

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VLIV VYBRANÝCH PRENYLFLAVONOIDŮ NA ÚČINEK
CYTOSTATIK V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petra Matoušková Ph.D.

Hradec Králové 2017

Klára Pešková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum

Podpis

Chtěla bych poděkovat vedoucí diplomové práce Ing. Petře Matouškové Ph.D. za cenné rady a čas, který mi věnovala při vypracovávání práce a řešení dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům katedry biochemických věd, kteří byli vždy velmi ochotní.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Kolorektální karcinom	10
2.1.1	Epidemiologie a etiologie	10
2.1.2	Patogeneze	11
2.1.2.1	Chromozomální instabilita.....	11
2.1.2.2	Mikrosatelitní instabilita.....	12
2.1.2.3	Metylace CpG ostrůvků.....	12
2.1.3	Faktory vzniku kolorektálního karcinomu.....	12
2.1.4	Příznaky	13
2.1.5	Diagnostika a screening.....	13
2.1.5.1	Test na okultní krvácení.....	14
2.1.6	Klasifikace	15
2.1.7	Léčba	17
2.1.8	Nežádoucí účinky léčby.....	17
2.2	Humulus lupulus	18
2.3	Prenylflavonoidy	19
2.3.1	Metabolismus prenylflavonoidů.....	20
2.3.2	Antioxidační vlastnosti.....	20
2.3.3	Protirakovinné působení	21
2.3.3.1	6-prenylnaringenin	22
2.3.3.2	8-prenylnaringenin	23
2.4	Naringenin	24
2.5	Oxaliplatina.....	25
2.5.1	Mechanismus účinku	25
2.5.1.1	Poškození DNA.....	25

2.5.1.2	Zastavení syntézy DNA	26
2.5.1.3	Inhibice syntézy RNA	26
2.5.1.4	Spuštění imunologické reakce	26
2.5.2	Rezistence na oxaliplatinu	26
2.5.3	Nežádoucí účinky	27
2.5.3.1	Gastrointestinální obtíže	27
2.5.3.2	Neurotoxicita.....	27
2.5.3.3	Hematopoetický systém.....	27
3	CÍL PRÁCE	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	Materiál a chemikálie	30
4.2	Pomůcky a přístroje.....	30
4.2.1	Pomůcky	30
4.2.2	Přístroje.....	30
4.3	Metodika	31
4.3.1	Buněčné linie.....	31
4.3.2	Kultivační médium	31
4.3.3	Pasážování buněk	32
4.3.4	Počítání buněk.....	32
4.3.5	Nasazování buněk	33
4.3.6	Ovlivňování buněk	34
4.3.7	Test neutrální červeně.....	35
4.3.7.1	Princip.....	35
4.3.7.2	Postup	36
4.3.7.3	Příprava roztoků	36
5	VÝSLEDKY	37
5.1	Vliv 6-prenylnaringeninů na buněčné linie SW480 a SW620.....	37

5.2	Vliv 8-prenylnaringeninů na buněčné linie SW480 a SW620.....	41
5.3	Vliv naringeninů na buněčné linie SW480 a SW620.....	44
5.4	Vliv oxaliplatin na buněčné linie SW480 a SW620.....	45
5.5	Hodnoty IC50 pro jednotlivé buněčné linie.....	46
5.6	Vliv 6-prenylnaringeninů a oxaliplatin na buněčné linie SW480 a SW620.....	47
5.7	Vliv 8-prenylnaringeninů a oxaliplatin na buněčné linie SW480 a SW620.....	49
5.8	Vliv naringeninů a oxaliplatin na buněčné linie SW480 a SW620.....	51
5.9	Kombinační indexy	52
6	DISKUZE	55
7	ZÁVĚR.....	58
8	SEZNAM ZKRATEK	59
9	POUŽITÁ LITERATURA	61
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	66

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Klára Pešková

Školitel: Ing. Petra Matoušková Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv vybraných prenylflavonoidů na účinek cytostatik v nádorových buňkách

Prenylflavonoidy 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin a flavonoid naringenin jsou látky s antiproliferačními vlastnostmi. Prenylflavonoidy najdeme především v chmelu a v pivu. Hlavním zdrojem naringeninu jsou především citrusové plody. V této práci byl jejich účinek testován pomocí testu neutrální červeně na buněčných liniích SW480 a SW620. Látky byly testovány na každé linii samostatně a poté každá v kombinaci s cytostatikem oxaliplatinou. Oxaliplatina se používá v léčbě nádorových onemocnění. V testovaných koncentracích se jako nejúčinnější jevil 6-prenylnaringenin u obou buněčných linií. Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu Graphpad metodou One-way ANOVA v porovnání s kontrolou. Kombinační indexy byly určeny v programu Compusyn metodou dle Chou-Talalay.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Klára Pešková

Supervisor: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The impact of selected prenylflavonoids on the effect of anticancer therapy in cancer cell lines

Prenylflavonoids 6-prenylnaringenin and 8-prenylnaringenin and flavonoid naringenin are substances with anti-proliferative properties. Prenylflavonoids are present mostly in hop and in beer. Main source of naringenin are primarily citrus fruits. In this diploma thesis the effect of compounds was tested by neutral red uptake test in cell lines SW480 and SW620. These substances were tested individually and then in combination with cytostatic agent oxaliplatin. Oxaliplatin is used in treatment of cancer disease. 6-prenylnaringenin was the most effective compound in both cell lines. Statistical evaluation of the effect was carried out by Graphpad using the method One-way ANOVA in comparison with control. Combination index was determined by software program Compusyn using the method by Chou-Talalay.

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí. Podle dostupných dat bylo v roce 2013 diagnostikováno 81 541 pacientů se zhoubným novotvarem a 26 944 jich v této souvislosti zemřelo. Kolorektální karcinom se řadí na první místa výskytu nádorových onemocnění. Základní léčbou tohoto onemocnění stále zůstává chirurgické odstranění kombinované s chemoterapií.

V posledních letech se výzkum zaměřuje na rostlinné metabolity, na zkoumání jejich účinku. Mezi tyto látky můžeme zařadit také sekundární metabolity rostlin patřící do skupiny flavonoidů. U této široké skupiny záleží na substituentech, které se váží na základní flavanovou strukturu. Jednou z oblastí ve výzkumu jsou prenylované flavonoidy nacházející se v největším množství v chmelu. Nejvíce studovanou látkou je xanthohumol a následně další jeho deriváty 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin. Dále je věnována pozornost i látkám obsažených v citrusových plodech, které vykazují stejně jako prenylované flavonoidy antioxidační, protizánětlivé a antiproliferativní působení. Mezi látky nalezené v citrusových plodech patří také naringenin.

Velmi přínosné by bylo nalezení látky, která by účinně zastavila rakovinné bujení a měla minimální nežádoucí účinky na lidský organismus.

2 TEORETICKÁ ČÁST

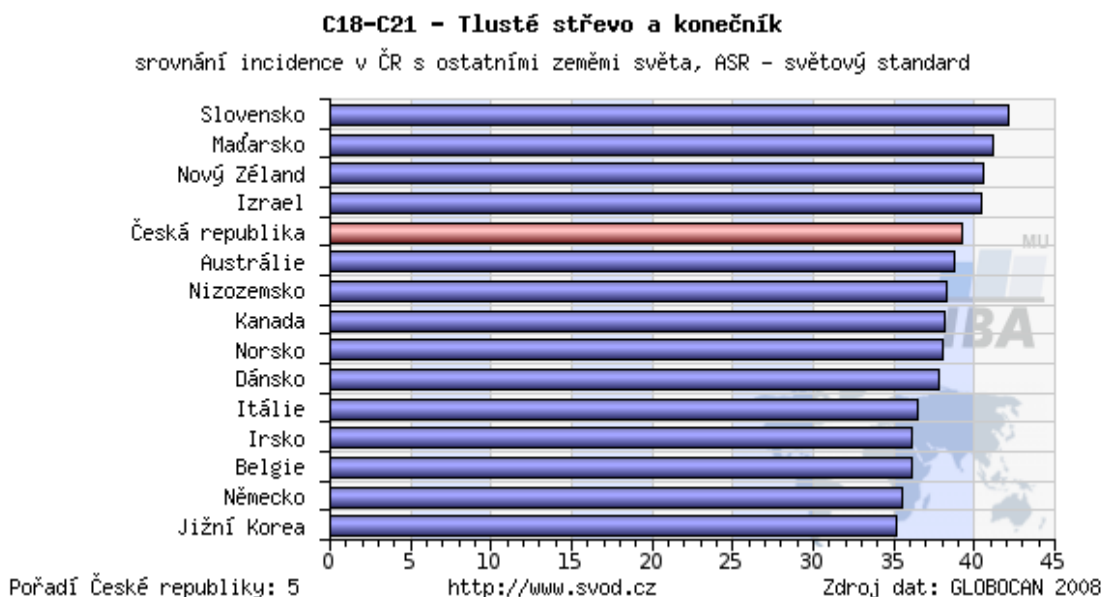
2.1 Kolorektální karcinom

2.1.1 Epidemiologie a etiologie

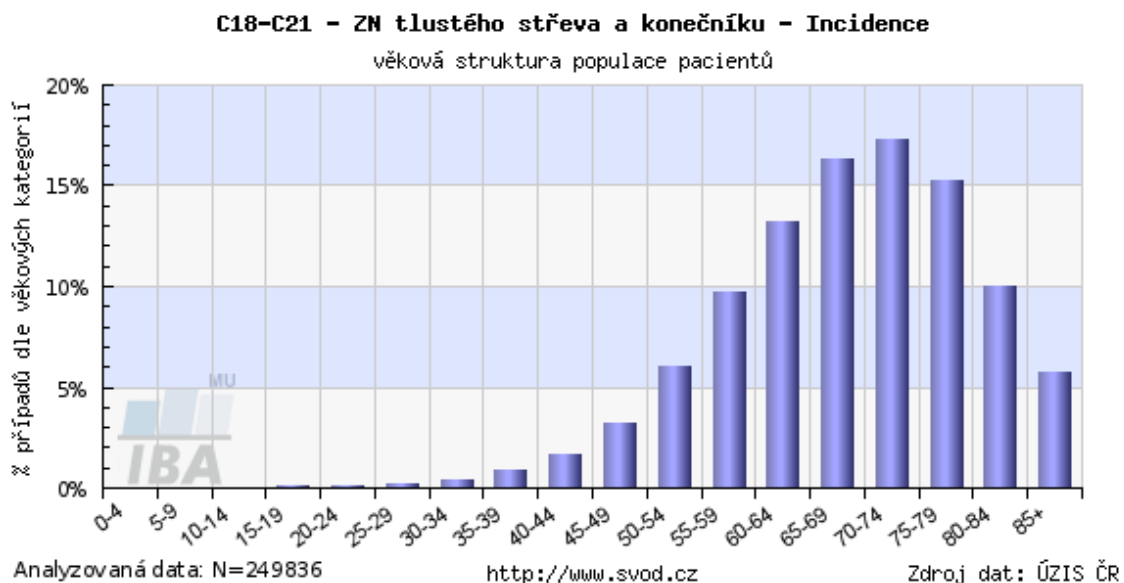
Kolorektální karcinom je zhoubné onemocnění tlustého střeva a konečníku. Jedná se o druhé nejčastější maligní onemocnění a nejčastější maligní onemocnění trávicí soustavy ve vyspělých zemích. Během tohoto onemocnění dochází k nekontrolovanému buněčnému růstu.

Dle statistických údajů se Česká republika řadí na páté místo výskytu kolorektálního karcinomu. Od roku 1977, kdy jsou dostupná data, se zvyšuje počet postižených touto nemocí. Od 50-ti let věku dochází ke zvyšující se incidenci tohoto onemocnění. Muži jsou postiženi tímto onemocněním častěji než ženy. Více než polovina případů kolorektálního karcinomu je zjištěna v pokročilém stádiu, které má horší prognózu. Mortalita na toto onemocnění je vysoká. Každý rok je diagnostikováno 8 000 nových pacientů a polovina z nich umírá (Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice).

Během posledních let dochází ke snižování mortality. Jedním z velkých důvodů může být i včasná diagnostika díky plošnému screeningu.



Obr. 1 Porovnání výskytu kolorektálního karcinomu v jednotlivých zemích
(Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice)



Obr. 2 Věkové rozložení výskytu kolorektálního karcinomu (Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice)

Rozlišujeme dva základní typy kolorektálního karcinomu. Sporadický typ je tvořen 80 % výskytu všech případů kolorektálního karcinomu, který vzniká v důsledku postupné akumulace mutací. Druhý, hereditární, typ se vyskytuje ve 20 % všech případů a vzniká na podkladu zděděné mutace. Zde řadíme syndrom mnohočetné adenomatózní polypózy, syndrom familiárního výskytu nepolypózních karcinomů tlustého střeva (Lynchův syndrom). V případě podezření, že se jedná o dědičnou formu, je indikováno genetické vyšetření (Diviš et al. 2016; Zavoral et al., 2013).

2.1.2 Patogeneze

Při vzniku kolorektálního karcinomu se postupně akumulují genetické mutace a epigenetické změny. Dochází k přestavbě normální střevní sliznice na nádorovou tkáň. Rozlišujeme tři patologické cesty vzniku kolorektálního karcinomu. Jednou z nejčastějších je chromozomální instabilita. Další dvě méně časté cesty jsou mikrosatelitní instabilita a metylace CpG ostrůvků (Král et al., 2016; Suchánek et al., 2011).

2.1.2.1 Chromozomální instabilita

Touto cestou vzniká asi 70 % případů kolorektálního karcinomu. Dochází k hromadění strukturálních a numerických abnormalit na chromozomu, které mohou vést k chybnému

počtu chromozomů, zmnožení DNA nebo k chromozomovému přeskupení. Při této poruše se objevuje mutace ve specifických onkogenech a tumor supresorových genech mezi které patří TP53 a APC gen (Král et al., 2016).

2.1.2.2 Mikrosatelitní instabilita

Zde dochází k mutaci genů, které opravují párování bází nukleotidů při replikaci DNA. Při jejich tvorbě může dojít ke špatnému párování bází a geny MutS Homolog 6 (MSH6), MutS Homolog 2 (MSH2), MutL Homolog 1 (MLH1) vyhledají toto špatné párování a zajišťují jejich nápravu. Při mutaci těchto genů nedochází ke správné opravě DNA a báze jsou špatně spárované (Král et al., 2016).

2.1.2.3 Metylace CpG ostrůvků

Metylace ovlivňuje zejména promotorovou oblast genu tím, že sníží jeho expresi. V této oblasti bývá zvýšený výskyt CG dinukleotidu, na kterém může docházet k metylaci. Geny, které jsou ovlivněny hypermethylací promotorové oblasti jsou především APC, MCC, MLH1, O⁶-methylguanin DNA methyltransferáza (MGMT) a další (Král J. et al., 2016). MGMT hraje důležitou roli v patogenezi kolorektálního karcinomu. Její funkcí je ochraňovat buňky před působením exogenních karcinogenů odstraňováním alkylskupiny z pozice O⁶-guaninu. Alkyl se naváže na promotorové místo v enzymu a tím dochází k obnově guaninu. Tato reakce je ireverzibilní a musí být syntetizován nový enzym (Král et al., 2016).

2.1.3 Faktory vzniku kolorektálního karcinomu

Faktory, které mohou způsobit vznik kolorektálního karcinomu, můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné.

Mezi neovlivnitelné faktory řadíme věk, pohlaví, genetickou predispozici a rasovou příslušnost. Věk je jeden z hlavních faktorů vzniku kolorektálního karcinomu. U lidí nad 50 let věku dochází k výraznému růstu incidence. Nejvíce ohroženou populací jsou lidé ve věku mezi 70 a 75 lety. Více ohroženi jsou muži než ženy. Dle studií bylo zjištěno, že kolorektální karcinom se objevuje ve větší míře u černošské populace.

Mezi faktory ovlivnitelné řadíme složení potravy. Negativní vliv má vysoký příjem tučných jídel, červeného masa. Nevhodné je také jeho časté upravování smažením, grilováním a pečením. Zvýšený výskyt kolorektálního karcinomu se objevuje také

u osob s abdominální obezitou. Dalšími faktory, které mohou způsobit vznik karcinomu je kouření cigaret a zvýšená konzumace alkoholu. Naopak zvýšení příjmu zeleniny, vitamínů A, C, E a minerálů selenu a vápníku v potravě a dostatek pohybu snižuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu.

