

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

***In vitro* studium mechanismu protinádorového účinku montaninových  
alkaloidů čeledi Amaryllidaceae**

**Darja Koutová**

**Autoreferát disertační práce**  
**Doktorský studijní program: Lékařská chemie a biochemie**

**Hradec Králové**  
**2022**

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Darja Koutová  
Ústav lékařské chemie a biochemie  
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Školitel: RNDr. Radim Havelek  
Ústav lékařské chemie a biochemie  
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Oponenti: pplk. gšt. doc. PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.  
Katedra radiobiologie  
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

doc. PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.  
Katedra farmaceutické botaniky  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská chemie a biochemie dne ..... v ..... od ..... hod.

Tato práce vznikla za podpory grantů:  
Progres Q40/01  
SVV260543

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

Prof. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie  
Garant studijního programu

# Obsah

<b>OBSAH</b> .....	<b>3</b>
<b>SOUHRN</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b> .....	<b>6</b>
NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	6
BUNĚČNÝ CYKLUS.....	6
APOPTÓZA .....	7
MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY VEDOUcí K AKTIVACI MITOGENY AKTIVOVANÝCH PROTEINKINÁZ .....	8
SIGNÁLNÍ DRÁHA FOSFATIDYLINOSITOL-3-KINÁZY PI3K A KINÁZY AKT .....	9
ALKALOIDY V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ .....	9
ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY MONTANINOVÉHO TYPU ČELEDI AMARYLLIDACEAE .....	9
POTENCIÁL MONTANINOVÝCH ALKALOIDŮ V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ .....	10
<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>11</b>
<b>MATERIÁL A METODIKY</b> .....	<b>12</b>
BUNĚČNÉ KULTURY A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY .....	12
CYTOSTATIKA A VYBRANÉ ALKALOIDY MONTANINOVÉHO TYPU.....	12
CYTOTOXICKÝ SCREENING IZOLOVANÝCH MONTANINOVÝCH ALKALOIDŮ .....	12
STANOVENÍ VIABILITY A PROLIFERACE .....	12
ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU .....	13
MĚŘENÍ AKTIVITY KASPÁZ .....	13
STANOVENÍ INDUKCE APOPTÓZY METODOU ZNAČENÍ ANNEXINEM V/PI.....	13
ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOTTING .....	13
STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT .....	13
<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>15</b>
CYTOTOXICKÝ SCREENING IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ .....	15
VLIV PANKRACINU NA VIABILITU A PROLIFERACI BUNĚČNÉ LINIE A549 A MOLT-4 .....	17
SNÍŽENÁ PROLIFERACE BUNĚK A549 A MOLT-4 JE SPOJENA S REDISTRIBUCÍ BUNĚK V BUNĚČNÉM CYKLU.....	19
PANKRACIN INDUKUJE APOPTÓZU U BUNĚK LEUKEMICKÉ LINIE MOLT-4.....	21
ZVÝŠENÍ PROCENTA BUNĚK V G1 A S FÁZI U BUNĚK A549 JE SPOJENO S AKTIVACÍ SIGNÁLNÍ DRÁHY AKT/P27/PRB A PROAPOPTOTICKÁ AKTIVITA PANKRACINU V BUŇKÁCH MOLT-4 JE SPOJENA S UPREGULACÍ PROTEINU P53 FOSFORYLOVANÉHO NA SERINU 392.....	23
<b>DISKUSE</b> .....	<b>25</b>
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>29</b>
<b>SEZNAM CITACÍ POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>30</b>
<b>PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA</b> .....	<b>34</b>
PŮVODNÍ VĚDECKÉ PUBLIKACE S IMPAKT FAKTOREM .....	34
PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY.....	34
PŘEDNÁŠKY NA ODBORNÝCH SETKÁNÍCH .....	34
ABSOLVOVANÉ VZDĚLÁVACÍ AKCE, PREZENTACE POSTERŮ:.....	35

## Souhrn

Možnosti současné terapie nádorových onemocnění jsou široké, přesto však tato onemocnění stále patří mezi nejčastější příčiny úmrtí. Dosavadní poznatky biomedicínského výzkumu se čím dál tím více uplatňují v léčebné strategii tohoto typu onemocnění. Pochopení molekulárních drah spojených se vznikem nádorových buněk, jejich progresí a metastází vedl k objevu nových protinádorových léčiv a rozvoji cílené léčby. Současně také poznání molekulárního mechanismu účinku protinádorových léčiv získaných z rostlin či jejich semisyntetických derivátů umožňuje rozšířit portfolio dosud používaných cytostatik.

Cílem disertační práce bylo studium cytotoxického a cytostatického účinku dosud neprozkoumaných isochinolinových alkaloidů montaninového typu *in vitro* s použitím panelu nádorových buněčných linií a nenádorové buněčné linie lidských plicních fibroblastů. V počáteční fázi studie byly základní typy montaninových alkaloidů - montanin a pankracin - izolovány, dále podrobeny screeningu cytotoxicity s použitím panelu devíti nádorových buněčných linií odlišného histotypu a jedné nenádorové buněčné linie plicních fibroblastů. Byly stanoveny hodnoty 50 % inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub>. Pankracin, parentní alkaloid čeledi Amaryllidaceae, byl komplexně prostudován s cílem pochopit molekulární mechanismus jeho účinku, především tedy vliv na viabilitu a proliferaci rezistentní buněčné linie adenokarcinomu plic A549 a leukemické linie MOLT-4. Jako součást detailnějšího studia molekulárních mechanismů účinku byly rovněž použity metody, které pomohly odkrýt vliv pankracinu na buněčný cyklus, vliv na indukci apoptózy a dále metody použité k detekci proteinů molekulárních drah vedoucí k antiproliferačnímu a cytotoxickému účinku. Nejprve byla zkoumána buněčná proliferace a viabilita nádorových buněk metodou barvení Trypanovou modří a detekcí proliferace v reálném čase systémem xCELLigence. Vliv na buněčný cyklus byl stanoven průtokovou cytometrií. Apoptóza byla stanovena pomocí značení Annexinem V/PI a také kvantifikací aktivity kaspáz (-3/7, -8 a -9). Proteiny účastníci se dějů spojených se zastavením růstu či iniciací apoptózy byly detekovány elektroforeticky a pomocí metody Western blott. Pankracin statisticky významně snížil viabilitu a proliferaci leukemické buněčné linie MOLT-4. Indukce apoptózy v buňkách MOLT-4 po ovlivnění pankracinem byla prokázána statisticky významně vyšší aktivitou kaspáz a rovněž detekcí fosfatidylserinu na mimobuněčné straně cytoplazmatické membrány leukemických buněk. Dalším důkazem indukce programované buněčné smrti vyvolané pankracinem je detekce tumor supresorového proteinu p53 fosforylovaného na serinu 392, proapoptotické MAP kinázy p38 fosforylované na threoninu 180 a tyrosinu 182 a upregulace inhibitoru cyklin dependentních kináz, proteinu p27. Pankracin statisticky významně inhiboval proliferaci buněčné linie adenokarcinomu plic A549 a tento efekt přetrvával po dobu 96 h. Inhibice růstu rezistentního adenokarcinomu plic se projevila v důsledku zvýšení akumulace buněk v G1 fázi, tato zástava byla způsobena downregulací tumor supresorového proteinu Rb fosforylovaného na serinu 807 a 811, upregulací p27 a downregulací Akt kinázy fosforylované na threoninu 308. Závěrem lze tedy uvést, že redistribuce buněk v buněčném cyklu a indukce programované buněčné smrti jsou klíčové mechanismy působení pankracinu.

## Summary

The possibilities of current therapy of cancer diseases are wide, yet these diseases are still among the most common causes of death. The current findings of biomedical research are increasingly being applied in the treatment strategy of cancer. Understanding the molecular pathways associated with cancer cell formation, progression, and metastasis has led to the discovery of new anticancer drugs and the development of targeted therapies. Simultaneously, knowledge of the molecular mechanism of action of anticancer drugs derived from plants or their semisynthetic derivatives makes it possible to expand the portfolio of cytostatics used so far.

The aim of the dissertation was to study the cytotoxic effect of hitherto unexplored montanine-type isoquinoline alkaloids *in vitro* using a panel of cancer cell lines and a non-cancer cell line of human lung fibroblasts.

In the initial phase of the study, the basic types of montanine alkaloids, montanine and pancracine, were isolated, further subjected to cytotoxicity screening using a panel of 9 cancer cell lines of different histotype and one non-cancerous cell line formed by lung fibroblasts. Mean inhibitory concentrations IC<sub>50</sub> values were determined. Pancracine, the parent alkaloid of the Amaryllidaceae family, has been comprehensively studied in order to understand the molecular mechanism of its action, especially the effect on viability and proliferation of the resistant lung adenocarcinoma cell line A549 and the leukemic cell line MOLT-4. As part of a more detailed study of the molecular mechanisms of action, methods have also been used that have shown its effect on cell cycle, replication, induction of apoptosis, and detection of molecular pathway proteins leading to antiproliferative and cytotoxic effects. First, cell proliferation and cancer cell viability were measured by Trypan blue staining assay and xCELLigence real-time proliferation system. The effect on the cell cycle was determined by flow cytometry. Apoptosis was determined by Annexin V / PI labelling and quantification of caspase activity (-3/7, -8 and -9). Proteins involved in growth arrest or apoptosis activation were detected by electrophoresis and western blotting. Pancracine significantly reduced the viability and proliferation of the leukemic cell line MOLT-4. The apoptosis-inducing effect of pancracine in MOLT-4 cells was demonstrated by a significantly higher caspase activity as well as by the detection of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane of leukemia cells. Further evidence of apoptosis is the detection of the p53 tumor suppressor protein phosphorylated at serine 392, the proapoptotic MAP kinase p38 phosphorylated at threonine 180, and tyrosine 182, and the upregulation of the inhibitor of cyclin-dependent kinases p27. Pancracine significantly inhibited the proliferation of the A549 lung adenocarcinoma cell line and this effect persisted for 96 h. Growth inhibition of resistant lung adenocarcinoma was due to increased cell accumulation in the G1 phase, this G1 block was caused by downregulation of the tumor suppressor protein Rb phosphorylated at serine 807 and 811, upregulation of p27, and downregulation of Akt kinase phosphorylated at threonine 308.

In conclusion, cell cycle perturbation and induction of apoptotic cell death were considered to be the key mechanisms of pancracine action.

# Úvod do problematiky

## Nádorová onemocnění

Přes značné vědecké a lékařské úsilí patří nádorová onemocnění mezi nejčastější příčiny úmrtí. Léčba v současné době zahrnuje chirurgické odstranění, radioterapii, chemoterapii, včetně hormonální terapie, neustále se rozvíjející imunoterapii a biologickou léčbu a samozřejmě kombinaci zmíněných. Hledání nových protinádorových léčiv v rovině základního výzkumu je možné chemickou *de novo* syntézou, kombinatorní chemií, purifikací nových protinádorových antibiotik, izolací a identifikací nových sloučenin rostlinného původu, případně přípravou semisyntetických derivátů vycházejících z látek přírodního původu (Klener a Klener 2010). Pochopení mechanismu účinku těchto látek v rovině základního výzkumu včetně jejich vlivu na buněčný cyklus a apoptózu je předpokladem úspěšného terapeutického zásahu.

## Buněčný cyklus

Buněčný cyklus představuje sled vzájemně navazujících a souvisejících dějů, které vedou od jednoho buněčného dělení k následujícímu (Kovář 2000). Původně bylo buněčné dělení rozděleno do dvou fází: mitóza (M), tj. proces jaderného dělení; a interfázi, tedy přechod mezi dvěma M fázemi. Fáze mitózy zahrnují profázi, metafázi, anafázi a telofázi. Později se ukázalo, že i relativně klidná interfáze zahrnuje specifické děje, které se vymezily do fází G1, S a G2 (Vermeulen et al. 2003). Fáze G1 představuje časový úsek mezi ukončením předchozí mitózy a začátkem replikace DNA, součástí S fáze je tedy syntéza DNA. Ukončením S fáze začíná G2 fáze, což je časový úsek, ve kterém probíhá hlavní příprava na mitózu, tedy M fázi (Kovář 2000). Buňky v G1 mohou před zahájením replikace DNA vstoupit do klidového stavu zvaného G0. Buňky v G0 představují hlavní populaci nerostoucích, neproliferujících buněk v lidském těle (Vermeulen et al. 2003). Vzhledem k důležitosti procesů, které jsou součástí buněčného cyklu, je v rámci buněčného cyklu nastaven důmyslný systém kontroly. Kontrolní body buněčného cyklu jsou takové body progresu, kde se na základě endogenních i exogenních signálů rozhoduje o dalším postupu buňky buněčným cyklem (Kovář 2000). Hlavní rodiny regulačních proteinů, které hrají klíčovou roli v řízení progresu buněčného cyklu, jsou cykliny, cyklin dependentní kinázy (Cdk), jejich substrátové proteiny, inhibitory Cdk (CKI) a tumor supresorový genový produkt p53 a tumor supresorový fosforylovaný retinoblastomový protein pRb (Golias et al. 2004). Tyto rodiny tvoří základní regulační mechanismus zodpovědný za katalýzu přechodu buněčného cyklu a postup kontrolními body (Golias et al. 2004).

