

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

University of Helsinki
Faculty of Pharmacy
Division of Pharmacology and Pharmacotherapy
a
Faculty of Agriculture and Forestry
Department of Food and Environmental Sciences

Kandidát: Tereza Hergeselová
Školitelé: Doc. Atso Raasmaja
Doc. Anne-Maria Pajari, Ph. D
Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* studie molekulárních mechanismů antiproliferativního účinku extraktu z plodu jalovce v buňkách kolorektálního karcinomu

Rakovina tlustého střeva je jednou z nejčteněji diagnostikovaných typů rakoviny a zároveň jednou z nejčastějších příčin smrti ve vyspělých státech. Vznik rakoviny tlustého střeva je silně ovlivněn okolními faktory, zejména stravou, která může poskytovat účinek preventivní i terapeutický, díky látkám odvozených z rostlinných metabolitů s chemopreventivními a/nebo antiproliferačními schopnostmi a na rozdíl od běžně užívané syntetické medicíny, s minimem nežádoucích účinků. Fenolické sloučeniny, obsažené zejména v různých bobulovitých plodech, projevují zdraví prospěšné vlastnosti včetně protinádorového účinku.

V této studii jsem se zabývala hodnocením cytotoxických účinků extraktu z plodu jalovce a mechanismy jeho antiproliferační aktivity *in vitro*. Dvě buněčné linie kolorektálního karcinomu - HCA-7 a Caco-2 - byly vystaveny různým koncentracím jalovcového extraktu a výsledky byly porovnávány s kontrolními, neošetřenými buňkami. Cytotoxický účinek extraktu byl hodnocen měřením metabolické aktivity

za použití testové komerční sady a měřením úniku laktát dehydrogenasy (LDH) do média. Molekulární mechanismy účinků extraktu jalovce byly hodnoceny metodou Western blot, kdy jsme analyzovali množství specifických proteinů související s buněčnou smrtí. Změny v morfologii buněk po působení extraktu ve vybraných koncentracích jsme pozorovali konfokálním mikroskopem.

Výsledky experimentů životaschopnosti buněk ukázaly zvýšený antiproliferační účinek extraktu v obou buněčných liniích, který byl závislý na koncentraci a době působení, kdy pokusy za použití CCK-8 testovací sady prokázaly významný cytotoxický účinek již při koncentraci 30 µg/ml, avšak LDH test zachytil tento účinek až při koncentraci 100x vyšší. Studie buněčné morfologie na HCA-7 buněčné linii při koncentraci extraktu 30 µg/ml odkryly typické znaky apoptózy, jako je vznik blebů (nepravidelné záhyby plazmatické membrány) a pyknotická jádra, které potvrdily, že účinek extraktu je dán programovanou buněčnou smrtí. Výsledky Western blot analýzy ukázaly na koncentraci závislý pokles množství proteinu p53 v buňkách HCA-7, na něž působil jalovcový extrakt. Tyto výsledky mohou souviset se snížením pro-onkogenetické aktivity proteinu p53, který se nachází v buňkách HCA-7 v mutované formě. Hladina proteinu p27 byla zvýšena v závislosti na koncentraci extraktu v obou buněčných liniích, což souvisí s inhibicí růstu a proliferace buněk a může hrát roli v reorganizaci cytoskeletu, pozorované při konfokální mikroskopii. Extrakt jalovce neprokázal významný účinek na množství β-cateninu ani v HCA-7 ani v Caco-2 buňkách ve srovnání s kontrolou. Účinek inhibovat Akt signální dráhu byl patný jen u Caco-2 buněk při koncentraci extraktu 1 µg/ml.

Tato studie prokázala potenciální cytotoxické účinky extraktu připraveného z plodu jalovce, které souvisí s různými mechanismy aktivace programované buněčné smrti v buňkách kolorektálního karcinomu.