

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**Fakulta chemicko – technologická**

**Využití průtokové cytometrie při studiu protinádorové aktivity  
vybraných isochinolinových alkaloidů**

**Bc. Štěpánka Vlasáková**

**Diplomová práce**

**2017**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Štěpánka Vlasáková**  
Osobní číslo: **C15631**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Využití průtokové cytometrie při studiu protinádorové aktivity vybraných isochinolinových alkaloidů**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Definujte princip průtokové cytometrie, její využití při studiu potenciálně protinádorových látek a popište nejčastěji používané metody.
- 2) Charakterizujte reakce buněk na působení cytotoxických a cytostatických látek používaných v klinické terapii nádorů a malignit. V úvodu práce představte mechanismy poškození jaderné DNA buňky, zástavy buněčného cyklu, rozdílné typy reparace genetické informace buňky, programovanou buněčnou smrt a základní mechanismy rezistence nádorových buněk.
- 3) Popište vlastnosti nejvýznamnějších isochinolinových alkaloidů různých strukturních typů s potenciálem využití při terapii nádorových onemocnění a biologickou aktivitu studovaných látek.
- 4) V experimentální části proveďte studium cytotoxicity, popřípadě antiproliferační aktivity vybraných isochinolinových alkaloidů.
- 5) U vybraných koncentrací aktivních látek se pokuste kvantifikovat, zda je jejich cytotoxická a antiproliferační aktivita zprostředkovaná zástavou buněčného cyklu, nebo apoptózou. K experimentální práci použijte metod průtokové cytometrie, spektrofotometrie a popřípadě jiných dle vývoje experimentální práce.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Radim Havelek, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

Bc. Štěpánka Vlasáková

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala zejména vedoucímu mé práce RNDr. Radimovi Havelekovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu a přátelský přístup při práci na experimentech a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za poskytnuté látky pro biologické studium.

Děkuji také své rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

## **Anotace**

Diplomová práce se zabývá cytotoxickou a antiproliferační aktivitou vybraných isochinolinových alkaloidů – chelidonin, homochelidonin, berbamin a bersavin. Práce v rámci svého cíle zjišťuje, jakým způsobem tyto vybrané alkaloidy ovlivňují viabilitu a proliferaci modelových buněčných linií, zda indukcí apoptózy nebo zástavou buněčného cyklu. V prvním kroku byla provedena základní analýza systémem xCELLigence, který zaznamenává změnu cell indexu buněk v čase, čímž se zjistila antiproliferační aktivita testovaných látek. Pro analýzu byly použity buněčné linie MRC-5, A2780 a A549. Chelidonin, homochelidonin, částečně bersavin a berbamin vykazovaly antiproliferační účinek. K verifikaci dat a pro rozšíření základního screeningu byla použita metoda stanovení viability a proliferace buněk pomocí Trypanové modři. Následně bylo využito metod průtokové cytometrie pro studium mechanismu antiproliferačního a cytotoxického působení. U vybraných alkaloidů byl studován vliv na změny distribuce buněčného cyklu u buněk MRC-5, A-2780, Jurkat a MOLT-4. Metodou kvantifikace vazby Annexinu V a propidium jodidu bylo zjišťováno procento buněk časně a pozdně apoptotických po expozici nejslibnějším testovaným látkám.

Výsledky ukázaly účinnou antiproliferační aktivitu chelidoninu a homochelidoninu. Jejich schopnost zástavy buněčného cyklu v G1 nebo v G2/M fázi a schopnost indukce apoptózy. Bersavin rovněž jevil antiproliferační a cytotoxickou aktivitu doprovázenou zástavou buněčného cyklu v G1 nebo v G2/M fázi. Berbamin se jevil jako nejméně účinný alkaloid v porovnání s ostatními studovanými alkaloidy.

## **Klíčová slova**

Průtoková cytometrie, isochinolinové alkaloidy, chelidonin, homochelidonin, berbamin, bersavin

## **Annotation**

This diploma thesis deals with cytotoxic and antiproliferative activity of isoquinoline alkaloids - chelidone, homochelidone, berbamine and bersavine. This thesis within its goal discovers in what ways these selected alkaloids influence viability and proliferation of model cell lines, if it is happening through the apoptosis induction or the cell cycle arrest. The first step was to perform the elementary analysis by the xCELLigence system which detects the cell index change in time and it lead to finding the antiproliferative activity of the tested substance. Cell lines MRC-5, A2780 and A549 were used for the analysis. Chelidone, homochelidone, partly bersavine and berbamine showed antiproliferative effect. The method of cell viability and proliferation determination using Trypan Blue was applied to verify data and to expand elementary screening. Subsequently, we used the methods of flow cytometry to study the antiproliferative and cytotoxic mechanism. We explored the influence on distribution of cell cycle changes of MRC-5, A-2780, Jurkat and MOLT-4 cells in the selected alkaloids. The percentage of early and late apoptotic cells was determined by quantification of the Annexin V binding assay.

The results showed effective chelidone and homochelidone antiproliferative activity and their capability of cell cycle arrest in G1 or G2/M phase and apoptosis induction. Bersavine also showed antiproliferative and cytotoxic activity accompanied by cell cycle arrest in G1 or G2/M phase. Berbamine appeared to be least effective alkaloid compared to other studied alkaloids.

## **Keywords**

Flow cytometry, isoquinoline alkaloids, chelidone, homochelidone, berbamine, bersavine

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIF	z angl. apoptosis-inducing factor
Apaf-1	z angl. apoptic protease activating factor-1
Bcl-2	z angl. B-cell lymphoma 2
BER	base excision repair
BLBC	z angl. Basal-like breast cancer
CAD	z angl. caspase activating DNase
CI	cell index
CML	chronická myeloidní leukémie
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
DiOC6	3-3'-dihexyloxacarbocyanine jodid
DISC	smrt indukující signální komplex (z angl. death-inducing signaling complex)
DMSO	dimetylsulfoxid
DSB	double-strand break
EB	ethidium bromid
EMEM	Eagle's minimal essential medium
EMT	z angl. epithelial-mesenchymal transition
EndoG	endonukleáza G
FADD	z angl. FAS-associated death domain protein
FBS	fetální bovinní sérum
FC	volný chelidonin
FITC	fluoresceinizothiokyanát



FS	forward scatter
HR	homologní rekombinace (z angl. homologous recombination)
IAP	z angl. inhibitor of apoptosis proteins
IDLs	inzerce/delece smyček (z angl. insertion/deletion loops)
JC-1	3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine jodid
LAMP2	z angl. lysosome-associated membrane protein 2
LED	z angl. light-emitting diode
LRP	z angl. lung resistance related protein
MDR	mnohočetná léková rezistence (z angl. multidrug resistance)
MMR	DNA mismatch repair
MRP	z angl. multidrug associated protein
NC	nanochelidonin
NER	nucleotide excision repair
NHEJ	nehomologní spojování konců (z angl. non-homologous end joining)
NK	natural killer
P53	tumor supresorový protein
PARP1	z angl. poly(ADP-ribose)polymerase-1
PBS	fosfátový pufr
PE	phycoerythrin
PS	fosfatidylserin
RIP	z angl. receptor interacting protein

RTCA	analýza buněk v reálném čase (z angl. real-time cell analyzer)
SMAC/DIABLO	z angl. Second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein
SS	side scatter
SSB	single-strand break
STAT3	z angl. signal transducer and activator of transcription 3
TNF	z angl. tumor necrosis factor

## 1. Obsah

Úvod.....	14
1 Cíl práce.....	16
2 Teoretická část.....	17
2.1 Průtoková cytometrie .....	17
2.1.1 Princip .....	17
2.1.2 Základní komponenty .....	18
2.1.2.1 Fluidní systém .....	18
2.1.2.2 Optický systém .....	18
2.1.2.3 Elektronický systém .....	19
2.1.3 Měřené parametry .....	20
2.1.3.1 Rozptyl světla (Forward scatter, Side scatter).....	20
2.1.3.2 Fluorescence .....	20
2.1.4 Analýza dat .....	23
2.1.5 Využití v klinické praxi.....	24
2.1.5.1 Analýza změny optických vlastností buňky.....	24
2.1.5.2 Analýza kondenzace chromatinu a propustnosti buněčné membrány.....	24
2.1.5.3 Analýza změny asymetrie a propustnosti buněčné membrány.....	25
2.1.5.4 Analýza změny mitochondriálního potenciálu buňky.....	25
2.1.5.5 Stanovení buněk sub G0/G1 analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA .....	26
2.1.5.6 TUNEL assay .....	26
2.2 Vliv cytotoxických a cytostatických látek .....	27
2.2.1 Mechanismy poškození jaderné DNA .....	27
2.2.2 Typy reparace DNA .....	28
2.2.2.1 Nehomologní spojování konců (NHEJ) .....	28

2.2.2.2	Homologní rekombinace (HR).....	28
2.2.2.3	DNA mismatch repair (MMR).....	28
2.2.2.4	Base excision repair (BER).....	29
2.2.2.5	Nucleotide excision repair (NER).....	29
2.2.3	Programovaná buněčná smrt.....	29
2.2.3.1	Apoptóza.....	29
2.2.3.2	Nekróza.....	34
2.2.3.3	Autofagie.....	34
2.2.4	Rezistence nádorových buněk.....	36
2.3	Vybrané isochinolinové alkaloidy.....	37
2.3.1	Benzofenanthridinové alkaloidy.....	38
2.3.1.1	Chelidonin.....	38
2.3.1.2	Homochelidonin.....	40
2.3.1.3	Sanguinarin.....	41
2.3.1.4	Chelerythrin.....	42
2.3.2	Bisbenzylisochinolinové alkaloidy.....	43
2.3.2.1	Berbamin.....	43
2.3.2.2	Bersavin.....	45
2.3.3	Protoberberinové alkaloidy.....	45
2.3.3.1	Berberin.....	45
2.3.3.2	Palmatin.....	46
3	Experimentální část.....	48
3.1	Použité chemikálie.....	48
3.2	Použité přístroje a pomůcky.....	49
3.3	Buněčné kultury.....	49
3.4	Pasážování buněk a kultivační podmínky.....	50

3.5	Manuální počítání viability a proliferace buněk barvením Trypanovou modří .....	50
3.5.1	Postup.....	51
3.6	Systém xCELLigence – analýza v reálném čase.....	51
3.6.1	Postup.....	52
3.7	Stanovení apoptózy pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu .....	53
3.7.1	Postup.....	53
3.8	Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA .....	53
3.9	Statistická analýza.....	54
4	Výsledky.....	55
4.1	Analýza proliferace buněk systémem xCELLigence .....	55
4.1.1	Chelidonin a Homochelidonin .....	55
4.1.2	Berbamin a Bersavin.....	57
4.2	Stanovení viability a proliferace buněk barvením s Trypanovou modří.....	59
4.2.1	Bersavin .....	59
4.2.2	Berbamin.....	62
4.2.3	Chelidonin.....	64
4.3	Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie.....	67
4.3.1	Chelidonin a homochelidonin .....	67
4.3.2	Bersavin .....	70
4.4	Detekce apoptózy pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu .....	72
4.4.1	Chelidonin a homochelidonin .....	72
5	Diskuze .....	76
6	Závěr.....	82
7	Použitá literatura.....	84

## Úvod

Nádorové onemocnění vzniká na úrovni genomu, kdy dochází k jeho poruchám na podkladě mutace, delece, amplifikace nebo nedostatečné reparace genových defektů. Tyto poruchy následně způsobí poruchy regulace buněčného růstu a poškozené buňky se začnou neomezeně množit. Doposud nebyly vyvinuty léky, které by dokázaly cíleně opravit poruchy na úrovni DNA. Avšak včasná diagnostika většinou vede k úspěšnému vyléčení nádorového onemocnění na podkladě eliminace nádorových buněk. Důraz je kladen především na léčbu s minimálními vedlejšími účinky. Onkologická onemocnění se v České republice řadí mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí a meziroční statistiky ukazují zvyšující se výskyt nádorových onemocnění. Léčba pacienta je mnohdy velmi komplikovaná a kombinovaná několika postupy (léčba chirurgická, chemoterapeutická, biologická a radioterapeutická). (Machová et al. 2012).

Na vznik rakovinného bujení mají vliv různé vnitřní a vnější faktory, přičemž vnější dle dostupných poznatků značně převažují. Každou tkáň lidského těla může postihnout maligní přeměna, avšak frekvence se u jednotlivých tkání může lišit v závislosti na histologickém složení, různé intenzitě buněčné proliferace a metabolismu, odlišných regulačních mechanismech, nebo na odlišných enzymových systémech, čímž se u každé tkáně mění schopnost aktivovat nebo vylučovat karcinogenní látky. Z tohoto důvodu nepůsobí karcinogeny na všechny tkáně a orgány stejně. Odlišné je i poškození různých tkání vnějšími faktory. Nejčastěji jsou nepříznivým faktorům vystaveny právě krycí tkáně na povrchu orgánů a kůže, čímž vznikají karcinomy (80 % všech nádorů) (Stratil a Kubáň, 2004).

Příčinou obtížné léčby nádorových onemocnění je nespecifický účinek používaných chemoterapeutik. V minulosti tento nespecifický účinek bránil cílenému zaměření terapeutik na nádorové buňky neschopností rozpoznat rozdíl mezi nádorovými a nenádorovými buňkami. V 80. letech byly prováděny výzkumy v molekulární biologii a genetice, jež více objasnily rozdíly v signálních drahách regulujících buněčnou proliferaci. V 90. letech se přístup zaměřil především na cílenou léčbu a hledání látek účinných na klíčové proteiny. Tyto látky s vysokým protinádorovým potenciálem jsou hojně nacházeny v přírodě a jejich výhodou je menší frekvence dokumentovaných nepříznivých vedlejších účinků. V současné době se využívá více než 50 % přírodních látek v terapii nádorových onemocnění. Jedním z nejvýznamnějších protinádorových léčiv jsou vinca alkaloidy, izolované z Barvínkovce

růžového (*Catharanthus roseus*). Jeho deriváty vinblastin, vinkristin nebo vinleurosine vykazují silné protinádorové účinky. Další významnou skupinou jsou taxany izolované z kůry stromu Tisu (*Taxus brevifolia*), kdy se z jedovatého alkaloidu taxanu vyrábí látka paklitaxel se silným protinádorovým účinkem. Mezi další přírodní látky používané v terapii nádorových onemocnění patří epipodofylotoxiny, combretastatiny, kolchicin a kampoeciny. (Cibíková et al. 2010). Narůstající výskyt nádorových onemocnění ukazuje na potřebu medicíny vynalézat novější a účinnější terapeutika. Velmi slibný protinádorový potenciál vykazují právě isochinolinové alkaloidy, které by mohly být v budoucnu klíčové pro efektivnější terapii nádorových onemocnění.

## **1 Cíl práce**

Cílem diplomové práce je prostudovat možnosti využití průtokové cytometrie při studiu potenciálně protinádorových látek a popsat nejčastěji používané metody. Teoretická část si klade za cíl stručně charakterizovat reakce buněk na působení cytotoxických a cytostatických látek používaných v terapii nádorů. Popsat jednotlivé typy poškození jaderné DNA, rozdílné typy reparace genetické informace buňky, programovanou buněčnou smrt a základní mechanismy rezistence nádorových buněk. Závěr teoretické části se bude věnovat popisu vlastností významných isochinolinových alkaloidů s potenciálem využití při terapii nádorových onemocnění. Cílem experimentální části je studium cytotoxické a antiproliferační aktivity vybraných isochinolinových alkaloidů. Záměrem je rozšířit výsledky základního screeningu o metody průtokové cytometrie s cílem lépe charakterizovat vliv studovaných látek na proliferaci a viabilitu modelových buněčných kultur.



## **2 Teoretická část**

### **2.1 Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie patří mezi molekulárně biologické metody. S její pomocí máme možnost kvantitativně i kvalitativně určit různé znaky na povrchu i uvnitř vyšetřované buňky a to na buněčné i molekulární úrovni. Umožňuje nám simultánní měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností nejen buněk, ale i různých částic během průchodu laserovým paprskem. Univerzálnost této metody vede k nespočtu možných aplikací v klinické praxi i ve výzkumných laboratořích například pro stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, analýzu buněčného cyklu, studium genové exprese, počítání a určení typu krevních buněk, detekci a charakterizaci mikroorganismů, třídění požadovaných částic, a mnoho dalších. V poslední době došlo k výraznému rozvoji této metody a dnes je standardně používána pro vysokorychlostní rozměrové a typové analýzy. Její široké uplatnění zahrnuje použití v klinické imunologii, klinické hematologii, při diagnostice a sledování nádorového bujení, ve farmakologii a toxikologii a dále k monitorování HIV pozitivních pacientů (Šinkorová a Zárybnická, 2008 a Suda 2005 a Jaha-Tigh et al. 2012 a Kurec 2014).

#### **2.1.1 Princip**

Průtoková cytometrie je metoda, umožňující simultánní měření a analýzu předem vybraných znaků a vlastností každé buňky nebo jiné biologické částice v heterogenní nebo homogenní buněčné populaci. Základem je unášení jednotlivých částic nebo buněk proudem nosné kapaliny a jejich průchod laserovým paprskem. Po interakci buňky a paprsku laseru dochází k lomu a rozptylu světla, čímž se zaznamenají dva základní parametry: velikost buněk a jejich granularita. Třetím základním parametrem je pak barevně definovaná fluorescence, kterou fluorochromem označená buňka emituje při průchodu laserovým paprskem dané vlnové délky (Kurec 2014 a Papandreou 2013).

Průtokové cytometry jsou dvojího typu: průtokové analyzátory a průtokové třídiče (anglicky sortery). Zatímco všechny průtokové cytometry jsou schopné analyzovat buňky, pouze speciální průtokové třídiče mohou třídit buňky podle různých kritérií. Průtokové cytometry jsou navrženy tak, aby měřily rozptýlené laserové světlo ze dvou odlišných úhlů a současně zaznamenávaly jeden nebo více emisních fluorescenčních signálů. Buňky jsou samostatně ze zkumavek různých typů a objemů nasávány, aspirovány do cytometru

a laminárním průtokem nosné tekutiny unášeny do prostoru určeného k měření. Pro snímací oblast se převážně používá křemenná kyveta, ve které je možno analyzovat 1000 až 10 000 buněk během několika sekund. Fluorochromy používané v cytometrii mají pro daný laser stejné absorpční, ale jiné emisní spektrum a jejich signál nám může poskytnout specificky definované parametry, například obsah DNA, povrchové receptory, pH a další (Mandy et al. 1995).

### **2.1.2 Základní komponenty**

Průtokový cytometr se skládá ze tří částí: první je fluidní systém umožňující hydrodynamickou fokusaci, druhou část tvoří optický systém se zdrojem světla, emisním systémem zahrnující soustavu optických zrcadel a filtrů a nakonec elektronický systém, který snímá a digitalizuje signál (Picot et al. 2012).

#### **2.1.2.1 Fluidní systém**

Pro správnou analýzu je třeba mít buňky ve formě suspenze, aby mohly procházet laserovým paprskem jedna po druhé, čímž se zajistí analýza vždy každé buňky zvlášť. Buňky jsou injektovány otvorem s malým průměrem do unášecí tekutiny, která je usměřována do laminárního toku. Tento proces se nazývá hydrodynamická fokusace a dá se měnit podle rozdílu tlaku vzorku a unášecí tekutiny. Suspenze buněk je konstantně hnána do měřicí komůrky, kde se procházející buňky kříží s monochromatickým laserem (Kurec 2014 a Picot et al. 2012).

#### **2.1.2.2 Optický systém**

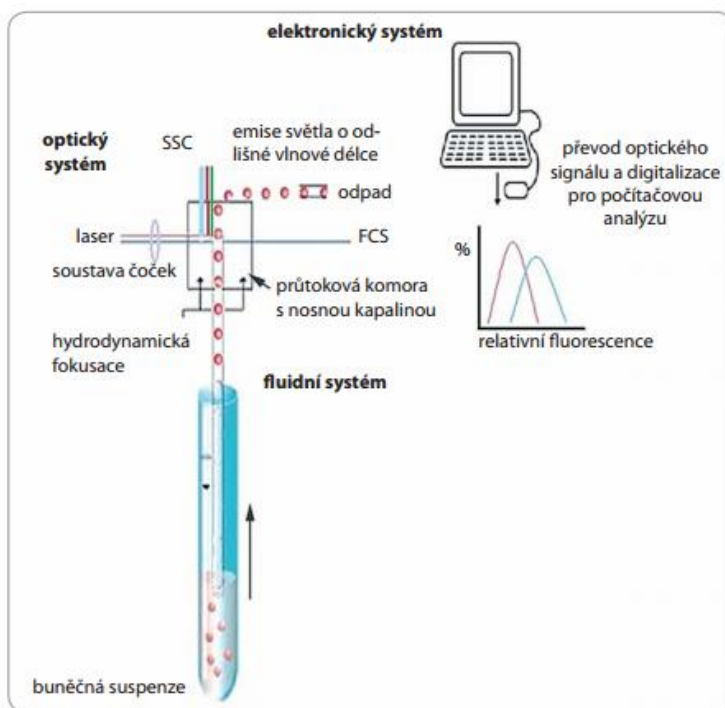
Optický systém se skládá z excitační části, kterou tvoří laser a sběrné části, kam patří soustava čoček, zrcadel a optických filtrů. Během průchodu buněk paprskem excitačního záření se detekuje rozptýl záření a v případě označení buňky fluorochromem také fluorescence. Tyto signály poté putují do fotodetektorů, kde jsou digitalizovány. Konečný osud buněk závisí na typu průtokového cytometru, buď odchází do sběrné odpadní nádoby, nebo se třídí do dalších zkumavek. Nejběžněji používaným monochromatickým zářením je laser, který vyzáří koherentní paprsek světla specifické vlnové délky. Průtokový cytometr může obsahovat od jednoho do několika laserů a tak je schopen excitovat několik fluorochromů rozdílných absorpčních maxim najednou. Čočky sbírají a usměřňují emitované záření, zrcadla a optické filtry rozdělují zachycené paprsky o různých vlnových délkách

(přesněji různých částech spektra elektromagnetického záření) k vhodnému detektoru (Mandy et al. 1995 a Picot et al. 2012 a Gilman-Sach 1994).

Záření, které dopadá na detektor (fotodiodu) přímo a lineárně, je dostatečně silné, nemusí se dále zesilovat a nazývá se Forward scatter (FS). Je to parametr určující velikost částice. Parametr určující granularitu částice představuje bočně rozptýlené záření dopadající kolmo na detektor. Nazývá se Side scatter (SS) a jeho intenzita musí být zesílena fotonásobičem (Picot et al. 2012 a Gilman-Sach 1994 a Šinkorová a Zárybnická, 2008).

### 2.1.2.3 Elektronický systém

Elektronika průtokového cytometru umožní převést optické signály (fluorescenci a rozptyl světla) na elektronické signály. Ty se následně zesilují a digitalizují. Každá individuální buňka poskytuje různé parametry získané analýzou, které se ukládají do tzv. List mode file, který slouží k dalšímu zpracování. Výsledky mají vždy grafickou a číselnou podobu, ať už jako jednoparametrové, dvouparametrové nebo víceparametrové histogramy, nebo hodnoty reprezentující zastoupení buněk s daným markerem v procentech (Šinkorová a Zárybnická, 2008).

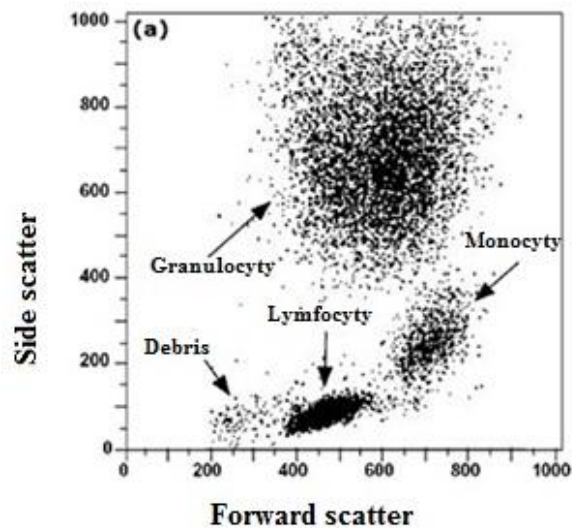


**Obr. 1:** Schéma sestavení průtokového cytometru. Upraveno podle: Pekarčíková et al. 2014.

### 2.1.3 Měření parametry

#### 2.1.3.1 Rozptyl světla (Forward scatter, Side scatter)

Základním principem je současné měření dvou optických parametrů. Během průchodu buňky paprskem světla dochází k lomu paprsku a jeho rozptylu. Odražené světlo se dělí podle směru a úhlu lomu na forward scatter (přímý rozptyl) a side scatter (boční rozptyl). FS má lom světla malého úhlu ( $0,5^\circ - 2^\circ$ ) a je úměrný velikosti částic. Boční rozptyl má úhel  $90^\circ$  a odráží vnitřní strukturu (granularitu) buňky. K zobrazení těchto dvou parametrů se používá dot - plot, což je dvourozměrný graf. Tento záznam se může použít např. k rozdělení bílých krvinek, jak je vidět na obr. 2. Velké a granulární buňky mají vyšší hodnoty SS a FS, monocyty jsou také velké, ale jejich granularita není tak vysoká, proto je jejich záznam s vysokým FS, ale nižším SS. Menší lymfocyty a lymfoblasty vytváří samostatnou populaci s nižším FS, nejsou granulární, a proto mají i nízké SS (Jahan-Tigh et al. 2012 a Kurec 2014).



**Obr. 2:** Dvourozměrný graf, tzv. dot - plot leukocytů (Abcam).

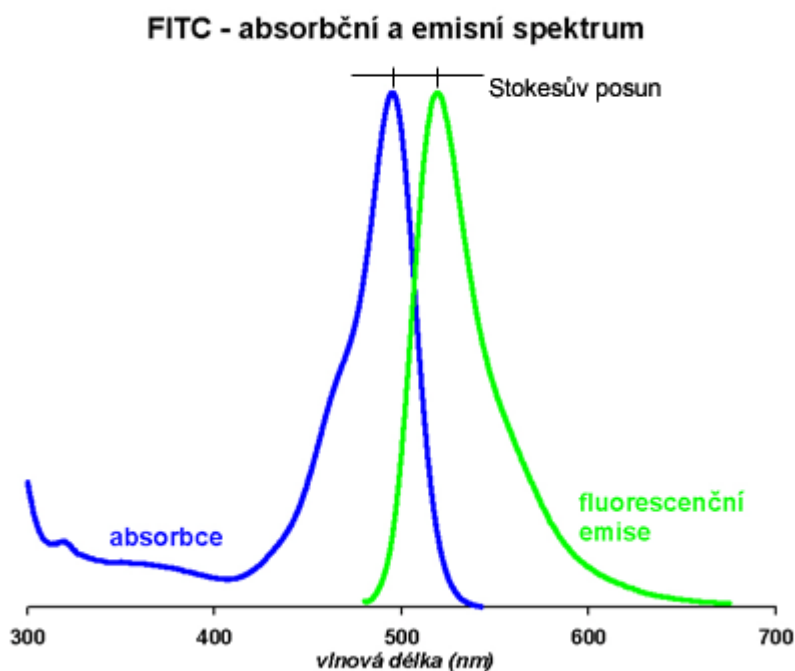
#### 2.1.3.2 Fluorescence

Třetím měřeným parametrem je fluorescenční záření, které má stejně jako SS nízkou intenzitu, proto se musí zesílit fotonásobičem. Fluorescence patří mezi sekundární záření, kdy dochází k vyzáření energie za velmi krátkou dobu. Tzn., po odstranění budícího zdroje přestane fluorescence zářit. K vyzáření světla dojde po pohlcení elektromagnetického záření látkou. Toto elektromagnetické záření se nazývá excitační, má kratší vlnovou délku a tudíž

vyšší energii než emitované elektromagnetické záření (Judson a Van le, 1997 a Lakowicz a Masters, 2008).

