

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**Cytotoxicita semisyntetických derivátů prenylflavonoidů
v buňkách prsního karcinomu**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové

Martin Hupák

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

Rád bych poděkoval doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za poskytnutí cenných rad při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat za pomoc a trpělivost při praktickém zpracování PharmDr. Tomáši Zárybnickému, Ph.D. a PharmDr. Martinu Ambrožovi, Ph.D.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Martin Hupák

Školitel: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Ambrož, Ph.D.

Název diplomové práce: Cytotoxicita semisyntetických derivátů prenylflavonoidů
v buňkách prsního karcinomu

Podstatná část úmrtí v lidské populaci je způsobena nádorovými onemocněními. V České republice je karcinom prsu u žen nejvíce zastoupeným nádorovým onemocněním. Farmakologická léčba nádorových onemocnění je často provázána vznikem rezistence, proto jsou stále hledány nové možnosti léčby a jedním ze zdrojů nových struktur jsou přírodní látky. Prenylflavonoidy obsažené v chmelu otáčivém (*Humulus lupulus*, Cannabaceae), např. xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin, mají široké spektrum biologických účinků. Jedním z nich je účinek protinádorový. Tato diplomová práce se zabývala určením cytotoxického potenciálu semisyntetických prenylovaných derivátů flavonoidu naringeninu v buněčné linii prsního karcinomu MCF-7. Mezi metody, které byly použity, patřilo sledování cytotoxicity metodou s neutrální červení, analýza apoptózy a nekrózy pomocí průtokové cytometrie, stanovení mitochondriálního membránového potenciálu pomocí sondy JC-1 a analýza morfologických změn buněk pomocí konfokální mikroskopie. Nejprve byl proveden prvotní screening cytotoxicity všech osmi studovaných látek. Látky A, B, C a E prokázaly v rámci testu cytotoxicity nejsilnější účinek a byly vybrány k dalšímu testování. Hodnoty poloviční inhibiční koncentrace (IC_{50}) pro tyto látky byly stanoveny na 21,2 μ M (A), 45,7 μ M (B), 47,3 μ M (C) a 53,4 μ M (E). K poklesu mitochondriálního membránového potenciálu došlo u všech čtyř látek, ale tento pokles nebyl statisticky významný. Morfologické změny ani změny v podílu apoptotických/nekrotických buněk se neprokázaly.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Martin Hupák

Supervisor: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Advisor: PharmDr. Martin Ambrož, Ph.D.

Title of diploma thesis: Cytotoxicity of semisynthetic derivatives of prenylflavonoids in breast carcinoma cells

Cancer is a cause of a significant portion of death in the human population. In the Czech Republic, breast cancer is the most common type of cancer in women. Pharmacological treatment of cancer is often accompanied by resistance development, so new treatment options are still searched for and natural compounds are one of the sources of new structures. Prenylflavonoids present in common hop (*Humulus lupulus*, Cannabaceae), for example, xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin, possess a wide spectrum of biological effects. One of them is an anti-cancer effect. This diploma thesis dealt with the determination of the cytotoxic potential of semisynthetic prenylated derivatives of flavonoid naringenin in breast carcinoma cell line MCF-7. Methods used included the determination of cytotoxicity using neutral red uptake assay, analysis of apoptosis and necrosis using flow cytometry, determination of mitochondrial membrane potential using JC-1 probe, and analysis of morphological changes of cells using confocal microscopy. Firstly, an initial cytotoxicity screening of all eight studied substances was performed. Substances A, B, C, and E showed the highest effect in the cytotoxicity test and were selected for further testing. The values of half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for these substances were determined to be 21.2 μ M (A), 45.7 μ M (B), 47.3 μ M (C), and 53.4 μ M (E). A decrease in mitochondrial membrane potential was detected for all four substances, but this decrease wasn't statistically significant. Neither morphological changes nor changes in the ratio of apoptotic/necrotic cells were detected.

Obsah

1	Úvod	8
2	Současný stav poznání	9
2.1	Nádorová onemocnění	9
2.1.1	Charakterizace nádorových buněk	10
2.2	Karcinom prsu	13
2.2.1	Geny ovlivňující rakovinu prsu	15
2.2.2	Rizikové faktory	16
2.2.3	Prevence	19
2.2.4	Screening	21
2.2.5	Diagnostika	23
2.2.6	Symptomy	23
2.2.7	Stádia onemocnění	24
2.2.8	Možnosti léčby	27
2.3	Prenylflavonoidy	31
2.3.1	Výskyt	32
2.3.2	Biologické účinky prenylflavonoidů	33
2.3.3	Farmakokinetika	37
2.4	Nádorová buněčná linie MCF-7	38
3	Cíl práce	39
4	Experimentální část	40
4.1	Biologický materiál a chemikálie	40
4.1.1	Testované látky	40
4.2	Pomůcky a přístroje	43
4.2.1	Pomůcky	43
4.2.2	Přístroje	43
4.3	Metody	44

4.3.1	Kultivační médium.....	44
4.3.2	Rozmrazování buněk.....	44
4.3.3	Pasáž buněk.....	44
4.3.4	Počítání buněk.....	45
4.3.5	Nasazování a ovlivňování buněk	45
4.3.6	Test s neutrální červení	46
4.3.7	Příprava vzorků pro sledování apoptózy a nekrózy pomocí průtokové cytometrie.....	46
4.3.8	Sledování morfologických změn buněk.....	47
4.3.9	Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu.....	47
4.3.10	Statistická analýza	47
5	Výsledky.....	48
5.1	Stanovení cytotoxicity látek.....	48
5.1.1	Derivát A.....	49
5.1.2	Derivát B	51
5.1.3	Derivát C	53
5.1.4	Derivát E	55
5.2	Průtoková cytometrie	57
5.3	Morfologické změny po ovlivnění látkami A, B, C a E.....	58
5.4	Mitochondriální membránový potenciál.....	59
6	Diskuze	60
7	Závěr.....	65
8	Zkratky	66
9	Použitá literatura.....	68

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocněních. V populaci žen patří k nejčastěji diagnostikovaným novotvarům zhoubný nádor prsu (karcinom prsu). Data z roku 2018 ukazují, že tento typ nádoru představoval více než čtvrtinu (26,5 %) všech nově diagnostikovaných zhoubných nádorů u žen. Incidence i prevalence karcinomu prsu mají od 80. let 20. století rostoucí trend, zatímco trend mortality v posledních patnácti letech mírně klesá. V posledních letech se daří zachycovat velkou část nově diagnostikovaných nádorů prsu v časných klinických fázích (stadium I a II), což úzce souvisí s příznivou prognózou (Krejčí et. al 2021). V léčbě karcinomu prsu se uplatňuje chirurgická léčba, radioterapie a systémová léčba (chemoterapie, hormonální léčba, cílená biologická léčba). Systémovou léčbu provázejí jak časté nežádoucí účinky, tak možnost vzniku rezistence nádorových buněk, proto je vyvíjena snaha o nalezení nových možností léčby.

Jednou ze skupin látek, u kterých byly popsány chemopreventivní účinky, jsou flavonoidy. Jedná se o velmi rozsáhlou skupinou rostlinných polyfenolických sekundárních metabolitů, které mají mnoho biologických a farmakologických účinků včetně protinádorového působení. Hlavním zdrojem látek od nich odvozených, tzv. prenylflavonoidů, je rostlina *Humulus lupulus* (chmel otáčivý). Za nositele farmakologického účinku jsou odpovědné hlavně látky jako xanthohumol (XN), isoxanthohumol (IX), 8-prenylnaringenin (8PN) a 6-prenylnaringenin (6PN). Jedná se o izomery a ve chmelu se vyskytují v různém poměru (Ambrož et al. 2019).

Na katedře biochemických věd FaF-UK je studována antiproliferační aktivita celé řady rostlinných extraktů a izolovaných přírodních látek, jako jsou flavonoidy, mono a seskviterpeny. Rovněž je zkoumán vliv těchto látek na antiproliferační aktivitu známých a klinicky používaných cytostatik, jako jsou doxorubicin, 5-fluorouracil, oxaliplatin a irinotekan (Ambrož et al. 2019b; 2017; 2019a). V rámci spolupráce s dr. Hubertem Chapui (University of Lorraine, Nancy, Francie) byly připraveny semisyntetické prenylované deriváty flavonoidu naringenin, jejichž antiproliferační aktivitu v buňkách SW480 odvozených od kolorektálního karcinomu studovala Mgr. Kateřina Blahová (Blahová 2021). V rámci své diplomové práce jsem se zaměřil na antiproliferační účinek těchto semisyntetických prenylflavonoidů v buňkách prsního karcinomu MCF-7.

2 Současný stav poznání

2.1 Nádorová onemocnění

V roce 2018 představovalo v ČR úmrtí na zhoubné nádory (ZN) kromě nemelanomových kožních novotvarů 24,5 % všech úmrtí, což v přepočtu činí 259,0 úmrtí na 100 000 osob. Zhoubné nádory průdušnice, průdušky a plíce měly nejvyšší mortalitu. U mužů se na druhém místě umístily ZN tlustého střeva a konečníku, zatímco u žen druhé místo obsadil ZN prsu. ZN s nejvyšší hodnotou 5letého přežití vykazují ZN štítné žlázy, varlete a prostaty. Naopak nejnižší hodnoty 5letého přežití mají ZN slinivky břišní, jater, intrahepatálních žlučových cest a jícnu (Krejčí et al 2021).

Z biochemického hlediska se na nádorovém zvratu podílí 2 typy genů: protoonkogeny a tumor – supresorové geny. Protoonkogeny jsou geny, které kódují bílkoviny stimulující proliferaci. Protipólem protoonkogenů jsou tumor – supresorové geny, jejichž produkty translace svým působením naopak brzdí množení buněk a podporují apoptózu. Tudíž mutace v těchto genech může způsobit nerovnováhu mezi přírůstkem a zánikem buněk a důsledkem je jejich nekontrolované množení. Na konci M fáze buněčného cyklu dojde k rozdělení buňky na dvě. Zpočátku dochází k dělení všech buněk, které se zdvojnásobí za délku buněčného cyklu a dochází k exponenciálnímu růstu nádoru. Postupně se rychlost množení snižuje například v důsledku nedostatku nutriční, nedostatku kyslíku a přechodem buněk do klidové fáze (Klener 2011).

Klinicky detekovatelné nádory se nachází za hranicí exponenciálního růstu, kdy se buňky alespoň 27× zdvojí. V tomto období je hmotnost nádoru cca 1 g a počet buněk je přibližně 1 miliarda. Nádor je v této chvíli heterogenní. Mimo buněk nádorově zvrhlých, se vyskytují i buňky determinované, schopné jen několika dělení a buňky reprodukčně mrtvé. Též se vyskytuje stroma, endotelové buňky a fibroblasty. V nádorových buňkách dochází pravidelně k mutacím, které zlepšují biologické vlastnosti buněk nádoru jako zrychlení proliferace, snížení senzitivity k chemoterapii a větší schopnost tvoření metastáz (Klener 2011).

Nádory jsou ovlivněny exogenními a endogenními vlivy. Exogenní vlivy můžeme rozdělit na chemické, fyzikální a biologické karcinogeny. Výčet karcinogenů je zobrazen v Tabulce 1. Tyto vlivy působí na spektrum lidí s různou genetickou výbavou, a tedy různou schopností odolávat těmto vlivům. Kancerogeneze není podmíněná jen jedním

faktorem, většinou je to proces multifaktoriální a v různou dobu se uplatňují různé vlivy (Schulz 2007).

Tabulka 1 Přehled karcinogenů (Schulz 2007)

Typ karcinogenu	Příklad
Chemický karcinogen	Nikl, kadmium, arsen, nitrosamin, trichlorethylen, arylaminy, benzo[a]pyren, aflatoxin, ROS
Fyzikální karcinogen	UV záření, ionizující záření
Biologický karcinogen	Lidský papilomavirus, virus Epstein a Barové, virus hepatitidy B, Helicobacter pylori, Schistosoma mansoni
Endogenní procesy	Replikace DNA, metabolické procesy generující ROS, chronický zánět

2.1.1 Charakterizace nádorových buněk

Nádorové buňky získávají během karcinogeneze jedinečné fenotypové vlastnosti, které je odlišují od nenádorových buněk. Za charakteristické znaky nádorových buněk jsou považovány:

1. Soběstačnost v produkci růstových signálů (aktivace onkogenů).
 - Geny schopné ovlivnit regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózu, a to hlavně ve směru stimulace buněčného dělení a inhibice apoptózy, se nazývají protoonkogeny. Nádorový proces modifikují až po své přeměně v onkogen. Mezi mechanismy zodpovědné za přeměnu protoonkogenu v onkogen patří: mutace, genové amplifikace a chromosomální přestavby. Důsledkem této přeměny může být např. zvýšené množství proteinu příslušného protoonkogenu.
2. Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus.
 - Další skupinou jsou tumor supresorové geny, které působí opačným účinkem než protoonkogeny. Uplatňují se jako kontrolní body buněčného dělení, které jsou schopny v určitých případech snížit proliferaci buněk a indukovat apoptózu. Buňka je nevyužívá neustále, ale pouze v konkrétních případech (např. při buněčném stresu nebo poškození). Např. protein p53 v případě poškození DNA zastavuje buněčný cyklus v G₁ fázi, indukuje její opravy prostřednictvím

stresových proteinů a v případě, že je DNA nenavratitelně poškozená potencuje proces apoptózy. V případě poškození proteinu p53 nedochází k odstranění poškozených buněk a ty dále pokračují v buněčném cyklu a transkripci svého genomu.

3. Schopnost přeprogramovat energetický metabolismus buňky.
4. Schopnost obejít apoptózu.
 - Proces apoptózy není aktivován pouze tumor-supresorovými geny. Uplatňuje se hlavně vnitřní a vnější dráha aktivace apoptózy. Nádorově zvrhlá buňka obsahuje rozsáhlé spektrum mutovaných genů. Mezi ně patří i mutace proteinů vnitřní a vnější dráhy aktivace apoptózy, např. snížené vyplavení cytochromu c, snížená množství receptoru smrti CD95 nebo upregulace inhibitorů apoptózy.
5. Nepřetržitá tvorba nových kapilár.
 - Z důvodu náročnosti tvorby nových buněk na nutriční a kyslíkový, patří angiogeneze mezi základní předpoklady růstu nádoru a představuje důležitý rys v osídlení nových tkání maligními buňkami. Buňky nemají schopnost tvorby nových kapilár až do doby ukončení tzv. angiogenního přepnutí, které představuje převážení angiogenních faktorů nad angiogenními inhibitory.
6. Schopnost invadovat a tvořit metastázy.
 - Proces tvorby metastáz je proces osídlení tkání vzdálených původnímu ložisku. Představuje hlavní příčinu morbidity a mortality nádorových onemocnění. V procesu metastázování (metastatická kaskáda) se uplatňují 4 etapy: invaze, transport, nidace a růst metastázy. V procesu invaze, zapříčiněného ztrátou adheze a zvýšené motility nádorové buňky, způsobené inaktivující mutací či sníženou expresí membránového glykoproteinu E-kadherinu, dochází k průniku nádorových buněk skrz bazální membránu endotelu do cévy. Po průniku buněk do krevní nebo lymfatické cesty následuje jejich transport pasivní difuzí. Buňky se snaží shlukovat mezi sebou nebo s trombocyty, ale i tak dochází ve velké míře k jejich zániku. Transport přežije jen asi 0,1 % nádorových buněk. Nádorové buňky pronikají do tkáně hlavně v kapilárách parenchymatózních orgánů. V procesu adheze se uplatňují cytoadhezivní molekuly, jako jsou selektin-1, intracelulární adhezivní molekula-1/2 (ICAM-1/2) a vaskulární adhezivní protein (VCAM-1). Fáze končí nidací buněk. Následně buňky zůstávají dlouho v klidovém stádiu a jejich proliferace záleží na rovnováze růstových a inhibičních faktorů.

7. Neomezený replikační potenciál.
8. Schopnost uniknout před imunitní odpovědí hostitele (Boušová 2018).

2.2 Karcinom prsu

Výskyt ZN prsu u žen v dlouhodobém trendu narůstá, avšak v poslední době pozorujeme náznak stabilizace. Potvrzují to data z roku 2018, kdy bylo toto onemocnění třetím nejčastějším novotvarem kromě nemelanomových kožních nádorů. U žen se jedná o typ nádoru s největší incidencí. Nejčastěji je diagnostikován ve věkové kategorii žen v intervalu 60-74 let. Z hlediska klinického stádia bylo více než $\frac{3}{4}$ diagnostikovaných zachyceno v časném stádiu nemoci (Krejčí et al 2021).

Pod pojem karcinom prsu patří různé histologické formy maligních nádorů vznikající z epitelálních buněk mléčné žlázy. Liší se klinickým a radiologickým nálezem, biologickými vlastnostmi a aktivitou. Shodují se ale ve schopnosti infiltrace prsní žlázy maligními buňkami, invaze do okolních struktur a tvorby metastáz (Adam et al. 2010).

Během života dochází v mléčné žláze k mnoha strukturálním změnám. Tyto změny však většinou nemají kauzální spojitost s rozvinutím karcinomu, s výjimkou atypické duktální a lobulární hyperplazie, které představují prekancerózy. Maligně změněné buňky můžeme rozdělit podle schopnosti proniknout bazální membránou lobulů či duktů do okolních tkání na neinvazivní a invazivní nádory. Mezi neinvazivní nádory, které osídlují vývodový systém a nekolonizují ostatní tkáň, se řadí duktální karcinom *in situ* a lobulární karcinom *in situ*. Mezi nádory invazivní, které jsou schopny osídlit jiné tkáň, patří podle morfologického hlediska karcinomy duktální a lobulární (Adam et al. 2010).

Buňky neschopné osídlení dalších struktur se mohou přetransformovat na invazivní formy. U invazivních forem karcinomu prsu dochází k vytvoření metastáz už v čase subklinické diagnózy primárního tumoru, jedná se o tzv. paralelní model metastázování (Staněk et al. 2017).

Karcinom prsu můžeme na základě molekulárních charakteristik rozdělit na jednotlivé podtypy. Základní odlišnost podtypů spočívá v receptorové vybavenosti buněk: 1) karcinom prsu exprimující hormonální receptor, buď estrogenový (ER+) nebo progesteronový receptor (PR+), 2) karcinom prsu exprimující receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2+), 3) triple negativní karcinom prsu (TNBC), který je charakterizován chybějící expresí genů pro estrogenový, progesteronový a HER2

receptor (ER-, PR-, HER2-) (Barzaman et al. 2020). Každý podtyp se liší svojí prognózou a odezvou na systémovou léčbu. Seznam podtypů je uveden v Tabulce 2 (Čmejlová 2020). Na základě analýzy genové exprese je TNBC rozdělen do šesti podtypů: 1) vysoce proliferující basal-like 1, 2) vysoce proliferující basal-like 2, 3) imunomodulační, 4) mezenchymální, 5) mesenchymal stem-like, 6) luminální typ (Navrátil et al. 2015).

Tabulka 2 Podtypy karcinomu prsu (Novotný et al. 2019)

Typ karcinomu prsu	Charakteristika
Luminální A	ER a PR pozitivní ($\geq 20\%$), HER2-negativní, nízké Ki67, grade musí být < 3
Luminální B (HER2-negativní)	ER pozitivní, HER2-negativní a buď vysoké Ki67, nebo PR $< 20\%$
Luminální B (HER2-pozitivní)	ER pozitivní, HER2-pozitivní, jakékoliv Ki67 a jakékoliv PR
HER2 (neluminální)	ER i PR-negativní, HER2-pozitivní
TNBC	ER i PR-negativní, HER2 – negativní

Ki67, marker proliferační aktivity

2.2.1 Geny ovlivňující rakovinu prsu

Breast cancer associated gen 1 a 2 (BRCA1 a BRCA2) jsou tumor – supresorové geny kódující proteiny, které představují důležitou roli v regulaci buněčného cyklu. Deficit proteinu BRCA1 vede k dysregulaci kontrolního bodu buněčného cyklu, abnormální duplikaci centrosomů, genetické nestabilitě a případně k apoptóze. Protein BRCA2 se účastní hlavně rekombinantní opravy dvouřetězcových zlomů DNA. Mutace těchto genů se dědí autosomálně dominantně (Sun et al. 2017). Podle studie Chena and Parmigianiho (2007) bylo riziko rakoviny prsu nositelek mutace ve věku 70 let pro BRCA1 57 % a pro BRCA2 49 %.