Významný vliv na vznik karcinomu mohou mít také dysplastické změny, ulcerózní kolitida, Crohnova choroba (Program kolorektální screeningu).

Pacienti s diabetem 2. typu mají vyšší riziko vzniku kolorektálního karcinomu. (Diviš et al., 2016).

Mezi další faktory ovlivňující vznik kolorektálního karcinomu řadíme léčiva. Kladný vliv na snížení rizik mají nesteroidní antiflogistika. Pacienti užívající dlouhodobě aspirin nebo jiná protizánětlivá léčiva mají nižší riziko vzniku onemocnění. Dále je důkaz, že ženy, které v menopauze užívají dlouhodobě hormonální přípravky, mají nižší riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Jejich nevýhodou je ale i zvýšené riziko karcinomu prsu a také kardiovaskulárních onemocnění. Proto nelze doporučit užívání těchto látek z hlediska jejich dalších nežádoucích účinků. Takže pacienti, kteří je užívají dlouhodobě vzhledem k jiným zdravotním problémům, mají nižší riziko vzniku karcinomu (American Cancer Society, 2014).

2.1.4 Příznaky

V počátečních stádiích je onemocnění bez příznaků. Později poté dochází k objevení různých příznaků. Mezi tyto příznaky můžeme zařadit: krvácení z konečníku nebo krev ve stolici, tmavou nebo černou stolici, změny ve střevní činnosti, diskomfort v podbříšku, snížení chuti k jídlu, zácpu nebo průjem, náhlý úbytek hmotnosti. Někdy může krvácení a ztráta krve vést k anémii a docházet k únavě, vyčerpání, ospalosti a celkové slabosti (Diviš et al., 2016; Suchánek et al., 2011).

2.1.5 Diagnostika a screening

V časném stádiu je onemocnění asymptomatické, později se mohou objevovat některé z příznaků, proto je důležitý screening v populaci, aby bylo onemocnění zachyceno v raném stádiu a byla co největší šance na vyléčení.

V případě nalezení nádoru jsou nezbytná histologická vyšetření na určení lokalizace, rozsahu a biologického chování nádoru. Základním vyšetřením je vyšetření per rektum.

Zlatým standardem pro diagnostiku je endoskopické vyšetření kolonoskopie pro vysokou senzitivitu s možností bezprostřední intervence. Jednou z velkých nevýhod kolonoskopie je, že hodně pacientů má nesprávně připravené střevo pro vyšetření. Zde potom hrozí riziko přehlédnutí kolorektální neoplazie. Nutný je poté častější interval mezi vyšetřeními nebo opakování výkonu. Poté je prováděno CT břicha a malé pánve, skiagram či CT hrudníku a u karcinomu rekta ještě vyšetření endosonografické či zobrazení malé pánve magnetickou rezonancí (Diviš et al., 2016). K monitoraci efektu léčby jsou odebírány onkomarkery (CEA a CA19-9) (Diviš et al., 2016; Suchánek et al., 2011).

Od roku 2014 bylo v České republice zahájeno adresné zvaní občanů na preventivní vyšetření. Dochází k plošnému vyšetřování občanů za účelem včasné detekce kolorektálního karcinomu, kdy pacienti ještě nemají příznaky. U kolorektálního karcinomu dochází k pravidelným testům na okultní krvácení do stolice (TOKS) nebo provedení primárního kolonoskopického vyšetření. Lidé ve věku od 50 do 54 let by měli pravidelně jednou ročně podstoupit vyšetření na okultní krvácení do stolice. Vyšetření je zcela nenáročné a testy jsou k dostání u praktických lékařů. U lidí starších 55 let se může pokračovat v testech na okultní krvácení do stolice nebo je zde možné kolonoskopické vyšetření. V případě, že je toto vyšetření bez nálezu, postačí ho provést jednou za 10 let (Diviš et al., 2016).

2.1.5.1 Test na okultní krvácení

Jedná se o test, který zachycuje krev ve stolici. Existují dva typy těchto testů. Oba typy testů jsou založeny na detekci hemoglobinu. První typ je guajakový test, od kterého se ustupuje. Jeho nevýhodou bylo, že je nezbytné ve stravě eliminovat potraviny, které by mohly zkreslovat výsledky. Jedná se o potraviny obsahující hemoglobin. Dle doporučení bylo nutné vyhnout se protizánětlivým léčivým přípravkům, červenému masu, alespoň tři dny před testováním, aby bylo zabráněno falešně pozitivním výsledkům. Nyní už se používá imunologický typ testu, u kterého toto omezení odpadá. Dochází zde k detekci hemoglobinu pomocí monoklonální protilátky, která rozpozná lidský hemoglobin. Jedná se o velmi citlivý typ testu. Tyto imunochemické testy můžeme rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativní test ukáže, zda je výsledek pozitivní, či negativní. Kvantitativní vyhodnotí množství hemoglobinu ve vzorku (American Cancer Society, 2014; Diviš et al. 2016).

V případě positivity testu je pacient odeslán na kolonoskopické vyšetření, kde je zjišťováno, zda se jedná o polypy či rakovinu. Tímto testováním byla velmi snížena úmrtnost na kolorektální karcinom. Dále byly odhaleny a včasné léčeny prekancerózní polypy. Je nutné dodržovat určité zásady a používat kvalitní testy, aby byl screening efektivní.

Pokud test vyjde pozitivní, neznamená to, že se jedná o kolorektální karcinom. Krev ve stolici může být způsobena přítomností polypů, Crohnovou chorobou či diverkultidou. Proto je nezbytné podstoupit další vyšetření.

V dnešní době se dají testy zakoupit i bez doporučení lékaře a provést testování v domácích podmínkách.

2.1.6 Klasifikace

Od roku 2011 je u nás používána TNM klasifikace zhoubných novotvarů. Písmenem T se označuje rozsah primárního nádoru. Písmeno N značí nepřítomnost či přítomnost a rozsah metastáz v regionálních mízních uzlinách a písmeno M ukazuje přítomnosti či nepřítomnosti vzdálených metastáz. Ke každému písmenu se dále přiřazují čísla, kterými je dán rozsah postižení.

Tab. 1 TNM klasifikace – písmeno T: rozsah primárního nádoru (Zavoral et al., 2013)

T	
T_x	Nádor nemůže být vyloučen
T₀	Žádný primární nádor
T_{is}	Karcinom in situ, invaze do lamina propria mucosae
T₁	Invaze do submukózy
T₂	Invaze do muskularis propria
T₃	Invaze přes muskularis propria
T_{4a}	Nádor prorůstá na viscerální peritoneum
T_{4b}	Nádor prorůstá do okolních orgánů

Tab. 2 TNM klasifikace – písmeno N: metastázy v regionálních lymfatických uzlinách (Zavoral et al., 2013)

N	
Nx	Postižení uzlin nemůže být vyloučeno
N0	Bez postižení regionálních lymfatických uzlin
N1	Postižení 1 – 3 regionálních lymfatických uzlin
N1a	1 uzlina
N1b	2 – 3 uzliny
N1c	Satelity v subseróze, bez postižení regionálních lymfatických uzlin
N2	Postižení 4 a více regionálních lymfatických uzlin
N2a	4 – 6 uzlin
N2b	7 a více uzlin

Tab. 3 TNM klasifikace – písmeno M: vzdálené metastázy (Zavoral et al., 2013)

M	
Mx	Vzdálené metastázy nemohou být vyloučeny
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálená metastáza
M1a	Metastáza omezená na jeden orgán (játra, plíce, vaječník, neregionální lymfatická uzlina)
M1b	Metastáza ve více než jednom orgánu nebo postižení peritonea

Pro snadnější použití TNM klasifikace v klinické praxi, je kolorektální karcinom rozdělen do pěti základních stádií, které z této klasifikace vycházejí.

Tab. 4 Stádia kolorektálního karcinomu dle TNM klasifikace (Diviš et al., 2016)

Stadium 0	Tis, N0, M0
Stadium I	T1-2, N0, M0
Stadium II	T3-4, N0, M0
Stadium III	Jakékoliv T, N1, N2, M0
Stadium IV	Jakékoliv T, jakékoliv N, M1 + lokálně pokročilé inoperabilní onemocnění

2.1.7 Léčba

Mezi terapeutické postupy v léčbě kolorektálního karcinomu patří chirurgická léčba, chemoterapie, cílená biologická léčba nebo radioterapie. Pro výběr léčby je důležitá správná diagnostika a určení velikosti a rozsahu nádoru dle klasifikace TNM. Nejúspěšnější je léčba při zachycení onemocnění ve velmi časném stádiu.

V případě časného stádia je indikovaná chirurgická resekce. U malých typů nádorů je možné odstranění při kolonoskopickém vyšetření. Pokud je nádor pokročilý přistupuje se k neoadjuvantní chemoradioterapii, což je kombinace radioterapie a chemoterapie. Snižuje se tak riziko lokální recidivy a prodlužuje se přežití. Dále může po této terapii dojít ke zmenšení nádoru a zvyšuje se možnost resekce bez trvalé kolostomie.

Po resekci primárního nádoru je na základě histologického vyšetření rozhodnuto o indikaci adjuvantní (zajišťovací) chemoterapie (Diviš et al., 2016). Tím se předchází recidivě onemocnění a dochází ke zničení zbývajících nádorových buněk. Nejobtížnější na léčbu jsou rozšířená metastatická ložiska kolorektálního karcinomu, která nejčastěji vznikají v játrech, ale objevují se i v plicích a v jiných orgánech. Nejčastěji používaná cytostatika v léčbě kolorektálního karcinomu jsou 5-fluorouracil, irinotekan, oxaliplatin, kapecitabin, raltitrexed. Dále může být použita cílená biologická léčba, která se uplatňuje především u pacientů s metastázemi a kombinuje se s chemoterapií (Diviš et al., 2016).

Dle klinické klasifikace kolorektálního karcinomu u stádia 0 a I je doporučována chirurgická léčba a adjuvantní chemoterapie není indikována. U stádia II a III také dochází k chirurgickému zákroku a po dobu 6 měsíců probíhá adjuvantní chemoterapie, kde záleží na přesném zhodnocení stavu pacienta. U posledního čtvrtého stádia probíhá systémová paliativní chemoterapie a cílená léčba metastatického karcinomu (Diviš et al., 2016).

2.1.8 Nežádoucí účinky léčby

Nežádoucí účinky vyvolává především léčba pomocí chemoterapie. Látky používané při chemoterapii dokážou zničit rychle rostoucí a množící se buňky, ale nerozlišují, zda jsou to buňky rakovinotvorné nebo tělu vlastní a jsou poškozeny i zdravé buňky. Velmi častým nežádoucím účinkem je zvracení a nevolnost. Bývá zde i ztráta chuti k jídlu. Tyto příznaky je možné ovlivnit některými dietními opatřeními (malé porce

jídla, používat z lékárny dostupné výživové doplňky, např. Nutridrinky, aby byl zajištěn alespoň nějaký příjem živin, konzumovat spíše studená, netučná a nesmažená jídla).

Chemoterapie také významně ovlivňuje krvetvorbu. Dochází ke snížení počtu jednotlivých krevních buněk. Při snížení počtu bílých krvinek hrozí riziko infekce. Při snížení krevních destiček může být zvýšené riziko krvácení, mohou vznikat modřiny na kůži, objevit se krev v moči. V případě nedostatku červených krvinek dochází k anémii a s tím související únavě, vyčerpání, ospalosti a slabosti.

Dalším problémem zejména působícím na psychickou stránku jedince je vypadávání vlasů. Po skončení chemoterapie dochází k jejich opětovnému růstu. Tento problém se může řešit pomocí paruky.

Po chirurgickém zákroku se objevují bolesti břicha. Je důležité ránu kontrolovat, aby nedošlo k infekci. V případě stomie jsou nutná hygienická opatření a může dojít k podráždění pokožky.

2.2 Humulus lupulus

Rostlinu *Humulus lupulus*, chmel otáčivý, řadíme do čeledi Cannabaceae, konopovité. Jedná se o trvalou, dvoudomou rostlinu. Její květenství jsou snadno rozlišitelná. Je celosvětově známá díky tomu, že je to jedna ze základních složek pro přípravu piva. Chmel otáčivý má dlouhou historii v používání v tradiční medicíně, kde je doporučován jako mírné antidepresivum, proti nespavosti, nervozitě. V tradiční čínské medicíně má široké uplatnění při léčbě nespavosti, dyspepsie, neklidu a při dalších nemocech. Výbor HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products), který patří pod Evropskou lékovou agenturu, vydal zprávu o používání chmelu při středních obtížích na uvolnění stresu a nespavosti. Hlavními rostlinnými metabolity identifikovanými v chmelových šišticích jsou především terpeny, hořké kyseliny a chalkony. Terpeny byly zjištěny jako éterické oleje, mezi které patří karyophylen a farnesen (Zanoli Paola a Zavatti Manuela, 2008).

Hořké kyseliny jsou fluoroglucinolové deriváty, které obvykle rozdělujeme na α -kyseliny a β -kyseliny. Hlavními α -kyselinami jsou humulon, cohumulon a adhumulon. U β -kyselin je pojmenování analogické a hlavními kyselinami jsou lupulon, colupulon a adlupulon. α -kyseliny jsou důležité pro výrobu piva, protože se podílejí na udržení stability pивní pěny a uplatňují se pro svou antibakteriální

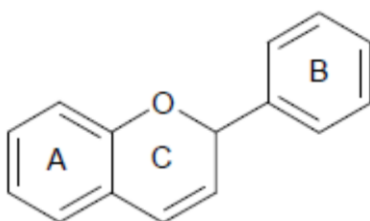
aktivitu. Teplem a vyšším pH isomerují na iso- α -kyseliny, které jsou více hořké a způsobují typickou chuť piva (Zanoli Paola a Zavatti Manuela, 2008).

Dalšími obsahovými látkami jsou prenylflavonoidy, zejména xanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin. Největší množství těchto látek nalezneme především v samičích šišticích.

Během růstu a dozrávání rostliny dochází ke změnám obsahu jednotlivých látek. Tyto změny také závisí na druhu chmele a podmínkách pěstování.

2.3 Prenylflavonoidy

Prenylflavonoidy jsou přírodní látky, které řadíme mezi flavonoidy. Flavonoidy jsou jedna z největších skupin sekundárních metabolitů rozšířených v mnoha rostlinných druzích. Základní strukturou je flavanový cyklus (2-fenyl-benzo- γ -pyran). Skládá ze dvou benzenových jader (kruhy A a B), které jsou spojeny přes vazbu s kyslíkem a vytváří pyranový kruh. Kruh C může být také otevřen a tyto deriváty se poté nazývají chalkony. Biologická aktivita flavonoidů závisí na struktuře sloučeniny, množství a pozici substituentů (Venturelli et al., 2016).



Obr. 3 Flavanový skelet (Chemické listy 106, 2012)

Na tento základní skelet mohou být navázány různé substituenty. Jedním z nich jsou také jedna nebo více prenylových skupin. Tyto deriváty se nacházejí v různých rostlinných řádech, nejvíce je jich však v těchto třech: Asteraceae, Cannabaceae a Leguminoseae. Z těchto řádů je nejvyšší obsah prenylflavonoidů nalezen v rostlině *Humulus Lupulus* (chmel otáčivý). Prenylová skupina v molekule zvyšuje její lipofilitu, afinitu k membránám a transmembránový přenos. Ve výzkumné oblasti je o tyto sloučeniny velký zájem, díky jejich rozličnému působení na lidský organismus. Působí

jako fytoestrogeny, mají antioxidační, antikoagulační, protizánětlivý, protimikrobní, protivirovou a anthelmintickou aktivitu a také protirakovinné působení (Venturelli et al., 2016).

Nejznámější zástupce těchto sloučenin je xanthohumol, který se v chmelu vyskytuje v největším množství. Dalšími sloučeninami jsou desmethylxanthohumol, 6-prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin, isoxanthohumol, kterých se nachází v rostlině menší množství.

2.3.1 Metabolismus prenylflavonoidů

Pro lidský organismus jsou prenylflavonoidy cizorodými látkami, xenobiotiky, a organismus má různé nástroje na jejich odstranění. Jednou z cest metabolizace prenylflavonoidů je jejich přestup přes stěnu tenkého střeva do krve a následná konjugace v játrech s kyselinou glukuronovou. Tento konjugát je následně vyloučen žlučí do tenkého střeva a dále přeměňován bakteriemi tlustého střeva. Prenylflavonoidy mohou být také metabolizovány oxidačními reakcemi zprostředkovanými převážně cytochromem P450.