### Fluorescenční látky

Látky schopné absorpce elektromagnetického záření a jeho následné emise se nazývají fluorochromy (fluorofory). Společnou vlastností fluorochromů používaných v průtokové cytometrii je stejné absorpční spektrum pro určitý laser, ale jiné emisní spektrum. Absorbují světlo se stejnou vlnovou délkou, ale emitující světlo už má odlišnou vlnovou délku. Tento rozdíl lze rozlišit a detekovat. S tímto jevem se pojí důležitý termín známý jako Stokesův posun, který je zobrazen na obr. 3, a je charakteristický pro každý fluorochrom a znamená rozdíl mezi excitační vlnovou délkou a emisní vlnovou délkou (Albani 2008).



**Obr. 3:** Stokesův posun. Převzato z: Soukup 2004.

Značením buněk fluorochromy se mohou analyzovat různé buněčné biomolekuly, jako je DNA, RNA, proteiny, enzymy, lipidy, povrchové receptory (například HLA molekuly), specifické DNA sekvence, intracelulární komponenty, jako mitochondrie a chromozomy. Detekce je poté založena na separaci záření různých vlnových délek pomocí dichroických

zrcadel a optických filtrů, což umožňuje rozlišení různých struktur a povrchových markerů buňky (Durack a Robinson, 2004).

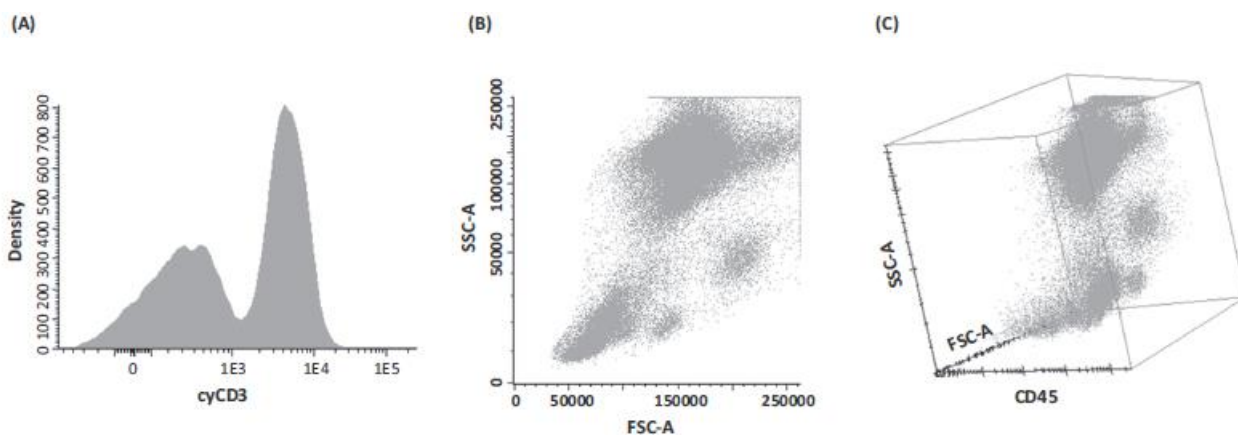
Mezi nejčastější fluorochromy používané v průtokové cytometrii patří fluoresceinizothiokyanát (FITC), phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cy5, Texas red a další. Ty mohou být konjugovány s monoklonálními popřípadě polyklonálními protilátkami. Dále jsou využívány fluorochromy specificky se vážící na buněčné komponenty, například propidiumjodid (PI) a jeho kovalentní vazba na DNA. Společnou vlastností těchto fluorochromů je jejich excitační vlnová délka 488 nm a zdrojem je tedy ve většině cytometrů argonový laser (Gilman-Sach 1994). Průtoková cytometrie se postupem let značně rozvíjí a v současné době je možné měřit přes 11 různých fluorescenčních látek v jedné analýze. Tato nová metoda se nazývá mnohobarevná průtoková cytometrie. Její budicí systém obsahuje více typů laserů a umožňuje tak současné využití několika fluorochromů najednou. Ve srovnání s klasickou průtokovou cytometrií poskytuje mnohobarevná průtoková cytometrie mnohem větší množství informací o analyzovaném vzorku. Je možné identifikovat vzácné buněčné populace, charakterizovat buněčné podskupiny a může být rozhodující pro stanovení patogeneze složitých imunologických onemocnění. Používanými lasery v mnohobarevné průtokové cytometrii jsou například helium-neonový laser o vlnové délce 632 nm, kryptonový o vlnové délce 407 nm nebo laser-diodový o vlnové délce 635 nm. Fluorochromy používané pro vícebarevnou průtokovou cytometrii jsou například allophycocyanin (APC), APC-Cy5 nebo iododicarboxycyanin (Cy5) (Baumgarth a Roederer, 2000 a Ormerod 2000 a Shapiro 2005).

Překážkou mnohobarevné průtokové cytometrie jsou fluorescenční přesahy. Fluorochromy totiž mají široká emisní spektra, proto není vyloučené jejich překrývání během analýzy. V důsledku těchto spektrálních překryvů mohou vznikat komplikace v rozlišení skutečných populací. Existuje však způsob korekce této chyby, tzv. kompenzace, kdy se nastavením v softwaru matematicky odstraní tento fluorescenční překryv (Baumgarth a Roederer, 2000).

Intenzita emitovaného fluorescenčního záření je přímo úměrná množství vazebných míst přítomných na buňce nebo částici určených pro fluorescenční látku. Tzn. čím více přítomných vazebných míst, tím je intenzita fluorescence vyšší (Baumgarth a Roederer, 2000).

## 2.1.4 Analýza dat

Data uložená v průběhu měření v List mode file, jsou připravena k další analýze. K jejich zobrazení se používají různé grafické záznamy – jednoparametrové, dvouparametrové histogramy nebo také 3D zobrazení základních parametrů – například rozptyl světla a fluorescence (Pedreira et al. 2013). Jednoparametrový histogram zobrazuje intenzitu signálu v reálném čase, kdy je na osu x vynesena intenzita signálu a na osu y množství buněk. Jednoparametrový histogram se většinou používá pro zobrazení intenzity fluorescence v jedné rovině, buď logaritmické nebo lineární škále. Pro složitější analýzy heterogenní buněčné populace se používají dvouparametrové dot - plot histogramy, kdy na ose x je vynesena intenzita jednoho signálu a na ose y intenzita druhého signálu. Každý bod vyneseny v tomto histogramu představuje konkrétní buňku. Hustota bodů v histogramu určuje množství přítomných buněk (tzv. dot – plot histogram). V multiparametrové analýze je možno selektovat heterogenní buněčnou populaci na základě dvou parametrů (velikost, granularita) a dále je možno je rozlišit díky expresi dalších markerů. Tato selektivní analýza a zobrazení konkrétní cílové populace se nazývá gating. Umožňuje rychlou a objektivní analýzu buněk, aniž by musely být fyzicky izolovány (Gilman-Sach 1994). Tímto způsobem získáme z klasického dvouparametrového bodového grafu až pěti-dimenzionální vizualizaci (Chattopadhyay a Roederer, 2012).



**Obr. 4:** A - klasický 1D histogram, B - 2D histogram, C – 3D histogram s použitím dvou světelných parametrů spojených s třetím parametrem (CD45 intenzita fluorescence).

Upraveno podle: Pedreira et al. 2013.

### **2.1.5 Využití v klinické praxi**

Průtoková cytometrie je velmi všestranná metoda analýzy buněk používaná napříč různými obory. Největší uplatnění nachází v klinické imunologii, hematonekologii, nádorové biologii a molekulární biologii. V nádorové a molekulární biologii se používá například k analýze buněčného cyklu, detekci apoptózy, sledování průniku léčiv do buněk, stanovení nukleových kyselin, stanovení ploidie. V následujícím přehledu budou zmíněny jen některé z nejpoužívanějších metod týkajících se nádorové biologie (van den Engh 1993). Což se týká převážně studia apoptózy, které je v posledních letech předmětem velkého zájmu. Pochopení a využití tohoto fyziologického procesu tkví v modulaci mechanismů kontrolujících apoptózu a tedy možný způsob léčby nádorových onemocnění, ať už spontánně nebo léčbou navozená apoptóza v nádorech (Eckschlager et al. 1999).

#### **2.1.5.1 Analýza změny optických vlastností buňky**

Nejjednodušší použití průtokové cytometrie v rozlišení apoptózy a nekrózy jsou právě optické vlastnosti. V počátečních fázích apoptózy se buňka postupně zmenšuje, zatímco membrána zůstává celistvá. K nekróze dochází po selhání membránové integrity. V důsledku buněčných změn u apoptózy FS klesá, protože se cytoplasma smršťuje, zatímco SS stoupá díky fragmentaci jádra. Po několika hodinách dochází k poklesu obou parametrů v důsledku vzniku apoptotických tělísek (Darzynkiewicz et al. 1992). U nekrózy dochází k počátečnímu vzestupu FS i SS následován rychlým poklesem obou parametrů (Dive et al. 1992).

#### **2.1.5.2 Analýza kondenzace chromatinu a propustnosti buněčné membrány**

Průtokovou cytometrií se může kvantitativně hodnotit rychlost příjmu a uchování některých barviv u apoptotických a nekrotických buněk. V závislosti na propustnosti plasmatické membrány živých, mrtvých a apoptotických buněk a tedy vstup a vazba barviv jako je PI, ethidium bromid (EB) nebo Hoechst-33342 na DNA, je možné tyto buňky rozlišit. Po vstupu PI do nekrotických buněk není vyloučen, ale váže se na DNA a způsobuje vznik červené fluorescence nekrotického jádra. Apoptotické buňky PI vyloučí a neobarví se. Vitální buňky přijímají Hoechst-33324 a to vytváří modrou fluorescenci buněčné DNA. Takto je možné rozlišit vitální buňky vykazující modrou fluorescenci, nekrotické buňky s červenou fluorescencí a apoptotické buňky s žádnou nebo velmi slabou červenou fluorescencí (Pollack a Ciancio, 1991, Dive et al. 1992).



### **2.1.5.3 Analýza změny asymetrie a propustnosti buněčné membrány**

Živé neporušené buňky mají v buněčné membráně fosfolipidy uspořádané tak, že fosfatidylcholin a sfyngomyelin jsou na vnějším povrchu a fosfatidylserin (PS) na vnitřním. Během apoptózy se plasmatická membrána mění, resp. mění se její povrchové struktury, kdy dochází k externalizaci PS (Eckschlager et al. 1999). Tento jev se využívá k průkazu apoptotických buněk interakcí s Annexinem V, který se právě váže na PS v přítomnosti vápenatých iontů (Andree et al. 1990 a Tait et al. 1989). Použitím Annexinu V značeným fluoresceinem v kombinaci s PI se dají rozlišit živé, apoptotické a nekrotické buňky (Van Engeland et al. 1996 a Van den Eijnde et al. 1997). Annexin V je protein, který má vysokou afinitu k fosfolipidům, v tomto případě k fosfatidylserinové struktuře. Proto jeho vazbou získáme přehled o populaci apoptotických buněk, jelikož na živé se navázat nemůže, protože není schopen proniknout přes fosfolipidovou dvouvrstvu. Barvením Annexinem V značeným fluorescenčním barvivem v kombinaci s PI je možné rozlišit až čtyři populace buněk: živé buňky (Annexin V a PI negativní), apoptotické (Annexin V pozitivní a PI negativní), v pozdní fázi apoptózy (Annexin V a PI pozitivní) a nekrotické (Annexin V negativní a PI pozitivní) (Van Engeland et al. 1998).

### **2.1.5.4 Analýza změny mitochondriálního potenciálu buňky**

Tvorba a otevření pórů způsobí asymetrické rozdělení protonů a dalších iontů na obou stranách vnitřní mitochondriální membrány a tím dochází ke změně mitochondriálního membránového potenciálu (Martinou 1999). Vnitřní strana vnitřní mitochondriální membrány je nabitá záporně a tak se kationtové lipofilní fluorochromy dostávají do matrix mitochondrií a tam se hromadí (Kroemer et al. 1997). Znakem časně fáze apoptózy je ztráta mitochondriálního potenciálu a tím i nemožnost přestupu fluorochromů do matrix mitochondrií (Marchetti et al. 1996). K analýze změny mitochondriálního potenciálu se používá několik typů lipofilních kationtových fluorochromů např.: rhodamin 123, JC-1 (3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine jodid), DiOC6 (3,3'-dihexyloxycarbocyanine jodid) (Kroemer et al., 1997). Živé metabolicky aktivní buňky inkubované s těmito barvivy propouští fluorochromy do matrix mitochondrií a intenzita záření zvoleného fluorochromu odráží změnu membránového potenciálu. Rhodamin 123 v kombinaci s PI je schopen rozlišit živé a apoptotické buňky. Vazbou fluorochromu JC-1 na mitochondrie je detekován posun barvy fluorescence ze zelené, která je charakteristická pro jeho monomerní strukturu na

oranžovou, charakterizující jeho agregaci v mitochondriích viabilních buněk (Vermes et al. 2000).

Mezi účinnější metody průkazu apoptotických buněk se řadí ty, které hodnotí fragmentaci DNA (Huang et al. 2005).

#### **2.1.5.5 Stanovení buněk sub G0/G1 analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA**

Charakteristickým rysem apoptózy je fragmentace DNA. Aby byl tento rys apoptózy detekován, je potřeba v první fázi permeabilizovat buněčnou membránu buněk. K tomu se používají různé detergenty, například ethanol, methanol nebo aceton. V důsledku permeabilizace dochází k úniku fragmentované DNA z buňky a výsledkem je populace buněk se sníženým obsahem DNA – sub G0/G1 (subdiploidní obsah DNA). Po obarvení interkalačními činidly jako je PI získáme profil prezentující buňky v G1, S a G2/M fázi a apoptotické buňky představující sub G0/G1 pík, který se nachází na levé straně histogramu (Gong et al. 1994 a Darzynkiewicz et al. 1997). V pozdější fázi apoptózy dochází k úplné ztrátě DNA v důsledku tvorby apoptotických tělísek obsahujících fragmenty chromatinu (Halicka et al. 2000). Vzhledem k měření obsahu DNA může tento přístup ukázat fáze buněčného cyklu normálních buněk a tím odhadnout podíl buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu stejně dobře jako kvantifikace apoptotických buněk v sub G1 píku. Obecnou výhodou je jednoduchost a nízké náklady na danou metodu (Bruno et al. 1992 a Halicka et al. 2002). Nevýhodou je, že sub G0/G1 apoptotický pík nemůže být použit jako jediný marker apoptózy, protože k fragmentaci DNA nemusí dojít výlučně při apoptóze (Darzynkiewicz et al. 2001).

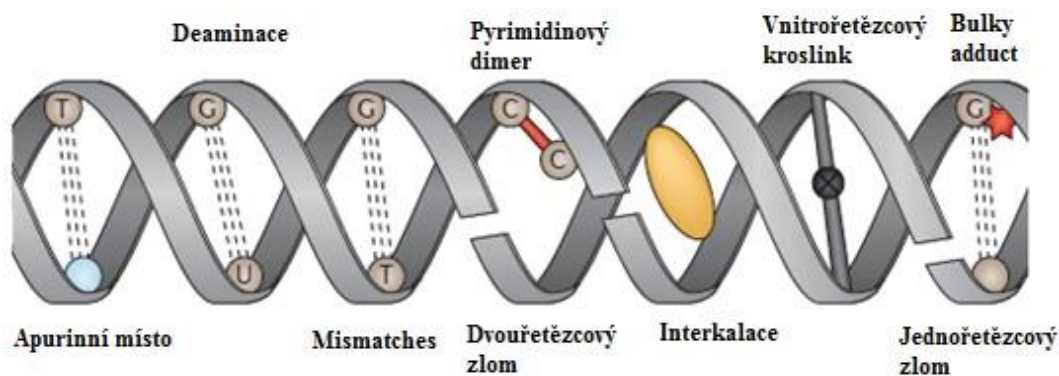
#### **2.1.5.6 TUNEL assay**

TUNEL je zkratka pro celý název (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) (Heatwole 1999). Tato metoda je dle některých literárních zdrojů nejpoužívanější z metod pro studium apoptózy. Je založena na specifické vazbě nukleotidu dUTP značeného biotinem nebo fluoresceinem na 3'OH konce fragmentované DNA za katalýzy deoxynukleotidy-ltransferazy. Pokud je nukleotid značen biotinem, detekuje se pomocí avidin-peroxidasy (Gavrieli et al. 1992). Nevýhodou této metody je náročné zpracování a zdlouhavá manipulace se vzorky. TUNEL assay může být použita nejen pro suspenzní buňky pěstované v kultuře, adherentní buňky, ale i pro tkáňové řezy. Metoda je také velmi spolehlivá v porovnání s jinými metodami (Huerta et al. 2007).

## 2.2 Vliv cytotoxických a cytostatických látek

### 2.2.1 Mechanismy poškození jaderné DNA

Chemoterapeutika a klasická cytostatika navozují genotoxický stres poškozením molekuly jaderné DNA. Nejčastější typy poškození DNA zahrnují poškození bází, vznik abázických segmentů, jednoduché a dvojité zlomy DNA (single-strand break – SSB, double-strand break – DSB). První reakcí na poškození DNA je zástava buněčného cyklu a aktivace opravných procesů DNA. Pokud je poškození příliš velké nebo dochází k selhání reparačních procesů, nastává nejčastěji smrt buňky. K indukci programované buněčné smrti (apoptózy) dochází následkem hromadění velkého počtu neopravené DNA doprovázené kolapsem mitózy a aktivací intracelulárních signálních proteinů. Dnes je již dobře známo, že v průběhu buněčného cyklu živočišných buněk dochází k pravidelným kontrolám integrity DNA v kontrolních bodech (checkpoints). Tyto body se nachází mezi fázemi G1 a S (G1-S checkpoints), po dokončení syntézy DNA (S-G2 checkpoint) a mezi fázemi G2 a M (G2-M checkpoint). Aby mohl být zahájen striktně regulovaný děj reparace DNA, dochází k zástavě buněčného cyklu v těchto kontrolních bodech. Zástavu buněčného cyklu řídí specifické proteiny. Stabilizací transkripčního faktoru tumor-supresorového proteinu p53 se zastaví buněčný cyklus v bodě G1-S a aktivací kináz CHK1/CHK2 se zastaví v bodě G2-M (Klener a Klener, 2013). Nejznámější chemoterapeutika (cytostatika) používaná k terapii nádorových onemocnění obsahují chemické sloučeniny na bázi platiny, jako je např. cisplatina nebo její analog, karboplatina (Helleday et al. 2014). Cisplatina je chemoterapeutikum, které se používá v léčbě celé řady karcinomů, například karcinom varlat, vaječníků, močového měchýře, děložního čípku nebo karcinomu plic. Hlavním mechanismem protinádorového účinku je interakce s DNA a vznik kovalentní vazby mezi chemoterapeutikem a purinovou bází. Tím vznikají vnitřetězcové a meziřetězcové kroslinky, zabraňující oddálení řetězců při replikaci. Expozice buněk cisplatině vede k zástavě jejich buněčného cyklu v S, nebo G2 fázi, čímž každá jednotlivá buňka získá čas pro adekvátní opravy zmíněného poškození DNA. Příliš velké poškození, které buňka nedokáže během zástavy buněčného cyklu opravit, však vede k buněčné smrti prostřednictvím apoptotického mechanismu (Ho et al. 2003).



**Obr. 5:** Typy poškození DNA. Upraveno podle: Helleday et al. 2014.

## 2.2.2 Typy reparace DNA

### 2.2.2.1 Nehomologní spojování konců (NHEJ)

Nejzávažnějším typem poškození DNA jsou dvouřetězcové zlomy, které může způsobit celá řada činitelů, jako ionizující záření, chemoterapeutické látky, ale také některé endogenní vlivy. Pokud takto poškozená DNA není opravena před replikací nebo mitózou, mohou tyto zlomy indukovat apoptózu. Pokud jsou zlomy nesprávně opraveny, mají potenciál pro vznik chromozomálních translokací a genomové nestability. Mechanismem opravy DNA pomocí NHEJ je přímé spojení rozlomených konců DNA. Této opravy se účastní proteiny DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-PK), XRCC4, DNA-ligázy IV a heterodimery Ku70/80 (Klener a Klener, 2013).

### 2.2.2.2 Homologní rekombinace (HR)

HR je na rozdíl od NHEJ velmi přesným mechanismem opravy DNA. HR je predominantně aktivována spolu se zástavou buněk v S a G2 fázi buněčného cyklu. Mechanismus je přesný díky použití sesterské chromatidy jako templátu pro přesnou opravu poškozené DNA. Celého procesu se účastní multiproteinový komplex obsahující BRCA1, BRCA2, RAD51, RAD52, RAD54, XRCC2, XRCC3 a další molekuly (Vriend a Krawczyk, 2017).

### 2.2.2.3 DNA mismatch repair (MMR)

MMR systém má významnou roli v korekci správného párování bází během replikace a rekombinace, které unikly opravným mechanismům. Dalším důležitým úkolem MMR je oprava inserce nebo delece smyček (IDLs – insertion/deletion loops), které vznikají na

základě „prokluzu“ polymeráz během replikace. MMR mechanismus pracuje na základě tří kroků. Prvním krokem je rozpoznání špatného spárování bází, dále dochází k degradaci části řetězce a vznik mezery a následná oprava mezery a resyntéza DNA. MMR proces je zprostředkován dvěma hlavními proteinovými komplexy MutS a MutL (Dexheimer 2013).

#### **2.2.2.4 Base excision repair (BER)**

BER je odpovědný za opravu bází DNA. Je to vysoce koordinovaný proces několika po sobě jdoucích enzymatických reakcí. Primárně dochází k odstranění poškozených bází specifickými glykosylázami, čímž vznikne abázické místo. Následné zpracování konců zlomeného vlákna, syntéza DNA a ligace (Dexheimer 2013).

#### **2.2.2.5 Nucleotide excision repair (NER)**

NER je vysoce univerzálním reparačním mechanismem schopným rozpoznat a odstranit celou řadu rozměrných lézí narušujících šroubovici DNA. Mezi nejvýznamnější léze patří pyrimidinové dimery nebo vnitrořetězcové příčné vazby. Mechanismus NER zahrnuje několik kroků. Rozpoznání léze, otevření DNA šroubovice kolem místa léze, následné odstranění krátkého jednovláknového segmentu poškozené DNA a konečnou syntézu sekvence a její ligaci (Dexheimer 2013).

### **2.2.3 Programovaná buněčná smrt**

#### **2.2.3.1 Apoptóza**

Programovaná buněčná smrt je základní buněčný program, který je vlastní každé buňce lidského těla (Fulda 2015). Termín apoptóza jako programovaná buněčná smrt byl poprvé použit v roce 1972, i když náznaky tohoto procesu a určité komponenty byly popsány o mnoho let dříve. Apoptóza je fyziologickým procesem doprovázejícím vývoj i stárnutí organismu a je nezbytná pro udržení buněčných populací v tkáních. Apoptóza je také důležitým obranným mechanismem, který hraje důležitou roli u imunitních reakcí buněčné imunity a mechanismů eliminace buněk. Ačkoli existuje široká škála podnětů, jak fyziologických, tak patologických pro zahájení apoptózy, ne všechny buňky reagují na podněty stejně. Ačkoli ionizující záření nebo léky používané v chemoterapii poškozují DNA ve všech buňkách, některé typy buněk vykazují rezistenci k aktivaci apoptózy. Některé hormony, například kortikosteroidy způsobují apoptózu u thymocytů, avšak jiné typy buněk nejsou tímto proapoptotickým účinkem ovlivněny (Elmore 2007). Apoptóza tedy hraje klíčovou roli jak ve fyziologických procesech, tak i v různých patologických stavech.

Homeostáza tkání je tak udržována jemnou rovnováhou mezi buněčnou smrtí na jedné straně a proliferací buněk na druhé straně. Případné změny v této rovnováze jsou základem pro vznik mnoha onemocnění (Fulda 2015).

Společně s procesem řízené buněčné smrti mechanismem apoptózy je potřeba rozlišovat mechanismus nekontrolovaného zániku buňky, který je označován jako nekróza. Zajímavostí je, že v některých případech proces smrti určuje typ nebo stupeň podnětů. Nízké dávky různých škodlivých stimulů, ať už je to teplo, radiace, chemoterapeutika, mohou indukovat apoptózu, ale tyto stejné podněty mohou vést při vyšších dávkách k nekróze (Elmore 2007).

### **Morfologické znaky apoptózy**

Během apoptózy dochází k typickým morfologickým změnám. Časnou apoptózu charakterizuje smršťování, buňky jsou tedy menší, cytoplasma se zhušťuje a organely jsou naopak větší. Nejdůležitějším charakteristickým znakem je pyknóza, tedy kondenzace chromatinu. Dále nastává blebbing membrány (váčkovité výrůstky z membrány) doprovázený oddělením buněčných fragmentů formujících se do apoptotických tělísek. Apoptotická tělíska obsahují cytoplasmu s organelami a jaderné fragmenty. Buď mohou, anebo nemusí být přítomny. Integrita organel je stále zachována uzavřením intaktní plasmatické membrány, jejíž molekulární změny tzv. „eat me“ signály, jsou důležité pro zahájení fagocytózy *in vivo*. Apoptotická tělíska jsou následně fagocytována makrofágy bez známek zánětlivých reakcí (Häcker 2000).

### **Mechanismus apoptózy**

Programovaná buněčná smrt je velmi složitý proces, který probíhá na základě kaskádovitých molekulárních reakcí. Její mechanismus se skládá ze dvou přísně regulovaných hlavních apoptotických cest: vnější receptorová dráha a vnitřní mitochondriální dráha. Existuje však ještě perforin-granzymová dráha zprostředkovaná cytotoxickými T-buňkami (Elmore 2007).

## **Vnější cesta aktivace apoptózy**

Vnější cesta přenáší signály z vnějšího prostředí do intracelulárního prostředí pro zahájení apoptózy. Receptory lokalizované v rámci buněčného povrchu jsou integrovány do plazmatické membrány a aktivovány po interakci s jejich přirozenými ligandy. Tyto receptory smrti jsou např. Fas receptor (známý také jako CD95 nebo Apo1), DR4 a DR5 nebo TNFR-1 a TNFR-2, jejich odpovídající receptorové ligandy jsou FasL, TRAIL ligand (apoptózu indukující ligand související s TNF) a TNF (tumor nekrotizující faktor). Pro zahájení apoptózy je potřeba simultánní vazba alespoň tří ligandů. Vazba receptorů s ligandy vede k oligomerizaci receptorů smrti a následně k převedení navázaných ligandových molekul do intracelulárního prostoru, které s pro-kaspázou-8 vytvoří DISC komplex (death-inducing signaling complex). Uvnitř tohoto komplexu poté dojde k proteolytickému štěpení pro-kaspázy-8 na kaspázu-8. Kaspáza-8 pak může přímo aktivovat další kaspázy, jako kaspázu-3, nebo nepřímo iniciovat aktivaci vnitřní mitochondriální cesty prostřednictvím proteolytického štěpení Bid na zkrácený (truncated) tBid (pro-apoptotický člen rodiny Bcl-2 proteinů). tBid se poté přemístí na vnější mitochondriální membránu, kde způsobí její permeabilizaci a uvolnění molekul cytochromu c, AIF (apoptózu indukující faktor), EndoG (endonukleázy G), prostřednictvím interakce s dalšími Bcl-2 proteiny přítomnými na mitochondriální membráně (Fulda 2015 a Elmore 2007 a Fulda a Debatin, 2006 a Ficková a Nagy, 2007).

Aktivace vnější cesty může být také zahájena granzymy, produkovanými cytotoxickými T-lymfocyty a buňkami označovanými jako natural killer (NK). Ty se dostávají do cytoplasmy póry vytvořenými specifickými proteiny perforiny, které taktéž produkují T-lymfocyty nebo NK buňky. Tato cesta iniciuje štěpení kaspázy-3 s následnou fragmentací DNA, degradací cytoskeletu a tvorby apoptotických tělísek (Elmore 2007).

## **Vnitřní cesta aktivace apoptózy**

Vnitřní signální dráhy zahrnují mnoho podnětů, které nejsou zprostředkované receptory, ale přímo působí na struktury uvnitř buňky. Podněty mohou spouštět intracelulární signály pozitivním nebo negativním způsobem. Negativní signály jsou způsobeny nepřítomností určitých růstových faktorů, hormonů nebo cytokinů, což může vést k selhání procesu potlačení apoptózy a tím její spuštění. Podněty způsobené pozitivními signály jsou

záření, toxiny, hypoxie, virové infekce, vysoké koncentrace vápníku nebo volné radikály (Elmore 2007 a Jayakiran 2015).

