



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Antiproliferační aktivita látek odvozených od alkaloidů
chelerythrinu a sanguinarinu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Pavlína Pospíšilová
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Pavlína Pospíšilová
Název práce:	Antiproliferační aktivita látek odvozených od alkaloidů chelerythrinu a sanguinarinu
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	<p>Kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy jsou rostlinné produkty, jejichž nejbohatším zdrojem jsou rostliny z čeledi <i>Papaveraceae</i>, <i>Fumariaceae</i> a <i>Rutaceae</i>. Základem jejich struktury je N-methylbenzo[c]fenanthridinový kationt, který souvisí se schopností interkalace do DNA a s jejich cytotoxickými vlastnostmi. Teoretická část se věnuje alkaloidům sanguinarinu a chelerythrinu, jejich účinkům a potenciálního využití v onkologii. Dále se zabývá přírodními benzo[c]fenanthridinovými alkaloidy a jejich syntetickými deriváty, z nichž některé jsou již v klinickém testování. V experimentální části byla studována antiproliferační aktivita látek odvozených od sanguinarinu a chelerythrinu s fenanthridinovým skeletem. Pro charakterizaci jejich biologických účinků byly použity metody průtokové cytometrie, imunodetekce vybraných proteinů, měření kaspázové aktivity a transkripční aktivity p53. Výsledky naznačují vyšší aktivitu u látek se substitucí v poloze 2,3 a 7,8. Tyto látky jsou schopny indukovat apoptózu, zvyšovat hladinu nádorového supresoru p53 a aktivitu kaspáz.</p>
Klíčová slova:	Kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy, sanguinarin, chelerythrin, rakovina, apoptóza
Počet stran:	64
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographic information

Autor's name:	Bc. Pavlína Pospíšilová
Title:	Antiproliferative activity of compounds derived from chelerythrine and sanguinarine
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of growth regulators
Supervisor:	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation:	2018
Abstract:	<p>Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids are plant products, the richest sources of which are plants of the family <i>Papaveraceae</i>, <i>Fumariaceae</i> and <i>Rutaceae</i>. The basis of their structure is N-methylbenzo[c]phenanthridine cation, which is related to the ability to intercalate into DNA and their cytotoxic properties. The theoretical part deals with the alkaloids of sanguinarine and chelerythrine, their effects and their potential use in oncology. It also deals with natural and synthetic derivatives of sanguinarine and chelerythrine, some of which are already in clinical testing. In the experimental part the antiproliferative activity of sanguinarin and chelerythrine with fenanthridine scaffold derived substances was studied. To describe their biological effects, methods of flow cytometry, immunodetectional selection of proteins, measurement of caspase activity and transcriptional activity of p53 were used. The results indicate a higher activity in substituents at the 2,3 and 7,8 positions. These compounds are able to induce apoptosis increase level of tumor suppressor p53 and elevate caspase activity.</p>
Keywords:	Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids, sanguinarine, chelerythrine, cancer, apoptosis
Number of page:	64
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji personálu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého za vstřícnost a praktické rady. Velké díky patří především mým rodičům, kteří mi studium umožnili a po celou dobu mě podporovali.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
2	BENZO[C]FENANTHRIDINOVÉ ALKALOIDY	9
2.1	Historie, struktura a základní vlastnosti.....	9
2.2	Sanguinarin	12
2.2.1	Vliv na buněčný cyklus a apoptózu	13
2.2.2	Vliv na signální dráhy.....	17
2.2.3	Vliv na angiogenezi	17
2.2.4	Vliv na metastazování.....	18
2.3	Chelerythrin.....	19
2.3.1	Inhibice proteinkinázy C.....	19
2.3.2	Interakce s G-kvadruplexní DNA	20
2.4	Další benzo[c]fenanthridinové alkaloidy	22
2.5	Syntetické deriváty.....	25
2.5.1	NK109.....	25
2.5.2	NK314.....	26
2.5.3	Preparát Ukrain™	27
2.6	Fenanthridinová analoga benzo[c]fenanthridinových alkaloidů.....	29
2.6.1	Struktury studovaných látek	31
3	MATERIÁL A METODY	33
3.1	Přístroje a vybavení.....	33
3.2	Použité chemikálie	33
3.3	Použité roztoky.....	33
3.4	Použité protilátky	34
3.5	Použité buněčné linie	34
3.6	Studované sloučeniny.....	35
3.7	SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce.....	35

3.8	Průtoková cytometrie	36
3.9	Aktivace p53	37
3.10	Fluorimetrické stanovení kaspázy 3 a 7.....	37
4	VÝSLEDKY	38
4.1	Analýza buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie.....	38
4.2	Imunodetekce vybraných proteinů.....	43
4.3	Transkripční aktivita proteinu p53	46
4.4	Stanovení aktivity kaspáz 3 a 7	47
5	DISKUZE	49
6	ZÁVĚR	52
7	SEZNAM LITERATURY	53
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	63

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Alkaloidy jsou nízkomolekulární dusíkaté a často heterocyklické látky, které jsou produkovány rostlinami jako sekundární metabolity chránící rostlinu před patogenními mikroorganismy. Významnou skupinou alkaloidů jsou kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy, jež se vyskytují v řadě rostlinných čeledí, jako jsou pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*), zemědýmovité (*Fumariaceae*), routovité (*Rutaceae*) a mákovité (*Papaveraceae*). Nejznámějšími benzo[c]fenanthridinovými alkaloidy jsou sanguinarin a chelerythrin, jejichž spektrum biologických aktivit je široké. Asi nejstarší zjištěnou schopností je účinné potlačování tvorby zubního plaku a snižování zánětu dásní prostřednictvím antioxidačních, antimikrobiálních a protizánětlivých účinků, díky čemuž se používají v přípravcích ústní hygieny. Avšak nedávné zjištění jejich antiproliferační aktivity vzbudilo velký zájem vědců, jakožto potenciálního cytostatika k léčbě rakoviny. Předmětem zkoumání jsou nejen sanguinarin a chelerythrin, ale i další přírodní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (sanguirubin, chelirubin, sanguiluthin, cheliluthin a makarpin) a jejich syntetické deriváty.

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracovat rešerši týkající se antiproliferační aktivity alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu a jejich derivátů.

Cílem experimentální části bylo objasnění biologických účinků několika nově syntetizovaných fenanthridinových derivátů připravených jako analoga benzo[c]fenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu na inhibici růstu v buněčných liniích MCF-7, K562 a ARN8.

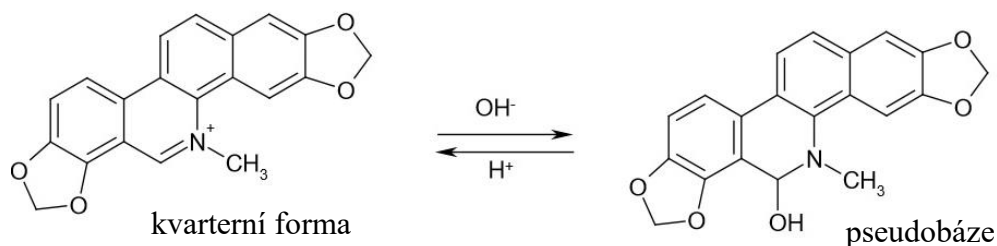
2 BENZO[C]FENANTHRIDINOVÉ ALKALOIDY

2.1 Historie, struktura a základní vlastnosti

Přírodní látky, zejména látky rostlinného původu, mají nezastupitelné místo v léčbě nádorových onemocnění, ale i nejrůznějších lidských chorob již několik let. V současné době tvoří látky přírodního charakteru, či látky z přírodních zdrojů odvozené více než 60 % běžně užívaných cytostatik (Cragg *et Newman*, 2005). Užití alkaloidů v léčbě rakoviny sahá již do 50. let minulého století, kdy byl objeven a izolován alkaloid vinblastin z barvínku menšího (*Vinca minor*), který měl najít uplatnění jako antihypertenzivum a antidiabetikum (Scheindlin *et Rubin*, 1954). Ukázalo se, že tato sloučenina měla velmi nepatrný vliv na hladinu cukru v krvi, proto nebylo praktické její užití k léčbě. Avšak později byl učiněn pokus o podání extraktu barvínku několika myším s lymfomem, u kterých byl po intraperitoneální aplikaci pozorován neočekávaný příznivý účinek na rychle rostoucí lymfom. Proto byla tato sloučenina přidána do seznamu látek určených pro skřínink možných chemoterapeutických látek (Noble, 1990).

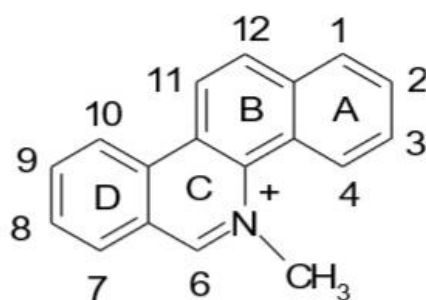
Mezi přírodní látky diskutované v souvislosti s terapií rakoviny, a to díky jejich antiproliferačnímu účinku, patří i benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (BA), z nichž nejznámější jsou sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE) (Zdařilová *et al.*, 2006). Tyto alkaloidy byly objeveny již v 19. století a jsou poměrně malou skupinou přírodních látek isochinolinového typu, které jsou na první pohled nápadné svým výrazným zbarvením. Vyskytují se v řadě rostlinných čeledí: mákovité (*Papaveraceae*), pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*), zemědýmovitě (*Fumariaceae*) a routovité (*Rutaceae*) a jejich hlavními zdroji jsou vlašovičnick větší (*Chelidonium majus*), makleja srdčitá (*Macleaya cordata*) a krevnice kanadská (*Sanguinaria canadensis*) (Šimánek, 1985; Dana, 1828). Tyto alkaloidy jsou považovány za sekundární metabolity chránící rostlinu před patogenními mikroorganismy.

Výchozími aminokyselinami v biosyntéze kvarterních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů (QBA) jsou tyrosin a fenylalanin (Cline, McHale *et Coscia*, 1993). BA se vyskytují ve dvou formách, mezi nimiž funguje reversibilní rovnováha v závislosti na pH prostředí. Jedna z forem se označuje jako kvarterní, která převládá v kyselém prostředí. Tato forma je polární, dobře rozpustná ve vodě a vždy výrazně zbarvena. Při vyšších hodnotách pH dochází k přechodu na druhou formu, která se označuje jako pseudobáze (Obr. 1). Tato forma je také někdy označována jako hydroxyadukt a je nepolární, ve vodě nerozpustná a bezbarvá (Dostál *et Slavík*, 2002; Zdařilová *et al.*, 2006).



Obr. 1: Strukturní formy kvarterních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů

Základem jejich struktury je N-methylbenzo[c]fenanthridinový kationt. Struktura nese čtyři aromatické kruhy, které jsou označeny jako A, B, C, D a dusíkový atom, který se nachází v pozici 5. Tento dusík nese methylovou skupinu (Obr. 2), má pozitivní náboj a vazba mezi ním a atomem uhlíku v pozici 6 se nazývá iminová a je nejvíce reaktivní, protože snadno podléhá nukleofilnímu ataku.



Obr. 2: N-methylbenzo[c]fenanthridinový kationt

Na základní tetracyklické struktře se mohou nacházet různé kombinace substitucí – methoxylové, methylenedioxyové či hydroxylové. Podle typu substituce rozdělujeme QBA do čtyř podskupin:

- a) 2, 3, 7, 8-tetrasubstituované alkaloidy (sanguinarin, chelerythrin, isofagaridin),
 - b) 2, 3, 8, 9-tetrasubstituované deriváty (nitidin, avicin a fagaronin),
 - c) pentasubstituované (sanguilutin, sanguirubin, chelirubin, chelilutin, 10-hydroxysanguinarin a 10-hydroxychelerythrin),
 - d) hexasubstituované (makarpin a 12-hydroxychelirubin)
- (Dostál *et al.*, 2000; Suchomelová *et al.*, 2007).

Právě chemická struktura je zodpovědná za rozdílnou biologickou aktivitu, kterou jednotlivé alkaloidy vykazují. Ta je dána planaritou molekuly, přítomností iminové vazby, pozicí, počtem a druhem jednotlivých substituentů (Toušek *et al.*, 2005).

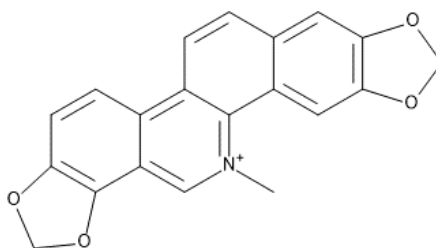
Kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy reagují s DNA prostřednictvím interkalace, kdy dochází k vmezeření alkaloidu mezi dvě báze ve dvoušroubovici. Tato schopnost byla potvrzena pouze pro kvarterní formu, zatímco forma pseudobáze tuto vlastnost nevykazuje (Sen *et Maiti*, 1994). Interakce SA a CHE s DNA je srovnatelná s typickým interkalátorem ethidiumbromidem. Jelikož vykazují také fluorescenční vlastnosti, mohou být využity ve výzkumu a diagnostice jako fluorescenční sondy DNA (Colombo *et Bosisio*, 1996; Slaninová, Slanina *et Táborská*, 2008).

SA a CHE jsou již léta používány v dentálních výrobcích k léčbě zánětu dásní, neboť je u nich prokázán antibakteriální a protizánětlivý účinek (Eley, 1999; Godowski *et al.*, 1995). Originální český výrobek zubní pasta Santoin právě obsahuje směs sanguinarinu a chelerythrinu z makleje srdčité a je patentově chráněn (Dostál *et Slavík*, 2000). Zajímavým zjištěním byla inhibiční aktivita CHE a SA vůči *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Candida albicans* srovnatelná s gentamycinem (Navarro *et Delgado*, 1999). Také byl u obou alkaloidů demonstrován antiprotozoární účinek, jejichž 10 µM koncentrace způsobovala 50% úmrtnost krevních forem *Trypanosoma brucei* a *T. congolense* (Rosenkranz *et Wink*, 2008). Dále pak vykazují antifungální a antivirotický účinek a při mikromolárních koncentracích cytotoxické účinky proti různým nádorovým buněčným liniím (Malíková *et al.*, 2006). V posledních letech je těmto látkám včetně jejich různých derivátů věnována stále větší pozornost jako potenciální látky při léčbě rakoviny. SA a CHE vykazují inhibiční účinek na růst buněk a indukují apoptózu v různých nádorových buňkách (Ahmad *et al.*, 2000; Chmura *et al.*, 2000).

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt, je zcela nezbytný a evolučně velmi starý mechanismus, který vede k řízené eliminaci přestárých, nefunkčních, mutovaných a infikovaných či transformovaných buněk. Defekty v apoptotických cestách přispívají k řadě lidských onemocnění a jsou průvodním znakem většiny nádorových onemocnění (Klener *et Klener*, 2010). Právě schopnost nádorových buněk uniknout apoptóze hraje významnou roli v jejich odolnosti vůči konvenční terapii (Kasibhatla *et Tseng*, 2003).

2.2 Sanguinarin

Sanguinarin je benzo[c]fenanthridinový alkaloid, který je považován za sekundární metabolit některých rostlin. Je převážně izolován z krevnice kanadské (*Sanguinaria canadensis*), od níž je také odvozen název alkaloidu. Dále se nachází ve vlaštovičniku větším (*Chelidonium majus*), makleji srdčité (*Macleaya cordata*) a pleskance mexické (*Agremone mexicana*) (Mackraj, Govender *et Gathiram*, 2008). Sanguinarin obsahuje ve své struktuře dusík v poloze 5 a dvě methylenedioxydové skupiny (-OCH₂O-) v poloze 2, 3 a 7, 8 (Obr. 3) (Malíková *et al.*, 2006).



Obr. 3: Chemická struktura sanguinarinu.

Jeho současné farmakologické použití je v dentálních produktech, u kterých bylo prokázáno, že snižují zánět dásní a tvorbu supragingiválních plaků díky represivní povaze sanguinarinu vůči bakteriím, houbám a zánětu (Laster *et Lobene*, 1990). V roce 2003 byla provedena studie, která prokázala antibakteriální efekt methanolového extraktu z rostliny *Sanguinaria canadensis* vůči bakterii *Helicobacter pylori* (Mahady *et al.*, 2003). Tato bakterie je označována jako jeden z hlavních rizikových faktorů pro vznik rakoviny žaludku (Stoicov *et al.*, 2004). Sanguinarin má také protinádorový potenciál, jak uvádějí předběžné preklinické studie na zvířecích modelech. Vyvolává apoptózu a vykazuje antiproliferativní, antiangiogenní a antiinvazivní vlastnosti. Tyto vlastnosti byly prokázány na řadě typů rakovinných buněk – prostaty (Adhami *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2006), děložního hrdla (Ding *et al.*, 2002), prsu (Dong *et al.*, 2013), leukémie (Weerasinghe *et al.*, 2001), lymfomu (Hussain *et al.*, 2007), kolonu (Matkar, Wrischnik *et Hellmann-Blumberg*, 2008), kolorektu (Han *et al.*, 2013), žaludku (Choi *et al.*, 2009), slinivky břišní (Ahsan *et al.*, 2007), úst (Tsukamoto *et al.*, 2011), a plic (Jang *et al.*, 2009). Také u osteosarkomu (Park *et al.*, 2010), neuroendokrinního karcinomu (Larsson *et al.*, 2010) a buněk lidského neuroblastomu (Cecen *et al.*, 2014) byly pozorovány antiproliferativní účinky.

Studie ukázaly, že sanguinarin postihuje několik buněčných cílů, včetně některých proteinkináz a transkripčního faktoru NF- κ B, který se podílí na dráhách signální transdukce spojených s buněčnou proliferací a mechanismy buněčné smrti. Dále ovlivňuje širokou škálu enzymů, jako je sodno-draselná ATPáza (Ding *et al.*, 2002), cyklooxygenáza-1 (Jeng *et al.*, 2007), cAMP-dependentní proteinkináza a Ca²⁺-dependentní proteinkináza C (Wang *et al.*, 1997). Sanguinarin byl také vyhodnocen jako selektivní inhibitor mitogenem aktivované proteinkinázy fosfatázy-1 (MKP-1), jejíž zvýšená exprese souvisí s celou řadou nádorových onemocnění (Vogt *et al.*, 2005). Sanguinarin nepředstavuje slibnou budoucnost jen v léčbě rakoviny, ale i u jiných chronických onemocněních, jako je například hypertenze či astma (Mackraj, Govender *et Gathiram*, 2008; Basu *et Kumar*, 2016).

2.2.1 Vliv na buněčný cyklus a apoptózu

Sanguinarin indukuje apoptózu třemi hlavními cestami: potlačením aktivace NF- κ B, deregulací buněčného cyklu a mitochondriálním poškozením (Obr. 4).

