



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNologiÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

CYTOTOXICITA VYBRANÝCH NAFTOCHINONŮ NA PROSTATICKÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH

CYTOTOXICITY OF SELECTED NAPHTHOQUINONES ON PROSTATIC CELL CULTURES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

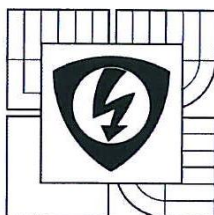
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. VĚRA MONDEKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Student: Bc. Věra Mondeková

ID: 115107

Ročník: 2

Akademický rok: 2012/13

NÁZEV TÉMATU:

Cytotoxicita vybraných naftochinonů na prostatických buněčných liniích

POKyny PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostudujte problematiku cytotoxicity a obvykle sledovaných parametrů prostatických buněčných linií. 2) Navrhněte aplikaci metod stanovení cytotoxicity vybraných naftochinonů plumbaginu a juglonu na prostatických buněčných liniích. 3) Navrhněte experimentální protokoly a vyberte parametry, které budou měřeny či sledovány (buněčné a jaderné změny, fragmentace DNA, apoptóza). 4) Proveďte experimenty založené na fluorescenční mikroskopii (jaderná struktura, fragmentace DNA, reaktivní formy kyslíku). 5) Vyhodnoťte výsledky ve formě uceleného souboru informací o cytotoxicitě zvolených látek a na základě získaných poznatků spolu s literaturou navrhněte mechanismus jejich účinku. 6) Výsledky diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] BABULA, P., ADAM, V., HAVEL, L., KIZEK, R. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones - their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. Current Pharmaceutical Analysis. 2009, roč. 5, č. 1, s. 47-68.
[2] BABULA, P., ADAM, V., KIZEK, R., SLADLY, Z., HAVEL, L. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. Environmental and Experimental Botany. 2009, roč. 65, č. 2-3, s. 330-337.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 24.5.2013

Vedoucí práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce:


prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

předseda oborové rady



UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Abstrakt: Tato diplomová práce pojednává o cytotoxicitě vybraných naftochinonů na prostatických buněčných liniích. Úvodní část je věnována obecné charakteristice naftochinonů se zaměřením na jejich cytotoxicitu, testování a mechanismy cytotoxicity. Dále navazují kapitoly o cytotoxicitě, charakteristice a hlavně biologické aktivitě vybraných naftochinonů plumbaginu a naftazarinu. Poslední část teoretického oddílu je věnována fluorescenční mikroskopii a jejímu využití při zkoumání cytotoxicity naftochinonů. Praktická část této práce se zabývá vyhodnocením výsledků cytotoxických testů a analýzou snímků buněk linií PC3 a PNT1A získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. V závěru práce jsou všechny poznatky shrnuty a dány do souvislosti.

Klíčová slova: naftochinony, plumbagin, naftazarin, buněčné linie, fluorescenční mikroskopie, PC3, PNT1A, segmentační metoda rozvodí, metoda rozvodí kontrolovaná markery

Abstract: This master's thesis discusses cytotoxicity of selected naphthoquinones on prostatic cell cultures. The introductory part is dedicated to general characteristic of naphthoquinones with focus on their cytotoxicity, testing of cytotoxicity and mechanisms of cytotoxicity. This part is followed by chapters about cytotoxicity, characteristics and biological activities of selected naphthoquinones; plumbagin and naphthazarin. The last part of this thesis' theoretical section speaks about fluorescence microscopy and its use in research of naphthoquinones cytotoxicity. The practical part is dedicated to evaluation of cytotoxic tests' results and to analysis of pictures of cells obtained by fluorescence microscope. At the end of thesis, all findings are summarized and put in the context.

Keyword: naphthoquinones, plumbagin, naphthazarin, cell cultures, fluorescence microscopy, PC3, PNT1A, watershed segmentation, marker-controlled watershed segmentation

MONDEKOVÁ, V. *Cytotoxicita vybraných naftochinonů na prostatických buněčných liniích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 101 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Dedikace

Experimentální část této diplomové práce byla podpořena v rámci projektu Evropského fondu pro regionální rozvoj FNUSA-ICRC CZ.1.05/1.1.00/02.0123.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma *Cytotoxicita vybraných naftochinonů na prostatických buněčných liniích* vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne

.....

podpis autora

Poděkování

Velice děkuji vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Ivo Provazníkovi, CSc. za účinnou pedagogickou pomoc a rady ohledně segmentace. Dále pak děkuji RNDr. Michalu Masaříkovi, Ph.D. za pomoc s cytotoxickými testy a také děkuji Doc. RNDr. Jaromíru Baštinci, CSc. za rady ohledně statistiky.

V Brně dne

.....

podpis autora

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK.....	13
ÚVOD.....	14
1 NAFTOCHINONY.....	15
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	15
1.2 BIOSYNTÉZA NAFTOCHINONŮ.....	15
1.2.1 <i>Cesty biosyntézy</i>	16
2 CYTOTOXICITA NAFTOCHINONŮ.....	18
2.1 BUNĚČNÉ LINIE	18
2.2 ROZDĚLENÍ A CHARAKTERIZACE BUNĚČNÝCH LINÍ	19
3 TESTOVÁNÍ TOXICITY NAFTOCHINONŮ.....	20
3.1 RŮST BUNĚK.....	20
3.2 ŽIVOTNOST BUNĚK	20
3.3 BAZÁLNÍ FUNKCE BUNĚK	20
3.4 CYTOTOXICKÉ TESTY	21
3.4.1 <i>MTS test</i>	21
3.4.2 <i>MTT test</i>	21
3.4.3 <i>LDH test</i>	21
3.4.4 <i>NR test</i>	21
3.4.5 <i>Millipore test</i>	22
3.4.6 <i>Systém xCELLigence</i>	22
4 MECHANISMUS ÚČINKU CYTOTOXICITY.....	24
4.1 APOPTÓZA.....	24
4.1.1 <i>Průběh apoptózy</i>	24
4.1.2 <i>Regulátory apoptózy</i>	24
4.2 AUTOFAGIE	26
4.2.1 <i>Průběh autofagie</i>	27
4.2.2 <i>Regulace autofagie</i>	27
5 PLUMBAGIN	30
5.1 CHEMICKÁ A FYZIKÁLNÍ CHARAKTERISTIKA PLUMBAGINU	30
5.2 IZOLACE A SYNTÉZA PLUMBAGINU	30
5.3 BIOLOGICKÉ PŮSOBNÍ PLUMBAGINU	31
5.3.1 <i>Antimikrobiální aktivita</i>	31
5.3.2 <i>Antimykotická aktivita</i>	32
5.3.3 <i>Antioxidační aktivita</i>	32

5.3.4	<i>Antikarcerogenní aktivita</i>	32
6	NAFTAZARIN	34
6.1	CHEMICKÁ A FYZIKÁLNÍ CHARAKTERISTIKA NAFTAZARINU	34
6.2	IZOLACE NAFTAZARINU	34
6.3	BIOLOGICKÉ PŮSOBENÍ NAFTAZARINU	35
6.3.1	<i>Antimikrobiální a antifugální aktivita</i>	35
6.3.2	<i>Antikarcerogenní aktivita</i>	35
6.3.3	<i>Oxidativní aktivita</i>	36
6.3.4	<i>Biostimulující aktivita</i>	36
6.3.5	<i>Antibakteriální aktivita</i>	37
7	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	38
7.1	FLUORESCENCE	38
7.1.1	<i>Vlastnosti fluorescenčního záření</i>	38
7.2	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP	39
7.2.1	<i>Konstrukce fluorescenčního mikroskopu</i>	39
7.3	METODY FLUORESCENCE	40
7.3.1	<i>Imunofluorescence</i>	40
7.3.2	<i>GFP</i>	41
7.4	FLUORESCENCE JAKO NÁSTROJ ZKOUMÁNÍ CYTOTOXICITY	42
7.5	VIZUALIZACE APOPTÓZY	42
7.5.1	<i>Mitochondriální markery</i>	42
7.5.2	<i>Fragmentace DNA</i>	43
7.5.3	<i>Struktura membrány</i>	43
7.5.4	<i>Buněčný metabolismus</i>	43
8	CÍLE PRÁCE	45
9	PRAKTICKÁ ČÁST	46
9.1	BUNĚČNÉ LINIE	46
9.2	TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY	46
9.2.1	<i>Testování pomocí systému xCELLigence</i>	46
9.2.2	<i>MTT test</i>	51
9.3	VIZUALIZACE BUNĚK	53
9.3.1	<i>Postup práce s buňkami</i>	54
10	ANALÝZA OBRAZOVÝCH DAT	55
10.1	STRUKTURA PROGRAMU	55
10.1.1	<i>Vylepšená metoda rozvodí</i>	60

11	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ ANALÝZY	64
11.1	PEROXIDACE LIPIDŮ	64
11.1.1	<i>Plumbagin na PNT1A buňkách – PL</i>	<i>64</i>
11.1.2	<i>Plumbagin na PC3 buňkách – PL</i>	<i>65</i>
11.1.3	<i>Naftazarin na PNT1A buňkách – PL</i>	<i>67</i>
11.1.4	<i>Naftazarin na PC3 buňkách – PL</i>	<i>68</i>
11.2	REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU	69
11.2.1	<i>Plumbagin na PNT1A buňkách – RFD</i>	<i>70</i>
11.2.2	<i>Plumbagin na PC3 buňkách – RFD</i>	<i>71</i>
11.2.3	<i>Naftazarin na PNT1A buňkách – RFD</i>	<i>72</i>
11.2.4	<i>Naftazarin na PC3 buňkách – RFD</i>	<i>73</i>
11.3	REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	75
11.3.1	<i>Plumbagin na PNT1A buňkách – RFK</i>	<i>75</i>
11.3.2	<i>Plumbagin na PC3 buňkách – RFK</i>	<i>76</i>
11.3.3	<i>Naftazarin na PNT1A buňkách – RFK</i>	<i>77</i>
11.3.4	<i>Naftazarin na PC3 buňkách – RFK</i>	<i>78</i>
11.4	MITOCHONDRIÁLNÍ POTENCIÁL	79
11.4.1	<i>Plumbagin na PNT1A buňkách – MP</i>	<i>80</i>
11.4.2	<i>Plumbagin na PC3 buňkách – MP</i>	<i>81</i>
11.4.3	<i>Naftazarin na PNT1A buňkách – MP</i>	<i>82</i>
11.4.4	<i>Naftazarin na PC3 buňkách – MP</i>	<i>83</i>
11.5	ZJIŠTĚNÍ MOŽNÝCH ZÁVISLOSTÍ	85
11.5.1	<i>Korelační analýza</i>	<i>85</i>
12	ZÁVĚR	89
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
	SEZNAM ZKRATEK	98
	SEZNAM PŘÍLOH	101

Seznam obrázků

Obr. 1 Naftochinony (převzato[2]).....	15
Obr. 2 Hydroxybenzoátová cesta (převzato z [1])	16
Obr. 3 Sukcinylbenzoátová cesta (převzato z [1])	17
Obr. 4 Linie zdravých epiteliálních prostatických buněk.....	18
Obr. 5 Linie prostatických rakovinných buněk	19
Obr. 6 Millipore test (převzato a upraveno z [12]).....	22
Obr. 7 Fáze apoptózy (převzato z [16]).....	24
Obr. 8 Mechanismus účinku naftochinonů (převzato z [21])	26
Obr. 9 Průběh autofagie (převzato z [22]) – vznik AV a její splynutí s lysozomem	27
Obr. 10 Regulace autofagie (převzato z [17])	28
Obr. 11 Chemická struktura plumbaginu	30
Obr. 12 Chemická struktura naftazarinu	34
Obr. 13 Princip excitačního a bariérového filtru.....	39
Obr. 14 Schéma konstrukce epifluorescenčního mikroskopu	40
Obr. 15 Graf závislosti BI buněk PNT1A na čase po přidání plumbaginu	47
Obr. 16 Graf závislosti BI buněk PNT1A na čase po přidání naftazarinu	48
Obr. 17 Graf závislosti BI buněk PC3 na čase po přidání plumbaginu	49
Obr. 18 Graf závislosti BI buněk PC3 na čase po přidání naftazarinu.....	50
Obr. 19 Působení DMSO na PNT1A buňky	51
Obr. 20 Působení DMSO na PC3 buňky	51
Obr. 21 Působení DMSO a plumbaginu na PNT1A buňky	52
Obr. 22 Působení DMSO a naftazarinu na PNT1A buňky	52
Obr. 23 Působení DMSO a plumbaginu na PC3 buňky	53
Obr. 24 Působení DMSO a naftazarinu na PC3 buňky	53
Obr. 25 Diagram segmentačního programu	55
Obr. 26 Šedotónový (vlevo) a k němu komplementární (vlevo) obrázek buněk	56
Obr. 27 Komplementární obrázek po ekvalizaci (vlevo) a následné filtraci (vpravo)	57
Obr. 28 Binární obrázek	58
Obr. 29 Profil obrazových dat	58
Obr. 30 Výsledek segmentace metodou rozvodí.....	59
Obr. 31 Výsledek segmentace na obrázku s barvivem pro LP (vlevo) a MP (vpravo).....	60
Obr. 32 Výsledek segmentace na obrázku s barvivem pro RFD (vlevo) a RFK (vpravo).....	60
Obr. 33 Příklad gradientu snímku	61
Obr. 34 Příklad nalezení vnitřních markerů	61
Obr. 35 Výsledek segmentace pomocí Marker-Controlled Watershed Segmentation.....	62

Obr. 36 Příklad hůře segmentovatelného snímku	63
Obr. 37 Výsledek segmentace hůře segmentovatelného snímku pomocí Marker-Controlled Watershed Segmentation.....	63
Obr. 38 Peroxidace lipidů - Plumbagin na PNT1A buňkách	65
Obr. 39 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách - PL	65
Obr. 40 Peroxidace lipidů - Plumbagin na PC3 buňkách.....	66
Obr. 41 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – PL	66
Obr. 42 Peroxidace lipidů - Naftazarin na PNT1A buňkách.....	67
Obr. 43 Graf intensit pro různé koncentrace naftazarinu na PNT1A buňkách – PL.....	67
Obr. 44 Peroxidace lipidů - Naftazarin na PC3 buňkách	68
Obr. 45 Graf intensit pro různé koncentrace naftazarinu na PC3 buňkách – PL	69
Obr. 46 Srovnání průběhů intensit po podání různých koncentrací cytotoxinů - PL.....	69
Obr. 47 Reaktivní formy dusíku - Plumbagin na PNT1A buňkách	70
Obr. 48 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách – RFD	71
Obr. 49 Reaktivní formy dusíku - Plumbagin na PC3 buňkách.....	71
Obr. 50 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – RFD.....	72
Obr. 51 Reaktivní formy dusíku - Naftazarin na PNT1A buňkách.....	72
Obr. 52 Graf intensit pro různé koncentrace naftazarinu na PNT1A buňkách – RFD	73
Obr. 53 Reaktivní formy dusíku - Naftazarin na PC3 buňkách	73
Obr. 54 Graf intensit pro různé koncentrace naftazarinu na PC3 buňkách – RFD	74
Obr. 55 Srovnání průběhů intensit po podání různých koncentrací cytotoxinů – RFD.....	74
Obr. 56 Reaktivní formy kyslíku - Plumbagin na PNT1A buňkách	75
Obr. 57 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách – RFD	76
Obr. 58 Reaktivní formy kyslíku - Plumbagin na PC3 buňkách.....	76
Obr. 59 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – RFD.....	77
Obr. 60 Reaktivní formy kyslíku - Naftazarin na PNT1A buňkách.....	77
Obr. 61 Graf intensit pro různé koncentrace naftazarinu na PNT1A buňkách – RFD	78
Obr. 62 Reaktivní formy kyslíku - Naftazarin na PC3 buňkách	78
Obr. 63 Graf intensit pro různé koncentrace naftazarinu na PC3 buňkách – RFD.....	79
Obr. 64 Srovnání průběhů intensit po podání různých koncentrací cytotoxinů - RFD.....	79
Obr. 65 Mitochondriální potenciál - Plumbagin na PNT1A buňkách.....	80
Obr. 66 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách – MP	81
Obr. 67 Mitochondriální potenciál - Plumbagin na PC3 buňkách	81
Obr. 68 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – MP.....	82
Obr. 69 Mitochondriální potenciál - Naftazarin na PNT1A buňkách	82
Obr. 70 Graf intensit pro různé koncentrace naftazarinu na PNT1A buňkách – MP	83
Obr. 71 Mitochondriální potenciál - Naftazarin na PC3 buňkách.....	83

Obr. 72 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarin na PC3 buňkách – MP	84
Obr. 73 Srovnání průběhů intenzit po podání různých koncentrací cytotoxinů - MP.....	84

Seznam tabulek

Tab. 1 Fluorofory a jejich aplikace (převzato z [52]).....	41
Tab. 2 IC ₅₀ plumbaginu na PNT1A buňkách	47
Tab. 3 IC ₅₀ naftazarinu na PNT1A buňkách	48
Tab. 4 IC ₅₀ plumbaginu na PC3 buňkách.....	49
Tab. 5 IC ₅₀ naftazarinu na PC3 buňkách.....	50
Tab. 6 Korelace výsledků působení plumbagin na PNT1A a PC3 buňky	86
Tab. 7 Korelace výsledků působení naftazarin na PNT1A a PC3 buňky.....	87
Tab. 8 Korelace výsledků působení plumbagin a naftazarinu na PC3 buňky	87
Tab. 9 Korelace výsledků působení plumbagin a naftazarinu na PNT1A buňky	88

Úvod

Rakovina prostaty je nejfrekventovaněji diagnostikovaný typ rakoviny u mužů. Riziko vzniku rakoviny prostaty strmě roste po překročení 50. roku věku muže. Karcinogeneze prostaty je charakteristická postupnou transformací normálního zdravého epitelu prostaty do podoby intraepiteliální neoplazie. Ta se nakonec mění v pokročilou metastatickou chorobu. Problémem dosavadní léčby rakoviny je její nespecifita a také to, že ne vždy je efektivní a to hlavně v případě pokročilých stádií rakoviny. Proto se vědci neustále snaží nalézt nejlepší možný způsob léčby rakoviny. Cesta za nalezením lepšího léku zavedla vědce a lékaře zpět do oblasti přírodní medicíny, kde by mohli nalézt látky přírodního původu, které by měly schopnosti a potenciál stát se novým lékem proti rakovině.

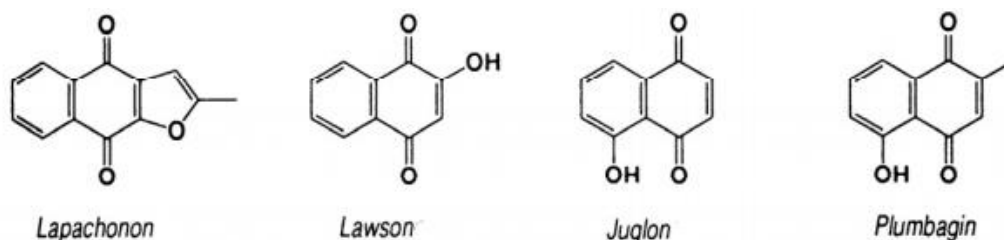
Takový potenciál byl nalezen v naftochinonech. Naftochinony jsou přírodní látky, které vykazují řadu biologických aktivit. Plumbagin a naftazarin, dvě látky patřící mezi naftochinony, jsou obsažené v určitých druzích rostlin, které se používají v tradiční medicíně jako antipyretika a antimykotika. Užívají se pro jejich antimikrobiální, antisklerotické nebo insekticidní vlastnosti. Kromě tohoto bylo zjištěno, že vykazují i cytostatické a antikarcinogenní vlastnosti. Všechny tyto vlastnosti vyvstávají z jejich schopnosti chovat se jako potentní inhibitory elektronového transportu, jako bioreduktivní alkalické agens biomolekul a také jako tvůrci reaktivních kyslíkových radikálů za aerobních podmínek. Jejich cytotoxické účinky byly studovány a ověřeny na řadě buněčných linií. Mezi nimi to byly např. prostatické buněčné linie, na nichž se testovala schopnost naftazarinu a plumbaginu inhibovat zhoubné bujení způsobené rakovinou prostaty.

1 Naftochinony

1.1 Obecná charakteristika

Naftochinony jsou skupina organických sloučenin. Spolu s antrachinony a benzochinony patří k tzv. chinonům, které jsou získány z aromatických sloučenin, jako je naftalen nebo benzen (Obr. 1).

Nejběžnější formou výskytu naftochinonů jsou barevné pigmenty nalézající se v mnohých druzích bakterií, hub (čeled' *Streptomyces*, *Fusarium*) i vyšších rostlin (čeled' *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Ebenaceae*, *Boraginaceae*). Tyto pigmenty se v rostlinách objevují volně nebo jsou glykosidovány a uloženy ve vakuolách. [1]



Obr. 1 Naftochinony (převzato[2])

K nejznámějším naftochinonům patří plumbagin, naftazarin a lawson. Díky svým farmakologickým účinkům jsou velmi zajímavými objekty pro zkoumání. Bylo zjištěno, že jsou vysoce cytotoxické a že rovněž vykazují vlastnosti antibakteriální, antifungální, antivirální a antiparazitní. Velké uplatnění nacházejí zejména v oblastech tradiční medicíny. [1, 3]

1.2 Biosyntéza naftochinonů

Místem syntézy a akumulace naftochinonů jsou rostlinné tkáně. Naftochinony se zde vyskytují jako primární metabolity, které mají důležité a dobře studované role. Ostatní chinony jsou typicky metabolity sekundární bez jakékoliv očividné metabolické role.

Důležitou látkou v biosyntéze naftochinonů je kyselina šikimová, která jako jedna z mála sloučenin prošla změnou ze sekundárního na primární metabolit. Kromě její biosyntetické funkce má kyselina šikimová i jiné využití – zajišťuje komponenty proteinům (fenylalanin, tyrosin a tryptofan) a je používána jako „most“ mezi lineárními uhlíkovými řetězci uhlovodíků a aromatickými sloučeninami. Ze šikimátu je také možné vytvořit tři deriváty

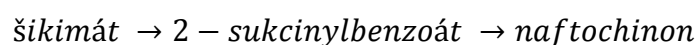
benzoátu (*o*-sukcinylbenzoát, 4-hydroxybenzoát a kyselina homogentisová). Ty slouží jako prekurzory naftochinonů. [4]

1.2.1 Cesty biosyntézy

Biologických cest vedoucích k syntéze chinonů je mnoho. Pro benzochinony a naftochinony existuje alespoň pět cest a pro antrachinony dvě cesty.

- **Sukcinylbenzoátová cesta**

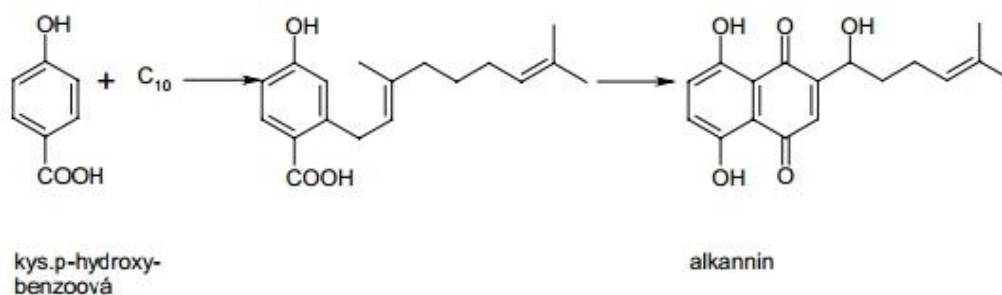
Prostřednictvím této cesty je možné vytvořit určité druhy naftochinonů a také antrachinonů (omezeno pouze na rostliny rodiny *Rubiaceae*). Jako prekurzor zde slouží 2-sukcinylbenzoát. [4, 5]



Tato cesta se větví od kyseliny chorismové, která je prekurzorem izochorismátu. Formování tohoto isomeru je katalyzováno enzymem izochorismát hydroxymutázou. Kyselina izochorismová se přemění na 2-sukcinylbenzoát za přítomnosti 2-oxoglutarátu a thiamin pyrofosfátu. Sukcinylbenzoát je následně přeměněn na mono-CoA ester. To vyžaduje přísun energie ve formě ATP a vynáší AMP u bakterií nebo ADP u vyšších rostlin. Dalším krokem je vytvoření 1,4-dihydroxy-2-naftoát vyskytující se u bakterií (u rostlin nemusí tento krok proběhnout). Většina metabolických kroků u vyšších rostlin za CoA-esterem zůstává neobjevena. Výjimkou je např. biosyntéza juglonu, která vychází z 1,4-naftochinonu (Obr. 3). [4, 5]

- **Hydroxybenzoátová cesta**

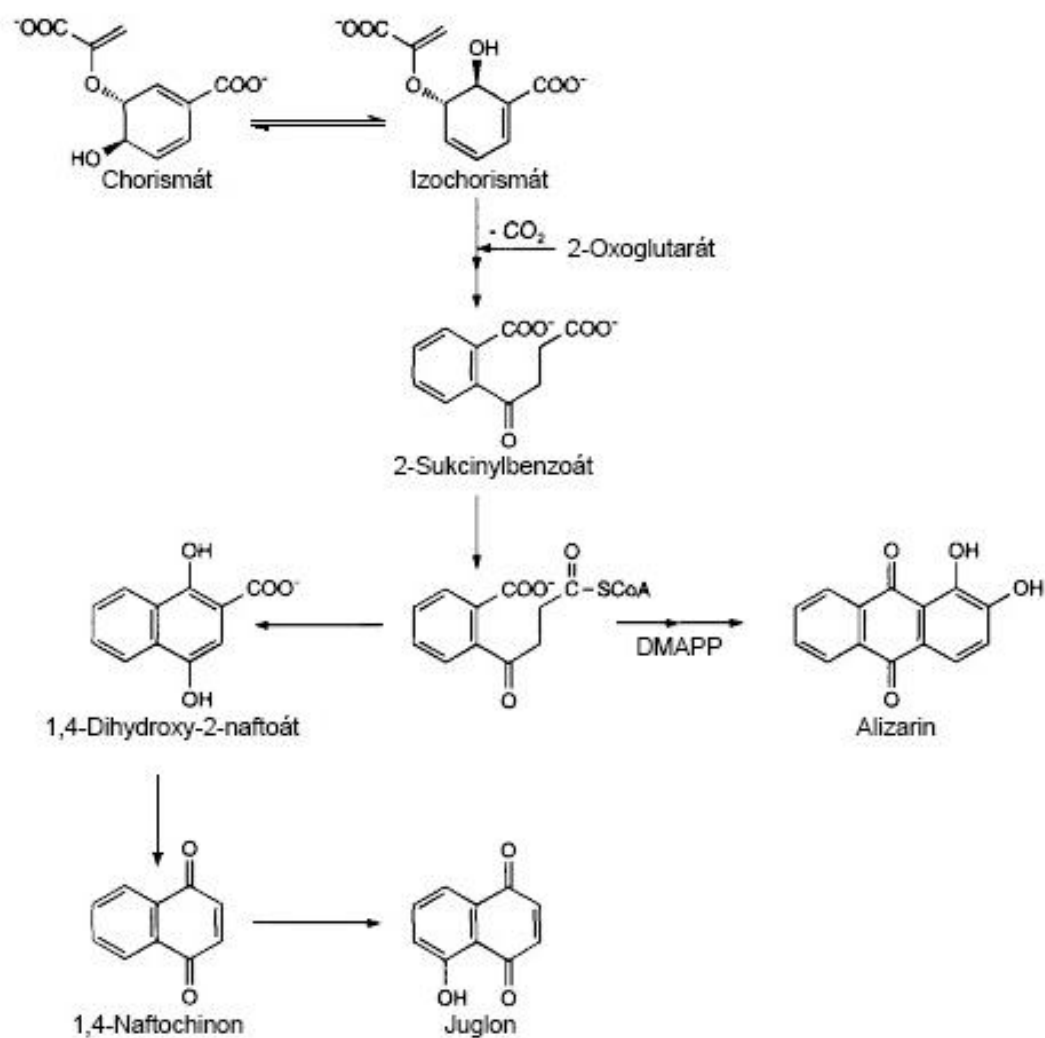
Další cestou zajišťující biosyntézu naftochinonů hlavně u rostlin rodu *Plagiobothrys* je hydroxybenzoátová cesta. Výsledkem může být alkanin nebo šikonin. Ty vznikají kondenzací kyseliny *p*-hydroxybenzoové a C₁₀ izoprenové jednotky. Konečným produktem je substituovaný 1,4-naftochinon (Obr. 2). [4, 5]



Obr. 2 Hydroxybenzoátová cesta (převzato z [1])

- **Acetát-malonátová cesta**

Tímto způsobem u rostlin čeledi *Plumbaginaceae* (rod *Plumbago*) vzniká plumbagin. Dochází tu ke kondenzačním reakcím mezi acetyl-CoA a malonyl-CoA. [4, 5]



Obr. 3 Sukcinylbenzoátová cesta (převzato z [1])

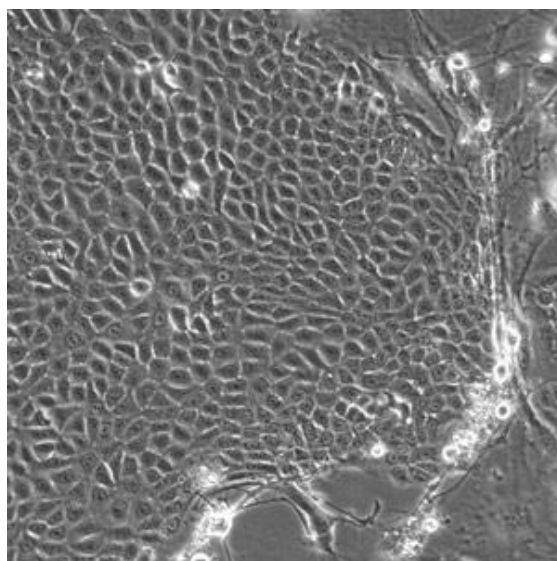
2 Cytotoxicita naftochinonů

Cytotoxicita je schopnost buněk nebo sloučenin ničit jiné buňky. Právě naftochinony jsou jedny z látek, u nichž se tato vlastnost projevuje velmi silně. Ve studiích zabývajících se *in vitro* cytotoxicitou naftochinonů byl tento účinek prokázán na množství buněčných linií, konkrétně nádorových buněčných linií.

2.1 Buněčné linie

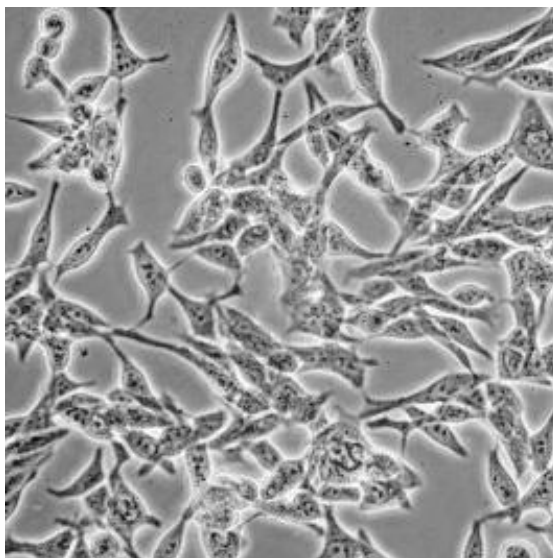
Buněčné linie ať už živočišné nebo lidské se získávají izolací. Na začátku se izolují tzv. primární kultury (primokultury). Tyto primokultury jsou obvykle získány z fragmentů tkání nebo orgánů. Mechanická disociace, či natrávení proteolytickými enzymy jsou metody, které se poté používají k uvolnění jednotlivých buněk z fragmentů. [6]

Po úspěšném vývoji primokultury *in vitro* vzniká buněčná linie. Tyto buňky se vyvinuly z primokultury během první pasáže. První pasáž je označení pro proces přenesení buněk z původní kultivační nádoby do nové. Během toho také dochází k výměně kultivačního média a naředění suspenze. [6]



Obr. 4 Linie zdravých epiteliálních prostatických buněk

Buněčné linie se používají jako obnovitelný zdroj buněčného materiálu, který se vyznačuje relativně stabilními biologickými vlastnostmi (Obr. 4). Buněčné linie získané z nádorových buněk (Obr. 5) obvykle reflektují vlastnosti nádorů, ze kterých pochází (zachovány jsou genotypové a fenotypové charakteristiky buněk). [6]



Obr. 5 Linie prostatických rakovinných buněk

2.2 Rozdělení a charakterizace buněčných linií

Buněčné linie se dělí na kontinuální a konečné linie. Kontinuální linie jsou schopné nekonečné expanze populace. Konečné linie umožňují jenom omezený počet dělení. K tomu, aby došlo k přeměně linií na kontinuální, je nutná transformace a ta vyžaduje buď přítomnost buněk, které byly už dříve transformovány nebo podstoupení transformace v raných stádiích. Samotné testování se provádí na eukaryotických buněčných liniích odvozených z různých lidských i zvířecích tkání. [6, 7]

Díky velkému množství buněčných linií, které se používají v experimentální biologii a medicíně, je nutné linie také charakterizovat. K tomuto účelu slouží určité postupy, které lze rozdělit do tří skupin:

- metody stanovení jedinečnosti linie (DNA fingerprinting, DNA profilování, analýza karyotypu),
- metody určení druhového původu (izoenzymová analýza, cytogenetická analýza, detekce druhově specifických protilátek),
- metody hodnocení obecných vlastností linií (určení morfologie, charakterizace růstových parametrů a buněčného cyklu, stanovení exprese proteinů intermediárních filament). [6, 7]

3 Testování toxicity naftochinonů

První a nejlépe rozeznatelný efekt následující po expozici buněčných linií toxinům je morfologická změna ve vrstvě buněk a/nebo tvaru buněk v kultuře. Proto není překvapením, že jsou morfologické změny používány k ohodnocení toxicity. Toxické efekty se mohou lišit a tedy vyžadovat jiný přístup k jejich zjištění nebo jinou úroveň citlivosti. Díky testování cytotoxicity jsme schopni ohodnotit účinnost testované látky, porovnat toxicitu mezi látkami nebo vyhodnotit synergické/antagonistické účinky látek. Samotné testování se provádí na eukaryotických buněčných liniích odvozených z různých lidských i zvířecích tkání. [8, 9]

3.1 Růst buněk

Možným indikátorem toxicity může být změna v růstu buněk. To, jak chemikálie ovlivňují schopnost replikace buněk, lze použít jako ukazatel toxicity. Koncentrace látky, po jejímž přidání do směsi se 50 % buněk nedělí, se nazývá inhibiční koncentrace (IC_{50}). Dalším efektivním ukazatelem míry replikace je tzv. PE (plating efficiency) – schopnost buněk tvořit kolonie po 10–15 dnech kultivace za přítomnosti toxinu. PE podává komplexnější informace o přežití buňky, nutričních požadavcích a schopnosti reprodukce. Reprodukce buněk může být měřena za pomoci několika parametrů zahrnující počet buněk, obsah DNA, obsah proteinů nebo enzymovou aktivitu. [9]

3.2 Životnost buněk

Dalším indexem toxicity je životnost buněk. Ta se dá měřit pomocí vitálních barviv, např. pomocí trypanové modři, která vstupuje pouze do mrtvých buněk nebo pomocí neutrální červení, která se akumuluje ve zdravých buňkách. Počet mrtvých a zdravých buněk ve srovnání s kontrolní skupinou nám poskytne informaci o úmrtnosti v testovaném vzorku. Bylo také zjištěno, že množství uvolněného radioaktivního ^{51}Cr je dalším možným ukazatelem úmrtnosti měřeným pomocí membránových funkcí. [9]

3.3 Bazální funkce buněk

V neposlední řadě stojí bazální funkce buňky (biochemické nebo metabolické změny v buňce) jako index toxicity. Cesty přenosu energie a jejich změny (spotřeba O_2 nebo úrovně ATP) jsou obvykle měřeny pomocí Clarkových elektrod a také pomocí luciferin-luciferinu.

