



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární
biologie



ÚČINEK VYBRANÝCH IZOCHINOLINOVÝCH ALKALOIDŮ NA NÁDOROVÉ BUŇKY

Diplomová práce

Lucie Válková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.

Brno 2014

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Lucie Válková Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Účinek vybraných izochinolinových alkaloidů na nádorové buňky
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Molekulární biologie a genetika
Vedoucí práce:	doc. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.
Akademický rok:	2013/2014
Počet stran:	99
Klíčová slova:	Benzo[c]fenanthridinové alkaloidy, maligní melanom, buněčná smrt, apoptóza, nekroptóza, autofagie, p53, cytotoxicita

Bibliographic Entry

Author:	Bc. Lucie Válková Faculty of Science, Masaryk University Department of Experimental Biology
Title of Thesis:	The effect of selected isochinoline alkaloids on tumour cells
Degree Programme:	Biology
Field of Study:	Molecular Biology and Genetics
Supervisor:	doc. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.
Academic Year:	2013/2014
Number of Pages:	99
Keywords:	Benzo[c]phenanthridine alkaloids, malignant melanoma, cell death, apoptosis, necroptosis, autophagy, p53, cytotoxicity

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá studiem účinku vybraných izochinolinových, konkrétně kvartérních benzo[c]fenanthridinových (KBA) a kvartérních protoberberinových alkaloidů (KPA) na nádorové buňky, především buněčné linie lidského maligního melanomu. Tyto přírodní látky mají široké spektrum biologických účinků.

Práce je zaměřena zejména na minoritní alkaloidy, které se vyskytují vzácně, nejsou komerčně dostupné a jejichž účinky nejsou dosud příliš prozkoumány. Mezi tyto alkaloidy patří sanguirubin, chelirubin, sanguilutin a koptisin. Jejich účinky jsou srovnávány s majoritními, komerčně dostupnými sanguinarinem, chelerytrinem a berberinem, které jsou již v dnešní době diskutovány jako potenciální cytostatika.

U všech studovaných KBA byla prokázána antiproliferační a cytotoxická aktivita na vybraných buněčných liniích, berberin a koptisin byly řádově méně toxické, proto nebyly podrobněji studovány. Byly studovány mechanismy indukce buněčné smrti. U sanguilutinu byla potvrzena indukce nekaspázové buněčné smrti, nekroptózy. Ostatní alkaloidy indukovaly u buněčné linie A-375 apoptózu i nekroptózu, u linie HeLa pouze nekroptózu. Schopnost vyvolat nekroptózu nebo oba typy buněčné smrti řadí KBA mezi látky zajímavé z hlediska studia nádorů rezistentních k apoptóze.

Abstract

The presented work deals with study of the effect of selected isoquinoline alkaloids, particularly quaternary benzo[c]phenanthridine (QBA) and quaternary protoberberine alkaloids (QPA) in tumour cells, especially cell lines of human malignant melanoma. These natural substances have a broad spectrum of biological effects.

The work is mainly focused on minor alkaloids, which are rare, not commercially available and effects of which are not deeply explored yet. These alkaloids include sanguirubine, chelirubine, sanguilutine and coptisine. Their effects are compared with the major, commercially available alkaloids sanguinarine, chelerythrine and berberine which are discussed as potential cytostatics.

All studied QBA revealed antiproliferative and cytotoxic activity on selected cell lines, however berberine and coptisine were much less toxic, therefore they have not been studied in details. The mechanism of the cell death induction was studied. The results confirmed induction of caspase-independent cell death, necroptosis, by sanguilutine. Other alkaloids induced apoptosis as well as necroptosis in cell line A-375 and only necroptosis in HeLa cells. The ability to induce necroptosis or both types of the cell death ranks QBA among interesting substances in terms of biology of tumour resistant to apoptosis.



Vysoká škola: Masarykova univerzita

Fakulta: Přírodovědecká

Ústav: Ústav experimentální biologie



Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Experimentální biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Směr: Molekulární biologie a genetika

Student(ka): **Lucie Válková**

Vedoucí diplomové práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto diplomovou práci:

Název tématu: **Účinek vybraných izochinolinových alkaloidů na nádorové buňky**

Název tématu anglicky: **The effect of selected isochinoline alkaloids on tumour cells**

Vedoucí diplomové práce: Doc. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D

Odborný konzultant:

Zásady pro vypracování

Anotace: Práce bude zaměřena na studium účinku vybraných izochinolinových alkaloidů na buněčné linie lidských nádorových buněk, především linie maligního melanomu. Alkaloidy budou získány z Biochemického ústavu LF MU, kde jsou izolovány z rostlinného materiálu. To umožňuje studovat látky, které nejsou komerčně dostupné a jejichž účinky jsou prozkoumány málo. Práce bude navazovat na předchozí práce naší laboratoře a bude se zabývat především alkaloidy ze skupiny benzophenanthridinů a protoberberinů. Bude studována zejména antiproliferační aktivita a mechanismy indukce buněčné smrti.

Časový harmonogram řešení (postup): říjen - prosinec 2012 - seznámení se s problematikou a metodikami práce v laboratoři nádorové biologie
leden - červen 2013 - stanovení toxicity testovaných alkaloidů (MTT assay, PI exclusion assay) na buňkách linií maligního melanomu
září - prosinec 2013 - testy na apoptózu - Western blot analýza kaspáz a PARP, mikroskopická analýza jader značených DAPI. Analýza buněčného cyklu .
leden - duben 2014 - dokončení experimentů, sepsání diplomové práce

Rozsah diplomové práce: 50 stran

Jazyk práce: český

Seznam odborné literatury:

- Adhami V M, Aziz M H, Mukhtar H et al (2003) Clin Cancer Res 9:3176-3182
Ahmad N, Gupta S, Husain M M et al (2000) Clin Cancer Res 6:1524-1528
De Stefano I, Raspaglio G, Zannoni G F et al (2009) Biochem Pharmacol 78:1374-1381
Dostál J, Slavík J (2002) Stud Nat Prod Chem 27:155-184
Dostal, J. and J.Slavik. 2000. Chemicke Listy 94:15-20.
Dvořák Z, Kubán V, Klejdus B et al (2006) Heterocycles 68:2403-2422
Hammerová J, Uldrijan S, Tábořská E et al (2011) J Dermatol Sci 62:22-35
Hammerová J, Uldrijan S, Tábořská E et al (2012) Biol Chem 393:647-658
Holy J, Laminy G, Perkins E (2006) BMC Cell Biol 7:13
Kaminsky V, Kulachkovsky O, Stoika R (2008). Toxicol Lett 177:168-181
Malíková J, Zdarilová A, Hlobilková A et al (2006). Cell Biol Toxicol 22:439-453
Philchenkov A, Kaminsky V, Zavelevich M et al (2008) Toxicol In Vitro 22:287-295
Serafim T L, Matos J A C, Sardao V A et al (2008). Biochem Pharm 76:1459-1475
Slaninová I, Slanina J, Tábořská E (2007a). Cytometry A 71:700-708
Slaninová I, Slunská Z, Šinkora J et al (2007b). Pharm Biol 45:131-139
Slaninová I, Tábořská E, Bochoráková H et al (2001) Cell Biol Toxicol 17:51-63
Slunská Z, Gelnarová E, Hammerová J et al (2010) Toxicol In Vitro 24:697-706
Šimánek V, Vespalec R, Šedo A et al (ed) (2003) Chem Probes Biol. 129:245-254.
Tábořský P, Slaninová I, Tábořská E (2010) In: Cassiano N M (ed) Alkaloids: Properties, Application and Pharmacological Effects, Nova Science Publishers Inc., New York
Urbanova J, Lubal P, Slaninova I, et al (2008). Anal Bioanal Chem 394:997-1002
Zdarilova A, Malikova J, Dvorak Z et al (2006) Chem Listy 100:30-41
Murthy, KNC, Jayaprakasha, GK, Patil, BS (2012) Eur J Pharmacol. 688 14-21
He, W, Wang, B, Zhuang, Y, Shao, D, et al. (2012) J Pharm Sci 119: 341-348
Wang, LH, Liu, LP, Shi, Y, et al. 2012 PLOS ONE 7 Issue: 5 Article Number: e36418
Kim, HS, Kim, MJ, Kim, EJ, Yang, Y, et al. (2012). Biochem Pharmacol 83: 385-394
Dostal, J, Man, S, Seckarova, P, Hulova, D, et al. (2004) J Mol Struc: 687: 135-142
Grycova, L, Dostal, J, Marek, R. (2007) Phytochemistry : 68 . 150-175

Datum zadání diplomové práce: 29.11.2012

Termín odevzdání diplomové práce: dle harmonogramu akademického roku

V Brně dne 29.11.2012.

Válcová Lucie

Bc. Lucie Válcová
podpis studenta

Iva Slaninová
Doc. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.
podpis vedoucího diplomové práce

Jan Šmarda
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel ústavu

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. MUDr. Ivě Slaninové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, cenné připomínky a čas, který mi při vypracování této diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat paní Zuzaně Prokopové za její ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Můj dík patří také Mgr. Gabriele Páchnikové a Bc. Haně Šustové za cenné rady a pomoc při řešení problematických situací a celému kolektivu Laboratoře nádorové biologie, Biologického ústavu, LF MU za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno dne 15. května 2014

Válková Lucie

.....

Lucie Válková

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	13
1 ÚVOD	18
1.1 Benzofenanthridinové alkaloidy	18
1.1.1 Charakteristika a výskyt benzofenanthridinových alkaloidů.....	18
1.1.2 Struktura benzofenanthridinových alkaloidů.....	20
1.1.3 Interakce alkaloidů s buněčnými komponentami	20
1.1.3.1 Interakce s DNA	21
1.1.3.2 Interakce s mikrotubuly	22
1.1.3.3 Interakce KBA s p53	22
1.2 Protoberberinové alkaloidy.....	23
1.3 Maligní melanom.....	23
1.3.1 Epidemiologie, rizikové faktory	23
1.3.2 Genetika maligního melanomu.....	26
1.3.3 Možnosti terapie	28
1.4 Buněčná smrt	29
1.4.1 Autofagie	30
1.4.2 Apoptóza.....	32
1.4.3 Nekróptóza.....	34
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	36
3 MATERIÁL A METODY	37
3.1 Buněčné linie a jejich kultivace.....	37
3.2 Použité alkaloidy	38
3.3 Příprava buněk pro experimenty.....	40
3.4 Testování antiproliferační aktivity KBA	40

3.4.1 MTT test	40
3.4.2 Test životaschopnosti buněk.....	41
3.5 Příprava buněčných lyzátů, polyakrylamidová elektroforéza, Westernový přenos, vizualizace proteinů.....	42
3.5.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	43
3.5.2 Westernový přenos	44
3.5.3 Vizualizace proteinů na membráně	45
3.6 Analýza buněčného cyklu.....	48
3.7 Mikroskopická analýza jader značených DAPI.....	49
3.8 Statistická analýza	49
4 VÝSLEDKY	50
4.1 Screening cytotoxicity vybraných izochinolinových alkaloidů na buněčné linii A-375	50
4.1.1 MTT test metabolické aktivity	50
4.1.2 Test viability	51
4.2 Účinek vybraných KBA na různé typy buněčných linií.....	52
4.2.1 Účinek na melanomové linie	52
4.2.2 Účinek na buněčnou linii HL-60	53
4.3 Mechanismus účinku alkaloidů	54
4.3.1 Indukce buněčné smrti.....	54
4.3.1.1 Důkaz apoptózy	54
4.3.1.2 Studium mechanismu indukce apoptózy	60
4.3.1.3 Typy buněčných smrtí indukovaných alkaloidy.....	62
4.3.1.4 SL jako induktor nekroptózy ve srovnání s kaptotecinem jako induktorem apoptózy.....	70
4.3.2 Úloha proteinu p53 v odpovědi buněk na účinek KBA.....	75
5 DISKUZE	78
6 SOUHRN	82

7 SUMMARY	83
8 LITERATURA.....	84

SEZNAM ZKRATEK

A-375	buněčná linie odvozená od lidského maligního melanomu; z angl. human amelanotic melanoma cell line
A-375-p53DD	buněčná linie odvozená z linie A-375 stabilní transfekcí plazmidu pCMVneoDDp53
AA	aminokyselina; z angl. amino acid
AIF	apoptózu vyvolávající faktor; z angl. apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptotický faktor sloužící k aktivaci kaspázy-9; z angl. apoptotic protease activating factor 1
APS	persulfát amonný; z angl. ammonium persulfate
Bad	proapoptotický protein; z angl. Bcl-2-associated death promoter
Bak	proapoptotický protein; z angl. Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	proapoptotický protein; z angl. Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	rodina proteinů zahrnující proapoptotické a antiapoptotické proteiny; z angl. B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	antiapoptotický protein; z angl. B-cell lymphoma-extra large
Bcl-xS	proapoptotický protein; z angl. B-cell lymphoma-extra small
BER	berberin/berberine
Bid	proapoptotický protein; z angl. BH3 interacting-domain death antagonist
Bik	proapoptotický protein; z angl. Bcl-2-interacting killer
Campt	kamptotecin; z angl. Camptothecin
CDK4	cyklin-dependentní kináza 4; z angl. cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	cyklin-dependentní kinázový inhibitor 2A; z angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CGH	komparativní genomová hybridizace; z angl. comparative genome hybridization
cIAP	protein s antiapoptotickou aktivitou; z angl. cellular inhibitor of apoptosis protein
cFLIP_L	z angl. cellular FLICE-like inhibitory protein, long splice variant
CVD	polychemoterapeutické tříslžkové léčivo zahrnující cisplatinu, vinblastin a dakarbazin

CYLD	nádorový supresor, deubikvitinylační enzym; z angl. cylindromatosis
Cyt C	cytochrom c
DAPI	4,6-diamino-2-fenylindol
DBCT	polychemoterapeutické čtyřsložkové léčivo zahrnující dakarbazin, karmustin (BCNU; z angl. bis-chloroethylnitrosourea), cisplatinu a tamoxifen; Dartmouth regimen; z angl. dacarbazine, BCNU, cisplatin, tamoxifen
DISC	proapoptotický signální komplex; z angl. death-inducing signaling complex
DMEM	z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DOXO	doxorubicin
ECL	z angl. enhanced chemiluminescent substrate
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová; z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	z angl. extracellular signal-regulated kinases
FADD	protein asociovaný s Fas doménou smrti; z angl. Fas-associated death domain protein
FasL	Fas ligand, transmembránový protein z rodiny TNF cytokinů
FDA	z angl. Food and Drug Administration
FFA	z angl. free fatty acid
FLICE	z angl. FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme
H2AX	z angl. HA2 histone family, member X
γH2AX	fosforylovaný histon H2AX
HeLa	buněčná linie adenokarcinomu děložního krčku; z angl. Henrietta Lacks
HL-60	buněčná linie akutní promyeloidní leukémie; z angl. human promyelotic leukemia cell line
HL-60 MDR	rezistentní buněčná linie akutní promyeloidní leukémie; z angl. human promyelocytic leukemia multidrug-resistance cell line
Hsc70	z angl. heat shock protein 70
CHE	chelerytrin/chelerythrine
CHL	chelilutin/chelilutine
CHR	chelirubin/chelirubine

IMS	mezimembránový prostor; z angl. intermembrane space
IPC-298	buněčná linie maligního melanomu
KBA	kvarterní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy
KFERQ	pentapeptidový motiv Lys-Phe-Glu-Arg-Gln; Lys = lysin = K, Phe = fenylalanin = F, Glu = kyselina L-glutamová = E, Arg = arginin = R, Gln = glutamin = Q
KOP	koptisin/coptisine
KPA	kvarterní protoberberinové alkaloidy
MA	makarpin
3-MA	3-methyladenin
MAPK	proteinkináza aktivovaná mitogenem; z angl. mitogen-activated protein kinase
MC1R	gen kódující receptor melanokortinu-1; z angl. melanocortin 1 receptor
Mcl-1	antiapoptotický protein; z angl. myeloid cell leukemia sequence 1
MDM2	negativní regulátor genu pro p53; z angl. murine double minute 2
MDMX = MDM4	z angl. murine double minute X
MEK	kináza aktivující MAPK kinázu; z angl. MAPK/extracellular signal-regulated kinase
MLKL	z angl. mixed lineage kinase domain-like
MMP	mitochondriální membránový potenciál; z angl. mitochondrial membrane potential
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid
NAC	N-acetylcystein
Nec-1	Necrostatin-1
NF-κB	jaderný faktor interagující s enhancerem genu pro lehký řetězec kappa u aktivovaných B lymfocytů; z angl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PARP	poly(ADP-ribóza) polymeráza; z angl. poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	fosfátový pufr; z angl. phosphate buffered saline
PCNA	proliferační buněčný jaderný antigen; z angl. proliferating cell nuclear antigen
PDGFR-β	destičkový receptor růstového faktoru β; z angl. platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide

PI	propidium jodid
Pif	Pifithrin
QBA	z angl. quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids
QPA	z angl. quaternary protoberberine alkaloids
RAF	serin threonin specifické proteinkinázy, mezi které patří ARAF, BRAF, CRAF; z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	rodina malých guanin nukleotid-vazebných proteinů, které zahrnují HRAS (z nagl. Harvey murine sarcoma virus), KRAS (z angl. Kirsten murine sarcoma virus), NRAS (z angl. neuroblastoma cell line); z angl. rat sarcoma
RGP	radiální růst melanomu; z angl. radial growth phase
RIP	protein interagující s receptorem; z angl. receptor interacting protein
ROS	reaktivní formy kyslíku; z angl. reactive oxygen species
RPMI	z angl. Roswell Park Memorial Institute medium
RTKs	z angl. receptor tyrosine kinases
SA	sanguinarin/sanguinarine
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného; z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SL	sanguilutin/sanguilutine
SR	sanguirubin/sanguirubine
tBid	z angl. truncated Bid
TBS	z angl. Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetrametylethylendiamin
TNF	tumor nekrotizující faktor; z angl. tumour necrosis factor
TNFR	receptor tumor nekrotizujícího faktoru; z angl. tumour necrosis factor receptor
TRADD	doména smrti asociující s TNF; z angl. tumour necrosis factor associated death domain
TRAF	faktor asociující s TNF; z angl. tumour necrosis factor associated factor
TRAIL	ligand spojený s TNF indukující apoptózu; z angl. tumour necrosis factor related apoptosis-inducing ligand

VGP	vertikální růst melanomu; z angl. vertical growth phase
WB	Westernový přenos; z angl. Western blot
XIAP	antiapoptotický protein (inhibitor kaspázy-9 a kaspázy-3); z angl. X-linked inhibitor of apoptosis
z-IETD-fmk	inhibitor kaspázy-8
z-LEHD-fmk	inhibitor kaspázy-9
z-VAD-fmk	inhibitor kaspáz; z angl. carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone

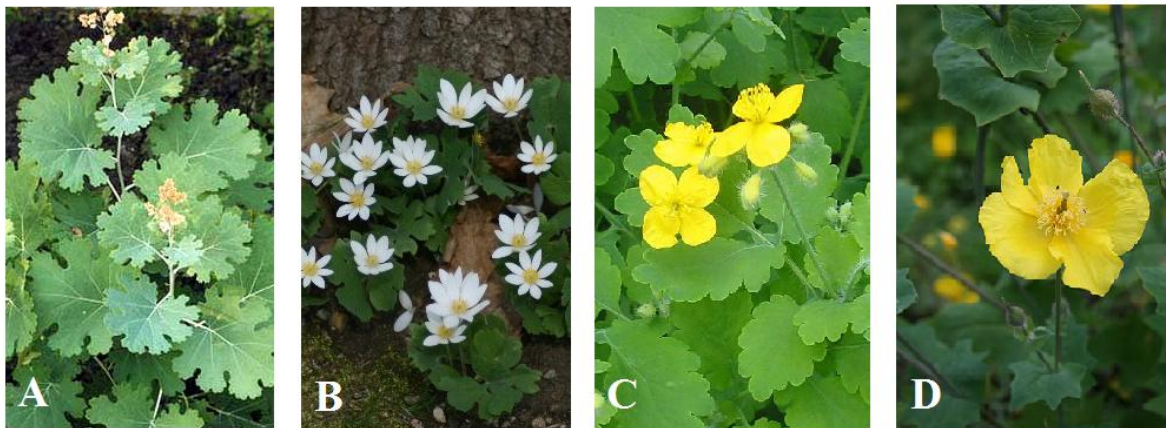
1 ÚVOD

1.1 Benzofenanthridinové alkaloidy

1.1.1 Charakteristika a výskyt benzofenanthridinových alkaloidů

Hlavní skupinou protinádorových léčiv jsou již po staletí přírodní produkty. Představují zhruba 50 % léků, 25 % z nich je odvozeno z látek získaných z vyšších rostlin (Mertens *et al.*, 1997). Mezi biologicky aktivní molekuly z přírodních zdrojů patří alkaloidy (Sen a Maiti, 1994; Chen *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2006).