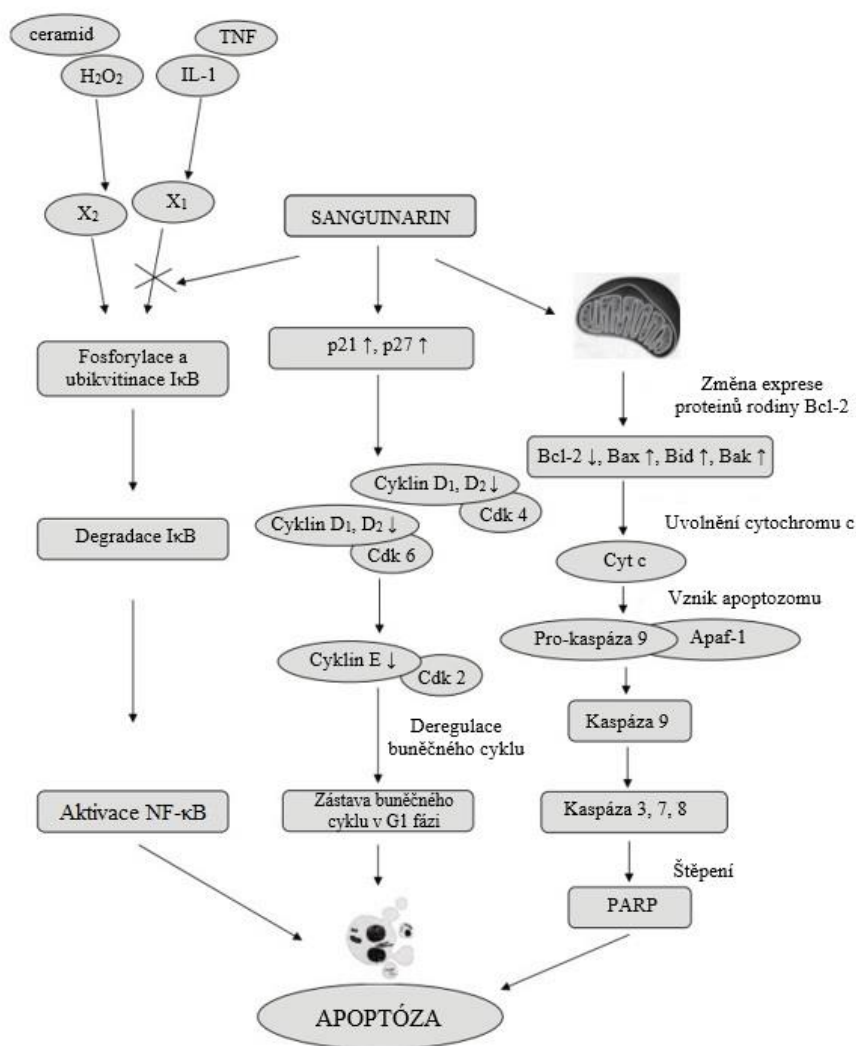
Progrese buněčného cyklu závisí na aktivaci cyklinů a cyklin-dependentních kináz (CDK), jejichž normální postupné působení je důležité pro správný průběh buněčného cyklu. Vzhledem k tomu, že nekontrolovaná aktivita CDK je často příčinou rakoviny člověka, jejich funkce je přísně regulována inhibitory buněčného cyklu, jako jsou proteiny p21^{Waf1} a p27^{Kip1}. Po antimitogenních signálech nebo poškození DNA se p21^{Waf1} a p27^{Kip1} váží na komplexy cyklin-CDK, čímž inhibují jejich katalytickou aktivitu a tím aktivují zástavu buněčného cyklu (Coqueret, 2003). Blokáda buněčného cyklu nakonec může vést k programované buněčné smrti neboli apoptóze (Pucci, Kasten *et Giordano*, 2000). Zvýšená hladina inhibitorů CDK p21^{Waf1} a p27^{Kip1} byla zjištěna u lidských nádorových buněk prostaty po ovlivnění sanguinarinem (0,2-2 μ M, 24 hodin). Příčinou jejich zvýšené aktivity je pravděpodobně vazba sanguinarinu na mikrotubuly (Wolff *et Knipping*, 1993) a interkalování do oblastí DNA bohatých na GC, což má za následek poškození DNA, které může v konečném důsledku indukovat apoptózu (Nandi *et Maiti*, 1985). V témže experimentu bylo také zjištěno, že submikromolární koncentrace sanguinarinu vlivem zvýšené hladiny inhibitorů CDK způsobují zastavení buněčného cyklu ve fázi G1/S a G2/M, což bylo potvrzeno sníženou hladinou cyklinů D1, D2, E a CDK2, 4 a 6 (Adhami *et al.*, 2004). Další studie byla zaměřena na průběh buněčného cyklu v buněčné linii rakoviny prsu MCF-7 ovlivněné sanguinarinem (5-10 μ M). Pomocí imunocytochemických metod bylo vizualizováno chování cyklinu D1 a topoizomerázy II. Výsledkem bylo prodloužení buněčného cyklu v G0/G1 fázi a inhibice buněčné proliferace. Inhibice růstu byla

doprovázena výraznou translokací cyklinu D1 a topoizomerázy II z jádra do cytoplazmy (Holy, Lamont *et al.*, 2006).

Sanguinarin působí inhibičně na transkripční faktor, který je označován jako NF- κ B (Chaturvedi *et al.*, 1997). Jedná se o jaderný transkripční faktor, který reguluje expresi velkého počtu genů podílejících se na regulaci apoptózy, tumorogenezi, zánětu, aterosklerózy, virové replikace a mnoha autoimunitních onemocnění (Ahmad *et al.*, 2000). Je aktivován celou řadou podnětů, jako jsou cytokiny (TNF- α , IL-1) a jejich receptory, růstové faktory, proteiny buněčné adheze, lymfokiny, záření a stres. Ve své neaktivní formě se NF- κ B nachází v cytoplazmě vázaný na inhibičních proteinech z rodiny I- κ B. Již zmíněné různé aktivační podněty způsobují fosforylaci I- κ B, po níž následuje ubiquitinace a degradace I- κ B. Výsledkem je vystavení nukleárních lokalizačních signálů na NF- κ B podjednotkách a následná translokace molekuly do jádra. V jádře se faktor váže na promotorové oblasti některých genů a tím aktivuje jejich transkripci (Baldwin, 1996). Sanguinarin neinhibuje vazbu proteinu NF- κ B na DNA, ale inhibuje dráhu vedoucí k aktivaci NF- κ B (Chaturvedi *et al.*, 1997).

Členové rodiny proteinů Bcl-2 regulují propustnost vnější mitochondriální membrány, čímž jsou schopné regulovat průběh apoptózy. Členové této rodiny se dělí do tří podskupin klasifikovaných podle jejich homologních domén. První skupinou jsou antiapoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-1-w, Ced-9), které obsahují všechny čtyři domény BH (BH1, BH2, BH3 a BH4). Druhou skupinou jsou proapoptotické proteiny (Bax, Bak, Bok, Bcl-XS), které obsahují tři domény BH (BH1, BH2 a BH3). Poslední skupina zahrnuje různorodé proteiny příbuzné proapoptotickým proteinům, které obsahují pouze doménu BH3 (Bid, Bik, Bad, Bim, PUMA, NOXA) (Siddiqui, Ahad *et al.*, 2015). U leukemických buněčných linií JM1 a K562 byla pozorována apoptóza indukovaná sanguinarinem v koncentraci 1,5 μ M a buněčná smrt srovnatelná s onkózou byla zjištěna při koncentraci 12,5 μ M. Sanguinarinem ošetřená buněčná linie K562 vykazovala výrazné zvýšení exprese proapoptotického proteinu Bax (Weerasinghe *et al.*, 2001). Účinek sanguinarinu (0,1 – 2 μ M) byl také hodnocen v imortalizovaných lidských keranocytech (HaCaT). Výsledkem tohoto experimentu bylo významné snížení hladiny antiapoptotického proteinu Bcl-2 a zvýšení hladiny proapoptotického proteinu Bax. Sanguinarin tak způsobil apoptotickou smrt uvolněním cytochromu c z mitochondrií do cytosolu, kde se váže na protein Apaf-1 a za pomoci ATP také na pro-kaspázu 9. Tím vzniká komplex apoptozom, který mění pro-kaspázu 9 na aktivní kaspázu 9. Ta je klíčová ve vnitřní dráze indukce apoptózy. Následně se kaskádovitě aktivují kaspázy 3, 7 a 8. Tento mechanismus účinku sanguinarinu byl potvrzen na experimentu s buněčnou linií HaCaT, kde byla detekována

zvýšená hladina cytochromu c a proteinu Apaf-1 a dále pak významné zvýšení aktivní formy kaspázy 3, 7, 8 a 9. Tento proces byl doprovázen štěpením substrátu kaspázy 3 – PARP a následnou degradací DNA a apoptotickou smrtí (Adhami *et al.*, 2003). Tato schopnost SA byla potvrzena i na dalších nádorových liniích, avšak při rozdílných koncentracích. Působení sanguinarinu (2,1 a 4,2 μM) na imortilizované endocervikální buňky infikované lidským papilomavirem vyvolalo apoptózu, kdy byla pozorována zvýšená hladina kaspázy 3 a indukce proteolytického štěpení PARP. Vyšší koncentrace SA (8,5 a 16,9 μM) způsobily u buněk onkózu charakterizovanou zvětšením buněk, vakuolizací, zvýšenou permeabilizací cytoplazmatické membrány a inaktivací kaspázy 3 (Ding *et al.*, 2002). Podobný účinek byl zjištěn na buněčné linii OCM-1 lidského uveálního melanomu, u níž při koncentraci 2,7 μM a 10 μM nastala apoptóza, zatímco u vyšších dávek (20 μM) byla dominantní formou buněčné smrti nekróza (Kemény-Beke *et al.*, 2006).



Obr. 4: Předpokládaný model proapoptického působení sanguinarinu prostřednictvím tří různých cest: potlačení aktivace NF- κ B, deregulace buněčného cyklu a depolarizace mitochondrií (upraveno podle Malíková *et al.*, 2006).

Apoptóza je regulována mimo jiné také proteinem p53. Tento transkripční faktor je klíčový a nezastupitelný mediátor a částečně i efektor indukce apoptózy v odpovědi na signály genotoxického stresu a onkogenní signalizace. Až u poloviny solidních nádorů byla detekována ztráta nebo mutace tohoto proteinu, proto je důležitá identifikace látek, které jsou schopny nádorovou buňku zabít bez ohledu na funkčnost p53 (Klener *et Klener*, 2010). Matkar *et al.* (2008) studovali účinek SA na buněčné linii karcinomu tlustého střeva. Porovnávali buněčnou linii s mutantním genem pro protein p53 a linii s normálním genem pro tento protein. Zjistili, že obě linie byly stejně citlivé na působení sanguinarinu. Výsledek tedy naznačuje, že tato sloučenina vyvolává buněčnou smrt, která není zprostředkována proteinem p53. Další experiment proběhl na buněčné linii DU145 s mutantním genem pro 53, kdy byla detekována hladina p21. Bylo zjištěno, že p21 byla aktivována i přes nefunkční p53. Tento fakt taktéž potvrzuje, že sanguinarin vykazuje apoptotické účinky bez ohledu na stav p53 (Adhami *et al.*, 2004).

Sanguinarin vyvolává apoptózu také produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Tyto látky jsou vysoce reaktivní molekuly, které v nízkých koncentracích regulují normální buněčnou proliferaci a diferenciaci (Circu *et Aw*, 2010). Nicméně ve vysokých koncentracích zprostředkovávají poškození buněčné DNA, redukují normální potenciál mitochondriální membrány a podporují tak buněčnou smrt (Hawk, McCallister *et Schafer*, 2016). U buněk lidského lymfomu a karcinomu prsu, které byly inkubovány v přítomnosti antioxidantů N-acetylcysteinu nebo glutathionu, byla pozorována snížená schopnost SA indukovat apoptózu, což naznačuje zapojení ROS v buněčné smrti zprostředkované SA (Kim *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2007). Avšak některými autory je tato schopnost sanguinarinu zpochybňována, a dokonce některé studie dokazují spíše antioxidační efekt sanguinarinu a oxidační stres, který vzniká při jeho účinku připisují právě probíhající apoptóze. To také potvrzuje experiment Slunské *et al.* (2010), kdy byla testována schopnost SA vyvolat oxidační stres a antioxidační účinek na buňkách endocervikálního karcinomu (HeLa). Výsledky ukázaly, že v buňkách ovlivněných SA nebyla produkce ROS zvýšená, a navíc byl potvrzen i antioxidační účinek, protože působením SA došlo k významnému snížení oxidačního stresu způsobeného H₂O₂.

Sanguinarin zvyšuje senzibilizaci rakovinných buněk k chemoterapeutickým činidlům prostřednictvím tvorby ceramidu. Tato látka je centrální molekula v biosyntéze sfingolipidu, která je zodpovědná za zlepšení signálních událostí, které vedou k apoptóze, autofágii a zástavě buněčného cyklu. Je zřejmé, že defekty v metabolismu ceramidu přispívají k přežití nádorových buněk a k rezistenci na chemoterapii (Morad *et Cabot*, 2013). Byla provedena studie, ve které byly leukemické buňky ovlivněny sanguarinem a bylo

prokázáno, že tato reakce byla zprostředkována nadměrnou produkcí ROS, konkrétně peroxidem vodíku, což vedlo k akumulaci ceramidu, který podporuje defosforylaci AKT. Inhibice AKT signální dráhy vedla k aktivaci kaspázové kaskády a výsledkem byla apoptóza leukemických buněk. Dnes je již dobře známo, že ceramid moduluje intracelulární signální dráhy, které zvyšují citlivost lidských nádorových buněk na různé protinádorové látky (Rahman *et al.*, 2016; Galadari *et al.*, 2015).

2.2.2 Vliv na signální dráhy

Sanguinarin potlačuje PI3K signální dráhu. Tato signální dráha má zásadní roli pro proliferaci a regulaci přežití buněk. Její deregulace je spojena s řadou lidských nádorových onemocnění. Ukázalo se, že sanguinarin potlačuje fosforylaci PI3K, což vede k defosforylaci následujících částí signální kaskády, kinázy GSK-3 β a mTOR (Rahman *et al.*, 2016). Velmi účinná se ukázala současná léčba sanguinarinem a inhibitory signální dráhy PI3K, způsobující synergické apoptotické účinky prostřednictvím mitochondriální a kaspázové aktivace (Lee *et al.*, 2016).

MAP kinázy jsou serin/threoninové kinázy, které hrají zásadní roli v různých buněčných funkcích, jako je proliferace, diferenciace, motilita, apoptóza a přežití buněk. Bylo zjištěno, že deregulace a nadměrná exprese signální dráhy MAPK jsou nejčastějšími změnami nalezenými u nádorů (Burotto *et al.*, 2014). V mnoha studiích bylo prokázáno, že sanguinarin reguluje aktivitu MAPK, působí jako inhibitor MKP-1 zvýšením fosforylace ERK a JNK (Vogt *et al.*, 2005). U nádorového modelu melanomu léčeného perorálním podáním sanguinarinu (5 mg/kg denně) bylo pozorováno 50% snížení růstu nádoru, což korelovalo se snížením aktivace MAPK a AKT (De Stefano *et al.*, 2009).

2.2.3 Vliv na angiogenezi

Sanguinarin projevuje protinádorovou aktivitu prostřednictvím represe a inhibice angiogeneze, novotvorby krevních cév, kterými rakovinné buňky dostávají dostatečné množství kyslíku a živin podporující proliferaci buněk a metastatické šíření. Nejvýznamnějším angiogenním růstovým faktorem je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Inhibiční účinek sanguinarinu na tento faktor byl dokázán několika experimenty. Bylo prokázáno, že sanguinarin výrazně potlačil tvorbu tubulárního uspořádání lidských endoteliálních buněk, které byly kultivovány v médiu obsahující sanguinarin. To naznačuje, že SA je inhibítozem angiogeneze zprostředkované VEGF. V dalším experimentu byl zkoumán vliv SA na sekreci a transkripci VEGF. Na buněčné linii endoteliálních buněk SA

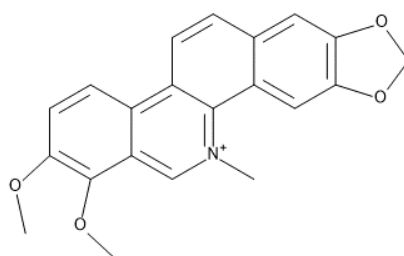
způsobil významnou inhibici sekrece VEGF závislou na dávce a čase ve všech zkoumaných koncentracích (0,25; 0,5 a 1 μM). Tvorba VEGF zde byla indukována kultivačním sérem bez živin. Kromě toho, že sanguinarin snížil sekreci VEGF, tak také byla zjištěna inhibice na úrovni transkripce VEGF v buňkách karcinomu plic A549. Zatímco u buněk, které byly vystaveny hypoxii a hladovění byla stanovena zvýšená hladina VEGF mRNA, tak u buněk kultivovaných spolu se sanguinarinem (1 μM) byla mRNA VEGF významně potlačena. V experimentech byla také zjištěna schopnost sanguinarinu inhibovat aktivitu VEGF, která je spojena s fosforylací a aktivací dobře známých modulátorů signální transdukční dráhy VEGF, včetně AKT, p38 a vaskulárního endotelového cadherinu (Basini *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2013).

2.2.4 Vliv na metastazování

Metastázy jsou hlavní příčinou úmrtnosti pacientů s rakovinou. Progrese nádorových metastáz zahrnuje řadu stádií umožňujících tvorbu a migraci sekundárních nádorů ve vzdálených orgánech od původního nádoru. Jakmile jsou nádorové buňky schopny proniknout do bazální membrány a extracelulární matrix, proces metastazování je zahájen (Martin *et al.*, 2013). Klíčovým faktorem při zahájení invaze nádorových buněk je degradace extracelulární matrix způsobena proteázami, jako například matrixové metaloproteázy (MMP). V metastatických nádorech byla zjištěna nadměrná produkce těchto proteáz a existuje několik studií, které identifikovaly zvýšení exprese MMP-2 a MMP-9 v buňkách prsního karcinomu a že tyto nadměrné hladiny vedly k migraci nádorových buněk. Právě sanguinarin inhibuje tuto migraci buněk a invazi prostřednictvím inhibice MMP-9, NF- κ B a AP-1 (Park *et al.*, 2014; Pica *et al.*, 2012). Také bylo zjištěno, že sanguinarin snižuje proliferaci nádorových buněk prostřednictvím inhibice aktivace transkripčního faktoru STAT3, který byl rovněž identifikován jako významný faktor v migraci nádorových buněk, jejich invazi a celkové progresi (Sun *et al.*, 2012).

2.3 Chelerythrin

Chelerythrin je sloučenina, která se řadí mezi kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy, jehož hlavní výskyt je ve vlašovičniku větším (*Chelidonium majus*), od něž je také odvozen název alkaloidu. V poloze 7 a 8 obsahuje methoxylové skupiny (Obr. 5), což má pravděpodobně vliv na jeho nižší cytotoxicitu a sníženou schopnost interkalovat do DNA na rozdíl od sanguinarinu (Colombo *et Bosisio*, 1996; Malíková *et al.*, 2006). Je to účinný, selektivní a buňkou propustný inhibitor proteinkinázy C. Chelerythrin také reguluje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A (VEGFA), proteinu Bcl-2 a protoonkogenu KRAS prostřednictvím blokady G-quadruplexu (Jana *et al.*, 2017).



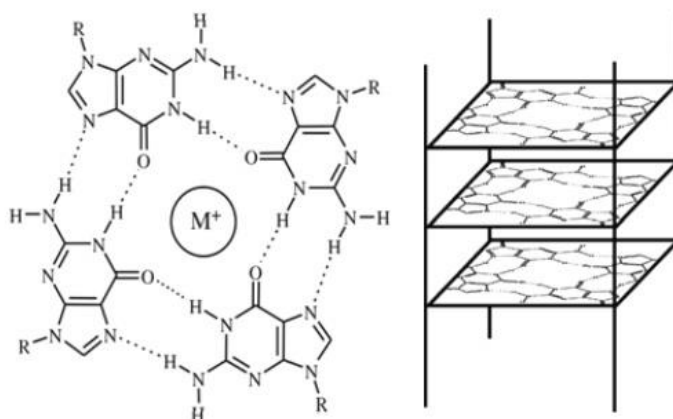
Obr. 5: Chemická struktura chelerythrinu.

2.3.1 Inhibice proteinkinázy C

Proteinkinázy C (PKC) se podílejí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace a přežití. Jedná se o serin/threoninové kinázy zahrnující alespoň 11 izoenzymů. Pro studium role inhibice PKC při indukci apoptózy byl použit houbový alkaloid staurosporin, což prvně popsal Bertrand *et al.* (1994). Aktivita PKC je důležitá pro potlačení hydrolýzy sfingomyelinu a pro následné potlačení apoptózy indukované ceramidem. Inhibice aktivity PKC vyvolává apoptózu u většiny savčích buněk v různých fázích buněčného cyklu, a proto mají inhibitory PKC velký potenciál jako protinádorová činidla. Chelerythrin působí jako kompetitivní inhibitor PKC a vykazuje selektivitu vůči izoformám A a B. Experimentálně bylo zjištěno, že chelerythrin je až 100krát selektivnější pro PKC než pro jiné kinázy, na rozdíl od již zmiňovaného staurosporinu. Účinek CHE byl testován na nádorové buněčné linii laryngeálního karcinomu SQ-20B s deficiencí p53, přičemž výsledky ukazují, že chelerythrin je cytotoxický bez ohledu na stav p53 (Chmura *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 1990).

