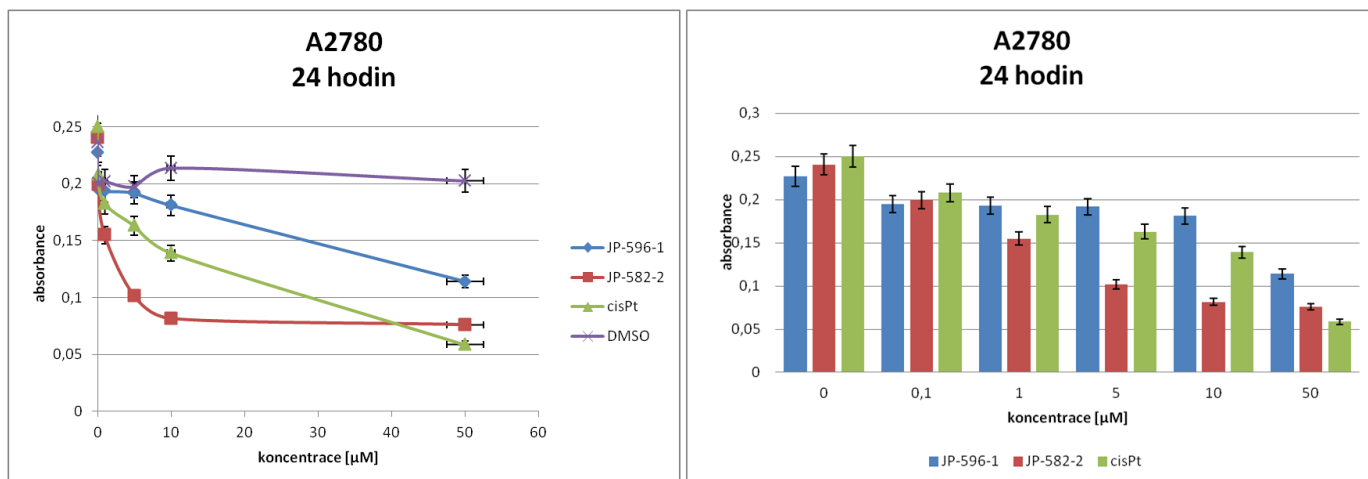
Použité zvětšení: 100x, cisPt=cisplatinu, JP-596-1= derivát titanocenu, JP-582-2= derivát ferrocenu

4.2 Stanovení cytotoxicity pomocí testu MTT

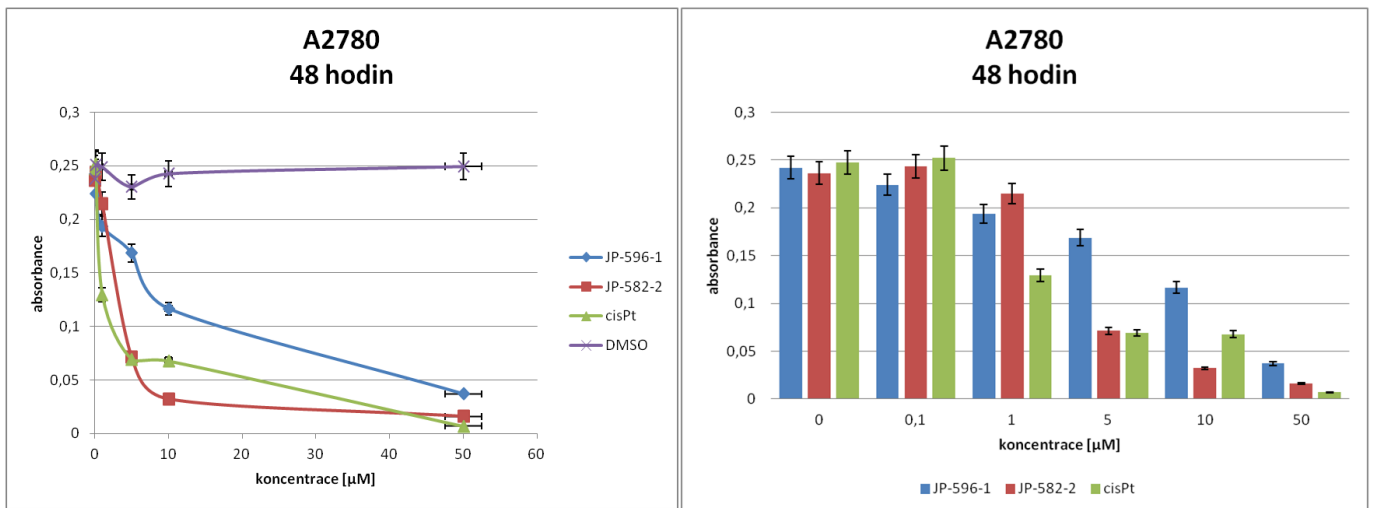
Cytotoxicita organokovových sloučenin byla stanovena pomocí MTT testu, jehož podstatou je přeměna MTT účinkem mitochondriálních enzymů na fialový formazan. Stanovená mitochondriální aktivita je obvykle úměrná počtu živých buněk. Buňky byly vysety na 96-jamkovou desku v kvadruplikátech (čtyřnásobném opakování), po 24 hodinách k nim byly přidány různé koncentrace testovaných látek, cisplatiny (pozitivní kontrola) a DMSO (negativní kontrola) na dobu 24 nebo 48 hodin. Poté byl k buňkám přidán roztok MTT soli a po inkubaci a rozpuštění krystalů formazanu v DMSO byla změřena absorbance při 595 nm. Změřená absorbance je přímo úměrná počtu živých buněk (viabilitě buněk).

Buněčná linie A2780

U buněčné linie A2780 byl zaznamenán vysoký cytotoxický účinek ferrocenového derivátu, který se projevil výrazným poklesem absorbance už po působení nízkých koncentrací této látky (1 μM po 24 hodinách působení). Derivát titanocenu vykazoval mnohem nižší cytotoxicitu, a to i ve srovnání s cisplatinou (Obr. 25). Po 48 hodinách byl účinek ferrocenového derivátu srovnatelný s cisplatinou (Obr. 26). Výraznější rozdíl v účinnosti po 24 hodinách než po 48 hodinách působení je patrně způsoben rychlejším nástupem účinku ferrocenového derivátu.



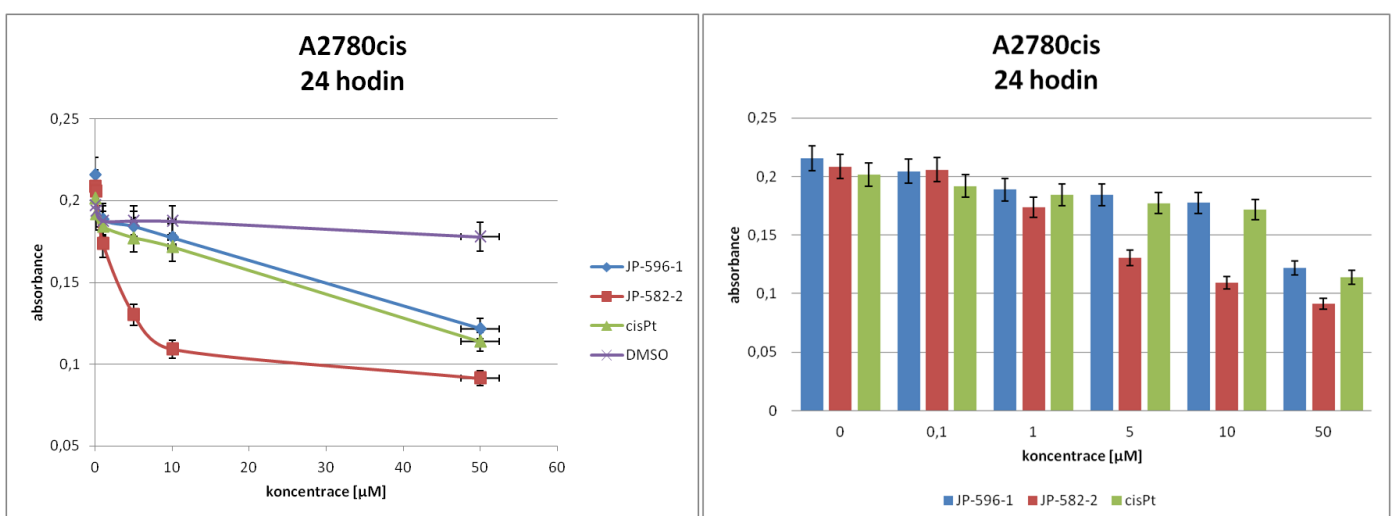
Obrázek 25 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatiny ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780 po 24 hodinách



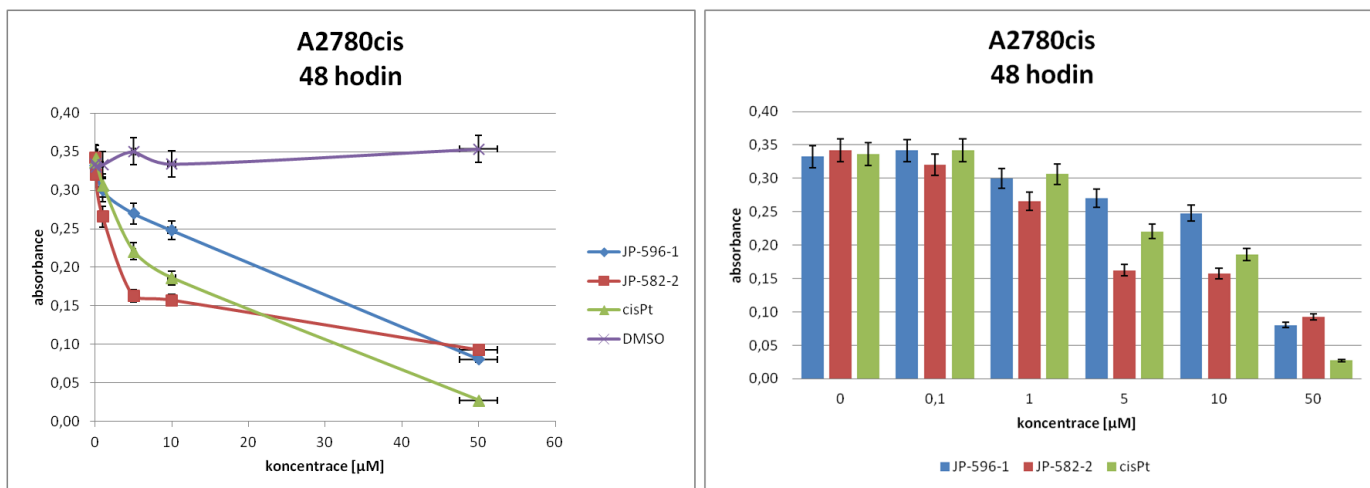
Obrázek 26 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatiny ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780 po 48 hodinách

Buněčná linie A2780cis

U buněk A2780cis, které jsou rezistentní k cisplatině, byl zaznamenán výrazně vyšší cytotoxický účinek látky JP-582-2 (derivát ferrocenu) ve srovnání s cisplatinou. Po 24 hodinách byl opět rozdíl v účinnosti větší než po 48 hodinách, nejvýraznější byl u koncentrací 5 μM a 10 μM. Derivát titanocenu i cisplatinu byly pro buňky A2780cis toxické až ve vysokých koncentracích, což potvrzuje rezistenci těchto buněk vůči cisplatině (Obr. 27, 28).



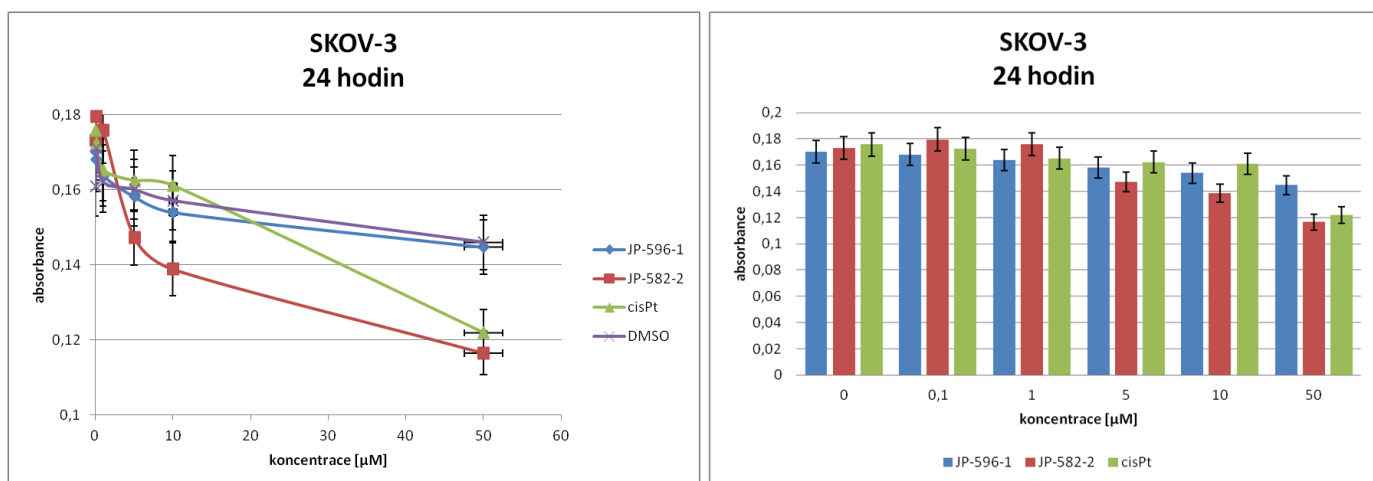
Obrázek 27 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatiny ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780cis po 24 hodinách