Tyto podněty finálně způsobí změny ve vnitřní mitochondriální membráně, dojde ke zvýšené permeabilitě membrány a tvorbě pórů, což vyústí ve ztrátu mitochondriálního transmembránového potenciálu. Důsledkem je uvolnění pro-apoptotických proteinů, jako je cytochrom c, SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO (direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein), AIF, EndoG, CAD (caspase activating DNase) a serinové proteázy HTRA2/OMI z mitochondrie do cytosolu a tyto následně aktivují kaspázy zahrnuté v mitochondriální dráze apoptózy. Na molekulární úrovni se cytochrom c váže na Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), tím umožní vazbu Apaf-1 společně s ATP a prokaspázou-9 za vzniku apoptozómu. V tomto komplexu se prokaspáza-9 autoproteolyticky aktivuje a je schopná dále aktivovat další kaspázy-3, -6 a -7. Proteiny SMAC/DIABLO a HTRA2/OMI podporují apoptózu inhibicí IAP proteinů (inhibitor of apoptosis proteins). AIF je transportována do jádra, kde působí fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu. Endonukleáza G společně štěpí chromatin na oligonukleosomální fragmenty. Následně je z mitochondrie uvolněna deoxyribonukleáza označována jako caspase-activated DNase (CAD), která se přemístí do jádra, kde je současně aktivována kaspázou-3, což vede k oligonukleosomální fragmentaci DNA a pokročilé kondenzaci chromatinu (Elmore 2007 a Ficková a Nagy, 2007)

Celý tento proces kontroluje skupina apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2. Bcl-2 je skupina protoonkogenů, které byly poprvé objeveny v souvislosti s lymfomem B-buněk a odtud název Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Tato rodina se skládá z pro-apoptotických a anti-apoptotických členů zodpovědných za propustnost mitochondriální membrány. Pro-apoptotické proteiny zahrnují Bax, Bak, Bok/Mtd a Bcl-x<sub>s</sub>, a jejich role je v podpoře uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Mezi anti-apoptotické patří samotný Bcl-2, dále Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Boo/Diva, Nrf-3 a Bcl-B. Jejich funkcí je blokáce pro-apoptotických proteinů a zamezení aktivace apoptózy. Převládající skupina proteinů rozhodne o dalším osudu buňky (Cory a Adams, 2002 a Gross et al. 1999).

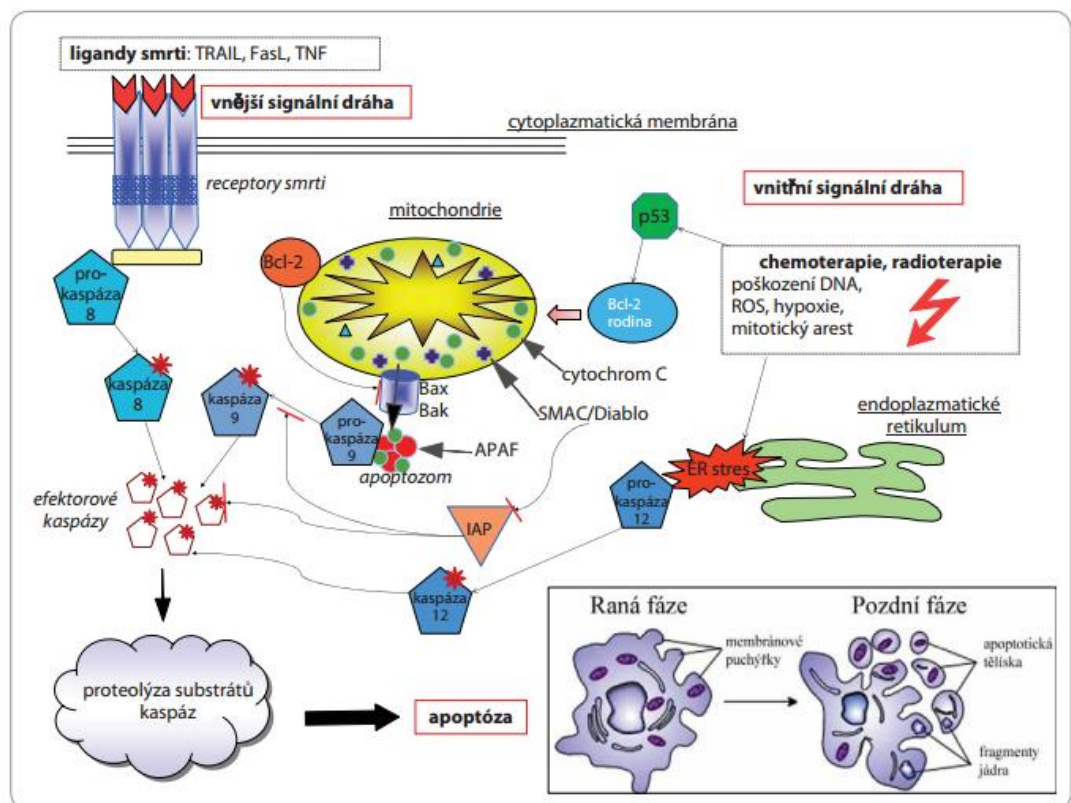
Nejčastější příčinou aktivace vnitřní cesty apoptózy je působení genotoxických agens (reaktivní formy kyslíku, cytostatika, ionizující záření), kdy dochází k poškození DNA a následné aktivaci proteinu p53 jeho fosforylací. Aktivovaný protein p53 se váže na DNA na



specifických regulačních místech a indukuje transkripci příslušných genů, například výše zmíněných pro-apoptotických genů rodiny Bcl-2 (Tintěra et al. 2010).

### Finální dráha

Vnější a vnitřní cesta apoptózy je konečná po aktivaci exekučních kaspáz. Tyto kaspázy poté aktivují cytoplasmatické endonukleázy, které degradují buněčný materiál a proteázy, a ty štěpí jaderné a cytoskeletární proteiny. Nejdůležitější kaspázou v tomto procesu je kaspáza-3, která specificky aktivuje endonukleázu CAD. CAD způsobuje kondenzaci chromatinu. Kaspáza-3 také indukuje reorganizaci cytoskeletu a formaci do apoptotických tělísek. Poslední fází apoptózy je fagocytární vychytávání apoptotických buněk, přičemž znakem této fáze je externalizace fosfatidylserinu na povrchu těchto buněk nebo jejich fragmentů a tedy signál pro rychlé odstranění fagocyty v organismu (Elmore 2007).



**Obr. 6:** Vnější a vnitřní cesta aktivace apoptózy. Upraveno podle: Ondroušková a Vojtěšek, 2007.

### **2.2.3.2 Nekróza**

Nekróza byla vždy považována za typ nekontrolované buněčné smrti charakteristická rozpadem plazmatické membrány a buněčným kolapsem. Je zřejmé, že v náročných podmínkách (chemické látky, zmrazení, rozmrazení atd.), buňky umírají prostřednictvím neregulovaného nekrotického procesu. Nicméně bylo zjištěno, že nekróza může být programována a její průběh je charakterizován kaskádou různých dějů. Tedy v závislosti na kontextu může být nekróza neregulovaná, nebo naopak programovaná (Goldstein a Kroemer, 2007). K nekróze dochází, pokud je mechanismus apoptózy nefunkční nebo zablokovaný. Má ale význam i v obraně před virovými infekcemi. U nádorových buněk může hrát roli v jejich usmrcení při defektu v apoptotické dráze. Problém však nastává při nekontrolovaném vyplavení cytosolového obsahu nekrotických buněk, vzniku lokální zánětlivé reakce a tím podpora angiogeneze a proliferace nádorových buněk (Ondroušková a Vojtěšek, 2007).

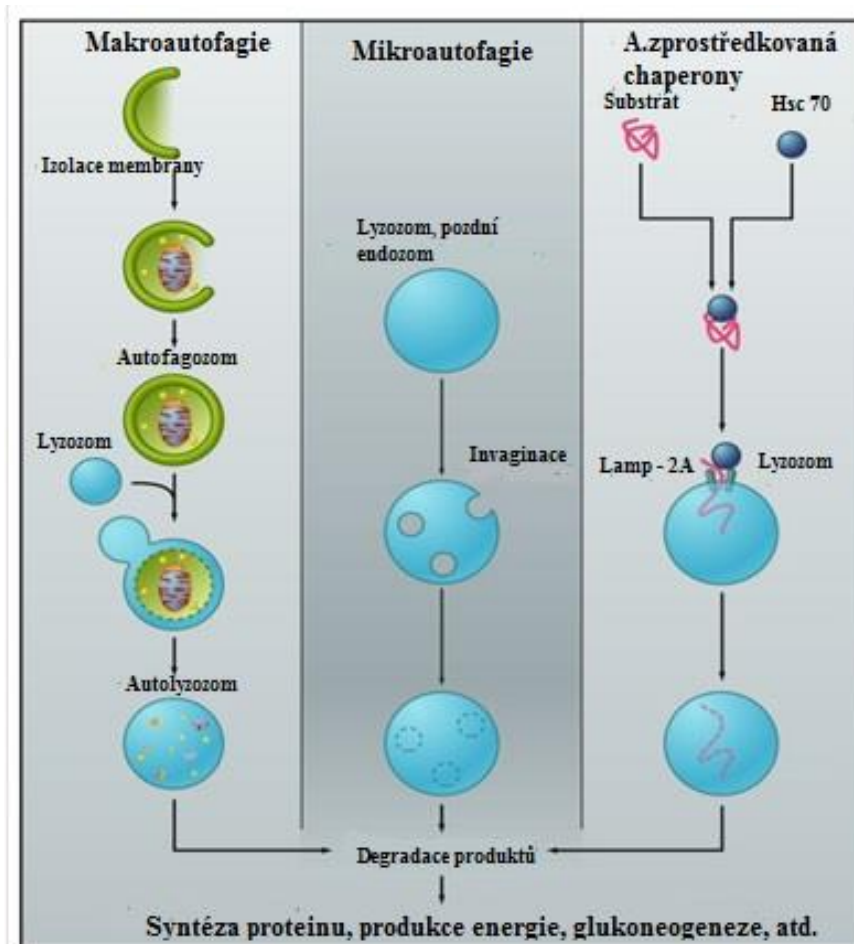
Nedávným objevem byly klíčové mediátory nekrotické smrti zahrnující RIP kinázy (receptor interacting protein kinases), PARP1 (poly(ADP-ribose)polymerase-1), NADPH oxidázy a kalpainy. Aktivace nekrózy může být zahájena různými stimuly, například nedostatkem ATP, přítomností patogenů, ischemie tkáně nebo vazbou ligandů smrti. Interakce proteinů smrti jako jsou TNF $\alpha$ , TRAIL, FasL s jejich receptory vede k tvorbě komplexu tvořeného kaspázou-8, adaptorovým proteinem FADD (FAS-associated death domain protein) a kinázou RIP1. Za normálních podmínek aktivní kaspáza-8 štěpí RIP1 a deaktivuje jí. Nicméně kaspázy mohou být inaktivovány např. virovými kmeny. V takových případech je formován komplex sestávající z kaspázy-8, FADD, RIP1 a RIP3. Následně komplex RIP1-RIP3 interaguje s metabolickými enzymy jako je fosforyláza, glutamátamonium ligáza a glutamátdehydrogenáza1 a tím se zvýší oxidativní metabolismus a zvýšená tvorba reaktivních kyslíkových radikálů. Přebytek radikálů způsobí permeabilizaci mitochondriální membrány vedoucí k nekróze. V buňce se však odehrává mnoho biochemických změn, které vedou k buněčné smrti, a není tedy jasné, která změna je pro buňku zásadní (Ondroušková a Vojtěšek, 2007 a Ouyang et al. 2012).

### **2.2.3.3 Autofagie**

Autofagie je buněčným mechanismem sloužícím k intracelulární degradaci cytoplasmatického materiálu. Autofagie pochází z řeckého „auto“=sebe, „phagein“=pojídat, významem schopnost buňky strávit a opět využít své části. Existují tři typy autofagie: makroautofagie, mikroautofagie a autofagie zprostředkovaná chaperony. Při makroautofagii

jsou organely a rozpustné buněčné materiály uzavírány do autofagozomu, který následně fúzuje s lyzozomem a buněčný materiál je v něm hydrolyticky degradován. Mikroautofagií sám lyzozom invaginuje malé složky cytoplasmy. Třetí typ autofagie zprostředkovaná chaperony rozkládá specifické proteiny, obsahující pentapeptidový motiv KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). Tyto proteiny se specificky váží s proteinem LAMP2a (lysosome-associated membrane protein 2a) a dále jsou rozpoznány molekulárními chaperony a tedy přednostně degradovány. Degradované produkty jsou poté recyklovány na nové produkty nebo zpracovány jako zdroj energie. (Mizushima a Komatsu, 2011 a Ondroušková a Vojtěšek, 2007).

Autofagie je velmi důležitým mechanismem pro přežití buněk za stresových podmínek a období hladovění. Pochopení jejího uplatnění v reakci živočišných buněk je ve vývoji, kdy je dále diskutována role autofagie v diferenciaci a přestavbě tkání, ale i úloha v rámci obranného systému před patogeny. V některých případech může autofagie naopak přispět ke vzniku nemoci, například u nádorových onemocnění paradoxně podporuje přežití nádorových buněk (Todde et al. 2009).



**Obr. 7:** Odlišné typy autofagie. Upraveno podle: Mizushima a Komatsu, 2011.

#### 2.2.4 Rezistence nádorových buněk

V dnešní době je léčba nádorových onemocnění na vysoké úrovni, nicméně její úspěšnost komplikuje rezistence na cytostatika, která je příčinou selhání protinádorové terapie. Nádorové buňky jsou schopné různými mechanismy rezistence odolávat působení cytostatik. V případě odolnosti nádorových buněk při první léčbě se jedná o primární rezistenci. Sekundární neboli získaná rezistence vzniká až v průběhu léčby. Ačkoli byly nádorové buňky původně citlivé na cytostatika, během léčby se jejich rezistence navýšila a tím se snížila účinnost cytostatik. Během terapie může dojít ke vzniku rezistence na více chemoterapeutik. V takovém případě se jedná o mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR – multidrug resistance) (Nosková et al. 2000).

Mechanismy lékové rezistence jsou různé, například změna farmakokinetiky, kdy dochází ke snížené resorpci nebo zvýšenému vylučování cytotoxické látky. Nebo změny

cytokinetiky, k jejichž vzniku je potřeba rozsáhlá populace nádorových buněk. Například nádorové buňky mohou přejít do G0 fáze buněčného cyklu a jejich rezistence k cytostatikům se tak zvýší. Pokud nádor stále roste, produkce takto predisponovaných buněk se zvyšuje a zvyšují se i počty rezistentních buněčných klonů. Mohou se měnit hladiny enzymů důležitých pro konverzi cytostatika nebo jeho biodegradaci. Další příčinou vzniku rezistence může být omezení průniku látky buněčnou membránou. Zvýšená rychlost opravy DNA nebo poruchy apoptózy způsobené vyšší expresí anti-apoptotických molekul (Bcl-2, Bclx, Mcl) nebo inaktivací pro-apoptotických efektorů (p53, Bax, Fas) patří mezi časté příčiny primární rezistence (Klener a Klener, 2010).

MDR je definována jako rezistence na více chemoterapeutických látek s odlišnou strukturou a mechanismem účinku. MDR je nejvýznamnější příčinou neúčinnosti různých chemoterapeutik a má zásadní význam pro vznik a šíření nádorových metastáz. Ke vzniku MDR přispívá např. ATP-dependentní transportéry (ABC transportéry). Zejména p-glykoprotein, který exportuje léčivo z buňky. Následkem je tak nízká akumulace léčiva v buňce. S MDR je spojeno více proteinů: multidrug resistance associated protein (MRP) nebo lung resistance related protein (LRP). Bylo zjištěno, že s vyšší expresí těchto proteinů souvisí právě vznik rezistence nádorových buněk. MDR vzniká také na základě poškození cílové struktury léčiva, změny v opravných procesech DNA nebo změny detoxikačních drah buňky (Wu et al. 2014 a Klener a Klener, 2010 a Nosková et al. 2000 a Szakács et al. 2006).

### **2.3 Vybrané isochinolinové alkaloidy**

Využívání přírodních produktů pro lékařské a terapeutické účely se stává stále více populárním. Léčivé rostliny jsou zdrojem mnoha biologicky aktivních látek, které se mohou využívat ve výzkumu a vývoji léčiv. Mezi nejvíce používané látky patří alkaloidy. Jsou to velmi silné terapeutické látky přírodního původu s často významnými farmakologickými účinky působícími na člověka i na zvířata. Isochinolinové alkaloidy patří do velké skupiny dusíkatých sloučenin a jejich počet se neustále rozrůstá spolu s nově objevenými zástupci a semisyntetickou modifikací přírodně se vyskytujících prekurzorů. Alkaloidy jsou sekundárními metabolity rostlin a vykazují řadu účinků, jako jsou antivirové, antimikrobiální, protizánětlivé, imunomodulační, antioxidační a protinádorové. Vzhledem k velkému množství se rozdělují do několika hlavních skupin: aporfínové alkaloidy, protopínové alkaloidy, protoberberinové alkaloidy, phthalideisochinolinové alkaloidy, benzofenanthridinové alkaloidy, benzyloisochinolinové alkaloidy, morfinanové alkaloidy

a spirobenzylisochinolinové alkaloidy. Aporfíny, benzylisochinoliny a protoberberiny mají vyšší cytotoxicitu než jiné typy isochinolinových alkaloidů (Rahman a Choudhary, 1998 a Iranshahy et al. 2014 a Wang a Chen, 2013). Jako modelová agens se v této práci pro danou problematiku rozeberou tyto čtyři: chelidonin, homochelidonin, berbamin a bersavin.

### 2.3.1 Benzofenanthridinové alkaloidy

Kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy patří do skupiny isochinolinových alkaloidů široce distribuovaných v rostlinné čeledi makovitých (*Papaveraceae*) a také částečně v čeledi zemědýmovitých (*Fumariaceae*) a rourovitých (*Rutaceae*) (Sandor et al. 2016).

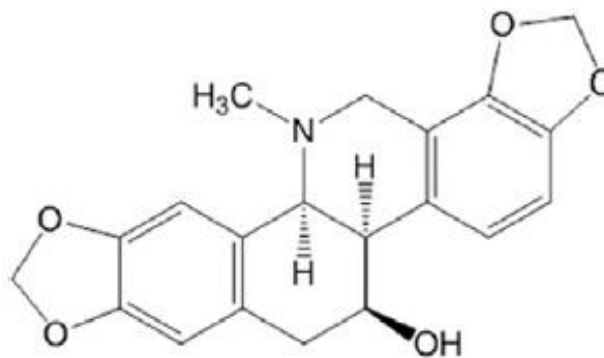
*Chelidonium majus* (Vlaštovičník větší) obsahuje řadu isochinolinových alkaloidů protopinové, protoberberinové a benzofenanthridinové struktury. Hlavními alkaloidy vyskytujícími se ve stonkové části rostliny jsou chelidonin, berberin a koptisin, zatímco v kořenové části dominují sanquinarin a chelerythrin (Colombo a Bosisio, 1996). Vlaštovičník patří do čeledi makovitých a je považován za důležitou léčivou rostlinu s protinádorovými vlastnostmi. Tyto protinádorové vlastnosti zajišťují právě isochinolinové alkaloidy. U benzofenanthridinových alkaloidů byla prokázána blokáda proliferace u několika transformovaných nebo maligních buněčných linií různými cytotoxickými mechanismy. Řada z těchto zajímavých sloučenin prokázala různou aktivitu v poškození intracelulárních buněk s navozením apoptózy bez poškození jaderné DNA (Noureini a Esmaili, 2014).

#### 2.3.1.1 Chelidonin

Chelidonin (obr. 8) byl izolován z *Chelidonium majus*. Z hlediska struktury je methoxyderivátem benzofenanthridinu s přítomností dvou methyldioxyskupin a methylových skupin vázaných na dusíkovém atomu (Staněk, 1957). Je znám svým širokým spektrem farmakologických účinků. Je silným analgetikem, používá se proti spasmům, má antibakteriální, antivirové, antimykotické a antioxidační účinky a také působí inhibicí acetylcholinesteráz a butyrylcholinesteráz. V poslední době byla rovněž zjištěna jeho cytotoxická a antiproliferativní aktivita a indukce apoptózy v různých leukemických liniích (Havelek et al. 2016). Jeho cytotoxický účinek byl zkoumán na myších zdravých slezinných buňkách a leukemických buňkách L1210 a bylo zjištěno, že cytotoxicky působí pouze na maligní buňky. Chelidonin indukuje zástavu buněčného cyklu a aktivaci stresem aktivované proteinové kinázy, to dále vede k inhibici polymerace tubulů, narušení struktury mikrotubulů

v buňce a následně k apoptóze (Panzer et al. 2001). Díky terapeutické účinnosti s minimálními vedlejšími účinky na zdravé buňky se chelidoninu dostává vyšší pozornosti v oblasti výzkumu léků proti rakovině (Táborská et al. 1995). Avšak omezujícím faktorem v jeho použití je jeho nízká rozpustnost ve vodě, což značně omezuje jeho biodegradabilitu v oblasti nádoru (Paul et al. 2012). Dnes se již tento problém řeší biologicky odbouratelnými nanočásticemi, které fungují jako nosiče léčiv (Vasir a Labhasetwar, 2007 a Kumari et al. 2010). Cílem jedné studie bylo porovnání terapeutické účinnosti volného chelidoninu (FC) a nanochelidoninu (NC) proti hepatocelulárnímu karcinomu (HepG2). Výsledkem byl silnější apoptotický účinek NC než FC, také vyšší blokáce HepG2 buněk v G2/M fázi. Zvýšená exprese p53, Bax, Bcl-2, cytochromu c, Apaf-1, kaspázy-9 a kaspázy-3 potvrdila vyšší protinádorový potenciál NC než FC. Rovněž byla prokázána vyšší dostupnost a distribuce v tkáních aniž by byla vyvolána toxicita u myši. NC může na rozdíl od FC pronikat do mozkové tkáně, což naznačuje možný protinádorový potenciál v onkologii nádorů mozku (Paul et al. 2013). Velmi silný antiproliferativní účinek chelidoninu byl ověřen také na lidských nádorových buňkách adenokarcinomu prsu MCF-7, kdy jasné morfologické změny ukázaly dva odlišné způsoby buněčné smrti působením různých koncentrací chelidoninu. V případě nižší koncentrace chelidoninu došlo k indukci apoptózy, vyšší koncentrace chelidoninu vedla k indukci autofagie. Z toho je patrné, že chelidonin je schopen stimulovat několik cest k potlačení růstu rakovinných buněk (Noureini a Esmaili, 2014). Účinná indukce apoptózy chelidoninu byla také potvrzena u studie provedené na buňkách HeLa. Chelidonin zde indukoval apoptózu prostřednictvím regulace tvorby pro-apoptotických a anti-apoptotických genů (Paul et al. 2012). Za zmínku stojí i jeho schopnost překonat MDR u různých rakovinných buněčných liniích prostřednictvím interakce s ABC-transportéry, CYP3A4 (cytochrom P450 3A4) a glutathion-S-transferázou indukci apoptózy a zvýšení cytotoxicity chemoterapeutik, zejména proti leukemickým buňkám (El-Readi et al. 2013).

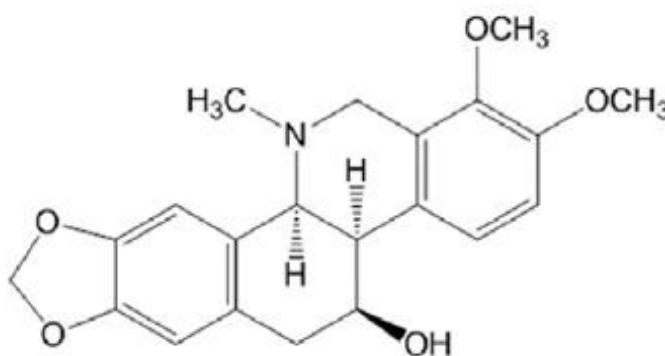
V odborné literatuře se objevují případy nežádoucích účinků, z nichž nejčastějším případem byla hepatotoxicita a akutní hepatitidy ve spojení s Vlastovičnickem větším, který se také používá pro podporu léčby žaludečních a střevních poruch. Experimenty na potkanech však ukázaly, že dávky 50x až 100x vyšší, než ty které se podávají u lidí, neměly na funkci jater vliv (Mazzanti et al. 2009).



**Obr. 8:** Chelidonin. Upraveno podle: Havelek et al. 2016.

### 2.3.1.2 Homochelidonin

Homochelidonin (obr. 9) stejně jako chelidonin byl izolován a popsán jako hlavní přírodní složka *Chelidonium majus*. Strukturně je dimethoxy analogem chelidoninu (Staněk, 1957). Jsou známy morfinu podobné, narkotické účinky homochelidoninu a také působí jako lokální anestetikum znecitlivující senzitivní zakončení nervů (Mačku a Mokrý, 1957). Má inhibiční účinek na aktivitu acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. Oproti chelidoninu je však známo mnohem méně z pohledu jeho biologických účinků. V nedávné studii byly porovnány účinky chelidoninu a homochelidoninu a bylo zjištěno, že i homochelidonin je silným induktorem buněčné smrti a to zejména u krevních nádorových buněčných linií (s výjimkou erythroleukemie HEL 92.1.7. a histiocytického lymfomu U-937). Mechanismus protinádorového účinku zahrnoval interakci s tubulinem, indukci apoptózy související s expozicí fosfatidylserinu, ztrátu mitochondriálního potenciálu a aktivaci kaspáz -3/7, -8 a -9 (Havelek et al. 2016).

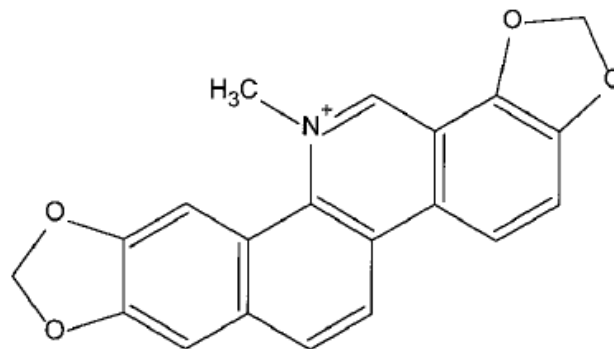


**Obr. 9:** Homochelidonin. Upraveno podle: Havelek et al. 2016.



### 2.3.1.3 Sanguinarin

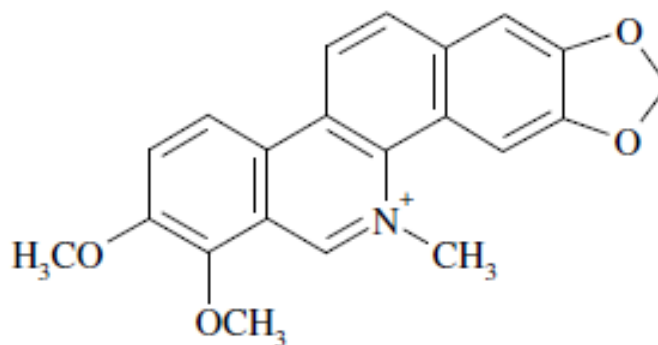
Sanguinarin (obr. 10) je kvarterním benzofenanhydridinovým alkaloidem nacházejícím se v mnoha čeledích, například *Fumariaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae* nebo *Rutaceae*. Pro rostlinu je tento alkaloid významný v ochraně před patogenními mikroorganismy. Jsou známy protizánětlivé účinky, antibakteriální a antioxidační aktivita. V nedávné studii bylo zjištěno, že sanguinarin je účinným inhibitorem aktivace jaderného transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, jež se podílí na regulaci buněčného růstu, buněčného cyklu a apoptózy (Zdařilová et al. 2006 a Ahmad et al. 2000). Sanguinarin silně indukuje filamentaci jak u gram-pozitivních tak u gram-negativních bakterií a brání buněčnému dělení inhibicí cytokineze (Beuria et al. 2005). Byla zjištěna i protinádorová aktivita. Zajímavostí je, že je více toxický pro rakovinné buňky v nižších koncentracích ve srovnání s normálními buňkami. Proto se také jeví jako slibný protinádorový lék. Výzkum jeho protinádorového účinku se zaměřuje především na schopnosti indukovat apoptózu v různých buněčných rakovinných modelech. (Rahman et al. 2016). V jedné studii se více jak na apoptózu však zaměřili na autofagii. Tato studie se týkala maligních gliomů a jejich notorické rezistence k terapiím, které indukují apoptózu. Ukázalo se, že sanguinarin indukuje autofagii i apoptózu a mohl by se stát silným chemoterapeutikem pro léčbu maligních gliomů (Pallichankandy et al. 2015). Pozornost mu byla věnována i u agresivního a obtížně léčitelného subtypu rakoviny prsu (Basal-like breast cancer – BLBC), kde experimentální data ukázala, že by mohl být v terapii účinný. Hlubší analýzou byl zjištěn zánik buněk prostřednictvím inhibice aktivace transkripčního faktoru STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3), který jak se ukázalo, hraje významnou roli v BLBC. Dále tato data naznačovala, že sanguinarin blokuje buněčný cyklus ve fázi G1/S, což vede k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi a vzniku apoptózy. Nicméně důležitým mechanismem, jehož prostřednictvím sanguinarin uplatňuje svůj protinádorový účinek je inhibice enzymové aktivity dihydrofolátreduktázy. Tento enzym se účastní syntézy prekurzorů nukleových kyselin, které jsou důležité pro proliferaci buněk. Problém je v supresivním účinku na normální buňky, další studie by se tedy mohly zabývat použitím nanočástic pro snížení vedlejších účinků sanguinarinu (Kalogris et al. 2014).