2.3.2 Interakce s G-kvadruplexní DNA

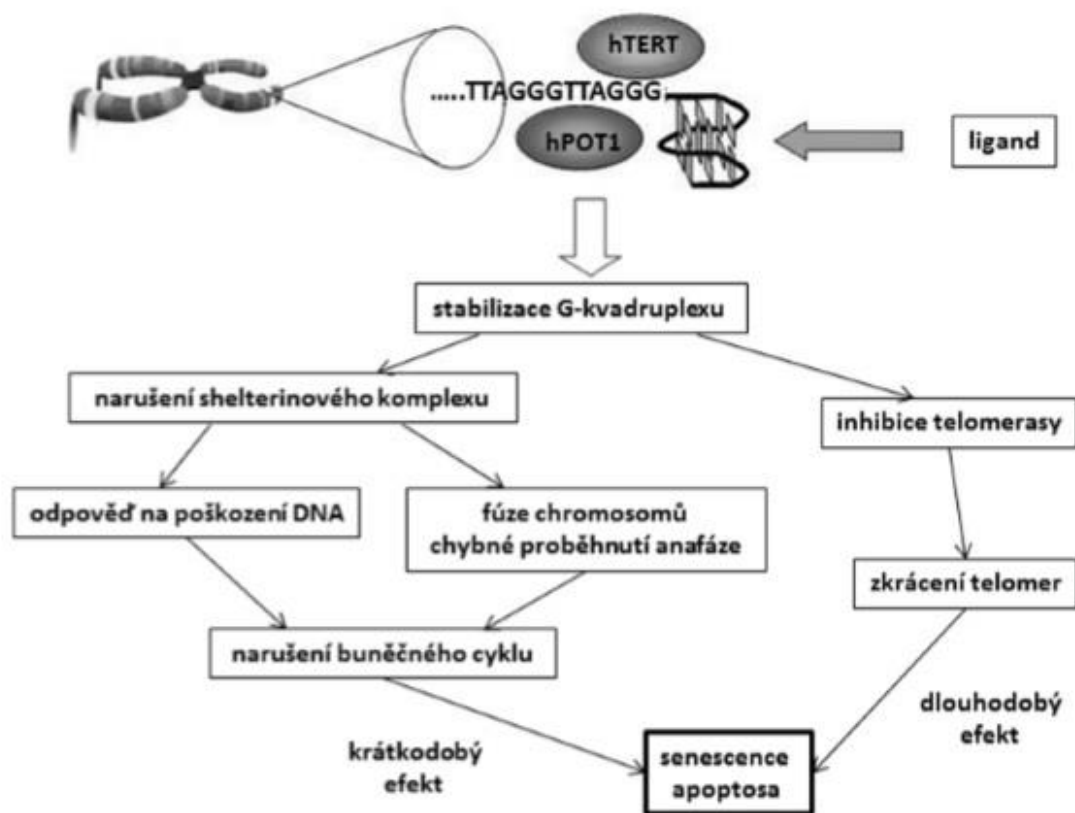
G-kvadruplexy jsou typem sekundární struktury nukleových kyselin a vyskytují se hlavně v oblastech bohatých na purinovou bázi guanin, jako jsou promotorové oblasti onkogenů nebo koncové části chromozomů. Obě tyto oblasti mají podstatný podíl na vznik a vývoj nádorových onemocnění. Spojením čtyř guaninových bází Hoogstenovým párováním vznikne struktura G-kvartetu. Uspořádáním několika G-kvartetů nad sebou vznikne G-kvadruplex. Celá struktura G-kvadruplexu je stabilizována pomocí jednomocných kationtů, nejčastěji K^+ a Na^+ (Obr. 6) (Bryan *et* Baumann, 2011; Huppert, 2008).



Obr. 6: Struktura G-kvartetu a G-kvadruplexu (převzato z Hubálková, 2015).

V oblasti telomer je hlavní funkcí vzniku G-kvadruplexní DNA ochrana genomu před ztrátou dědičné informace. Lidské telomery jsou při narození dlouhé přibližně 15-20 kbp s jednořetězcovým přesahem a s každým buněčným dělením dochází k jejich zkracování. Za fyziologických podmínek je délka telomer udržována pouze u embryonálních a kmenových buněk enzymem telomerázou. Dále je pak tento enzym funkční, ale se slabší aktivitou u buněk s vysokou schopností růstu a regenerace – bazální buňky epidermis, hematopoetické a endoteliální buňky, epiteliální buňky střevní sliznice a buňky vlasových folikulů (Gomez *et al.*, 2012). Naopak je tomu u většiny nádorových buněk, kdy je aktivita telomerázy patologicky zvýšena, což umožňuje jejich neomezené dělení. Z tohoto důvodu mají nádorové buňky obvykle velmi krátké telomery (2-5 kbp) (Hiyama *et* Hiyama, 2003). G-kvadruplexové ligandy by tak měly selektivně působit pouze na nádorové buňky, a to prostřednictvím zablokování interakce enzymu telomerázy s koncovou částí telomer (Bryan *et* Baumann, 2011; Huppert, 2008). Pokud je telomerický jednořetězcový přesah stočen do G-kvadruplexu, hTR podjednotka enzymu se nemůže navázat, čímž je zablokován první krok prodlužování telomer a s každým buněčným dělením dochází k jejich zkracování.

Protože délka telomer je u nádorových buněk ve srovnání s normálními nenádorovými buňkami výrazně kratší, docházelo by tak u nich k rychlejšímu zániku bez negativního ovlivnění normálních nenádorových buněk (Gomez *et al.*, 2012; Shay *et Wright*, 2001).



Obr. 7: Sled předpokládaných událostí po stabilizaci G-kvadruplexu ligandem (převzato z Hubálková, 2015).

Přestože uvedený předpokládaný mechanismus působení vyžaduje dlouhodobou terapii, bylo zjištěno, že efekt některých ligandů je pozorovatelný v mnohem kratší době, což je z terapeutického hlediska mnohem zajímavější. Principem tohoto efektu je, že stabilizací telomerického G-kvadruplexu vazbou ligandu dojde k narušení obvyklé struktury telomer a shelterinového komplexu, čímž dojde ke spuštění odpovědi na poškození DNA a tvorbě dvouřetězcových zlomů, chybnému proběhnutí anafáze, k senescenci a k indukci apoptózy. Při tomto krátkodobém efektu nedochází k výraznému zkrácení telomer a projevuje se v průměru za 5-10 dní (Gunaratnam *et al.*, 2007; Neidle, 2016). Právě u chelerythrinu byl zjištěn inhibiční účinek pro telomerázu, vlivem jeho vazby na telomerní DNA sekvenci, kde dochází ke stabilizaci G-kvadruplexu (Ghosh *et al.*, 2015). Ligandem indukovaná stabilizace v tomto případě vede k poškození DNA, což následně iniciuje kaskádu odpovědí se změnou regulací p21, p53 a PARP. Odpověď na poškození DNA je

také charakterizována stárnutím buněk a výskytem fosforylovaného histonu H2AX, což je často patrné již po 24 hodinách po ovlivnění daného ligandu (Rodriguez *et al.*, 2008).

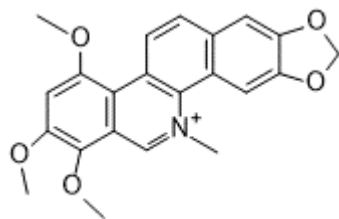
Velmi výhodné se jeví i jejich použití v kombinaci s běžně používanými chemoterapeutiky (paclitaxel, imatinib), kdy dochází k synergickému působení a touto kombinací bylo dosaženo lepších výsledků při léčbě nádorových onemocnění než při použití samotného chemoterapeutika (Gowan *et al.*, 2002; Phatak *et al.*, 2007).

Jak již bylo zmíněno, G-kvadruplexní DNA se nachází i v promotorových oblastech některých protoonkogenů, jako jsou c-MYC, c-KIT, KRAS, Bcl-2, VEGFA, kde regulují genovou expresi. Tato G-kvadruplexní struktura v promotorových oblastech blokuje vazbu represorového proteinu a funguje tak jako aktivátor transkripce, což je činí atraktivním cílem protirakovinného léčiva. Již dříve bylo uvedeno, že chelerythrin je rozpoznáván lidskou telomerní DNA a promotorovou oblastí genu c-KIT (Cui, Lin *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2014). Avšak poměrně nedávno bylo zjištěno, že chelerythrin reguluje expresi také dalších genů – Bcl-2, VEGFA a KRAS a dokonce, že jeho vazebná afinita ke G-kvadruplexovým promotorovým sekvencím je vyšší než v případě jeho vazby s kvadruplexní telomerickou DNA. Studie byla provedena na buněčné linii MCF-7 odvozené od prsního adenokarcinomu, přičemž výsledky dokazují, že chelerythrin v nanomolární koncentraci významně snižuje úroveň transkriptu uvedených tří genů po 24 hodinovém působení (Jana *et al.*, 2017).

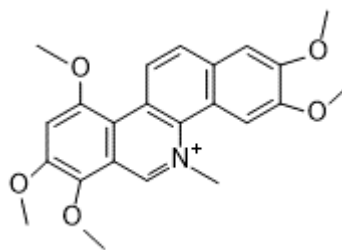
2.4 Další benzo[c]fenanthridinové alkaloidy

Dalšími vzácnějšími benzo[c]fenanthridinovými alkaloidy vyskytujícími se v rostlinách spolu s chelerythrinem a sanguinarinem jsou chelirubin, cheliluthin, sanguirubin, sanguiluthin, makarpin, nitidin a fagaronin. Všechny tyto alkaloidy jsou výrazně zbarvené, od žluté barva až po tmavě červenou (Dostál *et al.*, 2000; Slaninová *et al.*, 2014).

První dvojicí přírodních látek, které se řadí mezi pentasubstituované alkaloidy jsou cheliluthin a sanguiluthin.



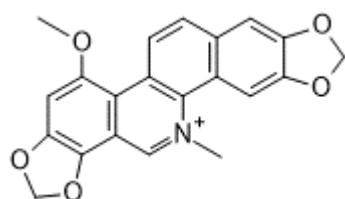
Obr. 8: Struktura cheliluthinu



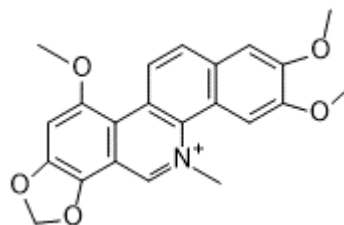
Obr. 9: Struktura sanguiluthinu

Ve struktuře se od sebe liší v poloze 2 a 3. Cheliluthin obsahuje v této poloze methyendioxydovou skupinu, kdežto u sanguiluthinu jsou v obou polohách přítomné dvě methoxylové skupiny. Udává se, že právě ty jsou odpovědné za cytotoxicitu alkaloidů. To dokládají i výsledky testování cytotoxicity u těchto dvou alkaloidů, kde bylo zjištěno, že sanguiluthin vykazoval vyšší cytotoxicitu u všech typů buněk užitých během testování (Dostál *et Slavík*, 2000; Slunská *et al.*, 2010).

Do skupiny pentasubstituovaných alkaloidů se řadí také další dvojice, jimiž jsou chelirubin a sanguirubin. Strukturální rozdíl mezi nimi je opět v poloze 2 a 3, kde sanguirubin obsahuje methoxylové skupiny, a proto je označován za více toxický než chelirubin. Ten má ve své struktuře v poloze 2 a 3 methyendioxydovou skupinu (Dostál *et Slavík*, 2000; Slaninová *et al.*, 2014).

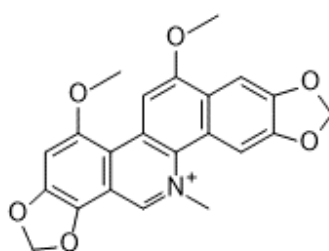


Obr. 10: Struktura chelirubinu



Obr. 11: Struktura sanguirubinu

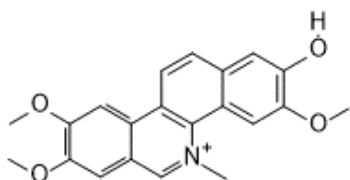
Makarpin patří do skupiny hexasubstituovaných benzo[c]fenanthridinových alkaloidů, který má jako jediný z těchto uvedených alkaloidů v poloze 12 substituovanou methoxylovou skupinu (Dostál *et Slavík*, 2000).



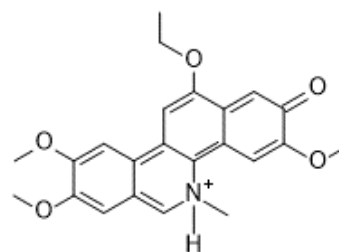
Obr. 12: Struktura makarpinu

Nitidin a fagaronin jsou tetrasubstituované deriváty, které mají stejně jako chelerythrin a sanguinarin substituenty v poloze 2 a 3, ale další substituenty se nenachází v poloze 7 a 8, ale v poloze 8 a 9. Oba byly charakterizovány jako inhibitory topoizomerázy I, přičemž tato aktivita byla zaznamenána již při koncentraci 0,15-0,3 μM (Wang, Hecht *et Johnson*, 1993).

První zmínka o fagaroninu je z roku 1972, kdy byl tento alkaloid izolován z rostliny *Fagara zanthoxyloides*, od níž také pochází název alkaloidu (Messmer *et al.*, 1972). Byla u něj zjištěna antiplasmodiální aktivita vůči kmeni *Plasmodium falciparum*, proto probíhá in vivo testování na vyhodnocení jeho potenciálu jako antimalarika (Kassim *et al.*, 2005; Rivaud *et al.*, 2012). Několik studií sice potvrzuje jeho protinádorovou a antileukemickou vlastnost, ale jeho použití v praxi je omezeno vzhledem k úzkému terapeutickému oknu pro toto použití. Poměrně nedávno byl syntetizován ethoxyfagaronin, syntetický derivát fagaroninu, který vykazuje vyšší vazebnou afinitu k DNA a je méně toxický. Na základě preklinických zkoušek byla u něj potvrzena antiangiogenní aktivita. Jeho cílem je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), což je nejúčinnější induktor angiogeneze. Zabraňuje tak tvorbě cév závislé na VEGF a také potlačuje fosforylaci vaskulárního endoteliálního růstového receptoru (VEGFR) (Lynch *et al.*, 2001; Ouchani *et al.*, 2015).

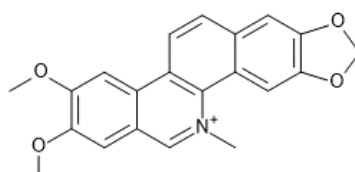


Obr. 13: Struktura fagaroninu



Obr. 14: Struktura 12-ethoxyfagaroninu

Nitidin je přírodní látka izolovaná z rostliny *Zanthoxylum nitidum*, u níž jsou prokázány antifungální, antioxidační a protizánětlivé účinky, a dokonce vykazuje i účinek proti viru HIV, jelikož je schopen inhibovat HIV reverzní transkriptázu (Del Poeta *et al.*, 1999; Matthee, Wright *et* König, 1999). V poslední době nitidin přilákal značnou pozornost díky jeho chemoterapeutickému potenciálu, prokázanému na několika typech rakovinných buněk (Chen *et al.*, 2012; Ou *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2014). Jeho cílem je proteinkináza ERK (extracellular signal-regulated kinase), která spolu s proteiny Raf a MEK tvoří signální dráhu regulující široké spektrum biologických dějů jako je proliferace, diferenciace, buněčný pohyb, adheze a apoptóza (Balmanno *et* Cook, 2009).



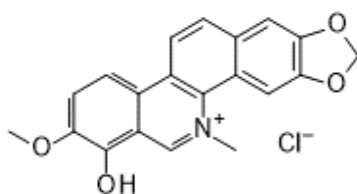
Obr. 15: Chemická struktura nitidinu

2.5 Syntetické deriváty

Vzhledem k zajímavým účinkům přírodních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů jsou tyto sloučeniny také předmětem chemických modifikací. Jejich smyslem je jednak pochopení mechanismu účinku, jednak snaha o vyvinutí derivátů s vyšší účinností, selektivitou a s výhodnějšími farmakologickými vlastnostmi.

2.5.1 NK109

Jedná se syntetický benzo[c]fenanthridinový derivát, který byl poprvé připraven a testován v roce 1993 (Kabasawa *et al.*, 1993). Bylo zjištěno, že inhibuje aktivitu DNA topoizomerázy II. To je enzym, který umožňuje měnit tzv. terciární strukturu DNA pomocí navození přechodných zlomů na obou vláknech. DNA topoizomerázy jsou v buňkách nezbytné k zajištění replikace, transkripce, ale i segregace či kondenzace chromozomů, právě proto představují cílovou molekulu pro řadu cytostatik, tzv. topoII inhibitorů. Jejich působením dochází k zablokování vazby rozštěpených konců DNA a tyto změny vedou k závažnému poškození DNA, což má obvykle pro buňku letální účinek (Hurley, 2002; Hande, 2008). NK109 inhibicí DNA topoizomerázy II zastavuje růst humánních rakovinných buněčných linií s IC_{50} 0,2 μ M (Kabasawa *et al.*, 1993). Na základě těchto velmi slibných výsledků byla v Japonsku provedena klinická studie, jejímž výsledkem bylo zjištění, že tato látka je snadno metabolizována *in vivo* a hlavní metabolit je neaktivní (Guo *et al.*, 2007).

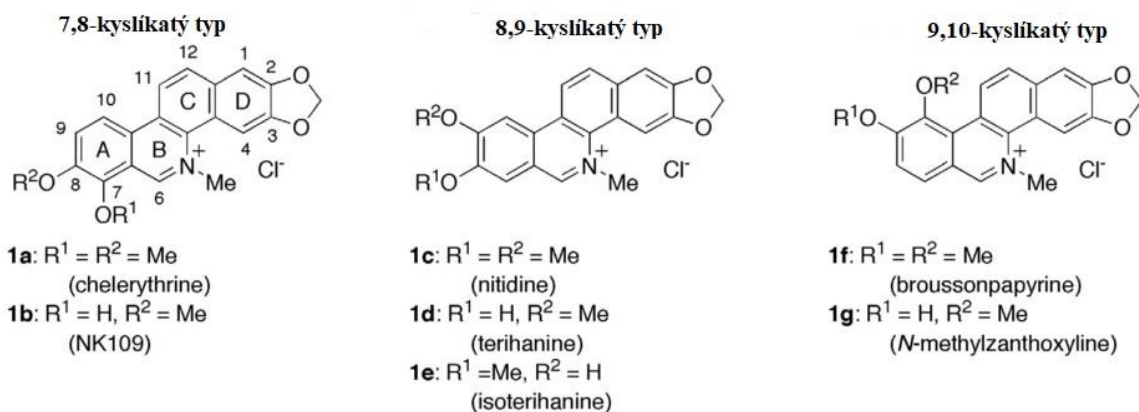


Obr. 16: Chemická struktura NK109

Za účelem zlepšení metabolické stability byly syntetizovány deriváty NK109, u kterých byla snaha najít vhodnou substituci s vlastnostmi rezistentními vůči redukci. Protože přítomnost hydroxy skupiny v poloze 7 je u benzo[c]fenanthridinových alkaloidů nezbytná pro protinádorovou aktivitu, tak byly připraveny deriváty s modifikací 5-CH₃, 6-H a 8-OCH₃. Bylo zjištěno, že míra redukce je u 5-substituovaných derivátů vyšší než v případě NK109 a u derivátů se substitucí v poloze 6 nebyly pozorovány velké změny. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u 8-O-substituentů, jež částečně přispívají k rezistenci na biologickou redukci (Nakanishi *et al.*, 2000).

Dále byly připraveny deriváty se substituenty na 8, 9-dimethoxy a 2-methoxy, u nichž se ukázalo, že tato substituce je nezbytná pro zvýšení inhibiční aktivity na topoizomerázu II, a tím jejich silnějším protinádorovým účinkům (Thai *et al.*, 2012).

V další studii byly porovnávány účinky tří typů derivátů: 7, 8-, 8, 9- a 9, 10-kyslíkatých benzo[*c*]fenanthridinových alkaloidů na buněčné linii HCT-116 a HL-60.



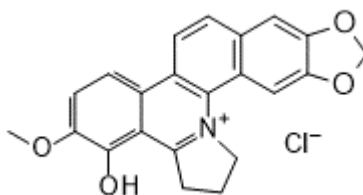
Obr. 17: Možné strukturní obměny *O*₄-benzo[*c*]fenanthridinových alkaloidů (upraveno podle Hatae *et al.*, 2015).