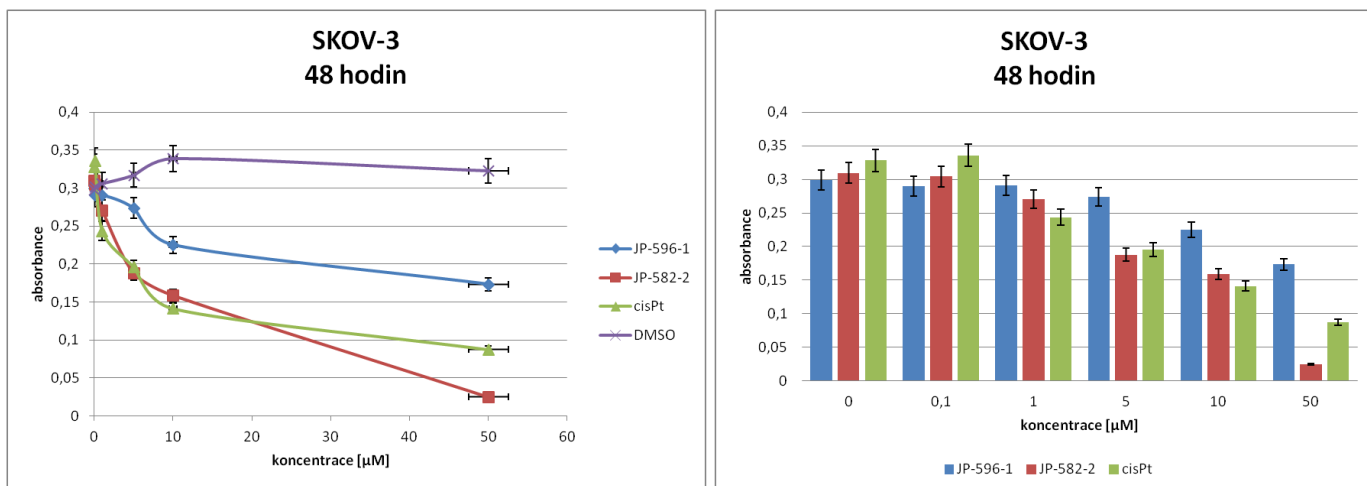
Obrázek 28 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatiny ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780cis po 48 hodinách

Buněčná linie SKOV-3

Buňky SKOV-3 vykazovaly celkově nižší citlivost k účinku testovaných látek i cisplatiny. Po 24 hodinách byl zaznamenán opět rychlejší nástup účinku ferrocenového derivátu ve srovnání s cisplatinou při koncentracích 5 µM a 10 µM. Cisplatin a titanocenový derivát byly pro buňky SKOV-3 toxické až při vysokých koncentracích, což je způsobeno přirozenou rezistencí těchto buněk k cisplatině (Obr. 29, 30).

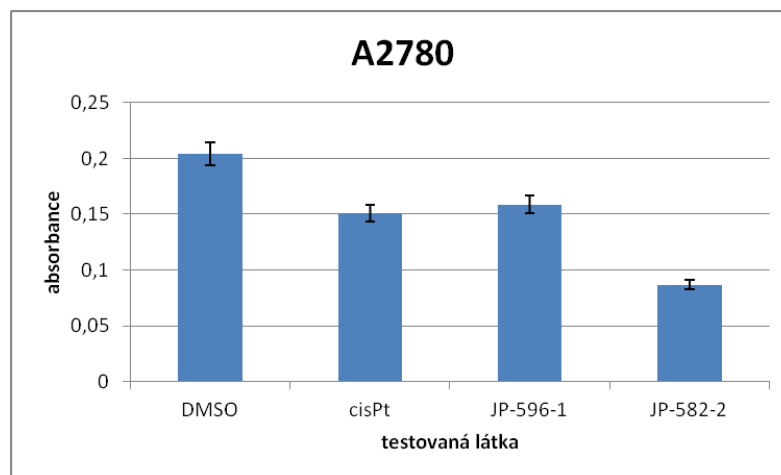


Obrázek 29 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatiny ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky SKOV-3 po 24 hodinách

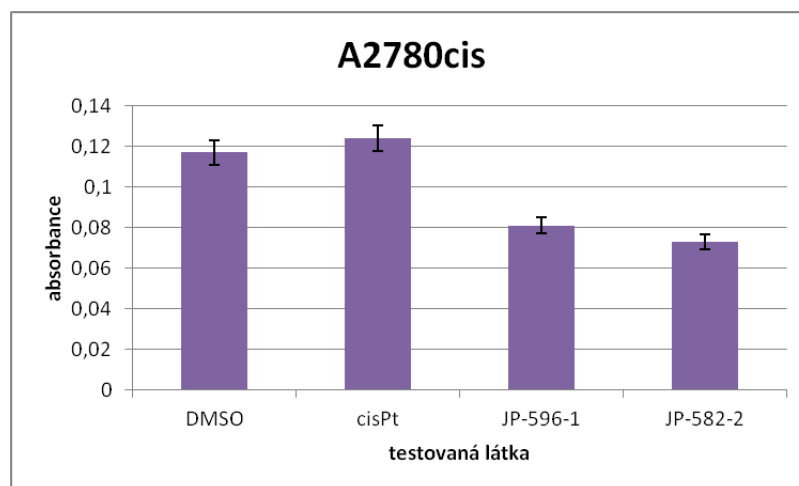


Obrázek 30 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatiny ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky SKOV-3 po 48 hodinách

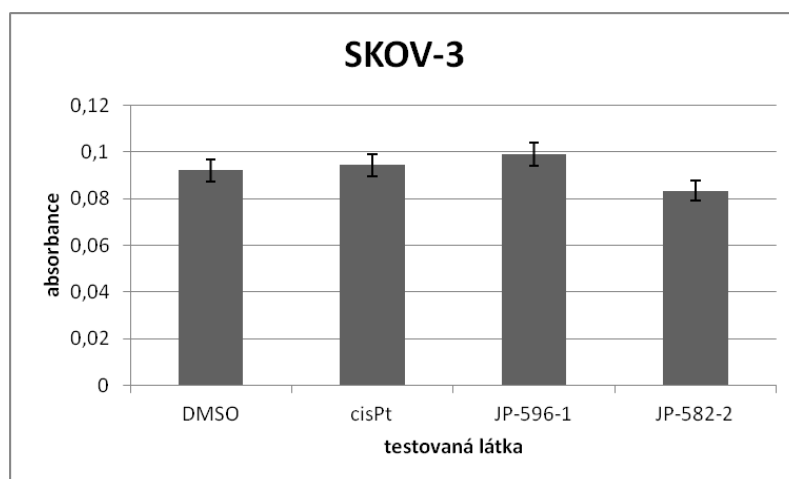
Na základě výsledků testů cytotoxicity byla pro další experimenty zvolena koncentrace látek 10 μM . Cytotoxicita testovaných látek v této koncentraci ve srovnání s cisplatinou a DMSO byla potvrzena dalšími testy (Obr. 31, 32, 33). Nejvýraznější cytotoxický účinek vykazoval opět derivát ferrocenu, zvláště u linií rezistentních k cisplatině.



Obrázek 31 Grafické znázornění cytotoxického účinku testovaných látek a cisplatiny v koncentraci 10 μM ve srovnání s DMSO na buňky A2780 po 24 hodinách



Obrázek 32 Grafické znázornění cytotoxického účinku testovaných látek a cisplatiny v koncentraci 10 μ M ve srovnání s DMSO na buňky A2780cis po 24 hodinách



Obrázek 33 Grafické znázornění cytotoxického účinku testovaných látek a cisplatiny v koncentraci 10 μ M ve srovnání s DMSO na buňky SKOV-3 po 24 hodinách

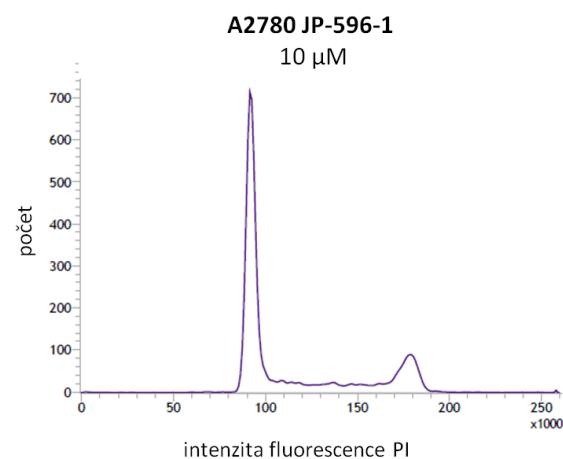
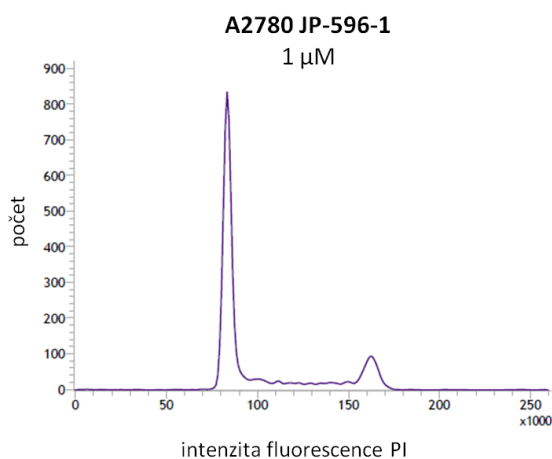
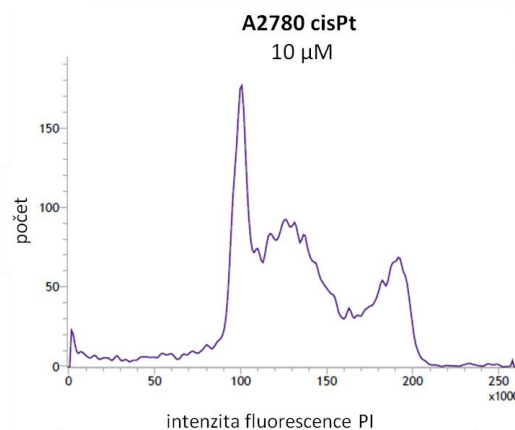
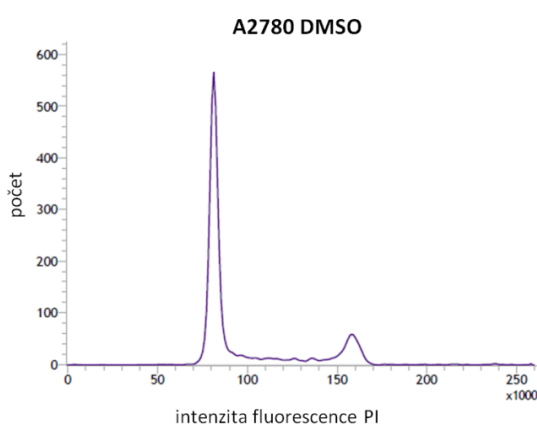
4.3 Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií

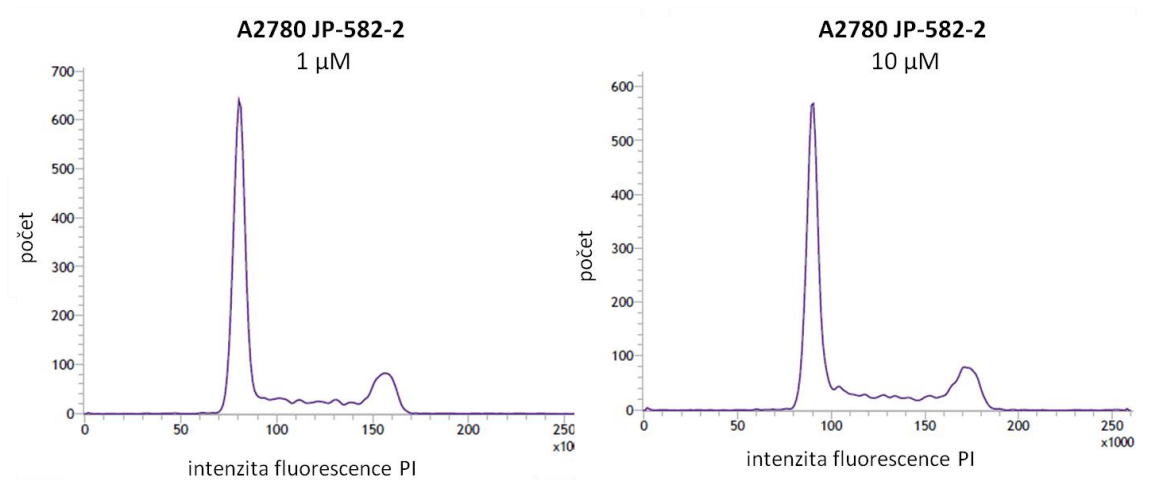
Mnohá chemoterapeutika (včetně cisplatiny) ovlivňují průběh buněčného cyklu, proto byla využita metoda průtokové cytometrie umožňující studium vlivu zkoumaných látek na regulaci buněčného cyklu a morfologii nádorových buněk.

K buňkám A2780, A2780cis a SKOV3 byly přidány testované látky v různých koncentracích na dobu 24 hodin. DNA v buňkách byla obarvena propidium jodidem (PI) a fluorescence byla změřena na průtokovém cytometru BD FACSVersTM (BD Biosciences, USA).