Xanthohumol a další prenylflavonoidy, které se nacházejí v chmelu, prochází během přípravy piva a následnou konzumací různým metabolismem. Dominantními látkami v chmelu jsou xanthohumol a desmethylxanthohumol. Tyto látky jsou během procesu přípravy piva teplem přeměňovány na další deriváty. Xanthohumol je přeměňován na prenylflavonoid isoxanthohumol a z desmethylxanthohumolu vzniká racemická směs 6-prenylnaringeninu a 8-prenylnaringeninu. Isoxanthohumol je dále v trávicím traktu pomocí střevních bakterií metabolizován O-methylací na 8-prenylnaringenin (Zanoli Paola a Zavatti Manuela, 2008).

2.3.2 Antioxidační vlastnosti

Antioxidační vlastnosti prenylflavonoidů se projevují několika způsoby. Působí jako lapači volných reaktivních částic, jsou schopny inhibovat aktivitu lipooxygenas a chelatací kovových iontů brání jejich katalytické činnosti a tím vzniku reaktivních částic (Karabín et al., 2012).

Reaktivní částice jsou zejména formy kyslíku, radikály, mezi které řadíme hydroperoxidový, hydroxylový, superoxidový. Tyto molekuly mohou podnítit sled

reakcí, kterými jsou v organismu modifikovány polynenasycené mastné kyseliny, proteiny a nukleové kyseliny (Karabín et al., 2012). Tyto změny mohou souviset s rozvojem civilizačních onemocnění, jedním z nich může být rakovinné postižení.

Dále mohou také inhibovat lipooxygenasu, což má velký význam pro rozvoj aterosklerózy. Při vzniku aterosklerózy dochází k oxidaci lipidových sloučenin a prenylované flavonoidy jsou schopny této reakci bránit. Také mohou inhibovat některé typy lipooxygenas. Inhibice může být zajištěna několika mechanismy, chelatací iontů železa, pohlčováním vzniklých hydroperoxidů. Zde to závisí hlavně na prostorovém uspořádání jednotlivých molekul a na polohách jednotlivých skupin v molekule (Karabín et al., 2012).

2.3.3 Protirakovinné působení

Rakovinné onemocnění je ve vyspělých státech jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Neustále se hledají nové látky, které mají chemoprotektivní účinek. Do popředí zájmu se dostávají rostlinné metabolity a jedním z nich jsou i prenylflavonoidy. Jedním z mechanismů, který působí proti vzniku rakovinných buněk je inhibice metabolické aktivace enzymů. Během odstraňování xenobiotik z lidského organismu dochází k řadě reakcí, které vedou ke zvýšení polaritě dané sloučeniny, aby byla dobře rozpustná ve vodě a dala se snadno vyloučit z organismu. Tyto reakce probíhají ve dvou fázích. V první fázi dochází k oxidačním, demethylačním a hydroxylačním reakcím pomocí cytochromu P450. Druhá fáze spočívá v konjugaci těchto produktů s malými molekulami, jako jsou glycin, cystein, glukuronát. Tím dochází ke zvýšení polaritě molekuly. Všechny tyto reakce mohou vést nejen k detoxifikaci, ale také ke vzniku toxických produktů, kancerogenů, mutagenů. Prenylflavonoidy mohou ovlivňovat a inhibovat některý z enzymů a tím snižovat vznik toxických produktů. Mají vliv na metabolismus heterocyklických aminů a benzopyrenu, které vznikají při úpravě potravin (Karabín et al., 2012).

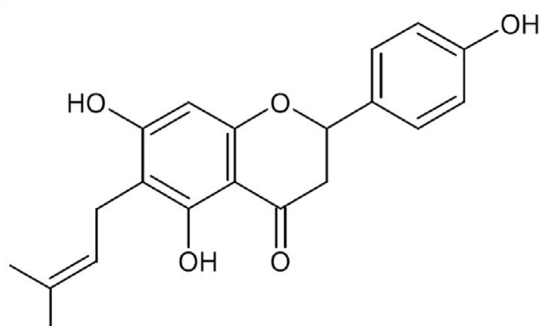
Dále mohou působit na enzymy druhé fáze, kde dochází k jejich indukci. Jedním z těchto enzymů je NAD(P)H: chinonreduktasa katalyzující přeměnu chinonů redukcí na hydrochinony. Hydrochinony jsou vhodnějšími substráty pro následnou konjugaci. V experimentech bylo prokázáno, že přítomnost prenylové skupiny je pro tento typ indukce nezbytná. Sloučeniny bez této skupiny jsou prakticky neúčinné. V případě, že

dojde ke vzniku nádoru selháním ochranných mechanismů, jsou nastartovány další mechanismy, které tento proces zpomalí či zastaví (Karabín et al., 2012).

Prenylflavonoidy vykazují i antiproliferační účinek. Je zřejmé, že některé nádorové onemocnění je spojené se vznikem chronického zánětu, kdy dochází k produkci protizánětlivých faktorů prostaglandinů a oxidu dusnatého. Zvýšená tvorba protizánětlivých faktorů je způsobena aktivací regulačního jaderného faktoru κ B, který následně podnítlí transkripci genu pro tvorbu enzymů cyklooxygenázy, zejména COX-2 a následně dochází ke vzniku prostaglandinů, kyseliny arachidonové. Při nadměrné produkci kvůli narušené regulaci může dojít ke vzniku rakovinného bujení. Prenylflavonoidy zde mohou působit svými antiproliferačními účinky na inhibici jaderného faktoru κ B a dochází tak ke snížené produkci všech faktorů ovlivňujících zánět (Karabín et al., 2012).

2.3.3.1 6-prenylnaringenin

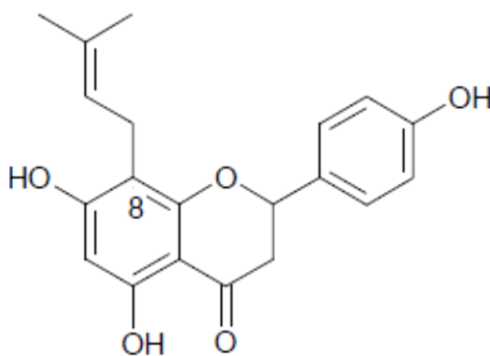
Přírodní zdroje 6-prenylnaringeninu jsou velmi vzácné. Malé množství najdeme v chmelových šišticích, ale většina 6-prenylnaringeninu se tvoří až během výroby piva z desmethyloxanthohumolu. 6-prenylnaringenin je inhibitor cytochromu 1A2, který hraje roli v metabolismu estrogenů a některých xenobiotik, např. kofeinu. Vykazuje antiproliferační, antioxidační aktivitu. U tohoto prenylflavonoidu ve vysokých koncentracích nacházíme cytotoxický účinek. Mechanismus účinku je zatím nejasný. Zdá se, že je nezávislý na aktivaci kaspázy 3 a nejsou zde typické znaky buněk podstupujících apoptózu. Vykazuje jen malou estrogení aktivitu (Venturelli et al., 2016).



Obr. 4 Vzorec 6-prenylnaringeninu (Venturelli et al., 2016)

2.3.3.2 8-prenylnaringenin

8-prenylnaringenin můžeme nalézt v chmelu. Dalším jeho zdrojem je přeměna desmethylxanthohumolu na 8-prenylnaringenin a také 6-prenylnaringenin. 8-prenylnaringenin dále vzniká přeměnou isoxanthohumolu střevní mikroflórou. Podobně jako 6-prenylnaringenin i 8-prenylnaringenin je inhibítoem cytochromu 1A2. Dále působí 8-prenylnaringenin jako slabý inhibitor COX-1. U 8-prenylnaringeninu nacházíme i výraznou estrogenní aktivitu. To je významné především pro ženy během klimakteria, kdy dochází k hormonálním změnám, zejména ke snížení produkce estrogenů. To má za následek nežádoucí účinky a jedním z nich je úbytek kostní hmoty a vyšší riziko zlomenin. Dále se objevují nepříjemné příznaky spojené s menopauzou, kam můžeme zařadit pocení, návaly horka, poruchy spánku, časté změny nálad, deprese. Tyto příznaky mohou být zmírněny pomocí fytoestrogenů a chmel je jedním ze zdrojů. Dříve se předpokládalo, že největší fytoestrogenní aktivitu má xanthohumol. Nyní je považován 8-prenylnaringenin za nejúčinnější z izolovaných fytoestrogenů. 8-prenylnaringenin ovlivňuje estradiolové receptory, u kterých rozlišujeme dva subtypy: ER α a ER β . Větší afinitu nacházíme k receptoru ER α . Dále vykazuje účinek antiestrogenní tím, že působí kompetitivní inhibicí a může zabránit estrogenu navázat se na receptor. Nedostatek hormonů je dnes kompenzován hormonální substituční terapií, kdy dochází k aplikaci velké dávky hormonů. Dochází zde sice ke snížení projevů klimakteria, ale mohou se objevit závažné nežádoucí účinky na kardiovaskulární systém, je zde vyšší riziko karcinomu dělohy a prsu a vyšší riziko vzniku trombózy. To je rozdíl od fytoestrogenů, u kterých zatím žádné z těchto nežádoucích účinků zjištěny nebyly (Venturelli et al., 2016; Karabín et al., 2012).



Obr. 5 Vzorec 8-prenylnaringeninu (Chemické listy 106, 2012)

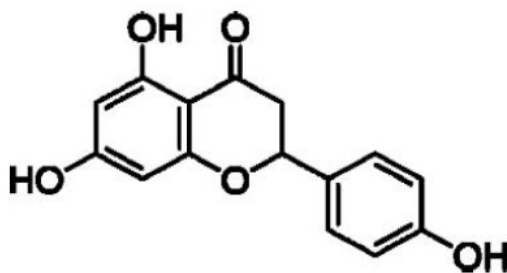
2.4 Naringenin

Naringenin je rostlinný metabolit, který se nachází ve vysoké koncentraci především v citrusových plodech. V nízké koncentraci se objevuje i v rajčatech. Patří do skupiny flavonoidů a podskupiny flavanonů. Základem struktury naringeninu je flavanový skelet. Na tento skelet jsou navázány v molekule naringeninu tři hydroxylové skupiny. Naringenin je testovanou látkou pro jeho antiproliferativní, antioxidační, protizánětlivé účinky. Existuje v několika formách, nejčastěji ve třech hlavních: glykosylovaný, ve formě aglykonu a neohesperidosid. V pomerančích a grapefruitech se vyskytuje v glykosylovaných formách. V pomerančích je hlavní formou naringeninu narirutin. V grapefruitech se nachází naringenin-7-neohesperidosid, neboli naringinin. Biodostupnost naringeninu závisí na tom, v jaké formě se vyskytuje. Ve formě aglykonu přechází přes stěnu tenkého střeva do krve pomocí pasivního transportu, na rozdíl od glykosylovaných forem, které jsou více hydrofilní. U nich dochází velmi často k enzymatickému odštěpení cukerné složky pomocí střevních bakterií (Mir et al., 2014).

U naringeninu pozorujeme antiproliferativní účinek. Mechanismem účinku je indukce apoptózy, inhibice protizánětlivých markerů a zastavení buněčného cyklu.

Naringenin působí proti vzniku aterosklerózy. Při tomto onemocnění dochází k oxidaci lipidů a vzniku zánětu. Při zvýšené produkci reaktivních kyslíkových radikálů dochází k aktivaci buněk imunitního systému a tvorbě prozánětlivých cytokinů, jako je TNF- α . Naringenin působí proti volným radikálům a snížení tvorby TNF- α , čímž dochází ke snížení zánětlivé odpovědi a rizika vzniku aterosklerózy.

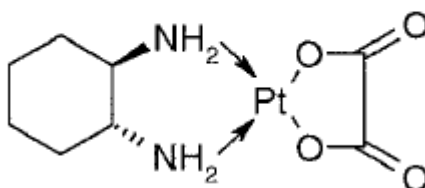
U naringeninu se vyskytuje protizánětlivý, antiproliferativní účinek, působí jako lapač volných radikálů, modulátor imunitního systému. Tyto účinky naringeninu mohou být použity v prevenci a léčbě celé řady onemocnění.



Obr. 6 Vzorec naringeninu (Mir and Tiku, 2014)

2.5 Oxaliplatina

Oxaliplatina je derivát sloučenin platiny, který se řadí do třetí generace těchto sloučenin. Je používán k léčbě onkologických onemocnění. Jedná se o nejnovější derivát platiny, který je používán ve standardní chemoterapii. Od karboplatiny a cisplatiny se tato sloučenina liší strukturou. Oxaliplatina nemá ve své molekule volné aminoskupiny, ale obsahuje cyklus zvaný diaminohexan, ve kterém jsou molekuly dusíku, které jsou součástí aminoskupin, vázané v tomto diaminohexanovém cyklu. Je to sloučenina, která je snadno rozpustná ve vodě a téměř nerozpustná v etanolu a acetonu. Jedná se o základní sloučeninu, která se používá k léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. Další sloučeniny platiny, karboplatina a cisplatina, jsou v klinické praxi také používány, ale u kolorektálního karcinomu jsou neúčinné. Oxaliplatina se podává nejčastěji v kombinaci s 5-fluorouracilem nebo cílenou protinádorovou léčbou, aby se předešlo případné rezistenci a byla zajištěna dostatečná léčba (Aclindor et al., 2011; Melichar, 2005).



Obr. 7 Vzorec oxaliplatiny (Graham et al., 1999)

2.5.1 Mechanismus účinku

Oxaliplatina působí cytotoxicky na buňky. Působení spočívá v poškození DNA a aktivaci apoptózy. Ta může být aktivována několika cestami: poškození tvorby DNA, zastavení DNA syntézy, inhibice syntézy RNA a spuštění imunologické reakce (Aclindor et al., 2011).

Po vstupu do buňky dochází v její molekule k nahrazení oxalátové skupiny vodou nebo nukleofilními ionty (HCO_3^-). Výhodou je, že biotransformace neovlivňuje cytochrom P450, a proto zde není příliš velké riziko lékových interakcí.

2.5.1.1 Poškození DNA

Poškození DNA probíhá zejména tvorbou příčných vazeb uvnitř vláken i mezi vlákny navzájem. Dochází zde k tvorbě kovalentních vazeb mezi molekulami oxaliplatiny

a DNA, což vede k apoptóze buněk. Tvorba vazeb uvnitř vláken je nejdominantnější mechanismus účinku. Nejčastěji dochází k vazbě mezi dvěma molekulami guaninu, méně častá je tvorba páru guanin-adenin (Aclindor et al., 2011).

2.5.1.2 Zastavení syntézy DNA

Experimenty ukazují, že kombinace oxaliplatiny a 5-fluorouracilu je výhodná v tom, že je zde přímý inhibiční efekt na thymidilát syntázu, tím se zabrání inkorporaci thymidinu do nukleové kyseliny během syntézy. Tento efekt má za následek zastavení mitotického procesu.

2.5.1.3 Inhibice syntézy RNA

Inhibice replikace DNA není dostačující pro buněčnou smrt, ale inhibice transkripce v iniciační a elongační fázi zde hraje klíčovou roli. Existují tři hlavní mechanismy inhibice transkripce pro oxaliplatinu. Prvním je vazba faktorů transkripce. V iniciační fázi slouží komplex platina a DNA jako vazebné místo pro transkripční faktory, zvláště pro ty, které mají velkou afinitu k platině, a tím je zabráněno vazbě faktorů na promotorová místa. Dalším mechanismem je inhibice RNA-polymerázy. Tento mechanismus je zásadní pro cisplatinu, ale předpokládá se, že oxaliplatinu funguje stejným způsobem. Komplexy platiny a DNA nejsou schopny se navázat na aktivní místa RNA polymerázy. Jako poslední hrají roli nukleosomální DNA komplexy. Tyto komplexy blokují přístup RNA polymerázy do templátové DNA (Aclindor et al., 2011).