Nejsilnější antiproliferační aktivita byla zjištěna u 7, 8- kyslíkatých benzo[*c*]fenanthridinových derivátů. Výsledky také dále naznačují, že konverze dimethoxy skupiny na hydroxylovou skupinu by mohla ovlivnit antiproliferační aktivitu těchto látek. Stejně tak pozice substituované hydroxylové skupiny má významný vliv na aktivitu. Jako neúčinnější se jevíly látky NK109 a isoterihanine (Hatae *et al.*, 2015).

2.5.2 NK314

Jelikož se u syntetického derivátu NK109 ukázalo, že *in vivo* dochází k jeho redukci na inaktivní metabolit, byla syntetizována další látka s označením NK314. Zavedením trimethylenové skupiny na N₅-C₆ (obr. 17) se předpokládalo překonání této metabolické eliminace. Látka NK314 prokázala silnou protinádorovou aktivitu u rakoviny žaludku, tlustého stěva, plic a pankreatu (Okamoto *et al.*, 2005). Jedná se také o inhibitor topoizomerázy II. Vzhledem k vývoji rezistence vůči inhibitorům topoizomerázy, která je často v klinickém použití pozorována, byl požadován nový typ účinného inhibitoru. Látka NK314 má velmi slibnou budoucnost, protože nejen že byla potvrzena silná protinádorová aktivita, ale navíc byl i popsán účinek na tumory rezistentní vůči jiným inhibitorům topoizomerázy II. V Japonsku nyní probíhají další klinická studie (Onda *et al.*, 2008).

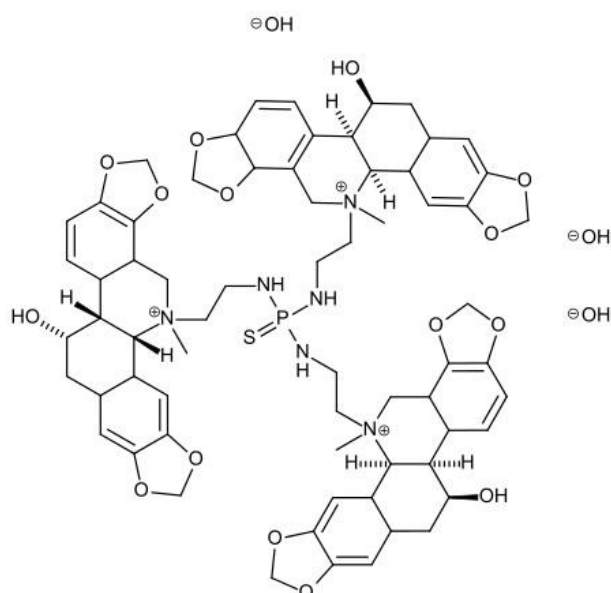
Velmi pozitivního výsledku bylo také dosaženo při testování NK314 na růst různých buněčných liniích odvozených od T-buněčné leukémie dospělých (ALT) (Hisatomi *et al.*, 2011). Jedná se o agresivní nevyhládivitelné onemocnění, které je způsobeno lidským T-lymfotropickým virem typu 1 (HTLV-1). Je to endemický retrovirus vyskytující se převážně v jižním Japonsku a několika dalších zemích (Hinuma *et al.*, 1981; Matsuoka *et Jeang*, 2007). V současné době na toto onemocnění neexistuje léčba a střední doba přežití je pouze 13 měsíců, avšak výsledky různých klinických studií používající kombinovanou chemoterapii vedou ke zlepšení doby přežití u pacientů s agresivním ATL (Tsukasaka *et al.*, 2007). Při testování NK314 na buněčných liniích ALT bylo zjištěno, že vedle indukce dvouřetězcových zlomů DNA inhibicí topoizomerázy II, způsobuje NK314 indukovanou degradaci katalytické podjednotky protein kinázy závislé na DNA (DNA-PK) (Hisatomi *et al.*, 2011). Protein kináza závislá na DNA (DNA-PK) hraje důležitou úlohu při opravě poškozené DNA a kromě katalytické podjednotky má také regulační podjednotku dimer proteinů Ku70 a Ku80 (Muller, Calsou *et Salles*, 2000).



Obr. 18: Chemická struktura NK314.

2.5.3 Preparát Ukrain™

Ukrain™ (celandin) je preparát obsahující polosyntetickou sloučeninu odvozenou od benzo[c]fenanthridinového alkaloidu chelidoninu, který je obsažen v rostlině *Chelidonium majus*. V roce 1983 byl na mezinárodním kongresu chemoterapie ve Vídni představen jako nadějný kandidát pro léčbu rakoviny. Údajně se jedná o konjugát kyseliny thiofosforečné se třemi molekulami chelidoninu (Obr. 19). V několika státech bývalého Sovětského svazu má povolení ke klinickému používání (Nowicky, 1983; Ernst *et Schmidt*, 2005). Pod kódovým označením NSC-631570 prošel nezávislým testováním na 60 nádorových buněčných liniích v National Cancer Institute. Jeho mechanismus účinku není objasněn, některé studie mu přisuzují selektivní působení na inhibici růstu pouze vůči buňkám nádoru, bez ovlivnění normálních zdravých buněk (Ernst *et Schmidt*, 2005).



Obr. 19: Chemická struktura sloučeniny údajně obsažená v přípravku Ukrain™

Selektivní působení vysvětlují na základě odlišného náboje na povrchu nádorových buněk. Za klidových podmínek je uvnitř buněk záporný náboj a vně buňky kladný náboj, což je dáno odlišnou koncentrací iontů v intracelulárním a extracelulárním prostředí buňky. Avšak téměř u všech metabolicky aktivních rakovinných buněk je známo, že vylučují velké množství laktátu. Tento jev je důsledkem zvýšené glykolýzy, a tím nádorová buňka získává na povrchu negativní náboj (Chen *et al.*, 2016). Během výroby preparátu Ukrain™ se jeho účinná struktura stává pozitivně nabitá, čímž vysvětlují jeho vysokou afinitu k rakovinným buňkám (Hohenwarter *et al.*, 1992). Mechanismus jeho účinku je popisován inhibicí polymerace mikrotubulů a následnou změnou jejich dynamiky v procesu dělení buňky či indukci apoptózy skrz ovlivnění mitochondriálního membránového potenciálu, což je doprovázeno aktivací kaspáz (Habermehl *et al.*, 2006).

Dalším navrhovaným mechanismem působení této látky je inhibice tvorby nových cév zásobujících nádor. Inhibice angiogeneze také brání tvorbě metastáz (Uglicanica *et al.*, 1996). Dle autorů má tento přípravek také schopnost povzbudit imunitní systém, kdy v některých imunitních cílových efektorových systémech významně zesílil maligní toxicitu makrofágů, lymfocytů a NK buněk a stimuloval zrání dendritických buněk *in vitro* (Nowicky *et al.*, 1992; Mozhenok *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2008). To, že by se mělo jednat o velmi nadějnou látku je dle autorů také dáno tím, že její terapeutický index byl vypočten na 1250, což je neobvykle vysoké pro protirakovinový přípravek. Terapeutický index konvenčních cytostatických přípravků je v rozmezí 1,4-1,8. Autoři studie uvádějí, že neexistuje riziko předávkování díky jeho velmi vysokému terapeutickému indexu (Sotomayor *et al.*, 1992).

Některými autory jsou výše uvedené účinky této látky zpochybňovány, jako v případě studie Panzer *et al.* (2000a). Cílem této studie bylo zjistit mechanismus působení přípravku Ukrain a potvrdit jeho selektivní toxicitu vůči maligním buňkám zkoumáním jeho účinků na růst, průběh buněčného cyklu a morfologii na dvou maligních, dvou transformovaných a dvou normálních buněčných liniích. Také byly porovnávány jeho účinky s benzo[c]fenanthridinovým alkaloidem chelidoninem, od něhož je obsahová látka UkrainTM odvozena. V experimentu, kdy byl kterýkoliv ze šesti buněčných typů ovlivněn 50 mg/ml preparátu UkrainTM po dobu 48 nebo 120 hodin, došlo k signifikantní inhibici růstu. Ve všech buněčných liniích UkrainTM způsobil akumulaci buněk ve fázi G2/M, a v buňkách působil neselektivně na inhibici polymerizace tubulinu. Dále bylo zjištěno, že účinky tohoto přípravku jsou velmi podobné účinkům chelidoninu, který vykazuje neselektivní cytotoxické působení (Panzer *et al.*, 2000a). Z těchto důvodů byl preparát podroben metodám HPLC a LC-MS, v nichž bylo potvrzeno, že preparát UkrainTM neobsahuje nic jiného, než směs alkaloidů z rostliny *Chelidonium majus* a žádná trimerní struktura chelidoninu zde prokázána nebyla a dříve popisované účinky jsou způsobeny směsí alkaloidů obsažených ve vlašovičnicku (Panzer *et al.*, 2000b).

Dnes už je zcela zřejmé, že se jednalo o podvod, neboť pan Nowicky byl v květnu 2016 Nejvyšším vídeňským soudem odsouzen k tříletému vězení za šíření zakázaných léků a podvodnictví s výrobními značkami. Je zaznamenáno mnoho případů, kdy Nowicky prodával načerno tento neschválený přípravek po celé Evropě, čímž si přišel zhruba na 1,1 milionu eur (<https://ac24.cz/-/zpravy-ze-sveta/10266-lek-rakovina-vezeni>). Paradoxem je, že v roce 2004 byl za tento „objev“ nominován na Nobelovu cenu za chemii (<http://www.ukrin.com/docs/lettertonobel.pdf>).

2.6 Fenanthridinová analoga benzo[c]fenanthridinových alkaloidů

Sanguinarin a chelerythrin jsou poměrně dobře prostudované sloučeniny, které vykazují širokou škálu biologických účinků. V předchozích kapitolách byly popsány výsledky modifikací jejich struktury, které se však obvykle týkaly substitucí. Pokusů modifikovat heterocyklickou kostru benzo[c]fenanthridinů je výrazně méně, většina z těchto studií popisuje syntézu různých izomerních a aza analogických struktur (Yu *et al.*, 2003; Yapi *et al.*, 2010; Steinhauer *et al.*, 2016), s výjimkou benzo[h]chinolonů, které jsou strukturně příbuzné benzo[c]fenanthridinům, ale postrádají D kruh (Janin *et Bisagni*, 1993). Proto byly nedávno připraveny fenanthridiny příbuzné benzo[c]fenanthridinům, které nemají benzenový kruh A. Způsoby jejich přípravy založené na analogických způsobech přípravy

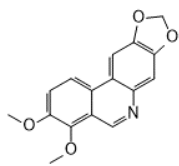
fenanthridinových alkaloidů jsou připravovány k publikaci (Lasák *et al.*, v recenzním řízení). Testovaná série obsahuje deriváty, které se liší v přítomnosti hydroxy, methoxy a benzyloxy skupiny v poloze 7, methyendioxy můstky v poloze 2,3- nebo 3,4-, ale všechny sloučeniny obsahují 8-methoxy skupinu. Deriváty byly připraveny buď jako volné báze, nebo ve formě protonovaných solí, tudíž v některých sloučeninách je heterocyklický dusík dostupný v kvarterní formě s methylovou substitucí. Taková variabilita umožnila vytvořit předběžné vztahy struktury a aktivity pro antiproliferační aktivitu a porovnat nově syntetizované fenanthridiny se známými benzo[c]fenanthridiny.

Tab. 1: Testované látky a jejich cytotoxicita na buněčné linii MCF-7

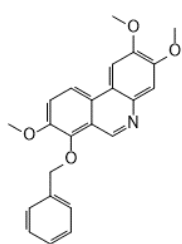
TESTOVANÉ LÁTKY	IC ₅₀ [μM]
5667	5,1
5669	11,4
5672	1,7
5673	10,7
5678	2,5
5681	12,9
5685	16,4
5686	20,1
5690	17,3
5691	23,7
5692	11,9
5693	9,2
5695	2,3
5696	4,5
5701	17,1
5703	27,3
5705	15,9
5706	10,3
5707	45,9
5814	1,37
5898	7,7
5899	4,3
6385	8,7
6386	5,2
6389	21,3
NK109	4,6
SA	2
CHE	5,9

2.6.1 Struktury studovaných látek

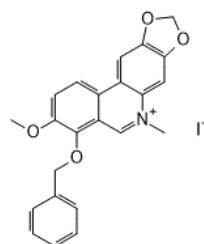
5667



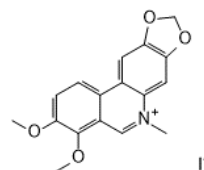
5669



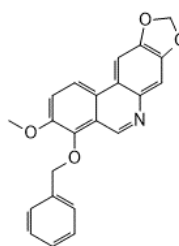
5672



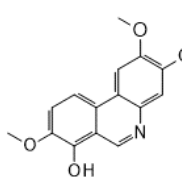
5673



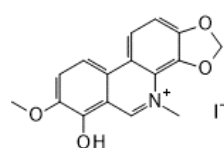
5678



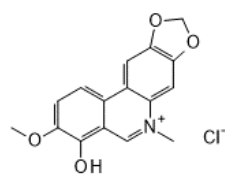
5681



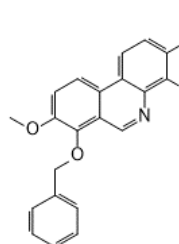
5685



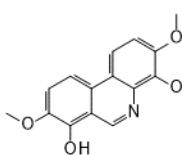
5686



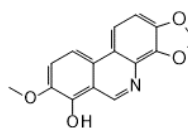
5690



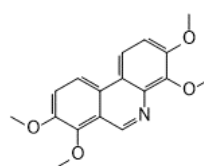
5691



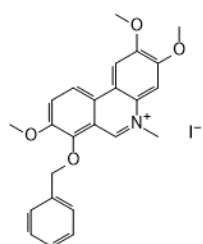
5692



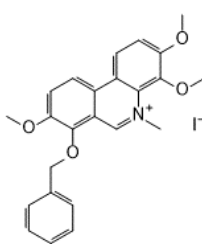
5693



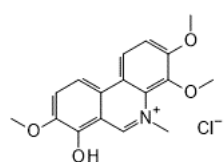
5695



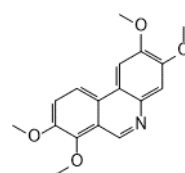
5696



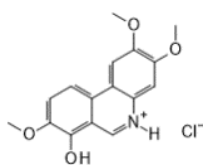
5701



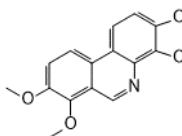
5703



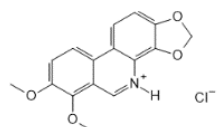
5705



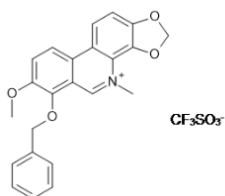
5706



5707

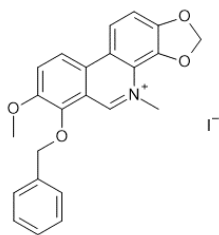


5814

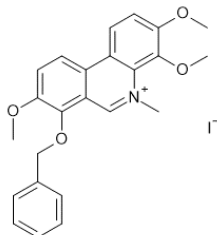


Obr. 20: Struktury studovaných fenanthridinových látek

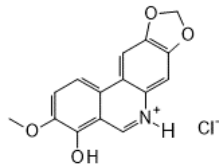
5898



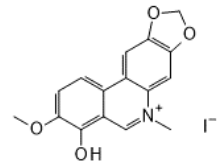
5899



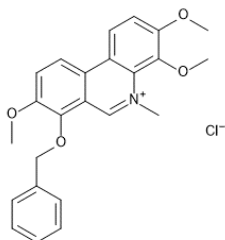
6385



6386



6389



Obr. 20-pokračování

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Přístroje a vybavení

Během zpracování experimentální části diplomové práce byly použity následující přístroje: flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), CO₂ inkubátor (Sanyo), mikroskop Nikon TMS (Nikon), centrifuga BR4i (Jouan), vodní lázeň, ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Schimadzu), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm), průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC – MPL (Beckman Coulter), fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystem).

3.2 Použité chemikálie

V experimentální části byly použity následující chemikálie: ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), trypsin, kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), dimethylsulfoxid (DMSO), penicilin, streptomycin, glutamin, aprotinin, leupeptin, dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fluorid sodný, Nonidet P-40, akrylamid, tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton X-100, 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), propidium jodid, 4-methyl-umbelliferyl β -D-galaktosid (MUG), acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC) od firmy Sigma Aldrich; hovězí sérový albumin (BSA) od firmy Invitrogen; Tween 20, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) od firmy MP Biomedicals; chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid od firmy Thermo Scientific; 2-merkapt ethanol a Ponceau S od firmy Serva; chlorid sodný, dodecylsírán sodný (SDS) a glycerol od firmy Lach-Ner; dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, ethanol, chlorid draselný a chlorid sodný od firmy Penta; dihydrogenfosforečnan draselný od firmy Chemapol; formaldehyd od firmy MP Biomedicals.

3.3 Použité roztoky

Při experimentech bylo pracováno s následujícími roztoky:

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4 – 7,5);

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8);

RIPA pufr: 20 mM TRIS (pH = 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin;

Činidlo Bradforda: 0,01% Coomassie Brilliant Blue, 95% ethanol, 85% kyselina fosforečná;
5× SDS vzorkový pufr: 0,3 M TRIS (pH = 6,8), 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, 5% 2-merkaptoethanol;

Elektroforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS;

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin;

Blokovací roztok: 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20;

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové;

Reakční pufr pro fluorimetrické stanovení aktivity kaspázy 3/7: 25 mM PIPES/KOH (pH = 7,3), 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, před použitím přidán: 5 mM DTT, 100 mM PMSF;

Promývací roztoky pro cytometrické techniky: 1% BSA v PBS, 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20, 0,5% BSA v PBS a 2 M HCl s 0,5% Triton X-100.

3.4 Použité protilátky

V experimentální části diplomové práce byly použity specifické monoklonální protilátky od firmy Cell Signalling (PCNA, p53, p21, γH2Ax) a protilátka od firmy Santa Cruz Biotechnology (PARP). Při western blottingu byly primární protilátky vizualizovány pomocí sekundárních protilátek značených kořenovou peroxidázou RAM/Px (rabbit anti-mouse) a SwAR/Px (swine anti-rabbit) od firmy Sigma Aldrich. Při cytometrických analýzách byla použita protilátka anti-BrdU značená fluorescenční látkou FITC (fluorescein izothiokyanát) od firmy Roche.

3.5 Použité buněčné linie

Pro experimenty byly použity adherentní nádorová buněčná linie MCF-7 odvozená od lidského prsního adenokarcinomu a suspenzní buněčná linie K562 odvozená od lidské myeloidní leukémie. Pro stanovení aktivace transkripce p53 byla použita melanomová linie ARN8 se stabilně transfekovaným reporterovým konstruktem s p53-responzivním elementem.

Buněčné linie byly kultivovány na Petriho miskách v živném médiu DMEM s obsahem fetálního telecího séra (10 %), penicilinu (0,1 mg/ml), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml) v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého.

3.6 Studované sloučeniny

V experimentální části diplomové práce byly studovány biologické účinky několika vybraných substituovaných derivátů kvarterních benzo[c]phenanthridinových alkaloidů chelerythrinu a sanguinarinu. Sloučeniny byly připraveny docentem Jakubem Stýskalou z Katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Struktury byly potvrzeny analýzami hmotovou spektrometrií, nukleární magnetickou rezonancí a elementární analýzou. Čistota studovaných sloučenin byla min. 99 %. Sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a připraveny zásobní roztoky o koncentraci 100 mM. Tyto zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě 4 °C a ředěny těsně před použitím do kultivačního média tak, aby koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 0,1 %.

3.7 SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce

Buněčná linie MCF-7 byla kultivována na Petriho miskách při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly vysazeny v počtu 1,5 milionu na 1 Petriho misku, poté následovala 24 hodinová inkubace, aby došlo k adhezi buněk ke dnu kultivační nádoby. Po inkubaci bylo v Petriho miskách vyměněno médium za médium, které obsahovalo naředěné testované látky v požadované koncentraci (2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM). Toto médium bylo ponecháno na miskách 24 hodin. Poté byly buňky připraveny na sklizení. Jako kontrola byly použity buňky, ke kterým bylo přidáno médium s odpovídajícím množstvím DMSO.