Kvartérní benzofenanthridinové alkaloidy (KBA) jsou relativně malá skupina izochinolinových alkaloidů. Tyto látky jsou sekundárními rostlinnými metabolity, které jsou produkovány rostlinami čeledi *Papaveraceae* (např. *Chelidonium majus*, *Macleaya cordata*, *Sanguinaria canadensis* L., *Dicranostigma lactucoides* – Obr. 1), *Fumariaceae* (*Corydalis ophiocarpa*, *Fumaria schrammi*), *Ranunculaceae* a *Rutaceae* a díky svým rozmanitým biologickým účinkům jsou předmětem zvýšené pozornosti a studia. Rostlinné alkaloidy mají silný protinádorový, proapoptotický, antimikrobiální, protizánětlivý, analgetický a spasmolytický účinek (Slaninová *et al.*, 2014). Blokují proliferaci a indukují apoptózu v různých nádorových buňkách (Yu *et al.*, 2000; Habermehl *et al.*, 2006; Jantova *et al.*, 2007). Díky jejich antiproliferačním účinkům jsou diskutovány jako potenciální cytostatika při léčbě rakoviny (Ishikawa *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2000; Adhami *et al.*, 2003; Ahsan *et al.*, 2006). Například UkrainTM (NSC-631570), semisyntetický derivát chelidoninu, je účinný při léčbě celé řady nádorů, včetně nádorů slinivky, tlustého střeva či močového měchýře (Ernst a Schmidt, 2005).



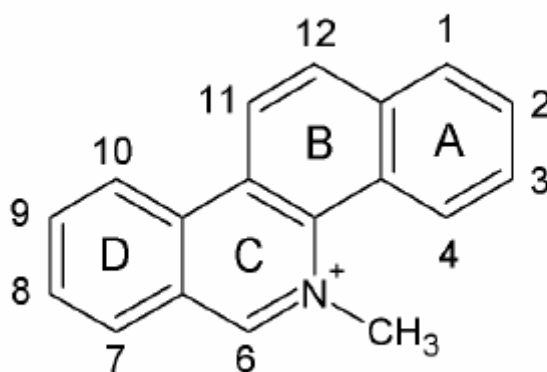
Obrázek č. 1: Rostlinné zdroje KBA. *Macleaya cordata* (okecek srdčitý; A); *Sanguinaria canadensis* (krvavěnka kanadská; B); *Chelidonium majus* (vlaštovičník větší; C); *Dicranostigma lactuoides* (D). Převzato z internetových zdrojů 1–4 a upraveno.

Hlavními představiteli KBA jsou komerčně dostupné tetrasubstituované alkaloidy sanguinarin (SA) a chelerytrin (CHE). SA, který má výrazné antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivé účinky (Chaturvedi *et al.*, 1997), je schopen v mikromolárních koncentracích inhibovat růst různých nádorových buněčných linií a vyvolat selektivní apoptotickou reakci pouze u nádorových buněk (Ahmad *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2002; Adhami *et al.*, 2004). Fakt, že SA je pro normální buňky relativně netoxický, by mohl hrát důležitou roli v léčbě rakoviny (Choi *et al.*, 2008). Méně známé jsou sanguirubin (SR) a chelirubin (CHR), které jsou předmětem studia této práce. Jsou to minoritní alkaloidy, což znamená, že se v rostlinách vyskytují v malém množství a musí být separovány ze směsi jiných alkaloidů. Je známo, že nejlepším zdrojem pro izolaci je bylina *Dicranostigma lactuoides* (Suchomelová *et al.*, 2007). Jedním z nejznámějších rostlinných zdrojů KBA SA a CHE jsou nadzemní části *Macleaya cordata* (Zhang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Kosina *et al.*, 2010). Největším zdrojem SA je severoamerická bylina *Sanguinaria canadensis* a jediný evropský zástupce *Chelidonium majus*.

Rostliny obsahující alkaloidy se používají v tradiční čínské medicíně k léčbě rakoviny, některých kožních onemocnění a zánětů (Deng a Hai-Lin, 2010). V některých zemích jsou SA a CHE aktivními složkami zubních past a ústních vod, jelikož zabraňují tvorbě zubního plaku a zlepšují kvalitu dásní (Das *et al.*, 2004).

1.1.2 Struktura benzofenanthridinových alkaloidů

Všechny KBA jsou intenzivně zbarvené (od žluté až po tmavě červenou) a mají fluorescenční vlastnosti (Kovář *et al.*, 1985). Základní strukturou KBA je N-methylbenzo[c]fenanthridinový kationt (Obr. 2). Skládá se ze 4 aromatických kruhů, které mohou být různě substituovány, dle toho, o jaký alkaloid se jedná. Chemická reaktivita KBA je založena na přítomnosti iminové $C=N^+$ vazby. Atom uhlíku této vazby, který leží v poloze 6 (C6), má velmi nízkou hustotu elektronů a je snadno přístupný k ataku nukleofilních činidel (Dostál a Slavík, 2002). V alkalických vodných roztocích se váže OH^- na kvartérní amoniovou formu a vzniká 6-hydroxyderivát neboli alkanolamin (pseudobáze). Obě formy alkaloidů se vyskytují v roztoku při fyziologickém pH a mohou se účastnit interakcí s biologickými systémy (Slaninová *et al.*, 2014). Díky kladnému náboji a polycyklické, planární struktuře kvartérní formy dochází k interakci těchto alkaloidů s DNA (Urbanová *et al.*, 2008; Táborský *et al.*, 2010). KBA interagují s DNA, indukují apoptózu a zástavu buněčného cyklu. Účinkují v koncentracích, které jsou srovnatelné s koncentracemi v cytostatikách využívaných v klinické praxi (Slaninová *et al.*, 2014).



Obrázek č. 2: N-methylbenzo[c]fenanthridinový kationt. Převzato z Šimánek *et al* (2003).

1.1.3 Interakce alkaloidů s buněčnými komponentami

Protinádorová aktivita mnoha malých organických molekul je způsobena interakcí s DNA (Bai *et al.*, 2006). KBA mají více buněčných cílů, mezi které patří zejména reakce s nukleofilními a aniontovými zbytky aminokyselin peptidů a proteinů (Schmeller *et al.*, 1997), tvorba molekulárního komplexu s DNA interkalací (Maiti *et al.*, 1982), inhibice

proteinkinázy C, Ca^{2+} -dependentní proteinkinázy C, cyklické AMP-dependentní proteinkinázy a fosfolipid-dependentní proteinkinázy C (Wang *et al.*, 1997).

1.1.3.1 Interakce s DNA

Mezi látky, které jsou schopné interagovat s DNA, patří látky schopné interkalace, mezi které patří antracyklinová antibiotika (doxorubicin), alkylační činidla (cisplatina, dakarbazin), antimetabolity (jako jsou purinové a pyrimidinové analogy) a inhibitory topoizomeráz jako jsou podofylotoxiny (etoposid) a kamptoteciny (topotecan a irinotecan). Interakce SA a CHE byla studována řadou metod a bylo prokázáno, že tyto alkaloidy tvoří komplexy s DNA (Maiti *et al.*, 1982; Sen *et al.*, 1996; Bhadra a Kumar, 2011; Vacek *et al.*, 2011).

Mezi alkaloidy a DNA existují dva typy interakcí: ireverzibilní kovalentní a reverzibilní nekovalentní. Mezi kovalentní interakce patří modifikace bází, alkylace, křížové vazby a zlomy řetězců, přičemž všechny z uvedených vedou k mutacím. Nekovalentní interakce zahrnují interkalace a vazbu na malý žlábek. Interkalace je hlavním mechanismem reakce KBA s DNA, při kterém se alkaloid vmezeří mezi dva sousední páry bází DNA. Tím se vlákna dvoušroubovice částečně rozvinou, struktura se prodlouží, zpevní a stabilizuje. Tato změna má vliv na vlastnosti a funkce DNA. Interkalující látka může například indukovat faktory ovlivňující apoptózu s následkem cytotoxického účinku. Právě to je principem některých protinádorových léčiv (Maiti a Kumar, 2007).

Alkaloidy typu SA se mohou vyskytovat v iminiové nebo alkanolaminové formě. Zatímco iminová forma představuje polycyklickou planární molekulu s kvartérním dusíkem, která je schopna interkalovat s DNA, alkanolaminové formy alkaloidů se na DNA nevážou (Maiti *et al.*, 1984; Sen a Maiti, 1994; Hossain a Kumar, 2009). Výsledky dalších biofyzikálních experimentů rovněž prokázaly, že afinita KBA je vyšší u sekvencí bohatých na GC páry, než u sekvencí bohatých na AT páry (Bai *et al.*, 2006; Adhikari *et al.*, 2008).

Také u ostatních alkaloidů byla zkoumána jejich vazebná aktivita. Slaninová *et al.* (2001; 2007) prokázali díky fluorescenci alkaloidů schopnost SA, SR, CHR a makarpinu (MA) a částečnou schopnost CHE interagovat s DNA na buněčné úrovni u různých lidských buněčných linií. U některých KBA byla po interakci s DNA pozorována změna fluorescenčních vlastností. Těchto změn je využito pro studium vstupu alkaloidů do buňky a studium struktur, na které se tyto látky vážou (Slaninová *et al.*, 2007). KBA mohou být také použity jako specifické fluorescenční sondy pro fluorescenční mikroskopii a průtokovou

cytometrii. Nejznámější DNA sondou je MA, který se využívá pro značení jádra a analýzu buněčného cyklu (Slaninová *et al.*, 2007; 2008).

Kromě přímé interakce s DNA byly popsány také nepřímé efekty KBA a jejich polosyntetických derivátů na DNA. Tyto účinky zahrnují inhibici topoizomeráz (Guo *et al.*, 2007; 2011), interakce s chromatinem a telomerami (Ji *et al.*, 2012), modulaci epigenetických změn (Selvi *et al.*, 2009) a vlivy na syntézu DNA (Schmeller *et al.*, 1997; Holy *et al.*, 2006). KBA také ovlivňují některé procesy související s replikací DNA a buněčným cyklem.

1.1.3.2 Interakce s mikrotubuly

Jedním ze základních mechanismů působení cytostatik je účinek na mikrotubuly, který má za následek zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M. Mezi nejznámější cytostatika odvozená z alkaloidů patří např. vinblastin a vinkristin, jež indukují depolymerizaci mikrotubulů, zatímco paclitaxel a docetaxel zvyšují polymerizaci mikrotubulů. Bylo zjištěno, že KBA interagují s mikrotubuly (Wolff a Knipling, 1993; Slaninová *et al.*, 2001). U HeLa buněk ovlivněných SA, CHE, sanguilutinem (SL) a chelilutinem (CHL) v nižších koncentracích bylo pozorováno ztenčení mikrotubulární sítě, zatímco vyšší koncentrace a delší expoziční časy měly za následek úplnou depolymerizaci mikrotubulů. Největší vliv na mikrotubulární síť měl SA. Možným vysvětlením tohoto výsledku by mohl být vysoký stupeň planarity SA a jeho snadná prostupnost přes membránu (Slaninová *et al.*, 2001).

1.1.3.3 Interakce KBA s p53

Úloha proteinu p53 v buněčných odpovědích na KBA je velmi důležitá kvůli interakci KBA s DNA. p53 působí jako strážce integrity genomu a má úlohu i v apoptotických drahách. Ztráta nebo mutace nádorového supresoru p53 se vyskytuje přibližně u 50 % všech lidských nádorů a zvýšená hladina jeho negativních regulátorů MDM2 (z angl. murine double minute 2) a MDMX (z angl. murine double minute X) je přítomna ve většině ostatních nádorů (Toledo a Wahl, 2006). Nádorové buňky s mutovaným nebo nefunkčním p53 jsou odolnější vůči běžně používané chemoterapii. Identifikace látek s cytostatickými účinky nezávislými na funkčním p53 by tedy mohla vést k účinnější léčbě velké části lidských nádorů. KBA byly několika autory identifikovány jako látky působící nezávisle na aktivaci p53. Hammerová *et al.* (2011) provedli experimenty na dvou buněčných liniích s nefunkčním p53. Výsledky ukázaly, že tento protein nemá zásadní roli v buněčných odpovědích na treatment KBA a že KBA mohou účinně zastavit proliferaci nádorových buněk postrádajících funkční p53.

1.2 Protoberberinové alkaloidy

Kvartérní protoberberinové alkaloidy (KPA) jsou dalším typem izochinolinových alkaloidů. Jedná se o alkaloidy biogeneticky odvozené z tyrozinu. Představují přibližně 25 % všech aktuálně známých alkaloidů s protoberberinovým skeletem. KPA se často vyskytují v rostlinách společně s KBA. Nejznámějšími zástupci KPA jsou berberin (BER), koptisin (KOP) nebo palmatin (Grycová *et al.*, 2007).

KPA vykazují řadu biologických a farmakologických aktivit, mezi které patří inhibice syntézy DNA, biosyntéza proteinů, inhibice propustnosti membrány a rozpojení oxidativní fosforylace (Schmeller *et al.*, 1997). Tyto procesy pravděpodobně přispívají k toxickým účinkům na bakterie, plísňe, rostliny, hmyz a obratlovce. Interakce s DNA a inhibice zpětné transkripce by mohly být zodpovědné za inhibici fágů a jiných virů. Interakce s neuroreceptory, inhibice ATPázy a vazba na mikrotubuly ovlivňují hlavně hmyz a obratlovce. Nejdůležitější a nejvíce studovanou vlastností KPA je cytotoxicita (Colombo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). Cytotoxická aktivita souvisí s indukcí apoptózy a inhibicí telomerázy.

Nejběžnějším KPA je BER. BER inhibuje řadu enzymů, např. NADH oxidázu, reverzní transkriptázu nebo diaminooxidázu. Mechanismem interkalace interaguje s DNA, poly(A) fragmenty mRNA a tRNA (Nandi *et al.*, 1990). Srovnávací studie inhibičních a protinádorových účinků KPA a KBA ukázaly, že účinky KPA jsou výrazně slabší (Slaninová *et al.*, 2001).

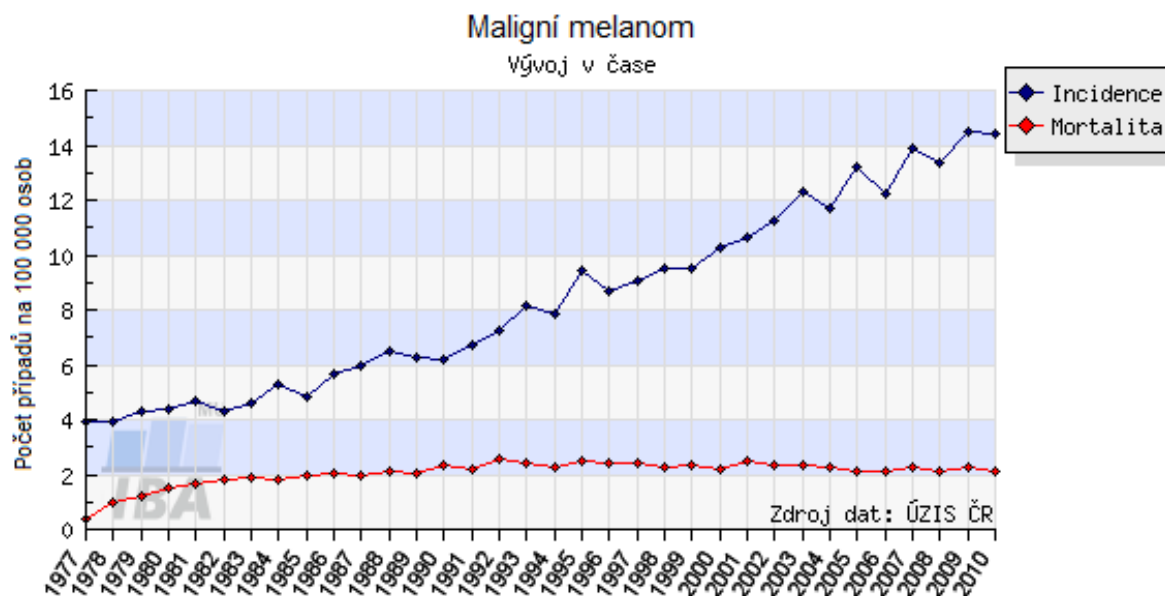
1.3 Maligní melanom

Maligní melanom je svým téměř epidemickým vzestupem incidence a vysokou úmrtností považován za moderní černý mor. Jedná se o agresivní nádorové onemocnění, které vzniká neoplastickou transformací melanocytů. Melanom je šestým nejčastějším nádorem a zároveň se jedná o maligní onemocnění s nejvyšším nárůstem výskytu (Dahl a Guldborg, 2007).

1.3.1 Epidemiologie, rizikové faktory

Výskyt maligního melanomu se v mnoha zemích s bílou populací zvyšuje (Obr. 3). Ačkoliv toto onemocnění tvoří méně než 5 % zhoubných nádorů kůže, je zodpovědné téměř za 80 %

úmrtí spojených s rakovinou kůže (Miller a Mihm, 2006). Frekvence výskytu je úzce spojena s barvou kůže a taktéž závisí na geografické zóně. Nejvyšší výskyt maligního melanomu je v Queenslandu v Austrálii (MacLennan *et al.*, 1992). Obecně nižší výskyt je u jedinců tmavé pleti, jako jsou Afričané, Asiaté a Hispánci.



Obrázek č. 3: Nárůst incidence maligního melanomu v České republice. Převzato z www.svod.cz a upraveno.

Incidence v Evropě a USA se pohybuje okolo 15 případů na 100 000 obyvatel. Konkrétně v Evropě je každý rok nově diagnostikováno přibližně 26 000 případů melanomu u mužů a 35 000 případů u žen, přičemž každý rok 8 500 mužů a 8 000 žen na tuto nemoc umírá (Ferlay *et al.*, 2002). Nejvíce pacientů ročně je diagnostikováno v Austrálii a na Novém Zélandu a to až 60 případů na 100 000 obyvatel. V těchto zemích je maligní melanom nejčastějším typem rakoviny (Marks 2000; Marrett *et al.*, 2001).

Prognóza se díky časně detekci melanomu v léčitelném stádiu zlepšuje. Výskyt u žen i mužů je podobný, u dětí je tato nemoc výjimkou. Na rozdíl od ostatních typů rakoviny kůže se maligní melanom projevuje v mladším věku. Zhruba 50 % všech případů je diagnostikováno před 55. rokem života (Garbe a Leiter, 2009). Nejčastější místa výskytu maligního melanomu jsou trup (43,5 %), končetiny (33,9 %), akrální části těla (prsty končetin, nos, uši, brada a podobně; 11,9 %) a hlava a krk (10,7 %) (Radović-Kovacević *et al.*, 1997).

Hlavním faktorem ovlivňujícím výskyt melanomu jsou rasové rozdíly v pigmentaci kůže a reakce pokožky na sluneční záření. Lze říci, že u lehce pigmentované rasy je melanom přibližně třikrát až čtyřikrát běžnější (Crombie, 1979). K rozdílu v pigmentaci dochází v důsledku kolísání melanogeneze a obsahu melaninu v kůži (Armstrong a Holman, 1987). Melanin má fotoprotektivní vlastnosti a na kůži působí jako filtr, kdy rozptyluje sluneční záření a pohlcuje ultrafialové záření. Melanin je produkován melanocyty, což jsou buňky neuroektodermálního původu nacházející se v bazální vrstvě epidermis a vlasových váčků (Fitzpatrick, 1971; Nordlund a Boissy, 2001). Melaninový pigment je produkován ve specifických cytoplazmatických organelách melanocytů zvaných melanosomy. Transformace melanocytů do buněk melanomu je stále relativně nejasná (Uong a Zon, 2010). Do této přeměny je pravděpodobně zapojena kombinace upregulace a downregulace efektorů, které působí na různé molekulární dráhy (Palmieri *et al.*, 2009) a dále také modifikace proteinů buněčného cyklu (např. cyklin D1, pRb a p16). V transformaci a progresi benigního névu¹ na melanom byla prokázána progresivní ztráta p16 a progresivní nárůst exprese cyklinu D1 a pRb (Karim *et al.*, 2009).

Na vzniku maligního melanomu se podílí interakce exogenních a endogenních rizikových faktorů. Až 65 % souvisí se slunečním zářením. Dramatický nárůst výskytu melanomu v průběhu posledních 50 let lze alespoň z části připsat změnám návyků vystavování se slunci (Tucker a Goldstein, 2003). Nicméně vztah mezi melanomem a UV zářením je poměrně složitý, což dokládá menší výskyt u osob pracujících venku ve srovnání s osobami pracujícími vevnitř. Jediným možným vysvětlením tohoto paradoxu je, že chronicky opálená kůže je méně náchylná k tvorbě melanomu (Houghton a Viola, 1981; Tucker a Goldstein, 2003), což by mohlo také vysvětlit nižší riziko melanomu u černochoďů a vyšší u osob se světlou pokožkou a zrzavými vlasy, kteří jsou méně schopni produkovat pigment v důsledku genetických variant receptoru melanokortinu-1 (Valverde *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 2000). Mezi další faktory patří kromě již zmíněné světlé kůže a blond či zrzavých vlasů také četné pihy, špatné opalování a tendence spálit se na slunci (fototyp kůže 1-3) (Whiteman a Green, 1999), přítomnost více než 50 získaných névů (Schneider *et al.*, 1994), névy větší než 6 mm (Naldi *et al.*, 2000), užívání solárií, onemocnění Xeroderma pigmentosum, imunosuprese, expozice karcinogenním chemickým sloučeninám, jizvy, Marjolinův vřed² (Gan *et al.*, 1995) a genetické faktory (Grange *et al.*, 1995). 8 - 12 % maligních melanomů je způsobeno geneticky, což má pravděpodobně souvislost s mutací

¹ nezhooubný kožní útvar vzniklý místním nahromaděním melanocytů

² maligní vřed, který vzniká v předchozí jizvě nebo benigním vředu

v genu CDKN2A (z angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), který kóduje p16 a leží na chromozomu 9p21.