2.5.1.4 Spuštění imunologické reakce

Po vystavení buněk oxaliplatinou, nádorové buňky vysílají imunogenní signály na jejich povrch před probíhající apoptózou. Tyto signály spouští produkci interferonu γ pomocí T buněk, dále mohou probíhat reakce s toll-like receptorem 4 dendritických buněk. Celý tento proces vede k jakési protinádorové vakcinaci (Aclindor et al., 2011).

2.5.2 Rezistence na oxaliplatinu

I přes citlivost oxaliplatiny se může na toto cytostatikum vyvinout rezistence. Může být způsobená sníženým vstupem do buňky nebo prostorovými změnami navázáním jiných molekul. Hlavní důvod rezistence je zřejmě spojený s opravou DNA. Prevencí rezistence je proto kombinace oxaliplatiny s jinými typy cytostatik.

2.5.3 Nežádoucí účinky

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří vliv na hematopoetický systém, gastrointestinální obtíže a postižení periferních nervů.

2.5.3.1 Gastrointestinální obtíže

Nejčastější gastrointestinální obtíže způsobené oxaliplatinou jsou nevolnost a zvracení. Jsou většinou mírné a dají se kontrolovat a předcházet jim podáním léčiv ze skupiny antagonistů 5-HT₃ receptoru. Horší jsou nevolnosti při použití kombinační terapie, ale tyto účinky nepřeváží prospěšnost léčby a málokdy je nutné z tohoto důvodu přerušit léčbu (Cassidy a Misset, 2002).

2.5.3.2 Neurotoxicita

Rozlišuje se akutní neurotoxicita a kumulativní senzorická neuropatie.

Akutní periferní neuropatie je charakterizována parestezií, dysestézií nebo alodynii během podávání infúzí nebo krátce poté. Je často spuštěná po vystavení se chladu. Pro pacienty je velmi nepříjemná faryngolaryngeální dysestezie, která se může projevit potížemi s dýcháním a obtížným polykáním. Obvykle vymizí během pár hodin nebo dnů. Experimenty ukazují, že se jedná o komplex spojený s napětově řízenými sodíkovými kanály spolu s vápníkem (Aclindor et al., 2011; Melichar, 2005).

Senzorická forma periferní neuropatie vzniká v důsledku hromadění sloučenin platiny v organismu, proto se nedoporučuje podávání oxaliplatiny ve více než 6 – 8 cyklech léčby. Jedná se o chronickou toxicitu. Dochází zde také k ovlivnění sodíkových kanálů, jako u akutní formy, ale také se zde setkáváme se sekundární akumulací sloučenin platiny v zadním míšním ganglionu způsobující atrofii a mitochondriální dysfunkci. Většinou se projevuje snížením citlivosti v periferních oblastech. Některé studie naznačují, že je vhodné jako prevenci podávat infúze s obsahem glukonátu kalcia a magnesium sulfátu před a po podání oxaliplatiny. Není žádný důkaz o tom, že by to mělo mít negativní vliv na účinek oxaliplatiny (Aclindor et al. 2011; Melichar, 2005).

2.5.3.3 Hematopoetický systém

Oxaliplatina je mírně myelotoxická a má vliv na vývoj buněk v kostní dřeni. Může se vyskytnout neutropenie, anémie a trombocytopenie. Anémie a trombocytopenie nejsou

obvykle příliš vážné. Ve větším procentu se vyskytuje neutropenie, ale pouze u 4 % pacientů se vyskytuje neutropenická horečka (Aclindor et al., 2011).

3 CÍL PRÁCE

1. Stanovení antiproliferačního účinku 6-prenylnaringeninů, 8-prenylnaringeninů a naringeninů na buněčnou linii SW620
2. Stanovení antiproliferačního účinku 6-prenylnaringeninů, 8-prenylnaringeninů a naringeninů na buněčnou linii SW480
3. Stanovení antiproliferačního účinku oxaliplatin na buněčné linie SW480 a SW620
4. Stanovení kombinačních indexů 6-prenylnaringeninů, 8-prenylnaringeninů a naringeninů s oxaliplatinou metodou Chou-Talalay

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

Buněčné linie SW480 a SW620 – (ATCC, UK)

6-prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin, naringenin – (Sigma-Aldrich, ČR)

Oxaliplatina – (Sigma-Aldrich, ČR)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose – (Biosera, Francie)

HEPES – (Sigma-Aldrich, ČR)

FBS – (Lonza, ČR)

Gentamycin – (Sigma-Aldrich, ČR)

PBS fosfátový pufr v tabletách – (Sigma-Aldrich, ČR)

Trypsin-EDTA – (Lonza, ČR)

Neutrální červeň – (Sigma-Aldrich, ČR)

DMSO – (Sigma-Aldrich, ČR)

Tryptanová modř – (Biotech, ČR)

Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.2 Pomůcky a přístroje

4.2.1 Pomůcky

Sterilní kultivační lahve, sterilní mikrotitrační destička – 96 jamek, pipetík, sterilní jednorázové pipety (5 a 10 ml), mikrozkuhavky, kádinky, manuální a automatické pipety (jedno i multikanálové), špičky (sterilní a nesterilní), Bürkerova komůrka, jednorázové rukavice, stojan na zkumavky

4.2.2 Přístroje

Laminární box (BioAir AURA 2000 M.A.C.)

CO₂ Inkubátor (HeraCell)

Termomixér (IKA MS2 Minishaker)

Mikroskop (Nikon)

Vodní lázeň (Memmert)

Spektrometrický a spektrofluorimetrický analyzátor (Tecan Infinite M 200)

Vortex (V-1 plus, BioSan)

4.3 Metodika

4.3.1 Buněčné linie

Buněčná linie SW480 byla získána z kolorektálního adenokarcinomu. Byla izolována z tkáně 50-ti letého muže, bělocha. Tato buněčná linie byla odvozena o rok dříve než linie SW620.

Buněčná linie SW620 byla získána z lymfatických uzlin, kam metastazovala z kolorektálního adenokarcinomu. Byla izolována o rok později z tkáně stejného muže jako SW480.

Obě linie buněk jsou adherentní, rostou na specifickém povrchu a pochází z banky buněčných kultur ATCC (American Type Culture Collection). Buněčné linie jsou pěstovány za přesně definovaných podmínek týkajících se typu media, séra a jiných látek, které ke svému růstu potřebují (Slabý, 2015).

4.3.2 Kultivační médium

Pro růst buněk je velmi důležitý výběr kultivačního media. Bylo používáno medium DMEM high glucose, které bylo nutné před prvním použitím správně připravit. K tomu bylo nutné FBS (fetal bovine serum), HEPES a gentamycin (antibiotikum).

Bylo odebráno 50 ml media a následně do lahve s mediem přidáno 50 ml FBS, 5 ml HEPES a 0,5 ml gentamycinu. Medium bylo důkladně promícháno, aby byla zajištěna homogenita směsi. Veškeré práce byly prováděny ve sterilním laminárním boxu.

FBS (fetal bovine serum) je sérum, které obsahuje velké množství molekul různé velikosti, které jsou nezbytné pro růst, proliferaci a přežití buněk.

HEPES je pufr, který udržuje stálé pH v rozmezí hodnot 7,2 – 7,4.

Tab. 5 Složení kultivačního media pro buněčné linie

Složka média	Médium	FBS	HEPES	Gentamicin
Množství	450 ml	50 ml	5 ml	0,5 ml

4.3.3 Pasážování buněk

Pasážování buněk bylo prováděno dvakrát týdně.

Asi 20 minut před samotnou prací bylo nutné si ve vodní lázni nahřát kultivační medium, PBS a těsně před prací vložit trypsin. Do laminárního boxu byly připraveny sterilní pipety, odpadní kádinka, nová kultivační láhev a pipetík. Dále bylo nutné zkontrolovat buňky pod mikroskopem, zda dosáhly potřebné konfluence a nedošlo k jejich kontaminaci.

Do laminárního boxu byly přeneseny buňky, zahřátý trypsin, PBS a kultivační medium. Staré medium bylo přelito do odpadní kádinky, a poté buňky opláchnuty dvakrát 7 ml PBS. Dále byly nabrány 2 ml trypsinu a přidány k buňkám a necháno půl minuty inkubovat. Po půl minutě byly odebrány 2/3 trypsinu, kultivační láhev byla uzavřena a vložena na 3-4 minuty do inkubátoru. Pravidelně byly buňky kontrolovány pod mikroskopem, zda jsou odděleny od kultivační láhve. K buňkám byly přidány 4 ml media, aby bylo ukončeno působení trypsinu. Směs byla homogenizována pomocí pipety. Suspenze byla nabrána do pipety a asi 0,5 ml vloženo do nové kultivační láhve a přidáno 13 ml nového media. Láhev byla uzavřena a vložena do inkubátoru. V případě, že byl prováděn experiment, zbylá suspenze buněk byla vložena do sterilní kádinky. Pokud buňky použity nebyly, daly se do odpadní kádinky.

4.3.4 Počítání buněk

Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce.

Bürkerova komůrka je podložní sklíčko, do kterého jsou vryté čáry, které tvoří čtverec. Ten je rozdělen na několik částí. Tvoří ho 9 velkých čtverců, které jsou ohraničeny trojitými čarami, a v každém tomto čtverci je 16 menších čtverců, které jsou ohraničeny dvojitými čarami.

Z kádinky bylo odebráno 10 μ l suspenze do mikrozkušavky a smícháno v poměru 1:1 s tryptanovou modří. Směs byla důkladně promíchána a následně pipetována do komůrky. Komůrka byla vložena pod mikroskop a počítaly se všechny buňky ve všech devíti čtvercích. Buňky ležící na čarách, byly počítány pouze ze dvou stran (z horní a levé), aby bylo zabráněno dvojímu počítání buněk. Byly počítány pouze buňky kulovitého tvaru, které neměly modře obarvenou plasmatickou membránu.

Byla vypočítána koncentrace buněk v 1 ml dle vzorce:

$$c = x/9 \cdot 2 \cdot 10^4$$

c...počet buněk v 1 ml

x/9...počet buněk napočítaných v 1 čtverci Bürkerovy komůrky

2...ředění

10⁴...přepočet množství na 1 ml

4.3.5 Nasazování buněk

Po výpočtu koncentrace buněk byla připravena jejich suspenze. Na jednu destičku bylo potřeba 15 ml suspenze, protože do každé jamky 96-ti jamkové destičky bylo pipetováno 100 μl. Bylo počítáno i s rezervou pro multikanálovou pipetu. Potřebný objem buněčné suspenze byl počítán ze vzorce:

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1}$$

V₁...potřebný objem buněčné suspenze

c₂...koncentrace buněk, která je potřeba dle doby expozice danou látkou (závisí na nastavení experimentu)

c₁...koncentrace buněk námi spočítaná

V₂...objem potřebný na celou destičku (15 ml)

Objem potřebného media byl získán rozdílem V₂ – V₁. Dle těchto výpočtů byla připravena suspenze buněk, která byla následně pipetována do destičky. Destička byla řádně označena a následně uložena do inkubátoru na 24h a poté ovlivněna příslušnými látkami.

Tab. 6 Koncentrace buněk v jamce 96-j destičky dle experimentu

Doba expozice	24 h	48 h	72 h
Potřebná koncentrace buněk	10000	5000	3500

4.3.6 Ovlivňování buněk

Po 24 hodinové kultivaci byly buňky ovlivňovány příslušnými látkami. Nejprve byly zkontrolovány destičky pod mikroskopem, zda je pokryto zhruba 70 % povrchu jamky. Následně bylo vloženo do vodní lázně kultivační medium. Do laminárního boxu byla připravena automatická jednokanálová pipeta, stojan na zkumavky, mikrozukavky, odpadní kádinka, příslušné látky a z vodní lázně přesunuto medium. Buňky byly ovlivňovány látkami: 6-prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin, naringenin, oxaliplatin a jejich kombinace. Do mikrozukavek byly naředěny roztoky určitých koncentrací. Všechny roztoky byly důkladně promíchány, aby byla zajištěna homogenita. Na jednu destičku bylo potřeba 800 μ l roztoku jedné koncentrace od jedné látky. Jako pozitivní kontrola byl použit roztok DMSO v mediu. Jeho koncentrace byla 0,1%, případně 0,2 % u 8-PN. U oxaliplatin bylo použito jako pozitivní kontrola samotné medium. Jako negativní kontrola byl použit 10% roztok DMSO v mediu. Koncentrace jednotlivých látek pro každou buněčnou linii jsou uvedeny v tabulkách.

Tab. 7 Koncentrace látek u buněčné linie SW620

Látka	Kontrola	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	Negativní kontrola
6-PN	K ₁	1	5	10	20	30	40	50	-	-	-	
8-PN	K ₁	5	10	25	50	75	100	-	-	-	-	
	K ₂											
NAR	K ₁	1	5	10	25	50	100	200	-	-	-	
OxPt	K ₁	0,1	0,5	1	2,5	5	7,5	10	15	20	25	

Koncentrace C₁ – C₁₀ v tabulce byly v μ M. Jako kontroly K₁ bylo použito 0,1% DMSO nebo medium (OxPt), jako kontrola K₂ bylo použito 0,2% DMSO u koncentrací 75 a 100 μ M. Jako negativní kontrola bylo použito 10% DMSO.

Tab. 8 Koncentrace látek u buněčné linie SW480

Látka	Kontrola	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	Negativní kontrola
6-PN	K ₁	1	5	10	20	30	40	50	-	-	-	
8-PN	K ₁	5	10	25	50	75	100	-	-	-	-	
	K ₂											
NAR	K ₁	1	5	10	25	50	100	200	-	-	-	
OxPt	K ₁	0,1	0,5	0,75	1	2,5	5	10	15	20	25	

Koncentrace C₁ – C₁₀ v tabulce byly v µM. Jako kontroly K₁ bylo použito 0,1% DMSO nebo medium (OxPt), jako kontrola K₂ bylo použito 0,2% DMSO u koncentrací 75 a 100 µM. Jako negativní kontrola bylo použito 10% DMSO.

Po provedení experimentu se samotnými látkami, byly vytvořeny jejich kombinace: 6-PN a OxPt, 8-PN a OxPt, NAR a OxPt. Jako základní hodnota byla u kombinací využita hodnota IC₅₀, která byla získána z jednotlivých měření u každé látky. IC₅₀ nám říká, kolik látky je potřeba k inhibici biologického procesu na polovinu.

Jako výchozí hodnota pro kombinace byl brán dvojnásobek hodnoty IC₅₀, který se následně ředil sestupnou řadou na polovinu. Přehled jednotlivých koncentrací je v tabulce:

Tab. 9 Koncentrace použité pro kombinace látek – sestupná řada ředění

Kontrola	C ₇	C ₆	C ₅	C ₄	C ₃	C ₂	C ₁	Negativní kontrola
0,1%DMSO	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	IC ₅₀	2xIC ₅₀	10% DMSO

C₁ byla základní koncentrace, která se připravila a poté byla vždy odebrána polovina množství z každé mikrozkušavky a doplněna na požadovaný objem mediem.

4.3.7 Test neutrální červeň

4.3.7.1 Princip

Neutrální červeň se využívá k testování životnosti buněk. Základem je schopnost živých buněk inkorporovat a vázat barvivo neutrální červeň v lysosomech. Neutrální červeň je slabé kationické barvivo pronikající přes plasmatickou membránu neionizovanou difuzí a koncentruje se v lysosomech, kde je vázáno elektrostatickými hydrofobními vazbami nebo fosfátovými skupinami na lysosomální matrix. V lysosomech je udržováno nižší

pH než je pH v okolní plasmě a toto udržení je energeticky náročné. Při poškození buňky nebo při snížení gradientu dochází k uvolnění zadržené neutrální červeně. Množství zadržného barviva je úměrné počtu životaschopných buněk. Jedná se o velmi citlivý indikátor životnosti buněk.

4.3.7.2 Postup

Po 24h, 48h, případně 72h kultivaci buněk s testovanou látkou bylo opatrně odsáto z každé jamky veškeré kultivační medium (200 μ l = 100 μ l buněčné suspenze a 100 μ l media s testovanou látkou). Následně bylo přidáno 200 μ l roztoku neutrální červeně v mediu do každé jamky (40mg/ml tj. 303 μ l zásobního roztoku neutrální červeně do 25 ml media). Destička byla vložena do inkubátoru na 2 hodiny. Po dvou hodinách bylo veškeré medium odsáto pipetou a pipetováno 100 μ l fixačního roztoku do každé jamky. Destička byla ponechána při pokojové teplotě na stole 15 minut. Po uplynutí této doby byl z destičky opatrně vyklepnut fixační roztok a buňky byly opláchnuty dvakrát 200 μ l roztoku PBS. Nakonec bylo přidáno 200 μ l lyzačního roztoku do každé jamky a umístěno na 30 minut do termomixeru při teplotě 25°C a 550 rpm. Po 30 minutách byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 540 nm a vyhodnoceny výsledky.