**Obr. 10:** Sanguinarin. Upraveno podle: Ahmad et al. 2000.

#### 2.3.1.4 Chelerythrin

Alkaloid chelerythrin (obr. 11) pochází ze stejných čeledí jako sanguinarin. V biosyntéze těchto alkaloidů jsou výchozími aminokyselinami tyrosin a fenylalanin, meziprodukty protopiny a dihydroderiváty, které jsou následně oxidovány na kvarterní soli. Chelerythrin spolu se sanguinarinem se používají jako hlavní složky přípravků pro ústní hygienu díky svým protizánětlivým a antibakteriálním účinkům (Zdařilová et al. 2006). Chelerythrin ovšem vykazuje mnohem širší spektrum biologické aktivity. Včetně protinádorové a protiplísňové, může být účinný při léčbě diabetu nebo má ochranný účinek proti žaludečním vředům vyvolaným ethanolem a proti lipopolysacharidem indukovanému endotoxickému šoku. Účinek proti rakovině byl studován jak *in vitro*, tak *in vivo* v různých nádorových buněčných liniích (Tang et al. 2017). O chelerythrinu je známo, že je široce používaným inhibítorem proteinkinázy C, indukuje apoptózu v řadě buněčných typů. Například v osteosarkomu, chelerythrin indukuje apoptózu prostřednictvím aktivace Raf/MEK/ERK, což je signální síť pro vznik rakoviny. Toto zjištění by mohlo být použito pro terapeutickou strategii léčby osteosarkomu (Yang et al. 2008). Studie zaměřená na buňky hepatocelulárního karcinomu ukázala účinek chelerythrinu v indukci apoptózy inhibicí exprese Bcl-2 a aktivací mitochondriální dráhy vedoucí k apoptóze (Zhang et al. 2011). Chelerythrin rovněž indukuje apoptózu a zastavení buněčného cyklu u lidských promyelocytárních leukemických HL-60 buněk (Vrba et al. 2008). Je zřejmé, že chelerythrin se vyznačuje velkým potenciálem protinádorového charakteru, vyplývajícího z již tolika existujících studií.



**Obr. 11:** Chelerythrin. Upraveno podle: Vrba et al. 2008.

### 2.3.2 Bisbenzylisochinolinové alkaloidy

Tato skupina alkaloidů obsahuje více než 225 odlišných sloučenin, které byly izolovány z různých rostlinných čeledí, např. dřišťálovité (*Berberidaceae*), lunoplodovité (*Menispermaceae*) nebo pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*) (Phillipson et al. 2012).

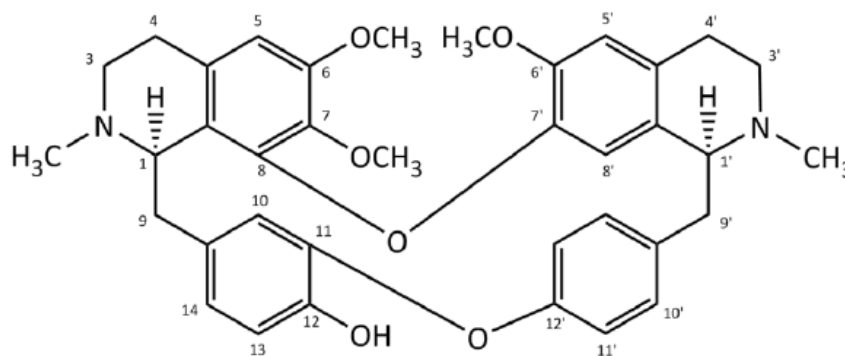
Čeledi produkující bisbenzylisochinolinové alkaloidy jsou známe pro své široké spektrum účinků, např. antimikrobiální, antipyretické, protizánětlivé, protinádorové a antimalarické. Takovými alkaloidy jsou například berberin a berbamin (Rahmatullah et al. 2014).

#### 2.3.2.1 Berbamin

Berbamin (obr. 12) pochází z čeledi *Berberidaceae*, konkrétně z rostliny *Berberis amurensis* (Dřišťál amurský), jež se hojně využívá v tradiční čínské medicíně při léčbě zánětů a různých forem nádorových onemocnění, včetně leukémie, hepatomů, rakoviny prsu a dalších typů (Duan et al. 2010). Jeho protinádorová aktivita a schopnost překonání rezistence nádorových buněk byla zkoumána v mnoha studiích. Příkladem je studie efektu berbaminu na buňky ChR-24, které byly izolovány z lidských rakovinných kmenových buněk rezistentních na různé cytostatické látky, jako je vinkristin, daunomycin nebo aktinomycin D. Výsledkem bylo částečné překonání rezistence vůči daunomycinu (Shiraishi et al. 1987). Další studie byla zaměřena na snížení rezistence na adriamycin a vinkristin u nádorových buněčných linií MCF-7 a KBv200. Zde bylo zjištěno, že berbamin napomáhá zvýšení intracelulární akumulace adriamycinu v MCF-7 buněčných liniích (Tian a Pan, 1997). Berbamin také zvýšil chemosenzitivitu na adriamycin u lidských erythroleukemických nádorových buněčných liniích K562 (Han et al. 2003). Berbamin se dále jevil jako úspěšné terapeutikum při terapii chronické myeloidní leukémie (CML), za situace, kdy se u pacientů léčených

cytostatikem Gleveec (Imatinib - inhibitor Bcr/abl tyrosin kináz) začala vytvářet resistance. Tato studie ukazuje, že berbamin snižuje hladinu p210 Bcr/abl (jedna z variant fúzního genu charakteristická aberací, tzv. Philadelphský chromozom) onkoproteinu a zároveň u těchto buněk indukuje apoptózu prostřednictvím dráhy závislé na aktivaci kaspázy-3 (Xu et al. 2006). Podobně při ovlivnění CML buněčné linie KU812, berbamin inhiboval proliferaci buněk v závislosti na čase a dávce zastavením buněčného cyklu ve fázi G1 a zároveň indukoval apoptózu. Byla pozorována zvýšená transkripce proteinů Smad3, p21 a Bax a snížila se hladina anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub> (Liang et al. 2011). Protinádorový účinek měl berbamin i na nádorovou buněčnou linii SMMC7721 lidského hepatomu. Berbamin zde indukoval apoptózu ztrátou mitochondriálního transmembránového potenciálu a aktivací kaspáz -3 a -9 (Wang et al. 2007). Studie zaměřená na protinádorovou aktivitu berbaminu na buněčné linii HepG2 lidského hepatocelulárního karcinomu prokázala indukcii apoptózy zvýšením hladiny pro-apoptotických proteinů Fas a p53 způsobující pokles membránového potenciálu a aktivaci kaspáz -3, -8 a -9 (Wang et al. 2009). Bylo prokázáno, že berbamin omezuje růst buněk A549 nemalobuněčného karcinomu plic *in vitro* a *ex vivo*. Alkaloid působí snížení hladiny anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a současné zvýšení exprese pro-apoptotického proteinu Bax. Kromě toho významně inhiboval migraci buněk A549 bez omezení růstu nenádorových buněk a v neposlední řadě významně zvýšil protinádorový účinek léčiv, jako je trichostatin A a celecoxib (Duan et al. 2010).

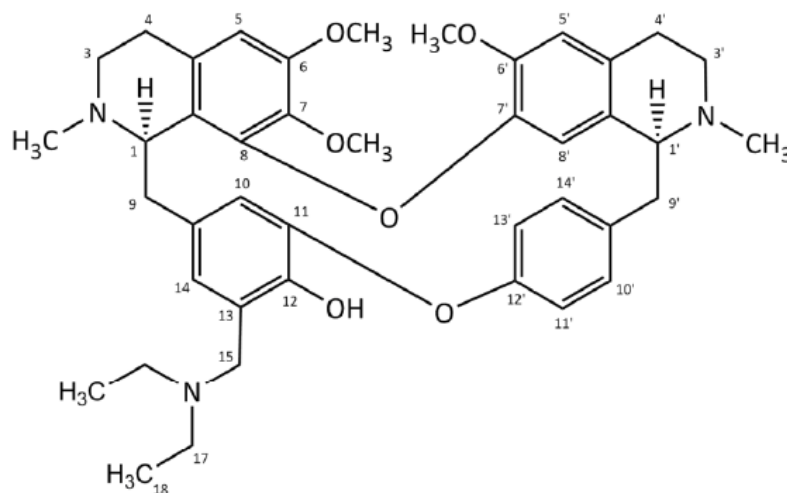
Z celé řady studií popisujících cytostatický a cytotoxický účinek je patrné, že berbamin má opravdu velký potenciál v léčbě nádorových onemocnění. Výsledky těchto studií jsou důkazem širokých terapeutických a adjuvantních účinků tohoto alkaloidu.



**Obr. 12:** Berbamin. Převzato z: Hošťálková 2015.

### 2.3.2.2 Bersavin

Bersavin (obr. 13) byl nově izolován z rostliny *Berberis vulgaris* (Dříšťál obecný) a dosud se o něm ví jen velmi málo. Je pravděpodobné, že vychází z berbaminu a je přírodním alkaloidem *Berberis vulgaris*. Doposud byla testována pouze jeho potenciální neuroprotektivní aktivita ve formě inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze a bylo zjištěno, že tato aktivita je vyšší než u strukturně podobného berbaminu (Hošťálková 2015).



Obrázek č. 13: Bersavin. Převzato z: Hošťálková 2015.

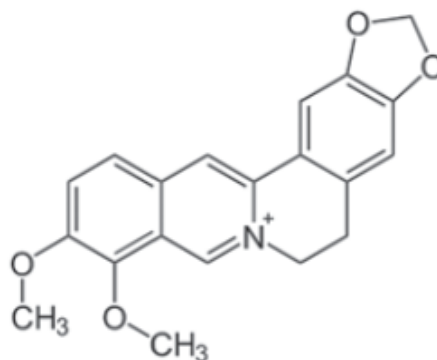
### 2.3.3 Protoberberinové alkaloidy

Protoberberinové alkaloidy jsou odvozeny od tyrosinu a představují asi čtvrtinu v současné době známých alkaloidů s protoberberinovou kostrou, izolované z přírodních zdrojů (Grycová et al. 2007). Tyto alkaloidy se nejčastěji vyskytují v různých rostlinách rodu dymnivek (*Corydalis*), dříšťálu (*Berberis*), zemědýmu (*Fumaria*), vlašovičnicku (*Chelidonium*), vodílký (Hydrastis) (Staněk 1957).

#### 2.3.3.1 Berberin

Berberin (obr. 14) je hlavní složkou mnoha léčivých rostlin, společných pro protoberberinové alkaloidy s tisíciletou historií využití v tradiční medicíně. Četnost farmakologických účinků vykázaná v posledních dvou desetiletích přitahuje velký zájem vědeckých a lékařských asociací. Možností využití v moderní medicíně je velké množství. Berberin se uplatňuje především v boji s bakteriálními průjmy, diabetem 2. typu, hypercholesterolémií, neurodegenerativními chorobami. Další účinky jsou protizánětlivé, kardioprotektivní nebo antidepresivní (Habtemariam 2016). Stejně jako u předchozích

alkaloidů byla u berberinu prokázána cytotoxicita. Existuje již mnoho studií zabývajících se působením berberinu na nádorové buňky. Například působení berberinu na buňky rakoviny prsu, vyvolalo apoptózu buněk v závislosti na koncentraci a čase. Jeho přítomnost zvýšila produkci reaktivních forem kyslíku a tím aktivaci pro-apoptotických signálů a související mitochondriální dráhu apoptózy (Xie et al. 2015). Protinádorová aktivita byla zkoumána na lidských nádorových buňkách prostaty PC3 a myších RM-1. Výsledky ukázaly inhibiční účinky na proliferaci závislé na koncentraci a čase působení. Berberin zde indukoval zástavu buněčného cyklu ve fázi G0/G1 a následnou apoptózu u buněk PC3. Vliv koncentrace přiblížil mechanismus působení ještě více, protože při nízkých koncentracích byla zástava cyklu indukována ve fázi G0/G1 a při vyšší koncentraci došlo k indukci zástavy v G2/M fázi (Lu et al. 2015). Inhibiční účinek na proliferaci, migraci a invazi byl pozorován u myších buněk melanomu B16. Bylo zjištěno, že berberin má redukční mechanismus na EMT (The epithelial-mesenchymal transition) a tím inhibuje tvorbu metastáz v buňkách melanomu (Kou et al. 2016). Výsledky v současné době naznačují, že využití berberinu jako účinného léku proti rakovině by mohlo být v současné medicíně velmi rozšířené.

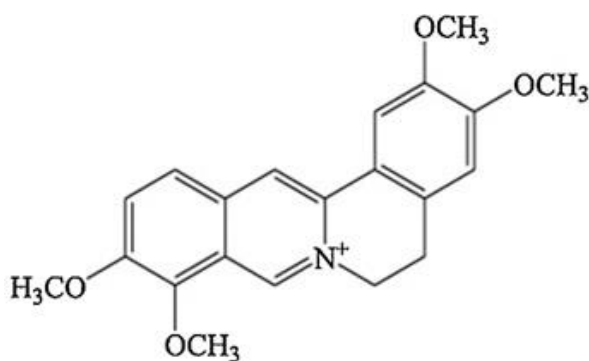


**Obr. 14:** Berberin. Upraveno podle: Lu et al. 2015.

### 2.3.3.2 Palmatin

Tento poměrně známý alkaloid se hojně vyskytuje v čeledích *Papaveraceae*, *Berberidaceae*, *Fumariaceae* nebo *Rutaceae*. Vykazuje mnoho farmakologických účinků a jeho využití je především v tradiční čínské medicíně, například při léčení úplavice, žloutenky, diabetu a revmatické artritidy (Schmeller et al. 1997 a Vrba et al. 2015). Palmatin (obr. 15) je také zkoumán pro svou potencionální protinádorovou aktivitu. Jeho použití bylo zkoumáno na lidských buňkách rakoviny prsu MCF-7, kdy buňky byly inkubovány s palmatinem a poté ozářeny elektromagnetickým zářením specifické vlnové délky (470 nm)

ze světelného zdroje LED (light-emitting diode). Výsledky ukázaly, že samotný palmatin neměl žádnou nebo minimální cytotoxicitu na buňky MCF-7 po inkubační době 24 hodin ve tmě. Avšak po 40 minutách vystavení světlu o vlnové délce 470 nm byla prokázána významná fotocytotoxicita, indukce apoptózy a zvýšené hladiny intracelulárních ROS (Wu et al. 2016b). Stejný experimentální princip byl aplikován v nedávné studii na buňkách HT-29 adenokarcinomu tlustého střeva a v porovnání byla účinnost palmatinu mnohem vyšší u buněk MCF-7 než u HT-29. Důvodem rozdílu v účinnosti palmatinu může být typ buněk nebo obecně různá citlivost na léky (Wu et al. 2016a).



**Obr. 15:** Palmatin. Upraveno podle: Wu et al. 2016a.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie

- RPMI 1640 medium – Life Technologies, USA
- Eagle's minimal essential medium (EMEM) – Life Technologies, USA
- fetální bovinní sérum (FBS) – Life Technologies, USA
- antibiotika: penicilin – streptomycin - Life Technologies, USA
- trypsin - Life Technologies, USA
- L-Glutamin - Life Technologies, USA
- Sodium Pyruvate - Life Technologies, USA
- HEPES - Life Technologies, USA
- amino acids non-esentiel - Life Technologies, USA
- Dimetylsulfoxid (DMSO) – Carl Roth
- Destilovaná voda – Lonza, Česká republika
- 70% ethanol – Penta, Česká republika
- 100% methanol - Sigma-Aldrich, USA
- fosfátový pufr (DPBS) – Gibco - Invitrogen
- buňky linie Jurkat E6.1 - European Collection of Cell Cultures , UK
- buňky linie MOLT-4 - European Collection of Cell Cultures , UK
- buňky linie A549 - European Collection of Cell Cultures , UK
- buňky linie MRC-5 - European Collection of Cell Cultures , UK
- buňky linie A2780 - European Collection of Cell Cultures , UK
- 0,4% roztok Trypanové modři – Sigma-Aldrich, USA
- APOPTTEST – FITC kit – DakoCytomation, Dánsko
- Vindelův roztok (Tris, RNáza, Triton X-100, NaCl, propidium jodid – Sigma – Aldrich, USA)
- citrát-fosfátový pufr (192 ml 0,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 8 ml 0,1 mM kyseliny citrónové, pH=7,8
- Alkaloidy studované v diplomové práci byly získány od paní doc. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D. a pana PharmDr. Jakuba Chlebka, Ph.D., Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova.



Testované látky byly izolovány z rostlin čeledi. Látky byly poskytnuty pro experimenty ve farmaceutické kvalitě. Čistota byla kontrolována elementární analýzou, 1D-, 2D-NMR spektroskopii a hmotnostní spektrometrií. Autorka děkuje za poskytnutí látek pro experimentální studium.

### 3.2 Použité přístroje a pomůcky

- světelný mikroskop Nikon Eclipse E200– Nikon, Japonsko
- CO2 inkubátor
- vodní lázeň
- biohazard box třídy II
- xCELLigence RTCA SP – Roche, Švýcarsko
- RTCA software
- MS Excel 2010 – Microsoft, USA
- průtokový cytometr CyAn™ ADP – Beckman Coulter, USA
- program Multicycle AV software – Phoenix Flow Systems, USA
- program xCELLigence software verze 1.2.1 - Roche, Švýcarsko
- centrifuga

**Ostatní pomůcky:** automatické pipety, mikrozkušavky Eppendorf, sterilní špičky na automatické pipety, centrifugační zkumavky, pasturovy pipety, E-destičky, kultivační láhve - velikosti 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>, sérologické pipety jednotlivě balené o objemech 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml a 25 ml.

### 3.3 Buněčné kultury

K hodnocení cytotoxické a antiproliferační aktivity vybraných isochinolinových alkaloidů byly použity adherentní buňky MRC-5, odvozené ze zdravých fibroblastů plicní tkáně, nádorové buňky A2780 karcinomu vaječníku a nádorové buňky A549 adenokarcinomu plic. Dále pak suspenzní buňky MOLT-4 a Jurkat, které jsou tvořeny z lidských T-lymfocytárních leukemických buněk, lymfoblastů akutní T-buněčné leukemie. Buněčná linie Jurkat se vyznačuje absencí exprese funkčního proteinu p53 (p53 deficient), naopak buněčná linie MOLT-4 funkční protein p53 exprimuje (p53 wild-type). Všechny buněčné

linie pochází z Evropské sbírky buněčných kultur (European Collection of Cell Cultures – ECACC, Salisbury, UK).

### **3.4 Pasážování buněk a kultivační podmínky**

Během experimentů je nutné se o buňky v kultivaci pečlivě starat, tzn. častá výměna média podle rychlosti proliferace a následné rozdělení namnožených buněk do dalších kultivačních nádob. Tento proces se nazývá pasážování a provádí se přibližně 2 x týdně. Velmi důležitým aspektem při kultivaci buněčných linií je použití správného a předem optimalizovaného média pro daný typ buněk. Buňky MRC-5 byly kultivovány v médiu EMEM obohaceném 10% fetálním bovinním sérem, 2 mM L-glutaminem, 10 µl/ml MEM neesenciálními kyselinami, 50 µg/ml penicilinem a 50 µg/ml streptomycinem (Life Technologies, USA). Buňky A2780 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obohaceném 10% fetálním bovinním sérem, 2mM L-glutaminem, 1 mM pyruvát, 10 mM HEPES, 10 µl/ml MEM neesenciálními aminokyselinami, 50 µg/ml penicilinem a 50 µg/ml streptomycinem (Life Technologies, USA). Buňky A549 byly kultivovány v médiu EMEM s L-glutaminem a hydrogenuhličitanem sodným (Sigma-Aldrich, USA) v přítomnosti 10% fetálního telecího séra, 1 mM pyruvátu, 10 mM HEPES, 50 µg/ml penicilinu a 50 µg/ml streptomycinu (Life Technologies, USA). Buňky MOLT-4 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obohaceném 20% fetálním bovinním sérem, 2mM L-glutaminem, 1 mM pyruvát, 10 mM HEPES, 10 µl/ml MEM neesenciálními aminokyselinami, 50 µg/ml penicilinem a 50 µg/ml streptomycinem (Life Technologies, USA). Buňky Jurkat byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obohaceném 10% fetálním bovinním sérem, 2mM L-glutaminem, 1 mM pyruvát, 10 mM HEPES, 10 µl/ml MEM neesenciálními aminokyselinami, 50 µg/ml penicilinem a 50 µg/ml streptomycinem (Life Technologies, USA). Buněčné kultury byly udržovány ve zvlhčovaném inkubátoru při 37°C a atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a 95% vzduchu.

### **3.5 Manuální počítání viability a proliferace buněk barvením Trypanovou modří**

Tato metoda je velmi jednoduchá a používaná již mnoho let. Rozlišují se jí živé a mrtvé buňky specifickým barvením. Detekce viability a proliferace buněk se provádí za použití 0,4% roztoku Trypanové modří (Sigma-Aldrich, USA). Principem této metody je prostup tmavě modrého barviva Trypanové modří přes plazmatickou membránu mrtvých buněk, kde se hromadí v intracelulárním prostoru a dochází tak k obarvení buněk. Naopak živé buňky zůstávají bezbarvé, díky celistvosti plazmatické membrány. Pro mikroskopické

počítání a stanovení proliferace buněk byl využit světelný mikroskop (Nikon, Tokyo, Japonsko) a Bürkerova komůrka s krycím sklíčkem

### 3.5.1 Postup

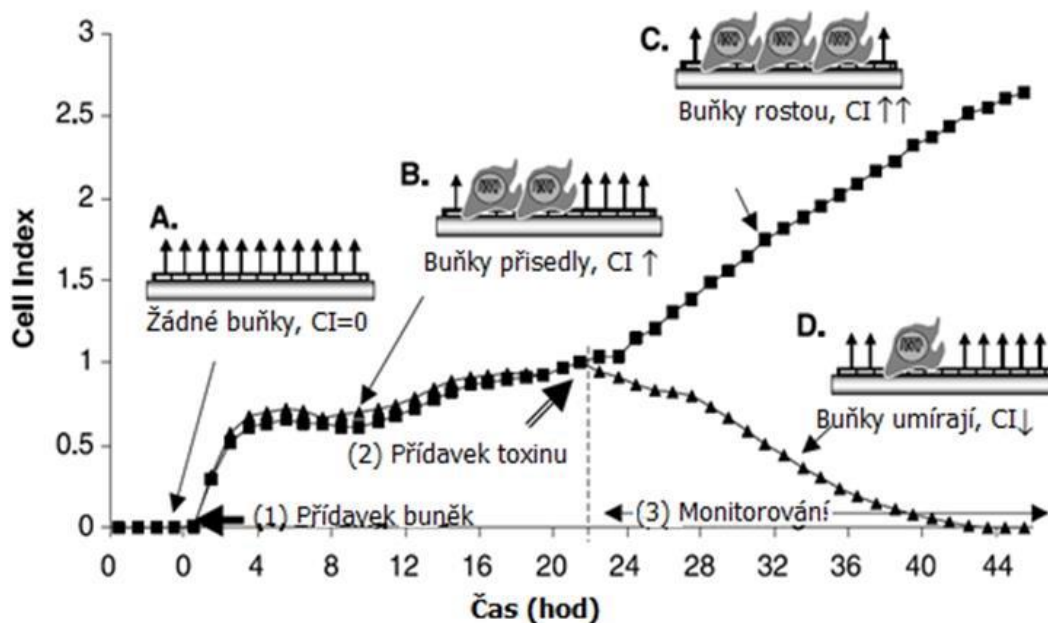
Životaschopnost buněk A2780 a MRC-5 byla stanovena po 24 a 48 hodinách po ovlivnění chelidoninem o koncentraci 5 a 10  $\mu\text{M}$ . Dále byly jako experimentální model použity buňky Jurkat a MOLT-4, které byly ovlivněny berbaminem, bersavinem o koncentracích 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$ . Buňky ovlivněny 0,1% DMSO byly použity jako negativní kontrola. Buňky ovlivněny 5  $\mu\text{M}$  cisplatinou byly použity jako pozitivní kontrola. Z připravené buněčné suspenze bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$ , které se smíchalo s 50  $\mu\text{l}$  Trypanové modři. Následně bylo 10  $\mu\text{l}$  obarvené směsi aplikováno na Bürkerovu komůrku s krycím sklíčkem a hodnotil se počet buněk (počítáno 50 čtverců) a poměr živých a mrtvých buněk. Při hodnocení výsledků bylo započteno ředění primární suspenze buněk.

### 3.6 Systém xCELLigence – analýza v reálném čase

Systém xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer) je novým technologickým přístupem, který umožňuje analýzu buněk v reálném čase. Je používán pro monitorování buněčných procesů, jako např. sledování buněčné adheze, proliferace a diferenciace, viability cytotoxického účinku látek na buňky, buněčně zprostředkovanou cytotoxicitu, viry způsobenou cytopatogenicitu a aktivaci buněčných receptorů. Metoda se dá využít také pro kontrolu kvality buněk a jejich pasáží. Velkou výhodou je sledování chování buněk v reálném čase bez jakékoliv aplikace činidla, barvení nebo značení buněk. Základem systému je sledování buněk, které rostou v 96 jamkových destičkách („E-plates“), kde každá jamka má své dno pokryté zlatými mikroelektrodami. Buňky musí být adherentní kultury nebo u nich musí být adheze vyvolaná uměle. Principem detekce je měření impedance (elektrický odpor) na dně jamky. Čím více buněk je přisedlých na dně jamky, tím vyšší je impedance. Míra impedance se poté vyjadřuje v bezrozměrných jednotkách tzv. „buněčného indexu“ (anglicky cell index - CI).

Zásadní výhodou tohoto systému je sledování změn buněčného indexu v reálném čase i několik dní. Celé zařízení je po dobu experimentu umístěno v  $\text{CO}_2$  inkubátoru, který zajišťuje optimální *in vitro* podmínky pro analyzované buňky. Tato metoda je schopna kontinuálně sledovat buněčné procesy v reálném čase, čímž se liší od klasických end-point analýz.

Během proliferace buněk je možné přidat k buňkám chemickou sloučeninu, která následně ovlivní buněčný růst, morfologii a adhezi. Odezva buněk na tento stimul je poté zaznamenán měřením impedance a tyto změny jsou vyjádřeny buněčným indexem. Průběh analýzy je znázorněn na obr. 16 (Vondráčková et al. 2010).