Buňky byly sklizeny pomocí škrabky, kterou byly uvolněny ode dna kultivační nádoby a přeneseny do zkumavky. Zkumavky obsahující buňky byly centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a teplotě 4°C a 2x promyty roztokem PBS. Po druhém promytí byly buňky přeneseny do 1,5 ml mikrozkuvek, centrifugovány a po odstranění supernatantu byly buněčné pelety uskladněny při -80 °C.

Poté byly pelety resuspendovány v daném množství lyzačního pufru RIPA dle velikosti peletu. Buňky byly lyzovány 15 minut na ledu a poté sonifikovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (3 cykly, 10 sekund, 40 % max.). Vzorky byly centrifugovány po dobu 25 minut při 14000 g a teplotě 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do mikrozkuvek a metodou podle Bradfordové byla stanovena koncentrace proteinů v lyzátu. Koncentrace ve všech vzorcích byla upravena dle nejnižší naměřené koncentrace pomocí RIPA pufru a byl přidán vzorkovací pufr pro elektroforézu. Nakonec byly lyzáty denaturovány 5 minut při teplotě 95 °C a uskladněny v mrazáku při teplotě -20 °C.

Proteiny byly separovány diskontinuální elektroforézou v 10% a 15% polyakrylamidovém gelu v kombinaci se zaostřovacím 5% gelem. Separace proteinů probíhala při napětí 80 V po dobu asi 30 minut a jakmile proteiny dosáhly dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po elektroforetické separaci byly proteiny přeneseny z gelu na nitrocelulóзовou membránu metodou western blottingu. Membrána s přenesenými proteiny byla nařezána podle známé hmotnosti analyzovaných proteinů. Poté byly nařezané membrány blokovány po dobu 1 hodiny v 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20, čímž bylo zabráněno vzniku nespecifických vazeb. Pro imunodetekci proteinů byly na membrány nanесeny specifické primární protilátky, inkubace probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Před nanесením sekundárních protilátek byly membrány promyty roztokem TBS a roztokem TBS s 0,1% Tween 20. Inkubace sekundární protilátkou probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté následovalo druhé promytí v roztoku TBS a v roztoku TBS s 0,1% Tween 20. Pro vizualizaci proteinů bylo nutné nanесení roztoku luminolu a peroxidu v poměru 1:1. Signál byl detekován pomocí CCD kamery LAS4000.

3.8 Průtoková cytometrie

Pro studium buněčného cyklu metodou průtokového cytometru byla buněčná linie MCF-7 kultivována na Petriho miskách při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly vysazeny v počtu 500 tisíc na jednu Petriho misku a následovala 24 hodinová inkubace. Poté bylo buňkám vyměněno médium za médium obsahující testované látky v požadovaných koncentracích (1x IC₅₀, 3x IC₅₀). Po 24 hodinách byly buňky sklizeny trypsinizací. Kultivační médium bylo přeneseno do zkumavek, buňky byly opláchnuty roztokem EGTA, který byl poté také přenesen do zkumavek. Do Petriho misek byl napipetován trypsin, který byl ponechán 5 minut při 37 °C. Jeho působením došlo k odlepení buněk ode dna misky. Proteolytický účinek trypsinu byl zastaven přidáním kultivačního média DMEM a celý obsah byl opět přidán do zkumavek. Zkumavky obsahující buňky byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C. Kultivační médium bylo odsáto a buněčný pelet byl propláchnut 1 ml PBS. Následovala další centrifugace za stejných podmínek a odsátí PBS. Poté bylo k buněčnému peletu přidáno 100 µl PBS a 1 ml 70% ethanolu, který byl přidáván po kapkách za mírného vortexování, čímž došlo k zafixování buněk. Minimální doba fixace byla 30 minut na ledu.

Po fixaci byly buňky centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C, supernatant byl odsát a buňky byly promyty 0,5% BSA v PBS s 0,1% Tween 20. Následně byly buňky resuspendovány v PBS obsahující propidium jodid (10 µg/ml) a po půlhodinové inkubaci ve tmě při pokojové teplotě byly analyzovány průtokovým cytometrem.

Pro měření buněčné syntézy DNA, byl k buňkám hodinu před ukončením inkubace s testovanou látkou přidán 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridin, který je do DNA inkorporován místo thymidinu. Buňky byly poté sklizeny a zafixovány 70% ethanolem. Po fixaci byly buňky centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C a poté promyty 1% BSA v PBS s 0,1 % Tween 20. Následovala 30 minutová inkubace za pokojové teploty 2 M HCl s 0,5% tritonem X-100, po které byly buňky promyty 0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (pH = 8,5) a 1% BSA v PBS s 0,5% Tween 20. Inkubace buněk s protilátkou anti-BrdU-FITC trvala 1 hodinu při pokojové teplotě ve tmě, po níž byly buňky promyty 1% BSA v PBS s 0,5% Tween 20. Následovala centrifugace, buněčný pelet byl resuspendován v PBS obsahující propidium jodid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a po půlhodinové inkubaci při pokojové teplotě ve tmě byly buňky analyzovány průtokovým cytometrem.

3.9 Aktivace p53

Transkripční aktivita proteinu p53 u látek 5898 a NK109 byla testována v buněčné linii ARN8, která nese stabilně integrovaný reporterový gen pro β -galaktosidázu kontrolovaný promotorem p53. Transkripční aktivita p53 odpovídala indukci exprese β -galaktosidáze. Buňky byly vysazeny do mikrotitrační destičky v počtu 13 tisíc na jednu jamku. Po 24 hodinové inkubaci následovalo přidání testovaných látek v příslušné koncentraci (20 μl). Následující den byl k buňkám přidán substrát β -galaktosidázy MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-galaktosid) a pomocí fluorescenčního readeru byla změřena míra fluorescence fluorescenční značky MUG při 360/460 (ex/em).

3.10 Fluorimetrické stanovení kaspázy 3 a 7

Pro stanovení kaspázové aktivity byla použita suspenzní buněčná linie K562, která byla kultivována na Petriho miskách při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly vysazeny do mikrotitrační destičky v počtu 25 tisíc na jednu jamku, poté následovala 24 hodinová inkubace. Následující den bylo k buňkám přidáno médium (20 μl) obsahující testované látky o požadované koncentraci (10 μM a 50 μM). Ovlivnění buněk látkami probíhalo 24 hodin a 48 hodin. Po uplynutí této doby byl do jamek k buňkám přidán reakční pufr (3x koncentrovaný, 50 $\mu\text{l}/\text{jamka}$, složení viz. kap. 5.3), ke kterému bylo těsně před použitím přidáno DDT, PMSF a substrát pro kaspázu 3 a 7 (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin). Vzorky byly inkubovány 3 hodiny a poté byla změřena míra fluorescence při 346/442 nm (ex/em) pomocí fluorescenčního readeru pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent od firmy Labsystems.

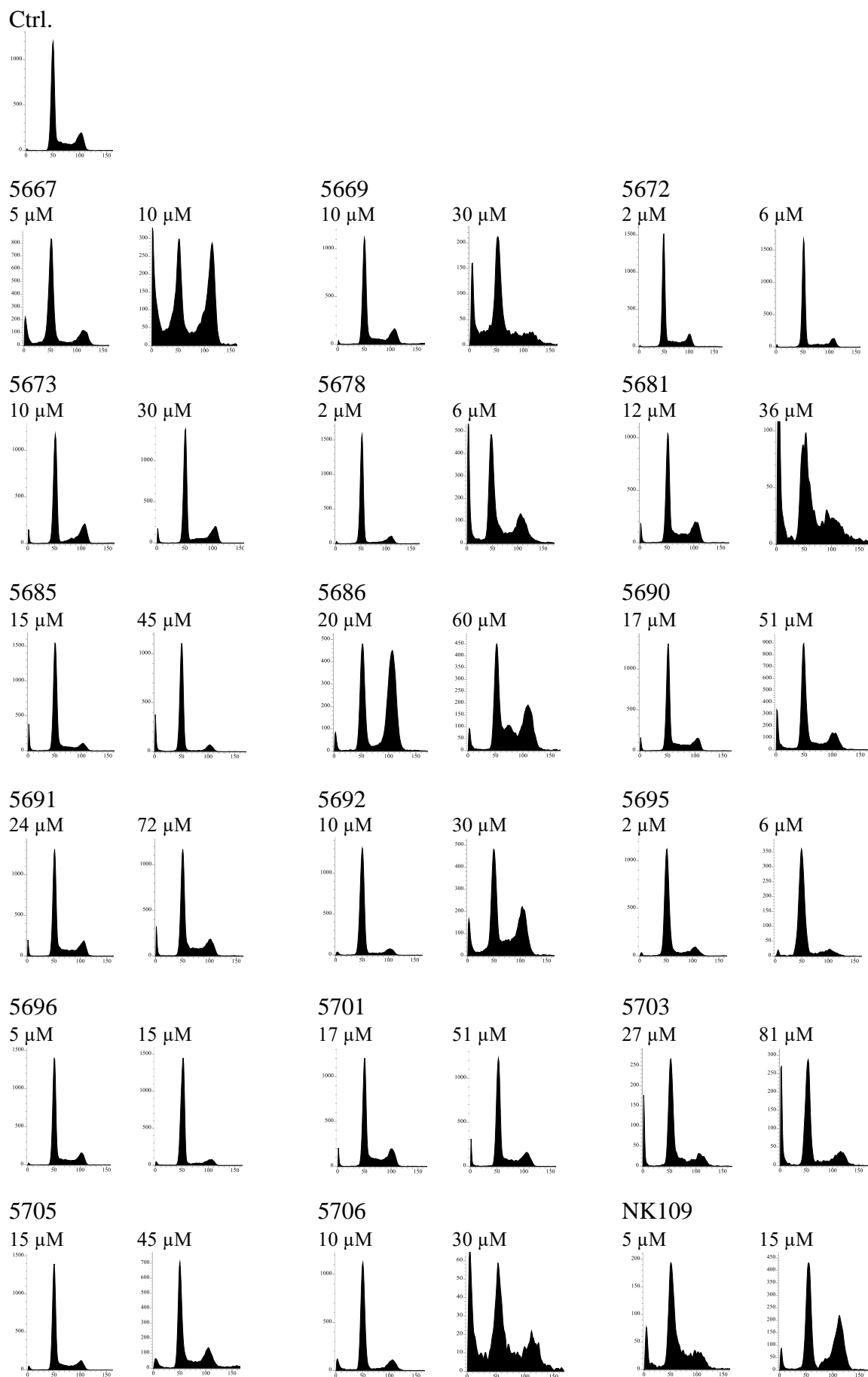
4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza buněčného cyklu metodou průtokové cytometrie

Pro sérii dvaceti nově syntetizovaných fenanthridinových derivátů byla provedena studie jejich vlivu na buněčný cyklus nádorové buněčné linie MCF-7. Deriváty byly aplikovány ve dvou koncentracích (1x a 3x IC_{50}) a ovlivnění látkami trvalo 24 hodin. Po této době byly buňky sklizeny pro analýzu DNA pomocí průtokové cytometrie po barvení propidium jodidem, což je barvivo, které se interkaluje do struktury DNA a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm dochází k emisi fluorescence. Ta je zachycována detektorem průtokového cytometru. Pro lepší posouzení vlivu na buněčný cyklus byla použita také referenční sloučenina se známými biologickými účinky – benzo[c]fenanthridinový derivát NK109. NK109 vykazuje svou cytotoxickou aktivitu inhibicí topoizomerázy II vyvolávající zlomy DNA, přičemž poškození DNA má za následek zastavení buněčného cyklu ve fázích G2/M (Fukuda *et al.*, 1996).

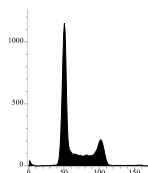
Vliv studovaných sloučenin na buněčný cyklus se lišil (Obr. 21). U nejvíce cytotoxické látky 5672 došlo ke snížení S a G2/M buněčné populace, zatímco slabě cytotoxická sloučenina 5686 způsobila výrazný G2/M blok již při koncentraci 1x IC_{50} . Taktéž u látky 5667 byl detekován poměrně silný G2/M blok a nárůst buněčné populace v subG1 fázi. Kontrolní látka NK109 způsobila předpokládané zablokování buněčného cyklu v G2/M fázi, které ale nebylo tak výrazné jako u výše zmíněných látek 5667 a 5686. U většiny ostatních látek bylo pozorováno snížení S a G2/M fáze. Tyto rozdíly naznačují, že studované sloučeniny mohou mít různé molekulární cíle.

U látek, u kterých byl zjištěn určitý zásah do buněčného cyklu, byla provedena další analýza pro potvrzení jejich účinku (Obr. 22 a 23). Jelikož u některých látek nebyl výsledek předchozího měření zcela jednoznačný, byly tyto látky rovněž podrobeny analýze. Navíc byly testovány známé benzo[c]fenanthridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Buněčná linie MCF-7 byla ovlivněna látkami ve třech koncentracích na základě jejich hodnoty IC_{50} po dobu 24 hodin. U obou látek 5667 a 5686 byl v koncentraci 20 μ M potvrzen silný G2/M blok a nárůst subG1 populace, která odpovídá apoptotickým buňkám. U většiny látek bylo potvrzeno snížení fáze S a fáze G/M (Obr. 22). U sanguinarinu byla v koncentraci 10 μ M detekována snížená hladina buněk v G1 fázi a mírný nárůst S fázové buněčné populace. Koncentrace sanguinarinu 20 μ M byla pro buňky pravděpodobně již příliš cytotoxická, proto v této koncentraci nebylo možné detailněji buněčný cyklus analyzovat. Chelerythrin ovlivnil buněčný cyklus podobně jako sanguinarin a tento účinek se projevil při koncentraci 20 μ M (Obr. 23).



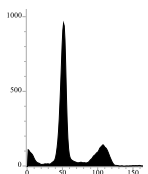
Obr.21: Účinek studovaných látek na buněčný cyklus v koncentraci $1 \times IC_{50}$ a $3 \times IC_{50}$ v linii MCF-7.

Ctrl.