4.3.7.3 Příprava roztoků

Fixační roztok byl připraven v odměrné baňce. Asi v 500 ml H₂O bylo rozpuštěno 10 g CaCl₂, přidáno 14 ml formaldehydu a doplněno na 1000 ml. Roztok byl důkladně promíchán.

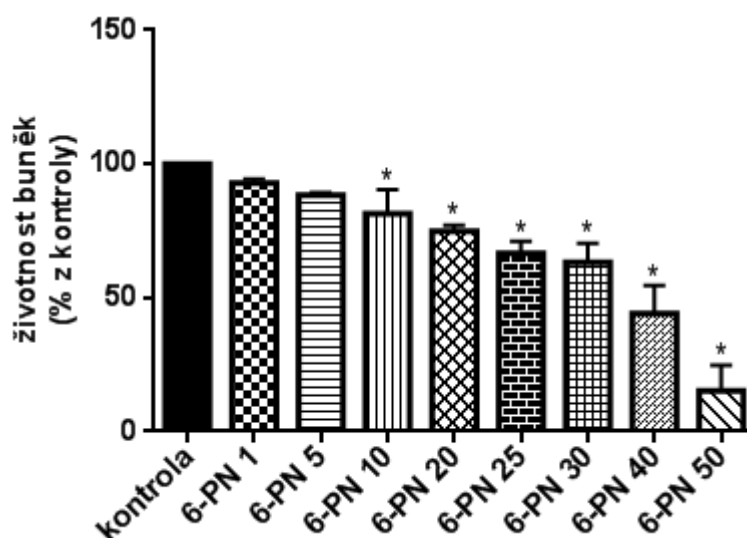
Lyzační roztok byl připraven smícháním 520 ml ethanolu 96% s 480 ml vody a důkladně promícháno. Tím vznikl 50% ethanol. Z tohoto roztoku bylo odebráno 10 ml 50% ethanolu a přidáno 10 ml kyseliny octové a vše bylo důkladně promícháno.

5 VÝSLEDKY

Cytotoxicita všech testovaných látek byla stanovována na dvou buněčných liniích, kdy byla sledována viabilita buněk NRU testem. Po změření absorbance na spektrofotometru Tecan byly v programu Excel zpracovány výsledky. Bylo vypočítáno procento živých buněk. Získané hodnoty jsou uvedeny v grafech jako závislost viability buněk [% kontroly] na koncentraci látek [μM] (Obr. 8 – 29). V Programu Graphpad byly zjištěny hodnoty IC50 a pomocí metody One-way ANOVA určena statistická signifikance proti kontrole. Po kombinovaném podání testovaných látek s oxaliplatinou byly v programu CompuSyn určeny kombinační indexy.

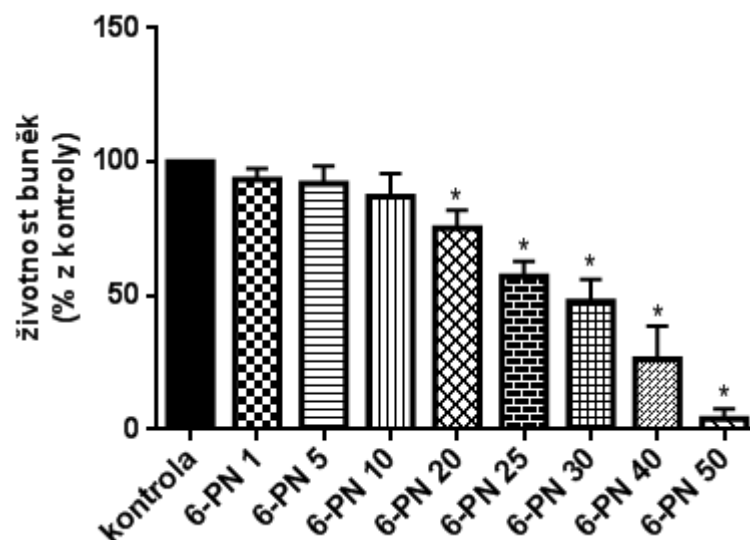
5.1 Vliv 6-prenylnaringeninu na buněčné linie SW480 a SW620

U obou buněčných linií byly doby expozice 6-prenylnaringeninem 24h, 48h, 72h. Nejvyšší účinek je dosažen působení vyšších koncentrací 6-PN. Na buněčnou linii SW620 má 6-PN větší cytotoxický účinek než na linii SW480.



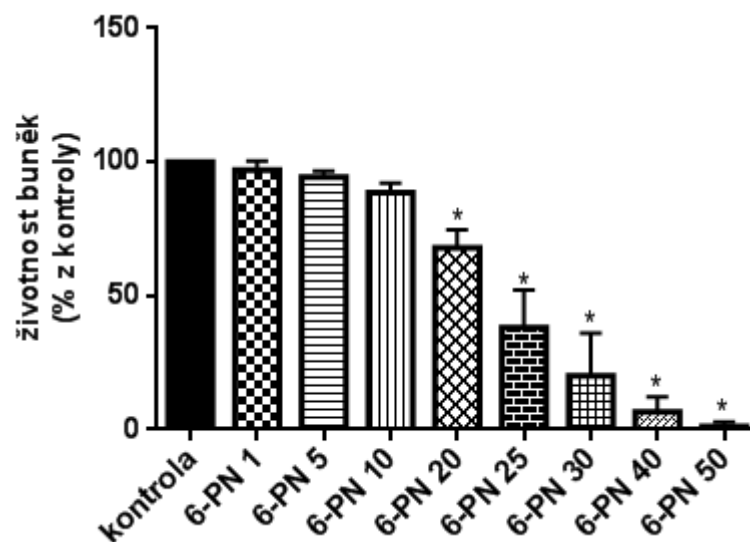
Obr. 8 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW480 po 24h expozici

6-PN - 6-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



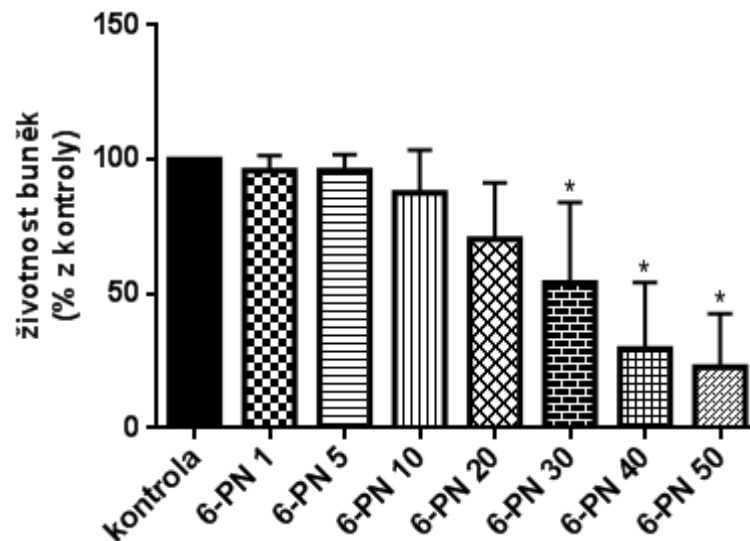
Obr. 9 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW480 po 48h expozici

6-PN - 6-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



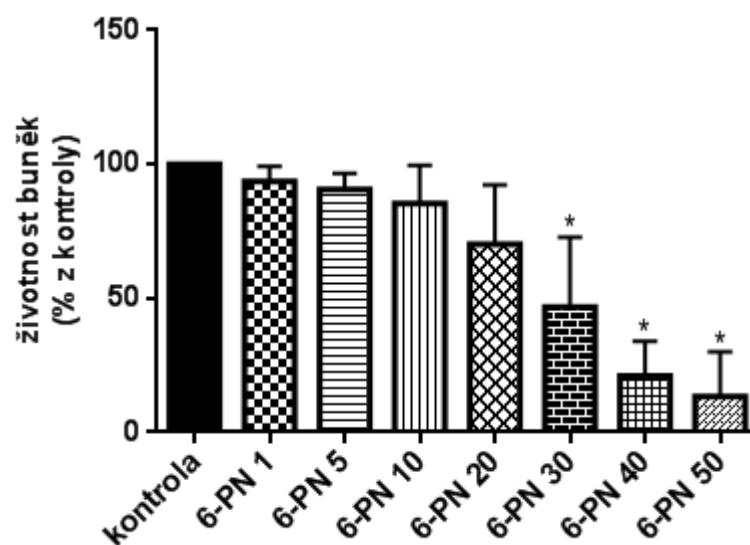
Obr. 10 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

6-PN - 6-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



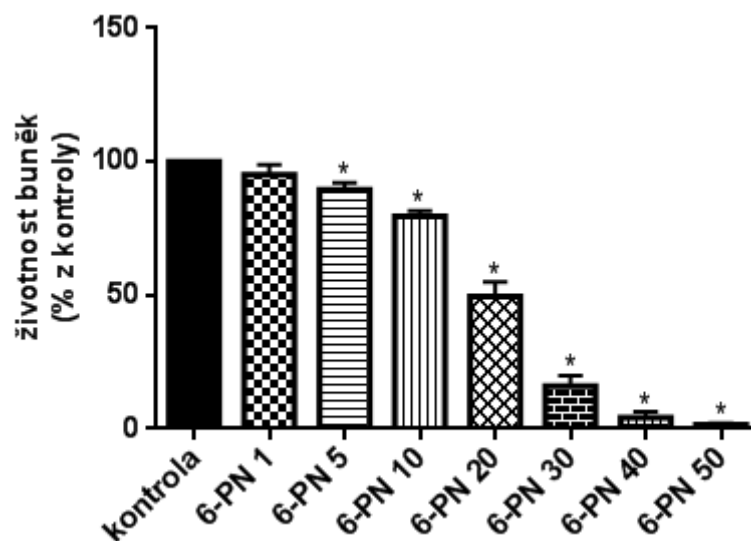
Obr. 11 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW620 po 24h expozici

6-PN - 6-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



Obr. 12 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW620 po 48h expozici

6-PN - 6-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

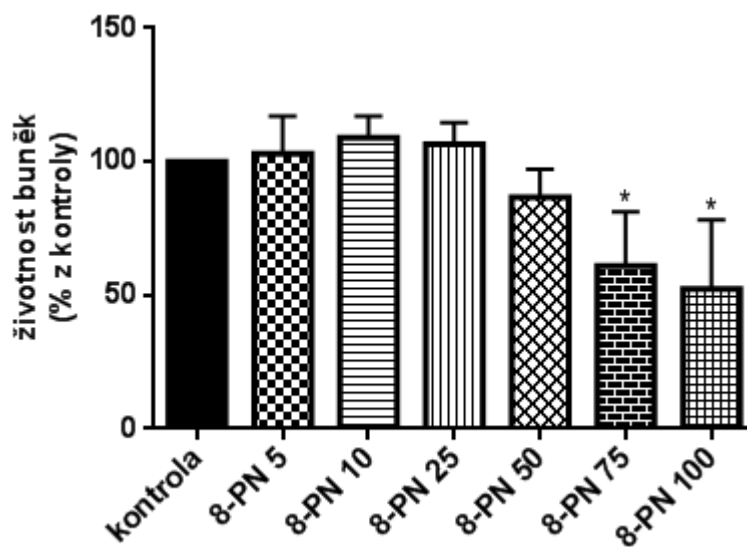


Obr. 13 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

6-PN - 6-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=4$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

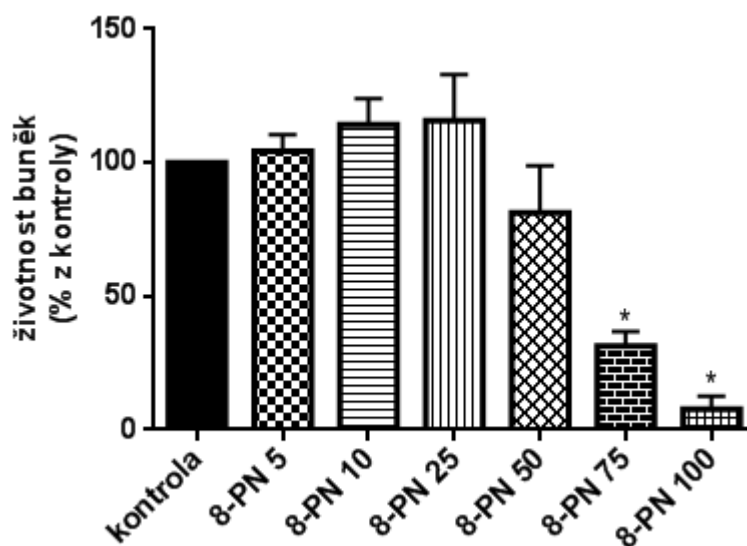
5.2 Vliv 8-prenylaringeninů na buněčné linie SW480 a SW620

Nízké koncentrace 8-PN podporují růst buněk u obou buněčných linií. Významný statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrole ukazují vyšší koncentrace 8-PN. Vyšší cytotoxický účinek má 8-PN u buněčné linie SW620. U buněčné linie SW620 je výrazný účinek 8-PN ve vyšších koncentracích už po 24h expozici. U linie SW480 až při delší době expozice.



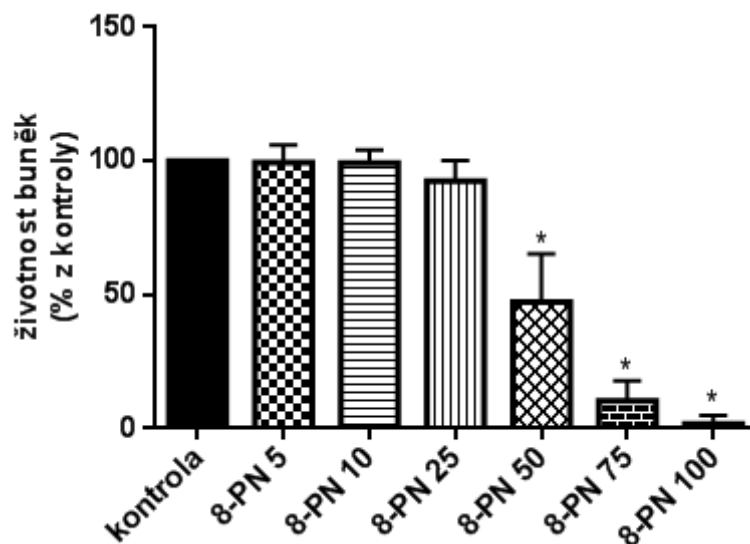
Obr. 14 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW480 po 24h expozici

8-PN - 8-prenylaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

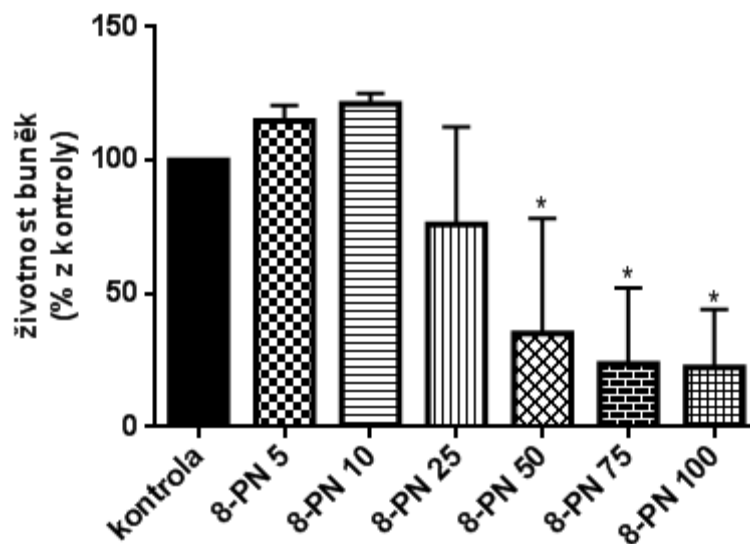


Obr. 15 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW480 po 48h expozici