**Obr. 16:** Analýza RTCA. Upraveno podle: Xing et al. 2006.

### 3.6.1 Postup

Systém xCELLigence (Roche, Basel, Switzerland and ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) je složen ze 4 částí – analyzátor (měří elektrický odpor), stanice (přenos signálu z destičky do analyzátoru), počítač a destička (96 jamek). Stanice s destičkou byly umístěny v inkubátoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) pro kultivaci buněk, počítač a analyzátor byly mimo inkubátor. xCELLigence byl použit pro monitorování adheze buněk, proliferace a cytotoxicity.

Prvním krokem bylo zoptimalizování koncentrace každé buněčné linie. Poté bylo napipetováno 190 µl buněčné suspenze do každé jamky 96 jamkové destičky a každých 30 minut byla sledována proliferace buněk. Po uplynutí 20 hodin, kdy buňky proliferovaly a byly v logaritmické růstové fázi, k nim bylo přidáno 10 µl deionizované vody obsahující chelidonin, homochelidonin, berbamin nebo bersavin s příslušnou koncentrací 1-50 µM. Pro negativní kontrolu byla přidána sterilní deionizovaná voda s DMSO s finální koncentrací 0,1 %. Buňky ošetřené 5 % DMSO byly použity jako pozitivní kontrola. Všechny

experimenty byly provedeny po dobu 74 hodin. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí xCELLigence software 1.2.1 (Roche, Basel, Switzerland and ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA).

### **3.7 Stanovení apoptózy pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu**

Fosfatidylserin se u živých buněk za normálních okolností vyskytuje na vnitřní straně (cytosolové) buněčné membrány. Během apoptózy dochází k externalizaci fosfatidylserinu na vnější stranu. Pro detekci apoptózy se využívá vazby fluorescenčně značeného proteinu Annexinu V na fosfatidylserin za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Propidium jodid je fluorescenční barvivo, které se váže na nukleové kyseliny v již nekrotických buňkách. Takto můžeme rozlišit živé, apoptotické a nekrotické buňky.

#### **3.7.1 Postup**

Z buněk v suspenzi bylo v požadovaný čas po inkubaci s testovaným alkaloidem odstraněno medium centrifugací, buňky byly opakovaně promyty PBS a výsledná peleta buněk byla resuspendována ve vazebném pufru s obsahem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ( $10^5$ - $10^6$  buněk/ml). Vazebný  $\text{Ca}^{2+}$  pufr z kitu byl zředěn 10x deionizovanou vodou a před použitím vychlazen na ledu. Buňky v suspenzi v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů obsažených ve vazebném pufru byly značeny Annexinem V konjugovaným s fluorescein isothiokyanátem (Annexin V-Alexa Fluor® 488) a propidium jodidem (PI) z kitu Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) podle instrukcí v návodu výrobce. Na konci značení a potřebné inkubaci ve tmě a na ledu (15 minut) byla provedena analýza na průtokovém cytometru CyAn (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Pro každou skupinu bylo kultivováno a ovlivňováno  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  buněk koncentracemi alkaloidů 5, 10, 15 a 20  $\mu\text{M}$ . Buňky byly nasazeny v celkovém objemu 10 ml. Pipetováno bylo vždy korespondující medium, zásobní roztok alkaloidů a suspenze buněk na celkový objem 10 ml.

### **3.8 Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA**

Přibližně  $1 \times 10^6$  buněk v buněčné suspenzi bylo dvakrát promyto PBS, fixováno a permeabilizováno v 70% ethanolu minimálně po dobu 1 hodiny při 4 °C. Po centrifugaci (2300 ot./min, 15 min, 4 °C) a odstranění ethanolu byly buňky dvakrát promyty PBS a suspendovány v 0,5 ml PBS a 0,5 ml fosfátového pufru (192 ml 0,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 8 ml 0,1 mM kyseliny citrónové, pH=7,8) a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. V posledním kroku byly buňky značeny 0,5 ml

Vindelova roztoku: 1 ml 1 mol Tris, pH=8, 1 mg RNasy, 100 µl Triton X-100, 60 mg NaCl, 5 mg propidium jodidu (Sigma-Aldrich, USA) a destilovaná voda do 100 ml ve tmě v pokojové teplotě a po proběhlé inkubaci analyzovány na průtokovém cytometru. Propidium jodid je fluorescenční interkalační činidlo, které se ve stechiometrickém poměru váže na jadernou DNA. Intenzita fluorescence propidium jodidu odpovídá množství DNA v dané buňce. V každém vzorku bylo ovlivňováno přibližně  $1 \times 10^6$  buněk ředěnými roztoky alkaloidů o koncentracích 5, 10 a 20 µM. Do celkového objemu 10 ml byl pipetován příslušné médium, zásobní roztok alkaloidů a suspenze buněk. Obsah DNA byl stanoven s použitím průtokového cytometru CyAn (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Data byla analyzována pomocí softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). V každém vzorku bylo hodnoceno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

### **3.9 Statistická analýza**

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programech Microsoft office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) a GraphPad Prism 5 biostatistics (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Všechny statisticky hodnocené experimenty byly provedeny v  $n = 3$ , pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Data byla hodnocena jako parametrická. Pro porovnání výsledků byl použit Studentův t-test.

## 4 Výsledky

Cílem této práce bylo stanovit cytotoxickou a antiproliferační aktivitu čtyř vybraných isochinolinových alkaloidů – chelidonin, homochelidonin, berbamin a bersavin na modelových buněčných liniích MRC-5, A2780, A549, MOLT-4 a Jurkat. Dalším úkolem bylo zjistit, zda je cytotoxická a antiproliferační aktivita zprostředkována indukcí programované buněčné smrti nebo zástavou buněčného cyklu. K dosažení správných výsledků bylo nutné seznámit se a osvojit si techniky spojené s manipulací s buňkami jako je jejich kultivace a pasážování. Dále seznámit se s metodou stanovení viability a proliferace buněk MRC-5, A2780 a A549 v reálném čase přístrojem xCELLigence RTCA a využít metody stanovení viability a proliferace buněk MRC-5, A2780, Jurkat a MOLT-4 v určitém čase pomocí barvení buněk s Trypanovou modří. Pro hlubší prozkoumání mechanismu cytotoxické aktivity na buněčné úrovni bylo využito analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA a analýzy vazby Annexinu V a propidium jodidu pomocí průtokové cytometrie. Cílem bylo prostudovat na různých modelových buněčných liniích, jakým mechanismem byla antiproliferační nebo cytotoxická aktivita vybraných alkaloidů zprostředkována. K tomu bylo využito několika metod, založených na principu průtokové cytometrie.

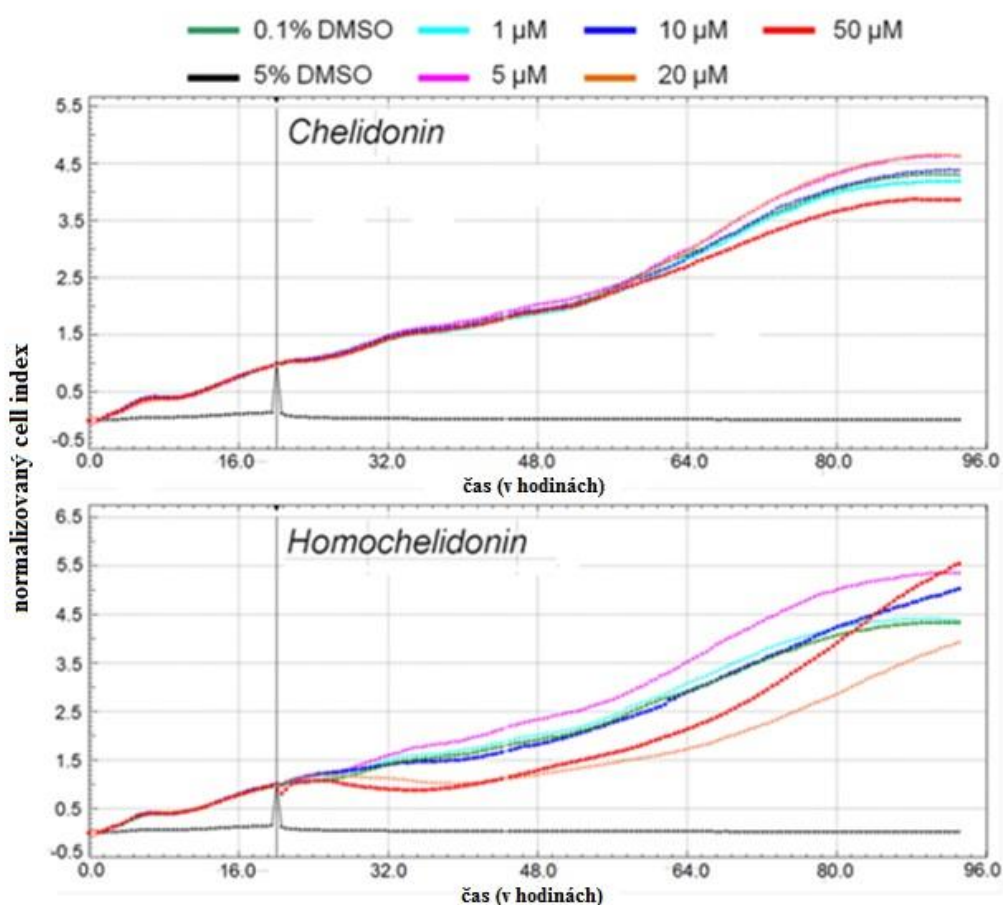
### 4.1 Analýza proliferace buněk systémem xCELLigence

Stanovení cytotoxicity a antiproliferační aktivity na přístroji xCELLigence metodou RTCA bylo provedeno na adherentních buňkách MRC-5, A2780 a A549. Roztoky alkaloidů byly ředěny podle stoupající koncentrace a spolu s DMSO v množství 0,1 a 5 % objemu jako negativní, respektive pozitivní kontrolou byly přidány asi po 20 hodinách, kdy buňky dosáhly optimálního cell indexu blízko hodnoty 1. Měření umožnilo průběžné monitorování účinku alkaloidů v průběhu zhruba 75 hodin.

#### 4.1.1 Chelidonin a Homochelidonin

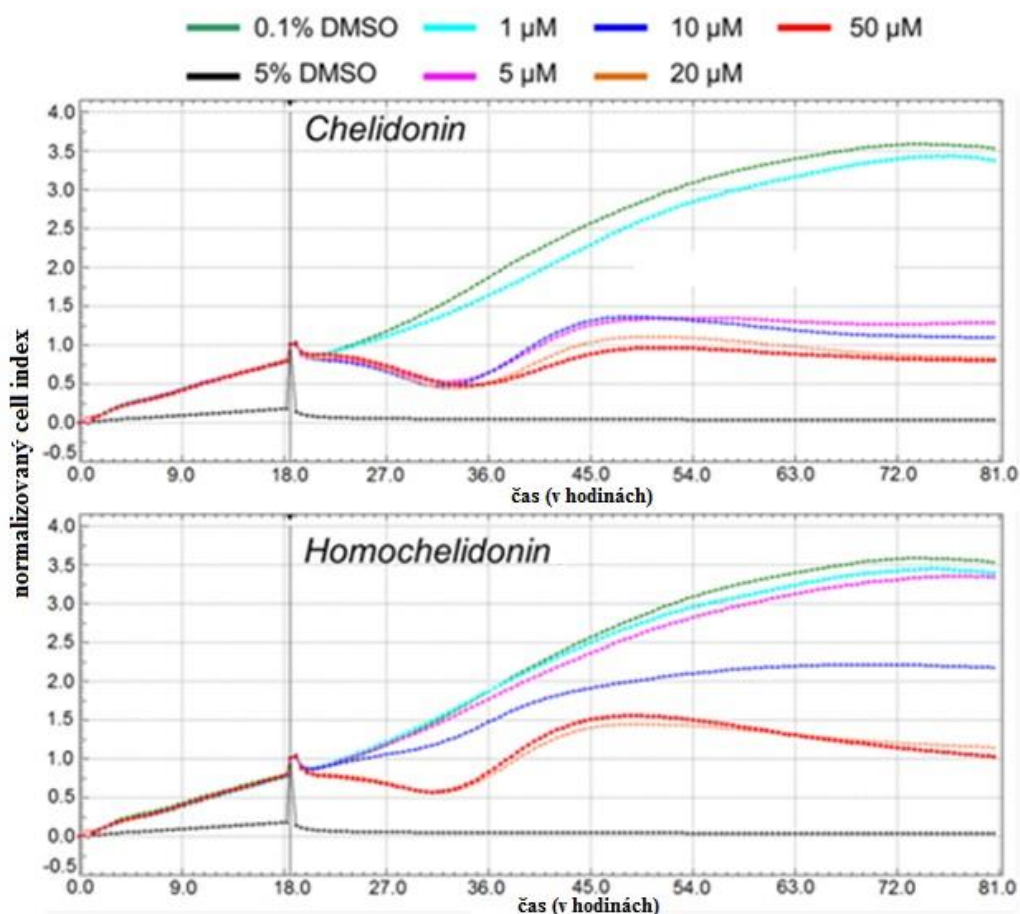
Alkaloidy chelidonin a homochelidonin byly testovány na adherentních buňkách MRC-5 a A2780 v koncentračním rozmezí 1 – 50  $\mu$ M. Buňky ovlivněné 0,1% DMSO (rozpuštědlo pro testované látky v maximálním množství při dosažení testovaných koncentrací) byly použity jako negativní kontrola a v grafu jsou znázorněny zelenou křivkou. Buňky ovlivněné 5% DMSO byly použity jako pozitivní kontrola v rámci jednotlivých experimentů a v grafu jsou znázorněny černou křivkou. Tato koncentrace DMSO je pro buňky smrtelná a nedochází k obnově buněčné proliferace. Přidání sloučenin (v grafu označeno jako

svislé čáry) snížilo počet nádorových buněk A2780 po 24 hodinách kultivace. Inhibice buněčného růstu byla prokázána po vystavení působení chelidoninu již o koncentraci 5  $\mu\text{M}$  na buněčnou linii A2780. Dále se ukázala antiproliferační aktivita homochelidoninu způsobem závislým na dávce, nicméně byla nižší v porovnání s chelidoninem, používaným ve stejných koncentracích. Chelidonin a homochelidonin vykazovaly silný antiproliferační účinek na buňky A2780, zejména během prvních 24 hodin. Avšak u buněk plicních fibroblastů MRC-5 byla pozorována rozdílná proliferace po expozici chelidoninu a homochelidoninu. Nenádorové buňky MRC-5 byly méně citlivé a jejich proliferace probíhala podobným způsobem jako negativní kontroly až do koncentrací 50  $\mu\text{M}$ .



**Obr. 17:** Vliv chelidoninu a homochelidoninu na proliferaci buněk MRC-5 analýzou RTCA.



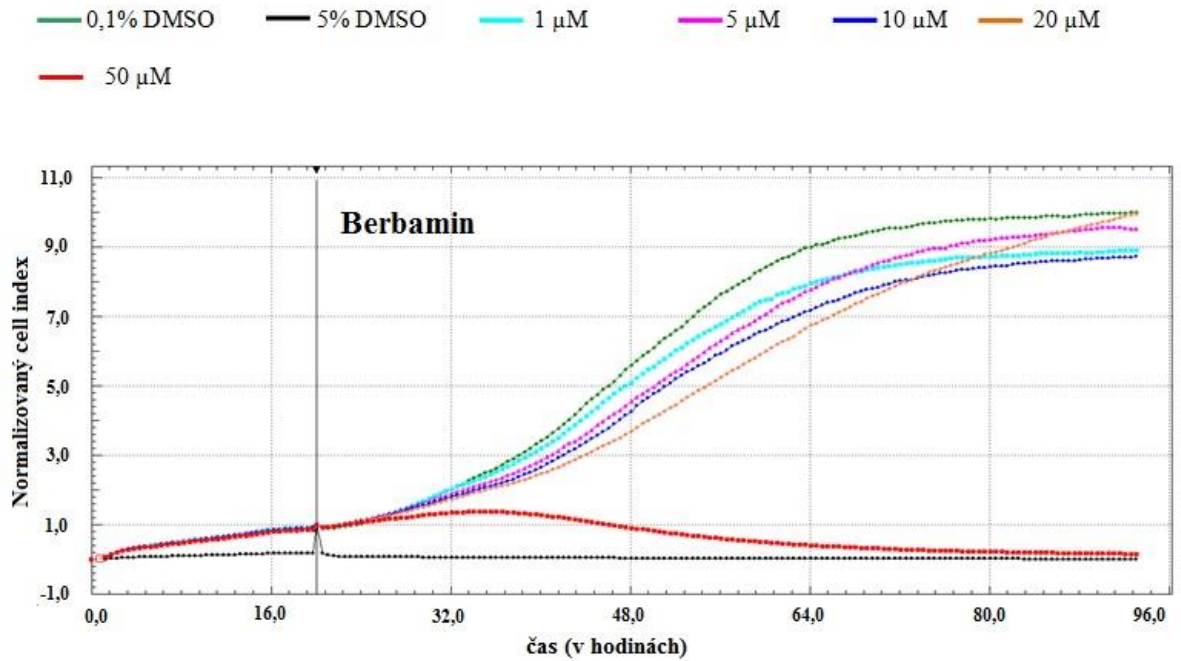


**Obr. 18:** Vliv chelidoninu a homochelidoninu na proliferaci buněk A2780 analýzou RTCA.

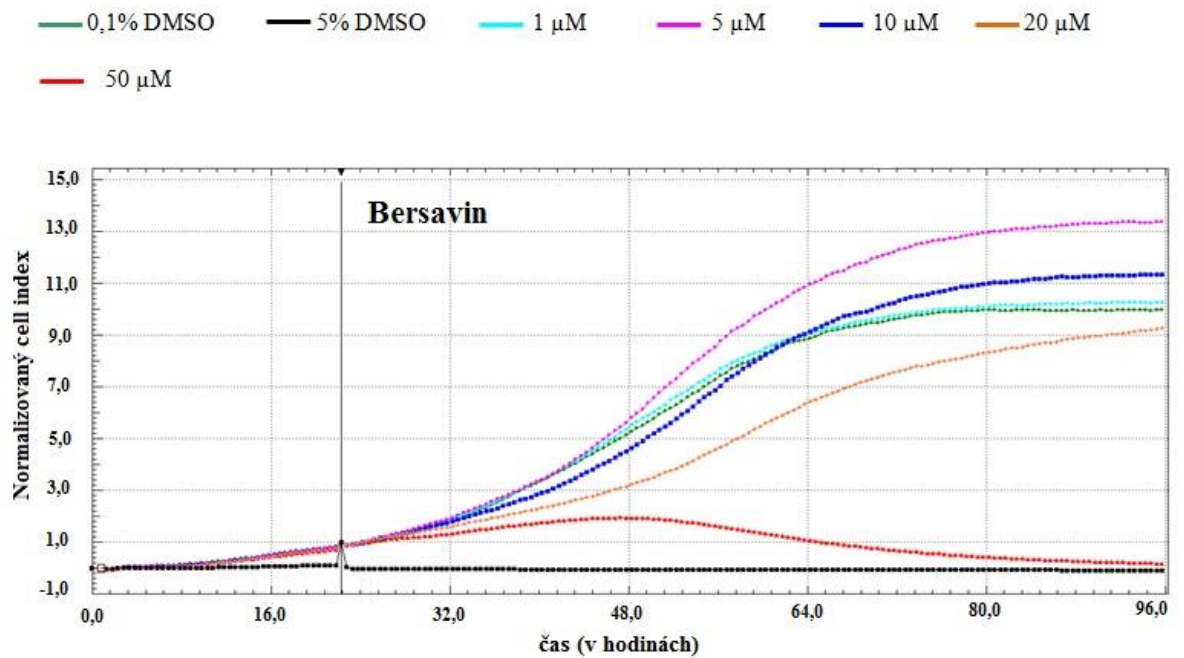
#### 4.1.2 Berbamin a Bersavin

Alkaloidy berbamin a bersavin byly testovány na adherentních buňkách adenokarcinomu plic A549 v koncentračním rozmezí 1 – 50  $\mu\text{M}$ . Kontrolní linie jsou opět zbarveny zelenou (0,1% DMSO) a černou (5% DMSO) barvou. Z obr. 19 je patrné, že koncentrace berbaminu v rozmezí 1 – 20  $\mu\text{M}$  nijak zvlášť neovlivňovaly viabilitu buněk A549. Až expozice berbaminu o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  vedlo k úplné inhibici buněčné proliferace. Po ovlivnění buněk A549 bersavinem v koncentračním rozmezí 1 – 50  $\mu\text{M}$  vedlo k podobnému výsledku, avšak z obr. 20 je patrné zvýšení proliferace buněk A549 po expozici bersavinu o koncentracích 1 – 10  $\mu\text{M}$  vůči kontrole. Toto dočasné zvýšení proliferace buněk A549 mohlo zapříčinit morfologické změny buněk, čímž buňky více adherovaly k povrchu dna destiček a tím se zvýšila měřená impedance, a tedy i cell index. Bersavin o koncentraci 20  $\mu\text{M}$

působil snížení buněčného růstu a o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  již způsoboval plnou inhibici buněčné proliferace.



**Obr. 19:** Vliv berbaminu na proliferaci buněk A549 analýzou RTCA.



**Obr. 20:** Vliv bersavinu na proliferaci buněk A549 analýzou RTCA.

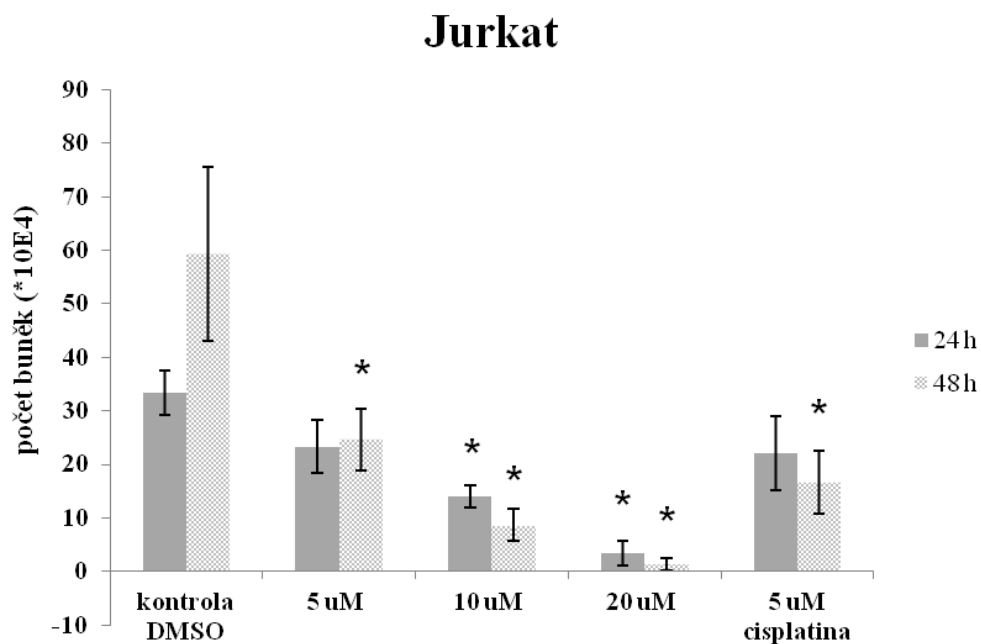
## 4.2 Stanovení viability a proliferace buněk barvením s Trypanovou modří

Pro verifikaci výsledků buněčné proliferace a viability po působení chelidoninu, berbaminu a bersavinu byla použita metoda barvení Trypanovou modří. K jejímu provedení byly použity suspenzní buňky MOLT-4 a Jurkat a adherentní buňky A2780 a MRC-5, které byly ovlivněny ředěnými roztoky alkaloidů o koncentracích 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$ . Jako negativní kontrola byly použity buňky ovlivněné 0,1% DMSO. Pozitivní kontrolou byla 5  $\mu\text{M}$  cisplatina. Buňky byly počítány ve dvou časových intervalech a to po 24 a 48 hodinové inkubaci. Množství buněk živých (bezbarvých) a mrtvých (obarvených) bylo spočítáno v 50 čtvercích Bürkerovy komůrky. Získané výsledky umožnily vypočítat viabilitu buněk z procentuálního zastoupení živých buněk a proliferaci z počtu živých buněk. Počítání buněk bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu Nikon Eclipse E200 ve třech opakováních.

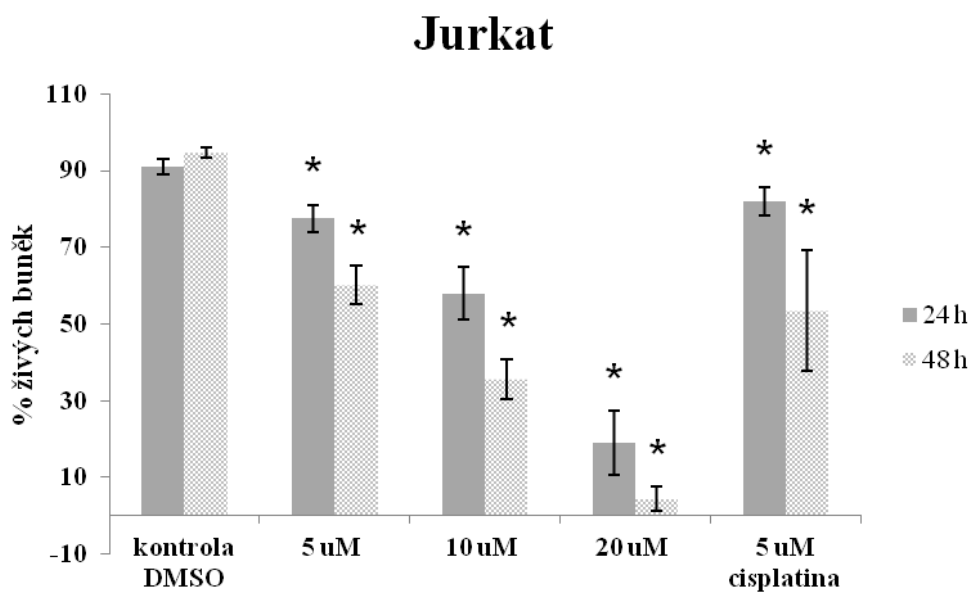
### 4.2.1 Bersavin

Expozice buněk Jurkat bersavinu o koncentracích 10 a 20  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin statisticky významně snížila počet buněk oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ). Po dobu 48 hodin byl počet buněk statisticky významně snížen po expozici bersavinu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$  (viz. graf 1). Statisticky významné hodnoty jsou v grafech označeny vždy hvězdičkou. Při stanovení viability buněk Jurkat (viz. graf 2) bylo pozorováno, že koncentrace 5 – 20  $\mu\text{M}$  vedly ke statisticky významnému snížení viability buněk Jurkat po 24 i 48 hodinách. Antiproliferační efekt bersavinu byl dávkově závislý. Současně byl proveden experiment na buňkách MOLT-4, které byly ovlivněny bersavinem o stejných koncentracích. Inhibiční účinek na proliferaci buněk MOLT-4 byl podobný jako u buněk Jurkat. Statisticky významné výsledky byly u koncentrací 10 a 20  $\mu\text{M}$  po 24 hodinách a u koncentrací 5 – 20  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách (viz. graf 3). Bersavin dále statisticky významně snižoval viabilitu buněk MOLT-4 o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$  v porovnání s negativní kontrolou (viz. graf 4). Bersavin celkově více snižoval viabilitu buněk Jurkat než MOLT-4.