Buněčná linie A2780

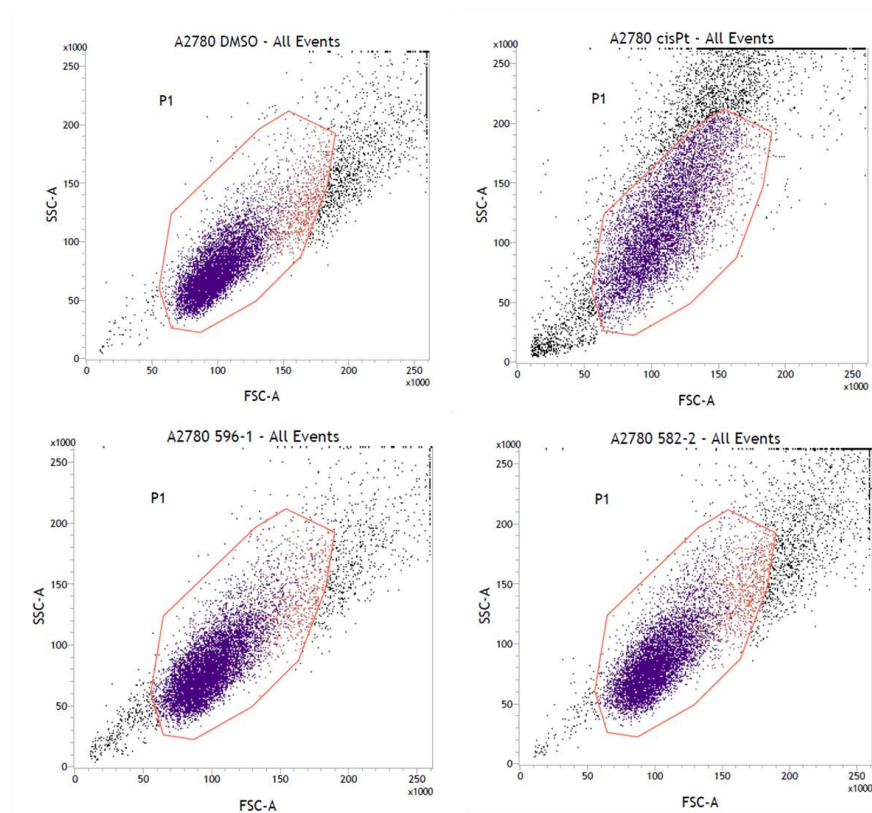
Po přidání DMSO, které bylo použito jako negativní kontrola, byl u buněk A2780 pozorován typický průběh buněčného cyklu, který je vyjádřen histogramem na Obr. 34, jehož vrcholy odpovídají různým fázím buněčného cyklu. První vrchol křivky („peak“) značí počet buněk v G₁-fázi, druhý vrchol vyjadřuje buněčnou populaci v G₂/M-fázi. 24 hodin po přidání cisplatiny v koncentraci 10 μM bylo pozorováno narušení průběhu buněčného cyklu a zvýšený počet apoptotických tělísek v sub-G₁ populaci (Obr. 34). Na základě analýzy přímého a bočního rozptylu („forward scatter, side scatter“) bylo zjištěno, že cisplatina má vliv i na morfologii buněk a způsobuje zvýšení granularity a celkové velikosti buněk (Obr. 35). Na rozdíl od cisplatiny neměl derivát titanocenu (JP-596-1) ani derivát ferrocenu (JP-582-2) žádný vliv na průběh buněčného cyklu ani na morfologii buněk 24 hodin po přidání látek (Obr. 34, 35).





Obrázek 34 Histogramy vyjadřující průběh buněčného cyklu buněk A2780 24 hodin po přidání testovaných látek, cisplatiny nebo DMSO (negativní kontrola)

Hodnoty na ose x odpovídají intenzitě fluorescence PI a tedy obsahu DNA, hodnoty na ose y odpovídají počtu zaznamenaných událostí a tedy i počtu buněk.

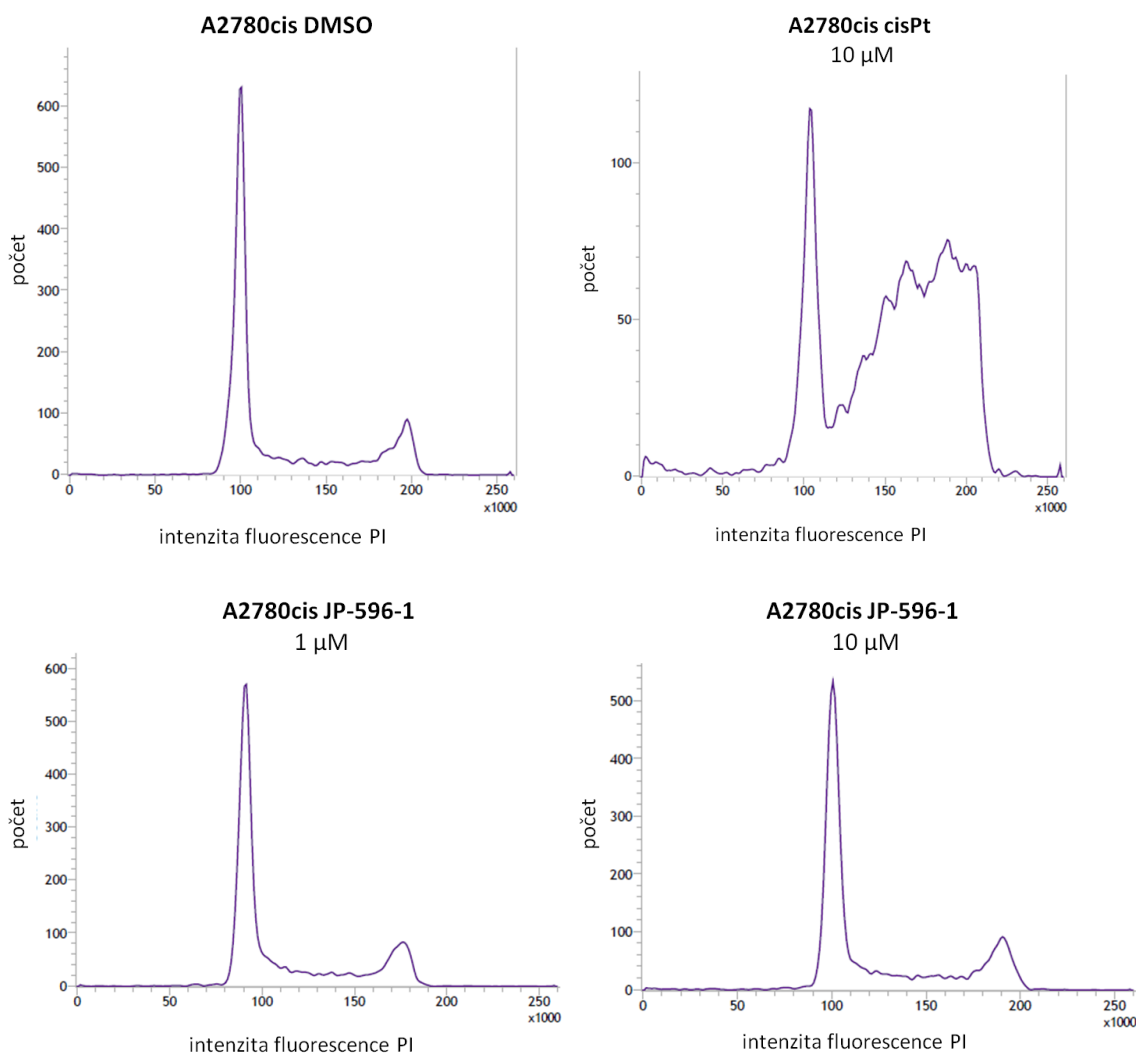


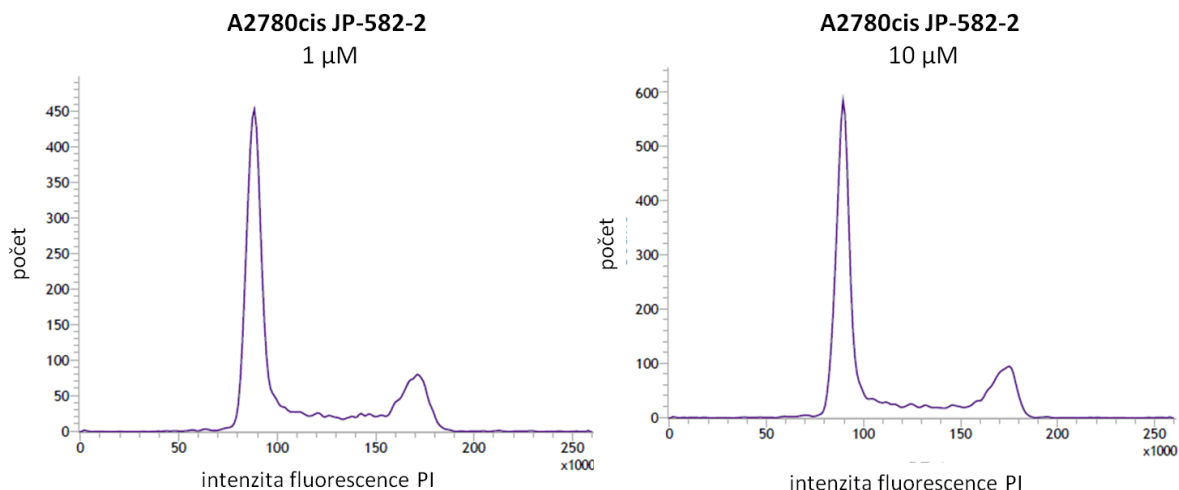
Obrázek 35 Bodový graf („dot plot“) vyjadřující velikost a granularitu buněk A2780 po působení testovaných látek a cisplatiny (koncentrace 10 μM) a DMSO

FSC-A = „forward scatter“, přímý rozptyl, závisí na velikosti buněk; SSC-A = „side scatter“, boční rozptyl, závisí na granularitě buněk

Buněčná linie A2780cis

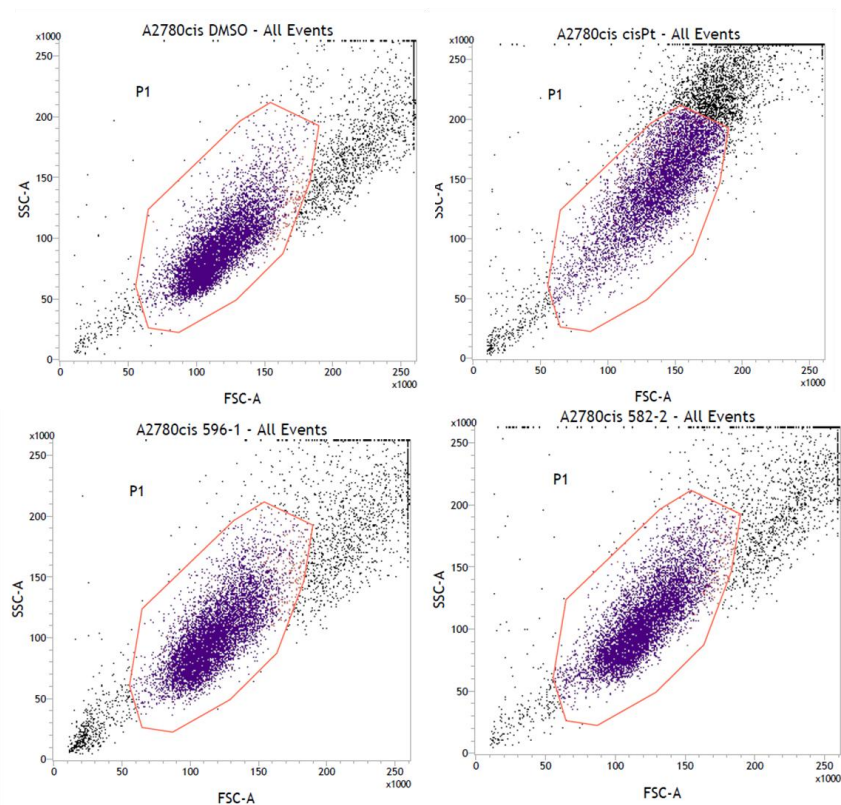
U buněk A2780cis došlo také po přidání cisplatiny k narušení buněčného cyklu a přítomnosti apoptotických tělísek v sub-G₁ populaci. Na rozdíl od buněk A2780 došlo k výraznému nárůstu počtu buněk v G₂/M-fázi (Obr. 36). Cisplatina u těchto buněk také způsobila změnu morfologie, většina buněk měla ve srovnání s kontrolní populací větší velikost i granularitu (Obr. 37). Po působení derivátu titanocenu (JP-596-1) a derivátu ferrocenu (JP-582-2) nebyly pozorovány výrazné změny v buněčném cyklu ani v morfologii buněk (Obr. 36, 37).





Obrázek 36 Histogramy vyjadřující průběh buněčného cyklu buněk A2780cis 24 hodin po přidání testovaných látek, cisplatiny nebo DMSO (negativní kontrola)

Hodnoty na ose x odpovídají intenzitě fluorescence PI a tedy obsahu DNA, hodnoty na ose y odpovídají počtu zaznamenaných událostí a tedy i počtu buněk.



Obrázek 37 Bodový graf („dot plot“) vyjadřující velikost a granularitu buněk A2780cis po působení testovaných látek a cisplatiny (koncentrace 10 μM) a DMSO

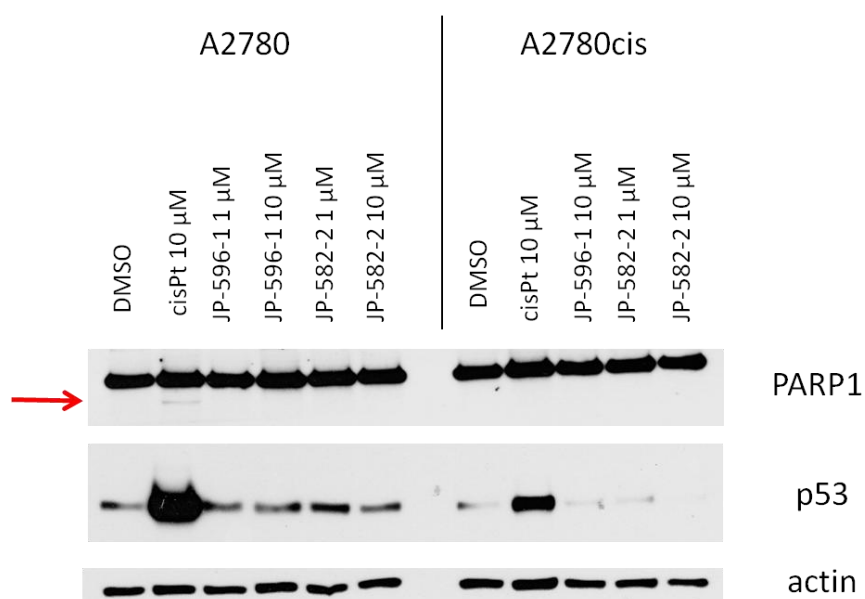
FSC-A = „forward scatter“, přímý rozptyl, závisí na velikosti buněk; SSC-A = „side scatter“, boční rozptyl, závisí na granularitě buněk

4.4 Detekce změn hladiny proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu a apoptózy

Detekce proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu a procesu apoptózy byla provedena pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) ve spojení s western blottingem. Buňky byly inkubovány s testovanými látkami v různých koncentracích po dobu 24 hodin. Jako negativní kontrola byl použit dimethylsulfoxid a jako pozitivní kontrola cisplatina. V jednotlivých vzorcích byla změřena koncentrace celkového proteinu a vzorky byly následně naředěny na shodnou koncentraci. Pro ověření, že v jednotlivých vzorcích je skutečně stejné množství celkového proteinu, byla využita detekce aktinu. Aktin je cytoskeletální protein, jehož hladina v buňkách by se účinkem použitých látek neměla měnit.