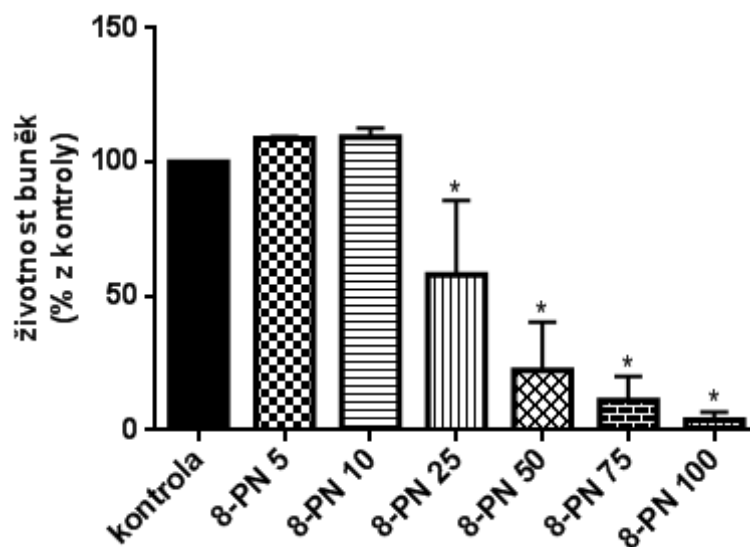
8-PN - 8-prenylaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



Obr. 16 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW480 po 72h expozici
 8-PN - 8-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=3$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

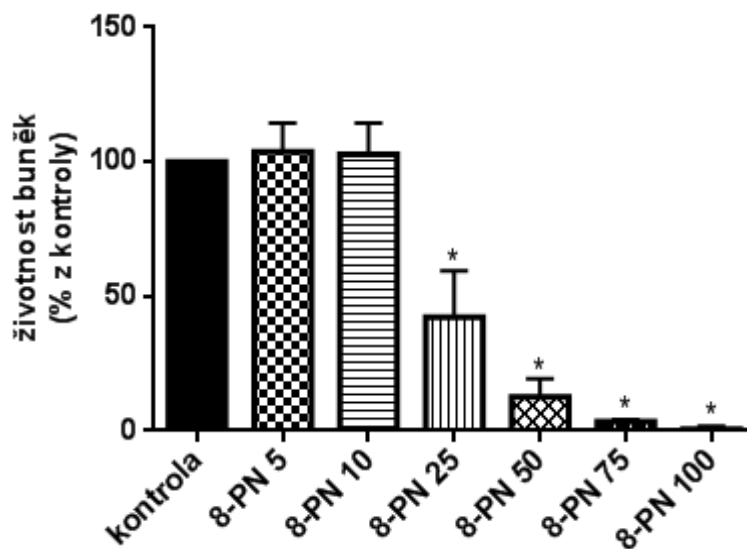


Obr. 17 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW620 po 24h expozici
 8-PN - 8-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=4$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



Obr. 18 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW620 po 48h expozici

8-PN - 8-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=4$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

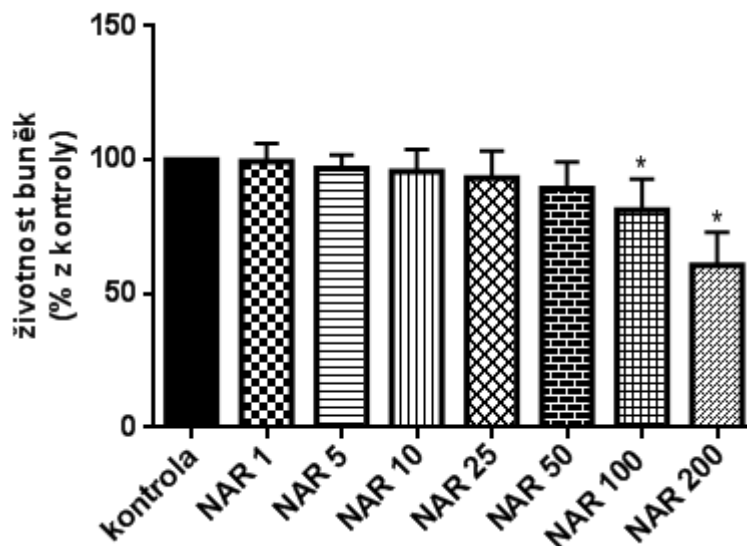


Obr. 19 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

8-PN - 8-prenylnaringenin v příslušné koncentraci μM , $N=4$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

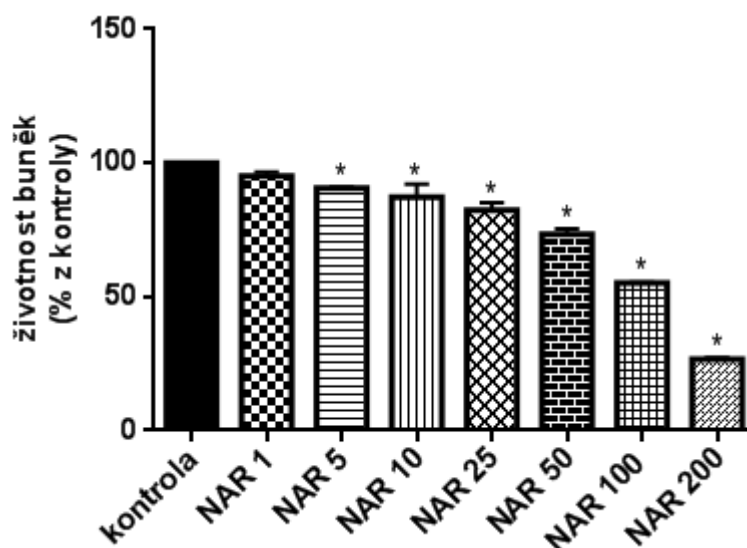
5.3 Vliv naringeninu na buněčné linie SW480 a SW620

Pro porovnání účinku flavonoidu bez prenylace byl také testován vliv naringeninu na tyto buněčné linie, ale pouze při 72h expozici. Vliv naringeninu není tak výrazný. Cytotoxický účinek se projevuje až po 72h expozici pouze u nejvyšších koncentrací 100 μM a 200 μM . U linie SW620 je účinek výraznější.



Obr. 20 Vliv NAR na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

NAR - naringenin v příslušné koncentraci μM , $N=2$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

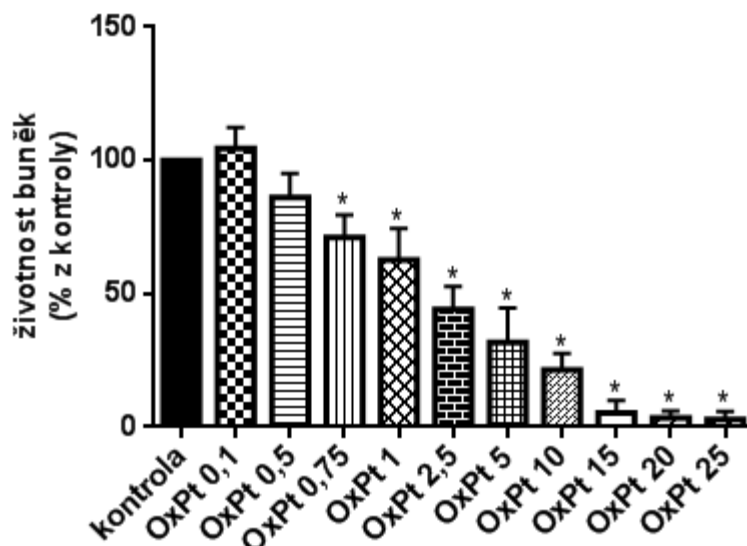


Obr. 21 Vliv NAR na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

NAR - naringenin v příslušné koncentraci μM , $N=2$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

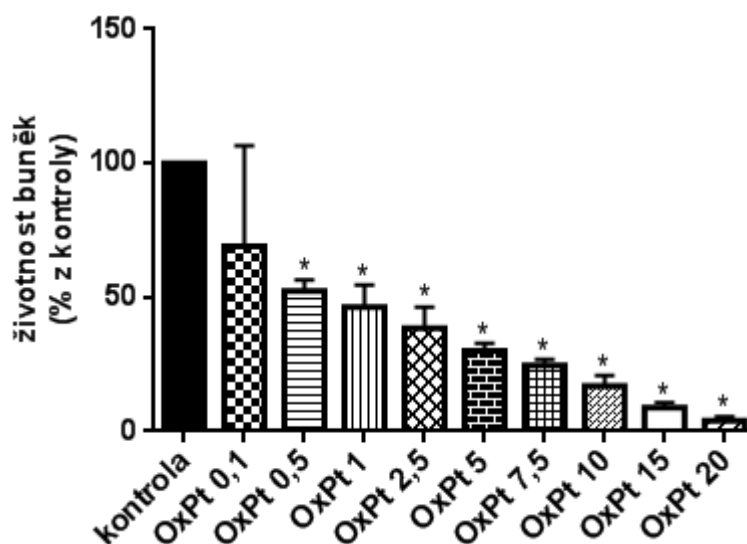
5.4 Vliv oxaliplatiny na buněčné linie SW480 a SW620

Oxaliplatina zde byla použita jako cytostatikum, které se používá v chemoterapii těchto nádorových onemocnění. S vyšší koncentrací rostla účinnost oxaliplatiny. U obou buněčných linií je účinnost oxaliplatiny podobná.



Obr. 22 Vliv OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

OxPt - oxaliplatina v příslušné koncentraci μM , $N=2$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



Obr. 23 Vliv OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

OxPt - oxaliplatina v příslušné koncentraci μM , $N=2$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

5.5 Hodnoty IC50 pro jednotlivé buněčné linie

V tabulkách 10 a 11 jsou uvedeny hodnoty IC50 pro buněčné linie SW480 a SW620. Od těchto hodnot byly následně odvozeny hodnoty, se kterými jsme pracovali při kombinačních studiích jednotlivých látek s oxaliplatinou (Tab 12).

Tab. 10 Hodnoty IC50 pro buněčnou linii SW620

Látka	IC50 - 48h*	IC50 - 72h**
6-prenylnaringenin	24,5	13,7
8-prenylnaringenin	26,2	24,9
Naringenin	58,8	48,8
Oxaliplatina	3,3	1,1

*IC50 – 48h, **IC50 – 72h – koncentrace hodnoty IC50 pro jednotlivé látky v μM

Tab. 11 Hodnoty IC50 pro buněčnou linii SW480

Látka	IC50 – 72h*
6-prenylnaringenin	16,5
8-prenylnaringenin	39,2
Naringenin	292,4
Oxaliplatina	1,9

*IC50 – 72h – koncentrace hodnoty IC50 pro jednotlivé látky v μM

Tab. 12 Koncentrace použité při kombinačních studiích látek s oxaliplatinou

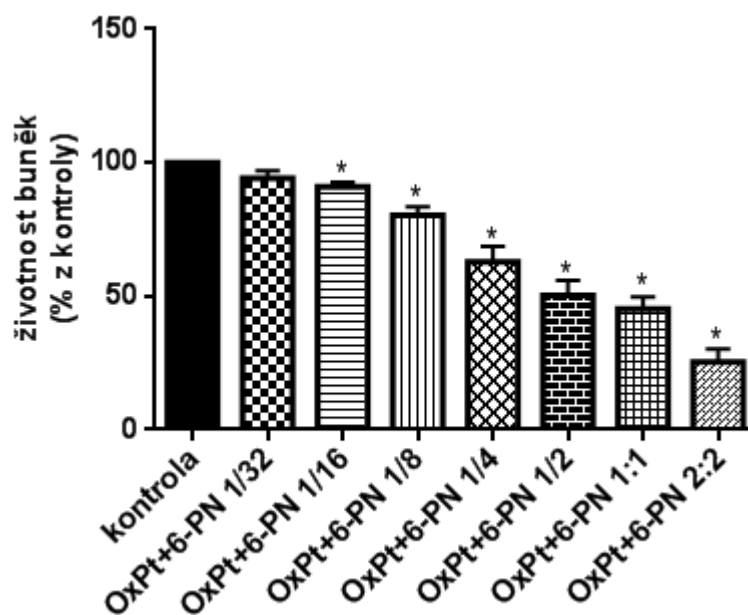
Látka	IC50 – SW480*	IC50 – SW620**
6-prenylnaringenin	15	15
8-prenylnaringenin	40	25
Naringenin	100	50
Oxaliplatina	2	1

*IC50 – SW480 – upravené koncentrace pro kombinace po 72h expozici u buněčné linie SW480

**IC50 – SW620 – upravené koncentrace pro kombinace u buněčné linie SW620

5.6 Vliv 6-prenylaringenin a oxaliplatinu na buněčné linie SW480 a SW620

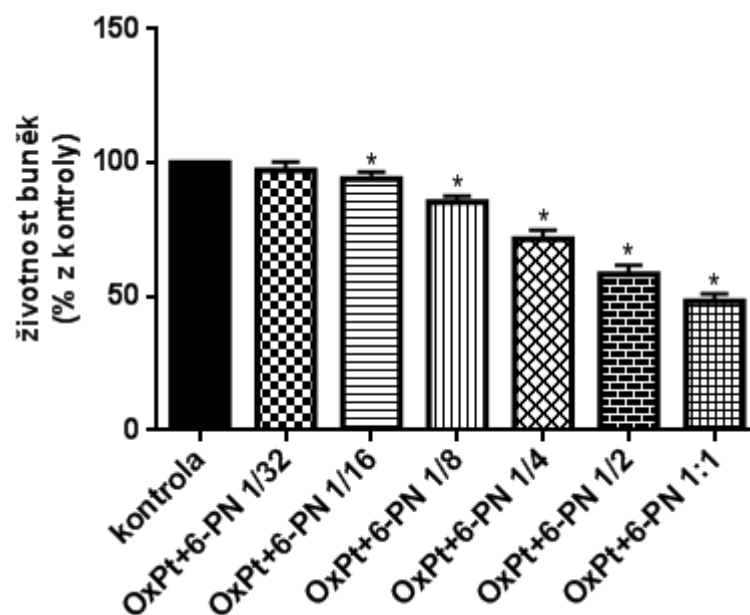
Na základě vypočítaných hodnot IC50 byly určeny koncentrace testovaných látek pro kombinační studie. Pro stanovení kombinačních indexů byly měřeny hodnoty cytotoxicity vyhodnocené pomocí NRU testu. Byla použita metoda postupného ředění při stálém poměru testovaných látek (Tab. 9). Vliv kombinace 6-PN a oxaliplatinu má na obě buněčné linie téměř stejný účinek.



