

V. Závěr

Tato práce se zaměřila na studium procesů uplatňujících se v indukci apoptosy různými faktory. V našem případě jsme indukovali buněčnou smrt u nádorových buněk deprivací železa, klinicky používanými taxany (paclitaxel, docetaxel) a nově syntetizovanými fotosensitivními látkami. Z presentovaných publikací jsme získali tyto závěry.

(1) Studie týkající se indukce apoptosy deprivací železa prokázaly účast odlišných signálních drah vedoucí k indukci apoptosy u myších a lidských nádorových buněk. V obou případech byla použita B lymfomová buněčná linie citlivá k deprivaci železa.

U myších buněk jsme popsali významnou část apoptotické signální dráhy u 38C13 buněk sensitivních k indukci apoptosy deprivací železa. Deprivace železa u těchto buněk vede k translokaci proapoptotického proteinu Bax z cytosolu na mitochondrie, která je následována zhroucením mitochondriálního membránového potenciálu v důsledku porušení integrity vnější mitochondriální membrány, uvolněním cytochromu c z mitochondrií, aktivací kaspasy 9 a následnou aktivací kaspasy 3.

U lidských buněk jsme taktéž zaznamenali indukci apoptosy deprivací železa, avšak charakterem mechanismu odlišnou od apoptosy popsané u myších 38C13 buněk. V případě lidských Raji buněk sensitivních k indukci apoptosy deprivací železa docházelo pouze k aktivaci kaspasy 3, nikoliv však k aktivaci kaspasy 9 a mitochondriálním změnám. Způsob aktivace kaspasy 3 v tomto případě zůstává neznámý.

Významného zjištění jsme dosáhli vytvořením resistantního klonu Raji buněk k indukci apoptosy deprivací železa. Během přípravy resistantního klonu byly Raji buňky adaptovány na nižší koncentraci železa v médiu za pomoci nízkomolekulárního citrátu železitého. Výsledný klon Raji buněk adaptovaný na nízkomolekulární zdroj železa vykazoval resistenci k indukci apoptosy deprivací železa. Avšak, je-li tento klon readaptován na transferinové železo (optimální zdroj železa), dochází opět k obnovení sensitivity tohoto klonu k indukci apoptosy deprivací železa. Toto zjištění ukazuje, že sensitivity buněk k určitému stimulu buněčné smrti může záviset na konkrétním metabolickém stavu buněk.

(2) Studie zaměřené na potenciální transportéry nízkomolekulárního železa vedly k identifikaci HSP90 jako železo vázajícího proteinu. Prokázali jsme, že HSP90 je

asociován s plasmatickou membránou. Avšak otázka, je-li HSP90 nějakým způsobem uplatněn v transportu nízkomolekulárního železa, vyžaduje další studie.

(3) Studie týkající se indukce buněčné smrti taxany byla založena na srovnání sensitivní (MDA-MB-435) a resistantní (NCI-ADR-RES) buněčné linie. Pro indukci buněčné smrti jsme u resistantních buněk použili 300x větší koncentraci ve srovnání se sensitivní buněčnou linií.

U obou buněčných linií předcházela buněčné smrti akumulace buněk v G2/M fázi, jak je typické pro účinek taxanů na buněčný cyklus. Následná indukce apoptosy byla u obou těchto buněčných linií nezávislá na aktivaci proteinu p53. Dále, jak u MDA-MB-435 tak u NCI-ADR-RES buněk nedocházelo k oligonukleosomální fragmentaci DNA, ačkoliv byla detekována aktivní kaspasa 3. Obě testované linie aktivovaly po aplikaci účinné koncentrace paclitaxelu kaspasu 9, nicméně pouze u resistantní buněčné linie (NCI-ADR-RES) docházelo i k uvolňování cytochromu c z mitochondrií, vyžadovaného k aktivaci kaspasy 9. Dosažené výsledky ukazují na rozdílný mechanismus indukce buněčné smrti u obou linií a jeho poznání vyžaduje další studie.

(4) Ve studii zaměřené na PDT jsme zkoumali vlastnosti dvou nových derivátů porfyrinu P(β -CD)1 a P(β -CD)2 pro jejich použití ve fotodynamické terapii (PDT). Oba deriváty byly testovány na několika buněčných nádorových liniích a v BALB/c myších s transplantovaným syngením karcinomem 4T1. Jak P(β -CD)1, tak P(β -CD)2 byly po aplikaci lokalizovány v lysosomech, avšak celkový účinek na nádorové buňky se trochu odlišoval. V *in vitro* experimentech prokázal P(β -CD)1 takové lepší vlastnosti než P(β -CD)2 jako jsou nižší ozařovací dávka, nižší účinná koncentrace a rychlejší kinetika příjmu buňkou. V případě *in vivo* experimentech byl však za vhodných podmínek P(β -CD)2 schopný trvale odléčit transplantovaný nádor, navíc zde nedocházelo k nežádoucí kumulaci P(β -CD)2 v kůži. U P(β -CD)1 bohužel nedošlo k trvalému odléčení nádoru v žádné zvolené koncentraci a navíc u této látky docházelo poměrně rychle k nežádoucí akumulaci v kůži.

Proto se domíváme, že P(β -CD)2 derivát se díky svým fotosensitivním vlastnostem, rychlé distribuce v nádorové tkáni, rychlému vyloučení z těla a nízké systémové toxicitě ukázal jako vhodný prostředek pro *in vivo* PDT aplikace.