V jedné studii byla použita vysokotlaká kapalinová chromatografie k měření množství DNA a RNA prekurzorů, jejichž poměr je chápán jako další indikátor toxicity. [9]

3.4 Cytotoxické testy

Kromě výše zmíněných způsobů hodnocení cytotoxického působení látek na buňky, existují i speciální testy, které lze k tomuto účelu také použít.

3.4.1 MTS test

MTS test měří redukční potenciál buňky pomocí kolorimetrické reakce. Živá buňka redukuje MTS reaktant na barevný formazan. Formazan jako produkt redukce je rozpustný v roztoku kultury, u kterého je nakonec měřena absorbance. Redukční reakce probíhá jenom v případě, že jsou mitochondriální reduktázové enzymy aktivní. Proto je možné tuto konverzi vztáhnout k životnosti buněk ve vzorku. [10]

3.4.2 MTT test

MTT neboli žlutý tetrazol se využívá ve stejnojmenném kolorimetrickém testu k měření aktivity buněčných enzymů, cytotoxicity nebo cytostatické aktivity potencionálních léčiv nebo toxinů. U této metody dochází k redukci tetrazoliové soli (MTT) na fialově zbarvený ve vodě nerozpustný formazan. Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Po přidání silného detergentu se formazan rozpustí a zabarvení se poté vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Hodnota absorbance odpovídá množství živých buněk (čím vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk). [11]

3.4.3 LDH test

Testování cytotoxicity pomocí LDH testu je založeno na kolorimetrické metodě. Test obsahuje směs laktátu, NAD^+ a diaforázy. LDH katalyzuje redukci NAD^+ na NADH za přítomnosti L-laktátu. Množství barevného a rozpustného formazanu se měří spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm. Jinak řečeno. Laktát dehydrogenáza je vypuštěn do média kultury ve chvíli buněčné smrti v důsledku poškození buněčné membrány. Nárůst aktivity LDH v supernatantu je úměrný počtu lizovaných buněk. [10]

3.4.4 NR test

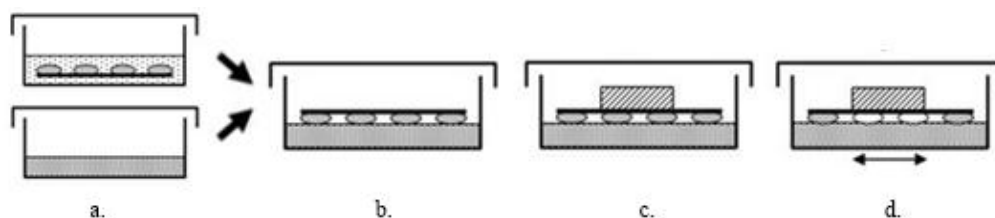
Tento test je založen na schopnosti živých buněk přijmout a navázat neutrální červeň (NR). NR je pozitivně nabitě barvivo, které lehce difunduje přes buněčnou membránu,

akumuluje se v cytoplasmě a je ukládáno v kyselém prostředí lysozomů. Princip je takový, že jenom živé buňky jsou schopné NR absorbovat a vázat, což je nemožné u buněk mrtvých nebo zničených. Množství nakumulovaného NR je tedy proporcionální k množství živých buněk v buněčné kultuře. [8]

3.4.5 Millipore test

Millipore test je test na ultrafiltru. Buňky jsou vypěstovány na jedné straně filtru a z druhé strany je přiložen testovaný vzorek (Obr. 6). Filtr umožňuje definovaný kontakt materiálu a zabraňuje mechanickému poškození. Látky uvolněné ze vzorku mohou filtrem difundovat do okolí. Takto se obvykle prokazuje sukcinát dehydrogenázová aktivita živých buněk. Po působení směsi je plocha ultrafiltru se živými buňkami modrofialově zbarvena, oblast „postižených“ buněk zůstává nezbarvena. Usušené ultrafiltry se archivují přímo, ale mikroskopické hodnocení buněk není možné, neboť ultrafiltr není transparentní. [12]

Existuje i jiné uspořádání testu na membránovém ultrafiltru, kdy lze prokazovat v živých buňkách enzymatickou transformaci fluoresceindiacetátu ve fluorescein. Protože vzniklý fluorescein neproniká přes buněčnou membránu, reakce se projeví žlutozelenou fluorescencí plochy živých buněk v UV světle. Zóna poškozených buněk nevyzařuje fluorescenci. Pro vyhodnocení jsou vhodnější snímky pořízené v UV světle; ve viditelném světle se filtry jeví jako nezbarvené. [12]



Obr. 6 Millipore test (převzato a upraveno z [12])

a. Nasazení buněk na ultrafiltr a příprava Petriho misky s agarem b. Položení ultrafiltru na agarovou vrstvu buňkami směrem dolů c. Položení testovaného materiálu na ultrafiltr d. Po 24 hodinách se vyhodnotí velikost oblasti poškozených buněk

3.4.6 Systém xCELLigence

Tento systém pracuje na principu sledování buněk umístěných na dno jamek destičky “E-plate“, do které jsou buňky umístěny. Při aplikaci nízkého napětí dojde ke vzniku elektrického pole mezi zlatými mikroelektrodami umístěnými na dně jamek destičky. Elektrické pole se mění v závislosti na počtu adherovaných buněk na dně jamky, na morfologii buněk a síle jejich adheze. Interakce buněk, v tomto případě adheze buněk na mikroelektrodách, generuje

impedanční odpověď. Míra impedance je dána bezrozměrnou veličinou BI (buněčný index). [13, 14]

Oproti jiným metodám má xCELLigence řadu výhod. Zaprvé. Impedanční měření je neinvazivní, takže buňky setrvávají ve více normálním fyziologickém stavu při testování. Zadruhé. Tato metoda je ekonomičtější, protože odpadá nutnost použití drahých reagentů. Nakonec. xCELLigence umožňuje zkoumání buněčné proliferace, adheze, buněčné smrti, viability a cytotoxicity v reálném čase, bez barvení či značení buněk. [13, 14]

4 Mechanismus účinku cytotoxicity

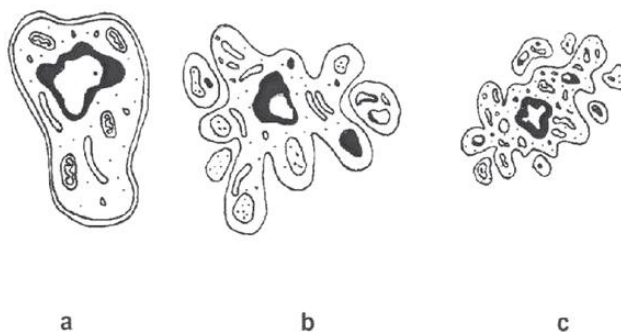
S cytotoxicitou úzce souvisí i mechanismus účinku. U některých naftochinonů byla prokázána programovaná buněčná smrt (apoptóza, autofagie) jako hlavní účinek působení.

4.1 Apoptóza

Apoptóza je určitý druh programované buněčné smrti. Je to nezbytný proces pro přesný embryonální vývoj a tkáňovou homeostázi, kdy buňka umírá jak fyziologicky tak i patologicky. Obecně je programovaná buněčná smrt kontrolována sekvencí dějů specifického druhu proteinů, které jsou přítomny v mnohobuněčných organismech a konvertují smrt vyvolávající signál na biochemický proces rozpadu buňky. [15, 16]

4.1.1 Průběh apoptózy

Na počátku apoptózy dochází k smršťování buňky, až buňka přichází o kontakt se svým okolím. Endoplazmatické retikulum se rozpadá a dochází k tvorbě váčků a vezikulárních útvarů. V jádře se kondenzuje chromatin a přemísťuje se k periférii. Dále se štěpí DNA pomocí endonukleázy. Po dokončení štěpení přechází apoptóza do finální fáze, kdy vlivem vysoké autoproteolytické aktivity buňky mění tvar a mění se v apoptotická tělíska (Obr. 7). [17]



Obr. 7 Fáze apoptózy (převzato z [16])

- a. Buněčný chromatin, směs chromozomů a bílkovin se začíná srážet b. Buněčná membrána ztrácí svou strukturální integritu.
c. Buňka se smršťuje a její DNA se stává zlomkovitou. Části buňky jsou pak recyklovány.

4.1.2 Regulátory apoptózy

Programovaná buněčná smrt je řízena kaskádou genů. K proběhnutí apoptózy jsou nutné geny ced-3, ced-4 a nuc-1, který kóduje nukleázu štěpící chromatin. [11]

- ***Bcl-2 proteiny***

Rodina proteinů Bcl-2 je zodpovědná za odpověď na apoptózu a také za regulaci integrity vnější mitochondriální membrány. Zahrnuje širokou řadu anti-apoptotických proteinů a také proteinů, které apoptózu podporují. Anti-apoptotičtí členové Bcl-2 rodiny zabráňují vypuštění cytochromu c a patří k nim Bcl-2, Mcl-1, A1-BFL-1 a BIM/BOD. Pro-apoptotičtí členové vyvolávají vypuštění cytochromu c z mitochondrie a patří k nim BAK, BIM/BOD a Bax. Bax je za normálních podmínek rozpustný v cytosolu. V případě přítomnosti nějakého apoptotického stimulu (např. nadměrná produkce ROS), se Bax přesune k vnější mitochondriální membráně a vnikne do ní. Poté Bax vytvoří oligomery, o kterých se myslí, že jsou důležité pro vznik PTP. Bcl-2 inhibuje apoptózu negativní regulací apoptotické aktivity Bax a formuje Bcl-2/Bax heterodimer. Rovnováha mezi Bcl-2/Bax tvoří apoptotickou reostázu, která určuje citlivost k apoptóze. [18–21]

- ***p53***

p53 je nádorový supresorový gen, který potlačuje růst nádoru prostřednictvím řady cest, které zahrnují genovou transkripci, DNA syntézu, zastavení buněčného cyklu a apoptózu. Mutace genu p53 nebo ztráta jeho funkce vede k šíření nádoru, genetické nestabilitě a odolnosti vůči apoptóze. p53 se také chová jako transrepresor pro anti-apoptotické faktory. Navíc je schopen sám aktivovat apoptózu bez použití jeho transkripčních funkcí. [18–21]

- ***Kaspázy***

Kaspázy jsou velmi důležité enzymy pro průběh apoptózy. Jde o cystein-aspartátové proteázy. Jejich neaktivní forma, prokaspázy, se vyskytují v cytoplasmě a jsou aktivovány proteolýzou. Dají se rozdělit na iniciační (zahájení apoptózy), efektorové (štěpení buněčných substrátů – apoptotická morfologie) a další, které nehrají při apoptóze velkou roli. Důležitou efektorovou kaspázou je kaspáza-3. Popisuje se jako klíčový mediátor apoptózy savčích buněk. Jeho aktivita je považována za míru odpovědi na cytotoxicitu. [18–21]

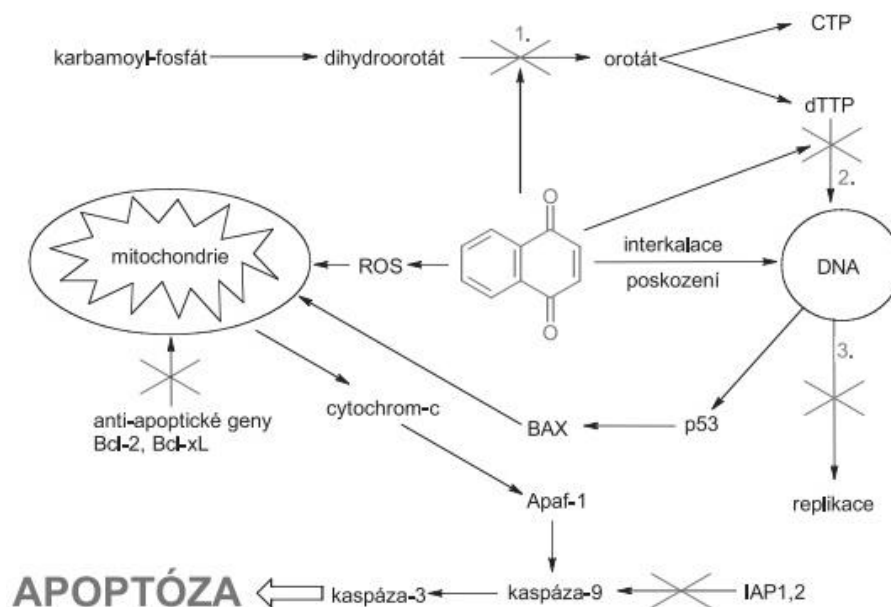
- ***Mitochondrie***

Mitochondrie hraje významnou roli při transdukcii signálu během apoptózy; jeho selhání může vést k rapidní inhibici přežití buňky a proliferaci. Jakákoliv fyziologická dysfunkce a změna ve struktuře mitochondrie vede k buněčné smrti. Proto může být mitochondriální degradace úspěšnou protirakovinnou strategií. Otevření mitochondriální PTP může vést k vypuštění cytochromu c a jiných pro-apoptotických molekul z mezimembránového prostoru. Po vypuštění cytochromu c do cytosolu je z něj vytvořen apoptosom a prokaspáza 9. [18–21]

- **ROS**

ROS jsou známé mediátory intracelulární signálové kaskády. Přílišná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) vede k oxidativnímu stresu, ztrátě funkcí buňky a nakonec apoptóze. ROS mohou také způsobit lipidovou peroxidaci. [18–21]

Mechanismus účinku naftochinonů je znázorněn na Obr. 8.



Obr. 8 Mechanismus účinku naftochinonů (převzato z [21])

Inhibice dihydroorotát dehydrogenázy (1), inkorporace thymidinu do DNA (2), inhibice některých enzymů replikace DNA-topoizomeráz (3) Naftochinony jsou rovněž schopny generovat reaktivní formy kyslíku (ROS). Ve schématu je vyznačena down-regulace některých anti-apoptotických genů (rodina Bcl genů, IAP genů).

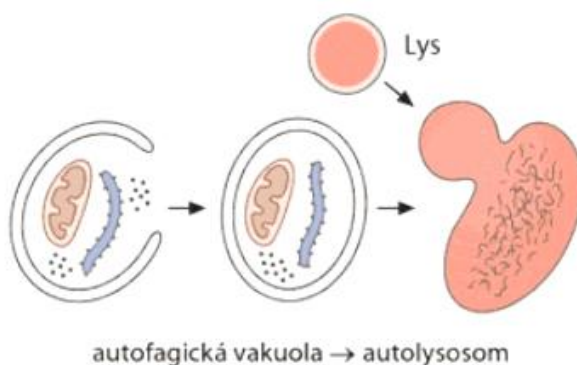
4.2 Autofagie

Autofagie je proces indukovaný nedostatkem živin a buněčným stresem. Autofagie řídí degradaci většiny proteinů a celých organel. To buňce umožňuje přežít stresy vyvolané jak externím prostředím (nedostatek živin), tak vnitřním prostředím (hromadění poškozených organel, vniknutí patogenů). Při autofagii jsou buněčné komponenty rozloženy v autofagických vakuolách. Dochází k degradaci Golgiho aparátu, polyribosomů a endoplasmatického retikula. Nakonec je buňka zničena fagocytem. Autofagie je důležitý fyziologický proces probíhající ve všech eukaryotických buňkách. [16, 22]

Podobně jako u apoptózy i zde u autofagie bylo zjištěno, že je autofagie u maligních nádorů potlačena. Další studie zjistily, že se autofagie aktivuje jako odpověď na gama ozáření a různé protirakovinné terapie. [23]

4.2.1 Průběh autofagie

Základní projevem autofagie je rozvoj autofagických vakuol (AV). Autofagie začíná tvorbou dvojité membrány (fagoforu) uvnitř buňky. Membrána postupně roste a prodlužuje se, až vytvoří autofagosom, který odloučí cytoplasmatické proteiny a některé organelly. Autofagosom dospěje s přispěním acidifikace H^+ -ATPzou a následně se spojí s lysozomem za vzniku autolysozomu. Ten obsahuje důležité lytické enzymy. Na konci celého děje dochází k odbourávání (Obr. 9). [22]



Obr. 9 Průběh autofagie (převzato z [22]) – vznik AV a její splynutí s lysozomem

4.2.2 Regulace autofagie

Na regulaci se podílejí dva základní mechanismy. Jedním z nich je regulace prostřednictvím aktivity kinázy mTOR, která zapíná a vypíná autofagické dráhy. Druhým je eukaryotický iniciační faktor eIF2 kinázy Gcn2. Mimo těchto hlavních regulátorů existují i jiné neméně důležité regulátory.

- ***PI3K/AKT/ mTOR signálová dráha***

PI3K/AKT/mTOR signálová dráha je velmi důležitá pro autofagii a je aktivována v mnoha druzích rakovin. V případě, že je kináza mTOR aktivovaná AKT, dochází k potlačení autofagie. Bylo zjištěno, že tato cesta má roli v negativní regulaci autofagie. Tato down-regulační funkce je spojována s resistencí při léčbě rakoviny prostaty, prsu a dalších. [17, 21]

- ***PTEN***

Fosfatáza-tensin homolog je rakovinový supresorový gen, který také reguluje autofagii. PTEN defosforyluje PIP3 a tudíž antagonizuje funkci PI3K třídy I, což potlačí aktivitu AKT a umožní zahájení autofagie. V případě odstranění nebo mutace PTEN, vede aktivace PI3K/AKT/mTOR dráhy k tumorigenezi. [17, 21]

- **BECN1**

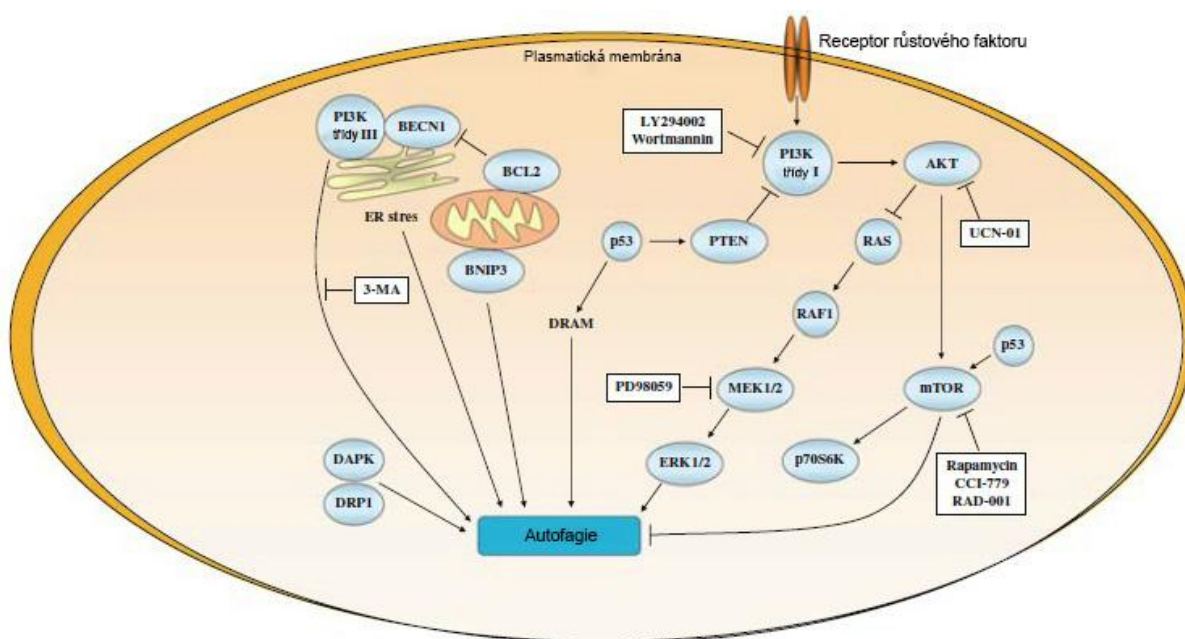
BECN1 je první identifikovaný nádor-potlačující protein, který je součástí lysosomální degradační cesty autofagie. V případě exprese mutované formy BECN1, která se nemůže vázat na BCL2, dochází k přemíře autofagie. Tento stav je spojován s buněčnou smrtí nezávislou na kaspázách a inhibovanou siRNA. Proto BCL2 blokuje autofagii tím, že se naváže na BECN1. Navíc se BECN1 váže na PI3K komplex třídy III, čímž reguluje formování autofagosomu. [17, 21]

- **DAPK a DAP1**

DAPK a DAP1 protein jsou Ca^{2+} -kalmodulin regulující serin-treonin kinázy. Tyto kinázy indukují autofagii u rakoviny prsu a rakoviny děložního čípku. [17, 21]

- **p53**

Transkripční faktor p53, který je zmutovaný nejméně v polovině lidských nádorů. Inhibuje aktivitu mTOR prostřednictvím AMPK. Navíc pozitivně reguluje autofagii v buňkách zničené DNA. Proto může být považován za spouštěč autofagie a buněčné smrti. [17, 21]



Obr. 10 Regulace autofagie (převzato z [17])

Za přítomnosti růstových faktorů dojde prostřednictvím receptoru růstového faktoru k aktivaci PI3K třídy I. Ta aktivuje AKT, což vede až k aktivaci mTOR – výsledkem je inhibice autofagie. Nadměrná exprese PTEN antagonizuje PI3K třídy I a zahajuje autofagii. RAS působí dvojím způsobem - po aktivaci PI3K třídy I je autofagie inhibována, ale když aktivuje RAF1-MEK-ERK kaskádu, autofagie se stimuluje. Dále. Aktivace p53 pozitivně reguluje autofagii. Komplex PI3K třídy III a BECN2 zahajuje autofagii na trans-Golgiho síti. Tato cesta je inhibovaná 3-MA. Down-regulace BCL2 nebo up-regulace BNIP3 na mitochondrii také zahajuje autofagii. DAPK, DRP1 a stres ER autofagii také stimuluje.

- ***ER stres***

Endoplasmatické retikulum má velkou roli v regulaci buněčné homeostázy, zvláště pak UPR (unfolded protein odpověď), která hraje důležitou roli u rakovin a mnoha jiných onemocnění. Nedávné výzkumy spojily ER stres s předzvěstí autofagie. Pod vlivem ER stresu dochází k vytvoření pre-autofagosomální struktury a následnému transportu autofagosomu do vakuol. Bohužel výzkum autofagie indukované ER stresem je teprve v začátcích a je potřeba dalších studií. [17, 21]

Buněčná smrt není jediný účinek, který mají naftochinony na buňky. Tyto látky jsou schopné zasahovat do metabolismu dusíkatých bází nukleových kyselin, kde je výsledkem snížení syntézy DNA buňkách (nádorových). Také ovlivňují procesy, jako jsou replikace DNA a průběhy různých fází buněčného cyklu. [17, 21]

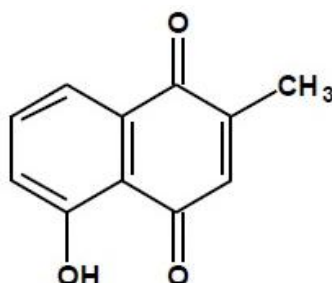
Princip regulace autofagie je znázorněn na Obr. 10.

5 Plumbagin

Plumbagin se vyskytuje ve formě žlutého pigmentu. Byl pojmenován po rostlinách z čeledi *Plumbagineae* - rod *Plumbago*, ze kterých byl poprvé izolován. Mnohými výzkumy bylo dokázáno, že plumbagin vykazuje řadu farmakologických vlastností. Je také velmi silným dráždidlem. V malých dávkách podporuje pocení a stimuluje centrální nervovou soustavu. Ve velkých dávkách může způsobit zástavu dýchání, paralýzu a smrt. [24]

5.1 Chemická a fyzikální charakteristika plumbaginu

Plumbagin (Obr. 11) neboli 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naftochinon je organická sloučenina s chemickým vzorcem $C_{11}H_8O_3$ molekulární hmotností 188,18.



Obr. 11 Chemická struktura plumbaginu

Je považován za vysoce toxickou látku. Po extrakci plumbagin postupně krystalizuje buď do podoby tenkých jehel, nebo prodloužených pyramid. Je lehce rozpustný v teplé vodě, alkoholu, acetonu, chloroformu, benzenu a kyselině octové. Na druhou stranu, se jen velmi těžce rozpouští ve vodě studené, kterou pouze obarví. Bod tání má v rozmezí od 78 °C do 79 °C. [25]

5.2 Izolace a syntéza plumbaginu

Vzhledem k faktu, že je plumbagin přírodní látka vyskytující se v určitých druzích rostlin, je jeho izolace možná právě z těchto rostlin. V dnešní době se k získání plumbaginu využívají některé *in vitro* rostlinné kultury – např. *in vitro* kultury *Plumbago rosea*. [26]

Proces izolace plumbaginu z kořenů rostlin od jeho počátku prošel značným vývojem. V začátcích se k izolaci používal Soxletův extraktor následovaný silikagelovou chromatografií, kapalinovou chromatografií na normálních fázích, kapalinovou chromatografií s opačnými fázemi a studenou macerací následovanou chromatografií na tenké

vrstvě. Později bylo zjištěno, že tento proces není efektivní. Použití TLC bylo limitováno jeho nízkou účinností, náročností na čas a špatnou separační schopností. Silikagelová chromatografie ačkoliv spolehlivější, měla také velké nevýhody, jako byla např. velká spotřeba rozpouštědla, relativně drahé analytické kolony nebo také možnost kontaminace jinými složkami z rostliny. Díky těmto důvodům, ale také díky nízké výtěžnosti a únavnému chromatografickému separačnímu postupu, se z plumbaginu stala velmi drahá farmakologická komodita. Bylo tedy nutné vytvořit jednodušší a hlavně levnější způsob separace plumbaginu. *Bothiraja a spol. (2011)* vyvinuli nový postup izolace plumbaginu, a to pomocí studené macerace. Jak bylo zjištěno, tato metoda dovoluje efektivní získání látky ze vzorku s vysokou výtěžností (2–10krát větší než předešlé metody) za současného udržení nadprůměrné kvality výtěžku (ze 100 g kořene bylo získáno 1,2 g plumbaginu o 93,6 % čistotě). [26]

Další možností získání plumbaginu je syntéza. 5-hydroxy-2-metyl-1,4-naftochinon byl získán tak, že nejdříve došlo k hydrolyzaci triacetylové sloučeniny. Ta byla poté acidifikována a zchlazena. Následně byla doplněna o dichroman draselný. Hydroxychinon krystalizoval do podoby dlouhých žluto-oranžových jehel s výtěžkem 40 mg a bodem tání okolo 79 °C. [27]

5.3 Biologické působení plumbaginu

Chinony, resp. plumbagin, mají v přírodě velmi důležitou roli. Použití extraktu plumbaginu jako lék proti rakovině nebo artritidě má v přírodní medicíně dlouhou tradici. Plumbagin však nemusí být jenom lékem. Extrakt z kořene rostliny *Plumbago zeylanica*, kterou je možné nalézt na jihu Indie, je silným jedem, který, nanesen na *ostium uteri*, může způsobit potrat. Vzhledem k jeho toxicitě je jeho použití v tradiční medicíně nebezpečné. Není vzácností, že po jeho užití došlo k úmrtí. [28]

5.3.1 Antimikrobiální aktivita

Je dobře známo, že infekční onemocnění přispívají velkou měrou ke vzniku různých zdravotních potíží. Díky excesivnímu nadužívání antibiotik si mnoho mikroorganismů vyvinulo rezistenci vůči antibiotikům. Proto se hledají jiné alternativy.

Vědecký tým *Paiva a spol. (2003)* studovali účinnost plumbaginu jako antimikrobiální látky. Ten byl získán z kořenů *Plumbago scandens*. Pro detekci mikrobiální aktivity použili bakterii *Staphylococcus aureus*, jakožto hlavní příčina vzniku infekcí u chirurgických ran a špatně dezinfikovaných nástrojů. Dále pak *Candida albicans* (jedna s neodolnějších patogenních hub), *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* (nejznámější symbiotická

bakterie tlustého střeva, ale také možný patogenní organismus). Antimikrobiální aktivita plumbaginu byla testována pomocí mikrodiluční metody. Po vyhodnocení výsledků bylo zjištěno, že růst *S. aureus* a *C. albicans* byl úplně inhibován. *E. coli* a *S. typhimurium* nebylo nijak dotčeno. [29]

5.3.2 Antimykotická aktivita

Stejně jako mikroby, také houby a kvasinky jsou v dnešní době velkým problémem. Ve velké míře jdou odpovědné za biodegradaci potravinářských produktů, i přesto, že se využívá nejmodernější uchovávací technika a postupy. Navíc jsou tyto látky odolné vůči mnoha chemickým konzervativům. Grevenstuk a spol (2011) provedli výzkum, kde jako antimykotikum použili extrakt z *Drosera intermedia*, masožravé rostliny obsahující plumbagin. Závěr byl takový, že plumbagin (získaný z *D. intermedia*) je schopen s velkou účinností inhibovat patogenní houby a kvasinky, tudíž by se dal použít v potravinářském průmyslu jako slabě kyselý konzervativ. [30]

5.3.3 Antioxidační aktivita

Oxidativní stres byl dlouho považován za faktor přispívající k rozvoji rakoviny. Nedávno bylo zjištěno, že reaktivní formy kyslíku (ROS) produkované uvnitř rakovinné tkáně mohou fungovat jako signální molekuly, které by iniciovaly a/nebo modulovaly různé regulační dráhy tumorigeneze a metastáze. Zvýšení ROS bylo zjištěno skoro ve všech rakovinách. Vysoká koncentrace ROS může zničit mnoho biomolekul (lipidy, proteiny a nukleové kyseliny). Jako odpověď na vysokou koncentraci ROS, dochází k vzniku antioxidačních proteinů, což naznačuje, že k fungování rakovinných buněk je nutná rovnováha ROS. [31, 32]

Jestliže oxidativní stres hraje významnou roli ve vývoji nádoru, potom je žádoucí vlastností jakékoliv protirakovinné látky schopnost reverze nebo minimalizace buněčného poškození oxidativním stresem – antioxidační potenciál. Samotný plumbagin byl v začátcích nejdříve zkoumán kvůli jeho potencionálním antioxidačním vlastnostem. Bylo zjištěno, že dokáže významně inhibovat peroxidaci lipidů. Při jeho aplikaci na buňky myšího lymfomu došlo k redukci poškození DNA způsobené katecholem, což naznačilo, že by plumbagin v malé koncentraci působil jako antioxidant. [33, 34]

5.3.4 Antikarcinogenní aktivita

Mimo antioxidační aktivitu byla u plumbaginu potvrzena i aktivita protirakovinná. Plumbagin může v organismu působit mnoha způsoby vedoucí k inhibici růstu rakoviny nebo zániku rakovinných buněk. Základními mechanismy jsou apoptóza a autofagie.

- ***Autofagie***

Při studiu protirakovinného působení plumbaginu na buňkách rakoviny prsu bylo zjištěno, že plumbagin inhibuje proliferaci buněk, tím že nutí buňku přeskočit G₂/M kontrolní bod a podstoupit autofagickou buněčnou smrt. Plumbagin také redukuje funkci Cdc2 zvýšením asociace p21/WAF1/Cdc2 komplexu a hladin inaktivovaného fosfo-Cdc2 a fosfo-Cdc25C aktivací Chk2. Plumbagin dále down-reguluje expresi Bcl-2 a aktivitu NF-κB. Bylo také dokázáno, že plumbagin inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu u buněk rakoviny prsu. Důležitou roli má v procesu inhibice působení plumbaginu i AKT. Nadměrná exprese AKT snižuje výskyt plumbaginem vyvolané autofagické smrti. Na druhou stranu, snížení exprese AKT zlepšuje efekt plumbaginu – podpora inhibice AKT je pro autofagii přínosná. [35–37]

- ***Apoptóza***

Druhým mechanismem je apoptóza. Porucha apoptózy může vést k celé řadě onemocnění. V případě nadměrné apoptózy může dojít k hypotrofii tkáně a naopak při nedostatečné apoptóze může dojít k proliferaci buněk a tedy začátku rakovinného bujení.

Ukázalo se, že plumbagin je schopen efektivně potlačit růst rakovinných buněk tím, že iniciuje terminaci G₂/M buněčné fáze a apoptózu těchto buněk. Blokace buněčného cyklu je asociována se zvýšenými hladinami p21 a redukováným množstvím cyklinu-B1, Cdc2 a Cdc25C. Dále bylo zjištěno, že léčba plumbaginem spouští cestu mitochondriální apoptózy indikovanou změnou v poměru Bax/Bcl-2, vedoucí k potencionální ztrátě mitochondriální membrány, uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspáz. [36]

K tomu, aby došlo k plumbaginem indukované inhibici růstu buněk je nezbytná JNK kináza. Aktivace JNK fosforylovaným p53 vede k zvýšení stability p53. Dá se tedy říct, že nejenom plumbagin ale hlavně JNK a p53 hrají kritickou roli v plumbaginem vyvolané apoptóze rakovinných buněk. [38, 39]

V jiných studiích bylo zjištěno, že plumbagin u rakoviny prostaty indukuje apoptózu, která je doplněna o zvýšení ROS. Také se ukázalo, že je schopný selektivně zničit rakovinné buňky bez toho, že by došlo k poškození buněk prostatického epitelu. [35, 39]

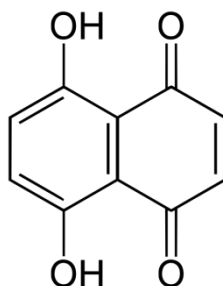
U buněk rakoviny slinivky se ukázalo, že plumbagin inhibuje jejich růst. Způsobuje up-regulaci Bax, změny v trans-membránovém potenciálu mitochondrií, aktivaci kaspáz-9 a 3 a down-regulaci PI3K. To naznačuje indukci apoptózy prostřednictvím na kaspázách závislých i nezávislých kaskádách. [40]

6 Naftazarin

Naftazarin je derivát 1,4-naftochinonu a lipofilní červený pigment, který se v přírodě vyskytuje v kůře stromu *Lomatia obliqua*, ve slupkách ořechů stromu *Juglans mandschurica* a v kořenech několika druhů rostlin z rodu *Boraginaceae*. Používá se při výrobě kosmetiky, barvení textilií nebo jídla. V dřívějších dobách se naftazarin používal jako velmi drahé barvivo. [42]

6.1 Chemická a fyzikální charakteristika naftazarinu

Naftazarin, 5,8-dihydroxy-1,4-naftochinon, je organická sloučenina odvozená z 1,4-naftochinonu prostřednictvím záměny dvou atomů vodíku H za hydroxylové skupiny OH (Obr. 12). Chemickým vzorec naftazarinu je $C_{10}H_6O_4$ a molekulární hmotností je 190,15 g/mol.



