

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Tomáš Mráz

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Tomáš Mráz**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**SLEDOVÁNÍ VLIVU POLYFENOLICKÝCH LÁTEK  
NA VLASTNOSTI TKÁŇOVÝCH KULTUR**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2024



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 25. 3. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Mráz Tomáš

Katedra: Katedra zdravotnictví, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Sledování vlivu polyfenolických látek na vlastnosti tkáňových kultur

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 46

Počet stran – nečíslované: 17

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 52

Klíčová slova: fytochemikálie, fenolové kyseliny, flavonoidy, katechiny, kyselina gallové, epigalokatechin galát, buněčné kultury, buněčné linie, B-buněčná linie C1R, průtoková cytometrie, 7-AAD, IncuCyte

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce zjišťuje vliv kyseliny gallové a epigalokatechin galátu na proliferační potenciál B buněčné linie C1R, a to metodami analýzou buněk v reálném čase pomocí přístroje IncuCyte, průtokovou cytometrií a pomocí programu ImageJ. Výsledky mezi těmito metodami jsou porovnány.

Výsledky potvrzují, že 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  roztoky kyseliny gallové a 100  $\mu\text{M}$  roztok epigalokatechin galátu potlačují růst buněk C1R.

## **Abstract**

Surname and name: Mráz Tomáš

Department: The Department of Paramedical Sciences, Medical diagnostics studies and Public health

Title of thesis: Monitoring the effect of polyphenolic substances on the properties of tissue cultures

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 46

Number of pages – unnumbered: 17

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 52

Keywords: Phytochemicals, Phenolic acids, Flavonoids, Catechins, Gallic acid, Epigallocatechin gallate, Cell cultures, Cell lines, B-cell line C1R, Flow cytometry, 7-AAD, IncuCyte

### Summary:

This bachelor's thesis investigates the effect of gallic acid and epigallocatechin gallate on the proliferation potential of the B cell line C1R, using the methods of real-time cell analysis using the IncuCyte device, flow cytometry and the ImageJ program. The results between these methods are compared.

The results confirm that 50  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  solutions of gallic acid and 100  $\mu\text{M}$  solution of epigallocatechin gallate inhibit the growth of C1R cells.

## **Abstrakt**

Name und Vorname: Mráz Tomáš

Abteilung: Katheder für Gesundheit, Diagnostik und öffentliche Gesundheit

Titul der Arbeit: Überwachung des Einflusses polyphenolischer Substanzen auf die Eigenschaften von Gewebekulturen

Betreuer: Ing. Tomáš Vlas

Anzahl der Seiten – nummeriert: 46

Anzahl der Seiten – nicht nummeriert: 17

Anzahl der Anhänge: 0

Anzahl der Titel der verwendeten Literatur: 52

Schlüsselwörter: Phytochemikalien, Phenolsäuren, Flavonoide, Catechine, Gallussäure, Epigallocatechingallat, Zellkulturen, Zelllinien, B-Zelllinie C1R, Durchflusszytometrie, 7-AAD, IncuCyte

### Zusammenfassung:

In dieser Bachelorarbeit wird die Wirkung von Gallussäure und Epigallocatechingallat auf das Proliferationspotential der B-Zelllinie C1R untersucht, wobei die Methoden der Echtzeit-Zellanalyse mit dem IncuCyte-Gerät, der Durchflusszytometrie und dem ImageJ-Programm zum Einsatz kommen. Die Ergebnisse dieser Methoden werden verglichen.

Die Ergebnisse bestätigen, dass 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Gallussäurelösungen und 100  $\mu\text{M}$  Epigallocatechingallat-Lösungen das Wachstum von C1R-Zellen hemmen.

## **Předmluva**

Tato bakalářská práce zkoumá vliv polyfenolických látek na vlastnosti tkáňových kultur se snahou porozumět, jak tyto látky ovlivňují růst a funkci těchto kultur a s cílem objasnit jejich potenciál v lékařství, biomedicíně a onkologii. Cílem práce je poskytnout stručný přehled o současných poznatcích v dané problematice a přispět k dalšímu rozvoji v oblasti využití polyfenolických látek v rámci léčby onkologických onemocnění.

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat Ing. Tomáši Vlasovi za trpělivost, poskytnutí cenných rad během odborného vedení této práce a za veškerý čas, který mi po dobu práce věnoval. Stejně tak děkuji i Mgr. Monice Holubové, Ph. D. Dále bych rád poděkoval Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň a Hematologicko-onkologickému oddělení FN Plzeň za poskytnutí prostor a materiálních zdrojů při práci na praktické části této BP. V neposlední řadě děkuji Mgr. Jitce Tauchenové, a to za korekturu práce.



# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM ZKRATEK .....	14
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1 FYTOCHEMIKÁLIE .....	17
2 FENOLOVÉ KYSELINY .....	18
2.1 Mechanismy protirakovinového působení fenolových kyselin .....	18
2.2 Kyselina gallová .....	18
2.2.1 Struktura a chemické vlastnosti.....	18
2.2.2 Výskyt.....	19
2.2.3 Metabolismus, farmakokinetika .....	19
2.2.4 Fyziologické a farmakologické účinky .....	19
2.2.5 Toxicita.....	19
3 FLAVONOIDY .....	20
3.1 Mechanismus antioxidační aktivity flavonoidů .....	20
3.2 Epigalokatechin galát.....	22
3.2.1 Struktura a chemické vlastnosti.....	22
3.2.2 Výskyt.....	22
3.2.3 Metabolismus, farmakokinetika .....	22
3.2.4 Fyziologické a farmakologické účinky .....	23
3.2.5 Toxicita.....	24
4 BUNĚČNÉ KULTURY .....	25
4.1 Primární kultury .....	25
4.2 Sekundární kultury.....	25
4.3 Buněčné linie .....	26
4.3.1 Výhody a nevýhody nestabilizovaných a imortalizovaných buněčných linií	26
5 LYMFOIDNÍ BUNĚČNÉ LINIE.....	28
5.1 Lymfoblastická leukémie.....	28
5.1.1 Příklady maligních transformací při vzniku ALL/LL .....	29
5.2 Buněčná linie C1R.....	30
5.2.1 CD Ag.....	30
5.2.2 CD19.....	31
6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	33
6.1 Fluorochrom 7-AAD.....	34
7 INCUCYTE .....	35
7.1 Analýza živých buněk v reálném čase .....	35
7.2 Výhody užití IncuCyte .....	35

PRAKTICKÁ ČÁST .....	36
8 CÍL PRÁCE .....	37
9 VÝZKUMNÉ OTÁZKY .....	38
10 METODIKA PRÁCE .....	39
10.1 Charakteristika experimentu .....	39
10.2 Vybavení a materiály .....	39
10.2.1 Přístrojové vybavení .....	39
10.2.2 Programy, Software .....	39
10.2.3 Použitý materiál .....	39
10.2.4 Chemikálie .....	39
10.3 Postup .....	40
10.3.1 Příprava zásobních roztoků .....	40
10.3.2 Příprava 48jamkové destičky .....	40
10.3.3 Příprava 1000 $\mu$ M roztoků GA a EGCG .....	40
10.3.4 Zjištění buněčnosti buněčné linie C1R .....	41
10.3.5 Další postup .....	41
10.4 Způsob hodnocení .....	42
10.4.1 IncuCyte .....	42
10.4.2 Průtoková cytometrie .....	42
10.4.3 ImageJ .....	43
10.4.4 Korelace .....	44
11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	46
11.1 Kyselina gallová .....	46
11.1.1 IncuCyte .....	46
11.1.2 Měření viability pomocí 7-AAD .....	47
11.1.3 Ruční měření buněčných klastrů .....	48
11.2 Epigalokatechin galát .....	50
11.2.1 IncuCyte .....	50
11.2.2 Měření viability pomocí 7-AAD .....	50
11.2.3 Ruční měření buněčných klastrů .....	51
11.3 Korelace .....	53
11.3.1 IncuCyte x Průtoková cytometrie x ImageJ .....	53
11.3.2 IncuCyte x ImageJ .....	54
DISKUZE .....	56
ZÁVĚR .....	60
SEZNAM LITERATURY .....	61

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Konfluence C1R v přítomnosti GA měřená přístrojem IncuCyte.....	46
Graf 2 Viabilita C1R v přítomnosti GA hodnocená podle mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence na průtokovém cytometru.....	47
Graf 3 Viabilita C1R v přítomnosti GA hodnocená podle mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence na průtokovém cytometru (bez koncentrace 100 $\mu$ M) .....	47
Graf 4 Průměrná plocha kolonií C1R v přítomnosti GA měřená pomocí programu ImageJ .....	48
Graf 5 Inhibice růstu C1R v přítomnosti GA vycházející z měření pomocí ImageJ [%]....	49
Graf 6 Konfluence C1R v přítomnosti EGCG měřená přístrojem IncuCyte.....	50
Graf 7 Viabilita C1R v přítomnosti EGCG hodnocená podle mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence na průtokovém cytometru.....	51
Graf 8 Průměrná plocha kolonií C1R v přítomnosti EGCG měřená pomocí programu ImageJ .....	52
Graf 9 Inhibice růstu C1R v přítomnosti EGCG vycházející z měření pomocí ImageJ [%] .....	52
Graf 10 Grafické zobrazení korelací mezi konfluencí a plochou klastrů C1R u jednotlivých koncentrací GA vyjma GA, c = 100 $\mu$ M, + celková korelace pro všechny koncentrace ....	54
Graf 11 Grafické zobrazení korelací mezi konfluencí a plochou klastrů C1R u jednotlivých koncentrací EGCG vyjma GA, c = 100 $\mu$ M, + celková korelace pro všechny koncentrace	55

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorec kyseliny gallové .....	18
Obrázek 2	Dělení flavonoidů a výskyt v rostlinách .....	20
Obrázek 3	Cesta biosyntézy flavonoidů .....	20
Obrázek 4	In-vitro mechanismy antioxidační aktivity flavonoidů.....	21
Obrázek 5	Strukturní vzorec EGCG .....	22
Obrázek 6	Struktura CD19 .....	31
Obrázek 7	Strukturní vzorec 7-AAD.....	34
Obrázek 8	Scattergramy gatovací strategie pro měření C1R se 7-AAD na průtokovém cytometru (GA QC).....	43
Obrázek 9	Histogramy intenzity fluorescence 7-AAD u vzorku C1R (GA QC – vlevo, GA 100 $\mu$ M – vpravo).....	43
Obrázek 10	Náhled programu ImageJ s vyznačeným klastrem buněk C1R .....	44

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Nejčastější fenolové kyseliny .....	18
Tabulka 2 Pipetovací protokol pro 48jamkovou destičku .....	41
Tabulka 3 Pipetovací protokol 96jamkové destičky pro průtokový cytometr.....	42
Tabulka 4 Korelace vlivu GA po inkubaci dvou dnů a 21 hodin na C1R.....	53
Tabulka 5 Korelace vlivu EGCG po inkubaci dvou dnů a 21 hodin na C1R.....	53

## SEZNAM ZKRATEK

(PLA)-(PEG).....	kyselina polymléčná–polyethylenglykol (z angl. poly-(lactic acid)-poly(ethylene glycol))
4CL .....	kyselina 4-kumarová: CoA ligáza
7-AAD .....	7-aminoaktinomycin D
ALL.....	akutní lymfoblastická leukémie
AMK .....	aminokyselina
BCR .....	B-buněčný receptor (z angl. B-cell receptor)
BCR/ABL .....	fúzní gen
BP.....	bakalářská práce
C4H.....	4-hydroxyláza kyseliny skořicové
CD.....	diferenční skupina (z angl. cluster of differentiation)
COMT.....	katechol-O-methyltransferáza
DMF.....	dimethylformamid
DMSO.....	dimethylsulfoxid
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
DNMT.....	DNA methyltransferázy
dsDNA .....	dvouvláknová DNA (z angl. double stranded DNA)
EGCG.....	epigalokatechin galát
GA.....	kyselina gallová (gallic acid)
HLA (MHC) .....	hlavní histokompatibilní systém (z angl. Human Leucocyte Antigen)
Ig .....	imunoglobulin
LD50 .....	střední letální (smrtná) dávka (z angl. Lethal dose)
LL.....	lymfoblastický lymfom
mAb .....	monoklonální protilátky
MAP kináza .....	mitogenem aktivované protein kinázy
miRNA.....	microRNA (ribonukleová kyselina)
NAD(P)H.....	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
NCR .....	receptory přirozené cytotoxicity
NK-buňky .....	přirozený zabiják (z angl. natural killer cell)
PAL.....	fenylalanin amonná lyáza
px .....	pixel
ROS.....	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
RT-PCR .....	polymerázová řetězová reakce – reverzní transkripce
Src PTK.....	protein tyrosinkináza Src
TCR.....	T-buněčné receptory (z angl. T-cell receptor)
UDP .....	uridindifosfát
UVA.....	ultrafialové záření (z angl. Ultra Violet)
WHO.....	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

## ÚVOD

Rakovina je celosvětově jednou z nejčastějších příčin úmrtí, a proto je předmětem rozsáhlého výzkumu, který se snaží objevit metody a látky zaměřené na prevenci a léčbu, a objasnit mechanismy vzniku různých forem tohoto onemocnění. Pochopení mechanismů vzniku tohoto onemocnění totiž přispívá k jeho léčbě.

Poslední dekády přinesly velký posun ve výzkumu zaměřeného, mimo jiné, na zjišťování vlivu přírodních látek na různé typy rakoviny. Mezi tyto látky patří i fytochemikálie, které se přirozeně vyskytují v rostlinách a jejich využití při terapii se jeví velice nadějně.

Tato bakalářská práce je rozdělena do dvou částí. První, teoretická, část poskytuje čtenáři základní informace o fytochemikáliích, jejich dělení a o kyselině gallové a epigalokatechin galátu. Mimo to teoretická část shrnuje základní informace o buněčných kulturách, lymfoidních buněčných liniích, do kterých patří i B-buněčná linie C1R a dále o využití analytické metody průtokové cytometrie a využití přístroje IncuCyte, u kterých shrnuji jejich principy analýzy.

V praktické části se zabývám analýzou výsledků vlivů dvou výše zmíněných fytochemikálií na buněčnou linii C1R získaných na přístroji IncuCyte a porovnávám je spolu s výsledky měření pomocí průtokové cytometrie a ručního měření v programu ImageJ.

# TEORETICKÁ ČÁST



# 1 FYTOCHEMIKÁLIE

Fytochemikálie tvoří širokou škálu bioaktivních chemických látek, které nalzáme ve velkém množství v rostlinách. Tyto látky slouží rostlinám v mnoha ohledech, ať už jako ochrana před predátory, rostlinnými onemocněními nebo proti UV záření. Zároveň zapříčiňují vznik barvy a chuti jednotlivých rostlin a využívají se proto při výrobě potravin jako dochucovadla a barviva. Pro lidi nemají fytochemikálie žádný nutriční význam, mnoho z nich má však potenciál přispět v boji proti zánětlivým onemocněním, diabetu melitu, při léčbě a prevenci rakoviny nebo se stát pomocníky při léčbě imunitních onemocnění. <sup>(1)(2)</sup>

Potlačování nádorů fytochemikáliemi souvisí se schopností těchto látek působit na konkrétní signální cesty genové exprese v jednotlivých fázích iniciace, progresu, metastazování, a nakonec i buněčné smrti včetně autofagie. Dochází tak ke snížení proliferace buněk, zpomalování vzniku metastáz, inhibici angiogeneze a k apoptóze. Mezi další mechanismy, které fytochemikálie ovlivňují, je metylace promotorové DNA, modifikace histonů nebo post-transkripční modifikace miRNA. Některé fytochemikálie jsou studovány také jako selektivní růstové faktory pro prospěšné bakterie gastrointestinálního traktu nebo jako vylučovače reaktivních a toxických sloučenin. Mnohé důkazy nasvědčují tomu, že se fytochemikálie dají použít protektivně pro mnoho dalších onemocnění, jako je např. šedý zákal, atopický ekzém, hyperaktivita a porucha pozornosti. <sup>(1)(2)</sup>

Je ale zapotřebí dodat, že ačkoliv se většina epidemiologických studií shodne na pozitivním vlivu příjmu fytochemikálií a vyššího titru těchto látek v plazmě, což má za následek nižší riziko vzniku značné části druhů rakoviny, v klinických studiích zatím nebylo možné tyto výsledky potvrdit kvůli nedostatku důkazů. Důkazy o antikarcinogenních a antimutagenních vlastnostech fytochemikálií tak v současné době přinášejí hlavně studie laboratorní a populační, s využitím buněčných linií a zvířecích modelů. <sup>(2)</sup>

Fytochemikálie můžeme rozdělit do pěti hlavních podskupin. Jsou jimi fenoly, alkaloidy, karotenoidy, organické sloučeniny síry a sloučeniny obsahující dusík. Mezi fenoly řadíme mimo jiné fenolové kyseliny a flavonoidy. <sup>(2)</sup>

## 2 FENOLOVÉ KYSELINY

Tyto látky řadíme mezi polyfenoly a podle struktury rozlišujeme dvě hlavní skupiny. Jsou to kyseliny hydroxybenzoové a kyseliny hydroxyskořicové. V potravinách, zejména pak v kávě, čaji, bobulích, víně, v jádrech ořechů a peckovicích, se hojně vyskytují obě skupiny fenolových kyselin. <sup>(2)</sup>

Tabulka 1 Nejčastější fenolové kyseliny

kyseliny hydroxybenzoové	kyseliny hydroxyskořicové
kyselina gallová	kyselina kávová
kyselina ellagová	kyselina ferulová
kyselina 4-hydroxybenzoová	kyselina p-kumarová
kyselina vanilová	kyselina sinapová

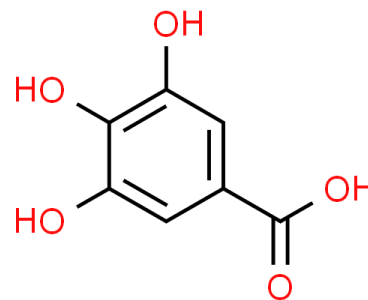
### 2.1 Mechanismy protirakovinového působení fenolových kyselin

Z výsledků několika studií lze působení fenolových kyselin rozdělit do dvou částí. Na jedné straně fenolové kyseliny díky antioxidačním vlastnostem ochraňují zdravé buňky před oxidačním poškozením a také podporují detoxikaci. Na straně druhé u rakovinových buněk indukují apoptózu, inhibují tvorbu nitrosloučenin a inhibují proliferaci. <sup>(2)</sup> Russo a spol. ve své studii došli k výsledku, že vysoký příjem kyseliny kávové a kyseliny ferulové obsažených v ovoci, zelenině, kávě, čaji a kakau může být spojen s nižším rizikem výskytu rakoviny prostaty. <sup>(3)</sup> Závěry prospektivní kohortové studie vedené Romanosem a spol. uskutečněné v průběhu 11,8 let, do které bylo zapojeno 10 812 žen středního věku vysokoškolského vzdělání ukázaly, že vysoký příjem hydroxyskořicových kyselin obsažených v kávě, ovoci a zelenině je spojen s nižším výskytem rakoviny prsu u žen po menopauze. <sup>(4)</sup>

### 2.2 Kyselina gallová

#### 2.2.1 Struktura a chemické vlastnosti

GA je bílá až světle nažloutlá pevná látka se sumárním vzorcem  $C_7H_6O_5$  a molekulární hmotností ( $M_r$ ) = 170,12 g/mol. Systematicky se jedná o kyselinu 3,4,5-trihydroxybenzoovou a je to derivát kyseliny benzoové. Tvoří bílé hygroskopické krystalky jehlicovitého tvaru, které dráždí oči a kůži. Tyto krystalky se rozpouštějí