ErbBs je rodina receptorů zahrnující 4 typy receptorů: receptory pro epidermální růstový faktor (EGFR), ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 a ErbB4/HER4. Receptory mají tři části: 1) extracelulární glykosylovanou část skládající se ze 4 domén, 2) membránovou část, 3) intracelulární část, která se skládá z juxtamembránové domény, kinasové domény a karboxylové funkce obsahující tyrosinové zbytky, které se uplatňují při transdukcii signálu. Rodina se prezentuje specifickým způsobem aktivace receptoru. Při navázání ligandu na extracelulární straně dochází ke změně konformace a odhalení dimerizačního raménka, které spojuje dva receptory v dimer. Na rozdíl od ostatních receptorů s tyrosinkinasovou aktivitou, kde se ligand uplatňuje v přemostění dvou receptorů, je zde ligand navázán na okraj extracelulární části receptoru (Lemmon et al. 2014).

Myc je protoonkogen, jehož proteinový produkt funguje jako transkripční faktor. Fyziologická úloha proteinu není stále známá, v buňkách rakoviny prsu ovlivňuje buněčný růst, transformaci, angiogenezi a kontrolu buněčného cyklu. Snižuje aktivitu několika signálních drah prostřednictvím regulace transkripce nebo modifikace proteinů. Jeden z ovlivňovaných genů je také gen pro protein BRCA1. Jeví se, že amplifikace myc je přímo úměrná progresi a závažnosti nádorového onemocnění (Chen and Olopade 2008).

2.2.2 Rizikové faktory

Věk patří mezi nejvýznamnější rizikové faktory nádoru prsu a jeho výskyt je na věku přímo závislý. Výskyt onemocnění a úmrtnost se rapidně zvyšuje v období 40. roku života a vrcholí kolem 60. roku. Zvyšování četnosti výskytu onemocnění v závislosti na zvyšujícím se věku je celosvětovým trendem (Winters et al. 2017).

Důležitým rizikovým faktorem je rodinná anamnéza. Výskyt rakoviny prsu v rodině zvyšuje riziko výskytu o 80 %, dvojnásobný výskyt o 300 % a u tři a vícečetného výskytu je riziko zvýšené až o 400 %. Tato skupina je z hlediska rizika rozvinutí nádoru prsu velmi riziková. Zodpovědné za to jsou tumor supresorové geny jako BRCA1 a BRCA2, které zvyšují riziko manifestace onemocnění o 80-85 % v průběhu života (Washbrook 2006).

Porod dítěte obecně snižuje riziko vzniku prsního karcinomu u hormonálně dependentních nádorů (ER+, PR+) až o 50 %. Každý další porod snižuje míru rizika o dalších 10 %. K největšímu snížení rizika dochází při intervalu mezi dvěma porody buď menší než 1 rok nebo větší než 3 roky. Benefit z porodu nezískávají matky, které porodily první dítě až po 35. roce života. Porod paradoxně v této věkové kategorii míru rizika manifestace nádoru prsu zvyšuje v porovnání s bezdětnými ženami. Ke snížení rizika přispívá též kojení dítěte, které snižuje riziko nádoru prsu o 4,3-4,5 % za každých 12 měsíců kojení (Dall and Britt 2017).

Časná menopauza snižuje míru rizika vzniku ER+ nádoru prsu. V případě menarche je trend opačný. Prokázalo se, že menarche před 11. rokem života zvyšuje riziko, naopak menarche po 14. roce života riziko snižuje. Snížení věku menarche nepřímou souvisí se zvýšením hmotnosti matky v těhotenství (Dall and Britt 2017). Načasování věku menarche u dívky je multifaktoriálního rázu. Vysoká hodnota indexu tělesné hmotnosti (BMI) ve věku 8 let společně s nízkou porodní hmotností podle studie Sloboda et al. (2007) představuje největší vliv na snížení věku dívky při menarche. Spojitost mezi hodnotou BMI a věkem při menarche je přisuzován adipozitě a sekreci gonadotropinu. Metaanalýza dat provedená Hamajimou et al. (2012) ukázala, že nástup menarche o 1 rok dříve má na riziko vzniku rakoviny prsu větší vliv než manifestace menopauzy o 1 rok později.

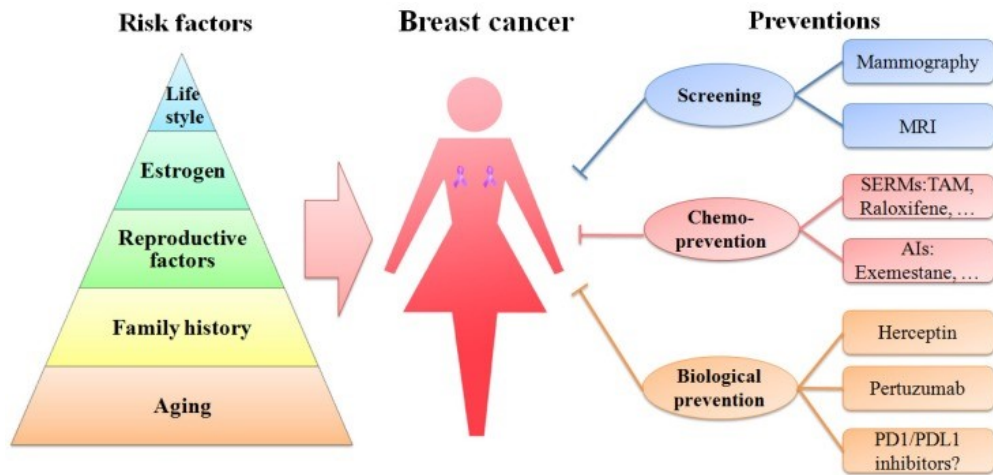
Pokud se zaměříme na hladiny estrogenů a progesteronů v organismu, dojdeme k závěru, že veškeré odchylky od fyziologické koncentrace jsou rizikové. Buňky prsu nejsou navyklé na odlišnou hladinu hormonů, než kterou očekávají. V případě perorální kontracepce je důležité zvážit riziko brzkého podání, které zvyšuje potenciál rozvinutí nádoru prsu. Avšak zvýšené riziko podle údajů mizí v rozmezí 4-10 let po vysazení přípravků. Podobně je tomu při užívání hormonální substituční terapie s podobným trendem, nejdříve dochází ke zvýšení rizika manifestace prsního nádoru a po vysazení se riziko v rozmezí 1-5 roků vrátí na původní hodnoty (Dall and Britt 2017).

Konzumace alkoholických nápojů má také dopad na rozvinutí prsního nádoru. Příjem alkoholu nad 15 gramů za den ve srovnání se skupinou abstinentů se projevil zvýšeným rizikem rakoviny prsu o 23-33 %. Množství 15 gramů alkoholu může být reprezentováno např. 0,5 l piva (Jung et al. 2016).

Se vzrůstající konzumací alkoholu stoupá podle studie Hamajima et al. (2002) riziko rakovinového zvratu s každými 10 g alkoholu o 7,1 %. Pokud uplatníme tato data v praxi, dojdeme k závěru, že ve vyspělých zemích s průměrnou spotřebou alkoholu 6 g za den, je alkohol zodpovědný za 4 % případů rakoviny prsu. Pravděpodobný mechanismus účinku, který je zodpovědný za podpoření nádorového zvratu buněk, je schopnost alkoholu zvyšovat produkci estrogenu v krvi. Tudíž nádory prsu, které jsou spojené s příjmem alkoholu, jsou většinou podtypu ER+ (Winters et al. 2017).

Vliv aktivního kouření na zvýšení incidence nádoru prsu bylo dlouhou dobu kontroverzní téma, až v poslední době se objevují důkazy o přímém vztahu kouření a vzniku nádoru prsu. Vzniklo více studií popisujících negativní vliv kouření na rozvinutí karcinomu prsu (Luo et al. 2011). Podle studie Luo et al. (2011) měly bývalé kuřačky o 9 % a současné kuřačky dokonce o 16% zvýšené riziko rozvinutí nádoru prsu oproti ženám, které nikdy nekouřily. Vzniklé riziko záviselo na mnoha faktorech: délce kouření, počtu vykouřených cigaret, věku na začátku kouření a počtu let od konce kouření. Riziko přetrvávalo po dobu 20 let. Asociace mezi kouřením a nádorovou přeměnou prsních buněk byla hlášena hlavně u silných a dlouhodobých kuřáků. Největší riziko bylo spojeno se začátkem kouření v brzkém věku života. Případný pozitivní účinek může mít kouření po menopauze, kdy dochází ke snížení produkce endogenních estrogenů. Kouření může mít antiestrogenní účinek a v momentě, kdy produkce hormonů je malá, může se

antiestrogenní účinek více projevit. Schéma ukazující možné rizikové faktory a možnosti prevence rozvinutí nádoru prsu je znázorněno na Obrázku 1 (Xue et al. 2011).



Obrázek 1 Výčet rizikových faktorů a možnosti jejich prevence (Sun et al. 2017)

2.2.3 Prevence

Snížit riziko rozvinutí prsního nádoru u predisponovaných lidí lze několika různými přístupy. Základním přístupem je změna životního stylu. Se změnou životního stylu úzce souvisí BMI, který moduluje riziko nádorového zvratu po celý život jedince. Vyšší tělesná hmotnost premenopauzálních žen vykazuje ochranný účinek na rozvoj premenopauzálního karcinomu prsu, ale podporuje manifestaci postmenopauzálního karcinomu prsu. Vysvětlení sníženého premenopauzálního rizika by mohla představovat nedostatečná ovulace žen s nadváhou. Zvýšené riziko u postmenopauzálních žen s nadváhou souvisí s uvolněním estrogenů z tukové tkáně, spolu s tím nadváha představuje rizikový faktor pro rozvinutí diabetu mellitu II. typu, který je také rizikovým faktorem pro manifestaci karcinomu prsu (Winters et al. 2017). Zvýšení hmotnosti ženy po 18. roce života vede ke zvýšení rizika postmenopauzální rakoviny prsu. Hmotnostní přírůstek podporuje vznik hlavně nádorů ER+ a PR+. Naopak pokud dojde ke snížení hmotnosti v dospělosti, dochází tak automaticky ke snížení rizika vzniku karcinomu po menopauze. Zároveň dle této studie byly ženy s BMI nižším než 21 v 18 letech citlivější k vzniku postmenopausálního karcinomu. Stejný trend probíhá v období po menopauze. Což znamená, že primárně u žen s BMI pod 25, u kterých se zvýší hmotnost, zvýší se i riziko vzniku nádoru prsu. Riziko vzniku nádoru se naopak snížilo hlavně u žen s BMI nad 25, které zredukovaly svou hmotnost. Takové hmotnostní změny mají vliv na receptorovou vybavenost prsní tkáně, kde dochází k ovlivnění nádorů prsu ve prospěch ER+ a PR+. Spojitost mezi receptorovou vybaveností prsního nádoru a hmotností ženy souvisí s přeměnou androgenů na estrogen v tukové tkáni. Vyšší hladina estrogenu může podporovat vznik prsních nádorových buněk charakterizovaných ER+ a PR+ (Eliassen et al. 2006).

Dle studie Baer et al. (2010) vyšší množství tělesného tuku u dospívajících žen může být důležitým faktorem, který chrání před manifestací premenopauzálního nebo postmenopauzálního karcinomu prsu. Silnější vztah byl pozorován v podskupině žen s nižší porodní váhou než 8,5 liber a žen užívajících hormony po menopauze. Pozorování bylo nezávislé na aktuální hmotnosti žen. Mechanismus, kterým vyšší objem tukové tkáně snižuje pravděpodobnost manifestace nádoru prsu není znám.

Fyzická aktivita jako faktor životního stylu snižuje riziko vzniku karcinomu prsu. Ženy s intenzivní pohybovou aktivitou vykazovaly až o 25% nižší riziko nádoru prsu

oproti ženám, které měly pohyb minimální. Zjištění bylo nezávislé na faktorech typu přítomnosti estrogenového receptoru (ER), BMI, zvýšení hmotnosti v dospělosti nebo užívání postmenopauzální hormonální terapie. Efekt fyzické aktivity může být zprostředkován přes ovlivnění hladiny endogenních hormonů, kontrolu hmotnosti, metabolismus glukózy, citlivosti k inzulinu a zánětlivých markerů. Všechny zmíněné faktory se podílejí na etiologii postmenopauzálního nádoru prsu (Hildebrand et al. 2013). Fyzická aktivita v pubertě a ideální váha dle BMI v období menarche a 21. roku života podporovala dle studie King et al. (2003) pozdější manifestaci nádoru prsu u žen s mutací genů BRCA1 a BRCA2.

Chemoprevence má potenciál snížit výskyt nádoru prsu u velmi rizikové populace. Používají se chemoterapeutika s dvojitým mechanismem účinku. Společným rysem chemoprevence nádoru prsu je snížení aktivace ER. Selektivní modulátory estrogenového receptoru působí jako agonisté či antagonisté na ER. Nejvýznamnějšími zástupci jsou tamoxifen a raloxifen. Druhou skupinou jsou inhibitory aromatasy účinkující prostřednictvím inhibice enzymu aromatasy, který katalyzuje přeměnu androgenu na estrogen a zástupci jsou exemestan, anastrozol a letrozol (Sun et al. 2017).

Tamoxifen vykazuje snížení rizika u zdravých vysoce rizikových žen o 38 %. Ovlivněna byla hlavně subpopulace nádorů charakterizovaných jako ER+, a to se sníženým výskytem o 48 %, nádory bez zvýšeného výskytu ER nebyly ovlivněny vůbec. Terapie má za následek nežádoucí účinky jako jsou návaly horka a gynekologické projevy. Společně s nimi se rozvíjí i závažné nežádoucí účinky zastoupené hlavně rozvojem karcinomu endometria a tromboembolickými příhodami (Bozovic-Spasojevic et al. 2012).

Zástupce IA anastrozol stejně jako exemestan prokázal schopnost snížit výskyt nádoru. Stejně jako u tamoxifenu došlo ke snížení manifestace nádorů ER+ nádorů a nedošlo k ovlivnění výskytu subpopulace nádorů ER-. Vliv anastrozolu na snížení rozvoje karcinomu prsu byl ve srovnání s tamoxifem vyšší. Zajímavým rysem se zdá být účinnost anastrozolu na nádory s vysokým gradingem, který se projevil tím, že převládal výskyt nádorů nižšího stupně než stupně vyššího. Výhodným rysem do klinické praxe je, že anastrozol neovlivňuje frekvence výskytu tromboembolických a cerebrovaskulárních příhod a infarktu myokardu. Avšak došlo k ovlivnění krevního tlaku směrem k vyšším hodnotám (Cuzick et al. 2014).

2.2.4 Screening

Jedním z přístupů, který už nelze označit jako prevenci, je screeningové vyšetření. Cílem vyšetření je detekovat bulku dříve, než bude hmatatelná, tudíž diagnostikovat nádorové onemocnění v dřívější fázi a v optimálním případě tak zvýšit šanci na vyléčení, neboť prognóza nádoru prsu mimo jiné závisí na velikosti novotvaru. V nedávné studii autoři došli k závěru, že screening karcinomu prsu má vliv na obecné snížení úmrtnosti na toto onemocnění, avšak závěry nejsou statisticky významné pro ženy ve věku 39-49 let a 70-74 let. Obecné snížení mortality stanovila studie na 22 %. V případě vlivu screeningu u pokročilého karcinomu prsu vykázal screening signifikantní snížení u žen nad 50 let věku. Na druhou stranu byl zaznamenán vliv zvýšeného zachytu duktálního karcinomu *in situ* a raného onemocnění (Nelson et al. 2016). Kritický pohled přináší studie Gøtzsche and Jørgensen (2013), která se zaměřuje hlavně na již zmíněný trend naddiagnostikování a léčení útvarů, které by se dále už nerozrostly. Důvodem je, že ve významné části pozitivních nálezů dochází k zachycení pomalu rostoucích benigních útvarů, oproti tomu rychle rostoucí agresivní nádory se detekují obtížněji, a tak v populaci dochází k zachycení případů, které by pacienta v budoucnu neohrožovaly na životě. V těchto případech pak často dochází k zbytečnému indikování nemoci a zbytečnému vykonání dalších intervencí jako je například radioterapie. Zvyšování úspěšnosti léčby studie přisuzuje pokročilým terapeutickým postupům a větší míře informovanosti v široké veřejnosti.

Studie uvádí, že pokud je žena pozvána ke screeningu a bude jí diagnostikováno nádorové onemocnění prsu, je 19 % šance na naddiagnostikování (=zbytečná diagnóza). Znamená to tedy, že každá 1 ze 77 žen, které jsou pozvány na screeningové vyšetření podle této studie bude naddiagnostikována. Tyto ženy představují největší problém v procesu diagnózy. Naddiagnostikované ženy budou indikovány k dalším terapeutickým výkonům za nulového snížení mortality. Výsledek správného indikování karcinomu prsu a naddiagnostikování nemoci studie udává, že na každé jedno úmrtí na karcinom prsu budou indikovány tři pacientky naddiagnostikované (Marmot et al. 2012).

Darby et al. (2005) ve své studii tvrdí, že ženy, které podstoupily v sedmdesátých letech radioterapii nádoru prsu, trpěly zvýšeným rizikem onemocnění srdce a plic v následujících letech. Příčinou vzniklého rizika byl směr průniků paprsků záření a postavení orgánů srdce a plic vůči prsní tkáni. V případě ozáření levého prsu se mohlo

riziko rozvoje srdečních onemocnění až zdvojnásobit vůči neozářené populaci. V případě ozáření pravého prsu mohlo dojít ke zvýšení rizika pouze o jednu třetinu. Paprsky záření ovlivnily i plicní tkáň. Větší postižení vykazovala vždy ipsilaterální strana, což je oblast za daným postiženým prsem.

Dle studie Gøtzsche et al. (2012) snižuje screening mortalitu nádoru prsu v rozmezí 0-12 %. V současné době je tento údaj dále ještě oslaben zavedenou farmakoterapií, díky které je hodnota ještě nižší a efekt může být dokonce až nulový. Zásadní věc je neschopnost screeningu snížit výskyt pokročilých nádorů. Do určité míry svou roli na snížení účinku screeningu hraje i větší informovanost žen o rakovině prsu a vykonávání samovyšetření. Avšak další problém může představovat i samotná identifikace nádoru na mamografu. Při preventivním screeningu to souvisí s vysokým množstvím negativních vzorků na málo pozitivních pacientek.

2.2.5 Diagnostika

Základním diagnostickým postupem určujícím rozsah postižené tkáně je vyšetření zobrazovacími metodami. Díky pravidelnému mamografickému screeningu ženské populace dochází k záchytu hlavně časných lokalizovaných forem, tudíž obecné provádění screeningu metastáz u nově diagnostikovaných se považuje za obsoletní. Ke screeningu metastáz se přistupuje jen u pacientek s větším potenciálem rozsevu nádorových buněk do okolních tkání, např. asymptomatických pacientek s HER2+ nádory. Na přítomnost metastáz se vyšetřují především tkáně hrudníku, břicha a mozku. Dále se na charakterizaci nádoru uplatňuje bioptická verifikace. Mezi její principy patří vyšetření histologického typu, určení nádorového gradu, exprese ER a PR, určení jednoho z proliferačních markerů, exprese HER2, lymfatické a vaskulární invaze (Novotný et al. 2019).

2.2.6 Symptomy

Rozsáhle množství symptomů, které mohou poukazovat na nádorové onemocnění prsu, lze zjistit při domácím samovyšetření prsní tkáně. Hlavním znakem nádorového ložiska je přítomnost tvrdé, nepohyblivé léze s nepravidelnými okraji. Můžeme dále pozorovat změnu velikosti a tvaru prsu, retrakci bradavky, bolest prsu či výtok z bradavky. Progredující onemocnění se projevuje axilární adenopatií nebo kožními nálezy jako je výskyt erytému, ztlustění pokožky či tzv. *peau-d'orange*. Na základě přítomnosti alespoň jednoho z těchto symptomů by mělo dojít k vyhledání odborníka a podstoupení dalších vyšetření. Výskyt kožních příznaků poukazuje na zánětlivý nádor prsu. Pokud dojde k rozšíření do jiných orgánů, můžeme nalézt širší množství projevů. Nejčastěji dochází ke vzniku metastáz v kostech, které se manifestují bolestí nebo citlivostí kostí. V případě metastáz do plic může dojít k bolesti na hrudi, kašli nebo dušnosti a v případě rozšíření do jater dochází k nevolnosti, bolesti břicha a žloutence (Adam et al. 2010; Joe 2022).