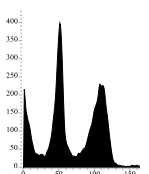


5667

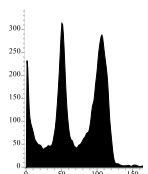
5 μ M



10 μ M

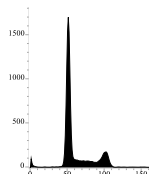


20 μ M

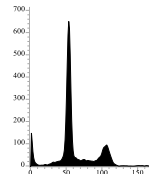


5669

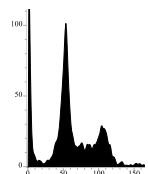
10 μ M



20 μ M

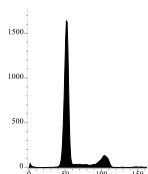


40 μ M

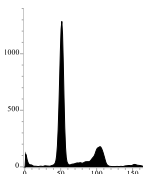


5672

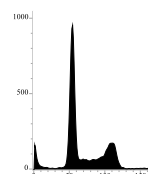
5 μ M



10 μ M

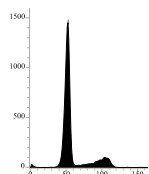


20 μ M

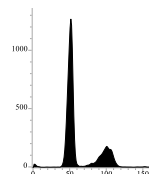


5673

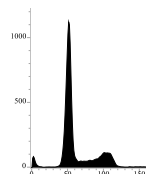
10 μ M



20 μ M

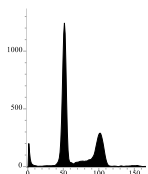


40 μ M

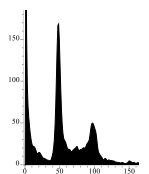


5678

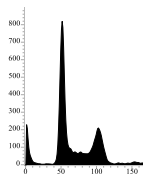
5 μ M



10 μ M

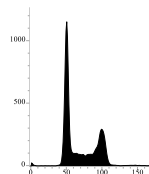


20 μ M

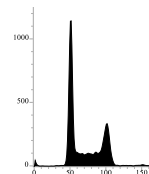


5681

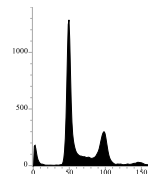
10 μ M



20 μ M

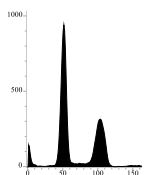


40 μ M

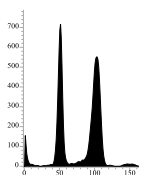


5686

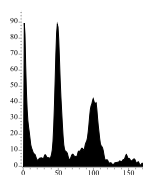
10 μ M



20 μ M

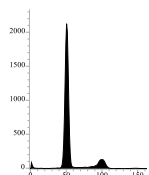


40 μ M

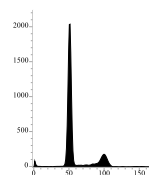


5695

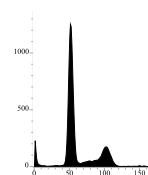
5 μ M



10 μ M

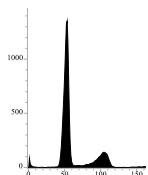


20 μ M

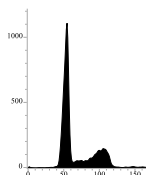


5898

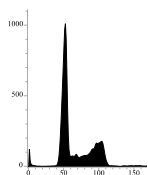
5 μ M



10 μ M

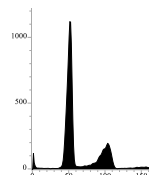


20 μ M

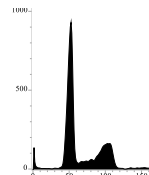


5899

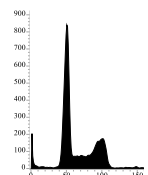
5 μ M



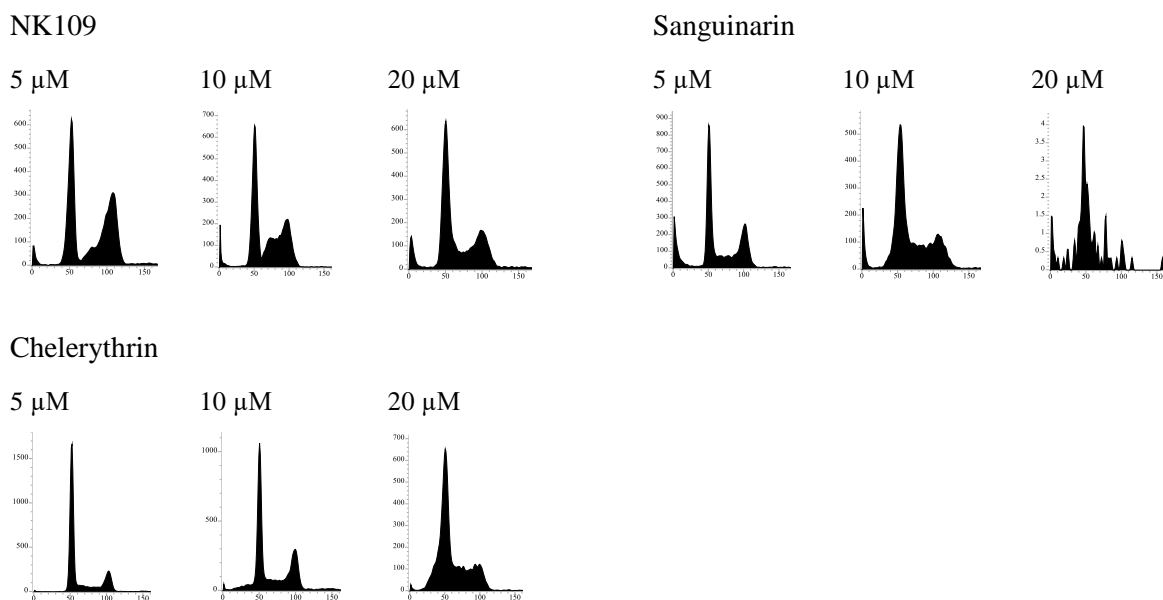
10 μ M



20 μ M

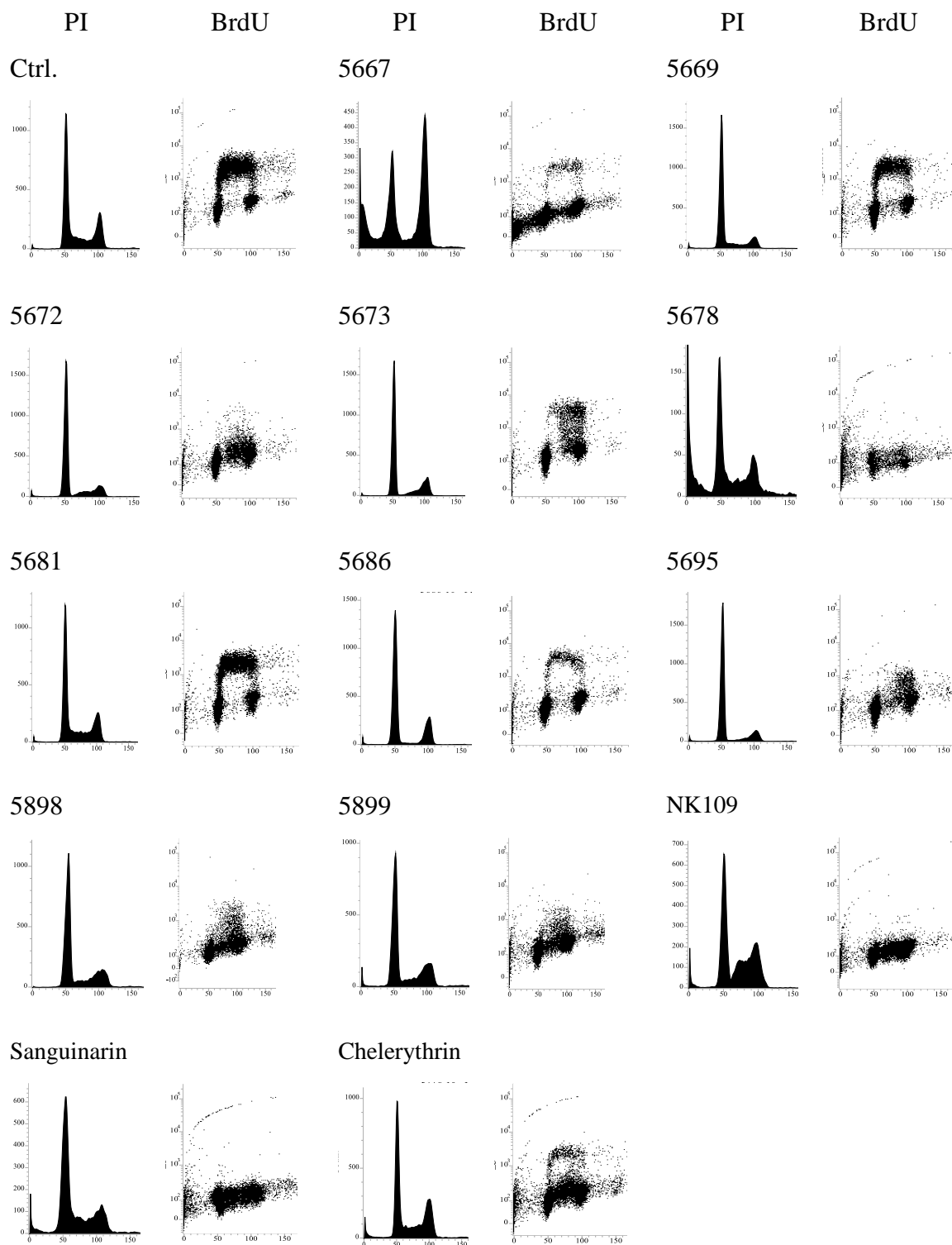


Obr. 22: Účinek studovaných látek na buněčný cyklus ve třech koncentracích v linii MCF-7



Obr. 23: Účinek kontrolních látek na buněčný cyklus v linii MCF-7.

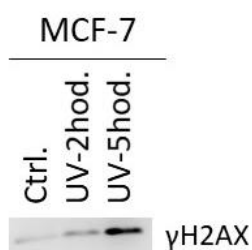
Pro detailnější analýzu buněčného cyklu byla využita metoda průtokové cytometrie s detekcí inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU). BrdU je analog thymidinu inkorporovaný do DNA dělících se buněk během S fáze. Tato metoda tak umožňuje detekci aktivně proliferujících buněk. Vizualizace BrdU byla provedena pomocí anti-BrdU-FITC značené protilátky, jejíž signál byl měřen průtokovým cytometrem. Látky pro analýzu byly vybrány na základě přechodících experimentů a jejich výsledků. Všechny testované sloučeniny byly použity v koncentraci 10 μM, jimiž byla ovlivněna buněčné linie MCF-7 po dobu 24 hodin. Z nově syntetizovaných sloučenin, které způsobily pokles aktivně se replikujících buněk, byl nejvýraznější účinek pozorován u látek 5672, 5678, 5695, 5898 a 5899 (Obr. 24). Nárůst apoptotických buněk byl pozorovatelný na histogramech u látek 5667 a 5678. Ačkoliv byla pozorována v předchozím experimentu zvýšená fáze S, tak zde se ukázalo, že replikace DNA v těchto buňkách neprobíhá.



Obr. 24: Účinek studovaných látek na buněčný cyklus v koncentraci 10 μ M v linii MCF-7. Buňky byly dvojitě značeny pomocí BrdU a propidium jodidu (PI).

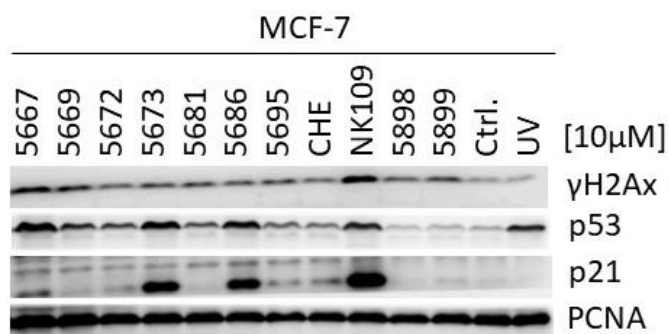
4.2 Imunodetekce vybraných proteinů

Předchozí cytometrické analýzy odhalily výrazné subG1 populace u ovlivněných buněčných kultur, které indikují probíhající buněčnou smrt. Pro lepší pochopení antiapoptotického účinku studovaných sloučenin byl proveden další experiment, ve kterém byly v ovlivněných buňkách linie MCF-7 detekovány proteiny, které souvisí s poškozením DNA a apoptózou. Studované látky byly použity v koncentraci 10 μM a doba jejich působení byla 24 hodin. Jedním z detekovaných proteinů byl fosforylovaný histon H2AX (Ser139), který slouží jako ukazatel poškození DNA, konkrétně přítomnosti zlomů v obou řetězcích DNA. Jelikož UV záření způsobuje dvouřetězcové zlomy DNA, předpokládal se intenzivní signál právě u buněk, které byly sklizeny 2 hodiny po ozáření UV (20 $\mu\text{J}/\text{m}^2$). Signál zde ale detekován nebyl (Obr. 26), a proto byl proveden pokus, jehož cílem bylo zjistit, zda je protilátka funkční. Bylo zjištěno, že pro pozitivní detekci fosforylovaného histonu H2AX je nutné sklizení buněk po delší době než 2 hodiny po ozáření (Obr. 25). Nejvýraznější signál fosfo-histonu H2AX byl detekován u kontrolní látky NK109 (Obr. 26).



Obr. 25: Ověření účinnosti protilátky fosfo-histonu H2AX na buněčné linii MCF-7, která byla vystavena UV záření a sklizena po 2 a 5 hodinách po ozáření.

U nových fenantridinových derivátů se hladina tohoto proteinu příliš nelišila, ale u látek 5667 a 5669 byl pozorován signál silnější (Obr. 26). Dalším z detekovaných proteinů byl protein p53, který také hraje klíčovou roli v reakci na poškození DNA a protein p21, jehož aktivita je stimulována proteinem p53. Signály obou proteinů u testovaných látek spolu korelovaly, zvýšená hladina byla detekována u látek 5667, 5673, 5686 a NK109. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA.



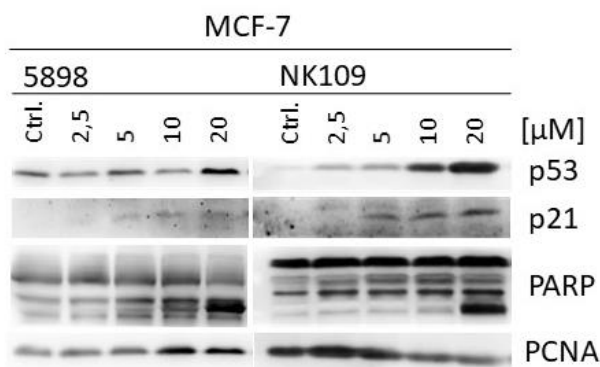
Obr. 26: Vliv nových fenanthridinových derivátů na aktivitu proteinů souvisejících s poškozením DNA v linii MCF-7. Látky byly použity v koncentraci 10 μM a doba jejich působení byla 24 hodin. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA.

Pro přesnější stanovení účinné koncentrace byly vybrány látky (5672, 5673, 5898, 6385, 6386 a NK109) testovány v koncentrační řadě (Obr. 27). V tomto experimentu byla navíc byla zjišťována i hladina proteinu PARP (Poly(ADP-ribose)polymerasa) a jeho štěpení. Tento protein je známým substrátem kaspázy 3, jejíž aktivita je jedním z charakteristických znaků apoptózy. Kaspáza 3 se účastní vnitřní apoptotické kaskády a v případě její aktivace dochází ke štěpení proteinu PARP na dva fragmenty. Štěpný fragment (89 kDa) byl vizualizován v lyzátu buněk vystavených působení látky 5672 v koncentraci 20 μM . Detekce proteinů p53 a p21 koreluje s předchozími výsledky, kdy u látky 5672 v 10 μM koncentraci nebyla hladina těchto proteinů výrazně zvýšena. Naopak u látky 5673 byly p53 a p21 aktivovány u buněk ovlivněných 10 μM koncentrací dané látky. Fosforylovaný histon H2AX se ani u jedné látky detekovat nepodařilo.



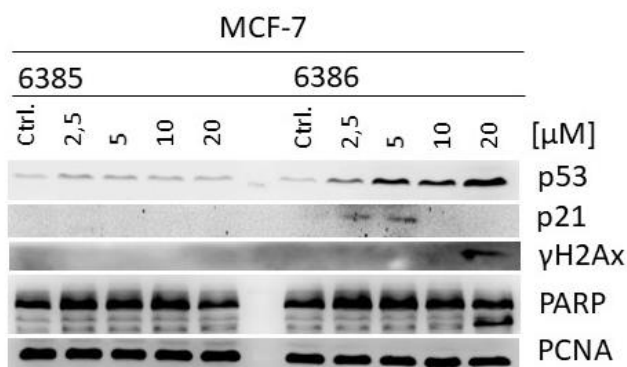
Obr. 27: Vliv nových fenanthridinových derivátů 5672 a 5673 na aktivitu proteinů souvisejících s poškozením DNA a apoptózou v linii MCF-7. Látky byly použity v koncentraci 2,5-5-10-20 μM a doba jejich působení byla 24 hodin. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA.

Dalšími blíže charakterizovanými látkami byly 5898 a NK109. Hladina proteinu p53 u látky 5898 byla zvýšena v koncentraci 20 μM , v této koncentraci také došlo ke štěpení proteinu PARP. Zvýšená hladina proteinu p21 nebyla detekována. Látka NK109 se vzrůstající koncentrací zvyšovala hladinu proteinu p21 a p53 a v koncentraci 20 μM způsobovala štěpení proteinu PARP (Obr. 28).



Obr. 28: Vliv nových fenanthridinových derivátů 5898 a standardu NK109 na aktivitu proteinů souvisejících s poškozením DNA a apoptózou v linii MCF-7. Látky byly použity v koncentraci 2,5-5-10-20 μM a doba jejich působení byla 24 hodin. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA.

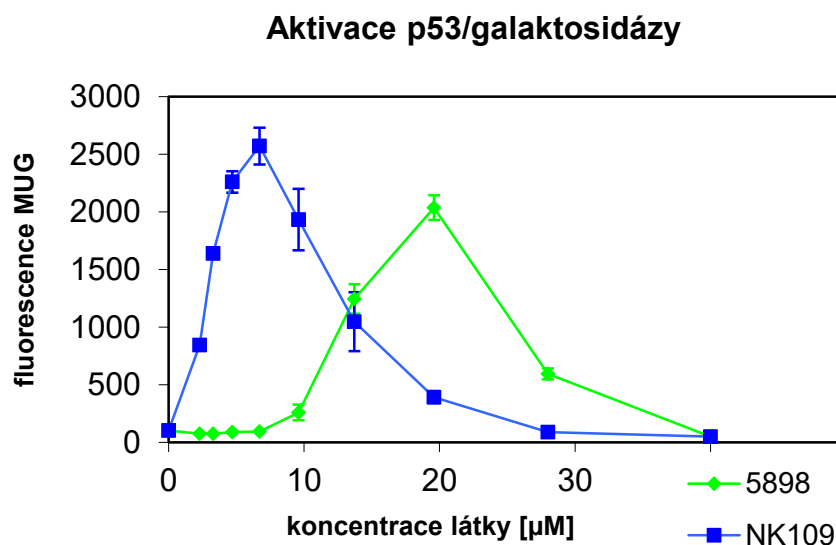
U látek 6385 a 6386 byla pomocí imunodetekce zjištěna zcela odlišná aktivita stanovovaných proteinů. Zatímco u látky 6385 nebyla v žádné z koncentrací detekována zvýšená hladina ani jednoho proteinu souvisejícího s poškozením DNA, u látky 6386 byla výrazná aktivita proteinu p53 již v koncentraci 5 μM . U této látky byl v nejvyšší koncentraci pozorován signál fosfo-histonu H2AX a v koncentraci 2,5 a 5 μM signál proteinu p21. Štěpení proteinu PARP vyvolala 20 μM koncentrace látky 6386 (Obr. 29).



Obr. 29: Vliv nových fenanthridinových derivátů 6385 a 6386 na aktivitu proteinů souvisejících s poškozením DNA a apoptózou v linii MCF-7. Látky byly použity v koncentraci 2,5-5-10-20 μM a doba jejich působení byla 24 hodin. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA.

4.3 Transkripční aktivita proteinu p53

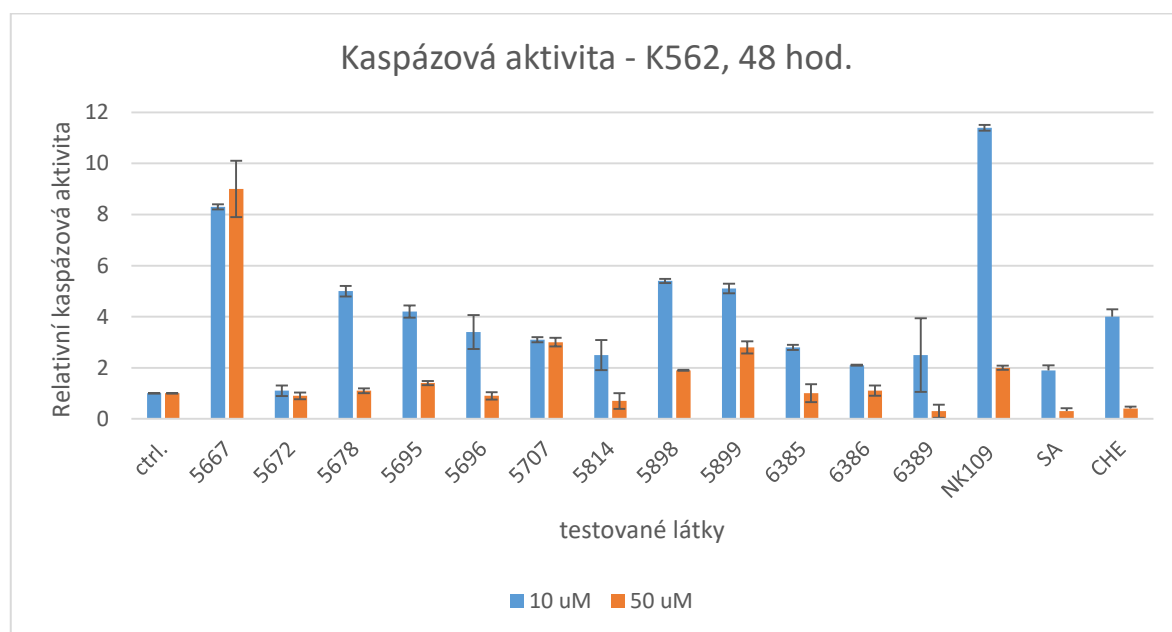
Předchozí experimenty prokázaly vliv některých fenanthridinových derivátů na buněčnou koncentraci nádorového supresoru p53. Jeho hladina je při působení podnětů způsobujících poškození DNA zvyšována a zároveň dochází k jeho aktivaci. Pro ověření aktivity proteinu p53 v buňkách vystaveným vlivu fenanthridinovým derivátům byla použita buněčná linie ARN8. Tato linie nese stabilně integrovaný reporterový gen pro β -galaktosidázu, který je kontrolován promotorem obsahujícím p53 vazebnou sekvenci rozlišovanou pouze funkčním proteinem 53. Buněčná linie byla inkubována s látkami 5898 a NK109, které byly použity v 10 koncentracích (0-40 μ M) po dobu 24 hodin. Pomocí fluorescenčního readeru byla změřena míra fluorescence rozkladného produktu MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-galaktosid) při 360/460 (ex/em). U obou látek byla pozorována aktivace proteinu p53 (Obr. 30). Látka NK109 je účinnější – k aktivaci transkripce p53 dochází při nižší koncentraci a hladina MUG je i vyšší. U látky 5898 byla maximální hladina transkripční aktivity pozorována v koncentraci 20 μ M. Výsledky korelují s výsledky imunodetekce proteinu p53.



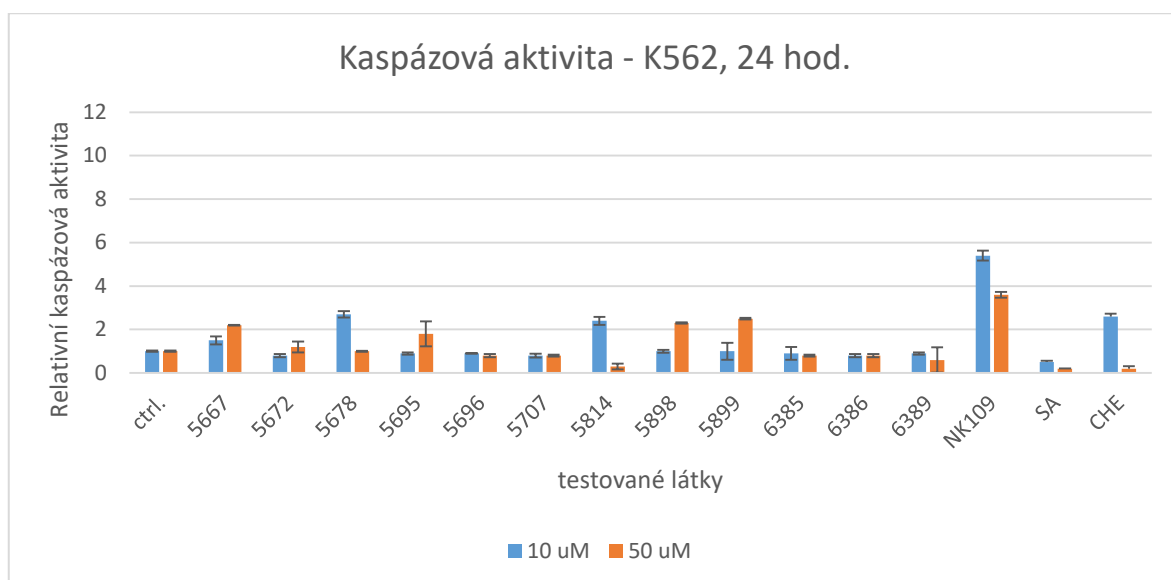
Obr. 30: Sledování transkripční aktivity proteinu p53 v buněčné linii ARN8 stanovené pomocí aktivace reporterového genu kódujícího β -galaktosidázu. Aktivita p53 byla vztažena ke katalytické aktivitě β -galaktosidázy, jejíž exprese je kontrolována p53-responzivním promotorem.