U buněk nacházejících se v G1/S kontrolním bodě probíhá kontrola iniciace replikace DNA a tato kontrola se provádí v závěrečné části G1 fáze (Kovář 2000). Cyklin dependentní kinázy (Cdk) a cykliny buněčného cyklu tvoří aktivní komplexy. V této fázi buněčného cyklu jsou důležité 2 typy těchto komplexů, konkrétně Cdk4/6 ve vazbě s cyklinem D a Cdk2 ve vazbě s cyklinem E, jež vzájemně spolupracují na uvolnění transkripčního komplexu, který obsahuje Rb protein a transkripční faktor E2F (Bartek a Lukas 2001). Součástí tohoto inhibičního komplexu je hypofosforylovaný Rb protein ve vazbě na E2F-DP1 a histondeacetyláza HDAC. Fosforylací Rb proteinu komplexem Cdk4/6-cyklin D a Cdk2-cyklin

E dojde k disociaci HDAC, čímž je umožněna transkripce genů potřebných pro replikaci DNA. Růstové faktory tuto kaskádu spustí aktivací Akt kinázy, která fosforyluje transkripční faktor FoxO1/3, tím jej inhibuje a zajišťuje tak přežití a proliferaci buněk. Faktorů a podnětů, které naopak zastaví celý tento proces, je celá řada, například poškození DNA, replikační stárnutí nebo snížená koncentrace růstových faktorů. Zvláštní úlohu v tomto procesu zajišťují inhibitory Cdk (CKI), rodina specifických členů INK4 nebo Kip/Cip, mezi které řadíme například protein p21 nebo p27 (Bartek a Lukas 2001). Zablokování replikace DNA na základě indukce inhibitoru p21 realizuje protein p53 v reakci na poškození DNA (Kovář 2000). K aktivaci inhibitoru p27 dochází prostřednictvím inhibičního růstového faktoru transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) a také v důsledku kontaktu buněk. Substrátem p27 je Cdk2-cyklin E, ale také Cdk4/6-cyklin D. Zvýšená exprese p27 vede ke G1 bloku. TGF $\beta$  kromě regulace CKI také inhibuje transkripci cdc25A, což je fosfatáza přímo vyžadována pro aktivaci Cdk. K inhibici cdc25A dochází také ubikvitinylací pomocí ubikvitin ligázy SCF v reakci na poškození DNA cestou přes Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinázu, ATM and Rad3-related (ATR) kinázu a checkpoint kinázy Chk1/2.

G2 kontrolní bod se nachází na přechodu G2 fáze do mitózy. Je spojen s aktivací Cdk2-cyklin B. Zablokování vstupu do mitózy způsobuje detekované poškození DNA, nedokončená replikace DNA a detekované poruchy duplikace centrozómu. Cdk2 je udržována v neaktivním stavu pomocí tyrosinkináz Wee1 a Myt1. Stopy poškození DNA vyvolané například ionizačním zářením vedou k aktivaci ATM/ATR kinázy, které spustí dvě paralelní kaskády, jež ve výsledku vedou k inaktivaci komplexu Cdk2-cyklin B. První kaskáda rychle inhibuje progresi do mitózy aktivací Chk1, která fosforylací inaktivuje cdc25, čímž se zabrání aktivaci Cdk2 (Řezáčová a Vávrová 2000). Druhá cesta vede přes tumor supresorový protein p53, jehož fosforylace umožní disociaci z MDM2 a MDM4 komplexu a to následně umožní aktivovat DNA vazebnou a transkripční regulační aktivitu p53. Transkripční aktivita p53 má dopad na gen 14-3-3, který se váže na fosforylovaný komplex Cdk2-cyklin B a exportuje ho z jádra, dále na gen GADD45, který váže a disociuje komplex Cdk2-cyklin B a p53 rovněž zvyšuje transkripční aktivitu pro protein p21, který je inhibítorem cyklin dependentních kináz včetně Cdk2 (Al-Ejeh et al. 2010). Až polovina solidních nádorů vykazuje strukturální defekty p53. Nejčastější funkční blokádu p53 představuje zvýšení exprese MDM2 (Klener a Klener 2013).

## **Apoptóza**

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je proces, který vede k řízené eliminaci přestárných, nefunkčních, nepotřebných, mutovaných, infikovaných či transformovaných buněk (Klener a Klener 2013). Jedná se o evolučně velmi starý mechanismus a obvykle nevede k rozvoji zánětlivé reakce. Je jisté, že jakékoliv omezení regulačních zásahů v procesu apoptózy vede k rozvoji různých patologických stavů, včetně nádorových onemocnění. Buňka umírající apoptózou vykazuje charakteristické morfologické změny, které ji odlišují od jiných typů buněčné smrti. Patří mezi ně kondenzace a fragmentace chromatinu v jádře, tvorba výběžků cytoplazmatické membrány, celkové zmenšení a zakulacení buňky a v pozdních fázích rozpad celé buňky do tzv. apoptotických tělísek (Ondroušková a Vojtěšek 2014). Rozlišujeme dvě

hlavní apoptotické dráhy, receptorovou (vnější, extrinsická) a mitochondriální (vnitřní, intrinsická).

Součástí obou těchto drah je aktivace cysteinových proteáz tzv. kaspáz a to štěpením neaktivních zymogenů, prokaspáz. Proces v obou případech vede ke spuštění efektorových kaspáz, které mají za úkol ireverzibilní strukturní změnu buněčných komponent a řízenou přeměnu buňky v apoptotická tělíska (Klener a Klener 2013). Apoptotická tělíska obsahují stále funkční organely, fragmenty kondenzovaného jádra a udržují si intaktní cytoplazmatickou membránu, která se od membrány zdravých buněk liší přítomností fosfatidylserinu na její vnější straně (Ondroušková a Vojtěšek 2014) a tím jsou rozpoznána a fagocytována makrofágy bez rozvoje zánětlivé reakce (Klener a Klener 2013).

K aktivaci vnější dráhy dochází vazbou ligandů smrti (TRAIL, FasL, TNF) na receptory smrti (DR4/DR5, Fas, TNFR atd.) vytvářející trimery. Následně spustí apoptotickou kaskádu dějů přes adaptorové proteiny, a to aktivací prokaspázy-8 nebo prokaspázy-10 (Ondroušková a Vojtěšek 2014).

K iniciaci apoptózy vnitřní mitochondriální cestou dochází zejména v případě neopravitelného poškození DNA. Pokud poškození DNA buňka neopraví, je odsouzena k záhubě. Hlavní roli v tomto procesu pak má tumor supresorový transkripční faktor p53. Mutace p53 či jiný defekt v rámci kontroly buněčné integrity, či defekt v apoptotické dráze může vést k přežívání buněčných klonů s mutovanou DNA. Selže-li apoptotická kontrola a překonají-li tyto buňky navíc ještě imunologický dohled, dochází k šíření nádorového onemocnění (Klener a Klener 2013). Regulaci apoptózy zajišťuje rodina Bcl-2 proteinů, které jsou přítomné v membráně mitochondrií nebo v cytoplazmě. Společným znakem těchto proteinů je přítomnost BH-domén v jejich struktuře (Řezáčová a Vávrová 2000). Rozlišujeme proapoptotické (Bax, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa) a antiapoptotické (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1) Bcl-2 proteiny. Vzájemný poměr a interakce proapoptotických a antiapoptotických členů rodiny Bcl-2 rozhoduje o tom, zda bude apoptotická dráha inhibována nebo aktivována (Ondroušková a Vojtěšek 2014). K vzájemné interakci dochází právě pomocí BH-3 domén, dojde k vytvoření dimérů a tím se mohou navzájem inaktivovat (Ondroušková a Vojtěšek 2014). V procesu mitochondriální apoptotické cesty dochází k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií, ten se v cytoplazmě spojuje s proteinem Apaf-1 a prokaspázou-9, vytvoří se apoptozom a dochází ke štěpení prokaspázy-9 na aktivní kaspázu-9. Současně dochází k uvolnění dalších proteinů z mitochondrií (např. second mitochondria-derived aktivátor/ direct IAP-binding protein with low pI SMAC/DIABLO či protein patřící do rodiny septinů ARTS apod.), které vážou a inaktivují antiapoptotické proteiny. Kaspáza-9 aktivuje efektorové kaspázy (kaspázy -3/-7), které v dalším procesu štěpí proteiny související s buněčnou adhezí, regulací apoptózy, strukturou jádra, buněčným cyklem a ve výsledku dojde k buněčné smrti (Ondroušková a Vojtěšek 2014).

### **Molekulární mechanismy vedoucí k aktivaci mitogeny aktivovaných proteinkináz**

V důsledku poškození DNA jsou v buňce aktivovány mechanismy vedoucí k odstranění tohoto poškození nebo mechanismy vedoucí k přežití a proliferaci buňky, hlavní roli v tomto



procesu hrají mitogenem aktivované proteinkinázy MAPK (Řezáčová a Vávrová 2000). Dosud bylo popsáno pět základních MAPK, z nichž extracelulárními signály regulované kinázy ERK1 a ERK2 mají význam spíše v signalizaci vedoucí k přežití buňky. Druhým typem jsou Jun N-terminální kinázy, JNK1, JNK2 a JNK3, dále mezi MAP kinázy řadíme p38 kinázy a ERK3/ERK4 a ERK5. Z těchto kináz jsou vzhledem k indukci signálů vedoucí ke smrti buňky nejdůležitější kinázy typu JNK a kináza p38, v literatuře je popisována spíše jejich proapoptotická úloha (Řezáčová a Vávrová 2000). Kináza p38 se rovněž podílí na zástavě buněčného cyklu (Muthná et al. 2010).

### **Signální dráha fosfatidylinositol-3-kinázy PI3K a kinázy Akt**

Signální dráha zahrnující fosfatidylinositol-3-kinázu PI3K a kinázu Akt řídí buněčnou odpověď jako reakci na poškození buňky či v reakci na dostatek růstových faktorů a zajišťuje tak růst a přežití buněk a dále také metabolickou kontrolu a migraci (Faes a Dormond 2015). Tato dráha se například aktivuje během G1/S přechodu buněčného cyklu a reguluje několik klíčových regulátorů buněčného cyklu, včetně stability proteinů p21, cyklinu D a p27 (Fresno-Vara et al. 2004). Klíčový mechanismus pro Akt modulaci specifické substrátové aktivity, jako jsou transkripční faktory  $\beta$ -catenin, p21, p27, MDM2 nebo Forkhead, zahrnuje regulaci jejich cytoplazmatické nebo jaderné lokalizace fosforylací. Dochází k indukci exprese několika genů, jako je např. gen cyklinu D1, který indukuje progresi buněčného cyklu prostřednictvím regulace hyperfosforylace a inaktivace proteinu Rb. Akt fosforyluje p27 a inhibuje jeho antiproliferační účinky tím, že jej zadržuje v cytoplazmě, podobný mechanismus byl popsán i pro protein p21 (Fresno-Vara et al. 2004).

### **Alkaloidy v terapii nádorových onemocnění**

Výzkum léků na bázi rostlin se týká především vývoje protinádorových léčiv z alkaloidů (Mondal et al. 2019), ačkoliv jejich biologické účinky jsou mnohem širší a rozmanitější. Intenzivní výzkum přírodních látek obohatil léčebnou strategii protinádorové terapie. Alkaloidy vinblastin, vinkristin a semisyntetické deriváty vinorelbin, vindesin a vinflunin získané studiem obsahových látek barvínku (*Catharanthus roseus*, *Vinca rosea* L.) představují významnou součást dnešní palety cytostatik (Klener a Klener 2010). Dále lze uvést například inhibitory topoizomerázy I inspirované alkaloidem kamptotecinem stromu *Camptotheca acuminata* (Gordaliza 2007). Rovněž je nutné zmínit taxany, látky izolované z kůry tisu, jež daly vzniknout inhibitorům depolymerace mikrotubulů a paletu cytostatik tak doplňuje paklitaxel a docetaxel (Klener a Klener 2013).

### **Isochinolinové alkaloidy montaninového typu čeledi Amaryllidaceae**

Do dnešního dne bylo izolováno přes 500 isochinolinových alkaloidů Amaryllidaceae s rozdílnou strukturou a biologickou aktivitou (Van Goietsenoven 2010). Ačkoliv některé látky jako Amaryllidaceae alkaloid pankratistatin (pankratistatinový strukturální typ) dosáhly po sérii podrobných studií procesu klinického hodnocení, většina isochinolinových alkaloidů je, co se týče úrovně inhibiční aktivity vůči růstu a viabilitě nádorových buněk, poznáním pouze na počátku preklinického vývoje (Qing et al. 2017). Negativum pro širší studium tak představuje absence detailnějších znalostí o mechanismu působení isochinolinových alkaloidů, cílové

molekule nebo vlivu struktury na aktivitu, což potlačuje proces vedoucí k efektivnímu výběru kandidátního léčiva. Isochinolinové alkaloidy montaninového strukturního typu patří do čeledi Amaryllidaceae nejsou zdaleka tak prozkoumány, ačkoliv již dříve byla publikována první data naznačující cytotoxicitu montaninu, který je hlavním představitelem této skupiny látek (Silva et al. 2008).

Manthidin, koccinin, manthin a montanin byly první alkaloidy montaninového typu izolované Wildmanem a kol. v roce 1955 z rostliny rodu *Haemanthus* (Wildman a Kaufman 1955).