2.2.7 Stádia onemocnění

Podstatou stagingu je určení stádia nádorového procesu. Nejvíce využívaným systémem stagingu je tzv. Tumor-Node-Metastasis (TNM), který určuje prognózu nádorového onemocnění na základě charakteristiky primárního nádoru (T), postižení regionálních mízních uzlin metastáz (N) a přítomnosti/nepřítomnosti vzdálených metastáz (M). Další uplatnění nachází např. při plánování následující léčby nebo při zhodnocení proběhlé léčby. Jednotlivé kategorie TNM obsahují podkategorie, které odrážejí charakter nádorového onemocnění. Klasifikace TNM pro nádor prsu je zobrazena v Tabulce 3 (Cserni et al. 2018).

Tabulka 3 TNM klasifikace pro nádor prsu (Brierley et al. 2022)

T – PRIMÁRNÍ NÁDOR

TX	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
Tis (DCIS)	Duktální karcinom <i>in situ</i>
Tis (LCIS)	Lobulární karcinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pagetova choroba bradavky bez spojení s invazivním karcinomem a/nebo s karcinomem <i>in situ</i> (DCIS a/nebo LCIS) nacházejícím se v prsním parenchymu. Karcinomy prsního parenchymu spojené s Pagetovou chorobou jsou klasifikovány na základě velikosti a vlastností onemocnění prsního parenchymu, i když přítomnost Pagetovy choroby by měla být uvedena
T1	Nádor do 2 cm v největším rozměru
T1mi	Mikroinvaze do 0,1 cm v největším rozměru
T1a	Větší než 0,1 cm, do 0,5 cm včetně v největším rozměru
T1b	Větší než 0,5 cm, do 1 cm včetně v největším rozměru
T1c	Větší než 1 cm, do 2 cm včetně v největším rozměru
T2	Nádor větší než 2 cm, do 5 cm včetně největšího rozměru
T3	Nádor větší než 5 cm v největším rozměru
T4	Nádor jakékoliv velikosti s přímým šířením do stěny hrudní a/nebo do kůže (ulcerace nebo kožní uzly)

T4a	Šíření do stěny hrudní (nezahrnuje pouhé postižení m. pectoralis)
T4b	Ulcerace, stejnostranné satelitní kožní uzly, nebo edém kůže (včetně <i>peau d'orange</i>)
T4c	Obě výše uvedená kritéria 4a a 4b současně
T4d	Inflamatorní karcinom

N – Regionální mízní uzliny

NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit (např. dříve odstraněné)
N0	Regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	Metastázy v pohyblivé stejnostranné axilární mízní uzlině (uzlinách) I. a II. etáže
N2	Metastázy ve stejnostranné axilární mízní uzlině (uzlinách) I. a II. etáže, které jsou klinicky fixované nebo srostlé (paket); bez přítomnosti klinicky zjevných metastáz v axilárních mízních uzlinách
N2a	Metastázy v axilárních mízních uzlinách, fixovaných mezi sebou navzájem nebo k jiným strukturám
N2b	Metastázy pouze klinicky zřejmé ve vnitřní mamární mízní uzlině (uzlinách), bez přítomnosti klinicky zjevných metastáz v axilárních mízních uzlinách
N3	Metastázy ve stejnostranné infraklavikulární mízní uzlině (uzlinách) s nebo bez postižení I. a II. etáže axilárních mízních uzlin; nebo metastázy ve stejnostranné supraklavikulární mízní uzlině (uzlinách), s nebo bez postižení axilárních či vnitřních mamárních mízních uzlin
N3a	Metastázy v infraklavikulární mízní uzlině (uzlinách)
N3b	Metastázy ve vnitřních mamárních a axilárních mízních uzlinách
N3c	Metastázy v supraklavikulární mízní uzlině (uzlinách)

M – Vzdálené metastázy

M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy

Na základě klasifikace TNM dochází k zařazení kategorií TNM do jednotlivých klinických stádií. Tato stádia spojují jednotlivé kategorie TNM podle schopnosti přežití. Klinická stádia jsou znázorněna v Tabulce 4. Obecně platí, že nádory lokalizované v tkáni svého původu jsou zařazeny ve stádiu I a II. Ve stádiu III jsou zařazeny nádory zasahující do regionálních mízních uzlin a stádium IV sdružuje nádory se vzdálenými metastázami (Brierley et al. 2022).

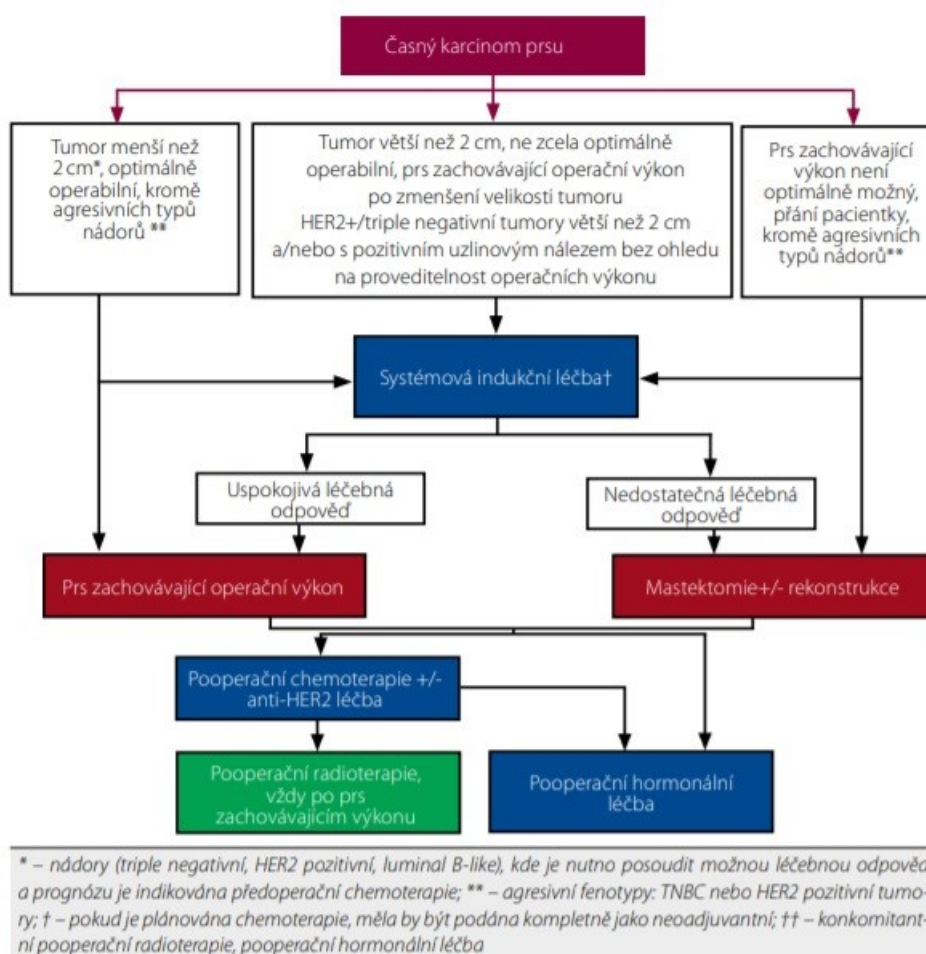
Tabulka 4 Klinická stádia nádoru prsu (Brierley et al. 2022)

STADIUM 0	Tis	N0	M0
STADIUM IA	T1*	N0	M0
STADIUM IB	T0, T1*	N1mi	M0
STADIUM IIA	T0, T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
STADIUM IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
STADIUM IIIA	T0, T1*, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
STADIUM IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
STADIUM IIIC	jakékoliv T	N3	M0
STADIUM IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

2.2.8 Možnosti léčby

Léčba časného nádoru prsu je komplexní a zahrnuje kombinaci lokálních, systémových intervencí a podpůrných opatření. Mezi lokální postupy se řadí chirurgické a radioterapeutické výkony, systémová léčba zahrnuje chemoterapii, hormonální terapii a cílenou terapii (Cardoso et al. 2019).

Postup léčby je založen na stádiu onemocnění podle klasifikace TNM. Mezi standardní postupy charakterizace nádoru prsu patří určení exprese ER, PR, HER2 a Ki67 (Cardoso et al. 2019). Postup léčby je založen na stádiu onemocnění podle klasifikace TNM. Následná terapie se liší podle stádia onemocnění, kdy pro stádia IA a B nebo menší IIA je indikován primárně operační výkon s následnou adjuvantní terapií. Stádia IIA či IIB, IIIA-IIIIC, nádory HER2+ a triple negativní nádory nad 2 cm nejsou zpočátku operabilní, a proto se přistupuje nejdříve k neoadjuvantní terapii a až posléze k chirurgickému zákroku. Strategie léčby je znázorněna na Obrázku 2 (Čmejlová 2020).



Obrázek 2 Strategie léčby časného karcinomu prsu (Čmejlová 2020)

Chirurgické řešení je v případě operabilních nádorů primárním terapeutickým přínosem. Operuje se nádorová oblast prsu s cílem eliminovat tumor a zabránit progresi onemocnění. Souběžně dochází k chirurgickému výkonu v axile za účelem určení rozsahu postižení mízních uzlin. V dnešní době se preferuje záchovná operace prsu (tzv. parciální mastektomie) s vyšetřením sentinelové uzliny. Totální mastektomie je volena na přání pacientky nebo pokud je parciální mastektomie nedostačující. Pokud nejsou před chirurgickým výkonem axilární uzliny postiženy, je upřednostněna biopsie sentinelové uzliny před axilární disekcí. Zavedení biopsie sentinelové uzliny na úkor axilární disekce snížilo nežádoucí projevy jako lymfedém horní končetiny nebo parestázie (Čmejlová 2020).

Následně po chirurgickém odstranění nádoru je indikována adjuvantní terapie, přesný charakter je závislý na proměnných typu rozsahu onemocnění, radikalitě operačního výkonu, anebo histologickému vyšetření. Účelem adjuvantní terapie je úplné zahubení nádorových buněk a následné vyléčení pacientky. V rámci adjuvantní terapie se uplatňuje cytostatická léčba, biologická terapie a léčba hormonální, využívá se i následné indikování radioterapie. Podle použitého typu adjuvantní terapie se odvíjí i délka použité aplikace. Chemoterapie se podává 3-6 měsíců, cílená anti-HER2 terapie po dobu 1 roku a nejdéle se užívá hormonální terapie, která se aplikuje po dobu 5-10 let v závislosti na riziku recidivy onemocnění. Adjuvantní chemoterapie je indikována hlavně u TNBC, HER2+ a pacientek s luminálním nádorem s výskytem dalších rizikových faktorů relapsu onemocnění. Indikují se chemoterapeutické režimy založené na kombinaci antracyklinů, cyklofosfamidu a taxanů. Chemoterapie u premenopauzálních pacientek vyvolává menopauzu. Ochrana ovariální funkce je zajištěna použitím syntetických analog gonadoliberinů před podáním chemoterapie. U pacientek HER2+ je standardním léčebným postupem podání anti-HER2 protilátky společně s indikovaným chemoterapeutickým režimem zahrnujícím antracyklin s taxany. Následně po chemoterapeutickém režimu se u hormon-dependentních nádorů pokračuje s hormonální léčbou. Farmakoterapeutické schéma je zobrazeno v Tabulce 5 (Čmejlová 2020).

Tabulka 5 Farmakoterapeutické doporučení pro adjuvantní léčbu dle podtypů karcinomu prsu (Novotný et al. 2019)

Podtyp	Léčba	Poznámky
Luminální A	Hormonální	CHT lze zvážit u N>3 a u rizikových N+ pacientek dle Oncotype Dx.
Luminální B (HER2-negativní)	Hormonální+CHT	Zvážit podle positivity receptorů a rizika relapsu.
Luminální B (HER2-negativní)	CHT+anti-HER2+hormonální	Vynechání CHT se nedoporučuje.
HER2+ (neluminální)	CHT+anti-HER2	Pacientky pT1a N0 mohou být pouze sledované.
TNBC (duktální)	CHT	Medulární a adenoidně cystický karcinom N0 může být pouze sledován.

CHT, chemoterapie

U hormon-dependentních nádorů by měla být adjuvantní hormonální terapie indikována za všech okolností. Lékem volby jsou léčivé přípravky obsahující antagonistu estrogenových receptorů nebo inhibitory aromatas. U premenopauzálních pacientek je terapie kombinovaná s ovariální supresí zprostředkovanou analogy hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH) nebo provedením chirurgické kastrace. V případě podání goserelinu, který je analogem LHRH, je terapie indikována po dobu 5 let. Nevýhodou tamoxifenu z hlediska bezpečnostního profilu je riziko endometriálních proliferčních změn, v krajních případech až manifestace karcinomu endometria (Čmejlová 2020).

Podávání bisfosfonátů v adjuvantní terapii prokázalo vliv na snížení rizika recidiv kostních metastáz. Největší prospěch se předpokládá u více rizikových nádorů typů TNBC, HER2+ a N+. Nejvíce důkazů máme pro 3–5leté podávání klodronátu a zolendronátu (Čmejlová 2020).

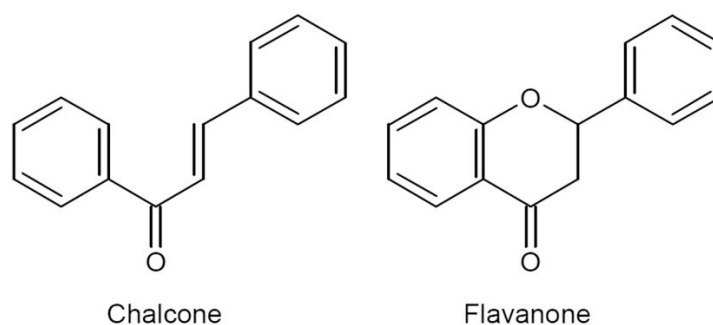
V případě, že nádor prsu není operabilní, přistupuje se k neoadjuvantní léčbě. Neoperabilní nádory prsu jsou podle klasifikace TNM stádia IIIA-IIIIC. V případě, že lze dosáhnout u stádia IIA-IIB zachovné operace prsu, lze indikovat neoadjuvantní terapii i zde. U nádorů HER2+ a u TNBC velikosti nad 2 cm lze neoadjuvantní léčbu zvážit taktéž. Cílem přístupu je umožnit operabilitu nádoru, snížit množství chirurgických výkonů a u

agresivních forem snížit riziko metastatického postižení. Ideálním důsledkem neoadjuvantní léčby je dosažení kompletní patologické remise. V případě neoadjuvantní chemoterapie se používají režimy založené na antracyklinech a taxanech. U pacientů s HER2+ nádorem je v případě neoadjuvantní léčby indikovaný chemoterapeutický režim společně s transtuzumabem (monoklonální látka proti HER2) doplněným na základě biologického určení nádoru hormonální léčbou. U pacientek s neoperabilním nádorem exprimujícím ve zvýšené míře hormonální receptory je podána hormonální terapie. Zároveň je léčba vhodná pro starší a morbidně zatíženější pacientky, díky svému úzkému spektru nežádoucích účinků. V dnešní době je prokázána větší efektivita inhibitorů aromatázy před tamoxifenem. Operační výkon navazující na ukončení neoadjuvantní léčby by měl být uskutečněn nejdéle do 6 týdnů po ukončení neoadjuvantní terapie. Ve většině případů se odstraňuje zbytková nádorová tkáň po ukončené neoadjuvantní proceduře. Další postup po operačním výkonu se řídí fenotypem nádoru a rozsahem onemocnění (Čmejlová 2020).

Radioterapie je zahájena nejdéle 6 měsíců po chirurgickém výkonu. Po výkonu zachovávající prs se aplikuje na oblast celé tkáně prsu a spádová lymfatika. Při zvýšeném riziku rekurence je možná aplikace tzv. „boost dávky“ na oblast primárního nádoru. Alternativou k „boost radioterapii“ je brachyterapie, která se s výhodou indikuje u pacientek s objemnějšími prsy a uložením tumoru v hloubce prsu. Radioterapie po mastektomii se indikuje u tumorů T3 a T4 s pozitivními okraji a pozitivním nálezem v axile (Čmejlová 2020).

2.3 Prenylflavonoidy

Flavonoidy jsou deriváty 2-fenylchromanu (flavanu) a patří k nejrozšířenější skupině sekundárních metabolitů rostlin. Z uvedené molekuly dochází k odvození dalších strukturních podtypů: flavanonů, flavanonolů, flavonů, flavandiolů, flavonolů, flavanolů a anthokyanidinů. V přírodě se vyskytují buď volně jako tzv. aglykony nebo vázané na cukerný zbytek ve formě tzv. glykosidu. Rozdíl mezi strukturou chalkonů a flavonoidů je uveden na Obr. 3 (Opletal 2016).

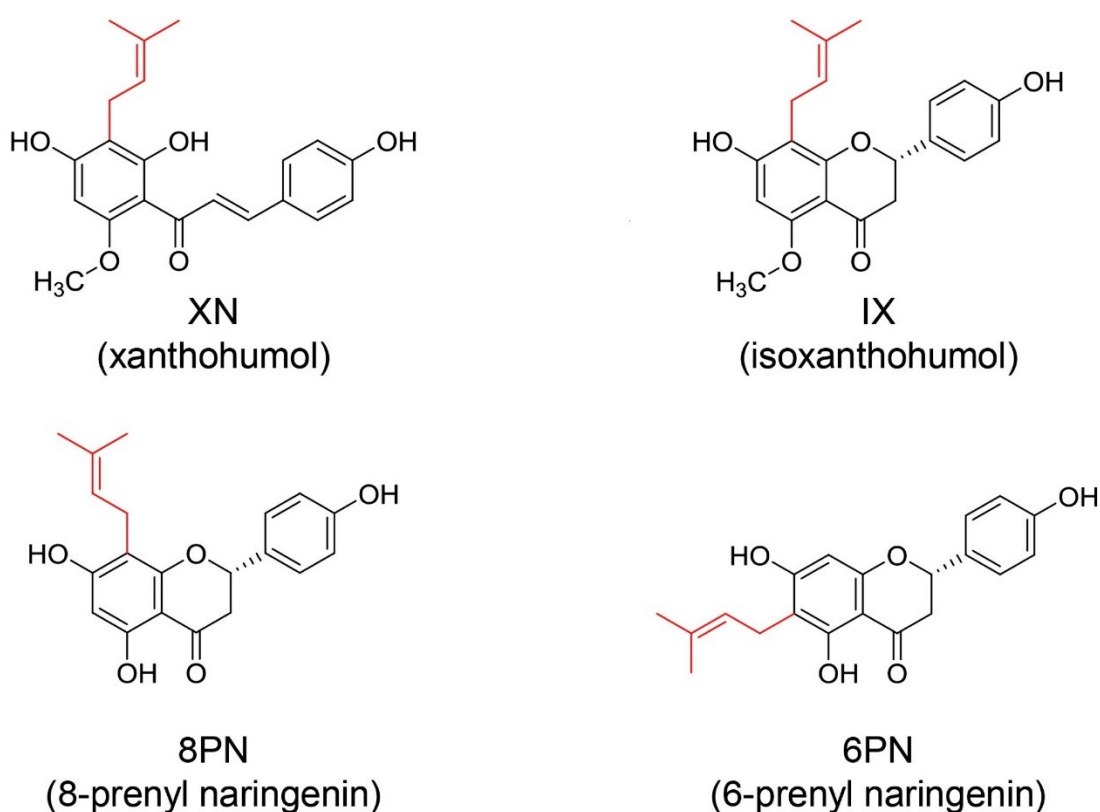


Obr. 3 Porovnání struktury chalkonů a flavonoidů (Venturelli et al. 2016)

Základní strukturu flavonoidů tvoří systém dvou benzenových kruhů spojených pyranovým heterocyklem. Nahrazením vodíku na základním skeletu prenylovým zbytkem (dimethylallyl) odvodíme prenylchalkony a prenylflavonoidy (Venturelli et al. 2016). Důsledkem prenylace je zvýšená lipofilita molekuly, což umožňuje vyšší průnik do tkání a silnější biologickou odezvu. Díky zvýšené lipofilitě dochází u prenylovaných derivátů k nižší střevní absorpci a zvýšené kumulaci v buňkách. Rychlost vyloučení z buněk je podmíněna rychlostí glukuronidace molekuly, která je závislá mimo jiné na rozsahu prenylace flavonoidu. Důsledkem je schopnost prenylace pozitivně zvyšovat tkáňovou kumulaci (Mukai 2018).