Zahájení a progres melanomu jsou doprovázeny řadou histologických změn, které jsou popsány v Clarkově modelu (Clark, 1991). Tento model zahrnuje pět fází: 1. névus, tj. benigní léze charakterizována zvýšeným počtem vnořených melanocytů; 2. dysplastický névus vyznačující se náhodnou a nesouvislou cytologickou atypií; 3. fáze radiálního růstu (RGP, z angl. radial growth phase) melanomu, kde buňky získávají schopnost proliferace; 4. fáze vertikálního růstu (VGP, z angl. vertical growth phase) melanomu, kde buňky získávají schopnost proniknout přes bazální membránu do škáry a podkožní tkáně; 5. metastatický melanom vyznačující se šířením buněk do jiných oblastí kůže a ostatních orgánů. Nejkritičtější částí progresu je přechod z RGP do VGP, kdy dochází k nekontrolovatelnému růstu zprostředkovanému keratinocyty, což je jeden z nejsilnějších prediktorů metastazujícího onemocnění a nepříznivého klinického výsledku (Tsao *et al.*, 2004).

U podezřele pigmentovaných lézí je nutné provést biopsii k vyloučení či potvrzení melanomu (Dolianitis *et al.*, 2005).

1.3.2 Genetika maligního melanomu

Hnací silou iniciace vývoje melanomu je získání somatických mutací v klíkových regulačních genech. V souvislosti s vývojem melanomu byly objeveny dva geny: CDKN2A (p16) na chromozomu 9p21 a CDK4 (z angl. cyclin-dependent kinase 4) na chromozomu 12 (Bataille, 2000). Gen CDKN2A funguje jako nádorový supresor a hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a stárnutí. Mutace tohoto genu souvisí s projevem familiárního melanomu. Mezi další geny související s náchylností k malignímu melanomu patří například MC1R (gen kódující receptor melanokortinu-1, z angl. melanocortin-1 receptor; mutace tohoto genu jsou příčinou odlišné pigmentace) nebo geny řídící opravy DNA (Bataille, 2003). Pro melanomy jsou typické onkogenní mutace genů BRAF (RAF rodina) a NRAS (z angl. neuroblastoma cell line), které vykazují časté chromozomální aberace, kam patří ztráty chromozomů 6q, 8p, 9p a 10q a získání chromozomů 1q, 6p, 7, 8q, 17q a 20q, zatímco u benigních névů při srovnávací celogenomové hybridizaci (CGH, z angl. comparative genome hybridization) či karyotypování nebyly zjištěny žádné chromozomální odchylky (Bastian *et al.*, 2003).

První gen, u kterého byla zjištěna souvislost se vznikem melanomu, byl NRAS. Mutace tohoto genu byly objeveny v 15–25 % melanomových buněčných linií a primárních nádorů (Tsao *et al.*, 2000; Demunter *et al.*, 2001). NRAS patří do rodiny malých guanin nukleotid-vazebných proteinů RAS (z angl. rat sarcoma), které dále zahrnují také HRAS (z angl. Harvey murine sarcoma virus) a dvě sestřihové varianty genu KRAS (z angl. Kirsten murine sarcoma virus) (Giehl, 2005). Mutace NRAS a KRAS se vyskytují u různých lidských nádorů, u melanomu jsou však nejčastější. Přítomnost mutace HRAS u melanomu je velmi vzácná (Whitwam *et al.*, 2007). Téměř všechny mutace NRAS související s melanomem zahrnují substituci glutaminu na kodonu 61, obvykle za arginin, lysin nebo leucin. V reakci na různé buněčné podněty, včetně ligandem zprostředkované aktivace receptoru tyrozin kináz (RTKs, z angl. receptor tyrosine kinases), RAS s navázaným GTP aktivuje RAF (z angl. rapidly accelerated fibrosarcoma) na vnitřní straně buněčné membrány a dochází k fosforylaci řízené aktivaci kaskády RAF-MEK-ERK.

Kinázy RAF jsou serin/treonin specifické proteinkinázy, které aktivují kinázu MEK (z angl. MAPK/extracellular signal-regulated kinase) a tím následně ERK (z angl. extracellular signal-regulated kinases). U lidí existují tři RAF geny: ARAF, BRAF a CRAF (Wellbrock *et al.*, 2004). Mutace BRAF jsou nejčastější mutace u melanomu s výskytem 50–70 % (Davies *et al.*, 2002, Gorden *et al.*, 2003). Konkrétně substituce valinu za glutamovou kyselinu v pozici 600 (V600E) představuje více než 90 % všech mutací BRAF v melanomu (Wan *et al.*, 2004). Tato mutace se vyskytuje v 80 % benigních a dysplastických névů, což naznačuje, že se jedná o jednu z prvních událostí vedoucí k tvorbě melanomu (Pollock *et al.*, 2003). Mutace BRAF a NRAS se zároveň ve stejném nádoru vyskytují zřídka (Davies *et al.*, 2002; Christensen a Guldberg, 2005; Goel *et al.*, 2006), což signalizuje efektivitu obou mutantů v aktivaci MEK-ERK dráhy. Výskyt NRAS nebo BRAF mutací v 80–90 % všech melanomů naznačuje, že aktivace RAS-RAF-MEK-ERK dráhy by mohla představovat základní krok v transformaci melanocytů. Některé chemické inhibitory složek této dráhy se staly cílem klinických výzkumů. Zatím nejúčinnější látkou proti melanomu jsou inhibitory MEK. Je zajímavé, že k inhibitorům MEK byly citlivé pouze buněčné linie nesoucí mutaci BRAFV600E, nikoli linie nesoucí mutace NRAS kodonu 61. Toto zjištění vede k závěru, že typizace mutací NRAS a BRAF by mohla vést k identifikaci pacientů, kteří by s větší pravděpodobností reagovali na léčby MEK inhibitory (Solit *et al.*, 2006).

1.3.3 Možnosti terapie

Maligní melanom je odolný vůči terapii. Stejně jako u většiny maligních onemocnění je i tady prognóza velmi závislá na klinickém stádiu (rozsahu nádoru) v době diagnózy, podle toho se také určuje výběr léčby. Jestliže je melanom diagnostikován brzy, je možná léčba chirurgickou resekcí. Metastatická forma tohoto onemocnění je do značné míry odolná vůči stávající terapii a má špatnou prognózu se střední mírou přežití 6 měsíců, 5 let se dožívá méně než 5 % pacientů. K dispozici je několik schválených adjuvantních terapií maligního melanomu, mezi které patří monochemoterapie (léčba jedním preparátem), polychemoterapie (kombinace více terapeutických preparátů), cílená léčba a biochemoterapie (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Monochemoterapie má v léčbě neresekovatelného či metastazujícího melanomu omezenou účinnost. Řada chemoterapeutických látek je účinná vůči melanomu, nicméně míra odpovědi léčby nepřesahuje 25 %. Mezi tyto látky diskutované v souvislosti s léčbou maligního melanomu patří dakarbazin, sloučeniny platiny, *Vinca* alkaloidy, nitrosomočoviny a taxany. Dakarbazin je nejběžněji používané léčivo ve Spojených státech. Jedná se o alkylační činidlo s mírou odpovědi mezi 7 % a 25 % (Bedikian *et al.*, 2006). Dakarbazin byl zaveden před více než 30 lety a je jediným chemoterapeutickým léčivem pro metastazující melanom schváleným FDA (z angl. Food and Drug Administration). Temozolomid, imidazotetrazinový derivát dakarbazinu, je další cytotoxické alkylační činidlo a má tytéž aktivní metabolity jako dakarbazin. Temozolomid se obvykle používá v léčbě solidních nádorů, jako jsou nádory mozku, jelikož je schopný procházet přes hematoencefalickou bariéru. Z tohoto důvodu by mohl být alternativou dakarbazinu v léčbě mozkových metastáz, při které je dakarbazin neefektivní. Temozolomid zatím prošel prvními třemi fázemi klinických studií (Bleehen *et al.*, 1995; Middleton *et al.*, 2000). Medián celkového přežití pacientů léčených temozolomidem je 7,7 měsíců a 6,4 měsíců u pacientů léčených dakarbazinem. Monochemoterapie temozolomidem má u některých pacientů výhody, sice zatím nebyla schválena FDA pro pokročilá stadia melanomu, avšak i přesto se v USA k léčbě používá (Jilaveanu *et al.*, 2009). Další dvě chemoterapeutické látky, které jsou účinné při léčbě metastazujícího melanomu, jsou cisplatina a karboplatina (Glover *et al.*, 2003). Co se týká *Vinca* alkaloidů, nejběžněji studovaným léčivem je vindesin, derivát vinblastinu (Emmert *et al.*, 2003). Mezi taxanové sloučeniny patří paclitaxel, rostlinný produkt izolovaný z kůry stromu *Taxus brevifolia*, a docetaxel extrahovaný z jehličí *Taxus baccata*.

Celkově lze říci, že existuje mnoho potenciálních látek, u kterých je diskutován účinek v souvislosti s léčbou pokročilého melanomu, avšak žádné z nich není tak účinné jako dakarbazin. Z tohoto důvodu jsou chemoterapeutické látky často kombinovány s jinými chemoterapeutiky či biologickými látkami. Cílem polychemoterapie je zvýšit míru odezvy a docílit lepších výsledků. Nejrozšířenější je tříslučková kombinace cisplatinu, vinblastinu a dakarbazinu (tzv. CVD) a čtyřslučková kombinace cisplatinu, dakarbazinu, karmustinu a tamoxifenu známá také jako DBCT (Dartmouth regimen).

Další možností léčby je léčba cílená. Ve většině melanomů dochází ke konstitutivní aktivaci mitogenem aktivované proteinkinázové (MAPK, z angl. mitogen-activated protein kinase) dráhy (RAS-RAF-MEK-ERK). Stejně jako v případě jiných typů rakoviny i zde je výzkum zaměřen na cílenou léčbu (kdy dochází k inhibici specifických proteinů). Mezi aktuálně studovaná cílená terapeutika patří například sorafenib, což je multikinázový inhibitor, který byl původně vyvinut jako inhibitor RAF kinázy. Bylo prokázáno, že sorafenib inhibuje mnoho proteinů, jako je BRAF, CRAF, MEK, ERK, vaskulární endoteliální receptor růstového faktoru 2 a 3, destičkový receptor růstového faktoru β (PDGFR- β , z angl. platelet-derived growth factor receptor β) a p38a (faktory podílející se na angiogenezi a progresi nádoru) (Karasarides *et al.*, 2004).

Poslední možností je použití biochemoterapie. Jedná se o kombinaci chemoterapie a imunoterapie – použití chemoterapie (CVD = cisplatina, vinblastin a dakarbazin) a následně imunoterapie (interleukin-2; interferon- α) či současně chemoimunoterapie (Tarhini a Agarwala, 2006). Nejčastěji používanou adjuvantní imunoterapií pro pokročilé melanomy je interferon- α , jehož účinnost je ale stále předmětem diskuze. Dalším schváleným je interleukin-2, avšak míra odezvy je nízká a relativně velkým problémem je toxicita (Tarhini a Agarwala, 2006). Zatím nebyla vyvinuta žádná systémová léčba, která by zlepšovala celkové přežití pacientů s pokročilým metastazujícím melanomem. Tento problém se stal předmětem výzkumu mnoha vědeckých skupin.

1.4 Buněčná smrt

Dráhy buněčných smrtí jsou jedním z klíčových mechanismů existence a integrity mnohobuněčných organismů, normální homeostázy, buněčné proliferace a diferenciace. Vývoj a homeostáza organismů závisí na rovnováze mezi přežitím buněk a buněčnou smrtí. Jednoduše řečeno – není života bez smrti (Berghe *et al.*, 2014). Dysregulace buněčné smrti

může vést k rakovině, vývojovým abnormalitám a autoimunitním poruchám (Thompson, 1995).

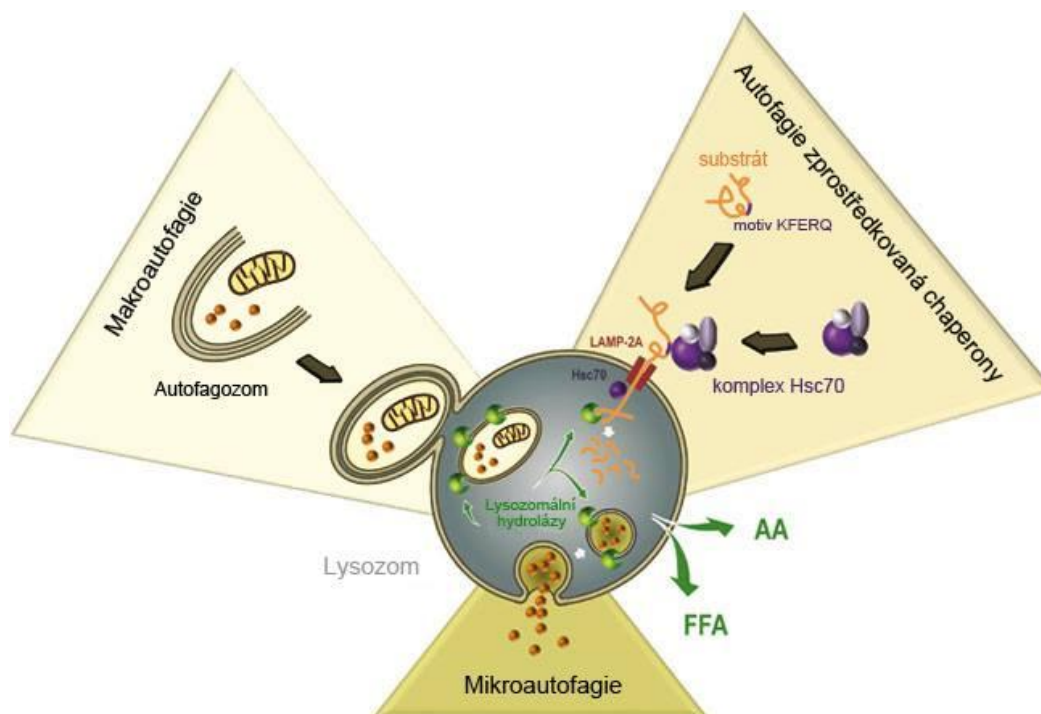
V současné době se rozlišuje několik typů buněčných smrtí, přičemž mezi tři základní patří apoptóza, autofagie a nekróza. Liší se ve funkci, morfologii i enzymologii (Galluzzi *et al.*, 2012). Některé formy buněčné smrti mohou být vyvolané ve stejné tkáni, přičemž apoptóza je nejrychlejší. Mnoho autorů již studovalo různé formy buněčné smrti, avšak práce popisující interakce a vzájemnou závislost mezi těmito procesy nejsou příliš časté a tato otázka není zcela objasněna (Chaabane *et al.*, 2013).

1.4.1 Autofagie

Autofagie je evolučně vysoce konzervovaná degradační dráha. Souvisí s celou řadou fyziologických a patologických procesů, včetně přežití buněk, buněčné smrti, buněčného metabolismu, vývoje, infekce, imunity a stárnutí (Mehrpour *et al.*, 2010). Autofagie se také úzce podílí na etiologii mnoha důležitých lidských onemocnění jako je rakovina, neurodegenerativní onemocnění a poruchy metabolismu (Meijer a Codogno, 2009).

Autofagie je morfologicky definována jako typ buněčné smrti, která je charakterizována absencí kondenzace chromatinu a masivní autofagickou vakuolizací cytoplazmy (Yu *et al.*, 2004). Autofagie je aktivována buněčným stresem, jako je hladovění, hypoxie, poškození DNA nebo stres endoplazmatického retikula. V této souvislosti má autofagie cytoprotektivní roli (Kroemer *et al.*, 2010). Nádorové mikroprostředí je chudé na živiny a kyslík, což vede k indukci autofagie. Taktéž zmírňuje poškození genomu a mutace nádorových buněk, což naznačuje, že autofagie může zpomalovat nádorový vývoj (Mathew *et al.*, 2007).

Autofagie je proces lysozomální degradace, při kterém buňka tráví své vlastní komponenty pro udržení životně důležitých buněčných funkcí během hladovění nebo degraduje poškozené a přestárlé organely a špatně složené proteiny. U savců autofagie buňku většinou chrání před hromaděním poškozených organel, ztrátou interakce s extracelulární matrix, ale i před účinkem cytostatik (Scarletti *et al.*, 2008). Ochranná role autofagie proti buněčné smrti se však nevztahuje pouze k apoptóze, ale také k nekróze. Antinekrotická funkce autofagie má důležité biologické role v různých patologických procesech a onemocněních jako je například rakovina (Esposti *et al.*, 2010).



Obrázek č. 4: Typy autofagie podle mechanismu působení. Převzato z Wirawan *et al.* (2012) a upraveno.

Podle mechanismu působení je možné autofagii rozdělit na 3 typy: makroautofagii, mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony (Obr. 4) (Mizushima a Komatsu, 2011). Makroautofagie se vyznačuje tvorbou dvoumembránových autofagozomů. Tyto vezikuly přebírají kontrolu nad nepárovými organelami nebo nežádoucími buněčnými komponentami a dodávají je lysozomům k degradaci a recyklaci (Klionsky, 2007).

Naproti tomu u mikroautofagie k tvorbě autofagozomů nedochází. Proteiny a buněčné částice se do lysozomu dostávají invaginací (Farré *et al.*, 2009). Autofagie zprostředkovaná chaperony je typická tím, že proteiny degraduje pouze selektivním způsobem. Je specifická pro proteiny, které mají ve své struktuře pentapeptidový motiv KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) nebo jeho strukturní analogy (okolo 30 % všech cytoplazmatických proteinů) (Dice, 1990). Nicméně role autofagie je kontroverzní proces – je totiž otázkou, zda nádorové buňky zabíjí či je naopak chrání před nepříznivými podmínkami (Yousefi a Simon, 2009).

1.4.2 Apoptóza

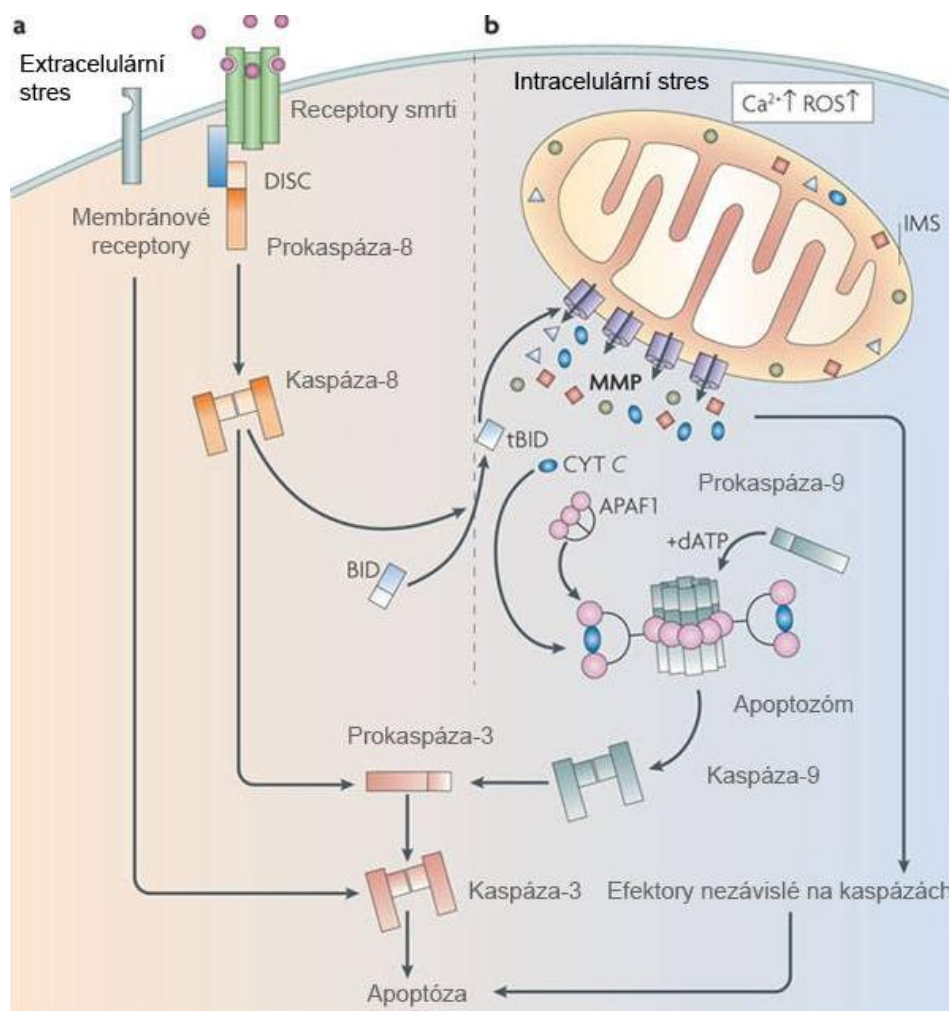
Apoptóza je programovaná buněčná smrt zprostředkovaná rodinou cystein dependentních aspartát specifických proteáz (kaspáz), které nevyvolávají zánět. U zdravého dospělého člověka podstoupí apoptózu přibližně 10 milionů buněk za den (Curtin a Cotter, 2003). Tento mechanismus je důležitý nejen k zachování homeostázy organismu, ale také ke kontrole velikosti a tvaru tkáně v různých vývojových stádiích (Los *et al.*, 1999) a k odstraňování nežádoucích, dysfunkčních a infikovaných buněk nebo buněk s poškozenou DNA (Kinloch *et al.*, 1999). Indukce apoptózy je hlavním mechanismem účinku cytostatik.