Doposud bylo identifikováno čtrnáct alkaloidů izolovaných z různých rostlin čeledi Amaryllidaceae, základní skelet tohoto strukturního typu tvoří pentacyklický 5,11-methanomorphanthridinový kruhový systém (Koutová et al. 2020). Byly započaty studie věnující se biologické aktivitě alkaloidů typu montaninu. Vzhledem k jejich významným inhibičním účinkům na růst nádorových buněčných linií patří dnes tyto struktury k nejintenzivněji zkoumaným (Masi et al. 2019, Al Shammari et al. 2020, Breiterová et al. 2020, Govindaraju et al. 2018). Bylo také prokázáno, že některé alkaloidy typu montaninu vykazují anxiolytické, antidepressivní a antikonvulzivní účinky včetně účinků imunomodulačních (da Silva et al. 2006). Samotný montanin byl studován také z hlediska inhibice acetylcholinesterázy jako potenciální zdroj léčiva Alzheimerovy choroby, potlačení revmatických onemocnění a terapeutického využití jeho antibakteriálních a antimykotických účinků (Farinon et al. 2017, Pagliosa et al. 2010, Evidente et al. 2004).

### **Potenciál montaninových alkaloidů v terapii nádorových onemocnění**

Prvním důkazem, že alkaloidy montaninového strukturního typu vykazují slibné *in vitro* cytotoxické účinky vůči nádorovým liniím, byla studie z roku 2008 popisující inhibiční efekt na růst nádorových buněk po aplikaci montaninu izolovaného z cibulí rostliny *Hippeastrum vittatum* (Silva et al. 2008). Od té doby se výzkum alkaloidů montaninového typu včetně izolace, přípravy semisyntetických derivátů a vlivu těchto látek na proliferaci a životaschopnost nádorových buněk rozšířil, stále však chybí data naznačující mechanismus tohoto působení.

## Cíle disertační práce

Cílem komentovaného souboru publikací bylo komplexně prostudovat cytostatickou a cytotoxickou aktivitu skupiny vybraných montaninových alkaloidů s použitím panelu nádorových buněčných linií odlišného histotypu a nenádorové lidské buněčné linie plicních fibroblastů. Zároveň si tato práce klade za cíl poodhalit molekulární mechanismus účinku vybraného montaninového alkaloidu. Konkrétně se věnuje těmto dílčím úkolům:

- Stanovení růstového procenta (GP) dosud netestovaných alkaloidů izolovaných z rostlin *Hippeastrum cultivars* v panelu 9 buněčných linií odvozených z histotypově odlišných nádorů a u jedné nenádorové linie lidských plicních fibroblastů.
- Stanovení hodnoty inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  u těch izolovaných alkaloidů, jejichž jednodávková koncentrace  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  snížila GP pod 50 %.
- Stanovení růstového procenta (GP) dosud netestovaných alkaloidů izolovaných z rostliny *Narcissus L. cv. Professor Einstein* v panelu 9 buněčných linií odvozených z histotypově odlišných nádorů a u jedné nenádorové linie lidských plicních fibroblastů.
- Stanovení hodnoty inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  u těch izolovaných alkaloidů, jejichž jednodávková koncentrace  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  snížila GP pod 50 %.
- Pomocí vhodné metody určit, zda je cytostatický účinek vybraného montaninového alkaloidu dlouhodobý a dávkově závislý.
- Posoudit, zda je cytostatický a cytotoxický účinek alkaloidu spojen s redistribucí buněčné populace v jednotlivých fázích buněčného cyklu.
- Zhodnotit, zda je cytotoxický účinek montaninového alkaloidu spojen s aktivací programované buněčné smrti a pomocí vybrané metody kvantifikovat počet apoptotických buněk v časně a pozdní fázi apoptózy.
- Detekovat a kvantifikovat klíčové proteiny účastníci se molekulárních dějů v pozadí cytostatického a cytotoxického účinku montaninového alkaloidu spojených se zástavou buněčného cyklu či indukci apoptózy.

## **Materiál a metodiky**

### **Buněčné kultury a kultivační podmínky**

Experimenty byly provedeny s vybranými lidskými nádorovými buněčnými liniemi A549 (nemalobuněčný adenokarcinom plic), HT-29 (adenokarcinom tlustého střeva), A2780 (adenokarcinom ovarií), HeLa (karcinom děložního hrdla), MCF-7 (karcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom), Jurkat (akutní leukémie T-buněk) a MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), HepG2 (hepatocelulární karcinom), HT-29 (adenokarcinom tlustého střeva), PANC-1 (karcinom slinivky břišní) a vybranou nenádorovou buněčnou linií MRC-5 (lidské plicní fibroblasty), které byly zakoupeny od firmy ECACC (Salisbury, Velká Británie) a kultivovány v souladu s pokyny dodavatele. Všechny buněčné linie byly kultivovány v kontrolované atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> při 37 ° C v kultivačním médiu. Buňky byly pasážovány každé 2 až 3 dny v maximálním rozsahu 20 pasáží v případě adherentních linií, 10 pasáží u linií suspenzních.

### **Cytostatika a vybrané alkaloidy montaninového typu**

Isochinolinové alkaloidy montaninového typu poskytla výzkumná skupina ADINACO, Katedry farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy. Čerstvé zásobní roztoky alkaloidů montaninového typu v koncentracích 50 μmol.l<sup>-1</sup> byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a dále ředěny podle potřeby příslušného experimentu. Jako negativní kontrola sloužily buňky ovlivněné 0,1 % DMSO. Pozitivní kontrolou v experimentech byly buňky ovlivněné 5 % DMSO, cisplatinou v koncentraci 5 μmol.l<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nebo doxorubicinem v koncentraci 1 μmol.l<sup>-1</sup> a 0,25 μmol.l<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **Cytotoxický screening izolovaných montaninových alkaloidů**

Byla zhodnocena antiproliferační a cytotoxická aktivita alkaloidů montaninového typu působením jednodávkové expozice 10 μmol.l<sup>-1</sup> s použitím cytotoxického testu WST-1 (Sigma-Aldrich) v panelu 9 nádorových a 1 nenádorové buněčné linie. U látek s nejvyšší aktivitou snižujících proliferaci buněk alespoň na 50 % oproti negativní kontrole (0,1 % DMSO) po aplikaci dávky 10 μmol.l<sup>-1</sup> byla stanovena hodnota inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> s využitím biostatistického programu GrahPad Prism 7 biostatistics (GraphPad).

### **Stanovení viability a proliferace**

Buněčná proliferace a viabilita buněk byla stanovena u vybrané suspenzní nádorové buněčné linie MOLT-4 a adherentní buněčné linie A549 v intervalu 24 a 48 h (MOLT-4) a 24, 48 a 72 h (A549) po aplikaci pankracinu (2,5; 5; 10 a 20 μmol.l<sup>-1</sup>). Integrita buněčné membrány byla stanovena použitím barviva Trypanové modře (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Počty buněk byly stanoveny pomocí Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu Nikon Eclipse E200 (Nikon, Tokio, Japonsko). Kontinuální měření proliferace a viability v reálném čase bylo měřeno přístrojem xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, CA, USA) po působení vybraných koncentrací pankracinu (1; 5; 10; 20 a 50 μmol.l<sup>-1</sup>). Kinetika růstu byla detekována u lidského adenokarcinomu plic A549, adenokarcinomu prsu MCF-7, hepatocelulárního karcinomu HepG2 a karcinomu ovarií A2780. Buňky ošetřené 0,1 % DMSO byly použity jako

negativní kontrola a buňky ošetřené 5 % DMSO jako pozitivní kontrola. Normalizovaný buněčný index CI byl měřen po dobu 72 h.

### **Analýza buněčného cyklu**

Buňky byly promyty ledově vychlazeným PBS a fixovány 70 % ethanolem. Pro detekci fragmentů DNA s nízkou molekulovou hmotností byly buňky označeny propidium jodidem (PI) ve Vindelově roztoku po dobu 1 h při 37 ° C. Obsah DNA byl stanoven pomocí průtokového cytometru CyAn (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) při excitační vlnové délce 488 nm. Data byla analyzována pomocí softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA).

### **Měření aktivity kaspáz**

Indukce programované buněčné smrti byla stanovena monitorováním aktivit kaspáz-3/7, kaspázy-8 a kaspázy-9 pomocí komerčního kitu Caspase-Glo Assays (Promega, Madison, WI, USA) a s použitím 96 jamkového destičkového formátu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po přidání 50 µl Caspase-Glo Assays reagentu a po 30 min inkubace byla měřena luminiscence na spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko).

### **Stanovení indukce apoptózy metodou značení Annexinem V/PI**

Apoptóza byla stanovena pomocí kitu Alexa Fluor®488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) dle manuálu výrobce. Měření byla provedena pomocí průtokového cytometru CytoFLEX LX (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Data byla analyzována softwarem Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

### **Elektroforéza a western blotting**

Pro přípravu vzorků byly použity celobuněčné lyzáty a obsah proteinů byl kvantifikován metodou s kyselinou bicinchoninovou BCA pomocí kitu BCA Protein Assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Proteiny byly separovány elektroforeticky a přeneseny metodou Western blot na polyvinylidenfluoridové PVDF membrány (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Inkubace s primární protilátkou proti specifickým antigenům a ve vhodných ředěních byly provedeny při 4 °C přes noc. Následující den byly membrány promyty a poté inkubovány s vhodnou sekundární protilátkou (DakoCytomation, Glostrup, Dánsko nebo Cell Signaling, Danvers, MA, USA) po dobu 1 h při pokojové teplotě. Detekce specifických proteinů byla stanovena chemiluminiscenčním detekčním kitem (Roche, Basel, Švýcarsko). Kvantifikace byla provedena denzitometricky systémem pro analýzu obrazu GeneTools (Syngene, Cambridge, UK).

### **Statistické zpracování dat**

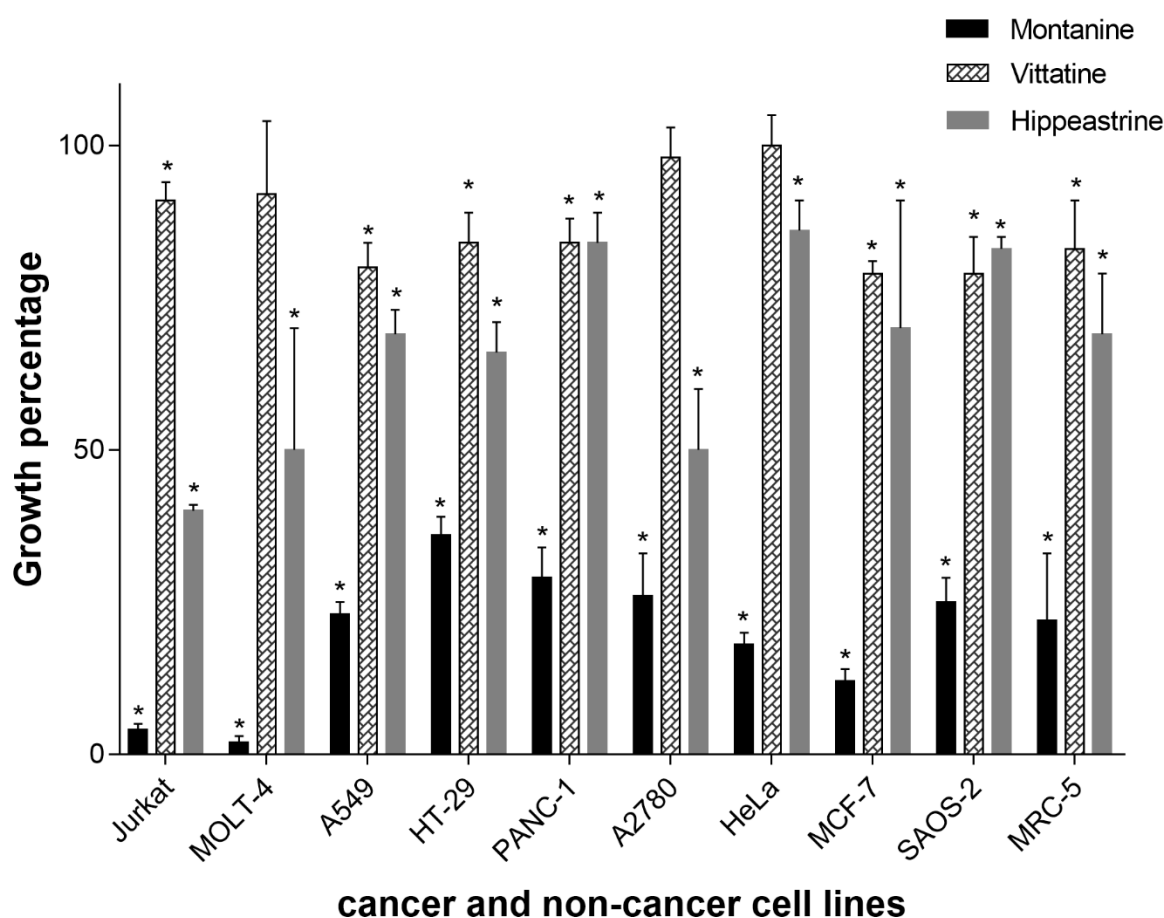
Pro statistické zpracování dat byl použit program Microsoft Office 365 Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA), nebo biostatistický software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou z měření v triplikátu, pokud není uvedeno jinak. U kvantitativních dat

bylo provedeno testování normality za účelem posouzení, zda by měly být použity parametrické nebo neparametrické testy. Pro experimenty s parametrickými proměnnými byla k porovnání průměrných hodnot mezi různými skupinami použita jednosměrná analýza rozptylu (ANOVA) následovaná post-hoc Dunnettovým testem, přičemž hodnota  $p$  nižší než 0,05 byla považována za statisticky významnou.