2.3.1 Výskyt

Humulus lupulus (Cannabaceae) je jedinečným zdrojem přírodních prenylovaných flavonoidů jako jsou XN jeho izomer IX, 8PN a 6PN. Uvedené látky (Obr. 4) vykazují např. antioxidační, antidiabetickou, protizánětlivou a estrogení aktivitu. Výzkumy ukázaly, že XN a další prenylflavonoidy vykazují též aktivitu protinádorovou u mnoha typů nádorů, jako je kolorektální karcinom, karcinom prsu, glioblastom a nádory slinivky břišní. Mechanismus jejich protinádorového působení zahrnuje indukci apoptózy nádorových buněk a inhibici angiogeneze. Struktury prenylovaných flavonoidů jsou znázorněny na Obr. 4 (Ambrož et al. 2019a).

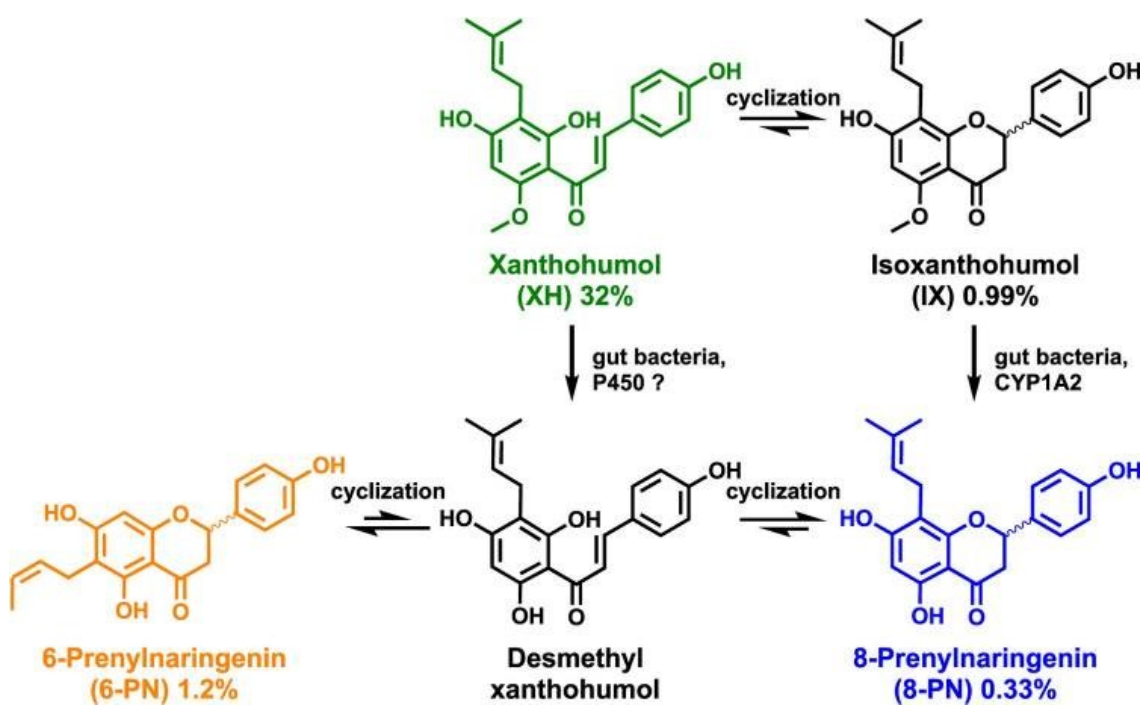


Obr. 4 Struktura hlavních prenylflavonoidů obsažených ve standardizovaném chmelovém extraktu (Mukai 2018)

Součástí samičích chmelových hlávek jsou lupulinové žlázy, které produkují kromě hořkých kyselin směs prenylovaných, geranylovaných, oxidovaných nebo cyklizovaných chalkonů a flavanonů. Přítomnost volné hydroxylové skupiny v chalkonech umožňuje izomerizaci na flavanony, které se vyskytují v chmelových hlávkách v nižších koncentracích. Produktem izomerizace XN je IX a produktem

izomerace desmethylxanthohumolu je díky přítomnosti dvou hydroxylových skupin směs 6PN a 8PN (Karabin et al. 2014). Konečným produktem biosyntetických drah jsou podle současných poznatků chalkony, zatímco flavanony vznikají chemickou izomerizací v přírodě se vyskytujících prekurzorů chalkonů (Bolton et al. 2019).

XN je nejkoncentrovanější fenolickou složkou chmele. Tak jak můžeme vidět na Obr. 5, všechny chmelové prenylflavonoidy jsou chemicky interkonvertibilní, v důsledku čehož se získané chmelové extrakty liší poměrem zastoupení jednotlivých sekundárních metabolitů, což je dáno použitým technologickým postupem přípravy (Bolton et al. 2019).



Obr. 5 Prenylflavonoidy obsažené v chmelu a jejich vzájemné přeměny mezi sebou (Bolton et al. 2019)

2.3.2 Biologické účinky prenylflavonoidů

Prenylflavonoidy jsou jedinečnou třídou přirozeně se vyskytujících flavonoidů, které hrají významnou roli v obranné strategii rostliny. Prenylace základního skeletu flavonoidů zvyšuje bioaktivitu molekuly, proto mají prenylované flavonoidy větší potenciál pro vývoj nových léčiv či potravních doplňků a využití v podpoře lidského zdraví (Chen et al. 2014).

Zdá se, že příznivé účinky prenylflavonoidů souvisejí s různými biologickými a farmakologickými aktivitami, jakými jsou protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidantní, protinádorové, estrogenní vlastnosti. Prenylace ovlivňuje biodostupnost jednotlivých prenylflavonoidů vlivem zvýšené tkáňové akumulace a snížené absorpce (Mukai 2018).

Miranda et al. (2000) studovali antioxidantní a prooxidantní vlastnosti prenylovaných a neprenylovaných chalkonů a flavanonů *in vitro*. Výsledky studie prokázaly, že prenylované chalkony jsou schopné v koncentracích 5 a 25 μM zabránit oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) způsobenou Cu^{2+} . Například XN vykazoval společně s α -tokoferolem úplnou inhibici oxidace LDL. Prenylflavanony vykazovaly antioxidantní aktivitu v menší míře. Zmíněné sloučeniny jsou spolu s dalšími fenolickými látkami jako jsou glykosidy kempferolu a kvercetinu, zodpovědné za antioxidantní aktivitu piva, která u testovaných vzorků byla větší než antioxidantní účinky zeleného čaje. Zmíněný účinek se však bude lišit podle typu jednotlivých piv a technologie přípravy. Za antioxidantní účinek jsou zodpovědné hydroxylové a methoxylové skupiny navázané na základní skelet flavonoidů.

Mezi významné účinky flavonoidů patří modulace protizánětlivé odpovědi. Flavonoidy, zejména prenylflavonoidy jsou schopné ovlivnit účinek prostaglandinů, oxidu dusnatého (NO) a transkripčního jaderného faktoru κB (NF- κB). Prenylflavonoidy ovlivňují produkci prostaglandinů prostřednictvím inhibice genové exprese genů pro cyklooxygenasu-1 (COX-1) a cyklooxygenasu-2 (COX-2). Tímto mechanismem účinku se profiloval hlavně XN. IX protizánětlivý účinek nevykazoval (Karabin et al. 2014). Dalším testovaným byl ještě 8PN, který podle studie Paoletti et al. (2009) inhiboval hlavně genovou expresi COX-2, dále zasahoval do procesu zánětu ovlivněním produkce NO. Bylo prokázáno, že XN je schopný inhibovat iNOS a tím snižovat produkci NO v zánětu. Prenylflavonoidy byly schopny inhibovat transkripci NF- κB , tento transkripční faktor je hlavní regulátor genů kódujících COX-1 a COX-2 (Karabin et al. 2014).

Prenylflavonoid kubraflavon B izolovaný z *Morus alba* (morušovník bílý, Moraceae) prokázal silnou protizánětlivou odpověď v *in vitro* modelu lipopolysacharidem vyvolané zánětlivé reakce v lidských makrofázích. Tento efekt je přisuzován více mechanismům. Působením přes inhibici translokace NF- κB do jádra došlo ke snížení transkripce genů pro COX-1 a COX-2, jejichž produkty se uplatňují při zánětlivé odpovědi. Kudraflavon B inhiboval také enzymovou aktivitu obou

cyklooxygenas. Silnější inhibiční aktivitu, která byla srovnatelná s působením nesteroidního antiflogistika indometacinu, vykazoval vůči COX-2, což je klíčový enzym zánětlivé odpovědi. Byl však zaznamenán také inhibiční vliv této látky na COX-1. Aktivita cyklooxygenas byla stanovována pomocí měření produkce prostaglandinu E₂ metodou enzymové imunoanalýzy (Hošek et al. 2011).

Z buněčných linií karcinomu prsu patří mezi TNBC např. linie MDA-MB-231 a Hs578T, ve kterých XN působil cytotoxicky, bránil proliferaci a invazivitě *in vitro* (Kim et al. 2013). Schopnost XN inhibovat růst *in vitro* byl prokázán i u buněk MCF-7, které mají exprimovaný ER i PR. V *in vivo* studii na athymických nahých myších s implantovanými buňkami MCF-7 byl per-orálně podáván XN, který vyvolal centrální nekrózu v nádorové tkáni, snížil počet zánětlivých buněk, snížil hustotu mikrocév a zvýšil procento apoptických buněk. XN též vykázal účinnost u buněčné linie MCF-7/ADR, které je charakteristická svou multirezistencí k chemoterapeutikům. V závislosti na dávce indukoval XN apoptózu, snižoval životaschopnost buněk a zastavoval buněčný cyklus. XN byl schopný v této linii zvyšovat odpověď na radioterapii a terapii doxorubicinem (Jiang et al. 2018).

XN má protektivní účinek vůči mutagenní aktivitě prokarcinogenů 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolinu (IQ) a benzo(a)pyrenu (BaP). XN v těchto buňkách účinně bránil aktivaci IQ a BaP lidským cytochromem P450 1A2 a inhiboval vazbu metabolitů IQ a BaP na DNA a proteiny. XN je rovněž induktorem a antioxidačních enzymů, které se pravděpodobně podílejí na chemoprotektivním a antimutagenním účinku XN (Plazar et al. 2007).

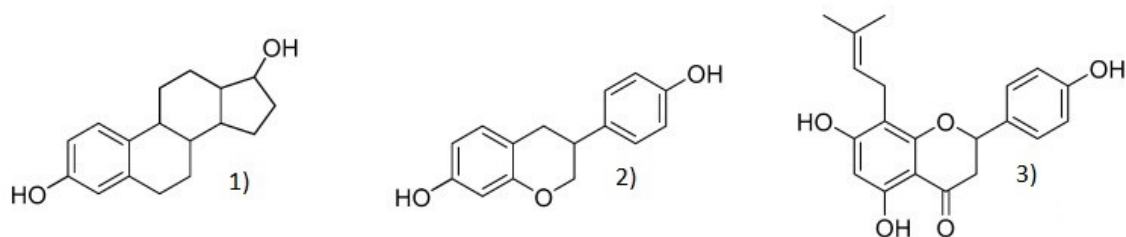
Důležitým prvkem pro růst a metastázování nádoru je podpora angiogeneze a tím i dodání nezbytných živin do nádorových buněk. XN přímo ovlivňoval několik kroků v procesu angiogeneze v buňkách karcinomu pankreatu, kromě toho také inhiboval produkci angiogenních faktorů např. vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) nebo interleukinu-8 (IL-8). K inhibici produkce VEGF a IL-8 došlo pravděpodobně vlivem inhibice transkripce NFκB (Liu et al. 2015).

Protinádorová aktivita XN je zprostředkována inhibicí proliferace a indukcí apoptózy v nádorových buňkách. Navození apoptózy bylo pozorováno u různých typů nádorových buněk, jako jsou leukemické buňky, buňky karcinomu prostaty, ovariálního karcinomu, hepatocelulárního karcinomu, karcinomu prsu a lidského maligního

glioblastomu. Účinek jednotlivých prenylflavonoidů je ovlivněn typem základního flavonoidního skeletu a modifikací prenylové skupiny, ale liší se i v různých nádorových buněčných liniích, což napovídá, že se uplatňuje více mechanismů účinku a molekulárních cílů. Apoptóza indukovaná XN souvisí hlavně s up-regulací anti-apoptotických proteinů, down-regulací pro-apoptotických proteinů, aktivací kaspas, receptorů smrti a mitochondriální apoptózy. Na apoptóze indukované XN se podílí též oxidační stres a stresová reakce endoplazmatického retikula. K indukci apoptózy přispívá i inhibice aktivace NF- κ B a další mechanismy, jako např. inhibice aromatasu a topoisomerasy I (Liu et al. 2015).

XN zvyšuje citlivost rezistentních nádorových buněk k radio- a chemoterapii, pomocí kterých dochází k apoptóze buněk. Byla popsána jeho schopnost zvyšovat citlivost buněčné linie MCF-7/ADR na radiační léčbu. Společně s IX,6PN a 8PN je inhibítorem efluxního transportního proteinu BCRP/ANCG2 (breast cancer resistance protein), který se podílí na vzniku rezistence buněk na chemoterapeutika (Liu et al. 2015).

Hlavní látkou obsaženou v chmelu, která má estrogenní aktivitu, je 8PN. Svým účinkem se řadí mezi nejsilnější fytoestrogeny. Větší afinitu má k estrogennímu receptoru α , ke kterému má pouze 70x slabší afinitu než 17 β -estradiol. U enantiomerů nebyla pozorována odlišná afinita k estrogenním receptorům. V porovnání s naringeninem má mnohonásobně silnější vazbu na estrogenní receptor α . Za tuto vazbu je zodpovědná prenylace naringeninu v poloze 8 a s tím související zvýšení hydrofobicity molekuly, která se uplatní v posílení vazby v lipofilní kapse ER α . Struktury estradiolu, isoflavonu a 8PN jsou uvedeny v Obr. 6 (Tronina et al. 2020).



Obr. 6 1) Chemická struktura estradiolu, 2) Chemická struktura isoflavonu, 3) Chemická struktura 8PN (Tronina et al. 2020)

Standardizovaný chmelový extrakt s obsahem 8PN byl schopný snížit klimakterické potíže žen. Avšak při testování 8PN *in vivo* na prasečím modelu došlo k ovlivnění zrání oocytů. Tento jev může vést až k neplodnosti. Vzhledem k malé

velikosti vzorku nemusí být výsledky objektivní a k určení bezpečnosti a účinnosti u chmelových extraktů při zmírnění menopauzy budou zapotřebí další klinické studie (Tronina et al. 2020).

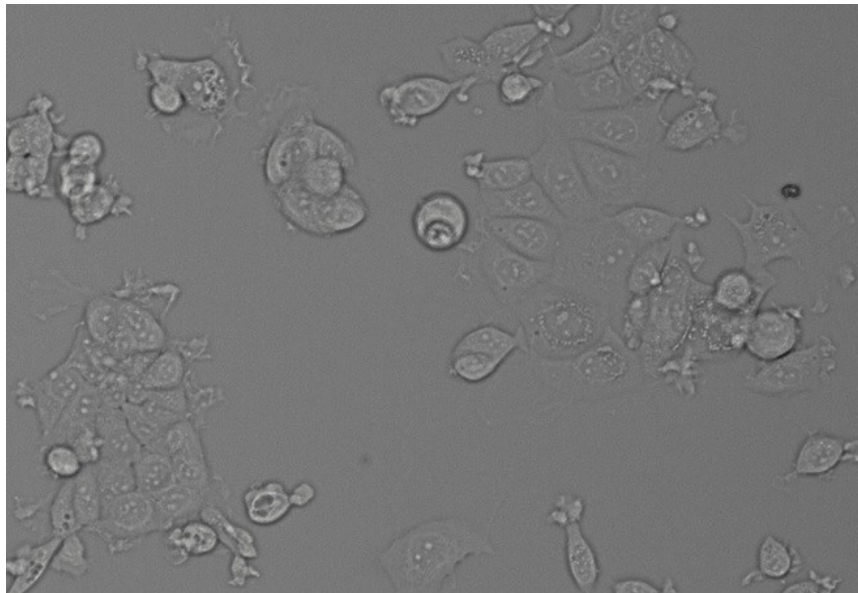
2.3.3 Farmakokinetika

Při podání standardizovaného extraktu chmelu byla prokázána cyklizace XN na IX, který byl prostřednictvím střevní mikroflóry zastoupené *Eubacterium limosum* a cytochromu P450 1A2 přeměněn na 8PN procesem demetylace. Teoreticky možná je též O-demetylace XH na desmetylxanthohumol, který by rychle cyklizoval na 6PN nebo 8PN, avšak u lidských subjektů nebyla pozorována přítomnost metabolitu 6PN. To znamená, že O-demetylace XH a následná cyklizace na 6PN, není hlavní metabolickou dráhou u lidí (Bolton et al. 2019).

Prenylované fenoly z chmelu jsou po per-orálním podání absorbovány střevním epitelem. 8PN prochází střevní sliznicí rychleji než XH. Při průchodu střevní sliznicí může dojít k sulfataci a glukuronidaci prenylflavonoidů. Produkty druhé fáze metabolismu převažovaly a následně docházelo k vylučování těchto metabolitů přechodem do žluče a fekální eliminací ven z těla. Při vylučování se uplatnil enterohepatální oběh. Maximální sérové koncentrace byly závislé na dávce a objevily se v intervalu 1-7 hodin, za 4-5 hodin byly pozorovány sekundární vrcholy sérové koncentrace zprostředkované enterohepatálním oběhem. S ohledem na pomalou absorpci a na enterohepatální oběh se biologický poločas prodloužil na cca 20 hodin (Bolton et al. 2019).

2.4 Nádorová buněčná linie MCF-7

Buněčná linie MCF-7 byla izolována z pleurálního výpotku 69leté ženy s metastatickým onemocněním karcinomu prsu. MCF-7 je akronymem názvu organizace Michigan Cancer Foundation, kde byla tato linie v roce 1973 zavedena. Buněčná linie je zobrazena na obr. 7. Na základě molekulárně genetických parametrů se řadí do kategorie lumenálních A karcinomů prsu. Buněčná linie je charakteristická zvýšenou expresí estrogenového a progesteronového receptoru. Společně s nimi se na růstu buněk podílí HER2. Prezentuje se menší agresivitou, neinvazivním potenciálem a malou schopností tvorby metastáz. Díky nižší syntéze vaskulárního endoteliálního růstového faktoru dochází k menší aktivaci autokrinní signalizace a podpoře invaze/migrace buněk (Comsa et al. 2015).



Obr. 7 Snímek buněčné linie MCF-7 pod mikroskopem

I když se na buněčnou linii MCF-7 pohlíží a zachází jako s jednou entitou, skládá se z velkého počtu samostatných fenotypů, z nichž většina tvoří jen malou část celkové populace. Jednotlivé fenotypy se liší expresním profilem genů, expresí receptorů a signálními cestami. Jednotlivé fenotypy disponují odlišnou rychlostí proliferace, avšak při kultivaci se mezi jednotlivými fenotypy udržuje rovnováha, zřejmě díky určité formě signalizační kooperace. Vlivem různých specifických podmínek růstu můžeme vyvinout selekční tlak na upřednostnění daného fenotypu. Například prostřednictvím obsahu estrogenu ve fetálním bovinním séru můžeme selektovat buňky se zvýšeným množstvím ER (Comsa et al. 2015).