V průběhu apoptózy buňky podstoupí spoustu morfologických změn, mezi které patří smršťování buňky, zhušťování cytoplazmy, rozpad jádra, kondenzace chromatinu, fragmentace DNA a bobtnání membrány. Tyto změny jsou následované fragmentací celé buňky do tzv. apoptotických tělísek s malými, téměř sférickými, cytoplazmatickými fragmenty zapouzdřenými v buněčné membráně. Díky tomu nedochází k vylití intracelulárního obsahu a vyvolání zánětlivé reakce. Apoptotická tělíska mohou obsahovat funkční organely obklopené intaktní plazmatickou membránou. Fosfatidylserin, fosfolipid vnořený do plazmatické membrány, je vystaven na vnější straně apoptotických tělísek a funguje jako tzv. „eat me“ signál, čímž přitahuje makrofágy a dochází k fagocytóze (Elmore, 2007).

V procesu indukce apoptózy hraje rozhodující roli rodina proteinů Bcl-2 (z angl. B-cell lymphoma 2) (Weerasinghe *et al.*, 2001). Za normálních okolností jsou tyto proteiny umístěny v mezimembránovém prostoru mitochondrií a v reakci na různé apoptotické stimuly se uvolňují do cytosolu, kde iniciují apoptózu. Do této rodiny proteinů patří antiapoptotické Bcl-2 a Bcl-xL (z angl. B-cell lymphoma-extra large) a proapoptotické Bax (z angl. Bcl-2-associated X protein), Bcl-xS (B-cell lymphoma-extra small), Bad (z angl. Bcl-2-associated death promoter), Bak (z angl. Bcl-2 homologous antagonist/killer), Bid (z angl. BH3 interacting-domain death antagonist) a Bik (z angl. Bcl-2-interacting killer). Signály indukující apoptózu způsobují přesun proapoptotických proteinů z cytoplazmy do vnější mitochondriální membrány a usnadňují uvolňování některých složek včetně cytochromu c a faktoru indukujícího apoptózu (AIF, z angl. apoptosis inducing factor) z mitochondrií do cytosolu, což vede k apoptotické buněčné smrti (Kroemer, 1997).

Apoptóza závislá na kaspázách je iniciována buď vnějšími nebo vnitřními faktory (Obr. 5). Vnější dráha je aktivována zapojením transmembránových receptorů smrti patřících

do proteinové rodiny TNFR (z angl. tumour necrosis factor receptor). Na tyto receptory se váží ligandy smrti (např. tumor nekrotizující faktor TNF nebo FasL) a přes adaptorové molekuly FADD (z angl. Fas-associated death domain protein) a TRADD (z angl. tumour necrosis factor associated death domain) přenáší signál do cytoplazmy a aktivací prokaspázy-8 zahajují kaspázovou kaskádu. Vnitřní mitochondriální dráha je regulována proteinovou rodinou Bcl-2. Tyto proteiny řídí propustnost mitochondriální membrány. Díky aktivaci proapoptotických proteinů Bax a Bak se cytochrom c, který je umístěný na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány, uvolňuje do cytosolu, kde se spolu s ATP váže k apoptotickému faktoru Apaf-1 (z angl. apoptosis protease activating factor 1) a formuje komplex, který se nazývá apoptozóm (Elmore, 2007). Apoptozóm aktivuje prokaspázu-9 na kaspázu-9, což vede k aktivaci exekučních kaspáz (kaspáza-3, kaspáza-6, kaspáza-7) (Sawai, 2013).



Obrázek č. 5: Vnější a vnitřní dráha apoptotické buněčné smrti. Převzato z Galluzzi *et al.* (2009) a upraveno.

Jedním z charakteristických znaků rakoviny jsou poruchy apoptózy (Hanahan a Weinberg, 2011). Z toho důvodu je v terapii rakoviny velmi důležité hledání nových biologicky aktivních molekul, které by byly schopny aktivovat apoptotickou smrt v nádorových buňkách (Mansoor *et al.*, 2013).

1.4.3 Nekróptóza

Nekróza jako katastrofická buněčná smrt je známá již dlouhou dobu. Její příčinou je ireverzibilní poškození buňky vnějšími faktory, což vede k dysfunkci mitochondrií, disrupci membrány, uvolnění buněčného obsahu a zánětlivé reakci (Jain *et al.*, 2013). Novější studie však prokázaly, že existuje i speciální podtyp této buněčné smrti – nekroptóza. Zatímco nekróza je charakterizována jako neprogramovaná buněčná smrt, nekroptóza byla popsána jako nový typ neapoptotické programované buněčné smrti (Degeretev *et al.*, 2008), mezi jejíž projevy patří zvýšená produkce kyslíkových radikálů (ROS, z angl. reactive oxygen species) (Schulze-Osthoff *et al.*, 1992), zvýšená glykolýza (Zhang *et al.*, 2009), aktivace fosfolipáz (Suffys *et al.*, 1991) nebo indukce lyzozomální membránové permeabilizace (Edinger a Thompson, 2004).

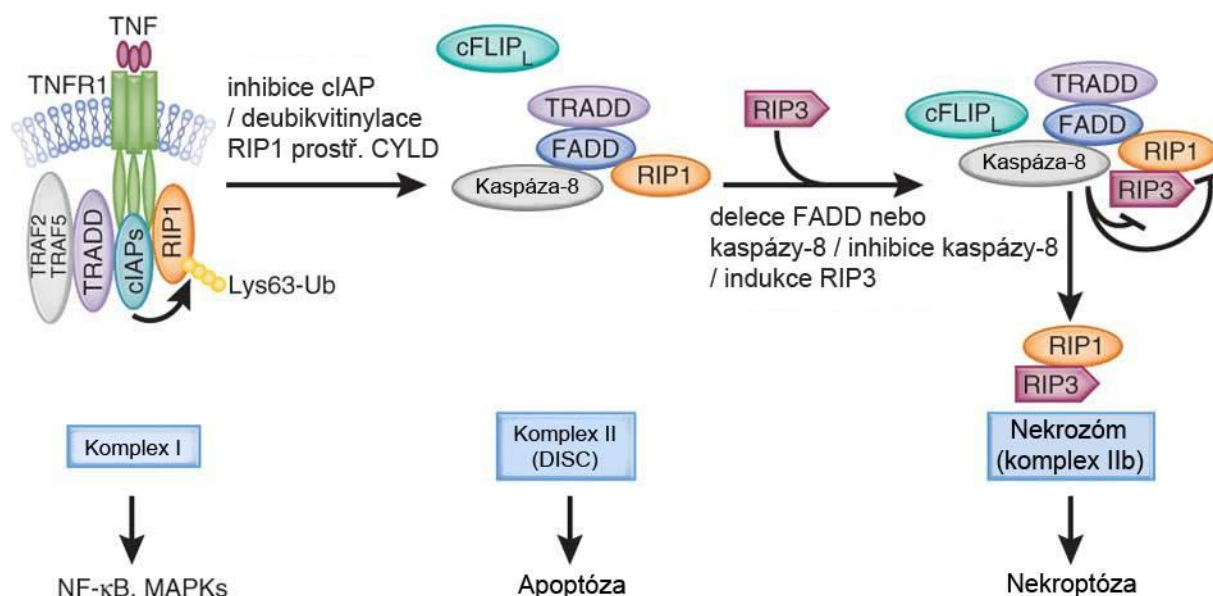
Nekroptóza může být stejně jako apoptóza iniciována navázáním ligandu na některý z receptorů smrti (Vercammen *et al.*, 1997). Nejčastěji využívaným receptorem smrti je receptor TNFR1; mezi často se vázající ligandy pak patří rodina proteinů TNF (z angl. tumour necrosis factor), které jsou považovány za silné induktory nekroptózy (Obr. 6). Po navázání TNF na receptor smrti následuje tvorba komplexu I (TRAF2-TRAF5, TRADD, cIAPs, RIP1) a deubikvitinylace kinázy RIP1 (z angl. receptor interacting protein) pomocí proteinu cIAPs (z angl. cellular inhibitor of apoptosis protein). Deubikvitinylace kinázy RIP1 umožňuje vazbu dalších proteinů a vytvoření komplexu II (TRADD, FADD, RIP1, kaspáza-8). Důležitou částí komplexu II je kaspáza-8, jejíž aktivita rozhoduje o tom, zda buňka zemře procesem apoptózy či nekroptózy. V případě, že v komplexu II dojde k homodimerizaci kaspázy-8, celý komplex je pomocí autoproteolytického zpracování aktivován a dochází k rychlé indukci apoptózy. Pokud však dojde k vazbě proteinu cFLIP_L (z angl. cellular FLICE-like inhibitory protein, long splice variant) ke kaspáze-8, je zabráněno její dimerizaci, což způsobuje inhibici apoptózy. Úplná inaktivace kaspázy-8 pak vede k aktivaci RIP1 a indukci nekroptózy (Oberst *et al.*, 2011).

Po indukci nekroptózy dochází pomocí RIP kináz k fosforylaci proteinu MLKL (z angl. mixed lineage kinase domain-like) a k tvorbě multiproteinového signálního komplexu

nekrozómu. Tento signální komplex se skládá z proteinů RIP1, RIP3 a MLKL a jeho tvorba může být ovlivněna řadou procesů. Mezi negativní regulátory tvorby nekroptozómu patří např. faktory FADD, inhibiční protein FLICE (z angl. FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme) (Vandenabeele *et al.*, 2010; Vercammen *et al.*, 1998) nebo nekrostatiny. Jedním z nekrostatinů je např. nekrostatin Nec-1 (z angl. Necrostatin-1), jež funguje jako inhibitor aktivity kinázy RIP1 (Galluzzi *et al.*, 2011). Naopak zablokování některého z proteinů zapojených do apoptické signální dráhy (např. pomocí inhibitoru z-VAD-fmk) stimuluje tvorbu nekroptozómu a proces nekroptózy.

Některé studie (Feoktistova *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2011) ukázaly, že nekroptóza může být také indukována nezávisle na TNF, FasL a TRAIL (z angl. tumour necrosis factor related apoptosis-inducing ligand) drahách receptorů smrti tvorbou ripoptozómu (komplex RIP1, FADD a kaspázy-8).

Bylo zjištěno, že KBA SL spouští u melanomových buněk A-375 nekaspázovou buněčnou smrt – pravděpodobně nekroptózu (Hammerová *et al.*, 2012).



Obrázek č. 6: Dráha nekroptické buněčné smrti. Převzato z Han J. *et al.* (2011) a upraveno.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce je zaměřena na studium antiproliferační aktivity tří minoritních KBA – sanguirubinu, chelirubinu a sanguilutinu, dvou majoritních KBA – sanguinarinu a chelerytrinu a dvou KPA – berberinu a koptisinu, na lidské nádorové buňky, převážně buňky maligního melanomu.

Cílem mé diplomové práce bylo:

- Stanovení antiproliferační aktivity testovaných KBA a KPA na buňkách melanomu
- Stanovení toxicity vybraných KBA na různé nádorové buněčné linie
- Objasnění úlohy proteinu p53 v odpovědi buněk A-375 na přítomnost KBA
- Studium mechanismu indukce buněčné smrti, charakterizace typu buněčné smrti indukované účinkem testovaných alkaloidů (apoptóza, nekroptóza, autofagie)

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Buněčné linie a jejich kultivace

K experimentům v této práci byly použity tyto buněčné linie: A-375 (lidský maligní melanom; ECACC, Salisbury, Velká Británie), A-375-p53DD (buněčná linie odvozená z A-375, kde byla provedena stabilní transfekce plazmidu pCMVneoDDp53, který kóduje zkrácený protein p53; ten je pod kontrolou cytomegalovirového promotoru, je schopný vázat se na C-terminální doménu endogenního p53 a tím tento protein vyřadit z funkce; Hammerová *et al.*, 2011), HeLa (lidský adenokarcinom děložního krčku; ECACC, Salisbury, Velká Británie), HL-60 (akutní promyeloidní leukémie; ECACC, Salisbury, Velká Británie), HL-60 MDR (z angl. multi-drug resistance; rezistentní buněčná linie HL-60; prof. Sarkadi, Budapešť, Maďarsko), IPC-298 (lidský maligní melanom; ECACC, Salisbury, Velká Británie).

Všechny buněčné linie byly kultivovány v termostatu při 37 °C, 5% obsahu CO₂ a vysoké vzdušné vlhkosti. Pro kultivaci buněčných linií A-375, A-375-p53DD a IPC-298 bylo použito médium RPMI (Invitrogen) a DMEM (z angl. Dulbecco's modified Eagle's medium, Hy-Clone) pro linie HeLa, HL-60 a HL-60 MDR. Obě kultivační média byla doplněna o 10 % fetálního telecího séra (Gibco), 2mM L-glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 100 IU/ml penicilin (PAA) a 100 µg/ml streptomycin (PAA).

Buňky byly pasážovány přibližně třikrát týdně v závislosti na jejich růstu. Z misky bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty roztokem 1× PBS (z angl. phosphate buffer saline) (složení PBS viz Tab. 1) a následně inkubovány v roztoku Trypsin-EDTA (Hy-Clone) přibližně 2-5 minut, než se uvolnily z podkladu. Poté byl trypsin inaktivován přidáním malého množství média. Část suspenze byla přenesena na novou misku a naředěna čerstvým médiem. V případě suspenzních buněk HL-60 není nutné používat trypsin. Obsah kultivačních lahvíček byl přenesen do zkumavky a stočen. Staré médium bylo odsáto a bylo přidáno nové. Část suspenze byla přenesena do kultivační lahvičky a naředěna čerstvým médiem.

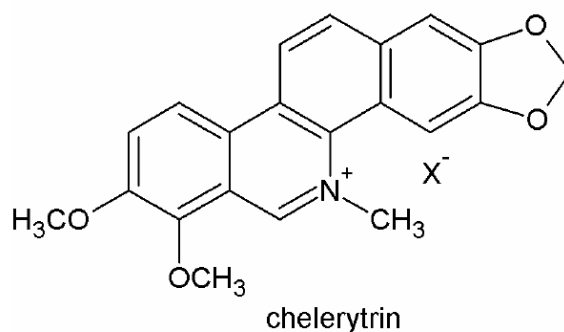
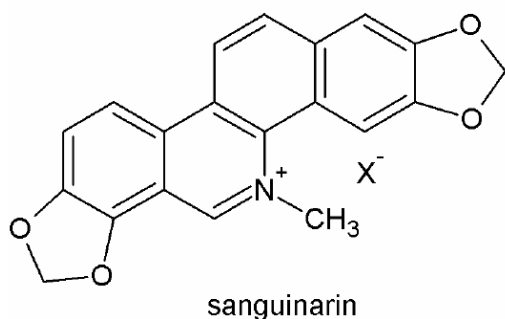
Tabulka č. 1: Složení fosfátového pufru PBS (pH 7,4)

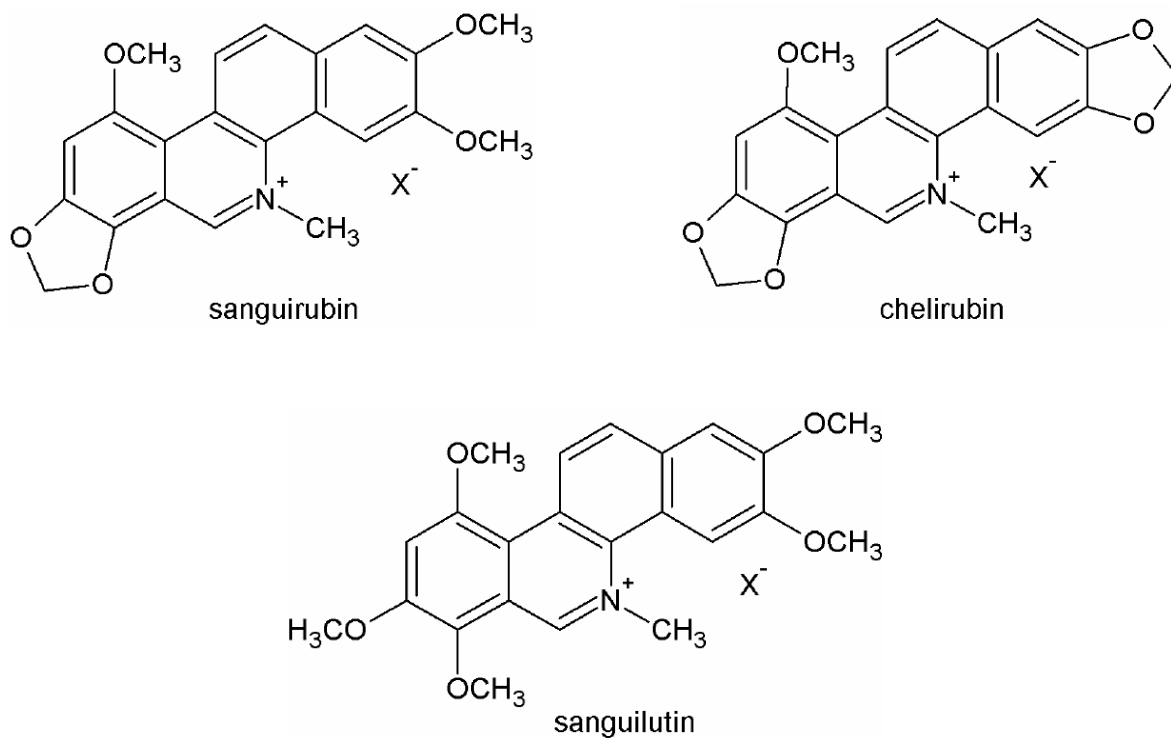
Chemikálie	Množství
NaCl (Penta, Praha, Česká republika)	8 g
KCl (Penta)	0,2 g
KH ₂ PO ₄ (Penta)	0,158 g
Na ₂ HPO ₄ (Penta)	2,31 g
Destilovaná H ₂ O	1000 ml

3.2 Použité alkaloidy

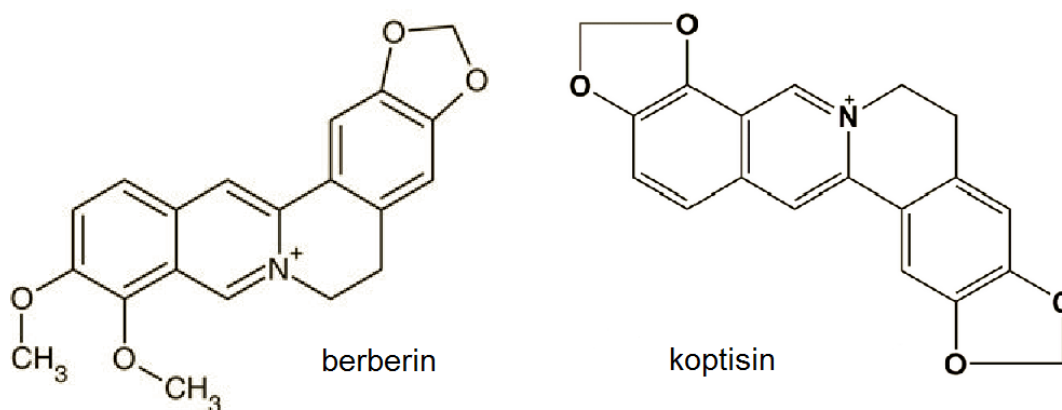
Všechny studované alkaloidy (Obr. 7) byly izolovány preparativní sloupcovou chromatografií na Biochemickém ústavu Lékařské fakulty MU v Brně. SA, CHE a CHR byly izolovány z rostlin *Dicranostigma lactuoides* (Hook F. et Thoms.) (Slavík & Slavíková, 1960); SR a SL byly izolovány ze *Sanguinaria canadensis* (L.) (Táborská *et al.*, 1978), BER a KOP ze *Stylophorum lasiocarpum* (Slavík *et al.*, 1991) (Obr. 8). Zásobní roztoky alkaloidů (1 mg/ml) byly připraveny rozpuštěním ve sterilní destilované vodě a uchovány při teplotě –20 °C.

Jak již bylo zmíněno, základní strukturou KBA je N-methylbenzo[c]fenanthridinový kationt (Obr. 2), jednotlivé alkaloidy se liší v substituentech.





Obrázek č. 7: Chemická struktura testovaných benzofenanthridinových alkaloidů. Převzato z Vavrečková a Ulrichová (1994).



Obrázek č. 8: Chemická struktura BER a KOP. BER a KOP patří mezi KPA, což je poměrně široká skupina izochinolinových alkaloidů. V rostlinách se vyskytují spolu s benzofenanthridinovými alkaloidy. Převzato z Yamasaki *et al.* (2013) a Herman *et al.* (2013) a upraveno.

3.3 Příprava buněk pro experimenty

Po trypsinizaci byly buňky přeneseny do zkumavky s čerstvým médiem a zcentrifugovány 5 minut/1000 rpm. Poté bylo médium odsáto a přidáno nové. Hustota buněk pro jednotlivé experimenty byla stanovena obarvením trypanovou modří (1:1) a počítáním buněk v Bürkerově komůrce. Následně byly buňky naředěné příslušným kultivačním médiem a v určité koncentraci vysety na kultivační desky. U experimentů byla použita koncentrace $5 \cdot 10^4$ buněk/ml.

3.4 Testování antiproliferační aktivity KBA

3.4.1 MTT test

MTT test se používá ke stanovení antiproliferační aktivity. Jedná se o kolorimetrickou metodu, při které dochází v metabolicky aktivních buňkách k redukci žluté tetrazoliové soli MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid] (Sigma-Aldrich) na fialový, ve vodě nerozpustný formazan.