Obrázek 1 Strukturální vzorec kyseliny gallové <sup>(7)</sup>

při teplotě kolem 260 °C, sublimují při teplotě 210 °C a bodu varu dosahují při teplotě 510 °C a tlaku 760 mm Hg. Je rozpustná ve vodě, alkoholu, acetonu, glycerolu a etheru. Maximální absorpenci má při  $\lambda = 272,5$  nm. <sup>(5) (6) (7)</sup>

### 2.2.2 Výskyt

Coby rostlinný produkt se GA vyskytuje volně nebo vázaná na tanin ve stromech divi-divi, dále pak v dubové kůře, dubových ořechách, v kořenech granátového jablka, škumpě a čaji. Odtud se pak získává a zpracovává pro využití ve farmaceutickém nebo papírnickém průmyslu, k výrobě pyrogalolu, léčiv a různých analytických činidel. Vysoké koncentrace GA byly také naměřeny v hřebíčku, kaštanech, vlašských ořechách, šalvěji, moruších, ostružinách a v červeném víně. <sup>(5) (6) (8)</sup>

### 2.2.3 Metabolismus, farmakokinetika

GA se do krevního oběhu snadno vstřebává v gastrointestinálním traktu. V játrech, ledvinách, dále pak v krvinkách, kožních buňkách, různých žlázách a nervových vláknech je pomocí COMT methylována na 3,5-dihydroxy-4-metoxybenzoovou kyselinu. Ve střevě se působením střevní mikroflóry dekarboxyluje GA na pyrogalol. Metabolity GA se pak z velké části vylučují močí. <sup>(5)</sup>

### 2.2.4 Fyziologické a farmakologické účinky

Již nyní se jedná o látku používanou při terapii mnoha onemocnění, např. osteosarkomu, leukémie, metastáz novotvarů, přítomnosti fúzního genu BCR/ABL a mnoho dalších a je slibný i u terapie melanomu, kde však stále probíhá výzkum. Ve veterinárním lékařství je pak GA používána jako antidiuretikum a intestinální hemostatikum. Dále bylo dokázáno, že 0,5 %  $\Theta$  GA inhibuje růst hub z rodů *Cladosporium*, *Trichocladium* a *Fusarium*. <sup>(5) (6)</sup>

### 2.2.5 Toxicita

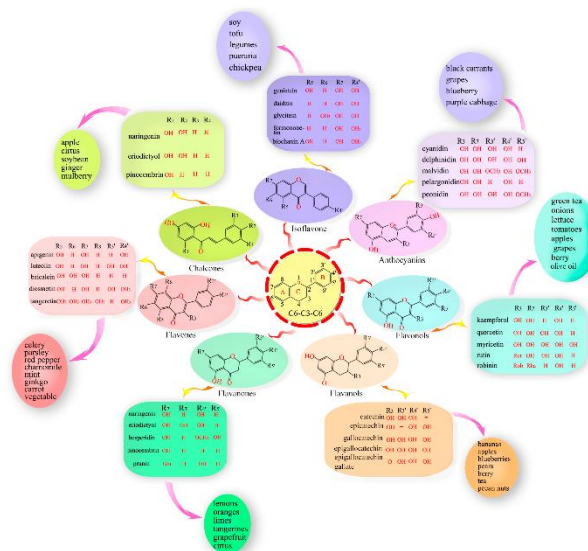
LD50 při pokusech na zvířatech se v různých studiích pohybuje v rozmezí 500 mg až 5 g/kg váhy. Při podávání GA lidem v množství 2 až 10 g se neobjevily žádné těžké nežádoucí účinky. Podle některých zdrojů je toxicita GA menší než toxicita kyseliny salicylové a celková systémová toxicita je velmi nízká. <sup>(5) (6)</sup>

### 3 FLAVONOIDY

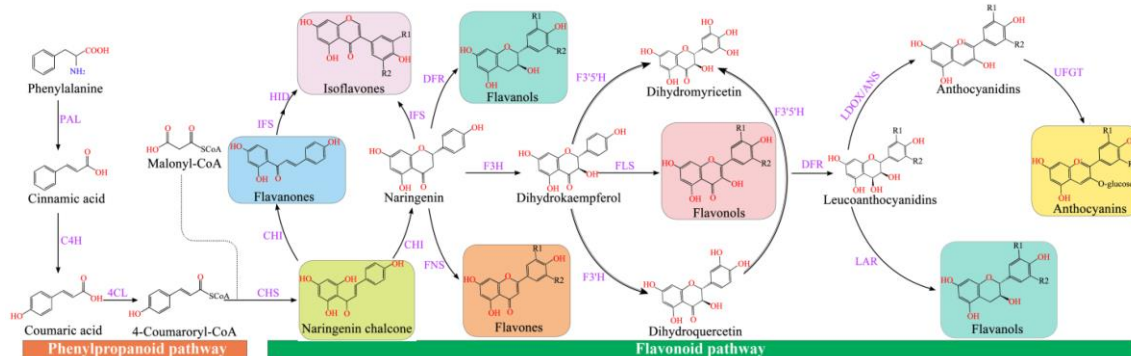
Flavonoidy představují širokou skupinu sekundárních rostlinných metabolitů, které nalzáme ve vakuolách rostlinných buněk. Zde jsou ve formě C-glykosidů nebo O-glykosidů a jsou odvozeny od aromatické aminokyseliny fenylalaninu, kdy jsou syntetizovány v rámci jedné z cest fenylpropanoidové dráhy.

Fenylalanin amonná lyáza (PAL) deaminuje fenylalanin za vzniku amoniaku a kyseliny skořicové.

4-hydroxiláza kyseliny skořicové (C4H) působením na kyselinu skořicovou katalyzuje vznik kyseliny 4-kumarové a v přítomnosti 4CL (kyselina 4-kumarová: CoA ligáza) vzniká 4-kumaroyl-CoA. Ten dále reguluje syntézu flavonoidů. (viz Obr. 3) <sup>(2)</sup> <sup>(9)</sup>



Obrázek 2 Dělení flavonoidů a výskyt v rostlinách <sup>(9)</sup>



Obrázek 3 Cesta biosyntézy flavonoidů <sup>(9)</sup>

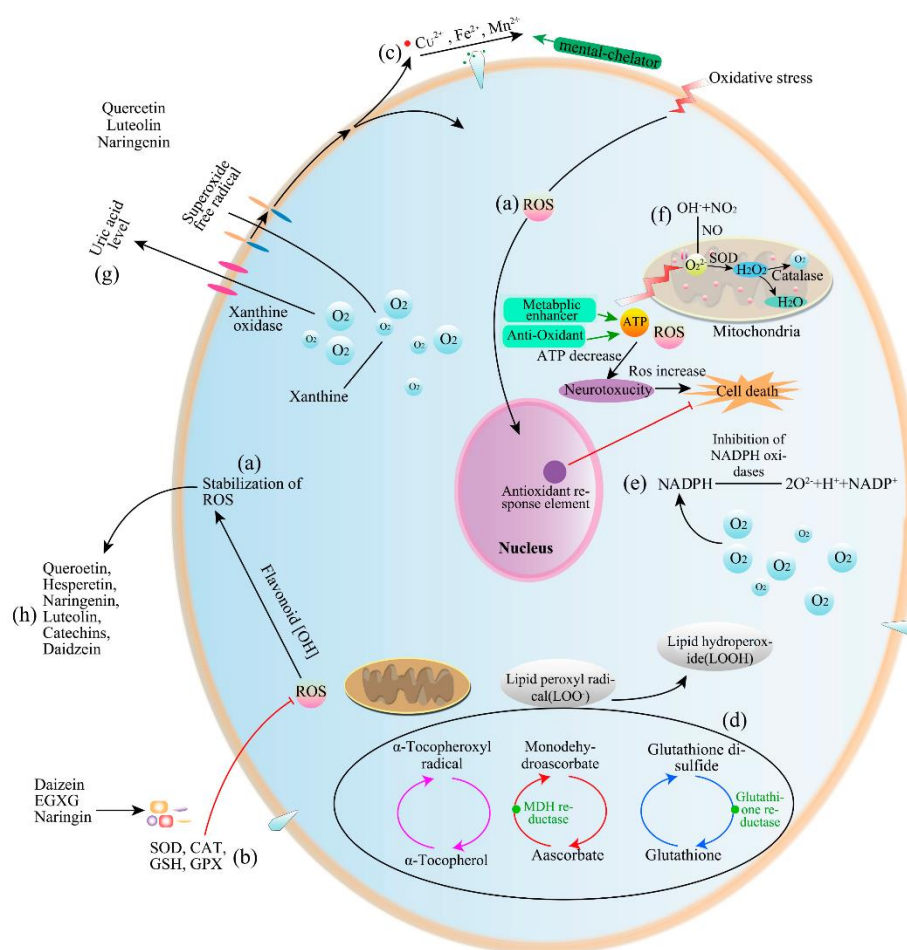
#### 3.1 Mechanismus antioxidační aktivity flavonoidů

Flavonoidy se ve značném množství nalzájí v citrusech, bobulích, ořeších, rajčatech, zelí, fazolích, čajích (včetně bylinných) a v červeném víně. V posledních dekádách jsou flavonoidy předmětem výzkumu pro jejich protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Mezi mechanismy antioxidační aktivity patří:

- 1. Přímé vychytávání ROS** – antioxidační aktivita závisí na uspořádání hydroxylových skupin v molekule. Antioxidační aktivita na kruhu B (viz Obr. 2) je způsobena jeho o-dihydroxy strukturou. Ta umožňuje flavonoidním účast na delokalizaci

elektronů a následně dislokaci elektronů na kruhu B s možností vychytávat kyslíkové radikály.

2. **Aktivace antioxidantních enzymů** – flavonoidy aktivují jedny z hlavních obranných enzymů, které mají na starost boj proti toxickým látkám, ale i proti oxidativnímu stresu. Jsou to např. UDP-glukuronyltransferázy nebo NAD(P)H-chinon oxidoreduktázy. Kromě toho mohou flavonoidy potlačovat i aktivitu enzymů syntázy oxidu dusnatého nebo xantinoxidázy, což jsou enzymy zodpovědné za vznik volných radikálů.
3. **Inhibice oxidáz** – Mezi látky, které jsou schopné katalyzovat vznik superoxidového aniontu patří xantinoxidáza a proteinkináza C. Flavonoidy jsou schopné aktivitu těchto enzymů potlačovat a tím snižují oxidační poškození buněk. <sup>(2) (9)</sup> (viz Obr.3)

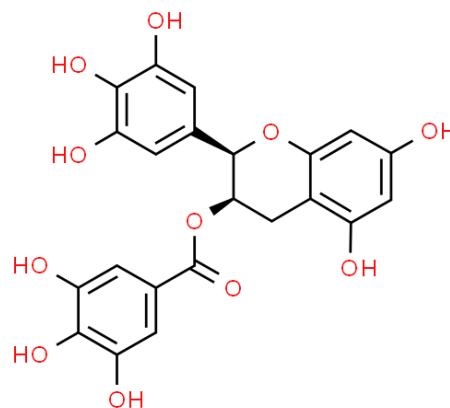


Obrázek 4 In-vitro mechanismy antioxidantní aktivity flavonoidů <sup>(9)</sup>

## 3.2 Epigalokatechin galát

### 3.2.1 Struktura a chemické vlastnosti

Epigalokatechin galát (EGCG) je pevná bílá látka ze skupiny flavanolů (známých také jako katechiny), jejíž sumární vzorec je  $C_{22}H_{18}O_{11}$  a její ( $M_r$ ) = 458,4 g/mol. Vzniká kondenzací kyseliny gallové s (3R)-hydroxyskupinou epigalokatechinu. EGCG je využíván coby induktor apoptózy, používá se pro svoje antioxidační účinky, ale také jako anti-neoplastické činidlo.



Obrázek 5 Strukturální vzorec EGCG <sup>(19)</sup>

Systematický název této látky je: [(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoát.

Bod tání EGCG je při teplotě 140 až 142 °C, vypařuje se při 909 až 910 °C a tlaku 760 mm Hg. Je rozpustná ve vodě, ethanolu, v DMSO a DMF. Maximální absorbanci má při  $\lambda = 274$  nm. V závislosti na druhu rozpouštědla je EGCG vysoce fluorescenční látka, kdy při excitaci světlem o  $\lambda = 275$  nm je její maximální emisní záření mezi 350 a 400 nm. Tyto emise jsou pak zhruba 85x intenzivnější při použití DMSO coby rozpouštědla oproti vodnému roztoku s pH=7,0. <sup>(10) (11) (12) (42)</sup>

### 3.2.2 Výskyt

EGCG je hlavní katechin nalézající se v čaji. Výluh z něj je celosvětově druhým nejkonsumovanějším nápojem, a podle způsobu přípravy obsahuje jeden šálek 0,1 až 0,2 gramu EGCG. Různé čaje a doplňky stravy jsou ale co do koncentrace EGCG velice variabilní, a proto je zapotřebí provádět výzkum ze standardizovaných nebo vysoce purifikovaných přípravků. Studie bohužel ukazují, že vstřebatelnost EGCG a dalších flavonoidů je velice nízká a většina látky, která se dostane do krve je v rámci několika hodin odstraněna žlučí do tlustého střeva. V krvi pak nalézáme EGCG v množství do 0,1 % přijaté dávky. Mezi další plodiny, kde nalézáme EGCG, řadíme kiwi, avokádo, heřmánek, pekanové a lískové oříšky. <sup>(11)</sup>  
<sup>(13)</sup>

### 3.2.3 Metabolismus, farmakokinetika

V rámci několika studií biologické dostupnosti EGCG bylo zjištěno, že absorpce této látky je pouze v řádu několika %. Maximální koncentrace v plazmě bylo dosahováno 2 hodiny po podání. Poločas rozpadu, který je u této látky zhruba 3 hodiny, se silně odvíjí

od přítomnosti dalších katechinů přijatých spolu s EGCG. EGCG je do krevního oběhu vstřebávána v jejunu a ileu, malá část je pak reabsorbována pomocí enterohepatální recirkulace. Po přechodu přes enterocyty se zhruba 75 % EGCG nachází v plazmě ve volné formě. Zdá se, že EGCG dobře prostupuje do tkání a překonává i hematoencefalickou bariéru. Jeden z metabolitů EGCG vzniká metylací enzymem katechol-O-methyltransferáza a vzniká dimetoxyl-EGCG. Spolu s dalšími metabolity, které vznikají mimo jiné i jako produkty metabolismu střevních bakterií, jsou vylučovány žlučovými i močovými cestami. I přes poměrně dobrou představu o farmakokinetice EGCG, kterou máme, jsou nám biologické účinky jednotlivých metabolitů stále z velké části neznámé. <sup>(13)(14)</sup>

### 3.2.4 Fyziologické a farmakologické účinky

EGCG je předmětem výzkumu pro svoje antikarcinogenní, antimutagenní, antioxidantní a neuroprotektivní vlastnosti. Bylo zjištěno, že 3'-O-methyl-epikatechin je schopný zabránit u fibroblastů oxidativnímu poškození, které způsobuje UVA. <sup>(10)(14)</sup>

Metylace DNA přispívá ke vzniku mutací a tyto epigenetické změny zvyšují riziko vzniku rakoviny. Mirza a kol. ve svém výzkumu zjišťovali pomocí RT-PCR vliv EGCG a dalších přírodních látek na specifické DNA methyltransferázy (DNMT), které jsou nejspíše zapojené do karcinogeneze prsu. Došli k závěru, že léčba pomocí EGCG a dalších látek snížila množství DNMT, což poukazuje na potenciál těchto látek v chemoprevenci rakoviny prsu. <sup>(15)</sup> Ke stejnému závěru došli ve své studii také Lewis a kol. <sup>(16)</sup>

Podle rešeršní studie, kterou realizovala Lecumberri a kol., by mohly být EGCG a další podobné látky použity v již zaběhnutých chemoterapeutických postupech, ve kterých by mohly působit aditivními nebo synergickými účinky na léčbu. Pro toto tvrzení je ale zapotřebí dalších klinických studií. <sup>(17)</sup>

Sidigui a kol. ve svém výzkumu zapouzdřili EGCG do nanočástic (PLA)-(PEG) a pozorovali, že oproti nezapouzdřenému EGCG si zapouzdřený uchovává více jak desetinásobnou biologickou účinnost. Toto zjištění by mohlo v budoucnu pomoci vyřešit problém s krátkým poločasem rozpadu. <sup>(18)</sup>

Zdá se, že přínos EGCG pro lidský organismus je spojený s konzumací čaje, případně potravinových doplňků, a především s dlouhodobým vystavováním se této látce, což in-vitro studie nedokážou dostatečně napodobit. Tyto látky ale mají vysoký potenciál při léčbě onkologických, ba i dalších onemocněních. Je však zapotřebí dalšího výzkumu, protože některé

studie poukazují na skutečnost, že ačkoli látky obsažené v zeleném čaji, jako je EGCG, umí předcházet vzniku rakoviny prsu, tytéž látky se jeví jako neúčinné při prevenci rakoviny prostaty a další látky, které se nacházejí v černém čaji riziko vzniku rakoviny prostaty dokonce nejspíše zvyšují. Pití zeleného čaje a kávy, na rozdíl oproti pití černého čaje, také nejspíš snižuje riziko vzniku rakoviny jícnu. <sup>(14)</sup> <sup>(20)</sup>

### **3.2.5 Toxicita**

Při pokusu na myších byla LD50 EGCG stanovena na 2170 mg/kg. <sup>(10)</sup>



## 4 BUNĚČNÉ KULTURY

Výzkum buněčných kultur začal až na začátku minulého století, kdy v roce 1912 francouzský lékař Alexis Carrel dokázal kultivovat buňky srdečního svalu kuřecího embrya in-vitro, a to po dobu 34 let bez použití antibiotik. Dalším velkým pokrokem byl objev doktora George Otto Geye, kterému se v roce 1951 podařilo vykultivovat buňky s vysokou mitotickou aktivitou odebrané z karcinomu děložního čípku Henrietty Lacksové, po které tuto stabilizovanou buněčnou linii pojmenoval HeLa. Harry Eagle přispěl k výzkumu buněčných kultur vytvořením médií, ve kterých dokázaly buňky kultur růst. Jednalo se o směs minerálních látek, cukrů a aminokyselin doplněných o zvířecí séra s růstovými faktory. <sup>(21) (22)</sup>

Buněčné kultury, nejčastěji z čistých buněčných linií, jsou nezdědka nesprávně zaměňovány za tkáňové kultury, které vznikají růstem buněk z malého kousku čerstvé tkáně do okolí. Buněčné kultury rozdělujeme na dva základní typy. První skupinou jsou kultury adherentní, které mohou růst až po přichycení na dno kultivační nádoby, kde jejich postupným růstem v jedné vrstvě vzniká tzv. monolayer. Tímto způsobem ale můžeme připravovat i kultury tkáňové nebo orgánové, které jsou mnohem složitější, skládají se z více typů buněk a v prostředí in-vitro lépe napodobují podmínky in-vivo. Druhou skupinu tvoří buňky označované jako lymfoblastoidní. Ty vytvářejí suspenzní kultury. U těchto kultur je důležité zabránit adhezii buněk k pevnému povrchu, protože rostou rozptýlené v roztoku, kde mohou tvořit shluky. Ať už se jedná o kultury buněčné nebo tkáňové, je důležité rozlišovat, jestli jsou právě odebrané z organismu, bez adaptace na nové in-vitro prostředí, nebo jsou již plně přizpůsobené. Podle toho kultury dělíme na primární a sekundární. <sup>(21)</sup>

### 4.1 Primární kultury

Pro založení primokultury používáme buď suspenzi buněk (tu tvoříme dezintegrací tkáně) anebo méně často malý kousek tkáně samotné. Těmto kulturám je zapotřebí zajistit velice podobné podmínky růstu, kterým byly vystaveny v organismu. Při výběru podmínek kultivace se zaměřujeme především na výběr kultivačního média nebo způsob kultivace (adherentní / suspenzní typ růstu). Díky lepšímu proliferačnímu potenciálu se lépe kultivují buňky mladých jedinců, popř. buňky s nádorovou nebo virovou transformací. <sup>(21)</sup>

### 4.2 Sekundární kultury

Primokultivací zpravidla získáváme heterogenní buněčnou populaci, jelikož odebraný buněčný materiál obsahuje více typů buněk. Sekundární kultivace má stejně jako v mikrobiologii za úkol vhodným postupem (v tomto případě pasážováním) vyizolovat čistou

buněčnou kulturu, kterou můžeme považovat za sekundární. Vzniká tak buněčná linie, kterou tvoří totožné buňky. <sup>(21)</sup>

### 4.3 Buněčné linie

Buněčné linie, které vznikají z buněčných kultur, jsou drtivou většinou nestabilizované. To znamená, že buňky daných linií s každým dalším dělením stárnou, počet buněk s abnormální morfologií postupně narůstá a buněčné linie jako takové postupně dojdou do stádia, kdy už nejsou schopné se dále dělit a zaniknou. Tento proces označujeme jako senescence neboli replikativní stárnutí. Je způsobeno zkracováním konců telomer na chromozomech během každého mitotického dělení. Počet možných dělení je charakterizován tzv. Hayflickým limitem a dává nám informace o proliferačních možnostech jednotlivých typů buněk. U savčích buněk je tento limit 45 až 60 mitotických dělení, konkrétně u buněk lidských se pak průměrná hodnota pohybuje okolo čísla 52. Pro zachování buněčných linií bychom proto museli neustále zakládat nové primokultury. To by s sebou neslo řadu problémů, jako je nejednotný fenotyp buněčných linií stejných buněk, ale jiných primokultur, různé vlastnosti buněk jako rychlost dělení, exprese povrchových proteinů nebo tvorba různých intracelulárních enzymů ovlivňujících metabolismus daných buněk. <sup>(21)</sup>

Řešením tohoto problému je uměle navozená imortalizace nestabilizovaných buněčných linií. Vzniká imortalizovaná, také kontinuální nebo stabilizovaná buněčná linie, u které nedochází k projevům degenerativních změn. Tuto imortalizaci nemusíme provádět u buněčných kultur, které pocházejí z nádorových buněk, jelikož disponují neomezenou mitotickou aktivitou již samy o sobě. Podobné dělicí vlastnosti projevují kromě nádorových buněk také buňky kmenové. <sup>(21)</sup>

#### 4.3.1 Výhody a nevýhody nestabilizovaných a imortalizovaných buněčných linií

Mezi hlavní nevýhody nestabilizovaných buněčných linií patří omezená doba, během které se s těmito liniemi dá pracovat a jejich citlivost na negativní vlivy pocházejících z prostředí, ve kterém se s liniemi pracuje. Jejich velkou výhodou je ale jejich genetická a fenotypová podobnost k původním buňkám, ze kterých pocházejí, čehož se využívá při nutnosti simulovat podmínky in-vivo v laboratorním prostředí. Navíc jsou relativně odolné proti vzniku spontánních mutací. Za zmínku stojí i kontaktní inhibice, což je jev, kdy buňky inhibují svou proliferační aktivitu ve chvíli, kdy se navzájem začnou dotýkat a vytvoří celistvou vrstvu. <sup>(21)</sup>

Nevýhodou imortalizované linie je fakt, že během imortalizace zpravidla ztrácí schopnost kontaktní inhibice, a tak dochází k jejich přerůstání. Díky tomu ovšem dokážeme vytvořit buněčné linie o vyšší buněčné koncentraci. Imortalizace ale u buněk způsobuje změny na genové úrovni, což souvisí s vykazováním odlišných fenotypových vlastností v porovnání s buňkami původními. Kvůli tomu jsou také náchylnější k dalším mutacím, a proto je zapotřebí je po imortalizaci před další prací nejdříve stabilizovat. <sup>(21)</sup>

## 5 LYMFOIDNÍ BUNĚČNÉ LINIE

V rámci krvetvorby se ze společné lymfoidní progenitorové buňky diferencují a vyvíjejí B a T lymfocyty a NK-buňky. Zatímco NK-buňky jsou důležitou součástí vrozené imunity, B a T lymfocyty tvoří klíčovou součást imunity humorální. Tyto buňky se podílejí na imunologické regulaci nádorů a jejich imunoeditaci. T lymfocyty se vyvíjejí v brzlíku a diferencují na dvě subpopulace. První jsou T lymfocyty s povrchovým znakem CD4, ze kterých se později stávají pomocné T buňky (Th) a druhou jsou T lymfocyty s povrchovým znakem CD8. Ty v pozdějších fázích svého života přecházejí v cytotoxické T buňky (Tc). NK-buňky na svém povrchu exprimují receptory přirozené cytotoxicity (NCR). Díky nim jsou schopné rozpoznávat širokou škálu aktivačních ligandů, ať už virových, bakteriálních nebo buněčných a které po své aktivaci spouští cytotoxickou reakci. Vývoj B lymfocytů probíhá v kostní dřeni, dokončuje se ale až po setkání s antigenem v uzlinách, slezině nebo v Peyrových plátech (ty patří mezi sekundární lymfatické orgány). Na svém povrchu vystavují receptor pro antigen, kterým je komplex imunoglobulinové molekuly a dalších struktur. Tento receptor se nazývá BCR. Po setkání s antigenem způsobí dělení B lymfocytů a způsobí vznik finálního stádia, plazmocytů, které následně produkují protilátky proti antigenům, které vyvolaly reakci. Pro tvorbu vysoce specializovaných protilátek z řad IgG, IgA a IgE je zapotřebí podpora (potvrzení) subtypu T lymfocytů Th2. Malá část T i B lymfocytů se po setkání s antigenem diferencují v tzv. paměťové buňky. <sup>(23) (24) (25) (26)</sup>

### 5.1 Lymfoblastická leukémie

Leukémie a lymfoblastické lymfomy patří mezi neoplazie vznikající z lymfocytárních prekurzorů. „Vzhledem k podobnostem mezi akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a lymfoblastickým lymfomem (LL), které se týkají zejména obdobného buněčného původu, imunofenotypu a morfologie maligních buněk, se často hovoří o dvojí prezentaci jedné diagnózy.“ (27, s. 225) ALL i LL se dělí na B a T buněčné podle toho, jaké prekurzorové buňky stály u vzniku konkrétního onemocnění. B buněčné ALL/LL jsou častěji spojovány s diagnostikou leukémií, což je maligní proliferace hematopoetické, popř. progenitorové buňky, pocházející z kostní dřene, jejíž maligně transformovaný klon prostupuje do periferní krve a infiltrací postihuje lymfatické uzliny nebo nervovou soustavu. Tyto klony mohou mít původ jak v buněčné linii lymfatické, myeloidní, monocytové tak i megakaryocytární. Naproti tomu, T buněčné ALL/LL tvoří častěji mimodřeňové malignity. Vznikají přímo v periferních lymfatických orgánech, odkud se pomocí cévního řečiště rozšiřují (diseminují) do dalších orgánů jako jsou játra, slezina, mozek, kostní dřeň, nebo plíce, a tím je infiltrují. <sup>(27) (28)</sup>

I přesto, že ALL/LL nejsou dědičná onemocnění a většina případů vzniká de-novo v rámci několika stupňového procesu, na jehož začátku je maligní transformace buňky, která získá jistou proliferační výhodu a dá vzniknout pre-leukemickému klonu, jejich incidence narůstá v rodinách s některými onemocněními. Jsou jimi např. neurofibromatóza, Shwachman-Diamondův syndrom, Bloomův syndrom nebo Franconiho anémie. Podle epidemiologických dat je jediným dosud popsáným vnějším faktorem, který má vliv na vznik ALL/LL ionizující záření. To bylo pozorováno po konci druhé světové války na přeživších, které tvořily zejména děti, postižených výbuchy atomových bomb v Japonsku. <sup>(27)</sup> <sup>(28)</sup>

Incidenci ALL/LL můžeme rozdělit do dvou oddělených píků. První nalzáme u dětí do 18. roku života, druhý pak u osob starších 40 let. Kromě kojeneckých leukémií, které se vyskytují častěji u dívek, postihují ALL/LL častěji chlapce/muže. <sup>(27)</sup> <sup>(28)</sup>

### 5.1.1 Příklady maligních transformací při vzniku ALL/LL

Protoonkogeny jsou geny, jejichž mutace mohou vést ke vzniku nádorového bujení. Dávají vzniknout proteinům, které mají abnormální funkce nebo je zvýšená jejich aktivita. Mezi změny na chromozomech, které vedou ke vzniku nádorového bujení, patří:

- **t(12;21)(p13;q22) s fúzním genem TEL/AML1 (ETV6/RUNX1)**

Jedna z nejstudovanějších hematologických aberací vzniká fúzí genu TEL a AML1. Gen TEL produkuje transkripční faktor z rodiny Ets a je nutný pro správné převedení krvetvorby ze žloutkového vaku do kostní dřene. AML1 je součástí transkripčního faktoru CBF (core binding factor) zodpovědného jednak za správné navázání DNA, ale také reguluje geny zodpovědné za definitivní krvetvorbu v rámci všech linií. Bohužel, biologický mechanismus lymfoidní transformace TEL/AML1 zatím není plně pochopen. <sup>(27)</sup>

- **t(9;22)(q34;q11) s fúzním genem BCR/ABL1**

Tato mutace, známá také jako Filadelfský chromozom, se vyskytuje u naprosté většiny pacientů s ALL/LL. Vzniká translokací onkogenů BCR na chromozomu 22 a ABL na chromozomu 9, které po spojení aktivují fúzní gen, díky kterému se tvoří nová tyrosinkináza. Ta umožňuje buňce další nekontrolovatelné dělení. <sup>(27)</sup> <sup>(28)</sup>

- **t(1;19)(q23;p13) s fúzním genem E2A/PBX1**

Jak fúzní gen E2A/PBX1 přispívá k rozvoji ALL/LL v současné době není jasné. Je schopný navodit transformaci fibroblastů in-vitro a vyvolat vznik T lymfomů, nicméně

u B prekurzorů transformační aktivitu nejeví a zdá se, že naopak dokáže vyvolávat apoptózu. Pro maligní transformaci je tedy krom samotné přítomnosti E2A/PBX1 nejspíš zapotřebí ještě další, dosud neznámý faktor. <sup>(27)</sup>

- **Přestavba genu MLL (11q23)**

Přestavba genu MLL probíhá s více než 100 chromosomálními lokusy, což má za následek širokou škálu projevů. U leukémií, kde bylo prokázáno poškození genu MLL, dochází ke změnám v expresi tzv. homeoboxových genů. Ty jsou zodpovědné za diferenciaci buněk. Zároveň dochází k poškození mechanismů, které jsou zodpovědné za reparaci poškozené DNA, což vede k dalšímu zvýšení incidence chromozomových abnormalit v proliferujících buňkách. <sup>(27)</sup>

- **Mutace genu NOTCH1**

Gen NOTCH1 dává vzniknout transmembránovému receptoru, který směřuje vývoj lymfoidního progenitoru do T buněčné linie. Jeho inaktivace, potažmo abnormální exprese, vede k tvoření buď to pouze B nebo T buněčné linie a nalézáme ji u více než poloviny pacientů. <sup>(27)</sup>

Dalším výrazným činitelem vzniku ALL/LL je častá přítomnost zvýšeného počtu chromozomů v blastech. Nízká hyperdiploidita je charakterizovaná více jak 47 chromozomy, vysoká hyperdiploidita pak přítomností více jak 50 chromozomů. Objevuje se i hypodiploidie, která se vyskytuje zhruba u 5 % případů ALL/LL a je spojena s výrazně horší prognózou. <sup>(27) (28)</sup>

## **5.2 Buněčná linie C1R**

Buněčná linie C1R byla odvozena z B lymfoblastoidní buněčné linie HMy.2 pocházející z lidských B buněk tříkolovou mutagenezí virem Epsteina-Barrové a imunoselekcí s anti-HLA mAb. U této linie je potlačena exprese HLA-A2, HLA-A3, HLA-B35, HLA-Bw62 a HLA-Cw3. <sup>(29) (30)</sup>

Potlačená exprese výše zmíněných HLA může přispět k rozvoji Hodgkinova lymfomu, vlasatobuněčné leukémie nebo chronické myeloidní leukémie. <sup>(31) (32) (33)</sup>

### **5.2.1 CD Ag**

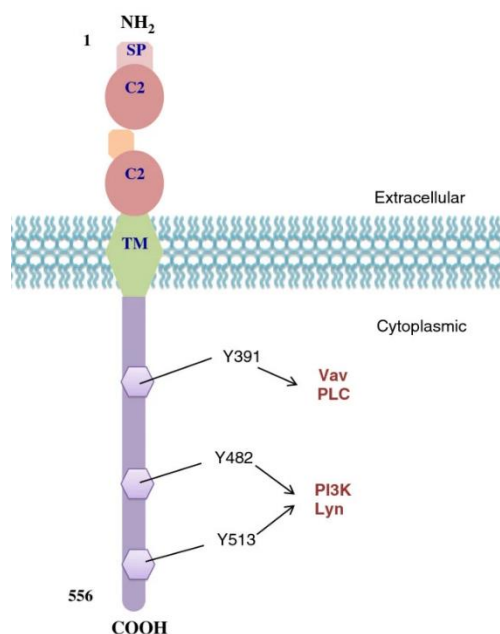
CD (z anglického spojení cluster of differentiation) jsou molekuly, které nalézáme na buňkách imunitního systému, včetně lymfocytů. Nomenklatura CD byla vytvořena,

a je průběžně aktualizována, na Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshops. Byla schválena Mezinárodní unií imunologických společností a WHO a díky tomu poskytuje jednotný systém klasifikace a označování mAb a molekul buněčného povrchu, které rozpoznávají. V uplynulých 30 letech bylo charakterizováno a označeno již více než 400 těchto CD molekul, které se staly nedílnou součástí mnoha vědních oborů coby buněčné markery umožňující identifikaci a izolaci populací a podskupin, včetně vývojových stádií leukocytů, což je využíváno při průkazu znaků průtokovou cytometrií nebo imunohistochemií. mAb jsou důležitou součástí biomedicínského výzkumu, biotechnologie a diagnostiky, které mohou být použity při léčbě malignit a autoimunních onemocnění. <sup>(26) (34)</sup>

### 5.2.2 CD19

Buněčná linie C1R na svém povrchu prezentuje celou řadu antigenů, včetně CD19. Spolu s CD81, CD21, CD82 a CD225 tvoří komplex koreceptoru BCR. Ten pak reguluje tok vápníku, aktivaci MAP kinázy nebo Src PTK. Přes tyto mechanismy je CD19 klíčový progenitor B lymfocytů, který hraje důležitou roli při jejich vývoji a správné funkci, včetně rozvoje adekvátní imunitní odpovědi, a podílí se na stanovení prahů vnitřní signalizace. Jeho exprese začíná při diferenciaci z pluripotentní kmenové buňky již v časných prekurzorech B buněk a končí až během terminální diferenciaci na plazmatickou buňku. Ve zralých B buňkách je jeho exprese zhruba 3x vyšší než u nezralých. Exprese tohoto znaku je udržována také ve folikulárních dendritických buňkách a v B buňkách, které prošly neoplastickou transformací, a proto je o něj opřena diagnostika a léčba B buněčných leukémií a lymfomů pomocí monoklonálních protilátek (mAb). Deficit CD19 vede k hyporeaktivitě na transmembránové signály a slabé imunitní odpovědi, která je závislá na T buňkách. To vede k celkové horší humorální imunitní odpovědi. CD 19 patří do imunoglobulinové “superrodiny“, kam řadíme molekuly imunitního systému s podobnou strukturou. Jsou to:

- imunoglobuliny a receptory T buněk (TCR)
- molekuly hlavního histokompatibilního systému I. a II. třídy (MHC)



Obrázek 6 Struktura CD19 <sup>(37)</sup>

- molekuly zapojené do mezibuněčné interakce (CD4, CD8 a CD22, včetně CD19)
- adhezní molekula CD56
- polymerní imunoglobulinové receptory IgR.

Co do struktury je CD19 transmembránový glykoprotein 1. typu, který má v extracelulární oblasti dvě C2 domény, mezi kterými se nachází třetí nejspíše disulfidem vázaná doména. Mezi extracelulární a intracelulární oblastí je transmembránová oblast CD19. Na ni navazuje intracelulární oblast s velkým cytoplazmatickým koncem zahrnujícím 242 AMK s devíti tyrosinovými zbytky. Biologické funkce jsou podle studií závislé na schopnosti fosforylace tyrosinových zbytků na pozicích Y391, Y482 a Y513. <sup>(26) (27) (35) (36) (37) (38)</sup>



## 6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie je v dnešní době již běžná laboratorní metoda, která našla své uplatnění v imunologii, onkologii, hematologii a ve výzkumu. Pro měření vždy využíváme jistou suspenzi buněk, u kterých zjišťujeme buď povrchové nebo intracelulární molekuly. Pokud se jedná o molekuly intracelulární, musíme buňky nejdříve fixovat. K tomu využíváme např. 1% roztok paraformaldehydu. Takto připravené buňky následně permeabilizujeme a díky tomu protilátky proniknou i do středu buňky. Pro průtokovou cytometrii se většinou využívají monoklonální protilátky (mAb), které jsou značené fluorochromem. Tyto protilátky necháme navázat na příslušné extracelulární (popř. intracelulární) antigeny a poté přistupujeme k samotnému měření.

Buněčnou suspenzi necháváme nasávat do průtokového cytometru, kde jsou vysokou rychlostí a za využití hydrodynamické fokusace jednotlivé buňky řazeny za sebou, aby při následném průletu komorou byla každá buňka ozářena laserem samostatně. Tento průlet laserem zapříčiní vznik několika signálů, které jsou zaznamenány a počítačově zpracovány.

První signál vzniká jako důsledek Tyndallovu jevu, kdy každá granulovaná částice způsobuje jakýsi odraz laserového paprsku do okolí (boční rozptyl, side scatter). Detektory umístěné v úhlu  $90^\circ$  tento odražený signál zachytí a po zesílení fotonásobičem je jeho velikost úměrná míře granularity částic. Druhý signál měří přímý rozptyl (forward scatter) buněk procházejících laserem. Detektor je umístěn v úhlu  $0^\circ$  a vzniklý signál je úměrný velikosti buněk. Třetí signál vzniká díky fluorochromům navázaných na buněčné struktury. Laser tyto fluorochromy excituje a vzniklé emisní záření je detekováno v úhlu  $90^\circ$ . Průtokové cytometry v dnešní době umožňují zapojení většinou 3 laserů současně a díky tomu je možné měřit v jednu chvíli hned několik emitních signálů najednou. Jsou jimi argonový laser ( $\lambda = 488$  nm), helium-neonový laser ( $\lambda = 633$  nm) a fialový nebo UV laser ( $\lambda = 407$  nebo  $350$  nm).

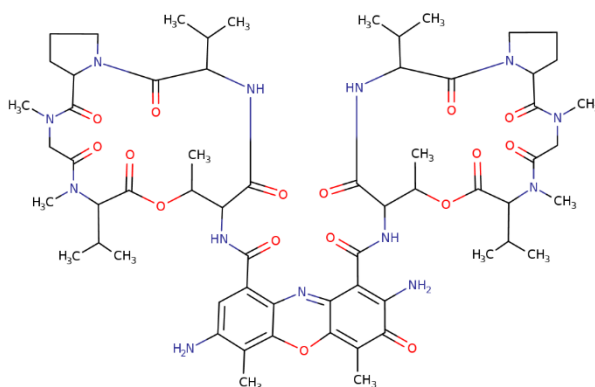
Vzniklé paprsky světla různých vlnových délek jsou pomocí optické soustavy diachroických, pásmových, long pass a short pass filtrů upraveny tak, aby prošlo pouze monochromatické světlo konkrétní vlnové délky, které je po detekci převedeno na elektrický impuls. Takto získaná data jsou následně softwarově zpracována a zobrazena graficky ve formě histogramů, které nám dávají informace o % zastoupení buněk pozitivních pro daný parametr a scattergramů. Scattergramy jsou dvourozměrné bodové grafy, kdy každý bod znázorňuje jednu buňku. V závislosti na nastavení parametrů na ose x a ose y jsou buňky

rozmístěny podle vztahu dvou určených veličin, kterými může být velikost, granularita nebo (ne)přítomnost buněčné struktury, kterou jsme značili fluorochromem. <sup>(25) (27) (39)</sup>

## 6.1 Fluorochrom 7-AAD

Jedním z těchto fluorochromů je 7-aminoaktinomycin D se sumárním vzorcem  $C_{62}H_{87}N_{13}O_{16}$  a  $M_r = 1270,43$  g/mol, který využíváme při měření buněčné viability. Kromě hodnocení životaschopnosti buněk se využívá také k rozlišení pozdních apoptických a nekrotických buněk. Principem měření se 7-AAD je skutečnost, že se tato látka váže na dsDNA, ale u buněk s neporušenou plazmatickou membránou je vylučován do extracelulárního prostoru, jinak řečeno, mrtvé buňky s narušenou plazmatickou membránou jsou obarveny 7-AAD, kdežto živé nikoli. <sup>(40) (41)</sup>

Systematicky se jedná o 2,7-diamino-*N,N'*-bis[(6*S*,9*R*,10*S*,13*R*,18*aS*)-6,13-diisopropyl-2,5,9-trimethyl-1,4,7,11,14-pentaoxohexadekahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*i*][1,4,7,10,13]oxatetraazacyklohexadecin-10-yl]-4,6-dimethyl-3-oxo-3*H*-phenoxazin-1,9-dikarboxamid. <sup>(41)</sup>



Obrázek 7 Strukturální vzorec 7-AAD <sup>(41)</sup>

## 7 INCUCYTE

V roce 1992 založili Kirk Schroeder a Brad Neagle společnost NovelTech Systems, Inc. Ve spolupráci s Upjohn Company vyvinuli čtečku fluorescenčních zobrazovacích destiček (FLIPR), která se rychle stala průlomovou technologií při výzkumu receptorů spojených s G-proteinem a cílů léčiv na iontových kanálech. Dalším významným přínosem pro objevování a výzkum léčiv bylo představení IonWorks v roce 2002, již pod názvem společnosti Essen Instruments. Na přelomu let 2005 a 2006 Essen představil zobrazovací systém IncuCyte® a v roce 2010 se společnost přejmenovala na Essen BioScience. <sup>(43)</sup>

### 7.1 Analýza živých buněk v reálném čase

Od svého vydání v roce 2006 se systém IncuCyte dočkal několika inovací, ale technologie založená na analýze živých buněk v reálném čase zůstala stejná. Možnosti aplikace tohoto systému jsou široké a umožňují studium buněčné proliferace, buněčné smrti, apoptózy, zabíjení imunitních buněk, dále pak pozorování migrace, chemotaxe, angiogeneze, vyrůstání neuritů nebo fagocytózy. Další využití nalézá systém IncuCyte při posuzování účinků různých sloučenin na buňky a pro nalezení správného okamžiku nasazení těchto látek např. pro léčebné účely, analýze různých metabolitů nebo vylučovaných proteinů. <sup>(44)</sup>

IncuCyte je navržen tak, aby se mohl nacházet ve stabilním prostředí buněčných inkubátorů, kde pomocí mikroskopů a pohyblivého optického systému zaručujícím nehybnost destiček a buněk během celého procesu měření, pořizuje vysoce kvalitní snímky buněk, a to buď fázovým kontrastem, ve světlém poli a/nebo pomocí fluorescence. Tyto snímky pořizuje automaticky podle nastavení opakovaně a nepřetržitě, bez nutnosti invazivního narušování buněk. Získávaná data jsou analyzována již v průběhu měření, snímek po snímku tak, aby bylo možné pozorovat chování buněk v reálném čase. <sup>(44)</sup>

### 7.2 Výhody užití IncuCyte

Pro oblasti výzkumu, jako je virologie, onkologie nebo farmakologie je možnost sledování dynamiky živých buněk klíčová, což jiné systémy a technologie v takové míře neumí. Tyto systémy nejsou často schopné podchytit buněčné změny v rámci dlouhého časového období, kdy např. zrání a diferenciací kmenových buněk může trvat od několik hodin po několik týdnů. IncuCyte je navíc relativně dostupný, bez nutnosti vysokých investic do vybavení nebo vysoce školeného personálu a obsluhy laboratoře. Nespornou výhodou tohoto systému je pak odpadnutí nutnosti různých zásahů do prostředí buněk a tím předcházení nechtěných a zavádějících experimentálních artefaktů a chyb. <sup>(43) (44)</sup>

# PRAKTICKÁ ČÁST

## **8 CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo ověřit, zda polyfenoly kyselina gallová a epigalokatechin galát, mají vliv na proliferační potenciál B buněčné linie C1R.

## 9 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

1. Ovlivňuje přítomnost kyseliny gallové proliferaci buněčné linie C1R?
2. Ovlivňuje přítomnost epigalokatechin galátu proliferaci buněčné linie C1R?
3. Poskytuje měření konfluence pomocí IncuCyte stejné výsledky jako měření viability buněk průtokovým cytometrem s využitím 7-AAD?
4. Korelují výsledky konfluence měřené pomocí IncuCyte s průměrnou plochou buněčných klastrů měřených ručně s využitím programu ImageJ?

## 10 METODIKA PRÁCE

### 10.1 Charakteristika experimentu

V praktické části bakalářské práce jsem experimentálně navrhl postup kultivace buněčné kultury C1R s předem definovanými roztoky GA a EGCG o známé koncentraci v přístroji IncuCyte. Po zjištění, že podmínky nastavené pro provedení experimentu jsou vyhovující, jsem toto měření provedl znovu za stejných podmínek a zároveň jsem si připravil materiál pro kontrolní měření na průtokovém cytometru. Všechna získaná data jsem zpracoval, porovnal jsem jednotlivé metody měření a vyhodnocování a dále jsem tato data statisticky zhodnotil.

### 10.2 Vybavení a materiály

#### 10.2.1 Přístrojové vybavení

- Průtokový cytometr DxFLEX, Beckman Coulter, USA
- IncuCyte, Sartorius, USA

#### 10.2.2 Programy, Software

- CytoExpert, Beckman Coulter, USA
- IncuCyte, USA
- ImageJ, US

#### 10.2.3 Použitý materiál

- Vacuum Filtration 150 „rapid“-Filtermax, 0,22 µm pore size, TPP, Švýcarsko
- BD Trucount™ Tubes, LOT: 21258, Exp.: 2023-09-30, BD
- 96F NONTREATED BLACK MICROWELL SI, Thermo Fischer Scientific, USA
- 48-well Clear TC-treated Multiple Well Plates, Individually Wrapped, Sterile, Corning, USA

#### 10.2.4 Chemikálie

- Gallic acid, Sigma-Aldrich, USA
- (-)-Epigallocatechin gallate ≥80% (HPLC), from green tea, Sigma-Aldrich, USA
- RPMI Medium 1640 (1x), GIBCO – Thermo Fischer Scientific, UK
- Poly-L-ornithine solution, Sigma-Aldrich, USA

- 7-AAD Viability Staining Solution Liquid, EXBIO, Česká republika
- Water for injection, Kabi
- Anti-Anti (100x) Antibiotic-Antimycotic, GIBCO – Thermo Fischer Scientific, UK
- DPBS (10x), GIBCO – Thermo Fischer Scientific, UK
- Propidium jodid, ORPEGEN Pharma, Německo
- Buněčná linie C1R, Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň

## 10.3 Postup

Z důvodu možné kontaminace pracovních roztoků, vzorků i spotřebního materiálu jsem pracoval po celou dobu sterilně v laminárním boxu.

### 10.3.1 Příprava zásobních roztoků

#### 10.3.1.1 GA

Navážku 0,1630 g GA jsem převedl pomocí 50 ml RPMI na roztok, ke kterému jsem následně napipetoval 0,5 ml Anti-Anti. Takto připravený roztok jsem filtroval pomocí Vacuum Filtration. Vzniklý filtrát roztoku GA o  $c = 19,1$  mM jsem rozalíkvoval po 500  $\mu$ l a zamrazil na  $-20$  °C pro další použití.

#### 10.3.1.2 EGCG

100 mg EGCG jsem převedl pomocí 50 ml RPMI na roztok, ke kterému jsem následně napipetoval 0,5 ml Anti-Anti. Takto připravený roztok jsem filtroval pomocí Vacuum Filtration. Vzniklý filtrát roztoku EGCG o  $c = 4,36$  mM jsem rozalíkvoval po 500  $\mu$ l a zamrazil na  $-20$  °C pro další použití.

### 10.3.2 Příprava 48jamkové destičky

Den před měřením jsem na dno jamek 48jamkové destičky (celkem 4 destičky) napipetoval 100  $\mu$ l roztoku Poly-L. Pomocí parafilmu jsem destičku utěsnil a nechal v lednici přes noc. Poly-L jsem následující den vyklepl z destiček a zbývající Poly-L jsem nechal vyschnout

### 10.3.3 Příprava 1000 $\mu$ M roztoků GA a EGCG

#### 10.3.3.1 GA

Ke 100  $\mu$ l roztoku GA ( $c = 19,1$  mM) jsem připipetoval 1910  $\mu$ l RPMI. Vznikl roztok GA o  $c = 1000$   $\mu$ M.



### 10.3.3.2 EGCG

Ke 400  $\mu\text{l}$  roztoku EGCG ( $c = 4,36 \text{ mM}$ ) jsem připipetoval 1744  $\mu\text{l}$  RPMI. Vznikl roztok EGCG o  $c = 1000 \mu\text{M}$ .

### 10.3.4 Zjištění buněčnosti buněčné linie C1R

Buněčnost roztoku buněčné linie C1R (dále už jen  $\Theta$  C1R) poskytnuté Hematologicko-onkologickým oddělením FN Plzeň jsem si ověřil pomocí BD Trucount<sup>TM</sup> Tubes. Do této zkumavky jsem napipetoval 50  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R, přidal jsem 400  $\mu\text{l}$  DPBS a poté dalších 100  $\mu\text{l}$  propidium jodidu. Tuto směs jsem proměřil průtokovým cytometrem. Ze získaných výsledků buněčnosti  $\Theta$  C1R jsem musel  $\Theta$  C1R naředit RPMI (1 díl  $\Theta$  C1R + 5 dílů RPMI), abych dosáhl buněčnosti roztoku 100 000 buněk/ml.

### 10.3.5 Další postup

1. Z připravených roztoků polyfenolů o  $c = 1000 \mu\text{M}$  jsem dvojkovým ředěním pomocí RPMI připravil jednotlivé roztoky o koncentracích 1000, 500, 250, 125, 62,5 a 31,25  $\mu\text{M}$ .
2. Na dna jamek připravené 48jamkové destičky jsem podle schématu zobrazeného v Tabulce 2 napipetoval 50  $\mu\text{l}$  roztoku polyfenolů o určených koncentracích, a připipetoval jsem 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R.

Pro GA a EGCG jsem připravoval po dvou destičkách.

Tabulka 2 Pipetovací protokol pro 48jamkovou destičku

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	V	V	V	V	V	V	V	V
B	V	K	K	K	K	K	K	V
C	V	100	50	25	12,5	6,25	3,125	V
D	V	100	50	25	12,5	6,25	3,125	V
E	V	100	50	25	12,5	6,25	3,125	V
F	V	V	V	V	V	V	V	V

Legenda: V = 500  $\mu\text{l}$  Water for injection, K = 50  $\mu\text{l}$  RPMI + 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R, 100 = 50  $\mu\text{l}$  polyfenolu (1000 $\mu\text{M}$ ) + 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R, 50 = 50  $\mu\text{l}$  polyfenolu (500 $\mu\text{M}$ ) + 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R, 25 = 50  $\mu\text{l}$  polyfenolu (250 $\mu\text{M}$ ) + 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R, 12,5 = 50  $\mu\text{l}$  polyfenolu (125 $\mu\text{M}$ ) + 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R, 6,25 = 50  $\mu\text{l}$  polyfenolu (62,5 $\mu\text{M}$ ) + 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R, 3,125 = 50  $\mu\text{l}$  polyfenolu (31,25 $\mu\text{M}$ ) + 500  $\mu\text{l}$   $\Theta$  C1R

3. Takto připravené 48jamkové destičky jsem utěsnil parafilmem. Dvě (jednu pro každý polyfenol) jsem umístil do IncuCyte a spustil přednastavený program,

zbylé dvě 48jamkové destičky (také po jedné pro každý polyfenol) jsem vložil do CO<sub>2</sub> inkubátoru.

4. V IncuCyte probíhalo měření s odečtem po 3 hodinách během následujících dvou dnů a 21 hodin.
5. Z CO<sub>2</sub> inkubátoru jsem destičky vyndal po třech dnech. Z každé jamky (vyjma těch s Water for injection) jsem přepipetoval 150 µl podle Tabulky 3 do 96jamkové destičky. Do každé jamky jsem také napipetoval 6 µl 7-AAD. Takto připravenou desku jsem po inkubaci 30 minut při 5,5 °C nechal změřit průtokovým cytometrem.

*Tabulka 3 Pipetovací protokol 96jamkové destičky pro průtokový cytometr*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	K	K	K	K	K	K						
<b>B</b>	100	50	25	12,5	6,25	3,125						
<b>C</b>	100	50	25	12,5	6,25	3,125						
<b>D</b>	100	50	25	12,5	6,25	3,125						
<b>E</b>	K	K	K	K	K	K						
<b>F</b>	100	50	25	12,5	6,25	3,125						
<b>E</b>	100	50	25	12,5	6,25	3,125						
<b>F</b>	100	50	25	12,5	6,25	3,125						

*Legenda: Do buněk A1 až D6 jsem přepipetoval obsah 48jamkové destičky GA. Do buněk E1 až F6 jsem přepipetoval obsah 48jamkové destičky EGCG.*

6. Všechna získaná data jsem vyhodnotil a porovnal.

## 10.4 Způsob hodnocení

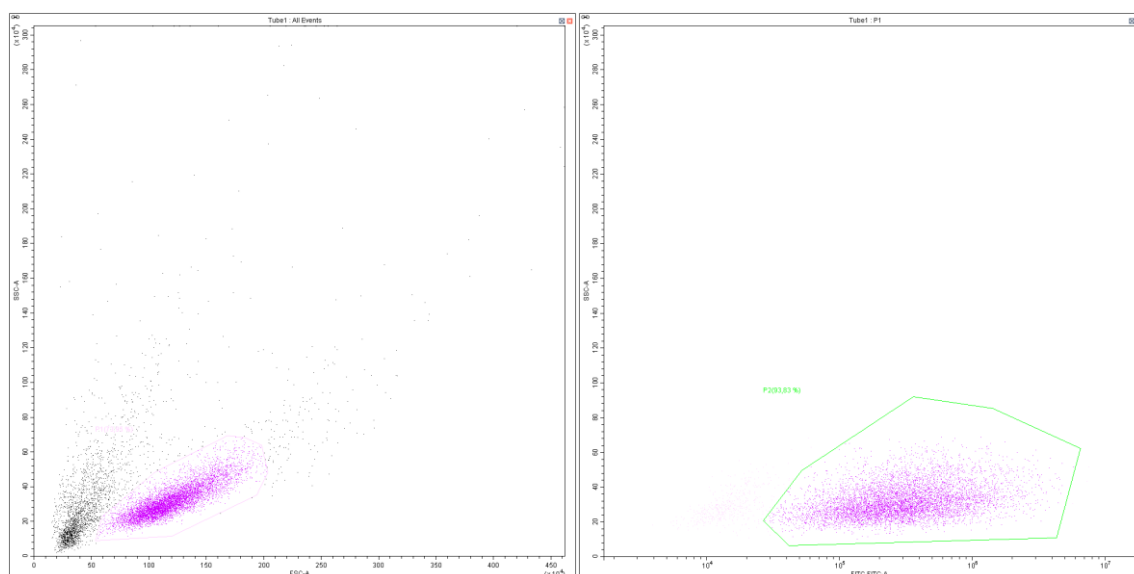
### 10.4.1 IncuCyte

Z dat o konfluenci buněk C1R, což je míra porůstání buněk vyjádřená v %, v prostředí GA a EGCG o různých koncentracích získaných průběžným měřením vzorků v IncuCyte jsem vytvořil grafy, na kterých je vidět průběh a intenzita konfluencie buněk C1R.

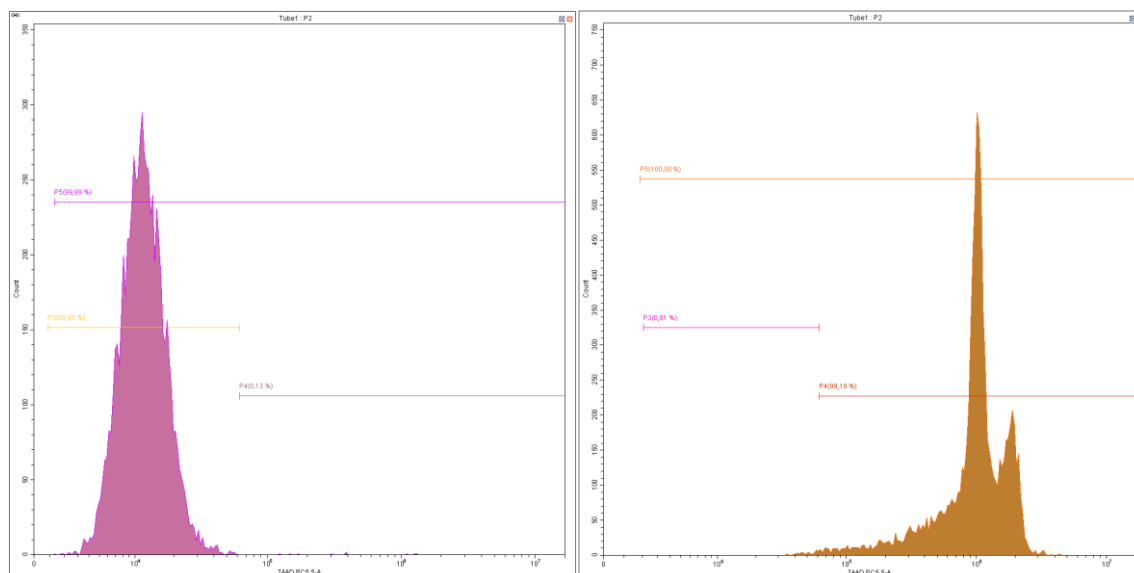
### 10.4.2 Průtoková cytometrie

Z dat získaných měření vzorků buněk C1R kultivovaných v přítomnosti roztoků GA a EGCG o různých koncentracích v CO<sub>2</sub> inkubátoru jsem pro hodnocení a porovnání s ostatními daty v této BP využil medián střední hodnoty intenzity fluorescence 7-AAD PC5, 5-A. Tato hodnota odráží míru přežívání buněk C1R v přítomnosti různě koncentrovaných roztoků GA a EGCG, a to tak, že čím více buněk přežívá, tím menší je hodnota mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence 7-AAD PC5, 5-A. (viz obr. 9). Histogram vlevo patří

kontrolnímu vzorku buněk C1R bez GA s jeho mediánem maxima 11430,7 7-AAD PC5, 5-A. V tomto případě buňky přežívají. Naproti tomu, histogram vpravo patřící vzorku buněk C1R se 100  $\mu$ M roztokem GA má medián maxima 878215,3 7-AAD PC5, 5-A a buňky jsou v tomto případě neživotaschopné.



Obrázek 8 Scattergramy gatovací strategie pro měření C1R se 7-AAD na průtokovém cytometru (GA QC)



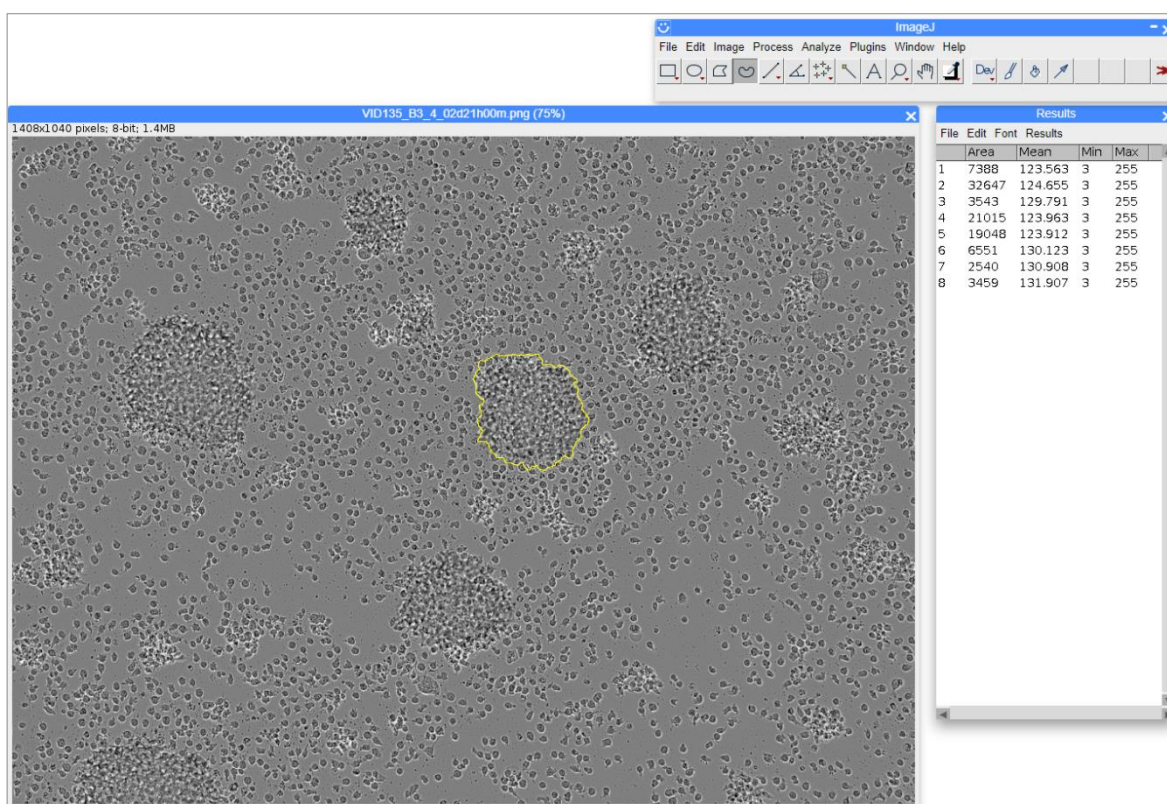
Obrázek 9 Histogramy intenzity fluorescence 7-AAD u vzorku C1R (GA QC – vlevo, GA 100  $\mu$ M – vpravo)

### 10.4.3 ImageJ

IncuCyte během svého měření každou jamku jednou v daném časovém intervalu vyfotí (v rámci této BP byla každá jamka se vzorkem 48jamkové destičky vyfocena na čtyři

zorná pole každé tři hodiny) a tyto snímky dále zpracovává, vyhodnocuje a ukládá. V rámci obou destiček tak během měření po dobu dvou dní a 21 hodin vzniklo tímto způsobem 1344 fotografií. Tyto fotografie jsem postupně nahrával do programu ImageJ (viz obr. 10), kde jsem jednotlivé buněčné klastry označoval, měřil jejich průměry a z průměrných hodnot těchto průměrů buněčných klastrů jsem následně vytvořil grafy. Ty znázorňují, jak se průměrně zvětšoval průměr jednotlivých buněčných klastrů C1R v přítomnosti roztoků GA a EGCG o různých koncentracích.

Z těchto dat jsem byl také schopný graficky znázornit procentuální míru inhibice růstu buněk C1R v přítomnosti roztoků GA a EGCG o různých koncentracích.



Obrázek 10 Náhled programu ImageJ s vyznačeným klastrem buněk C1R

#### 10.4.4 Korelace

Korelace popisuje vztah mezi dvěma náhodnými soubory znaků. Lze říct, že nám dává informaci o tom, jestli se při změně jednoho znaku jednoho souboru mění i příslušný znak souboru druhého. Pokud mezi těmito znaky vzniká korelace, jsou na sobě tyto znaky lineárně závislé. Výsledkem korelace je korelační koeficient  $R$ , který může nabývat hodnot od 1 do -1. V případě, kdy je korelační koeficient roven 0, oba soubory na sobě nejsou nijak lineárně závislé. Čím více se korelační koeficient blíží hodnotě 1, hovoříme o přímé lineární

závislosti, kdy zvýšení jednoho znaku zvýší i znak druhý, a naopak, čím více se korelační koeficient blíží hodnotě -1, jedná se o nepřímou závislost, kdy zvýšení jednoho znaku vede ke snížení druhého. Podle absolutní hodnoty korelace dělíme její sílu do pěti stupňů.

1.  $R = 0,01$  až  $0,19$  velmi slabá korelace
2.  $R = 0,20$  až  $0,39$  slabá korelace
3.  $R = 0,40$  až  $0,59$  střední korelace
4.  $R = 0,60$  až  $0,79$  silná korelace
5.  $R = 0,80$  až  $1,00$  velmi silná korelace

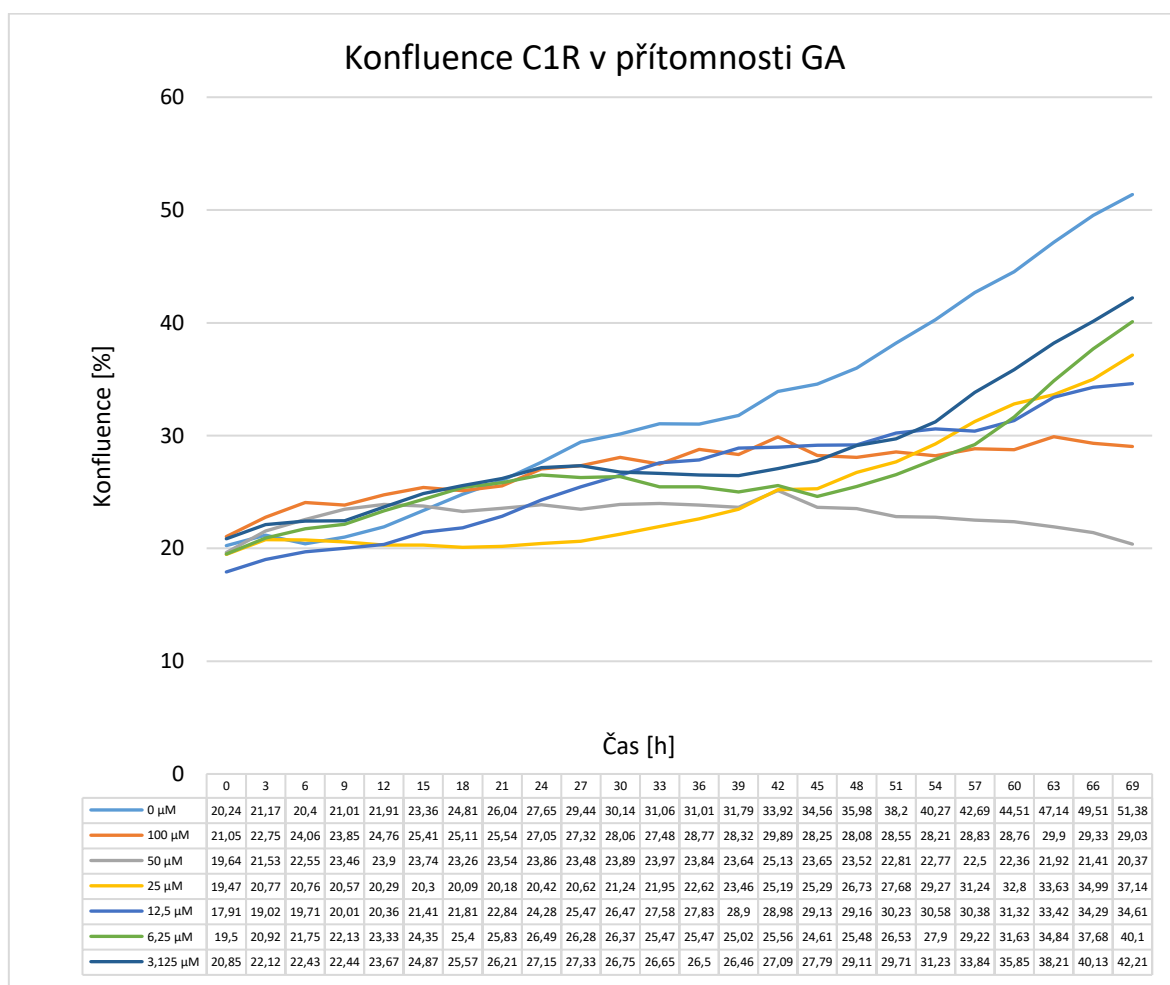
# 11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

## 11.1 Kyselina gallová

### 11.1.1 IncuCyte

Konfluencí je procentuální vyjádření toho, jakou plochu z celku zaujímá plocha buněk. V rámci měření konfluencí buněk C1R v přítomnosti GA vidíme (viz graf 1), že vysoké koncentrace GA (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) zpomalují nebo inhibují růst buněk C1R. S klesající koncentrací GA se konfluencí zvyšuje a nejvyšší je u vzorku s GA o  $c = 0 \mu\text{M}$ . V případě roztoku GA o  $c = 100 \mu\text{M}$  se konfluencí na konci měření zvýšila od začátku měření ve srovnání se zvýšením konfluencí buněk C1R ve vzorku bez GA o 24,68 %, u roztoku GA o  $c = 50 \mu\text{M}$  byl tento nárůst dokonce jen 2,43 %.

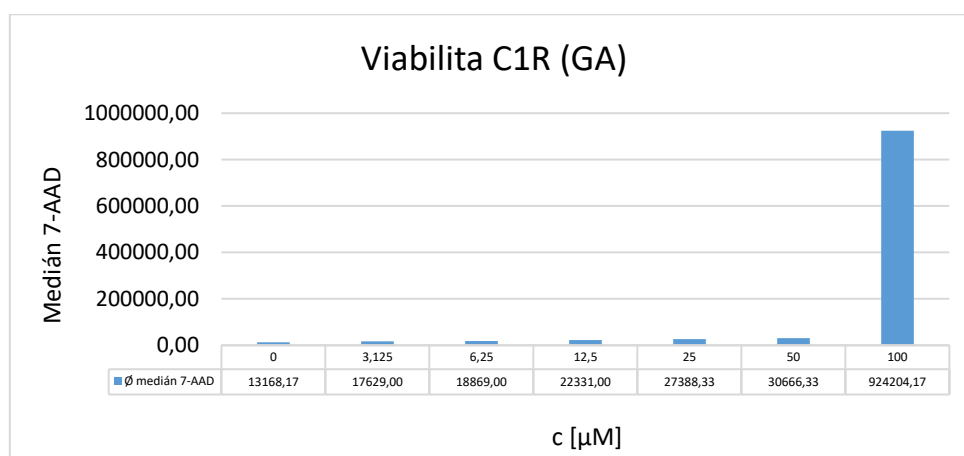
Graf 1 Konfluencí C1R v přítomnosti GA měřená přístrojem IncuCyte



### 11.1.2 Měření viability pomocí 7-AAD

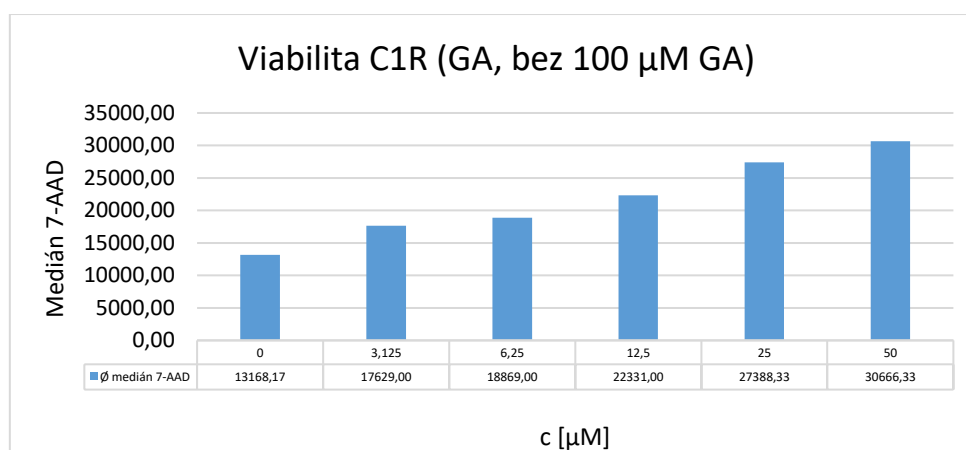
Viabilita se dá popsat jako schopnost buněk provádět základní biologické funkce, jako je růst a dělení, metabolismus a interakce s okolím. Proto, čím více je ve vzorku živých buněk, tím větší bude i viabilita tohoto vzorku. 7-AAD je látka se schopností vázat se na dsDNA, ale živé buňky schopné udržovat neporušenou buněčnou membránu dokážou tuto látku vylučovat a při měření průtokovým cytometrem nejsou, n rozdíl od buněk mrtvých, detekovány. Na grafu 2 je jasně patrná vysoká hodnota mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence 7-AAD PC5, 5-A u vzorku buněk C1R s roztokem GA o  $c = 100 \mu\text{M}$ . To ukazuje na vysokou úmrtnost buněk C1R v tomto vzorku.

Graf 2 Viabilita C1R v přítomnosti GA hodnocená podle mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence na průtokovém cytometru



Po odstranění vysoké hodnoty tohoto vzorku a při práci pouze se vzorky buněk C1R s roztoky GA o koncentracích  $0 \mu\text{M}$  až  $50 \mu\text{M}$  je vidět, že viabilita buněk stoupá s klesající koncentrací GA a nejnižší hodnoty dosahuje u kontroly s koncentrací GA  $0 \mu\text{M}$  (viz graf 3).

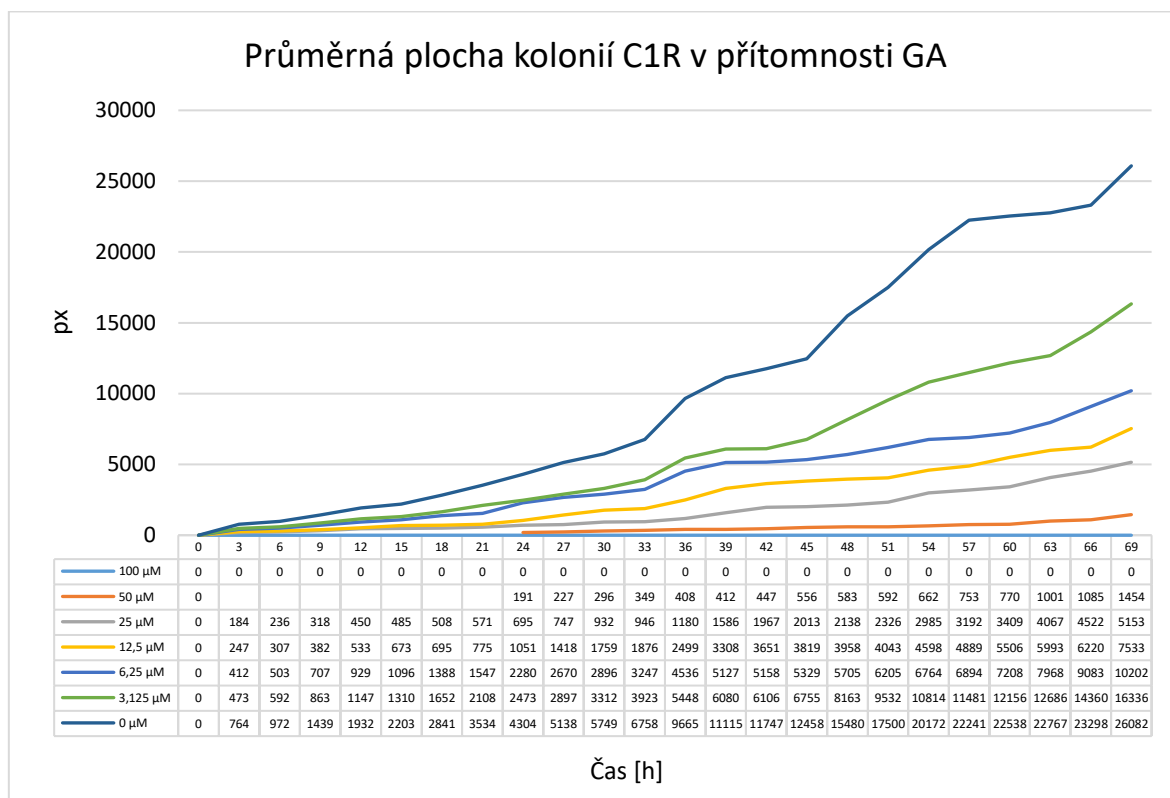
Graf 3 Viabilita C1R v přítomnosti GA hodnocená podle mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence na průtokovém cytometru (bez koncentrace  $100 \mu\text{M}$ )



### 11.1.3 Ruční měření buněčných klastřů

Ruční měření buněčných klastřů je poměrně subjektivní způsob zjišťování dat, jelikož v rámci fotek pořízených IncuCyte, s kterými bylo pracováno při tomto měření, je často velice obtížné rozlišit a vytyčit hranici mezi buněčným klastrem a jeho okolím.

Graf 4 Průměrná plocha kolonií C1R v přítomnosti GA měřená pomocí programu ImageJ



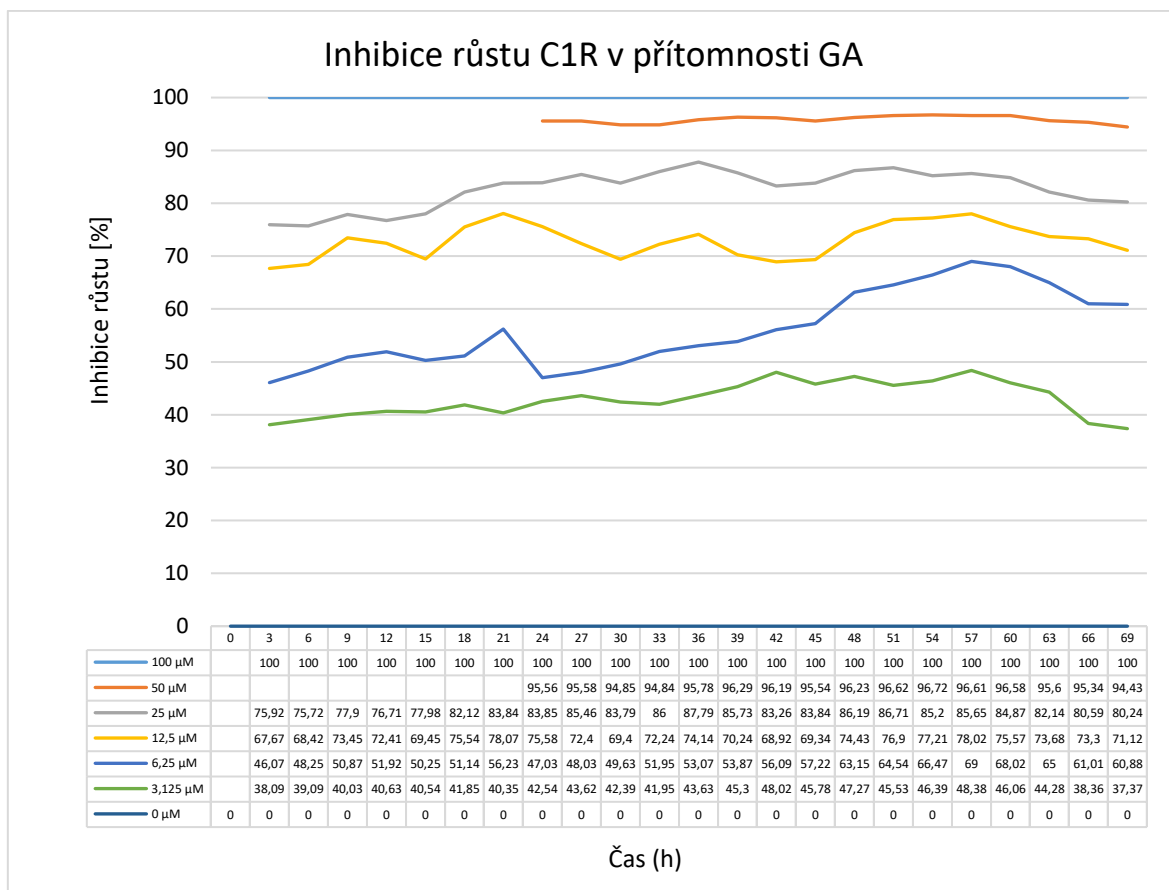
V grafu 4 vidíme rostoucí tendenci plochy klastřů buněk C1R u všech vzorků s výjimkou vzorku buněk C1R s roztokem GA o  $c = 100 \mu\text{M}$ , u kterého se viditelné buněčné klastry neobjevily po celou dobu dvou dní a 21 hodin měření. Z průběhu křivek zbylých vzorků vidíme, že se snižující koncentrací GA a přibývajícím časem roste plocha rostoucích buněčných klastřů. U vzorku buněk C1R s roztokem GA o  $c = 50 \mu\text{M}$  bylo možné hodnotit velikost klastřů z důvodu příliš malých hodnot, které jsem nebyl schopen zachytit pomocí této metody, až od 24. hodiny měření.

Ze získaných dat jsem pomocí vzorečku: *Inhibice růstu vzorku x s GA o koncentraci y v čase t = 100 - (100 ÷ plocha vzorku s GA o koncentraci 0 v čase t · plocha vzorku x s GA o koncentraci y v čase t [%]*,



získal data, která ukazují, jakou mírou inhibují roztoky GA o různých koncentracích růst (proliferaci) klastrů a celkově buněk C1R. Pomocí stejného vzorce jsem tento výpočet provedl i u vzorků s použitím EGCG.

Graf 5 Inhibice růstu C1R v přítomnosti GA vycházející z měření pomocí ImageJ [%]



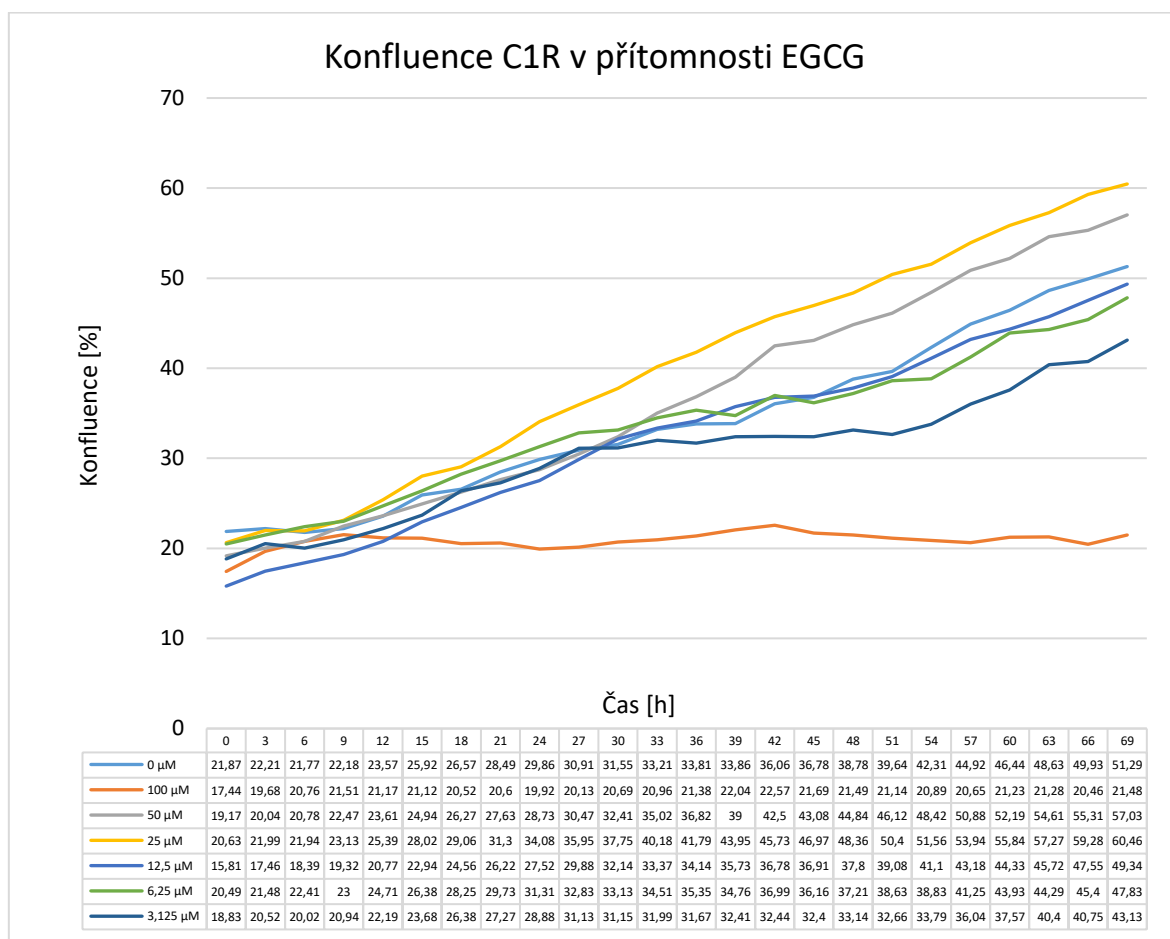
Z těchto dat a jejich grafického zobrazení v podobě grafu 5 je jasně vidět, že roztok GA o  $c = 100 \mu\text{M}$  inhibuje růst buněk C1R ze 100 %. Velice vysokou inhibiční aktivitu má také roztok GA o  $c = 50 \mu\text{M}$ , který inhibuje růst buněk C1R průměrně z 95,8 %. Průměrná inhibice růstu je průměrnou hodnotou jednotlivých hodnot inhibice v rámci dané koncentrace. Průměrnou inhibici růstu C1R nad 80% má ještě roztok GA o  $c = 25 \mu\text{M}$ , a to 82,7 %. Zbylé roztoky GA snižují inhibici se svoji snižující se koncentrací, avšak i roztok GA o  $c = 3,125 \mu\text{M}$  má průměrnou míru inhibice růstu buněk C1R 42,9 %.

## 11.2 Epigalokatechin galát

### 11.2.1 IncuCyte

Konfluenci buněk C1R v přítomnosti EGCG znázorňuje graf 6. Je zde jasně vidět vliv EGCG o  $c = 100 \mu\text{M}$ , která konfluenci buněk C1R potlačuje. Konfluencie ostatních vzorků s koncentrací EGCG od  $3,125 \mu\text{M}$  do  $50 \mu\text{M}$  se pohybují nad i pod konfluencí vzorku s EGCG o  $c = 0 \mu\text{M}$ . Vyšší konfluenci jeví vzorky s koncentrací EGCG  $50 \mu\text{M}$  a  $25 \mu\text{M}$ . Vzorky s koncentrací EGCG  $12,5 \mu\text{M}$ ,  $6,25 \mu\text{M}$  a  $3,125 \mu\text{M}$  mají konfluenci oproti vzorku s EGCG o  $c = 0 \mu\text{M}$  pouze mírně sníženou. V případě roztoku EGCG o  $c = 100 \mu\text{M}$  se konfluencie na konci měření zvýšila od začátku měření ve srovnání se zvýšením konfluencie buněk C1R ve vzorku bez EGCG o 17,22 %

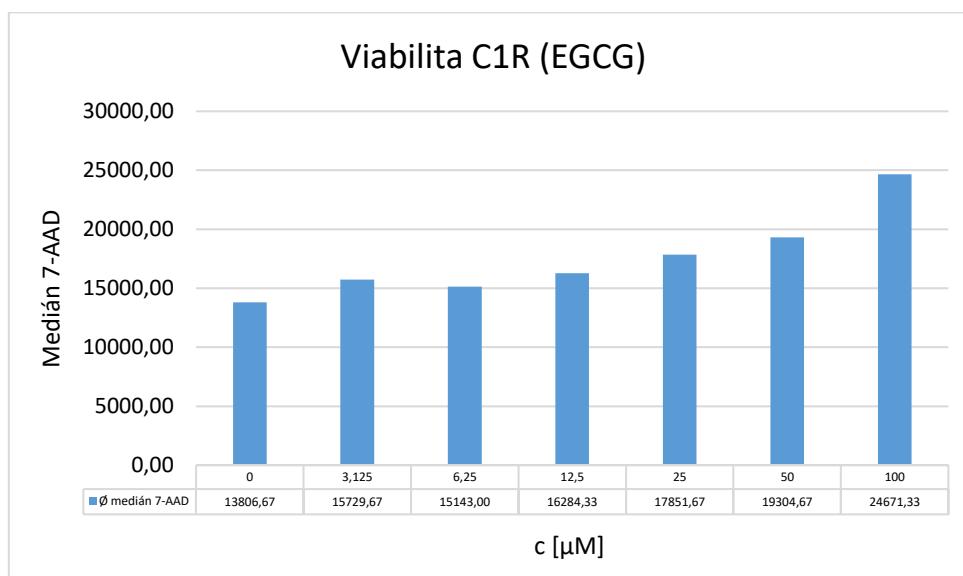
Graf 6 Konfluencie C1R v přítomnosti EGCG měřená přístrojem IncuCyte



### 11.2.2 Měření viability pomocí 7-AAD

Na grafu 7 vidíme stoupající tendenci mediánů středních hodnot intenzity fluorescence vzorků buněk C1R s roztoky EGCG, která roste se stoupající koncentrací EGCG. Pozorujeme výkyv u vzorku s EGCG o  $c = 3,125 \mu\text{M}$ .

Graf 7 Viabilita C1R v přítomnosti EGCG hodnocená podle mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence na průtokovém cytometru

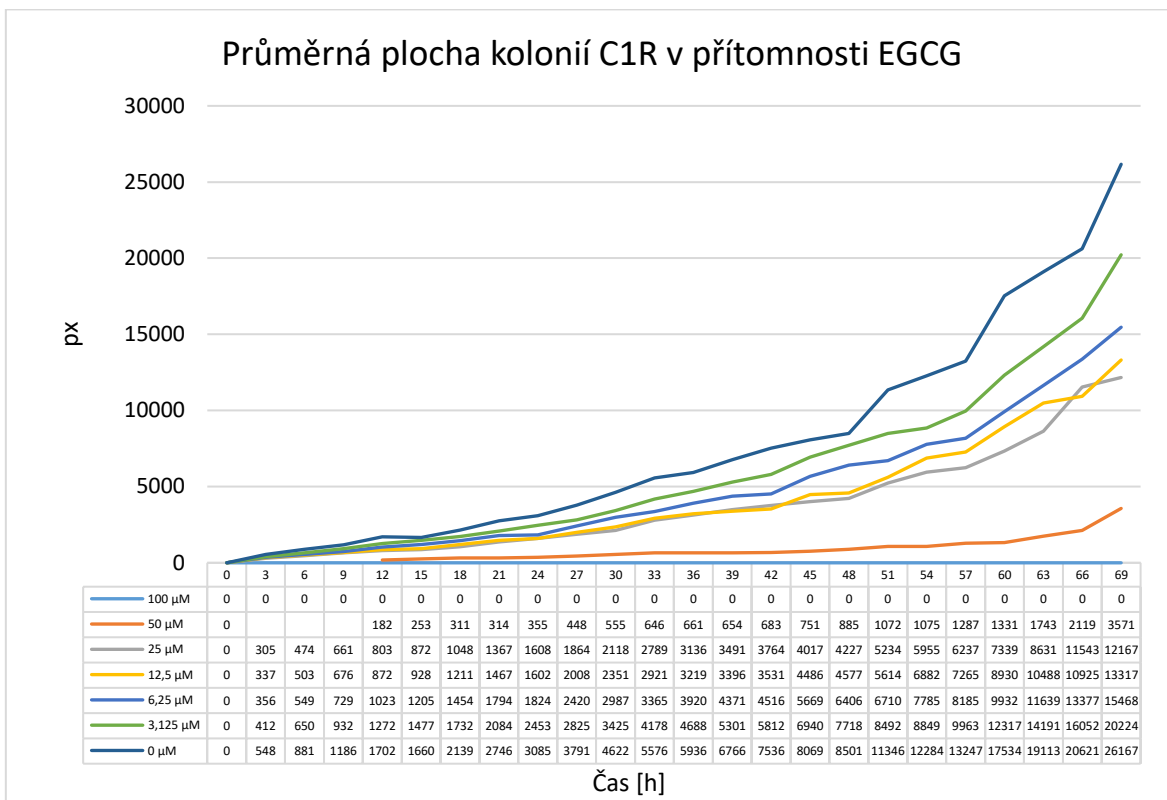


### 11.2.3 Ruční měření buněčných klastrů

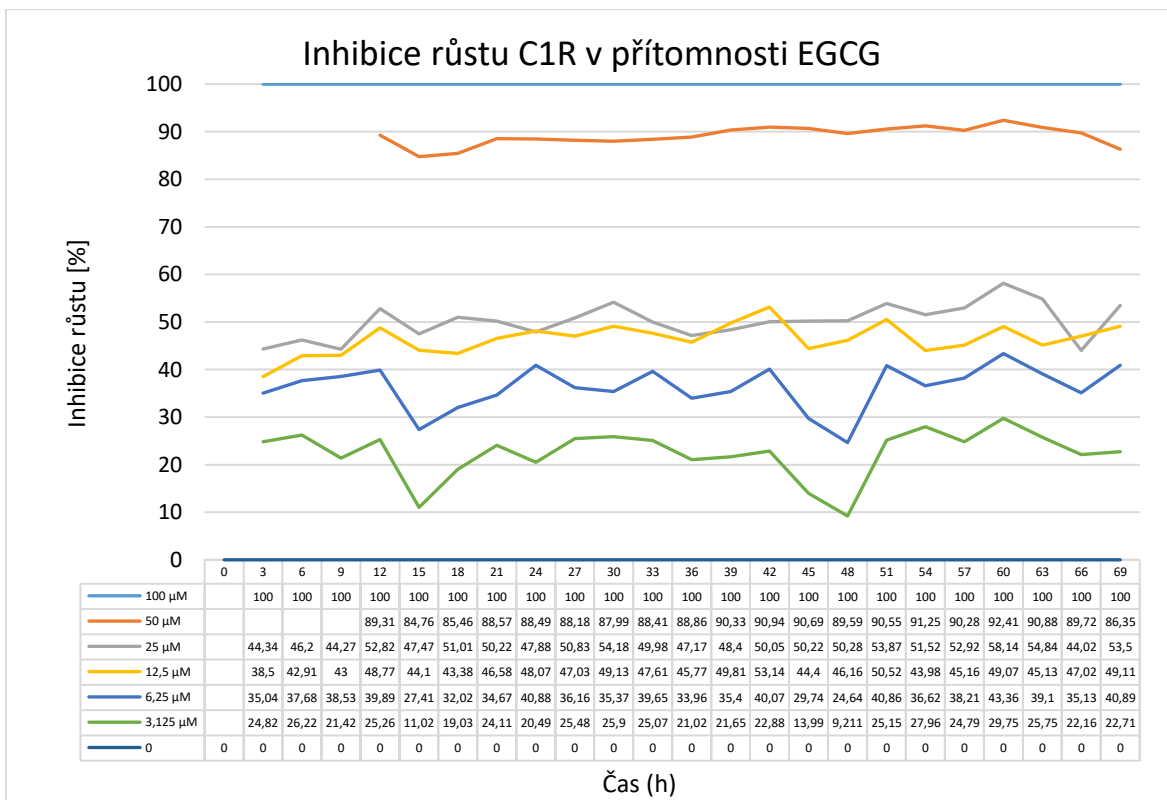
V grafu 8 vidíme rostoucí tendenci ploch buněčných klastrů C1R u všech vzorků s výjimkou vzorku s roztokem EGCG o  $c = 100 \mu\text{M}$ , u kterého se viditelné buněčné klastry neobjevily po celou dobu dvou dní a 21 hodin měření a dále u vzorku C1R s roztokem EGCG o  $c = 50 \mu\text{M}$ , kde významnější růst velikosti buněčných klastrů začíná až okolo 60. hodiny měření. U tohoto vzorku také bylo možné hodnocení velikosti buněčných klastrů z důvodu příliš malých hodnot, které jsem nebyl schopený touto metodou zaznamenat, až od 12. hodiny měření. Z průběhu křivek ostatních vzorků s koncentrací EGCG od  $0 \mu\text{M}$  do  $25 \mu\text{M}$  pozorujeme zvyšující se plochu buněčných klastrů C1R se snižující se koncentrací EGCG.

Roztok EGCG o  $c = 100 \mu\text{M}$  inhibuje růst buněk C1R ze 100 %. Vysokou inhibiční aktivitu má rovněž roztok EGCG o  $c = 50 \mu\text{M}$ , a to 89,2 %. To můžeme vidět na grafu 9. Průměrná inhibiční aktivita roztoku EGCG o  $c = 25 \mu\text{M}$  se pohybuje na hranici 50 % a zbylé koncentrace EGCG mají tuto inhibiční aktivitu nižší, kdy průměrná inhibiční aktivita EGCG o  $c = 3,125 \mu\text{M}$  je pouze 22,4 %.

Graf 8 Průměrná plocha kolonií C1R v přítomnosti EGCG měřená pomocí programu ImageJ



Graf 9 Inhibice růstu C1R v přítomnosti EGCG vycházející z měření pomocí ImageJ [%]



## 11.3 Korelace

### 11.3.1 IncuCyte x Průtoková cytometrie x ImageJ

Z výsledků korelací a korelačních koeficientů v tabulce 4 je patrné, že měřené a zjištěné hodnoty konfluency (IncuCyte), střední hodnoty intenzity fluorescence 7-AAD (průtoková cytometrie) a měření plochy klastrů (ImageJ) korelují vzájemně velmi silně u všech metod a v rámci zjišťování vlivu roztoků GA o různých koncentracích poskytují tyto metody velmi podobné výsledky. V rámci porovnání konfluency a plochy klastrů jde o velmi silnou přímou korelaci, ve zbylých dvou případech pak o velmi silné nepřímé korelace. Z důvodu vysoké hodnoty u FC 7-AAD nebyly výsledky GA o  $c = 100 \mu\text{M}$  do korelací započteny.