3 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zjistit cytotoxický potenciál semisyntetických derivátů prenylflavonoidů v tkáni prsního karcinomu reprezentovaného buněčnou linií MCF-7. V experimentální části byly použity následující úkony:

- Rozmražení buněk MCF-7, počítání buněk v Bürkerově komůrce, pasážování, nasazení a kultivace buněk a ovlivnění buněk testovanými látkami
- Určení cytotoxicity pomocí testu s neutrální červení
- Analýza změn apoptózy a nekrózy ovlivněných buněk
- Analýza morfologických změn buněk sledovaných konfokálním mikroskopem
- Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu

4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál a chemikálie

Buněčná linie MCF-7 (ATCC, USA)

Dimethylsulfoxid-DMSO (Sigma-Aldrich, ČR)

Doxorubicin (Sigma-Aldrich, ČR)

Eagle's minimal essential medium-EMEM (Sigma-Aldrich, ČR)

Fetální bovinní sérum inaktivované-FBS (Lonza, ČR)

Fosfátem pufovaný fyziologický roztok-PBS (Sigma-Aldrich, ČR)

Neutrální červeň (Sigma-Aldrich, ČR)

Penicilin/streptomycin (Lonza, ČR)

5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimi-dazolocarboxyanine iodid (JC-1)
(Sigma-Aldrich, ČR)

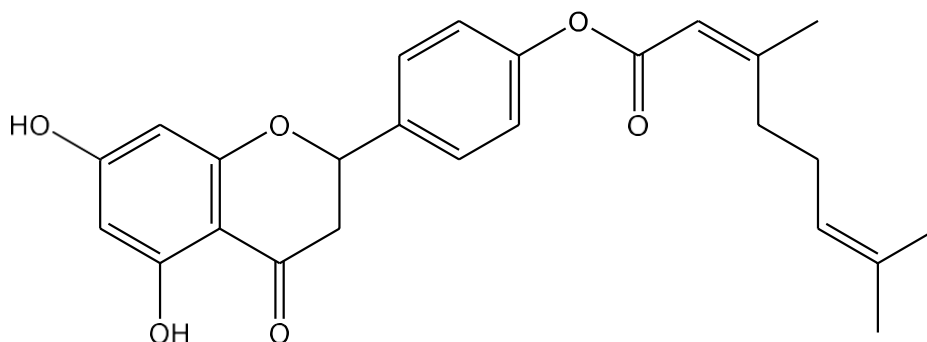
Trypanová modř (Biotech, ČR)

Trypsin-EDTA (Lonza, ČR)

Běžné chemikálie čistoty p.a.

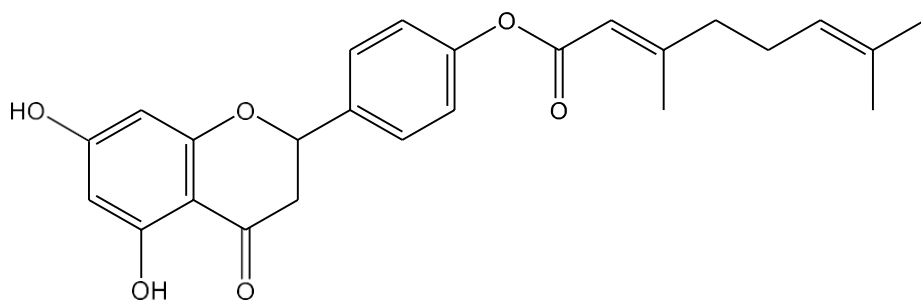
4.1.1 Testované látky

Dr. Hubert Chapui společně s Mgr. Jakubem Kernalem nasyntetizovali testované deriváty naringeninů na University of Lorraine. Strukturní vzorce jednotlivých sloučenin je možné vidět na Obr. 8. Vzorek G obsahoval naringenin vyextrahovaný z kvasinkové kultury bez obsahu prenyltransferas. Vzorek H obsahoval směs naringeninů a jeho prenylovaných derivátů, které byly získané z kvasinkové kultury obsahující prenyltransferasu AtaPT (*Aspergillus terreus* aromatická prenyltransferasa).



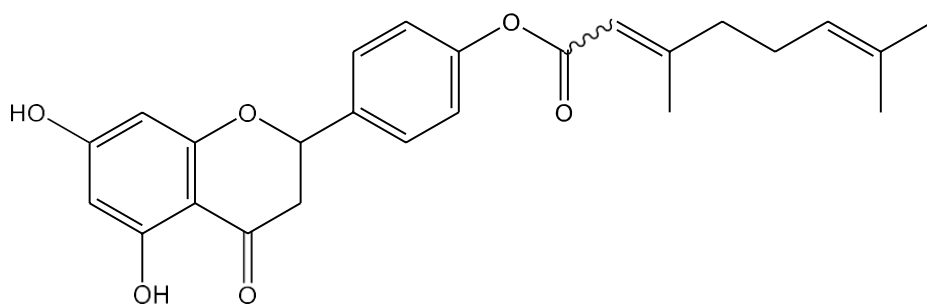
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl (Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

Derivát A



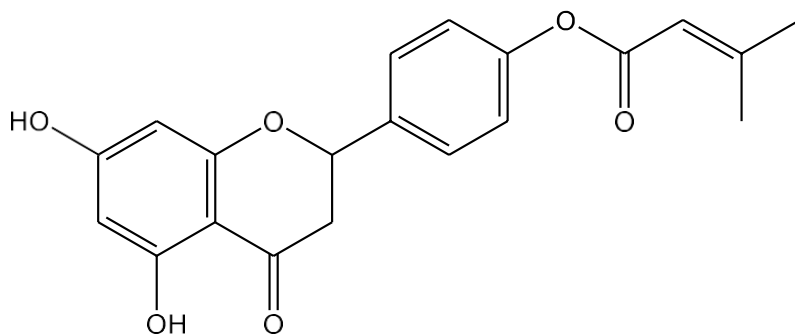
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl (*E*)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

Derivát B



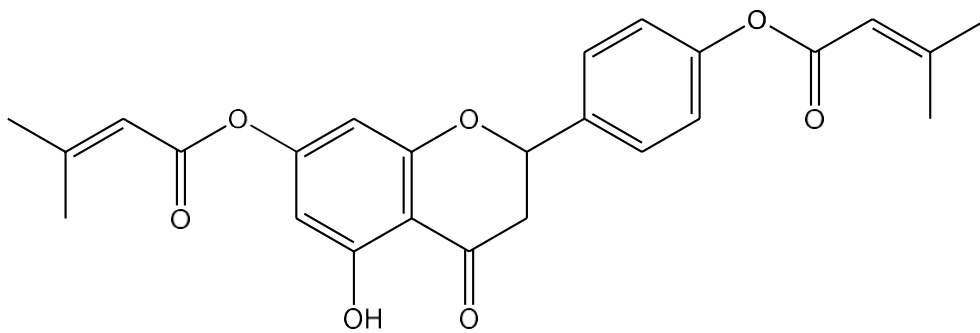
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl 3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

Derivát C



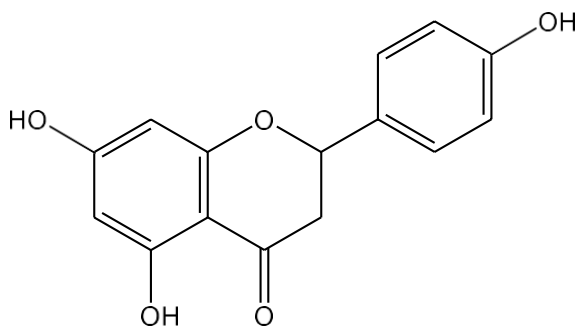
4-(5,7-dihydroxy-4-oxochroman-2-yl)phenyl 3-methylbut-2-enoate

Derivát D



5-hydroxy-2-(4-((3-methylbut-2-enoyl)oxy)phenyl)-4-oxochroman-7-yl 3-methylbut-2-enoate

Derivát E



5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one

Derivát F – naringenin

Obr. 8 Strukturní vzorce jednotlivých testovaných sloučenin.

4.2 Pomůcky a přístroje

4.2.1 Pomůcky

Jednorázové špičky, kahan, pinzeta, jednokanálové a multikanálové pipety, sterilní jednorázové pipety, 6 a 96jamkové destičky, kádinky, Bürkerova komůrka, mikrozkumavky, zkumavky, kultivační lahve (T-75), vaničky, nitrilové a latexové jednorázové rukavice, stojan na zkumavky

4.2.2 Přístroje

Centrifuga (Eppendorf 5810 R)

CO₂ inkubátor (Heraeus HeraCell 150)

Konfokální mikroskop s kamerou (Nikon A1+)

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

Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100)

Průtokový cytometr (SONY SA3800)

Spektrometr (Tecan Infinite M200)

Vodní lázeň (Memmert)

4.3 Metody

4.3.1 Kultivační médium

Pro kultivaci linie MCF-7 bylo použito médium EMEM suplementované 10 % FBS s přidavkem penicilinu a streptomycinu (pen/strep-50000 U/50mg).

4.3.2 Rozmrazování buněk

Zkumavku se zmrazenými buňkami jsme rozehtřivali asi 1-2 min ve vodní lázni vytemperované na 37 °C. Dále jsme si připravili 15ml zkumavku s cca 12 ml kultivačního média, do které jsme napipetovali rozehtřátou suspenzi buněk, a obsah jsme pipetou zhomogenizovali. Následovala centrifugace trvající 5 minut při 70×g za laboratorní teploty. Odsáli jsme supernatant a sediment jsme resuspendovali v 15 ml nového kultivačního média, které jsme napipetovali do kultivační lahve T-75 a vložili do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Další den jsme vyměnili kultivační médium a pokračovali pasážováním buněk.

4.3.3 Pasáž buněk

Poté, co buňky v inkubátoru dosáhly 70-80 % konfluence, přišlo na řadu jejich pasážování. Tento úkon jsme prováděli každé 3 nebo 4 dny. Nejdříve jsme odstranili médium z inkubační lahve. Buňky přirostlé k její stěně jsme dvakrát opláchli 7 ml PBS. Pufir jsme odstranili, přidali 1 ml roztoku trypsin-EDTA a lahev dali na 2 minuty inkubovat (37 °C, 5 % CO₂). Buňky po dvou minutách změnilly tvar a trhnutím jsme je odlepili od stěny lahve, připipetovali jsme 5 ml kultivačního média a zhomogenizovali. Do nové kultivační lahve jsme přenesli 1,2 - 1,5 ml suspenze, ke které jsme přidali 10 ml čerstvého média. Kultivační lahev s buňkami jsme vložili do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Zbytek suspenze jsme použili pro uskutečnění pokusů.

4.3.4 Počítání buněk

Počítání buněk je důležité pro nasazení definovaného počtu buněk do pokusu. Proces navazuje na pasážování buněk. K odečtení koncentrace buněk v kultivačním médiu slouží tzv. Bürkerova komůrka. V prvním kroku jsme odebrali 9 μ l homogenní buněčné suspenze, napipetovali je do mikrozkušavky, přidali 9 μ l trypanové modři a promíchali. Z této zkušavky jsme odebrali 9 μ l suspenze a napipetovali je do jedné části Bürkerovy komůrky. Počítali jsme buňky, které ležely uvnitř čtverce nebo se dotýkaly pravého a spodního okraje čtverce, celkem v pěti čtvercích.

Výpočet buněk obsažených v 1 ml:

$$n = \frac{\text{počet buněk}}{\text{počet čtverců}} * 2 * 10\,000$$

2.... ředění buněk

10000.... převod na 1 ml suspenze

n.... počet buněk v 1 ml

4.3.5 Nasazování a ovlivňování buněk

Po určení množství buněk v 1 ml média, jsme napipetovali vypočtené množství buněčné suspenze do jednotlivých jamek 96jamkové destičky. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l suspenze obsahující 4000 buněk. Dále jsme destičku s buňkami nechali 24 hodin inkubovat (37 °C, 5 % CO₂). Další den jsme buňky ovlivnili testovanými látkami. Do každé jamky jsme přidali 100 μ l roztoku, který se skládal z média a zkoumané látky. Jako kontrola byly použity buňky ovlivněné médiem s přídavkem stejného rozpouštědla a ve stejné koncentraci jako u testovaných látek, jako negativní kontrola sloužil 10% roztok DMSO a 0,07 μ M roztok doxorubicinu. V prvním pokusu jsme pro každou testovanou sloučeninu použili koncentrace 1, 10 a 100 μ M. V dalších pokusech jsme použili koncentrace 1, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 μ M. Pipetovaný roztok měl vždy dvojnásobnou koncentraci, než byla koncentrace výsledná. Každou koncentraci látky jsme testovali v hexaplikátu. Buňky jsme s testovanými látkami inkubovali po dobu 72 hodin (37 °C, 5 % CO₂). Následně jsme stanovili viabilitu buněk pomocí testu s neutrální červení (NRU).

4.3.6 Test s neutrální červení

Podstatou samotné metody je kumulace neutrální červeně v živých buňkách. Barvivo prochází buněčnou membránou ve své neionizované formě a aktivním transportem se dostává do lyzozomů, kde dochází díky kyselějšímu pH k ionizaci molekul barviva a jeho hromadění. Poškozené/mrtvé buňky nejsou schopné neutrální červeně do lyzozomů transportovat. Po opláchnutí se z živých buněk barvivo uvolňuje pomocí kyselého lyzačního roztoku (1% kys. octová v 50% ethanolu). Množství uvolněného barviva se dá určit spektrofotometricky při 540 nm a je přímo úměrné počtu živých buněk (Repetto et al. 2008).

Po inkubaci buněk jsme pomocí testu NRU vyhodnotili cytotoxický účinek jednotlivých studovaných látek. Nejdříve jsme vyklepli médium obsažené v jednotlivých jamkách destiček. Poté jsme k buňkám přidali 200 μ l roztoku neutrální červeně o koncentraci 60 μ g/ml rozpuštěné v kultivačním médiu a inkubovali 3 hodiny (37 °C, 5% CO₂). Následně jsme barvicí roztok odstranili a přidali fixační roztok (1 g/100ml CaCl₂ v 0,5% roztoku formaldehydu). Roztok jsme nechali působit 15 min, poté byl vyklepnutím odstraněn. Nakonec jsme přidali 200 μ l lyzačního roztoku, třepali 30 minut při laboratorní teplotě a následně jsme pomocí spektrofotometru Tecan měřili absorbanci při 540 nm.

4.3.7 Příprava vzorků pro sledování apoptózy a nekrózy pomocí průtokové cytometrie

Pro sledování změn apoptózy a nekrózy buněk byly buňky nasazeny do pěti 6jamkových destiček. Do každé jamky jsme nasazovali 150.000 buněk, doplnili do 2000 μ l médiem a inkubovali 24 hodin (37 °C, 5 % CO₂). Kultivace buněk s testovanými látkami probíhala po dobu 2, 4, 6, 18 a 24 hodin. Po inkubaci jsme odstranili médium, buňky jsme dvakrát opláchli PBS, a nakonec jsme k buňkám přidali 250 μ l roztoku trypsinu. Po proběhnutí dvouminutové inkubace jsme k buňkám přidali 500 μ l PBS a suspenzi centrifugovali (200 \times g, 4 °C, 5 min), supernatant jsme poté odsáli a celý proces ještě jednou opakovali. Nakonec jsme k buněčné suspenzi přidali 2 μ l annexinu (1 mg/ml) a 2 μ l propidium jodidu (1 mg/ml). Zkumavky jsme celou dobu uchovávali na ledu. Nakonec proběhlo měření na průtokovém cytometru.

4.3.8 Sledování morfologických změn buněk

Do jamek 6jamkové destičky jsme nasadili 150.000 buněk ve 2 ml média a inkubovali po dobu 24 hodin (37 °C, 5 % CO₂). Následující den jsme médium odstranili a do každé jamky přidali 2500 µl média s testovanou sloučeninou v koncentraci odpovídající hodnotě IC₅₀. Následně jsme destičku vložili do temperované komory konfokálního mikroskopu syčené CO₂, kde jsme buňky snímali po dobu 24 hodin. Poté jsme získané snímky vyhodnotili.

4.3.9 Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu

Zkratka JC-1 je označení fluorescenční sondy, která se selektivně hromadí v mitochondriích. V závislosti na mitochondriálním transmembránovém potenciálu červeně nebo zeleně fluoreskuje. Pokud nejsou mitochondrie poškozeny, dochází k tvorbě tzv. J-agregátů a červené fluorescence. Pokud je mitochondrie poškozená, sonda fluoreskuje zeleně. Do 96jamkových destiček jsme do každé jamky nasadili 4.000 buněk ve 100 µl kultivačního média a inkubovali 24 hodin (37 °C, 5 % CO₂). Další den jsme přidali 100 µl testované látky v koncentraci 2× větší než její IC₅₀ a buňky jsme inkubovali po dobu 24, 48 a 72 hodin. Poté jsme odstranili médium, do každé jamky přidali 100 µl roztoku JC-1 v koncentraci 4µl/ml a inkubovali 15 minut (37 °C, 5 % CO₂). Následně jsme médium z jamek vyklepli, buňky se opláchly PBS, a nakonec do každé jamky přidali 750 µl PBS a změřili fluorescenci při excitační vlnové délce-514 nm a emisních vlnových délkách 530 nm (J-monomery) a 590 nm (J-agregáty).

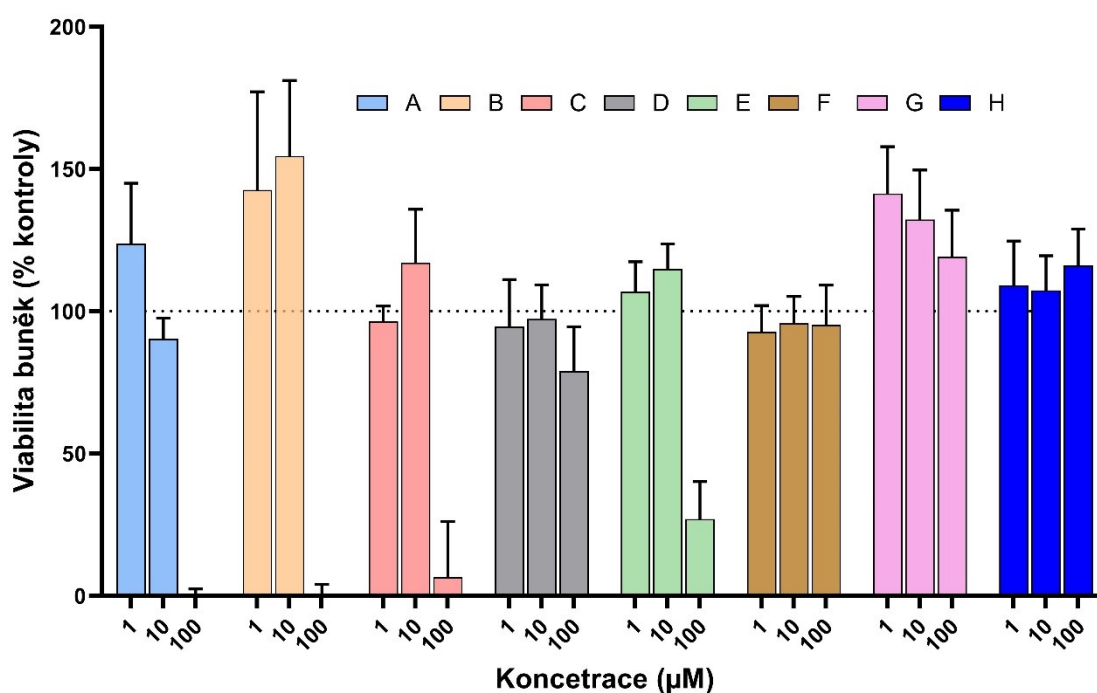
4.3.10 Statistická analýza

Viabilitu buněk jsme měřili v hexaplikátu v rámci jednoho pokusu. Pokusy byly opakovány jednou, pouze pokus s látkami ABCE v koncentracích 1, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 µM byl opakován dvakrát. Vliv látek na membránový potenciál mitochondrií (sonda JC-1) byl měřen v hexaplikátu a dvakrát opakován. Možnost zopakování pokusů byla ovlivněna nastupující pandemií Covid-19. Vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9 pomocí one-way ANOVA s Dunnettovým post-hoc testem (cytotoxicita) a nepárovým t-testem (měření mitochondriálního membránového potenciálu). Výsledky měření byly považovány za významné při $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Stanovení cytotoxicity látek

Nejprve byl screeningem zjištěn cytotoxický účinek všech látek (A–H). Látky byly testovány v koncentracích 1, 10 a 100 μM . Experiment byl opakován pouze jednou. Největší vliv na viabilitu MCF-7 buněk měly deriváty A a B, které v nejvyšší koncentraci úplně snížily viabilitu buněk. Získané výsledky jsou prezentovány v Obr. 9.