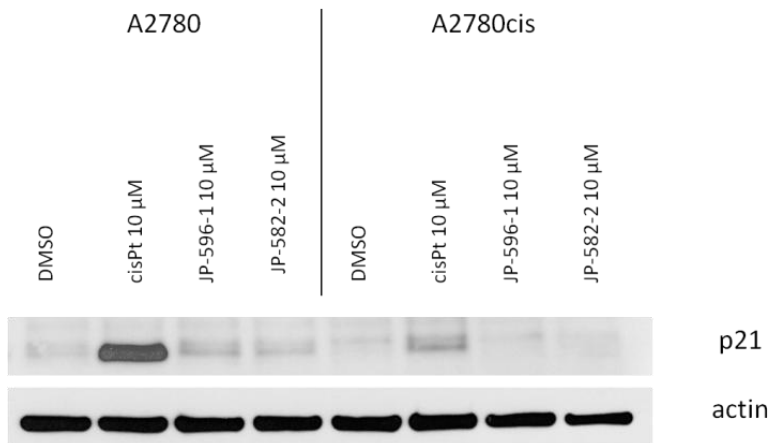
Pro zjištění, jak buňky reagují na působení testovaných látek, byla jako první zvolena detekce exprese proteinu **p53**. U buněk A2780 i A2780cis, bylo pozorováno výrazné zvýšení hladiny tohoto proteinu po působení cisplatiny. Derivát titanocenu (JP-596-1) ani derivát ferrocenu (JP-582-2) neměl na expresi proteinu p53 výrazný vliv (Obr. 38). U buněk SKOV-3 nebyl protein p53 detekován, protože obsahují mutaci v genu *TP53*, která má za následek ztrátu exprese tohoto proteinu.

Pro zjištění indukce apoptózy působením testovaných látek byla zvolena detekce štěpení proteinu **PARP** na fragmenty o molekulové hmotnosti 113 a 89 kDa. Toto štěpení bylo opět zaznamenáno pouze po působení cisplatiny (červená šipka, Obr. 38). Po působení derivátu titanocenu ani derivátu ferrocenu nedošlo ke štěpení PARP.



Obrázek 38 Detekce proteinů PARP1 a p53 u buněk linie A2780 a A2780cis
Šipka označuje fragment vzniklý štěpením proteinu PARP.
cisPt = cisplatina, JP-596-1 = derivát titanocenu, JP-582-2 = derivát ferrocenu

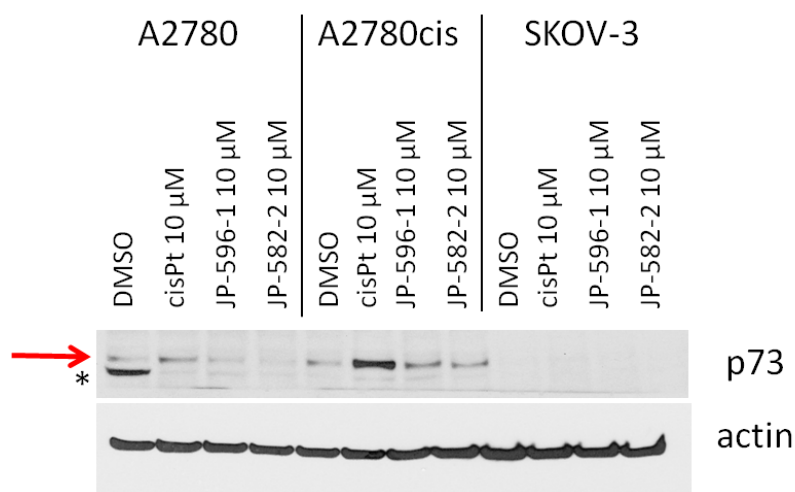
Podobný výsledek měla detekce hladiny proteinu **p21** (regulátor buněčného cyklu), jehož exprese je indukována proteinem p53. Podle předpokladů byla hladina tohoto proteinu zvýšena po působení cisplatiny (Obr. 39).



Obrázek 39 Detekce proteinu p21 u buněk linie A2780 a A2780cis

cisPt = cisplatin, JP-596-1 = derivát titanocenu, JP-582-2 = derivát ferrocenu

Ve všech třech buněčných liniích byla provedena detekce dalšího proapoptického proteinu **p73**. Výrazné zvýšení hladiny p73 bylo pozorováno u buněk A2780cis po působení cisplatiny. Derivát titanocenu a derivát ferrocenu neměl na expresi p73 téměř vliv. U buněk A2780 došlo po cisplatině pouze k mírnému nárůstu množství p73. U buněčné linie SKOV-3 nebyl protein p73 detekován (Obr. 40).

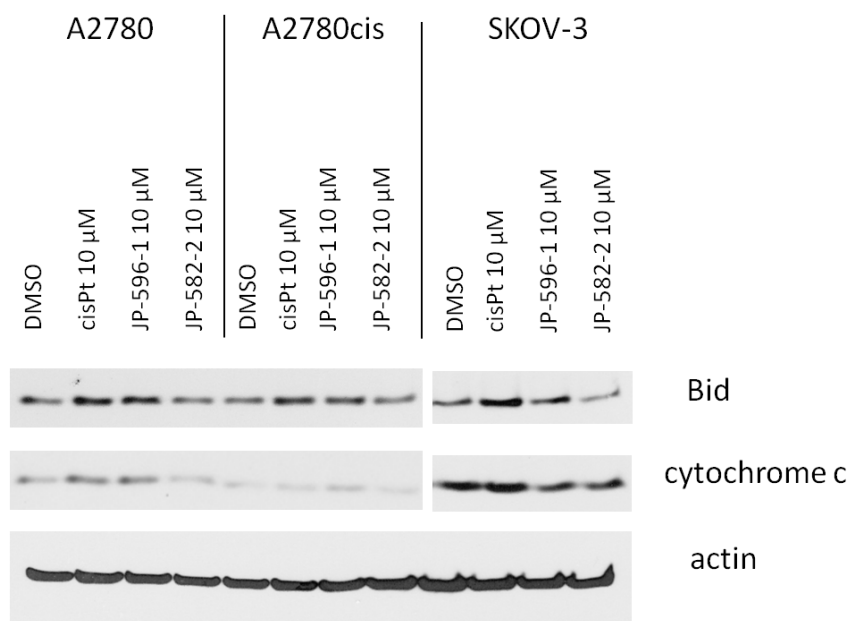


Obrázek 40 Detekce proteinu p73 u buněk linie A2780, A2780cis a SKOV-3

Šipka označuje protein p73, hvězdička nespecifický pruh.

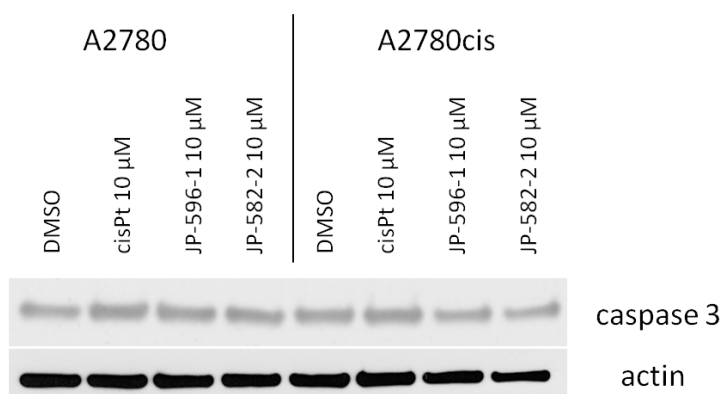
cisPt = cisplatin, JP-596-1 = derivát titanocenu, JP-582-2 = derivát ferrocenu

Dále byla také sledována přítomnost proapoptotických proteinů zapojených v různých fázích apoptózy. U buněčných linií A2780 a A2780cis bylo dále zaznamenáno mírné zvýšení hladiny proapoptotických proteinů **Bid** a **cytochromu c** po působení derivátu titanocenu a cisplatiny. U linie SKOV-3 došlo k mírnému nárůstu exprese těchto proteinů pouze po působení cisplatiny (Obr. 41). Štěpení **kaspázy 3**, které je spojeno s průběhem apoptózy nebylo pozorováno po působení žádné z použitých látek (Obr. 42).



Obrázek 41 Detekce proteinů Bid a cytochromu c u buněk linie A2780, A2780cis a SKOV-3

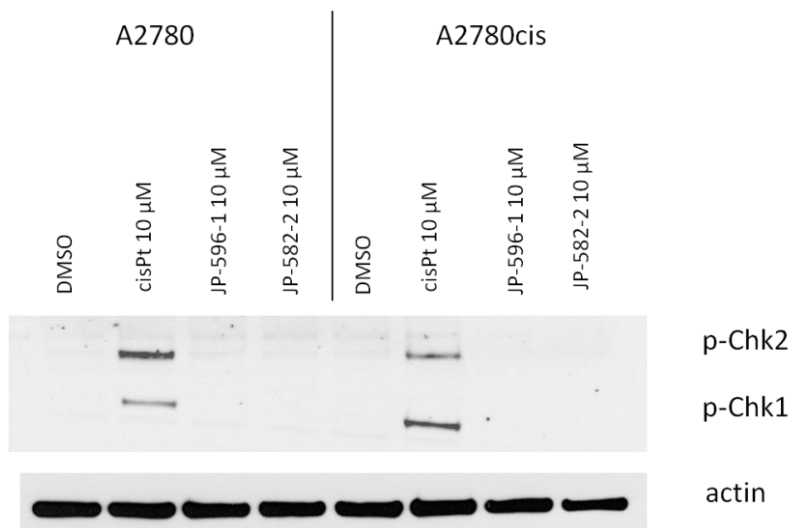
cisPt = cisplatina, JP-596-1 = derivát titanocenu, JP-582-2 = derivát ferrocenu



Obrázek 42 Detekce kaspázy 3 u buněk linie A2780 a A2780cis

cisPt = cisplatina, JP-596-1 = derivát titanocenu, JP-582-2 = derivát ferrocenu

Zvýšení hladiny aktivované fosforylované formy checkpoint kináz 1 a 2 (p-Chk 1 a 2), které se podílí na regulaci buněčného cyklu, bylo detekováno po působení cisplatinu u buněk A2780 i A2780cis (Obr. 43). U linie A2780 byla zaznamenána vyšší hladina p-Chk 2 ve srovnání s p-Chk 1, u linie A2780cis byl poměr opačný. Derivát titanocenu ani derivát ferrocenu nezvyšoval hladinu těchto regulačních proteinů.



Obrázek 43 Detekce fosforylované formy checkpoint kinázy 1 a 2 u buněk linie A2780 a A2780cis

cisPt = cisplatin, JP-596-1 = derivát titanocenu, JP-582-2 = derivát ferrocenu

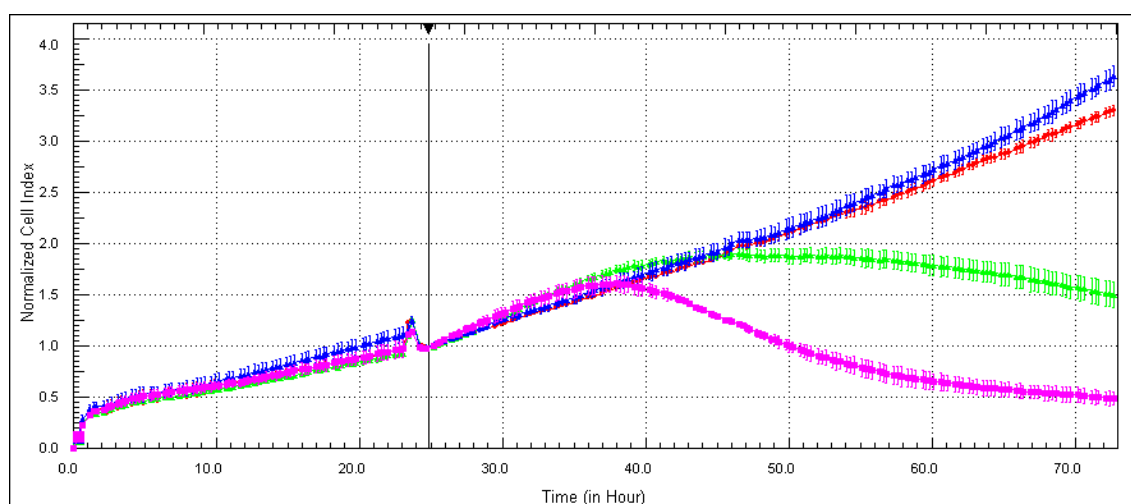
4.5 Měření buněčné proliferace v reálném čase

Vliv testovaných látek na proliferaci buněčných linií odvozených od karcinomu ovaria byl studován pomocí systému xCELLigence (ACEA Biosciences, USA).