Tabulka 4 Korelace vlivu GA po inkubaci dvou dnů a 21 hodin na CIR

GA						
koncentrace	IncuCyte	Průtoková cytometrie (7-AAD)	IncuCyte	ImageJ	Průtoková cytometrie (7-AAD)	ImageJ
100	29,03338	924204,67	29,03338	0	924204,67	0
50	20,37	30666,33	20,37	1454	30666,33	1454
25	37,14099	27338,33	37,14099	5153	27338,33	5153
12,5	34,60744	22331	34,60744	7533	22331	7533
6,25	40,10354	18869	40,10354	10202	18869	10202
3,125	42,2115	17629	42,2115	16336	17629	16336
0	51,37535	13168,17	51,37535	26082	13168,17	26082
Korelační koeficient	IncuCyte X Průtoková cytometrie (7-AAD)		IncuCyte X ImageJ		Průtoková cytometrie X ImageJ	
	-0,912131507		0,904565969		-0,935019434	

Korelace v rámci měření EGCG (viz tabulka 5) nejsou již tak jasné, jelikož jediná velmi silná záporná korelace je mezi hodnotami střední hodnoty intenzity fluorescence 7-AAD (FC) a plochou klastrů (ImageJ), kde je korelační koeficient roven -0,91. Střední až silnou zápornou korelaci vidíme mezi konfluencí (IncuCyte) a průtokovou cytometrií s korelačním koeficientem -0,63. Slabá kladná korelace s korelačním koeficientem 0,37 se vyskytuje mezi výsledky měření konfluency a plochou klastrů buněk CIR.

Tabulka 5 Korelace vlivu EGCG po inkubaci dvou dnů a 21 hodin na CIR

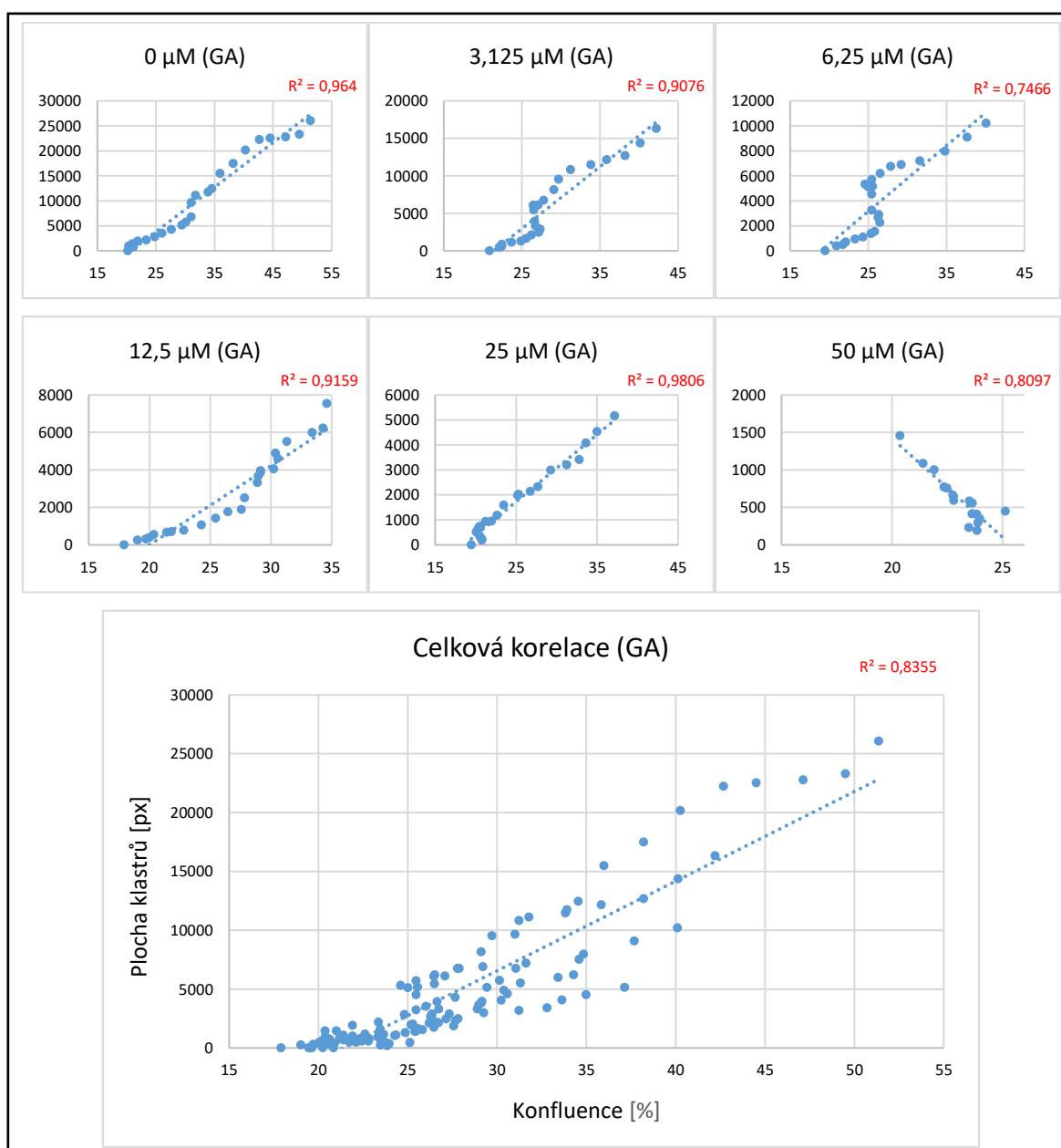
EGCG						
koncentrace	IncuCyte	Průtoková cytometrie (7-AAD)	IncuCyte	ImageJ	Průtoková cytometrie (7-AAD)	ImageJ
100	21,4783	24671,33	21,4783	0	24671,33	0
50	57,02732	19304,67	57,02732	3571	19304,67	3571
25	60,45753	17851,67	60,45753	12167	17851,67	12167
12,5	49,34036	16284,33	49,34036	13317	16284,33	13317
6,25	47,82644	15143	47,82644	15468	15143	15468
3,125	43,12568	15729	43,12568	20224	15729	20224
0	51,29333	13806	51,29333	26167	13806	26167
Korelační koeficient	IncuCyte X Průtoková cytometrie (7-AAD)		IncuCyte X ImageJ		Průtoková cytometrie X ImageJ	
	-0,629563764		0,372741837		-0,907473734	

## 11.3.2 IncuCyte x ImageJ

### 11.3.2.1 Kyselina Gallová

Korelace mezi konfluencí a velikostí buněčných klastrů C1R ovlivněných přítomností GA jsou graficky znázorněny v grafu 10. Velmi silnou korelaci vidíme u všech hodnot koncentrací GA vyjma koncentrace GA 6,25  $\mu\text{M}$ . Korelace GA o  $c = 50 \mu\text{M}$  je ovlivněna nezahrnutím výsledků v časech měření 0 až 21 hodin, kde nebylo možné získat výsledky pro velikost buněčných klastrů C1R. I z toho důvodu zde pozorujeme velmi silnou zápornou korelaci. Celková korelace je pak velmi silná pozitivní s  $R = 0,91$

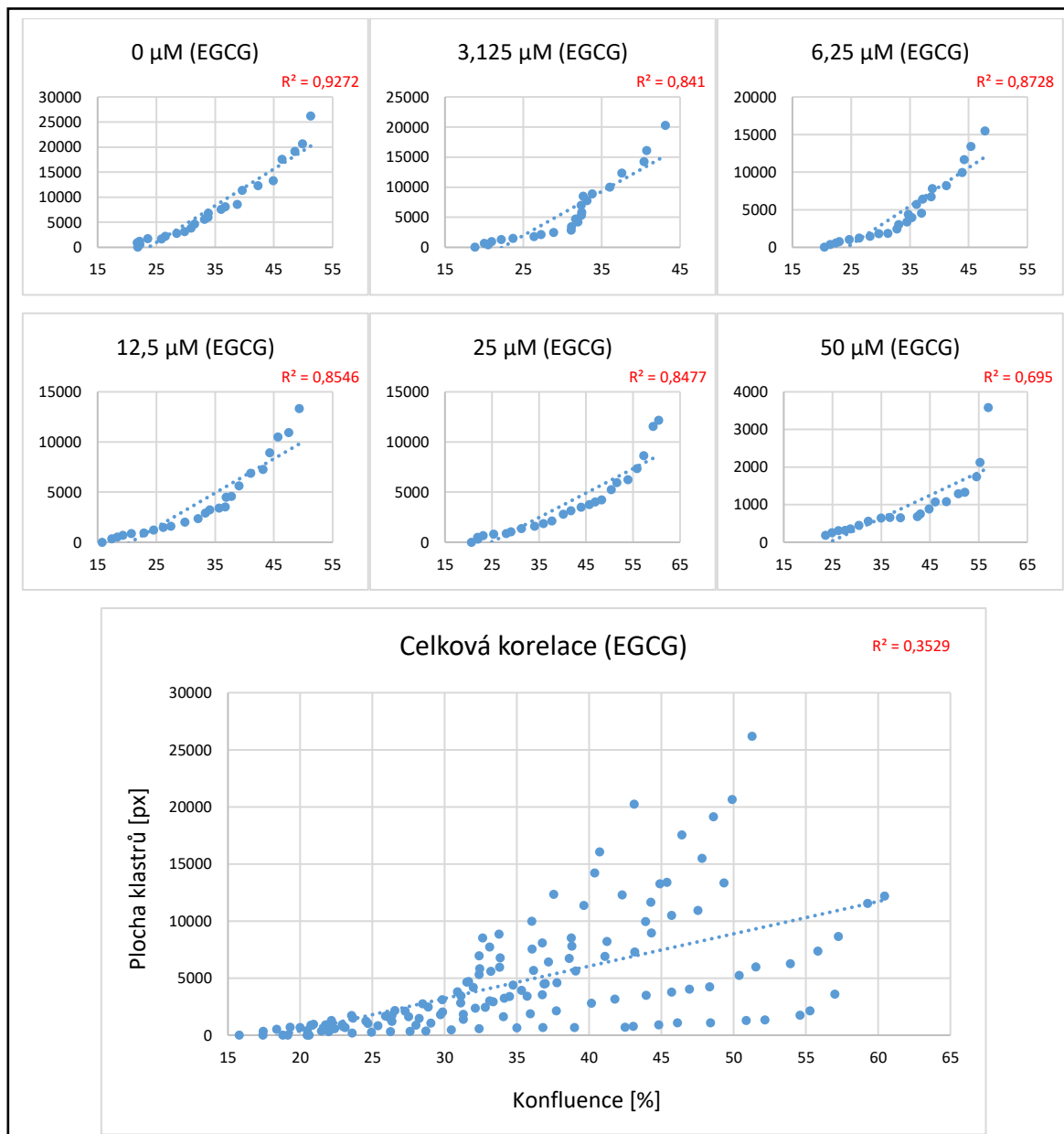
Graf 10 Grafické zobrazení korelací mezi konfluencí a plochou klastrů C1R u jednotlivých koncentrací GA vyjma GA,  $c = 100 \mu\text{M}$ , + celková korelace pro všechny koncentrace



### 11.3.2.2 Epigalokatechin galát

Korelace mezi konfluencí a velikostí buněčných klastrů C1R ovlivněných přítomností EGCG jsou graficky znázorněny v grafu 11. Velmi silnou pozitivní korelaci vidíme u všech hodnot koncentrací EGCG. Celková korelace s korelačním faktorem  $R = 0,59$  je pak střední až silná.

Graf 11 Grafické zobrazení korelací mezi konfluencí a plochou klastrů C1R u jednotlivých koncentrací EGCG vyjma GA,  $c = 100 \mu\text{M}$ , + celková korelace pro všechny koncentrace



## DISKUZE

Hlavním cílem praktické části bakalářské práce bylo ověřit, zda mají kyselina gallová a epigalokatechin galát vliv na proliferační aktivitu B-buněčné linie C1R. Na to se zaměřují první dvě výzkumné otázky. V rámci obou lze prohlásit, že jak kyselina gallová, tak i epigalokatechin galát, inhibují proliferační aktivitu B-buněčné linie C1R. Nejvyšší inhibiční aktivity na B-buněčnou linii C1R jevíly roztoky kyseliny gallové o koncentracích 50  $\mu\text{M}$  (konfluce 20,37 %, nárůst konfluce 2,43 % oproti vzorku buněk C1R bez kyseliny gallové) a 100  $\mu\text{M}$  (konfluce 29,03 %, nárůst konfluce 24,68 %). Nejvyšší inhibiční aktivitu na B-buněčnou linii C1R pak měl roztok epigalokatechin galátu o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  (konfluce 21,48 %, nárůst konfluce 17,22 %).

Yang a kol. <sup>(45)</sup> ve své studii zjišťovali synergický vliv kyseliny gallové při léčbě buněk maligního gliomu U87MG látkou temozolomid. Zjistili, že při vystavení obou látek došlo během 48 hodin ke snížení viability buněk U87MG na pouhých 30 %, avšak i použití pouze samotné kyseliny gallové vedlo po 48hodinové kultivaci ke snížení viability buněk U87MG na 68 % (50  $\mu\text{M}$ ) a 48 % (100  $\mu\text{M}$ ). Také zjistili, že použití samotné kyseliny gallové snižuje celkové množství buněk, zatímco kombinace kyseliny gallové a temozolomidu vede i k řadě poškození buněk, vzniku apoptických tělísek a membránových bublin. Toto působení připisují synergickému vlivu kyseliny gallové (100  $\mu\text{M}$ ) a temozolomidu, které ve vysokých koncentracích dokáží potlačit produkci Bcl-2 (což je antiapoptický protein) a tím zrušit lékovou rezistenci při léčbě. Nižší koncentrace nebo použití látek samotných ale produkci Bcl-2 v jejich práci nesnižovalo. Popsali také vliv kyseliny gallové na buněčný cyklus, kdy je kyselina gallová schopná zastavit dělení buněk v G1 fázi. Pozorovali i antioxidační účinky kyseliny gallové, která v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  snížila expresi ROS o 53,3 %. Mezi další mechanismy, které Yang a kol. popsali, patří aktivace p-38-MAPK, což vede k navození samotné apoptózy. To podporují i výsledky studie Wanga a kol. <sup>(46)</sup>, kteří došli k závěru, že kyselina gallová zvyšuje prostřednictvím intracelulární tvorby ROS protirakovinné účinky cis-platiny, což souvisí s aktivací mitochondriální apoptotické cesty v buňkách malobuněčného karcinomu plic H446. Zvýšení apoptózy a potlačení množení buněk nemalobuněčného karcinomu plic A549 pozorovali ve své studii i Zhang a kol. <sup>(47)</sup>, kteří tuto aktivitu připisují inhibici Bcl-2 jako následek synergického působení GA na cis-platinu. S jejich výsledky se shodují závěry mé práce a vysvětlují možné mechanismy působení kyseliny gallové na buňky C1R.



Další možné mechanismy působení kyseliny gallové na rakovinné buňky poskytuje studie Kima a kol. <sup>(48)</sup>. V ní se autoři zaměřili na možné mechanismy funkce kyseliny gallové analýzou transkriptomu pomocí veřejně dostupné databáze LINCS L1000, kdy porovnávali změny v profilech genové exprese indukované kyselinou gallovou se změnami způsobenými působením různých léků, a to na třech rakovinných buněčných liniích (A549: epiteliální karcinom plic, PC3: lidský adenokarcinom prostaty a MCF7: lidský karcinom prsu). Závěrem uvádí schopnost kyseliny gallové vázat se přímo na DNA polymerázu  $\beta$  a ribonukleosid-difosfát reduktázu coby hlavní cílové proteiny působení kyseliny gallové. Ta tak působí v drahách oprav DNA a při přežívání buněk závislých na p53. Mimo to ale kyselina gallová může působit i jinými mechanismy, kterými reguluje buněčnou proliferaci a přežívání, indukuje apoptózu, inhibuje angiogenezi a spouští oxidační stres. Tang a Cheung <sup>(49)</sup> pak ve svém článku přehledně ukazují seznam několika desítek mechanismů, kterými působí kyselina gallová na různé typy rakovin a buněčných linií. Zmíním z nich např. poškození a fragmentaci DNA, down-regulaci přežití Akt/mTOR cesty u tumorů jícnu, zvýšení exprese p53 u rakoviny prsu, down-regulaci Bcl-2 u neuroendokrinních typů rakoviny nebo pak inhibici BCR/ABL tyrosinkinázy u leukémií. Zatímco většina studií spojuje působení kyseliny gallové s apoptózou, Tang a Cheung ale dokazují, že je kyselina gallová schopná aktivovat i ferototické a nekroptické dráhy buněčné smrti přes mechanismy, které je ale zapotřebí popsat, jelikož nám dosud nejsou zcela známé.

Lewis a kol. <sup>(16)</sup> hodnotili vliv epigalokatechin galátu (EGCG) a suberoylanilid hydroxamové kyseliny (SAHA) na tripl-negativní karcinomy prsu. Obě látky byly schopné ovlivnit expresi onkogenů miR-221/222 a tumor supresorů, p27 a PTEN. Působením těchto látek také došlo u buněk ke snížení aktivity DNMT. Došlo ke snížení migrace triple-negativních buněk rakoviny prsu, omezení růstu a proliferace. Inhibici proliferace buněk C1R v přítomnosti EGCG ve své bakalářské práci pozorují také, což souhlasí i s výsledky Mirzi a kol. <sup>(15)</sup>, kteří ve své studii rovněž poukazují na schopnost EGCG a dalších přírodních látek snižovat množství DNMT a proteinů DNMT1, HDAC1 a MeCP2.

Wang a kol. <sup>(50)</sup> ve své studii zkoumali vliv EGCG na buněčné linie B-lymfomu Raji a Jeko-1. Prokázali schopnost EGCG indukovat inhibici růstu a apoptózu obou buněčných linií. Zjistili, že EGCG up-reguluje expresi mRNA Fas a Bax (titry proteinů Bax, aktivované kaspázy-3, -7, -8, -9 a PARP byly zvýšené) a down-reguluje Bcl-2, jehož proteinová hladina byla snížena. S ohledem na skutečnost, že Wang a kol. pracovali také s B-buněčnými liniemi, lze předpokládat, že mechanismy vlivu EGCG na buněčnou linii C1R, jejíž růst byl při

vysokých koncentracích EGCG inhibován, budou přinejmenším podobné. Obecně lze říct, že EGCG indukuje apoptózu jednak prostřednictvím vnitřních kapsázových drah (mitochondriálních), a pak také pomocí vnějších drah s využitím receptorů smrti, což jsou dvě hlavní cesty apoptózy. Další mechanismy působení EGCG popisují ve své práci Rahman a spol.<sup>(51)</sup>, kteří dosáhli synergického účinku EGCG a hydroxychavicolu (HC). Kombinace těchto dvou látek zastavila dělení buněk v S fázi buněčného cyklu a snížila celkovou migraci buněk 1321N1 a LN18. Došlo k down-regulaci procesu vedení axonů a metabolické dráhy. Apoptózu v buňkách 1321N1 a LN18 navozuje EGCG s HC také schopností poškozovat mitochondriální geny MT-CO3 a MT-RNR2. Sharifi-Rad a spol.<sup>(52)</sup> zjistili, že se EGCG podílí na modulaci cyklooxygenázy-2, oxidativního stresu a zánětu. Dále byl prokázán mechanismus působení EGCG založený na inhibici ERK1/2, p38 MAPK, NF-KB a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, stejně tak jako inhibice proteazomu a podílu na epigenetických mechanismech.

V rámci třetí výzkumné otázky jsem porovnával, jestli jsou výsledky získané měřením konfluency C1R pomocí IncuCyte shodné s výsledky hodnot mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence 7-AAD PC5, 5-A získanými průtokovou cytometrií.

Dospěl jsem k závěru, že výsledky měření vlivu kyseliny gallové na C1R pomocí IncuCyte velice silně záporně korelují ( $R = -0,91$ ) s výsledky získanými měřením na průtokovém cytometru. Toto tvrzení ale může narušit skutečnost, že do korelace nebyly začleněny výsledky v rámci koncentrace GA (100  $\mu\text{M}$ ), jelikož hodnota mediánu 7-AAD byla u této koncentrace enormně vysoká a při práci s těmito hodnotami se korelační koeficient  $R$  snížil na pouhých  $-0,34$ . To sice značí vysokou míru úmrtnosti buněk C1R v prostředí 100  $\mu\text{M}$  roztoku kyseliny gallové, ale zároveň vnáší chybu do tohoto porovnání.

Při porovnávání stejných parametrů výsledků při použití EGCG jsem dospěl k závěru, že mezi výsledky konfluency IncuCyte a mediánu fluorescence 7-AAD existuje záporná, středně silná až silná korelace s  $R = -0,63$ . Tato nižší hodnota  $R$  může být způsobena několika faktory, které by bylo vhodné v dalších pracích blíže prozkoumat. Zaprvé se jedná o fakt, že v rámci měření viability průtokovým cytometrem byly hodnoty mediánu střední hodnoty intenzity fluorescence 7-AAD podobné u vzorků s EGCG o koncentraci 0  $\mu\text{M}$ , 3,125  $\mu\text{M}$  a 6,25  $\mu\text{M}$ , a tato hodnota začala stoupat až u koncentrace EGCG 12,5  $\mu\text{M}$ . Tyto výsledky navíc zcela nesouhlasí s výsledky získanými pomocí IncuCyte, kde konfluency všech vzorků vyjma vzorku s EGCG o  $c = 100 \mu\text{M}$ , se pohybovala v rozmezí od 43,1 %

do 60,5 % (vzorek se 100  $\mu\text{M}$  roztokem EGCG dosahoval konfluence 21,5 %) a proto bych očekával mnohem větší rozdíl hodnot mediánu 7-AAD mezi koncentrací 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . Další anomálií, na kterou by bylo zapotřebí se více zaměřit, je skutečnost, že zatímco roztok EGCG o  $c = 100 \mu\text{M}$  podle očekávání prakticky zastavil růst buněk C1R a nízké koncentrace této látky měly na C1R pouze minimální inhibiční vliv, roztoky EGCG o  $c = 25 \mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  měly podle výsledků konfluence IncuCyte na buňky C1R opačný efekt a je možné, že EGCG v jisté koncentraci může pomáhat růstu buněk C1R. To však nepodporují žádné jiné mnou prostudované studie, a proto by bylo zajímavé této anomálii věnovat pozornost.

Zásadní rozdíl pro možnosti hodnocení ale představuje především skutečnost, že zatímco u výsledků konfluence získaných IncuCyte můžeme hodnotit vývoj, rychlost a dynamiku porůstání C1R v čase, u hodnocení viability pomocí hodnoty fluorescence 7-AAD pracujeme pouze s absolutní hodnotou na konci měření a pro stejné možnosti hodnocení v čase bychom museli nasazovat ohromné množství kultivačních desek.

Tato překážka odpadá u hodnocení vlivu GA, případně EGCG, na buňky C1R při ručním měření průměrné plochy kolonií C1R, kdy využíváme snímky pořízené pomocí IncuCyte. I přes to, že tato metoda poskytuje prakticky stejné výsledky jako IncuCyte a výsledky obou metod korelují, je časově velice zdouhavá, a s ohledem na subjektivnost měření a vnímání jednotlivých buněčných klastrů také nejspíš více nepřesná. Navíc, konfluence měřená přístrojem IncuCyte bere v potaz celkovou plochu porostlou buňkami C1R, zatímco u ručního měření v programu ImageJ je měřena pouze velikost klastrů, a ne celkové porůstání. To se ukázalo jako omezující faktor v případě využití vyšších koncentrací jak GA, tak EGCG, kdy z důvodu malých ploch klastrů nebylo možné v prvních hodinách měření plochy těchto klastrů programem ImageJ měřit.

## ZÁVĚR

Tato práce si kladla za hlavní cíl zjistit, jestli mají kyselina gallová a epigalokatechin galát vliv na proliferační potenciál B buněčné linie C1R. V rámci praktické části byly buňky C1R kultivovány a měřeny v přístroji IncuCyte pro zjištění jejich konfluence a dále pak také inkubovány a proměřeny průtokovým cytometrem s využitím látky 7-AAD pro zjištění míry viability buněk C1R. Získané výsledky byly použity pro generaci dalších dat v programu ImageJ a veškeré výsledky jednotlivých metod byly porovnány.

### Zjistili jsme:

1. Kyselina gallová inhibuje proliferační aktivitu buněk C1R ve vysokých koncentracích 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ .
2. Epigalokatechin galát inhibuje proliferační aktivitu buněk C1R při použití roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{M}$ .
3. Roztoky EGCG o koncentracích 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  se jeví jako neúčinné, a naopak růst buněk C1R podporovali.
4. Konfluence měřená přístrojem IncuCyte poskytuje stejné výsledky jako měření viability za využití průtokového cytometru a látky 7-AAD.
5. Výsledky konfluence naměřené přístrojem IncuCyte korelují s průměrnou plochou buněčných klastrů manuálně měřených v programu ImageJ.

Výsledky této práce mohou přispět k cílené chemoterapii nejen B-buněčné leukémie, a přispět k identifikaci mechanismů, kterými zkoumané polyfenoly působí na antiproliferační aktivitu nádorových buněk.

V rámci budoucího výzkumu považuji za přínosné zaměřit se na plné pochopení mechanismů, kterými GA a EGCG ovlivňují proliferační aktivitu buněk C1R. V rámci výzkumu, především pak GA, je vhodné zaměřit se kromě apoptózy i na jiné mechanismy buněčné smrti, a tyto mechanismy objasnit a zjistit možnosti jejich použití v praxi. Zároveň je žádoucí zaměřit se na objevování a výzkum dalších látek, se kterými mohou GA a EGCG působit synergicky během léčby. S ohledem na antiproliferační vliv GA a EGCG na buňky C1R in-vitro by bylo vhodné navrhnout experiment se zvířecími modely a působení GA a EGCG ověřit in-vivo.

## SEZNAM LITERATURY

1. **JANG, Ji-Hoon** and Tae-Jin Lee. Mechanisms of Phytochemicals in Anti-Inflammatory and Anti-Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(9):7863. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/ijms24097863> [citováno 2024-01-05]
2. **RUDZIŃSKA, Anna**, Pola Juchaniuk, Jakub Oberda, Jolanta Wiśniewska, Witold Wojdan, Katarzyna Szklener, and Sławomir Mańdziuk. Phytochemicals in Cancer Treatment and Cancer Prevention—Review on Epidemiological Data and Clinical Trials. *Nutrients*. 2023; 15(8):1896. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/nu15081896> [citováno 2024-01-05]
3. **RUSSO, Giorgio Ivan**, Daniele Campisi, Marina Di Mauro, Federica Regis, Giulio Reale, Marina Marranzano, Rosalia Ragusa, Tatiana Solinas, Massimo Madonia, Sebastiano Cimino, and et al. Dietary Consumption of Phenolic Acids and Prostate Cancer: A Case-Control Study in Sicily, Southern Italy. *Molecules*. 2017; 22(12):2159. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/molecules22122159> [citováno 2024-01-06]
4. **ROMANOS-Nanclares, A.**, Sánchez-Quesada, C., Gardeazábal, I., Martínez-González, M. Á., Gea, A., & Toledo, E. Phenolic Acid Subclasses, Individual Compounds, and Breast Cancer Risk in a Mediterranean Cohort: The SUN Project. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2020; 120(6), 1002–1015.e5. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jand.2019.11.007> [citováno 2024-01-06]
5. **National Center for Biotechnology Information**. PubChem Annotation Record for, GALLIC ACID. *Hazardous Substances Data Bank (HSDB)*. 2024. Online. Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/2117> [citováno 2024-01-07]
6. **National Center for Biotechnology Information**. PubChem Compound Summary for CID 370, Gallic Acid. *PubChem*. 2024. Online. Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-Acid> [citováno 2024-01-07]
7. **ChemSpider**. Search and share chemistry. Gallic Acid. © *Royal Society of Chemistry 2024*. 2024. Online. Dostupné na: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.361.html> [citováno 2024-01-07]
8. **Phenol-Explorer**. Showing polyphenol metabolite Gallic acid. *Phenol-Explorer*. 2015. Online. Dostupné na: <http://phenol-explorer.eu/metabolites/413> [citováno 2024-01-07]
9. **CHEN, Shen**, Xiaojing Wang, Yu Cheng, Hongsheng Gao, and Xuehao Chen. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules*. 2023; 28(13):4982. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/molecules28134982> [citováno 2024-01-07]
10. **National Center for Biotechnology Information**. PubChem Compound Summary for CID 65064, Epigallocatechin Gallate. *PubChem*. 2024. Online. Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epigallocatechin-Gallate> [citováno 2024-01-07]
11. **Phenol-Explorer**. Showing dietary polyphenol (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate. *Phenol-Explorer*. 2015. Online. Dostupné na: <http://phenol-explorer.eu/compounds/129> [citováno 2024-01-07]
12. **IBRAHIM, Y.M.**, Aminu Musa, Yakasai I.A. Spectrophotometric Method for Determination of Catechins in Green Tea and Herbal Formulations. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*, March, 2017, Vol. 16 No.1, P25-30, ISSN: 0189-823X. Dostupné na: <https://www.researchgate.net/publication/321194556> [citováno 2024-01-07]
13. **HMDB**. Showing metabocard for Epigallocatechin gallate (HMDB0003153). *the Human Metabolome Database*. Online. Dostupné na: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003153> [citováno 2024-01-07]
14. **LEGEAY, Samuel**, Marion Rodier, Laetitia Fillon, Sébastien Faure, and Nicolas Clere. Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2015; 7(7):5443-5468. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/nu7075230> [citováno 2024-01-07]
15. **MIRZA S.**, Sharma G., Parshad R., Gupta S.D., Pandya P., Ralhan R. Expression of DNA Methyltransferases in Breast Cancer Patients and to Analyze the Effect of Natural Compounds on DNA Methyltransferases and Associated Proteins. *Journal of Breast Cancer*. 2013 Mar;16(1):23-31. Dostupné na: <https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.1.23> [citováno 2024-01-07]
16. **LEWIS, Kayla A.**, Harrison R. Jordan, and Trygve O. Tollefsbol. Effects of SAHA and EGCG on Growth Potentiation of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancers*. 2019; 11(1):23. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/cancers11010023> [citováno 2024-01-07]

17. **LECUMBERRI, Elena**, Yves Marc Dupertuis, Raymond Miralbell, Claude Pichard. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy. *Clinical Nutrition*. 2013; 32(6):P894-903. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.03.008> [citováno 2024-01-07]
18. **IMTIAZ A. Siddiqui**, Vaqar M. Adhami, Dhruba J. Bharali, Bilal B. Hafeez, Mohammad Asim, Sabih I. Khwaja, Nihal Ahmad, Huadong Cui, Shaker A. Mousa, Hasan Mukhtar. Introducing Nanochemoprevention as a Novel Approach for Cancer Control: Proof of Principle with Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate. *Cancer Research*. 2009; 69(5):1712–1716. Dostupné na: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3978> [citováno 2024-01-07]
19. **ChemSpider**, Search and share chemistry. (-)-Epigallocatechin gallate. © *Royal Society of Chemistry* 2024. 2024. Online. Dostupné na: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58575.html> [citováno 2024-01-07]
20. **SCHWALFENBERG G.**, Genuis S.J., Rodushkin I. The Benefits and Risks of Consuming Brewed Tea: Beware of Toxic Element Contamination. *Journal of Toxicology*. 2013; ID 370460. Dostupné na: <https://doi.org/10.1155/2013/370460> [citováno 2024-01-13]
21. **ŠEBEK, Jaroslav**, Buněčné kultury v medicíně. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-380-7.
22. **ČINÁTL, Jaroslav** a Miloš Novák, Tkáňové a buněčné kultury, příprava a pěstování. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, n. p., 1968. ISBN 08-035-08/6
23. **BAUER, Jan**, Viera Bajčiová, Ivana Krajsová, Aleš Ryška, Blanka Říhová, Marek Šťastný a Jan Uhlíř, Imunologie a imunoterapie nádorů. Praha: Mladá fronta a. s., 2018. ISBN 978-80-204-4944-3.
24. **HOŘEJŠÍ, Václav**, Jiřina Bartůňková, Tomáš Brdička a Radek Špišek, Základy imunologie, 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – TRIRON, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
25. **BARTŮŇKOVÁ, Jiřina**, Milan Paulík a kolektiv, Vyšetřovací metody v imunologii, 2., přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
26. **KREJSEK, Jan**, Ctirad Andrys, Irena Krčmová, Imunologie člověka, 1. vydání. Hradec Králové: Garamon s.r.o., 2016. ISBN 978-80-86472-74-4.
27. **POSPÍŠILOVÁ, Šárka**, Dana Dvořáková, Jiří Mayer et al., Molekulární hematologie, 1. vydání. Praha: Galén, 2016. ISBN 978-80-7262-942-8.
28. **CHAPEL, Helen**, Mansel Haeney, Siray Misbah, Neil Snowden; přeložil Vojtěch Thon., Základy klinické imunologie: 6. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – TRITON, 2018. ISBN 978-80-7553-396-8.
29. **ZEMMOUR, J.**, Little A.M., Schendel D.J., Parham P., The HLA-A,B “negative” mutant cell line C1R expresses a new novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *The Journal of Immunology*. 1992; 148(6): 1941–1948. Dostupné na: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.148.6.1941> [citováno 2024-01-16]
30. **Culture Collections**. C1R. *UK Health Security Agency*. Online. Dostupné na: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/c1r> [citováno 2024-01-16]
31. **NIENS, Marijke**, Ruth F. Jarrett, et. al., HLA-A\*02 is Associated with a reduced risk and HLA-A\*01 with an increased risk of developong ABV<sup>+</sup> Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2007; 110(9):3310–3315. Dostupné na: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-086934> [citováno 2024-01-16]
32. **VILLEMEGNE, Bruno**, Jacques-Olivier Bay, Olivier Taumilhac, et. al. Two new cases of familial hairy cell leukemia associated with HLA haplotypes A2, B7, Bw4, Bw6. *National Library of Medicine*. 2005; 46(2): 243–5. PMID: 15621808. DOI: 10.1080/10428190400013589 [citováno 2024-01-16]
33. **ALEJANDRO, Rosas-Cabral**, Lourdes Irigoyen, Lilia Alvarado, et. al., HLA CW3 and HLA CW4 have a protective effect on acquisition of chronic myeloid leukemia on Mexican patients. *Rev Invest Clin*. 2003; 55(4):423–8. PMID: 14635607. [citováno 2024-01-16]
34. **ENGEL, Pablo**, Laurence Boumsell, Robert Balderas et. al., CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*. 2015; 195(10):4555–63. DOI: 10.4049/jimmunol.1502033 [citováno 2024-01-17]
35. **SCHEUERMANN, R.H.**, E. Racila, CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk Lymphoma*. 1995; 18(5-6):385-97. DOI: 10.3109/10428199509059636. [citováno 2024-01-17]

36. **HCDM**. Responsible for HLDA Workshops & CD Molekules. Molecule Information – CD19. *Human Cell Differentiation Molecules*, Copyright © 2016. Online. Dostupné na: <https://www.hcdm.org/index.php/molecule-information> [citováno 2024-01-17]
37. **WANG, K.**, Wei, G. & Liu, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* 1. 36 (2012). Dostupné na: <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-36> [citováno 2024-01-17]
38. **BURMESTER, Gerd-Rürig**, Antonio Pezzutto, Color Atlas of Immunology. *New York: Thieme*, 2003. ISBN: 3-13-126741-0 [citováno 2024-01-18]
39. **ECKSCHLANGER, Tomáš** a kolektiv, Průtoková cytometrie v klinické praxi. Praha: *Grada*, 1999. ISBN 80-7169-279-4 [citováno 2024-01-18]
40. **Exbio**, 7-AAD Viability Staining Solution, © 2019 *EXBIO Praha, a.s.* Online. Dostupné na: <https://www.exbio.cz/research-product/accessory-reagents/dna-binding-probes/7-aad-viability-staining-solution> [citováno 2024-01-18]
41. **Fermentek**, 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), *All rights reserved 2023* ©, FERMENTEK Ltd. Online. Dostupné na: <https://www.fermentek.com/product/7-aad-7-aminoactinomycin-d> [citováno 2024-01-18]
42. **SNITSAREV, Vladislav**, Michael N. Young, Ross M. S. Miller, David P. Rotella. The spectral properties of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) fluorescence in different solvents: dependence on solvent polarity. *PLoS One*. 2013 Nov 22;8(11):e79834. DOI: 10.1371/journal.pone.0079834 [citováno 2024-01-22]
43. **SARTORIUS**. High impact innovation for over twenty years. © 2024 *Essen BioScience*. Online. Dostupné na <https://www.essenbioscience.com/en/about/timeline/> [citováno 2024-01-22]
44. **SARTORIUS**. Live-Cell Analysis Handbook, A Guide to Real-Time Live-Cell Imaging and Analysis. Sixth Edition. 2022. © 2024 *Essen BioScience*. Dostupné na: <https://www.sartorius.com/en/products/live-cell-imaging-analysis> [citováno 2024-01-22]
45. **YANG, J.-T.**; Lee, I.-N.; Chen, C.-H.; Lu, F.-J.; Chung, C.-Y.; Lee, M.-H.; Cheng, Y.-C.; Chen, K.-T.; Peng, J.-Y.; Chen, C.-H. Gallic Acid Enhances the Anti-Cancer Effect of Temozolomide in Human Glioma Cell Line via Inhibition of Akt and p38-MAPK Pathway. *Processes* 2022, 10, 448. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/pr10030448> [citováno 2024-03-01]
46. **WANG R.**, Ma L, Weng D, Yao J, Liu X and Jin F: Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *Oncol Rep* 35: 3075-3083, 2016, Dostupné na: <https://doi.org/10.3892/or.2016.4690> [citováno 2024-03-01]
47. **ZHANG T.**, Ma L, Wu P, Li W, Li T, Gu R, Dan X, Li Z, Fan X, Xiao Z, Xiao Z, et al: Gallic acid has anticancer activity and enhances the anticancer effects of cisplatin in non-small cell lung cancer A549 cells via the JAK/STAT3 signaling pathway. *Oncol Rep* 41: 1779-1788, 2019. Dostupné na: <https://doi.org/10.3892/or.2019.6976> [citováno 2024-03-02]
48. **KIM, J.**; Kim, B.K.; Moh, S.H.; Jang, G.; Ryu, J.Y. Investigation of the General Molecular Mechanisms of Gallic Acid via Analyses of Its Transcriptome Profile. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 2303. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/ijms25042303> [citováno 2024-03-03]
49. **TANG HM**, Cheung PCK. Gallic Acid Triggers Iron-Dependent Cell Death with Apoptotic, Ferroptotic, and Necroptotic Features. *Toxins* (Basel). 2019 Aug 26;11(9):492. doi: 10.3390/toxins11090492. PMID: 31455047; PMCID: PMC6783835. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6783835/> [citováno 2024-03-05]
50. **WANG J.**, Xie Y, Feng Y, Zhang L, Huang X, Shen X and Luo X: (-)-Epigallocatechingallate induces apoptosis in B lymphoma cells via caspase-dependent pathway and Bcl-2 family protein modulation. *Int J Oncol* 46: 1507-1515, 2015. Dostupné na: <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2869> [citováno 2024-03-05]
51. **RAHMAN A. Abdul**, Wan Ngah WZ, Jamal R, Makpol S, Harun R and Mokhtar N, Inhibitory Mechanism of Combined Hydroxychavicol With Epigallocatechin-3-Gallate Against Glioma Cancer Cell Lines: A Transcriptomic Analysis. *Front. Pharmacol.* 13:844199, 2022. doi: 103389/fphar.2022.844199. Dostupné na: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.844199> [citováno 2024-03-06]
52. **SHARIFI-RAD, M.**; Pezzani, R.; Redaelli, M.; Zorzan, M.; Imran, M.; Ahmed Khalil, A.; Salehi, B.; Sharopov, F.; Cho, W.C.; Sharifi-Rad, J. Preclinical Activities of Epigallocatechin Gallate in Signaling Pathways in Cancer. *Molecules* 2020, 25, 467. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/molecules25030467> [citováno 2024-03-06]