Buňky byly nasazeny na 96jamkovou desku (Nunc A/S, Rockkilde, Dánsko), do každé jamky bylo napipetováno 200 μ l buněčné suspenze v koncentraci $5 \cdot 10^4$ buněk/ml. Buňky byly kultivovány 24 hodin za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). Poté bylo médium odsáto a nahrazeno médiem s testovanými alkaloidy v daných koncentracích. Po 48 hodinách byl proveden MTT test. Nejprve bylo odsáto médium, následně bylo do každé jamky napipetováno médium obsahující MTT ve finální koncentraci 445 μ g/ml. Po 4 hodinách kultivace byla tato směs odsáta a nahrazena dimethylsulfoxidem (DMSO), který rozpouští vzniklý formazan. Výsledná optická denzita vzorků byla měřena na spektrofotometrickém readeru DTX 880, Multimode Detector (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) při vlnové délce 570 nm. Každý z alkaloidů byl testován ve 4 opakováních. Experimenty byly opakovány 2–4krát.

3.4.2 Test životaschopnosti buněk

Test životaschopnosti buněk je založen na schopnosti živých buněk vyloučit fluorescenční barvivo propidium jodid (PI; Sigma Aldrich) ze svého nitra, zatímco mrtvá buňka s porušenou membránou tuto schopnost nemá.

Buňky byly kultivovány na 24jamkových deskách (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgie). Do každé jamky bylo napipetováno 500 μ l buněčné suspenze v koncentraci $5 \cdot 10^4$ buněk/ml. Buňky byly kultivovány 24 hodin za standardních kultivačních podmínek. Poté bylo médium odsáto a nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím testované alkaloidy, případně kombinací alkaloidu s daným inhibitorem. Po 48 hodinách kultivace byl obsah jamek přenesen do zkumavek na ledu. Jamky byly promyty ve fosfátovém pufru PBS, ztrypsinizovány, zcentrifugovány, médium bylo odsáto a k peletu bylo přidáno 350 μ l studeného PBS. Před měřením byl do každého vzorku přidán 1 μ l PI (1 μ g/ml PBS). Po 1 minutě inkubace v přítomnosti fluorescenčního barviva byl počet mrtvých buněk (PI-pozitivních) kvantifikován pomocí průtokového cytometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA); (kanál FL3, emisní vlnová délka 620 nm). Počet analyzovaných buněk každého vzorku byl 10 000. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních, experimenty byly opakovány 2–4krát.

Test životaschopnosti buněk s PI byl použit k následujícím experimentům:

Test cytotoxicity alkaloidů – k buněčným liniím byly přidávány testované alkaloidy: SA (0,2; 0,5; 1; 1,5 a 2 μ g/ml), CHE (0,2; 0,5; 2,5 a 3 μ g/ml), SL (0,5; 1 a 1,5 μ g/ml), SR (0,1; 0,3; 1 a 3 μ g/ml), CHR (0,1; 0,3; 1; 2,5 a 3 μ g/ml), BER (10 a 30 μ g/ml) a KOP (10 a 30 μ g/ml). V některých experimentech byl jako pozitivní kontrola použit doxorubicin (DOXO; Sigma-Aldrich) v koncentraci 1 μ g/ml nebo kamptotecin (Campt; Sigma-Aldrich) v koncentraci 10 μ M. Takto ovlivněné buňky byly kultivovány 48 hodin.

Efekt inhibitoru kaspáz, z-VAD-fmk, na cytotoxicitu daných alkaloidů – buňky linií A-375 a HeLa byly kultivovány v přítomnosti 20 μ M z-VAD-fmk (Enzo Life Sciences) po dobu 3 hodin, po uplynutí této doby preinkubace byly přidány dané alkaloidy v příslušných koncentracích. V této kombinaci byly buňky kultivovány 45 hodin.

Efekt inhibitoru RIP1 kinázy, Necrostatinu-1 (Nec-1), na cytotoxicitu daných alkaloidů – buňky linií A-375 a HeLa byly kultivovány v přítomnosti 20 μ M Nec-1 (Sigma-

Aldrich) po dobu 3 hodin, po uplynutí této doby preinkubace byly přidány dané alkaloidy v příslušných koncentracích. V této kombinaci byly buňky kultivovány 45 hodin.

Efekt inhibitoru ROS, N-acetylcysteinu (NAC), na cytotoxicitu daných alkaloidů – buňky linií A-375 a HeLa byly kultivovány v přítomnosti 10mM NAC³ (Sigma-Aldrich) po dobu 3 hodin, po uplynutí této doby preinkubace byly přidány dané alkaloidy v příslušných koncentracích. V této kombinaci byly buňky kultivovány 45 hodin.

Efekt inhibitoru autofagie, 3-methyladeninu (3-MA), na cytotoxicitu daných alkaloidů – buňky linií A-375 a HeLa byly kultivovány v přítomnosti 5mM 3-MA (Sigma-Aldrich) po dobu 3 hodin, po uplynutí této doby preinkubace byly přidány dané alkaloidy v příslušných koncentracích. V této kombinaci byly buňky kultivovány 45 hodin.

Efekt inhibitoru p53, Pifithrinu, na cytotoxicitu daných alkaloidů – buňky A-375 byly kultivovány v přítomnosti 20μM Pifithrinu (Pif; Sigma-Aldrich) po dobu 90 minut, po uplynutí této doby byly přidány dané alkaloidy v příslušných koncentracích. V této kombinaci byly buňky kultivovány 46 - 47 hodin.

Efekt inhibitoru kaspázy-8, z-IETD-fmk, na cytotoxicitu daných alkaloidů – buňky A-375 byly kultivovány v přítomnosti 20 μM z-IETD-fmk (R&D Systems) po dobu 3 hodin, po uplynutí této doby byly přidány dané alkaloidy v příslušných koncentracích. V této kombinaci byly buňky kultivovány 45 hodin.

Efekt inhibitoru kaspázy-9, z-LEHD-fmk, na cytotoxicitu daných alkaloidů – buňky A-375 byly kultivovány v přítomnosti 20 μM z-LEHD-fmk (R&D Systems) po dobu 3 hodin, po uplynutí této doby byly přidány dané alkaloidy v příslušných koncentracích. V této kombinaci byly buňky kultivovány 45 hodin.

3.5 Příprava buněčných lyzátů, polyakrylamidová elektroforéza, Westernový přenos, vizualizace proteinů

Pro přípravu buněčných lyzátů byly buňky kultivovány na 12jamkové desce. Do každé jamky byl napipetován 1 ml buněčné suspenze o koncentraci $5 \cdot 10^4$ buněk/ml. Po 24 hodinách kultivace ve standardních podmínkách bylo médium odsáto a nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím testované látky. Buněčné lyzáty byly připraveny pomocí 2× nanášecího pufru, (Sample Buffer, 2×Laemmli; Sigma-Aldrich) (složení nanášecího pufru viz Tab. 4).

³ NAC je inhibitor ROS, jejichž metabolismus je zapojen do nekroptózy.

Médium bylo přeneseno do eppendorfky, buňky byly dvakrát propláchnuty pufrem PBS a stočeny v centrifuze 5 minut/1000 rpm. Do jamek bylo napipetováno 80 μ l 2 $\times$ nanášecího pufru. Po 5 minutách, kdy pufr změnil svou konzistenci, byly buňky z jamek pufrem opláchnuty pufrem a přeneseny do eppendorfek. Poté byly lyzáty 5 minut povařeny při 95 °C, krátce stočeny v centrifuze a nanесeny na poakrylamidový gel, kde byly proteiny separovány pomocí SDS-PAGE (z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

3.5.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Při polyakrylamidové gelové elektroforéze byla použita aparatura Hoefer Small Mighty SE 250 (Hoefer, Inc., Holliston, USA). Do sestavené aparatury byl nalit nejprve dělicí gel o příslušné koncentraci (složení gelů viz Tab. 2), převrstven 1 ml 70% ethanolu a následně se nechal tuhnout po dobu 20–30 minut. Poté byl do aparatury nalit zaostřovací gel (složení gelu viz Tab. 3), do kterého byl zapuštěn hřebínek o 10 či 15 jamkách. Po dalších 20–30 minutách polymerizace byl gel zalit elektroforetickým pufrem (složení elektroforetického pufru viz Tab. 4), hřebínek byl vyjmut a do jamek byly nanесeny připravené vzorky. Do první jamky byl nanесen 1 μ l markeru molekulové hmotnosti (Fermentas International Inc.), který byl doplněn 2 $\times$ nanášecím pufrem do 15 μ l. Do dalších jamek byly nanесeny vzorky o objemu 15 μ l. Případné prázdné jamky byly vyplněny 2 $\times$ nanášecím pufrem.

Aparatura byla zapojena do zdroje napětí (PowerPac Basic Power Supply; BioRad). Na začátek elektroforézy bylo napětí nastaveno na 75 V, po přechodu proteinů do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 95 V. Jakmile se začal marker roztahovat, bylo napětí zvýšeno na 110–120 V. Proces byl ukončen ve chvíli, kdy proteiny prošly až na konec gelu.

Tabulka č. 2: Složení separačních (dělicích) gelů

Chemikálie	7,5% gel	10% gel	12,5% gel
Deionizovaná H ₂ O	1,35 ml	1,05 ml	0,75 ml
1M Tris-HCl (pH 8,8)	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
10% SDS	37,5 µl	37,5 µl	37,5 µl
10% APS	10 µl	10 µl	10 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
30% Akrylamid	0,95 ml	1,25 ml	1,56 ml

Tabulka č. 3: Složení zaostřovacího gelu

Chemikálie	5% gel
Deionizovaná H ₂ O	1,3 ml
1M Tris-HCl (pH 6,8)	234,5 µl
10% SDS	18,75 µl
10% APS	9,375 µl
TEMED	1,875 µl
30% Akrylamid	313,125 µl

3.5.2 Westernový přenos

Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury a spolu s nitrocelulózovou membránou pro westernový přenos (BioRad) (WB, z angl. western blot) a filtračními papíry (extra thick blot paper, BioRad) ponořen do vychlazeného roztoku 1× přenosového pufru (složení přenosového pufru viz Tab. 4).

Do přenosové aparatury (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer cell; BioRad) byl nejdříve umístěn filtrační papír, na něj membrána, poté gel a nakonec další filtrační papír. Pomocí plastové pipety byly vytlačeny bubliny. Uzavřená a připravená aparatura byla zapojena do zdroje (PowerPac HC Power Supply; BioRad). Pro přenos proteinů z gelu na membránu byl použit konstantní proud 0,35 A po dobu 1 hodiny.

3.5.3 Vizualizace proteinů na membráně

Po ukončení přenosu byla membrána s proteiny blokována 1 hodinu při pokojové teplotě v 5% roztoku odtučněného sušeného mléka (Laktino) v TBS (z angl. Tris-buffered saline) (složení TBS viz Tab. 4). Poté byla nanášena primární protilátka (seznam použitých primárních protilátek viz Tab. 5) naředěná do příslušné koncentrace v 5% roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS. Membrána byla s protilátkou inkubována při 4 °C 12–24 hodin.

Po inkubaci byla membrána opláchnuta 3×10 minut v 1% roztoku odtučněného sušeného mléka ředěného v TBS. Poté na ni byla nanášena sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (seznam použitých sekundárních protilátek viz Tab. 6), naředěná v 1% roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS. Membrána byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě. Následně byla membrána opět propláchnuta 3×10 minut v 1% roztoku odtučněného sušeného mléka v TBS.

Membrána byla inkubována 1 minutu s roztokem ECL (z angl. enhanced chemiluminescent substrate; GE Healthcare). V této chvíli křenová peroxidáza konjugovaná se sekundární protilátkou přeměnila substrát ECL na citlivý reagent, který se mění na tripletový karbonyl v nestabilním stavu, přičemž dochází k uvolnění energie v podobě fotonů.

Takto emitované světlo bylo detekováno v temné komoře ve světlotěsné kazetě (Amersham Hypercassette; GE Healthcare) na světlocitlivý film (AGFA CP-BU new) po dobu 1–15 minut, dle intenzity signálu. Film byl poté vyvolán ve vývojce a ustalovači.

Filmy byly následně skenovány (Epson Stylus DX4800) a upraveny v programu Picasa 3. Výsledek byl analyzován pomocí programu ImageJ. Hodnota optické denzity cílového proteinu byla normalizována vzhledem k hodnotě optické denzity PCNA nebo α -tubulinu, jež sloužily jako nanášecí kontroly. Získané hodnoty byly porovnávány s hodnotou vzorku, který sloužil v daném experimentu jako kontrola.

Tabulka č. 4: Složení pufrů používaných při polyakrylamidové elektroforéze a Westernovém přenosu

Pufr	Chemikálie	Množství
2× nanášecí pufr	1M Tris-HCl (pH 6,8) 10% SDS β -mercaptoethanol směs glycerolu (20%) a bromfenolové modři (0,01%) destilovaná voda	6,25 ml 20 ml 5 ml 5 ml 13,75 ml
10× elektroforetický	Glycin Tris deionizovaná voda	144,2 g 30,3 g 1000 ml
1× elektroforetický	10× elektroforetický pufr 10% SDS destilovaná H ₂ O	100 ml 10 ml 890 ml
1× přenosový	10× elektroforetický pufr methanol destilovaná H ₂ O	100 ml 200 ml 700 ml
10× TBS pufr (pH 7,4)	2M Tris-HCl (pH 7,4) NaCl Tween-20 destilovaná H ₂ O	5 ml 5,9 g 500 μ l 1000 ml

Tabulka č. 5: Seznam použitých primárních protilátek

Označení	Výrobce	Číslo produktu	Typ	Zdroj	Velikost (kDa)	Ředění
Bcl-xL	Cell Signaling	2764	monoklonální	K	30	1:1000
H2AX	BioLegend	613401	monoklonální	M	14	1:1000
kaspáza-3	Cell Signaling	9915	monoklonální	K	35	1:1000
štěpená kaspáza-3	Cell Signaling	9661	monoklonální	K	17, 19	1:500
Mcl-1	Sigma-Aldrich	M 8434	polyklonální	K	40	1:5000
p53	*	-	monoklonální	M	53	1:50
PARP	Cell Signaling	9915	monoklonální	K	116	1:1000
štěpený PARP	Cell Signaling	9915	monoklonální	K	89	1:1000
PCNA	*	-	monoklonální	M	29	1:70
α -tubulin	EXBIO	11-250-C100	monoklonální	M	50	1:1000
XIAP	Cell Signaling	2045	polyklonální	K	53	1:1000

Zdroj – M/K – myší/králičí protilátka

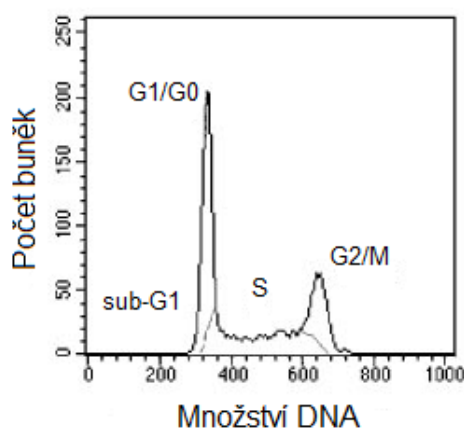
* - darováno Dr. Vojtěškem (Masarykův onkologický ústav, Brno, Česká republika)

Tabulka č. 6: Seznam použitých sekundárních protilátek

Označení	Výrobce	Číslo produktu	Zdroj	Ředění	Popis
donkey antimouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2314	anti-M	1:3500	oslí protilátka proti myšímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou
donkey antirabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2313	anti-K	1:3500	oslí protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou

3.6 Analýza buněčného cyklu

Buňky linie A-375 byly kultivovány na 12jamkové desce. Do každé jamky byl napipetován 1 ml buněčné suspenze v koncentraci 10^6 buněk/ml. Po 24 hodinách kultivace za standardních podmínek bylo odsáto médium a nahrazeno médiem novým, které obsahovalo testované alkaloidy. Takto byly buňky kultivovány dalších 24 hodin. Poté byl obsah jamek přepipetován do zkumavek (všechny následující kroky probíhaly na ledu), buňky byly promyty PBS a ztrypsinizovány. Obsah zkumavek byl zcentrifugován 6 minut/1500 rpm. Médium bylo odsáto a k peletu bylo přidáno 530 μ l PBS. Následně bylo za neustálého vortexování po kapkách přidáno 1470 μ l ledového 95% ethanolu. Po 30 minutách na ledu byl obsah zkumavek přenesen do eppendorfek. Buňky byly 3 $\times$ promyty PBS. Poté bylo přidáno 50 μ l RNázy o koncentraci 0,1 mg/ml a obsah eppendorfek byl inkubován 30 minut při 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 10 μ l PI o koncentraci 1 mg/ml. Buněčný cyklus byl analyzován pomocí průtokového cytometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). Vzorový histogram rozložení fází buněčného cyklu ukazuje Obr. 9.



Obrázek č. 9: Vzorový výstup cytometrické analýzy buněčného cyklu.

3.7 Mikroskopická analýza jader značených DAPI

Buňky linie A-375 byly vysety na krycí mikroskopická sklíčka v 1 ml a kultivovány po dobu 24 hodin. Druhý den bylo médium odsáto a nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím dané alkaloidy. Buňky byly kultivovány dalších 12 hodin. Poté byla sklíčka fixována 3% paraformaldehydem (Sigma-Aldrich) v PBS po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po odsátí paraformaldehydu byla sklíčka opatrně promyta v PBS a bylo přidáno 10 μ l DAPI (4,6-diamino-2-fenylindol; Sigma-Aldrich) v koncentraci 1 μ g/ml. Poté byla sklíčka přenesena na podložní skla do montovacího média (Vectashield; Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Jádra buněk značená DAPI byla analyzována pomocí konfokálního (Olympus FluoViewTM 500 confocal laser scanning fluorescence microscope, Olympus C&S Ltd., Praha, Česká republika) a fluorescenčního mikroskopu (Leica DMI4000 B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.8 Statistická analýza

Výsledky tří nezávislých pokusů byly analyzovány pomocí Studentova t-testu (program STATISTICA 9 CZ). Hranice statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

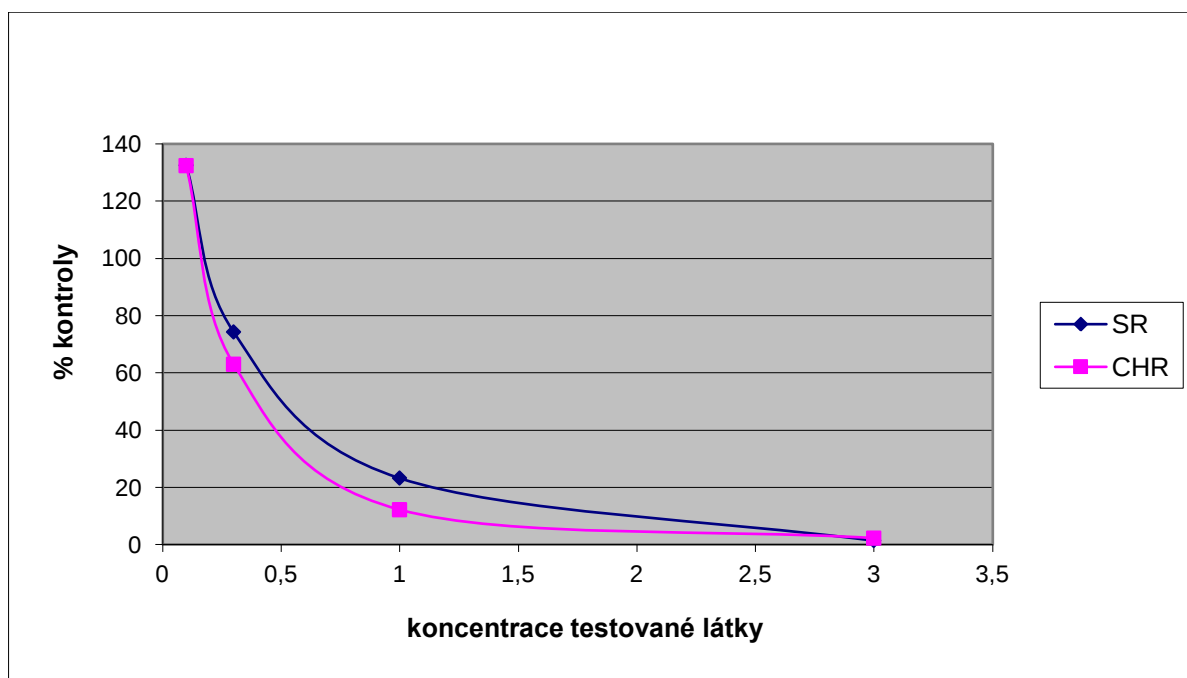
4 VÝSLEDKY

4.1 Screening cytotoxicity vybraných izochinolinových alkaloidů na buněčné linii A-375

Cytotoxicita byla testována MTT testem a PI exclusion esejí (cytometrická analýza viability buněk využívající značení PI).

4.1.1 MTT test metabolické aktivity

MTT test byl proveden na buněčné linii maligního melanomu A-375. Z grafu je patrné, že metabolická aktivita buněk se snižuje se zvyšující se koncentrací SR a CHR (Obr. 10). Hodnoty IC₅₀ jsou přibližně 0,4 µg/ml (CHR) a 0,55 µg/ml (SR).