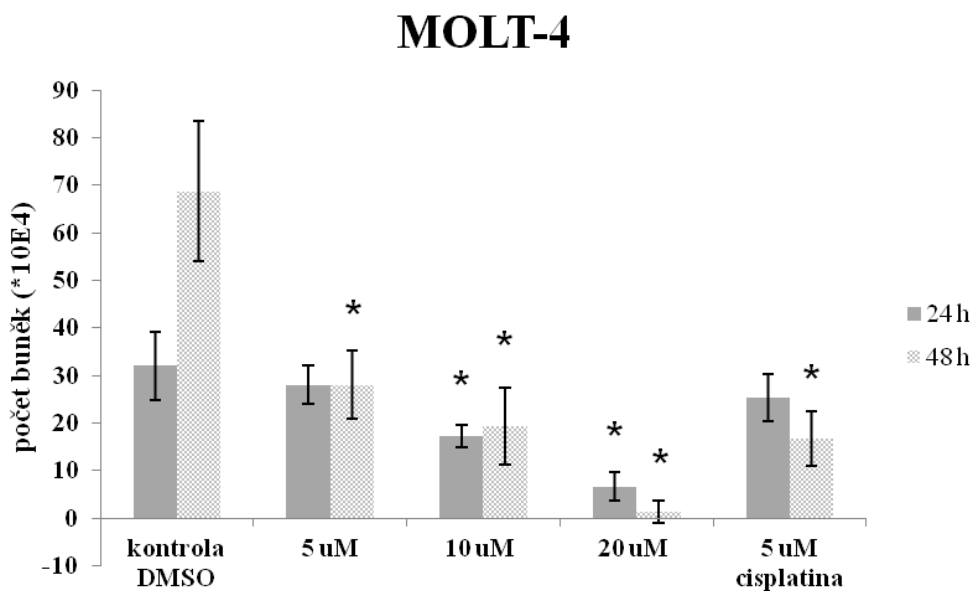
**Graf 1:** Analýza proliferace buněk Jurkat po expozici bersavinu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ . Jako pozitivní kontrola sloužila cisplatina v koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



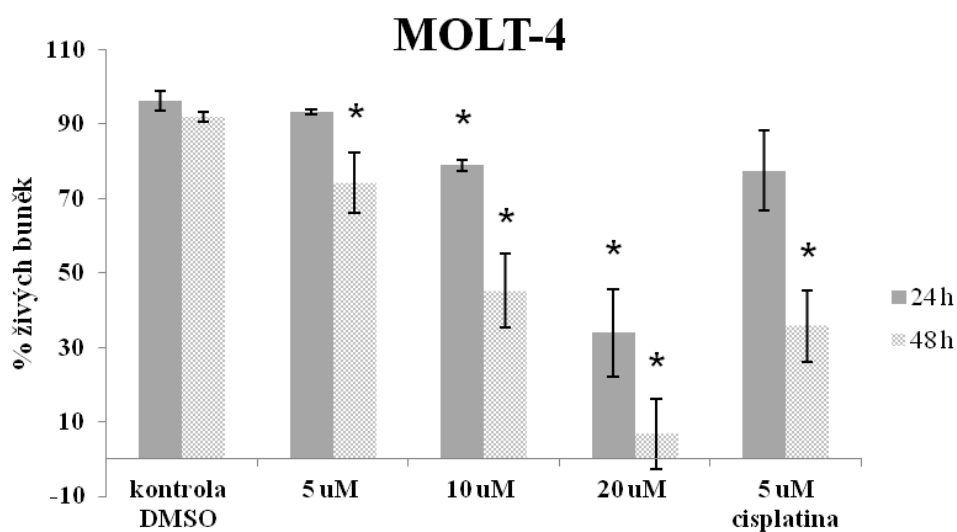
**Graf 2:** Analýza viability buněk Jurkat po expozici bersavinu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ . Jako pozitivní kontrola sloužila cisplatina v koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



**Graf 3:** Analýza proliferace buněk MOLT-4 po expozici bersavinu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ . Jako pozitivní kontrola sloužila cisplatina v koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



**Graf 4:** Analýza viability buněk MOLT-4 po expozici bersavinu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ . Jako pozitivní kontrola sloužila cisplatina v koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).

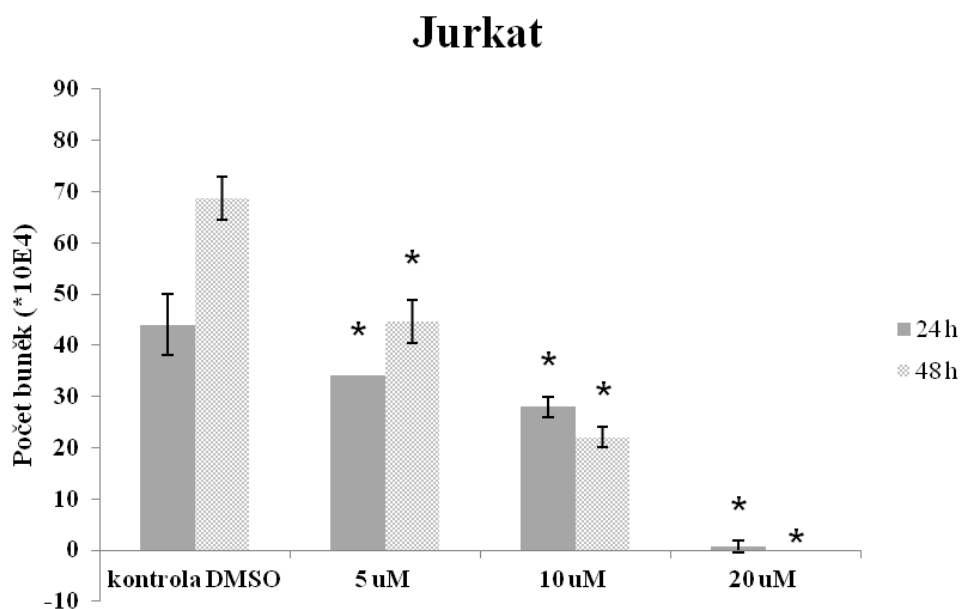


#### 4.2.2 Berbamin

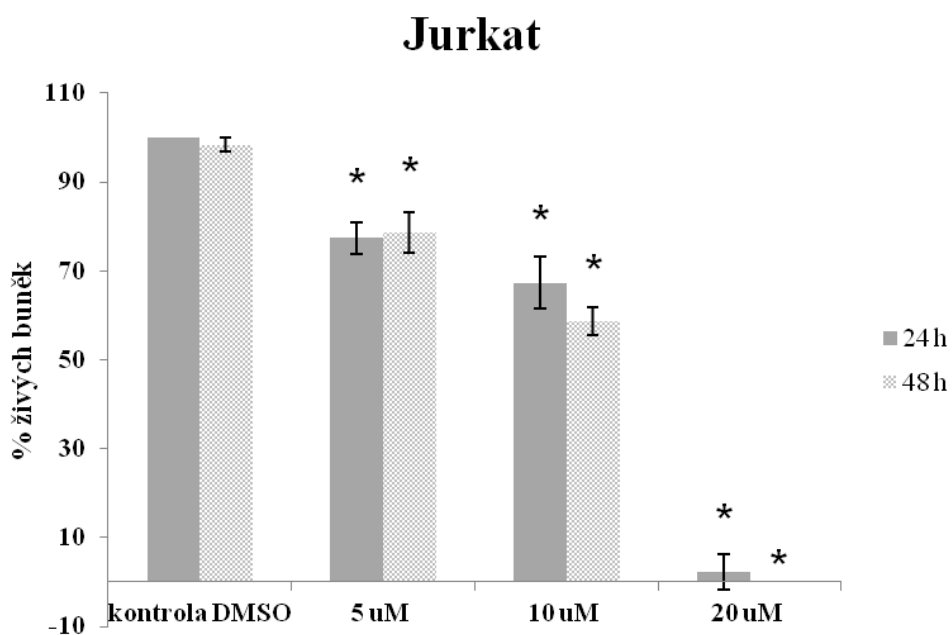
Berbamin o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$  statisticky významně snížil proliferaci buněk Jurkat po 24 a 48 hodinách (viz. graf 5). Jeho vliv na buňky MOLT-4 byl podobný, kdy statisticky významně snížil proliferaci buněk MOLT-4 o koncentracích 10 a 20  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách (viz. graf 7). Stanovení viability buněk Jurkat ukázalo, že se viabilita buněk Jurkat statisticky významně snížila po působení berbaminu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$  po 24 a 48 hodinách (viz. graf 6). Analogicky byla stanovena viabilita buněk MOLT-4 po působení berbaminu a analýza ukázala statisticky významné snížení viability buněk MOLT-4 po působení berbaminu o koncentracích 10 a 20  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách (viz. graf 8). Podobně jako v předchozím experimentu byl pozorován dávkově závislý antiproliferační a cytotoxický účinek berbaminu a současně vyšší odolnost buněk MOLT-4 po expozici berbaminu.

**Graf 5:** Analýza proliferace buněk Jurkat po expozici berbaminu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ .

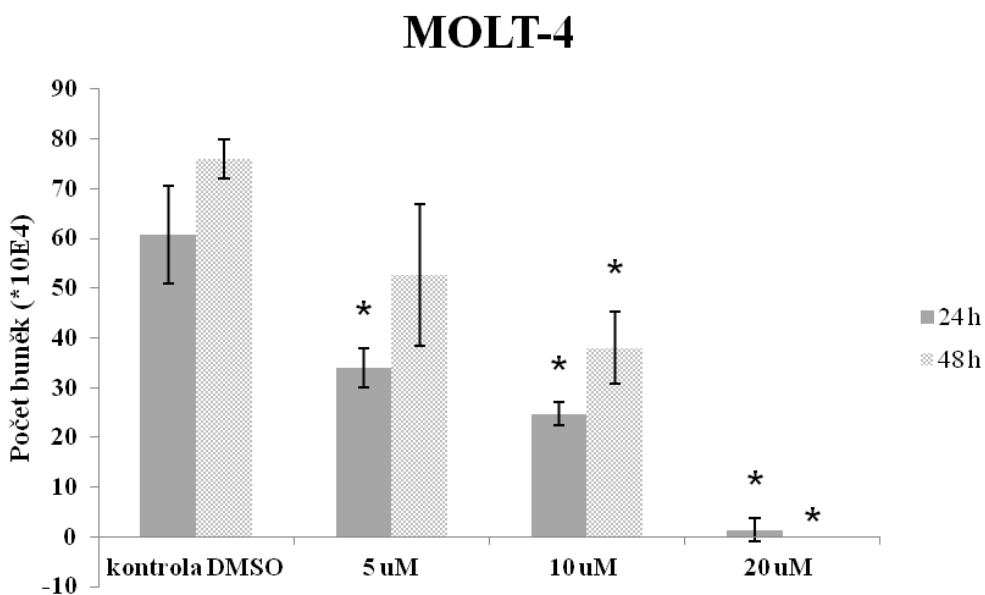
\* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



**Graf 6:** Analýza viability buněk Jurkat po expozici berbaminu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).

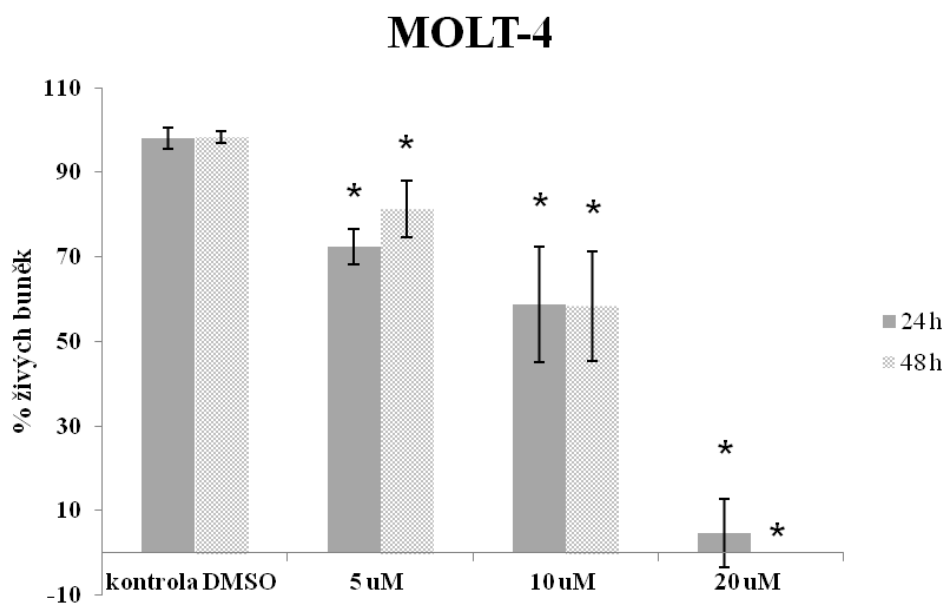


**Graf 7:** Analýza proliferace buněk MOLT-4 po expozici berbaminu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



**Graf 8:** Analýza viability buněk MOLT-4 po expozici berbaminu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ .

\* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).

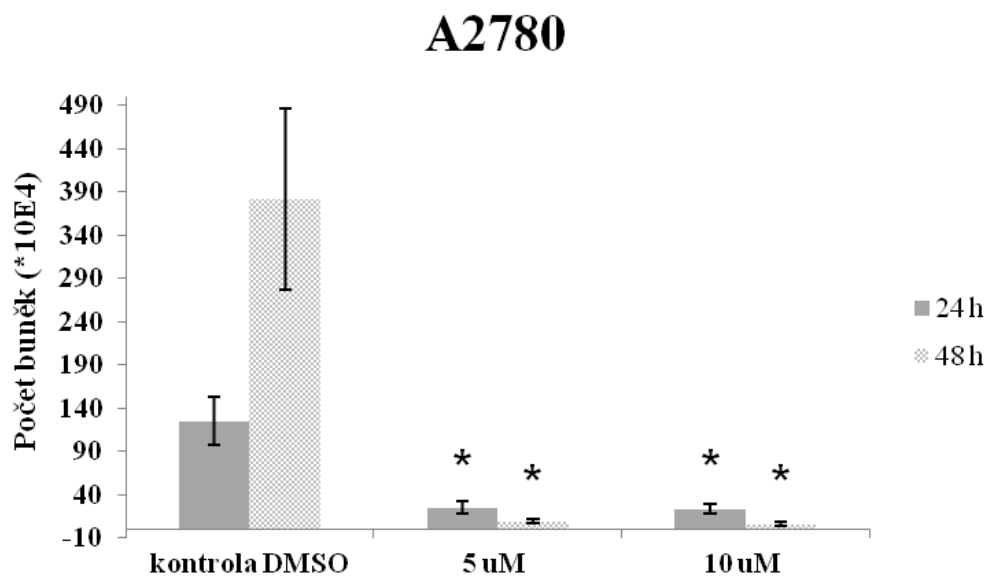


#### 4.2.3 Chelidonin

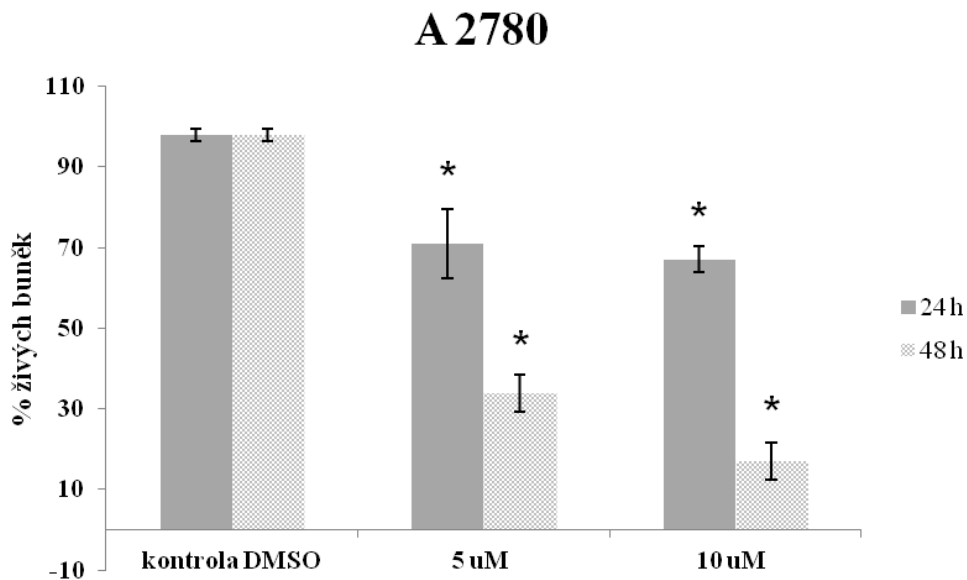
Antiproliferační vliv chelidoninu byl studován na buňkách A2780 a MRC-5 a bylo zjištěno, že chelidonin statisticky významně snížil jejich proliferaci o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$  po 24 a 48 hodinách. Antiproliferační vliv chelidoninu nebyl dávkově závislý (viz. graf 9 a graf 11). Současně byl proveden experiment pro stanovení viability buněk A2780, jehož výsledkem bylo statisticky významné snížení viability buněk A2780 po expozici chelidoninu o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$  po 24 hodinách. Dále byl zjištěn časově závislý cytotoxický účinek chelidoninu na buňky A2780, protože po 48 hodinách byla viabilita buněk snížena znatelně více (viz. graf 10). Působení chelidoninu na buňky MRC-5 statisticky významně snížilo viabilitu buněk MRC-5 o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$ , nicméně časová závislost cytotoxického účinku nebyla pozorována (viz. graf 12). Cytotoxický vliv chelidoninu nebyl u buněk MRC-5 dávkově závislý.



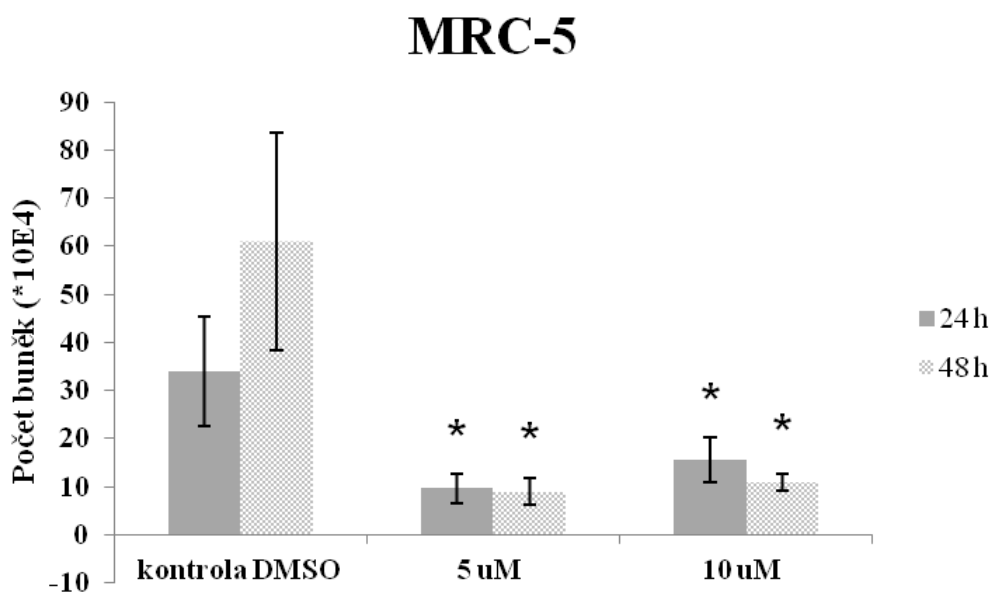
**Graf 9:** Analýza proliferace buněk A2780 po expozici chelidoninu o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



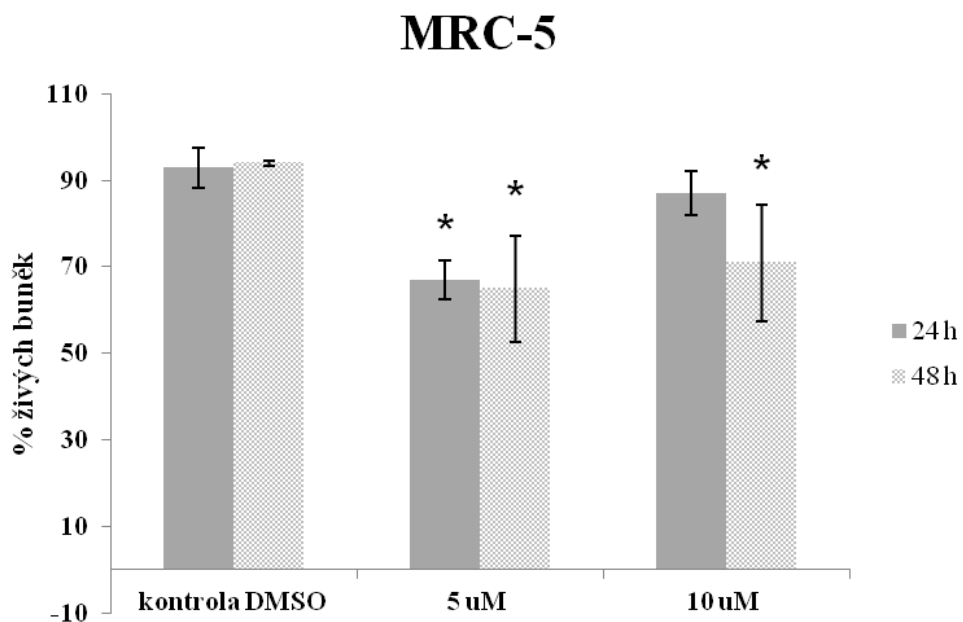
**Graf 10:** Analýza viability buněk A2780 po expozici chelidoninu o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



**Graf 11:** Analýza proliferace buněk MRC-5 po expozici chelidoninu o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



**Graf 12:** Analýza viability buněk MRC-5 po expozici chelidoninu o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$ . \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



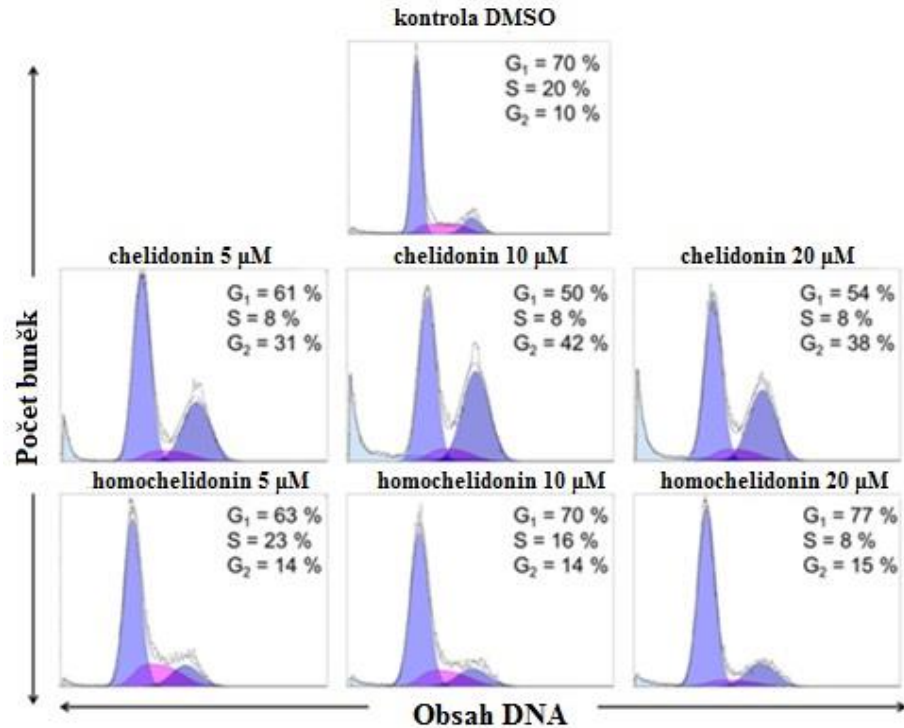
### **4.3 Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie**

Distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu byla analyzována u tří typů buněčných linií, ovlivněných již zmiňovanými alkaloidy – chelidonin, homochelidonin a bersavin. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO. Roztoky testovaných alkaloidů byly ředěny na koncentrace 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$ . V analýze byly použity buněčné linie MRC-5, A2780, Jurkat a MOLT-4. Obsah DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu byl analyzován na průtokovém cytometru CyAn. K analýze dat byl použit software Multicycle AV.

#### **4.3.1 Chelidonin a homochelidonin**

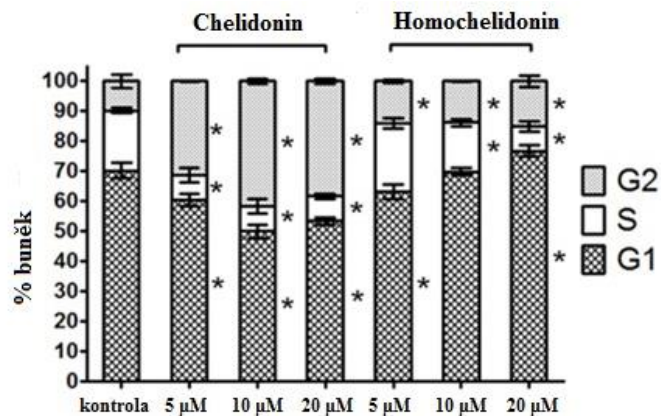
Pomocí průtokové cytometrie byly hodnoceny účinky chelidoninu a homochelidoninu na proliferaci nádorových buněk A2780 a nenádorových buněk MRC-5. Výrazná antiproliferační aktivita byla zaznamenána u buněk A2780, zatímco nízké inhibice růstu byly pozorovány u buněk MRC-5. Exponenciálně proliferující buňky byly vystaveny působení chelidoninu a homochelidoninu a redistribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu byla sledována v intervalu 24 hodin po expozici. Ovlivnění chelidoninem mělo za následek zvýšenou ( $P \leq 0,05$ ) akumulaci buněk MRC-5 ve fázi G2/M a současně byla statisticky významně ( $P \leq 0,05$ ) snížena přítomnost buněk ve fázi G1 a S ve srovnání s negativní kontrolou, jak je patrné z obr. 21. Po ovlivnění homochelidoninem byly zaznamenány menší změny, kdy byl analýzou zjištěn zvýšený podíl buněk v G1 a G2/M fázích a naopak snížený podíl v S fázi, přičemž vliv homochelidoninu vykazoval závislost na aplikované dávce.

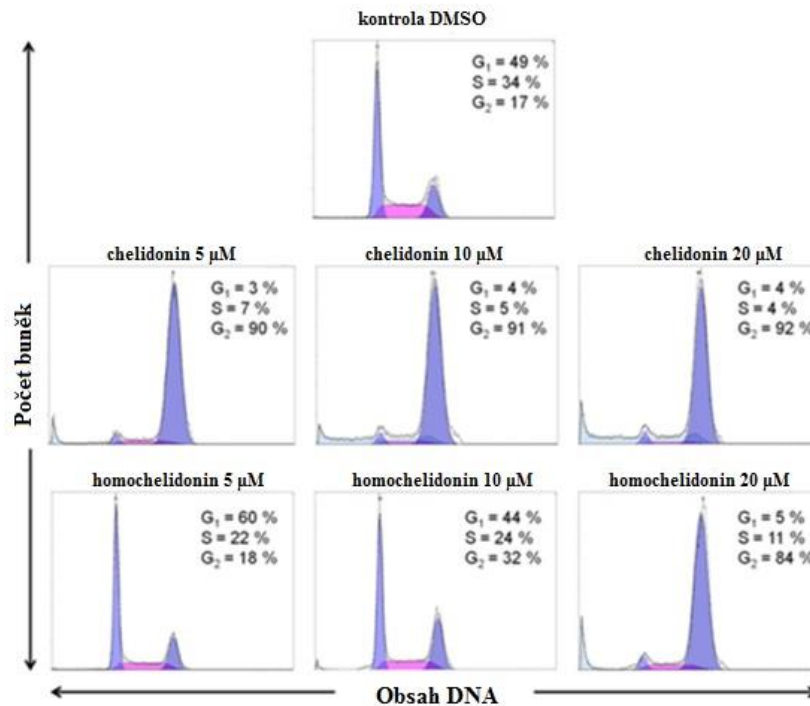
Obr. 22 demonstruje výraznější antiproliferační aktivitu zástavou buněčného cyklu buněk A2780 ovlivněných chelidoninem. Výsledky ukazují výraznou zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a pokles procentuálního zastoupení buněk v G1 a S fázi již od 5  $\mu\text{M}$  koncentrace. Expozice buněk A2780 homochelidoninu vykazovala výraznější závislost na aplikované dávce. Nižší koncentrace homochelidoninu indukovala zástavu buněčného cyklu v G1 fázi, naopak vyšší koncentrace indukovaly zástavu v G2/M fázi.



**Obr. 21:** Histogram distribuce buněk MRC-5 ovlivněných chelidoninem a homochelidoninem v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> – procento buněk v G<sub>1</sub>-, S- a G<sub>2</sub>- fázi. Reprezentativní histogramy s průměrnými hodnotami n = 3.