Principem metody je měření impedance, která závisí na počtu buněk adherovaných k elektrodě na dně jamky. Je vyjádřena tzv. buněčným indexem, který roste s adhezí a proliferací buněk a naopak klesá, když buňky odumírají. Buňky byly kultivovány v 16-jamkových deskách (E-plate) 24 hodin. Následující den byly přidány testované látky, cisplatina jako pozitivní kontrola a DMSO jako negativní kontrola. Měření bylo provedeno v kvadruplikátech (čtyřnásobné opakování). Všechny látky byly testovány v koncentraci 10 μM , která byla vyhodnocena jako optimální na základě provedených testů cytotoxicity.

Pro měření proliferace byly použity tři buněčné linie – A2780 (Obr. 44) A2780cis (Obr. 45) a SKOV3 (Obr. 46).

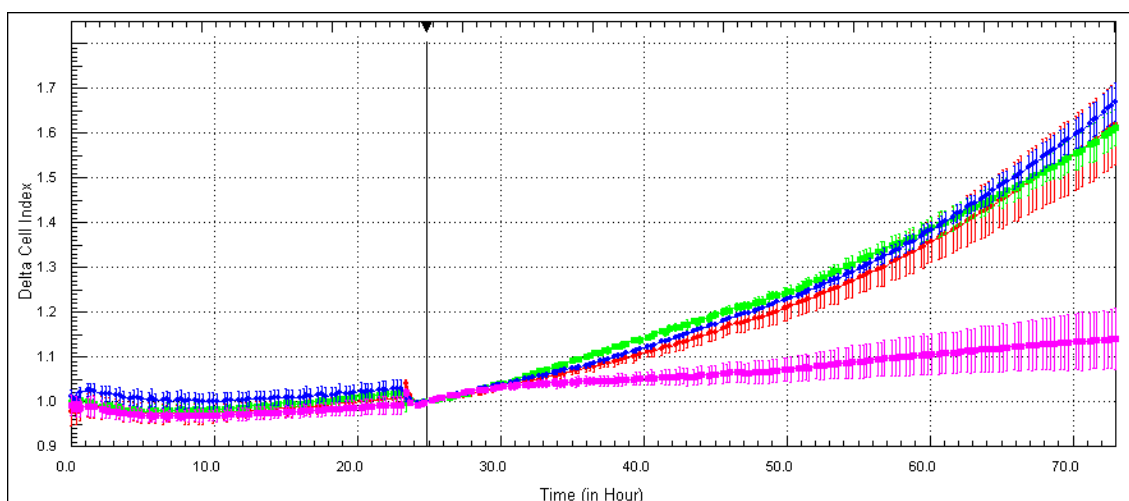
Buněčná linie A2780



Obrázek 44 Graf znázorňující proliferaci buněk A2780 ovlivněnou působením různých látek
Proliferační křivka po působení DMSO je vyznačena **červeně**, po cisplatině **zeleně**, JP-596-1 (derivát titanocenu) **modře** a JP-582-2 (derivát ferrocenu) **růžově**.

U buněk A2780 dochází účinkem cisplatiny a ferrocenového derivátu přibližně po 14 hodinách k poklesu buněčného indexu, který je způsoben zastavením proliferace a následným odumíráním buněk (Obr. 44). Derivát ferrocenu má ve srovnání s cisplatinou silnější účinek. Proliferační křivka negativní kontroly (DMSO) lineárně stoupá s časem. U titanocenového derivátu nebyl prokázán vliv na buněčnou proliferaci, křivka je srovnatelná s kontrolou.

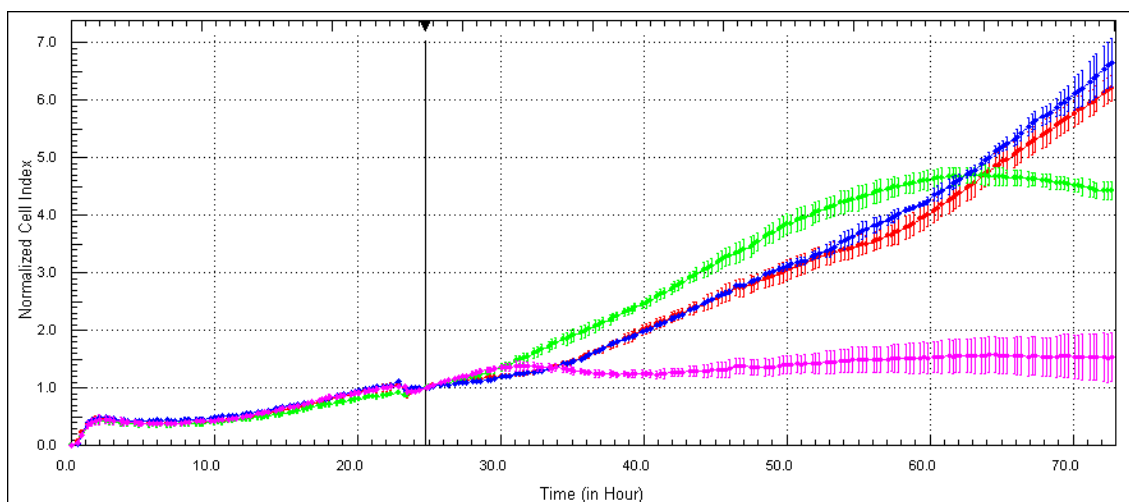
Buněčná linie A2780cis



Obrázek 45 Graf znázorňující proliferaci buněk A2780cis ovlivněnou působením různých látek
Proliferační křivka po působení DMSO je vyznačena **červeně**, po cisplatině **zeleně**, JP-596-1
(derivát titanocenu) **modře** a JP-582-2 (derivát ferrocenu) **růžově**.

Buňky A2780cis byly rezistentní k působení derivátu titanocenu i k cisplatině, vykazovaly však výraznou citlivost k derivátu ferrocenu (Obr. 45). Byla tím potvrzena rezistence této buněčné linie k cisplatině.

Buněčná linie SKOV-3



Obrázek 46 Graf znázorňující proliferaci buněk SKOV-3 ovlivněnou působením různých látek
Proliferační křivka po působení DMSO je vyznačena **červeně**, po cisplatině **zeleně**, JP-596-1
(derivát titanocenu) **modře** a JP-582-2 (derivát ferrocenu) **růžově**.

Buněčná linie SKOV-3 byla necitlivá k působení derivátu titanocenu, vykazovala však výraznou citlivost k účinkům derivátu ferrocenu (pokles buněčného indexu nastal už po 6 hodinách od přidání látky) (Obr. 46). Účinek cisplatinu byl ve srovnání

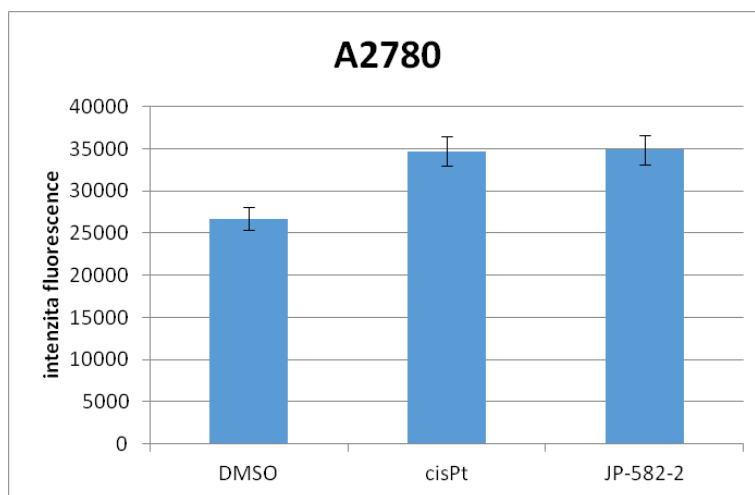
s derivátem ferrocenu (látka JP-582-2) jen velmi mírný a s pozdním nástupem (přibližně 34 hodin po přidání látky), což souhlasí se známou rezistencí těchto buněk k cisplatině.

4.6 Stanovení oxidačního stresu buněk

Z výsledků předchozích experimentů vyplynulo, že testované látky mají patrně jiný mechanismus účinku než cisplatin, která se váže na DNA. Je známo, že mnohá chemoterapeutika včetně cisplatin vyvolávají v buňkách oxidační stres, dalším krokem bylo proto měření oxidačního stresu buněk po působení testovaných látek pomocí fluorescenční metody (viz *Kapitola 3.7*). Principem této metody je detekce reaktivních forem kyslíku a dusíku v buněčném lyzátu. Buňky byly s testovanými látkami (derivát ferrocenu a cisplatin v koncentraci 10 μM) inkubovány po dobu 24 hodin, poté byly lyzovány a sonikovány v PBS. K buněčnému lyzátu byl přidán stabilizovaný roztok DCFH („2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate“), který se v přítomnosti ROS/RNS přeměňuje na fluoreskující DCF („2', 7'-dichlorodihydrofluorescein“). Intenzita fluorescence je proto přímo úměrná množství kyslíkových a dusíkových radikálů v lyzátu. Měření bylo provedeno v triplicátech na přístroji Tecan Infinite M1000 PRO (Tecan, Švýcarsko). Jako negativní kontrola byl použit dimethylsulfoxid (DMSO).

Buněčná linie A2780

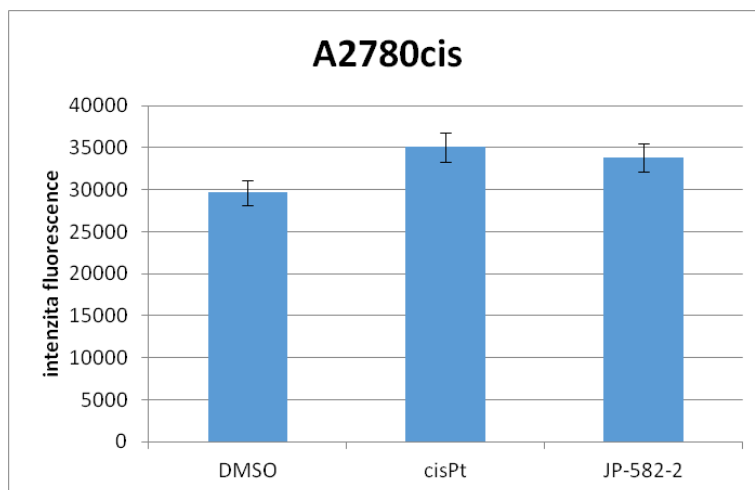
U buněk A2780 byl pozorován nárůst fluorescence a tedy i hladiny reaktivních forem kyslíku a dusíku po působení ferrocenového derivátu i cisplatin ve srovnání s DMSO (Obr. 47).



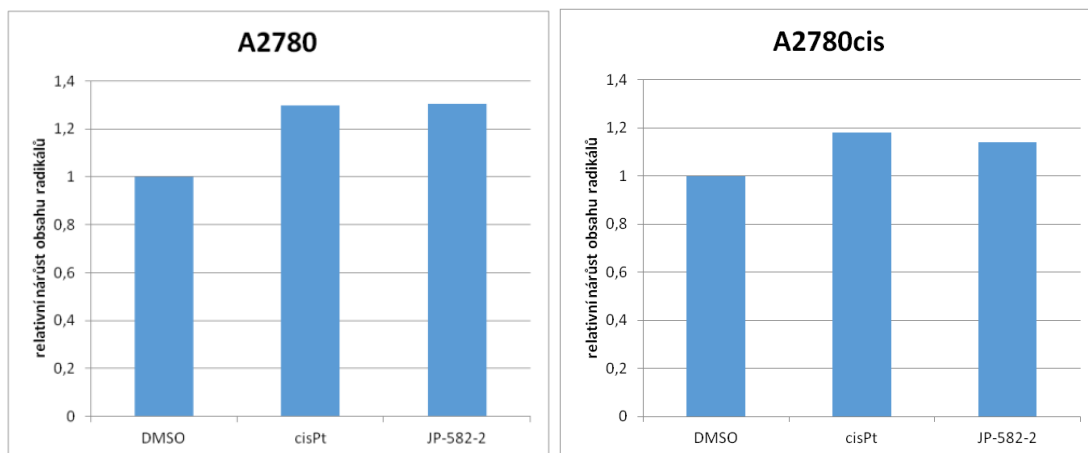
Obrázek 47 Graf vyjadřující intenzitu fluorescence, která je úměrná množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v lyzátu buněk A2780 24 hodin po přidání 10 μM derivátu ferrocenu a cisplatin

Buněčná linie A2780cis

Ke zvýšení množství ROS/RNS došlo po působení ferrocenového derivátu a cisplatiny i u buněk A2780cis (Obr. 48), celkový nárůst byl však ve srovnání s buňkami A2780 nižší (Obr. 49).



Obrázek 48 Graf vyjadřující intenzitu fluorescence, která je úměrná množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v lyzátu buněk A2780cis 24 hodin po přidání 10 μ M derivátu ferrocenu a cisplatiny



Obrázek 49 Graf vyjadřující relativní nárůst množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v lyzátu buněk A2780 a A2780cis oproti negativní kontrole (DMSO) 24 hodin po přidání 10 μ M derivátu ferrocenu a cisplatiny

5 Diskuze

Cílem této práce bylo stanovit cytotoxicitu nově syntetizovaných derivátů ferrocenu a titanocenu a určit mechanismus jejich účinku na nádorové buňky.