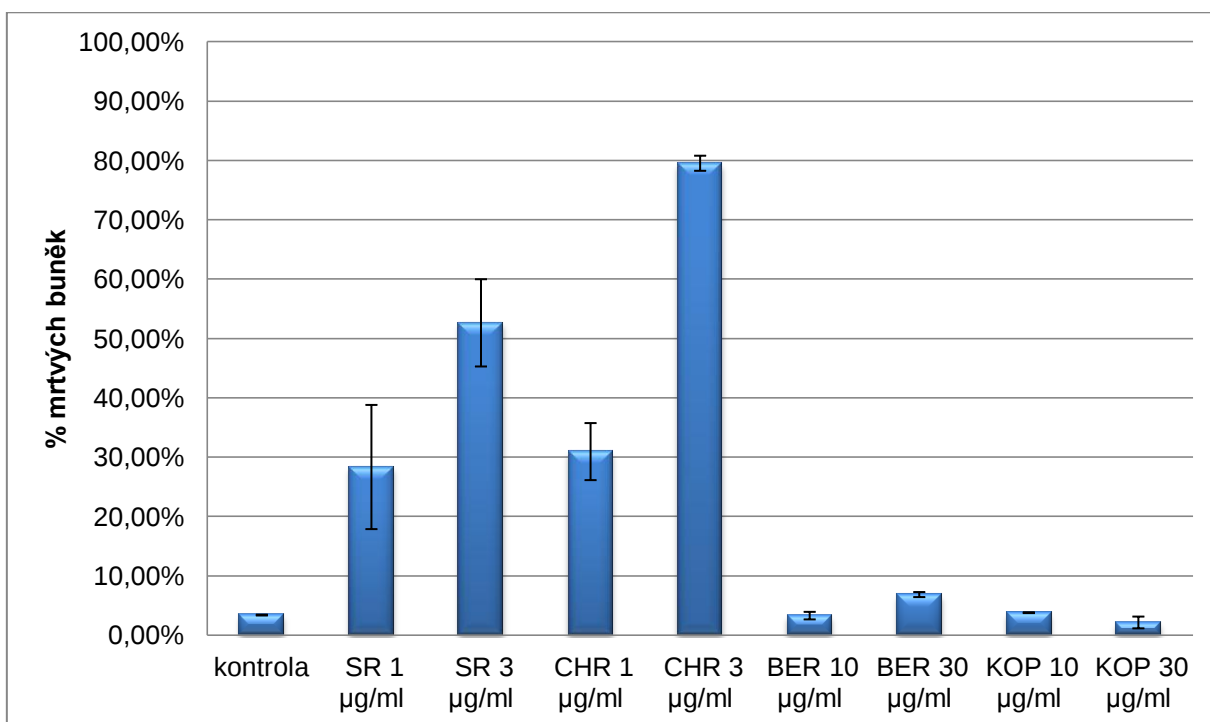


Obrázek č. 10: Antiproliferační aktivita vybraných izochinolinových alkaloidů. Výsledek MTT testu buněčné linie A-375 ovlivněné SR a CHR v koncentracích 0,1; 0,3; 1 a 3 µg/ml. Buňky byly kultivovány s danými alkaloidy po dobu 48 hodin. Z grafu je patrné, že toxicita alkaloidů roste se zvyšující se koncentrací.

4.1.2 Test viability

Viabilita (životaschopnost) buněk byla testována PI exclusion esejí, při které se používá fluorescenční barvivo PI. Díky tomuto barvivu je možné rozlišit živé a mrtvé buňky. Živé buňky zůstávají v důsledku aktivního pumpování PI ven nezbarveny.

V následujícím experimentu byly použity čtyři izochinolinové alkaloidy, přičemž dva z nich patří do skupiny KBA (SR, CHR) a dva do skupiny KPA (BER, KOP). Experiment byl proveden na buněčné linii A-375. Z Obr. 11 je zřejmé, že toxicita protoberberinů KOP a BER je řádově nižší než KBA, proto jsme se podrobněji věnovali studiu KBA. Nejvíce toxický je CHR a SR, oba v koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$. Tato koncentrace byla použita i pro další experimenty.



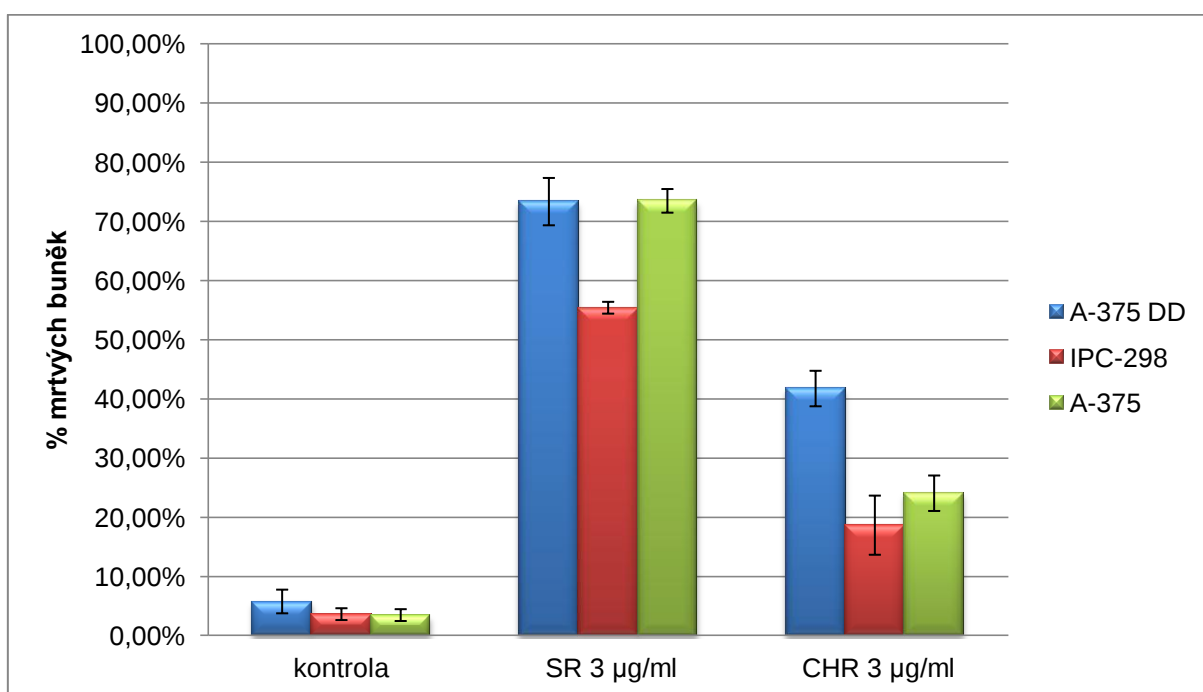
Obrázek č. 11: Viabilita buněk A-375 po účinku vybraných izochinolinových alkaloidů. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly ovlivněny benzofenanthridinovými alkaloidy SR a CHR v koncentracích 1 a 3 $\mu\text{g/ml}$ a protoberberiny BER a KOP v koncentracích 10 a 30 $\mu\text{g/ml}$ a následně byly kultivovány 48 hodin. Toxicita KPA je řádově nižší. Nejvíce toxický je CHR v koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$, následovaný SR ve stejné koncentraci.

4.2 Účinek vybraných KBA na různé typy buněčných linií

Z důvodu poměrně nízké toxicity KPA byly pro další studium vybrány pouze KBA.

4.2.1 Účinek na melanomové linie

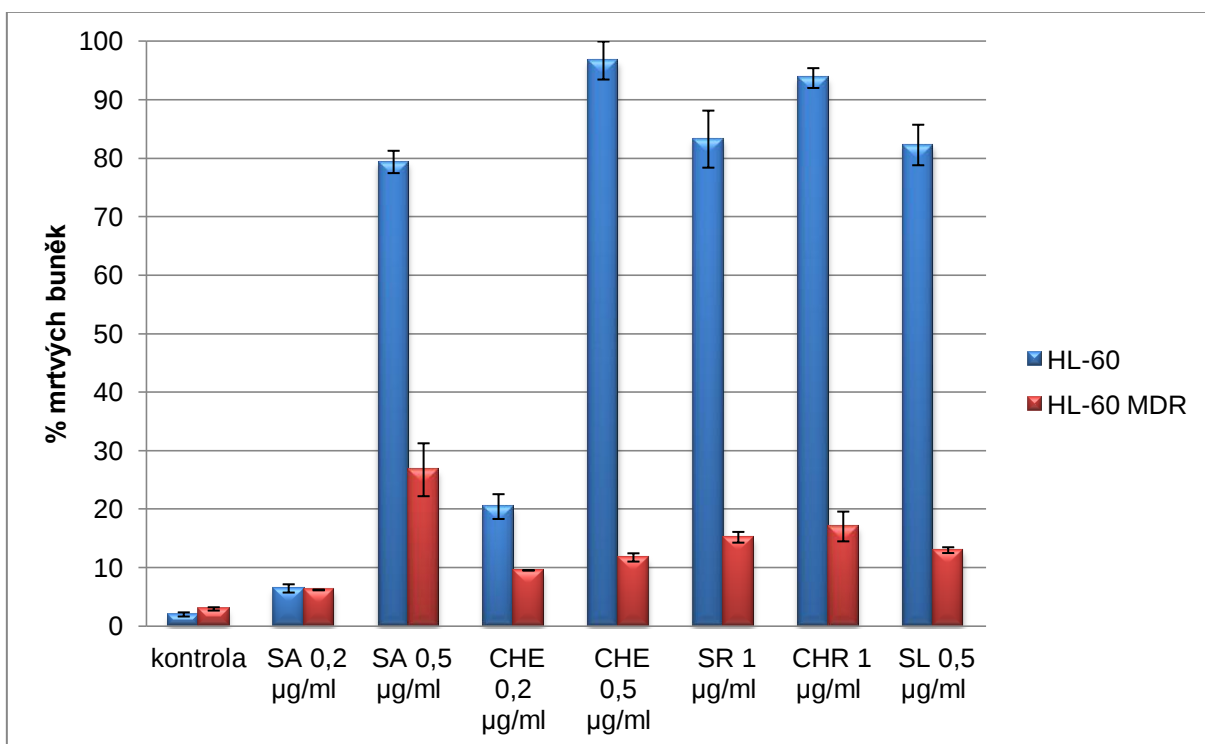
Po studiu antiproliferační aktivity u buněčné linie A-375 nás zajímalo, jak působí KBA na jiné buněčné linie. Pro následující experiment byly použity buňky tří různých linií maligního melanomu: A-375-p53DD (buněčná linie odvozená z A-375 s nefunkčním p53), IPC-298 a pro srovnání také A-375. Buňky byly ovlivněny SR a CHR v koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ a byly značeny PI. Z grafu (Obr. 12) je patrné, že v případě obou testovaných alkaloidů je nejméně citlivá linie IPC-298. U obou linií A-375 (mateřská i odvozená s vyřazeným proteinem p53) je v případě kultivace se SR cytotoxické působení srovnatelné. Po ovlivnění CHR jsou buňky A-375-p53DD citlivější. Rozdílnost účinku je patrně dána rozdílnými vlastnostmi jednotlivých linií.



Obrázek č. 12: Viabilita po účinku SR a CHR na vybrané buněčné linie. Výsledek cytometrické analýzy buněk linií A-375, A-375-p53DD a IPC-298 značených PI. Všechny tři buněčné linie byly ovlivněny SR a CHR v koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ a kultivovány za standardních kultivačních podmínek po dobu 48 hodin. Výsledky v grafu ukazují procento mrtvých buněk. V případě SR je vidět, že buněčné linie A-375 a A-375-p53DD jsou k účinku alkaloidu o něco citlivější než linie IPC-298. Podobný výsledek byl získán i v případě CHR – nejcitlivější linií je linie A-375-p53DD, která je následovaná buněčnými liniemi A-375 a IPC-298.

4.2.2 Účinek na buněčnou linii HL-60

V následujícím experimentu (Obr. 13) byla pomocí PI exclusion eseje otestována cytotoxicita KBA na buňkách HL-60 (lidská promyelocytární leukémie) a HL-60 MDR (z angl. multi-drug resistance; rezistentní buněčná linie nadprodukuje P-glykoprotein, odvozená z HL-60). Byly použity alkaloidy SA a CHE v koncentracích 0,2 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, SR a CHR v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a SL v koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Téměř ve všech případech (kromě SA a CHE v nízké koncentraci 0,2 $\mu\text{g/ml}$) je vidět výrazný rozdíl v citlivosti buněk mateřské linie HL-60 a odvozené rezistentní linie HL-60 MDR. Buňky HL-60 jsou citlivější – po ovlivnění alkaloidem se ve vzorcích nacházelo více než 80 % mrtvých buněk, kdežto u HL-60 MDR nedosáhly ani 30 %.



Obrázek č. 13: Viabilita buněk linií HL-60 po účinku vybraných izochinolinových alkaloidů. Výsledek cytometrické analýzy buněk linií HL-60 a HL-60 MDR značených PI. Obě buněčné linie byly ovlivněny SA a CHE v koncentracích 0,2 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, SR a CHR v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a SL v koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Buňky byly kultivovány za standardních kultivačních podmínek po dobu 48 hodin. Z grafu je jasné, že buněčná linie HL-60 je citlivější k účinkům KBA. Výsledek nebyl statisticky potvrzen.

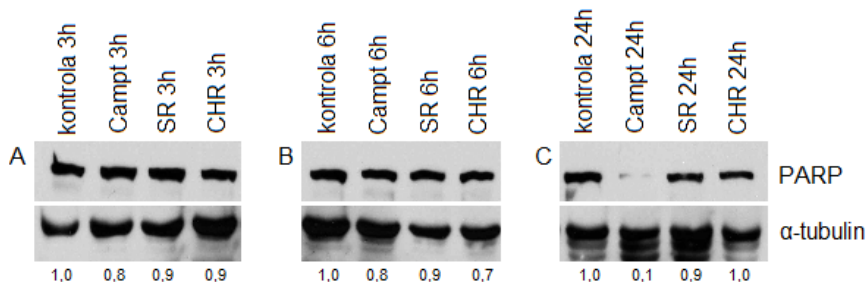
4.3 Mechanismus účinku alkaloidů

4.3.1 Indukce buněčné smrti

Vzhledem k poměrně výrazné toxicitě KBA nás zajímalo, který typ programované buněčné smrti je účinkem alkaloidů indukován. Zvažovali jsme apoptózu, nekroptózu a autofagii.

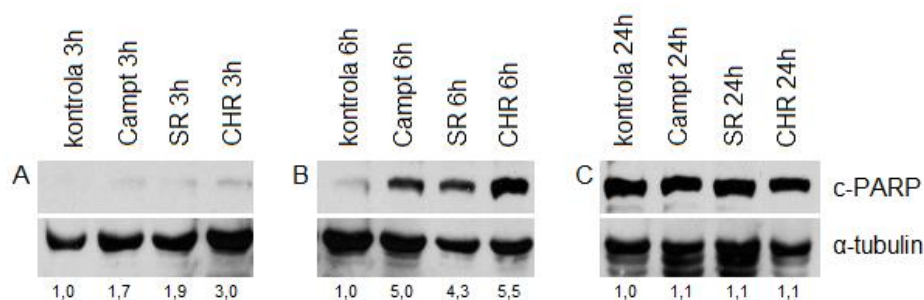
4.3.1.1 Důkaz apoptózy

Jedním z charakteristických znaků apoptózy je štěpení poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP). PARP patří mezi proteiny, které se podílí na opravě DNA. Jako pozitivní kontrolu látky indukující apoptózu jsme zvolili Campt v koncentraci 10 μ M. U buněčné linie A-375, která byla kultivována v přítomnosti Campt, SR a CHR, byla provedena WB analýza proteinů charakteristických pro apoptózu. Na 7,5% SDS gelu byl separován protein PARP. Neštěpený PARP byl detekován u všech vzorků (Obr. 14). Výjimkou byl Campt, u kterého došlo po 24 hodinách kultivace k výraznému snížení hladiny tohoto proteinu.



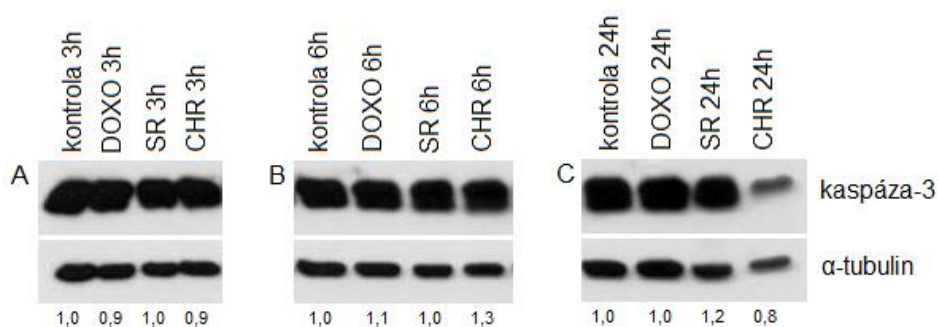
Obrázek č 14: WB analýza neštěpeného proteinu PARP. Výsledek WB analýzy neštěpeného proteinu PARP detekovaného po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μ M a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 7,5% SDS gelu. Neštěpený PARP byl detekován u všech vzorků s výjimkou Campt, u kterého došlo po 24 hodinách kultivace k výraznému snížení.

Z výsledku je jasné vidět kontinuální nárůst štěpeného proteinu PARP (Obr. 15), což prokazuje indukcí apoptózy po 6 a 24 hodinách účinku SR i CHR.



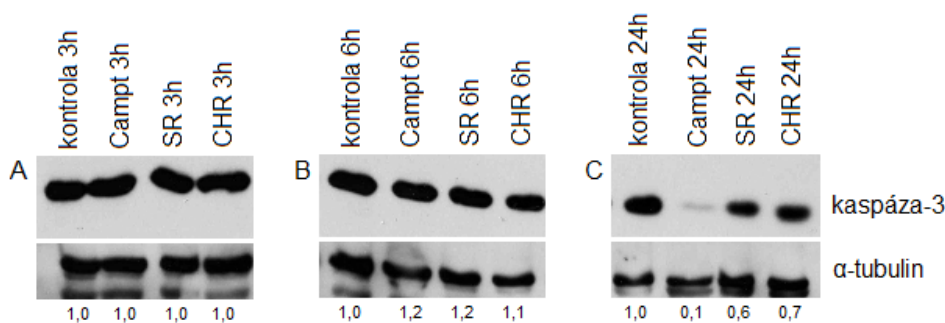
Obrázek č. 15: WB analýza štěpeného proteinu PARP. Výsledek WB analýzy štěpeného proteinu PARP detekovaného po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μ M a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 7,5% SDS gelu. Štěpený PARP byl detekován po 6 a 24 hodinách kultivace s KBA.

Dalším typickým rysem apoptózy je štěpení neaktivní prokaspázy 3 na aktivní kaspázu. U buněk linie A-375 byly kultivovány v přítomnosti DOXO (1 μ g/ml) jako pozitivní kontroly, SR a CHR (oba v koncentraci 3 μ g/ml), byla provedena WB analýza štěpené i neštěpené verze efektorové kaspázy-3. Neštěpená kaspáza-3 byla separována na 10% SDS gelu a byla detekována u všech vzorků (Obr. 16). V případě CHR je po 24 hodinách viditelné snížení.



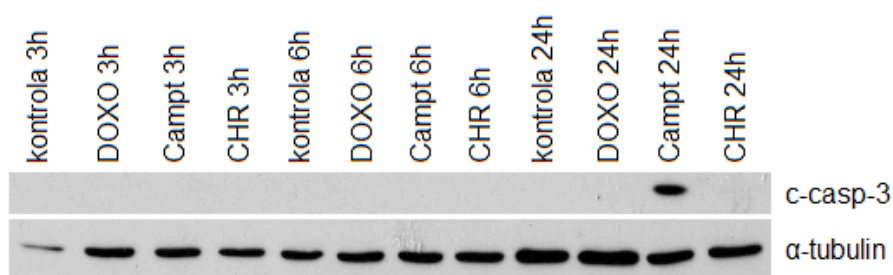
Obrázek č. 16: WB analýza neštěpené kaspázy-3. Výsledek WB analýzy neštěpené kaspázy-3 detekované po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti DOXO v koncentraci 1 μ g/ml a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 10% SDS gelu. Neštěpená kaspáza-3 byla detekována u všech vzorků v relativně stejném množství.

Analýza kaspázy-3 byla provedena ještě jednou s lyzáty stejné buněčné linie. Jako pozitivní kontrola byl v tomto experimentu zvolen Campt v koncentraci 10 μ M. Separace kaspázy-3 proběhla opět na 10% SDS gelu a detekovat se ji podařilo u všech vzorků s výjimkou Campt, kde bylo po 24 hodinách kultivace vidět výrazné snížení tohoto proteinu (Obr. 17).