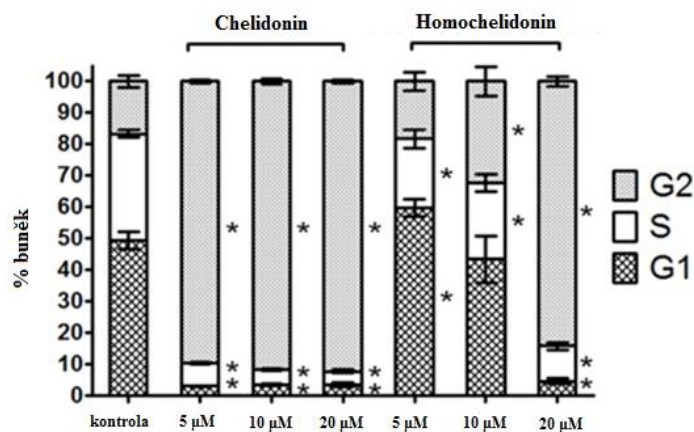
**Graf 13:** Procentuální zastoupení buněk MRC-5 v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ovlivnění chelidoninem a homochelidoninem. Graf reprezentuje aritmetický průměr, n = 3, ± směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole (P≤0,05).





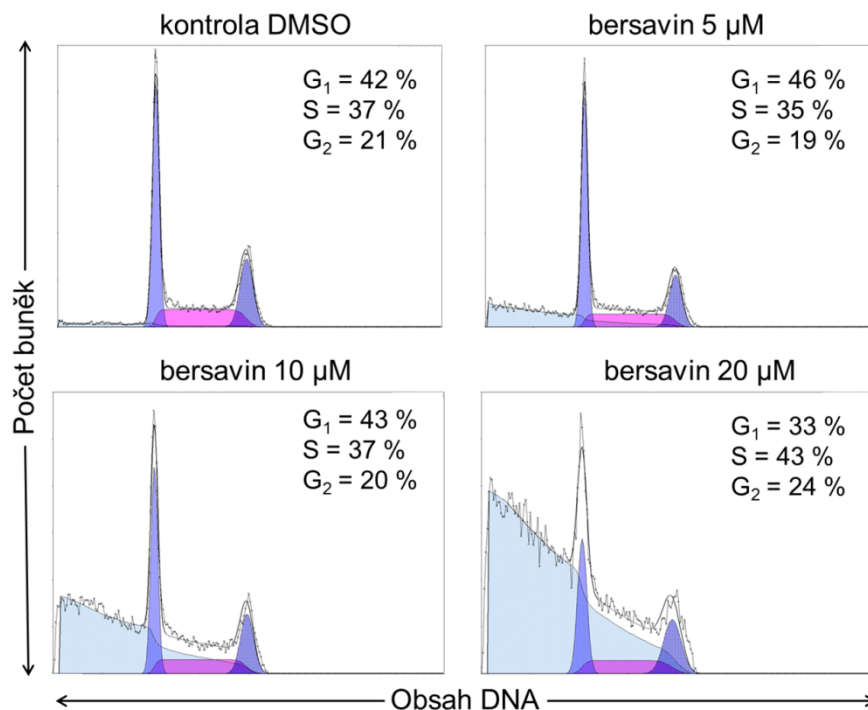
**Obr. 22:** Histogram distribuce buněk A2780 ovlivněných chelidoninem a homochelidoninem v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> – procento buněk v G<sub>1</sub>-, S- a G<sub>2</sub>- fázi. Reprezentativní histogramy s průměrnými hodnotami n = 3.

**Graf 14:** Procentuální zastoupení buněk A2780 v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ovlivnění chelidoninem a homochelidoninem. Graf reprezentuje aritmetický průměr, n = 3, ± směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole (P ≤ 0,05).



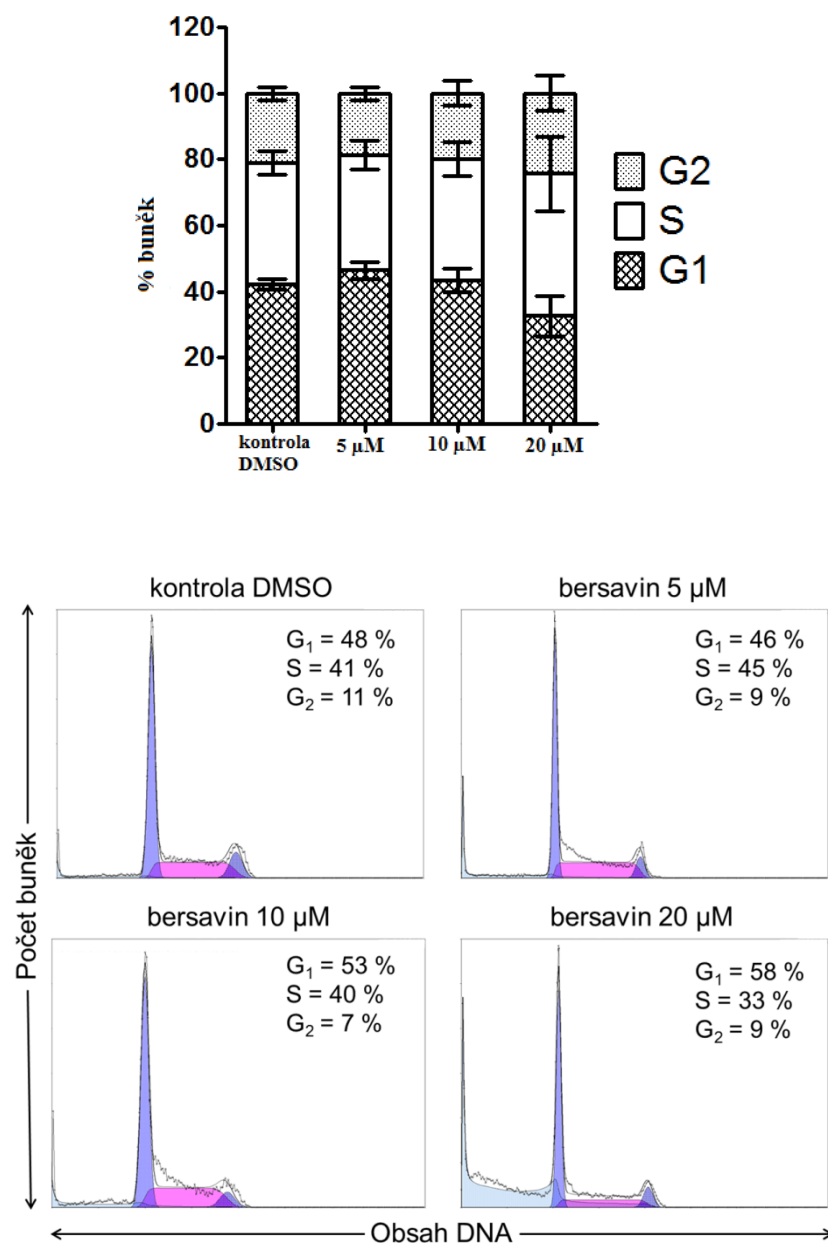
### 4.3.2 Bersavin

Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA byla rovněž studována na buňkách Jurkat a MOLT-4 po ovlivnění bersavinem o stejných koncentracích jako v předchozím experimentu. Po expozici bersavinu v nízkých koncentracích nebyly pozorovány výrazné inhibice růstu prostřednictvím analýzy buněčného cyklu u buněk Jurkat oproti negativní kontrole. Až při koncentraci 20  $\mu\text{M}$  došlo k mírně zvýšené akumulaci buněk v S a G<sub>2</sub>/M fázích a současně byla snížena přítomnost buněk v G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu (obr. 23). Analogicky byl proveden experiment na buňkách MOLT-4. Výsledkem bylo statisticky významné ( $P \leq 0,05$ ) snížení počtu buněk v G<sub>2</sub>/M fázi buněčného cyklu po expozici bersavinu o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Zaznamenáno bylo i mírné zvýšení počtu buněk v G<sub>1</sub> fázi. Ovlivnění bersavinem o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  mělo za následek statisticky významně ( $P \leq 0,05$ ) zvýšenou akumulaci buněk MOLT-4 ve fázi G<sub>1</sub> a současně byl zaznamenán snížený podíl buněk v S a G<sub>2</sub>/M fázích buněčného cyklu (obr. 24).



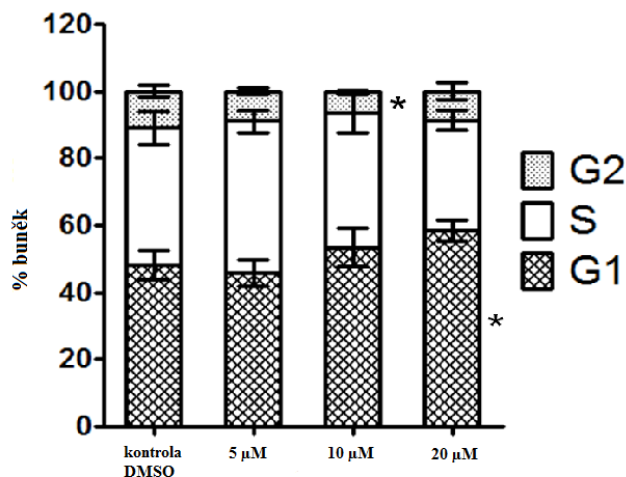
**Obr. 23:** Histogram distribuce buněk Jurkat ovlivněných bersavinem v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> – procento buněk v G<sub>1</sub>-, S- a G<sub>2</sub>- fázi. Reprezentativní histogramy s průměrnými hodnotami  $n = 3$ .

**Graf 14:** Procentuální zastoupení buněk Jurkat v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ovlivnění bersavinem. Graf reprezentuje aritmetický průměr,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka.



**Obr. 24:** Histogram distribuce buněk MOLT-4 ovlivněných bersavinem v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> – procento buněk v G<sub>1</sub>-, S- a G<sub>2</sub>- fázi. Reprezentativní histogramy s průměrnými hodnotami  $n = 3$ .

**Graf 15:** Procentuální zastoupení buněk MOLT-4 v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ovlivnění bersavinem. Graf reprezentuje aritmetický průměr,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



#### 4.4 Detekce apoptózy pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu

Další metoda, která je zprostředkována pomocí průtokové cytometrie, využívá protein Annexin V konjugovaný s fluorescein isothiokyanátem (FITC), jež má silnou afinitu k fosfatidylserinu v přítomnosti  $Ca^{2+}$  iontů a propidium jodid se schopností vazby na DNA. Tato analýza je schopná zjistit, zda byl cytostatický efekt alkaloidů zprostředkován indukci apoptózy. Analýza byla provedena na adherentních buňkách MRC-5 a A2780. Testované alkaloidy byly zkoumány v rozmezí koncentrací 5 – 20  $\mu$ M. Analýza byla provedena pomocí průtokového cytometru CyAn. Data byla analyzována pomocí softwaru Kaluza Analysis.

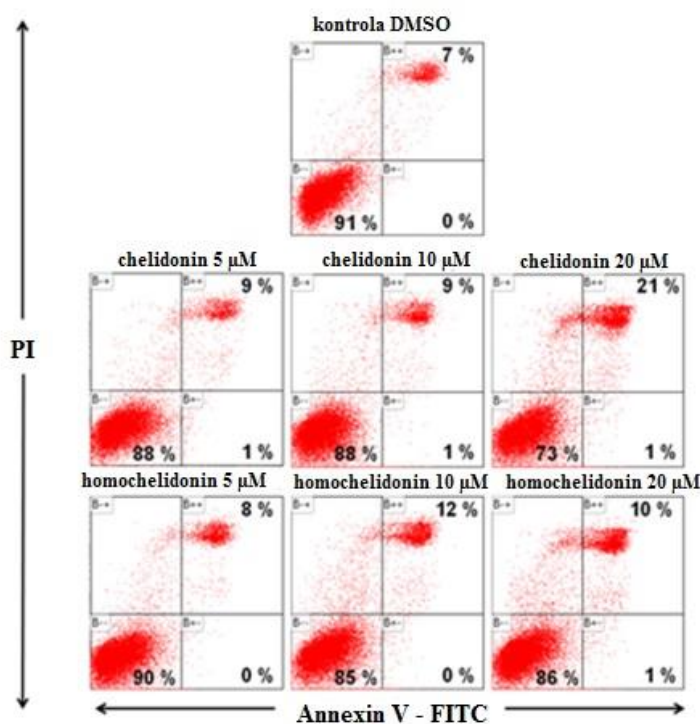
##### 4.4.1 Chelidonin a homochelidonin

Buňky ovlivněny testovanými látkami po dobu 24 hodin byly značeny Annexinem V a PI. Zobrazení výsledků v histogramu se dělí podle kvadrantů. První kvadrant vlevo dole zobrazuje živé buňky, které jsou negativní na obě sondy, druhý kvadrant vpravo dole zobrazuje časně apoptotické buňky pozitivní na Annexin V a třetí kvadrant vpravo nahoře odpovídá pozdně apoptotickým, či nekrotickým buňkám pozitivním na obě sondy.

Buňky MRC-5 byly ovlivněny chelidoninem o koncentraci 5, 10 a 20  $\mu$ M. Výsledky kvantifikace vazby Annexinu V a PI ukazují, že chelidonin o koncentraci 20  $\mu$ M významně



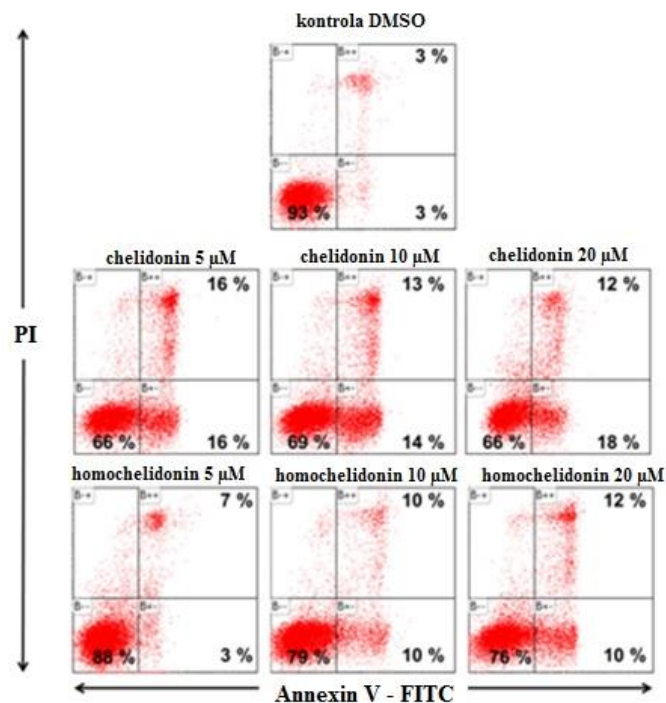
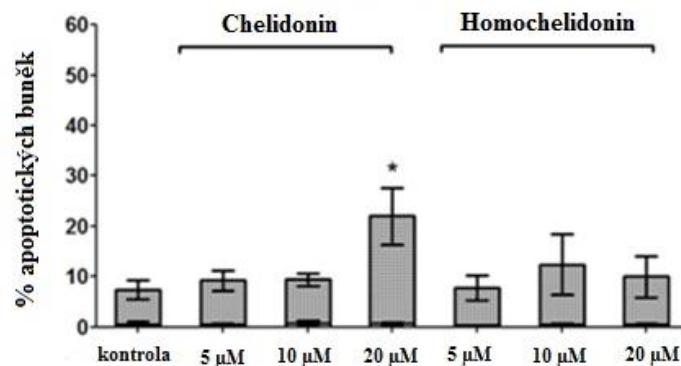
( $P \leq 0,05$ ) zvýšil procento pozdně apoptotických buněk MRC-5 vůči kontrole. Obr. 25 ukazuje procentuální zvýšení pozdně apoptotických buněk na 21 %. Expozice homochelidoninu o koncentraci 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$  vedlo k mírnému zvýšení počtu pozdně apoptotických buněk MRC-5 značených Annexinem V a PI (obr. 25). Paralelně byla provedena analýza vazby Annexinu V a PI na buňkách A2780 (obr. 26). Chelidonin indukoval apoptózu detekovanou prostřednictvím vazby Annexinu V na buňkách A2780 nezávisle na aplikovaných dávkách. Chelidonin vyvolal statisticky významnou ( $P \leq 0,05$ ) časnou (Annexin V) a pozdní (Annexin V a PI) apoptózu v koncentračním rozmezí 5 – 20  $\mu\text{M}$ . Buňky ovlivněné chelidoninem o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  vykazovaly zvýšenou přítomnost buněk pozitivních na Annexin V (18 %) a také dvojitě pozitivních na Annexin V a PI (12 %). Podobnou, avšak nižší aktivitu vyvolávající sníženou viabilitu buněk za externalizace fosfatidylserinu, jevil i homochelidonin ve srovnání s kontrolními buňkami. Vůči kontrole se počet časně a pozdně apoptotických buněk zvýšil na 22 % po expozici homochelidoninu o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  (obr. 26).



**Obr. 25:** Detekce vazby Annexinu V a PI u buněk MRC-5 po ovlivnění chelidoninem a homochelidoninem. Histogramy spolu s příslušnými procenty reprezentují zastoupení tří typů buněk - negativní buňky (živé), Annexin V pozitivní/ PI negativní (časně apoptotické)

a Annexin V/ PI dvojité pozitivní (pozdě apoptotické). Reprezentativní histogramy s průměrnými hodnotami  $n = 3$ .

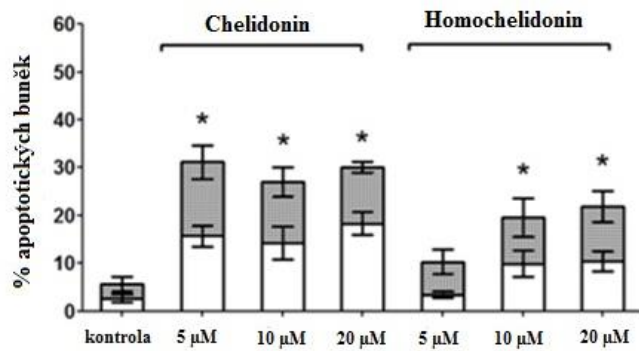
**Graf 16:** Analýza časných a pozdních apoptotických buněk MRC-5 po ovlivnění chelidoninem a homochelidoninem. Graf reprezentuje aritmetický průměr,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významné hodnoty vůči kontrole ( $P \leq 0,05$ )



**Obr. 26:** Detekce vazby Annexinu V a PI u buněk A2780 po ovlivnění chelidoninem a homochelidoninem. Histogramy spolu s příslušnými procenty reprezentují zastoupení tří typů buněk - negativní buňky (živé), Annexin V pozitivní/ PI negativní (časně apoptotické)

a Annexin V/ PI dvojitě pozitivní (pozdně apoptotické). Repräsentativní histogramy s průměrnými hodnotami  $n = 3$ .

**Graf 17:** Analýza časných a pozdních apoptotických buněk A2780 po ovlivnění chelidoninem a homochelidoninem. Graf reprezentuje aritmetický průměr,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významné hodnoty vůči kontrole ( $P \leq 0,05$ ).



## 5 Diskuze

Nádorová onemocnění jsou v současnosti druhým nejzávažnějším civilizačním onemocněním na světě. Každým rokem je nově diagnostikováno nespočet případů. Existuje velké množství velmi účinných chemoterapeutických látek, ale ani tento fakt dosud plně nestačí k vyšší účinnosti terapie a delšímu přežití pacientů s nádorovými onemocněními. Mnoho chemoterapeutik totiž není zacíleno pouze na nádorové buňky, jelikož nedokáže rozpoznat rozdíly mezi zdravou, nebo nádorovou tkání a poškozuje i zdravé buňky pacienta. Výsledkem je často neúspěšná léčba s mnohdy fatálním následkem. Vědci se proto snaží vynalézt látky schopné cílit na konkrétní nádorové struktury. Látky přírodního původu tento potenciál mají a jejich účinky jsou využívány v tradiční čínské medicíně po tisíce let. Vědecko-výzkumný zájem o ně proto začíná být značně veliký, což potvrzuje i nespočet nových klinických studií, jejichž nárůst je exponenciální.

V této práci byla studována antiproliferační a cytotoxická aktivita čtyř vybraných isochinolinových alkaloidů – chelidonin, homochelidonin, berbamin a bersavin. Negativní kontrolou byl 0,1% DMSO, který zároveň sloužil jako rozpouštědlo pro testované látky. Pozitivní kontrolou byl 5% DMSO a 5  $\mu$ M cisplatina. Cisplatina patří do skupiny alkylačních činidel, která jsou nejúčinnějšími cytostatiky, používanými v léčbě celé řady karcinomů (Ho et al. 2003). Testy byly uskutečněny na adherentní buněčné linii nenádorových buněk MRC-5 (fibroblasty plicní tkáně) a nádorových buněčných liniích A549 (adenokarcinom plic), A2780 (karcinom vaječníku). Dále pak na suspenzních buňkách MOLT-4 a Jurkat, které jsou tvořeny z lidských T-lymfocytárních leukemických buněk, lymfoblastů akutní T-buněčné leukemie. Buněčná linie Jurkat se vyznačuje absencí exprese funkčního proteinu p53 (p53 deficient), naopak buněčná linie MOLT-4 funkční protein p53 exprimuje (p53 wild-type).

První metodou využitou v experimentální části pro posouzení antiproliferační a cytotoxické aktivity vybraných isochinolinových alkaloidů byla metoda RTCA s využitím analyzátoru xCELLigence na adherentních buněčných liniích MRC-5, A2780 a A549. Zásobní roztoky alkaloidů byly ředěny v koncentračním rozmezí 1 – 50  $\mu$ M. Metodou RTCA bylo zjištěno, že chelidonin, homochelidonin, berbamin i bersavin vykazují antiproliferační aktivitu na vybraných modelových buněčných liniích. Měření bylo prováděno zhruba 75 hodin od přidání testovaných látek. Chelidonin byl testován o koncentraci 1 – 50  $\mu$ M na adherentní buněčné linie MRC-5 a A2780. Chelidonin o koncentraci 1  $\mu$ M nepůsobil

antiproliferačně na buňky A2780, až koncentrace 5, 10, 20 a 50  $\mu\text{M}$  měla zřejmý antiproliferační účinek na tyto buňky. Chelidonin o stejných koncentracích však neměl tak zjevný růst-inhibující vliv na nenádorové buňky plicních fibroblastů MRC-5. Jejich proliferace probíhala podobným způsobem jako negativní kontroly. Tento závěr se shoduje s publikací, kde byl zkoumán vliv chelidoninu na myší leukemické buňky L1210 a myší zdravé slezinné buňky. Byl zde zjištěn cytotoxický účinek pouze na leukemické buňky L1210 (Kaminsky et al. 2008). Naše výsledky se rovněž shodují s výsledky publikace, která analyzovala antiproliferační účinek chelidoninu na nádorové buňky maligního melanomu A375 pomocí systému xCELLigence (Hammerová et al. 2011). Analogicky byl prokázán antiproliferační účinek chelidoninu o koncentracích 10, 15, 20 a 50  $\mu\text{M}$  na nádorové buňky adenokarcinomu plic A549, který vedl k úplné inhibici proliferace buněk ve srovnání s pozitivní kontrolou (Havelek et al. 2016). Slibný antiproliferační účinek chelidoninu byl také prokázán na lidských nádorových buňkách adenokarcinomu prsu MCF-7 (Noureini a Esmaili, 2014) a na lidských buňkách hepatocelulárního karcinomu HepG2 (Paul et al. 2013).

Buněčné linie MRC-5 a A2780 byly v naší práci rovněž vystaveny alkaloidu homochelidoninu o koncentracích 1 – 50  $\mu\text{M}$ . Antiproliferační aktivita homochelidoninu na buňky A2780 se jevila až při koncentracích 20 a 50  $\mu\text{M}$ , přičemž tento účinek byl závislý na zvyšující se dávce. Expozici homochelidoninu o stejných koncentracích byly vystaveny rovněž nenádorové buňky MRC-5 a výsledkem byla nízká antiproliferační aktivita. Homochelidonin byl dosud testován pouze v jedné studii, jejíž výsledky korelují s našimi daty. Aplikace homochelidoninu o koncentracích 10, 15 a 20  $\mu\text{M}$  snížila proliferaci buněk A549 a o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  vedla k úplné inhibici proliferace buněk A549, přičemž účinek byl rovněž závislý na aplikované dávce (Havelek et al. 2016).

Alkaloid berbamin byl testován, s ohledem na svůj vliv, na buněčnou proliferaci na adherentních buňkách adenokarcinomu plic A549 v koncentračním rozmezí 1 – 50  $\mu\text{M}$ . Jeho antiproliferační aktivita byla detekována až při koncentraci 50  $\mu\text{M}$  a vedla k úplné inhibici proliferace buněk A549. Tyto výsledky se shodují s výsledky studie zkoumající antiproliferační aktivitu berbaminu rovněž na buňkách A549 v koncentračním rozmezí 10 – 80  $\mu\text{M}$ , přičemž silný účinek nastupoval při koncentracích 50  $\mu\text{M}$  a výše (Duan et al. 2010). Antiproliferační účinek berbaminu byl dále prokázán na několika epiteliálních buněčných liniích rakoviny jater Huh7, HepG2, MHCC97H a PLC/PRF/5 s hodnotou  $\text{IC}_{50}$  5,2 mg/ml.

Jeho účinek rovněž potlačil růst mezenchymálních buněk karcinomu jater SK-Hep-1 a SNU398 (Meng et al. 2013). V nedávné studii byl testován nový syntetický derivát berbaminu - 4-chlorbenzoylberbamin (BBMD9), který inhiboval proliferaci myelomových buněk KM3, RPMI8226 a U266 v závislosti na čase a dávce. Hodnoty  $IC_{50}$  při 24, 48 a 72 hodinách byly 0,65; 0,69 a 0,72  $\mu\text{g/ml}$  v daném pořadí (Liang et al. 2016).

Buněčná linie A549 byla rovněž v našich experimentech vystavena působení alkaloidu bersavinu o koncentracích 1 – 50  $\mu\text{M}$ . Antiproliferační účinek bersavinu nastupoval již při koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a při 50  $\mu\text{M}$  způsoboval úplnou inhibici proliferace buněk A549. V porovnání s berbaminem se bersavin jevil jako účinnější protinádorová látka. Zde je nutné podotknout, že doposud nebyly publikovány žádné experimenty prokazující jeho potencionální protinádorový účinek.

Pro nezávislé ověření viability a proliferace buněk byla použita metoda manuálního počítání buněk barvením Trypanovou modří. Tímto specifickým barvením se rozlišují živé a mrtvé buňky. Principem této metody je prostup tmavě modrého barviva Trypanové modří přes plazmatickou membránu mrtvých buněk, kde se hromadí v intracelulárním prostoru a dochází tak k obarvení buněk. Naopak živé buňky zůstávají bezbarvé, díky celistvosti plazmatické membrány. Pro stanovení viability a proliferace byly vybrány buňky A2780 a MRC-5, které byly vystaveny expozici chelidoninu o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$ . Dále byly vybrány buňky Jurkat a MOLT-4, které byly ovlivněny berbaminem a bersavinem o koncentracích 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$ . Počítání buněk bylo provedeno po 24 a 48 hodinách. Všechny tři alkaloidy vykazovaly antiproliferační a cytotoxický účinek. Antiproliferační účinek bersavinu na buňky Jurkat a MOLT-4 statisticky významně snižoval jejich proliferaci o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách. Podobně byl pozorován i jeho cytotoxický účinek, kdy docházelo ke statistickému snížení viability obou buněčných linií po expozici bersavinu o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách. Analogicky byl antiproliferační a cytotoxický účinek na buňkách Jurkat a MOLT-4 pozorován i u berbaminu. Expozice berbaminu o koncentracích 10 a 20  $\mu\text{M}$  působila statisticky významné snížení proliferace buněk Jurkat a MOLT-4 po 48 hodinách. Analýza viability buněk Jurkat a MOLT-4 ukázala cytotoxický efekt berbaminu o koncentracích 10 a 20  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách. Výsledky analýz ukázaly podobnost dávkově závislých účinků bersavinu a berbaminu, avšak bersavin byl mnohem účinnější v porovnání s berbaminem, což nám potvrzuje správnost předchozí metody RTCA. Výsledky dále ukázaly vyšší rezistenci buněk MOLT-4 vůči působení bersavinu

a berbaminu v porovnání s buňkami Jurkat. Chelidonin byl studován na nádorových buňkách A2780 a nenádorových buňkách MRC-5. Antiproliferační vliv chelidoninu byl pozorován u obou buněčných linií, kdy koncentrace 5 a 10  $\mu\text{M}$  chelidoninu významně snižovaly jejich proliferaci po 24 a 48 hodinách, přičemž jeho expozice nebyla dávkově závislá. Výsledek antiproliferačního účinku chelidoninu na buňky MRC-5 jsou v rozporu s výsledky analýzy proliferace buněk metodou RTCA pomocí systému xCELLigence. Z toho vyplývá, že chelidonin rovněž může antiproliferačně působit na nenádorové buňky. Chelidonin byl dále testován na cytotoxickou aktivitu proti buňkám A2780 a analýzou bylo zjištěno významné statistické snížení viability buněk A2780 po expozici chelidoninu o koncentracích 5 a 10  $\mu\text{M}$  po 24 hodinách. Po 48 hodinách byla viabilita buněk A2780 snížena znatelně více, což naznačuje možný cytotoxický účinek závislý na čase. Chelidonin měl rovněž statisticky významný účinek snižující viabilitu buněk MRC-5 od koncentrace 5  $\mu\text{M}$ . Časově závislý cytotoxický účinek chelidoninu na buňky MRC-5 však nebyl pozorován.