Obr. 12 Chemická struktura naftazarinu

V krystalické podobě lze naftazarin popsat jako hnědo-červené krystaly. Je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, jako je benzen, 1,4-dioxan nebo dichlorometan. S těmito rozpouštědly tvoří krvavě rudý roztok. Naftazarin je rozpustný v rozmezí teplot 228–232 °C. [42]

6.2 Izolace naftazarinu

Příprava naftazarinu může probíhat buď přímo zahřátím 1,5-dinitronaftalenu se sírou a kyselinou sírovou, nebo pomocí dvojité Friedel-Craftovi acylace hydrochinonu nebo 1,4-dimetoxibenzenu s anhydridu kyseliny maleinové. Výtěžek obou postupů je obecně nízký. V dnešní době se používá nepřímý třístupňový proces s použitím anhydridu kyseliny dichloromaleinové, díky kterému se dá dosáhnout produkce většího množství naftazarinu pro laboratorní využití. [42]

6.3 Biologické působení naftazarinu

Naftazarin a jeho deriváty jsou dobře známy pro své antioxidační, antibakteriální, antifugální působení. Používají se také k léčení. [41]

6.3.1 Antimikrobiální a antifugální aktivita

Yakubovskaya a spol. (2009) testovali antimikrobiální a antifugální vlastnosti naftazarinu a jeho substituentů, které nejdříve vysyntetizovali. Testovací organismus *Saccharomyces carlsbergensis* byl nejvíce citlivý na studované sloučeniny. Mezi všemi látkami měl největší antifugální aktivitu původní naftazarin. Na druhou stranu, většina testovaných sloučenin při aplikaci na *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* vykazovala slabou bakteriostatickou aktivitu. [43]

Kvůli hledání nových antimikrobiotik proti methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a vancomycin-rezistentní enterobakteriím (VRE) byl testován extrakt z *Arnebia euchroma*, ze které bylo izolováno osm naftazarinů. Deriváty naftazarinu vykazovaly silnou anti-MRSA aktivitu (minimální inhibiční aktivita se pohybovala v rozmezí od 1,56 µg/ml do 3,13 µg/ml). Jejich aktivita byla bakteriocidní s minimální bakteriocidní koncentrací $MIC \leq 2$ a nástup působení byl 2 hodiny. Deriváty také vykazovaly velkou aktivitu vůči VRE. Nakonec se testovala cytotoxicita derivátů na rakovinných buněčných liniích. Hodnoty jejich aktivity dosahovaly hodnot v rozmezí 0,6–5,4 µg/ml (IC_{50}). [44]

6.3.2 Antikarcinogenní aktivita

Při studiu mechanismů cytotoxicity bylo zjištěno, že naftazarin spouští buněčnou smrt nádorových buněk za pomoci apoptózy a autofagie.

Acharya a spol. (2011) zjistili, že naftazarin redukuje životnost plicních nádorových buněk A549 s IC_{50} $16,4 \pm 1,6$ µM. Spouští buněčnou smrt v závislosti na dávce a čase prostřednictvím aktivace autofagických a apoptotických cest. Konkrétně naftazarin inhibuje PI3K/Akt signálovou cestu pro přežití buňky, což bylo zjištěno pomocí měření úrovně fosforylovaného proteinu p53 a AKT a aktivace kaspázy-3. Tato inhibice dále způsobila zvýšený poměr Bax/Bcl2 proteinů, který poukazuje na aktivaci mitochondriální apoptotické cesty. Podobně naftazarin v těchto buňkách spouští expresi LC3II a následně autofagii. Během toho výzkumu se ukázalo, že naftazarin působí jako inhibitor mikrotubulů a to tak, že depolymerizuje mikrotubuly v interfázi a dezorganizuje dělicí vřeténka. Díky tomu dochází u většiny buněk k zástavě na G_2/M přechodu. [41]

Dále bylo dokázáno, že naftazarin je možným protirakovinným agens u rakoviny žaludku. Naftazarin prokázal schopnost inhibovat růst buněk prostřednictvím zástavy G₂/M a vyvolat apoptózu, což bylo asociováno s redukováním množství exprese Cdc2 a Cdc25C. Naftazarin také zvyšuje množství kaspáz-3, exprese poly-ADR polymerázy a γ -H2AX (indikátor zlomů DNA) a DNA fragmentaci. Vznik reaktivních forem kyslíku je kritickým mediátorem pro naftazarinem indukovanou inhibici růstu buněk a apoptózu. [45]

Mitochondriální apoptózu indukující faktor (AIF) je protein, který obsahuje FAD a za určitých podmínek se přesouvá do jádra a způsobuje apoptózu. Apoptogenní chování AIF je redoxně kontrolováno, když má NADH redukovaný AIF dimer nižší afinitu k DNA než oxidovaný monomer. Přírodní toxická sloučenina naftazarin je schopna v případě značného přebytku NADH udržet AIF v oxidovaném stavu. To znamená, že tato sloučenina může předcházet akumulaci redukované formy AIF *in vivo* a zvýšit apoptózu zprostředkovanou AIF. [46]

6.3.3 Oxidativní aktivita

Chinony jsou schopné prodělat buď intracelulární dvou-elektronovou redukci na hydrochinony nebo jedno-elektrodovou redukci na semichinony. NAD(P)H:chinon-oxidoreduktáza (DT-diaforáza) katalyzuje právě dvou-elektronovou redukci. Semichinony nebo hydrochinony jsou schopné regenerace na chinony a to za pomoci reakce s molekulami kyslíku. Tento redoxní cyklus, při kterém se tvoří toxické formy kyslíku, může vyústit v poškození makromolekul a cytotoxicitu. Je obecně známo, že DT-diaforáza hraje velkou roli při potlačování cytotoxicity. Je to tím, že hydrochinony obvykle formují autooxidázy méně efektivně než semichinony, a proto mohou být snadno glukuronizovány a poté odstraněny nebo detoxikovány. [47]

Také bylo zjištěno, že buňky L5178Y/HBMIO jsou citlivější na působení naftazarinu než jejich rodičovské buňky. Poznatky získané výzkumem naznačují, že tento chinon je aktivován DT-diaforázou, protože dochází k rapidnímu formování reaktivních forem kyslíku. Takový chinon je poté schopen označovat rakovinné buňky obsahující velké množství DT-diaforáz a nízké množství kataláz. [47]

6.3.4 Biostimulující aktivita

Naftazarin vykazuje kromě už zmíněných vlastností i vlastnosti biostimulující. Konkrétně jde o neurohormezi. Neurohormeze je děj, při kterém určitá úroveň stresu zlepšuje schopnost nervového systému odolat většímu stresu, který by byl v normálním případě smrtelný nebo by způsobil nějakou dysfunkci. Na rozdíl od jiných naftochinonů, jako je

např. plumbagin, které způsobují mohutné hormetické stresové odpovědi, může naftazarin působit jako ochrana před nemocemi mozku a to prostřednictvím aktivace cest adaptivní stresové odpovědi. Po aplikaci naftazarinu na model Parkinsonovy choroby bylo zjištěno, že je naftazarin schopen zlepšit pohybové schopnosti, zabránit ztrátě dopaminergických neuronů a oslabit zánět v 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridinem indukovaném modelu Parkinsonovy choroby. [48]

6.3.5 Antibakteriální aktivita

Antibakteriální aktivita 1,4-naftochinonů zahrnující i naftazarin byla zkoumána. *Riffel a spol. (2009)* ji testovali pomocí difúzního disku na několika druzích gram-pozitivních a gram-negativních bakteriích. Naftazarin se sice v této studii neprokázal jako nejlepší, ale také dosáhl velmi dobrých výsledků. Inhibiční zóna dosahovala 20 mm proti různým patogenním bakteriím v koncentraci 50 µg/ml. Také se podařilo inhibovat methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* a několik jeho dalších izolátů. U všech testovaných sloučenin byla minimální bakteriocidní koncentrace větší než 500 µg/ml, což prokázalo jejich antibakteriální aktivitu. [49]

7 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je důležitým nástrojem při studiu cytotoxicity, resp. programované buněčné smrti. S použitím široké škály technik je s jeho pomocí možné detekovat např. charakteristickou kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra během apoptózy.

7.1 Fluorescence

Fluorescenční mikroskopie je založena na jevu zvaném fluorescence. Fluorescence, stejně jako fosforescence, patří do skupiny fotoluminiscencí - vlivem záření dopadajícího na látku dochází k excitacím atomů této látky do vyšších energetických vrstev a jejich opětovnému návratu do základního stavu za současného vyzáření fotonu. [50]

Rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí je v délce luminiscence. Pokud po odstranění zdroje záření luminiscence přetrvává, hovoříme o fosforescenci. Jestliže po odstranění zdroje záření luminiscence ustane, jedná se o fluorescenci. [50]

7.1.1 Vlastnosti fluorescenčního záření

Charakteristickou vlastností fluorescence je, že fluoreskující látka absorbuje záření o vlnových délkách kratších, než jsou vlnové délky záření, které tato látka emituje.

Další vlastnosti fluorescence:

1. Fluorescence každé látky má charakteristické spektrum vlnových délek.
2. U mnoha látek dochází k postupnému útlumu fluorescence.
3. Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě světla do látky vstupující I_0 , hustotě vzorku C a koeficientu K .

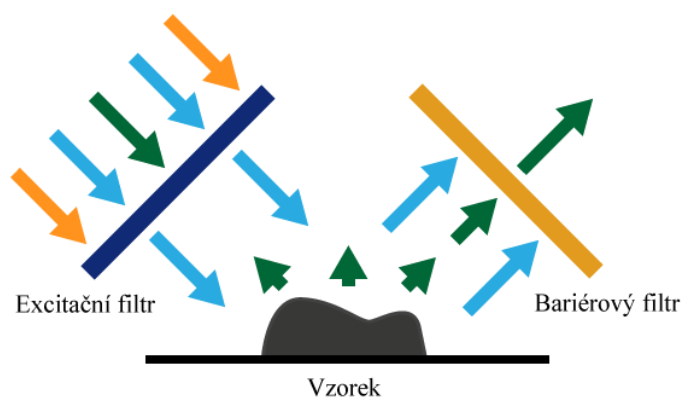
$$I \approx I_0 \cdot C \cdot K \quad (7.1)$$

4. Intenzita fluorescence je mnohem menší, než intenzita pohlcovaného světla. Pro koeficient útlumu K se udává velikost od 10^{-3} do 10^{-6} .

[51]

7.2 Fluorescenční mikroskop

Prvním předpokladem pro fluorescenční mikroskopii je použití fluoroforu. Tato látka je schopná absorbovat světlo určité vlnové délky a poté emitovat světlo o delší vlnové délce. V dnešní době je možné si vybrat z široké řady fluoroforů, které se cíleně vážou na určité buněčné struktury, nebo je možné volit reagenty, které byly vytvořeny kovalentní vazbou fluoroforu a látky, o níž je prokázána specifická vazba na určitou buněčnou strukturu. Druhým předpokladem je světelný zdroj, který musí emitovat dostatečně intenzivní záření. Nejčastěji se využívají rtuťové výbojky, xenonové výbojky a halogenové žárovky. Posledním předpokladem je soustava filtrů. První filtr je tzv. excitační filtr. Tento filtr propouští z barevného spektra jenom tu část, která je potřebná pro excitaci fluorescence a zároveň zabraňuje průchodu světla, jehož vlnové délky jsou stejné nebo podobné se světlem emisním, protože pak takové světlo bez filtrace by tvořilo pozadí. Druhý filtr, tzv. bariérový filtr propouští pouze světlo emitované a zabraňuje průchodu excitačního světla. Excitační světlo a emisní se liší barvou. Bariérový filtr je použit hlavně kvůli tomu, že je excitační světlo je velmi intenzivní a emisní světlo by kvůli tomu nemohlo být rozpoznáno (Obr. 13). [50]



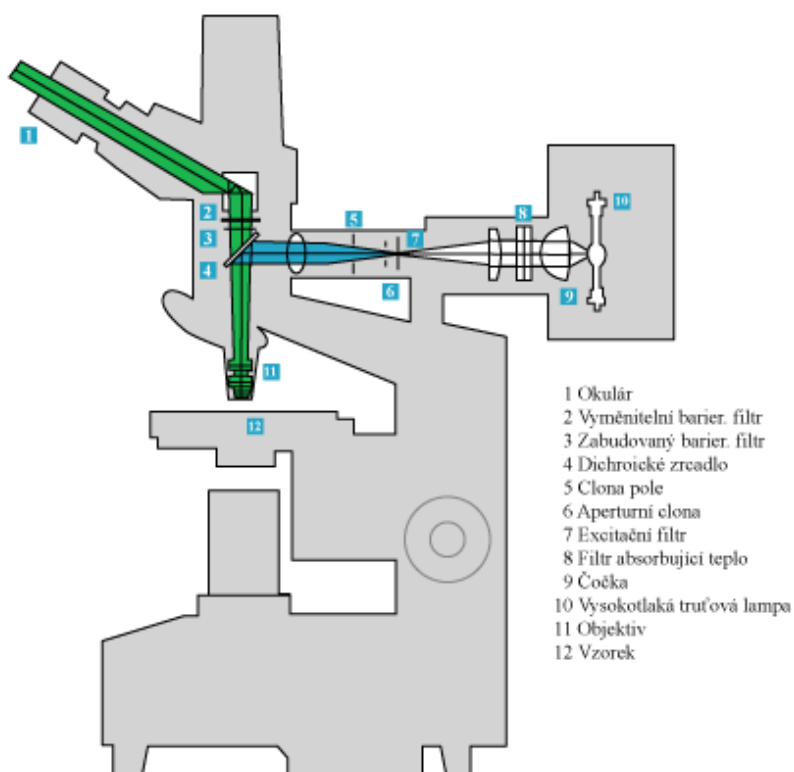
Obr. 13 Princip excitačního a bariérového filtru

7.2.1 Konstrukce fluorescenčního mikroskopu

Existují dva typy fluorescenčních mikroskopů: diafluorescenční a epifluorescenční. Jelikož se od používání diafluorescenční mikroskopie upouští, v následujícím textu se budeme zabývat fluorescenční mikroskopii v dopadajícím světle – epifluorescencí. [50]

U epifluorescence prochází excitační světlo objektivem, dopadá na preparát se vzorkem a emisní světlo se vrací zpět do objektivu. K tomu, aby se emisní světlo dostalo do okuláru, se používá zrcadlo. V počátcích se používalo polopropustné zrcadlo, ale během jeho užívání docházelo k značným ztrátám. Toto polopropustné zrcadlo totiž polovinu světla propouštělo a polovinu odráželo, bez ohledu na to, o jaké světlo šlo. Kvůli tomu se v dnešní době používá

tzv. dichroické zrcadlo, které propouští nebo odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Spolu s bariérovým a excitačním filtrem tvoří dichroické zrcadlo „filtroblok“. Dvě stěny této „kostky“ jsou tvořeny filtry a v její diagonále je dichroické zrcadlo (Obr. 14). [50]



Obr. 14 Schéma konstrukce epifluorescenčního mikroskopu

7.3 Metody fluorescence

Normální světelnou mikroskopií není možné zobrazit vnitřní struktury buňky. K tomuto účelu se využívá fluorescenční mikroskopie. Jak už bylo zmíněno výše, podstatou fluorescenční mikroskopie je využití fluoroforu (fluorochromu). Některé fluorofory se sami osamě vážou na určité struktury (např. DNA), a proto jsou použitelné pro zviditelnění těchto molekul. Této aplikaci fluoroforu se říká přímá fluorescence.

7.3.1 Imunofluorescence

Ve skutečnosti je však velmi těžké najít buněčnou strukturu takovou, na kterou by se nějaký fluorofor specificky vázal. Proto se využívá tzv. imunofluorescence.

- **Přímá imunofluorescence**

Při imunofluorescenci se využívá speciální protilátky, která se váže na jakoukoliv molekulu. V případě, že je taková protilátka k dispozici, lze na ni kovalentně navázat

fluorofor. Takový konjugát je schopen rozeznat přesně takovou strukturu, jaká je potřeba. Tomuto postupu se říká přímá imunofluorescence.

- ***Nepřímá imunofluorescence***

Vzhledem k tomu, že příprava konjugátu je velmi náročná, často se dává přednost nepřímé imunofluorescenci. U této metody se nejdříve připraví protilátka k určité molekule (primární protilátka) a nechá se navázat na molekulu nebo strukturu, kterou je potřeba lokalizovat. Přebytek protilátky se odmyje a přidá se k ní komerční protilátka konjugovaná s fluoresceinem, která specificky rozeznává všechny protilátky daného zvířecího druhu. Ta se naváže na primární protilátku a zviditelní hledanou strukturu. Nevýhodou nepřímé fluorescence oproti přímé fluorescenci je nižší specifita.

- ***Biotin-avidinová metoda imunofluorescence***

Zde se využívá silné vazby mezi biotinem a glykoproteinem avidinem. Biotin se snadno navazuje na primární protilátku, na kterou se váže fluorofor značený avidinem. Výsledkem je jasná a ostrá fluorescence.

7.3.2 GFP

GFP neboli zelený fluorescenční protein je velmi zajímavým případem využití fluorescence. Existují chvíle, ve kterých je nutné nějakým způsobem zjistit osud určitého genového produktu. Ať už je to, jestli je aktivní, nebo v které tkáni či kompartmentu je. V této chvíli je možné použít GFP. Tento protein byl získán z medúzy pohárkové (*Aequorea victoria*). Před samotnou aplikací je nutné vytvořit tzv. fúzní gen - spojení genu pro studovaný protein a genu pro zelený fluorescenční protein. Poté je gen vpraven do organismu, kde je exprimována do podoby proteinu, který bude fluoreskovat. Tím pádem je možné kdykoliv během života organismu tento protein sledovat. V dnešní době existuje kromě zeleného fluorescenčního proteinu také jeho žlutá, modrozelená a červená varianta.[51]

Tab. 1 Fluorofory a jejich aplikace (převzato z [52])

Fluorofor	Aplikace	Sumární molekulový vzorec	Excit. / Emis. maximum
FITC	imunofluorescence	$C_{21}H_{11}NO_5S$	495 nm / 521 nm
Hoechst	DNA	$C_{25}H_{24}N_6O$	360 nm / 461 nm
DAPI	DNA a RNA	$C_{16}H_{15}N_5$	358 nm / 500 nm
Ethidium bromid	Dvouřetězcová DNA a RNA	$C_{21}H_{20}BrN_3$	526 nm / 605 nm
Propidium Jodid	DNA	$C_{27}H_{34}I_2N_4$	535 nm / 617 nm
Congo Red	amyloidy	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$	560 nm / 630 nm

7.4 Fluorescence jako nástroj zkoumání cytotoxicity

Fluorescenci lze využít pro zkoumání cytotoxicity naftochinonů. V případě použití určitých barev, lze zviditelnit celé buňky, jejich části i procesy, které se v nich během působení cytotoxinu odehrávají.

Jedním z nejběžnějších způsobů měření viability buňky a cytotoxického efektu je hodnocení integrity buněčné membrány. Sloučeniny, které mají cytotoxický efekt, tuto integritu mění. Při použití určitých vitálních barviv, např. propidium jodidu, u zdravé buňky dojde k jeho vyloučení. Pokud je však integrita buňky jakkoliv narušena dojde k přechodu barviva do buňky a následnému obarvení intracelulárních komponent. Podobně je možné hodnotit integritu podle látek, které jsou uloženy v buňce, ale při poškození unikají do okolního prostředí buňky. [53]

7.5 Vizualizace apoptózy

V dnešní době existuje množství nástrojů pro detekci apoptózy. Jedním z nich je fluorescenční mikroskopie. U počátečních stádií apoptózy jsou vědci schopni monitorovat ztrátu integrity buněčné membrány, a to za pomoci barviv, které nejsou schopné procházet neporušenou membránou, ale membránou apoptotických buněk procházejí selektivně. Dále je možné použít barviva detekující změnu potenciálu mitochondriální membrány. Často se používá annexin V nebo protilátky PS (fosfatidyl-serin) k detekci translokace PS z vnitřního povrchu buněčné membrány k vnějšímu. Nakonec se také využívají protilátky aktivovaných kaspáz, které nevykazují fluorescenci, dokud nevstoupí do buňky a nenaváží se. Mnoho dalších sloučenin se používá k detekci počátečních a pokročilých stádií apoptózy. Konečné stádium lze vizualizovat štěpení PARP pomocí TUNEL testu a to k detekci DNA zlomů. [52]

7.5.1 Mitochondriální markery

- JC-1

JC-1 je barvivo, které se vyznačuje akumulací v mitochondriích v závislosti na jejich potenciálu. Tento děj je indikovatelný posunem fluorescenčního vyzařování od zelené (~525 nm) k červené (~590 nm) části spektra. Mitochondriální depolarizace je indikovatelná poklesem poměru červené fluorescence ku zelené fluorescenci. JC-1 je možné použít jako indikátor mitochondriálního potenciálu u různých druhů buněk (myocyty, neurony nebo izolované mitochondrie). [54]

- MitoRed

MitoRed je permeabilní na rhodaminu založené barvivo. Emituje fluorescenční záření o vlnových délkách od 560 nm do 580 nm. Interakce barviva s mitochondriemi závisí na potenciálu mitochondriální membrány. Mitochondrie lze barvit 20–200 nM barviva MitoRed. [55]

7.5.2 Fragmentace DNA

- barviva Hoechst

Tyto modré fluorescenční barviva se používají k zviditelnění DNA. K nejpoužívanější patří barviva Hoechst 33258 a Hoechst 33342. Obě barviva jsou excitovatelné UV světlem (okolo 350 nm) a emitují modrozelené fluorescenční světlo o vlnové délce max. 461 nm. Barviva se váží mezi protisměrně běžící vlákna šroubovice DNA. [56]

7.5.3 Struktura membrány

- Annexin V

Annexin V je fosfolipidový protein, který má velkou afinitu k fosfatidylserinu (FS). Během buněčné smrti se FS dostává na povrch fosfolipidové membrány. Annexin V se neváže na neporušené buňky, avšak když buňka umírá, Annexin V se váže na FS. Spolu s navázaným barvivem je Annexin V schopen označit apoptotické buňky. [57]

- YO-PRO[®]-1

Toto barvivo je excitovatelné zdrojem záření o vlnové délce 488 nm a emituje zelené fluorescenční záření. Je to kyanidové barvivo, které má velkou afinitu k nukleovým kyselinám a lehce prochází přes membránu buňky. V případě nepoškozené membrány je toto barvivo z buňky vypuzeno. [58]

7.5.4 Buněčný metabolismus

- C₁₂-resazurin

Tato látka se používá ke zkoumání metabolismu buňky. Původně modrý nefluoreskující resazurin je uvnitř buňky oxidoreduktázami redukován na růžovou a vysoce fluoreskující formu. Měření fluorescence této látky můžeme indikovat funkčnost buňky. [59]

- Akridinová oranž

Akridinová oranž je buňkou průchodné barvivo, které při vazbě na dsDNA vyzařuje zeleně a v případě vazby na RNA nebo ssDNA vyzařuje červeně. Tato vlastnost dělá akridin

oranž vhodným pro studium buněčného cyklu. Také se dá využít k měření apoptózy, detekci intracelulárního pH gradientu a měření aktivity protonových pump. [60]

8 Cíle práce

- Seznámit se s problematikou cytotoxicity naftazarinu a plumbaginu. Dále pak s problematikou buněčných linií a fluorescenční mikroskopie.
- Sledování a měření parametrů buněčných linií (fluorescenční mikroskopie, testy cytotoxicity).
- Analýza snímků buněk, které byly ovlivněny různými koncentracemi plumbaginu a naftazarinu.
- Vyhodnocení výsledků testů a analýzy.

9 Praktická část

Tato část diplomové práce se zabývá vyhodnocením cytotoxických testů působení naftazarinu a plumbaginu na určité druhy buněčných linií, analýzou snímků z fluorescenčního mikroskopu a vyhodnocení získaných dat.

9.1 Buněčné linie

V této práci se pracovalo se dvěma druhy buněčných linií. První byla linie PNT1A, která zastupuje zdravé epiteliální buňky a druhá byla linie PC3. Tato linie představuje rakovinné epiteliální buňky.

9.2 Testování cytotoxicity

Jedním s úkolů bylo zjistit, jak vybrané naftochinony plumbagin a naftazarin¹ působí na jednotlivé buněčné linie. Proto se nejdříve začalo s testováním cytotoxicity různých koncentrací naftazarinu a plumbaginu na PNT1A a PC3 buňky. Celkem byly provedeny dva testy.

9.2.1 Testování pomocí systému xCELLigence

Na grafech níže jsou vidět výsledky impedančního měření vzorků buněčných linií PNT1A a PC3, na které byl aplikován určitý objem cytotoxinu. Délka každé analýzy činila cca 100 hodin.

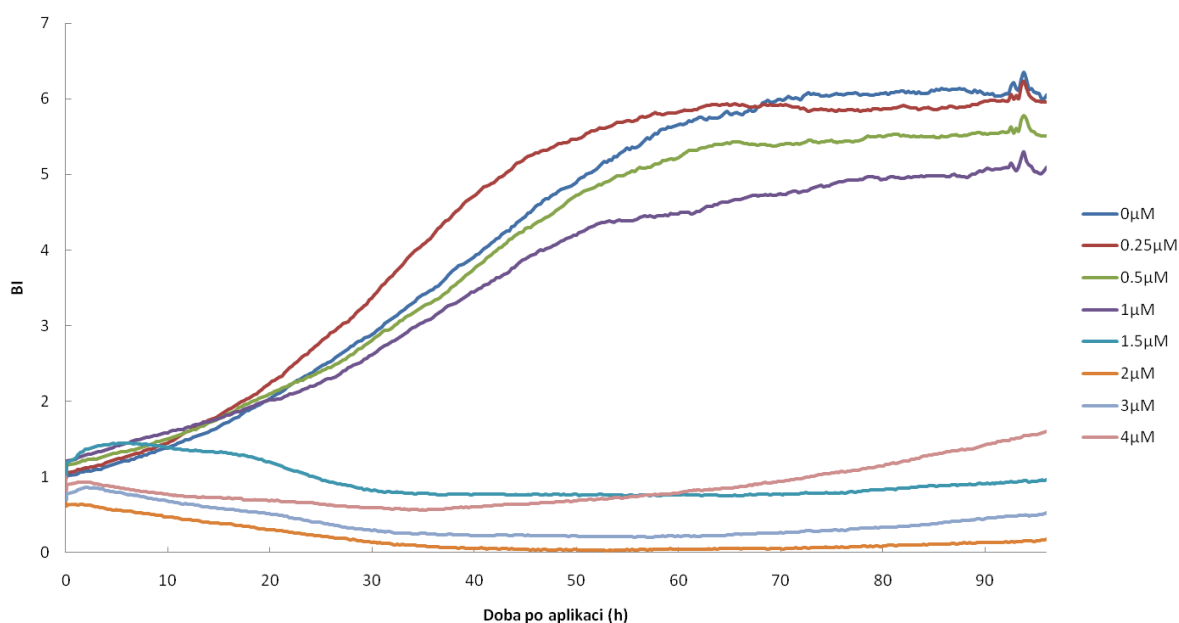
Hlavním parametrem analýzy je BI. BI reprezentuje status buňky, který je založený na měření relativní změny impedance. Ta se objevuje za přítomnosti nebo absence buněk v jamkách. Změna impedance obecně závisí na dvou faktorech:

- Počet buněk uchycených na elektrodách:** V případě, že by se na povrchu elektrody neobjevila žádná buňka, impedance bude nulová. Ale se vzrůstajícím počtem zachycených buněk (proliferace) se zvyšuje impedance – zvyšuje se BI. Pokud však dojde k buněčné smrti nebo přidání cytotoxinu, BI se snižuje. [61]
- Změna dimenzionality uchycených buněk:** Bez ohledu na počet buněk, změna dimenzionality uchycených buněk bude vést ke změně BI. Přidané toxiny mohou

¹ Po dohodě s vedoucím práce, byl juglon zaměněn za naftazarin.

způsobit rozšiřování buněk nebo naopak jejich shlukování, což by automaticky vedlo k zvýšení BI. [61]

Obr. 15 ukazuje růstové křivky, a jak dochází k neustálému růstu impedance u vzorků buněk s objemy plumbaginu od 0,25–1 μM (průběh je podobný růstové křivce kontroly). Tento růst znamená, že koncentrace plumbaginu u těchto vzorků byla příliš nízká na to, aby ovlivnila proliferaci buněk. Na druhou stranu koncentrace 1,5–4 μM plumbaginu působí na buňky cytotoxicky. Buňky dosahují stacionární fáze hned po prvních hodinách. Jejich aktivita klesá až do cca 35. hodiny, od které je sledována obnovená buněčná aktivita.



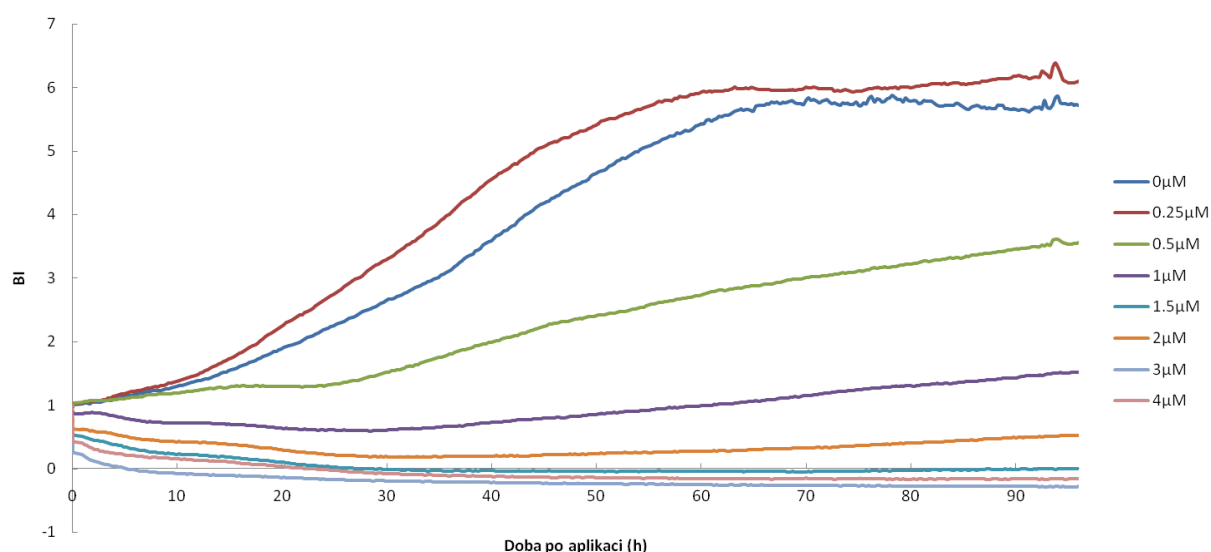
Obr. 15 Graf závislosti BI buněk PNT1A na čase po přidání plumbaginu

Další parametr, který byl sledován, byl IC_{50} . Ten měří efektivitu inhibice sloučeniny. Jinými slovy, je to koncentrace látky potřebná k 50 % inhibici. Pro plumbagin působící na PNT1A buňky je to $1,88 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Tab. 2).

Tab. 2 IC_{50} plumbaginu na PNT1A buňkách

$\text{IC}_{50} \text{ (M)}$			
24h-72h po přidání látky	24h-96h po přidání látky	48h-72h po přidání látky	48h-96h po přidání látky
$2,13 \cdot 10^{-6}$	$2,01 \cdot 10^{-6}$	$2,03 \cdot 10^{-6}$	$1,95 \cdot 10^{-6}$
12h po přidání látky	24h po přidání látky	48h po přidání látky	72h po přidání látky
$8,10 \cdot 10^{-6}$	$2,78 \cdot 10^{-6}$	$2,21 \cdot 10^{-6}$	$1,88 \cdot 10^{-6}$

Na Obr. 16 je vidět, že je naftazarin při styku s buňkami PNT1A cytotoxičtější než plumbagin. U koncentrací 0,25 μM a 0,5 μM je zaznamenána vzrůstající aktivita. Vzorek bez naftazarinu (kontrola) a s 0,25 μM naftazarinu dosahuje stacionární fáze kolem 60. hodiny, poté nejspíše kvůli vyčerpání živin, přechází do fáze odumírání. Vzorek s koncentrací 0,5 μM je poslední, který od počátku ještě roste. U zbývajících koncentrací (1–4 μM) dochází k poklesu proliferace, avšak u buněk s přidaným 1 μM a 2 μM naftazarinu dochází kolem 30. hodiny k obnovení buněčného růstu. Za povšimnutí stojí koncentrace 1,5 μM , 3 μM a 4 μM naftazarinu. Na jejich růstových křivkách je vidět okamžitý pokles impedance k nule už ve 20. hodině. V případě 3 μM naftazarinu, je nulová aktivita zaznamenána kolem 5. hodiny.



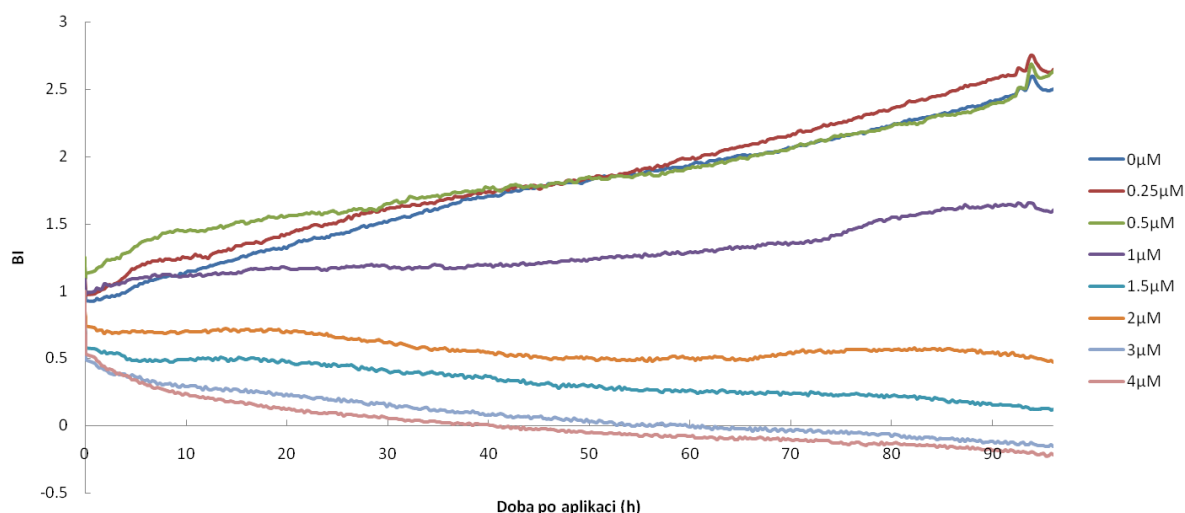
Obr. 16 Graf závislosti BI buněk PNT1A na čase po přidání naftazarinu

Nejmenší koncentrace naftazarinu, při které dojde k úmrtí poloviny populace PNT1A buněk je $8,43 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (Tab. 3).

Tab. 3 IC_{50} naftazarinu na PNT1A buňkách

$\text{IC}_{50} \text{ (M)}$			
24h-72h po přidání látky	24h-96h po přidání látky	48h-72h po přidání látky	48h-96h po přidání látky
$8,99 \cdot 10^{-7}$	$9,10 \cdot 10^{-7}$	$8,44 \cdot 10^{-7}$	$8,87 \cdot 10^{-7}$
12h po přidání látky	24h po přidání látky	48h po přidání látky	72h po přidání látky
$1,87 \cdot 10^{-6}$	$1,09 \cdot 10^{-6}$	$9,11 \cdot 10^{-7}$	$8,43 \cdot 10^{-7}$

Růstové křivky na následujícím grafu (Obr. 17) ukazují, jak pro koncentrace plumbaginu 0,25 μM a 0,5 μM je proliferace buněk nezměněna (dochází k neustálému růstu), která je téměř shodná s průběhem růstové křivky pro kontrolu. U koncentrace 1 μM plumbaginu však už dochází k zpomalení růstu buněk (křivka je méně strmá). Koncentrace 1,5–4 μM plumbaginu, jak je vidět z grafu, působí toxicky (jejich růstové křivky klesají). U posledních dvou koncentrací, 3 μM a 4 μM plumbaginu, se buněčná aktivita dostává na nulu kolem 40. hodiny (4 μM) a 60. hodiny (3 μM).