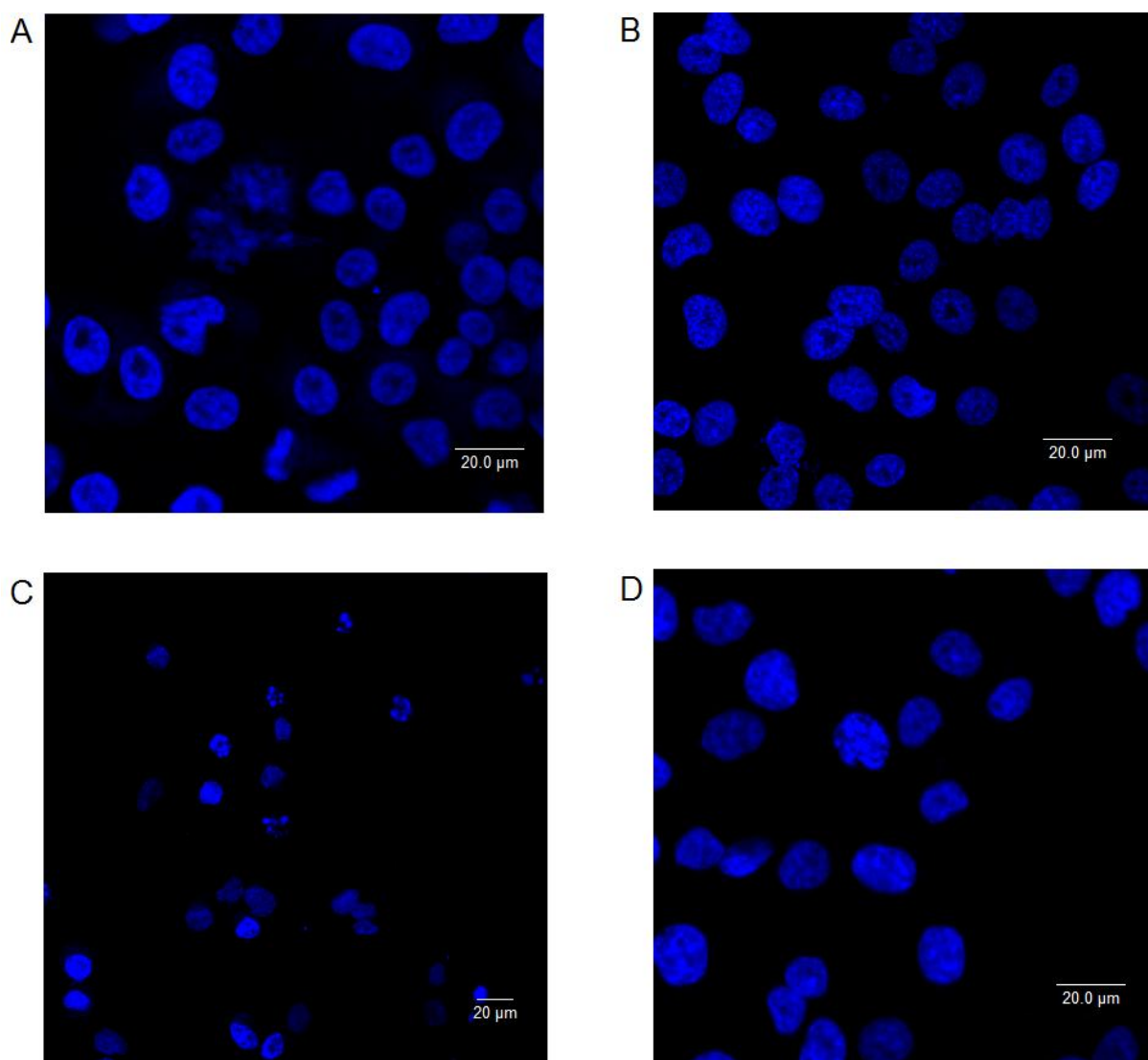
Obrázek č. 17: WB analýza neštěpené kaspázy-3. Výsledek WB analýzy neštěpené kaspázy-3 detekované po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μ M a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 10% SDS gelu. Neštěpená kaspáza-3 byla detekována u všech vzorků s výjimkou Campt, u kterého došlo po 24 hodinách kultivace k výraznému snížení.

Následně byla tedy detekována štěpená kaspáza-3 (Obr. 18). Separace proteinu proběhla na 12,5% gelu. Štěpenou kaspázu-3 se podařilo detekovat pouze u jednoho vzorku – u stejného, kde po 24 hodinách kultivace v přítomnosti Campt došlo k výraznému poklesu neštěpeného proteinu. U ostatních alkaloidů se štěpenou kaspázu nepodařilo zachytit.

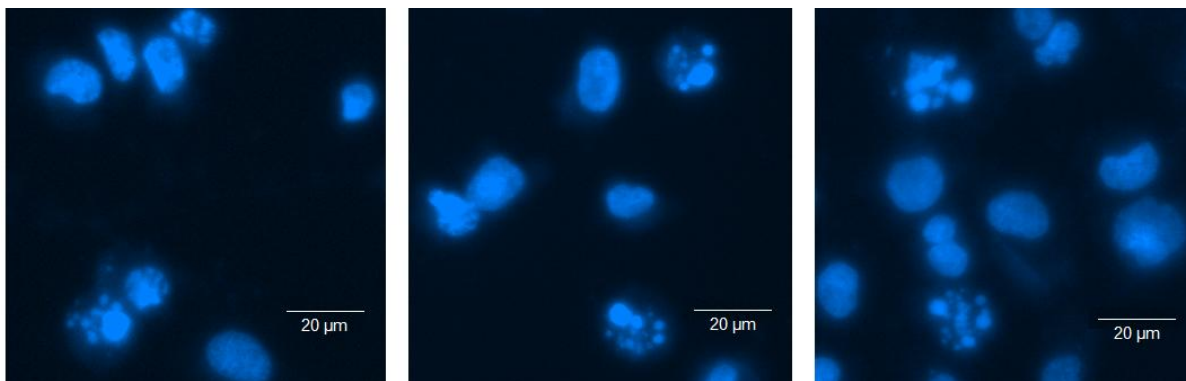


Obrázek č. 18: WB analýza štěpené kaspázy-3. Výsledek WB analýzy štěpené kaspázy-3 detekované po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μ M a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 12,5% SDS gelu. Štěpenou kaspázu-3 se podařilo detekovat pouze u jednoho vzorku po 24 hodinách kultivace v přítomnosti Campt.

Další metodou sloužící k průkazu apoptózy byla mikroskopická analýza jader značených DAPI. Byly použity buňky linie A-375, které byly po dobu 12 hodin kultivovány v přítomnosti Campt, SR a CHR (oba v koncentraci 3 μ g/ml). Kontrolní buňky mají pravidelná neporušená jádra (Obr. 19A). U buněk ovlivněných Campt (Obr. 19B) a CHR (Obr. 19D) je pozorovatelná fragmentace jader. Přítomnost SR (Obr. 19C) způsobuje fragmentaci celé buňky do tzv. apoptotických tělísek (Obr. 20).

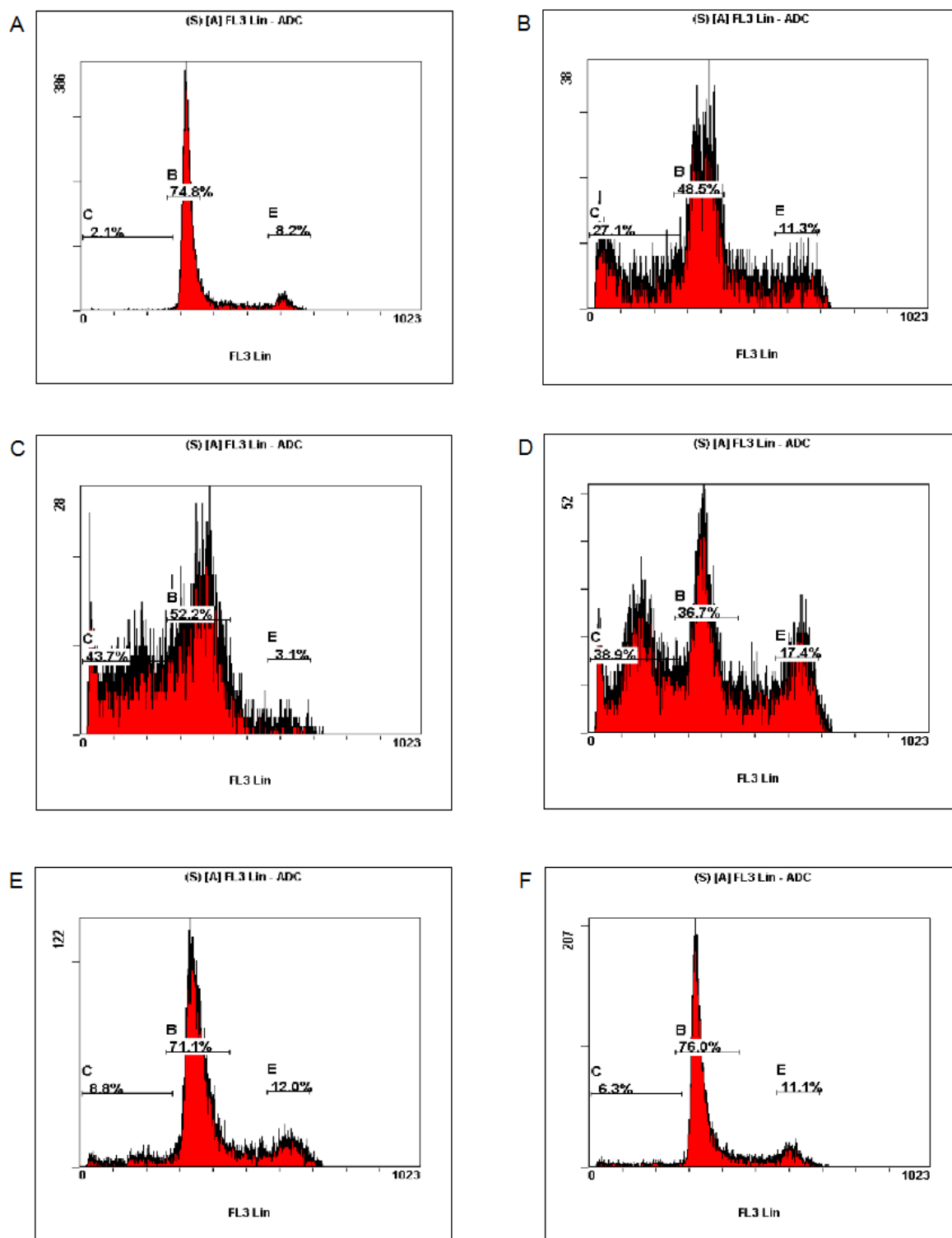


Obrázek č. 19: Detekce apoptózy pod konfokálním mikroskopem. Výsledky mikroskopické analýzy jader buněk linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μM a SR a CHR v koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 12 hodin. Buňky byly následně značeny DAPI a pozorovány pod mikroskopem. Kontrolní buňky mají pravidelné neporušené jádro (A). U buněk ovlivněných Campt (B) a CHR (D) je pozorovatelná fragmentace jádra. Buňky kultivované v přítomnosti SR (C) tvoří apoptotická tělíska. Měřítko – 20 μm .



Obrázek č. 20: Detekce apoptózy pod fluorescenčním mikroskopem. Výsledky mikroskopické analýzy jader buněk linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti SR v koncentraci 3 µg/ml po dobu 12 hodin. Buňky byly následně značeny DAPI a pozorovány pod mikroskopem. Buňky kultivované v přítomnosti SR tvoří apoptotická tělíska. Měřítka – 20 µm.

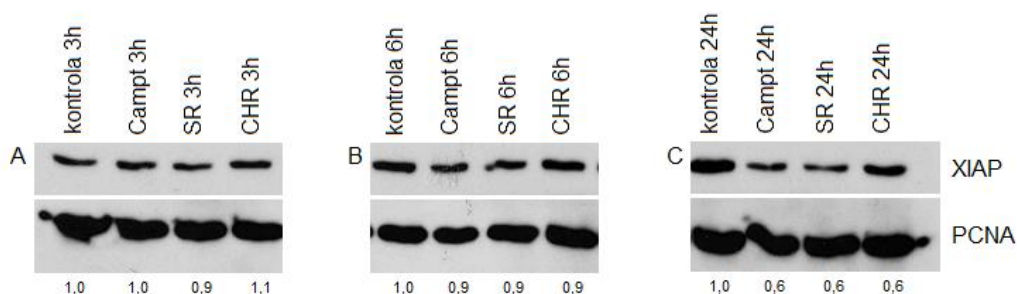
Následujícím experimentem jsme chtěli prokázat, zda studované alkaloidy ovlivňují buněčný cyklus a zda skutečně způsobují apoptózu (zjišťovala se přítomnost sub-G1 fáze, která zobrazuje apoptotické buňky; viz Obr. 9). Campt a DOXO byly použity jako pozitivní kontroly. Buňky linie A-375 byly kultivovány v přítomnosti testovaných alkaloidů po dobu 24 hodin. Následně byly značeny PI a analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Kontrolní buňky vykazovaly normální rozložení buněčného cyklu (Obr. 21A). Velmi výrazný pík sub-G1 byl u buněk ovlivněných DOXO v koncentraci 1 µg/ml (27,1 %; Obr. 21B), Campt v koncentraci 10 µM (43,7 %; Obr. 21C) a SA v koncentraci 1,5 µg/ml (38,9 %; Obr. 21D). U buněk kultivovaných v přítomnosti CHE (8,8 %; Obr. 21E) a CHR (6,3 %; Obr. 21F) (oba v koncentraci 3 µg/ml) nebyl tento pík příliš výrazný, přesto bylo procento buněk v sub-G1 fázi vyšší než u buněk kontrolních.



Obrázek č. 21: Analýza buněčného cyklu. Výsledky cytometrické analýzy buněčného cyklu. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti DOXO v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ (B), Campt 10 μM (C), SA 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (D) a CHE (E) a CHR v koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ (F) po dobu 24 hodin (A – kontrola). Osa x zobrazuje intenzitu fluorescence (množství DNA), osa y množství buněk vykazující danou fluorescenci.

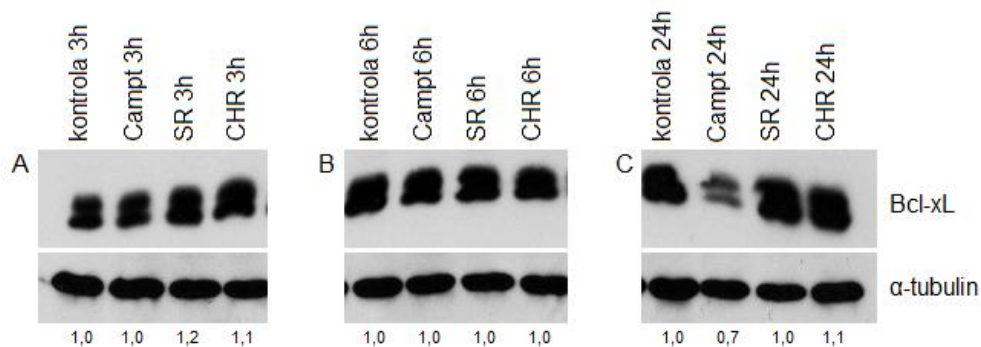
4.3.1.2 Studium mechanismu indukce apoptózy

Jedním z hlavních mechanismů indukce apoptózy je snížení hladiny antiapoptotických proteinů, mezi které patří např. antiapoptotický faktor XIAP (z angl. X-linked inhibitor of apoptosis), Mcl-1 (z angl. myeloid cell leukemia sequence 1) nebo Bcl-xL, jenž patří do rodiny antiapoptotických proteinů Bcl-2. Významným faktorem indukujícím apoptózu je poškození DNA. Proto jsme se zaměřili rovněž na jeho detekci. Z tohoto důvodu byla provedena WB analýza, jejímž cílem bylo zachytit snížení těchto proteinů u buněk linie A-375 kultivovaných v přítomnosti testovaných alkaloidů (Campt v koncentraci 10 μ M, SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml). Antiapoptotický faktor XIAP byl detekován ve všech vzorcích, snížení hladiny tohoto proteinu nastalo po 24 hodinách kultivace se SR i CHR (Obr. 22).



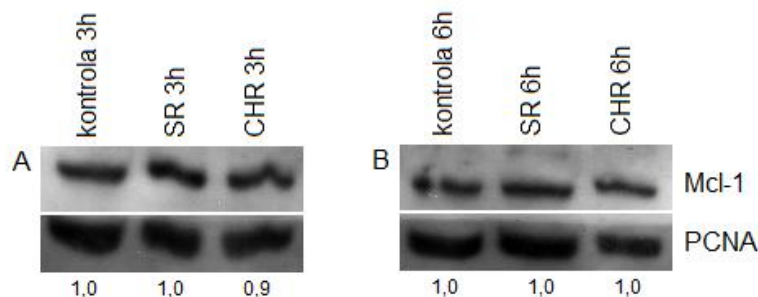
Obrázek č. 22: WB analýza proteinu XIAP. Výsledek WB analýzy antiapoptotického faktoru XIAP detekovaného po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μ M a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 10% SDS gelu. Mírné snížení je pozorovatelné po 6 hodinách, výraznější snížení hladiny tohoto proteinu po 24 hodinách kultivace s testovanými alkaloidy.

Antiapoptotický protein Bcl-xL byl také detekován u všech vzorků (Obr. 23). Snížení hladiny bylo viditelné pouze u Campt po 24 hodinách kultivace. Testované alkaloidy neměly na hladinu proteinu žádný vliv.



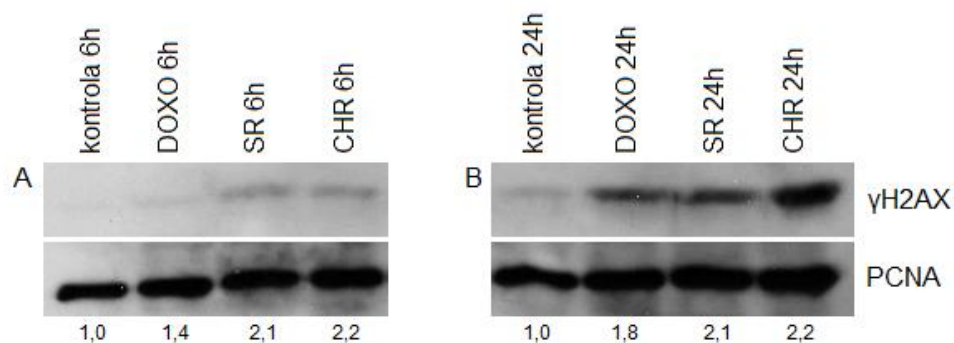
Obrázek č. 23: WB analýza antiapoptotického proteinu Bcl-xL. Výsledek WB analýzy antiapoptotického proteinu Bcl-xL detekovaného po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μ M a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 10% SDS gelu. Snížené množství Bcl-xL je pozorovatelné pouze u Campt po 24 hodinách.

Westernovým přenosem byl analyzován také antiapoptotický protein Mcl-1 (Obr. 24). Buňky byly kultivovány v přítomnosti SR a CHR po dobu 3 a 6 hodin. Mcl-1 byl detekován u všech vzorků, hladina se neměnila.

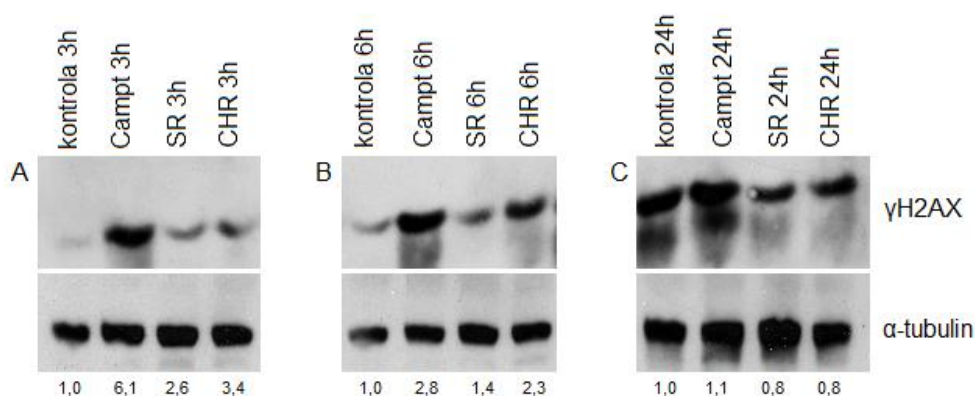


Obrázek č. 24: WB analýza antiapoptotického proteinu Mcl-1. Výsledek WB analýzy antiapoptotického proteinu Mcl-1 detekovaného po 3 (A) a 6 (B) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 10% SDS gelu. Antiapoptotický protein Mcl-1 byl detekován ve všech vzorcích, množství se s časem neměnilo.

Westernovým přenosem byl analyzován fosforylovaný H2AX (γ H2AX, z angl. H2A histone family, member X) značící poškození DNA v důsledku působení testovaných alkaloidů na buňky linie A-375 (Obr 25). Protein byl detekován již po 3 hodinách kultivace v obou alkaloidech, přičemž nejvyšší hladina byla pozorována u Campt (Obr. 26). Bylo zjištěno, že hladina proteinu se s časem zvyšuje.



Obrázek č. 25: WB analýza histonu γ H2AX. Výsledek WB analýzy fosforylované formy histonu H2AX detekované po 6 (A) a 24 (B) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti DOXO v koncentraci 1 μ g/ml a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 12,5% SDS gelu. γ H2AX byl detekován po 6 hodinách, hladina proteinu se s časem zvyšovala.