Jako modelová látka a pozitivní kontrola byla použita cisplatina, jejíž široké využití v protinádorové chemoterapii ji řadí k nejvýznamnějším cytostatikům současnosti. Její použití je však limitováno postupným vznikem rezistence nádorových buněk k jejímu působení a velkým množstvím nežádoucích účinků.^{9, 12, 24, 25, 28, 32, 33} Vznik rezistence nádorových buněk k cytostatiku významně snižuje úspěšnost léčby, vede ke zhoršení fyzického i psychického stavu nemocného a zvyšování nákladů na léčbu. Cílem současného výzkumu je proto nalezení nových látek, které by umožnily u pacientů překonat rezistenci (nejen) k cisplatině, měly nižší toxicitu pro lidský organismus a umožňovaly i léčbu těch typů nádorů, pro které je cisplatina neúčinná.

K testování účinku zkoumaných látek byly vybrány buněčné linie odvozené od karcinomu ovaria, protože u tohoto typu nádorového onemocnění jsou platinové deriváty standardní součástí léčby²⁴ a vznik rezistence nádorových buněk je zásadním problémem. Z tohoto důvodu jsou k dispozici i buněčné linie se získanou rezistencí k cisplatině, které slouží jako modely pro studium mechanismů rezistence. V této práci byla použita buněčná linie A2780, která je citlivá vůči cisplatině a dvě rezistentní linie, A2780cis a SKOV-3. Buňky A2780cis mají získanou rezistenci k cisplatině, vznikly totiž postupnou selekcí cisplatinou z mateřské linie A2780. Buňky SKOV-3 jsou přirozeně rezistentní k cisplatině.

Stanovení cytotoxicity derivátů ferrocenu a titanocenu

Pro primární zjištění cytotoxického účinku testovaných látek byl zvolen test cytotoxicity s použitím soli MTT a zároveň byly pod mikroskopem sledovány změny morfologie a růstu buněk. V testu MTT vykazoval nejvyšší cytotoxicitu derivát ferrocenu a to i ve srovnání s cisplatinou. Cytotoxický účinek byl u této látky pozorován již při nízkých koncentracích a dokonce u všech buněčných linií, včetně buněk rezistentních k cisplatině. Příčinou překonání rezistence by proto mohl být odlišný mechanismus účinku této látky oproti cisplatině. Derivát titanocenu měl pouze mírný cytotoxický účinek. Výsledkům testu MTT odpovídalo i pozorování buněk pod mikroskopem. Důsledkem působení cisplatinu a testovaných látek byla nižší konfluencí buněk. Jako nejúčinnější se jevil opět derivát ferrocenu, který významně snížil nárůst buněk a to i u linií rezistentních k cisplatině. Nižší konfluencí může být způsobena zpomalením růstu či diferenciací buněk, případně může být důsledkem apoptózy.

Vliv zkoumaných látek na proliferaci buněk

Test MTT byl poté doplněn testem proliferace na přístroji xCELLigence. Hlavní výhodou této metody je možnost pozorovat chování buněk v reálném čase včetně porovnání účinku látek v závislosti na čase. Byly potvrzeny předchozí výsledky, kdy účinkem derivátu ferrocenu došlo u všech testovaných buněčných linií k výraznému poklesu signálu, který přímo souvisí se zpomalením nebo zastavením buněčné proliferace a apoptózou. Ve srovnání s cisplatinou měla tato látka také rychlejší nástup účinku (u linie SKOV-3 přibližně o 26 hodin dříve). Po působení derivátu titanocenu nebyla pozorována výrazná změna buněčné proliferace. Pomocí této metody byla také opět potvrzena (alespoň částečná) rezistence linií A2780cis a SKOV-3 vůči cisplatině. Buňky A2780cis nereagovaly na její přítomnost ani po 72 hodinách, u linie SKOV-3 byl zaznamenán nástup účinku s výrazným zpožděním ve srovnání s kontrolními citlivými buňkami A2780 (36 hodin u SKOV-3 ve srovnání s 14 hodinami u A2780).

Vliv testovaných látek na indukci apoptózy a deregulaci buněčného cyklu

Aby bylo možné objasnit mechanismus působení testovaných sloučenin, byla sledována exprese genů zapojených v regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Genová exprese byla studována na úrovni hladiny proteinů pomocí SDS-PAGE ve spojení s western blottingem.

Po působení cisplatiny došlo u buněčných linií A2780 a A2780cis ke zvýšení hladiny proapoptotického proteinu p53 a proteinu p21, který inhibuje funkci cyklin-dependentní kinázy 1 (Cdk1) a jeho aktivace tak má za následek zastavení buněčného cyklu v G₂/M-fázi. Gen *CDKN1A*, který kóduje gen p21, je cílovým genem transkripčního faktoru p53, nárůst hladiny p21 je proto v přímé souvislosti se zvýšenou expresí p53. Působení cisplatiny mělo také za následek zvýšení hladiny aktivovaných forem checkpoint kináz 1 a 2, které se podílí na regulaci buněčného cyklu a jsou součástí signální dráhy p53. Jejich zvýšená hladina může mít souvislost s narušením buněčného cyklu a indukcí apoptózy. Je zajímavé, že u buněčných linií A2780 a A2780cis je poměr hladiny p-Chk 1 a p-Chk 2 opačný, což patrně souvisí s rezistencí buněk A2780cis k cisplatině, která obvykle zahrnuje mnoho různých mechanismů.⁴³ Byla také zjištěna nižší hladina p53 a p21 u buněk A2780cis ve srovnání s buňkami A2780 po působení cisplatiny, což je také nepochybně součástí obranných mechanismů těchto buněk.

Deregulace buněčného cyklu účinkem cisplatiny byla následně potvrzena i pomocí průtokové cytometrie, kde byl pozorován zvýšený počet buněk v G₂/M-fázi. Vlivem cisplatiny došlo také ke zvýšení počtu apoptotických tělísek v sub-G₁ populaci.

Změna hladiny dalšího transkripčního faktoru podílejícího se na průběhu apoptózy-proteinu p73- byla zjištěna u buněk A2780 i A2780cis. U rezistentních buněk SKOV-3 nebyl protein p73 detekován. U buněk A2780cis došlo dokonce k většímu nárůstu hladiny proteinu p73 oproti kontrolním buňkám A2780, což je v rozporu s prací

Muscolini *et al.*, která ukazuje, že u rezistentních buněk není protein p73 působením cisplatinou indukován.⁴⁴

Po působení cisplatinou bylo také pozorováno štěpení proteinu PARP, které je často využíváno pro detekci apoptózy. Došlo také k mírnému nárůstu hladiny proapoptotických proteinů Bid a cytochromu c, které jsou známkou permeabilizace mitochondriální membrány a spuštění apoptózy. Celkově tak byla potvrzena indukce apoptózy vlivem cisplatinou, která probíhá vnitřní mitochondriální dráhou zprostředkovanou p53.

Na rozdíl od cisplatinou však žádná z testovaných organokovových sloučenin nezpůsobila zvýšení hladiny proteinu p53, p73 ani p21 ani štěpení proteinu PARP. Byl detekován pouze mírný nárůst hladiny Bid a cytochromu c po derivátu titanocenu, který může souviset s alternativním způsobem indukce apoptózy. Po derivátu ferrocenu nebylo pozorováno žádné zvýšení hladiny proapoptotických proteinů, což potvrzuje jiný mechanismus účinku této sloučeniny. Analýza buněk průtokovou cytometrií neprokázala výrazný vliv derivátu ferrocenu ani titanocenu na buněčný cyklus. Nedošlo k zastavení ani deregulaci jeho průběhu a také nebyla pozorována přítomnost apoptotických tělísek v sub-G₁ populaci.

Na základě provedených experimentů proto předpokládáme odlišný mechanismus působení obou testovaných látek a cisplatinou, derivát ferrocenu ani derivát titanocenu se patrně nevážou na DNA a nevyvolávají následně apoptózu vnitřní mitochondriální cestou. Zřejmě zde dohází k alternativnímu způsobu buněčné smrti.

Výsledky měření oxidačního stresu buněk po působení organokovových sloučenin

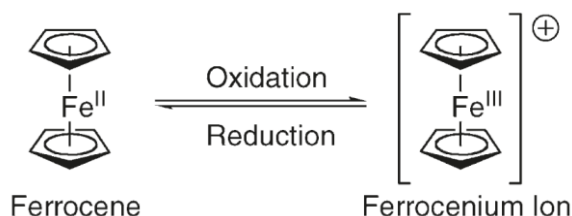
Dalším krokem k objasnění mechanismu působení organokovových sloučenin bylo stanovení oxidačního stresu buněk, protože je známo, že některé organokovové sloučeniny včetně cisplatinou vyvolávají nárůst hladiny reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů v buňkách.^{19, 21, 28, 31} Zvýšená míra oxidačního stresu vyvolává poškození různých buněčných struktur a buněčnou smrt, a proto se stala indukce oxidačního stresu jedním z cílů a možných mechanismů účinku protnádorové terapie.^{19, 21, 24, 31}

Pro stanovení oxidačního stresu byl vybrán pouze derivát ferrocenu, protože byla v experimentech prokázána jeho větší účinnost ve srovnání s derivátem titanocenu. Nárůst oxidačního stresu byl zjištěn u buněk A2780 i A2780cis po působení derivátu ferrocenu i cisplatinou. Zvýšení hladiny reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů po derivátu ferrocenu bylo srovnatelné s cisplatinou u obou buněčných linií. Reaktivní radikály jsou velmi nestabilní sloučeniny, proto mohl být nižší celkový nárůst jejich obsahu v buňkách A2780cis způsoben delší dobou, která uplynula mezi sklizením buněk a měřením (ve srovnání s buňkami A2780) nebo může mít souvislost s rezistencí těchto buněk k účinkům cisplatinou. Zjištěná schopnost derivátu ferrocenu vyvolat

v buňce oxidační stres je zajímavá z toho důvodu, že tuto vlastnost lze potenciálně využít v nádorové terapii.

Nádorové buňky vykazují ve srovnání s normálními buňkami zvýšenou hladinu ROS (peroxidu vodíku, hydroxylových radikálů), což může být využito pro cílenou protinádorovou terapii.^{19, 21} V současné době probíhá výzkum látek s potenciálním léčebným účinkem, které jsou aktivovány přítomností ROS v nádorových buňkách.²¹ Po aktivaci pak ovlivňují redoxní rovnováhu buňky buď inhibicí aktivity antioxidantů, nebo zvýšením produkce ROS s cílem vyvolat buněčnou smrt. Hlavní výhodou těchto látek je jejich selektivní působení na nádorové buňky, což má za následek snížení množství nežádoucích účinků. Mezi látky s potenciálním protinádorovým účinkem aktivované přítomností ROS patří sloučeniny odvozené od boru, dusíkatého yperitu či ferrocenu.²¹

U sloučenin odvozených od ferrocenu byla již dříve zjištěna schopnost po oxidaci peroxidem vodíku (Obr. 50) katalyzovat rozklad H_2O_2 na velmi reaktivní hydroxylové radikály (Fentonova reakce). To má za následek zvýšení intracelulárního oxidačního stresu, který může vést až k buněčné smrti.^{21, 31} Vzhledem ke struktuře sloučeniny derivátu ferrocenu lze proto předpokládat jeho schopnost vyvolat v nádorových buňkách produkci reaktivních hydroxylových radikálů vedoucích ke zvýšení oxidačního stresu.

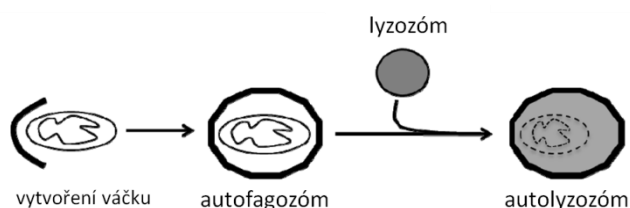


Obrázek 50 Reverzibilní oxidace ferrocenu na ferroceniový iont, který může katalyzovat rozklad peroxidu vodíku za vzniku hydroxylových radikálů (31)

Nadměrně vysoký obsah reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů v buňkách vede obvykle k buněčné smrti. Nemusí se však jednat o apoptózu, v souvislosti s oxidačním stresem se mohou uplatňovat alternativní mechanismy buněčné smrti, například autofágie.^{19-23, 45}

Autofágie je druhý typ programované buněčné smrti, při které se buňka sama postupně degraduje. Dochází k ní při chronickém nedostatku nutričních látek nebo energie, jejímž důsledkem je zvýšení vnitřní hladiny ROS a případné poškození mitochondrií a dalších buněčných komponent vedoucí k buněčné smrti.^{45, 46} Na začátku procesu jsou poškozené či nefunkční organely a proteiny postupně uzavřeny do membránových váčků za vzniku tzv. autofagozómů (Obr. 51). Ty posléze fúzí s lyzozómy a vznikají tzv. autolyzozómy, jejichž vnitřní obsah je rozložen

lyzozomálními enzymy na aminokyseliny a mastné kyseliny, které mohou být využity pro získání energie ve formě ATP nebo jako stavební materiál. Průběh autofágie je regulován různými proteiny, například proteiny Atg 6 (Beclin-1) a Atg 8 (LC3), které se podílejí na indukci autofágie a formaci membrány autofagozómů.^{23, 46} Autofágie je důležitá pro udržení buněčné homeostázy, její mírné zvýšení může mít ochranný vliv a může dokonce inhibovat apoptózu a přispívat k přežití buňky. Nadměrná míra autofágie však způsobuje rychlou buněčnou senescenci a buněčnou smrt. Indukce autofágie může být proto využita jako strategie protinádorové terapie.



Obrázek 51 Schéma autofágie (23)

Ačkoliv mohou mít autofágie a apoptóza podobné stimuly a některé signální dráhy se mohou vzájemně ovlivňovat, každý z těchto procesů má svá specifika. Na rozdíl od apoptózy není aktivace autofágie závislá na kaspázách. V buňce dochází k postupné akumulaci autofagozómů, buněčná membrána i cytoskelet však zůstávají až do konečné fáze procesu nedotčené.⁴⁵

Jako marker autofágie je obvykle sledováno štěpení proteinu LC3. Již mimo rámec této práce bylo štěpení LC3 detekováno po účinku některých dalších nově syntetizovaných derivátů ferrocenu. Toto zjištění podporuje hypotézu o alternativním způsobu buněčné smrti po působení derivátu ferrocenu JP-582-2.

Stabilita derivátů ferrocenu a titanocenu

V průběhu práce byl zaznamenán postupný pokles účinnosti zkoumaných látek, který zřejmě souvisí s jejich nízkou stabilitou. Nízká stabilita derivátu titanocenu (látky JP-596-1) může souviset s jeho strukturální podobností s titanocenem dichloridem, o kterém je známo, že snadno podléhá hydrolyze.³⁵

Postupné snižování účinku derivátu ferrocenu bylo zaznamenáno při kontrole buněk pod mikroskopem. Předpokládáme, že jeho degradace mohla ovlivnit výsledky měření oxidačního stresu, které bylo prováděno jako poslední. V rámci této práce byla také zavedena další metoda měření oxidačního stresu s využitím látky DHE (dihydroethidium) a průtokové cytometrie. Její použitelnost byla ověřena na buňkách ovlivněných cisplatinou, derivát ferrocenu však už bohužel nevykazoval téměř žádné cytotoxické účinky. Tato metoda proto nemohla být do práce zahrnuta.

Nízká stabilita organokovových sloučenin je jedním z limitujících faktorů pro jejich použití v protinádorové léčbě. Zvýšení stability změnou chemické struktury je proto výzvou pro další generaci nově syntetizovaných sloučenin.

Další směřování výzkumné práce

Pro potvrzení mechanismu účinku testovaných látek vyvoláním oxidačního stresu a následnou indukci autofágie bude využita fluorescenční látka DHE (dihydroethidium) v kombinaci s průtokovou cytometrií a detekce štěpení proteinu LC3. Autofágie a apoptóza bude studována pomocí dalších specifických protilátek po delším působení látek (48 a 72 hodin), aby tak byl potvrzen mechanismus buněčné smrti. Pomocí elektrochemických metod bude ověřeno, zda se látky vážou či nevážou na DNA.

Všechny tyto experimenty budou provedeny s využitím nově syntetizovaných organokovových sloučenin v co nejkratším čase, aby byl eliminován vliv nízké stability těchto látek. Bude pokračováno v testování vlastností dalších generací organokovových sloučenin s potenciálním protinádorovým účinkem. Ty budou syntetizovány na základě dosud získaných výsledků. Už nyní je k dispozici soubor 30 nových látek, opět z Ústavu chemických procesů AV ČR, se kterým byla v této oblasti navázána úspěšná spolupráce.

6 Souhrn

Cílem této práce bylo ověřit cytotoxicitu nově syntetizovaných derivátů ferrocenu a titanocenu a pokusit se odhalit mechanismus jejich působení. Byl zjištěn výrazný cytotoxický účinek derivátu na nádorové buněčné linie odvozené od karcinomu ovaria a to včetně linií rezistentních k cisplatině. Příčinou překonání rezistence je patrně odlišný mechanismus účinku této látky. Na základě výsledků provedených experimentů předpokládám, že je založen na indukci oxidačního stresu a následné autofágie nebo alternativní cesty apoptózy nezávislé na p53, tato hypotéza však musí být potvrzena dalšími metodami. Látky s podobným mechanismem účinku by jednou mohly být využity pro léčbu nádorů rezistentních k cisplatině.

Velkým problémem se ukázala být stabilita testovaných látek, která ovlivnila některé experimenty. Nízká stabilita organokovových sloučenin je jedním z limitujících faktorů pro jejich využití v klinické praxi a představuje výzvu pro další výzkum jejich struktury a přípravy stabilních roztoků.

Hlavním přínosem této práce jsou nové podněty pro další výzkum organokovových sloučenin jako potenciálních protinádorových léčiv. Na základě získaných poznatků o testovaných látkách budou v Ústavu chemických procesů AV ČR syntetizovány další generace těchto sloučenin s vyšším protinádorovým účinkem. Metody úspěšně zavedené v této práci budou využity pro testování jejich cytotoxicity a mechanismu působení.

6 Summary

The aim of this study was to confirm the cytotoxicity of newly synthesized titanocene and ferrocene derivatives and an attempt to clarify their mechanisms of action. It was observed, that the ferrocene derivative has a significant cytotoxic effect on cancer cell lines derived from ovarian carcinoma including cell lines resistant to cisplatin. The reason of overcoming the resistance is apparently a different mechanism of action of this compound. Based on the results of previous experiments I assume that it is based on the induction of oxidative stress and subsequent autophagy or an alternative apoptosis pathway independent of p53. However this hypothesis must be confirmed by other methods. Compounds with similar mechanism of action could one day be used in the treatment of cisplatin resistant tumors.

The major problem turned out to be the stability of tested compounds, which affected some experiments. A low stability of organometallic compounds is one of the limiting factors for their use in clinical practice and presents a challenge for further research on their structure and the preparation of stable solutions.

The main contributions of this study are new impulses to further research of organometallic compounds as potential anticancer drugs. Based on the acquired knowledge of tested compounds, the next generation of these compounds will be synthesised in the Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, with higher antitumor effects. Methods successfully introduced in this work will be used for testing their cytotoxicity and mechanism of action.

7 Seznam literatury

1. *Novotvary 2010* [online]. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013 [cit. 2014-02-22]. ISSN 1210 857X; ISBN 978-80-7472-034-5.
Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>
2. *Zemřelí 2012* [online]. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013 [cit. 2014-02-22]. ISSN 1210-9967; ISBN: 978-80-7472-043-7.
Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/zemreli>
3. *Zdravotnická ročenka České republiky 2012* [online]. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013 [cit. 2014-02-22]. ISSN 1210-9991; ISBN 978-80-7472-083-3.
Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/rocenky/zdravotnicka-rocenka-ceske-republiky>
4. HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, vol. 144, issue 5, s. 646-674 [cit. 2014-01-22]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>
5. WEINBERG, Robert A. *The biology of cancer*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007. ISBN 0-8153-4078-8.
6. WEINBERG, Robert A. *Jediná odrodilá buňka: jak vzniká rakovina*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2003, 156 s. Mistři vědy. ISBN 80-200-1071-8.
7. KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2008, 211 s. ISBN 978-80-86960-36-4.
8. *Obecná onkologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vyd. Editor Jiří Petera. Praha: Karolinum, 2005, 205 s. ISBN 80-246-0968-1
9. KLENER, Pavel. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-246-0468-X.
10. ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998, 630 s. ISBN 80-902-9060-4
11. ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5. vyd. New York: Garland science, 2008. ISBN 978-081-5341-062.

12. KLENER, Pavel. Chemoterapie: minimum pro praxi. Vyd. 1. Praha: Triton, 1999, 114 s. Levou zadní. ISBN 80-725-4028-9

13. LODISH, Harvey F. Molecular cell biology. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Co., 2012. ISBN 978-1-4292-3413-9.

14. NOJIMA, Hiroshi. G1 and S-Phase Checkpoints, Chromosome Instability, and Cancer. SCHÖNTHAL, Axel H. *Checkpoint controls and cancer: Volume 1: Reviews and Model Systems* [online]. Totowa, N.J.: Humana Press, 2004, s. 3-49 [cit. 2014-02-07]. *Methods in molecular biology*, v. 280-281. ISBN 978-1-59259-788-8.
Dostupné z: [http://www.bjcancer.org/_Library/UserFiles/pdf/Checkpoint%20controls%20and%20cancer%20vol-1%20\(2004%20MMB\).pdf](http://www.bjcancer.org/_Library/UserFiles/pdf/Checkpoint%20controls%20and%20cancer%20vol-1%20(2004%20MMB).pdf)

15. BARTEK, Jiri a Jiri LUKAS. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* [online]. 2003, vol. 3, issue 5, s. 421-429 [cit. 2014-03-22]. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00110-7.
Dostupné z: <http://www.cell.com/cancer-cell/retrieve/pii/S1535610803001107>

16. ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. 2007, vol. 35, issue 4, s. 495-516 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1080/01926230701320337.
Dostupné z: <http://tpx.sagepub.com/cgi/doi/10.1080/01926230701320337>

17. NETUŠIL, Pavel. *Apoptóza* [online]. Příbor [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: http://www.netusil.net/files_public///maturantum/Apopt%C3%B3za.rtf. Výklad. Masarykovo gymnázium v Příboře.

18. BALÁŽ, Vojtech, Filip KOLÁŘ, Jana LIŠKOVÁ, Alena PLUHAŘOVÁ a Petr SYNEK. *Smrt jako součást života: Biologická olympiáda 2008-2009, 43. ročník : přípravný text pro kategorie A, B* [online]. vyd. 1. Praha: Národní institut dětí a mládeže MŠMT, Ústřední komise Biologické olympiády, 2008 [cit. 2014-02-03]. ISBN 978-808-6784-649.
Dostupné z: http://www.biologickaolympiada.cz/files/pripravne_texty/PT2008.pdf

19. JUNGWIRTH, Ute, Christian R. KOWOL, Bernhard K. KEPPLER, Christian G. HARTINGER, Walter BERGER a Petra HEFFETER. Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes. *Antioxidants* [online]. 2011, vol. 15, issue 4, s. 1085-1127 [cit. 2014-03-23]. DOI: 10.1089/ars.2010.3663.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371750/>

20. RAY, Paul D., Bo-Wen HUANG a Yoshiaki TSUJI. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* [online]. 2012, vol. 24, issue 5, s. 981-990 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3454471/>
21. PENG, Xiaohua a Varsha GANDHI. ROS-activated anticancer prodrugs: a new strategy for tumor-specific damage. *Therapeutic Delivery* [online]. 2012, vol. 3, issue 7, s. 823-833 [cit. 2014-02-09]. DOI: 10.4155/tde.12.61.
Dostupné z: <http://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/tde.12.61>
22. HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2007, vol. 35, issue 5, s. 1147-1150 [cit. 2014-02-22]. DOI: 10.1042/BST0351147.
Dostupné z: <http://www.biochemsoctrans.org/bst/035/bst0351147.htm>
23. BOLISSETTY, Subhashini a Edgar JAIMES. Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, vol. 14, issue 3, s. 6306-6344 [cit. 2014-02-22]. DOI: 10.3390/ijms14036306.
Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/3/6306/>
24. KLENER, Pavel. *Protinádorová chemoterapie*. 1. vyd. Editor Lubomír Houdek. Praha: Galén, 1996, 614 s. ISBN 80-858-2436-1.
25. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti* [online]. Brno, 2000, roč. 13, č. 2 [cit. 2014-01-06]. ISSN 0862-495.
Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/45.pdf>
26. MAREČEK, Aleš a Jaroslav HONZA. *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000, 250 s. ISBN 80-718-2057-1
27. BOWMAN, Donald C. The Amazingly Versatile Titanocene Derivatives. *Journal of Chemical Education* [online]. 2006, vol. 83, issue 5, s. 735- [cit. 2014-03-23]. DOI: 10.1021/ed083p735.
Dostupné z: <http://web.eotvos.elte.hu/oksz/femorg/titanocen.pdf>
28. PIZARRO, Ana M., Abraha HABTEMARIAM a Peter J. SADLER. Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes. *Topics in Organometallic Chemistry* [online]. 2010, č. 32, s. 21-56 [cit. 2014-03-23]. DOI: 10.1007/978-3-642-13185-1_2.

Dostupné z:

http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783642131844-c1.pdf?SGWID=0-0-45-1010253-p174005466

29. ANILANMERT, Beril. Therapeutic Organometallic Compounds [online]. GALLELLI, Luca. *Therapeutic Organometallic Compounds*. Rijeka: InTech, 2012, s. 651-680. [cit. 2014-03-23]. ISBN 978-953-51-0222-9.

Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/pharmacology/therapeutic-organometallic-compounds->

30. Phase I Trial of Weekly Scheduling and Pharmacokinetics of Titanocene Dichloride in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1998, roč. 16, č. 8, s. 2761-2769.

Dostupné z: <http://jco.ascopubs.org/content/16/8/2761.full.pdf+html?sid=44fbfa6a-d82c-49d1-8b65-001a56ad1fd9>

31. GASSER, Gilles, Ingo OTT a Nils METZLER-NOLTE. Organometallic Anticancer Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2011, vol. 54, issue 1, s. 3-25 [cit. 2014-03-08]. DOI: 10.1021/jm100020w.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3018145>

32. MARQUES, M. P. M. Platinum and Palladium Polyamine Complexes as Anticancer Agents: The Structural Factor. *ISRN Spectroscopy* [online]. 2013, vol. 2013, s. 1-29 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1155/2013/287353.

Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/isrn.spectroscopy/2013/287353/>

33. GÓMEZ-RUIZ, Santiago, Danijela MAKSIMOVIĆ-IVANIĆ, Sanja MIJATOVIĆ a Goran N. KALUĐEROVIĆ. On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications* [online]. 2012, vol. 2012, s. 1-14 [cit. 2014-03-31]. DOI: 10.1155/2012/140284.

Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bca/2012/140284/>

34. ORNELAS, Cátia. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New Journal of Chemistry* [online]. 2011, vol. 35, issue 10, s. 1973-1985 [cit. 2014-03-23]. DOI: 10.1039/c1nj20172g.