4.4 Stanovení aktivity kaspáz 3 a 7

Jelikož je jedním z charakteristických znaků apoptózy aktivace kaspáz štěpením neaktivní prokaspázy na aktivní kaspázu, byl u série vybraných látek sledován vliv na buněčnou aktivitu kaspáz 3 a 7. Experiment probíhal na suspenzní buněčné linii K562, která byla 24 a 48 hodin ovlivněna látkami v koncentraci 10 a 50 μM . Pomocí fluorimetrického měření byly získány absolutní hodnoty fluorescence substrátu kaspáz 3 a 7. Tyto hodnoty byly normalizovány podle signálu kontrolního vzorku a převedeny na hodnoty relativní (Obr. 31 a 32). K významnějšímu zvýšení kaspázové aktivity došlo u buněk, které byly ovlivněny testovanými látkami po dobu 48 hodin (Obr. 31). Nejúčinnější látka vyvolávající aktivaci kaspáz byla NK109. Téměř u všech látek byla vyšší aktivita kaspáz pozorována v koncentraci 10 μM . Výjimkou byla látka 5667, která byla účinnější v koncentraci 50 μM , avšak rozdíl oproti nižší koncentraci byl minimální. Zároveň byla u této látky pozorována nejvyšší relativní kaspázová aktivita ze všech nově syntetizovaných látek. Sanguinarin a chelerythrin byly použity jako srovnávací sloučeniny a jejich vliv byl srovnatelný s většinou látek.



Obr. 31: Relativní aktivita kaspáz 3 a 7 v buněčné linii K562 po 48 hodinové kultivaci se studovanými látkami v koncentracích 10 a 50 μM . Fluorescence byla měřena po 3 hodinách inkubace.



Obr 32: Relativní aktivita kaspáz 3 a 7 v buněčné linii K562 po 24 hodinové kultivaci se studovanými látkami v koncentracích 10 a 50 μ M. Fluorescence byla měřena po 3 hodinách inkubace.

5 DISKUZE

Benzo[c]fenanthridinové alkaloidy byly na základě mnoha experimentů vyhodnoceny jako látky s širokým spektrem biologických účinků. Významný je především prokázaný antiproliferační a proapoptotický účinek vůči mnoha typům nádorových buněčných linií (Hatae *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Weerasinghe *et al.*, 2001). Biologická aktivita benzo[c]fenanthridinových alkaloidů je výsledkem jejich molekulárních interakcí s několika různými cíli uvnitř buňky (Maiti *et al.*, 2010). Mezi hlavní cíle patří právě nukleové kyseliny a s nimi spojené fyziologické procesy. Cílem této diplomové práce bylo prostudovat antiproliferační aktivitu několika nově syntetizovaných fenanthridinových derivátů odvozených od sanguinarinu a chelerythrinu, které připravil doc. Jakub Stýskala z Katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (Lasák *et al.*, v recenzním řízení), a pokusit se nalézt závislost mezi strukturou a účinkem.

Pro analýzu buněčného cyklu byly vybrány sloučeniny, jejichž hodnota IC_{50} nepřesahovala koncentraci 30 μM v linii MCF-7. Pro porovnání byla spolu s novými fenanthridinový deriváty během experimentů použita i látka NK109. Jedná se o syntetický benzo[c]fenanthridinový derivát, který je charakterizován jako inhibitor topoizomerázy II vyvolávající zlomy DNA, přičemž poškození DNA má za následek zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M (Fukuda *et al.*, 1996). Látky způsobující ještě silnější G2/M blok, než kontrolní látka NK109 byly 5667 v koncentraci 10 μM a 5686 v koncentraci 20 μM . Strukturálně se jedná o velmi podobné látky lišící se substituentem v poloze 7, přičemž u látky 5667 se zde nachází methoxy skupina a u látky 5686 hydroxy skupiny. Na struktuře 5686 se navíc na dusíku nachází methylová skupina. U obou látek byla také detekována zvýšená populace v subG1 fázi, která odpovídá apoptotickým buňkám. Naopak u některých látek došlo k poklesu S a G2/M fáze a ke zvýšení G1 fáze, tento efekt byl velmi výrazný u nejvíce cytotoxické látky 5672 v koncentraci 5 μM . Zástava buněčného cyklu ve fázi G0/G1 byla pozorována i v několika studiích benzo[c]fenanthridinových látek (Adhami *et al.*, 2004; Slunská *et al.*, 2010). Tyto rozdíly naznačují, že studované sloučeniny mohou mít různé molekulární cíle.

Imunodetekcí byly u studovaných látek sledovány hladiny proteinů souvisejících s poškozením DNA (γH2AX , p53, p21, PARP). V experimentu, v němž byly všechny látky použity ve stejné koncentraci 10 μM v linii MCF-7 byly signály proteinů nejvýraznější u látek 5667, 5673, 5686 a NK109. V rámci tohoto experimentu byl testován také chelerythrin, u kterého byla již dříve zjištěn vliv na fosforylaci histonu H2AX. V melanomových buňkách A-375 způsobil fosforylaci fosfo-histonu H2AX, avšak v melanomové linii SK-MEL-2 k výrazné fosforylaci nedošlo (Hammerová *et al.*, 2011),

stejně jako v tomto experimentu, kde současně nebyla pozorována zvýšená hladina proteinu p53 a p 21. Slabá nebo žádná aktivita těchto proteinů po působení chelerythrinu byla také pozorována v melanomových buňkách (Hammerová *et al.*, 2011). U šesti látek byla pro detailnější studium a stanovení přesnější koncentrace nutné pro aktivaci detekovaných proteinů použita koncentrační řada (2,5-5-10-20 μM). Kromě látky 6385, docházelo u všech ostatních (5672, 5673, 5898, 6386 a NK109) se vzrůstající koncentrací látky k aktivaci sledovaných proteinů. Nejúčinnější látka byla 6386, jejíž struktura je totožná s látkou 5686, liší se pouze aniontovou skupinou. Tato látka vyvolala zvýšenou aktivaci p53 a p21 v 5 μM koncentraci. Signál fosfo-histonu H2AX a štěpného fragmentu PARP byl pozorován u buněk ovlivněných 20 μM koncentrací. U látky 6385 nebyla detekována žádná odezva na hladinu proteinů.

U dvou látek (5898 a NK109) byl zjišťován jejich vliv na transkripční aktivitu p53 ve stabilně transfekovaných buňkách ARN8, které obsahují reporterový gen kódující β -galaktosidázu. Aktivita p53 byla vztažena ke katalytické aktivitě β -galaktosidázy, jejíž exprese je kontrolována p53-responzivním promotorem. Cílem bylo provést srovnávací analýzu s výsledky získanými pomocí imunodetekce proteinu p53. U obou látek byla pozorován pozitivní vliv na transkripční aktivitu p53. Účinnost látky 5898 byla nižší, k maximální aktivaci došlo v koncentraci 20 μM , zatímco u látky NK109 bylo toto maximum pozorováno v koncentraci 6,7 μM . Vliv benzo[c]fenanthridinových alkaloidů na hladinu p53 je v literatuře zdokumentován. Sanguinarin a chelerythrin jsou schopny zvyšovat hladinu p53 v nádorových buňkách (Malíková *et al.*, 2006), i když není zcela zřejmé, jestli je tato akumulace spojená s mechanismem působení, nebo je pouze jejím důsledkem (Hammerová *et al.*, 2011).

Posledním experimentem, který byl u studovaných sloučenin proveden, bylo stanovení aktivity kaspáz 3 a 7, jelikož aktivace kaspáz je jedním z charakteristických znaků apoptózy (Klener et Klener, 2010). Suspenzní buněčná linie K562 odvozená od myeloidní leukémie byla ovlivněna látkami ve dvou koncentracích (10 μM a 50 μM) po dobu 24 a 48 hodin. Efekt testovaných látek na kaspázovou aktivitu byl výraznější při ovlivnění buněk po dobu 48 hodin, což může souviset s rychlostí průběhu apoptózy. Pozdní apoptóza je u benzo[c]fenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu prokázána studiemi (Vrba *et al.*, 2008; Vrba *et al.*, 2008). Téměř u všech látek byla hladina kaspáz vyšší při použití 10 μM koncentrace; nižší odezva na vyšší koncentraci (50 μM) pravděpodobně souvisí opět s rychlostí probíhající apoptózy. Nejúčinnější látka vyvolávající aktivaci kaspáz byla NK109. Všechny testované nově syntetizované benzo[c]fenanthridinových deriváty vykazovaly nižší účinnost než látka NK109. Nejvyšší aktivita kaspáz 3 a 7 byla pozorována

u látky 5667. Zajímavý výsledek byl zjištěn u látky 6386, u níž bylo imunodetekcí pozorováno štěpení proteinu PARP v koncentraci 20 μ M. Tento protein je při indukci apoptózy štěpen kaspázou 3, a tudíž se předpokládala její vyšší hladina, což ale výsledky kaspázové aktivity nepotvrzují. Možným vysvětlením by mohlo být použití odlišných buněčných linií u obou testů, kdy stejná látka nemusí být v různých liniích stejně aktivní. Vliv benzo[c]fenanthridinových alkaloidů na apoptózu v leukemických buňkách byl již dříve studován; sanguinarin zvyšoval aktivitu kaspáz v leukemické linii U937 (Han, Yoo *et* Choi, 2008).

I když z provedených experimentů vyplývá, že největší antiproliferativní aktivitu vykazuje látka již známá pod označením NK109, tak je její limitací metabolizace na inaktivní produkt (Guo *et al.*, 2007). Z nově syntetizovaných fenanthridinových derivátů byly na základě několika experimentů vyhodnoceny jako nejúčinnější látky 5667, 5672 a 5686/6386. Z hlediska struktury jsou všechny tři látky benzo[c]fenanthridinovými deriváty postrádající kruh A se substituenty v polohách 2 a 3, v níž se u všech nachází methyldioxydová skupina a se substituenty v polohách 7 a 8. Poloha 8 nese methoxy skupinu a v poloze 7 se vyskytuje buď methoxy skupina, nebo hydroxy skupina. Důvodem největší antiproliferační aktivity látky 5667 je pravděpodobně i to, že se jedná o látku nenabitou, tudíž lépe prochází skrze buněčnou membránu. U derivátů obsahující substituenty v polohách 3 a 4 se významná antiproliferační aktivita neprojevila, stejně tak u derivátů nesoucí v poloze 7 benzyloxy skupinu.

Pro další studium těchto látek by bylo vhodné prověřit jejich schopnost indukovat buněčnou smrt buňky v buněčných liniích s nefunkčním genem pro protein p53. Bylo zjištěno, že mutace tohoto genu se vyskytují u více než 50 % lidských nádorů a inaktivace p53 mají obecně velký význam v diagnostice zhoubných nádorů a jsou považovány za významné prognostické faktory. Z tohoto důvodu je přínosnější, aby potenciální látky indukovaly apoptózu nezávislou na funkci p53 (Lane, 2005). Ani v případě již známých benzo[c]fenanthridinových není zcela jednoznačné, zda jejich proapoptické účinky jsou závislé na aktivitě p53, avšak většina autorů uvádí, že tyto látky jsou schopny indukovat buněčnou smrt nezávisle na funkci p53 (Matkar, Wrischnik *et* Hellmann-Blumberg, 2008; Hammerová *et al.*, 2011).

6 ZÁVĚR

Pomocí několika metod byly charakterizovány některé biologické vlastnosti nových fenanthridinových derivátů připravených jako analoga benzo[c]fenanthridinových derivátů v buněčných liniích MCF-7, K562 a ARN8. Testovaná série obsahovala fenanthridinové deriváty postrádající benzenový kruh A a deriváty se lišily v přítomnosti substituentů v polohách 2, 3, 4, 7 a 8, kterými byly hydroxy, methoxy, methyldioxy a benzyloxy skupiny.

Z výsledků vyplývá, že studované sloučeniny vykazovaly antiproliferační a proapoptickou aktivitu, ale nemají vyšší potenciál než látka NK109, která byla použita pro srovnání. Avšak velkým omezením této látky pro klinickém využití je její metabolizace na neaktivní produkt. Z nově syntetizovaných derivátů byla vyhodnocena jako nejúčinnější látka s označením 5667, která nese na fenanthridinovém skeletu v poloze 7 methoxy skupinu, v poloze 2,3 methyldioxy můstek a 8-methoxy skupinu. Tato látka způsobila v 10 μ M koncentraci výrazný G2/M blok, při imunodetekci byla v téže koncentraci detekována fosforylace histonu H2AX a zvýšená hladina proteinů p53 a p21 a byl u ní pozorován výrazný vliv na aktivitu kaspáz 3 a 7. Proto by bylo vhodné u tohoto derivátu blíže charakterizovat jeho biologické účinky.

7 SEZNAM LITERATURY

Adhami, V. M., Aziz, M. H., Mukhtar, H., Ahmad, N. (2003). Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratinocytes. *Clinical Cancer Research*, 9(8), 3176-3182.

Adhami, V. M., Aziz, M. H., Reagan-Shaw, S. R., Nihal, M., Mukhtar, H., Ahmad, N. (2004). Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(8), 933-940.

Ahmad, N., Gupta, S., Husain, M. M., Heiskanen, K. M., & Mukhtar, H. (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1524-1528.

Ahsan, H., Reagan-Shaw, S., Breur, J., Ahmad, N. (2007). Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins. *Cancer letters*, 249(2), 198-208.

Bai, L. P., Hagihara, M., Nakatani, K., Jiang, Z. H. (2014). Recognition of chelerythrine to human telomeric DNA and RNA G-quadruplexes. *Scientific Reports*, 4, 6767.

Baldwin Jr, A. S. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, 14(1), 649-681.

Balmanno, K., Cook, S. J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell death and differentiation*, 16(3), 368.

Basini, G., Santini, S. E., Bussolati, S., Grasselli, F. (2007). The plant alkaloid sanguinarine is a potential inhibitor of follicular angiogenesis. *Journal of Reproduction and Development*, 53(3), 573-579.

Basu, P., Kumar, G. S. (2016). Sanguinarine and its role in chronic diseases. In *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases* (pp. 155-172). Springer, Cham.

Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental cell research*, 211(2), 314-321.

Bryan, T. M., Baumann, P. (2011). G-quadruplexes: from guanine gels to chemotherapeutics. *Molecular biotechnology*, 49(2), 198-208.

Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., Kohn, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*, 120(22), 3446-3456.

Cecen, E., Altun, Z., Ercetin, P., Aktas, S., Olgun, N. (2014). Promoting effects of sanguinarine on apoptotic gene expression in human neuroblastoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(21), 9445-9451.

Circu, M. L., Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749-762.

Cline, S. D., McHale, R. J., Coscia, C. J. (1993). Differential enhancement of benzophenanthridine alkaloid content in cell suspension cultures of *Sanguinaria canadensis* under conditions of combined hormonal deprivation and fungal elicitation. *Journal of natural products*, 56(8), 1219-1228.

- Colombo, M. L., Bosisio, E. (1996). Pharmacological activities of chelidonium majus L. (Papaveraceae). *Pharmacological research*, 33(2), 127-134.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. *Trends in cell biology*, 13(2), 65-70.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 72-79.
- Cui, X., Lin, S., Yuan, G. (2012). Spectroscopic probing of recognition of the G-quadruplex in c-kit promoter by small-molecule natural products. *International journal of biological macromolecules*, 50(4), 996-1001.
- Dana, J. F. (1828). An account of some experiments on the root of the *Sanguinaria canadensis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2(1), 245-252.
- De Stefano, I., Raspaglio, G., Zannoni, G. F., Travaglia, D., Prisco, M. G., Mosca, M., Gallo, D. (2009). Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochemical pharmacology*, 78(11), 1374-1381.
- Del Poeta, M., Chen, S. F., Von Hoff, D., Dykstra, C. C., Wani, M. C., Manikumar, G., Perfect, J. R. (1999). Comparison of in vitro activities of camptothecin and nitidine derivatives against fungal and cancer cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(12), 2862-2868.
- Ding, Z., Tang, S. C., Weerasinghe, P., Yang, X., Pater, A., Liepins, A. (2002). The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death. *Biochemical pharmacology*, 63(8), 1415-1421.
- Dong, X. Z., Zhang, M., Wang, K., Liu, P., Guo, D. H., Zheng, X. L., Ge, X. Y. (2013). Sanguinarine inhibits vascular endothelial growth factor release by generation of reactive oxygen species in MCF-7 human mammary adenocarcinoma cells. *BioMed research international*, 2013.
- Dostal, J., Slavik, J. (2000). Recent knowledge on sanguinarine and related alkaloids. *Chemická listy*, 94(1).
- Dostál, J., Slavík, J. (2002). Some aspects of the chemistry of quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids. In *Studies in natural products chemistry* (Vol. 27, pp. 155-184). Elsevier.
- Eley, B. M. (1999). Periodontology: antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. *British dental journal*, 186(6), 286.
- Ernst, E., Schmidt, K. (2005). Ukrain—a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials. *BMC cancer*, 5(1), 69.
- Fang, Z., Tang, Y., Jiao, W., Xing, Z., Guo, Z., Wang, W., Liu, Z. (2014). Nitidine chloride induces apoptosis and inhibits tumor cell proliferation via suppressing ERK signaling pathway in renal cancer. *Food and chemical toxicology*, 66, 210-216.
- Fukuda, M., Inomata, M., Nishio, K., Fukuoka, K., Kanzawa, F., Arioka, H., Saijo, N. (1996). A Topoisomerase II Inhibitor, NK109, Induces DNA Single- and Double-strand Breaks and Apoptosis. *Cancer Science*, 87(10), 1086-1091.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Thayyullathil, F. (2015). Tumor suppressive functions of ceramide: evidence and mechanisms. *Apoptosis*, 20(5), 689-711.

- Ghosh, S., Jana, J., Kar, R. K., Chatterjee, S., Dasgupta, D. (2015). Plant Alkaloid Chelerythrine Induced Aggregation of Human Telomere Sequence. A Unique Mode of Association between a Small Molecule and a Quadruplex. *Biochemistry*, 54(4), 974-986.
- Godowski, K. C., Wolff, E. D., Thompson, D. M., Housley, C. J., Polson, A. M., Dunn, R. L., Southard, G. L. (1995). Whole mouth microbiota effects following subgingival delivery of sanguinarium. *Journal of periodontology*, 66(10), 870-877.
- Gomez, D. E., Armando, R. G., Farina, H. G., Menna, P. L., Cerrudo, C. S., Ghiringhelli, P. D., Alonso, D. F. (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease. *International journal of oncology*, 41(5), 1561-1569.
- Gowan, S. M., Harrison, J. R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M. A., Neidle, S., Kelland, L. R. (2002). A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Molecular pharmacology*, 61(5), 1154-1162.
- Gunaratnam, M., Greciano, O., Martins, C., Reszka, A. P., Schultes, C. M., Morjani, H., Neidle, S. (2007). Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening. *Biochemical pharmacology*, 74(5), 679-689.
- Guo, L., Liu, X., Nishikawa, K., Plunkett, W. (2007). Inhibition of topoisomerase II α and G2 cell cycle arrest by NK314, a novel benzo [c] phenanthridine currently in clinical trials. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(5), 1501-1508.
- Habermehl, D., Kammerer, B., Handrick, R., Eldh, T., Gruber, C., Cordes, N., Jendrossek, V. (2006). Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. *BMC cancer*, 6(1), 14.
- Hammerová, J., Uldrijan, S., Táborská, E., Slaninová, I. (2011). Benzo [c] phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. *Journal of dermatological science*, 62(1), 22-35.
- Han, M. H., Yoo, Y. H., Choi, Y. H. (2008). Sanguinarine-induced apoptosis in human leukemia U937 cells via Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Chemotherapy*, 54(3), 157-165.
- Han, M. H., Kim, G. Y., Yoo, Y. H., Choi, Y. H. (2013). Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction. *Toxicology letters*, 220(2), 157-166.
- Hande, K. R. (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics*, 3(1), 13-26.
- Hatae, N., Fujita, E., Shigenobu, S., Shimoyama, S., Ishihara, Y., Kurata, Y., Hibino, S. (2015). Antiproliferative activity of O4-benzo [c] phenanthridine alkaloids against HCT-116 and HL-60 tumor cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(14), 2749-2752.
- Hawk, M. A., McCallister, C., Schafer, Z. T. (2016). Antioxidant activity during tumor progression: a necessity for the survival of cancer cells?. *Cancers*, 8(10), 92.
- Herbert, J. M., Augereau, J. M., Gleye, J., Maffrand, J. P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochemical and biophysical research communications*, 172(3), 993-999.

- Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K. I., Miyoshi, I. (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6476-6480.
- Hisatomi, T., Sueoka-Aragane, N., Sato, A., Tomimasu, R., Ide, M., Kurimasa, A., Sueoka, E. (2011). NK314 potentiates antitumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II α and DNA-dependent protein kinase. *Blood*, 117(13), 3575-3584.
- Hiyama, E., Hiyama, K. (2003). Telomerase as tumor marker. *Cancer letters*, 194(2), 221-233.
- Hohenwarter, O., Strutzenberger, K., Katinger, H., Liepins, A., Nowicky, J. W. (1993). Selective inhibition of in vitro cell growth by the anti-tumour drug Ukrain. *Drugs under experimental and clinical research*, 18, 1-1.
- Holy, J., Lamont, G., Perkins, E. (2006). Disruption of nucleocytoplasmic trafficking of cyclin D1 and topoisomerase II by sanguinarine. *BMC cell biology*, 7(1), 13.
- Hubáľková, P. (2015). G-kvadruplexy v oblasti lidských telomer a jejich terapeutický potenciál. *Chem. Listy*, 109, 918-922.
- Huh, J., Liepins, A., Zielonka, J., Andrekopoulos, C., Kalyanaraman, B., Sorokin, A. (2006). Cyclooxygenase 2 rescues LNCaP prostate cancer cells from sanguinarine-induced apoptosis by a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase activity. *Cancer Research*, 66(7), 3726-3736.
- Huppert, J. L. (2008). Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chemical Society Reviews*, 37(7), 1375-1384.
- Hurley, L. H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 188.
- Hussain, A. R., Al-Jomah, N. A., Siraj, A. K., Manogaran, P., Al-Hussein, K., Abubaker, J., Uddin, S. (2007). Sanguinarine-dependent induction of apoptosis in primary effusion lymphoma cells. *Cancer research*, 67(8), 3888-3897.
- Chaturvedi, M. M., Kumar, A., Darnay, B. G., Chainy, G. B., Agarwal, S., Aggarwal, B. B. (1997). Sanguinarine (pseudochelethrythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30129-30134.
- Chen, B., Le, W., Wang, Y., Li, Z., Wang, D., Ren, L., Yang, P. (2016). Targeting negative surface charges of cancer cells by multifunctional nanoprobes. *Theranostics*, 6(11), 1887.
- Chen, J., Wang, J., Lin, L., He, L., Wu, Y., Zhang, L., Liu, M. (2012). Inhibition of STAT3 signaling pathway by nitidine chloride suppressed the angiogenesis and growth of human gastric cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 11(2), 277-287.
- Chmura, S. J., Dolan, M. E., Cha, A., Mauceri, H. J., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R. (2000). In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo. *Clinical Cancer Research*, 6(2), 737-742.
- Choi, W. Y., Jin, C. Y., Han, M. H., Kim, G. Y., Kim, N. D., Lee, W. H., Choi, Y. H. (2009). Sanguinarine sensitizes human gastric adenocarcinoma AGS cells to TRAIL-mediated apoptosis via down-regulation of AKT and activation of caspase-3. *Anticancer Research*, 29(11), 4457-4465.

- Jana, J., Mondal, S., Bhattacharjee, P., Sengupta, P., Roychowdhury, T., Saha, P., Chatterjee, S. (2017). Chelerythrine down regulates expression of VEGFA, BCL2 and KRAS by arresting G-quadruplex structures at their promoter regions. *Scientific reports*, 7, 40706.
- Jang, B. C., Park, J. G., Song, D. K., Baek, W. K., Yoo, S. K., Jung, K. H., Suh, S. I. (2009). Sanguinarine induces apoptosis in A549 human lung cancer cells primarily via cellular glutathione depletion. *Toxicology in Vitro*, 23(2), 281-287.
- Janin, Y. L., Bisagni, E., Carrez, D. (1993). Synthesis of some benzo [h] quinoline derivatives. *Journal of heterocyclic chemistry*, 30(4), 1129-1131.
- Jeng, J. H., Wu, H. L., Lin, B. R., Lan, W. H., Chang, H. H., Ho, Y. S., Chang, M. C. (2007). Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production. *Atherosclerosis*, 191(2), 250-258.
- Jeng, J. H., Wu, H. L., Lin, B. R., Lan, W. H., Chang, H. H., Ho, Y. S., Chang, M. C. (2007). Antiplatelet effect of sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production. *Atherosclerosis*, 191(2), 250-258.
- Kabasawa, T. (1993). Antitumor activity of NK109, a novel antitumor agent. In *Proc. Jpn. Cancer Assoc., 52nd Annu. Meet.* (Vol. 576).
- Kasibhatla, S., Tseng, B. (2003). Why target apoptosis in cancer treatment?. *Molecular cancer therapeutics*, 2(6), 573-580.
- Kassim, O. O., Loyevsky, M., Elliott, B., Geall, A., Amonoo, H., Gordeuk, V. R. (2005). Effects of root extracts of *Fagara zanthoxyloides* on the in vitro growth and stage distribution of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 264-268.
- Kemény-Beke, Á., Aradi, J., Damjanovich, J., Beck, Z., Facskó, A., Berta, A., Bodnár, A. (2006). Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine. *Cancer letters*, 237(1), 67-75.
- Kim, S., Lee, T. J., Leem, J., Choi, K. S., Park, J. W., Kwon, T. K. (2008). Sanguinarine-induced apoptosis: Generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. *Journal of cellular biochemistry*, 104(3), 895-907.
- Klener, P., Klener jr, P. (2010). *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii.* Grada Publishing as.
- Lane, D. P. (2005, January). Exploiting the p53 pathway for the diagnosis and therapy of human cancer. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 70, pp. 489-497). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Larsson, D. E., Wickström, M., Hassan, S., Öberg, K., Granberg, D. A. N. (2010). The cytotoxic agents NSC-95397, brefeldin A, bortezomib and sanguinarine induce apoptosis in neuroendocrine tumors in vitro. *Anticancer research*, 30(1), 149-156.
- Laster, L. L., Lobene, R. R. (1990). New perspectives on Sanguinaria clinicals: individual toothpaste and oral rinse testing. *Journal (Canadian Dental Association)*, 56(7 Suppl), 19-30.
- Lee, T. K., Park, C., Jeong, S. J., Jeong, M. J., Kim, G. Y., Kim, W. J., Choi, Y. H. (2016). Sanguinarine induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma KB cells via inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Drug development research*, 77(5), 227-240.

- Lynch, M. A., Duval, O., Sukhanova, A., Devy, J., MacKay, S. P., Waigh, R. D., Nabiev, I. (2001). Synthesis, biological activity and comparative analysis of DNA binding affinities and human DNA topoisomerase I inhibitory activities of novel 12-alkoxy-benzo [c] phenanthridinium salts. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(19), 2643-2646.
- Mackraj, I., Govender, T., Gathiram, P. (2008). Sanguinarine. *Cardiovascular therapeutics*, 26(1), 75-83.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L., Stoia, A., Chadwick, L. R. (2003). In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. *Phytotherapy Research*, 17(3), 217-221.
- Malikova, J., Zdarilova, A., Hlobilkova, A. (2006). Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis. *Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc*, 150(1), 5.
- Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., Jiang, W. G. (2013). Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective.
- Matkar, S. S., Wrischnik, L. A., Hellmann-Blumberg, U. (2008). Sanguinarine causes DNA damage and p53-independent cell death in human colon cancer cell lines. *Chemico-biological interactions*, 172(1), 63-71.
- Matsuoka, M., Jeang, K. T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), nrc2111.
- Matthée, G., Wright, A. D., König, G. M. (1999). HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta medica*, 65(06), 493-506.
- Messmer, W. M., Tin-Wa, M., Fong, H. H. S., Bevelle, C., Farnsworth, N. R., Abraham, D. J., Trojanek, J. (1972). Fagaronine, a new tumor inhibitor isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam.(Rutaceae). *Journal of pharmaceutical sciences*, 61(11), 1858-1859.
- Morad, S. A., Cabot, M. C. (2013). Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, 13(1), 51.
- Mozhenok, T. P., Belyaeva, T. N., Leontieva, E. A., Faddejeva, M. D. (2005). Modulation of vesicular membrane fusion and of actin cytoskeleton in mouse macrophages inducing by alkaloid sanguinarine and a derivative drug Ukrain. *Cytologia*, 10, 860-865.
- Muller, C., Calsou, P., Salles, B. (2000). The activity of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) complex is determinant in the cellular response to nitrogen mustards. *Biochimie*, 82(1), 25-28.
- Nakanishi, T., Masuda, A., Suwa, M., Akiyama, Y., Hoshino-Abe, N., Suzuki, M. (2000). Synthesis of derivatives of NK109, 7-OH benzo [c] phenanthridine alkaloid, and evaluation of their cytotoxicities and reduction-resistant properties. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(20), 2321-2323.
- Nandi, R., Maiti, M. (1985). Binding of sanguinarine to deoxyribonucleic acids of differing base composition. *Biochemical pharmacology*, 34(3), 321-324.
- Navarro, V., Delgado, G. (1999). Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(2), 223-226.
- Neidle, S. (2016). Quadruplex nucleic acids as novel therapeutic targets. *Journal of medicinal chemistry*, 59(13), 5987-6011.

- Noble, R. L. (1990). The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and cell biology*, 68(12), 1344-1351.
- Nowicky JW, Manolakis G, Meijer D, Vatanasapt V, Brzosko WJ. Ukrain both as an anticancer and immunoregulatory agent. *Drugs Exptl. Clin. Res.*, XVIII, 51, 1992.
- Nowicky JW. New Immunostimulating anticancer preparation "Ukrain". 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, 28th August to 2nd September, 1983, PS 12 5 3 3/A-6, part 288/
- Okamoto, K., Seno, C., Onda, T., Toyoda, E., Nishikawa, K. (2005). Rapid DNA breakage induced by a novel antitumor agent, NK314.
- Onda, T., Toyoda, E., Miyazaki, O., Seno, C., Kagaya, S., Okamoto, K., Nishikawa, K. (2008). NK314, a novel topoisomerase II inhibitor, induces rapid DNA double-strand breaks and exhibits superior antitumor effects against tumors resistant to other topoisomerase II inhibitors. *Cancer letters*, 259(1), 99-110.
- Ou, X., Lu, Y., Liao, L., Li, D., Liu, L., Liu, H., Xu, H. (2015). Nitidine chloride induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through a pathway involving p53, p21, Bax and Bcl-2. *Oncology reports*, 33(3), 1264-1274.
- Ouchani, F., Jeanne, A., Thevenard, J., Helesbeux, J. J., Wahart, A., Letinois, I., Devy, J. (2015). Ethoxyfagaronine, a synthetic analogue of fagaronine that inhibits vascular endothelial growth factor-1, as a new anti-angiogenic agent. *Investigational new drugs*, 33(1), 75-85.
- Panzer, A., Hamel, E., Joubert, A. M., Bianchi, P. C., Seegers, J. C. (2000a). UkrainTM, a semisynthetic chelidonium majus alkaloid derivative, acts by inhibition of tubulin polymerization in normal and malignant cell lines. *Cancer letters*, 160(2), 149-157.
- Panzer, A., Joubert, A. M., Eloff, J. N., Albrecht, C. F., Erasmus, E., Seegers, J. C. (2000b). Chemical analyses of UkrainTM, a semi-synthetic Chelidonium majus alkaloid derivative, fail to confirm its trimeric structure. *Cancer letters*, 160(2), 237-241.
- Park, H., Bergeron, E., Senta, H., Guillemette, K., Beauvais, S., Blouin, R., Faucheux, N. (2010). Sanguinarine induces apoptosis of human osteosarcoma cells through the extrinsic and intrinsic pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 399(3), 446-451.
- Park, S. Y., Jin, M. L., Kim, Y. H., Lee, S. J., Park, G. (2014). Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression. *Oncology reports*, 31(1), 497-504.
- Phatak, P., Burger, A. M. (2007). Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *British journal of pharmacology*, 152(7), 1003-1011.
- Pica, F., Balestrieri, E., Serafino, A., Sorrentino, R., Gaziano, R., Moroni, G., Sinibaldi-Vallebona, P. (2012). Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in a rat syngeneic model of colorectal cancer. *Anti-cancer drugs*, 23(1), 32-42.
- Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2(4), 291-299.
- Rahman, A., Thayyullathil, F., Pallichankandy, S., Galadari, S. (2016). Hydrogen peroxide/ceramide/Akt signaling axis play a critical role in the antileukemic potential of sanguinarine. *Free Radical Biology and Medicine*, 96, 273-289.

- Rivaud, M., Mendoza, A., Sauvain, M., Valentin, A., Jullian, V. (2012). Short synthesis and antimalarial activity of fagaronine. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(15), 4856-4861.
- Rodriguez, R., Müller, S., Yeoman, J. A., Trentesaux, C., Riou, J. F., Balasubramanian, S. (2008). A novel small molecule that alters shelterin integrity and triggers a DNA-damage response at telomeres. *Journal of the American Chemical Society*, 130(47), 15758-15759.
- Rosenkranz, V., Wink, M. (2008). Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*). *Molecules*, 13(10), 2462-2473.
- Sen, A., Maiti, M. (1994). Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. *Biochemical pharmacology*, 48(11), 2097-2102.
- Shay, J. W., Wright, W. E. (2001). Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Radiation research*, 155(1), 188-193.
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of toxicology*, 89(3), 289-317.
- Slaninová, I., Pěňčíková, K., Urbanová, J., Slanina, J., Táborská, E. (2014). Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. *Phytochemistry reviews*, 13(1), 51-68.
- Slaninová, I., Slanina, J., Táborská, E. (2008). Fluorescenční vlastnosti kvarterních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chem. Listy*, 102, 427-433.
- Slunská, Z., Gelnarova, E., Hammerova, J., Taborska, E., Slaninova, I. (2010). Effect of quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids sanguilutine and chelilutine on normal and cancer cells. *Toxicology in vitro*, 24(3), 697-706.
- Sotomayor, E. M., Rao, K., Lopez, D. M., Liepins, A. (1992). Enhancement of macrophage tumouricidal activity by the alkaloid derivative Ukrain. In vitro and in vivo studies. *Drugs under experimental and clinical research*, 18, 5-11.
- Steinhauer, T. N., Girreser, U., Meier, C., Cushman, M., Clement, B. (2016). One-Step Synthetic Access to Isosteric and Potent Anticancer Nitrogen Heterocycles with the Benzo [c] phenanthridine Scaffold. *Chemistry-A European Journal*, 22(24), 8301-8308.
- Stoicov, C., Saffari, R., Cai, X., Hasyagar, C., Houghton, J. (2004). Molecular biology of gastric cancer: Helicobacter infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene*, 341, 1-17.
- Suchomelová, J., Bochořáková, H., Paulová, H., Musil, P., Táborská, E. (2007). HPLC quantification of seven quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids in six species of the family Papaveraceae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(1), 283-287.
- Sun, M., Liu, C., Nadiminty, N., Lou, W., Zhu, Y., Yang, J., Gao, A. C. (2012). Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion. *The Prostate*, 72(1), 82-89.
- Šimánek, V. (1985). Benzophenanthridine alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Vol. 26, pp. 185-240). Academic Press.
- Thai, K. M., Bui, Q. H., Tran, T. D., Huynh, T. N. P. (2012). QSAR modeling on benzo [c] phenanthridine analogues as topoisomerase I inhibitors and anti-cancer agents. *Molecules*, 17(5), 5690-5712.

- Toušek, J., Dostál, J., Slaninová, I., Táborská, E. (2005). A quantum chemical study vs. Biological activity of seven quaternary benzophenanthridine alkaloids. In *Book of Abstracts of 11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry*. Brno, Czech Republic: Masaryk University.
- Tsukamoto, H., Kondo, S., Mukudai, Y., Nagumo, T., Yasuda, A., Kurihara, Y., Shintani, S. (2011). Evaluation of anticancer activities of benzo [c] phenanthridine alkaloid sanguinarine in oral squamous cell carcinoma cell line. *Anticancer research*, 31(9), 2841-2846.
- Tsukasaki, K., Utsunomiya, A., Fukuda, H., Shibata, T., Fukushima, T., Takatsuka, Y., Tamura, K. (2007). VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *Journal of clinical oncology*, 25(34), 5458-5464.
- Uglyanica, K. N., Fomin, K. A., Nefyodov, L. I., Nowicky, J. W., Brzosko, W. J., Jankowski, A. (1996). Influence of Ukrain on patients with surgically treated breast cancer. Part I. Clinical and laboratory parameters. *Drugs under experimental and clinical research*, 22, 135-138.
- Vogt, A., Tamewitz, A., Skoko, J., Sikorski, R. P., Giuliano, K. A., Lazo, J. S. (2005). The benzo [c] phenanthridine alkaloid, sanguinarine, is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 19078-19086.
- Vrba, J., Doležel, P., Vičar, J., Modrianský, M., Ulrichová, J. (2008). Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology in vitro*, 22(4), 1008-1017.
- Vrba, J., Doležel, P., Vičar, J., Ulrichová, J. (2009). Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Toxicology in vitro*, 23(4), 580-588.
- Wang, D., Song, H., Evans, J. A., Lang, J. C., Schuller, D. E., Weghorst, C. M. (1997). Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis*, 18(11), 2285-2290.
- Wang, L. K., Johnson, R. K., Hecht, S. M. (1993). Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine. *Chemical research in toxicology*, 6(6), 813-818.
- Weerasinghe, P., Hallock, S., Tang, S. C., Liepins, A. (2001). Sanguinarine induces bimodal cell death in K562 but not in high Bcl-2-expressing JM1 cells. *Pathology-Research and Practice*, 197(11), 717-726.
- Weerasinghe, P., Hallock, S., Tang, S. C., Liepins, A. (2001). Sanguinarine induces bimodal cell death in K562 but not in high Bcl-2-expressing JM1 cells. *Pathology-Research and Practice*, 197(11), 717-726.
- Wolff, J., Knipling, L. (1993). Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry*, 32(48), 13334-13339.
- Xu, J. Y., Meng, Q. H., Chong, Y., Jiao, Y., Zhao, L., Rosen, E. M., Fan, S. (2013). Sanguinarine is a novel VEGF inhibitor involved in the suppression of angiogenesis and cell migration. *Molecular and clinical oncology*, 1(2), 331-336.

Yapi, A. D., Desbois, N., Chezal, J. M., Chavignon, O., Teulade, J. C., Valentin, A., & Blache, Y. (2010). Design and preparation of aza-analogues of benzo [c] phenanthridine framework with cytotoxic and antiplasmodial activities. *European journal of medicinal chemistry*, 45(7), 2854-2859.

Yu, S., Zemskov, S., Skachkova, O., Ravis, O., Khranovska, N. (2008). Anticancer drug „ukrain“ stimulates dendritic cells maturation in vitro. *Immunology & Allergology*, 4, 24-27.

Yu, Y., Singh, S. K., Liu, A., Li, T. K., Liu, L. F., LaVoie, E. J. (2003). Substituted dibenzo [c, h] cinnolines: topoisomerase I-targeting anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(7), 1475-1491.

Zdařilová, A., Malíková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J., Šimánek, V. (2006). Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vitro a in vivo. *Chem. listy*, 100, 30-41.

Internetové zdroje:

<https://ac24.cz/-/zpravy-ze-sveta/10266-lek-rakovina-vezeni>

<http://www.ukrin.com/docs/lettertonobel.pdf>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin
AKT	Protein kinase B
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosine triphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
BA	Benzophenanthridine alkaloids
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CDK	Cyclin-dependent kinase
DDT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
ERK	Extracellular-signal-regulated protein kinase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GSK3- β	Glycogen synthase kinase 3 β
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	High-performance liquid chromatography
HTLV-1	Human T-lymphotropic virus 1
hTR	Human telomerase RNA
CHE	Chelerythrine
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IL-1	Interleukin-1
I κ B	Inhibitor of nuclear faktor κ B
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase

MKP-1	Mitogen-activated protein kinase-1
MMP	Matrix metalloproteinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MUG	4-methylumbelliferyl- β -D-galaktosid
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
QBA	Quaternary benzophenanthridine alkaloids
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
ROS	Reactive oxygen species
SA	Sanguinarine
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT3	Signal transducer and aktivátor of transcription 3
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiammin
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor