

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 IC₅₀. 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.