## Výsledky

### Cytotoxický screening izolovaných alkaloidů

Protinádorový účinek tří izolovaných molekul z rostlin *Hippeastrum* cv. (montanin, vittatin a hippeastrin) byl testován v panelu lidských nádorových buněčných linií odlišného histotypu (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2). Paralelně s těmito nádorovými liniemi byl testován také vliv na normální lidské plicní fibroblasty MRC-5 (obr. 1). Cytotoxická aktivita těchto alkaloidů byla hodnocena pomocí testu WST-1 po 48 h. Nejúčinnější alkaloid, montanin, snižoval v dávce  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  růstové procento (GP) u všech testovaných linií pod 50 %.



Obr. 1 Vliv montaninu, hippeastrinu a vittatinu v jednodávkové koncentraci  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na růst 9 nádorových buněčných linií (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) a nenádorové buněčné linie (MRC-5) s využitím kolorimetrického cytotoxického testu WST-1. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ). Převzato z Al Shammari et al. 2020.

Na základě těchto výsledků tedy byly stanoveny hodnoty inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> montaninu. Jak je patrné z tab.1, montanin vykazoval nejvyšší aktivitu vůči buňkám Jurkat, MOLT-4 a A549.

Cell type	Montanine
Jurkat	1.04 ± 0.14
MOLT-4	1.26 ± 0.11
A549	1.09 ± 0.31
HT-29	1.35 ± 0.47
PANC-1	2.30 ± 0.45
A2780	1.67 ± 0.29
HeLa	1.99 ± 0.22
MCF-7	1.39 ± 0.21
SAOS-2	1.36 ± 0.49
MRC-5	1.79 ± 0.50

Tab. 1 Hodnoty 50 % inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> montaninu pro lidské nádorové buněčné linie a nenádorovou linii MRC-5. Převzato z Al Shammari et al. 2020.

Screening cytotoxické aktivity všech izolovaných sloučenin, které nebyly dříve v daném experimentálním uspořádání studovány a byly získány v dostatečném množství izolací z rostliny *Narcissus* L. cv. Professor Einstein, byl proveden v panelu nádorových buněčných linií a jedné nenádorové s použitím testu WST-1 a v dávce 10 μmol.l<sup>-1</sup> (tab. 2). Prahová hodnota GP pro tento screening byla < 50 % (50 % inhibice růstu nádoru), z čehož vyplývá, že nejúčinnějším alkaloidem byl isochinolinový alkaloid montaninového typu, pankracin (v tabulce označen č. 22). Dalšími testovanými leč cytotoxicky neúčinnými alkaloidy byly masonin (1), homolykorin (2), lykoraminon (7), norlykoramin (13), epimaritidin (16), norpluviin (20), 9-*O*-demethylmaritidin (21), 9-*O*-demethylhomolykorin (23).

Cell type	extract	1	2	7	13	16	20	21	22	23	Dox.
Jurkat	3 ± 1	76 ± 5	78 ± 7	102 ± 9	102 ± 2	102 ± 4	96 ± 12	97 ± 6	17 ± 5	100 ± 10	2 ± 0
MOLT-4	3 ± 2	105 ± 8	110 ± 5	99 ± 2	106 ± 1	106 ± 4	107 ± 8	95 ± 9	1 ± 0	100 ± 3	0 ± 0
A549	25 ± 2	109 ± 22	114 ± 21	107 ± 8	93 ± 7	110 ± 10	111 ± 2	104 ± 7	29 ± 3	109 ± 9	11 ± 5
HT-29	41 ± 6	110 ± 17	199 ± 11	98 ± 7	94 ± 1	103 ± 5	92 ± 5	89 ± 10	39 ± 3	106 ± 8	47 ± 4
PANC-1	34 ± 3	94 ± 7	100 ± 5	97 ± 5	100 ± 3	91 ± 2	84 ± 1	80 ± 2	52 ± 13	92 ± 1	78 ± 3
A2780	30 ± 3	102 ± 12	96 ± 14	100 ± 3	106 ± 1	98 ± 2	101 ± 4	98 ± 0	40 ± 2	94 ± 5	5 ± 1
HeLa	35 ± 3	117 ± 14	108 ± 10	98 ± 9	93 ± 5	97 ± 8	91 ± 12	93 ± 9	28 ± 6	96 ± 10	11 ± 6
MCF-7	11 ± 1	98 ± 9	102 ± 6	95 ± 7	99 ± 5	96 ± 7	100 ± 3	91 ± 3	18 ± 2	102 ± 8	37 ± 3
SAOS-2	30 ± 8	98 ± 4	97 ± 7	102 ± 4	102 ± 5	103 ± 4	96 ± 7	95 ± 4	26 ± 3	103 ± 4	17 ± 5
MRC-5	29 ± 6	99 ± 12	97 ± 4	96 ± 9	108 ± 4	98 ± 4	92 ± 4	92 ± 6	39 ± 3	93 ± 4	29 ± 3

Tab. 2 Cytotoxická aktivita extraktu alkaloidů rostliny *Narcissus* L. cv. Professor Einstein (o koncentraci 50 μg/ml) a izolovaných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae (o koncentraci 10 μmol.l<sup>-1</sup>) s využitím kolorimetrického cytotoxického testu WST-1. Alkaloid č. 22 představuje pankracin, isochinolin montaninového typu. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka.

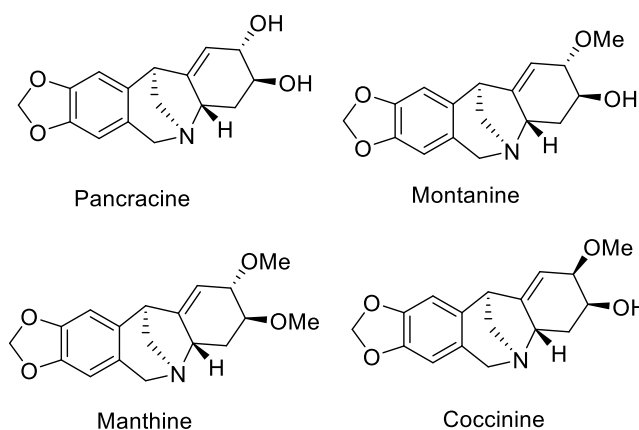
Hodnoty inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> pro pankracin jsou uvedeny v tab. 3.



Cell type	Panracine	Doxorubicin
Jurkat	5.07 ± 0.31	0.05 ± 0.02
MOLT-4	2.71 ± 0.25	< 0.01
A549	2.29 ± 0.43	0.43 ± 0.06
HT-29	2.60 ± 0.51	0.77 ± 0.24
A2780	5.08 ± 0.43	< 0.01
HeLa	5.03 ± 0.36	0.55 ± 0.05
MCF-7	2.68 ± 0.37	0.44 ± 0.10
SAOS-2	2.20 ± 0.25	0.1 ± 0.17
MRC-5	5.15 ± 0.34	0.72 ± 0.23

Tab. 3 Hodnoty inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> pankracinu pro lidské nádorové buněčné linie a nenádorovou linii. Převzato z Breiterová et al. 2020.

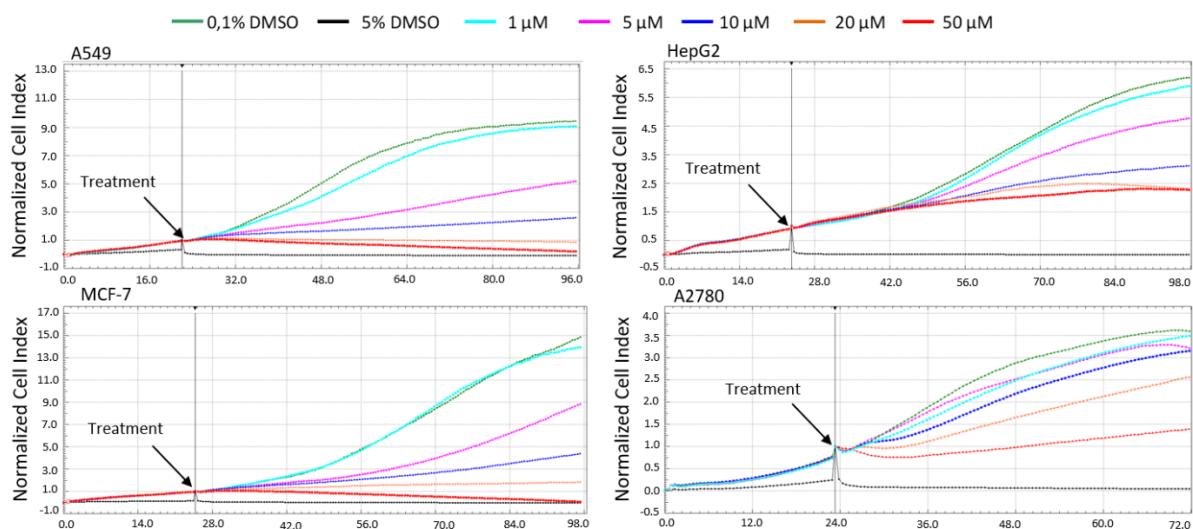
Panracin patří do stejné skupiny isochinolinových alkaloidů montaninového typu jako např. montanin, koccinin a manthin, struktury těchto alkaloidů jsou uvedeny v obr. 2.



Obr. 2 Struktury isochinolinových alkaloidů montaninového typu čeledi Amaryllidaceae. Převzato z Koutová et al. 2020.

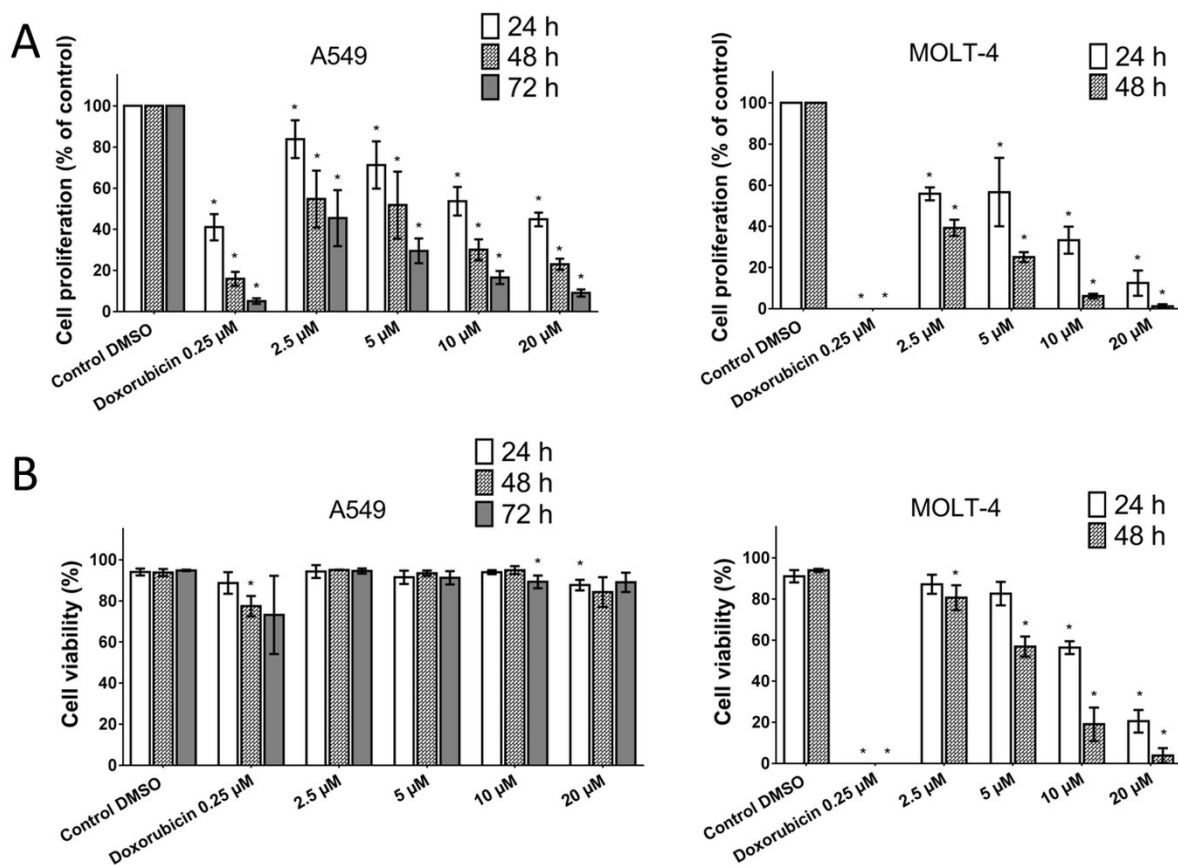
### Vliv pankracinu na viabilitu a proliferaci buněčné linie A549 a MOLT-4

Pro sledování vlivu pankracinu na viabilitu a proliferaci vybraných adherentních nádorových buněčných linií byla využita metoda analýzy buněčné proliferace v reálném čase xCELLigence RTCA. Systém xCELLigence měří adhezi buněk, životaschopnost, morfologii a počet buněk na základě impedance, a jsou zobrazeny jako hodnoty normalizovaného buněčného indexu (CI). Efekt na růst byl pozorován u lidského adenokarcinomu plic A549, adenokarcinomu prsu MCF-7, hepatocelulárního karcinomu HepG2 a karcinomu ovaríí A2780 ovlivněných v rozmezí koncentrací od 1 do 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pankracinu po dobu 96 h. Buňky ovlivněné 0,1 % DMSO byly použity jako negativní kontrola, buňky ovlivněné 5 % DMSO jako pozitivní kontrola. Z obr. 3 je zřejmé, že se zvyšováním koncentrace pankracinu došlo ke snížení proliferace ve všech testovaných buněčných liniích. V případě buněčné linie A549 koncentrace 20  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  inhibovala proliferaci nádorových buněk v celém testovacím rozmezí 96 h. Proliferační schopnost buněk A549 byla také významně snížena po ovlivnění koncentracemi 5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .



Obr. 3 Kontinuální měření proliferace a viability v reálném čase přístrojem xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, CA, USA) po působení vybraných koncentrací pankracinu. Kinetika růstu je ukázána u lidského adenokarcinomu plic A549, adenokarcinomu prsu MCF-7, hepatocelulárního karcinomu HepG2 a karcinomu ovarií A2780 ovlivněných pankracinem. Buňky ošetřené 0,1 % DMSO byly použity jako negativní kontrola a buňky ošetřené 5 % DMSO jako pozitivní kontrola. Normalizovaný buněčný index byl měřen až po dobu 96 h. Uvedené grafy jsou reprezentativní pro nejméně tři nezávisle měřené experimenty. Převzato z Koutová et al. 2021.

Počty proliferujících buněk byly spočítány v Bürkerově komůrce metodou barvení Trypanovou modří 24, 48 a 72 h po ovlivnění buněk pankracinem v koncentracích 2,5; 5; 10 a 20  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Významný ( $p \leq 0,05$ ) antiproliferační účinek nastal i při nejnižší testované koncentraci pankracinu (2,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) po 48 h a 72 h pro buněčnou linii A549 a 24 h a 48 h pro buněčnou linii MOLT-4 (obr. 4A). Pokud jde o účinek pankracinu na viabilitu buněk, byl pozorován značný rozdíl mezi celkově rezistentní adherentní buněčnou linií A549 a suspenzní leukemickou buněčnou linií hematopoetického původu MOLT-4 (obr. 4B). U buněčné linie A549 došlo k mírnému poklesu viabilních buněk pouze při nejvyšších testovaných koncentracích (10 a 20  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Viabilita buněčné linie MOLT-4 významně ( $p \leq 0,05$ ) klesla po ovlivnění pankracinem v koncentraci 2,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  po 48 h, po kratším časovém intervalu 24 h s použitím koncentrace 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

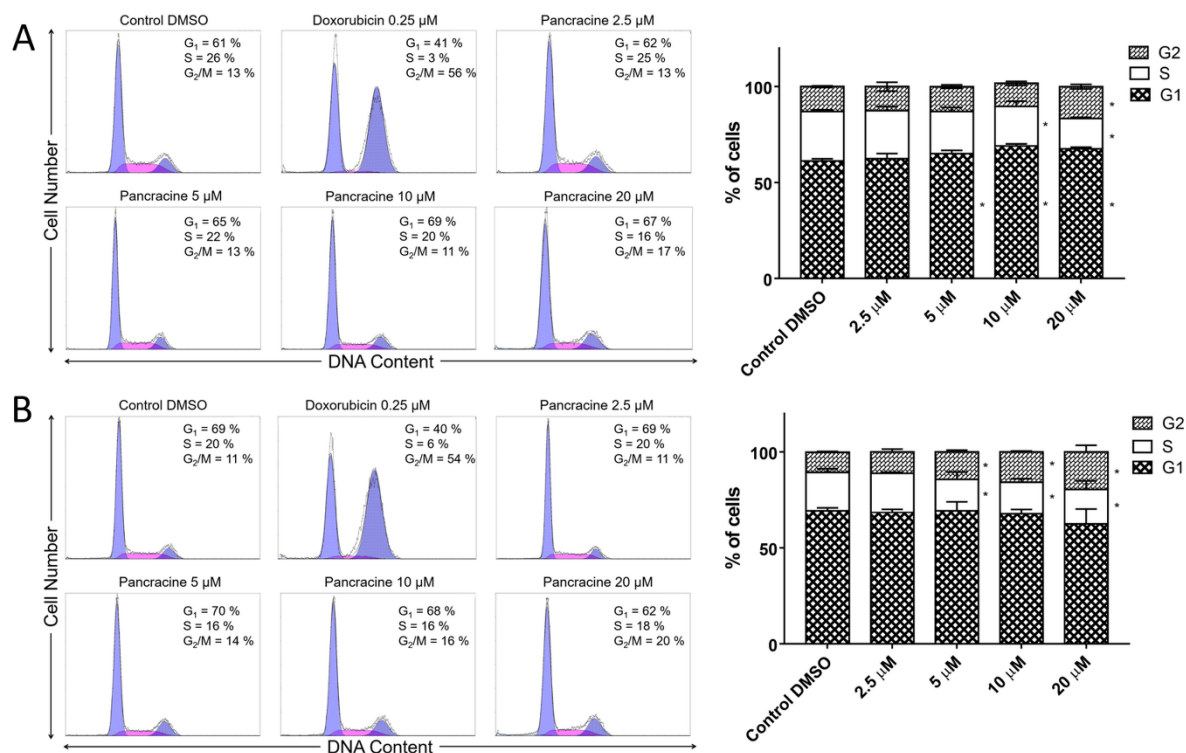


Obr. 4 Účinek pankracinu na proliferaci (A) a viabilitu (B) buněk MOLT-4 a A549. Integrita buněčné membrány byla stanovena použitím barviva Trypanové modři po 24 a 48 h u buněk MOLT-4 a po 24, 48 a 72 hodinách v buňkách A549. Buňky ovlivněné doxorubicinem v koncentraci  $0,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  sloužily jako pozitivní kontrola. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ). Převzato z Koutová et al. 2021.

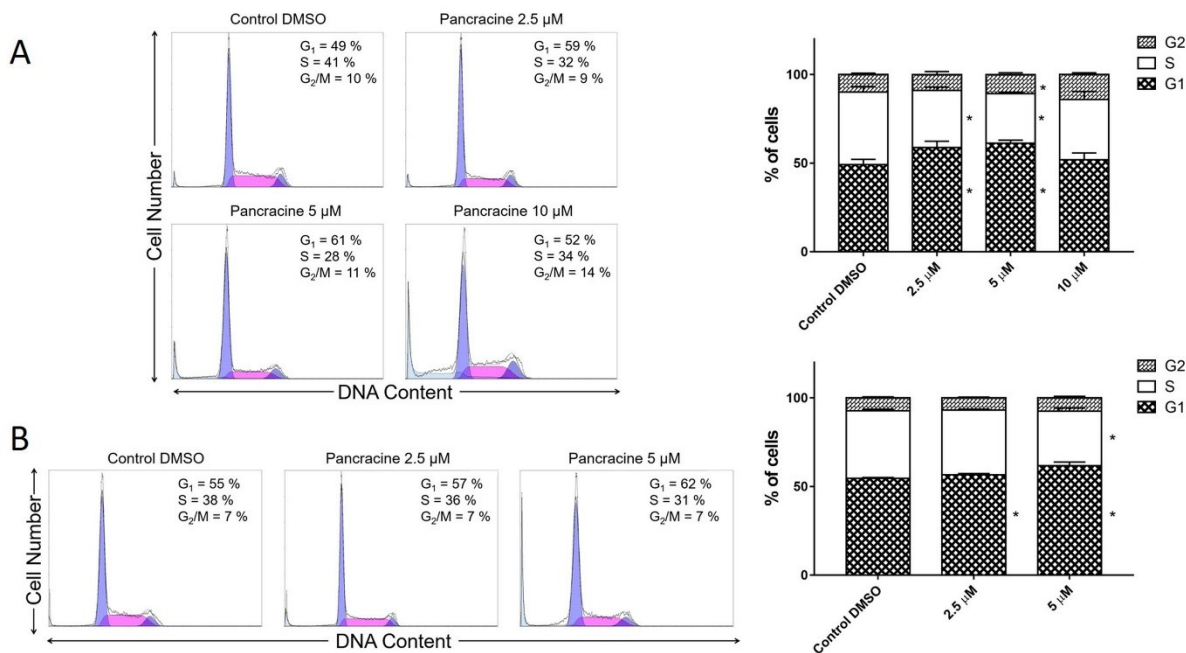
### Snížená proliferace buněk A549 a MOLT-4 je spojena s redistribucí buněk v buněčném cyklu

U buněk A549 ovlivněných pankracinem po 24 h (obr. 5A) došlo k významnému ( $p \leq 0,05$ ) nárůstu buněčné populace ve fázi G1. Při použití nejvyšší koncentrace současně došlo k nárůstu buněčné populace ve fázi G2 (obr. 5A). Po 48 h působení pankracinu o koncentraci  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (obr. 5B) byl pozorován významný ( $p < 0,05$ ) nárůst buněk A549 ve fázi G2 se souběžnou redukcí buněk ve fázích G1 a S.

Analýza buněčného cyklu buněk MOLT-4 je znázorněna na obr. 6. Jak je patrné z obr. 6A, došlo ke statisticky významnému ( $p \leq 0,05$ ) nárůstu buněčné populace v G1 a poklesu populace ve fázi S při použití koncentrace  $2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  již za 24 h. Při použití koncentrace  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  došlo ke statisticky významnému ( $p \leq 0,05$ ) zvýšení buněčné populace v G1 a statisticky významnému ( $p \leq 0,05$ ) snížení populace v S-fázi za 48 h (obr.6B).



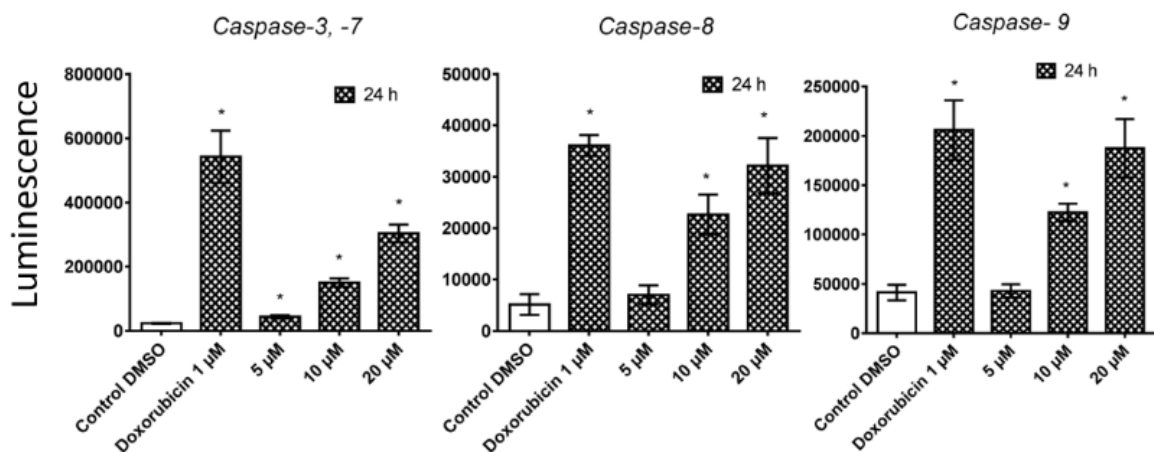
Obr. 5 Analýza buněčného cyklu buněk A549 ovlivněných pankracinem. Obrázek ukazuje reprezentativní histogramy průměrného procenta buněk procházejících fázemi G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>, analyzovaných průtokovou cytometrií ze tří jednotlivých měření 24 h (A) a 48 h (B) hodin po aplikaci pankracinu v dávkách 2,5 μmol.l<sup>-1</sup>, 5 μmol.l<sup>-1</sup>, 10 μmol.l<sup>-1</sup> a 20 μmol.l<sup>-1</sup>. Sloupcový graf shrnuje kumulativní data o procentu buněk v každé fázi buněčného cyklu. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole (p ≤ 0,05). Převzato z Koutová et al. 2021.



Obr. 6 Analýza buněčného cyklu buněk MOLT-4 ovlivněných pankracinem. Obrázek ukazuje reprezentativní histogramy průměrného procenta buněk procházejících fázemi G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>, analyzovaných průtokovou cytometrií ze tří nezávislých měření 24 h (A) a 48 h (B) hodin po aplikaci pankracinu v dávce 2,5 μmol.l<sup>-1</sup>, 5 μmol.l<sup>-1</sup>, 10 μmol.l<sup>-1</sup> a 20 μmol.l<sup>-1</sup>. Sloupcový graf shrnuje kumulativní data ilustrující procento buněk v každé fázi buněčného cyklu. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole (p ≤ 0,05). Převzato z Koutová et al. 2021.

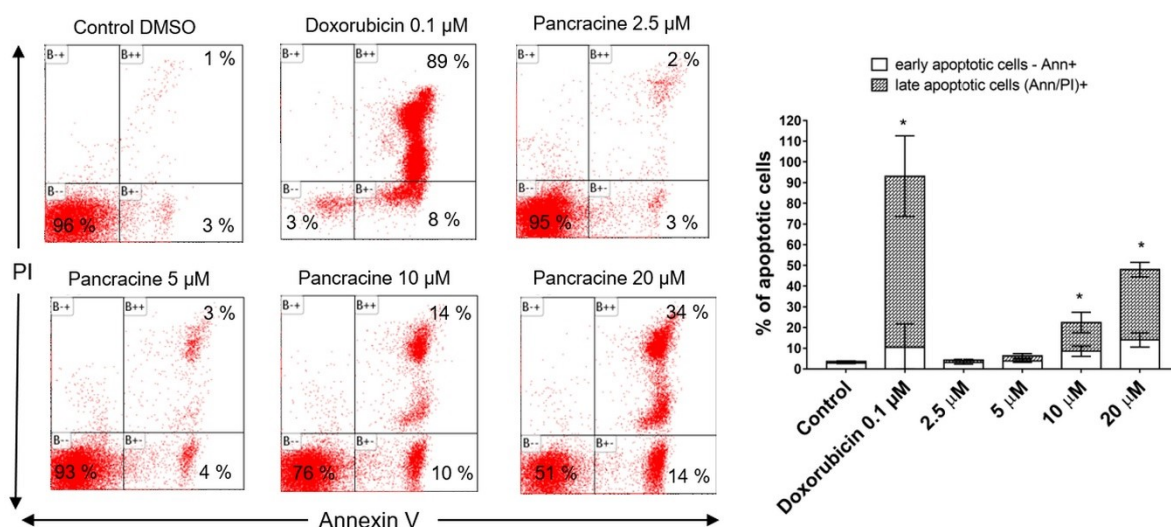
### Pancracin indukuje apoptózu u buněk leukemické linie MOLT-4

Abychom zjistili, zda je smrt nádorových buněk vyvolaná pankracinem spojena s apoptózou, použili jsme detekci aktivity kaspáz -3, -7, -8 a -9 po 24 h v buňkách A549 a MOLT-4. Každý typ kaspázy je zodpovědný za specifickou buněčnou odpověď; efektorové kaspázy-3 a -7 reagují na aktivaci kaspázy-8 pro vnější cestu apoptózy a na aktivaci kaspázy-9 pro aktivaci vnitřní mitochondriální dráhy apoptózy. V případě účinku pankracinu na indukcii apoptózy nebylo u buněk A549 pozorováno zvýšení aktivity kaspáz. Zjevně odlišná situace byla zjištěna po aplikaci koncentrací pankracinu 10 a 20 μmol.l<sup>-1</sup> na buněčnou linii MOLT-4, kdy došlo k významnému (p ≤ 0,05) zvýšení aktivity všech typů testovaných kaspáz ve srovnání s negativní kontrolou (obr. 7).



Obr. 7 Vliv pankracinu na aktivitu kaspázy-3, -7, kaspázy-8 a kaspázy-9 v buňkách MOLT-4. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ). Převzato z Koutová et al. 2021.

Abychom potvrdili indukci apoptózy vyvolanou pankracinem v buňkách MOLT-4, byla povrchová expozice fosfatidylserinu a ztráta integrity membrány stanovena pomocí barvení Annexinem V a propidium jodidem (PI). Kombinace těchto fluorescenčních sond nám umožnila oddělit živé buňky (Annexin V i PI negativní), apoptotické buňky (Annexin V pozitivní a PI negativní) a buněčnou populaci v pozdní fázi apoptotické buněčné smrti (Annexin V a PI pozitivní). Jak je znázorněno na obr. 8, 24 h po ovlivnění pankracinem v koncentraci 2,5; 5; 10 a 20  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  bylo procento buněk v časné fázi apoptózy u 3 %, 4 %, 10 % a 14 % a procento buněk v pozdní fázi apoptózy 2 %, 3 %, 14 %, respektive 34 %.



Obr. 8 Indukce apoptózy u leukemické buněčné linie MOLT-4 po ovlivnění pankracinem. Apoptóza byla stanovena barvením Annexinem V a PI za 24 h od ovlivnění. Jsou ukázány reprezentativní histogramy jednoho ze tří nezávislých měření. Doxorubicin

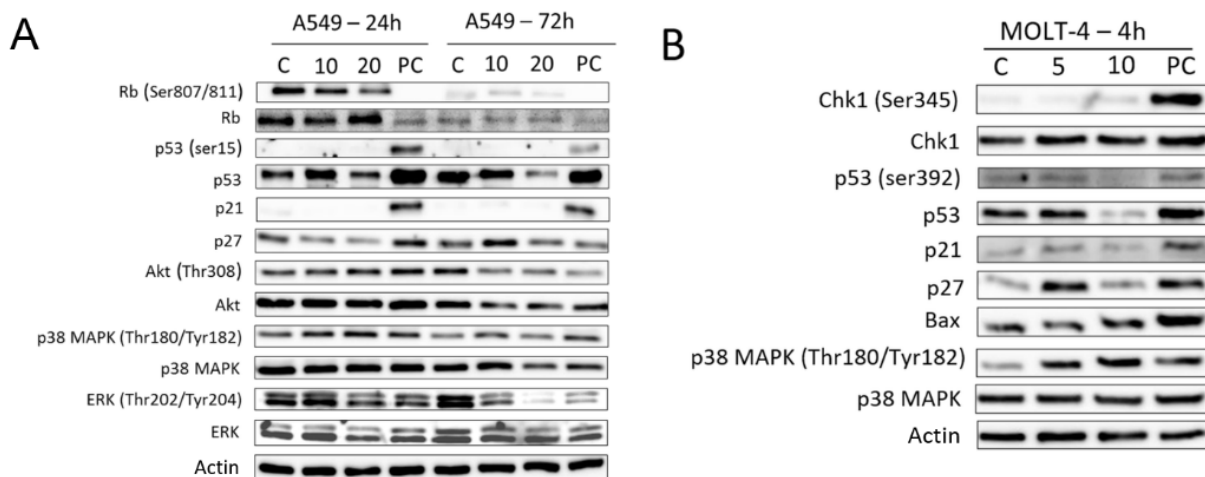
v dávce  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  sloužil jako pozitivní kontrola. Sloupcový graf představuje procento časných a pozdních apoptotických buněk detekovaných průtokovou cytometrií (průměr  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). \* - statisticky významný rozdíl od kontroly raných a pozdních apoptotických buněk ( $p \leq 0,05$ ). Převzato z Koutová et al. 2021.

### **Zvýšení procenta buněk v G1 a S fázi u buněk A549 je spojeno s aktivací signální dráhy Akt/p27/pRb a proapoptotická aktivita pankracinu v buňkách MOLT-4 je spojena s upregulací proteinu p53 fosforylovaného na serinu 392**

Na základě předchozích výsledků nás zajímala detekce proteinů, které se podílí na redistribuci buněk v buněčném cyklu a indukci apoptózy. K detekci proteinů hlavních signálních drah, konkrétně tedy checkpoint kináza 1 (Chk1), extracelulárně regulovaná kináza 1/2 (ERK1/2), mitogenem aktivovaná proteinkináza p38 (MAPK), proteinkináza Akt, retinoblastomový tumor supresorový protein (pRb), protein p53, inhibitor cyklin dependentních kináz p21 a p27 a proapoptotický protein Bax, spojených s výše jmenovanými ději, byla provedena elektroforéza a Western blot.

Pokud jde o molekulární změny v buňkách A549 po aplikaci pankracinu (obr. 9A), byla antiproliferační aktivita v expozičním čase 24 h spojena s aktivací p38 MAPK prostřednictvím fosforylace na threoninu 180 a tyrosinu 182 a hypofosforylací ERK na threoninu 202 a tyrosinu 204. K větším změnám v hladinách ostatních detekovaných proteinů došlo po 72 h od ovlivnění. Pankracin v dávce  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a vyšší indukoval hypofosforylací Akt kinázy na threoninu 308, zvýšil hladinu proteinu p27 a zároveň došlo k hypofosforylací proteinu Rb na serinu 807/811, rovněž také došlo k výrazné hypofosforylací ERK na threoninu 202 a tyrosinu 204 a hyperfosforylací p38 MAPK na threoninu 180 a tyrosinu 182.

K objasnění mechanismu apoptózy indukované pankracinem, byla detekce proteinů souvisejících s apoptózou v buňkách MOLT-4 stanovena 4 hodiny po ovlivnění koncentracemi  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Jak je ukázáno na obr. 9B, účinek pankracinu indukujícího apoptózu při  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  byl doprovázen aktivací tumor supresorového proteinu p53 prostřednictvím fosforylace na serinu 392. Je známo, že fosforylovaný p53 na serinu 392 se podílí na transdukcii signálů programované buněčné smrti (Řezáčová a Vávrová 2000), zvýšení hladiny proteinu Bax s upregulací p53 dobře koreluje. Zastavení buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze je způsobeno aktivací inhibitorů cyklin dependentních kináz p21 a p27. K upregulaci těchto proteinů dochází po ovlivnění pankracinem v koncentraci  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . V souladu s tímto dále dochází k hyperfosforylací p38 MAPK na threoninu 180 a tyrosinu 182, aktivita této kinázy je považována spíše za proapoptotickou. Snížené hladiny proteinů p21, p27 a p53 fosforylovaného na serinu 392 po dávce  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  jsou pravděpodobně důsledkem zvýšené buněčné smrti leukemických buněk.



Obr. 9 Western blot analýza proteinů, které regulují postup buněčného cyklu, buněčnou smrt nebo přežití buněk u buněčné linie A549 (A) a MOLT-4 (B) po ovlivnění pankracinem v koncentraci  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po dobu 24 a 72 h v případě buněčné linie A549 a po ovlivnění pankracinem v koncentraci  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po dobu 4 h v případě buněčné linie MOLT-4. Buňky ovlivněné 0,1 % DMSO sloužily jako negativní kontrola (označené jako C) a buňky ovlivněné doxorubicinem v koncentraci  $0,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u buněk A549 (A) a cisplatinou v koncentraci  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u buněk MOLT-4 (B) jako pozitivní kontroly (označené jako PC). Šipky označují molekulové hmotnosti proteinů. Jednotlivé bloty reprezentují výsledky ze tří nezávislých měření. Převzato a upraveno z Koutová et al. 2021.



## Diskuse

Zhoubná nádorová onemocnění provází lidskou společnost od nepaměti. I přes enormní úsilí špičkových vědeckých skupin se stále nepodařilo najít konečné řešení tohoto onemocnění, jež má také výrazné socioekonomické důsledky. Široká odborná veřejnost nahlíží na nádorová onemocnění komplexněji. Dávno se opustila představa nádoru jako izolované hmoty, ale je potřeba ho vnímat v kontextu jeho mikroprostředí, včetně toho nenádorového. Současně také terapie nádorových onemocnění vyžaduje komplexní přístup a multimodální léčba, zahrnující nejen klasické léčebné metody jako je radioterapie, chemoterapie a chirurgická léčba, ale také cílenou terapii a imunoterapii, včetně podpůrné a doplňkové léčby, je mnohem efektivnější. Stále je však potřeba přistupovat inovativně i k samotným dílčím léčebným postupům, kam řadíme i možnost rozšířit dostupnou chemoterapeutickou léčbu o nová cytostatika a zdokonalovat tak možnosti konvenční protinádorové léčby (Klener a Klener 2013). S ohledem na zaměření této práce a v rovině základního výzkumu se může jednat o izolaci a identifikaci nových sloučenin rostlinného původu či přípravu polosyntetických derivátů vycházejících z látek přírodního původu. V oblasti fytochemie se jedná o detailní screening biologicky aktivních molekul, především alkaloidů, jež jsou co do struktury, tak počtu významnou a rozmanitou skupinou a všechny tyto molekuly nebyly dosud zcela plně prozkoumány, ačkoliv jejich účinky byly využívány již po staletí i v lidovém léčitelství. Čeď Amaryllidaceae obsahující řadu významných alkaloidů právem patří k těm, které jsou tomuto screeningu podrobeny. Do této čeledi lze zařadit i isochinolinové alkaloidy montaninového typu. Jejich unikátní chemická struktura, významná biologická aktivita, ale také jejich poměrně vzácný výskyt v přírodě vedly ke zvýšenému úsilí o syntézu těchto organických molekul v dostatečném množství pro potřeby biologických studií a následné použití v klinické terapii (Guan et al. 2012, Matweenko et al. 2008, Ishizaki et al. 2002, Bao et al. 2013). Dokládá to také příprava alkaloidů montaninového typu přeskupením chemické struktury typu haemanthaminového (Inubushi et al. 1960, Cedrón et al. 2009). Bohužel bez pochopení molekulárních mechanismů jejich působení není možné využít výhody jejich slibné biologické aktivity oproti jiným alkaloidům čeledi Amaryllidaceae.