Obr. 24 Vliv 6-PN a OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

6-PN – 6-prenylaringenin, OxPt - oxaliplatin v příslušné koncentraci μM , $N=4$,

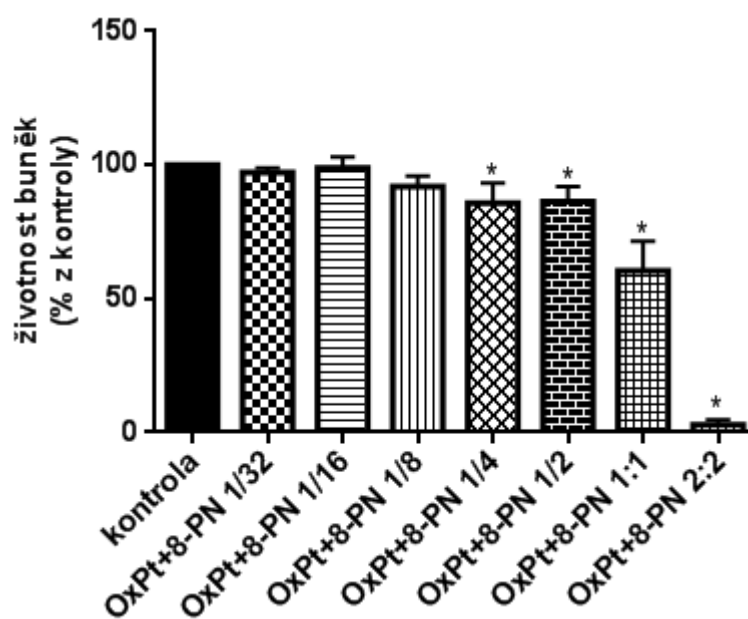
* - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P < 0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



Obr. 25 Vliv 6-PN a OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici
 6-PN – 6-prenylnaringenin, OxPt - oxaliplatin v příslušné koncentraci μM , $N=4$,
 * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$), Kontrola – kontrola 100%
 životnosti

5.7 Vliv 8-prenylaringenin a oxaliplatinu na buněčné linie SW480 a SW620

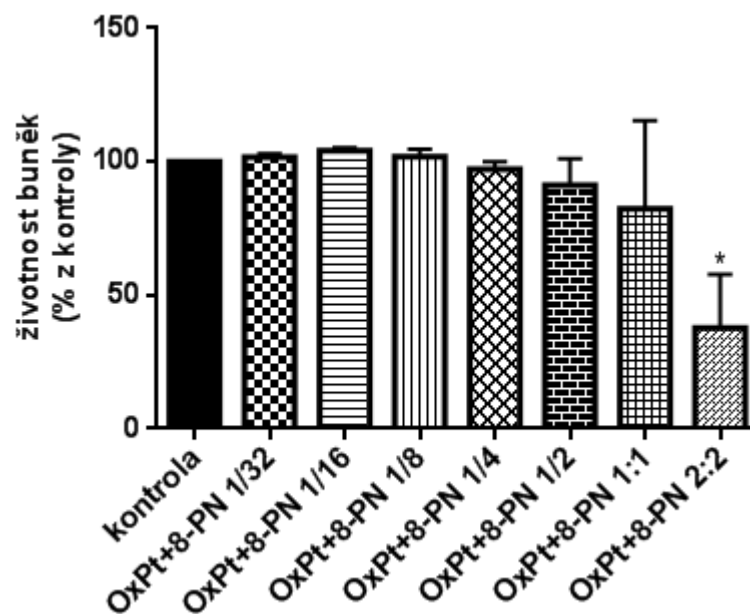
Na obě buněčné linie má tato kombinace podobný vliv. Nízké koncentrace obou látek výrazně nesnižují proliferaci buněk. Až dvojnásobek hodnoty IC50 snižuje jejich proliferaci. U buněčné linie SW480 je účinek dvojnásobku IC50 výraznější.



Obr. 26 Vliv 8-PN a OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

8-PN – 8-prenylaringenin, OxPt - oxaliplatin v příslušné koncentraci μM , $N=4$,

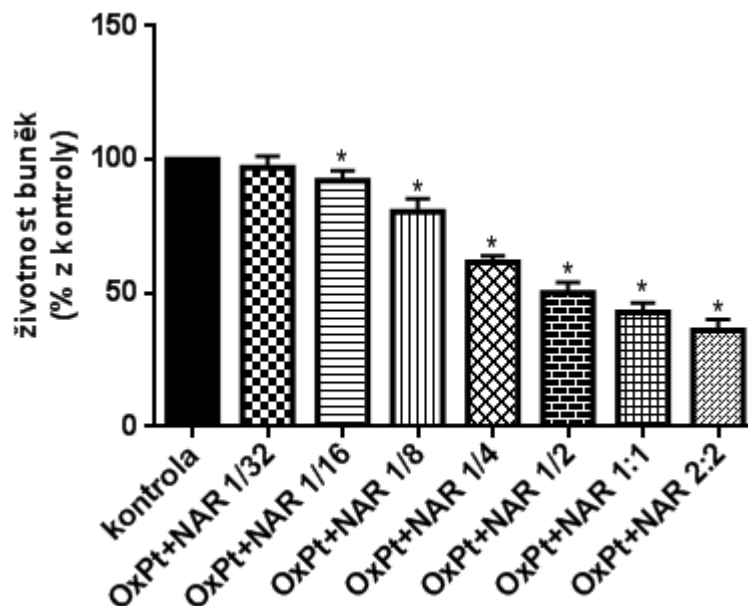
* - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P < 0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti



Obr. 27 Vliv 8-PN a OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici
 8-PN – 8-prenylnaringenin, OxPt - oxaliplatina v příslušné koncentraci μM , $N=4$,
 * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P<0,05$, Kontrola – kontrola 100%
 životnosti

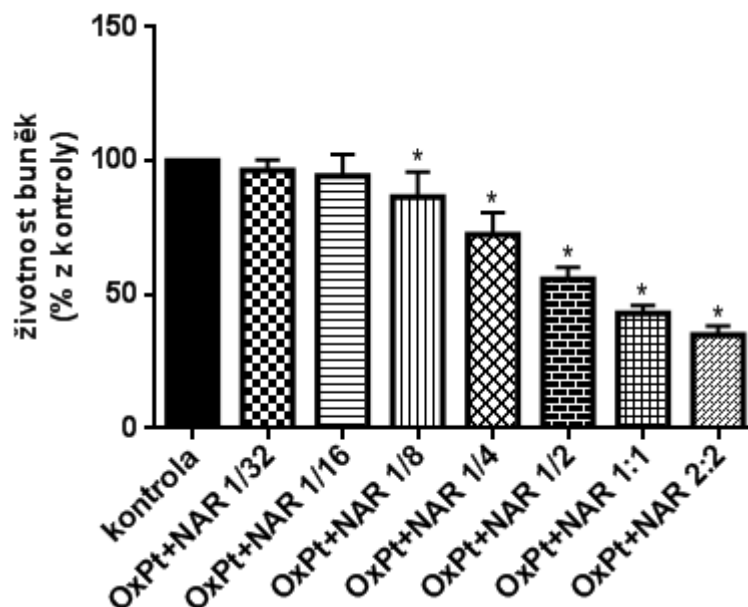
5.8 Vliv naringeninu a oxaliplatinu na buněčné linie SW480 a SW620

Účinek obou látek je na buněčné linie podobný. S rostoucí koncentrací roste i účinek a snižuje se buněčná proliferace.



Obr. 28 Vliv NAR a OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

NAR – naringenin, OxPt - oxaliplatin v příslušné koncentraci μM , $N=4$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P < 0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

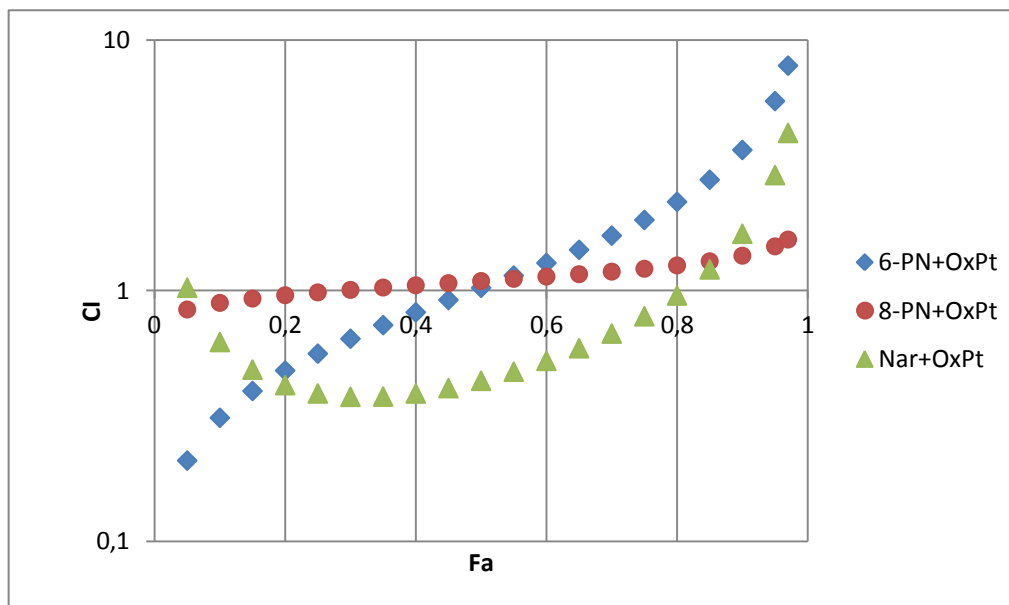


Obr. 29 Vliv NAR a OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

NAR – naringenin, OxPt - oxaliplatin v příslušné koncentraci μM , $N=4$, * - statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolou ($P < 0,05$), Kontrola – kontrola 100% životnosti

5.9 Kombinační indexy

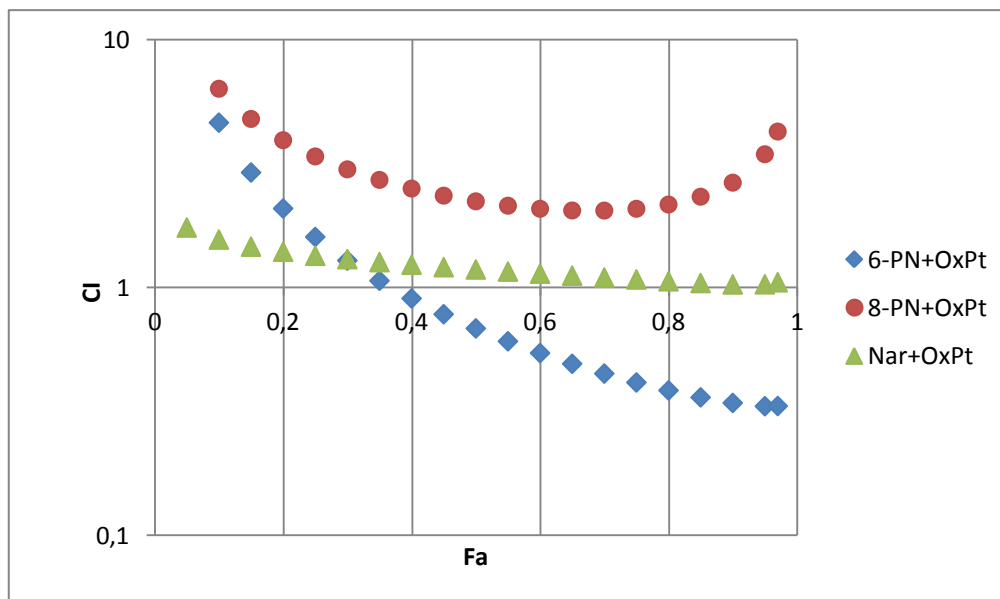
Pro zjištění kombinačních indexů byla použita data zjištěna při NRU testu. Data byla zpracována pomocí programu CompuSyn. Hodnoty kombinačních indexů (CI) popisují synergismus ($CI < 1$), antagonismus ($CI > 1$) a aditivní efekt ($CI \approx 1$).



Obr. 30 Kombinační indexy buněčné linie SW480 po 72h expozici

6-PN – 6-prenylnaringenin, 8-PN – 8-prenylnaringenin, Nar – naringenin,
OxPt – oxaliplatina, CI – kombinační index, Fa – fraction affected – 0 = stoprocentní
životnost buněk, 1 = nulová životnost buněk

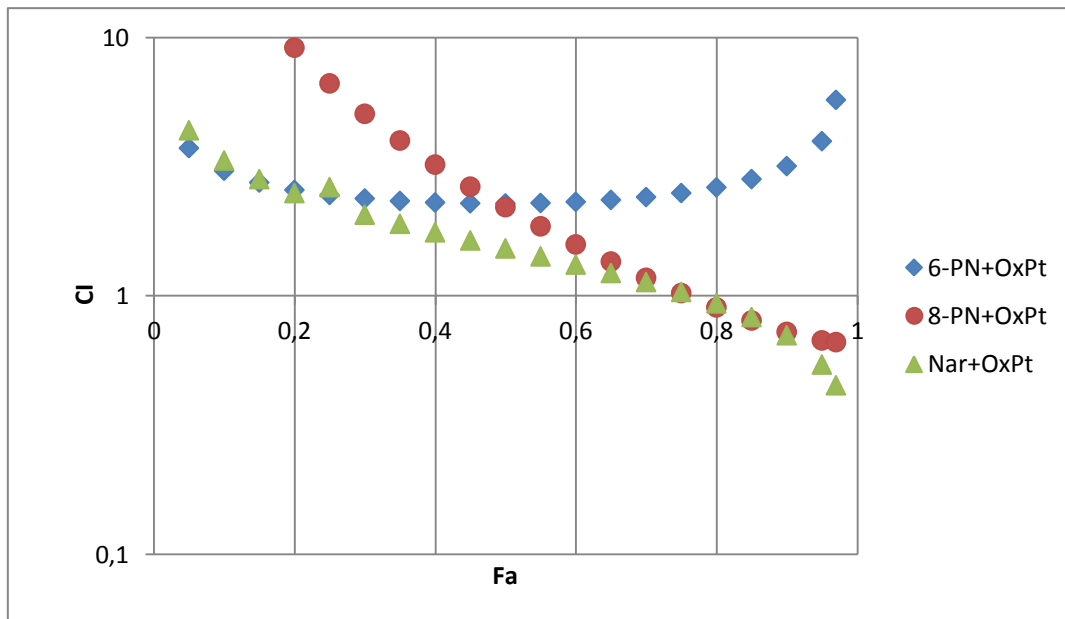
Kombinace NAR a OxPt způsobují kromě vysokých koncentrací synergické působení. Kombinace 6-PN a OxPt způsobují v nízkých koncentracích synergický efekt, ve vysokých poté antagonistický efekt. Kombinace 8-PN a OxPt působí aditivním efektem, ve vyšších koncentracích mírně antagonistickým účinkem.



Obr. 31 Kombinační indexy buněčné linie SW620 po 48h expozici

6-PN – 6-prenylnaringenin, 8-PN – 8-prenylnaringenin, Nar – naringenin,
 OxPt – oxaliplatina, CI – kombinační index, Fa – fraction affected – 0 = stoprocentní
 životnost buněk, 1 = nulová životnost buněk

Kombinace 6-PN a OxPt působí v nízkých koncentracích antagonistickým účinkem, ve vyšších koncentracích poté synergickým. Kombinace 8-PN a OxPt působí antagonistickým účinkem. Kombinace NAR a OxPt působí v nízkých koncentracích slabě antagonistickým účinkem, ve vyšších koncentracích pozorujeme spíše aditivní efekt.



Obr. 32 Kombinační indexy buněčné linie SW620 po 72h expozici
 6-PN – 6-prenylnaringenin, 8-PN – 8-prenylnaringenin, Nar – naringenin,
 OxPt – oxaliplatina, CI – kombinační index, Fa – fraction affected – 0 = stoprocentní
 životnost buněk, 1 = nulová životnost buněk

Kombinace 6-PN a OxPt má antagonistické působení. Kombinace 8-PN a OxPt má antagonistické působení, ve vysokých koncentracích poté synergické působení. Kombinace NAR a OxPt má antagonistické působení, ve vysokých koncentracích synergické působení.

6 DISKUZE

Kolorektální karcinom je druhé nejčastější nádorové onemocnění v populaci. Toto onemocnění je často diagnostikováno v pokročilém stádiu a je zde menší šance na vyléčení. V posledních letech, kdy probíhá celoplošný screening, se kolorektální karcinom diagnostikuje v časných stádiích. Polovina diagnostikovaných pacientů tomuto typu nádoru podléhá. Základní léčbou je chirurgické odstranění nádoru. V případě rozsáhlého poškození tkáně a v případě metastazujícího karcinomu se přistupuje k chemoterapeutické léčbě. Základem chemoterapie je většinou kombinovaná léčba oxaliplatinou a 5-fluorouracil. Použití těchto cytostatik je ovšem limitováno celou řadou nežádoucích účinků. V této práci byla testována oxaliplatinou na dvou buněčných liniích kolorektálního karcinomu: SW480 a SW620.

Předlohou pro syntézu nových molekul jsou přírodní látky, které se vyskytují v rostlinách velmi často jako sekundární metabolity. Jednou z těchto skupin jsou také flavonoidy. Je to velmi široká skupina látek, které se nacházejí v mnoha rostlinných druzích. U flavonoidů má velký vliv na jejich účinek struktura molekuly a substituenty na ní navázané. Jednou z těchto oblastí jsou prenylované flavonoidy získané především z rostliny *Humulus lupulus*, která je hojně využívána při výrobě piva.

Látky obsažené v chmelu byly testovány pro své antioxidační, antiproliferační či sedativní účinky. Hlavní látkou identifikovanou v chmelových šišticích byl xanthohumol, který se během přípravy piva mění na isoxanthohumol (Stevens et al., 1999). Další látkou v chmelu je desmethylxanthohumol, ze kterého vzniká racemická směs 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin (J. F. Stevens, J. E. Page. 2004). Tyto dva prenylflavonoidy byly testovány i v této diplomové práci.