Obr. 17 Graf závislosti BI buněk PC3 na čase po přidání plumbaginu

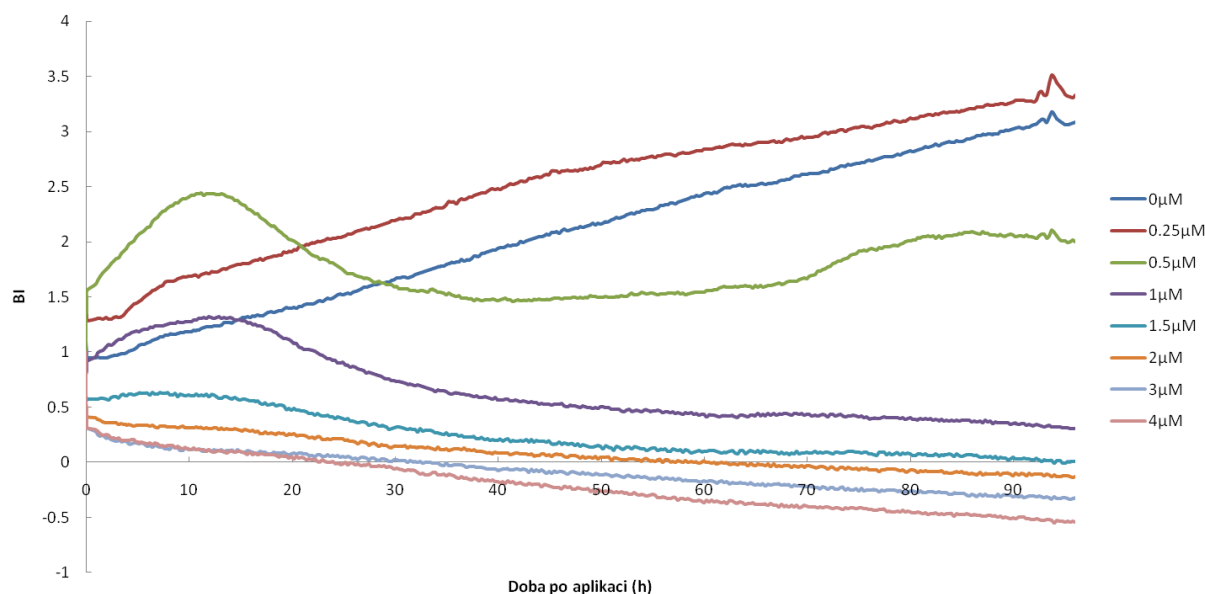
Spolu s růstovými křivkami byly zaznamenávány i hodnoty IC_{50} . V Tab. 4 jsou vidět hodnoty IC_{50} naměřené v určitém rozmezí hodin. Výsledná hodnota koncentrace, při které dochází k odumření 50% buněk linie PC3, na které byl aplikován plumbagin, byla určena jako $2,83 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Tab. 4).

Tab. 4 IC_{50} plumbaginu na PC3 buňkách

$\text{IC}_{50} \text{ (M)}$			
24h-72h po přidání látky	24h-96h po přidání látky	48h-72h po přidání látky	48h-96h po přidání látky
$3,17 \cdot 10^{-6}$	$2,99 \cdot 10^{-6}$	$2,85 \cdot 10^{-6}$	$2,84 \cdot 10^{-6}$
12h po přidání látky	24h po přidání látky	48h po přidání látky	72h po přidání látky
$9,64 \cdot 10^{-6}$	$6,25 \cdot 10^{-6}$	$2,98 \cdot 10^{-6}$	$2,83 \cdot 10^{-6}$

Poslední graf (Obr. 18) obsahuje růstové křivky pro různé koncentrace přidaného naftazarinu k PC3 buňkám. U buněk kontroly a s 0,25 μM naftazarinu nevidíme žádnou

změnu – buňky neustále proliferují. Růstové křivky jsou neustále rostoucí. U koncentrace 0,5 μM dochází k mírnému ovlivnění naftazarinem. Buňky s touto koncentrací vstupují do stacionární fáze ve 12. hodině a následně jejich aktivita klesá (vlivem cytotoxicity nebo vyčerpáním živin), aby se v 70. hodině znovu obnovila. Podobný děj probíhá u buněk s koncentrací 1 μM naftazarinu s tím rozdílem, že po překročení stacionární fáze se růst neobnovuje. Aktivita zde klesá. Aktivita klesá i u 1,5–4 μM naftazarinu a dosahuje nuly nejdříve ve 20. hodině (4 μM).



Obr. 18 Graf závislosti BI buněk PC3 na čase po přidání naftazarinu

Stejně jako v předcházejícím případě i pro naftazarin byly zaznamenávány hodnoty IC_{50} . Pro naftazarin byla určena hodnota koncentrace, při které je inhibováno 50 % populace buněk PC3, jako $1,15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Tab. 5).

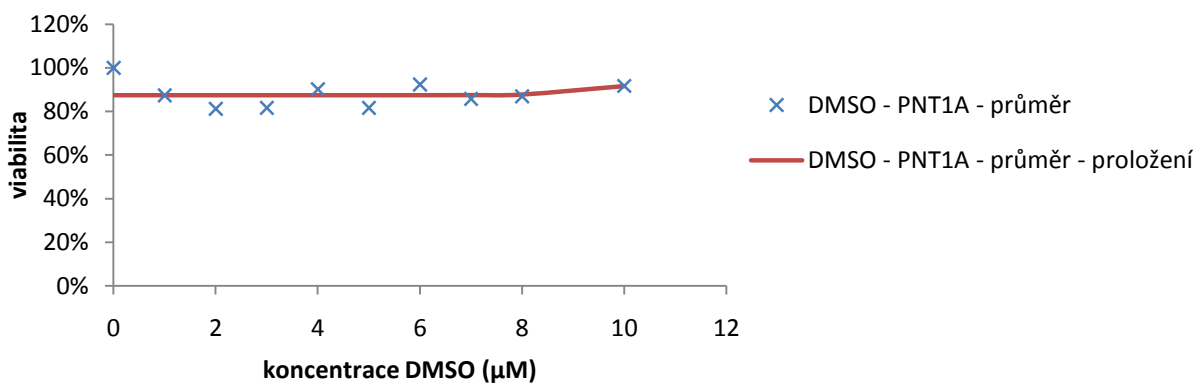
Tab. 5 IC_{50} naftazarinu na PC3 buňkách

$\text{IC}_{50} \text{ (M)}$			
24h-72h po přidání látky	24h-96h po přidání látky	48h-72h po přidání látky	48h-96h po přidání látky
$1,35 \cdot 10^{-6}$	$1,26 \cdot 10^{-6}$	$1,17 \cdot 10^{-6}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$
12h po přidání látky	24h po přidání látky	48h po přidání látky	72h po přidání látky
$8,13 \cdot 10^{-6}$	$2,99 \cdot 10^{-6}$	$1,30 \cdot 10^{-6}$	$1,15 \cdot 10^{-6}$

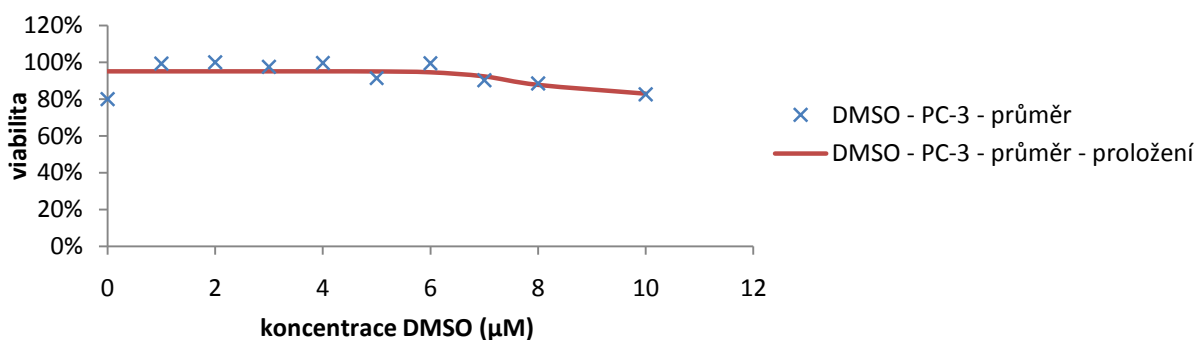
9.2.2 MTT test

Druhým testem cytotoxického působení plumbaginu a naftazarinu na PNT1A a PC3 buňkách byl MTT test.

Před samotným testováním plumbaginu a naftazarinu bylo nutné otestovat rozpouštědlo, kterým se naftochinony rozpouštěly. Naftochinony není možné rozpustit ve vodě, proto se muselo použít jiné rozpouštědlo. Tím byl dimethylsulfoxid neboli DMSO. Kvůli tomu, aby se vyloučil jakýkoliv vliv DMSO na buněčné linie, se nejdříve testovalo působení různých koncentrací DMSO na plumbagin a naftazarin (Obr. 19, Obr. 20). Dle těchto grafů se dá říct, že po přidání různých koncentrací DMSO k buňkám nedochází k jejich ovlivnění rozpouštědlem (lehký pokles viability při použití 7 μ M a výše, viditelný na Obr. 20, je stále v normě).



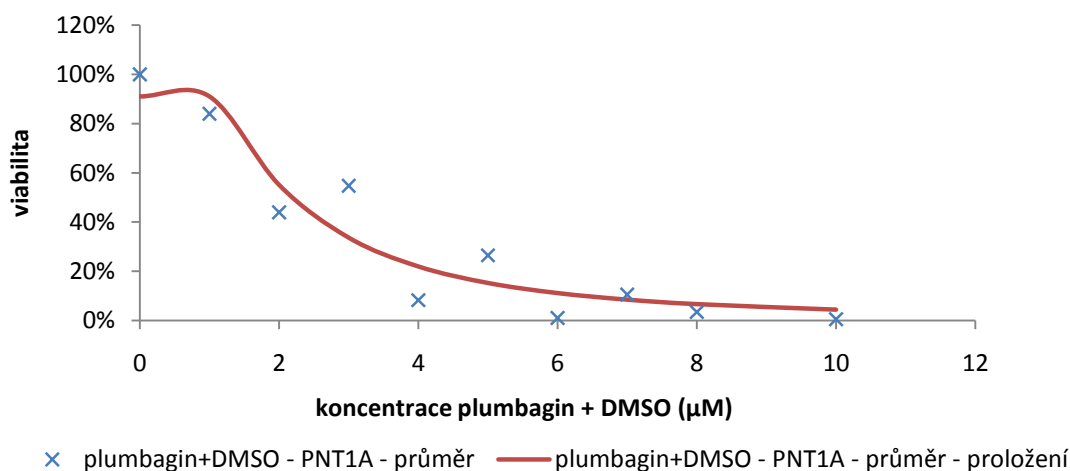
Obr. 19 Působení DMSO na PNT1A buňky



Obr. 20 Působení DMSO na PC3 buňky

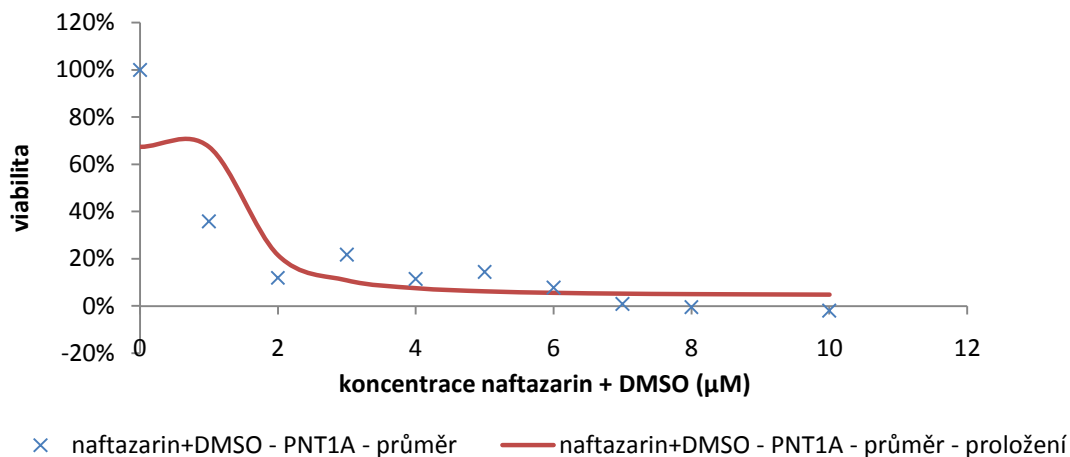
Po uspokojivém otestování DMSO se přešlo k testování plumbaginu a naftazarinu.

Na následujícím grafu (Obr. 21) je vidět, jak hned po přidání první dávky plumbaginu dochází k poklesu viability buněk linie PNT1A. IC_{50} , koncentrace plumbaginu, při které dojde k úmrtí 50% buněk je 1,9 μM .



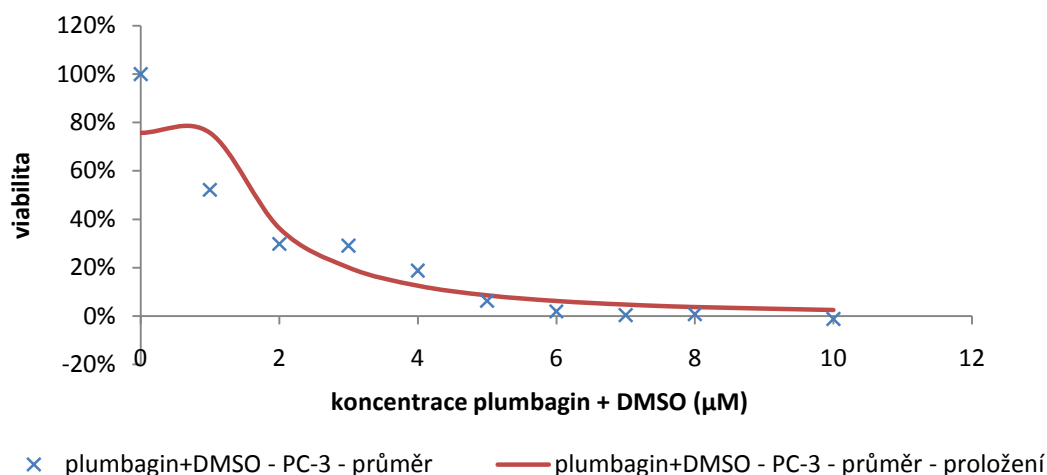
Obr. 21 Působení DMSO a plumbaginu na PNT1A buňky

Kdyby se porovnaly grafy působení plumbaginu (Obr. 21) a naftazarinu (Obr. 22) na PNT1A buňky, dalo by se říct, že naftazarin působí efektivněji. A to z toho důvodu, že došlo k úmrtí více než 50% buněk hned po první dávce naftazarinu o objemu 1 μM . IC_{50} je v tomto případě 1 μM . Celkový průběh křivky se rychleji blíží k 0 % viabilitě buněk PNT1A.



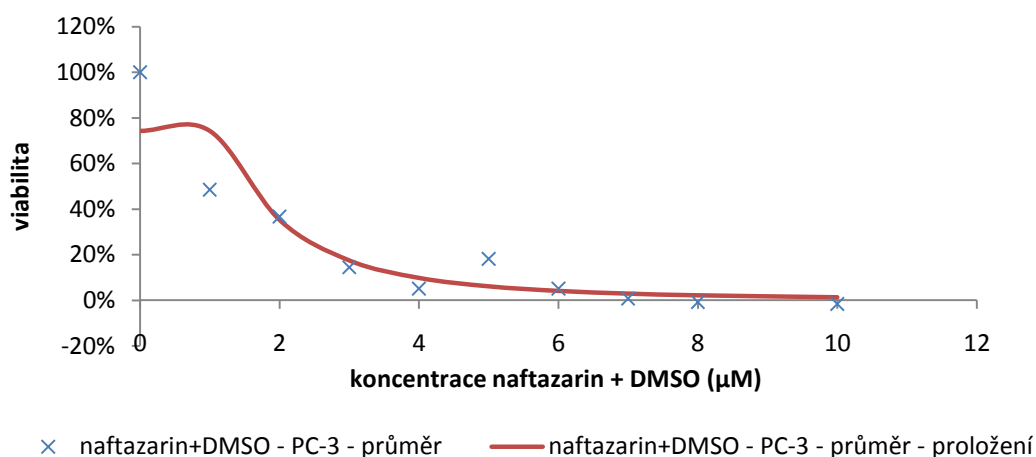
Obr. 22 Působení DMSO a naftazarinu na PNT1A buňky

Jako další v pořadí se testovalo cytotoxické působení naftochinonů na linii PC3 buněk. Při testování cytotoxicity plumbaginu na PC3 buňkách se ukázalo, že také po první dávce cytotoxinu dochází k značnému poklesu viability prostatických rakovinných buněk. IC_{50} pro plumbagin bylo 1,2 μM (Obr. 23). Viabilita PC3 buněk byla téměř nulová až po přidání 6 μM plumbaginu.



Obr. 23 Působení DMSO a plumbaginu na PC3 buňky

Na Obr. 24 je znázorněno působení naftazarinu na PC3 buňky. Viabilita klesá pod 50 % hned po podání první koncentrace naftazarinu. Hodnota této koncentrace byla 1,5 μM. Životaschopnost buněk dosáhla 0 % po podání 7 μM naftazarinu.



Obr. 24 Působení DMSO a naftazarinu na PC3 buňky

9.3 Vizualizace buněk

Kromě cytotoxických testů se zkoumalo působení naftazarinu a plumbaginu pomocí fluorescenční mikroskopie. Jejich působení bylo zkoumání pomocí 4 vybraných parametrů:

- ***Peroxidace lipidů (PL)***

Pro zviditelnění PL bylo použito barvivo BODIPY[®] 581/591 C11 (finální koncentrace 50 μM). Díky oxidaci polysaturované butadienylové části barviva dochází k posunu fluorescenční emise od červené (~590 nm) k zelené (~510 nm) části spektra. [62]

- ***Reaktivní formy dusíku (RFD)***

K detekci RFD byl použit 2,3-diaminonaftalen (finální koncentrace 50 μM). Tento detektor oxidu dusnatého reaguje s kationtem dusnatým a spolu tvoří fluorescenční produkt 1H-naftotriazol s excitačním maximem v ~ 365 nm a emisním maximem v ~ 415 nm. [63]

- ***Reaktivní formy kyslíku (RFK)***

Pro detekci RFK byla použita CellROX[®] fluorescenční sonda (finální koncentrace 50 μM). Toto buňkou pronikající barvivo v redukovaném stavu nevyzařuje žádnou fluorescenci. Po jeho oxidaci, která je způsobená RFK už k fluorescenci dochází s excitačním maximem v ~ 644 nm a emisním maximem v ~ 665 nm. [64]

- ***Mitochondriální potenciál (MP)***

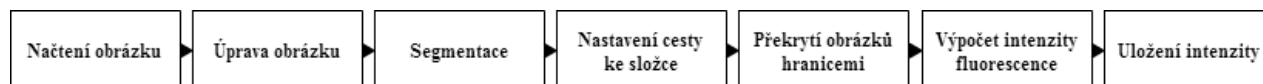
Barvivo Rhodamine 123 (finální koncentrace 30 μM) bylo použito pro detekci mitochondriálního potenciálu. Toto použití je založeno na faktu, že se Rhodamine 123 akumuluje v membránách mitochondrií v závislosti na změně potenciálu. Jeho excitační maximum je v ~ 505 nm a emisní maximum je v ~ 560 nm. [65]

9.3.1 Postup práce s buňkami

Buňky byly opláchnuty čerstvým médiem a kultivovány po dobu jedné hodiny v temnu s médiem obsahujícím výše uvedené finální koncentrace jednotlivých senzorů. Následně byly třikrát opláchnuty v PBS. Každá z buněčných linií byla ošetřena určitým objemem plumbaginu a naftazarinu. Ke kulturám PNT1A a PC3 se postupně přidalo 0,5 μM , 1 μM , 2 μM a 4 μM cytotoxinu. Buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem Axioskop 40 (Zeiss, Německo) za použití širokopásmové excitace a sady příslušných emisních filtrů. Tyto snímky byly následně analyzovány.

10 Analýza obrazových dat

Intenzita fluorescence buněk na snímcích z fluorescenčního mikroskopu byla analyzována pomocí programu (Obr. 25), který byl vytvořený v programovacím prostředí Matlab (R2011a).



Obr. 25 Diagram segmentačního programu

Základní myšlenkou bylo vytvořit program, který určitým způsobem určí hranice kolem buněk a ty se pak použijí pro zjištění intenzity fluorescence právě v těchto oblastech.

10.1 Struktura programu

- *Načtení obrázku*

Vstupem tohoto programu je obrázek ve formátu TIF. Po jeho načtení dochází k jeho převodu do datového formátu `double`. To znamená, že je obrázek reprezentován maticí, ve které má každý element hodnotu korespondující s tím jak světle/tmavě by pixel na stejné pozici měl být obarven. Převod na datový typ `double` přiřazuje každému pixelu hodnotu mezi 0 a 1, kde 0 je černá barva a 1 je bílá barva.

- *Úprava obrázku*

Dále bylo nutné odstranit z načteného obrázku alfa kanál (transparentnost), který byl pro další zpracování bezvýznamný a navíc zabraňoval dalšímu zpracování. Takto upravený obrázek (Obr. 26) byl převeden na šedotónový. Obvykle se při převádění na šedotónový obrázek využívá příkaz `rgb2grey`, který pro výpočet zářivosti snímku využívá algoritmus:

$$0,2989 \cdot R + 0,5870 \cdot G + 0,1140 \cdot B,$$

kde R je červená složka, G je zelená složka, B je modrá složka obrázku.

V podstatě jde o průměrování hodnot, ale váhované. Váhování je tu použito kvůli způsobu jakým člověk vnímá barvy. Lidské vidění je citlivější k zelené barvě, proto je zelená barva v algoritmu váhována silněji než ostatní barvy. V tomto programu bylo ale místo váhovaného průměrování použito k získání šedotónového snímku klasické průměrování:

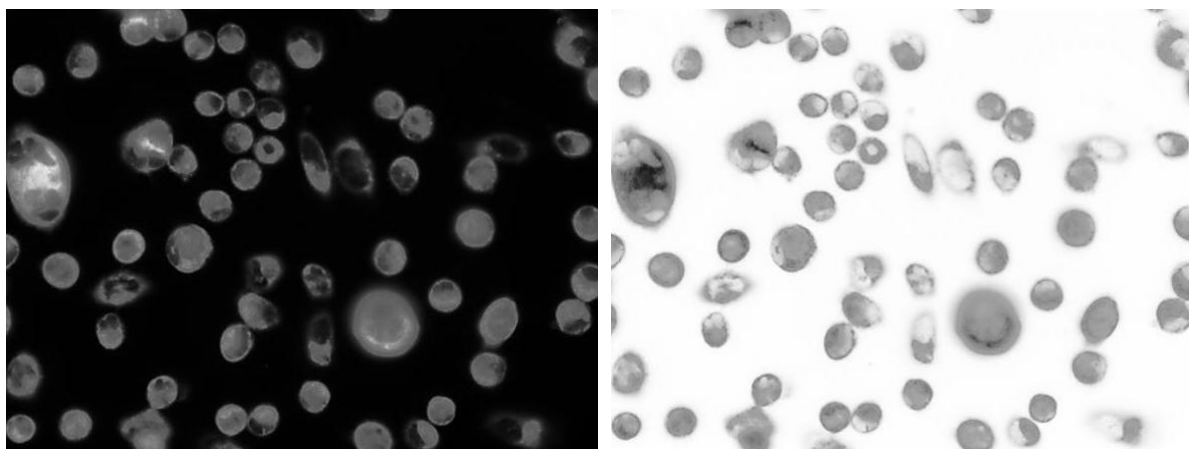
$$(R + G + B) / 3,$$

kde R je červená složka, G je zelená složka, B je modrá složka obrázku.

Obyčejné průměrování bylo použito z toho důvodu, že se analyzovaly snímky, které vyzařovaly v oblasti červené, zelené nebo modré části spektra. Ručně přepisovat příkazy, podle toho v jakém kanálu by se analyzovalo, by bylo namáhavé a zbytečné. Proto bylo místo toho použito průměrování, které převede barevný obrázek na šedotónový, vypočítáním průměru ze tří základních barev. Tím pádem je možné použít tento převod universálně pro všechny snímky – vždy dostaneme šedotónový snímek vzniklý průměrem jednotlivých barevných složek ve stejném poměru.

Problém s převodem nastal u snímků buněk s PL. Zde docházelo vlivem cytotoxinu ke změně vyzařování fluorescenčního barviva od červené k zelené. Proto, když bylo použito průměrování na těchto snímcích, docházelo k tomu, že výsledné intensity jednotlivých snímků byly v postatě na stejné úrovni. To se stalo proto, že se počítal průměr ze všech barev. Výsledné intensity tudíž nereflektovaly nástup PL, který se projevoval přechodem do zelené části spektra (11.1). Tento problém byl vyřešen tak, že se hodnoty pro snímky s PL analyzovaly zvlášť, za použití pouze zeleného kanálu, v programu, který je strukturou i funkcemi shodný s tímto.

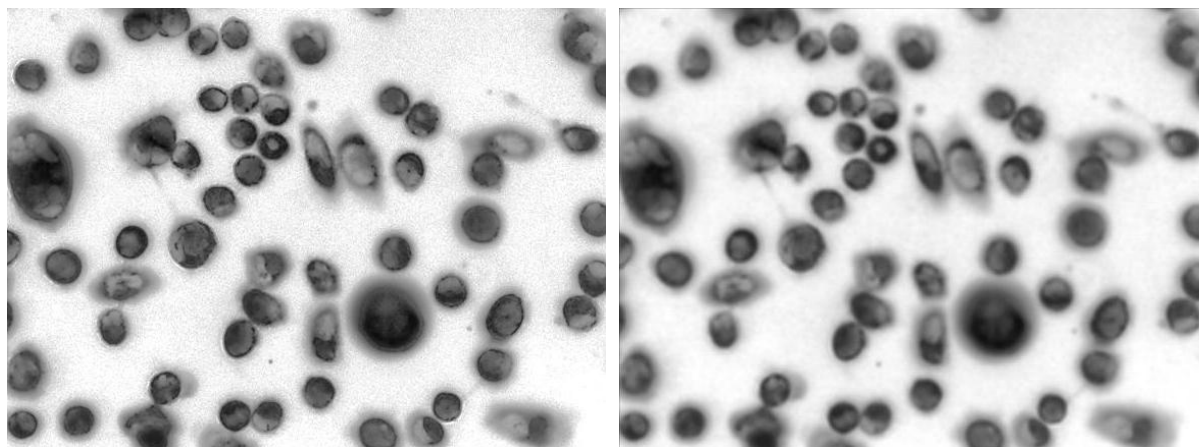
Po převodu snímku na šedotónové byl vytvořen obrázek k němu komplementární (buňky jsou lépe rozeznatelné).



Obr. 26 Šedotónový (vlevo) a k němu komplementární (vlevo) obrázek buněk

Tento komplementární obrázek je následně ekvalizován (Obr. 27). Ekvalizace je proces, ve kterém je distribuce úrovní šedi změněna tak, že dojde k vzniku uniformního („plochého“) histogramu obrázku. To znamená, že procento pixelů všech úrovní šedi je více méně stejné. U obrázků určených pro analýzu byla použita lokální ekvalizace na místo globální, která využívá transformační funkci (jako look-up table) na všechny pixely v obrázku. Zde bylo ale

žádoucí zlepšit detaily v malých oblastech než globálně celý obraz. Proto se použila lokální ekvalizace. V Matlabu je možné lokální ekvalizaci nalézt jako příkaz `adapthisteq` a jeho princip je takový, že se vytvoří okno (většinou čtvercové), které se pohybuje po obrázku. Pro každý pixel (ten je zarovnáný se středem okna) je vypočítán histogram okolí odděleného oknem. Vypočítá se mapovací funkce a referenční pixel je přemapován novou hodnotou získanou transformační funkcí. Nevýhodou použití lokální ekvalizace byla větší výpočetní náročnost a někdy docházelo k zašumění obrázku.



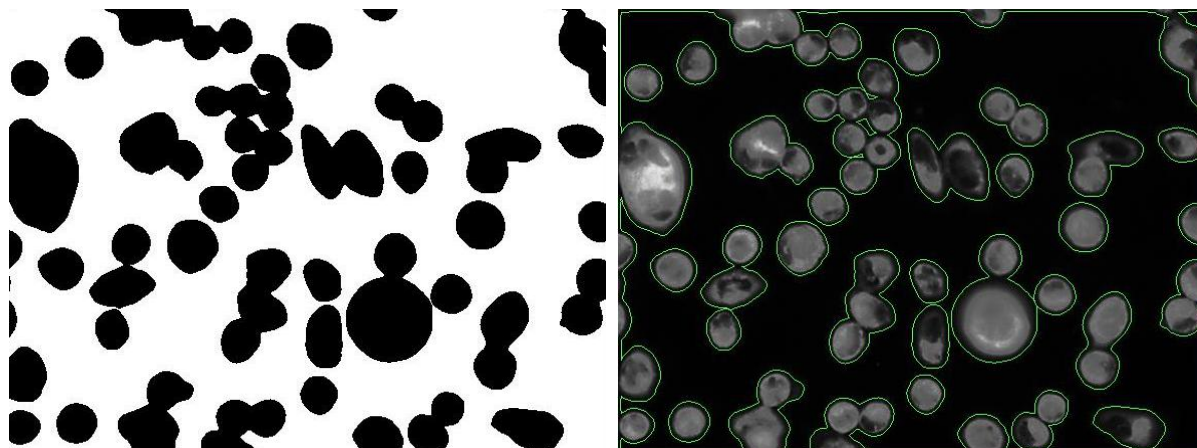
Obr. 27 Komplementární obrázek po ekvalizaci (vlevo) a následné filtraci (vpravo)

Obr. 27 (vlevo) ukazuje, jak došlo po ekvalizaci k zvýšení kontrastu v obraze. Bohužel, spolu s tím se objevilo i zašumění, která však lze odstranit (omezit) filtrací. Pro tento účel byl vybrán průměrovací filtr o velikosti 5x5, které mu se také říká vyhlazovací – redukuje velikost rozdílu intenzit mezi jedním pixelem a dalším (Obr. 27 - vpravo). [66]

Po filtraci se přešlo k převodu obrázku na binární a to pomocí příkazu `im2bw`. Vstupem je filtrovaný obrázek a tzv. úroveň (level), což je výstup po zjištění optimálního prahu filtrovaného obrázku pomocí metody Otsu (příkaz `graythresh`). Tato metoda se využívá pro prahování. Je jednoduchá a výpočetně nenáročná. Metoda Otsu vyhledává optimální práh na základě výpočtu rozptylu dvou skupin pixelů, které jsou odděleny prahovacím operátorem.

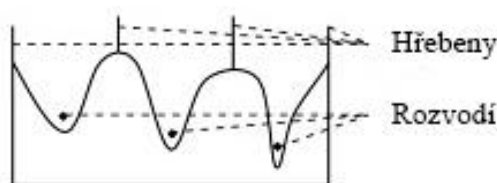
- ***Segmentování***

V této chvíli je k dispozici binární obraz, ze kterého jdou jednoduše určit kontury buněk. Jak je ale vidět na Obr. 28 vpravo, některé kontury zahrnují více než jednu buňku, což není žádoucí. V tomto případě pomůže k lepší segmentaci jednotlivých buněk tzv. metoda rozvodí.



Obr. 28 Binární obrázek (vlevo) a z něj vytvořené kontury (vpravo) přeložené na původní šedotónový snímek

Metoda rozvodí je speciální segmentační postup, kde je obraz chápán jako reliéf, v němž hřebeny odpovídají hranicím oblastí. Pro pochopení je dobré si představit, že v místech minim jsou „vyvrtané“ díry a z těchto děr přitéká voda, zaplňuje rozvodí, až dojde k ponoření povrchu. „Povodeň“ se zastaví o hřebeny, které tvoří hranice segmentovaných oblastí (Obr. 29).



Obr. 29 Profil obrazových dat

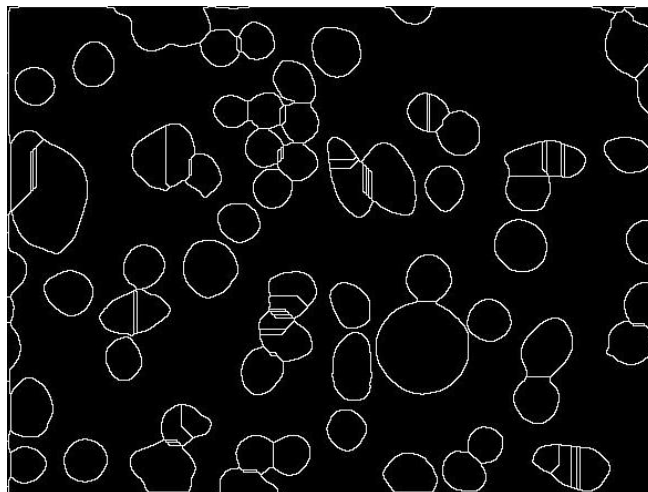
Metoda rozvodí produkuje celkem dobré výsledky pro šedotónové snímky s různými minimy a rozvodími. Pro binární obrázky ale existují jenom dva odstíny šedi, 0 a 1 (černá a bílá). V případě, že jsou dvě buňky spojené a tvoří spojený útvar, při použití metody rozvodí se u nich vytvoří jenom jedno minimum a rozvodí. K tomu, aby se spojené buňky vysegmentovaly zvlášť, je před použitím metody rozvodí nutné použít tzv. transformaci vzdálenosti (v Matlabu příkaz `bwdist`), která počítá pro každý pixel vzdálenost k nejbližšímu nenulovému pixelu. Existuje mnoho různých způsobů počítání vzdálenosti mezi pixely. V tomto programu se používala euklidovská vzdálenost.

Celý proces segmentace metodou rozvodí je tedy následující:

1. Konverze obrazu na binární.
2. Vytvoření komplementárního obrazu (v našem případě to už není třeba, bylo to provedeno na začátku v rámci předzpracování).