Z hlediska protinádorové léčby dokládají potenciál montaninových alkaloidů hodnoty 50 % inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  jednoho z hlavních představitelů této skupiny látek, to je pankracinu. Hodnoty  $IC_{50}$  byly stanoveny pro nádorové buněčné linie rozmanitého histotypu, A549 (adenokarcinom plic), HT-29 (adenokarcinom tlustého střeva), A2780 (karcinom ovarií), HeLa (karcinom děložního hrdla), MCF-7 (karcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom), Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů) a MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie) a pohybovaly se v nízkém mikromolárním koncentračním rozmezí od  $2,29 \pm 0,43 \mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $5,15 \pm 0,34 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Tyto hodnoty  $IC_{50}$  naměřené naší laboratoří odpovídaly hodnotám nalezeným v dřívější studii publikované Cedronem a kol., který popsal cytotoxický účinek pankracinu na nádorové buňky s hodnotami  $IC_{50}$  v rozmezí od  $4,3 \pm 0,7 \mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $9,1 \pm 1,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (Cedrón et al. 2015). Cytotoxický účinek montaninu se ukázal být ještě výraznější, neboť jeho hodnoty pro stejnou paletu použitých nádorových buněčných linií, na kterých byl námi testován i účinek pankracinu, byly naměřeny v rozmezí od  $1,04 \pm 0,14 \mu\text{mol.l}^{-1}$  do  $2,30 \pm 0,45 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Jelikož se pankracin

liší od montaninu pouze jedním substituentem na E kruhu 5,11-methanomorfantridinové struktury (na C2 má hydroxyl místo skupiny methoxy) (Koutová et al. 2020), lze předpokládat, že molekulární mechanismus účinku těchto látek bude podobný.

Strategie *in vitro* studia molekulárního mechanismu účinku byla zahájena výběrem nádorové buněčné linie rezistentní k apoptóze a nádorové buněčné linie k apoptóze citlivější a pomocí těchto experimentálních modelů se pokusit přiblížit účinek pankracinu včetně popisu dějů, které vedou buď k zástavě buněčného cyklu nebo k indukci apoptózy.

Nádorová buněčná linie A549 představuje nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) s velmi špatnou prognózou vyznačující se vůči konvenční léčbě cytostatiky vysokou chemorezistencí (Ashinuma et al. 2012, Zhang et al. 2015). Silný antiproliferační účinek pankracinu stanovený metodou měření proliferace v reálném čase je plně v souladu s dříve stanovenou hodnotou  $IC_{50}$  pro buňky A549 ( $2,29 \pm 0,43 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Inhibice růstu krom jiných testovaných buněčných linií i této rezistentní nádorové linie přetrvávala po dobu 96 h. Detekce inhibice růstu byla taktéž rozšířena o test barvení pomocí Trypanové modři, která patří mezi standardní end-point metody zjištění efektu cytostatika na viabilitu a proliferaci buněk. Statisticky významný antiproliferační účinek na buňky A549 byl prokázán již s použitím koncentrace  $2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a to ve všech měřených časových intervalech (24, 48 a 72 h). Dopad na viabilitu buněk A549 buněk byl zanedbatelný, jelikož ani nejvyšší měřená koncentrace  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  nesnížila životaschopnost buněk A549 pod 80 %. Metoda monitorování buněk v reálném čase ukázala, že koncentrace pankracinu  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  je pro nádorovou buněčnou linii A549 ve vztahu k proliferaci a viabilitě buněk fatální. K zastavení buněčného cyklu při přechodu G1/S fáze dochází aktivací několika signálních drah. Jeden z těchto mechanismů je řízen prostřednictvím aktivace MAP kináz konkrétně fosforylací p38 MAPK, která následně fosforyluje řadu dalších jaderných faktorů, jako je například tumor supresorový protein p53, aktivační transkripční faktor ATF-2 (activating transcription factor-2), transkripční faktor MEF-2 (members of myocyte enhance factor-2) a transkripční faktor Myc (gen izolovaný z viru ptačí myelocytomatózy) (Ambrosino a Nebreda 2001). Další možností, jak může dojít k zastavení buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze je signalizace prostřednictvím kinázy Akt. Fosforylovaná Akt kináza inhibuje protein p27 (Abbastabar et al. 2018). Tento inhibitor komplexu cyklin cyklin dependentní kinázy (Cdk) brání fosforylaci tumor supresorového proteinu Rb a v důsledku toho brání oddělení transkripčního faktoru E2F od Rb, což celkově brání transkripci požadovaných genů pro přechod G1/S (Abbastabar et al. 2018). Z našich naměřených dat vyplývá, že inhibice proliferace buněk A549 je způsobena zastavením buněčného cyklu ve fázi G1 prostřednictvím upregulace fosforylované MAPK p38 po 24 h od ovlivnění pankracinem v koncentraci 10 nebo  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Zastavení buněčného cyklu způsobené výše zmíněnými mechanismy, tedy downregulací fosforylovaného proteinu pRb, upregulací p27 souběžně s hypofosforylací Akt kinázy fosforylované na Thr308 a rovněž také downregulace MAP kinázy ERK, bylo pozorováno v delším časovém intervalu (72 h) za použití stejných experimentálních podmínek. Tyto děje nevedly k iniciaci apoptózy, jak je zřejmé z kvantifikace aktivity kaspáz -3/7, -8 a -9 v buňkách A549 po aplikaci pankracinu.

MOLT-4 je T-lymfoblastická buněčná linie původně odvozená z periferní krve devatenáctiletého pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií v relapsu. Leukemické buňky reagovaly na ovlivnění pankracinem s inhibiční koncentrací  $IC_{50} 2,71 \pm 0,25 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , ne příliš odlišné od hodnoty  $IC_{50}$  stanovené pro buňky A549. Statisticky významný antiproliferační účinek pankracinu, jaký byl pozorován u adenokarcinomu plic A549, byl pozorován také u leukemické linie MOLT-4. Na rozdíl od buněčné linie A549 však byl rovněž pozorován statisticky významný efekt na pokles viability leukemických buněk. Životaschopnost buněk MOLT-4 byla snížena po ovlivnění nejmenší měřené koncentrace  $2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , vyšší dávka  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  pak vedla ke snížení životaschopných buněk MOLT-4 až na 20 %. Vzhledem k významné účinnosti pankracinu na viabilitu leukemických buněk při vyšších koncentracích bylo možné použít pro detekci procent buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu pouze nižší koncentrace 2,5; 5 a  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 24 h od ovlivnění a 2,5 a  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  po 48 h od ovlivnění pankracinem. Z literatury je známo, že leukemické buňky podléhají apoptotické buněčné smrti (Šalovská et al. 2018, Tichý et al. 2008, Muthná et al. 2012). Buňky MOLT-4 odumírají apoptotickým procesem v důsledku ionizujícího záření a dalších činidel vyvolávajících poškození DNA aktivací kaspázy-8 a -9 a uvolněním cytochromu c (Tichý et al. 2008). Naše výsledky nejsou v rozporu s tímto pozorováním. Leukemické buňky MOLT-4 umíraly v důsledku aktivace apoptózy při aplikaci pankracinu  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a to zvýšením aktivity efektorové kaspázy-3/7 a kaspázy -9 odpovědné za vnitřní apoptotickou mitochondriální dráhu a kaspázy-8 odpovědnou za vnější apoptotickou dráhu iniciovanou prostřednictvím receptorů smrti. Nejen tento experiment, ale současně také detekce apoptotických buněk značených Annexinem V a propidium jodidem (PI) ukázala na statisticky významný nárůst apoptotických buněk MOLT-4 po expozici pankracinem v koncentraci  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  v intervalu 24 h. Při aplikaci koncentrace  $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  bylo již 50 % buněk buď v časné nebo pozdní fázi apoptózy. Aktivace signální dráhy ATM/Chk2/p53 byla popsána v buňkách MOLT-4 po expozici ionizujícím zářením (Řezáčová et al. 2008). Dále můžeme zmínit například cytotoxický účinek kyseliny valproové, který je navíc doprovázen aktivací p21 a zvýšenou produkcí fosforylovaného p53 na Ser392 (Muthná et al. 2012). V naší práci jsme se pokusili rozkrýt pozadí dějů vedoucí k apoptóze detekcí klíčových faktorů a proteinů a pozorovali jsme zvýšení hladiny proteinu p27, proapoptotického proteinu Bax a aktivaci MAP kinázy p38 prostřednictvím fosforylace na Thr 180 a Tyr 182. Tento proces se zdá být také provázen zvýšenou hladinou tumor supresorového proteinu p53 fosforylovaného na Ser 392.

Dosud nebyla publikována jiná studie naznačující molekulární mechanismus účinku alkaloidů montaninového typu čeledi Amaryllidaceae, ale vezmeme-li v potaz biosyntézu této skupiny alkaloidů, může být užitečné nahlédnout do již experimentálně ověřených studií alkaloidů podobných chemických struktur patřící do čeledi Amaryllidaceae. Haemanthamin jakožto  $\alpha$ -krinan také patří do skupiny isochinolinových alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a jeho biologická aktivita byla v nedávné době intenzivně zkoumána stejně jako děje k ní vedoucí (Cahlíková et al. 2021). Haemanthamin indukoval apoptózu v koncentraci  $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  v buněčné linii Jurkat představující akutní leukémii T-lymfocytů s deficientním proteinem p53 (Havelek et al. 2014). Alkaloidy na bázi montaninové kostry lze navíc připravit přesmykem kruhového systému struktury haemanthaminu (Inubushi et al. 1960, Cedrón et al. 2009). Podrobnější data

popisující detailněji mechanismus účinku haemanthaminu byly zveřejněny v roce 2018, autoři v této studii naznačují vazbu haemanthaminu k A místu velké ribozomální podjednotky a přeskupení rRNA, což následně vede k inhibici translace a v důsledku toho k potlačení růstu nádorových buněk (Pellegrino et al. 2018). Obecně lze zhodnotit, že jsou isochinolinové alkaloidy stále v centru vědecké pozornosti, avšak pro významnější využití těchto biologicky velmi účinných molekul v klinické praxi je potřeba ještě hlubší studium.

## Závěr

Po úspěšné izolaci dostatečného množství vybraných montaninových alkaloidů, pankracinu a montaninu, je jedním z přínosů této práce stanovení jejich 50 % inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  v devíti nádorových buněčných liniích a v nenádorové buněčné linii lidských plicních fibroblastů. Zjištění jejich nízké mikromolární účinnosti potvrdily i následující experimenty s vybraným zástupcem montaninových alkaloidů, pankracinem. Antiproliferační aktivita pankracinu byla pozorována u adherentních linií až po dobu 96 h. Cytostatický efekt byl potvrzen i v dalších experimentech s dvěma vybranými histotypově odlišnými buněčnými kulturami, konkrétně byl potvrzen u rezistentního adenokarcinomu plic A549 a u akutní lymfoblastické leukémie MOLT-4. Na leukemickou linii pankracin rovněž působil statisticky významně cytotoxicky. Dalším benefitem a odpovědí na jeden z cílů disertační práce je popsání vlivu pankracinu na distribuci buněčné populace v jednotlivých fázích cyklu u výše zmíněných vybraných buněčných linií. Po aplikaci pankracinu, který v měřených nízkých mikromolárních koncentracích vyvolával zástavu buněčného cyklu v G1/S fázi v buňkách adenokarcinomu plic A549, docházelo k aktivaci signální dráhy Akt/p27/pRb. Statisticky významný negativní dopad na viabilitu leukemických buněk byl způsoben apoptotickou odpovědí tohoto typu buněk, dokázaný jednak zvýšenou aktivitou kaspáz, ale také stanovením fosfatidylserinu na vnější cytoplazmatické membráně buněk. Klíčový mechanismus kontrolující programovanou buněčnou smrt leukemických buněk zahrnoval zvýšení hladiny tumor supresorového proteinu p53 fosforylovaného na serinu 392 a dalších proteinů, například p27 a Bax. Všechny cíle disertační práce, jež si tato práce stanovila, a které jsou uvedené v kapitole 1, se podařilo splnit.

Závěrem lze dodat, že klíčové fázi preklinického testování nových chemoterapeutik vždy předcházelo hlubší studium molekulárních mechanismů jejich cytostatické a cytotoxické aktivity. Pankracin, se svým silným inhibičním účinkem na proliferaci a životaschopnost nádorových buněk, může být jedním z potenciálních kandidátních léčiv používaných v terapii nádorových onemocnění.

## Seznam citací použité literatury

Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S.S., Maniati, M., Karimian, A. Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair*, 2018, 69, 63–72.

Al-Ejeh, F., Kumar, R., Wiegmanns, A., Lakhani, S. R., Brown, M. P., Khanna, K. K. Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene*, 2010, 29(46), 6085-6098.

Al Shammari, L., Al Mamun, A., Koutová, D., Majorošová, M., Hulcová, D., Šafratová, M., Breiterová, K., Maříková, J., Havelek, R., Cahlíková, L. Alkaloid profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS, isolation of Amaryllidaceae alkaloids and evaluation of their cytotoxicity. *Records of Natural Products*, 2020, 14, 154–159.

Ambrosino, C., Nebreda, A.R. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol. Cell*, 2001, 93, 47–51.

Ashinuma, H., Takiguchi, Y., Kitazono, S., Kitazono-Saitoh, M., Kitamura, A., Chiba, T., Tada, Y., Kurosu, K., Sakaida, E., Sekine, I., Tanabe, N., Iwama, A., Yokosuka, O., Tatsumi, K. Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncology reports*, 2012, 28(1), 8-14.

Bao, X., Cao, Y.X., Chu, W.D., Qu, H., Du, J.Y., Zhao, X.H., Ma, X.Y., Wang, C.T., Fan, C.A. Bioinspired total synthesis of montanine-type Amaryllidaceae alkaloids. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52, 14167–14172.

Bartek, J., Lukas, J. Mammalian G1-and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current opinion in cell biology*, 2001,13(6), 738-747.