Pro hlubší poznání cytotoxického účinku alkaloidů byla zvolena metoda analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie. Distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu byla analyzována u dvou typů buněčných linií ovlivněných chelidoninem a homochelidoninem. Roztoky testovaných alkaloidů byly ředěny na koncentrace 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$  a jejich expozici byly vystaveny buňky MRC-5 a A2780. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru CyAn 24 hodin od ovlivnění. Expozice buněk MRC-5 alkaloidu chelidoninu po dobu 24 hodin vedlo ke zvýšené akumulaci buněk v G2/M fázi a současně ke snížení buněk v G1 a S fázi ve srovnání s negativní kontrolou. Působení chelidoninu na buňky bylo nezávislé na použité koncentraci. Výsledkem byla inhibice buněčné proliferace. Současně byl na buňkách MRC-5 testován alkaloid homochelidonin, jehož expozice vedla ke zvýšené akumulaci buněk v G1 a G2/M fázi, a naopak ke sníženému podílu v S fázi. Aktivita homochelidoninu byla závislá na použité koncentraci, neboť při koncentraci 20  $\mu\text{M}$  došlo k zvýšení podílu buněk v G1 fázi na 77 %, v G2/M fázi na 15 % a k snížení podílu buněk v S fázi na 8 % oproti negativní kontrole. Druhá buněčná linie použitá v tomto experimentu byla A2780. Expozice chelidoninu vedla k mnohem výraznější antiproliferační aktivitě ve srovnání s působením na buňky MRC-5. Již koncentrace 5  $\mu\text{M}$  chelidoninu způsobila výraznou akumulaci v G2/M fázi na 90 % a pokles procentuálního zastoupení buněk v G1 fázi na 3 % a v S fázi na 7 % vůči negativní kontrole. Koncentrace 10 a 20  $\mu\text{M}$  měly stejný efekt. Expozice homochelidoninu o koncentraci 5  $\mu\text{M}$

způsoboval akumulaci buněk v G1 fázi, naopak vyšší koncentrace 10 a 20  $\mu\text{M}$  způsobovaly akumulaci buněk v G2/M fázi a snížení počtu buněk v G1 fázi vůči negativní kontrole. Existují studie potvrzující, že chelidonin indukuje zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi. Chelidonin je schopen inhibovat polymeraci tubulů, čímž se naruší struktura mikrotubulů. Tím je znemožněn průběh mitózy v G2/M fázi a následně dojde k apoptóze buňky (Panzer et al. 2001). Zástavu mitózy v G2/M fázi buněčného cyklu po působení chelidoninu potvrzují i studie na buňkách L1210 (Kaminsky et al. 2008). Podobné účinky homochelidoninu potvrzují i další studie na buňkách MOLT-4 (Havelek et al. 2016). Alkaloid bersavin nevykazoval tak silný antiproliferační účinek ve srovnání s chelidoninem. Jeho účinkům byly vystaveny modelové buňky Jurkat a MOLT-4, které byly rovněž podrobeny analýze buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Změny podílu buněk Jurkat v jednotlivých fázích buněčného cyklu nastaly až po ovlivnění bersavinem o koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Byla pozorována mírná statisticky nevýznamná akumulace buněk v S a G2/M fázích a současně snížený podíl buněk v G1 fázi buněčného cyklu. Následně byly působení bersavinu vystaveny buňky MOLT-4. Již koncentrace 10  $\mu\text{M}$  bersavinu působila statisticky významné snížení počtu buněk v G2/M fázi na 7 %. Bersavin o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  ovlivnil zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení procentuálního zastoupení buněk MOLT-4 v G1 fázi na 58 % oproti negativní kontrole (48 %). Reakce buněk Jurkat a MOLT-4 po ovlivnění bersavinem byly rozdílné. U buněk Jurkat převažovala mírná akumulace buněk v S a G2/M fázích, zatímco u buněk MOLT-4 převažovala akumulace buněk v G1 fázi.

Metodou pro zjištění, zda byl cytostatický efekt alkaloidů zprostředkován indukcí apoptózy, byla detekce apoptózy pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu průtokovou cytometrií. Analýza byla provedena na adherentních buňkách MRC-5 a A2780. Testovanými alkaloidy byly zvoleny chelidonin a homochelidonin o koncentracích 5 – 20  $\mu\text{M}$ . Tyto dva kongenery vykazovaly v našich experimentech nejslibnější aktivitu na proliferaci nádorových buněk. Tato metoda využívá protein Annexin V konjugovaný s fluorescein isothiokyanátem (FITC), jež má silnou afinitu na fosfatidylserin v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a propidium jodid se schopností vazby na DNA. Expozice chelidoninu buňkám MRC-5 významně zvýšila procento pozdně apoptotických buněk na 21 % až o koncentraci 20  $\mu\text{M}$  vůči kontrole (7 %). Expozice homochelidoninu vedla u všech koncentrací k podobně mírnému zvýšení počtu pozdně apoptotických buněk MRC-5. Paralelně bylo provedeno stanovení na buňkách A2780, kdy



chelidonin významně zvyšoval procento časně i pozdně apoptotických buněk nezávisle na aplikovaných dávkách. Podobnou, avšak nižší aktivitu vyvolávající sníženou viabilitu buněk jevil i homochelidonin ve srovnání s kontrolními buňkami, kdy se počet časně a pozdně apoptotických buněk zvýšil na 22 % po expozici homochelidoninu o koncentraci 20  $\mu$ M. Studie zabývající se vlivem chelidoninu na buňky HeLa rovněž ukázala jeho schopnost indukovat apoptózu (Paul et al. 2012). Publikace R. Haveleka a spolupracovníků se zabývala vlivem chelidoninu a homochelidoninu na buňky MOLT-4 a Jurkat. Výsledky též ukázaly schopnost chelidoninu a homochelidoninu indukovat apoptózu, přičemž homochelidonin vykazoval nižší aktivitu (Havelek et al. 2016).

## 6 Závěr

Studované alkaloidy byly podrobeny základnímu screeningovému stanovení metodou RTCA pomocí systému xCELLigence. Výsledky ukázaly antiproliferační aktivitu chelidoninu na buňkách A2780 již od koncentrace 5  $\mu\text{M}$  a homochelidoninu na buňkách A2780 o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Chelidonin se v porovnání s homochelidoninem jevil jako účinnější alkaloid. Dále byly testovány alkaloidy bersavin a berbamin na buňkách A549. Sníženou proliferaci buněk působil berbamin až o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , zatímco vliv bersavinu na proliferaci buněk nastupoval již od koncentrace 20  $\mu\text{M}$ . Z toho vyplývá vyšší účinnost bersavinu na buněčnou proliferaci. K ověření dat a rozšíření základního screeningu antiproliferační aktivity byla použita metoda stanovení viability a proliferace buněk barvením pomocí Trypanové modři, čímž byl potvrzen antiproliferační účinek všech čtyř alkaloidů a následně byl zjištěn i jejich cytotoxický účinek. Viabilita a proliferace byla testována na modelu leukemických buněk Jurkat a MOLT-4, jež byly vystaveny působení alkaloidů bersavinu a berbaminu. Oba alkaloidy účinně snižovaly viabilitu a proliferaci buněk Jurkat a MOLT-4 od koncentrace 10  $\mu\text{M}$ . Aktivita bersavinu se však vždy jevila vyšším účinkem oproti berbaminu. Experimenty bylo zjištěno, že antiproliferační a cytotoxický účinek berbaminu a bersavinu byl dávkově závislý v intervalu 24 a 48 hodin. Dále byl studován vliv chelidoninu na buňky MRC-5 a A2780 barvením pomocí Trypanové modři. Chelidonin působil snížení viability a proliferace obou buněčných linií již od koncentrace 5  $\mu\text{M}$  nezávisle na aplikované dávce. Antiproliferační účinek chelidoninu byl doprovázen akumulací buněk ve fázi G2/M buněčného cyklu u buněk MRC-5 i A2780, přičemž u buněk A2780 byla akumulace buněk výrazně vyšší. Expozice buněk MRC-5 homochelidoninu vedla k dávkově závislé akumulaci buněk v G1 a G2/M fázích buněčného cyklu. U buněk A2780 docházelo k akumulaci buněk v G1 fázi po expozici homochelidoninu o nižších koncentracích, naopak vyšší koncentrace indukovaly zástavu v G2/M fázi buněčného cyklu. Antiproliferační účinek bersavinu se projevil až při koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a částečně při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Pomocí průtokové cytometrie byl pozorován rozdíl v reakci obou buněčných linií ve smyslu zástavy buněčného cyklu. Stanovení buněčného cyklu podle obsahu DNA rovněž odhalilo rozdíly ve vlivu chelidoninu, homochelidoninu a bersavinu na distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po působení studovaných látek. U buněk Jurkat převažovala statisticky nesignifikantní akumulace buněk v S a G2/M fázích, zatímco u buněk MOLT-4 byla pozorována akumulace buněk v G1 fázi buněčného cyklu. Mechanismus cytotoxického

účinku chelidoninu a homochelidoninu byl studován pomocí vazby Annexinu V a PI, kdy kvantifikace vazby prozkoumala indukci apoptózy modelových buněk. Expozice buněk MRC-5 chelidoninu a homochelidoninu vedla k mírnému zvýšení počtu pozdně apoptotických buněk. Významné zvýšení procentuálního zastoupení pozdně apoptotických buněk na 21 % vůči kontrole bylo zaznamenáno po působení chelidoninu o koncentraci 20  $\mu$ M. Buňky A2780 vykazovaly nižší rezistenci, kdy po působení chelidoninu došlo ke zvýšení časně (buňky pouze Annexin V pozitivní) i pozdně apoptotických buněk (buňky pozitivní Annexin V a PI) nezávisle na aplikovaných dávkách. Podobně působil i homochelidonin na buňky A2780, jehož účinek však byl nižší v porovnání s chelidoninem.

Závěrem lze konstatovat, že pro studium přírodních látek (alkaloidů) s protinádorovým potenciálem je velmi důležité vhodně zvolit použité metody. Základní screening je vždy potřeba doplnit o podrobnější metody, analyzující mechanismus působení studovaných látek, k čemuž nám pomůžou metody průtokové cytometrie. Chelidonin, homochelidonin, bersavin i berbamin mají velký protinádorový potenciál a jsou vhodné k dalšímu podrobnému studování.

## 7 Použitá literatura

- Abcam. Dostupné z: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry#measurement-of-scattered-light-and-fluorescence> [2017-02-05].
- Ahmad, N., Gupta, S., Husain, M., et al. (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1524-1528.
- Albani, J. R. (2007). *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. Blackwell Publishing company, 1-264, ISBN 978-1-4051-3891-8.
- Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., et al. (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 4923-4928.
- Baumgarth, N., Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of immunological methods*, 243(1), 77-97.
- Beuria, T. K., Santra, M. K., Panda, D. (2005). Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry*, 44(50), 16584-16593.
- Bruno, S., Lassota, P., Giaretti, W., et al. (1992). Apoptosis of rat thymocytes triggered by prednisolone, camptothecin, or teniposide is selective to G0 cells and is prevented by inhibitors of proteases. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 4(1), 29-35.
- Cibíková, P., Šturdíková, M., Maruna, M. (2010). Přírodní látky rostlinného povodu a ich využitie v terapii onkologických ochorení. *Chemické listy*, 104, 12-20.
- Colombo, M. L., Bosisio, E. (1996). Pharmacological activities of chelidonium majus L. (papaveraceae). *Pharmacological research*, 33(2), 127-134.
- Cory, S., Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Traganos, F. (2001). Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. *Methods in cell biology*, 63, 527-546.

- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., et al. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13(8), 795-808.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., et al. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27(1), 1-20.
- Dexheimer, T. S. (2013). *DNA repair of Cancer Stem Cells*, Springer Netherlands, 19-32, ISBN 978-94-007-4590-2.
- Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., et al. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1133(3), 275-285.
- Duan, H., Luan, J., Liu, Q., et al. (2010). Suppression of human lung cancer cell growth and migration by berbamine. *Cytotechnology*, 62(4), 341-348.
- Durack, G., Robinson, J. P. (2004). *Emerging tools for single-cell analysis: Advances in Optical Measurement Technologies*. John Wiley & Sons, stran 359, ISBN 0471461008.
- Eckschlager, T., Bartůňková, J., Vybíralová, H. (1999). *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Grada Publishing, stran 169, ISBN 80-7169-279-4.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- El-Readi, M. Z., Eid, S., Ashour, M. L., et al. (2013). Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and Chelidonium majus alkaloids. *Phytomedicine*, 20(3), 282-294.
- Ficková, M., Nagy, M. (2007). Apoptóza – Programovaná bunková smrť a rastlinné metabolismy. *Chemické listy*, 101, 131-137.
- Fulda, S. (2015). Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in cancer biology*, 31, 84-88.
- Fulda, S., Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811.

- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of cell Biology*, 119, 493-493.
- Gilman-Sach, A. (1994). Flow cytometry. *Analytical Chemistry*, 66(13), 700-707.
- Golstein, P., Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37-43.
- Gong, J. P., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (1994). A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical biochemistry*, 218(2), 314-319.
- Gross, A., McDonnell, J. M., Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15), 1899-1911.
- Grycová, L., Dostál, J., Marek, R. (2007). Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68(2), 150-175.
- Habtemariam, S. (2016). Berberine and inflammatory bowel disease: a concise review. *Pharmacological research*, 113, 592-599.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research*, 301(1), 5-17.
- Halicka, D. H., Pozarowski, P., Ita, M., et al. (2002). Enhancement of activation-induced apoptosis of lymphocytes by the cytotoxic ribonuclease onconase (Ranpirnase). *International journal of oncology*, 21(6), 1245-1250.
- Halicka, H. D., Bedner, E., Darzynkiewicz, Z. (2000). Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Experimental cell research*, 260(2), 248-256.
- Hammerová, J., Uldrijan, S., Táborská, E., et al. (2011). Benzo [c] phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. *Journal of dermatological science*, 62(1), 22-35.

- Han, Y. Q., Yuan, J. Y., Shi, Y. J., et al. (2003). Reversal effect of berbamine on multidrug resistance of K562/A02 cells and its mechanism. *Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology*, 11(6), 604-608.
- Havelek, R., Seifrtová, M., Královec, K., et al. (2016). Comparative cytotoxicity of chelidonine and homochelidonine, the dimethoxy analogues isolated from *Chelidonium majus* L.(Papaveraceae), against human leukemic and lung carcinoma cells. *Phytomedicine*, 23(3), 253-266.
- Heatwole, V. M. (1999). TUNEL assay for apoptotic cells. *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 141-148.
- Helleday, T., Eshtad, S., Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 585-598.
- Ho, Y. P., Au-Yeung, S. C., To, K. K. (2003). Platinum-based anticancer agents: Innovative design strategies and biological perspectives. *Medicinal Research Reviews*, 23(5), 633-655.
- Hošťálková, A. *Studium obsahových vybraných taxonů z řádů Laurales a Ranunculales s potencionálně neuroprotektivní aktivitou*. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie.
- Huang, X., Halicka, H. D., Traganos, F., et al. (2005). Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell proliferation*, 38(4), 223-243.
- Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yepez, S., et al. (2007). Screening and detection of apoptosis. *Journal of surgical Research*, 139(1), 143-156.
- Chattopadhyay, P. K., Roederer, M. (2012). Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*, 57(3), 251-258.
- Iranshahy, M., Quinn, R. J., Iranshahi, M. (2014). Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. *RSC Advances*, 4(31), 15900-15913.
- Jahan-Tigh, R. R., Ryan, C., Obermoser, G., et al. (2012). Flow cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(10), 1-6.

- Jayakiran, M. (2015). Apoptosis-biochemistry: a mini review. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 5, 1-4.
- Kalogris, C., Garulli, C., Pietrella, L., et al. (2014). Sanguinarine suppresses basal-like breast cancer growth through dihydrofolate reductase inhibition. *Biochemical pharmacology*, 90(3), 226-234.
- Kaminsky, V., Lin, K. W., Filyak, Y., et al. (2008). Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells. *Cell Biology International*, 32(2), 271-277.
- Klener, P., Klener, P. jr. (2010). *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada Publishing, stran 209, ISBN 8024728087.
- Klener, P., Klener, P. jr. (2013). *Principy systémové protinádorové léčby*. Grada Publishing, stran 200, ISBN 8024741717.
- Kou, Y., Li, L., Li, H., et al. (2016). Berberine suppressed epithelial mesenchymal transition through cross-talk regulation of PI3K/AKT and RAR $\alpha$ /RAR $\beta$  in melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(2), 290-296.
- Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology today*, 18(1), 44-51.
- Kumari, A., Yadav, S. K., Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- Kurec, A. (2014). Flow cytometry: principles and practices. *Med lab. obs., Oradell*, 46(5), 30-31.
- Lakowicz, J. R., (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, stran 698, ISBN 1475730616.
- Liang, Y., He, X., Li, X., et al. (2016). 4-Chlorbenzoyl Berbamine, a Novel Derivative of the Natural Product Berbamine, Potently Inhibits the Growth of Human Myeloma Cells by Modulating the NF- $\kappa$ B and JNK Signalling Pathways. *Cancer Investigation*, 34(10), 496-505.



- Liang, Y., Qiu, X., Xu, R. Z., et al. (2011). Berbamine inhibits proliferation and induces apoptosis of KU812 cells by increasing Smad3 activity. *Journal of Zhejiang University Science B*, 12(7), 568-574.
- Lu, W., Du, S., Wang, J. (2015). Berberine inhibits the proliferation of prostate cancer cells and induces G0/G1 or G2/M phase arrest at different concentrations. *Molecular medicine reports*, 11(5), 3920-3924.
- Mačku, J., Mokřý, J. (1957) *Naše léčivé rostliny*. Slovenská akadémia vied, stran 405.
- Machová, I., Brázdová, A., Fusek, M., et al. (2012). Nádorové markery a jejich využití v klinické praxi. *Chemické Listy*, 106, 16-19.
- Mandy, F. F., Bergeron, M., Minkus, T. (1995). Principles of flow cytometry. *Transfusion Science*, 16(4), 303-314.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., et al. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 184(3), 1155-1160.
- Martinou, J. C. (1999). Apoptosis: key to the mitochondrial gate. *Nature*, 399(6735), 411-412.
- Mazzanti, G., Di Sotto, A., Franchitto, A., et al. (2009). Chelidonium majus is not hepatotoxic in Wistar rats, in a 4 weeks feeding experiment. *Journal of ethnopharmacology*, 126(3), 518-524.
- Meng, Z., Li, T., Ma, X., et al. (2013). Berbamine inhibits the growth of liver cancer cells and cancer-initiating cells by targeting Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Molecular cancer therapeutics*, 12(10), 2067-2077.
- Mizushima, N., Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728-741.
- Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., et al. (2000). Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. typická MDR. *Klinická Onkologie*, 13(2), 4-9.

- Noureini, S. K., Esmaili, H. (2014). Multiple mechanisms of cell death induced by chelidonine in MCF-7 breast cancer cell line. *Chemico-biological interactions*, 223, 141-149.
- Ondroušková, E., Vojtěšek, B. (2014). Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách. *Klinická onkologie*, 27(3), 7-14.
- Ormerod, M. G. (2000). *Flow cytometry: A Practical Approach*, OUP Oxford, stran 276, ISBN 0199638241.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., et al. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6), 487-498.
- Pallichankandy, S., Rahman, A., Thayyullathil, F., et al. (2015). ROS-dependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of anti-glioma effect of sanguinarine. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 708-720.
- Panzer, A., Joubert, A. M., Bianchi, P. C., et al. (2001). The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways. *European journal of cell biology*, 80(1), 111-118.
- Papandreou, S. (2013). *Flow cytometry: Principles, Methodology and Applications*. Nova Science Publishers, stran 130, ISBN 1628087102.
- Paul, A., Bishayee, K., Ghosh, S., et al. (2012). Chelidonine isolated from ethanolic extract of *Chelidonium majus* promotes apoptosis in HeLa cells through p38-p53 and PI3K/AKT signalling pathways. *Journal of Chinese integrative medicine*, 10(9), 1025-1038.
- Paul, A., Das, S., Das, J., et al. (2013). Cytotoxicity and apoptotic signalling cascade induced by chelidonine-loaded PLGA nanoparticles in HepG2 cells in vitro and bioavailability of nano-chelidonine in mice in vivo. *Toxicology letters*, 222(1), 10-22.
- Pedreira, C. E., Costa, E. S., Lecrevisse, Q., et al. (2013). Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends in biotechnology*, 31(7), 415-425.
- Pekarčíková, L., Knopfová, L., Ondroušková, E., et al. (2014). Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti. *Klinická onkologie*, 27(3), 15-21.

Phillipson, J. D., Roberts, M. F., Zenk, M. H. (2012). *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. Springer Science & Business Media, stran 304, ISBN 3642701280.

Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., et al. (2012). Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64(2), 109-130.

Pollack, A., Ciancio, G. (1990). Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. *Methods in cell biology*, 33, 19-24.

Rahman, A. U., Choudhary, M. I. (1998). Chemistry and biology of steroidal alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 50, 61-108.

Rahman, A., Thayyullathil, F., Pallichankandy, S., et al. (2016). Hydrogen peroxide/ceramide/Akt signaling axis play a critical role in the antileukemic potential of sanguinarine. *Free Radical Biology and Medicine*, 96, 273-289.

Rahmatullah, M., Jahan, R., Bashar, A. B. M. A., et al. (2014). A review on berbamine—a potential anticancer drug. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3, 95-110.

Sandor, R., Midlik, A., Sebrlová, K., et al. (2016). Identification of metabolites of selected benzophenanthridine alkaloids and their toxicity evaluation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 121, 174-180.

Shapiro, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons, stran 736, ISBN 0471434035.

Shiraishi, N., Akiyama, S. I., Nakagawa, M., et al. (1987). Effect of bisbenzylisoquinoline (biscoclaurine) alkaloids on multidrug resistance in KB human cancer cells. *Cancer research*, 47(9), 2413-2416.

Schmeller, T., Latz-Brüning, B., Wink, M. (1997). Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 44(2), 257-266.

Soukup, A. (2004). Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm> [2017-02-05].

- Staněk, J. (1957). *Alkaloidy*. Československá akademie věd, stran 653.
- Stratil, P., Kubáň, V. (2004). Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chemické listy*, 98(7), 379-387.
- Suda, J. (2005). Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 53(1), 46-48.
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., et al. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 5(3), 219-234.
- Šinkorová, Z., Zárbynická, L. (2008). Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. ČÁST. *Vojenské zdravotnické listy*, 3, 98-103.
- Táborská, E., Bochoráková, H., Dostál, J., et al. (1995). The greater celandine (*Chelidonium majus* L.)-Review of present knowledge. *Česká a Slovenská farmacie: časopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti*, 44(2), 71-75.
- Tait, J. F., Gibson, D., Fujikawa, K. (1989). Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 7944-7949.
- Tang, Z. H., Cao, W. X., Wang, Z. Y., et al. (2017). Induction of reactive oxygen species-stimulated distinctive autophagy by chelerythrine in non-small cell lung cancer cells. *Redox Biology*, 12, 367-376.
- Tian, H., Pan, Q. C. (1997). A comparative study on effect of two bisbenzylisoquinolines, tetrandrine and berbamine, on reversal of multidrug resistance. *Acta pharmaceutica Sinica*, 32(4), 245-250.
- Tintěra, Š., Fialová, V., Kožaná, K., et al. (2010). Programovaná buněčná smrt aneb fenomén apoptózy. *In vitro diagnostika*, 14, 10-22.
- Todde, V., Veenhuis, M., Van Der Klei, I. J. (2009). Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792(1), 3-13.

- Van den Eijnde, S. M., Boshart, L., Reutelingsperger, C. P., et al. (1997). Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 4(4), 311-316.
- Van den Engh, G. (1993). New applications of flow cytometry. *Current opinion in biotechnology*, 4(1), 63-68.
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., et al. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1-9.
- Van Engeland, M., Ramaekers, F. C., Schutte, B., et al. (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24(2), 131-139.
- Vasir, J. K., Labhasetwar, V. (2007). Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, 59(8), 718-728.
- Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. P. M. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods*, 243(1), 167-190.
- Vondráčková, L., Horváth, V., Žůrek, D. 2010. O zlatých elektrodách. *Labor Aktuell*, 1, 18-20.
- Vrba, J., Doležel, P., Vičar, J., et al. (2008). Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology in vitro*, 22(4), 1008-1017.
- Vrba, J., Papoušková, B., Pyszková, M., et al. (2015). Metabolism of palmatine by human hepatocytes and recombinant cytochromes P450. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 102, 193-198.
- Vriend, L. E., Krawczyk, P. M. (2017). Nick-initiated homologous recombination: Protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair*, 50, 1-13.
- Wang, G. Y., Lv, Q. H., Dong, Q., et al. (2009). Berbamine induces Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and inhibits its tumor growth in nude mice. *Journal of Asian natural products research*, 11(3), 219-228.

- Wang, G. Y., Zhang, J. W., Lü, Q. H., et al. (2007). Berbamine induces apoptosis in human hepatoma cell line SMMC7721 by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(4), 248-255.
- Wang, P., Chen, Z. (2013). Traditional Chinese medicine ZHENG and Omics convergence: A systems approach to post-genomics medicine in a global world. *Omics: a journal of integrative biology*, 17(9), 451-459.
- Wu, J., Xiao, Q., Zhang, N., et al. (2016a). Photodynamic action of palmatine hydrochloride on colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 15, 53-58.
- Wu, J., Xiao, Q., Zhang, N., et al. (2016b). Palmatine hydrochloride mediated photodynamic inactivation of breast cancer MCF-7 cells: Effectiveness and mechanism of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 15, 133-138.
- Wu, Q., Yang, Z., Nie, Y., et al. (2014). Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer letters*, 347(2), 159-166.
- Xie, J., Xu, Y., Huang, X., et al. (2015). Berberine-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. *Tumor Biology*, 36(2), 1279-1288.
- Xing, J. Z., Zhu, L., Gabos, S., et al. (2006). Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicology in vitro*, 20(6), 995-1004.
- Xu, R., Dong, Q., Yu, Y., et al. (2006). Berbamine: a novel inhibitor of bcr/abl fusion gene with potent anti-leukemia activity. *Leukemia research*, 30(1), 17-23.
- Yang, R., Piperdi, S., Gorlick, R. (2008). Activation of the RAF/mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway mediates apoptosis induced by chelerythrine in osteosarcoma. *Clinical Cancer Research*, 14(20), 6396-6404.
- Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., et al. (2006). Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vitro a in vivo. *Chemické listy*, 100, 30-41.

Zhang, Z. F., Guo, Y., Zhang, J. B., et al. (2011). Induction of apoptosis by chelerythrine chloride through mitochondrial pathway and Bcl-2 family proteins in human hepatoma SMMC-7721 cell. *Archives of pharmacal research*, 34(5), 791-800.