3. Výpočet transformace vzdálenosti komplementárního obrazu.
4. Použití metody rozvodí (příkaz `watershed`).

[67]



Obr. 30 Výsledek segmentace metodou rozvodí

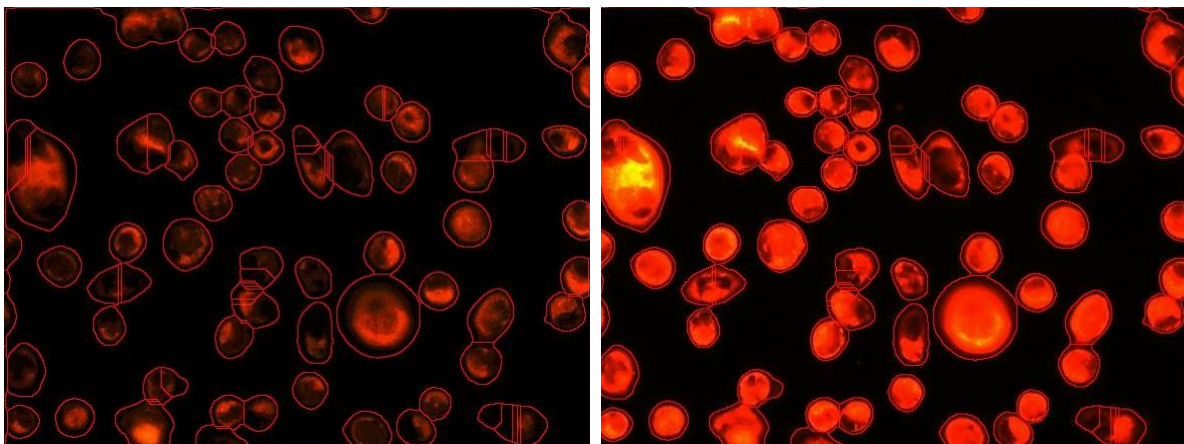
Metoda rozvodí je vcelku spolehlivá metoda segmentace (Obr. 30), ale má také řadu nevýhod:

1. **Přesegmentování** – základní metoda rozvodí pracuje dobře v případě, že každé lokální minimum koresponduje s objektem zájmu (buňkou). Potom každá čára rozvodí reprezentuje hranici kolem objektu. Ale pokud je na obrázku příliš mnoho minim (více než objektů), dojde k přesegmentování (Obr. 30). Řeší se to použitím markerů (10.1.1). [68]
2. **Citlivost na šum** – šum v obraze je hlavním důvodem přesegmentování obrazu. Řešením je zařazení filtrace před samotnou segmentací. [68]
3. **Hranice s nízkým kontrastem** – v případě, že není poměr signál šum dostatečně vysoký u kontur zájmu, metoda rozvodí ji nebude schopna detekovat přesně. [68]
4. **Špatná detekce tenkých hran** – jestliže je metoda rozvodí aplikovaná na gradientního snímku, vyhlazování spolu s odhadem gradientu způsobí nesnadnou detekci oblastí s tenkými rozvodími. [68]

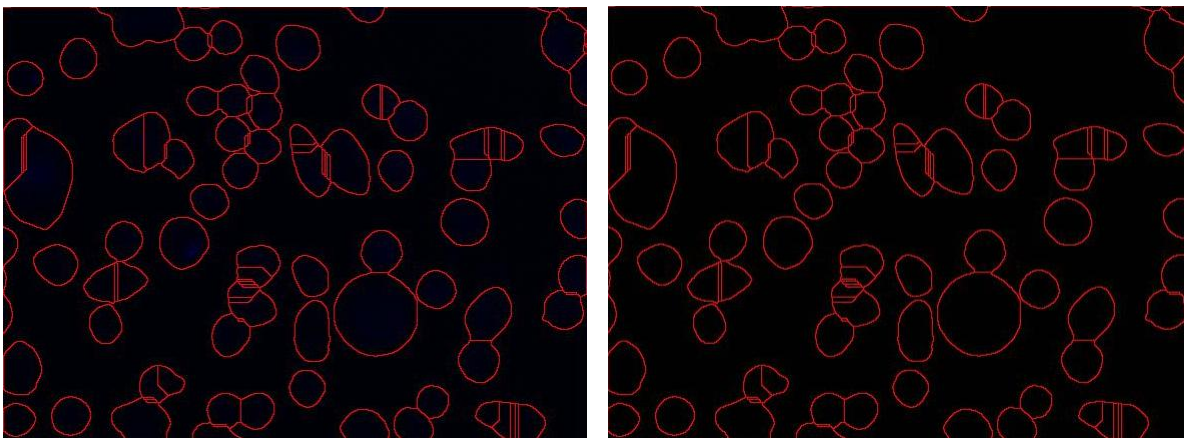
- *Načtení obrázků, jejich překrytí hranicemi a výpočet intenzity*

Po získání hranic se načtou ve `for` cyklu další snímky, u kterých jsme chtěli získat hodnoty intenzit. Postupně je každý obrázek překryt vysegmentovanou hranicí z původního

obrázku a pomocí příkazu `regionprops` se zjistí hodnoty intenzity pixelů v ohraničených oblastech jednotlivých obrázků (Obr. 31, Obr. 32.)



Obr. 31 Výsledek segmentace na obrázku s barvivem pro LP (vlevo) a MP (vpravo)



Obr. 32 Výsledek segmentace na obrázku s barvivem pro RFD (vlevo) a RFK (vpravo)

- ***Uložení hodnot intenzity***

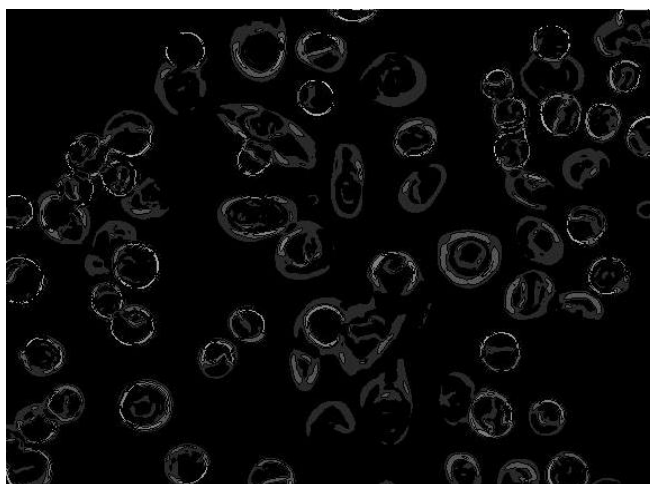
Výstupem celého programu je textový soubor *intensita*, ve kterém jsou hodnoty intenzit uloženy zvlášť pro každý sledovaný parametr.

10.1.1 Vylepšená metoda rozvodí

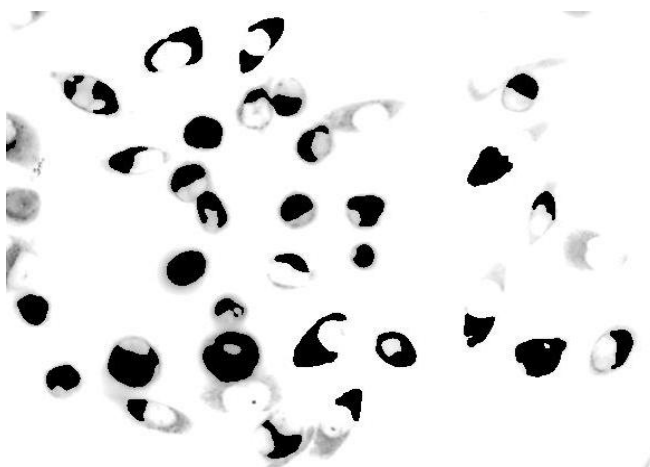
Jak bylo uvedeno výše. Při použití segmentace metodou rozvodí často dochází k přesežmenování obrazu. To se dá omezit jak filtrováním obrazu tak také použitím tzv. „Marker-Controlled Watershed Segmentation“ (metodou rozvodí kontrolovanou markery). Tato metoda je založená na použití interních markerů (místa uvnitř objektů zájmu) a externích markerů (místa umístěna v pozadí). Každý marker umístěný do obrazu bude postupně růst a po finální segmentaci vytvoří rozvodí. Vstupem této metody rozvodí je

obvykle gradient snímku. Výsledný obrázek má velké hodnoty pixelů v okolí hran objektů a malé hodnoty pixelů všude jinde (Obr. 33). Účelem použití gradientového snímku je ponechat jenom ty nejdůležitější kontury v oblasti zájmu mezi markery. V tomto programu byl gradient snímku získán pomocí Sobelovi hranové masky, příkazu `imfilter` a jednoduché aritmetiky. [69]

Po vytvoření gradientu se přešlo k eliminaci velkého počtu minim, které byly často velmi „mělké“ a reprezentovaly nepotřebné detaily. K jejich odstranění se použil příkaz `imextendedmin`, který vypočítal sadu bodů v obraze ležících hlouběji než jejich okolí (dané prahem). Výstupem je binární obrázek nalezených minim (Obr. 34). Na Obr. 34 je vidět, že ne ve všech buňkách byl vytvořen marker. To bylo způsobené tím, že při použití prahu pro jejich nalezení nebylo možné nalézt takovou hodnotu prahu, při které by byly označeny všechny buňky. Cílem tedy bylo nalézt takovou hodnotou prahu, při které je označeno nejvíce buněk. [69]



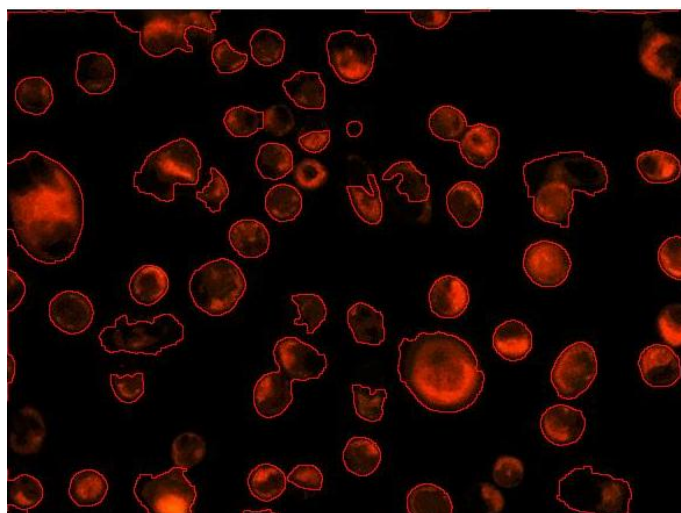
Obr. 33 Příklad gradientu snímku



Obr. 34 Příklad nalezení vnitřních markerů

Dalším krokem segmentace je nalezení externích markerů. To se provede tak, že se aplikuje metoda rozvodí na vzdálenostní transformaci obrázku interních markerů, kde jsou výstupem čáry „přehrad“ ležící právě na půl cesty k minimům. Jinými slovy. Najdou se pixely, které jsou přesně na půl cesty k interním markerům. [69]

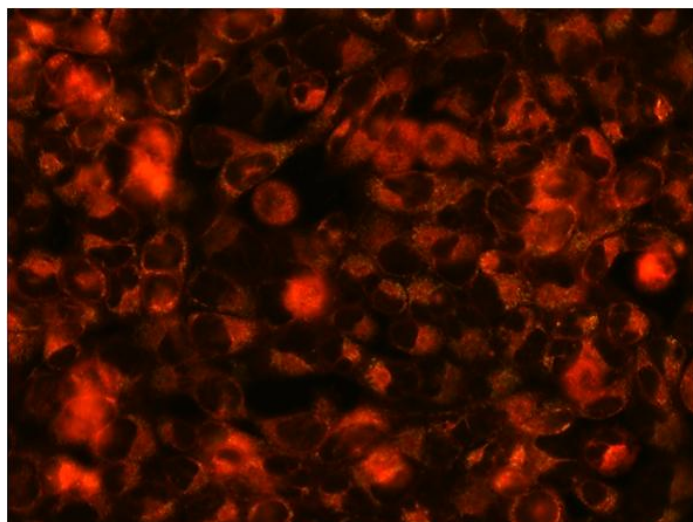
Takto nalezené markery se použijí k modifikaci gradientu obrázku. Modifikace je provedena za pomoci metody „minima imposition“. Tato technika modifikuje obrázek tak, že se jeho minima objeví jenom v označených oblastech (v tomto případě na místech externích i interních markerů). Nakonec se znovu použije metoda rozvodí na markery modifikovaný gradient obrázku. Výsledek je viditelný na obrázku níže (Obr. 35). [69]



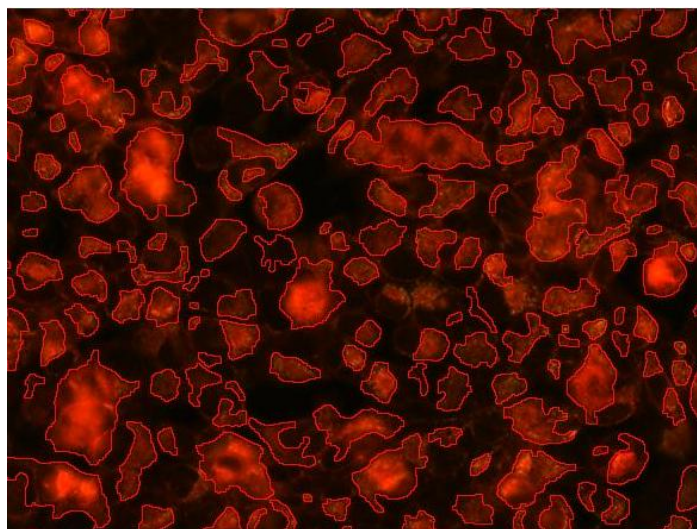
Obr. 35 Výsledek segmentace pomocí Marker-Controlled Watershed Segmentation

Na Obr. 37 můžeme vidět, že i při použití této metody dochází k nedokonalé segmentaci. Některé buňky jsou vysegmentované jen z části nebo, což se objevuje zřídka, nejsou vysegmentované vůbec. Vzhledem k ne moc dobré kvalitě snímků buněk (Obr. 36) a také jejich velké variabilitě (ne všechny snímky obsahují buňky jenom v jedné vrstvě a s dobře rozaznatelnými hranicemi i v případě jejich spojení) bylo cílem „spíše než „dokonalá segmentace“ každé buňky, segmentace, co největšího počtu buněk na snímcích (Obr. 37). To bylo také důvodem použití obou metod rozvodí. Některé snímky byly lépe segmentovatelné pouze jednou z metodou. Co se týče výsledků. Nakonec byly použity hodnoty získané tou metodou, která vysegmentovala nejvíce buněk bez přílišného přesegmentování.

Obě metody byly tedy používány podle charakteru jednotlivých snímků. Pro každou sadu snímků byly nalezeny optimální hodnoty (ekvalizace, velikost `strel` elementu a hodnota prahu pro nalezení interních markerů), nejvhodnější zdrojový snímek (ten, co se načítá jako první) a metoda pro segmentaci. Všechny tyto údaje jsou shrnuty v tabulkách a umístěny v příloze na CD.



Obr. 36 Příklad hůře segmentovatelného snímku



Obr. 37 Výsledek segmentace hůře segmentovatelného snímku pomocí Marker-Controlled Watershed Segmentation

11 Vyhodnocení výsledků analýzy

Výsledky analýzy získané pomocí vytvořeného programu byly zpracovány a vyneseny do grafů. Parametry, na kterých se hodnotila cytotoxicita obou naftochinonů, jsou peroxidace lipidů (PL), reaktivní formy dusíku (RFD) a kyslíku (RFK) a mitochondriální potenciál (MP).

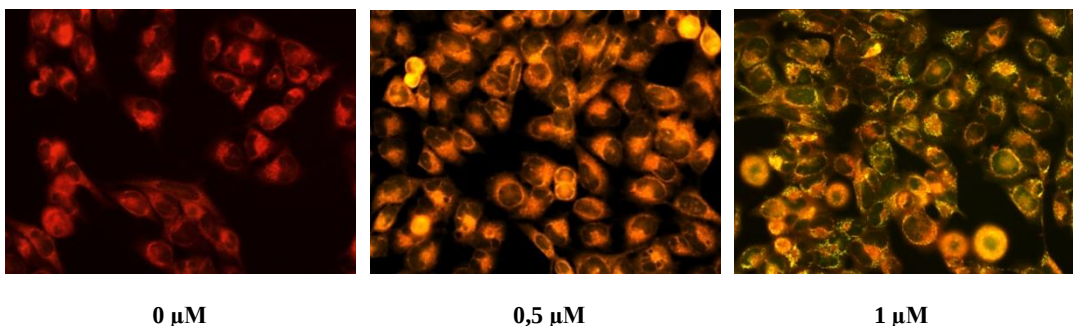
11.1 Peroxidace lipidů

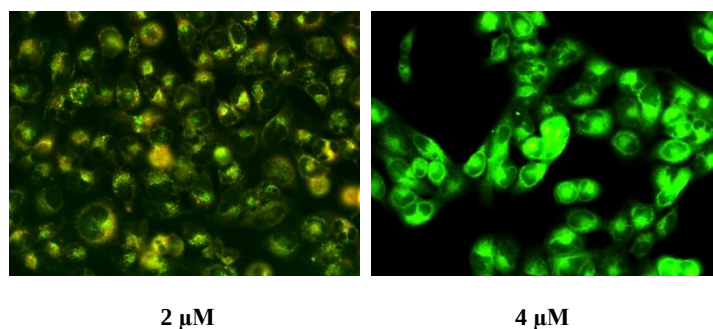
Při peroxidaci lipidů dochází k oxidační degradaci lipidů reaktivními formami kyslíku. Volné radikály odebírají elektrony lipidům umístěným v buněčné membráně, což vede k poškození buňky. Peroxidace ovlivňuje nejen integritu membrány, ale také transdukční cesty a apoptózu. [70]

Na následujících obrázcích (Obr. 38, Obr. 40, Obr. 42, Obr. 44) jsou vidět projevy peroxidace lipidů po aplikaci různých koncentrací plumbaginu a naftazarinu na PC3 a PNT1A buňky. Při oxidaci v buňkách dochází k posunu fluorescence od červené k zelené barvě fenylobutadienových segmentů fluoroforu. Dá se tedy říct, že čím červeněji buňky vyzařují, tím nižší je PL a čím zeleněji vyzařují, tím větší je úroveň PL v buňkách.

11.1.1 Plumbagin na PNT1A buňkách – PL

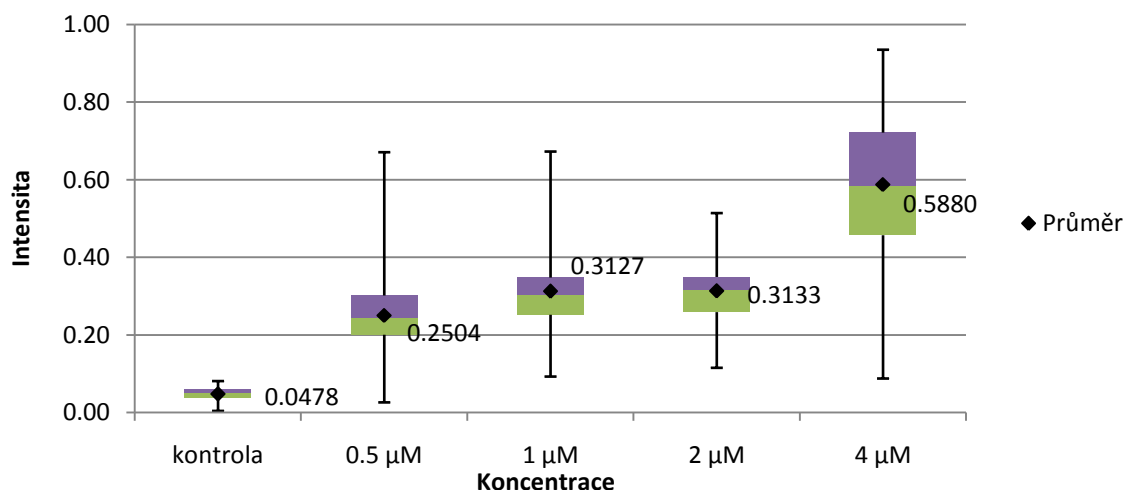
Na Obr. 38 můžeme vidět různé koncentrace plumbaginu aplikované na PNT1A buňky. Jeho působení je zde vyjádřeno pomocí PL. Na snímku kontroly (bez přidavku plumbaginu) je vidět, že zde logicky k žádné peroxidaci zatím nedochází a však po postupném navyšování koncentrace plumbaginu je znatelné čím dál větší vyzařování v oblasti zelené části spektra. Na posledním snímku, kde byla aplikována nejvyšší koncentrace plumbaginu (4 μM) buňky vyzařují jasně zeleně, z čehož se dá soudit, že lipidová peroxidace je zde nejsilnější.





Obr. 38 Peroxidace lipidů - Plumbagin na PNT1A buňkách

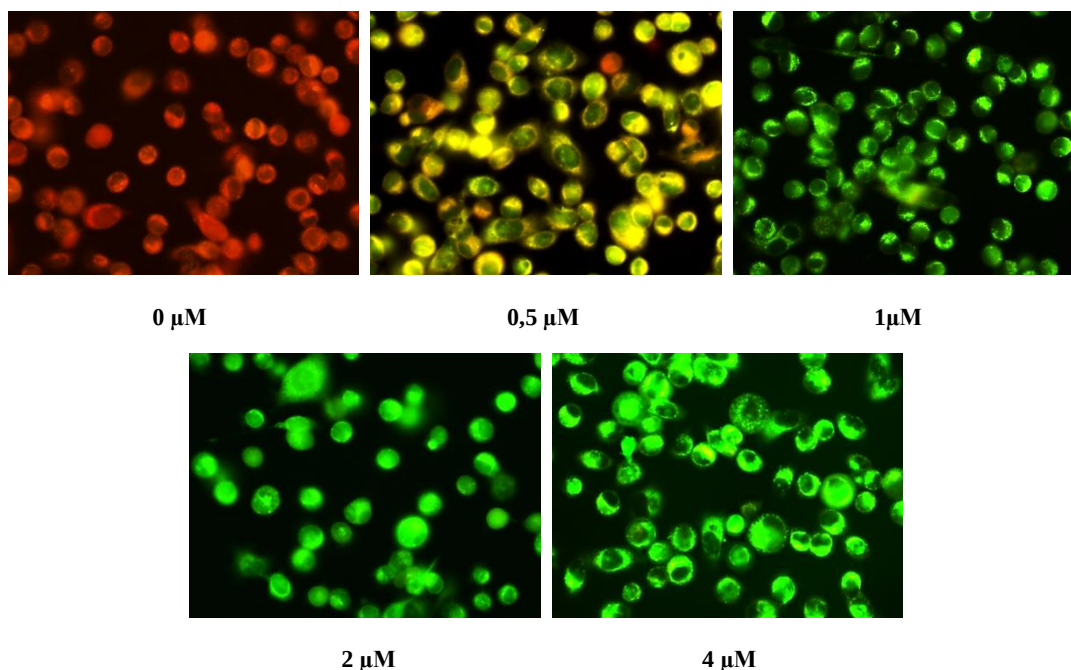
Po analýze výše zmíněné sady obrázků byly zjištěné intensity vyneseny do grafu (Obr. 39) ve formě box plotů. Ty dávají jasnou představu o rozložení intensit v jednotlivých snímcích. Navíc jsou u nich vyznačeny i průměrné hodnoty intensit, které mohou říct, jaká je průměrná úroveň PL pro různé koncentrace. Informace z tohoto grafu podporují dřívější myšlenku. Nejsilněji se PL projevuje při aplikaci 4 μM plumbaginu.



Obr. 39 Graf intensit pro různé koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách - PL

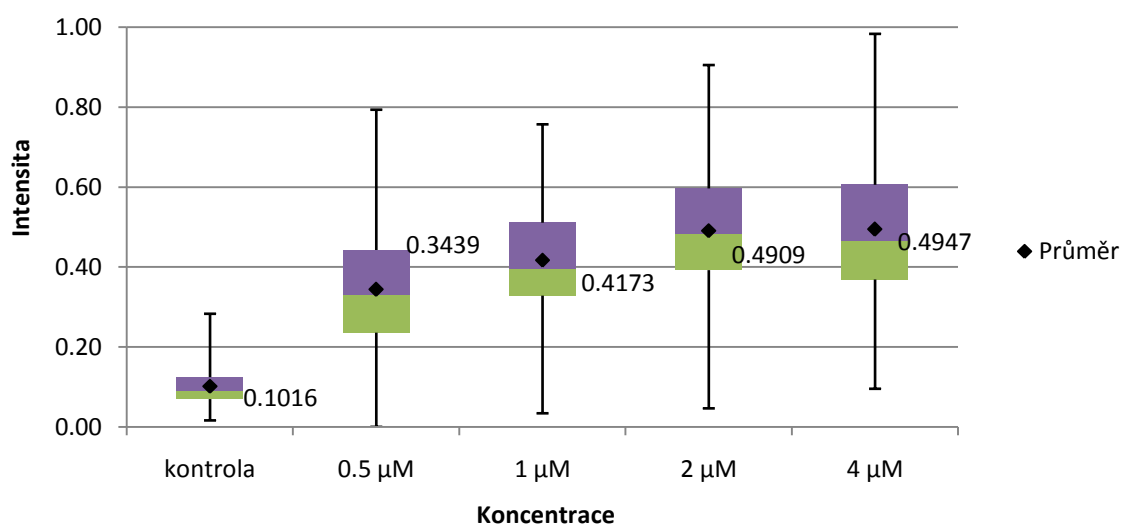
11.1.2 Plumbagin na PC3 buňkách – PL

Obr. 40 ukazuje působení různých koncentrací plumbaginu aplikované na PC3 buňky. Stejně jako v předešlém případě je jeho působení vyjádřeno pomocí PL. Na snímku kontroly (bez přídavku plumbaginu) k žádné peroxidaci nedochází. U snímků těchto buněk se zdá, že nejsilnější peroxidace probíhá při aplikaci 1 μM , 2 μM a 4 μM plumbaginu.



Obr. 40 Peroxidace lipidů - Plumbagin na PC3 buňkách

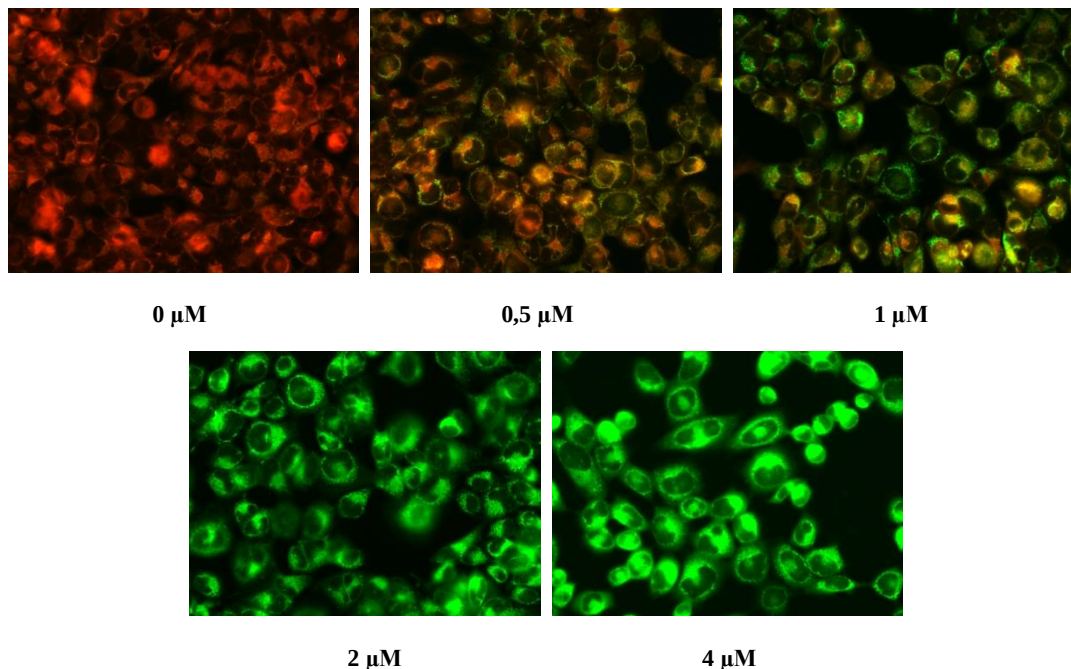
Při pohledu na graf intenzit (Obr. 41) vidíme, že nejvyšší průměrná intenzita se projevila po přidání 4 μM plumbaginu. Intenzita vyzařování je po přidání 2 μM plumbaginu druhá nejvyšší, což odpovídá příslušnému snímku výše. I přesto, že je na tomto snímku buněk znatelně méně, úroveň fluorescence je hodně vysoká. Tento fakt kompenzuje nedostatečné množství buněk oproti ostatním snímkům. Co se týká zbylých měření. Fluorescence byla u snímku s kontrolou nejnižší, jak se předpokládalo. Dá se tedy říct, že se vzrůstající koncentrací plumbaginu dochází k růstu intenzity fluorescence vyvolané peroxidací lipidů.



Obr. 41 Graf intenzit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – PL

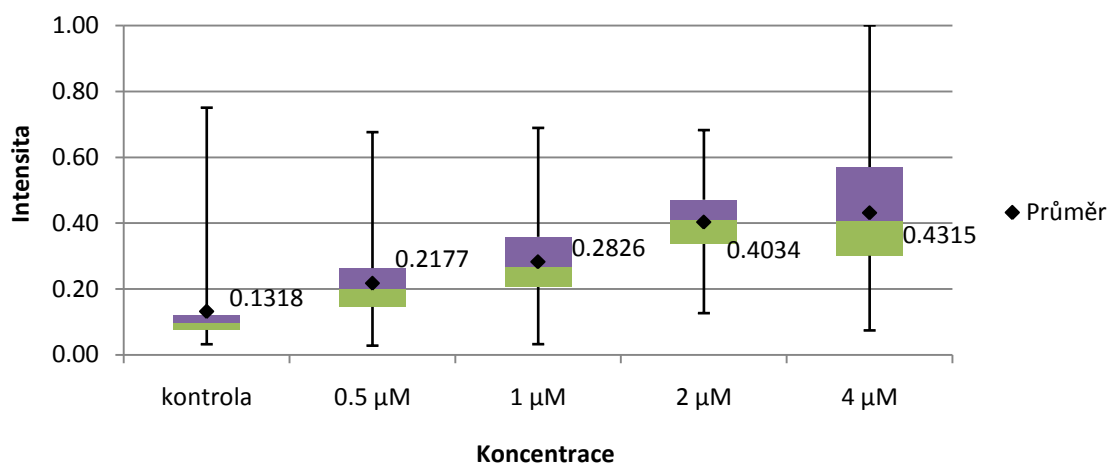
11.1.3 Naftazarin na PNT1A buňkách – PL

Na Obr. 42 lze vidět působení naftazarinu na PNT1A buňky vyjádřené pomocí PL. Při pohledu na snímky je možné říct, že až při aplikaci 2 μM a 4 μM naftazarinu dochází k největší PL. Snímek kontroly vyzařuje nejméně.



Obr. 42 Peroxidace lipidů - Naftazarin na PNT1A buňkách

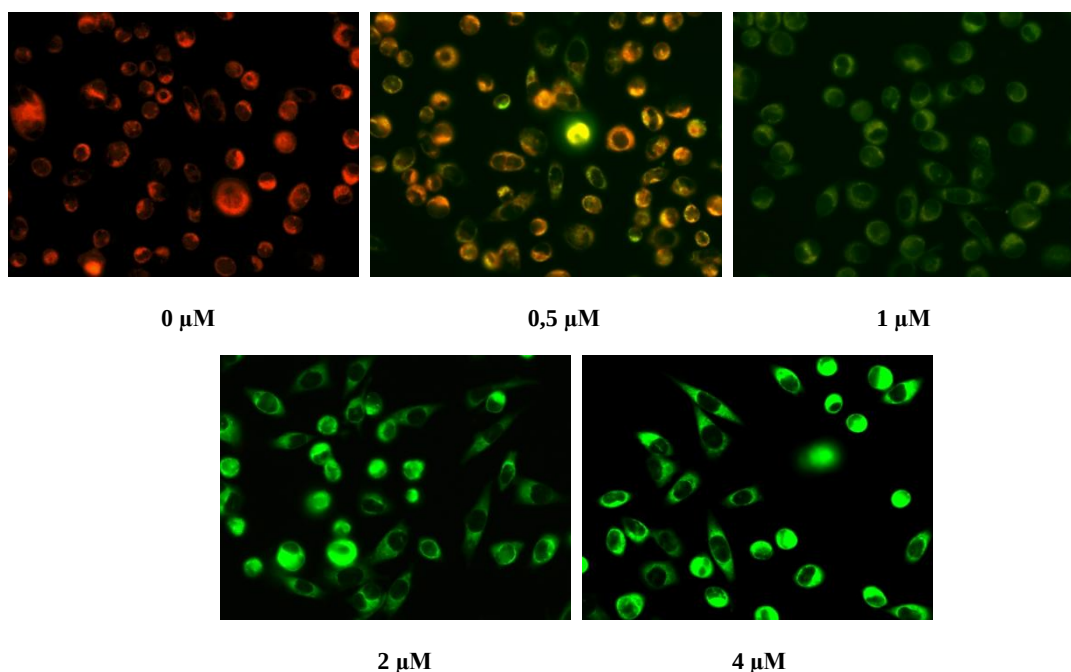
Následující graf (Obr. 43) ilustruje intenzitu vyzařování PNT1A buněk po přidání různých koncentrací naftazarinu. Průběh průměrů intenzit je rostoucí, což nutí k závěru, že čím větší přidaná koncentrace naftazarinu, tím silnější efekt resp. fluorescence – peroxidace lipidů. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u 2 μM a 4 μM naftazarinu. Jejich průměrné hodnoty fluorescence se od sebe liší jen lehce, jak se předpokládalo.



Obr. 43 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarinu na PNT1A buňkách – PL

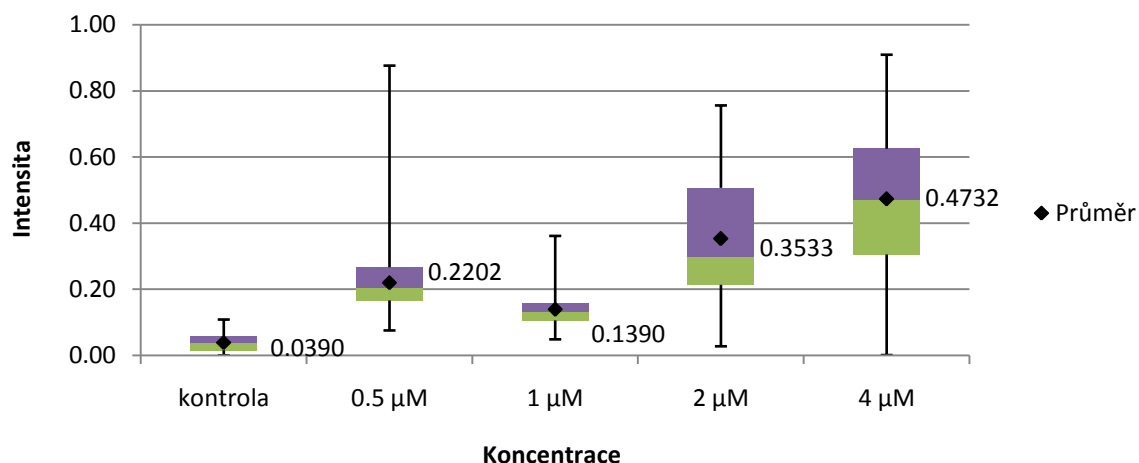
11.1.4 Naftazarin na PC3 buňkách – PL

Na Obr. 44 je vidět sada snímků zachycující působení různých koncentrací naftazarinu na PC3 buňky. Na snímku bez přídavku naftazarinu přirozeně nedochází k peroxidaci. K nejsilnější peroxidaci by mělo docházet u snímků buněk po aplikaci 2 μM a 4 μM naftazarinu. Při analýze snímku s přidanými 0,5 μM naftazarinu se nepočítalo s nejzářivější buňkou. Její nadměrná fluorescence v porovnání s ostatními buňkami na snímku způsobovala nesrovnalosti v celé analýze.



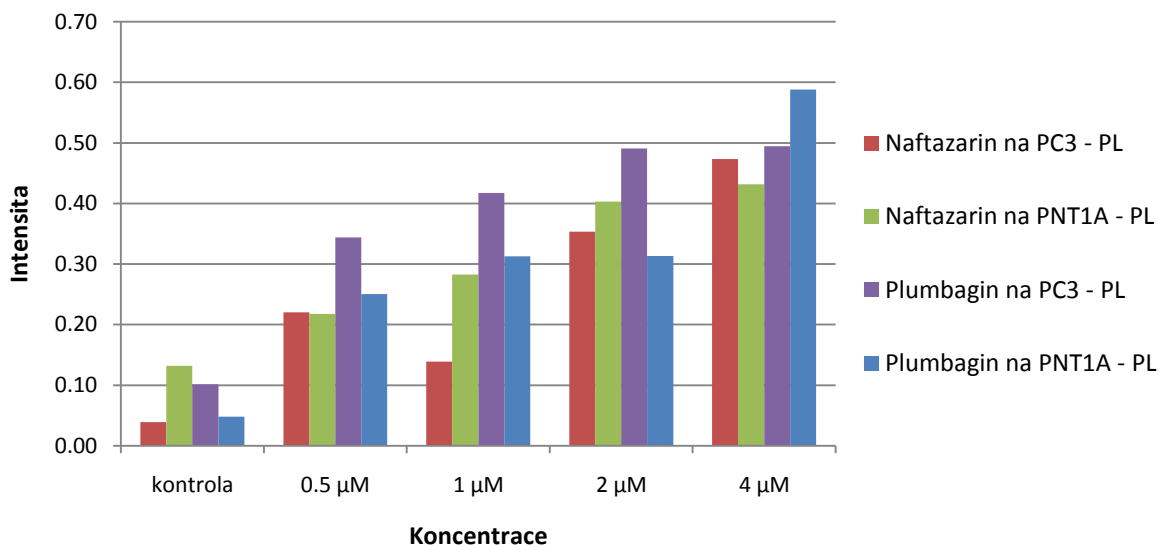
Obr. 44 Peroxidace lipidů - Naftazarin na PC3 buňkách

Graf na Obr. 45 potvrzuje dřívější předpoklad. Nejvyšší intensita byla zjištěna u 4 μM naftazarinu. Na grafu je také vidět, že i po vyřazení nadměrně vyzařující buňky na snímku s přidanými 0,5 μM naftazarinu, je intensita stále vyšší. Co se týká celkového průběhu. Pokud pomineme hodnotu intensity po přidání 1 μM naftazarinu, který byla zjištěna jako druhá nejnižší (koresponduje to s příslušným snímkem), průběh průměrných intensit je rostoucí. Se vzrůstající přidanou koncentrací naftazarinu dochází i k rostoucí intensitě vyzařování PC3 buněk.



Obr. 45 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarinu na PC3 buňkách – PL

Poslední graf (Obr. 46) srovnává průběhy intenzit vyzařování buněk, na které byly aplikovány různé koncentrace dvou naftochinonů. Je tu jasně vidět, jak s rostoucími koncentracemi cytotoxinů dochází k rostoucí intenzitě fluorescence, což poukazuje na to, že čím víc se zvyšuje detekovaná fluorescence, tím víc zde dochází k peroxidaci lipidů. Nejvyšší hodnota intenzity byla zaznamenána po aplikaci 4 µM plumbagin PNT1A buňky. Zde se peroxidace lipidů projevovala nejsilněji.



Obr. 46 Srovnání průběhů intenzit po podání různých koncentrací cytotoxinů - PL

11.2 Reaktivní formy dusíku

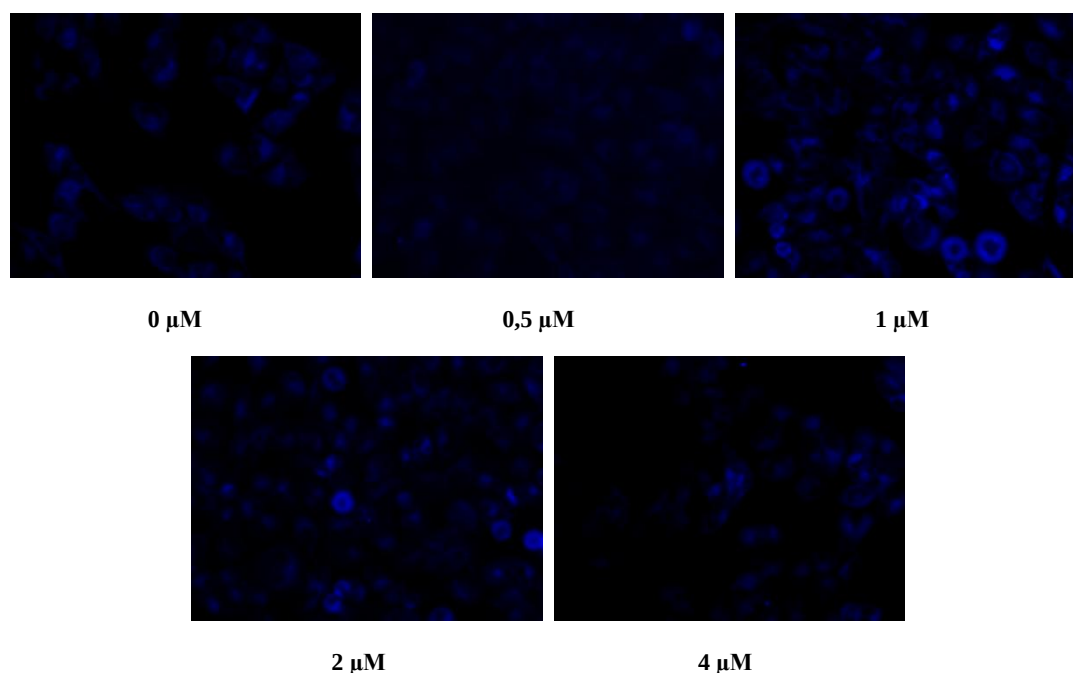
Reaktivní formy dusíku (dále jen RFD) jsou produkty buněčného metabolismu a jsou v případě normálních fyziologických podmínek součástí signálních cest. Koncentrace RFD je

regulována přirozenou detoxikací probíhající v buňkách. V případě selhání tohoto mechanismu dochází k vzniku nerovnováhy mezi RFD a RFK (reaktivní formy kyslíku), která vede k modifikaci a poškození buněčných proteinů, DNA a lipidů. Tato poškození narušují funkce buňky a eventuálně vyústí v buněčnou smrt. [71]

Snímky níže ilustrují, jak různé koncentrace plumbaginu a naftazarinu generují RFD v PC3 a PNT1A buňkách.

11.2.1 Plumbagin na PNT1A buňkách – RFD

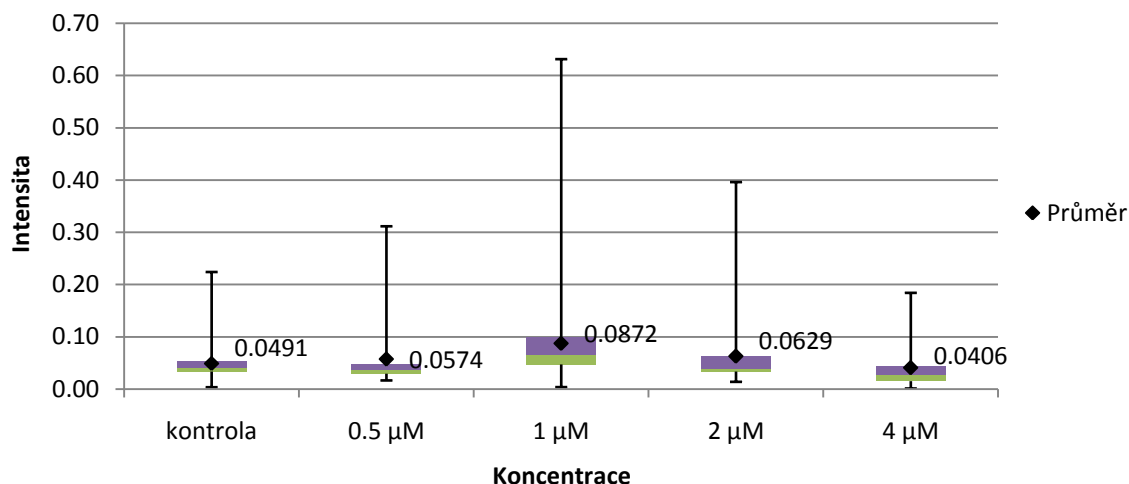
Na Obr. 47 Reaktivní formy dusíku - Plumbagin na PNT1A buňkách můžeme vidět působení různých koncentrací plumbaginu na PNT1A buňky. Každý snímek ukazuje, jak moc došlo ke generování RFD díky přidanému plumbaginu. Po pohledu na snímky by se dalo říct, že nemůžeme předpokládat neustále rostoucí průběh průměrů intenzit. Každá přidaná koncentrace plumbaginu způsobuje generování jiného množství RFD, bez jakéhokoli předpokládaného vzoru.



Obr. 47 Reaktivní formy dusíku - Plumbagin na PNT1A buňkách

Po analýze snímků byly výsledky zpracovány a vyneseny do grafu (Obr. 48). Jak je vidět průběh má se vzrůstající přidanou koncentrací rostoucí tendenci. Po přidání 2 μM a 4 μM

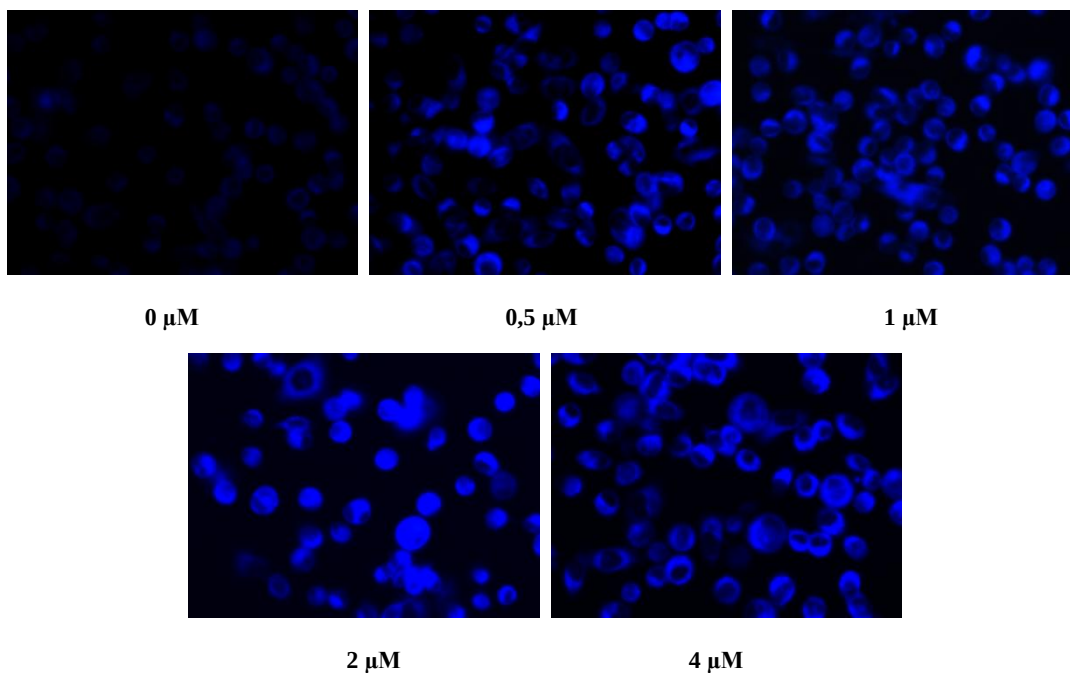
plumbaginu k buňkám dochází k poklesu intenzity vyzařování. Celková intenzita záření buněk je v porovnání s jinými sledovanými parametry velmi nízká.



Obr. 48 Graf intenzit pro různé koncentrace plumbagin na PNT1A buňkách – RFD

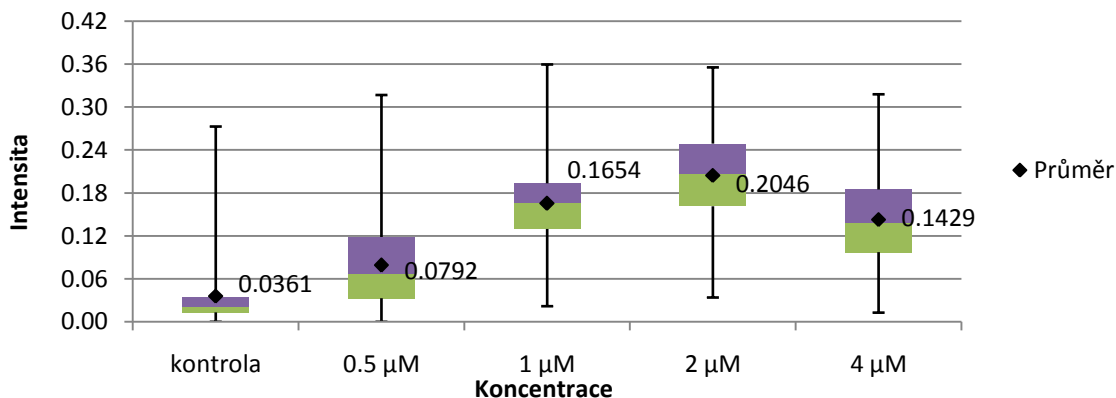
11.2.2 Plumbagin na PC3 buňkách – RFD

Následující snímky (Obr. 49 Reaktivní formy dusíku - Plumbagin na PC3 buňkách) ilustrují vznik RFD na PC3 buňkách jako odpověď na různé koncentrace přidaného plumbaginu. Na snímku s kontrolou je v porovnání s ostatními snímky vidět, že úroveň RFD je nejnižší. Buňky na dalších snímcích se zdají, že vyzařují se stejnou intenzitou



Obr. 49 Reaktivní formy dusíku - Plumbagin na PC3 buňkách

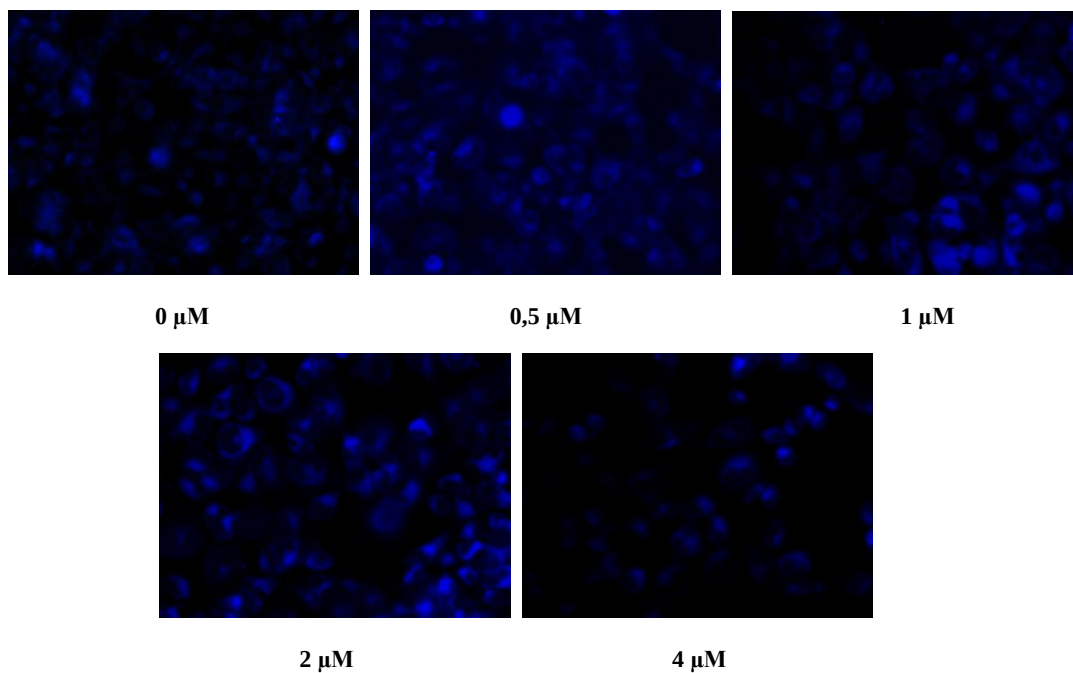
K rozpoznání úrovně intenzity mezi těmito snímky byl použit navržený program. Výsledky analýzy byly zpracovány a vyneseny do grafu (Obr. 50). Průběh intenzit je viditelně rostoucí až do hodnoty intenzity naměřené u snímku s přidanými 2 μM plumbaginu, poté dojde k poklesu. Největší hodnota intenzity byla naměřena u 2 μM plumbaginu.



Obr. 50 Graf intenzit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – RFD

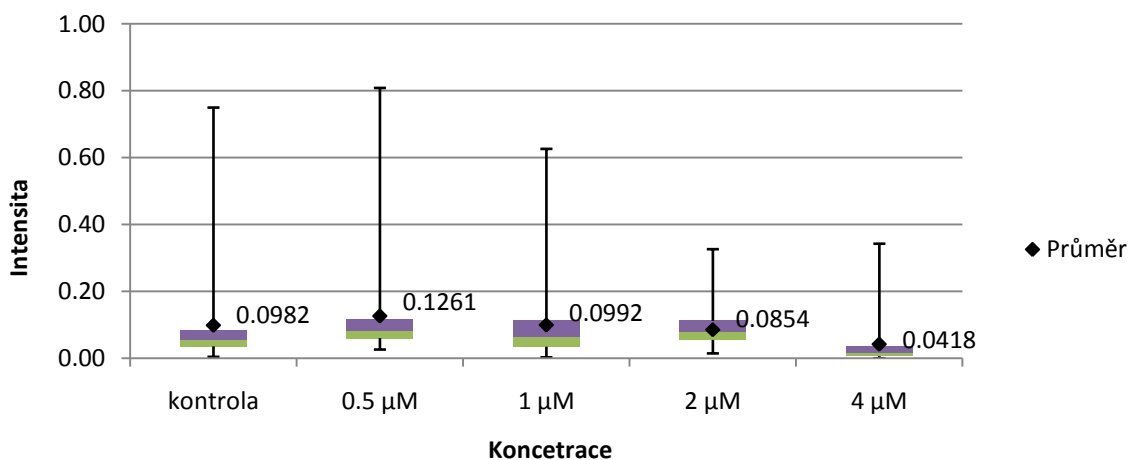
11.2.3 Naftazarin na PNT1A buňkách – RFD

Následující snímky (Obr. 51) ilustrují působení naftazarinu na PNT1A buňky po přidavku různých koncentrací naftazarinu právě k těmto buňkám. Při pohledu na snímky se zdá, že první tři obrázky (kontrola, 0,5 μM a 1 μM naftazarinu) budou mít podobnou intenzitu vyzařování a pak dojde k jejímu poklesu. Buňky na posledním snímku se zdají, že vyzařují nejméně intenzivně.



Obr. 51 Reaktivní formy dusíku - Naftazarin na PNT1A buňkách

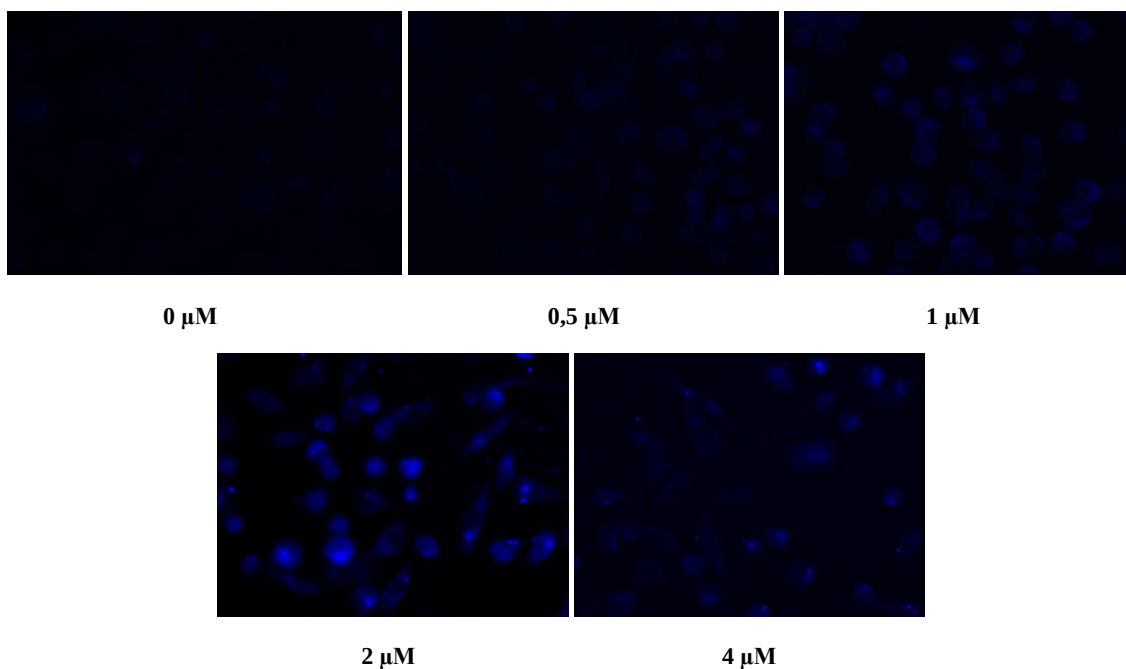
Po analýze (Obr. 52) se zjistilo, že první tři snímky mají téměř podobné intensity fluorescence. Následně dochází k poklesu hodnot. Nejnižší byla naměřena u 4 μM naftazarinu, jak bylo předpokládáno. Celkově byly hodnoty na velmi nízkých úrovních.



Obr. 52 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarinu na PNT1A buňkách – RFD

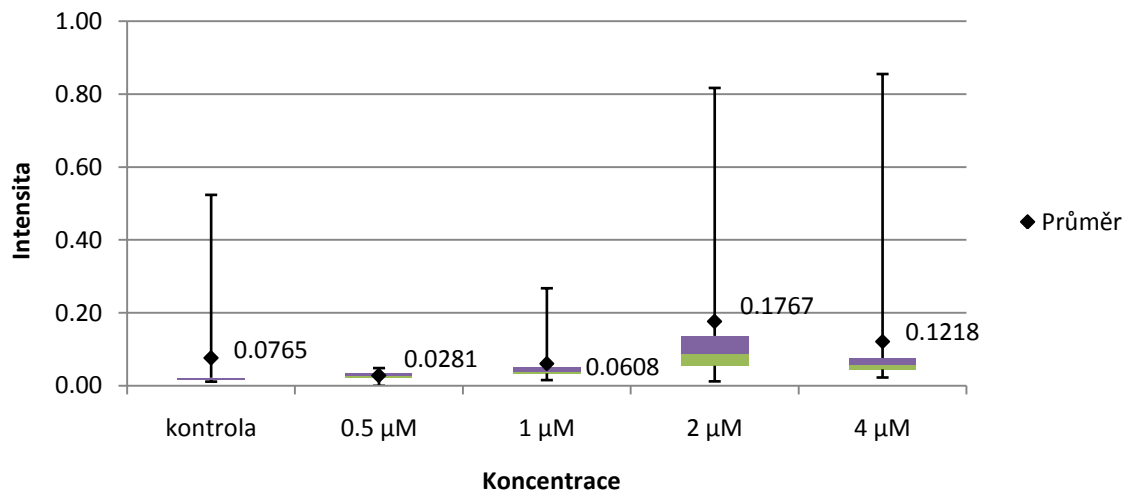
11.2.4 Naftazarin na PC3 buňkách – RFD

Intensita fluorescence je na snímcích velmi nízká (Obr. 53). U obrázku buněk s přidáním 2 μM a 4 μM naftazarinu dochází k zesílení intensity fluorescence. To značí, že při použití daných koncentrací naftazarinu dochází ke generování většího množství RFD.



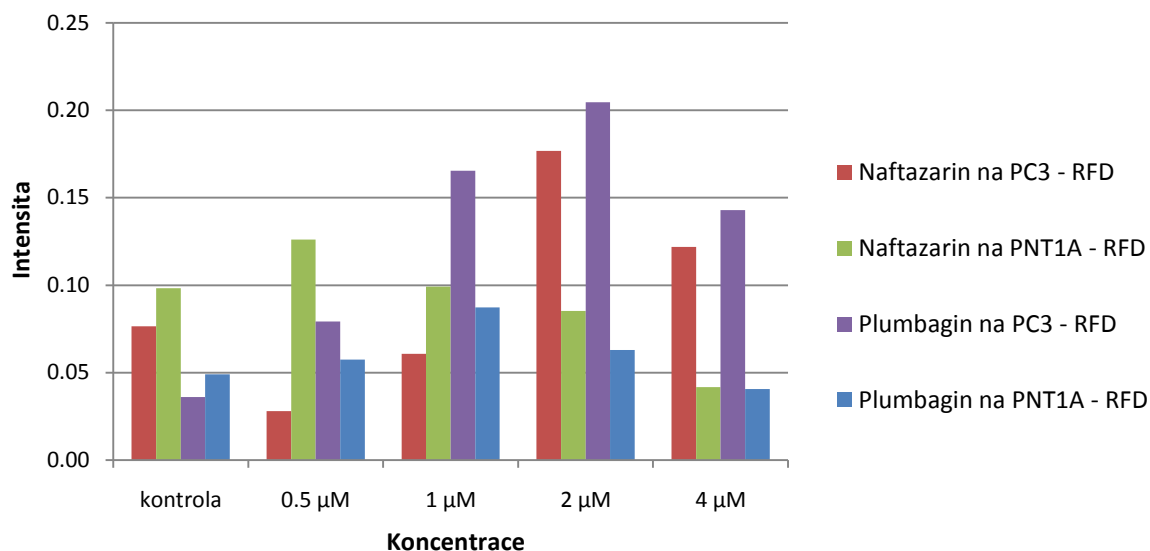
Obr. 53 Reaktivní formy dusíku - Naftazarin na PC3 buňkách

Na Obr. 54 jde vidět, že intenzita prvních tří snímků je opravdu velmi nízká. Téměř zde nedochází ke tvorbě RFD. Avšak u následujících dvou snímků je zaznamenáno zvýšení intenzity vyzařování. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u 2 μM naftazarinu. Ve srovnání s ostatními sadami snímků s RFD zde byly naměřené hodnoty nejnižší.



Obr. 54 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarinu na PC3 buňkách – RFD

Graf na Obr. 55 porovnává intenzit fluorescence buněk, ke kterým byly přidány různé koncentrace plumbaginu a naftazarinu. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u 2 μM plumbaginu na PC3 buňkách a u 2 μM naftazarinu přidaného k PC3 buňkám. Celková úroveň fluorescence je velmi nízká.



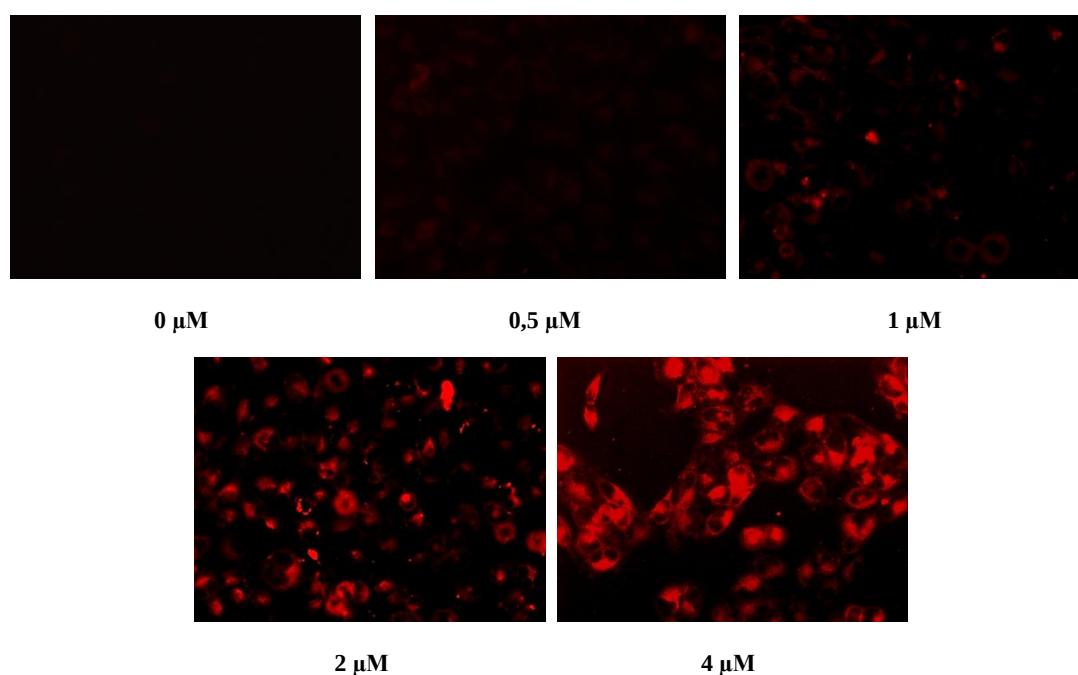
Obr. 55 Srovnání průběhů intenzit po podání různých koncentrací cytotoxinů – RFD

11.3 Reaktivní formy kyslíku

Stejně tak jako RFD jsou i reaktivní formy kyslíku (dále jen RFK) produkty buněčného metabolismu. Hlavní zdrojem tvorby RFK v buňkách jsou mitochondrie. Bylo dokázáno, že RFK hrají významnou roli v apoptotické signalizaci. Přesto stále není zcela jasný mechanismus, který RFK a apoptózu spojuje. Debatuje se o tom, jestli je zvýšení RFK během apoptózy příčina nebo důsledek poškozených mitochondriálních funkcí nebo jsou-li RFK produkovány mitochondriemi jako efektorové molekuly v odpovědi na signály apoptózy. [71]

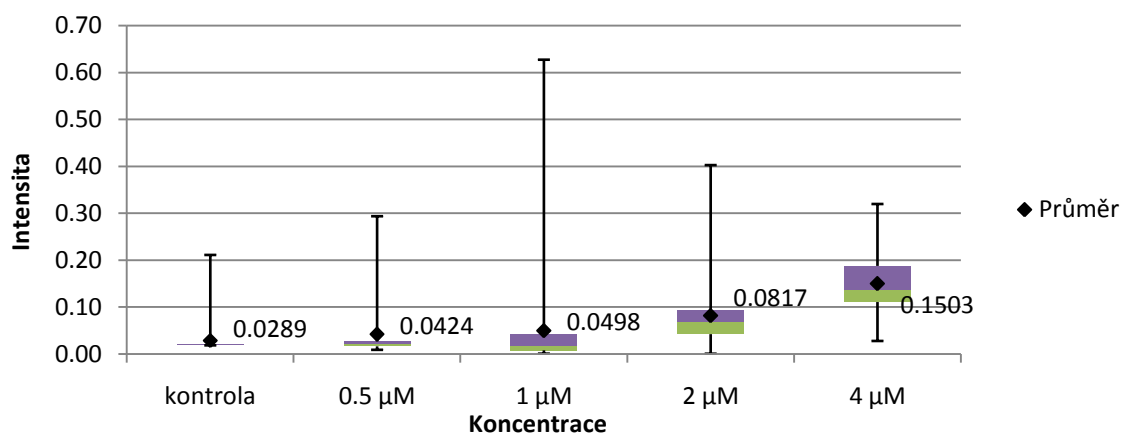
11.3.1 Plumbagin na PNT1A buňkách – RFK

Na Obr. 56 vidíme jak aplikací plumbaginu na PNT1A buňky způsobuje tvorbu RFK. Čím vyšší je použitá koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách, tím větší je fluorescence buněk. Podle všeho bude průběh průměrných intenzit rostoucí s nejvyšší hodnotou u 4 μM plumbaginu.



Obr. 56 Reaktivní formy kyslíku - Plumbagin na PNT1A buňkách

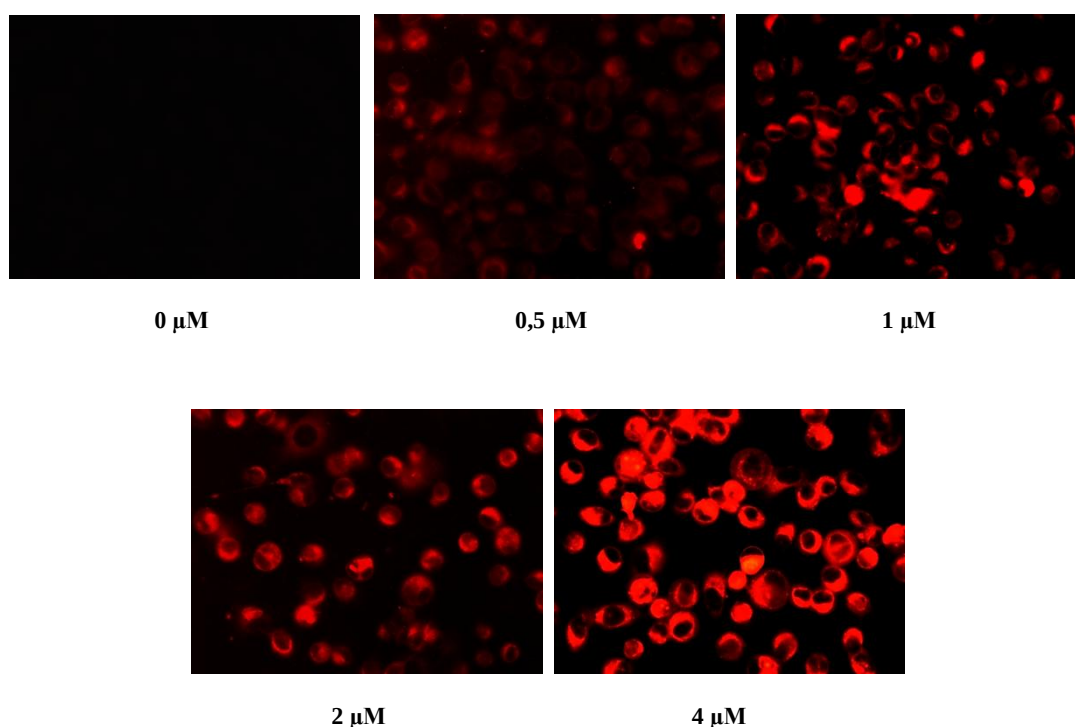
Informace z grafu (Obr. 57) potvrzují to, co lze vidět na snímcích. Nejvyšší naměřená intenzita vyzařování byla zjištěna u snímku buněk s přidaným plumbaginem o koncentraci 4 μM . Tvorba RFK se projevuje už při 1 μM plumbaginu. Průběh průměrných hodnot intenzit je rostoucí přímo úměrně s rostoucí koncentrací plumbaginu.



Obr. 57 Graf intenzit pro různé koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách – RFK

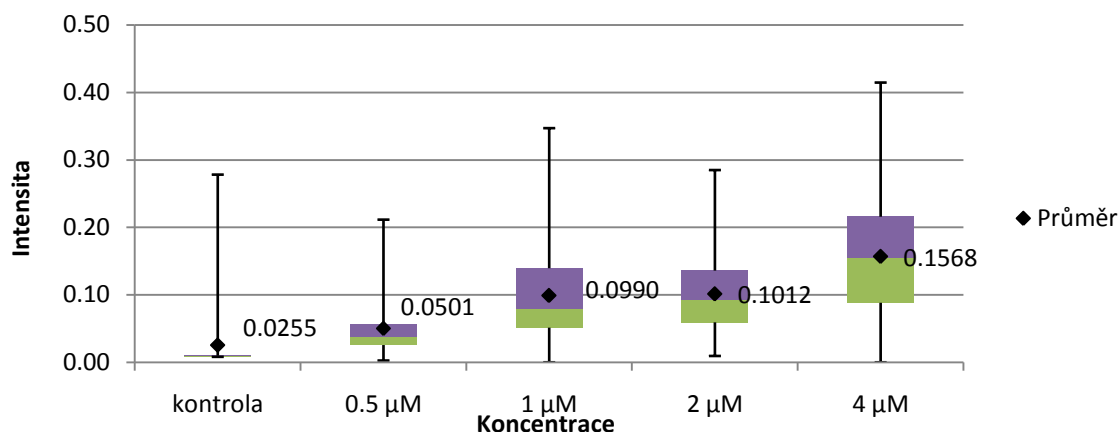
11.3.2 Plumbagin na PC3 buňkách – RFK

Na následující sadě snímků (Obr. 58) jde vidět, že při aplikaci plumbaginu na PC3 buňky dochází ke vzniku RFK už při použití 0,5 µM plumbaginu na PC3 buňky. Největší množství RFK se zdá být přítomno po použití 4 µM plumbaginu. Průběh průměrných hodnot bude s rostoucí koncentrací plumbaginu rostoucí.