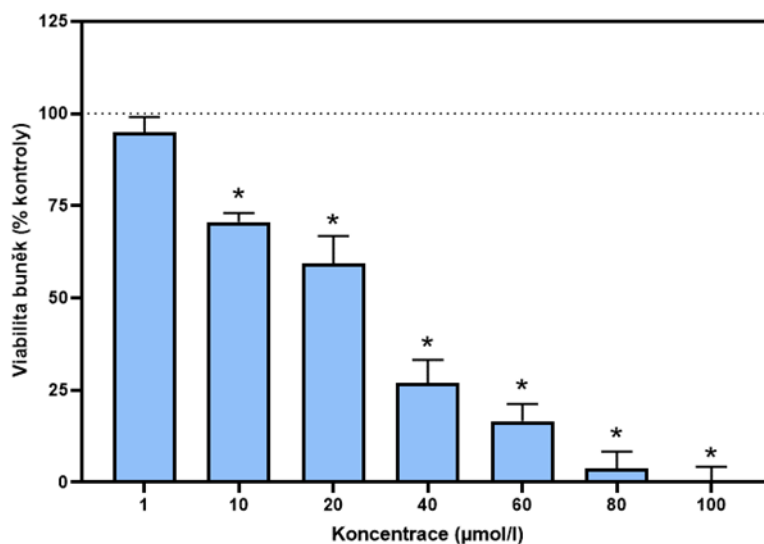


Obr. 9 Vliv prenylovaných derivátů naringeninů na viabilitu buněk MCF-7 po 72 hodinách inkubace – prvotní screening. Viabilita buněk byla měřena pomocí NRU testu. Data uváděná jako procenta kontroly (100 %) představují průměr \pm SD z jednoho experimentu. Horizontální linie indikuje kontrolu.

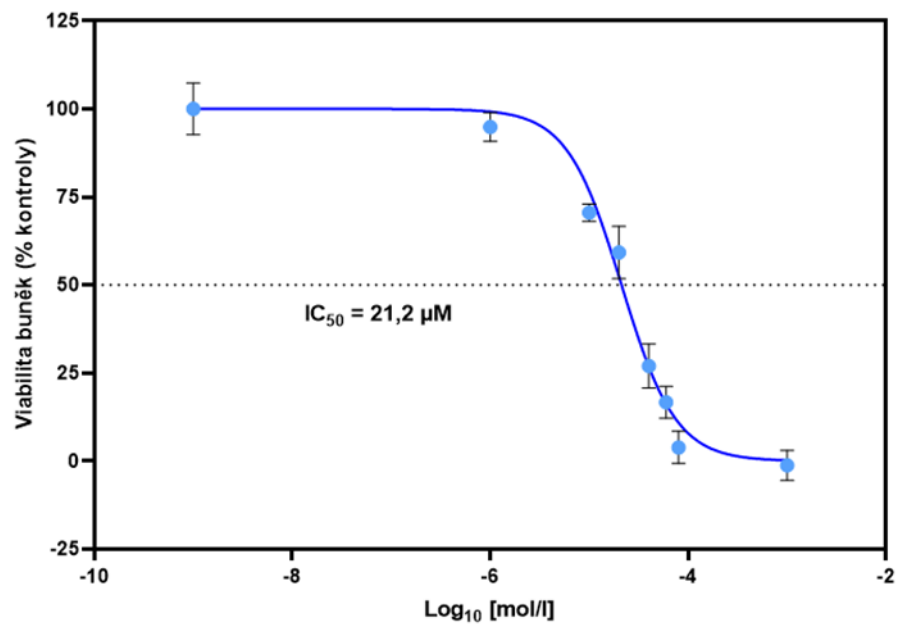
U derivátů s nejvyšším cytotoxickým potenciálem (sloučeniny A, B, C a E) dále proběhlo stanovení cytotoxicity v koncentracích 1, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 μM . Od získaných dat bylo odečteno pozadí a výsledek byl vztáhnut ke kontrole, kterou tvořila buněčná suspenze a rozpouštědlo, ve kterém byly buňky rozpuštěny. Experiment s látkami A, B, C a E byl zopakován 3–5 \times a výsledná data byla zprůměrována. Výsledná data byla zpracována do grafů zobrazujících viabilitu buněk v závislosti na koncentraci konkrétní zkoumané sloučeniny (Obr. 10, 12, 14, a 16). U látek A, B, C a E, byly stanoveny hodnoty IC_{50} , které jsou uvedeny v Obrázcích 11, 13, 15 a 17.

5.1.1 Derivát A

U pokusů s jemněji odstupňovanou koncentrací látky A se projevil signifikantní účinek na viabilitu buněk už od koncentrace 10 μM . Koncentrace 80 a 100 μM způsobily výrazné snížení životaschopnosti buněk (Obrázek 10). Hodnota IC_{50} pro látku A byla 21,2 μM (Obrázek 11).



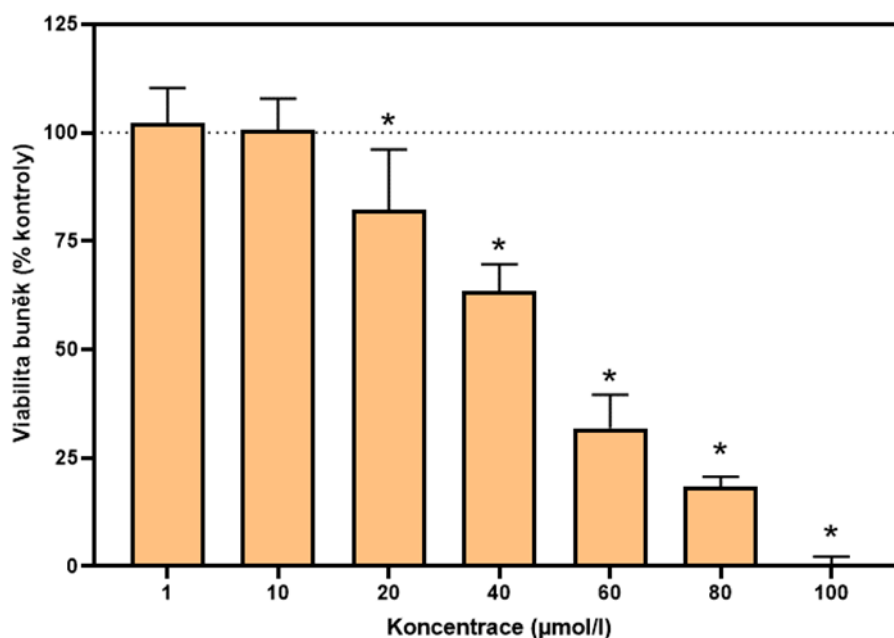
Obr. 10 Vliv látky A na viabilitu buněk MCF-7 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla měřena pomocí NRU testu. Data uváděná jako procenta kontroly (100 %) představují průměr \pm SD ($n=5$). Statisticky významné výsledky jsou označeny * (hodnota $p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).



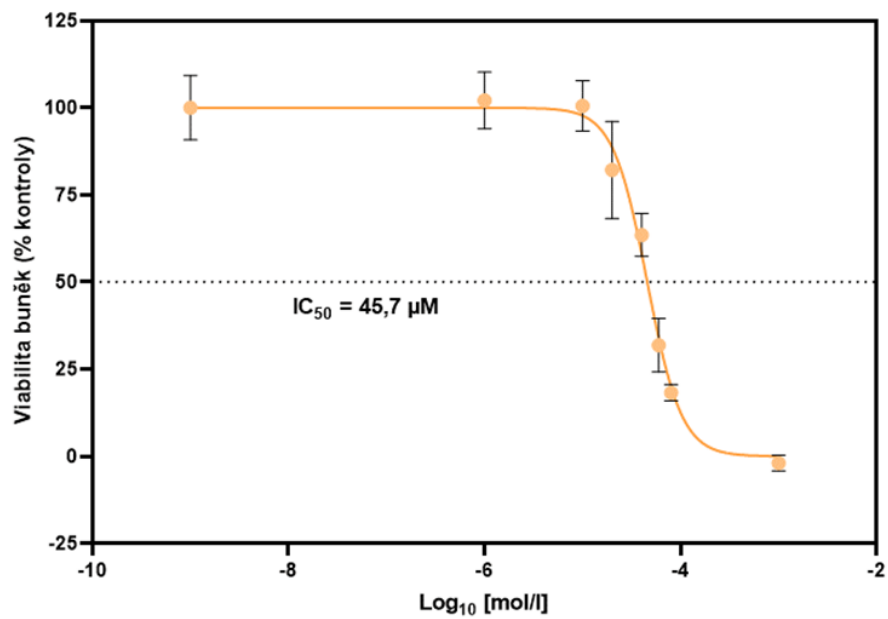
Obrázek 11 Stanovení IC₅₀ pro látku A. Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=5). Vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9.

5.1.2 Derivát B

Látka B způsobila signifikantní snížení viability buněk v koncentracích 20-100 μM (Obrázek 12). Hodnota IC_{50} pro látku B byla 45,7 μM (Obrázek 13).



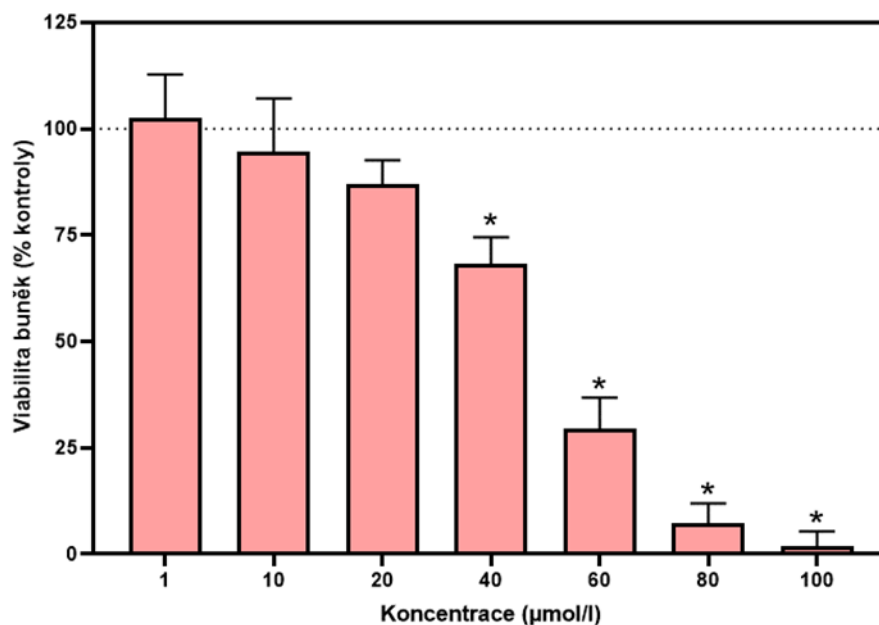
Obr. 12 Vliv látky B na viabilitu buněk MCF-7 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla měřena pomocí NRU testu. Data uváděná jako procenta kontroly (100 %) představují průměr \pm SD ($n=4$). Statisticky významné výsledky jsou označeny * (hodnota $p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).



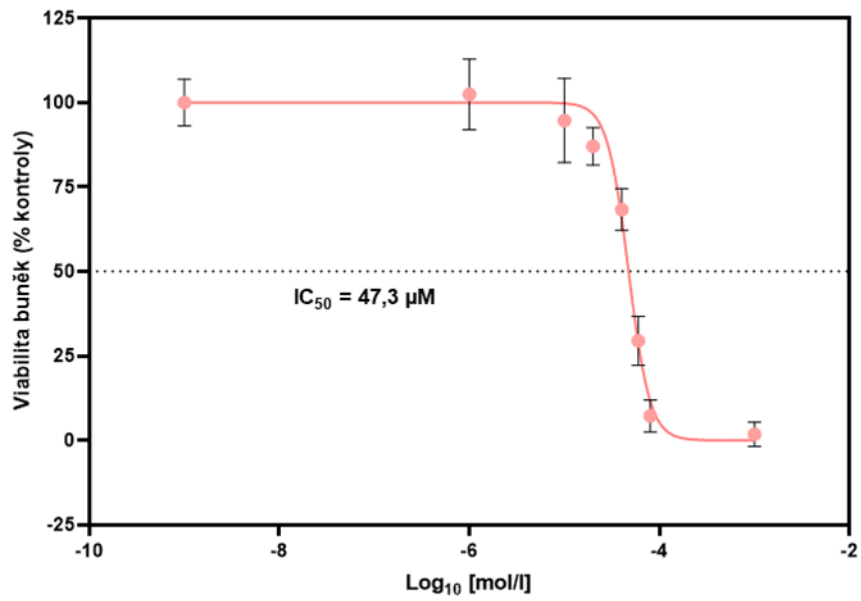
Obrázek 13 Stanovení IC₅₀ pro látku B. Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=4). Vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9.

5.1.3 Derivát C

U látky C došlo k signifikantnímu snížení viability buněk při koncentracích 40-100 μM (Obrázek 14). Látka C je směsí testované látky A a látky B, tudíž se daly předpokládat podobné výsledky jako u pokusů s testovanými látkami A a B. Hodnota IC_{50} pro látku C byla 47,3 μM (Obrázek 15).



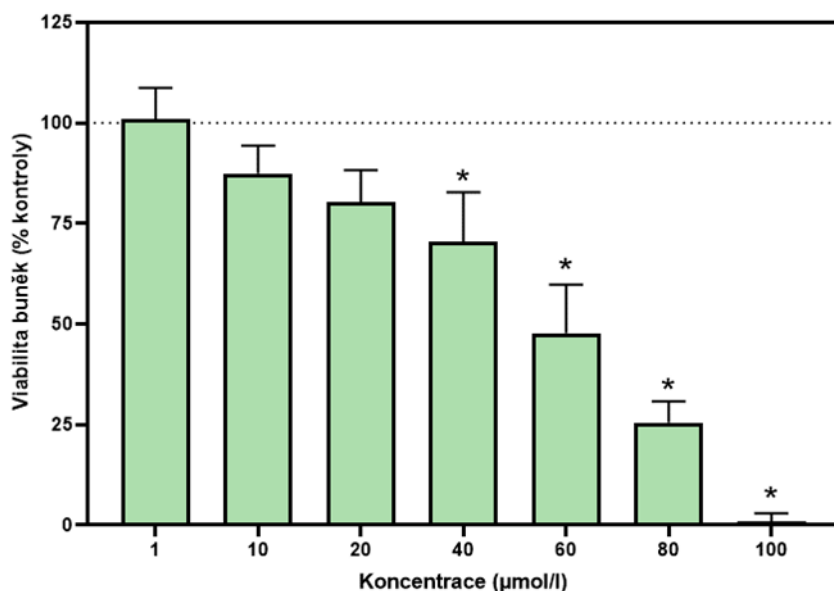
Obr. 14 Vliv látky C na viabilitu buněk MCF-7 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla měřena pomocí NRU testu. Data uváděná jako procenta kontroly (100 %) představují průměr \pm SD ($n=4$). Statisticky významné výsledky jsou označeny * (hodnota $p<0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).



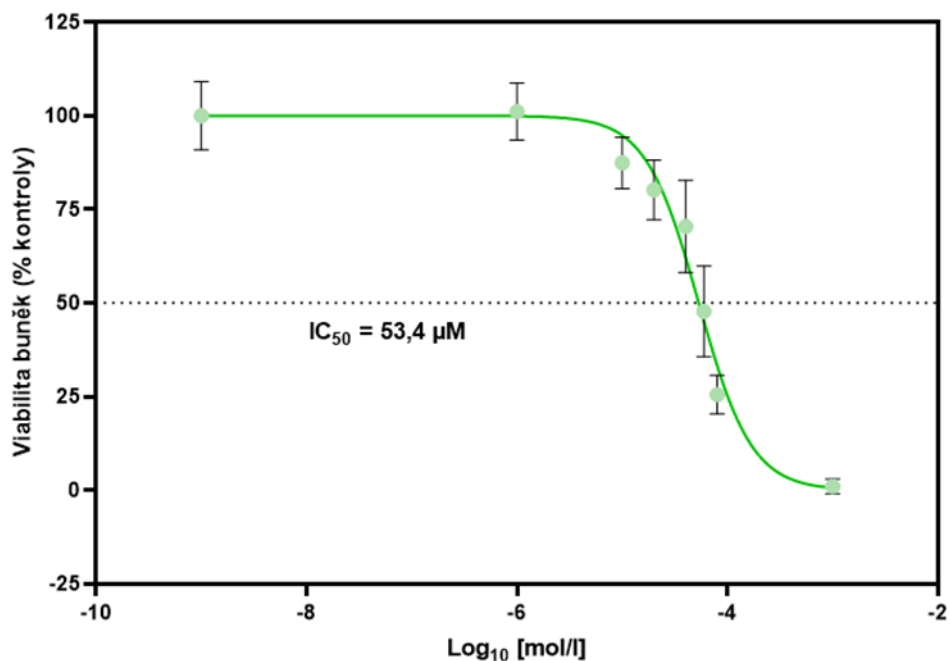
Obrázek 15 Stanovení IC₅₀ pro látku C. Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=4). Vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9.

5.1.4 Derivát E

Látka E signifikantně snížila životaschopnost buněk v koncentracích 40-100 μM , v koncentracích 10 a 20 μM došlo rovněž k určitému poklesu viability, ale ten nebyl statisticky významný (Obrázek 16). Hodnota IC_{50} pro látku E byla 53,4 μM (Obrázek 17).



Obr. 16 Vliv látky E na viabilitu buněk MCF-7 po 72 hodinách inkubace. Viabilita buněk byla měřena pomocí NRU testu. Data uváděna jako procenta kontroly (100 %) představují průměr \pm SD ($n=3$). Statisticky významné výsledky jsou označeny * (hodnota $p < 0,05$, jednocestná ANOVA s Dunettovým post-hoc testem).



Obr. 17 Stanovení IC₅₀ pro látku E. Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=3). Vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 9.

V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty IC₅₀, které byly stanoveny pro látky A, B, C a E testu cytotoxicity, a koncentrace použité v dalších experimentech (stanovení membránového potenciálu, změn v morfologii buněk a apoptózy/nekrózy).

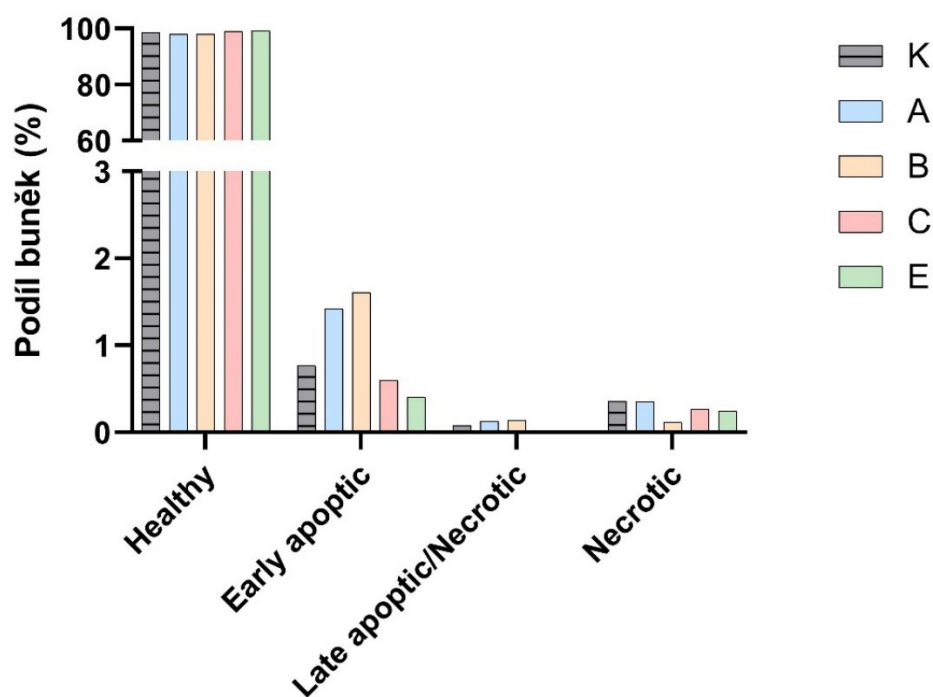
Tabulka 6 Stanovené IC₅₀ pro látky A, B, C a E

Zkoušená látka	IC ₅₀ [μM]	Koncentrace pro další experimenty [μM]
A	21,2	22
B	45,7	47
C	47,3	47
E	53,4	54

5.2 Průtoková cytometrie

Cílem měření bylo zjištění, zda testované látky, které v testu cytotoxicity snižovaly viabilitu buněčné linie MCF-7, působí přes ovlivnění procesu apoptózy nebo nekrózy. Testované látky byly přidány v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} , koncentrace pro látku A byla 22 μM , pro látky B a C 47 μM a pro látku E 54 μM .