Dostupné z:

http://www.chasqueweb.ufrgs.br/~ricardo.gomes/Disciplinas/040/artigos_PDF/derivados_ferroceno.pdf

35. <http://modernsteroid.blogspot.cz/2012/03/potent-antiproliferative-activity-of.html>

36. <http://genemol.org/genemol/secondesemaine/CELLS/count.html>

37. POZAROWSKI, Piotr a Zbigniew DARZYŃKIEWICZ. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. SCHÖNTHAL, Axel H. *Checkpoint controls and cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols* [online]. Totowa, N.J: Human Press, 2004, s. 301-311. [cit. 2014-02-07] *Methods in Molecular Biology*, 281. ISBN 978-159-2598-113. Dostupné z: <http://www.tcd.ie/IMM/flow-cytometry-facility/assets/pdf/Analysis-of-Cell-Cycle-by-Flow-Cytometry.pdf>
38. <http://www.andor.com/learning-academy/spectral-flow-cytometry-an-introduction-to-spectral-flow-cytometry>
39. *Protein Blotting Guide*, Bio-Rad Laboratories, Inc., US, dostupné z: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf
40. http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=184
41. http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=179
42. http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-347-in-vitro-ros-rns-assay-kit_0.pdf také: <http://www.cellbiolabs.com/in-vitro-ros-rns-assay>
43. SHEN, D.-W., L. M. POULIOT, M. D. HALL a M. M. GOTTESMAN. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews*[online]. 2012, vol. 64, issue 3, s. 706-721 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1124/pr.111.005637. Dostupné z: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.111.005637>
44. MUSCOLINI, M., R. CIANFROCCA, A. SAJEVA, S. MOZZETTI, G. FERRANDINA, A. COSTANZO a L. TUOSTO. Trichostatin A up-regulates p73 and induces Bax-dependent apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2008, vol. 7, issue 6, s. 1410-1419 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0299. Dostupné z: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-08-0299>
45. THORBURN, Andrew. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* [online]. 2008, vol. 13, issue 1, s. 1-9 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1007/s10495-007-0154-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-007-0154-9>
46. LEE, Jisun, Samantha GIORDANO a Jianhua ZHANG. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal* [online]. 2012, vol. 441, issue 2, s. 523-540 [cit. 2014-03-11]. DOI: 10.1042/BJ20111451. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/441/bj4410523.htm>

8 Příloha 1: Složení použitých činidel

<p><u>sterilní PBS</u></p> <table><tr><td>8 g</td><td>NaCl</td></tr><tr><td>0,2 g</td><td>KCl</td></tr><tr><td>0,2 g</td><td>KH₂PO₄ bezvodý</td></tr><tr><td>2,31 g</td><td>Na₂HPO₄ · 12 H₂O</td></tr></table> <p>-----</p> <p>doplnit do 1 L H₂O, sterilní filtrace ve flow boxu</p>	8 g	NaCl	0,2 g	KCl	0,2 g	KH ₂ PO ₄ bezvodý	2,31 g	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	<p><u>lyzační (NET) pufr</u></p> <table><tr><td>3 ml</td><td>5M NaCl</td></tr><tr><td>1ml</td><td>nonidetenylnylfenyl-PEG</td></tr><tr><td>5 ml</td><td>1 M Tris</td></tr><tr><td>0,21 g</td><td>NaF</td></tr><tr><td>1 ml</td><td>0,5 M EDTA</td></tr><tr><td>100 ml</td><td>H₂O</td></tr></table>	3 ml	5M NaCl	1ml	nonidetenylnylfenyl-PEG	5 ml	1 M Tris	0,21 g	NaF	1 ml	0,5 M EDTA	100 ml	H ₂ O
8 g	NaCl																				
0,2 g	KCl																				
0,2 g	KH ₂ PO ₄ bezvodý																				
2,31 g	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O																				
3 ml	5M NaCl																				
1ml	nonidetenylnylfenyl-PEG																				
5 ml	1 M Tris																				
0,21 g	NaF																				
1 ml	0,5 M EDTA																				
100 ml	H ₂ O																				
<p><u>0,5% EGTA v PBS</u></p> <table><tr><td>5 g</td><td>EGTA</td></tr><tr><td>1 L</td><td>sterilního PBS</td></tr></table> <p>-----</p> <p>pH upravit pomocí NaOH na 7.0 sterilní filtrace ve flow boxu, uchovávání při 4 °C</p>	5 g	EGTA	1 L	sterilního PBS	<p><u>MOPS Running buffer 20X</u></p> <table><tr><td>104,6 g</td><td>MOPS</td></tr><tr><td>60,6 g</td><td>Tris base</td></tr><tr><td>10 g</td><td>SDS</td></tr><tr><td>3 g</td><td>EDTA acid</td></tr></table> <p>-----</p> <p>doplnit do 500 ml H₂O</p>	104,6 g	MOPS	60,6 g	Tris base	10 g	SDS	3 g	EDTA acid								
5 g	EGTA																				
1 L	sterilního PBS																				
104,6 g	MOPS																				
60,6 g	Tris base																				
10 g	SDS																				
3 g	EDTA acid																				
<p><u>pracovní roztok trypsinu</u></p> <table><tr><td>25 ml</td><td>trypsinu (Gibco® LifeTechnologies, USA)</td></tr><tr><td>75 ml</td><td>0,5% EGTA</td></tr></table>	25 ml	trypsinu (Gibco® LifeTechnologies, USA)	75 ml	0,5% EGTA	<p><u>Blotting buffer 1X</u></p> <table><tr><td>1 L</td><td>methanol</td></tr><tr><td>500 ml</td><td>10X Blotting Buffer (15 g Tris base, 72,5 g glycinu, doplnit do 500 ml H₂O)</td></tr></table> <p>-----</p> <p>doplnit do 5 L H₂O</p>	1 L	methanol	500 ml	10X Blotting Buffer (15 g Tris base, 72,5 g glycinu, doplnit do 500 ml H ₂ O)												
25 ml	trypsinu (Gibco® LifeTechnologies, USA)																				
75 ml	0,5% EGTA																				
1 L	methanol																				
500 ml	10X Blotting Buffer (15 g Tris base, 72,5 g glycinu, doplnit do 500 ml H ₂ O)																				
<p><u>1x stabilizační roztok</u></p> <p>10x koncentrovaný stabilizační roztok byl zředěn v poměru 1:10 s vodou uchováván při 4 °C</p> <p><u>1x katalyzátor</u> (vždy pouze pro okamžité použití)</p> <p>250x koncentrovaný roztok katalyzátoru byla zředěn v poměru 1:250 s PBS</p>																					
<p><u>roztok DCFH</u> (vždy pouze pro okamžité použití)</p> <p>byl smíchán roztok DCF-DiOxyQ a základní („priming“) roztok v poměru 1:4 inkubace 30 minut/RT</p> <p>-----</p> <p>tato směs byla poté smíchána v poměru 1:40 se stabilizačním roztokem, vortexována a uchovávána ve tmě</p>																					

9 Příloha 2: Seznam použitých protilátek

<i>protilátka</i>	<i>označení a firma</i>
PARP 1	C2-10, Santa Cruz Biotechnology (USA)
p73	IHC-00197, Bethyl Laboratories (USA)
p-Chk 2 (Thr 68)	#2661, Cell Signaling (USA)
p-Chk 1 (Ser 345)	#2348, Cell Signaling (USA)
p53 (supernatant)	DO-1, Santa Cruz Biotechnology (USA)
aktin	Sigma Aldrich (USA)
caspase 3 (Asp 175)	#9664, Cell Signaling (USA)
Bid	C-20, Santa Cruz Biotechnology (USA)
p21 (supernatant)	ab118, Abcam (UK)
cytochrome c	#4272, Cell Signaling (USA)

10 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1 Schéma charakteristických rysů nádorových buněk (4)	14
Obrázek 2 Fáze buněčného cyklu (10)	18
Obrázek 3 Fáze mitózy (13)	20
Obrázek 4 Znárodnění cyklin-cdk komplexu a jeho fosforylované aktivní formy (10)	21
Obrázek 5 Schéma apoptotických drah (16)	27
Obrázek 6 Grafické znázornění principu cyklické chemoterapie (12)	31
Obrázek 7 Strukturální vzorec cisplatin (24)	35
Obrázek 8 Strukturální vzorec karboplatin (a) oxaliplatin (b) Převzato z: (24)	36
Obrázek 9 Strukturální vzorec klasického metalocenu s paralelními Cp ligandy (a) a ferrocenu (b)	37
Obrázek 10 Strukturální vzorec „ohnutého“ metalocenu (a) a titanocenu dichloridu (b)	37
Obrázek 11 Strukturální vzorec látky JP-596-1	39
Obrázek 12 Strukturální vzorec látky JP-582-2	39
Obrázek 13 Schéma redukce MTT soli na formazan (35)	44
Obrázek 14 Schéma Bürkerovy (cytometrické) komůrky (36)	45
Obrázek 15 Vztah mezi fází buněčného cyklu a obsahem DNA vyjádřený pomocí histogramu (37)	47
Obrázek 16 Schéma měřicí části průtokového cytometru (38)	47
Obrázek 17 Schéma chemoluminiscenční metody analýzy proteinů (39)	50
Obrázek 18 Schéma aparatury při wet blottingu (39)	52
Obrázek 19 Schéma systému RTCA („real time cell analysis“) (40)	54
Obrázek 20 16-jamková E-destička určená k real time analýze buněk (41)	55
Obrázek 21 Schéma metody stanovení ROS/RNS (42)	56
Obrázek 22 Buňky A2780 po 24 hodinách působení testovaných látek v koncentracích 1 a 10 μM a 10 μM cisplatin	58
Obrázek 23 Buňky A2780cis po 24 hodinách působení testovaných látek v koncentracích 1 a 10 μM a 10 μM cisplatin	59
Obrázek 24 Buňky SKOV-3 po 24 hodinách působení testovaných látek v koncentracích 1 a 10 μM a 10 μM cisplatin	60
Obrázek 25 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatin ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780 po 24 hodinách	61
Obrázek 26 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatin ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780 po 48 hodinách	62
Obrázek 27 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatin ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780cis po 24 hodinách	62
Obrázek 28 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatin ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky A2780cis po 48 hodinách	63
Obrázek 29 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatin ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky SKOV-3 po 24 hodinách	63
Obrázek 30 Grafické znázornění cytotoxického účinku různých koncentrací testovaných látek a cisplatin ve srovnání s DMSO (negativní kontrola) na buňky SKOV-3 po 48 hodinách	64
Obrázek 31 Grafické znázornění cytotoxického účinku testovaných látek a cisplatin v koncentraci 10 μM ve srovnání s DMSO na buňky A2780 po 24 hodinách	64
Obrázek 32 Grafické znázornění cytotoxického účinku testovaných látek a cisplatin v koncentraci 10 μM ve srovnání s DMSO na buňky A2780cis po 24 hodinách	65
Obrázek 33 Grafické znázornění cytotoxického účinku testovaných látek a cisplatin v koncentraci 10 μM ve srovnání s DMSO na buňky SKOV-3 po 24 hodinách	65
Obrázek 34 Histogramy vyjadřující průběh buněčného cyklu buněk A2780 24 hodin po přidání testovaných látek, cisplatin nebo DMSO (negativní kontrola)	67
Obrázek 35 Bodový graf („dot plot“) vyjadřující velikost a granularitu buněk A2780 po působení testovaných látek a cisplatin (koncentrace 10 μM) a DMSO	67

<i>Obrázek 36</i> Histogramy vyjadřující průběh buněčného cyklu buněk A2780cis 24 hodin po přidání testovaných látek, cisplatiny nebo DMSO (negativní kontrola).....	69
<i>Obrázek 37</i> Bodový graf („dot plot“) vyjadřující velikost a granularitu buněk A2780cis po působení testovaných látek a cisplatiny (koncentrace 10 μ M) a DMSO.....	69
<i>Obrázek 38</i> Detekce proteinů PARP1 a p53 u buněk linie A2780 a A2780cis	70
<i>Obrázek 39</i> Detekce proteinu p21 u buněk linie A2780 a A2780cis	71
<i>Obrázek 40</i> Detekce proteinu p73 u buněk linie A2780, A2780cis a SKOV-3.....	71
<i>Obrázek 41</i> Detekce proteinů Bid a cytochromu c u buněk linie A2780, A2780cis a SKOV-3.....	72
<i>Obrázek 42</i> Detekce kaspázy 3 u buněk linie A2780 a A2780cis.....	72
<i>Obrázek 43</i> Detekce fosforylované formy checkpoint kinázy 1 a 2 u buněk linie A2780 a A2780cis	73
<i>Obrázek 44</i> Graf znázorňující proliferaci buněk A2780 ovlivněnou působením různých látek.....	74
<i>Obrázek 45</i> Graf znázorňující proliferaci buněk A2780cis ovlivněnou působením různých látek.....	75
<i>Obrázek 46</i> Graf znázorňující proliferaci buněk SKOV-3 ovlivněnou působením různých látek.....	75
<i>Obrázek 47</i> Graf vyjadřující intenzitu fluorescence, která je úměrná množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v lyzátu buněk A2780 24 hodin po přidání 10 μ M derivátu ferrocenu a cisplatiny.....	76
<i>Obrázek 48</i> Graf vyjadřující intenzitu fluorescence, která je úměrná množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v lyzátu buněk A2780cis 24 hodin po přidání 10 μ M derivátu ferrocenu a cisplatiny	77
<i>Obrázek 49</i> Graf vyjadřující relativní nárůst množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v lyzátu buněk A2780 a A2780cis oproti negativní kontrole (DMSO) 24 hodin po přidání 10 μ M derivátu ferrocenu a cisplatiny.....	77
<i>Obrázek 50</i> Reverzibilní oxidace ferrocenu na ferroceniový iont, který může katalyzovat rozklad peroxidu vodíku za vzniku hydroxylových radikálů (31).....	81
<i>Obrázek 51</i> Schéma autofágie (23).....	82
<i>Tabulka 1</i> Přehled hlavních cyklinů, příslušných Cdk a jejich funkce během buněčného cyklu.....	22
<i>Tabulka 2</i> Schéma destičky pro MTT assay.....	46
<i>Tabulka 3</i> Poměr komponent na přípravu 4 polyakrylamidových gelů	51
<i>Tabulka 4</i> Seznam zkoumaných proteinů, jejich hmotností a poměr ředění protilátek.....	53