Obr. 58 Reaktivní formy kyslíku - Plumbagin na PC3 buňkách

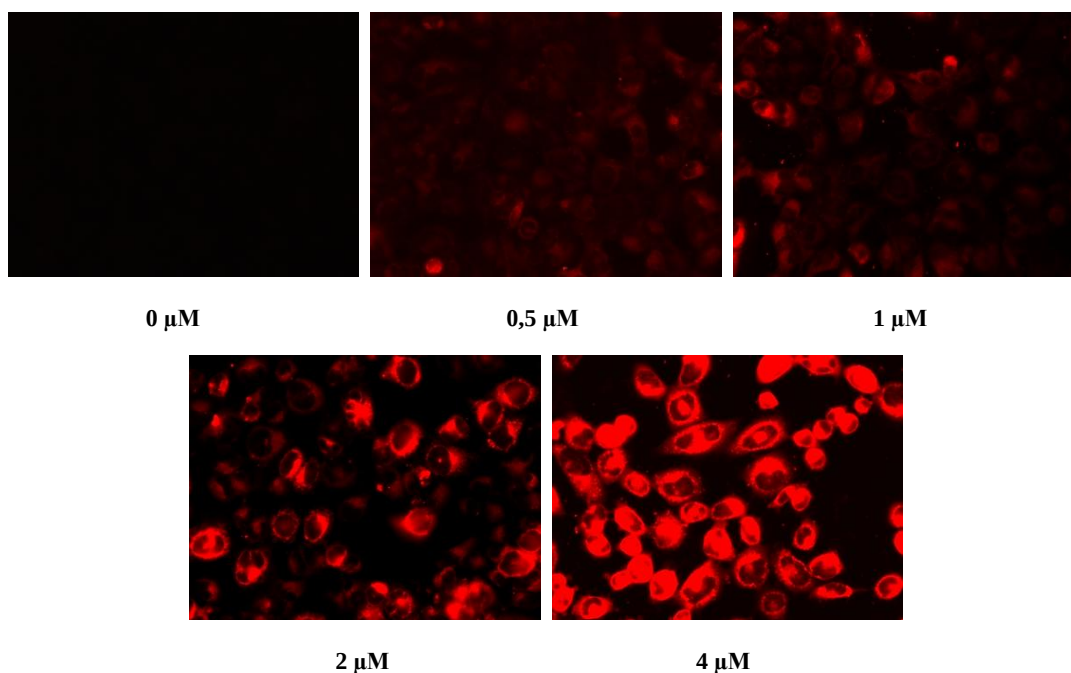
Z grafu (Obr. 59) získaného analýzou dříve zmíněných buněk jde vyčíst, že největší intenzita byla naměřena u 4 µM plumbaginu. Průběh středních hodnot je rostoucí. S rostoucí koncentrací plumbaginu dochází k růstu intenzity fluorescence PC3 buněk – úrovně RFK.



Obr. 59 Graf intenzit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – RFK

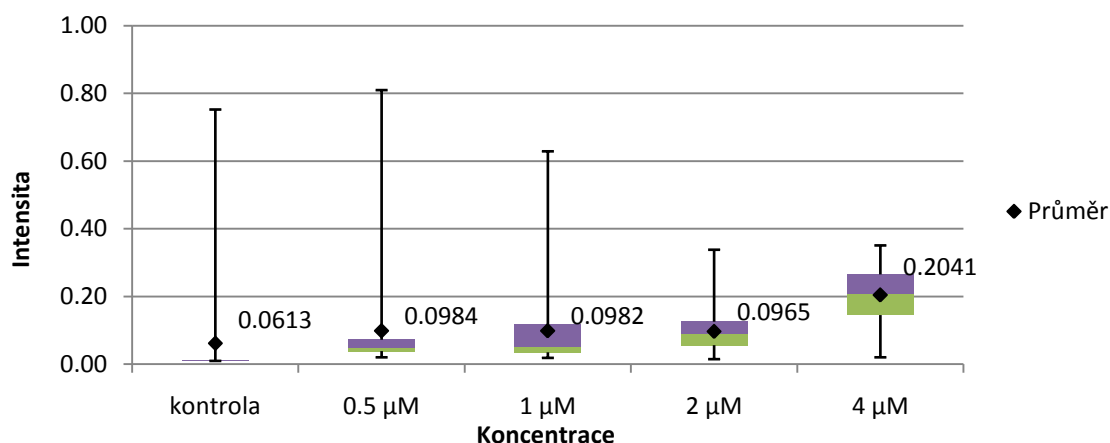
11.3.3 Naftazarin na PNT1A buňkách – RFK

Působení naftazarinu je na následujících obrázcích (Obr. 60) znát už po použití 0,5 µM. Cytotoxický efekt naftazarinu na PNT1A buňky způsobuje generování RFK a je nejsilnější na snímku buněk s aplikovanými 4 µM naftazarinu. Průběh průměrných hodnot bude rostoucí.



Obr. 60 Reaktivní formy kyslíku - Naftazarin na PNT1A buňkách

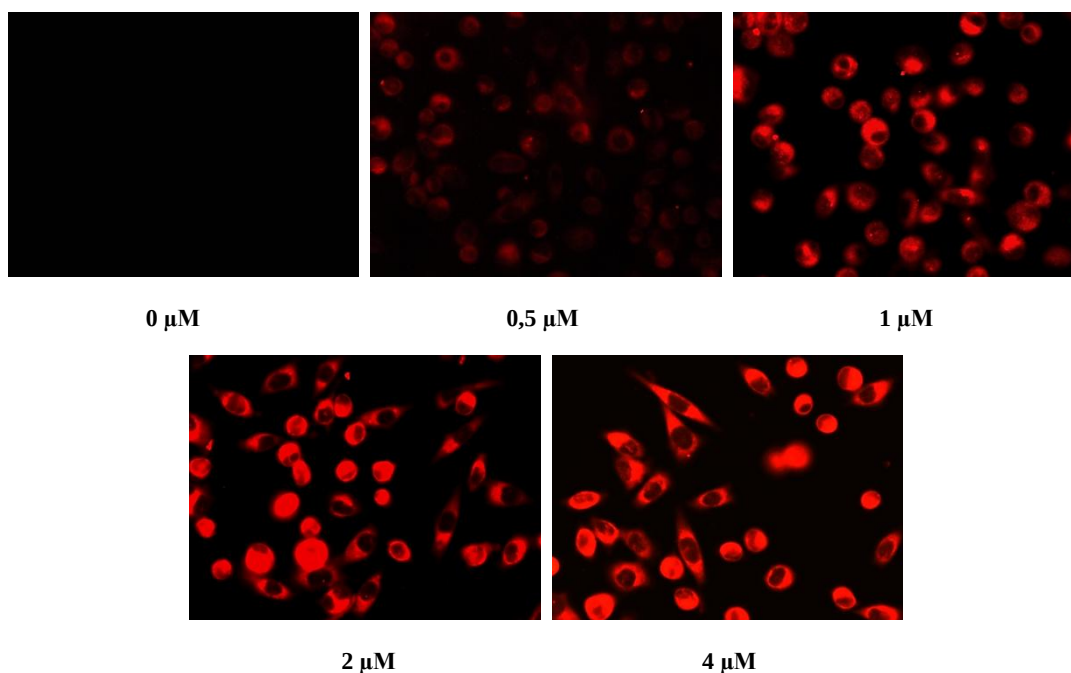
Graf (Obr. 61) potvrzuje tvrzení popsané výše. Naftazarin je nejtoxičtější v koncentraci 4 µM. Průběh průměrů je rostoucí. Se vzrůstající koncentrací přidaného naftazarinu k PNT1A buňkách dochází k růstu úrovně RFK.



Obr. 61 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarinu na PNT1A buňkách – RFK

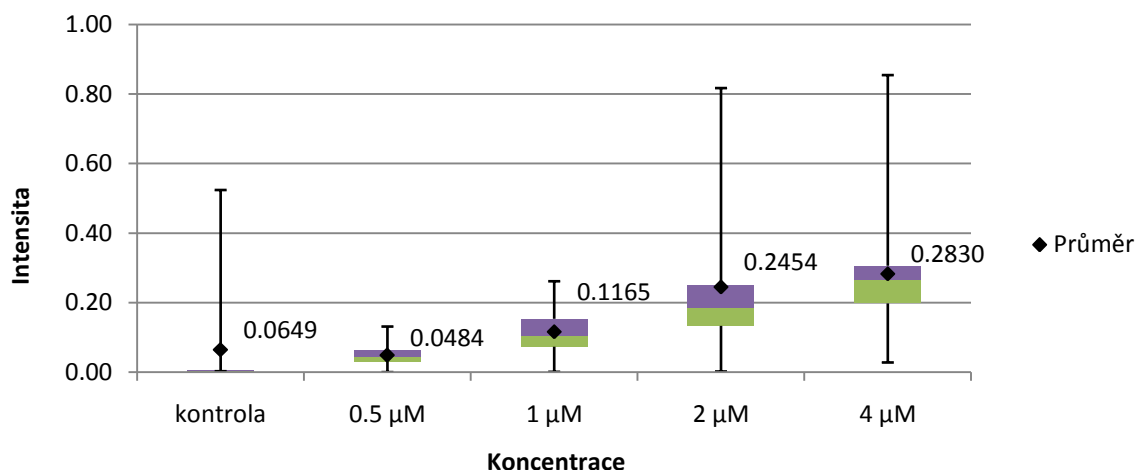
11.3.4 Naftazarin na PC3 buňkách – RFK

Působení naftazarinu na PC3 buňkách je podobné jeho působení na PNT1A buňky popsané výše. Tvorba RFK začíná při 0,5 µM naftazarinu a je nejvyšší při 4 µM přidaného naftazarinu (Obr. 62).



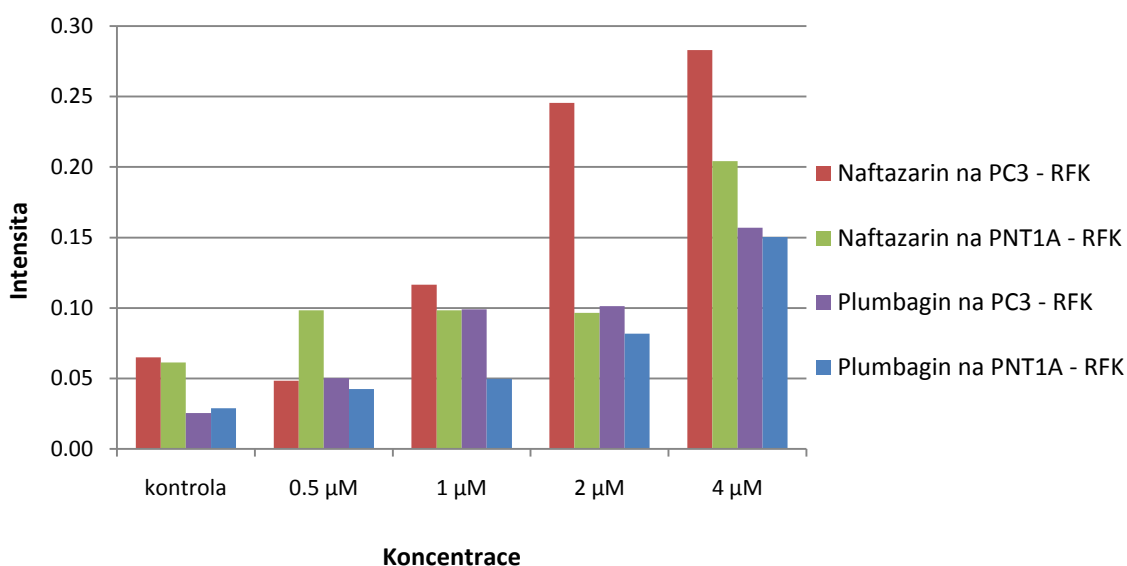
Obr. 62 Reaktivní formy kyslíku - Naftazarin na PC3 buňkách

Na Obr. 63 je vidět, že intenzita vyzařování je nejvyšší pro 4 µM naftazarinu. Průběh průměrů je rostoucí. S rostoucí koncentrací naftazarinu roste i intenzita fluorescence PC3 buněk – roste úroveň RFK.



Obr. 63 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarinu na PC3 buňkách – RFK

V případě, že jednotlivé průběhy porovnáme (Obr. 64), zjistíme, že průběhy intenzit pro plumbagin na PNT1A buňkách, plumbagin na PC3 buňkách, naftazarin na PNT1A a naftazarin na PC3 jsou podobné – s rostoucí koncentrací cytotoxinů dochází k růstu intensity fluorescence buněk. Naftazarin na PC3 buňkách způsobil (hlavně pro koncentrace 2 µM a 4 µM), prostřednictvím svého cytotoxického působení, největší produkci RFK. Nejnížší intensita byla zjištěna u snímků buněk PNT1A s přidaným plumbaginem.



Obr. 64 Srovnání průběhů intenzit po podání různých koncentrací cytotoxinů - RFK

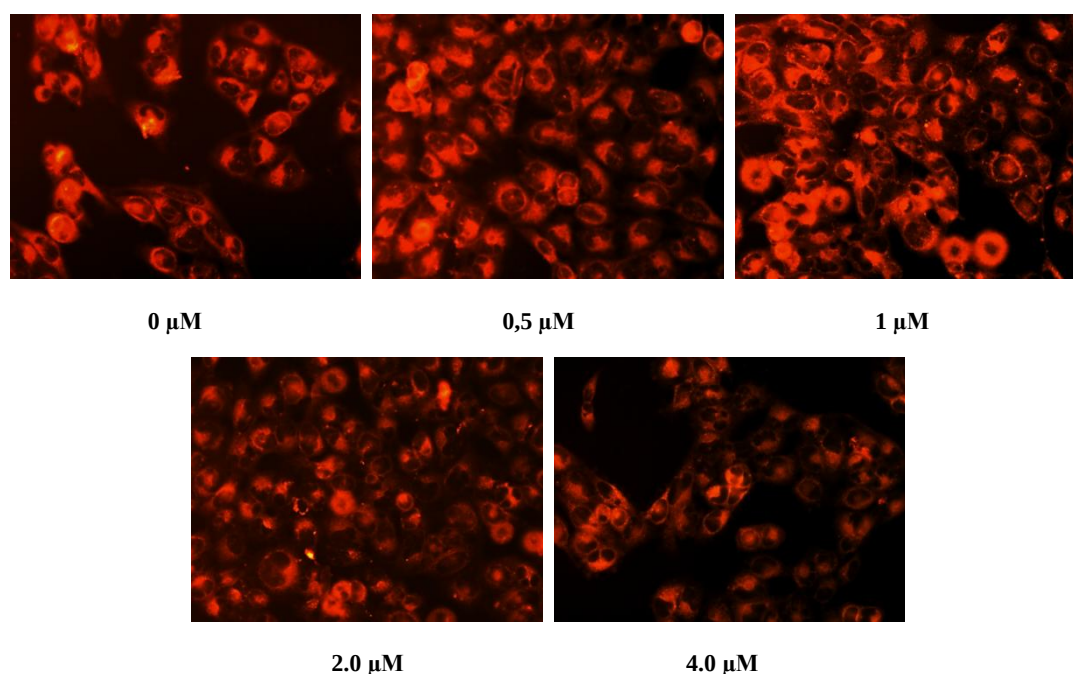
11.4 Mitochondriální potenciál

Mitochondrie jsou přímé a hlavní regulátory apoptózy. Zprostupnění vnitřní a vnější mitochondriální membrány reprezentuje krok vedoucí k apoptóze. Tento děj je indukován

pro-apoptotickými molekulami jako jsou molekuly Bcl-2 rodiny, fosfatázy, kinázy a transkripční faktory. Každá změna na mitochondriích je doprovázena změnou membránového potenciálu (dále jen MP). Buňky, které podstupují apoptózu ztrácí své MP. Je nutné podotknout, že kinetika ztráty MP je velmi rychlá, tudíž tyto buňky nemusí vykazovat charakteristické morfologické znaky apoptózy. [72]

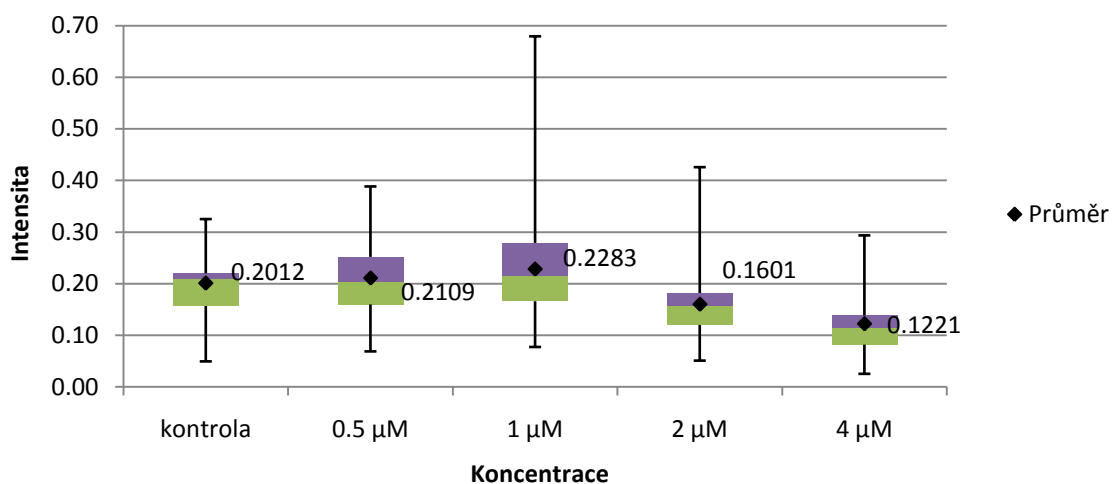
11.4.1 Plumbagin na PNT1A buňkách – MP

Na jednotlivých snímcích (Obr. 65) je zvýrazněna míra membránového potenciálu po přidání různých koncentrací plumbaginu k PNT1A buňkám. Po pouhém pohledu na snímky se nedá jednoznačně říct, kdy je úroveň MP nižší a kdy vyšší. Intenzita vyzařování buněk se zdá být oproti ostatním nižší u obrázků s použitými 2 μ M a 4 μ M plumbaginu.



Obr. 65 Mitochondriální potenciál - Plumbagin na PNT1A buňkách

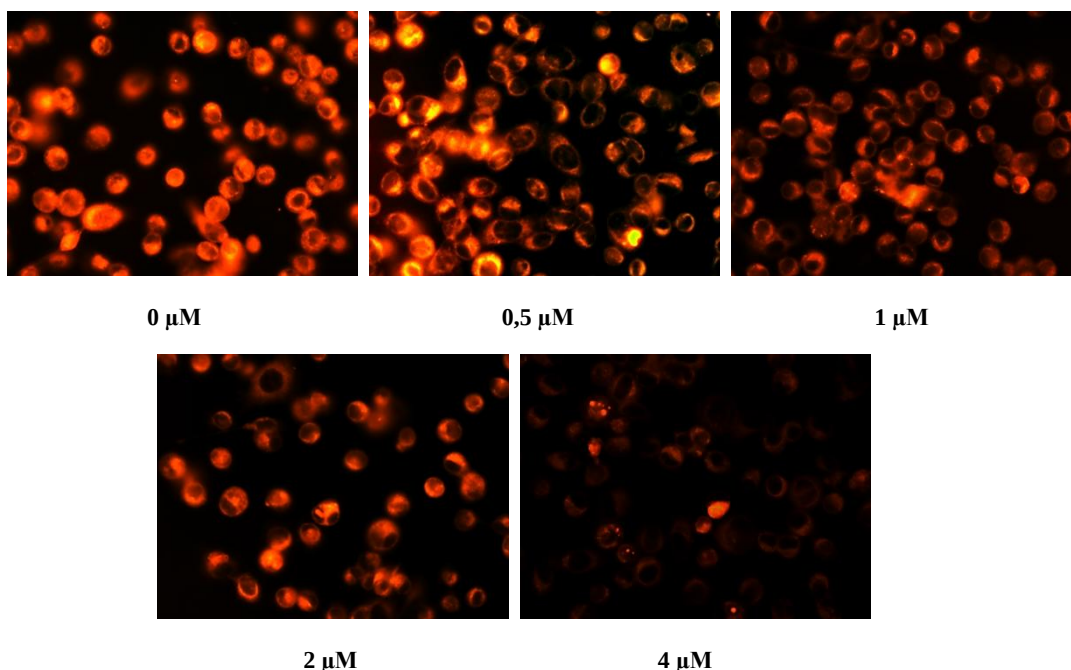
Po analýze obrázků byly hodnoty intenzit pro jednotlivé koncentrace plumbaginu vyneseny do grafu (Obr. 66). Nejnižší hodnoty intenzity byly zjištěny u koncentrací plumbaginu 2 μ M a 4 μ M. To značí největší toxicitu plumbaginu právě v těchto koncentracích. Co se týká zbylých snímků. Pokud bychom vycházeli z faktu, že u kontroly by měla být intenzita nejvyšší (vzorek bez přídavku), potom jsou vyšší hodnoty zjištěné na dalších dvou snímcích způsobené větším množstvím buněk. V ideálním případě by byly průběh průměrných intenzit klesající.



Obr. 66 Graf intenzit pro různé koncentrace plumbaginu na PNT1A buňkách – MP

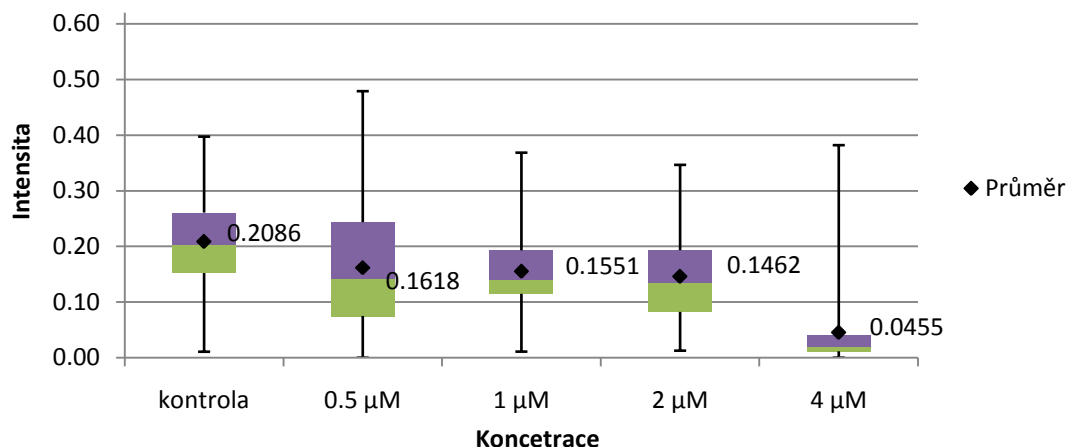
11.4.2 Plumbagin na PC3 buňkách – MP

Na Obr. 67 můžeme vidět postupnou ztrátu MP po aplikaci plumbaginu na PC3 buňky. Z vizuálního hlediska je ztelná ztráta MP již na snímku buněk po přidání 1 µM plumbaginu. Téměř neznatelná je MP na posledním snímku. Zde je působení 4 µM plumbaginu takové, že dochází k největší ztrátě MP.



Obr. 67 Mitochondriální potenciál - Plumbagin na PC3 buňkách

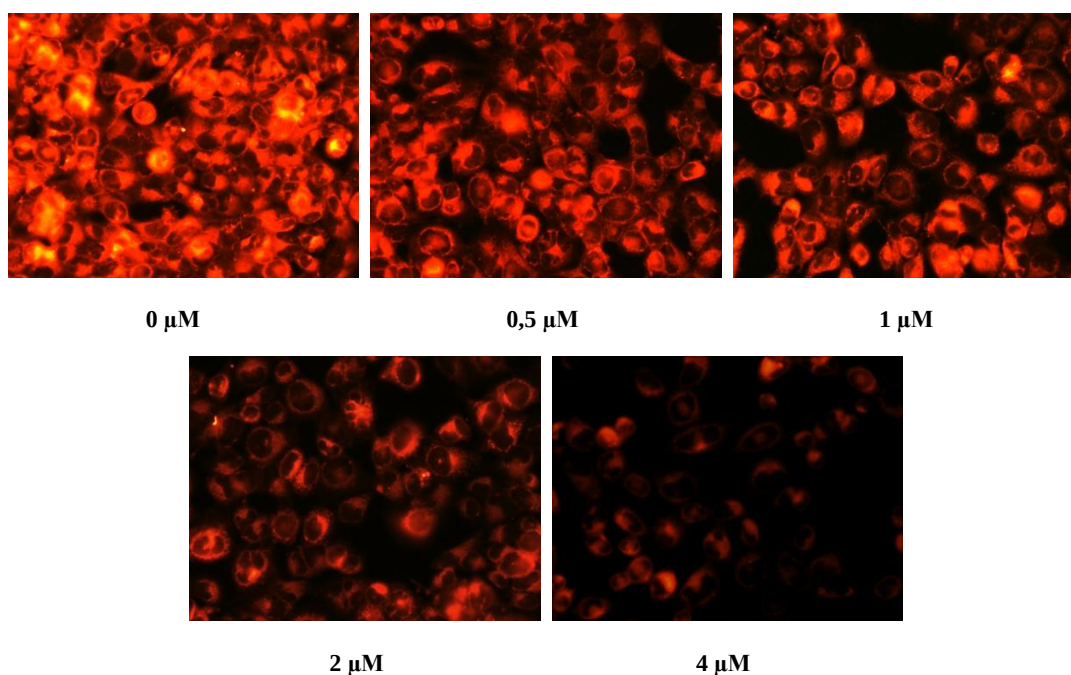
Obr. 68 ilustruje případ zmíněný výše – klesající průběh intenzit s největší hodnotou na snímku s kontrolou a nejnižší na snímku s použitými 4 µM plumbaginu. Se vzrůstající koncentrací plumbaginu se snižuje MP, což se projeví jako snížení fluorescence.



Obr. 68 Graf intenzit pro různé koncentrace plumbaginu na PC3 buňkách – MP

11.4.3 Naftazarin na PNT1A buňkách – MP

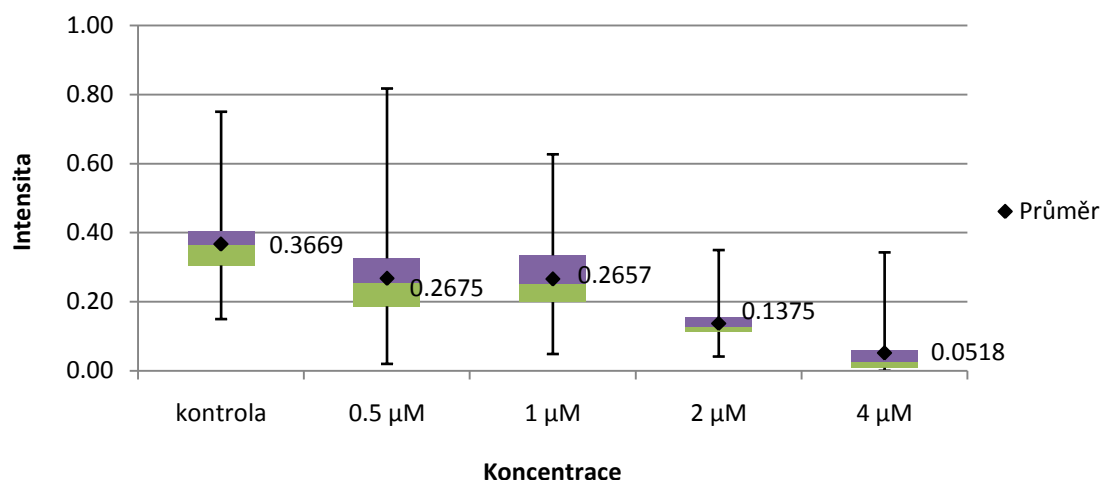
Z Obr. 69 se dá usoudit, že působení naftazarinu, s ohledem na MP, je největší u koncentrací 2 µM a 4 µM. Intensity na prvních snímcích po přidavku 0,5 a 1 µM naftazarinu se zdají být podobné.



Obr. 69 Mitochondriální potenciál - Naftazarin na PNT1A buňkách

Graf intenzit (Obr. 70) ukazuje, jak dochází se zvyšující se koncentrací naftazarinu k postupnému poklesu hodnot intenzity vyzařování buněk. Nejnížší hodnota je zaznamenána znovu po použití 4 µM. K lehkému odklonu od předpokládaných hodnot dochází u třetího

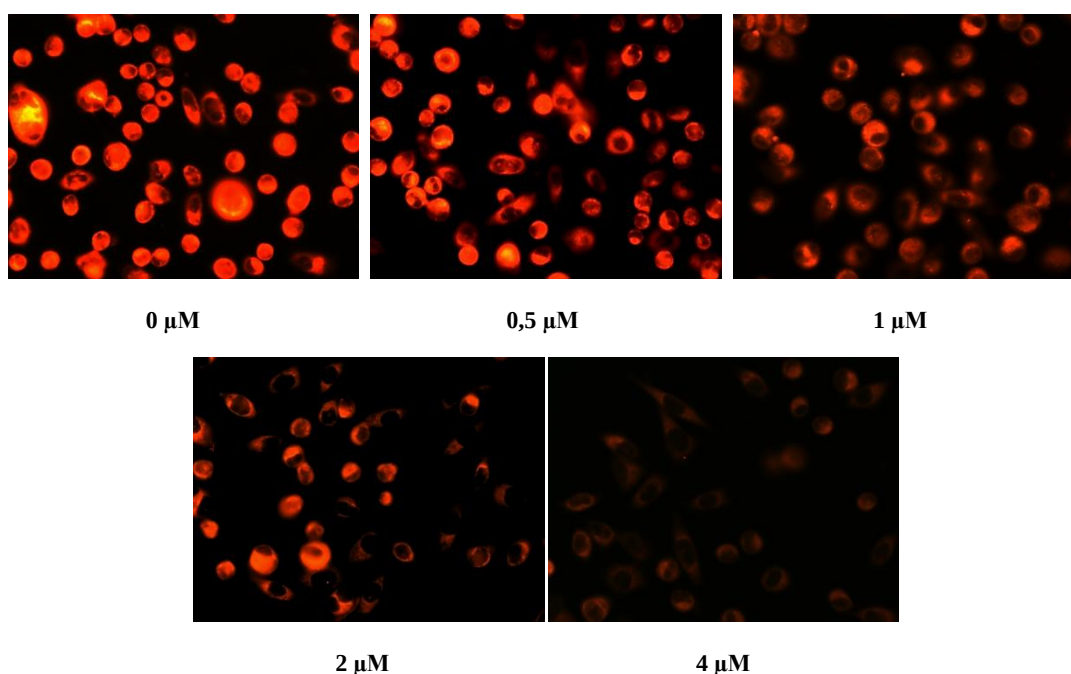
případu – 1 μM naftazarinu. To může být způsobené lehce vyšším počtem buněk v porovnání s ostatními.



Obr. 70 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarin na PNT1A buňkách – MP

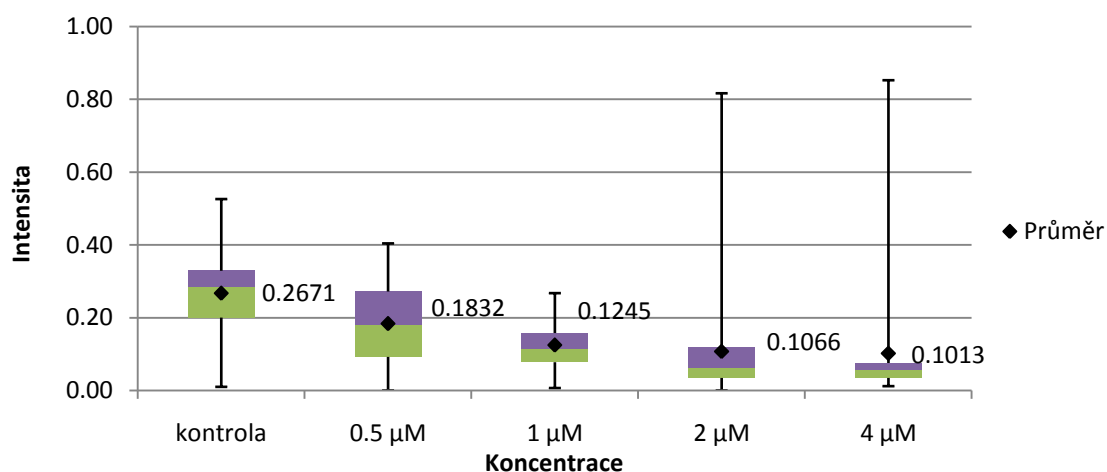
11.4.4 Naftazarin na PC3 buňkách – MP

Poslední snímky pro MP (Obr. 71) ukazují působení naftazarinu na PC3 buňky. Je vidět, že po podání 2 μM a 4 μM naftazarinu, je MP na velmi nízké úrovni. Tudiž se dá říct, že v těchto koncentracích je naftazarin PC3 buňkách nejtoxičtější. Se zvyšující se koncentrací naftazarinu klesá fluorescence buněk.



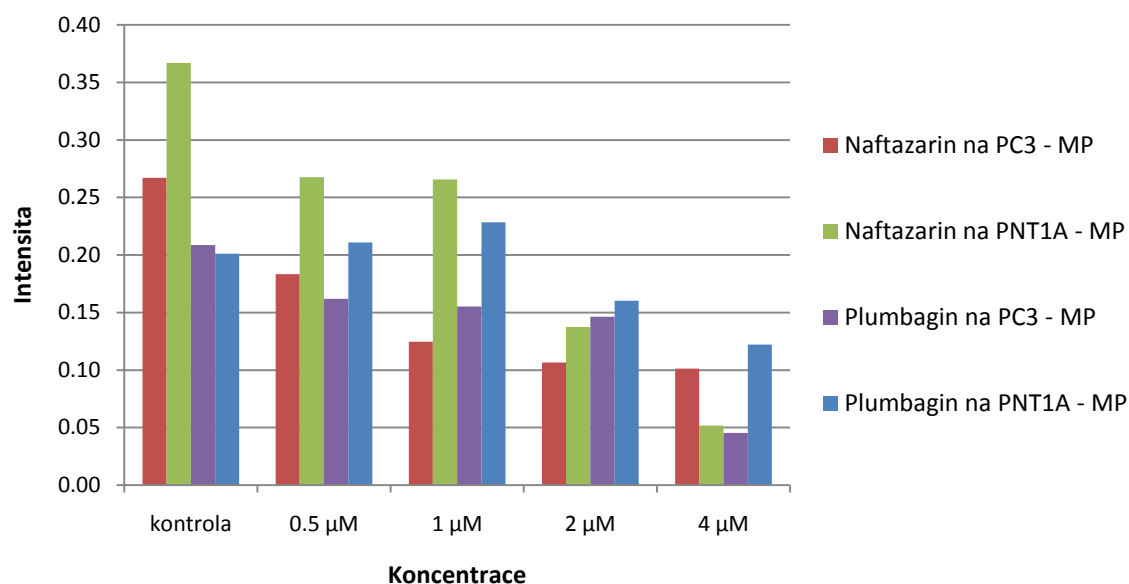
Obr. 71 Mitochondriální potenciál - Naftazarin na PC3 buňkách

Průběh průměrných intenzit zobrazených na grafu níže (Obr. 72) je klesající s nejnižší hodnotou u 4 μM naftazarinu. U snímku s přidanými 2 μM naftazarinu byla zjištěna druhá nejnižší hodnota fluorescence



Obr. 72 Graf intenzit pro různé koncentrace naftazarin na PC3 buňkách – MP

Pro srovnání byly všechny průběhy intenzit PC3 buněk pro MP zobrazeny v jednom grafu (Obr. 73). Na první pohled se dá říct, že jsou všechny průběhy klesající, což odpovídá předpokladu, že při vzrůstající koncentraci cytotoxinu dochází k změnám na mitochondriích, apoptóze a tudíž k snížení MP. Na některých průbězích jsou vidět odchylky (plumbagin na PC3, plumbagin na PNT1A), které byly zmíněny v textu výše. Důvod jejich vzniku může souviset s rozdílem v počtu buněk oproti ostatním snímkům.



Obr. 73 Srovnání průběhů intenzit po podání různých koncentrací cytotoxinů - MP

11.5 Zjištění možných závislostí

Předešlé kapitoly se zabývaly popisem výsledků analýzy provedené na fluorescenčních snímcích buněk. Působení plumbaginu a naftazarinu na buňky bylo sledováno pomocí 4 parametrů. Výsledky pro každý parametr byly na koncích každé podkapitoly vyneseny do společného grafu a srovnány. Tím pádem bylo možné sledovat, jak se projevovalo působení cytotoxinů na buňky prostřednictvím jednotlivých parametrů. Aby byla práce kompletní, bylo ještě nutné porovnat působení plumbaginu na PNT1A a PC3 buňky, naftazarinu na PNT1A a PC3 buňky a také porovnat působení plumbaginu a naftazarinu na PC3. A porovnat působení plumbaginu a naftazarinu na PNT1A buňky.

