

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VLIV VYBRANÝCH ISOFLAVONOIDŮ NA ÚČINNOST
PROTINÁDOROVÉ LÉČBY U BUNĚČNÉ LINIE MDA-MB-231.**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Hana Bártíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2015

Kateřina Lokvencová

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

.....

Kateřina Lokvencová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat PharmDr. Haně Bártíkové, Ph.D. za její ochotu, cenné rady a důležitou pomoc při získávání informací a dat pro tuto diplomovou práci. Dále děkuji pracovníkům Katedry biochemických věd za příjemné pracovní prostředí. Za podporu děkuji i svým rodičům a příteli Martinovi.

OBSAH:

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Karcinom prsu.....	9
2.1.1	Chemoterapie.....	11
2.1.2	Hormonoterapie.....	14
2.1.3	Cílená terapie.....	15
2.1.4	Kombinovaná terapie.....	16
2.1.5	Problematika terapie buněk MDA-MB-231.....	16
2.2	Doxorubicin.....	18
2.3	Charakteristika vybraných isoflavonoidů.....	22
2.4	Vliv isoflavonoidů na prsní karcinom.....	23
2.5	Vybrané mechanismy působení isoflavonoidů na buňky prsního karcinomu.....	25
2.5.1	Interakce isoflavonoidů s estrogenními receptory.....	25
2.5.2	Efekt na buněčný cyklus a indukci apoptózy.....	26
2.5.3	Inhibice tyrosinkinasového receptoru.....	29
2.5.4	Poškození DNA, inhibice topoisomerasy II.....	30
2.5.5	Efekt na antioxidační efekty.....	30
2.5.6	Vliv na invazi nádorových buněk a tvorbu metastáz.....	30
2.5.7	Epigenetická aktivita jako původ antionkogenních efektů.....	31
2.5.8	Vliv na biotransformační enzymy.....	33
2.5.9	Vliv na lékovou rezistenci.....	34
3	CÍL PRÁCE.....	35
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
4.1	Materiál a chemikálie.....	36
4.2	Přístroje a pomůcky.....	36
4.3	Kultivace buněčné kultury MDA-MB-231.....	37
4.3.1	Kultivační medium.....	37
4.3.2	Buněčná linie MDA-MB-231.....	37
4.3.3	Rozmrazování buněk MDA-MB-231.....	38
4.3.4	Pasážování buněk MDA-MB-231.....	38
4.3.5	Rutinní kultivace.....	39
4.4	Vliv isoflavonoidů na účinek doxorubicinu u buněk MDA-MB-231.....	39
4.4.1	Nasazování buněk.....	40
4.4.2	Expozice buněk.....	42

4.4.3	Testování cytotoxicity.....	43
4.4.4	Statistická analýza.....	45
5	VÝSLEDKY.....	46
5.1	Optimalizace metodiky	46
5.1.1	Stanovení vhodných koncentrací doxorubicinu.....	46
5.1.2	Stanovení vhodných koncentrací isoflavonoidů.....	49
5.1.3	Optimalizace testu cytotoxicity	49
5.2	Vliv doxorubicinu	49
5.3	Vliv genisteinu	50
5.4	Vliv daidzeinu	50
5.5	Vliv formononetinu.....	50
5.6	Vliv kombinace doxorubicinu s isoflavonoidem	50
5.7	Grafická část.....	52
5.7.1	24hodinové ovlivnění	52
5.7.2	48hodinové ovlivnění	58
5.7.3	72hodinové ovlivnění	64
6	DISKUZE.....	70
6.1	Genistein	70
6.1.1	Vliv koncentrace	70
6.1.2	Vliv prostředí, přítomnosti nebo nepřítomnosti estrogenů	71
6.1.3	Vliv načasování podání genisteinu	72
6.1.4	Vliv typu buněčné linie nádorových buněk	72
6.2	Daidzein	73
6.3	Formononetin	73
6.4	Kombinace doxorubicinu s isoflavonoidem.....	74
6.5	Kombinace tamoxifenu s isoflavonoidem u rakovinných buněk prsu	74
6.5.1	Kombinace tamoxifenu s isoflavonoidem u ER-negativních nádorů	74
6.5.2	Kombinace tamoxifenu s isoflavonoidem u ER-pozitivních nádorů.....	75
6.6	Inaktivace NF- κ B genisteinem.....	76
7	ZÁVĚR.....	77
	SEZNAM ZKRATEK	78
	POUŽITÁ LITERATURA	80

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta: Kateřina Lokvencová

Titul, jméno, příjmení školitele: PharmDr. Hana Bártíková, Ph.D.

Název diplomové práce: **Vliv vybraných isoflavonoidů na účinnost protinádorové léčby u buněčné linie MDA-MB-231.**

Karcinom prsu je nejčastějším onkologickým onemocněním u žen. Existuje značné množství terapeutických režimů pro léčbu tohoto onemocnění, často je však limituje nedostatečná účinnost nebo závažné nežádoucí účinky. Isoflavonoidy genistein (GEN), daidzein (DAID) a formononetin (FORM) patří mezi přírodní látky s bioprotektivními efekty na lidský organismus. Některé epidemiologické studie potvrdily protektivní efekt isoflavonoidů proti některým typům rakoviny, včetně karcinomu prsu. Cílem této práce bylo studium vlivu isoflavonoidů na rakovinné buňky a posouzení jejich schopnosti podporovat účinek cytostatik, konkrétně antracyklinového cytostatika doxorubicinu (Dox). K experimentům byla vybrána buněčná linie karcinomu prsu MDA-MB-231. Ke studiu vlivu isoflavonoidů na nádorové buňky jsme s ohledem na biologickou dostupnost isoflavonoidů zvolili koncentrace 1 a 10 μM . Prokázali jsme, že isoflavonoidy v takto nízkých koncentracích většinou buněčnou viabilitu významně neovlivňují. Kombinace Doxu s isoflavonoidy (1 a 10 μM) také neovlivnila jeho účinnost.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Title, Name, Surname of candidate: Kateřina Lokvencová

Title, Name, Surname of tutor: PharmDr. Hana Bártíková, Ph.D.

Title of a diploma work: The impact of selected isoflavonoids on the effectiveness of anticancer therapy in MDA-MB-231 cell line.

Breast cancer is the most common cancer disease in women. There is an extensive amount of therapeutic regimens for the treatment of this disease, but it is often limited by lack of efficiency or serious side effects. Isoflavonoids genistein (GEN), daidzein (DAID) and formononetin (FORM) belong among the natural substances with bioprotective effects on the human body. Some epidemiological studies have confirmed the protective effect of isoflavonoids against certain types of cancer, including breast cancer. The aim of this work was to study the effect of isoflavonoids on cancer cells and assess their ability to support the effect of cytostatics, namely anthracycline antineoplastic agents doxorubicin (Dox). For the experiments was chosen the breast cancer cell line MDA-MB-231. To study the effect of isoflavonoids on tumor cells we chose concentrations of 1 and 10 μM which is according to the bioavailability of isoflavonoids. We have shown that isoflavonoids in such low concentrations generally do not significantly affect cell viability. The combination of Dox with isoflavonoids (1 and 10 μM) also did not affect its efficacy.

1 ÚVOD

Karcinom prsu patří k nejčastějším zhoubným nádorům u žen. V České republice bylo za rok 2010 zjištěno 6 498 nových případů. U žen to představuje více než 16 % ze všech zhoubných nádorů. V porovnání s předchozími epidemiologickými daty incidence karcinomu prsu stále vzrůstá. V roce 2010 se proti předchozímu roku zvýšila i standardizovaná míra úmrtnosti. Přestože je v současnosti terapie poměrně úspěšná, zůstává karcinom prsu stále nejčastější příčinou úmrtí na onkologické onemocnění u žen (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2013). Z vysokých hodnot incidence i mortality vyplývá nezbytnost detailnějšího poznání patofyziologie onemocnění a vytvoření dokonalejších strategií léčby.

Antracyklinové antibiotikum Dox je stále jedním z nejužitečnějších cytostatik používaných k léčbě mnoha karcinomů. Nejvíce se využívá k chemoterapii nádorů prsu a leukemie (Václavíková et al., 2008). V některých případech se však stává, že jeho účinek není v terapeutických dávkách dostatečný. Jeho využití ve vyšších než terapeutických dávkách vzhledem k jeho systémové toxicitě, hlavně kardiotoxicitě, však představuje problém (Hanušová et al., 2011). Z důvodu vysoké systémové toxicity Doxu bylo testováno mnoho jeho analogů, jejichž struktura byla různě modifikována, u žádného z analogů však nebyla otázka toxicity uspokojivě vyřešena. Proto je soustředěna velká pozornost na výzkum nových mechanismů, které by pomohly posílit účinek Doxu na nádorové buňky a dokázaly by snížit vážnost jeho nežádoucích účinků (Carvalho et al., 2009).

Epidemiologické studie ukazují na existenci významného rozdílu v incidenci rakoviny prsu napříč různými etnickými skupinami. Incidence rakoviny prsu je mnohem vyšší v Evropě a USA v porovnání s asijskými státy, jako je Japonsko a Čína. Tento rozdíl je částečně přisuzován stravovacím návykům. Jedním z nejdůležitějších rozdílů ve stravování mezi těmito populacemi se zdá být fakt, že strava Japonců a Číňanů je tradičně bohatá na produkty ze sóji. Konzumují je v mnohem vyšším množství, než je obvyklé pro populaci Evropy nebo USA. V sóje jsou obsaženy isoflavonoidy, u nichž byly identifikovány potenciální protinádorové vlastnosti (Sarkar a Li, 2003).

Zvýšení účinku Doxu nebo zmírnění jeho nežádoucích účinků pomocí isoflavonoidů by pro dnešní terapii karcinomu prsu znamenalo nesmírný přínos.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu patří mezi hormonálně dependentní nádory. Důležitý vliv na jeho progresi mají estrogeny. Vývoj karcinomu prsu je poměrně dlouhodobým procesem zahrnujícím několik stupňů (Klener, 2002).

Existuje poměrně velké množství rizikových faktorů pro vznik karcinomu prsu. Incidence se zvyšuje s věkem, přičemž nejvyšší nárůst je zaznamenán po 50. roce věku (Abrahámová et al., 2000). Rizikovost pro ženy roste i s délkou doby, po kterou jsou vystaveny působení estrogenů. Vyšší riziko s sebou tak nese brzký začátek menstruačního cyklu během dospívání nebo naopak pozdní nástup menopauzy. Nepříznivě působí i vyšší věk při prvním porodu nebo nuliparita (Klener, 2002). Nelze také zanedbat rodinnou historii. Familiárně se karcinom prsu objevuje asi v 10 % případů, přičemž genetické předpoklady se na jeho vzniku podílí z 1 až 5 %. Náchylnost k nádorům prsu je děděna autozomálně dominantně s variabilní penetrací. To znamená, že mutaci přenáší obě pohlaví, u některých přenašečů se však nemoc neprojeví (Abrahámová et al., 2000). Hereditární vznik karcinomu prsu je nejčastěji spojován s mutací tumor-supresorových genů BRCA-1 (breast cancer 1) a BRCA-2. Riziko rozvoje karcinomu prsu v případě mutace genu BRCA-1 se pohybuje v rozmezí 56 až 85 %, často v tomto případě dochází ke vzniku karcinomu na obou prsech a nejčastěji postihuje ženy ve věku do 35 let. Mutace v BRCA genech jsou často spojovány i s dalšími nádorovými onemocněními. Vznik karcinomu prsu vyvolávají i mutace v dalších genech, např. v p53, PTEN (phosphatase and tensin homolog) a ATM (ataxia telangiectasia mutated) (Prašová, 2010). Dále by měla být věnována zvýšená pozornost i ženám s benigním onemocněním prsu. Mezi další rizikové faktory také patří vliv radiace, hormonální substituční léčba v menopauze, obezita, abúzus alkoholu a kontraceptiva (Abrahámová et al., 2000).

V současnosti odborná veřejnost přijímá názor, že rakovina prsu není typem onemocnění, ke kterému by se dalo terapeuticky přistupovat ve všech případech shodně. Místo toho je nutné brát ohled na skutečnost, že tento typ rakoviny obsahuje mnoho podtypů, které se liší buněčným původem, somatickými změnami a etiologií. V posledních letech byla vytvořena nová molekulární taxonomie založená na „vnitřní“

biologii nádorových buněk prsu. Ta v současnosti rozlišuje šest různých rakovinných podtypů (Perou a Borresen-Dale, 2011).

Charakterizací různorodosti znaků genové exprese u nádorových buněk prsu lze vytvořit rozdílné molekulární podtypy. Takovéto „molekulární portréty“ neodhalují pomocí rozdílů v genové expresi pouze určité podobnosti nebo odlišnosti mezi nádorovými buňkami, ale vytvářejí také možnost jejich biologické interpretace. Různorodost v rychlosti proliferace, aktivitě specifických signálních drah i uspořádání buněk v nádorové tkáni, to vše je odrazem odpovídající různorodosti v expresi specifických podmnožin genů. Tyto „molekulární portréty“ pak věrně odrážejí vlastnosti určitého typu nádoru, ne pouze vlastnosti konkrétního vzorku od daného jedince (Perou et al., 2000).

Vnitřní podtyp rakoviny prsu předpovídá riziko relapsu, celkové přežití a účinnost endokrinních a chemoterapeutických režimů (Perou a Borresen-Dale, 2011).

Sorlie et al. (2001) profilováním exprese RNA objevili nejméně 5 podtypů prsních nádorů, které se odlišují některými znaky genové exprese: „luminal-like“ A, „luminal-like“ B, „HER2+“, „basal-like“ a „normal-like“. Následně Herschkowitz et al. (2007) našli další molekulární podtyp buněk rakoviny prsu, který byl nazván „claudin-low“.

„Luminal-like“ podtypy patří mezi nejčastější podtypy rakoviny prsu. Jejich název vznikl díky skutečnosti, že mají znaky genové exprese připomínající luminální epitelové buňky prsu (Perou et al., 2000). Charakterizuje je nejlepší prognóza ze všech podtypů a také nejlepší odpověď na endokrinní terapii (Sorlie et al., 2001; Strehl et al., 2011). Pro tyto nádory je typická exprese genů pro estrogení receptory (ER), progesteronové receptory (PR) a exprese cytokeratinů (Perou a Borresen-Dale, 2011).

„Her2+“ podtyp se nevyskytuje příliš často, zahrnuje přibližně 10 % všech nádorů prsu. Vykazuje negativitu hormonálních receptorů (ER a PR). Definuje ho zvýšená exprese genu pro receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2, human epidermal growth factor receptor 2) a zvýšená exprese proliferativního souboru genů (Carey et al., 2006; Strehl et al., 2011). V době, kdy ještě nebyla objevena cílená terapie proti HER2, měl tento podtyp velmi špatnou prognózu (Perou a Borresen-Dale, 2011).

„Basal-like“ podtyp tvoří přibližně 15 % invazivních prsních nádorů. Charakterizuje ho exprese cytokeratinů a receptorů adheze, které jsou příznačné pro bazální buňky zdravého epitelu prsní žlázy. Typická je nízká exprese ER, PR

a HER2; z tohoto důvodu je někdy pojmenováván jako triple negativní karcinom prsu (TNBC, triple-negative breast cancer). Toto označení není ale úplně přesné, protože skupina TNBC zahrnuje kromě podtypu „basal-like“ ještě další molekulární podtypy rakoviny prsu, například „claudin-low“ (Perou a Borresen-Dale, 2011; Strehl et al., 2011).

„Claudin-low“ podtyp je charakterizován nízkou expresí genů ovlivňujících tight junctions a adhezi mezi buňkami včetně claudinů, occludinu a E-cadherinu, stejně jako vysokou expresí mnoha mezenchymálních genů. Nedostatek některých znaků epiteliálních buněk a zvýšená exprese některých mezenchymálních genů připomíná určité znaky spojené s kmenovými buňkami (Lim et al., 2009). Nádory podtypu „claudin-low“ připomínají „basal-like“ podtyp v takovém rozsahu, že vykazují negativitu pro ER, PR a HER2. Avšak „claudin-low“ podtyp postrádá klasické markery pro „basal-like“ podtyp, kterými jsou cytokeratiny 5/6 (Strehl et al., 2011).

„Normal breast-like“ podtyp představuje méně jasný podtyp. Podle nejnovějších výzkumů však s největší pravděpodobností reprezentuje kontaminaci vzorku nádoru normální nenádorovou tkání (Portier et al., 2012).

2.1.1 Chemoterapie

Karcinom prsu patří mezi systémová onemocnění, proto se u jeho terapie přistupuje k systémové léčbě, kterou představuje chemoterapie (Prausová, 2010). Pokud specialista uvažuje o chemoterapii nebo hormonální terapii, musí posoudit rozsah nádoru, načasování terapie, dávky cytostatik i možnost vzniku rezistence na cytostatika. Dále je důležité rozlišit, zda se bude jednat o léčbu adjuvantní, neadjuvantní nebo paliativní.

Adjuvantní léčba se indikuje po předchozí radikální léčbě (chirurgická, radiační), která odstranila nádorové ložisko. Systémová terapie ničí možná skrytá ložiska, které se nepodařilo radikální léčbou odstranit. Mezi hlavní cíle patří prodloužení intervalu před znovuobjevením nádoru a prodloužení doby přežití (Abrahámová et al., 2000). Indikuje se u pacientek s nepříznivými prognostickými faktory. Obvykle se používá kombinace dvou nebo tří cytostatik. Variabilita těchto kombinací je poměrně vysoká (Prausová, 2010).

Účelem neadjuvantní chemoterapie je hlavně zmenšení nádorového ložiska, aby dále byla např. usnadněna chirurgická resekce. Mezi další důležité efekty patří, podobně

jako u adjuvantní terapie, zničení nezjistitelných skrytých metastáz. To s sebou přináší i prodloužení beznádorového intervalu a celkové doby přežití.

Paliativní systémová léčba se provádí u pacientek s metastatickým karcinomem prsu, jež bohužel v dnešní době zůstávají téměř nevyléčitelné. Systémová léčba má zajistit navození částečných remisí, zkvalitnit a prodloužit život s chorobou (Abrahámová et al., 2000).

Mezi cytostatika, která lékaři indikují u karcinomu prsu v terapii adjuvantní, neadjuvantní i paliativní, řadíme Dox, metotrexát, 5-fluorouracil, gemcitabin, kapecitabin, cyklofosfamid, cisplatinu, karboplatinu, vinorelbin, paklitaxel a docetaxel (Prausová, 2010).

Metotrexát se řadí mezi antimetabolity, které jsou odvozeny od přirozených endogenních látek důležitých pro syntézu DNA a RNA. Pozměněním přirozené struktury endogenních látek došlo ke ztrátě původního účinku, přičemž afinita k cílovým strukturám se zachovala (Lincová a Farghali, 2007). Konkrétně se jedná o analog kyseliny listové. Mezi jeho mechanismy protinádorového účinku náleží: kompetice s přirozenými foláty o průchod do buňky a inhibice biochemických drah důležitých pro syntézu DNA a RNA, ve kterých kyselina listová figuruje jako kofaktor (Klener a Klener, 2013).

5-fluorouracil (5-FU) také patří mezi antimetabolity, konkrétněji mezi pyrimidinová analoga. Pro jeho účinek je důležité, aby byl v buňce fosforylací aktivován na 5-fluorouridin monofosfát, který se dále začleňuje do RNA a inhibuje její funkce. Aktivací 5-FU vzniká ještě další produkt, 5-fluorodeoxyuridin monofosfát, který pomocí kovalentní vazby interaguje s thymidylátsyntetasou, čímž potlačuje syntézu DNA. Tyto mechanismy způsobují indukci zlomů a následných oprav v DNA. To vede k zástavě replikace, dvojitým zlomům v DNA a indukci apoptózy (Klener a Klener, 2013; Lincová a Farghali, 2007).

Gemcitabin a kapecitabin také spadají mezi pyrimidinová analoga. Bázi u gemcitabinu tvoří cytosin a modifikovaným cukrem je fluorem substituovaná deoxyribóza. K aktivaci dochází fosforylací. Difosfát inhibuje ribonukleotidovou reduktasu, čímž je narušena tvorba deoxycytidinu. Trifosfátová forma gemcitabinu se začleňuje do DNA, čímž přerušuje syntézu DNA a vytvoří v DNA zlom, který už nedokáže endonukleasy opravit. Kapecitabin je proléčivem 5-FU, metabolická přeměna na 5-FU je poměrně komplikovaná. V konečné fázi přeměny je kapecitabin transformován na 5-FU prostřednictvím thymidinfosforylasy. Protože se

thymidinfosforylasa více produkuje v nádorových tkáních než ve tkáních zdravých, kapecitabin působí vůči nádorovým tkáním selektivněji než 5-FU (Lüllmann et al., 2002; Klener a Klener, 2013).

Cyklofosfamid patří mezi alkylující látky odvozené od dusíkatého yperitu. Mechanismus jeho účinku spočívá v kovalentní vazbě vysoce reaktivních alkylů na DNA rychle se dělících buněk, což následně vyvolává buněčnou smrt. Cyklofosfamid je interakcí s cytochromem P450 přeměněn na řadu cytotoxicky působících alkylujících metabolitů (Lincová a Farghali, 2007).

Cisplatina a karboplatina také reagují alkylačním mechanismem, uvolňují platinu. Molekula cisplatin je tvořena dvojmocnou platinou, na kterou jsou koordinačně navázány dva atomy chloru a dvě aminoskupiny. Z této struktury se uvolní vysoce reaktivní platina, která vytvoří můstky mezi dvěma molekulami DNA nebo ve vláknu stejné molekuly DNA. Tím dojde k narušení metabolismu DNA a indukci apoptózy. Cisplatina se také podílí na aktivaci stresových kinas, což vede ke zvýšené expresi death receptorů na povrchu nádorových buněk a současnému zvýšení exprese death ligandů, čímž je aktivována zevní apoptotická dráha. Dalším možným mechanismem je inhibice telomer. Cisplatina je velmi nefrotoxická, proto byly vytvořeny její deriváty, u kterých je tento nežádoucí účinek zmírněn, například karboplatina (Klener a Klener, 2013; Lüllmann et al., 2002).

Vinorelbin je zařazen mezi látky interferující s mikrotubuly mitotického vřeténka inhibicí polymerizace tubulinu. Je to semisynteticky získaný vinkaalkaloid. Váže se na tubulin, bílkovinu tvořící vřeténko, které odděluje chromozomy v průběhu mitózy. Vyvolává „krystalizaci“ tubulinu a rozpuštění vřeténka, tím dochází k přerušení buněčného dělení v G2/M fázi buněčného cyklu, následně je indukována apoptóza (Lincová a Farghali, 2007; Lüllmann et al., 2002).

Paklitaxel a docetaxel jsou přírodními látky izolovanými z tisu tichomořského (paklitaxel) nebo tisu červeného (docetaxel). Také interferují s mikrotubuly. Váží se na β -tubulinové podjednotky mikrotubulů, čímž způsobují inhibici depolymerizace mikrotubulů. Vznikají tak strukturálně modifikované mikrotubuly, které neplní správně svoji funkci a dochází proto k inhibici mitózy. Mitóza je narušena v bodě G2/M, následně je buňka předurčena k apoptóze (Klener a Klener, 2013; Lüllmann et al., 2002).

Dox bude podrobněji rozebrán v samostatné kapitole, která začíná na straně 18.

2.1.2 *Hormonoterapie*

Hormony mohou ovlivňovat vznik nádorového onemocnění. Například estrogény mají schopnost podporovat nádorovou tkáň různými mechanismy. Přispívají k aktivaci některých růstových faktorů (např. EGF), stimulují expresi receptorů pro růstové faktory, aktivují proteolytické enzymy, zasahují do aktivity adhezních molekul, podílejí se na aktivaci onkogenů a inaktivaci antionkogenů. Mají vliv i na cyklin D₁, prostřednictvím kterého je zvyšována buněčná proliferace. Z těchto účinků jasně vyplývá, že estrogény hrají významnou roli v růstu prsních karcinomů. Cílem hormonoterapie je pak potlačení těchto účinků pomocí vhodných chemoterapeutik (Klener a Klener, 2013).

Hormonoterapie také působí systémově. Je indikována v adjuvanci, neadjuvanci i paliaci. Zásadním faktorem pro možné využití hormonální terapie je přítomnost hormonálních receptorů v příslušném nádoru, nejvýznamnějšími jsou ER a PR (Prausová, 2010). U ER-pozitivních nádorů se obvykle nasazuje hormonální léčba. U ER-negativních se podle dalších okolností (např. podle délky bezpříznakového období) indikuje kombinace hormonální a chemoterapeutické léčby nebo jen samotná chemoterapie. Hormonální léčba může být provedena třemi různými mechanismy. Jde o ablativní, kompetitivní nebo inhibiční mechanismus (Abrahámová et al., 2000).

Ablativní způsob hormonální léčby je založen na odstranění zdroje produkujícího inkriminované hormony. Patří sem ovariectomie, která může být provedena chirurgicky, ozářením nebo medikamentózně (analogy gonadoliberinů – např. goserelin, buserelin, leuprolid, triptorelin). Později byly do praxe zavedeny i antagonisté gonadoliberinů – např. degarelix, cetorelix, abarelix, jejichž vazba na gonadoliberinový receptor v hypofýze způsobí supresi sekrece pohlavních hormonů (Abrahámová et al., 2000; Klener a Klener, 2013).

Kompetitivní způsob hormonální léčby je založen na aktivitě antihormonů, které zablokují vazbu inkriminovaného hormonu na receptor. V terapii karcinomu prsu se uplatňují hlavně antiestrogeny. Nejvíce se v rámci této skupiny využívají selektivní modulátory estrogenních receptorů. Jsou to látky, které mají kromě antiestrogenních vlastností částečně zachovanou i aktivitu estrogenní. Váží se na ER, ale jejich interakce s hormon-responzivním elementem na DNA vyvolávají modifikovanou genovou expresi v porovnání s estrogény. Sníží tak buněčnou proliferaci a zároveň podpoří apoptotické pochody v buňce. Do této skupiny jsou zařazeny látky tamoxifen, toremifen a raloxifen (Klener a Klener, 2013). Tamoxifen má k ER asi desetkrát nižší afinitu než estrogen,

proto je pro jeho účinek příznivé, pokud je potlačena přirozená sekrece estrogenů (Lincová a Farghali, 2007).

Inhibiční způsob hormonální léčby je zprostředkován látkami, které blokují tvorbu estrogenu v periferních tkáních i nadledvinkách. Tuto schopnost mají buď inhibitory aromatas nebo progestiny (Abrahámová et al., 2000). U postmenopauzálních žen se estradiol tvoří v periferních tkáních přeměnou z androstendionu na estron prostřednictvím enzymatického aromatasového komplexu. Estradiol pak vzniká přeměnou z estronu (Lincová a Farghali, 2007). Další možností léčby jsou tedy inhibitory aromatas, které snížením tvorby estradiolu zpomalí růst nádoru. V dnešní době se nejvíce používají anastrozol a letrozol (Klener a Klener, 2013).

Aditivní hormonální léčba je zprostředkována deriváty progesteronu, kterými jsou medroxyprogesteron acetát a megestrol acetát. Jejich mechanismus účinku nebyl ještě zcela odhalen, pravděpodobně tkví v inhibici syntézy některých růstových faktorů. Dalším mechanismem může být ovlivnění osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny, pomocí kterého snižují sekreci estrogenů (Abrahámová et al., 2000).

2.1.3 Cílená terapie

Cílená terapie se od klasické chemoterapie odlišuje mechanismem působení a toxicitou, vychází z detailního poznání patofyziologie onemocnění. Velmi důležité je v tomto případě určení konkrétního subtypu nádorového onemocnění. Hlavním rozdílem oproti konvenčním cytostatikům je schopnost cílených léčiv působit na konkrétní molekuly nebo signální dráhy. Mají proto daleko větší selektivitu vůči nádorovým buňkám než vůči buňkám zdravým, z toho také vyplývá výrazné snížení toxicity vůči zdravé tkáni. Avšak ani cílené látky nejsou stoprocentně specifické pro cílovou molekulu nebo signální dráhu ovlivňující chování nádorů. Navíc aberantní molekuly nebo signální dráhy podílející se na tumorogenezi nemusí být specifické jen pro patologické procesy, mohou být součástí některých fyziologických dějů. Proto se ani cílená terapie neobejde bez nežádoucích účinků (Klener a Klener, 2013). Cílená léčba může způsobit změnu v chování buněk i ve vlastnostech mikroprostředí nádoru, které má pro existenci nádoru také velký význam. Mezi protilátky využívané k terapii karcinomu prsu patří: trastuzumab, lapatinib a bevacizumab (Prausová, 2010).

Trastuzumab je monoklonální protilátkou proti HER2 receptoru. V současnosti se využívá pro adjuvantní i paliativní léčbu karcinomů prsu, u nichž byla prokázána

zvýšená exprese HER2. Terapeutického účinku je docíleno vazbou monoklonální protilátky na extracelulární doménu receptoru a vyvoláním antagonistického efektu.

Lapatinib je duálním nízkomolekulárním tyrosinkinasovým inhibitorem, který blokuje nitrobuněčnou tyrosinkinasovou doménu HER1 a HER2. Jeho schválenou indikací je karcinom prsu v pokročilém stádiu, u kterého nepomohla terapie trastuzumabem.

Bevacizumab je neutralizační monoklonální protilátka inhibující vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor). VEGF hraje významnou roli v angiogenezi solidních tumorů. Nádor si tvoří vlastní cévní systém, je-li tato schopnost přerušena, k nádoru se nedostává dostatek kyslíku a živin, proto přestává růst. Bevacizumab snižuje aktivaci VEGF receptorů, díky čemuž dochází k inhibici angiogeneze. Nepoužívá se v monoterapii, využití nalézá pouze v kombinační léčbě (Klener a Klener, 2013; Prausová, 2010).

2.1.4 *Kombinovaná terapie*

Efektivnost jednotlivých terapeutických postupů může být posílena jejich vzájemnou kombinací. Výhodnou se jeví kombinace chemoterapie s hormonální terapií nebo s biomodulační cílenou terapií (Klener, 2002).

2.1.5 *Problematika terapie buněk MDA-MB-231*

Buněčná linie rakoviny prsu MDA-MB-231 získaná z pleurálního výpotku se podle nádorového typu řadí mezi adenokarcinomy. Charakterizuje ji nízká exprese ER, PR i HER2. Proto je označována jako „basal-like“ (Neve et al., 2006) nebo někdy i jako „claudin-low“ (Perou a Borresen-Dale, 2011).

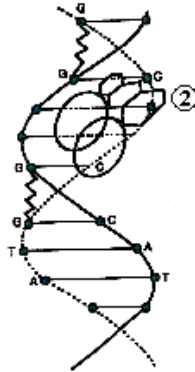
Triple negativní karcinomy prsu (TNBC) jsou charakterizovány jako nádory postrádající expresi ER, PR a HER2. Tato skupina nádorů zahrnuje několik molekulárních podtypů rakoviny prsu, patří sem „basal-like“ i „claudin-low“ molekulární podtypy (Foulkes et al., 2010). Z toho vyplývá, že mezi TNBC patří i buněčná linie MDA-MB-231.

Ženy s TNBC nemají užitek z endokrinní terapie nebo terapie trastuzumabem. Chemoterapie je v současné době základním pilířem systematické léčby. Pacienti s TNBC odpovídají na léčbu chemoterapií, ale existuje u nich vysoká rizikovitost rekurence a progresu onemocnění. Zatím neexistuje žádná preferovaná standardní forma

chemoterapie pro pacienty s TNBC. Retrospektivní studie naznačují, že přidání docetaxelu nebo paklitaxelu k antracyklinovým adjuvantním režimům může být užitečnější pro léčbu ER-negativních a HER2-negativních rakovinných podtypů než pro léčbu mnohem častějších ER-positivních a HER2-negativních podtypů. Avšak je nezbytné provést další studie, které by pomohly optimalizovat léčbu těchto nádorů za současného zvýšení specifity a snížení toxických účinků (Foulkes et al., 2010).

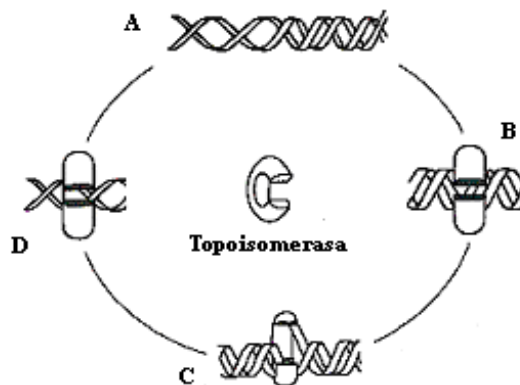
2.2 Doxorubicin

Dox byl izolován ze *Streptomyces peucetius*. Účinkuje především na buněčnou DNA. Mimo jiné způsobuje interkalaci, inhibuje topoisomerasu II a produkuje volné radikály (Lincová a Farghali, 2007; Minotti et al., 2004). Interkalace představuje nekovalentní vazbu cytostatika mezi dvoušroubovicemi DNA zprostředkovanou vodíkovými můstky, čímž je následně narušena replikace a transkripce.



Obr. 1. Znárodnění interkalačního mechanismu (Klener, 2002).

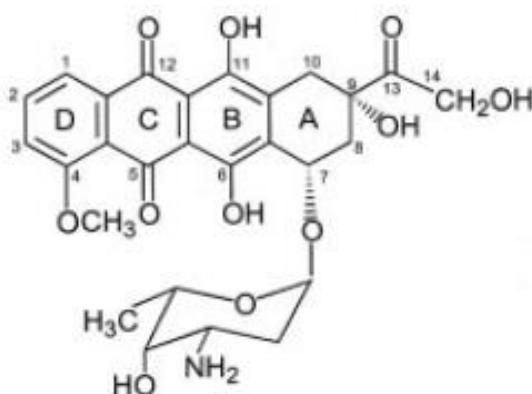
Topoisomerasy patří mezi nukleární enzymy, které mají vliv na správný průběh replikace. Během replikace může dojít k nadměrné torzi dvoušroubovice DNA a následné tvorbě zlomů na vláknech DNA. Topoisomerasa se váže na oba řetězce dvoušroubovice, přerušuje je a následně zase spojuje, čímž uvolňuje napětí a předchází spontánnímu vzniku zlomů. Pokud jsou topoisomerasy blokovány, nedojde ke spojení vzniklých zlomů, což buňku odsoudí k apoptóze (Klener a Klener, 2013).



Obr. 2. Mechanismus účinku topoisomerasy II: A) DNA v torzi podél vlastní osy. B) Vazba topoisomerasy II na řetězce DNA. C) Přerušování řetězce a uvolnění torze prostřednictvím topoisomerasy II. D) Opětovné spojení řetězce DNA (Klener, 2002).

Účinnost Doxu na nádorové buňky je závislá na dávce a době expozice, systémová toxicita však velmi limituje velikost maximální terapeutické dávky Doxu (Carvalho et al., 2009). Obvyklá dávka se pohybuje v rozmezí 30 až 60 mg/m² i. v. každý třetí týden léčby. Celková kumulativní dávka by neměla překročit 550 mg/m².

V terapii je Dox podáván intravenózní formou, pomalou injekcí nebo infúzí, protože po perorálním podání se dostatečně nevstřebává (Lincová a Farghali, 2007). Po intravenózním podání projevuje Dox lineární farmakokinetiku. V plasmě a tkáních je široce distribuován, distribuční objem převyšuje 500 l/m². Na plasmatické proteiny se váže z 50 až 85 % (Danesi et al., 2002).



Obr. 3. Strukturální vzorec doxorubicinu (Minotti et al., 2004).

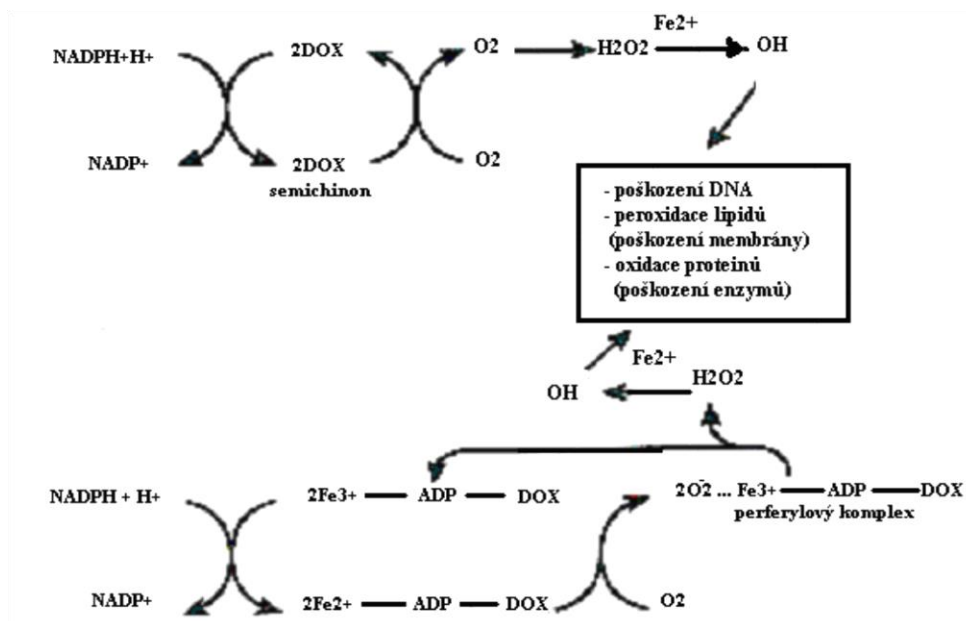
Dox je v organismu metabolisován redukcí karbonylové skupiny za tvorby inaktivního hydroxyderivátu doxorubicinolu (Doxol). Právě Doxol se zdá být méně protinádorově aktivní a velkou měrou odpovědný za kardiotoxicitu (Novotná et al., 2008). Existuje několik enzymů redukcí karbonylovou skupinu, které se účastní tvorby Doxolu. Expres těchto enzymů se liší mezi tkáněmi a orgány. Karbonylreduktasa CBR1 je enzym převládající v játrech, zatímco v srdci převažuje aldo-ketoreduktasa AKR1A1 (Hanušová et al., 2011). Dox má vysokou jaterní clearance, 50 % léčiva je do sedmi dnů po přerušení léčby vyloučeno do žluči. Eliminace Doxu a jeho metabolitů žlučí nebo jeho exkrece stolicí jsou z klinického hlediska nejdůležitějšími způsoby (Danesi et al., 2002).

Hlavním nežádoucím účinkem antracyklinů je kardiotoxicita. Významnou roli hraje dávkovací schéma. Nižší opakované dávky vykazují nižší riziko, podobné je to i u dlouhodobé infúze (Klener, 2002). Z některých studií vyplývá, že C_{max} (maximální koncentrace léčiva v krvi) spíše než AUC (plocha pod křivkou závislosti koncentrace léčiva v krvi na čase) je spojována s rozvojem chronické kardiotoxicity. Prodloužení

doby infúze však na druhou stranu zvyšuje incidenci a závažnost mukozitid a útlumu kostní dřeně (Danesi et al., 2002).

Kardiotoxicita je rozdělena na akutní, subakutní, chronickou a pozdní. Akutní toxicita se projeví několik hodin po podání Doxu, způsobuje převážně tachyarytmie. Subakutní toxicita způsobuje perikarditidu a myokarditidu, které se mohou vést k srdečnímu selhání. Chronická toxicita se objevuje během jednoho roku po ukončení terapie, ta se obvykle manifestuje systolickou dysfunkcí levé komory. Pozdní toxicitou je charakterizován stav, kdy se kardiotoxické následky léčby projeví po více jak jednom roce od ukončení léčby (Poprach et al., 2008).

Kardiotoxicita jako důsledek léčby Doxem je způsobena mnoha faktory. Dox negativně ovlivňuje membránu myocytů, což způsobuje zvýšení influxu kalcia do buňky, také inhibuje koenzym Q10 a způsobuje i další negativní metabolické změny (Klener, 2002). Jako hlavní kardiotoxický mechanismus poškození srdečního svalu je však bráno působení volných kyslíkových radikálů (ROS) a reaktivních sloučenin, které jsou tvořeny během nitrobuněčného působení antracyklinů (Poprach et al., 2008). Doxem vytvořené volné radikály vznikají nejméně dvěma způsoby. Jednak redukcí chinolonového kruhu na semichinolonový radikál, který reakcí s kyslíkem poskytuje superoxid, jednak tvorbou komplexu Doxu s ADP a ionty železa. Tento komplex reaguje s kyslíkem za vzniku perferylového komplexu, který se rozpadá za uvolnění peroxidu vodíku. ROS pak narušují nitrobuněčné struktury, způsobují peroxidaci lipidů, zvyšují prostupnost kalcia skrz buněčnou membránu a narušují funkci ATP-pumpy (Klener, 2002; Poprach et al., 2008).



Obr. 4. Schéma dvou mechanismů, které vedou ke tvorbě ROS. Redukce chinolonového kruhu na semichinolonový radikál, který reakcí s kyslíkem poskytuje superoxid. Tvorba komplexu Doxu s ADP a ionty železa (Klener, 2002).

Jedním z důvodů, proč jsou kardiomyocyty náchylnější k takovému poškození než ostatní tkáň, je skutečnost, že obsahují nízké hladiny antioxidantních enzymů (superoxiddismutasa, glutathionreduktasa) (Minotti et al., 2004). Také výše zmiňovaný Doxol je velkou měrou odpovědný za kardiotoxicitu (Novotná et al., 2008).

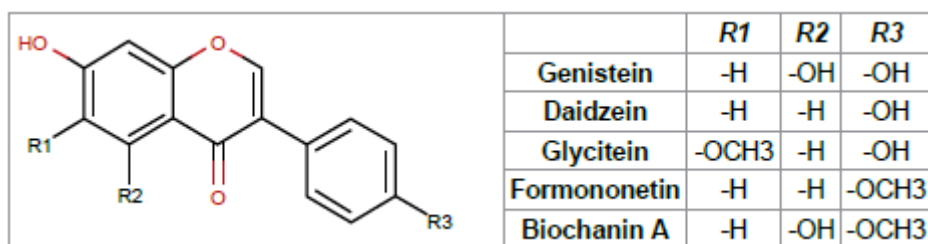
Van Acker et al. (2001) prokázali, že flavonoidy mohou ochraňovat zdravé buňky vylučováním ROS nebo chelatací železa.

Oxidativní poškození nádorových buněk volnými radikály však představuje jeden z mechanismů protinádorové aktivity Doxu. Flavonoidy jako přírodní antioxidanty tak redukcí ROS interferují s antineoplastickou aktivitou Doxu, proto je jejich využití rozporuplné (Hanušová et al., 2011).

Mezi další nežádoucí účinky Doxu patří myelosuprese, neutropenie a trombocytopenie, které jsou dávkově závislé. Dále se objevuje stomatitida, ezofagitida a mukozitida, které jsou zapříčiněny dlouhodobou infúzí. Dox patří mezi střední až silné emetogeny, nauzea a zvracení se objevuje ve 30 až 40 % případů. Alopecie se vyskytuje velmi často, v 90 až 100 % případů dochází k významnému vypadávání vlasů. Dox vyvolává i recall fenomen, který zvyšuje pravděpodobnost vzniku postradiačních lézí. V některých případech vzniká azoospermie a amenorea (Lincová a Farghali, 2007).

2.3 Charakteristika vybraných isoflavonoidů

Isoflavonoidy GEN, DAID a FORM patří mezi rostlinné sekundární metabolity, které zprostředkovávají rozmanité biologické funkce prostřednictvím různých metabolických drah. Převážně jsou obsaženy v rostlinách z čeledi Fabaceae. Vysoké koncentrace GENU a DAIDu byly nalezeny v bobech sóji luštiné (*Glycine Max*). GEN, DAID i FORM pak ve významných koncentracích obsahuje i jetel luční (*Trifolium pratense*) (Miadoková, 2009). Patří do skupiny flavonoidů, kde vytváří samostatnou podskupinu. Jejich hlavním strukturálním znakem je flavonové jádro, které se skládá ze dvou jader benzenových, které propojuje heterocyklický pyranový kruh. Isoflavonoidy charakterizuje 3-fenylchromanová kostra, která je biogeneticky odvozená z 2-fenylchromanového skeletu flavonoidů (Sarkar a Li, 2003). FORM může být konvertován 4'-O-demethylací na silněji působící GEN a DAID (Chandrasekharan, 2013).



Obr. 5. Struktura isoflavonoidů (Chandrasekharan, 2013).

V potravě jsou isoflavonoidy přítomny většinou jako glykosidické konjugáty, přičemž biologicky aktivní formu představují jejich aglykony. Pro vstřebání z gastrointestinálního traktu je třeba, aby proběhlo enzymatické odštěpení cukerné molekuly savčími nebo mikrobiálními glukosidasami. Ve střevě také dochází k tvorbě derivátů odvozených od isoflavonoidů (Sarkar a Li, 2003). U isoflavonoidů převládají konjugační metabolické reakce vytvářející glukuronidové a sulfátové konjugáty. Isoflavonoidy charakterizuje vysoký first-pass metabolismus (>90 %), proto pouze malá frakce isoflavonoidů zůstává v cirkulaci volná (Chandrasekharan, 2013). Konjugáty jsou snadněji transportovány krví a exkretovány do žluči než jejich mateřské aglykony. Tyto metabolity nemusí být nutně biologicky inertní, účinek na nádorové buňky se však může u konjugátů lišit. Například sulfátové konjugáty GENU nebyly asociovány s antiproliferativním efektem (Birt et al., 2001).

Isoflavonoidy se vyznačují poměrně nízkou biodostupností. V případě lidí, kteří třikrát denně konzumovali stravu obsahující sójové mléko, sérová koncentrace GENU

dosáhla hodnoty 4,6 μM . U postmenopauzálních žen, které užívaly doplňky stravy s isoflavonoidy jako alternativní substituční hormonální léčbu, se sérové koncentrace pohybovaly v rozmezí 5 až 10 μM (Chandrasekharan, 2013). V jiné studii se po nárazovém požití velkého množství sóji v některých případech plasmatické koncentrace GENu, DAIDu a equolu vyšplhaly ke koncentraci 2,4 μM . Mezi výsledky se však projevila velká variabilita a v některých případech byly dokonce zjištěny výrazně nižší plasmatické koncentrace (Setchell, 1998).

Konjugované isoflavonoidy jsou vylučovány do žluči a podléhají enterohepatálnímu oběhu. Hlavní eliminační cestu představuje pro isoflavonoidy exkrece do moči (Chandrasekharan, 2013).

Isoflavonoidy se chovají jako bioprotektivní látky. Přisuzuje se jim antioxidační, antimutagenní, antikancerogenní a antiproliferativní aktivita. Jako antioxidanty ochraňují buňky proti oxidativnímu stresu a snižují tak riziko poškození makromolekul volnými radikály. Dále je jim připisována schopnost ochraňovat tělo před rakovinou, kardiovaskulárními onemocněními, diabetem, osteoporózou, obezitou a mnoha dalšími zdravotními problémy. Přes široké spektrum potenciálně pro zdraví prospěšných vlastností však není role isoflavonoidů v působení na lidské zdraví ještě plně objasněna (Miadoková, 2009).

2.4 Vliv isoflavonoidů na prsní karcinom

Již mnoho studií potvrdilo protektivní efekt sójových isoflavonoidů, konkrétně GENu a DAIDu, proti karcinomu prsu. Obecně se má za to, že vysoká konzumace sóji a jejích produktů během dětství a dospívání pomáhá správnému rozvoji prsní žlázy, a tím přispívá k ochraně proti vzniku karcinomu prsu. Zda je konzumace isoflavonoidů bezpečná pro pacienty s již rozvinutým karcinomem nebo pro ženy s vysokým rizikem pro jeho vznik, však zatím zůstává kontroverzním tématem. Kromě protinádorových účinků disponují isoflavonoidy i vlastnostmi, které mohou růst některých typů nádorů podporovat (Kwon, 2014).

Největší vliv na nádorové buňky projevuje GEN. DAID se v porovnání s GENem vyznačuje mnohem menším biologickým účinkem, k potlačení proliferace buněk karcinomu prsu potřebuje více než dvojnásobnou koncentraci než GEN (Peterson a Barnes, 1991, 1996). DAID může být metabolisován intestinální mikroflórou na účinnější metabolit equol (Kwon, 2014).

FORM je také spojován s určitými protinádorovými schopnostmi, které však většinou projevuje až ve vyšších koncentracích než GEN a DAID (Zhou et al., 2014).

Isoflavonoidy interferují s velkým množstvím regulačních proteinů. Tento fakt by mohl částečně objasňovat, proč některé jejich efekty karcinogenezi podporují a jiné zase antagonizují. Navíc na mnohé fyziologické a patologické faktory schopné zesílit tyto efekty není během některých studií brán dostatečný ohled, čímž je interpretace dat ztížena (Leclercq a Jacquot, 2014).

Isoflavonoidy mohou zvyšovat efektivnost chemoterapie. Mají schopnost na nádorové buňky působit cytotoxicky, přičemž za jejich účinkem stojí rozličné mechanismy. Isoflavonoidy a chemoterapeutika mohou společně ničit rakovinné buňky pomocí stejného nebo odlišného farmakologického mechanismu (Boik, 2001; Miadoková, 2009).

Další variantou pro podpoření chemoterapie prostřednictvím isoflavonoidů je možnost potlačení rezistence nádorových buněk na chemoterapeutika. Isoflavonoidy pravděpodobně působí proti rezistenci buněk na chemoterapeutika nebo zvyšují jejich akumulaci v buňkách (Hanušová et al., 2011).

Isoflavonoidy, jako významné antioxidanty, mají také potenciál zlepšovat efekt chemoterapie nebo redukovat její nežádoucí účinky ochranou zdravých tkání před volnými radikály indukovanými chemoterapií, podpořením imunitního systému, prevencí vzniku mutací, redukcí peroxidace lipidů a redukcí oxidativního stresu (Boik, 2001; Miadoková, 2009).

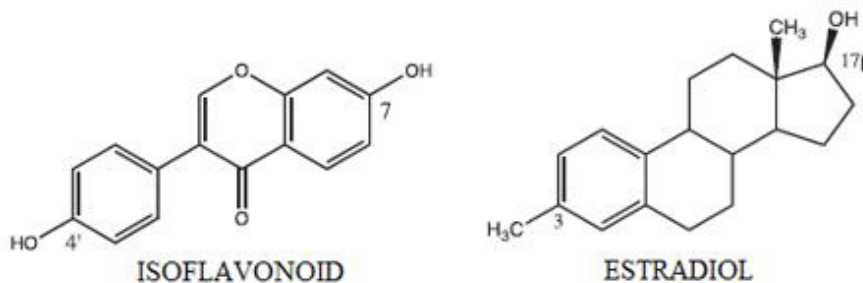
2.5 Vybrané mechanismy působení isoflavonoidů na buňky prsního karcinomu

2.5.1 Interakce isoflavonoidů s estrogenními receptory

Důležitým faktorem pro účinek isoflavonoidů na nádorové buňky prsu je stav estrogenních receptorů (ER) v nádorové tkáni (Kwon, 2014).

ER se chovají jako na ligandech závislé transkripční faktory. Estrogeny nebo estrogenům podobné látky prochází buněčnou membránou a váží se na nukleární estrogenní receptory nacházející se v cytosolu. Po navázání se receptory přemístí do jádra a aktivují transkripci svých cílových genů pomocí specifických DNA-responzivních elementů (Pecorino, 2012). Existují dva podtypy ER: ER α a ER β . ER α podporuje růst nádorových buněk, zatímco ER β tyto účinky antagonizuje.

Fenolické hydroxyly isoflavonoidů více či méně napodobují estradiolové hydroxyly (pozice 3 a 17) a umožňují tak interakci s několika molekulárními strukturami obou podtypů estrogenního receptoru. Strukturální podobnost s fyziologickým estrogenem 17- β estradiolem (E2) tedy isoflavonoidům umožňuje vazbu a aktivaci intracelulárních estrogenních receptorů, ER α i ER β .



Obr. 6. Porovnání struktur estrogenu a isoflavonoidu (Leclercq a Jacquot, 2014).

Jen malý rozdíl ve vazebných místech mezi ER α a ER β je dostatečný, aby udělil ER β topologicky vhodnější vlastnosti k vazbě isoflavonoidů. Zatímco isoflavonoidy se preferenčně váží na β isoformu, E2 interaguje s oběma podtypy receptorů s přibližně stejnou afinitou. S ER vytváří isoflavonoidy slabší vazbu než E2. Z předchozích informací vyplývá, že odpověď na isoflavonoidy by aspoň částečně mohla záviset na poměru ER α /ER β . ER β je dominantní isoformou v normálním prsním epitelu, zatímco ER α dominuje v nádorových buňkách senzitivních na estrogen.

Další experimentální studie však popírají vliv aktivace ER β isoflavonoidy na potlačení proliferace karcinomu prsu. V nízkých koncentracích isoflavonoidy aktivují

transkripci zprostředkovanou ER α a podporují tím proliferaci buněk. Účinky ER α , které podporují proliferaci, tak pravděpodobně převáží nad potenciálně antagonistickými účinky ER β . Při vyšších koncentracích isoflavonoidů (>10 μ M) však mohou převládnout jejich protinádorové vlastnosti, které jsou vyvolány jinými mechanismy. Z toho vyplývá, že účinek isoflavonoidů ve vztahu k rakovinným buňkám se odvíjí také od jejich koncentrace (Leclercq a Jacquot, 2014; Miadoková, 2009).

2.5.2 *Efekt na buněčný cyklus a indukci apoptózy*

Deregulace proliferace je znakem zvýšené citlivosti k neoplazii. Prevence rakoviny je obecně spojována s inhibicí nebo reverzí buněčné hyperproliferace. Isoflavonoidy obsažené v potravě se mohou chovat jako všeobecné buněčné inhibitory. Třebaže jsou většinou isoflavonoidy pro lidi i zvířata netoxické, inhibují proliferaci, zastavují buněčný cyklus nebo indukují apoptózu u mnoha linií nádorových buněk (Miadoková, 2009).

Inhibice růstu nádorových buněk může být způsobena zastavením buněčného cyklu. O buněčném cyklu je známo, že je ve svých různých fázích regulován mnohými cykliny, cyklin-dependentními kinasami (CDKs) a cyklin-dependentními kinasovými inhibitory (CDKIs). Cyklin B₁ hraje významnou roli v pozitivní regulaci aktivity CDK vytvořením komplexu CyklinB₁/CDK v průběhu G2/M fáze progresu buněčného cyklu. Aktivita komplexu cyklin/CDK je negativně regulována několika CDKIs, včetně p21^{WAF1} (Sarkar a Li, 2003).

Apoptóza je vysoce regulovaný proces buněčné smrti. Tento přirozený fyziologický jev je nepostradatelný pro správné fungování organismu. Signál k apoptóze může být odstartován téměř v každé buňce. Hraje klíčovou roli v potlačování vzniku nádoru, protože zbavuje tělo buněk s příliš poškozenou DNA, ze kterých by se mohly stát buňky nádorové (Pecorino, 2012).

2.5.2.1 *Vliv na expresi genů zahrnutých do regulace apoptózy*

Současné studie ukázaly, že GEN vykazuje četné efekty na apoptózu, které způsobuje mechanismy závislými i nezávislými na ER. Přispívá ke zvýšení apoptózy u nádorových buněk několika způsoby. K vysvětlení molekulárního mechanismu, který je zodpovědný za zvýšení apoptózy u rakovinných buněk ovlivňovaných GENem, byly zkoumány změny exprese genů, které ovlivňují apoptotické dráhy. Tumor-supresorové

geny p53 a p21^{WAF1} jsou zahrnuty do regulace apoptózy. Funkční p53 může potlačovat expresi genu Bcl-2 nebo může indukovat p21^{WAF1}. Geny Bax a Bcl-2 hrají hlavní roli v rozhodování, zda buňka podlehne nebo nepodlehne apoptóze. Zvýšení exprese genu Bax indukuje apoptózu, zatímco zvýšení exprese Bcl-2 buňku proti apoptóze chrání. Gen p21^{WAF1} inhibuje aktivitu CDKs, což vede k zastavení buněčného cyklu a apoptóze buňky (Sarkar a Li, 2003).

Li et al. (1999) provedli studii, ve které zkoumali efekt GENU na buněčný růst a expresi genů zahrnutých do regulace apoptózy u nádorových buněk prsu MDA-MB-231. V této studii byla u GENem ovlivněných buněk pozorována zvýšená exprese genů Bax a p21^{WAF1} a snížená exprese genů Bcl-2 a p53. Dále bylo zaznamenáno, že počet buněk, které podlehly apoptóze, se zvyšoval úměrně k délce ovlivnění GENem. Buňky MDA-MB-231 po 48hodinové inkubaci s GENem vykázaly jen mírné snížení exprese Bcl-2, významně však byla zvýšena exprese Bax. Snížení exprese Bcl-2 a zvýšení Bax korespondovalo se zvýšením buněčné apoptózy. Tyto výsledky tedy naznačují, že zvýšení exprese Bax a potlačení exprese Bcl-2 může být jedním z molekulárních mechanismů, pomocí kterého GEN indukuje apoptózu. Ovlivnění buněk GENem o koncentraci 30 μ M po dobu 24 h vyvolalo indukci p21^{WAF1}, avšak ke snížení exprese dysfunkčního genu p53 došlo až po 72h ovlivnění. Tyto výsledky naznačují, že indukce p21^{WAF1} může být zprostředkována p53-independentními cestami. Zvýšení exprese p21^{WAF1} vedlo k zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi. Zvýšená exprese p21^{WAF1} tak může být dalším molekulárním mechanismem, pomocí kterého GEN inhibuje růst rakovinných buněk a indukuje apoptózu.

Z výše uvedených faktů můžeme usuzovat, že je GEN schopen inhibovat růst a indukovat apoptózu rakovinných buněk modulací exprese genů, které jsou zahrnuty do regulace buněčného cyklu. U buněčné linie MDA-MB-231 je schopen zastavit buněčný cyklus ve fázi G2/M (Sarkar a Li, 2003). Inhibice buněčné proliferace, která může být důsledkem indukce apoptózy, zastavení buněčného cyklu nebo inhibicí růstu, je dávkově i časově závislá (Li et al., 1999).

Shao et al. (1998) ve své studii ukázali, že GEN inhibuje proliferaci podobně u ER-pozitivních (MCF7) a ER-negativních buněk (MDA-MB-231) a to částečně zastavením buněčného cyklu v G2/M fázi.

Podobné výsledky u ER-pozitivních buněk MCF7, které obsahují divoký typ alely p53, jako u ER-negativních buněk MDA-MB-231, které mají alely p53 mutované,

ukazují, že efekt GENU na buněčný růst a indukci apoptózy je částečně nezávislý na ER i p53 statutu (Li et al., 1999).

2.5.2.2 *Efekt na regulaci dráhy nukleárního faktoru κ B (NF- κ B)*

Transkripční faktor NF- κ B je klíčovým mediátorem zánětlivé odpovědi. Kromě vlivu na zánět má NF- κ B i další efekty podporující tumorogenezi, jakými jsou inhibice apoptózy, podpora angiogeneze a tvorby metastáz. NF- κ B tedy poskytuje molekulární spojení mezi zánětem a rakovinou. Onkogenní aktivace genu pro NF- κ B byla identifikována u mnoha lidských nádorů, včetně rakoviny prsu.

NF- κ B je souhrnný název pro několik příbuzných transkripčních faktorů. Hlavním dimerem NF- κ B, který je aktivován klasickou dráhou, je p65-p50. Normálně je NF- κ B v cytoplasmě inaktivován vazbou na svůj inhibitor (I κ B). Během buněčné aktivace však I κ B kinasa (IKK) fosforyluje I κ B, čímž je následně způsobena ubikvitin-proteazomová degradace I κ B. Fosforylace I κ B tedy vyvolá uvolnění a translokaci NF- κ B do jádra. Zde NF- κ B může regulovat transkripci cílových genů na svých responzivních elementech. NF- κ B reguluje více než 200 genů, což vysvětluje jeho četné účinky (Klener a Klener, 2013; Pecorino, 2012).

GEN ruší aktivaci NF- κ B látkami, které poškozují DNA, H₂O₂ a TNF- α (tumor-nekrotizující faktor α), u nádorových buněk prostaty LNCaP a PC3. Dále redukuje fosforylaci inhibičního proteinu I κ B a blokuje nukleární translokaci NF- κ B komplexu. Snižuje tedy hladiny p65 a p50 v jádře buněk. Předchází tak navázání NF- κ B na jeho cílová místa na DNA a inhibuje transkripci příslušných cílových genů. Konečným důsledkem je inhibice buněčného růstu a aktivace apoptotických cest (Davis et al., 1999).

Regulace aktivační dráhy NF- κ B je komplexní, proto jsou ještě potřeba další studie k úplnému poznání mechanismu působení GENU na dráhy spjaté s NF- κ B (Sarkar a Li, 2003).

V některých studiích byla zaznamenána inhibice růstu buněk prsního karcinomu, která byla způsobena inhibicí aktivity NF- κ B prostřednictvím signalizační dráhy NOTCH-1. NOTCH je skupinou receptorů s transmembránovou strukturou, které interagují se specifickými NOTCH ligandy. Rozdělují se na NOTCH 1 až 4. Signály z NOTCH receptorů jsou důležité pro embryogenezi; sebeobnovu a dělení kmenových buněk. Mutace v genech kódujících NOTCH signalizační dráhu je častá i u karcinomu

prsu. Farmakologická inhibice této dráhy může být do budoucna významná pro léčbu rakoviny u nádorových kmenových buněk (Klener a Klener, 2013).

Bylo zjištěno, že GEN inhibuje expresi NOTCH-1 a aktivaci NF- κ B u buněčné linie MDA-MB-231 a to v závislosti na dávce. Hladiny cílových proteinů NF- κ B, kterými jsou cyklin B₁, Bcl-2 a Bcl-xL, byly také významně sníženy. GEN tedy pravděpodobně inhibicí dráhy NOTCH-1 inhiboval NF- κ B signální dráhu. (Pan et al., 2012).

2.5.2.3 Efekt na regulaci signální dráhy proteinkinasy B (Akt)

Signální dráha Akt také hraje významnou roli v buněčném růstu a apoptóze. Akt může být aktivována insulinem a různými růstovými faktory. Po navázání příslušného ligandu na receptor dojde k aktivaci fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K). Aktivovaná PI3K reaguje s fosfatidylinositol-3,5-bisfosfátem (PIP₂), který tím transformuje na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃). PIP₃ způsobí fosforylaci proteinu Akt pomocí fosfoinositid dependentní kinasy 1 (PDK1). Akt je posledním článkem dráhy, který podporuje buněčné přežívání inhibicí apoptózy, což je uskutečněno fosforylací a inaktivací několika cílových struktur zahrnutých do drah apoptózy (Sarkar a Li, 2003; Weinberg, 2007). Tato signální dráha je aberantně aktivována u různých druhů nádorů. Inhibice této aberantně aktivované dráhy je zajímavým přístupem k léčbě poměrně širokého spektra nádorových onemocnění (Klener a Klener, 2013).

Některé experimenty naznačují, že GEN způsobuje snížení fosforylace proteinu Akt, čímž je potlačena jeho aktivita, dochází tak k inhibici signálů podporujících přežití buněk a k podpoření apoptózy (Sarkar a Li, 2003). Také se zjistilo, že GEN pravděpodobně skrz Akt signální dráhu vykazuje inhibiční efekt i na NF- κ B signální dráhu (Ozes et al., 1999). Souvislost mezi těmito signálními drahami se zdá být velmi důležitá pro účinek GENU a může být částečně zodpovědná za inhibici růstu a indukci apoptózy u nádorových buněk pomocí GENU (Sarkar a Li, 2003).

2.5.3 Inhibice tyrosinkinového receptoru

Receptory s vnitřní tyrosinkinovou aktivitou (RTK) jsou důležitými strukturami, které přenáší extracelulární signály růstových faktorů. U zdravých buněk tak zajišťují správnou mitogenní signalizaci. Geny kódující RTK však patří mezi známé

onkogeny, jejichž mutace či deregulovaná exprese přispívají ke vzniku mnoha typů nádorů (Klener a Klener, 2013).

Akiyama et al. (1987) ukázali, že GEN může inhibovat specifickou tyrosinkinasovou aktivitu receptoru epidermálního růstového faktoru (HER1) na buněčné kultuře A431 *in vitro*.

K zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi dochází u buněčné linie MDA-MB-231 až v koncentracích $\geq 40 \mu\text{M}$. Je pravděpodobné, že GEN inhibuje jednu nebo více tyrosinkinas, které jsou potřebné pro přechod skrz různé fáze buněčného cyklu, a že specifické přerušení buněčného cyklu GENem závisí na typu buněčné linie (Santell et al., 2000).

2.5.4 Poškození DNA, inhibice topoisomerasy II

DNA-topoisomerasy patří mezi nukleární enzymy, jež jsou velmi důležité pro správný průběh replikace a pro oddělení chromozomů během mitózy (Klener a Klener, 2013). Podrobnější informace o těchto enzymech byly uvedeny již dříve na straně 18.

Markovits et al. (1989) zjistili, že GEN může inhibovat rozdělení chromozomů inhibicí aktivity topoisomerasy II a indukovat poškození DNA tvorbou zlomů na obou řetězcích dvoušroubovice DNA stabilizací DNA štěpícího komplexu topoisomerasy II.

2.5.5 Efekt na antioxidační efekty

Sójové isoflavonoidy jsou známy jako antioxidanty. Bylo zaznamenáno, že oxidativní stres také aktivuje NF- κ B. Proto se uvažuje o možnosti, že inhibiční vliv GENu na karcinogenezi může být z části přičítán i jeho antioxidační aktivitě (Sarkar a Li, 2003). V případě kombinace s Doxem může však tento efekt působit negativně a snížením množství volných radikálů může potlačit účinek cytostatika na nádorové buňky (Hanušová et al., 2011).

2.5.6 Vliv na invazi nádorových buněk a tvorbu metastáz

Invaze nádorových buněk a tvorba metastáz jsou důležitou příčinou úmrtí na rakovinu prsu. Tento proces je asociován se zvýšenou expresí matrixových metaloproteas (MMPs), převážně MMP-2 a MMP-9. Tyto proteasy hrají důležitou roli

v degradaci extracelulární matrix a regulují migraci buněk nádoru prsu. Hladiny tkáňových a cirkulujících MMP-2 a MMP-9 obvykle korelují s progresí rakoviny prsu.

DAID, R- a S-equol mohou inhibovat invazi nádorových buněk a tvorbu metastáz prostřednictvím efektu na MMPs a jejich tkáňové inhibitory. Invazivní schopnost buněk MDA-MB-231 byla významně redukována (na 50 až 60 %) po ovlivnění DAIDem, R- nebo S-equolem o koncentraci 50 μ M. Inhibice invaze indukovaná všemi třemi látkami o koncentraci 50 μ M je spojována se sníženou expresí MMP-2. Efekt DAIDu a enantiomerů na inhibici invaze nádorových buněk prostřednictvím inhibice MMP-2 byl rovnocenný (Magee et al., 2014).

FORM také významně potlačuje migraci a invazi buněk MDA-MB-231. *In vitro* FORM redukuje expresi MMP-2, MMP-9 a zvyšuje expresi inhibitoru matrixové metaloproteasy-1 (TIMP-1) a TIMP-2. Dále bylo zjištěno, že je FORM velmi efektivní v potlačování fosforylace Akt a PI3K. Shrnutí dohromady, FORM inhibuje migraci a invazi buněk redukcí exprese MMP-2 a MMP-9 prostřednictvím inhibice signální dráhy PI3K/Akt (Zhou et al., 2014).

Také GEN inhibuje buněčnou invazi *in vitro* a také *in vivo*. Tato inhibice je způsobena sníženou expresí MMP-9 a zvýšenou expresí TIMP-1 (Shao et al., 2000).

2.5.7 **Epigenetická aktivita jako původ antionkogenních efektů**

Lidská DNA je přítomna v buněčném jádře ve formě 46 chromozomů. Chromozomy jsou tvořeny chromatinem: vlákno DNA (60 %) plus asociovaná RNA (5 %) a proteiny (35 %). Pojem epigenetika popisuje dědičnou informaci, která je zakódována v modifikaci genomu a komponent chromatinu. Tato modifikace zasahuje strukturu a konformaci chromatinu a následkem toho i regulaci transkripce. Epigenetické alterace v genové expresi nezpůsobují změny v nukleotidové sekvenci DNA, nejedná se tedy o mutace (Pecorino, 2012).

Mezi epigenetické úpravy patří methylace DNA, acetylace nebo deacetylace histonů a remodelace chromatinu. Pro správný průběh genové exprese je nutná komplexní interakce mezi promotorem a multiproteinovým transkripčním komplexem, jehož vazba na promotor vede k epigenetické modifikaci přilehlého protein kódujícího úseku DNA. Dojde tak ke změně prostorového uspořádání chromatinu, které je důležité pro průchod transkripčního komplexu rozevřenou vidlicí DNA.

Methylace DNA je uskutečněna navázáním methylové skupiny na pozici C5 cytosinů, které se nacházejí v sousedství guaninů. Tyto úseky tvoří CpG ostrůvky, které

se často vyskytují v oblastech promotorů genů. Methylace je důležitou skutečností pro ovlivnění genové exprese. Hypermethylace tumor-supresorových genů vede ke snížení jejich exprese (silencing), což může vyústit v rozvinutí neoplastické aktivity.

Acetylace histonů způsobuje rozevření struktury chromatinu, a dovoluje tak průchodu transkripčního komplexu rozvolněnou DNA vidlicí. Deacetylace histonů způsobuje uzavření chromatinové struktury, u které pak není průběh transkripce možný. Ve zdravých buňkách jsou tyto procesy vyváženy, avšak u nádorových buněk převažuje deacetylace (Klener a Klener, 2013).

Abnormální epigenetické programy mohou inaktivovat velkou skupinu genů. Epigenetické změny mohou vyvolat další epigenetické změny, které vedou ke značné změně genomu a genomové nestabilitě. Epigenetická inaktivace genů a inaktivace genů mutací spolupracují během karcinogeneze. Mnoho pozornosti bylo zaměřeno na hypermethylyaci zaznamenanou u normálně nemethylovaných CpG ostrůvků genových promotorů. Gene silencing způsobený methylyací může být důležitým mechanismem karcinogeneze, kdy jsou klíčové geny, které se normálně účastní nádorové suprese, vypnuté (Pecorino, 2012).

Fyziologická estrogenní stimulace indukuje epigenetické změny v promotorech cílových genů ERs (tj. acetylace, fosforylace a methylylace), dochází i k modifikaci histonů. Pozměnění této sítě regulované ERs hraje zásadní roli v neoplastických procesech spjatých s receptory.

V tomto kontextu bychom si měli uvědomit, že u GENU a několika dalších isoflavonoidů bylo popsáno, že mění genetickou expresi pomocí epigenetických změn (Leclercq a Jacquot, 2014).

Meeran et al. (2010) ve své studii prokázali, že některé bioaktivní molekuly, včetně GENU mění methylyaci DNA a modifikaci histonů. GEN indukoval tumor-supresorové geny včetně p21^{WAF1} a inhiboval geny podporující nádory jako je lidská telomerasová reverzní transkriptasa.

Buněčné linie MDA-MB-231 a MCF-7 byly ovlivněny GENem *in vitro*. Bylo zjištěno, že GEN (60 nebo 100 μ M, 48 nebo 72 h) snižuje úroveň globální methylyace DNA, aktivitu DNA methyltransferasy (DNMT) a expresi DNMT1. S využitím molekulárních modelů bylo rozpoznáno, že GEN může přímo interagovat s katalytickou doménou DNMT1, tedy kompetitivně inhibovat navázání hemimethylované DNA na katalytickou doménu DNMT1. GEN snížil methylyaci DNA v oblasti promotoru mnohých tumor-supresorových genů, například genu PTEN (phosphatase and tensin

homolog) a zvýšil expresi mRNA těchto genů. Tyto výsledky ukazují, že protinádorový efekt GENU na rakovinu prsu může být částečně výsledkem jeho schopnosti demetylovat a reaktivovat metylací reprimované tumor-supresorové geny pomocí přímé interakce s katalytickou doménou DNMT1 a inhibice exprese DNMT1 (Xie et al., 2014).

Isoflavonoidy GEN (18,5 μM), DAID (78,5 μM) a equol (12,5 μM , metabolit DAIDu) po 48h inkubaci také modifikují transkripci demethylací a acetylací histonů u buněčných linií MDA-MB-231 a MCF-7 (Dagdemir et al., 2013).

Epigenetické jevy mohou modulovat senzitivitu prsních epiteliálních buněk na fyziologické ER modulátory interferencí s vazbou dimerů receptorů na responzivní elementy pro ER, které jsou lokalizovány na promotorech genů. Pozorování, že ER-pozitivní i negativní buňky jsou senzitivní na isoflavonoidy indukovanou epigenetickou protekci, je v souladu s tímto náhledem (Leclercq a Jacquot, 2014).

2.5.8 *Vliv na biotransformační enzymy*

V lidském organismu je Dox metabolisován redukcí karbonylové skupiny na sekundární alkohol Doxol, který je méně cytostaticky aktivní a více kardiotoxický. I nádorové buňky jsou schopné deaktivovat Dox tímto způsobem, čímž se ochraňují proti jeho cytotoxickému účinku (Hanušová et al., 2011).

U prsní nádorové buněčné linie MCF-7 byla při léčbě Doxem zaznamenána významná tvorba Doxolu. Jako hlavní enzym redukující Dox na Doxol byla identifikována cytosolická karbonylreduktasa 1 (CBR1). Z těchto výsledků vyplývá, že metabolická deaktivace Doxu enzymem CBR1 může v průběhu léčby zvyšovat přežívání nádorových buněk. Inhibice CBR1 se jeví jako nadějná strategie pro zvýšení cytostatického účinku Doxu (Gavelová et al., 2008).

Mezi flavonoidy bylo nalezeno několik inhibitorů CBR1, např. quercetin. Hodnota IC_{50} u quercetinu byla naměřena přibližně 16 μM (Václavíková, 2008). Isoflavonoidy se od flavonoidů strukturně liší v poměrně malé míře, dá se tedy předpokládat, že isoflavonoidy mohou mít podobný efekt.

Nízká biodostupnost, vysoké IC_{50} nebo systémová toxicita však limitují využití flavonoidů a isoflavonoidů *in vivo*. Navíc jejich antioxidační vlastnosti snižují cytotoxický efekt Doxu (Hanušová et al., 2011).

2.5.9 *Vliv na lékovou rezistenci*

Aktivní eflux cytotoxických sloučenin zprostředkovaný ABC (ATP-binding cassette) transportéry představuje efektivní ochranu buněk proti potenciálně škodlivým chemickým působkům. Zvýšená exprese ABC transportérů je shledávána jako hlavní mechanismus rozvoje mnohočetné lékové rezistence (MDR). Dox přitom patří mezi cytostatika, které vyvolávají rozvoj MDR velmi často. Dox je vhodným substrátem pro několik členů ABC transportérové skupiny, např. pro P-glykoprotein, MRP1 a MRP2. Inhibitory těchto transportérů tak mohou zvýšit akumulaci a efektivnost Doxu na nádorové buňky (Hanušová et al., 2011).

Flavonoid naringenin o koncentraci 100 μM posílil protinádorový efekt Doxu u MCF-7 buněk selektivní inhibicí MRP1 transportéru, čímž byl snížen eflux Doxu a zvýšena jeho akumulace. Naringenin posiloval akumulaci Doxu u buněk exprimujících MRP transportéry, ne však u buněk exprimujících P-glykoprotein (Zhang et al., 2009).

GEN inhiboval eflux daunorubicinu u buněk, které se vyznačovaly mnohočetnou lékovou rezistencí. Působil tak ale jen u těch buněk, kde nebyla MDR zprostředkována P-glykoproteinem. Tato schopnost GENU byla prokázána u koncentrace 200 μM (Versantvoort et al., 1993).

3 CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce bylo:

- 1) Sepsání literární rešerše, ve které bude zpracována tematika vlivu vybraných isoflavonoidů na nádorové buňky a z toho vyplývajících možných mechanismů modifikace účinnosti protinádorové léčby se zaměřením hlavně na terapii Doxem u buněčné linie MDA-MB-231.
- 2) Optimalizace metody hodnotící vliv isoflavonoidů (GENu, DAIDu a FORMu), Doxu a jejich kombinací na buněčnou linii MDA-MB-231.
- 3) Stanovení vlivu vybraných isoflavonoidů na účinnost protinádorové léčby Doxem u buněčné linie MDA-MB-231.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

Buněčná linie MDA-MB-231 – ATCC (Wessen, SRN)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) D6429 – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Doxorubicin – Pharmacia (Upjohn, Itálie)

Zásobní roztoky isoflavonoidů (GEN, DAID, FORM) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Trypsin-EDTA (trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid) – Lonza (Praha, ČR)

HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) pufr – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

FBS (fetal bovine serum) – Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Gentamicin sulfát – Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Roztok neutrální červeně v mediu (3,3 g/l) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.2 Přístroje a pomůcky

Přístroje:

CO₂ inkubátor – HeraCell

Laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C.

Mikroskop – Nikon Eclipse TS 100

Spektrometrický a spektrofluorimetrický analyzátor – Tecan Infinite M 200

Vodní lázeň – Memmert

Termomixer – IKA MS2 Minishaker

Centrifuga – Eppendorf 5810R

Analytické váhy – Scaltec SBC 22

Ultrazvukový homogenizátor – Sonopuls Bandelin HD 2070

Stolní centrifuga – Heraeus Biofuge Stratos

Pomůcky:

Sterilní kultivační lahve, sterilní pipety, elektrický pipetník, automatické i mechanické pipety (jednokanálové i vícekanálové), sterilní pipetovací špičky, mikrodestičky (formát 96), zkumavky, vaničky, kádinky, odměrné válce, stojan na zkumavky, kahan, Bürkerova komůrka, podložní sklíčka, krycí sklíčka, váženka, kopistka, rukavice.

4.3 Kultivace buněčné kultury MDA-MB-231

4.3.1 Kultivační medium

Základem kultivačního media je DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). DMEM je modifikací media BME (Basal Medium Eagle), přičemž DMEM obsahuje čtyřnásobné hladiny aminokyselin a vitamínů. Existuje mnoho druhů DMEM, které se liší obsahem aminokyselin, vitamínů, glukosy a dalších látek.

Konkrétně jsme využili DMEM D6429 s vysokým obsahem glukosy (4500 mg/l glukosy), které bylo obohaceno o pyruvát sodný, hydrogenuhličitan sodný, L-glutamin a další komponenty.

Z media o objemu 500 ml jsme odebrali 50 ml. Přidali jsme 50 ml 10% inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS).

FBS obsahuje velké množství biologicky aktivních látek nezbytných pro růst a vývoj buněčné kultury, například růstové faktory, inhibitory proteas, stopové prvky, vitamíny atd. Pro vysoký obsah růstových faktorů se využívá převážně fetální sérum, protože koncentrace a vlastnosti růstových faktorů se mění se stářím jedince. U tepelně inaktivovaných sér se snižuje riziko přenosu infekce (Vejražka, 2014).

Dále jsme přidali 5 ml HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) pufru. Organický pufr HEPES zajišťuje v mediu pH blízké fyziologickému 7,4.

Nakonec jsme do media napipetovali 0,5 ml širokospektrého antibiotika gentamicinu o koncentraci 50 µg/ml, které zabraňuje bakteriální kontaminaci kultury.

Následně jsme medium s přidanými látkami důkladně promíchali. Hotové medium jsme skladovali v temnu při 4 °C.

Tab. 1 Složení kultivačního média pro MDA-MB-231.

DMEM	450 ml
FBS inaktivované (10%)	50 ml
gentamicin	500 µl
HEPES	5 ml

4.3.2 Buněčná linie MDA-MB-231

Jedná se o buněčnou linii prsního karcinomu, která byla odvozena z metastáz pleurálního výpotku 51leté ženy. Patří mezi adherentní typy buněk. Exprimuje receptory pro epidermální růstový faktor HER1 a transformující růstový faktor α (ATTC, 2014). Více informací o buněčné linii naleznete na straně 16.

4.3.3 *Rozmražování buněk MDA-MB-231*

Nezahřáté kultivační medium jsme napipetovali do 15 ml zkumavky. Zamrazovací zkumavku s buňkami jsme zahřivali přibližně 1 až 2 minuty ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Víčko jsme potom odezinfikovali. Rozmraženou suspenzi jsme přemístili do předem připravené 15 ml zkumavky obsahující kultivační médium a homogenizovali jsme pomocí pipety. Suspenzi jsme centrifugovali 5 minut při 70 g a při laboratorní teplotě. Pipetou jsme odsáli supernatant a sediment resuspendovali v 15 ml čerstvého kultivačního media. 15 ml suspenze jsme přemístili do T-75 kultivační lahve a uložili do inkubátoru, kde jsou nastaveny vhodné podmínky pro uchování buněk (37 °C, 5 % CO₂).

4.3.4 *Pasážování buněk MDA-MB-231*

Pasáž provádíme:

- *Abychom buňky přesadili do nových lahví.* Buněčná proliferace probíhá přibližně exponenciálně až do doby, než se růst buněk začne důsledkem kontaktní inhibice zpomalovat (fáze plató). U některých nádorových buněk ke kontaktní inhibici nedochází a rostou i po dosažení stavu konfluence. Začnou se ale vytvářet shluky buněk. Buňky ve středu těchto shluků odumírají, protože se k nim nedostane dostatečné množství živin. Následně se také zpomalí jejich dělení. Pro optimální kultivaci se tedy doporučuje udržovat buňky ve fázi exponenciálního růstu. Těsně před dosažením fáze plató je vhodné kulturu přesadit do nových lahví s čerstvým médiem (Vejražka, 2014). Naředěné buňky tak získají dostatek prostoru a živin pro další proliferaci. Pasáž jsme prováděli dvakrát týdně.
- *Abychom získali buňky pro další pokus.*

Provedení:

Po vyndání z inkubátoru jsme z kultivační lahve do odpadní kádinky vylili kultivační medium. Provedli jsme to opatrně, abychom spolu s médiem neodstranili také buňky přichycené na stěnách nádoby. Buňky jsme 2 krát propláchli 7 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) pufru, abychom je zbavili vápníku, hořčíku a zbylého media. Vápenaté a hořečnaté ionty jsou obsaženy v mnoha adhezních molekulách (Vejražka, 2014). Jejich odstranění usnadní odloučení buněk od stěn kultivační nádoby.

Navíc zbylé medium obsahuje antiproteasy, které by mohly inaktivovat následně přidávaný trypsin-EDTA.

Přidali jsme k nim 2 ml 0,25% trypsin-EDTA. Kýchavým pohybem rozprostřeli po celém dně nádoby a nechali přibližně půl minuty působit. Odpipetovali jsme 2/3 Trypsin-EDTA a vložili láhev asi na 3 minuty do inkubátoru (37 °C; 5 % CO₂). Láhev jsme vyndali z inkubátoru a prohlédli buňky pod mikroskopem. Pokud měly kulovitý tvar, sklepli jsme je ze dna rychlým trhnutím lahvi. Sklepnutím se zamezí vzniku shluků.

Díky protease trypsinu došlo k rozrušení bílkovinných adhezních molekul a uvolnění buněk od povrchu kultivační nádoby (Vejražka, 2014).

Přidali jsme 4 ml media, které jsme do lahve vypouštěli z pipety tak, abychom spláchli buňky ulpělé na dně nádoby. Díky přítomnosti antiproteas v inaktivovaném FBS došlo k inaktivaci trypsinu, který by jinak dále trávil bílkovinné struktury a buňky tak poškozoval.

Pomocí pipety jsme zhomogenizovali buněčnou suspenzi opakovaným natažením suspenze do pipety a následným vypuštěním zpět do lahve. Buňky jsme nasadili do lahve T-75, do které jsme přidali ještě 13 ml kultivačního media.

4.3.5 *Rutiní kultivace*

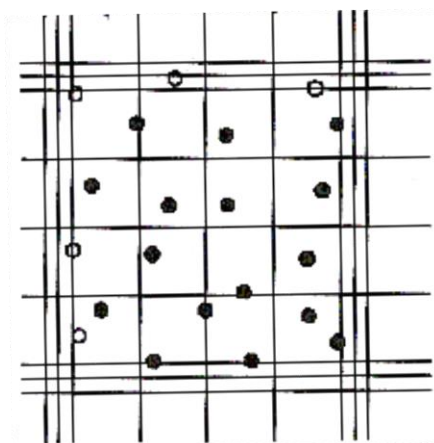
Při rutiní kultivaci jsme vylili medium z kultivační lahve a opatrně do ní napipetovali 13 ml čerstvého media. Láhev jsme uzavřeli a vrátili zpět do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).

4.4 **Vliv isoflavonoidů na účinek doxorubicinu u buněk MDA-MB-231**

V experimentu jsme testovali vliv vybraných isoflavonoidů (GENu, DAIDu a FORMu) na účinek cytostatické léčby Doxem u buněčné linie MDA-MB-231. Buňky jsme naředili mediem na koncentraci 5 tisíc buněk na 100 µl a nasadili do destičky s 96 jamkami. Nechali je inkubovat 24 h a následně ovlivnili roztoky Doxu s isoflavonoidů. Abychom zjistili, jak isoflavonoidy ovlivňují účinek Doxu na buněčnou linii MDA-MB-231, testovali jsme jejich různé koncentrace. Využili jsme Dox o koncentracích 0,01; 0,05; 0,5 a 1,0 µM; isoflavonoidy o koncentracích 1 a 10 µM. Buňky jsme ovlivnili uvedenými látkami jednak samostatně, jednak jejich vzájemnými kombinacemi. Kombinace byla vždy tvořena příslušně koncentrovaným

Doxem a isoflavonoidem. Vytvořili jsme tři typy kontrol, kontrolu 100% viability s odpovídajícím množstvím DMSO, kontrolu 0% viability (10% DMSO) a kontrolu tvořenou pouze buňkami a médiem. Po přidání Doxu a isoflavonoidů jsme opět nechali buňky inkubovat 24, 48 nebo 72 h. Experiment jsme vyhodnotili metodikou testu cytotoxicity s využitím neutrální červeně.

4.4.1 Nasazování buněk



Obr. 7. Bürkerova komůrka.

Množství živých buněk v suspenzi jsme zjišťovali pomocí Bürkerovy komůrky.

Barvivo trypanová modř prochází difúzí přes cytoplasmatickou membránu a dostává se tak do intracelulárního prostoru. Živé buňky ho ale brzy ze svého vnitřního prostředí vyloučí zpět do okolí, zatímco uvnitř mrtvých barvivo v intracelulárním prostoru zůstane. Pomocí této metody můžeme ve vzorku snadno rozlišit buňky živé od těch uhynulých (Vejražka, 2014).

Buněčnou suspenzi (BS) získanou pasáží jsme pečlivě promíchali a odebrali 20 μ l do zkušavky. K odebranému množství jsme přidali roztok trypanové modři v poměru 1:1 a vzniklou směs jsme homogenizovali. Naplnili jsme polovinu Bürkerovy komůrky 10 μ l směsí. Vložili komůrku pod mikroskop a nastavili příslušné rozlišení. Komůrka se skládá z devíti čtverců ohraničenými trojitými čarami. Takovéto velké čtverce obsahují 16 malých čtverců. Spočítali jsme buňky nacházející se na ploše těchto velkých čtverců. Při počítání buněk na okraji jsme uvažovali pouze dvě strany čtverce, např. takové buňky, které se z vnější nebo vnitřní strany dotýkají pravého nebo spodního okraje. Buňky ležící nebo dotýkající se protilehlých okrajů (levý a horní) jsme nezapočítali. Z napočítaného množství buněk jsme určili průměrný počet buněk na jeden velký čtverec a tuto hodnotu jsme použili do následujícího výpočtu.

Z průměrného množství buněk v jednom velkém čtverci jsme vypočítali koncentraci buněk v 1 ml neředěné BS.

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

c počet buněk v 1 ml neředěné BS

x průměrný počet buněk ležících v jednom čtverci ohraničeném trojitou čarou

10^4 přepočítání množství buněk na 1 ml

2 ředění

Např. jsme zjistili, že průměrné množství buněk na jeden čtverec je 30 buněk:

$$c = 30 \cdot 10^4 \cdot 2 = 6 \cdot 10^5 \text{ buněk/1 ml}$$

Následně jsme počet buněk v 1 ml přepočítali na počet buněk ve 100 μ l neředěné BS (objem pipetovaný do jedné jamky).

$$d = c / 10$$

d počet buněk ve 100 μ l BS

V našem případě:

$$d = \frac{6 \cdot 10^5}{10} = 6 \cdot 10^4$$

BS o známé koncentraci jsme naředili na příslušnou hodnotu 5 tis. buněk na 100 μ l kultivačního media, kterou jsme zjistili optimalizačními pokusy u příslušné buněčné linie.

$$5 \cdot 10^3 m = d \cdot n$$

m celkové množství buněčné suspenze o koncentraci 5 tis. buněk na 100 μ l kultivačního media, které potřebujeme pro provedení pokusu

n množství neředěné BS, které bude následně ředěno mediem na příslušnou koncentraci 5 tis. buněk na 100 μ l

Např. potřebuji získat 48 ml BS o koncentraci 5 tis. buněk na 100 μ l:

$$5 \cdot 10^3 \cdot 48 = 6 \cdot 10^4 \cdot n$$

$$\underline{4 \text{ ml} = n}$$

Odeberu 4 ml neředěné BS a přidám je do 44 ml media.

Do jednotlivých jamek jsme umístili po 100 μ l BS. Buňky jsme nechali kultivovat v inkubátoru 24 h. Ideálně by měly po uplynutí této doby dosáhnout 50% konfluence.

4.4.2 *Expozice buněk*

Po uplynutí 24 h jsme postupně přidali k buněčné suspenzi 100 μ l media s expoziční látkou o známé koncentraci. Ve zkumavkách jsme naředili DMSO, roztoky Doxu a isoflavonoidů na potřebné koncentrace. Zkumavky s napipetovanými substancemi jsme promíchali na centrifuze, abychom dosáhli dostatečné homogenity vzorku.

Následovala 24, 48 nebo 72h expozice v inkubátoru.

4.4.2.1 *Doxorubicin jako expoziční látka*

Využili jsme vodný roztok Doxu o koncentraci 2 mg/ml, ze kterého jsme vytvořili roztoky o molárních koncentracích 2 mM a 200 μ M, ty jsme dále ředili mediem za účelem získání potřebných koncentrací roztoku Doxu. V případě, kdy byl Dox zkoumán v kombinaci s isoflavonoidy, jsme do každé jamky napipetovali 50 μ l mediem naředěného vodného roztoku Doxu. Když byl však zkoumán vliv samotného Doxu, tak jsme do každé jamky napipetovali 100 μ l mediem naředěného vodného roztoku Doxu.

4.4.2.2 *Isoflavonoidy jako expoziční látka*

Využili jsme tři druhy isoflavonoidů rozpuštěných v 100% DMSO: GEN, DAID a FORM. Ty jsme naředili tak, abychom v příslušných jamkách dosáhli koncentrace isoflavonoidů 1 μ M a 10 μ M. Pro každou jamku ovlivněnou isoflavonoidy jsme určili, že bude obsahovat takové množství DMSO a s tím spojené množství isoflavonoidu, aby koncentrace DMSO v jamce byla 0,1%. V případě, kdy jsme testovali vliv isoflavonoidu v kombinaci s Doxem, tak jsme do každé jamky napipetovali 50 μ l mediem naředěného roztoku isoflavonoidu. Když jsme ale testovali vliv samotného isoflavonoidu, tak jsme do každé jamky napipetovali 100 μ l mediem naředěného roztoku isoflavonoidu.

4.4.2.3 *Kontroly*

- *Kontrola 100% viability*

Vyjadřuje míru ovlivnění množství a vlastností živých buněk, které byly inkubovány v přítomnosti 0,1% DMSO. Uvnitř každé jamky obsahující isoflavonoid byla koncentrace DMSO právě 0,1%, a proto je nutné přesně definovat vliv takto koncentrovaného DMSO na buňky. Vůči hodnotám absorbance této kontroly jsme porovnávali absorbance buněk ovlivněných příslušně nařazenými roztoky isoflavonoidů.

- *Kontrola 0% viability*

10% roztok DMSO způsobil uhynutí veškerých buněk. Hodnoty absorbancí u těchto jamek vyjadřují schopnost absorbance mrtvých těl a fragmentů buněk, stěn jamek a dalších rušivých faktorů. Předpokládá se, že hodnoty absorbance rušivých faktorů budou ve všech jamkách srovnatelné, proto jsme je odečetli od všech absorbancí naměřených v ostatních jamkách.

- *Kontrola tvořená buňkami suspendovanými v mediu neovlivněnými DMSO ani žádnými expozičními látkami.*

Do jamky se 100 μ l buněčné suspenze jsme přidali 100 μ l prostého media. Tato kontrola vyjadřuje stav růstu a dalších vlastností buněk kultivovaných pouze v přítomnosti media (neovlivněných 0,1% DMSO). Vůči této kontrole jsme porovnávali buňky v jamkách ovlivněných pouze Doxem. Ten totiž není rozpuštěn v DMSO, ale pouze ve vodě.

4.4.3 *Testování cytotoxicity*

4.4.3.1 *Metodika testu cytotoxicity s využitím neutrální červeně*

Test cytotoxicity neutrální červení poskytuje kvantitativní odhad počtu živých buněk, jinými slovy se jedná o test životnosti buněk. Je to jedna z nejpoužívanějších metod, která je založena na schopnosti živých buněk inkorporovat a vázat supravitální barvivo neutrální červeně v lysosomech. Toto slabě kationické barvivo prostupuje membránou buněk neiontovou pasivní difusí a koncentruje se v lysosomech, kde se váže pomocí elektrostatických hydrofobních vazeb na anionické a/nebo fosfátové skupiny lysosomálního matrix. Lysosomy udržují pH nižší, než je pH okolní plazmy.

Udržování protonového gradientu je energeticky náročné, závislé na schopnosti buňky produkovat ATP. Při fyziologickém pH má molekula téměř nulový náboj. To jí umožňuje, aby prošla buněčnými membránami. Uvnitř lysosomů, kde je pH nižší, molekula barviva získává náboj a tím je udržována uvnitř lysosomu. Ztráta gradientu pH při buněčném poškození nebo buněčné smrti způsobí, že barvivo přestane být udržováno uvnitř lysosomů a neutrální červeně se uvolní do okolí. Z toho vyplývá, že množství zadržovaného barviva je proporcionální k množství živých buněk. Čím více živých buněk, tím větší množství barviva se uvolní po jejich zlyzování a tím větší je naměřena absorbance (Tecan, 540 nm). Naopak při vysokém množství mrtvých buněk dojde k vymytí barviva při promývání a absorbance se naměří nižší (Repetto et al., 2008).

4.4.3.2 *Provedení*

Po 24, 48 nebo 72h inkubaci buněk s expozičními látkami v inkubátoru, po níž by konfluence buněk měla dosáhnout hodnot blízkých 100%, jsme růst buněk zkontrolovali pod mikroskopem. Posoudili jsme tak orientačně morfologické změny buněk způsobené inkubací s cytotoxickými látkami. Odsáli jsme z jamek veškerý obsah kromě buněk (před odsátím byl objem v jamce 200 μ l).

Následně jsme přidali 200 μ l roztoku neutrální červeně rozpuštěné v mediu o koncentraci 40 μ g/ml. Nechali jsme inkubovat dvě hodiny v inkubátoru.

Po uplynutí dvou hodin jsme odsáli pipetou veškeré medium s rozpuštěnou neutrální červení a přidali jsme 100 μ l fixačního roztoku (1% CaCl_2 v 0,5% formaldehydu). Nechali jsme stát na stole 15 minut. Po uplynutí uvedené doby jsme vyklepli fixační roztok rychlým pohybem z destiček. Buňky zůstaly zafixované na dně jamky.

Přidali jsme 200 μ l lyzačního roztoku a nechali třepat 30 minut v termomixeru (550 rpm, 25 $^{\circ}$ C).

Měření jsme provedli spektrofotometricky na Tecanu při 540 nm, zjišťovali jsme tak absorbanci.

4.4.3.3 Vyhodnocení

Od hodnoty absorbance příslušné jamky jsme odečetli hodnotu absorbance blanku. Blankem nazýváme kontrolu 0% viability. Hodnoty po odečtení blanku jsme vyjádřili jako procenta:

- *kontroly 100% viability* – u všech jamek, do kterých byl pipetován roztok isoflavonoidu
- *kontroly tvořené 100 μ l buněčné suspenze a 100 μ l čistého media* – u jamek, kam byl pipetován pouze roztok Doxu

Pro úplnost je ještě uvedena příprava použitých roztoků:

4.4.3.4 Příprava fixačního roztoku

Přibližně v 500 ml sterilní vody jsme nechali rozpustit 10 g chloridu vápenatého, přidali jsme 14 ml formaldehydu a v odměrné baňce jsme doplnili vodou po rysku na 1000 ml.

4.4.3.5 Příprava lyzačního roztoku

Nejdříve jsme přilili k 480 ml vody 520 ml ethanolu a pořádně promíchali, díky tomu nám vznikl 50% ethanol. Potom jsme odebrali 10 ml 50% ethanolu a přidali 10 ml kyseliny octové.

4.4.4 **Statistická analýza**

Statistická významnost výsledků měření byla hodnocena metodou one-way ANOVA a Tukeyovou metodou mnohonásobného porovnání s využitím programu GraphPad Prism verze 5.03.

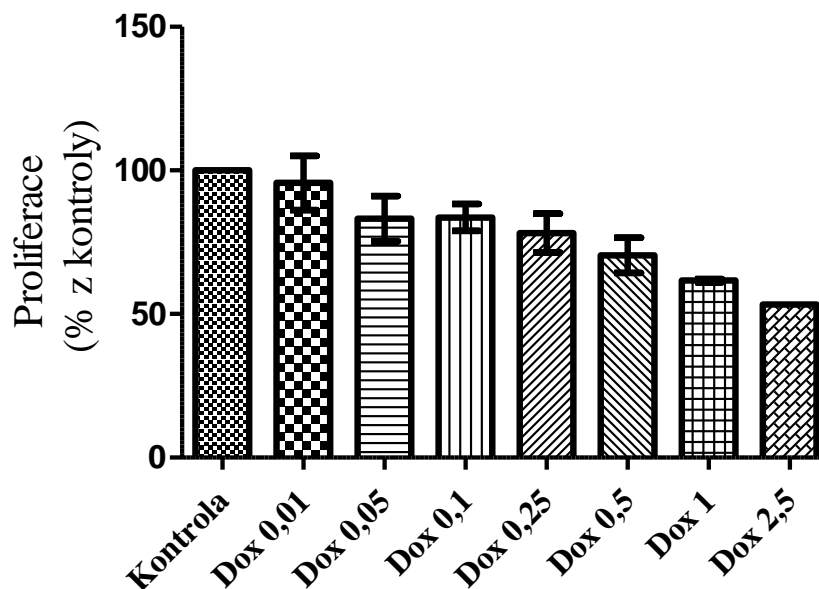
5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace metodiky

5.1.1 Stanovení vhodných koncentrací doxorubicinu

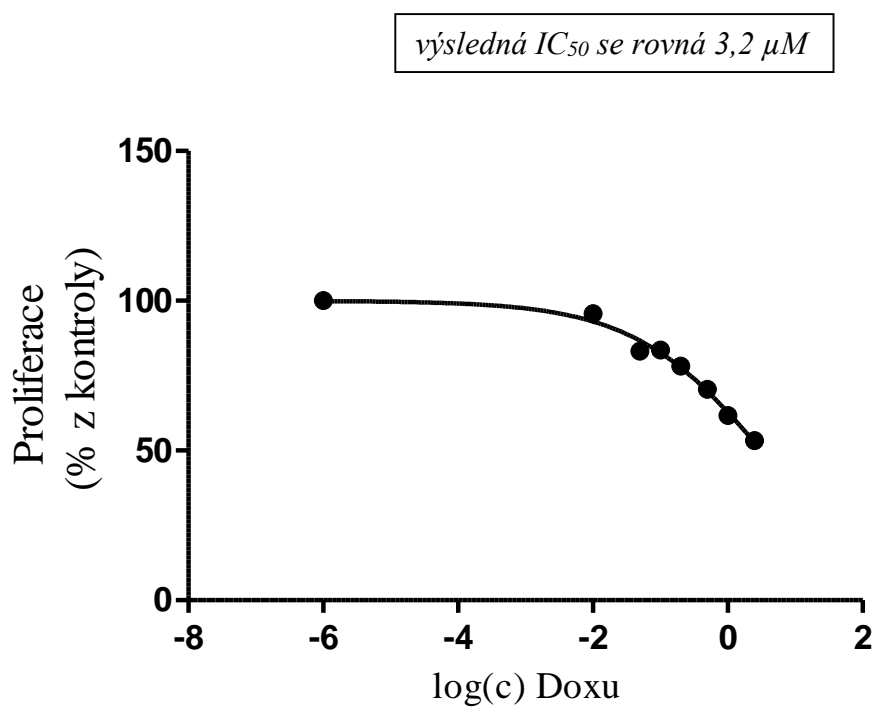
Vytvořili jsme koncentrační řadu Doxu v rozsahu 0,01 až 2,5 μM . Tu jsme proměřili v intervalech 24, 48 a 72 h. Pro všechny tři časové intervaly jsme stanovili střední inhibiční koncentraci Doxu. Ze získaných výsledků jsme vybrali čtyři koncentrace, které jsme se rozhodli otestovat pro kombinační léčbu. Rozhodli jsme se pro dvě nízké koncentrace (0,01 a 0,05 μM), při kterých došlo jen k mírnému poklesu proliferace a pro dvě koncentrace vyšší (0,5 a 1,0 μM), při kterých proliferace poklesla významně. Vyšší rozpětí hodnot jsme vybrali, abychom zachytili potenciálně různou účinnost kombinací Dox + isoflavonoid v závislosti na koncentraci Doxu. Isoflavonoidy totiž disponují širokou paletou potenciální protinádorových účinků, které se za různých podmínek mohou projevovat odlišně.

Graf 1. Koncentrační řada Doxu po 24h ovlivnění



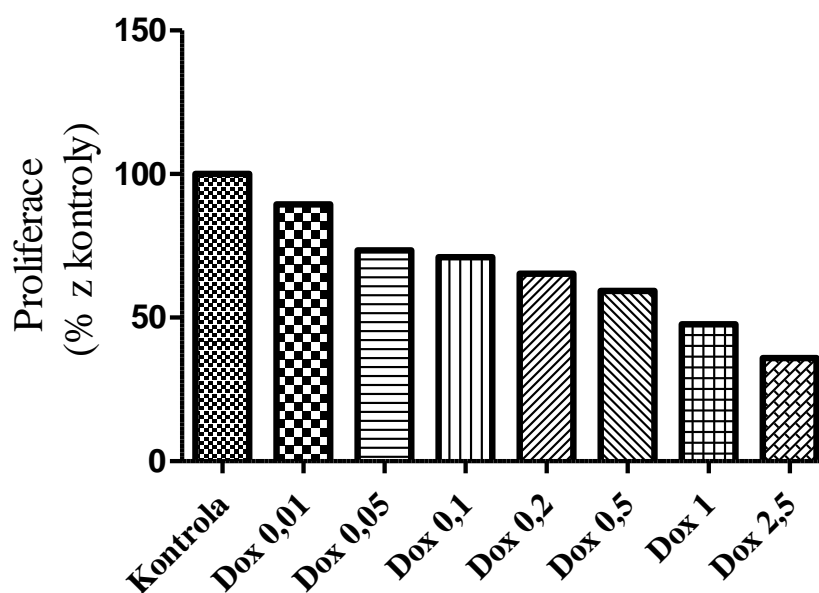
Dox – doxorubicin příslušné koncentrace v μM ; Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 2. Stanovení střední inhibiční koncentrace Doxu po 24h ovlivnění



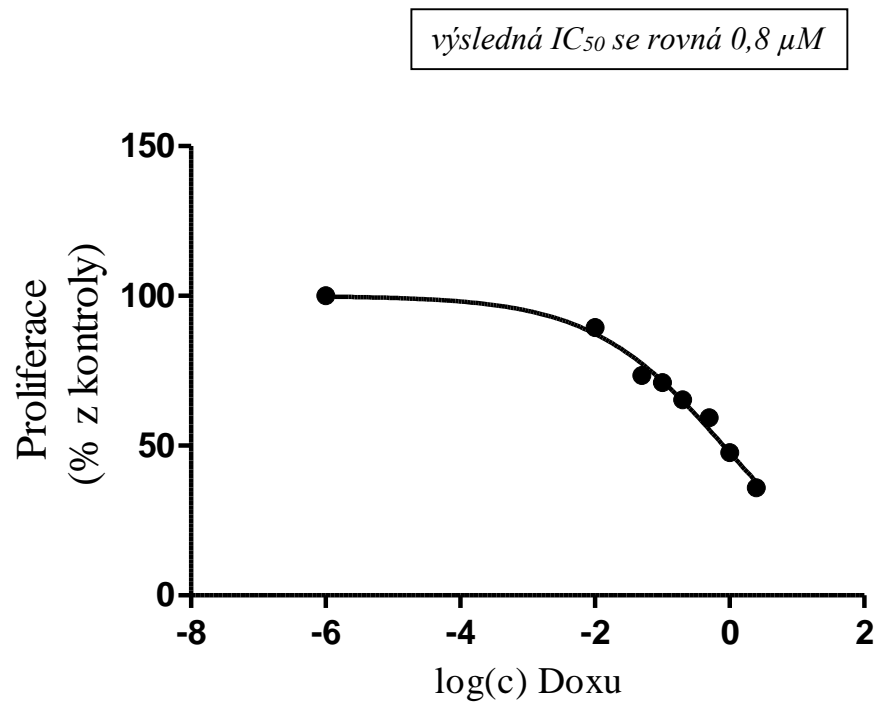
Dox – doxorubicin; c – koncentrace v μM

Graf 3. Koncentrační řada Doxu po 48h ovlivnění



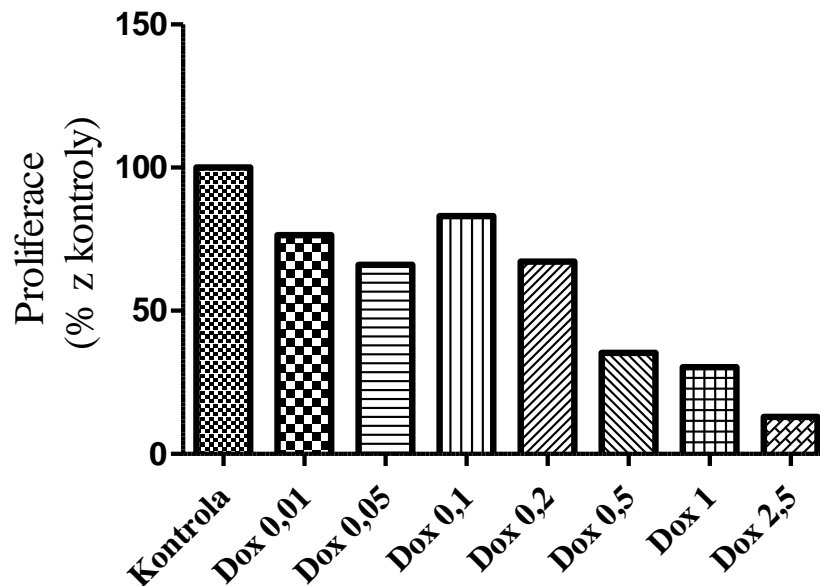
Dox – doxorubicin příslušné koncentrace v μM ; Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 4. Stanovení střední inhibiční koncentrace Doxu po 48h ovlivnění



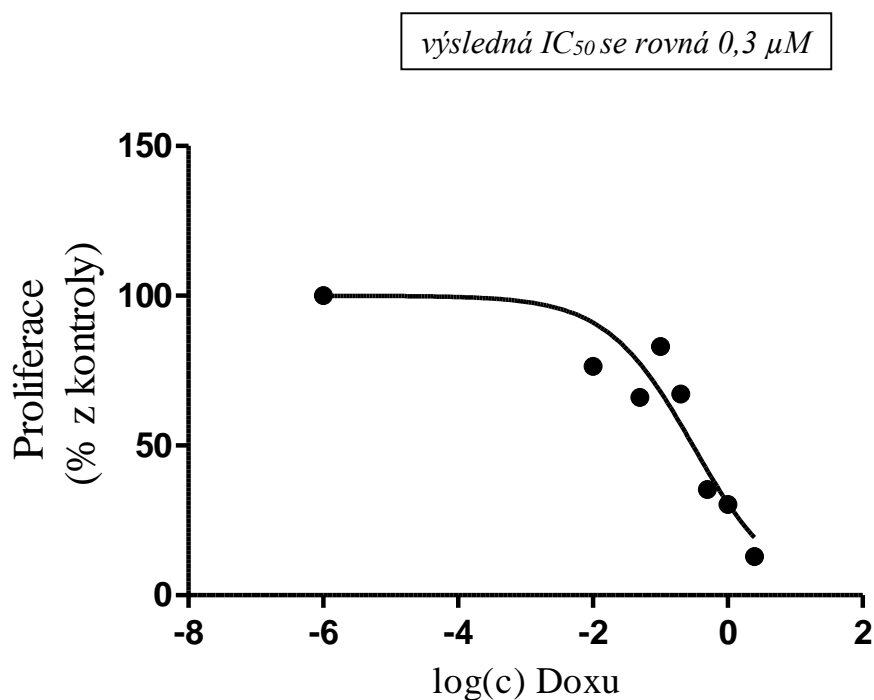
Dox – doxorubicin; c – koncentrace v μM

Graf 5. Koncentrační řada Doxu po 72h ovlivnění



Dox – doxorubicin příslušné koncentrace v μM ; Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 6. Stanovení střední inhibiční koncentrace Doxu po 72h ovlivnění



Dox – doxorubicin; c – koncentrace v μM

5.1.2 Stanovení vhodných koncentrací isoflavonoidů.

Pro isoflavonoidy jsme stanovili poměrně nízké koncentrace, 1 a 10 μM . Učinili jsme tak s ohledem na koncentraci isoflavonoidů, které se dá dosáhnout přijímáním stravy bohaté na isoflavonoidy. Otázka jejich biodostupnosti byla rozebrána v kapitole, která začíná na straně 22.

5.1.3 Optimalizace testu cytotoxicity

K experimentu jsme použili test cytotoxicity s využitím neutrální červeně. Ze začátku se nám červeně v mediu srazila, což působilo negativně na přesnost experimentu. Zjistili jsme, že srážení červeně závisí na pH a dochází k němu po jejím přidání do nesuplementovaného media. Suplementací je do media mimo jiné dodáván i pufr HEPES, který stabilizuje pH ve vhodném rozmezí. Problém jsme tedy vyřešili záměnou media nesuplementovaného za medium suplementované, poté už ke srážení nedošlo.

5.2 Vliv doxorubicinu

Účinek samotného Doxu podle očekávání projevil dávkovou i časovou závislost. Po 24 a 48h ovlivnění buněčné kultury došlo k signifikantnímu snížení proliferace vůči

kontrole až u koncentrace Doxu 0,5 μM , přičemž snížení proliferace bylo výraznější po 48h expozici. Po 72h expozici Doxu se buněčná proliferace snížila již při koncentraci 0,01 μM .

5.3 Vliv genisteinu

Vliv koncentrace GENU na buněčnou linii MDA-MB-231 se ukázal jako problematický. Neprokázala se koncentrační ani časová závislost účinku GENU na buněčnou proliferaci. GEN1 (GEN o koncentraci 1 μM) nezpůsobil v porovnání s kontrolou signifikantní změnu proliferace v žádném experimentu a to nezávisle na délce expozice (24, 48 a 72 h). U GENU10 (GEN o koncentraci 10 μM) jsme signifikantní snížení proliferace prokázali, ale jen v některých případech. Signifikantní snížení proliferace vlivem GENU10 nebylo zaznamenáno po 24h ovlivnění, po 48h ovlivnění bylo zaznamenáno jen částečně, přičemž po 72h ovlivnění opět nebylo zaznamenáno vůbec.

5.4 Vliv daidzeinu

Samotným DAIDem1 (DAID o koncentraci 1 μM) ani DAIDem10 nebyla ovlivněna buněčná proliferace a to u žádného z časových intervalů. Ukázalo se tedy, že v takto nízkých koncentracích DAID neovlivňuje proliferaci nádorových buněk MDA-MB-231.

5.5 Vliv formononetinu

Samotným FORMem1 (FORM o koncentraci 1 μM) ani FORMem10 nebyla ovlivněna buněčná proliferace a to u žádného z časových intervalů. Stejně jako u DAIDu se prokázalo, že FORM v rozsahu takovýchto koncentrací neovlivňuje buněčnou proliferaci MDA-MB-231.

5.6 Vliv kombinace doxorubicinu s isoflavonoidem

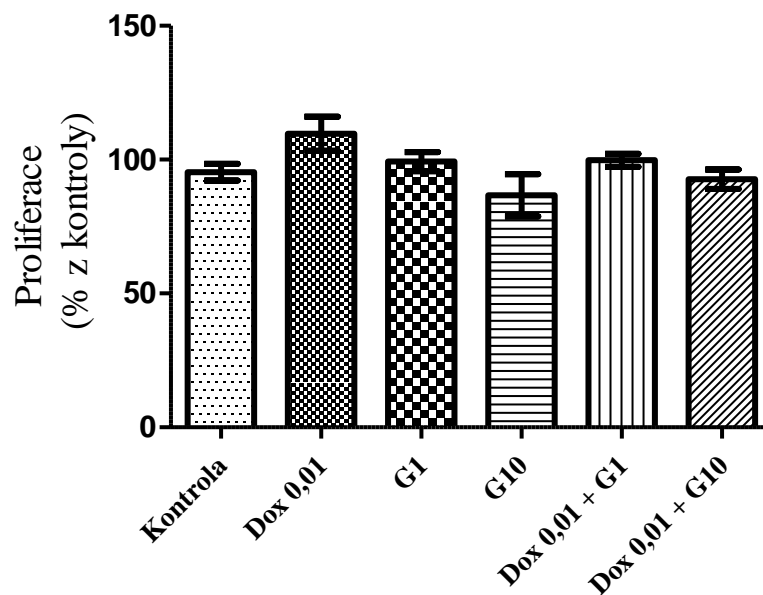
U žádné z kombinací Doxu s isoflavonoidem nedošlo v porovnání se samotným Doxem příslušné koncentrace k podpoře antiproliferativního efektu. Předpoklad, že by isoflavonoidy v takovýchto koncentracích podporovaly účinky cytostatické léčby, se neprokázal.

U kombinací Dox 0,05 + FORM1 (48 h) a Dox 0,05 + FORM1 (72 h) dokonce došlo ke snížení účinku cytostatika. FORM v těchto případech spíše ukázal cytoprotektivní vlastnosti.

5.7 Grafická část

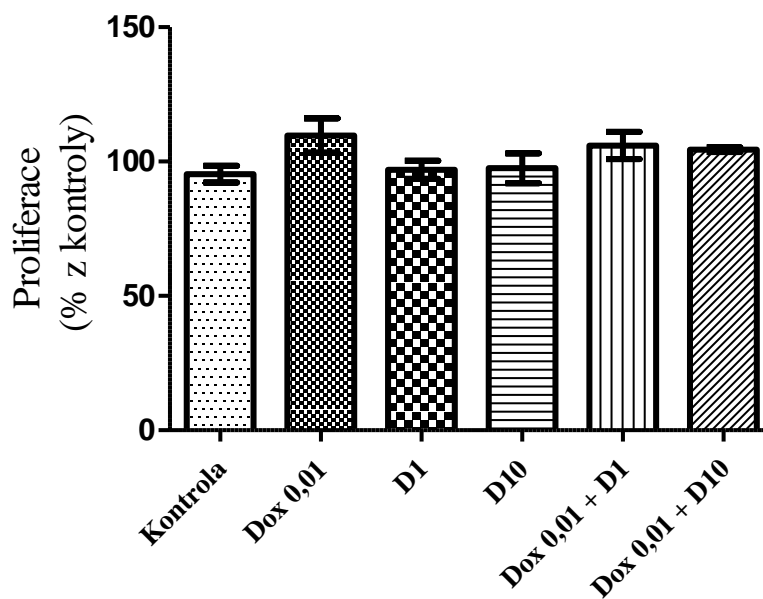
5.7.1 24hodinové ovlivnění

Graf 7. Vliv kombinace Doxu (0,01 μM) a GENU (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



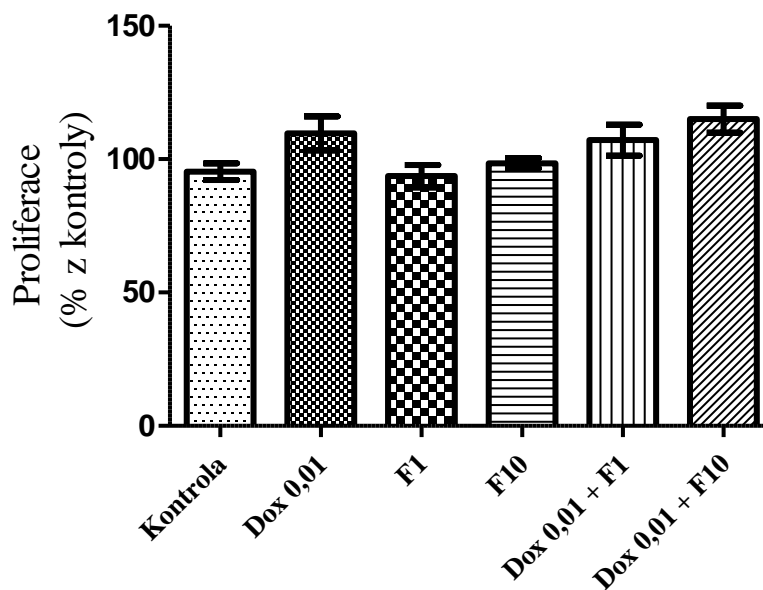
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μM ; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 8. Vliv kombinace Doxu (0,01 μM) a DAIDu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



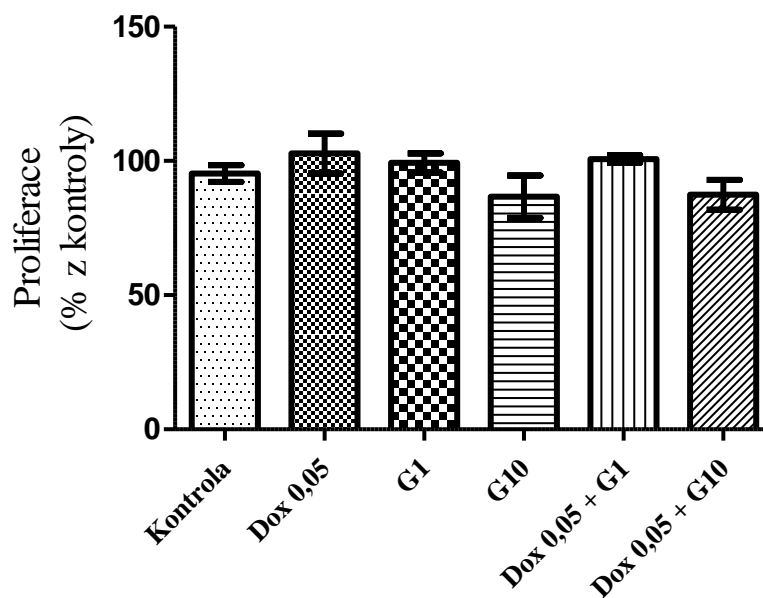
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μM ; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 9. Vliv kombinace Doxu (0,01 μM) a FORMu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



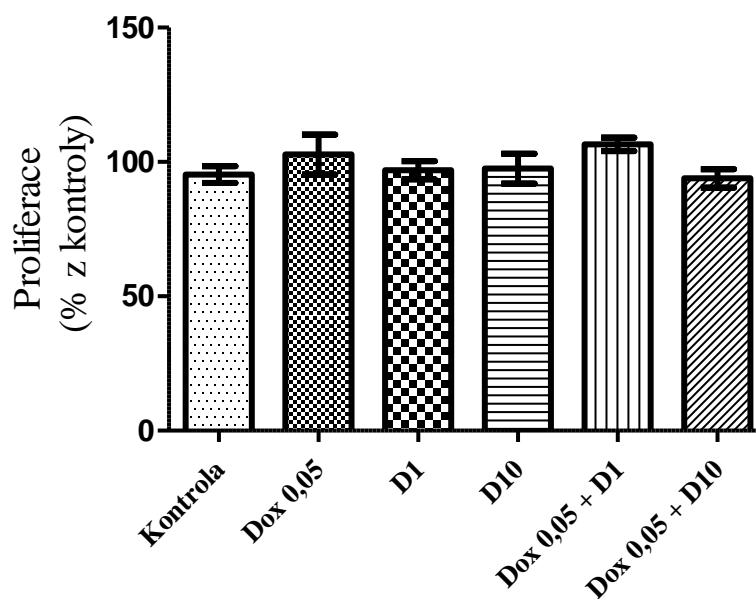
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μM ; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 10. Vliv kombinace Doxu (0,05 μM) a GENU (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



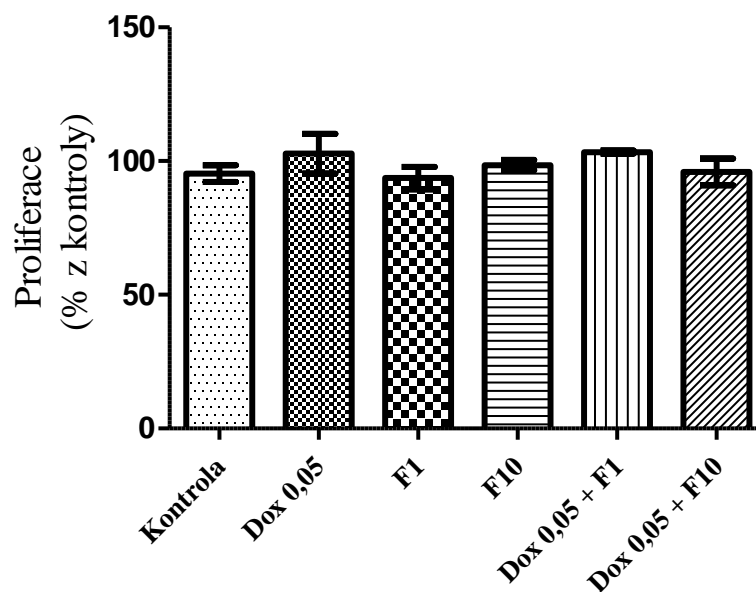
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μM ; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 11. Vliv kombinace Doxu (0,05 μM) a DAIDu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



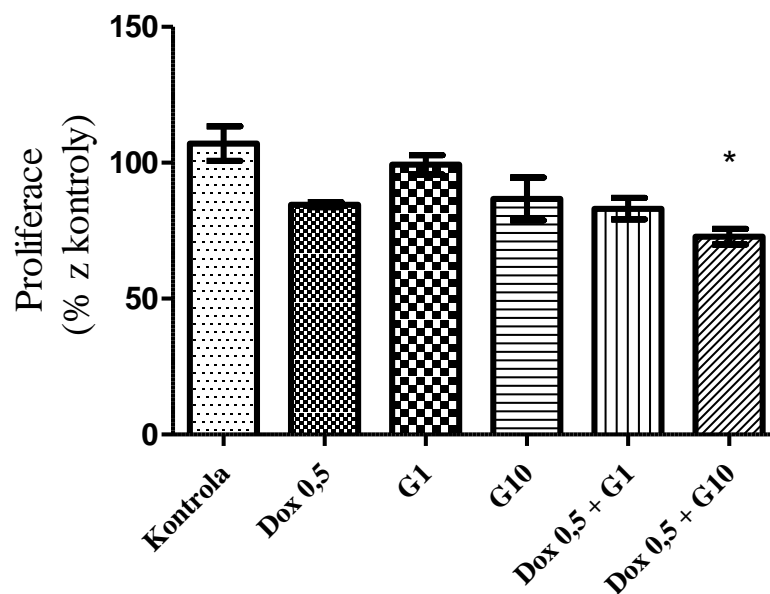
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μM ; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 12. Vliv kombinace Doxu (0,05 μM) a FORMu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



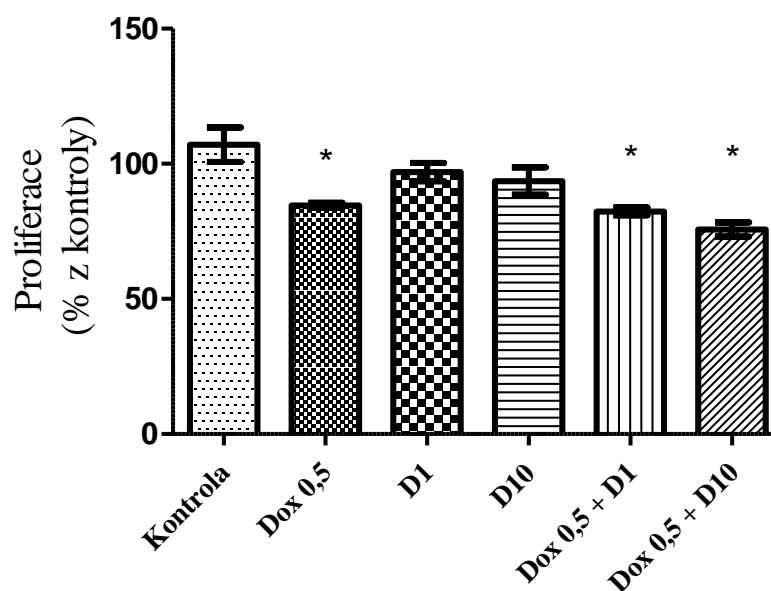
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μM ; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 13. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a GENU (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



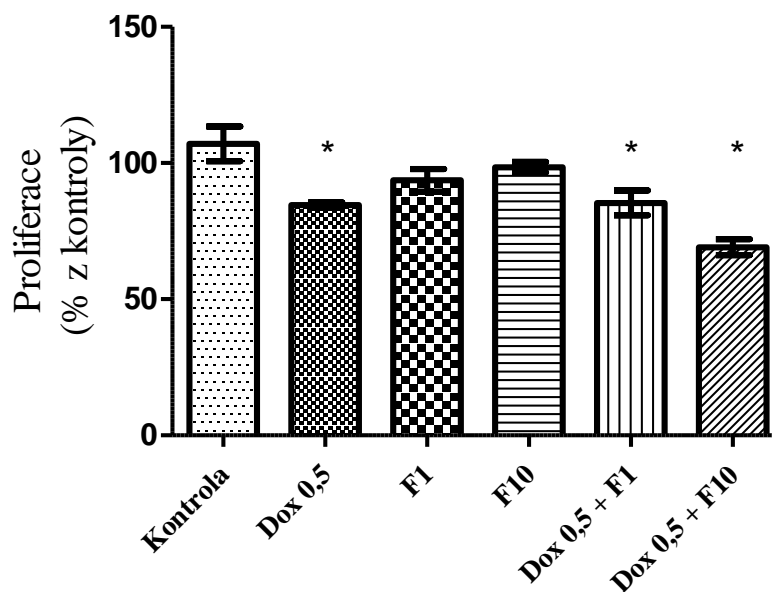
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 14. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



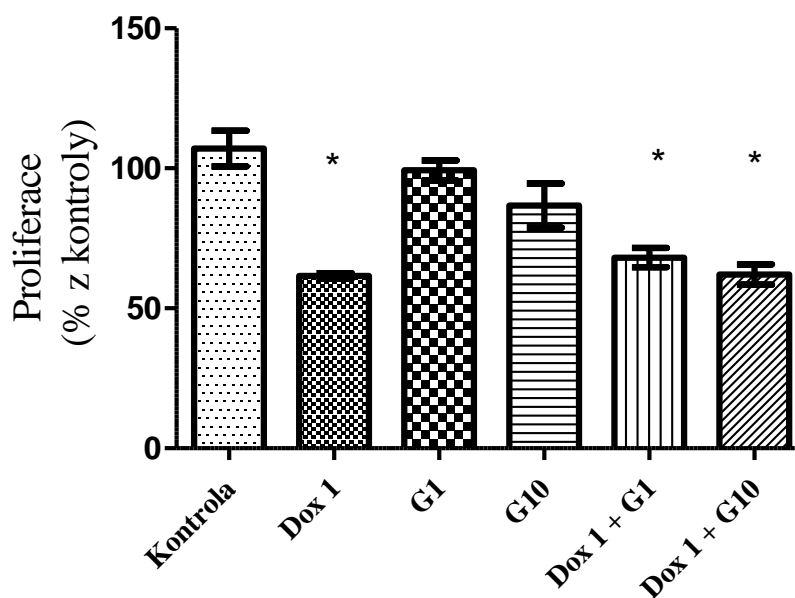
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 15. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a FORMu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



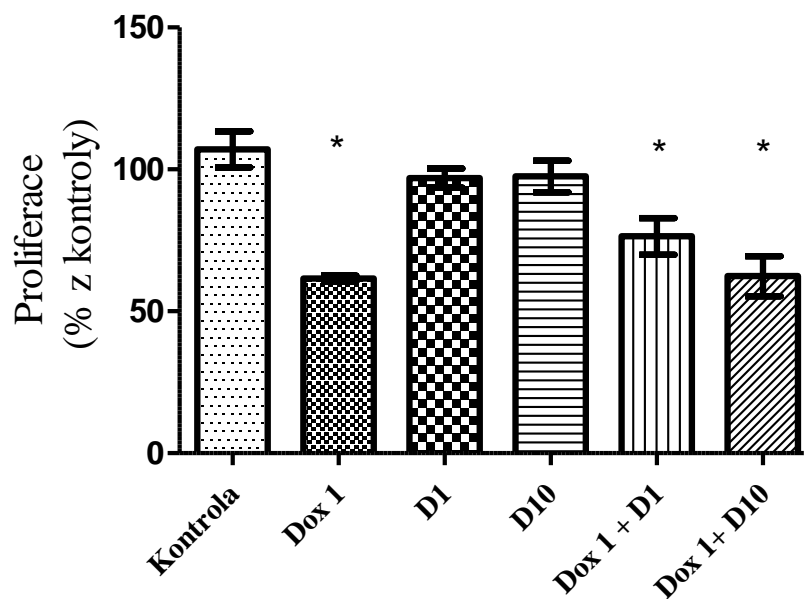
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 16. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a GENU (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



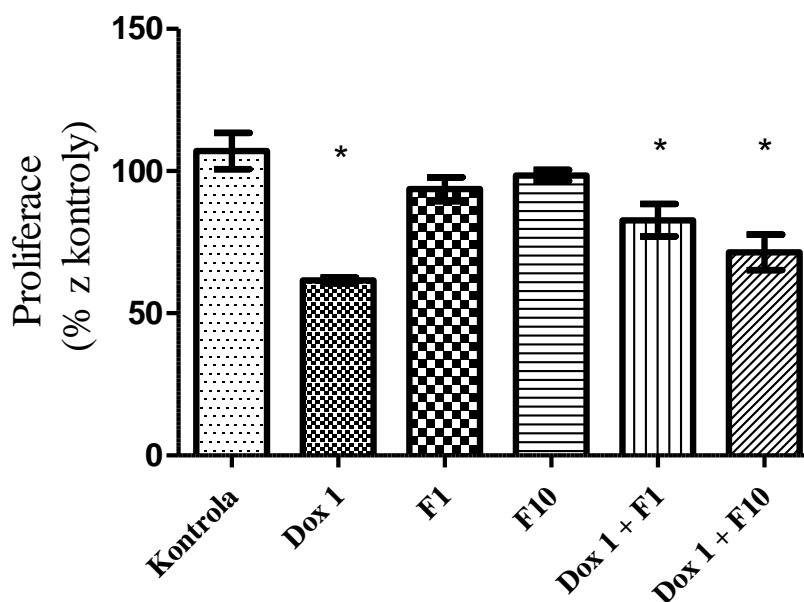
Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 17. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

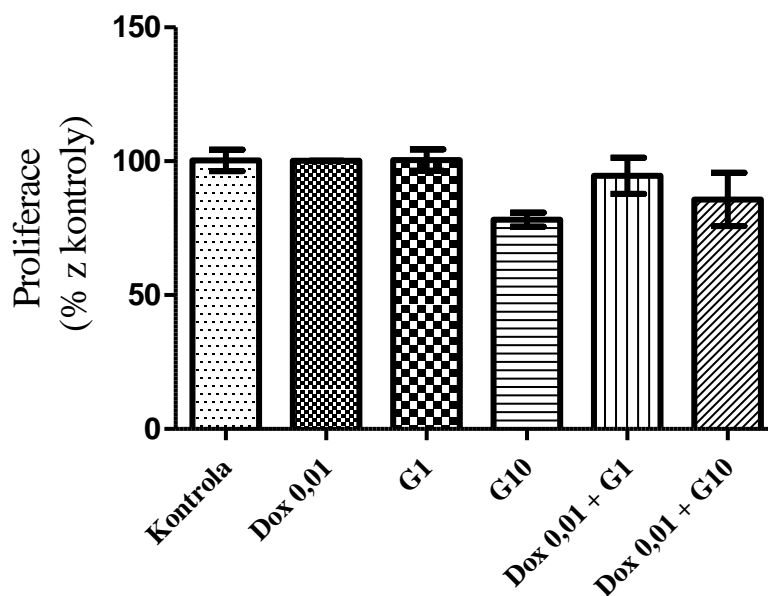
Graf 18. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a FORMu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

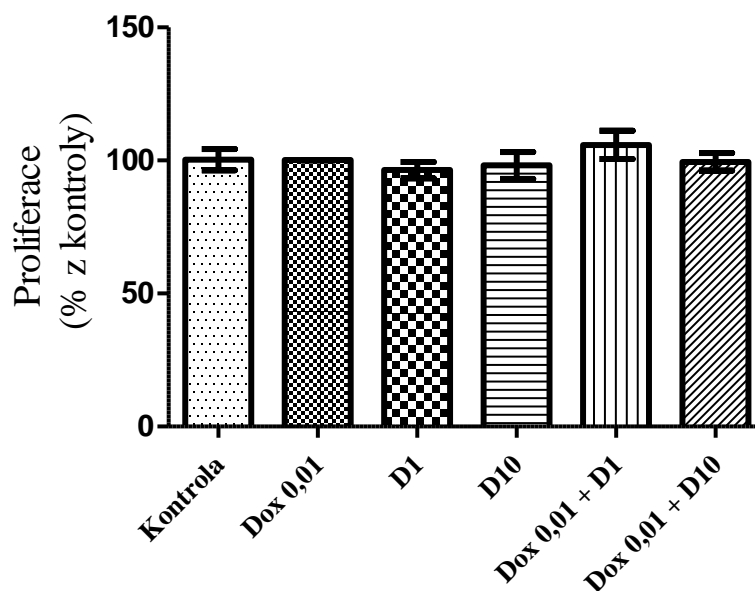
5.7.2 48hodinové ovlivnění

Graf 19. Vliv kombinace Doxu (0,01 μM) a GENU (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



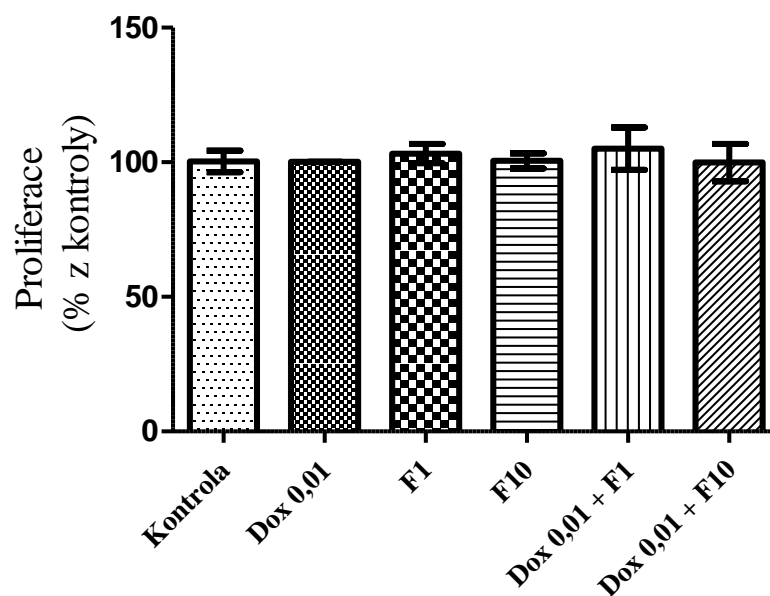
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μM ; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 20. Vliv kombinace Doxu (0,01 μM) a DAIDu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



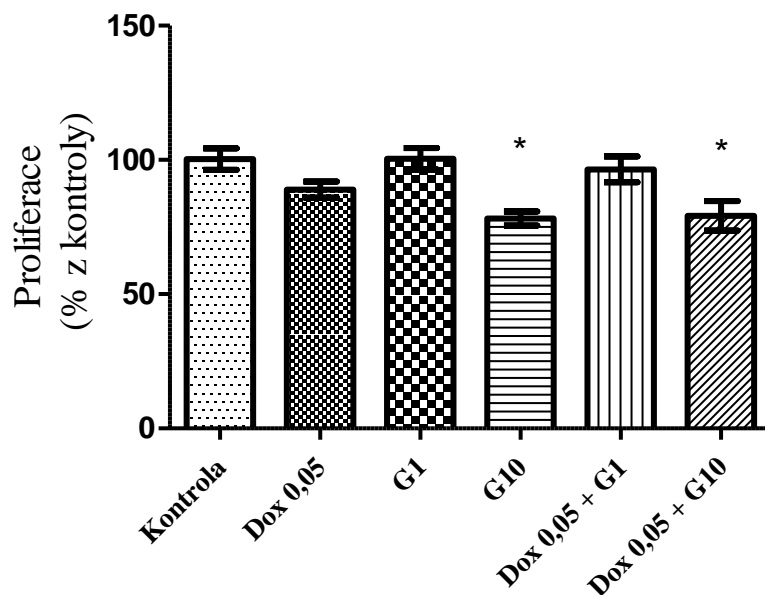
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μM ; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 21. Vliv kombinace Doxu (0,01 μM) a FORMu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



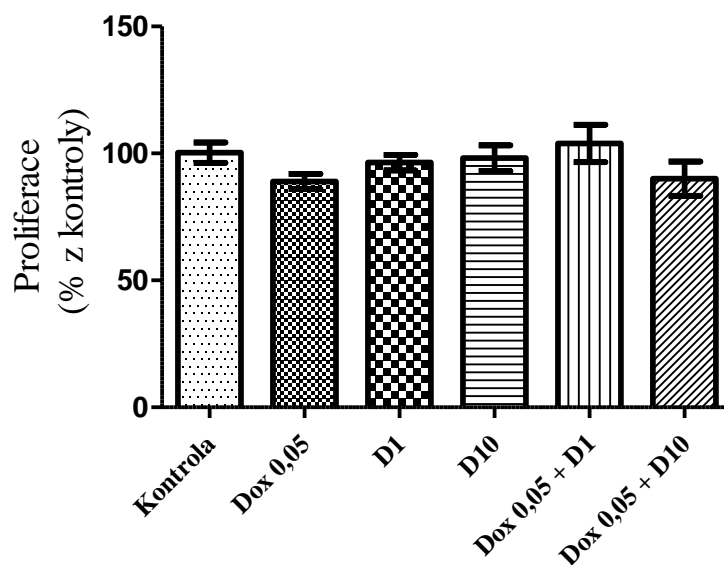
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μM ; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 22. Vliv kombinace Doxu (0,05 μM) a GENU (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



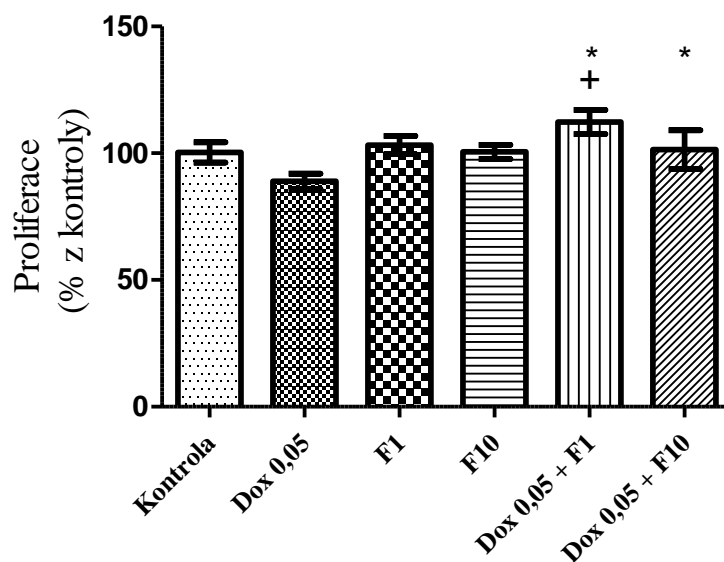
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μM ; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μM a 10 μM ;
Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 23. Vliv kombinace Doxu (0,05 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



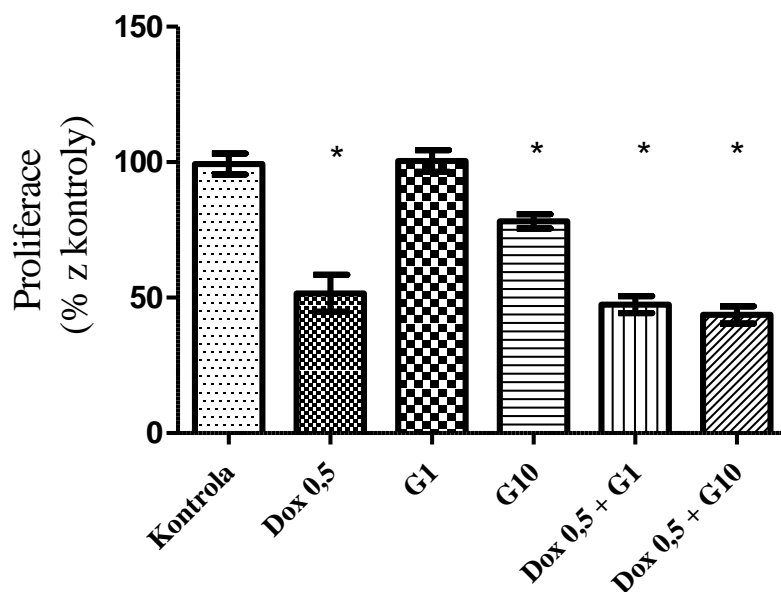
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability

Graf 24. Vliv kombinace Doxu (0,05 μ M) a FORMu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



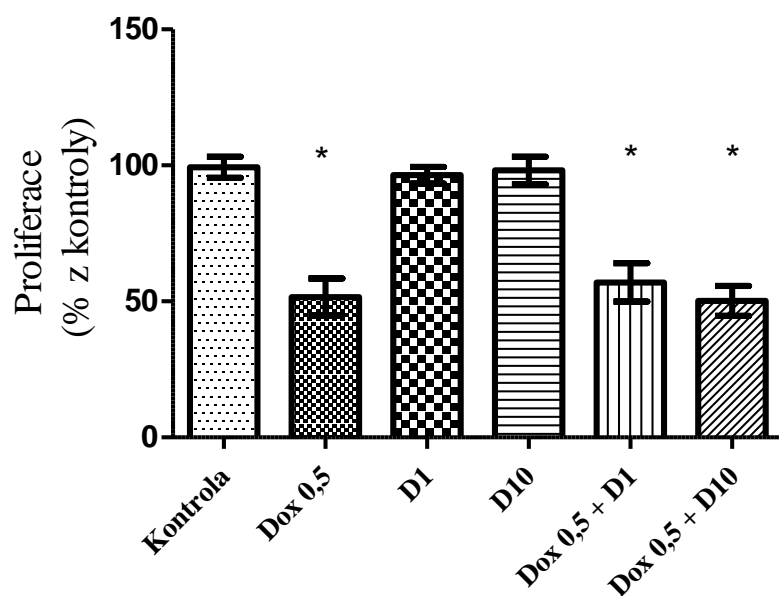
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μ M; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek; + - statisticky signifikantní výsledek mezi Doxem a příslušnou kombinací Dox + isoflavonoid

Graf 25. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a GENU (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



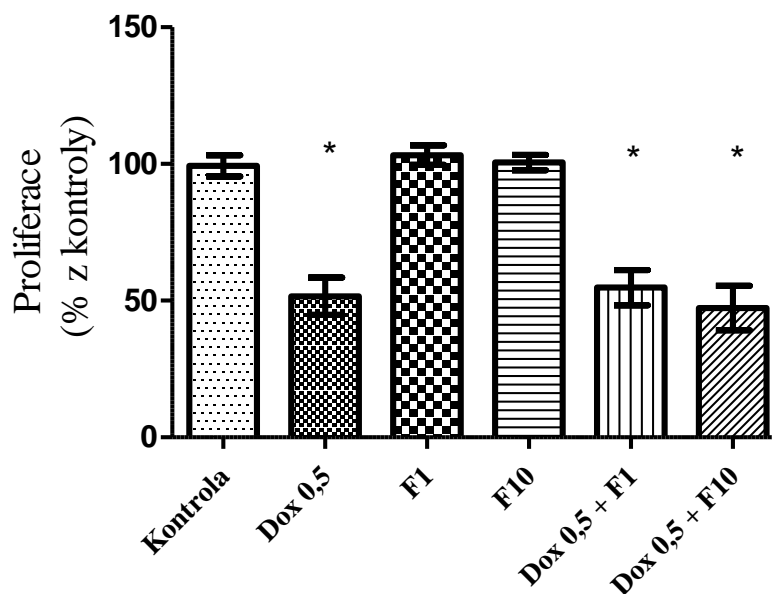
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 26. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



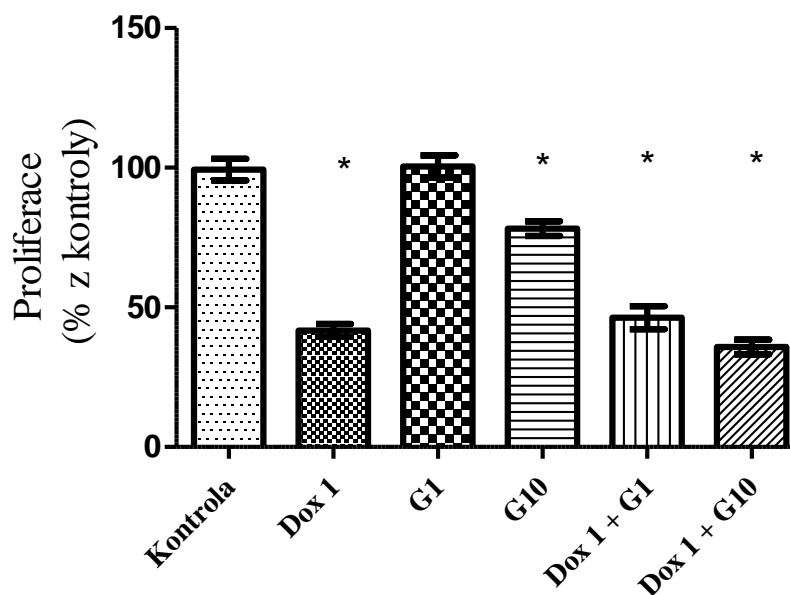
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 27. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a FORMu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



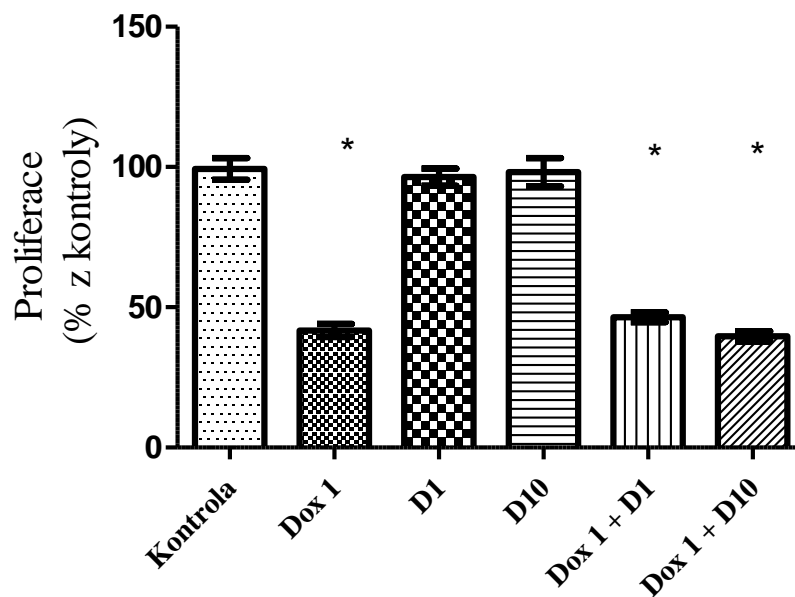
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 28. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a GENU (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



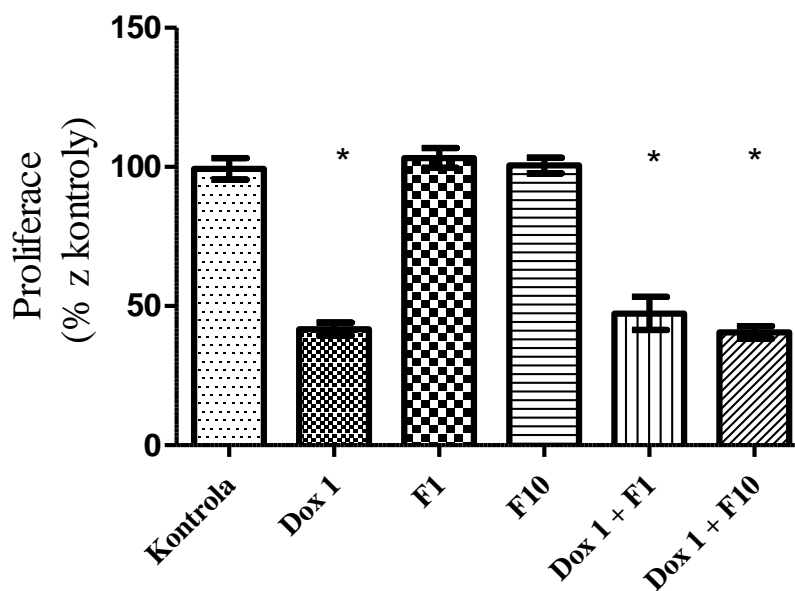
Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 29. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

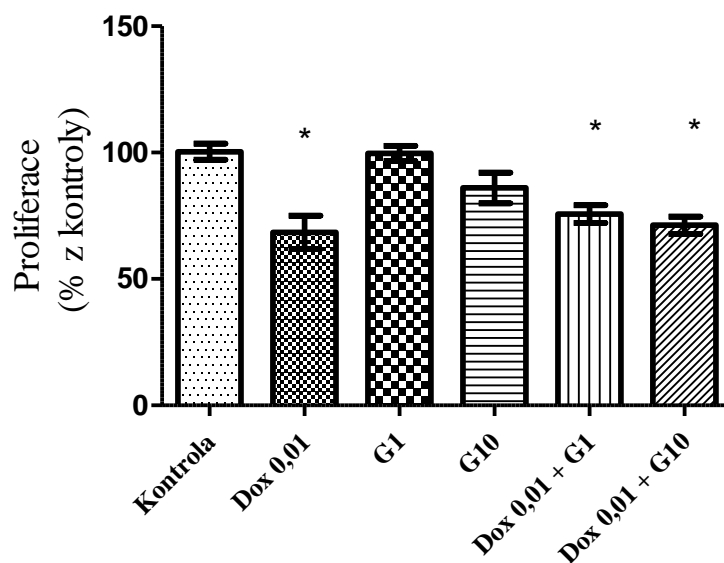
Graf 30. Vliv kombinace Doxu (1 μ M) a FORMu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

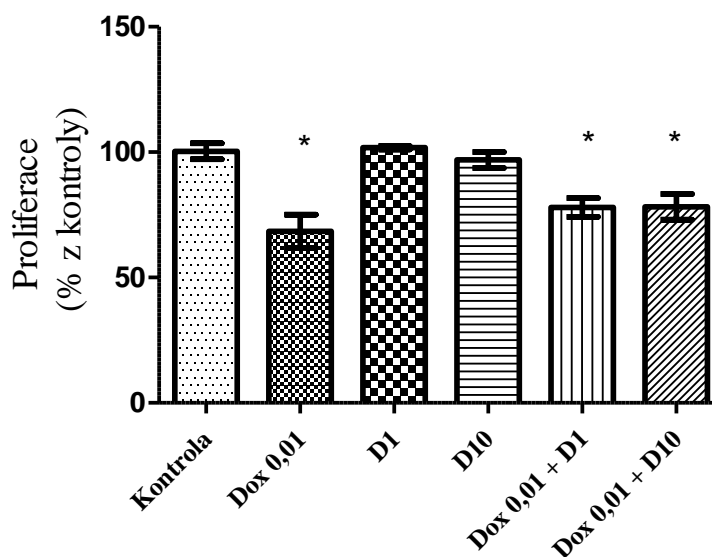
5.7.3 72hodinové ovlivnění

Graf 31. Vliv kombinace Doxu (0,01 μ M) a GENU (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



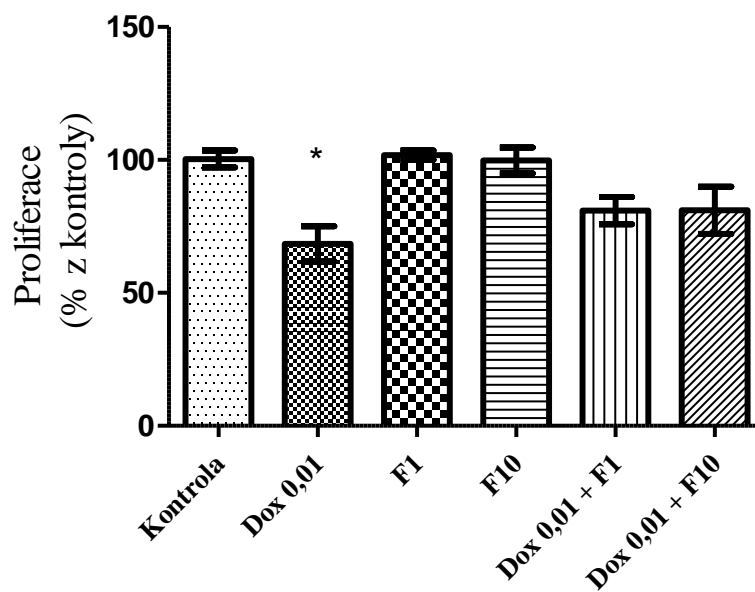
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μ M; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 32. Vliv kombinace Doxu (0,01 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



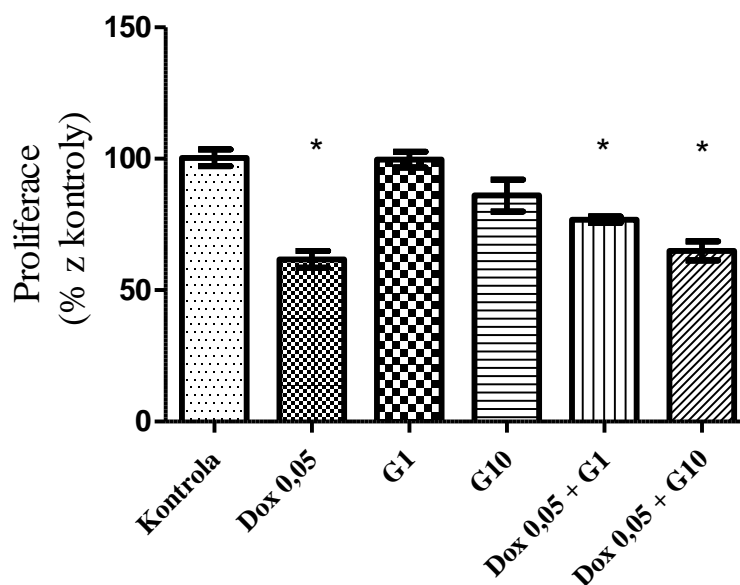
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 33. Vliv kombinace Doxu (0,01 μM) a FORMu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



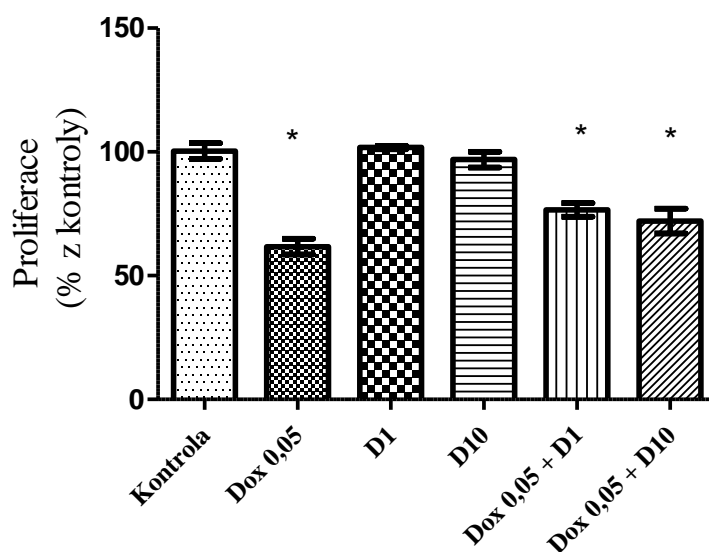
Dox 0,01 – doxorubicin o koncentraci 0,01 μM ; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μM a 10 μM ; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 34. Vliv kombinace Doxu (0,05 μM) a GENU (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



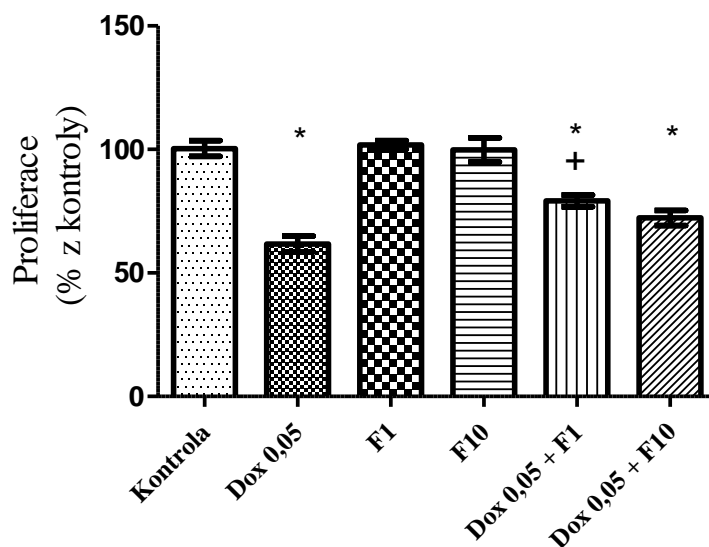
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μM ; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μM a 10 μM ; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 35. Vliv kombinace Doxu (0,05 μM) a DAIDu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



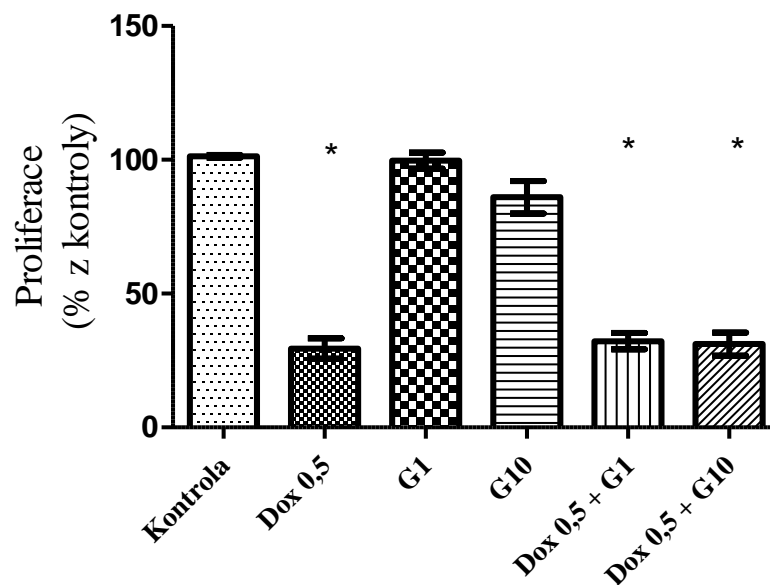
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μM ; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μM a 10 μM ; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 36. Vliv kombinace Doxu (0,05 μM) a FORMu (1 a 10 μM) na buněčnou proliferaci



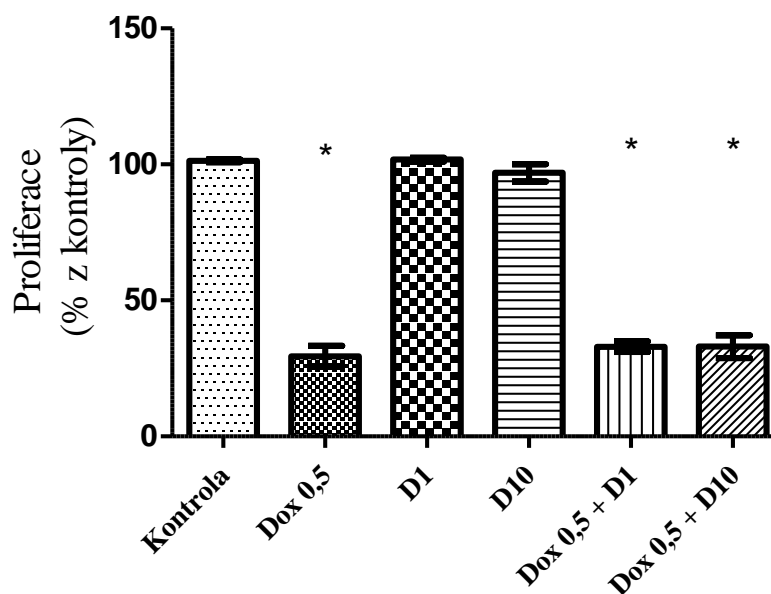
Dox 0,05 – doxorubicin o koncentraci 0,05 μM ; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μM a 10 μM ; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek; + - statisticky signifikantní výsledek mezi Doxem a příslušnou kombinací Dox + isoflavonoid

Graf 37. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a GENU (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



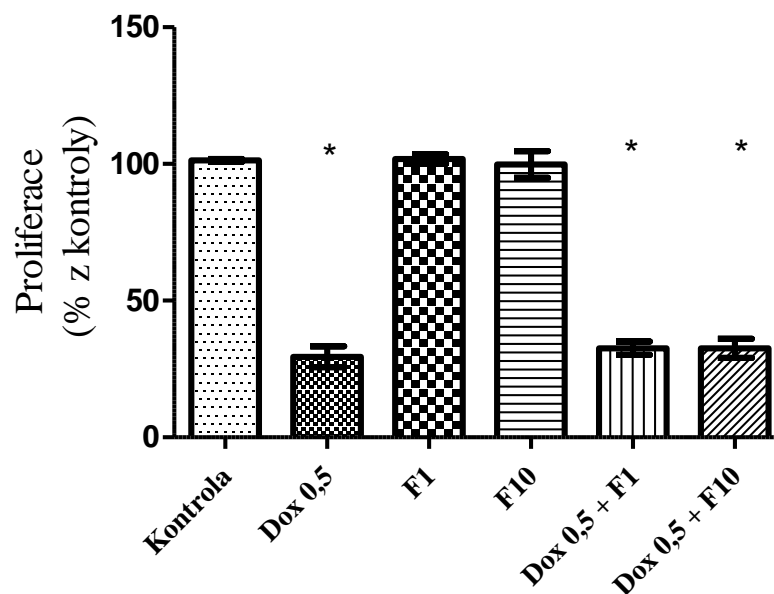
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 38. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



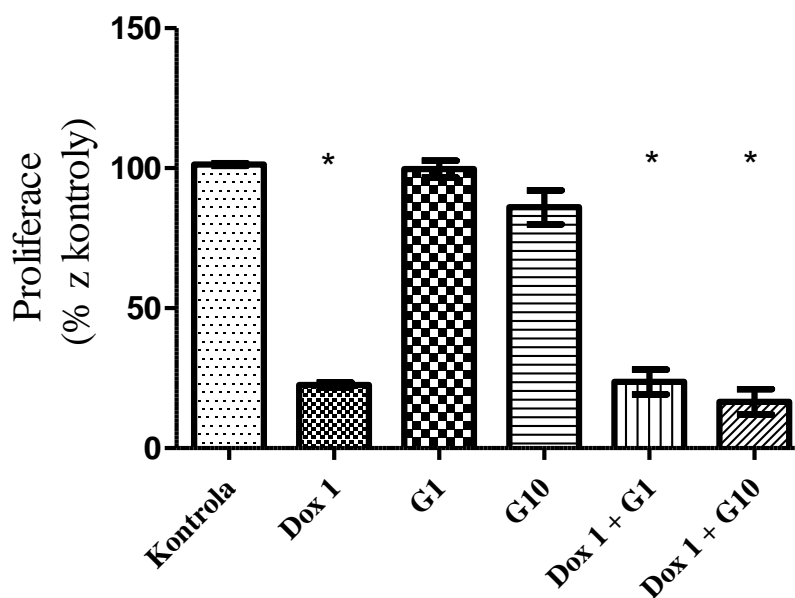
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 39. Vliv kombinace Doxu (0,5 μ M) a FORMu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



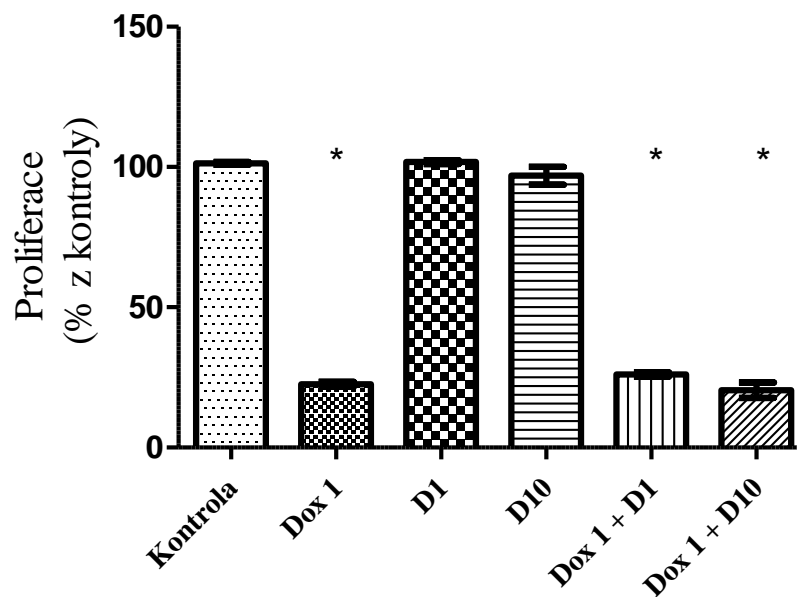
Dox 0,5 – doxorubicin o koncentraci 0,5 μ M; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 40. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a GENU (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



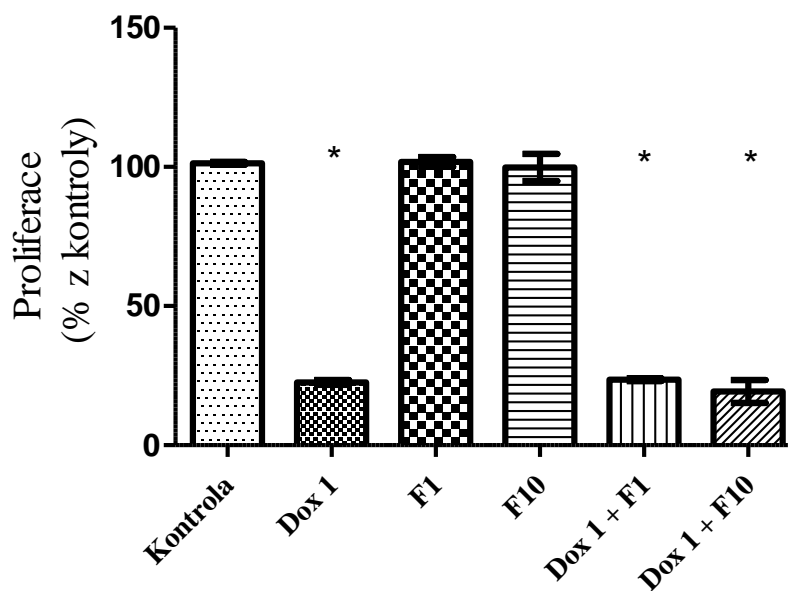
Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; G1 a G10 - genistein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 41. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a DAIDu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; D1 a D10 - daidzein o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

Graf 42. Vliv kombinace Doxu (1,0 μ M) a FORMu (1 a 10 μ M) na buněčnou proliferaci



Dox 1 – doxorubicin o koncentraci 1 μ M; F1 a F10 - formononetin o koncentraci 1 μ M a 10 μ M; Kontrola – kontrola 100% viability; * - statisticky signifikantní výsledek mezi kontrolou a příslušnou látkou nebo kombinací látek

6 DISKUZE

Efekt isoflavonoidů na rakovinu prsu stále zůstává kontroverzním tématem. Podle dostupných preklinických dat vysoké koncentrace isoflavonoidů inhibují proliferaci nádorových buněk prsu bez ohledu na jejich status estrogenních receptorů (ER), u nízkých koncentrací isoflavonoidů se však výsledky mnoha studií rozcházejí (Kwon, 2014).

6.1 Genistein

Nejvýznamnějším isoflavonoidem z hlediska protinádorové aktivity je GEN. Důležitou roli v modulaci účinku GENU na nádorové buňky hraje hned několik faktorů. Kromě koncentrace mezi ně patří i vliv přítomnosti nebo nepřítomnosti estrogenů v nejbližším okolí nádorových buněk, druh buněčné linie a načasování expozice isoflavonoidem (Kwon, 2014).

6.1.1 Vliv koncentrace

Vliv koncentrace GENU na buněčnou linii MDA-MB-231 se ukázal jako problematický. Neprokázala se koncentrační ani časová závislost účinku GENU na buněčnou proliferaci. U GENU1 nedošlo v porovnání s kontrolou k signifikantní změně proliferace v žádném experimentu a to nezávisle na délce expozice (24, 48 a 72 h). U GENU10 jsme signifikantní snížení proliferace prokázali, ale jen v některých případech. Signifikantní snížení proliferace vlivem GENU10 nebylo zaznamenáno po 24h ovlivnění, po 48h ovlivnění bylo zaznamenáno jen částečně, přičemž po 72h ovlivnění opět nebylo zaznamenáno vůbec. Možným vysvětlením může být skutečnost, že GEN10 tvoří hraniční koncentraci účinnosti tohoto isoflavonoidu, a že tedy jen malé změny v podmínkách pokusu mohou vychýlit jeho účinek buď pod nebo nad hranici signifikance. K této myšlence nás vede nekonzistence výsledků dalších studií, které popisují účinky GENU v podobných koncentracích.

Santell et al. (2000) například zjistili, že vliv GENU na proliferaci buněčné linie MDA-MB-231 *in vitro* závisí na jeho koncentraci. Poukázali na skutečnost, že GEN v nízkých dávkách ($\leq 10 \mu\text{M}$) buněčnou proliferaci *in vitro* významně neovlivňuje. K inhibici buněčné proliferace dochází až u koncentrací $\geq 20 \mu\text{M}$. Působení GENU bylo hodnoceno po 12, 24, 48 a 72 h.

Rajah et al. (2009) však zjistili, že GEN významně snižuje růst buněčné linie MDA-MB-231 v nízkých koncentracích (1 nM až 10 μ M) po 72h ovlivnění.

Rajah et al. (2012) ovlivnili buněčnou linii MDA-MB-231 škálou koncentrací GENU v rozpětí od 1 nM po 100 μ M. Proliferace byla zjišťována po 24 nebo 48 h. U buněk ovlivněných GENem v koncentračním rozmezí od 1 nM po 10 μ M, nebyl prokázán významný efekt na buněčnou proliferaci.

Odlišné výsledky pak naměřili Li et al. (1999), kteří navrhuji, že ovlivnění buněčné linie MDA-MB-231 GENem o koncentracích 5, 15 a 30 μ M na 1 až 6 dní vede k dávkově závislé inhibici buněčné proliferace.

6.1.2 *Vliv prostředí, přítomnosti nebo nepřítomnosti estrogenů*

Rozdílné vlivy mikroprostředí včetně vlivu přítomnosti nebo nepřítomnosti estrogenů mohou mít podle některých studií pro účinek GENU také velkou důležitost.

Ve své studii to popsali Rajah et al. (2009). Ti zjistili, že značnou roli v efektivnosti léčby GENem u ER-negativních buněk MDA-MB-231 hraje přítomnost 17- β estradiolu (E2). U buněk MDA-MB-231, které byly ovlivněny nízkými koncentracemi GENU (1 nM až 10 μ M) v přítomnosti E2 (1 nM) po dobu 72 h, byl v porovnání s buňkami ovlivněnými samotným GENem o stejných koncentracích zaznamenán signifikantní pokles buněčné proliferace.

Další studie, kterou vypracovali Rajah et al. (2012), tyto výsledky potvrzuje. Buněčná linie MDA-MB-231 byla opět ovlivněna škálou koncentrací GENU (1 nM až 100 μ M) v přítomnosti nebo nepřítomnosti E2 (1 nM), proliferace však byla tentokrát zjišťována po 24 nebo 48 h. U buněk ovlivněných samotným GENem (1 nM až 10 μ M) nebyl prokázán významný efekt na buněčnou proliferaci, zatímco u buněk ovlivněných GENem (1 nM až 10 μ M) v kombinaci s E2 bylo zaznamenáno signifikantní snížení buněčné proliferace. U buněk ovlivněných GENem (1 nM až 10 μ M) v kombinaci s E2 (1 nM) došlo ke zvýšení exprese Bax a snížení exprese Bcl-2, zvýšil se tak poměr Bax/Bcl-2, což u buněk vedlo ke zvýšení apoptózy. Z těchto výsledků tedy vyplývá důležitost přítomnosti E2 pro účinek nízkých koncentrací GENU (1 nM až 10 μ M).

V naší studii jsme k buněčné linii MDA-MB-231 E2 nepřidávali, což také mohlo mít vliv na nižší efektivnost působení GENU na proliferaci nádorových buněk.

Vliv prostředí na účinnost léčby GENem lze také využít k vysvětlení rozdílnosti některých *in vivo* studií.

Santell et al. (2000) popsali, že ve stravě přijímaný GEN (750 mg/kg), který byl podáván myším inokulovaným buňkami MDA-MB-231, významně nezměnil růst nádorů. Plasmatická koncentrace pravděpodobně nebyla dostatečná pro inhibici růstu nádorů (přibližně 1 μ M).

Avšak Li et al. (2013) ukázali, že stravou podávaný GEN (250 mg/kg) významně snížil růst nádorů odvozených od MDA-MB-231 buněčné linie, jež byly orthotopicky implantovány imunokompromitovaným potkanům.

Studie, kterou provedli Li et al. (2013), využila orthotopický myší model, který bere v úvahu lidské fyziologické podmínky lépe ve srovnání s konvenčními podkožními implantáty nádorových buněk, které použili Santell et al. (2000). Interakce s rozdílným tkáňovým mikroprostředím může tedy vysvětlovat tyto rozdílné výsledky (Kwon, 2014).

6.1.3 Vliv načasování podání genisteinu

Dalším důležitým rozdílem mezi studiemi, které vypracovali Santell et al. (2000) a Li et al. (2013), je načasování podání GENU. Li et al. (2013) podávali GEN ještě před inokulací myší nádorovými buňkami, zatímco Santell et al. (2000) nechali nádor nejprve rozvinout a až následně podávali GEN. Tedy rozdílné doby expozice GENem (před a po vytvoření nádoru) nebo interakce s rozdílným tkáňovým mikroprostředím mohou vysvětlovat tyto rozdílné výsledky (Kwon, 2014).

6.1.4 Vliv typu buněčné linie nádorových buněk

Významnou roli v reakci nádorových buněk prsu na léčbu GENem má jejich ER status. GEN svojí strukturou připomíná estrogenu, moduluje tak efekt estrogenu v prsní tkáni skrz ER (Leclercq a Jacquot, 2014).

Relativně vysoké koncentrace GENU (>25 μ M) inhibují růst ER-pozitivních buněk rakoviny prsu ER-dependentními i ER-independentními mechanismy. Naopak nízké koncentrace GENU zvyšují růst hormonálně dependentních rakovinných buněk prsu. Stimulují růst estrogen-dependentních MCF-7 buněk *in vitro* v rozsahu koncentrací 0,01 μ M až 10 μ M. Podpora růstu buněk nízkými koncentracemi GENU byla ještě více zřejmá v případě nepřítomnosti estrogenu (Kwon, 2014).

V souladu s dalšími studiemi Rajah et al. (2009) prokázali odlišný vliv GENU na ER-negativní (MDA-MB-231) a ER-pozitivní (T47D) nádorové buňky prsu. Zatímco

u MDA-MB-231 buněk GEN v nízkých koncentracích (1 nM až 10 μ M) způsobil signifikantní snížení proliferace (v přítomnosti i nepřítomnosti E2), u T47D v nepřítomnosti E2 způsobil GEN (o koncentraci 100 nM až 10 μ M) signifikantní stimulaci buněčné proliferace.

GEN ve vysokých koncentracích (25 až 100 μ M) signifikantně snížil buněčnou proliferaci u obou buněčných linií (v přítomnosti i nepřítomnosti E2). Snížení buněčné proliferace bylo signifikantně výraznější u buněk MDA-MB-231 než u buněk T47D.

V přítomnosti E2 a nízkých koncentrací GENU (1 nM až 10 μ M) došlo u buněk T47D k signifikantnímu zvýšení proliferace v porovnání s výsledky, které byly naměřeny v nepřítomnosti E2 (Rajah et al., 2009).

Z toho vyplývá, že GEN v nízkých koncentracích nepodporuje proliferaci ER-negativních MDA-MB-231 nádorových buněk, zatímco u ER-pozitivních buněk proliferaci stimulovat může. Kombinace nízkých koncentrací GENU s E2 u ER-negativních buněk může podpořit antiproliferační účinek, zatímco u ER-pozitivních buněk dochází ke zvýšení proliferace.

V našem experimentu jsme pracovali s ER-negativní buněčnou linií MDA-MB-231. V souladu s výše uvedenou studií GEN vykazoval spíše antiproliferativní účinky. K podpoře proliferace buněk GENem nedošlo u žádného měření.

6.2 Daidzein

DAID v porovnání s GENem vykazuje na nádorové buňky *in vitro* mnohem nižší biologický efekt. DAID k potlačení proliferace nádorových buněk prsu vyžaduje dvakrát vyšší koncentraci než je tomu u GENU (Peterson a Barnes, 1991, 1996).

U samotného DAIDu1 ani DAIDu10 se neprokázal účinek na změnu proliferace u zkoumaných buněk a to u žádného z časových intervalů. V souladu s výše uvedenými studiemi jsme prokázali, že DAID v koncentracích 1 a 10 μ M neovlivňuje proliferaci buněčné linie MDA-MB-231.

6.3 Formononetin

FORM efektivně neinhibuje buněčnou viabilitu MDA-MB-231 po 24h inkubaci koncentracemi nižšími než 160 μ M (Zhou et al., 2014).

V souladu se studií, kterou provedli Zhou et al. (2014), jsme prokázali, že FORM v koncentracích 1 a 10 μ M neinhibuje proliferaci buněčné linie MDA-MB-231.

6.4 Kombinace doxorubicinu s isoflavonoidem

U žádné kombinace Doxu s isoflavonoidem nedošlo v porovnání se samotným Doxem příslušné koncentrace k podpoře antiproliferativního efektu. Přestože existuje mnoho mechanismů, jak by isoflavonoidy mohly účinky cytostatik podporovat, v tomto případě nebyl žádný prokázán.

U kombinací Dox 0,05 + FORM1 (48 h) a Dox 0,05 + FORM1 (72 h) dokonce došlo ke snížení účinku cytostatika.

Pozitivní je skutečnost, že GEN ani DAID podle naší studie nesnižují účinek Doxu u buněčné linie MDA-MB-231. Tyto výsledky naznačují, že konzumace potravních doplňků obsahujících uvedené isoflavonoidy během chemoterapie Doxem, by nemusela narušovat terapii některých typů nádorů, aspoň v testovaných koncentracích.

U FORMu se vyskytly dva případy, kdy byla účinnost terapie Doxem snížena, proto by v tomto případě měla platit vyšší opatrnost.

Existují studie, ve kterých byl prokázán efekt GENU na zvýšení účinku cytostatik na nádorové buňky MDA-MB-231, ty se však liší druhem cytostatika, mechanismem účinku nebo provedením pokusu. Pro porovnání jsou tyto studie uvedeny v následujícím textu.

6.5 Kombinace tamoxifenu s isoflavonoidem u rakovinných buněk prsu

Tamoxifen je využíván pro léčbu ER-pozitivních nádorů prsu, protože hydroxytamoxifen (aktivní metabolit tamoxifenu) vykazuje antagonistický efekt na prsní ER. Sójové isoflavonoidy projevují částečně agonistický i antagonistický efekt vůči estrogenům, vznikl tedy předpoklad, že příjem sóji může podpořit nebo interferovat s protirakovinnou aktivitou tamoxifenu (Kwon, 2014).

6.5.1 Kombinace tamoxifenu s isoflavonoidem u ER-negativních nádorů

U ER-negativních nádorových buněk prsu MDA-MB-231 pravděpodobně GEN projevuje příznivý účinek na efektivnost tamoxifenu, avšak existuje zatím nedostatek studií, podle kterých bychom mohli odvozovat nějaké spolehlivé závěry (Kwon, 2014).

Existuje studie, která navrhuje, že GEN zcitlivuje ER-negativní nádorové buňky prsu k efektu tamoxifenu skrz epigenetickou regulaci. GEN reaktivuje expresi ER α modifikací histonů na promotoru ER α a inhibicí histondeacetylasy u buněk MDA-MB-

231. Signifikantní efekt na transkripci ER α byl pozorován již při koncentraci GENU 25 μ M. Reaktivace ER α byla ještě posílena kombinací GENU s trichostatinem, inhibitorem histondeacetylasy.

GEN přijímaný v potravě (250 mg/kg) také obnovil transkripci ER α u buněk MDA-MB-231. Pravděpodobně inhibicí exprese a aktivity enzymů, které regulují strukturu chromatinu. Významně tím zvýšil protinádorový efekt tamoxifenu (Li et al., 2013).

Kombinace tamoxifenu s GENem může být pro terapii dobrou volbou, proto je potřeba, aby tato problematika byla dále studována. Zůstává však otázkou, zda u nádorů, u kterých dojde působením GENU k obnovení exprese ER α , a tím i jejich citlivosti na tamoxifen, nedojde také k situaci, kdy se buňky stanou refrakterní na tamoxifen kvůli rušení efektu tamoxifenu GENem. V návaznosti na to by také mělo být studováno, zda se GEN může dostatečně akumulovat v lidských nádorových tkáních, aby v těchto koncentracích vykazoval biologickou aktivitu, protože isoflavonoidy mají u lidí nízkou biodostupnost (Kwon, 2014).

6.5.2 *Kombinace tamoxifenu s isoflavonoidem u ER-pozitivních nádorů*

V kombinační léčbě 5 μ M tamoxifenu s 25 μ M GENem došlo k inhibici růstu ER-pozitivních/HER2+ lidských rakovinných buněk prsu BT-474 synergickým způsobem. Synergická inhibice růstu je dáвана do souvislosti se zastavením buněčného cyklu, stejně jako s indukcí apoptózy. Navíc společná léčba tamoxifenem a GENem inhibuje expresi proteinu, známého jako survivin (inhibitor apoptózy). Z toho lze vyvozovat možné posílení účinku tamoxifenu pomocí GENU ve vyšších koncentracích (>25 μ M) na estrogen pozitivní nádory prsu (Mai et al., 2007).

V jiné studii však bylo zjištěno, že inhibiční efekt tamoxifenu na buňky MCF-7 podkožně inokulované do myši, kterým byl odstraněn thymus i ovaria, byl GENem podávaným potravou v nízkých dávkách (250, 500 mg/kg) významně snížen. Avšak GEN v dávkách 1000 mg/kg tento výsledek neprokázal (Du et al., 2012).

Pro vysvětlení nekonzistence mnohých studií zabývajících se kombinační léčbou tamoxifenu s GENem, je navrhována hypotéza, že pro efekt GENU na ovlivnění účinnosti tamoxifenu je důležitý poměr koncentrací estrogeneru, GENU a tamoxifenu. Je ale obtížné predikovat výsledek vzájemného ovlivnění těchto látek, protože existuje mnoho genetických a environmentálních faktorů, které přispívají ke změnám v jejich

metabolismu. Kromě toho, vzájemný poměr koncentrací estrogenu ke GENU v séru, nereflektuje poměr těchto látek v prsní tkáni a nádoru (Kwon, 2014).

6.6 Inaktivace NF- κ B genisteinem

Inaktivace NF- κ B GENem přispívá ke zvýšení apoptózy vyvolané chemoterapeutickými látkami. Chemoterapeutika indukují aktivitu NF- κ B, což snižuje jejich účinnost a může vést k rezistenci. V kontrastu k tomu je GEN znám jako látka, která inhibuje aktivitu NF- κ B, aniž by způsoboval systémovou toxicitu.

Buněčná linie MDA-MB-231 byla ovlivněna GENem o koncentraci 15 až 30 μ M na dobu 24 h a následně vystavena nízkým dávkám chemoterapeutik na dalších 48 až 72 h. Bylo zjištěno, že kombinace 15 až 30 μ M GENU se 100 až 500 nM cisplatinou, 0,5 až 2 nM docetaxelem nebo Doxem o koncentraci 50 ng/ml vedla k signifikantně vyšší inhibici buněčného růstu a indukcii apoptózy v porovnání s podáním každé látky samostatně. Aktivita NF- κ B byla u buněk neovlivněných GENem signifikantně zvýšená po 2h ovlivnění cisplatinou a docetaxelem, avšak u buněk „předlčených“ GENem byla indukce aktivity NF- κ B těmito látkami kompletně zrušena. Tyto výsledky byly ve shodě s pokusy na zvířatech, které jasně ukazují, že specifický cíl NF- κ B byl ovlivněn také *in vivo*. Výsledky jasně naznačují, že ovlivnění buněk GENem, které předchází přidání chemoterapeutika, inaktivuje NF- κ B a může přispět ke zvýšení inhibice růstu a k zvýšení apoptózy, jež je indukována cisplatinou, docetaxelem a Doxem u rakovinných buněk prsu (Li et al., 2005).

7 ZÁVĚR

- Na základě literární rešerše byla vytvořena charakteristika buněčné linie MDA-MB-231 a z toho vyplývajících úskalí při terapii takovýchto typů karcinomů prsu.
- Dále byly nastíněny současné možnosti terapie karcinomů prsu, včetně detailnější charakteristiky léčby Doxem.
- Následně byly zpracovány vybrané mechanismy působení isoflavonoidů. Jejich problematika byla vysvětlena na konkrétních zástupcích zkoumaných isoflavonoidů. Studie na toto téma byly vzájemně porovnány a byla navržena možná vysvětlení jejich nekonzistence.
- Pro přípravu roztoku neutrální červeně pro testování cytotoxicity je vhodnější použít suplementované medium, aby se předešlo srážení červeně.
- Ovlivnění buněčné linie MDA-MB-231 Doxem se ukázalo jako dávkově i časově závislé.
- Ovlivnění buněčné linie MDA-MB-231 GENem, DAIDem a FORMem o koncentraci 1 μM nevyvolalo signifikantní změnu proliferace.
- Ovlivnění buněčné linie MDA-MB-231 GENem o koncentraci 10 μM přineslo signifikantní snížení proliferace jen v některých případech, z čehož se dá usuzovat, že tato koncentrace GENU leží na hranici signifikance.
- Ovlivnění buněčné linie MDA-MB-231 DAIDem a FORMem o koncentraci 10 μM nevyvolalo signifikantní snížení proliferace v žádném z experimentů.
- Efektivnost působení Doxu na buněčnou linii MDA-MB-231 nebyla zvýšena v žádné z kombinací s isoflavonoidem.

SEZNAM ZKRATEK

5-FU – 5-fluorouracil

ABC – ATP-Binding Cassette

AKR – aldo-ketoreduktasa

Akt – serin-threoninová kinasa (známá též jako proteinkinasa B)

ATCC – Americká sbírka tkáňových kultur

ATM – (ataxia telangiectasia mutated) – tumor-supresorový gen

AUC – (Area Under the Curve) plocha pod křivkou závislosti koncentrace léčiva v krvi na čase

Bax – proapoptotický gen

Bcl-2 – protoonkogen („B-cell lymphoma“)

BME – Basal Medium Eagle – komerční kultivační medium

BRCA – tumor-supresorové geny („breast cancer“)

BS – buněčná suspenze

CBR1 – karbonylreduktasa

CDKIs – cyklin-dependentní kinasové inhibitory

CDKs – cyklin-dependentní kinasy

C_{max} – maximální koncentrace léčiva v krvi

DAID – daidzein

DAID1 a DAID10 – daidzein o koncentraci 1 μM a 10 μM

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium – komerční kultivační medium

DMSO – dimethylsulfoxid

DNMT – DNA methyltransferasa

Dox – doxorubicin

Doxol – doxorubicinol

E2 – 17-β estradiol

ER (ER α , ER β) – estrogenní receptor (estrogenní receptor α , β)

FBS – fetální bovinní sérum

FORM – formononetin

FORM1 a FORM10 – formononetin o koncentraci 1 μM a 10 μM

GEN – genistein

GEN1 a GEN10 – genistein o koncentraci 1 μM a 10 μM

HEPES – (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) - pufr

HER – (Human Epidermal Growth Factor Receptor) - receptor pro lidský epidermální růstový faktor

IC₅₀ – střední inhibiční koncentrace, představuje koncentraci látky mající za následek 50% snížení růstu buněk

IKK – IκB kinasa

IκB – inhibitor NF-κB

MDR – mnohočetná léková rezistence

MMP – matrixová metaloproteasa

NF-κB – (Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells) – nukleární faktor κB

p53 – tumor-supresorový gen

p21^{WAF1} – tumor-supresorový gen

PKC – (phosphoinositide-dependent kinase 1) – fosfoinositid dependentní kinasa 1

PI3K – fosfatidylinositol-3-kinasa

PIP2 – (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) – fosfatidylinositol-3,5-bisfosfát

PIP3 – (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) – fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát

PR – progesteronový receptor

PTEN – (phosphatase and tensin homolog) – tumor-supresorový gen

ROS – volné kyslíkové radikály

RTK – receptory s vnitřní tyrosinkinasovou aktivitou

TIMP – inhibitor matrixové metaloproteasy

TNBC – (triple-negative breast cancer) – triple negativní karcinom prsu

TNF-α – tumor-nekrotizující faktor α

Trypsin-EDTA – (trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid) trypsin-ethylendiamintetraoctová kyselina

VEGF – (vascular endothelial growth factor) – vaskulární endoteliální růstový faktor

POUŽITÁ LITERATURA

Monografie a časopisy:

- Abrahámová, J., Povýšil, C., & Horák, J. (2000). *Atlas nádorů prsu* (1 ed.). Praha: Grada Publishing.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., . . . Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 262(12), 5592-5595.
- Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 90(2-3), 157-177.
- Boik, J. (2001). *Natural Compounds in Cancer Therapy* (1 ed.). Princeton: Oregon Medical Press.
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., . . . Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492-2502. doi: 10.1001/jama.295.21.2492
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*, 16(25), 3267-3285.
- Dagdemi, A., Durif, J., Ngollo, M., Bignon, Y. J., & Bernard-Gallon, D. (2013). Histone lysine trimethylation or acetylation can be modulated by phytoestrogen, estrogen or anti-HDAC in breast cancer cell lines. *Epigenomics*, 5(1), 51-63. doi: 10.2217/epi.12.74
- Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., & Del Tacca, M. (2002). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*, 41(6), 431-444. doi: 10.2165/00003088-200241060-00004
- Davis, J. N., Kucuk, O., & Sarkar, F. H. (1999). Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, 35(2), 167-174. doi: 10.1207/S15327914NC352_11
- Du, M., Yang, X., Hartman, J. A., Cooke, P. S., Doerge, D. R., Ju, Y. H., & Helferich, W. G. (2012). Low-dose dietary genistein negates the therapeutic effect of tamoxifen in athymic nude mice. *Carcinogenesis*, 33(4), 895-901. doi: 10.1093/carcin/bgs017
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 363(20), 1938-1948. doi: 10.1056/NEJMra1001389
- Gavelová, M., Hladíková, J., Vildová, L., Novotná, R., Vondráček, J., Krčmář, P., . . . Skálová, L. (2008). Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Chem Biol Interact*, 176(1), 9-18. doi: 10.1016/j.cbi.2008.07.011
- Hanušová, V., Boušová, I., & Skálová, L. (2011). Possibilities to increase the effectiveness of doxorubicin in cancer cells killing. *Drug Metab Rev*, 43(4), 540-557. doi: 10.3109/03602532.2011.609174
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., . . . Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 8(5), R76. doi: 10.1186/gb-2007-8-5-r76
- Chandrasekharan, S. (2013). Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *Journal of Steroids & Hormonal Science*. doi: 10.4172/2157-7536.S12-004
- Klener, P. (2002). *Klinická onkologie*. Praha: Galén.
- Klener, P., & Klener, P. (2013). *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada.

- Kwon, Y. (2014). Effect of soy isoflavones on the growth of human breast tumors: findings from preclinical studies. *Food Sci Nutr*, 2(6), 613-622. doi: 10.1002/fsn3.142
- Leclercq, G., & Jacquot, Y. (2014). Interactions of isoflavones and other plant derived estrogens with estrogen receptors for prevention and treatment of breast cancer-considerations concerning related efficacy and safety. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 139, 237-244. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.12.010
- Li, Y., Ahmed, F., Ali, S., Philip, P. A., Kucuk, O., & Sarkar, F. H. (2005). Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res*, 65(15), 6934-6942. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4604
- Li, Y., Meeran, S. M., Patel, S. N., Chen, H., Hardy, T. M., & Tollefsbol, T. O. (2013). Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. *Mol Cancer*, 12, 9. doi: 10.1186/1476-4598-12-9
- Li, Y., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., & Sarkar, F. H. (1999). Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*, 18(20), 3166-3172. doi: 10.1038/sj.onc.1202650
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., . . . Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*, 15(8), 907-913. doi: 10.1038/nm.2000
- Lincová, D., & Farghali, H. (2007). *Základní a aplikovaná farmakologie* (2 ed.). Praha: Galén.
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Wehling, M. (2002). *Farmakologie a toxikologie* (1 ed.). Praha: Grada Publishing.
- Magee, P. J., Allsopp, P., Samaletdin, A., & Rowland, I. R. (2014). Daidzein, R-(+)-equol and S-(-)-equol inhibit the invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells potentially via the down-regulation of matrix metalloproteinase-2. *Eur J Nutr*, 53(1), 345-350. doi: 10.1007/s00394-013-0520-z
- Mai, Z., Blackburn, G. L., & Zhou, J. R. (2007). Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Mol Carcinog*, 46(7), 534-542. doi: 10.1002/mc.20300
- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., . . . Larsen, A. K. (1989). Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res*, 49(18), 5111-5117.
- Meeran, S. M., Ahmed, A., & Tollefsbol, T. O. (2010). Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics*, 1(3-4), 101-116. doi: 10.1007/s13148-010-0011-5
- Miadoková, E. (2009). Isoflavonoids - an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdiscip Toxicol*, 2(4), 211-218. doi: 10.2478/v10102-009-0021-3
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56(2), 185-229. doi: 10.1124/pr.56.2.6
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., . . . Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6), 515-527. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008

- Novotná, R., Wsól, V., Xiong, G., & Maser, E. (2008). Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol Lett*, *181*(1), 1-6. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.06.858
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, *401*(6748), 82-85. doi: 10.1038/43466
- Pan, H., Zhou, W., He, W., Liu, X., Ding, Q., Ling, L., . . . Wang, S. (2012). Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-kappaB activity via the Notch-1 pathway. *Int J Mol Med*, *30*(2), 337-343. doi: 10.3892/ijmm.2012.990
- Pecorino, L. (2012). *Molecular biology of cancer : mechanisms, targets and therapeutics* (3rd ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Perou, C. M., & Borresen-Dale, A. L. (2011). Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(2). doi: 10.1101/cshperspect.a003293
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-752. doi: 10.1038/35021093
- Peterson, G., & Barnes, S. (1991). Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun*, *179*(1), 661-667.
- Peterson, G., & Barnes, S. (1996). Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Differ*, *7*(10), 1345-1351.
- Poprach, Petráková, K., Vyskočil, J., Lakomý, R., Němeček, R., Kocák, I., . . . Vyzula, R. (2008). Kardiotoxicita léků používaných v onkologii. *Klinická onkologie : časopis České a Slovenské onkologické společnosti*, *21*(5), 288-293.
- Portier, B. P., Gruver, A. M., Huba, M. A., Minca, E. C., Cheah, A. L., Wang, Z., & Tubbs, R. R. (2012). From morphologic to molecular: established and emerging molecular diagnostics for breast carcinoma. *N Biotechnol*, *29*(6), 665-681. doi: 10.1016/j.nbt.2012.03.011
- Prausová, J. (2010). Karcinom prsu - problém i v 21. století. *Interní medicína pro praxi*, *12*(1), 26-32.
- Rajah, T. T., Du, N., Drews, N., & Cohn, R. (2009). Genistein in the presence of 17beta-estradiol inhibits proliferation of ERbeta breast cancer cells. *Pharmacology*, *84*(2), 68-73. doi: 10.1159/000226123
- Rajah, T. T., Peine, K. J., Du, N., Serret, C. A., & Drews, N. R. (2012). Physiological concentrations of genistein and 17beta-estradiol inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell growth by increasing BAX/BCL-2 and reducing pERK1/2. *Anticancer Res*, *32*(4), 1181-1191.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, *3*(7), 1125-1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75
- Santell, R. C., Kieu, N., & Helferich, W. G. (2000). Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. *J Nutr*, *130*(7), 1665-1669.
- Sarkar, F. H., & Li, Y. (2003). Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest*, *21*(5), 744-757.
- Setchell, K. D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*, *68*(6 Suppl), 1333S-1346S.

- Shao, Z., Wu, J., & Shen, Z. (2000). [Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 22(5), 362-365.
- Shao, Z. M., Alpaugh, M. L., Fontana, J. A., & Barsky, S. H. (1998). Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J Cell Biochem*, 69(1), 44-54.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., . . . Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874. doi: 10.1073/pnas.191367098
- Strehl, J. D., Wachter, D. L., Fasching, P. A., Beckmann, M. W., & Hartmann, A. (2011). Invasive Breast Cancer: Recognition of Molecular Subtypes. *Breast Care (Basel)*, 6(4), 258-264. doi: 10.1159/000331339
- Václavíková, R., Kondrová, E., Ehrlichová, M., Boumendjel, A., Kovář, J., Stopka, P., . . . Gut, I. (2008). The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism. *Bioorg Med Chem*, 16(4), 2034-2042. doi: 10.1016/j.bmc.2007.10.093
- Van Acker, F. A., Hulshof, J. W., Haenen, G. R., Menge, W. M., van der Vijgh, W. J., & Bast, A. (2001). New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 31(1), 31-37.
- Versantvoort, C. H., Schuurhuis, G. J., Pinedo, H. M., Eekman, C. A., Kuiper, C. M., Lankelma, J., & Broxterman, H. J. (1993). Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells. *Br J Cancer*, 68(5), 939-946.
- Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*. New York ; Abingdon: Garland Science.
- Xie, Q., Bai, Q., Zou, L. Y., Zhang, Q. Y., Zhou, Y., Chang, H., . . . Mi, M. T. (2014). Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 53(5), 422-431. doi: 10.1002/gcc.22154
- Zhang, F. Y., Du, G. J., Zhang, L., Zhang, C. L., Lu, W. L., & Liang, W. (2009). Naringenin enhances the anti-tumor effect of doxorubicin through selectively inhibiting the activity of multidrug resistance-associated proteins but not P-glycoprotein. *Pharm Res*, 26(4), 914-925. doi: 10.1007/s11095-008-9793-y
- Zhou, R., Xu, L., Ye, M., Liao, M., Du, H., & Chen, H. (2014). Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 through PI3K/AKT signaling pathways. *Horm Metab Res*, 46(11), 753-760. doi: 10.1055/s-0034-1376977

Internetové zdroje:

- ATCC [cit. 2014-12-05]. Získáno z: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=cz#generalinformation
- Ústav zdravotnické informatiky a statistiky (2013). *Novotvary 2010* [cit. 2014-12-05]. Získáno z: <http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>

Vejražka, M. *Buněčné kultury* [cit. 2014-11-10]. Získáno z:
<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>