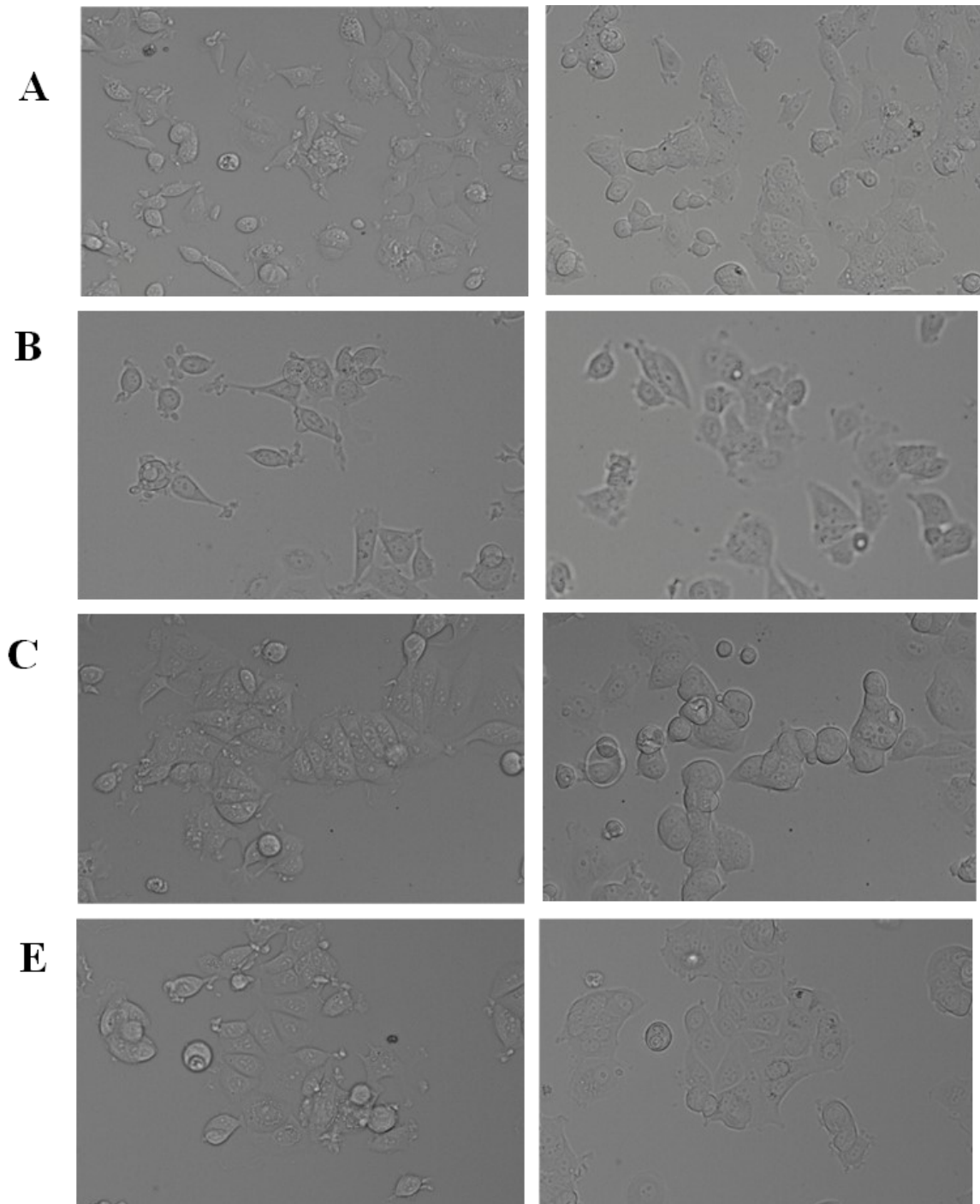
Výsledky měření jednotlivých testovaných látek jsou velmi podobné měření kontrolního vzorku. Kolem 98–99 % buněk se ve všech měření jeví jako „healthy“, 0,4–1,6 % se nachází ve stádiu „early apoptic“, 0,02–0,14 % se jeví jako „late apoptic/necrotic“ a 0,12–0,36 % je identifikováno jako „necrotic“. Odchytky látek A a B u buněk identifikovaných jako „early apoptic“ nejsou z biologického hlediska významné (Obrázek 18).



Obr. 18 Výsledek měření testu apoptózy po ovlivnění buněk MCF-7 testovanými látkami A, B, C a E po 24hodinové inkubaci (37 °C, 5 % CO_2). Buňky byly obarveny roztokem Annexinu V/propidium jodidu. „Healthy“ jsou buňky negativní na propidium jodid/Annexin V, „early apoptic“ jsou buňky pozitivní na Annexin V, buňky ve stádiu „late apoptic/necrotic“ vykazují pozitivitu na propidium jodid i na Annexin V a „necrotic“ jsou pozitivní na propidium jodid.

5.3 Morfologické změny po ovlivnění látkami A, B, C a E

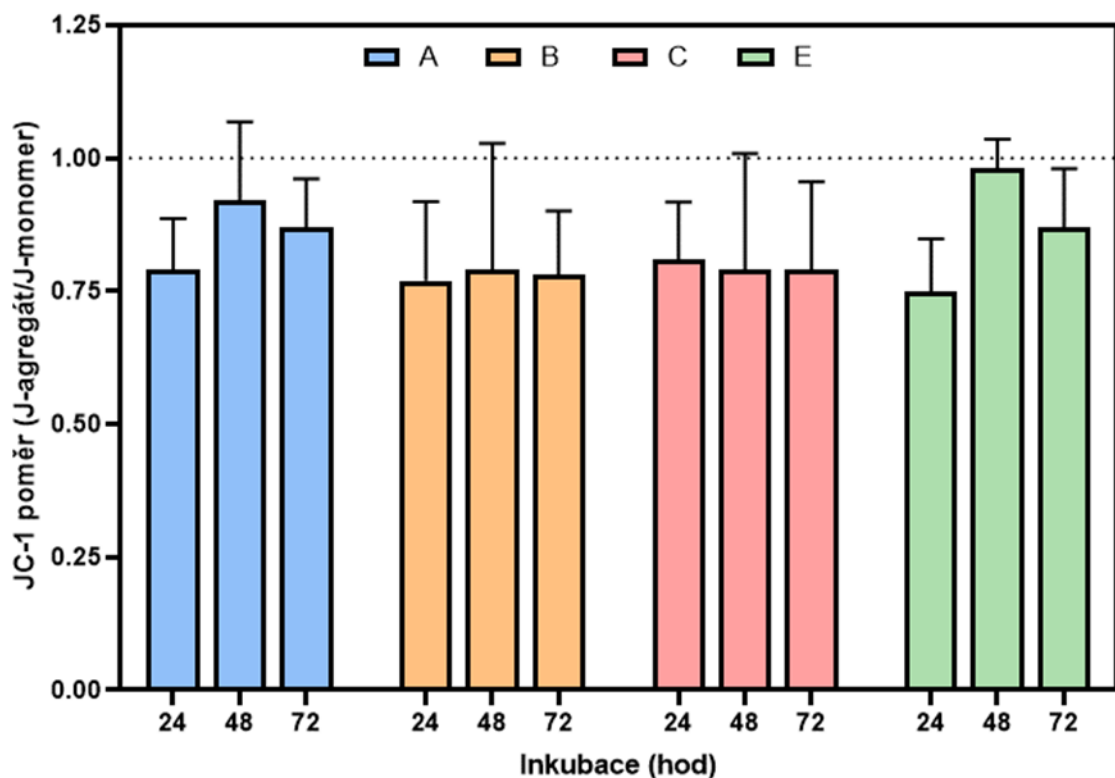
Za účelem zjištění morfologických anomálií bylo provedeno 24hodinové snímání buněk ovlivněných testovanými látkami (koncentrace odpovídající IC_{50}) konfokálním mikroskopem. Během snímání buněk nedošlo k žádnému zjištění buněčné anomálie (Obrázek 19).



Obr. 19 Snímky buněčné linie MCF-7 na začátku kultivace s testovanou látkou (nalevo) a snímek buněčné linie po 24 hodinách působení látky na buňky (napravo).

5.4 Mitochondriální membránový potenciál

Pomocí sondy JC-1 lze určit membránový potenciál mitochondriální membrány. Metoda měla odhalit možnost působení testovaných látek A, B, C a E skrze poškození mitochondriální membrány. V každém experimentu byly testované látky přidány k buňkám v koncentraci odpovídající IC_{50} . Buňky byly s testovanou látkou inkubovány po dobu 24, 48 a 72 hodin. Z důvodu nastupující pandemie Covid-19 byl experiment opakován pouze 2x. U všech studovaných látek došlo ve všech intervalech k poklesu poměru J-agregát/J-monomer sondy JC-1 ve srovnání s kontrolou, nicméně tento pokles nebyl statisticky významný (Obrázek 20).



Obr. 20 Vliv látek A, B, C a E na mitochondriální membránový potenciál buněk MCF-7 po 24, 48 a 72 hodinách inkubace. Membránový potenciál byl stanoven pomocí sondy JC-1. Výsledky představují průměr \pm SD ($n=2$). Látky byly porovnávány vůči kontrolnímu médiu. Horizontální linie indikuje kontrolu.

6 Diskuze

Podle údajů Světové zdravotnické organizace byla nádorová onemocnění celosvětově nejčastější příčinou úmrtí a v roce 2020 zapříčinila smrt téměř 10 milionů osob. Nádory prsu se v roce 2020 umístily u žen na 1. místě podle počtu nově diagnostikovaných případů a na 5. místě podle počtu úmrtí (Ferlay et al. 2021). Léčba nádorů prsu zahrnuje chirurgické odstranění, systémovou léčbu (adjuvantní či neoadjuvantní chemoterapie, hormonální terapie), cílenou biologickou léčbu, radioterapii a jejich kombinace (Cardoso et al. 2019). V léčbě nádorových onemocnění došlo v posledních letech k výraznému pokroku, přesto existují typy nádorů, které jsou prakticky neléčitelné. Mezi takové patří i některé agresivní formy karcinomu prsu. U některých nádorů se navíc objevuje rezistence k farmakoterapii. Proto stále pokračuje hledání a vývoj nových protinádorových léčiv a uplatňuje se kombinační chemoterapie (Falzone et al. 2018).

Tradičním zdrojem nových léčiv je příroda, více než 50 % všech v současnosti používaných léčiv je inspirováno přírodními látkami. Přírodní sloučeniny se často chemicky modifikují (semisyntetický přístup), syntetizují se sloučeniny mimikující přírodní látky nebo se syntetizují látky nesoucí farmakofor, který byl odvozen od přírodních látek (Atanasov et al. 2021; Sun et al. 2022). Slibnou skupinou přírodních látek jsou prenylflavonoidy, což jsou sekundární metabolity rostlin, které mají celou řadu biologických účinků včetně protinádorových (Bolton et al. 2019).

Prenylflavonoidy pocházející z chmelu otáčivého (*Humulus lupulus*, *Cannabaceae*), jejichž protinádorovou aktivitu v kombinaci s několika běžně používanými cytostatiky *in vitro* zkoumala i skupina doc. Boušové (Ambrož et al. 2019a), jsou prenylovanými deriváty flavonoidu naringenin. Tento flavanon byl použit jako základní skelet pro přípravu semisyntetických prenylflavonoidů, které nasyntetizovali Dr. Hubert Chapui a Mgr. Jakub Kernal (University of Lorraine) a jejichž protinádorovou aktivitu v buněčné linii MCF-7 prsního karcinomu jsem studoval v rámci své diplomové práce.

V dřívějších studiích bylo zjištěno, že flavanon naringenin disponuje širokou škálou biologických a farmakologických aktivit, mezi které patří i schopnost ovlivnění nádorových buněk inhibicí zánětlivých signálních drah. Mezi citlivé nádorové tkáně

patřila i prsní nádorová tkáň. Naringenin také zvyšoval kumulaci cytostatik doxorubicinu a irinotekanu v nádorových buňkách pomocí inhibice efluxního transportéru. Navíc se naringenin uplatňoval i v pozdějších fázích nádorového bujení, kdy bránil vzniku metastáz karcinomu prsu do plic prostřednictvím modulace nádorového prostředí (Zeng et al. 2018). V buněčné linii karcinomu prsu MDA-MB-231 zastavoval naringenin buněčný cyklus v G2 fázi a indukoval apoptózu, tyto účinky byly závislé na koncentraci (Wang et al. 2019).

První část diplomové práce byla zaměřena na stanovení cytotoxicity osmi vzorků prenylflavonoidů a naringeninu (látky A-H), z nichž 4 byly originálně připravené prenylflavonoidy (látky A, B, D a E), 1 vzorek byl směsí *cis* a *trans* isomeru prenylflavonoidu (vzorek C), vzorek F obsahoval naringenin a vzorky G a H byly extrakty kvasinkové kultury s/bez obsahu prenyltransferas vystavené naringeninu, v buněčné linii MCF-7. V prvotním screeningu vykazovaly látky A, B, C a E ve 100 μM koncentraci signifikantní cytotoxicitu a byly vybrány pro další studium. Látka D měla jen slabý účinek na viabilitu buněk a látky F-H viabilitu neovlivnily vůbec. Tyto výsledky se shodují s výsledky prescreeningu provedeného dr. Ambrožem v buněčné linii MDA-MB-231 prsního karcinomu, které neexprimují estrogenový receptor, a také s výsledky diplomové práce (Mgr. Kateřiny Blahové 2021), která se ve své diplomové práci zabývala antiproliferačním účinkem testovaných látek A-H v buněčné linii SW480 odvozené z kolorektálního karcinomu. V buněčných liniích SW480 a SW620 odvozených z kolorektálního karcinomu vykazoval naringenin velmi slabý cytotoxický potenciál, jeho IC_{50} byla větší než 200 μM v obou buněčných liniích (Ambrož a kol. 2019). Studie zabývající se cytotoxickým potenciálem naringeninu v buňkách MCF-7 se řádově liší udávanými hodnotami IC_{50} 1,3 μM ve studii Susanti et al. (2007), 18 $\mu\text{g/ml}$ (66,1 μM) ve studii So et al. (1997), 187,1 μM ve studii Bartmańska et al. (2018) a 780 μM ve studii Kocyigit et al. (2016).

U čtyř sloučenin s nejsilnějším cytotoxickým účinkem byla následně stanovena hodnota IC_{50} . Konkrétní hodnoty odpovídaly pro látku A 21,2 μM , pro látku B 45,7 μM , pro látku C 47,3 μM a pro látku E 53,4 μM . V diplomové práci Mgr. Kateřiny Blahové (2021) dosahovaly naměřené hodnoty IC_{50} v buněčné linii SW 480 pro látku A 51,5 μM , pro látku B 54,3 μM , pro látku C 40,4 μM a pro látku E 83,7 μM . Lze tedy říci, že buňky MCF-7, které exprimují estrogenový receptor, jsou citlivější k působení prenylflavonoidů než buňky odvozené z kolorektálního karcinomu.

Při srovnání cytotoxického potenciálu námi studovaných látek s jinými prenylflavonoidy (např. xanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin) lze říci, že isomery xanthohumol (XN) a isoxanthohumol (IX) měly v buňkách MCF-7 silnější účinek (IC_{50} kolem 11 resp. 16 μM), zatímco účinnost 6-prenylnaringeninu (6PN) a 8-prenylnaringeninu (8PN) byla zhruba srovnatelná s námi testovanými látkami B, C a E (IC_{50} kolem 45-50 μM) (Bartmańska et al. 2018). Při inkubaci buněk MCF-7 s XN byla po 48 resp. 96 hodinách dosažena IC_{50} 13,3 resp. 3,5 μM a v případě IX IC_{50} 15,3 resp. 4,7 μM . V obou případech byl tedy cytotoxický účinek prenylflavonoidů větší po 96 než po 48 hodinách inkubace. Opačný trend byl pozorován při inkubaci XN a IX s buněčnou linií A-2780 odvozenou z ovariálního karcinomu (Miranda et al. 1999).

XN se na rozdíl od naringeninu řadí mezi chalkony a má ve své molekule obsažený prenylový řetězec. Stejně jako naringenin se XN prezentuje výhodnými farmakologickými vlastnostmi. Jednou z farmakologických vlastností je i protinádorové působení s velkou selektivitou pro nádorové buňky. Toxicita XN v nenádorových buňkách je nízká. XN působí prostřednictvím indukce apoptózy, inhibice buněčné proliferace a migrace. Též byla popsána schopnost zastavení buněčného cyklu v závislosti na druhu onkologického onemocnění, v případě karcinomu prsu dochází k zástavě buněčného cyklu v S fázi (Gieroba et al. 2020).

Pro odhalení mechanismu pozorovaného cytotoxického účinku testovaných látek byl v další fázi experimentální práce studován vliv těchto sloučenin na proces buněčné apoptózy. Byla použita metoda průtokové cytometrie a buňky byly obarveny Annexinem V a propidium jodidem. Určení zdravých, apoptotických a nekrotických buněk je založeno na změnách v uspořádání fosfolipidů plazmatické membrány. Neapoptické buňky mají asymetricky uspořádanou vnější a vnitřní stranu plazmatické membrány, kdy fosfatidylserin je obsažený na vnitřní straně membrány. Na začátku apoptózy dochází k překlopení fosfolipidů a výskytu fosfatidylserinu na vnější straně membrány. Toho se využívá při barvení Annexinem V, který se váže na fosfatidylserin a detekuje se tak fáze časně apoptózy. Pro odlišení nekrotických buněk se využívá barvivo propidium jodid, které prochází pouze přes porušenou buněčnou membránu a interkaluje do DNA. K poškození plazmatické membrány dochází při fázi pozdní apoptózy nebo na začátku nekrózy (Pietkiewicz et al. 2015).

Buňky MCF-7 byly vystaveny působení semisyntetických prenylflavonoidů v koncentraci odpovídající jejich hodnotám IC_{50} po dobu 24 hodin. Ze získaných výsledků plyne, že námi testované látky nevykázaly oproti kontrolnímu vzorku žádné změny. V případě dalšího zkoumání testovaných látek by stálo za vyzkoušení prodloužit čas inkubace látek s buňkami, případně proměřit buněčný cyklus. Studie zabývající se strukturně blízkým prenylflavonoidem XN došly k odlišnému výsledku. Výzkum zabývající se vlivem XN na buněčnou linii A549 lidského alveolárního adenokarcinomu potvrdil schopnost této látky indukovat apoptózu. U buněk ošetřených 42 μM XN a kultivovaných 72 hod došlo ke zvětšení frakce buněk ve stádiu časně apoptózy z 1,42 % (kontrola) na 34,42 % a buněk ve frakci pozdní apoptózy/nekrózy z 1,80 % (kontrola) na 33,27 %. V případě použití XN v koncentraci odpovídající IC_{50} ($\sim 14 \mu M$) došlo jen k minimálním změnám vůči kontrole, frakce časně apoptózy se zvýšila na 2,72 % a frakce pozdní apoptózy/nekrózy na 4,90 % (Yong et al. 2015). XN ve studii Sun et al. (2018) způsobil zastavení buněčného cyklu buněk MCF-7 v G_0/G_1 fázi a vzorky s XN obsahovaly vyšší množství apoptických buněk, což svědčí o indukcii apoptózy XN. Tento mechanismus účinku byl pozorovaný i u jiných buněčných linií, např. u buněčných linií BPH-1 a PC-3 došlo ke zvýšení podílu buněk ve stádiu časně i pozdní apoptózy (Colgate et al. 2007). Uvedené proapoptické působení XN nebylo pozorováno u námi testovaných látek. Důvodem by mohla být nízká koncentrace těchto sloučenin (ani XN nezpůsobil v koncentraci odpovídající IC_{50} výraznější změny v práci Yong et al. (2015)) nebo krátká doba inkubace (24 hod \times 72 hod).

Posledním ze sledovaných mechanismů účinku byly změny v mitochondriálním membránovém potenciálu, jehož pokles je pozorován při aktivaci vnitřní dráhy apoptózy. Ke stanovení mitochondriálního membránového potenciálu byla použita sonda JC-1, jejíž molekuly existují v monomerní formě a emitují zelenou fluorescenci ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 488 nm/527 nm). Podle velikosti membránového potenciálu vytváří sonda J-agregáty s červenou fluorescencí ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 488 nm/590 nm). Pokles v poměru J-agregát/J-monomer indikuje depolarizaci mitochondriální membrány, která vede k inhibici respirace, tvorbě reaktivních forem kyslíku a poklesu syntézy ATP. Depolarizace mitochondriální membrány je důležitá pro uvolnění proapoptotických faktorů, které zahajují vnitřní (mitochondriální) cestu apoptózy, z mitochondrie do cytosolu (Pekarčíková et al. 2014).