Breiterová, K., Koutová, D., Maříková, J., Havelek, R., Kuneš, J., Majorošová, M., Opletal, L., Hošťálková, A., Jenčo, J., Řezáčová, M., Cahlíková, L. Professor Einstein and their cytotoxic activity. *Plants*, 2020, 9, 137.

Cahlíková, L., Kawano, I., Řezáčová, M., Blunden, G., Hulcová, D., Havelek, R. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochem. Rev.*, 2021, 20, 303–323.

Cedron, J.C., Estévez-Braun, A., Ravelo, A., Gutiérrez, D., Flores, N., Bucio, M.A., Pérez-Hernández, N., Joseph-Nathan, P. Bioactive montanine derivatives from halide-induced rearrangements of haemanthamine-type alkaloids. Absolute configuration by VCD. *Organic Letters*, 2009, 11, 1491–1494.

Cedron, J.C., Ravelo, A.G., León, L.G., Padrón, J.M., Estévez-Braun, A. Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules*, 2015, 20, 13854–13863.

da Silva, A.F.S., de Andrade, J.P., Bevilacqua, L.R.M., de Souza, M.M., Izquierdo, I., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2006, 85, 148–154.

Evidente, A., Andolfi, A., Abou-Donia, A.H., Touema, S.M., Hammada, H.M., Shawky, E., Motta, A. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry*, 2004, 65, 2113–2118.

Faes, S., Dormond, O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. *International journal of molecular sciences*, 2015, 16(9), 21138-21152.

Farinon, M., Clarimundo, V.S., Pedrazza, G.P., Gulko, P.S., Zuanazzi, J.A., Xavier, R.M., de Oliveira, P.G. Disease modifying anti-rheumatic activity of the alkaloid montanine on experimental arthritis and fibroblast-like synoviocytes. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 799, 180–187.

Fresno-Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 2004, 30, 193–204.

Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International journal of clinical practice*, 2004, 58(12), 1134-1141.

Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 2007, 9(12), 767-776.

Govindaraju, K., Ingels, A., Hasan, M.N., Sun, D., Mathieu, V., Masi, M., Evidente, A., Kornienko, A. Synthetic analogues of the montanine-type alkaloids with activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2018, 28, 589–593.

Guan, Y., Zhang, H., Pan, C., Wang, J., Huang, R., Li, Q. Flexible synthesis of montanine-like alkaloids: Revisiting the structure of montabuphine. *Organic & biomolecular chemistry*, 2012, 10, 3812–3814.

Havelek, R., Seifrtová, M., Královec, K., Bručková, L., Cahlíková, L., Dalecká, M., Vávrová, J., Řezáčová, M., Opletal, L., Bílková, Z. The effect of Amaryllidaceae alkaloids Haemanthamine and Haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*, 2014, 21, 479–490.

Inubushi, Y., Fales, H.M., Warnhoff, E.W., Wildman, W.C. Structures of montanine, coccinine, and manthine. *The Journal of Organic Chemistry*, 1960, 25, 2153–2164.

Ishizaki, M., Hoshino, O., Iitaka, Y. Total synthesis of montanine-type Amaryllidaceae alkaloids, which possess a 5, 11-methanomorphanthridine ring system, through cyclization with sodium bis (2-methoxyethoxy) aluminum hydride (SMEAH): The first stereoselective total syntheses of (±)-montanine, (±)-coccinine, (±)-O-acetylmontanine, (±)-pancracine, and (±)-brunsvigine. *The Journal of Organic Chemistry*, 1992, 57, 7285–7295.

Klener, P., Klener, P. Principy systémové protinádorové léčby. *Grada*, 2013, 9–41. ISBN: 978-80-2474171-0.

Klener, P., Klener, P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. *Grada*, 2010, 40-41. ISBN: 978-80-247-2808-7.

Koutová, D., Maafi, N., Havelek, R., Opletal, L., Blunden, G., Řezáčová, M., Cahlíková, L. Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. *Molecules*, 2020, 25(10), 2337.

Koutová, D., Havelek, R., Peterová, E., Muthná, D., Královec, K., Breiterová, K., Cahlíková, L., Řezáčová, M. Pancracine, a Montanine-Type Amaryllidaceae Alkaloid, Inhibits Proliferation of A549 Lung Adenocarcinoma Cells and Induces Apoptotic Cell Death in MOLT-4 Leukemic Cells. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(13), 7014.

Kovář J. Buněčná proliferace a mechanismy její regulace I. *Karolinum*, 2000, 14-15. ISBN: 80-7184-429-2.

Liang, J., Slingerland, J.M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2003, 2, 339–345 (2003)

Matveenko, M., Banwell, M.G., Willis, A.C. A chemoenzymatic total synthesis of the structure assigned to the alkaloid (+)-montabuphine. *Organic Letters*, 2008, 10, 4693–4696.

Masi, M., Van Slambrouck, S., Gunawardana, S., van Rensburg, M.J., James, P.C., Mochel, J.G., Heliso, P.S., Albalawi, A.S., Cimmino, A., van Otterlo, W.A.L., Kornienko, A., Green, I.R., Evidente, A. Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. *South African Journal of Botany*, 2019, 126, 277–281.

Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A.G., Bishayee, A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European journal of pharmacology*, 2019, 858, 172472.

Muthna, D., Soukup, T., Vavrova, J., Mokry, J., Cmielova, J., Visek, B., Jiroutová, A., Havelek, R., Suchanek, J., Filip, S., English, D., Rezacova, M. Irradiation of adult human dental pulp stem cells provokes activation of p53, cell cycle arrest, and senescence but not apoptosis. *Stem cells and development*, 2010, 19(12), 1855-1862.

Muthna, D., Vavrova, J., Lukasova, E., Tichy, A., Knizek, J., Kohlerova, R., Mazankova, N., Rezacova, M. Valproic acid decreases the reparation capacity of irradiated MOLT-4 cells. *Mol. Biol.*, 2012, 46, 110–116.

Ondroušková, E., Vojtěšek, B. Programmed cell death in cancer cells. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*, 2014, 27, S7-S14.

Qing, Z.X., Huang, J.L., Yang, X.Y., Liu, J.H., Cao, H.L., Xiang, F., Cheng, P., Zeng, J.G. Anticancer and reversing multidrug resistance activities of natural isoquinoline alkaloids and their structure-activity relationship. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 25(38), 5088-5114.

Pagliosa, L.B., Monteiro, S.C., Silva, K.B., De Andrade, J.P., Dutilh, J., Bastida, J., Cammarota, M., Zuanazzi, J.A.S. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine* 2010, 17, 698–701.

Pellegrino, S., Meyer, M., Zorbas, C., Bouchta, S.A., Saraf, K., Pelly, S.C., Yusupova, G., Evidente, A., Mathieu, V., Kornienko, A. The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth. *Structure*, 2018, 26, 416–425.

Řezáčová, M., Vávrová, J. Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření. *Nucleus HK®2000*, 40-44, 52-62. ISBN: 978-80-87009-82-6.



Řezáčová, M., Tichý, A., Vávrová, J., Vokurková, D., Lukášová, E. Is defect in phosphorylation of Nbs1 responsible for high radiosensitivity of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4? *Leuk. Res.*, 2008, 32, 1259–1267.

Silva, A.F.S, Andrade, J.P., Machado, K.R.B., Rocha, A.B., Apel, M.A., Sobral, M.E.G., Henriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine*, 2008, 15(10), 882 – 885.

Šalovská, B., Janečková, H., Fabrik, I., Karlíková, R., Čecháková, L., Ondrej, M., Link, M., Friedecký, D., Tichý, A. Radio-sensitizing effects of VE-821 and beyond: Distinct phosphoproteomic and metabolomic changes after ATR inhibition in irradiated MOLT-4 cells. *PLoS ONE*, 2018, 13, e0199349.

Tichý, A., Zášková, D., Pejchal, J., Řezáčová, M., Österreicher, J., Vávrová, J., Cerman, J. Gamma irradiation of human leukaemic cells HL-60 and MOLT-4 induces decrease in Mcl-1 and Bid, release of cytochrome c, and activation of caspase-8 and caspase-9. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2008, 84, 523–530.

Van Goiestsenoven, G., Andolfi, A., Lallemand, B., Cimmino, A., Lamoral-Theys, D., Gras, T., Abou-Donia, A., Dubois, J., Lefranc, F., Mathieu, V., Kornienko, A., Kiss, R., Evidente A. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products*, 2010, 73, 1223–1227.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 2003, 36(3), 131-149.

Wildman, W.C., Kaufman, C.J. Alkaloids of the Amaryllidaceae. III. Isolation of five new alkaloids from *Haemanthus* species1. *Journal of the American Chemical Society*, 1955, 77, 1248–1252.

Wildman, W.C., Olesen, B. Biosynthesis of montanine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1976, 14, 551.

Zhang, Y., Wang, X., Han, L., Zhou, Y., Sun, S. Green tea polyphenol EGCG reverse cisplatin resistance of A549/DDP cell line through candidate genes demethylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015, 69, 285-290.

## Přehled publikační činnosti autora

### Původní vědecké publikace s impakt faktorem

**Koutová, D.**, Havelek, R., Peterová, E., Muthná, D., Královec, K., Breiterová, K., Cahlíková, L., Řezáčová, M. Pancracine, a Montanine-Type Amaryllidaceae Alkaloid, Inhibits Proliferation of A549 Lung Adenocarcinoma Cells and Induces Apoptotic Cell Death in MOLT-4 Leukemic Cells. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(13), 7014. **IF2020 5,923, Q2 dle AIS**

Maafi, N., Mamun, A. A., Jand'ourek, O., Maříková, J., Breiterová, K., Diepoltová, A., Konečná, K., Hošťálková, A., Hulcová, D., Kuneš, J., Kohelová E., **Koutová D.**, Šafratová, M., Nováková, L., Cahlíková, L. Semisynthetic Derivatives of Selected Amaryllidaceae Alkaloids as a New Class of Antimycobacterial Agents. *Molecules*, 2021, 26(19), 6023. **IF2020 3,060, Q2 dle AIS**

**Koutova, D.**, Kulhava, M., Havelek, R., Majorosova, M., Královec, K., Habartova, K., Hošťálková, A., Opletal, L., Cahlikova, L., Řezáčová, M. Bersavine: a novel bisbenzylisoquinoline alkaloid with cytotoxic, antiproliferative and apoptosis-inducing effects on human leukemic cells. *Molecules*, 2020 25(4), 964. **IF2020 3,060, Q2 dle AIS**

Breiterová, K., **Koutová, D.**, Maříková, J., Havelek, R., Kuneš, J., Majorošová, M., Opletal, L., Hošťálková, A., Jenčo, J., Řezáčová, M., Cahlíková, L. Professor Einstein and their cytotoxic activity. *Plants*, 2020, 9, 137. **IF2020 3,935, Q1 dle IF**

Al Shammari, L., Al Mamun, A., **Koutová, D.**, Majorošová, M., Hulcová, D., Šafratová, M., Breiterová, K., Maříková, J., Havelek, R., Cahlíková, L. Alkaloid profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS, isolation of Amaryllidaceae alkaloids and evaluation of their cytotoxicity. *Records of Natural Products*, 2020, 14, 154–159. **IF2020 1,735, Q3 dle AIS**

Královec, K., Havelek, R., **Koutová, D.**, Veverka, P., Kubíčková, L., Brázda, P., Kohout, J., Herynek, V., Vosmanská, A., Kaman, O. Magnetic nanoparticles of Ga-substituted  $\epsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for biomedical applications: magnetic properties, transverse relaxivity, and effects of silica-coated particles on cytoskeletal networks. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2020, 108(7), 1563-1578. **IF2020 3,221, Q3 dle AIS**

Filipova, A., Marek, J., Havelek, R., Pejchal, J., Jelicova, M., Cizkova, J., Majorosova, M., Muckova, L., Kucera, T., Prchal, L, Psoška, M., Zivna, N., **Koutova, D.**, Sinkorova, Z., Rezacova, M., Tichy, A. Substituted piperazines as novel potential radioprotective agents. *Molecules*, 2020, 25(3), 532. **IF2020 3,060, Q2 dle AIS**

### Přehledové články

**Koutová, D.**, Maafi, N., Havelek, R., Opletal, L., Blunden, G., Řezáčová, M., Cahlíková, L. Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. *Molecules*, 2020, 25(10), 2337. **IF2020 3,060, Q2 dle AIS**

### Přednášky na odborných setkáních

- 17<sup>th</sup> International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové, 2020

Přednáška na téma: Montanine-type Amaryllidaceae Alkaloid Pancracine: Mechanistic insight into antiproliferative and cytotoxic activity.

- 16<sup>th</sup> Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Králové, 2020 – 1. místo

Přednáška na téma: Montanine-type Amaryllidaceae Alkaloid Pancracine: Mechanistic insight into antiproliferative and cytotoxic activity.

- Conference INOMED, Hradec Králové, 2020

Přednáška na téma: Montanine-type Amaryllidaceae Alkaloid Pancracine: Mechanistic insight into antiproliferative and cytotoxic activity.

**Absolvované vzdělávací akce, prezentace posterů:**

- 5<sup>th</sup> World Congress on Biotechnology and Biological Studies, Valencie, Španělsko, 2019

Prezentace posteru: Design, synthesis and biological screening of a novel class of small molecular inhibitors with radioprotective properties.

- Kurz: Rozvoj pedagogických schopností, Lékařská fakulta, Hradec Králové