Pro tento účel bylo použito statistické vyhodnocení.

11.5.1 Korelační analýza

Pomocí korelační analýzy lze měřit míru vztahu mezi proměnnými – jak je jejich vztah silný. Tato znalost je důležitá například tehdy, když máme veličiny s určitým vzájemným vztahem a čím je tento vztah těsnější, s tím větší pravděpodobností můžeme očekávat, že změny jedné veličiny budou mít za následek změny veličiny s ní statisticky svázané. [73]

Míra korelace je vyjádřena jako korelační koeficient. Existují dva druhy korelačních koeficientů: Pearsonův a Spearmanův korelační koeficient. Volba jednoho z koeficientů závisí na charakteru dat. [73]

Vstupem pro analýzu byly průměrné intensity fluorescence pro všechny použité koncentrace naftochinonů na obou druzích buněk. Tato použitá data byla spojitého charakteru. Co se týče jejich normality. Ta byla ověřena, a pokud některá tuto podmínku nesplňovala, byla logaritmicky transformována. Spojitý charakter a normalita rozložení jsou požadavky pro použití Pearsonova korelačního koeficientu. [73]

Pearsonův korelační koeficient je bezrozměrná veličina a značí se r . Pro korelační koeficient platí:

1. $-1 \leq r \leq 1$
2. Jestli je mezi veličinami lineární vztah, je $r = |1|$.
3. Jestli jsou veličiny lineárně nezávislé, je $r = 0$.

Vzhledem k těmto vlastnostem korelačního koeficientu se následující stupnice používá pro hodnocení těsnosti vztahu mezi veličinami:

$$0 < |r| \leq 0,3 \quad \text{slabá závislost}$$

$0,3 < |r| \leq 0,8$ střední závislost

$0,8 < |r| \leq 1$ silná závislost.

[73]

Korelační analýza byla provedena v programu STATISTICA 10.

Následující tabulky obsahují výsledky korelační analýzy. Tab. 6 ukazuje korelace průměrných intenzit pro plumbagin na PNT1A a PC3 buňkách. Hodnoty korelačních koeficientů v diagonále ilustrují vztahy mezi průběhy, které jsou viditelné na Obr. 46, Obr. 55, Obr. 64, Obr. 73. K velmi dobré pozitivní korelaci dochází u hodnot pro plumbagin na PNT1A (LP) a na PC3 (LP) buňkách. Silná pozitivní korelace je i mezi plumbaginem na PNT1A (LP) a PC3 (RFK). Podobně je to u plumbaginu na PNT1A (RFK) a PC3 (RFK). Silná pozitivní korelace vyjadřuje to, že pokud jsou hodnoty jedné proměnné rostoucí nebo klesající tak ta druhá také roste nebo klesá. Příklad silné negativní korelace lze vidět u plumbaginu na PNT1A (LP) a PC3 (MP). Podobné je to u plumbaginu na PNT1A (RFK) a PC3 (MP). Negativní korelace vyjadřuje případ, kdy hodnoty jedné proměnné rostou (klesají), druhé klesají (rostou). Ostatní korelační koeficienty vyjadřují střední až nízkou korelaci, což vyjadřuje velmi malý vztah mezi proměnnými.

Tab. 6 Korelace výsledků působení plumbagin na PNT1A a PC3 buňky

	Plumbagin na PNT1A - PL	Plumbagin na PNT1A - MP	Plumbagin na PNT1A - RFD	Plumbagin na PNT1A - RFK
Plumbagin na PC3 - PL	0.858773	-0.493661	0.196050	0.703758
Plumbagin na PC3 - MP	-0.978773	0.792290	0.348527	-0.967886
Plumbagin na PC3 - RFD	0.608376	-0.343747	0.434293	0.494803
Plumbagin na PC3 - RFK	0.960705	-0.706807	-0.059686	0.917510

Tab. 7 obsahuje korelační koeficienty pro určení míry vztahu mezi působením naftazarinu na PNT1A buňky a PC3 buňky. I zde není nutné okomentovávat hodnoty v diagonále z důvodu, který byl zmíněn v předešlém odstavci. Při prvním pohledu na tabulku je vidět, že hodnoty korelace ať už pozitivní nebo negativní jsou zde zastoupeny více než u předešlé tabulky. Hodnoty vyjadřující nízkou nebo žádnou korelaci tu jsou přítomny málo. Nejvyšší hodnoty pozitivní korelace jsou vidět u naftazarinu na PNT1A (LP) a PC3 (RFK). Dále pak u naftazarinu na PNT1A (RFK) a PC3 (LP). Většina zbývajících hodnot prozrazuje silnou negativní korelaci.

Tab. 7 Korelace výsledků působení naftazarin na PNT1A a PC3 buňky

	Naftazarin na PNT1A - PL	Naftazarin na PNT1A - MP	Naftazarin na PNT1A - RFD	Naftazarin na PNT1A - RFK
Naftazarin na PC3 - PL	0.923407	-0.984731	-0.707877	0.849229
Naftazarin na PC3 - MP	-0.932617	0.852578	0.521162	-0.653623
Naftazarin na PC3 - RFD	0.725332	-0.656674	-0.639454	0.282230
Naftazarin na PC3 - RFK	0.944654	-0.932183	-0.876705	0.733945

V následující tabulce jdou vidět (Tab. 8) výsledky korelační analýzy, která zjišťuje míru vztahu mezi působením plumbaginu a naftazarinu na PC3 buňky. Při pohledu na hodnoty koeficientů v tabulce se dá říct, že hodnoty korelují celkem silně, ať už pozitivně nebo negativně. Silná negativní korelace je mezi plumbaginem na PC3 (MP) a naftazarinem na PC3 (PL) a naftazarinem na PC3 (RFK). Dále také mezi plumbaginem na PC3 (PL) a naftazarinem na PC3 (MP). Nejsilnější pozitivní korelace se ukázala být mezi plumbaginem na PC3 (RFK) a naftazarinem na PC3 (LP) a naftazarinem na PC3 (RFK).

Tab. 8 Korelace výsledků působení plumbagin a naftazarinu na PC3 buňky

	Plumbagin na PC3 - PL	Plumbagin na PC3 - MP	Plumbagin na PC3 - RFD	Plumbagin na PC3 - RFK
Naftazarin na PC3 - PL	0.830770	-0.902030	0.603297	0.850599
Naftazarin na PC3 - MP	-0.989071	0.752337	-0.917659	-0.896966
Naftazarin na PC3 - RFD	0.484106	-0.379022	0.658461	0.529726
Naftazarin na PC3 - RFK	0.749622	-0.805142	0.723996	0.885683

Poslední tabulka (Tab. 9) vyjadřuje míru vztahu mezi výsledky působení plumbaginu a naftazarinu na PNT1A buňky. Silně pozitivně korelují výsledky působení naftazarinu na PNT1A (RFK) a plumbaginu na PNT1A (LP). Dále pak plumbagin na PNT1A (MP) a naftazarin na PNT1A (RFD). Silně negativně korelují výsledky působení plumbaginu na PNT1A (RFK) a naftazarinu na PNT1A (MP) a naftazarinu na PNT1A (RFD). Stejně je to u plumbaginu na PNT1A (PL) a naftazarinu na PNT1A (MP). K velmi nízké nebo téměř žádné korelaci dochází mezi plumbaginem na PNT1A (RFD) a naftazarinem na PNT1A (PL). Dále byla nízká korelace zaznamenána u plumbaginu na PNT1A (RFD) a naftazarinu na PNT1A (MP). Velmi nízká negativní korelace byla zjištěna u plumbaginu na PNT1A (RFD) a naftazarinu na PNT1A (RFK). Ve zkratce. Výsledky působení plumbaginu

na PNT1A (RFD) buňky téměř nekoreluje s výsledky působení naftazarinu na stejných buňkách pro všechny 4 parametry.

Tab. 9 Korelace výsledků působení plumbagin a naftazarinu na PNT1A buňky

	Plumbagin na PNT1A - PL	Plumbagin na PNT1A - MP	Plumbagin na PNT1A - RFD	Plumbagin na PNT1A - RFK
Naftazarin na PNT1A - PL	0.883614	-0.761248	-0.074451	0.873091
Naftazarin na PNT1A - MP	-0.925601	0.860932	0.293233	-0.949130
Naftazarin na PNT1A - RFD	-0.738352	0.871924	0.453534	-0.909520
Naftazarin na PNT1A - RFK	0.946481	-0.773772	-0.422859	0.947605

12 Závěr

Hlavní cílem této diplomové práce bylo seznámit se s působením naftochinonů, konkrétně plumbaginu a naftazarinu, na prostatických buněčných liniích. Plumbagin a naftazarin, obě látky přírodního původu, vykazují řadu vlastností, které z nich dělají velmi atraktivní objekty pro zkoumání. Zejména se jedná o vlastnosti antimikrobiální, antimykotické, přes oxidativní, až k té nejdůležitější, a tou je antikarcinogenita. Tyto vlastnosti a projevy naftochinonů byly zkoumány velkým množstvím vědeckých skupin, které byly schopné jejich působení potvrdit. Kromě faktu, že jsou plumbagin a naftazarin látky přírodní, jsou to také cytotoxiny. Jejich cytotoxicita se obvykle zkoumá na buněčných liniích. Pozoruje se vliv jejich působení na morfologii a fyziologii buněk.

V této práci byly použity buňky dvou buněčných linií, na kterých bylo zkoumáno cytotoxické působení plumbaginu a naftazarinu. Prvním krokem zkoumání vlivu na tyto buňky bylo provedení dvou cytotoxických testů. První testování bylo provedeno pomocí systému xCELLigence, kdy bylo proměřeno působení různých koncentrací plumbaginu a naftazarinu na obě linie, což bylo vyjádřeno růstovými křivkami. Současně se pro každou látku zjišťovala hodnota IC_{50} , tedy hodnota koncentrace látky při které dochází k 50 % inhibici buněčné aktivity. Hodnota IC_{50} pro plumbagin na PNT1A buňkách byla **1,88 μM** a pro plumbagin na PC3 buňkách byla **2,83 μM** . Hodnota IC_{50} pro naftazarin na PNT1A buňkách byla zjištěna jako **0,84 μM** a pro naftazarin na PC3 buňkách to bylo **1,15 μM** . Závěr tohoto testu je takový, že **naftazarin se projevuje více cytotoxicky než plumbagin** a to na obou druzích buněk. Koncentrace naftazarinu potřebná k usmrcení poloviny buněk je větší než u plumbaginu.

Druhým cytotoxickým testem byl MTT test. Znovu bylo zkoumáno působení různých koncentrací obou naftochinonů na buněčné linie a to v podobě závislosti viability buněk na koncentraci cytotoxinu. Hodnota IC_{50} pro plumbagin na PNT1A buňkách byla **1,9 μM** a pro jeho působení na PC3 buňky byla hodnota IC_{50} rovna **1,2 μM** . Hodnota IC_{50} pro naftazarin na PNT1A buňkách byla **1 μM** a pro naftazarin na PC3 buňkách byla hodnota IC_{50} **1,5 μM** . Závěr je tu takový, že **naftazarin působí více toxicky na PNT1A buňky a plumbagin působí více toxicky na PC3 buňky**.

Po testování cytotoxicity bylo přistoupeno k analýze fluorescenčních snímků buněk buněčných linií, na které byly aplikovány různé koncentrace plumbaginu a naftazarinu. Projevy jejich cytotoxicity byly sledovány na 4 parametrech: PL, RFD, RFK a MP. Proto, aby bylo možné tyto parametry sledovat, bylo nutné obarvit buňky fluorescenčními barvivami. Intensita fluorescence v digitálních mikroskopických snímcích buněk byla předmětem následné počítačové analýzy. Při analýze snímků buněk barvených pro peroxidaci lipidů bylo

zjištěno, že s rostoucí koncentrací naftochinonů roste i intenzita vyzařování, což znamená, že u buněk dochází k čím dál tím větší peroxidaci lipidů (Obr. 46). Dalším parametrem analýzy byl RFD. Výsledné intensity fluorescence se mezi sebou velmi lišily (Obr. 55). U plumbaginu a naftazarinu na PC3 buňkách docházelo s rostoucí použitou koncentrací k růstu počtu generovaných RFD. Generování RFD plumbaginem a naftazarinem u PNT1A buněk bylo pro naftazarin klesající a pro plumbagin nejdříve rostoucí a ke konci klesající. Jako další se testovaly projevy cytotoxicity pomocí RFK. Pro oba naftochinony docházelo s rostoucí koncentrací aplikovanou na obě buněčné linie k růstu intensity tedy míry tvorby RFK v buňkách (Obr. 64). Posledním sledovaným parametrem byl MP. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací naftochinonů dochází k poklesu fluorescence na snímcích buněk obou linií - klesá mitochondriální potenciál (Obr. 73).

Po vyhodnocení fluorescenčních snímků byla provedena korelační analýza za účelem zjištění, jestli existují nějaké vztahy mezi působením jednotlivých látek na buněčné linie (kapitola 11.5). Ve většině případů docházelo k pozitivní nebo negativní korelaci mezi proměnnými, což značí, že jejich hodnoty klesají nebo stoupají – **efekt látek na buňky je podobný**. Ale v případě srovnání působení plumbaginu na PNT1A (RFD) a působení naftazarinu na stejných buňkách pro všechny parametry nebyl zjištěn žádný vztah – hodnoty korelačních koeficientů se blížily nule.

Závěrem. Tato práce se zabývá cytotoxickým působením dvou vybraných naftochinonů na prostatické buněčné linie. Hlavním mechanismem jejich účinku na prostatické buněčné linie je apoptóza. Na základě tohoto faktu, byly vybrány dva cytotoxické testy a také 4 parametry podle, kterých se cytotoxicita plumbaginu a naftazarinu posuzovala. Testy a analýza byly provedeny. Výstupy těchto experimentů byly zpracovány a vyhodnoceny. Výstupem celé práce jsou ucelené informace o působení naftazarinu a plumbaginu na buňky linie PC3 a PNT1A v rámci jednotlivých analýz.

Seznam použité literatury

- [1] BABULA, P., R. MIKELOVÁ, D. POTĚŠIL, R. KIZEK, L. HAVEL a Z. SLADKÝ. Naftochinony - výskyt v přírodě, biologické vlastnosti. *MendelNet04 Agro*. 2004, s. 99–104.
- [2] Naftochinony. 2.5.1 *Naftochinony* [online]. 2012 Dostupné z: http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/docs/Compound/2-5-1_Naftochinony.pdf
- [3] BABULA, Petr, Radka MIKELOVÁ, Vojtěch ADAM, David POTĚŠIL, Josef ZEHNÁLEK, René KIZEK, Ladislav HAVEL a Zdenek SLADKÝ. Chromatographic analysis of naphthoquinones in plants [Chromatografické stanovení naftochinonů v rostlinách]. *Chemické Listy* [online]. 2006, roč. 100, č. 4, s. 271–276. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33645558821&partnerID=40&md5=df639d2270b6738836588857514252d7>.
- [4] BENTLEY, R. Biosynthesis of vitamin K and other natural naphthoquinones. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1975, roč. 41, č. 1-2, s. 47–68. doi 10.1351/pac197541010047. Dostupné z: <http://iupac.org/publications/pac/41/1/0047/>.
- [5] DEY, P. M. a J. B. HARBORNE. *Plant Biochemistry*. 3. S.l.: Elsevier Ltd., 1997. ISBN 978-0-12-214674-9.
- [6] CHLAPEK, Petr. *Primokultury z embryonálních nádorů dětského věku a charakterizace derivovaných buněčných linií* [online]. S.l., 2007. Masarykova univerzita. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/185032/prif_m/DPM_final.pdf
- [7] KOČÁREK, E., M. PÁNEK a D. NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1069-8.
- [8] GENERI BIOTECH. Testování toxicity in vitro. [online]. 2013 Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/testovani-cytotoxicity/>
- [9] EKWALL, B., V. SILANO, A. PAGANUZZI-STAMMATI a F. ZUCCO. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. In: *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects* [online]. Stanford: John Wiley & Sons Ltd, 1990. s. 75–96. Dostupné z: http://dgc.stanford.edu/SCOPE/SCOPE_41/SCOPE_41_2.02_Chapter_7_75-98.pdf.
- [10] CELIS, Julio E. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Amsterdam: Elsevier, 2006. ISBN 978-0-12-164730-8.
- [11] HUGHES, David a Huseyin MEHMET. *Cell Proliferation and Apoptosis*. S.l.: Garland Science, 2003. ISBN 0203495861.

- [12] Testy cytotoxicity na buňkách pěstovaných in vitro. *BIOLOGIE v kostce* [online]. 2012 Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/2011/05/246-testy-cytotoxicity-na-bunkach.html>
- [13] LIMAME, Ridha, An WOUTERS, Bea PAUWELS, Erik FRANSEN, Marc PEETERS, Filip LARDON, Olivier DE WEVER a Patrick PAUWELS. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PloS one* [online]. Leden 2012, roč. 7, č. 10, s. e46536. [vid. 4. březen 2013]. doi 10.1371/journal.pone.0046536. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3477108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [14] URCAN, Ebru, Ursula HAERTEL, Marianthi STYLOU, Reinhard HICKEL, Harry SCHERTHAN a Franz Xaver REICHL. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* [online]. Leden 2010, roč. 26, č. 1, s. 51–8. [vid. 11. duben 2013]. doi 10.1016/j.dental.2009.08.007. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767088>.
- [15] HOLCIK, Martin, Eric C. LACASSE, Alex E. MACKENZIE a Robert G. KORNELUK. *Apoptosis in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. ISBN 0521529565.
- [16] TOMAN, M. *Veterinární imunologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2009. ISBN 978-80-247-2464-5.
- [17] SIDDIK, Zahid H. a Kapil MEHTA. *Drug Resistance in Cancer Cells* [online]. New York, NY: Springer US, 2009 [vid. 28. březen 2013]. ISBN 978-0-387-89444-7. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-89445-4>
- [18] AL-RUBEAI, MOHAMED FUSSENEGGER, Martin. *Cell Engineering: Apoptosis*. 4. S.l.: Springer, 2004. ISBN 978-1-4020-2217-3.
- [19] SLUYSER, Mels. *Application of apoptosis to cancer treatment*. S.l.: Springer, 2005. ISBN 1402033036.
- [20] CHEN, George G. a Paul B. S. LAI. *Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy: Apoptosis in cancer*. S.l.: Springer, 2009. ISBN 140209597X.
- [21] BABULA, P., V. ADAM, L. HAVEL a R. KIZEK. Naftochinony a jejich farmakologické vlastnosti. *Czech and Slovak pharmacy*. 2007, roč. 3, č. 56, s. 114–119.
- [22] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2012. ISBN 9788024737294.
- [23] DERETIC, Vojo. *Autophagy in immunity and infection*. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd, 2006. ISBN 9783527608546.

- [24] SCHMELZER, Gabriëlla H. a Ameenah GURIB-FAKIM. *Medicinal Plants: Plant resources of tropical Africa*. Wageningen: PROTA, 2008. ISBN 9057822040.
- [25] THOMSON, Thomas. *Chemistry of Organic Bodies, Vegetables*. Glasgow: J.A.W. Weigel, 1838. ISBN 066547704X.
- [26] BOTHIRAJA, Chellampillai, Prajakta P. JOSHI, Ganesh Y. DAMA a Atmaram P. PAWAR. Rapid method for isolation of plumbagin, an alternative medicine from roots of *Plumbago zeylanica*. *European Journal of Integrative Medicine* [online]. Duben 2011, roč. 3, č. 1, s. 39–42. [vid. 18. březen 2013]. doi 10.1016/j.eujim.2011.02.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876382011000096>.
- [27] DUNN, J. T. a L. F. FIESER. Synthesis of Plumbagin. *Journal of the American Chemical Society*. 1928, roč. 58, č. 2, s. 572–575. doi 10.1021/ja01295a010.
- [28] *Summary of data for chemical selection* [online]. S.l. 2012. Dostupné z: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/plumbagin.pdf.
- [29] PAIVA, Selma R. a Maria R. FIGUEIREDO. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2003, roč. 98, č. 7, s. 959–961. [vid. 1. Květen 2013]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762525>.
- [30] GREVENSTUK, Tomás, Sandra GONÇALVES, Telma DOMINGOS, Célia QUINTAS, Justin VAN DER HOOFT, Jacques VERVOORT a Anabela ROMANO. Inhibitory activity of plumbagin produced by *Drosera intermedia* on food spoilage fungi. *Journal of the science of food and agriculture* [online]. Červen 2012, roč. 92, č. 8, s. 1638–42. [vid. 27. Březen 2013]. doi 10.1002/jsfa.5522. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5522>.
- [31] LIOU, Geou-Yarh and Peter STORZ. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research* [online]. Květen 2010, roč. 44, č. 5, s. 479–96. [vid. 9. duben 2013]. doi 10.3109/10715761003667554. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370557>.
- [32] TERTIL, Magdalena, Alicja JOZKOWICZ a Jozef DULAK. Oxidative stress in tumor angiogenesis- therapeutic targets. *Current pharmaceutical design* [online]. Leden 2010, roč. 16, č. 35, s. 3877–94. [vid. 27. duben 2013]. doi 10.1089/ARS.2009.2439. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2848518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [33] TILAK, Jai C., Soumyakanti ADHIKARI a Thomas P. A. DEVASAGAYAM. Antioxidant properties of *Plumbago zeylanica*, an Indian medicinal plant and its active ingredient, plumbagin. *Redox report : communications in free radical research* [online]. Leden 2004, roč. 9, č. 4, s. 219–27. [vid. 27. Duben 2013]. doi 10.1179/135100004225005976. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479566>.

- [34] SANKAR, R., P. S. DEVAMANOHARAN, G. RAGHUPATHI, M. KRISHNASAMY a C. S. Shyamala DEVI. Lipid peroxidation in plumbagin administered rats. *Journal of Biosciences* [online]. Září 1987, roč. 12, č. 3, s. 267–271. doi 10.1007/BF02703071. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02703071>.
- [35] AZIZ, Moammir H., Nancy E. DRECKSCHMIDT a Ajit K. VERMA. Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research* [online]. 1. Listopad 2008, roč. 68, č. 21, s. 9024–32. [vid. 18. března 2013]. doi 10.1158/0008-5472.CAN-08-2494. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2584362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [36] KUO, Po-Lin, Ya-Ling HSU a Chien-Yu CHO. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* [online]. Prosinec 2006, roč. 5, č. 12, s. 3209–21. [vid. 15. března 2013]. doi 10.1158/1535-7163.MCT-06-0478. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172425>.
- [37] NAZEEM, S., Asfar S. AZMI, Sarmad HANIF, Aamir AHMAD, Ramzi M. MOHAMMAD, S. M. HADI a K. Sateesh KUMAR. Plumbagin induces cell death through a copper-redox cycle mechanism in human cancer cells. *Mutagenesis* [online]. Září 2009, roč. 24, č. 5, s. 413–8. [vid. 19. Dubna 2013]. doi 10.1093/mutage/geb023. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505895>.
- [38] HSU, Ya-Ling, Chien-Yu CHO, Po-Lin KUO, Yu-Ting HUANG a Chun-Ching LIN. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 in vitro and in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* [online]. Říjen 2006, roč. 318, č. 2, s. 484–94. [vid. 24. března 2013]. doi 10.1124/jpet.105.098863. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632641>.
- [39] POWOLNY, Anna A. a Shivendra V. SINGH. Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species. *Pharmaceutical research* [online]. Září 2008, roč. 25, č. 9, s. 2171–80. [vid. 27. března 2013]. doi 10.1007/s11095-008-9533-3. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18213451>.
- [40] CHEN, Chien-An, Hen-Hong CHANG, Chung-Yu KAO, Tung-Hu TSAI a Yu-Jen CHEN. Plumbagin, isolated from *Plumbago zeylanica*, induces cell death through apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* [online]. Leden 2009, roč. 9, č. 6, s. 797–809. [vid. 27. dubna 2013]. doi 10.1159/000210028. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20110748>.
- [41] ACHARYA, Bipul R., Surela BHATTACHARYYA, Diptiman CHOUDHURY a Gopal CHAKRABARTI. The microtubule depolymerizing agent naphthazarin induces

- both apoptosis and autophagy in A549 lung cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* [online]. Září 2011, roč. 16, č. 9, s. 924–39. [vid. 4. duben 2013]. doi 10.1007/s10495-011-0613-1. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21667044>.
- [42] PAPAGEORGIOU, Vassilios P., Andreana N. ASSIMOPOULOU, Elias A. COULADOUROU, David HEPWORTH a K. C. NICOLAOU. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 1. Únor 1999, roč. 38, č. 3, s. 270–301. [vid. 1. květen 2013]. doi 10.1002/(SICI)1521-3773(19990201)38:3<270::AID-ANIE270>3.3.CO;2-S. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291521-3773%2819990201%2938%3A3%3C270%3A%3AAID-ANIE270%3E3.3.CO%3B2-S>.
- [43] YAKUBOVSKAYA, A. Y., N. D. POKHILO, V. F. ANUFRIEV a M. M. ANISIMOV. Synthesis and antimicrobial and antifungal activities of compounds of the naphthazarin series. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. 28. Říjen 2009, roč. 43, č. 7, s. 396–398. [vid. 16. duben 2013]. doi 10.1007/s11094-009-0322-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11094-009-0322-z>.
- [44] SHEN, C. C., W. J. SYU, S. Y. LI a Chia-hung LIN. Antimicrobial Activities of Naphthazarins from *Arnebia e uchroma*. *Journal of natural products* [online]. 2002, č. 1, s. 1857–1862. [vid. 16. duben 2013]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np010599w>.
- [45] KIM, Jin-Ah, Eun Kyeong LEE, Seong Joon PARK, Nam Deuk KIM, Dong-Hoon HYUN, Chang Geun LEE, Jae Ho LEE, Kwang Mo YANG, Kyu HEO and Tae Gen SON. Novel anti-cancer role of naphthazarin in human gastric cancer cells. *International journal of oncology* [online]. Leden 2012, roč. 40, č. 1, s. 157–62. [vid. 4. duben 2013]. doi 10.3892/ijo.2011.1195. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904775>.
- [46] MISEVIČIENĖ, Lina, Zilvinas ANUSEVIČIUS, Jonas SARLAUSKAS, Irina F. SEVRIOUKOVA a Narimantas CĖNAS. Redox reactions of the FAD-containing apoptosis-inducing factor (AIF) with quinoidal xenobiotics: a mechanistic study. *Archives of biochemistry and biophysics* [online]. 15. Říjen 2011, roč. 512, č. 2, s. 183–9. [vid. 4. duben 2013]. doi 10.1016/j.abb.2011.05.015. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3138912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [47] HALINSKA, A., T. BELEJ a P. J. O'BRIEN. Cytotoxic mechanisms of anti-tumour quinones in parental and resistant lymphoblasts. *The British journal of cancer. Supplement* [online]. červenec 1996, roč. 27, s. S23–7. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2150036&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [48] CHOI, Seon Young, Tae Gen SON, Hee Ra PARK, Young Jung JANG, Shin Bi OH, Bora JIN a Jaewon LEE. Naphthazarin has a protective effect on the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease model. *Journal of*

- neuroscience research* [online]. Zář 2012, roč. 90, č. 9, s. 1842–9. [vid. 4. duben 2013]. doi 10.1002/jnr.23061. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513651>.
- [49] RIFFEL, A., L. F. MEDINA, V. STEFANI, R. C. SANTOS, D. BIZANI a A. BRANDELLI. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]* [online]. Červen 2002, roč. 35, č. 7, s. 811–8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12131921>.
- [50] NIKON. *Základní metody světelné mikroskopie* [online]. Brno. 2004. Dostupné z: www.mikroskopy.cz.
- [51] ČERNÝ, Jan. *Fluorescenční mikroskopie* [online]. Praha. [b.r.]. Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>.
- [52] TAYLOR, D. a Yu-li WANG. FLUORESCENCE MICROSCOPY OF LIVING CELLS IN CULTURE. In: *Methods in cell biology*. Philadelphia: Elsevier, 1989. s. 333. ISBN 978-0-12-564129-6.
- [53] INGLESE, James. Measuring Biological Responses with Automated Microscopy. In: *Methods in enzymology*. S.l.: Elsevier Inc., 2006. s. 736. ISBN 978-0-12-182819-6.
- [54] LIFE TECHNOLOGIES. *JC-1 and JC-9 Mitochondrial Potential Sensors* [online]. Eugene. 2013. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp03168.pdf>.
- [55] SIGMA-ALDRICH. Mito Red. [online]. 2013 Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/53271?lang=en®ion=CZ>
- [56] LIFE TECHNOLOGIES. *Hoechst Stains* [online]. Eugene. 2013. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp21486.pdf>.
- [57] LIFE TECHNOLOGIES. *Annexin V Conjugates for Apoptosis Detection* [online]. Carlsbad. 2013. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp13199.pdf>.
- [58] LIFE TECHNOLOGIES. *Monomeric Cyanine Nucleic Acid Stains* [online]. Eugene. 2013. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp03602.pdf>.
- [59] LIFE TECHNOLOGIES. *Vybrant[®] Cell Metabolic Assay Kit* [online]. Eugene. 2013. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp23110.pdf>.
- [60] LIFE TECHNOLOGIES. Acridine Orange. [online]. 2013 Dostupné z: <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/A1301?ICID=search-product>
- [61] ACEA BIOSCIENCES. xCELLigence. [online]. 2012 Dostupné z: <http://www.aceabio.com/theory.aspx?cateid=277>

- [62] LIFE TECHNOLOGIES. *BODIPY® Lipid Probes* [online]. Eugene. 2003. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp03792.pdf>.
- [63] LIFE TECHNOLOGIES. 2,3-Diaminonaphthalene. [online]. 2013 Dostupné z: <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/D7918?ICID=search-product>
- [64] LIFE TECHNOLOGIES. *CellROX® Oxidative Stress Reagents* [online]. Carlsbad. 2012. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp10422.pdf>.
- [65] LIFE TECHNOLOGIES. Rhodamine 123. [online]. 2013 Dostupné z: <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/R302?ICID=search-product>
- [66] NASR-ISFAHANI, Shirin, Atefeh MIRSAFIAN a Ali MASOUDI-NEJAD. A New Approach for Touching Cells Segmentation. In: *2008 International Conference on BioMedical Engineering and Informatics* [online]. S.l.: IEEE, Květen 2008, s. 816–820. [vid. 7. květen 2013]. ISBN 978-0-7695-3118-2. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=4548784>.
- [67] SOLOMON, C a T BRECKON. *Fundamentals of Digital Image Processing: A Practical Approach with Examples in Matlab*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2011. ISBN 9781119957003.
- [68] JAYARAMAN, S., S. ESAKKIRAJAN a T. VEERAKUMAR. *Digital image processing* [online]. New Dehli: Tata McGraw Hill Education, 2011. ISBN 9780070144798.
- [69] GONZÁLEZ, R. C., R. R. E. WOODS a S. L. EDDINS. *Digital Image Processing Using Matlab*. USA: Gatesmark Publishing, 2004. ISBN 9788177588989.
- [70] MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* [online]. 8. March 1999, roč. 424, č. 1-2, s. 83–95. [vid. 16. May 2013]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064852>.
- [71] SRIVASTAVA, R. *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms*. New Jersey: Humana Press Inc., 2007. ISBN 9781597451994.
- [72] HUGHES, David and Huseyin MEHMET. *Cell Proliferation and Apoptosis*. Oxford: Garland Science, 2003. ISBN 0203495861.
- [73] SHARMA, A K. *Text Book Of Correlations And Regression*. New Dehli: Discovery Publishing House, 2005. ISBN 9788171419357.

Seznam zkratek

A1	protein příbuzný s BCL2
ADP	adenosindifosfát (z angl. adenosine diphosphate)
AIF	apoptózu vyvolávající faktor (z angl. apoptosis inducing factor)
AKT	protein kináza B
AMP	adenosinmonofosfát (z angl. adenosine monophosphate)
AMPK	AMP aktivovaná proteinová kináza
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
AV	autofagická vakuola
Bak	gen kódující antagonista Bcl-2
Bax	protein X asociovaný s Bcl-2 (z ang. Bcl-2-associated X protein)
Bcl-2	lymfoma B-buňky (z ang. B-cell lymphoma 2)
BECN1	protein Beclin-1
BFL-1	protein rodiny BCL2
BI	buněčný index
BIM	protein 11 podobný Bcl-2 (z angl. Bcl-2-like protein 11)
BOD	s Bcl-2 příbuzný ovariální gen (z angl. Bcl-2-related ovarian death gene)
Cdc2	cyklin-dependentní kináza (z ang. cyclin-dependent kinase 1)
Cdc25C	fosfatáza indukující M fázi buněčného cyklu
ced-3	gen buněčné smrti
ced-4	gen buněčné smrti
Chk2	gen účastnící se zástavy buněčného cyklu
CoA	koenzym A
cyklin B1	specifický cyklin pro G2/M fázi
DAP1	se smrtí asociovaný protein 1 (z angl. death associated protein 1)
DAPK	s buněčnou smrtí asociovaná proteinová kináza
DiOC₂(3)	3,3' - dietyloxakarbokyanin jodid

DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
eIF2	eukaryotický iniciační faktor (z angl. eukaryotic initiation factor 2)
FAD	flavin adenin dinukleotid
FITC	fluorescein isotiokyanát (z angl. fluorescein isothiocyanate)
FM	fluorescenční mikroskopie
fosfo-Cdc2	fosforylovaná cyklin-dependentní kynáza
fosfo-Cdc25C	fosforylovaná fosfatáza indukující M fázi buněčného cyklu
FS	fosfatidylserin
Gcn2	serine/treonin kináza
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
H	vodík
H⁺-ATP	protonová pumpa
IC₅₀	inhibiční dávka 50 (z angl. inhibitory concentration 50)
JNK	c-Jun NH2-terminální kináza
K	draslík
LDH	laktát dehydrogenáza
Mcl-1	protein z rodiny Bcl-2
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl. minimum inhibitory concentration)
MP	mitochondriální potenciál
MRSA	methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus
mTOR	cíl rapamycinu (z angl. mammalian target of rapamycin)
MTS	žlutý tetrazol
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfopfenyl)-2H-tetrazol
NAD⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	redukována forma NAD ⁺

NF-κB	skupina transkripčních faktorů
nuc-1	gen kódující nukleázu štěpící chromatin
OH	hydroxylová skupina
p21/WAF1	cyklin dependentní kinázový inhibitor 1
p53	supresorový protein 53
PARP	poly (ADP-ribóza) polymeráza
PBS	fosfátový pufr (z ang. phosphate buffered saline)
PE	plating efficiency
PI3K	PI-3 kináza
PIP3	produkt PI3K
PL	peroxidace lipidů
PS	fosfatidyl-serin (z angl. phosphatidyl serin)
PTEN	homolog fosfatázy a tenzinu
PTP	mitochondriální přechodné propustné póry
RAP1	druh GTPázy
RFD	reaktivní formy dusíku
RFK	reaktivní formy kyslíku
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNS	reaktivní formy dusíku (anglická zkratka)
ROS	reaktivní formy kyslíku (anglická zkratka)
siRNA	malé interferující RNA (z angl. small interfering RNA)
SSC	citrátový pufr (z ang. saline-sodium citrate)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (z ang. thin layer chromatography)
UPR	unfolded proteinová odpověď (z angl. unfolded protein response)
UV	ultrafialové (z angl. ultra-violet)
VRE	vancomycin-rezistentní enterobakterie
γ-H2AX	indikátor zlomů DNA

Seznam příloh

Příloha 1 Text diplomové práce v elektronické podobě

Příloha 2 Snímky z fluorescenčního mikroskopu (pouze na CD)

Příloha 3 Zdrojové kódy

Příloha 4 Tabulky s hodnotami pro nastavení programu

Příloha 5 Zdrojový soubor s hodnotami a grafy

Příloha 6 Zdrojový soubor se statistickou analýzou