Další látkou, která byla v této práci testována je flavonoid naringenin, který se hojně vyskytuje v citrusových plodech (Erlund, 2004). Naringenin i ostatní flavonoidy jsou testovány pro své antioxidační, antiproliferační či protizánětlivé účinky. Tento flavonoid byl testován především pro možnost sledování vlivu prenylované skupiny, neboť 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin jsou dvě prenylované formy flavonoidu naringenin.

V diplomové práci byl testován antiproliferační účinek u samotných látek a také kombinace oxaliplatinou s jednotlivými flavonoidy.

Pro experimenty byly použity dvě buněčné linie izolované z jednoho pacienta. Buněčná linie SW480 pochází z kolorektálního karcinomu a linie SW620 pochází z lymfatických uzlin, kam původní nádor metastazoval. Tyto dvě buněčné linie jsou v testování výhodné, protože reprezentují dva stupně rakovinného onemocnění. Nalezneme u nich malé genetické variability, proto jsou vhodným a validovaným modelem pro testování jejich změn spojených s různou fází vývoje rakoviny tlustého střeva. Ve studii Palmieri et al. (2015) byla testována morfologie těchto buněčných linií.

Citlivost obou buněčných linií na cytostatikum oxaliplatinu byla podobná. Po 72 hodinové expozici oxaliplatinou byla hodnota IC₅₀ u buněčných liniích SW480 a SW620 1,9 μM a 1,1 μM v daném pořadí. Ve studii Dahan et al. (2009) byly studovány čtyři buněčné linie HT29-D4, Caco-2, SW480 a SW620. Jedná se o buňky rakoviny tlustého střeva a konečníku. Výsledky ve studii ukázaly, že tyto buněčné linie jsou citlivé na oxaliplatinu. Ve studii Sharma et al. (2008) byla jednou z testovaných buněčných linií linie SW620. Testování probíhalo se třemi cytostatiky, oxaliplatinou, 5-fluorouracilem a irinotecanem. Hodnoty IC₅₀ u této linie pro jednotlivé látky byly 0,1 μM, 4 μM a 1 μM v daném pořadí. Námi stanovené hodnoty pro oxaliplatinu jsou v porovnání s těmito studiemi vyšší.

V této práci byl zjišťován účinek 6-prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin a naringenin na buněčné linie SW480 a SW620. Studie Delmulle et al. (2008) prokazovala antiproliferační aktivitu 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin na buněčné linie rakoviny prostaty PC-3 a DU145. V buněčné linii PC-3 byla hodnota IC₅₀ pro 6-prenylnaringenin 18,4 μM, v liniích PC-3 a DU145 u 8-prenylnaringenin byly hodnoty IC₅₀ 33,5 μM a 43,1 μM. Ve studii Allsopp et al. (2013) byl testován antiproliferační účinek na buněčných liniích Caco-2 a HT-115. Jsou to buňky rakoviny tlustého střeva. Ve všech studiích byl prokázán u těchto látek antiproliferační účinek. V této práci byly výsledky pro oba prenylflavonoidy podobné jako ve zmiňovaných studiích.

U obou buněčných linií byla hodnota IC₅₀ pro 6-prenylnaringenin podobná. U buněčné linie SW480 byla hodnota IC₅₀ 16,5 μM a pro linii SW620 byla tato hodnota 13,7 μM. Po 72 hodinové expozici látkou byl signifikantní antiproliferační účinek na linii SW620 už při koncentraci 5 μM. U buněčné linie SW480 při koncentraci 20 μM. U 8-prenylnaringenin byly hodnoty IC₅₀ pro každou linii jiné. U linie SW480 byla

IC₅₀ 39,2 μM , u linie SW620 24,9 μM . Po 72 hodinové expozici byl signifikantní výsledek u buněčné linie SW480 při koncentraci 50 μM , u linie SW620 při koncentraci 25 μM .

Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi. (Delmulle et al., 2008; Allsopp et al., 2012). V této práci byl prokázán antiproliferační účinek 6-prenylnaringeninů a 8-prenylnaringeninů na buněčné linie SW620 a SW480.

Další testovanou látkou byl flavonoid naringenin. Ve studii Frydoonfar et al. (2003) byla prokázána inhibice buněčné proliferace u naringeninů v koncentracích mezi hodnotami 0,71-2,85 mmol. Testování probíhalo na buněčné linii HT-29, buněčné linii rakoviny tlustého střeva. Ve studii Chidambara Murthy et al. (2012) byl testován efekt naringeninů na buněčné linii SW480 v koncentracích od 12,5 μM do 200 μM . Doba expozice buněk naringeninem byla 12h, 24h a 48h. Naringenin byl v těchto koncentracích neúčinný (Chidambara Murthy et al. 2012). V této diplomové práci byl po 72 hodinové expozici mírný antiproliferační účinek u buněčné linie SW620 už při koncentraci 5 μM , ale hodnota IC₅₀ byla desetkrát vyšší. U buněčné linie SW480 byl po 72 hodinové expozici výrazný účinek pozorován až při koncentraci 100 μM . Hodnota IC₅₀ u této linie nešla vypočítat, proto jsme se rozhodli testovat kombinace naringeninů s oxaliplatinou v koncentraci 100 μM pro naringenin. Buněčná linie SW480 je proti naringeninům odolnější než SW620. U linie SW480 by byly třeba vyšší koncentrace k prokázání antiproliferativního účinku. Výsledek je v souladu s předchozími studiemi (Chidambara Murthy et al. 2012).

Dále byly zjišťovány kombinační indexy 8-prenylnaringeninů, 6-prenylnaringeninů a naringeninů s oxaliplatinou. Při testování jednotlivých látek s oxaliplatinou nebylo zjištěno výrazné synergistické působení. Pouze u buněčné linie SW480 po 72 hodinové expozici vykazuje naringenin s oxaliplatinou synergistické působení. U ostatních flavonoidů není tedy prospěšné jejich podávání s oxaliplatinou. 8-prenylnaringenin působí spíše antagonistickým účinkem a mohl by účinek oxaliplatinu snižovat. Vliv prenylové skupiny na antiproliferační aktivitu byl prokázán díky nižším hodnotám IC₅₀ u stanovovaných prenylflavonoidů v porovnání s naringeninem. Vliv na kombinované působení s oxaliplatinou prenylová jednotka neměla.

7 ZÁVĚR

Byl prokázán antiproliferační účinek 6-prenylnaringeninů na obou buněčných liniích, SW480 a SW620.

Byl prokázán antiproliferační účinek 8-prenylnaringeninů na obou buněčných liniích, SW480 a SW620.

Byl prokázán antiproliferační účinek naringeninů na buněčnou linii SW620. U buněčné linie SW480 byl účinek až při nejvyšší koncentraci.

Byl prokázán antiproliferační účinek oxaliplatinů na obou buněčných liniích, SW480 a SW620.

Kombinační indexy neukázaly žádný výrazně pozitivní vliv testovaných látek na účinek oxaliplatinů v obou testovaných liniích.

8 SEZNAM ZKRATEK

5-HT₃ – receptor 5-hydroxytryptamin receptor typu 3

6-PN – 6-prenylnaringenin

8-PN – 8-prenylnaringenin

ATC gen – tumor supresorový gen

ATCC – American Type Culture Collection

CA19-9 – tumor marker

CEA – karcioembryonální antigen – tumor marker

CI – kombinační index

COX-1 – cyklooxygenáza 1

COX-2 – cyklooxygenáza 2

CT – počítačová tomografie

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ER- α , ER- β – estrogenový receptor α , estrogenový receptor β

Fa – fraction affected

FBS – Fetal Bovine Serum

HMPC – committee on Herbal Medicinal Products

IC₅₀ – střední inhibiční koncentrace (množství látky, které je potřeba k inhibici biologického procesu na polovinu)

MCC – gen v promotorové oblasti

MGMT – O⁶-methylguanin DNA methyltransferáza

MLH1 – MutL Homolog1

MSH2 – MutS Homolog2

MSH6 – MutS Homolog 6

NAR – naringenin

NRU test – test neutrální červeně

OxPt – oxaliplatina

PBS – Phosphate Buffered Saline – fosfátový pufr

RNA – ribonukleová kyselina

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α

TOKS – test na okultní krvácení ze stolice

TP53 – tumor protein 53

9 POUŽITÁ LITERATURA

ACLINDOR, T. a N. BEAUGER. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*. 2011, **18**(1), 18-24.

ALLSOPP, Philip, Sam POSSEMIERS, David CAMPBELL, Chris GILL a Ian ROWLAND. A Comparison of the Anticancer Properties of Isoxanthohumol and 8-Prenylnaringenin Using in vitro Models of Colon Cancer. *BioFactors*. 2013, **39**(4), 441-447.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016. 2014

CASSIDY, Jim a Jean-Louis MISSET. Oxaliplatin-related side effects: Characteristics and management. *Seminars in Oncology*. **29**(5 Suppl 15), 11-20.

DAHAN, Laetitia, Amine SADOK, Jean-Louis FORMENTO, Jean François SEITZ a Hervé KOVACIC. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology*. 2009, **158**(2), 610-620.

DELMULLE, L., T. VANDEN BERGHE, D. DE KEUKELEIRE a P. VANDENABEELE. Treatment of PC-3 and DU145 Prostate Cancer Cells by Prenylflavonoids from Hop (*Humulus lupulus* L.) induces a Caspase-independent Form of Cell Death. *Phytotherapy Research*. 2008, **22**(2), 197-203.

DIVIŠ, Petr, Kristýna DIVIŠOVÁ, Jana KATOLICKÁ a Simona ROTNÁGLOVÁ. Kolorektální karcinom - současný pohled na diagnostiku a léčbu. *Medicina pro praxi*. 2016, **13**(1), 34-38.

FRYDOONFAR, H. R., D. R. MCGRATH a A. D. SPIGELMAN. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid Naringenin. *Colorectal Disease*. 2003, **5**(2), 149-152.

HUDCOVÁ, Tereza, Jana BRYNDOVÁ, Kristýna FIALOVÁ, Jaromír FIALA, Marcel KARABÍN, Lukáš JELÍNEK a Pavel DOSTÁLEK. Antiproliferative effects of

prenylflavonoids from hops on human colon cancer cell lines. *Journal of the Institute of Brewing*. 2014, **120**(3), 225-230.

CHIDAMBARA MURTHY, K.N., Jinhee KIM, Amit VIKRAM a Bhimanagouda S. PATIL. Differential inhibition of human colon cancer cells by structurally similar flavonoids of citrus. *Food Chemistry*. 2012, **132**(1), 27-34.

CHOU, T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*. 2010, **70**(2), 440-446.

KARABÍN, Marcel, Tereza HUDCOVÁ, Lukáš JELÍNEK a Pavel DOSTÁLEK. Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. *Chemické listy*. **2012**(106), 1095-1103.

KRÁL, J., J. SLYŠKOVÁ, P. VODIČKA a J. ŠPIČÁK. Molekulární genetik kolorektálního karcinomu. *Klinická onkologie*. 2016, **29**(6), 419-427.

MASTERS, John R a Glyn N STACEY. Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocols*. 2007, **2**(9), 227-2284.

MELICHAR, Bohuslav. Oxaliplatina. *Farmakoterapie*. 2005, **2005**(6), 561-569.

MIR, Irfan Ahmad a Ashu Bhan TIKU. Chemopreventive and Therapeutic Potential of “Naringenin,” a Flavanone Present in Citrus Fruits. *Nutrition and Cancer*. 2014, **67**(1), 27-42.

PALMIERI, V., D. LUCCHETTI, A. MAIORANA, et al. Mechanical and structural comparison between primary tumor and lymph node metastasis cells in colorectal cancer. *Soft Matter*. 2015, **11**(28), 5719-5726.

REPETTO, Guillermo, Ana DEL PESO a Jorge L ZURITA. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008, **3**(7), 1125-1131

SHARMA, R. I. a T. A.D. SMITH. Colorectal Tumor Cells Treated with 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan, and Cetuximab Exhibit Changes in 18F-FDG Incorporation Corresponding to Hexokinase Activity and Glucose Transport. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008, **49**(8), 1386-1394.

SLABÝ, Ondřej. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-6.

STEVENS, Jan F a Jonathan E PAGE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochemistry*. 2004, **65**(10), 1317-1330.

SUCHÁNEK, Štěpán, Gabriela VEPŘEKOVÁ, Ondřej MÁJEK, Ladislav DUŠEK a Miroslav ZAVORAL. Epidemiologie, etiologie, screening a diagnostika kolorektálního karcinomu, včetně diagnosticko-terapeutických zákroků na tlustém střevě. *Onkologie*. 2011, **5**(5), 261-265.

VENTURELLI, Sascha, Markus BURKARD, Martin BIENDL, Ulrich M. LAUER, Jan FRANK a Christian BUSCH. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*. 2016, **32**(11-12), 1171-1178.

YOON, Hyuk, Tae Woo KIM, Soon Young SHIN, et al. Design, synthesis and inhibitory activities of naringenin derivatives on human colon cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, **23**(1), 232-238.

ZANOLI, Paola a Manuela ZAVATTI. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, **116**(3), 383-396.

ZAVORAL, Miroslav, Gabriela VOJTĚCHOVÁ a Štěpán SUCHÁNEK. Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie*. 2013, **7**(4), 172-175.

Online zdroje:

Program kolorektálního screeningu [online], Masarykova Univerzita, [cit. 8. 3. 2017]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/>

American type cell culture collection (ATCC) – Cell line SW480 [online], [cit. 22. 2. 2017]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-228.aspx>

American type cell culture collection (ATCC) – Cell line SW620 [online], [cit. 22. 2. 2017]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-227.aspx>

Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online], [cit. 7. 3. 2017]. Dostupné z: <http://www.svod.cz/>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Porovnání výskytu kolorektálního karcinomu v jednotlivých zemích

Obr. 2 Věkové rozložení výskytu kolorektálního karcinomu

Obr. 3 Flavanový skelet

Obr. 4 Vzorec 6-prenylnaringeninu

Obr. 5 Vzorec 8-prenylnaringeninu

Obr. 6 Vzorec naringeninu

Obr. 7 Vzorec oxaliplatinu

Obr. 8 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW480 po 24h expozici

Obr. 9 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW480 po 48h expozici

Obr. 10 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

Obr. 11 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW620 po 24h expozici

Obr. 12 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW620 po 48h expozici

Obr. 13 Vliv 6-PN na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

Obr. 14 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW480 po 24h expozici

Obr. 15 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW480 po 48h expozici

Obr. 16 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

Obr. 17 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW620 po 24h expozici

Obr. 18 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW620 po 48h expozici

Obr. 19 Vliv 8-PN na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

Obr. 20 Vliv NAR na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

Obr. 21 Vliv NAR na buněčnou linii SW620 po 72h expozici

Obr. 22 Vliv OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici

- Obr. 23 Vliv OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici
- Obr. 24 Vliv 6-PN a OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici
- Obr. 25 Vliv 6-PN a OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici
- Obr. 26 Vliv 8-PN a OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici
- Obr. 27 Vliv 8-PN a OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici
- Obr. 28 Vliv NAR a OxPt na buněčnou linii SW480 po 72h expozici
- Obr. 29 Vliv NAR na OxPt na buněčnou linii SW620 po 72h expozici
- Obr. 30 Kombinační indexy buněčné linie SW 480 po 72h expozici
- Obr. 31 Kombinační indexy buněčné linie SW620 po 48h expozici
- Obr. 32 Kombinační indexy buněčné linie SW620 po 72h expozici

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 TNM klasifikace – písmeno T: rozsah primárního nádoru

Tab. 2 TNM klasifikace – písmeno N: metastázy v regionálních mízních uzlinách

Tab. 3 TNM klasifikace – písmeno M: vzdálené metastázy

Tab. 4 Stádia kolorektálního karcinomu dle TNM klasifikace

Tab. 5 Složení kultivačního media pro buněčné linie

Tab. 6 Koncentrace buněk v jamce 96-j destičky dle experimentu

Tab. 7 Koncentrace látek u buněčné linie SW620

Tab. 8 Koncentrace látek u buněčné linie SW480

Tab. 9 Koncentrace použité pro kombinace látek – sestupná řada ředění

Tab. 10 Hodnoty IC50 pro buněčnou linii SW620

Tab. 11 Hodnoty IC50 pro buněčnou linii SW480

Tab. 12 Koncentrace IC50 použité při kombinačních studiích látek s oxaliplatinou