Buňky MCF-7 byly vystaveny působení semisyntetických prenylflavonoidů v koncentraci odpovídající jejich hodnotám IC_{50} po dobu 24-72 hodin. V této diplomové práci vykazovaly všechny testované látky (tzn. A, B, C a E) snížení membránového potenciálu, avšak pozorované změny nebyly signifikantní. V buňkách potkaního gliomu C6 způsobil XN signifikantní pokles poměru J-agregát/J-monomer už po 24 hod, tento účinek se po 48 a 72 hod ještě prohloubil (Hou et al. 2021). V práci (Yong et al. 2015) došlo vlivem XN ke koncentračně závislému snížení mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách A549, avšak pozorovaný vliv koncentrace XN odpovídající IC_{50} byl malý (snížení z 91,9 % pro kontrolní vzorek na 86,1 %). Tyto výsledky korelují s malými změnami pozorovanými v počtu apoptotických buněk.

7 Závěr

Výsledná data z jednotlivých měření prováděná v rámci této práce jsou shrnuta níže:

- Při prvotním screeningu cytotoxicity prokázaly látky A, B, C a E největší schopnost snižovat viabilitu buněk MCF-7 a to v koncentraci 100 μM . U těchto látek byla dále stanovena hodnota IC_{50} : 21,2 μM (A), 45,7 μM (B), 47,3 μM (C) a 53,4 μM (E).
- U čtyř zmíněných látek byl pomocí průtokové cytometrie dále sledován vliv na apoptózu/nekrózu buněk. Látky v koncentraci odpovídající IC_{50} neprokázaly žádný účinek na zvýšení míry apoptózy nebo nekrózy v buněčné populaci.
- Při porovnání buněk na začátku ovlivnění testovanými látkami (v koncentraci odpovídající IC_{50}) a po 24 hodinách pomocí konfokálního mikroskopu se snímacím zařízením nebyly pozorovány žádné změny v morfologii buněk.
- Za použití sondy JC-1 byl sledován vliv testovaných látek (v koncentraci odpovídající IC_{50}) na mitochondriální membránový potenciál. Ve všech časových intervalech (24, 48 a 72 hodin) došlo u všech látek ke snížení poměru J-agregát/J-monomer (a tedy i mitochondriálního membránového potenciálu). Tento pokles však nebyl signifikantní.

8 Zkratky

- BaP – benzo(a)pyren
BCRP – breast cancer resistance protein
BMI – index tělesné hmotnosti (*body mass index*)
BRCA 1/2 – breast cancer asociated gen 1/2
COX-1/2 – cyclooxygenasa-1/2
DMSO – Dimethylsulfoxid
EGFR – epidermální růstový faktor
EMEM - Eagle's minimal essential medium
ER – estrogenový receptor
ER+ – karcinom prsu pozitivní na estrogení receptor
FBS – Fetální bovinní sérum inaktivované
HER2 – lidský epidermální růstový faktor
HER2+ - karcinom prsu pozitivní na lidský epidermální růstový faktor
CHT – chemoterapie
ICAM-1/2 – intracelulární adhezivní molekula ½
IC₅₀ – poloviční inhibiční koncentrace
IQ – 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] chinolin
IL-8 – interleukin 8
IX – isoxanthohumol
Ki67 – marker proliferační aktivity
LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou
LHRH – hormon uvolňující luteinizační hormon
NF-κB – jaderný faktor κB
NO – oxid dusnatý
NRU – cytotoxický test s neutrální červení
PBS – Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
6PN – 6-prenylnaringenin
8PN – 8-prenylnaringenin
PR – progesteronový receptor
PR+ – karcinom prsu pozitivní na progesteronový receptor
TNBC – triple negativní karcinom prsu
TNM – tumor – node – metastasis

VCAM-2 – vaskulární buněčný adhezní molekula 1

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor

XN – xanthohumol

ZN – zhoubné nádory

9 Použitá literatura

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK, 2010. *Speciální onkologie*. 1. vyd., Galén, Praha, 417 s. ISBN 978-80-7262-648-9.

AMBROŽ, Martin, Petra MATOUŠKOVÁ, Adam SKARKA, Martina ZAJDLOVÁ, Katerina ŽÁKOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ, 2017. The effects of selected sesquiterpenes from myrica rubra essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules*. **22**(6):1021.

AMBROŽ, Martin, Kateřina LNĚNIČKOVÁ, Petra MATOUŠKOVÁ, Lenka SKÁLOVÁ a Iva BOUŠOVÁ, 2019a. Antiproliferative effects of hop-derived prenylflavonoids and their influence on the efficacy of oxaliplatin, 5-fluorouracil and irinotecan in human colorectal C cells. *Nutrients*. **11**(4):879.

AMBROŽ, Martin, Markéta ŠMATOVÁ, Michaela ŠADIBOLOVÁ, Eva POSPÍŠILOVÁ, Pavlína HADRAVSKÁ, Michaela KAŠPAROVÁ, Veronika Hanušová SKARKOVÁ, Věra KRÁLOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ, 2019b. Sesquiterpenes α -humulene and β -caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. *Acta Pharmaceutica*. **69**(1):121–128.

ATANASOV, Atanas G., Sergey B. ZOTCHEV, Verena M. DIRSCH, the INTERNATIONAL NATURAL PRODUCT SCIENCES TASKFORCE a Claudiu T. SUPURAN, 2021. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. **20**(3):200–216.

BAER, Heather J., Shelley S. TWOROGER, Susan E. HANKINSON a Walter C. WILLETT, 2010. Body fatness at young ages and risk of breast cancer throughout life. *American Journal of Epidemiology*. **171**(11):1183–1194.

BARTMAŃSKA, Agnieszka, Tomasz TRONINA, Jarosław POPŁOŃSKI, Magdalena MILCZAREK, Beata FILIP-PSURSKA a Joanna WIETRZYK, 2018. Highly Cancer Selective Antiproliferative Activity of Natural Prenylated Flavonoids. *Molecules*. **23**(11):2922.

BARZAMAN, Khadijeh, Jafar KARAMI, Zeinab ZAREI, Aysooda HOSSEINZADEH, Mohammad Hossein KAZEMI, Shima MORADI-KALBOLANDI, Elahe SAFARI a Leila FARAHMAND, 2020. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*. **84**:106535.

BLAHOVÁ, Kateřina, 2021. *Protinádorová aktivita semisyntetických derivátů prenylflavonoidů v buněčné linii SW480*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

BOLTON, Judy L., Tareisha L. DUNLAP, Atieh HAJIRAHIMKHAN, Obinna MBACHU, Shao Nong CHEN, Luke CHADWICK, Dejan NIKOLIC, Richard B. VAN BREEMEN, Guido F. PAULI a Birgit M. DIETZ, 2019. The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. *Chemical Research in Toxicology*. **32**(2):222–233.

BOZOVIC-SPASOJEVIC, I., E. AZAMBUJA, Wortá MCCASKILL-STEVENSON, P. DINH a F. CARDOSO, 2012. Chemoprevention for breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. **38**(5):329-39.

BRIERLEY, James D, Mary K GOSPODAROWICZ a Christian WITTEKIND, 2022. *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*. 8. vyd., Grada, Praha, 266 s. ISBN 978-80-7472-185-X.

CARDOSO, Fatima, Stella KYRIAKIDES, Shinji OHNO, Frederique PENAULT-LLORCA, Philip POORTMANS, Isabel T. RUBIO, Sophia ZACKRISSON a Elsbjeta SENKUS, 2019. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. **30**(8):1194–1220.

COLGATE, Emily C., Cristobal L. MIRANDA, Jan F. STEVENS, Tammy M. BRAY a Emily HO, 2007. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Letters*. **246**(1):201–209.

COMȘA, Șerban, Anca Maria CÎMPEAN a Marius RAICA, 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*. **35**(6):3147.

CSERNI, Gábor, Ewa CHMIELIK, Bálint CSERNI a Tibor TOT, 2018. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv*. **472**(5):697-703.

CUZICK, Jack, Ivana SESTAK, John F. FORBES, Mitch DOWSETT, Jill KNOX, Simon CAWTHORN, Christobel SAUNDERS, Nicola ROCHE, Robert E. MANSEL, Gunter VON MINCKWITZ, Bernardo BONANNI, Tiina PALVA a Anthony HOWELL, 2014. Anastrozole for prevention of breast cancer in high-risk postmenopausal women (IBIS-II): An international, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. **383**(9922):1041–1048.

ČMEJLOVÁ, Vlastimila, 2020. Komplexní léčba časného karcinomu prsu. *Onkologie*. **14**(4):148–156.

DALL, Genevieve Victoria a Kara Louise BRITT, 2017. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. *Frontiers in Oncology*. **7**:110.

DARBY, Sarah C., Paul MCGALE, Carolyn W TAYLOR a Richard PETO, 2005. Long-term mortality from heart disease and lung cancer after radiotherapy for early breast cancer: prospective cohort study of about 300 000 women in US SEER cancer registries. *Lancet Oncology*. **6**(8):557–565.

ELIASSEN, A. Heather, Graham A. COLDITZ, Bernard ROSNER, Walter C. WILLETT a Susan E. HANKINSON, 2006. Adult Weight Change and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. *JAMA*. **296**(2):193–201.

FALZONE, Luca, Salvatore SALOMONE a Massimo LIBRA, 2018. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in Pharmacology*. **9**:1300.

FERLAY, Jacques, Murielle COLOMBET, Isabelle SOERJOMATARAM, Donald M PARKIN, Marion PIÑEROS, Ariana ZNAOR a Freddie BRAY, 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. **149**(4):778–789.

GIEROBA, Barbara, Marta ARCZEWSKA, Adrianna SŁAWIŃSKA-BRYCH, Wojciech RZESKI, Andrzej STEPULAK a Mariusz GAGOŚ, 2020. Prostate and breast cancer cells death induced by xanthohumol investigated with Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **231**:118112.

GØTZSCHE, Peter C. a Karsten Juhl JØRGENSEN, 2013. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. **2013**(6):CD001877

GØTZSCHE, Peter C., Karsten Juhl JØRGENSEN, Per Henrik ZAHL a Jan MÆHLEN, 2012. Why mammography screening has not lived up to expectations from the randomised trials. *Cancer Causes & Control*. **23**(1):15-21.

HAMAJIMA, N et al., 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British Journal of Cancer*. **87**(11):1234–1245.

HAMAJIMA, N et al., 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncology*. **13**(11):1141–1151.

HILDEBRAND, Janet S., Susan M. GAPSTUR, Peter T. CAMPBELL, Mia M. GAUDET a Alpa v. PATEL, 2013. Recreational physical activity and leisure-time sitting in relation to postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. **22**(10):1906–1912.

HOŠEK, Jan, Milan BARTOS, Stanislav CHUDÍK, Stefano DALL'ACQUA, Gabriella INNOCENTI, Murat KARTAL, Ladislav KOKOŠKA, Peter KOLLÁR, Zsófia KUTIL, Přemysl LANDA, Radek MAREK, Veronika ZÁVALOVÁ, Milan ŽEMLIČKA a Karel

ŠMEJKAL, 2011. Natural compound cudraflavone B shows promising anti-inflammatory properties in vitro. *Journal of Natural Products*. **74**(4):614–619.

HOU, Shaozhi, Yang SONG, Di SUN, Shujun ZHU a Zhenhua WANG, 2021. Xanthohumol-Induced Rat Glioma C6 Cells Death by Triggering Mitochondrial Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. **22**(9):4506.

CHEN, Sining a Giovanni PARMIGIANI, 2007. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance. *Journal of Clinical Oncology*. **25**(11):1329-33.

CHEN, Xi, Emmanuel MUKWAYA, Man Sau WONG a Yan ZHANG, 2014. A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharmaceutical Biology*. **52**(5):655-60.

CHEN, Yinghua a Olufunmilayo I. OLOPADE, 2008. MYC in breast tumor progression. *Expert Review of Anticancer Therapy*. **8**(10):1689-98.

JIANG, Chuan Hao, Tao Li SUN, Da Xiong XIANG, Shan Shan WEI a Wen Qun LI, 2018. Anticancer activity and mechanism of xanthohumol: A prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.). *Frontiers in Pharmacology*. **9**:530.

JUNG, Seungyoung, et al., 2016. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: In a pooled analysis of 20 studies. *International Journal of Epidemiology*. **45**(3):916–928.

KARABIN, Marcel, Tereza HUDCOVA, Lukas JELINEK a Pavel DOSTALEK, 2014. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*. **33**(6 Pt 2):1063-90.

KIM, Sun Young, Ik Soo LEE a Aree MOON, 2013. 2-Hydroxychalcone and xanthohumol inhibit invasion of triple negative breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*. **203**(3):565–572.

KING, Mary-Claire, Joan H. MARKS, Jessica B. MANDELL a New York Breast Cancer Study Group, 2003. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. 302(5645):643-6.

KLENER, Pavel, 2011. *Základy klinické onkologie*. 1. vyd., Galen, Praha, 96 s. ISBN 978-80-7262-716-5.

KOCYIGIT, Abdurrahim, Ismail KOYUNCU, Murat DIKILITAS, Fatemeh BAHADORI a Baki TURKKAN, 2016. Cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of naringenin-oxime relative to naringenin on normal and cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(10):872-880.

LEMMON, Mark A., Joseph SCHLESSINGER a Kathryn M. FERGUSON, 2014. The EGFR family: Not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 6(4):a020768.

LIU, Ming, Poul Erik HANSEN, Genzhu WANG, Lin QIU, Jianjun DONG, Hua YIN, Zhonghua QIAN, Mei YANG a Jinlai MIAO, 2015. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules*. 20(1):754-79.

LUO, Juhua, Karen L. MARGOLIS, Jean WACTAWSKI-WENDE, Kimberly HORN, Catherine MESSINA, Marcia L. STEFANICK, Hilary A. TINDLE, Elisa TONG a Thomas E. ROHAN, 2011. Association of active and passivesmoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: A prospective cohort study. *BMJ*. 342:d1016.

MARMOT, Michael G., Douglas G. ALTMAN, David A. CAMERON, John A. DEWAR, Stephanie G. THOMPSON a Maggie WILCOX, 2012. The benefits and harms of breast cancer screening: An independent Review. *Lancet*. 380(9855):1778-86.

MIRANDA, Cristobal L., Jan F. STEVENS, Anne HELMRICH, Marilyn C. HENDERSON, Russell J. RODRIGUEZ, Yao-Hsu YANG, Max L. DEINZER, David W. BARNES a Donald R. BUHLER, 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of

prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. **37**(4):271–285.

MIRANDA, Cristobal L., Jan F. STEVENS, Vadim IVANOV, Mark McCALL, Balz FREI, Max L. DEINZER a Donald R. BUHLER, 2000. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**(9):3876–3884.

MUKAI, Rie, 2018. Prenylation enhances the biological activity of dietary flavonoids by altering their bioavailability. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **82**(2):207–215.

NAVRÁTIL, Jiří, Pavel FABIAN, Markéta PALÁCOVÁ, Katarína PETRÁKOVÁ, Rostislav VYZULA a Marek SVOBODA, 2015. Triple negativní karcinom prsu. *Klinická Onkologie*. **28**(6):405–415.

NELSON, Heidi D, Rochelle FU, Amy CANTOR, Miranda PAPPAS, Monica DAEGES a Linda HUMPHREY, 2016. Effectiveness of Breast Cancer Screening: Systematic Review and Meta-analysis to Update the 2009 U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. *Annals of Internal Medicine*. **164**(4):244–255.

NOVOTNÝ, Jan, Pavel VÍTEK a Zdeněk KLEIBL, 2019. *Onkologie v klinické praxi – Standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů*. 3. vyd., Mladá Fronta, Praha, 640 s. ISBN 978-80-204-5103-3.

OPLETAL, Lubomír, 2016. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita sv. 3. Nutraceutika. Sekundární metabolity rostlin*. 1. vyd. Karolinum, Praha, 700 s. ISBN 978-80-246-2084-8.

PAOLETTI, Tiziana, Silvia FALLARINI, Francesca GUGLIESI, Alberto MINASSI, Giovanni APPENDINO a Grazia LOMBARDI, 2009. Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin. *European Journal of Pharmacology*. **620**(1):120–130.

PEKARČÍKOVÁ Lucie, Lucia KNOPFOVÁ, Eva ONDROUŠKOVÁ a Jan ŠMARDA, 2014. Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti. *Klinická Onkologie*. **27**(Suppl 1):S15–S21.

PIETKIEWICZ, Sabine, Jörn H. SCHMIDT a Inna N. LAVRIK, 2015. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods*. **423**:99–103.

PLAZAR, Janja, Bojana ŽEGURA, Tamara T. LAH a Metka FILIPIČ, 2007. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **632**(1–2):1–8.

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

SCHULZ, Wolfgang Arthur, 2007. *Molecular Biology of Human Cancers*. 1. vyd. Springer, Dordrecht, 508 s. ISBN 1402065590.

SLOBODA, Deborah M., Roger HART, Dorota A. DOHERTY, Craig E. PENNELL a Martha HICKEY, 2007. Age at menarche: Influences of prenatal and postnatal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **92**(1):46–50.

SO, Felicia V., Najla GUTHRIE, Ann F. CHAMBERS a Kenneth K. CARROLL, 1997. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters*. **112**(2):127–133.

STANĚK, Libor, Petra TESAŘOVÁ a Robert GÜRLICH, 2017. *Molekulární onkologie v kazuistikách*. 1. vyd. Current Media, Praha, 198 s. ISBN 978-80-88129-27-1.

SUN, Xueni, Yintao ZHANG, Ying ZHOU, Xichen LIAN, Lili YAN, Ting PAN, Ting JIN, Han XIE, Zimao LIANG, Wenqi QIU, Jianxin WANG, Zhaorong LI, Feng ZHU a Xinbing SUI, 2022. NPCDR: natural product-based drug combination and its disease-specific molecular regulation. *Nucleic Acids Research*. **50**(D1):D1324–D1333.

SUN, Yi Sheng, Zhao ZHAO, Zhang Nv YANG, Fang XU, Hang Jing LU, Zhi Yong ZHU, Wen SHI, Jianmin JIANG, Ping Ping YAO a Han Ping ZHU, 2017. Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*. **13**(11):1387-1397.

SUN, Zhihong, Cheng ZHOU, Feng LIU, Wenchao ZHANG, Jing CHEN, Yanlong PAN, Lianqing MA, Qimin LIU, Yuping DU, Jinbo YANG a Qin WANG, 2018. Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway in vivo and in vitro. *Oncology Letters*. **15**(1):908–916.

SUSANTI, Deny, Hasnah M. SIRAT, Farediah AHMAD, Rasadah Mat ALI, Norio AIMI a Mariko KITAJIMA, 2007. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum* L. *Food Chemistry*. **103**(3):710–716.

TRONINA, Tomasz, Jarosław POPŁONSKI a Agnieszka BARTMANSKA, 2020. Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer. *Molecules*. **25**(18):4201.

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

WANG, Rui, Junhai WANG, Tianfu DONG, Jun SHEN, Xitao GAO a Jun ZHOU, 2019. Naringenin has a chemoprotective effect in MDA-MB-231 breast cancer cells via inhibition of caspase-3 and -9 activities. *Oncology Letters*. **17**(1):1217–1222.

WASHBROOK, Elinor, 2006. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Womens Health Medicine*. **3**(1):8–14.

WINTERS, Stella, Charmaine MARTIN, Daniel MURPHY a Navkiran K. SHOKAR, 2017. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. **151**:1-32.

XUE, Fei, Walter C. WILLETT, Bernard A. ROSNER, Susan E. HANKINSON a Karin B. MICHELS, 2011. Cigarette smoking and the incidence of breast cancer. *Archives of Internal Medicine*. **171**(2):125–133.

YONG, Wai Kuan, Yen Fong HO a Sri Nurestri Abd MALEK, 2015. Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacognosy Magazine*. **11**(Suppl 2):S275–S283.

ZENG, Wenfeng, Lingtao JIN, Fayun ZHANG, Chunling ZHANG and Wei LIANG, 2018. Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *Pharmacological Research*. **135**:122–126.

Online zdroje:

BOUŠOVÁ, Iva, *Moodle – UK* [online], Poslední revize 04.2018 [cit. 2.5.2022], Dostupné z: <<https://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=285618>>.

JOE, Bonnie N., *Clinical features, diagnosis, and staging of newly diagnosed breast cancer* [online], Poslední revize 04.2022 [cit. 4.5.2022], Dostupné z: <<https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-diagnosis-and-staging-of-newly-diagnosed-breast-cancer>>.

KREJČÍ, Denisa, Lucie, PEHALOVÁ, Adriana, TALÁBOVÁ, Kateřina, POKOROVÁ, Ivana, KATINOVÁ, Jan, MUŽÍK a Ladislav, DUŠEK. *Novotvary 2018 – Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice* [online]. Poslední revize 04.2021 [cit. 2022-09-05]. Dostupné z <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>