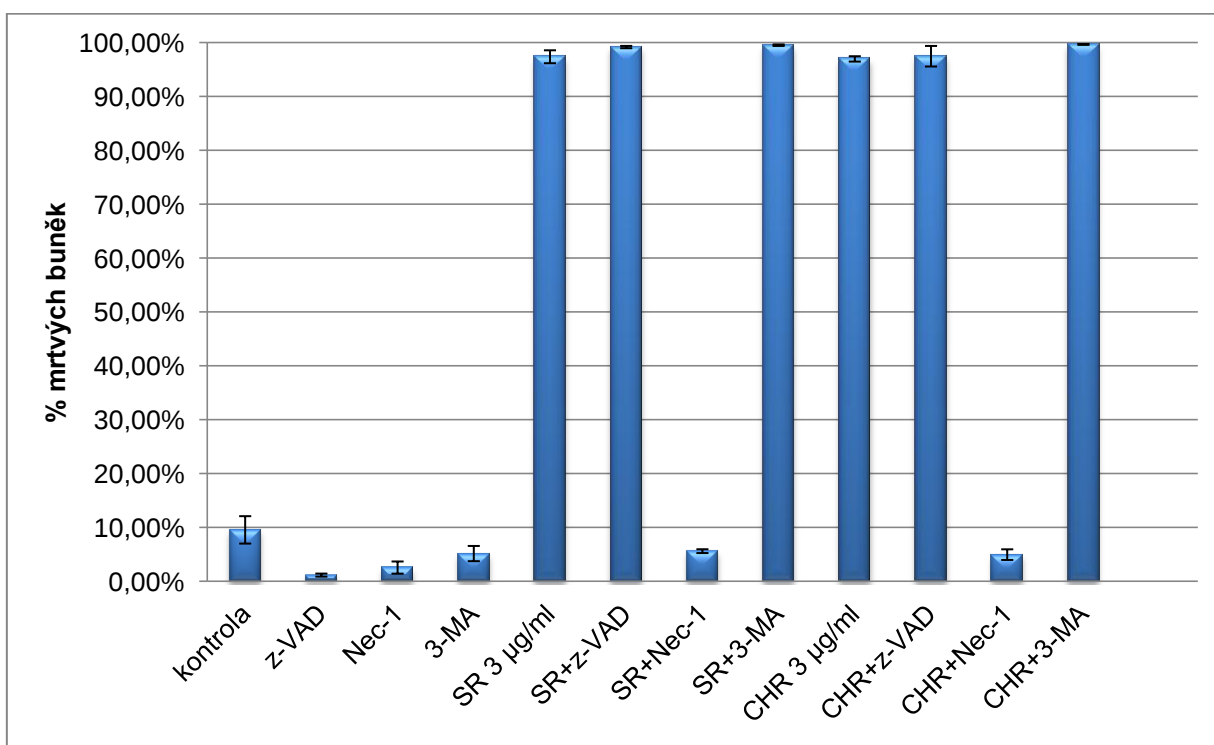
Obrázek č. 26: WB analýza histonu γ H2AX. Výsledek WB analýzy fosforylované formy histonu H2AX detekované po 3 (A), 6 (B) a 24 (C) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 1 μ M a SR a CHR v koncentraci 3 μ g/ml. Proteiny byly separovány na 12,5% SDS gelu. γ H2AX byl detekován po 3 hodinách, hladina proteinu se s časem zvyšovala.

4.3.1.3 Typy buněčných smrtí indukovaných alkaloidy

Uvažovali jsme o 3 základních typech programované buněčné smrti: apoptóze, nekroptóze a autofagii. K odhalení typu buněčné smrti způsobené testovanými alkaloidy na nádorových buňkách byly použity tyto inhibitory jednotlivých typů buněčných smrtí: z-VAD-fmk (inhibitor kaspáz, inhibitor apoptózy), Nec-1 (inhibitor RIP kináz, inhibitor nekroptózy), NAC (inhibitor ROS, jejichž metabolismus souvisí s nekroptózou) a 3-MA (inhibitor autofagie).

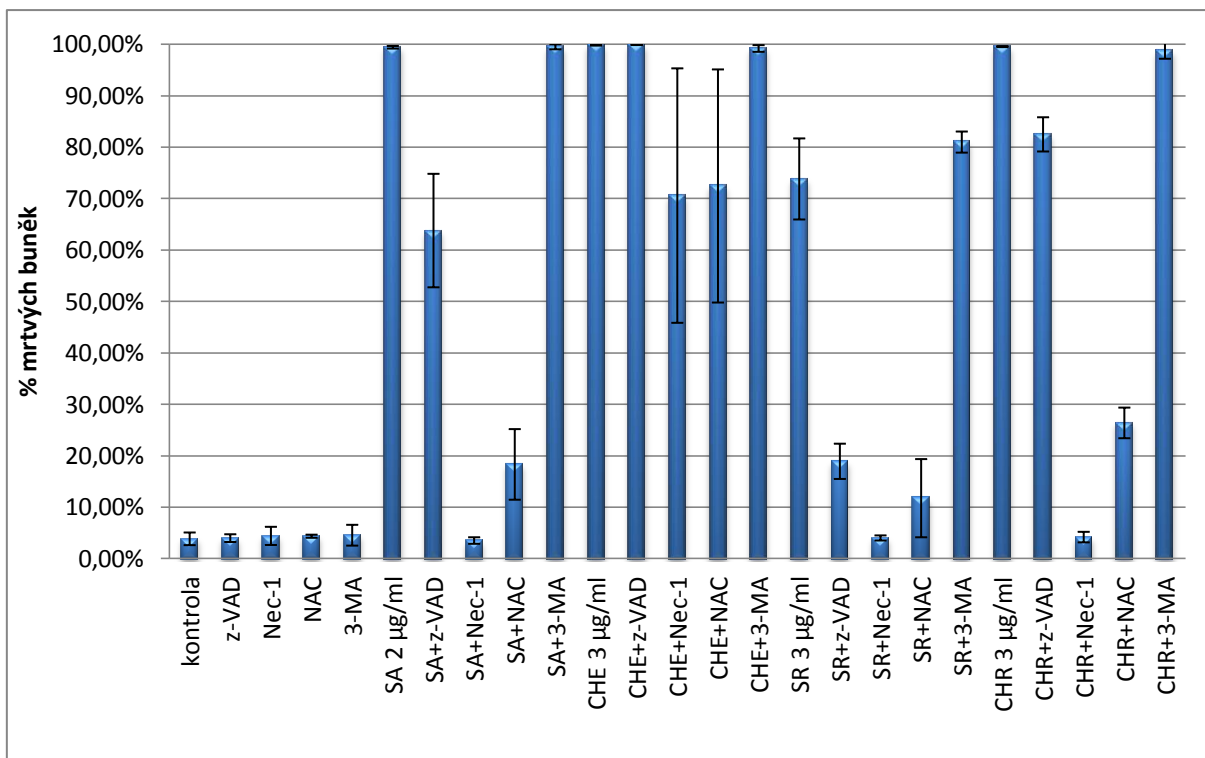
Melanomové buněčné linie

Buňky A-375 byly po tříhodinové preinkubaci v přítomnosti inhibitorů ovlivněny studovanými alkaloidy, po 48 hodinách kultivace za standardních podmínek proběhlo značení PI a cytometrická analýza. Procento mrtvých buněk po ovlivnění SR a CHR dosahuje téměř 100 % (Obr. 27). Snížení procenta mrtvých buněk nastává pouze v kombinaci s Nec-1, kde dochází zcela k inhibici buněčné smrti. Je zřejmé, že u takto ovlivněných buněk dominuje nekroptóza jako forma buněčné smrti.



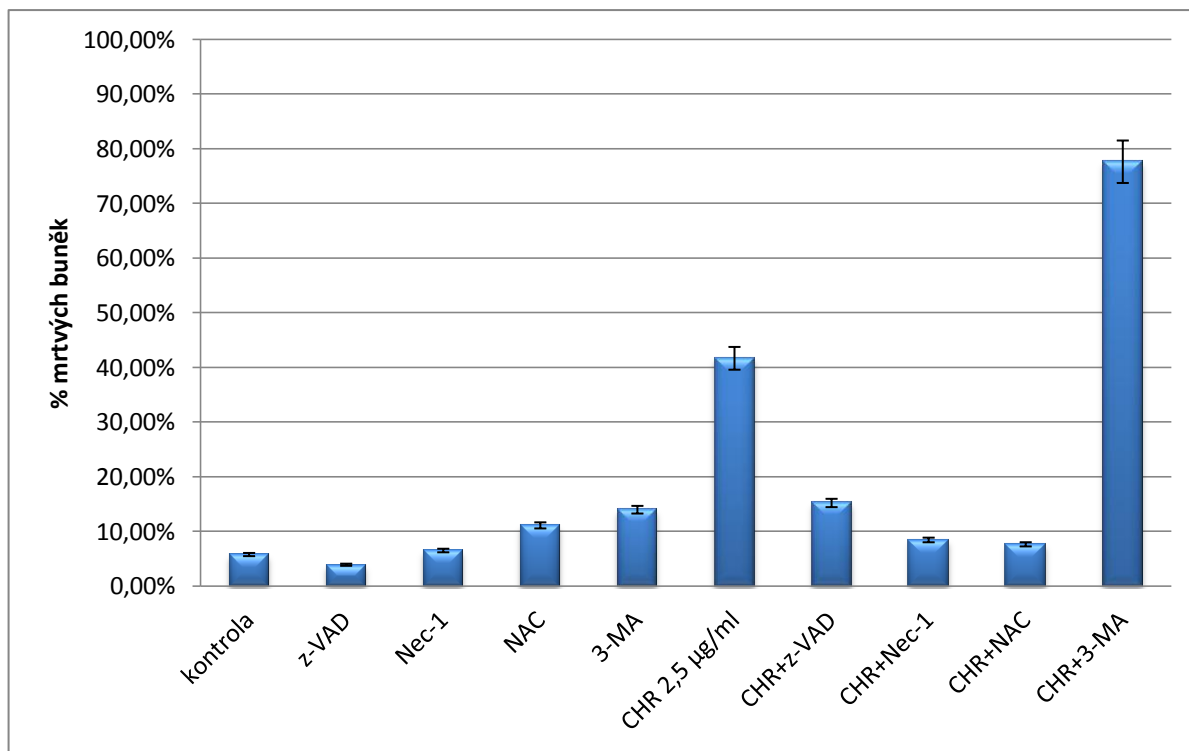
Obrázek č. 27: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti testovaných alkaloidů SR a CHR v koncentraci 3 µg/ml po dobu 45 hodin. V kombinaci testovaných alkaloidů s Nec-1 došlo k výraznému snížení procenta mrtvých buněk.

V následujícím grafu (Obr. 28) je vidět efekt vybraných KBA a jejich kombinace s inhibitory na buňky A-375. Stejně jako v předchozím případě nás zajímalo, který typ buněčné smrti ovlivněné buňky upřednostňují. Téměř ve všech případech lze jasně pozorovat snížení jak v kombinaci se z-VAD-fmk, tak v kombinaci s Nec-1, což naznačuje, že testované alkaloidy mohou spustit obě buněčné smrti – apoptózu i nekroptózu. Výjimkou je CHE, kde bylo zjištěno téměř 100 % mrtvých buněk, patrně jde o katastrofickou smrt, nekrózu. K mírnému snížení došlo pouze v kombinaci s Nec-1.



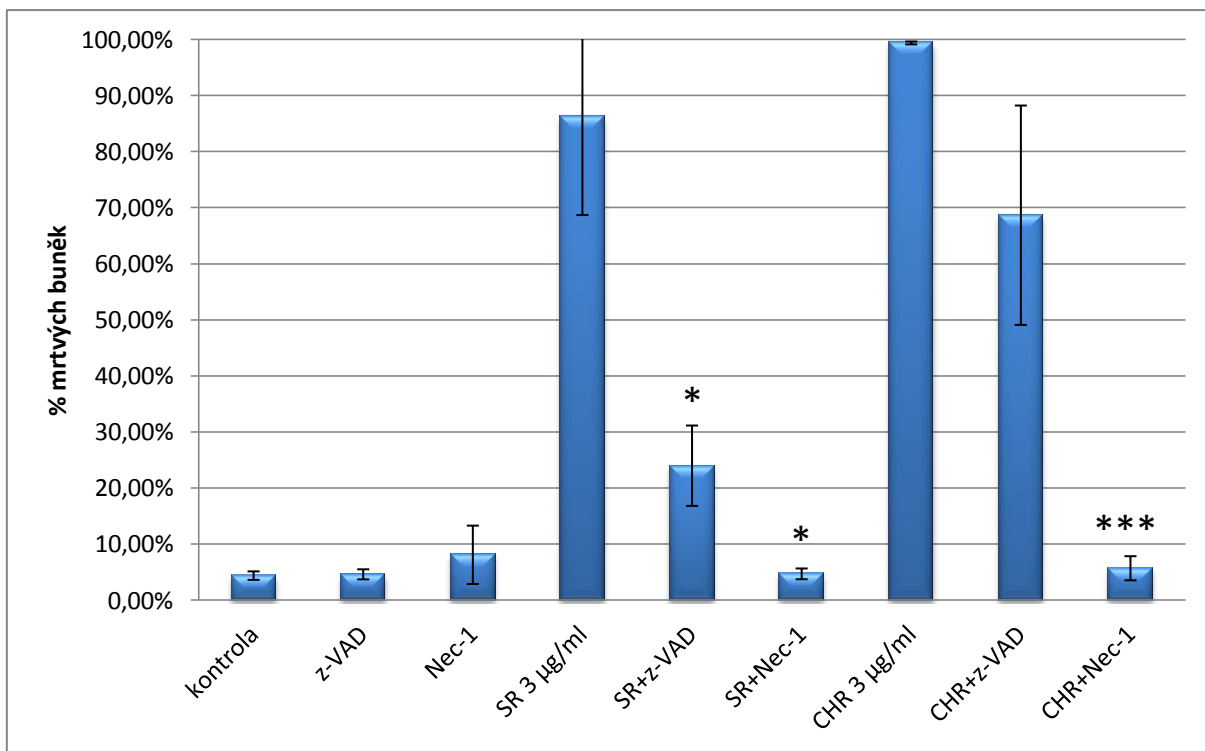
Obrázek č. 28: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti SA v koncentraci 2 µg/ml, CHE, SR a CHR v koncentraci 3 µg/ml po dobu 45 hodin. Téměř ve všech případech došlo ke snížení procenta mrtvých buněk v kombinaci s oběma inhibitory (z-VAD-fmk, Nec-1). Výjimkou je CHE, kde nastalo snížení pouze v kombinaci s Nec-1.

Při nižší koncentraci KBA (CHR v koncentraci 2,5 µg/ml) dochází ke snížení procenta mrtvých buněk jak v kombinaci s Nec-1, tak v kombinaci se z-VAD-fmk a buněčné smrti se nějakým způsobem střídají (Obr. 29).



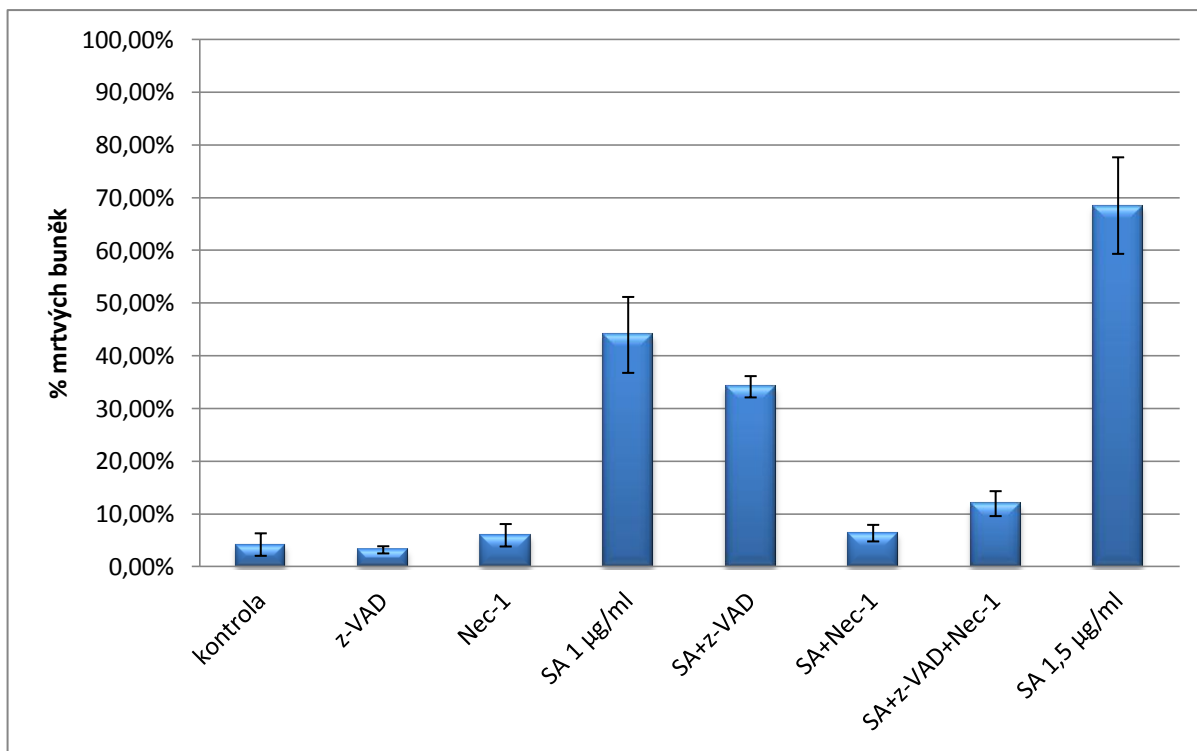
Obrázek č. 29: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti CHR v koncentraci 3 µg/ml po dobu 45 hodin. Ve všech kombinacích inhibitorů s testovaným alkaloidem došlo ke snížení procenta mrtvých buněk. Zvýšení nastalo pouze v kombinaci s 3-MA, což značí cytoprotektivní aktivitu autofagie.

Všechny tyto experimenty byly provedeny minimálně ve třech opakováních. Shrnující graf (Obr. 30) ukazuje statisticky významné snížení v kombinaci s Nec-1 a z-VAD-fmk v případě ovlivnění SR a snížení v kombinaci s Nec-1 u CHR.



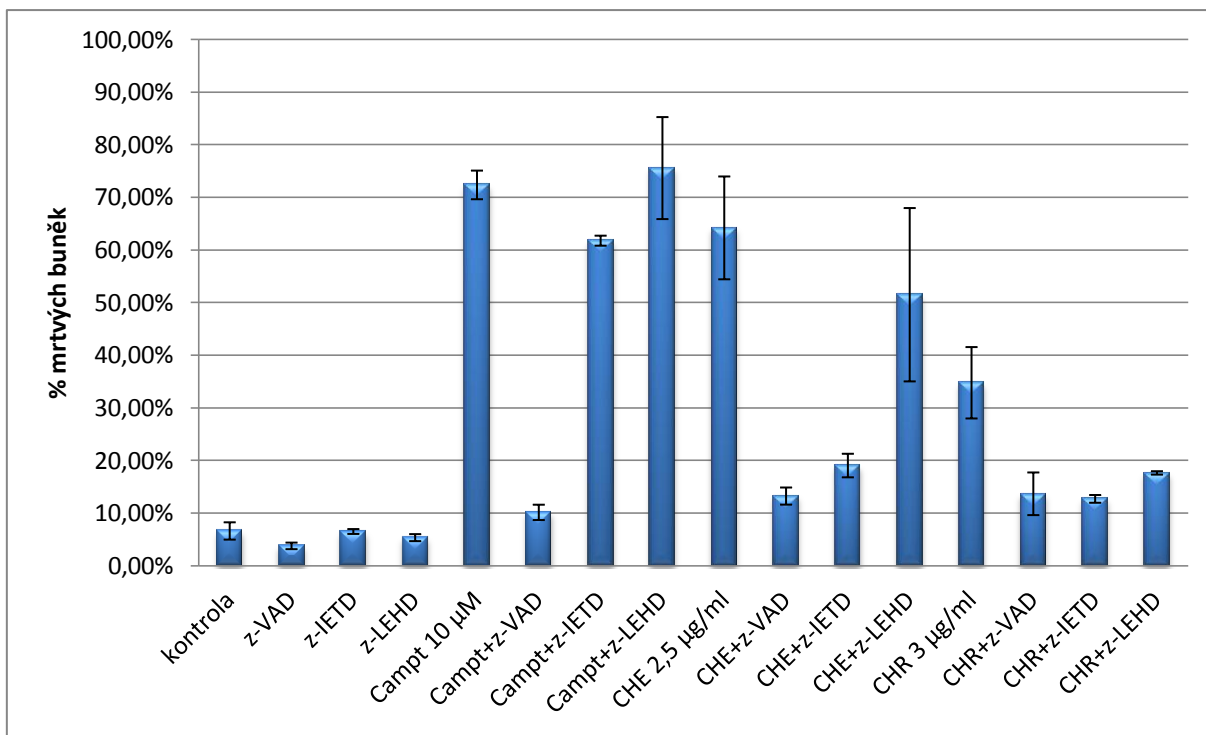
Obrázek č. 30: Studium typu buněčné smrti. Statisticky významný výsledek (experiment byl několikrát opakován) cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti SR a CHR v koncentraci 3 µg/ml po dobu 45 hodin. Ve všech kombinacích inhibitorů s testovaným alkaloidem došlo ke snížení procenta mrtvých buněk. Data jsou průměrnými hodnotami ze tří nezávislých pokusů. * $p < 0,05$ buňky ovlivněné samotným SR vs. buňky ovlivněné kombinací SR a z-VAD-fmk. * $p < 0,05$ buňky ovlivněné samotným SR vs. buňky ovlivněné kombinací SR a Nec-1. *** $p < 0,005$ buňky ovlivněné samotným CHR vs. buňky ovlivněné kombinací CHR a Nec-1.

Abychom rozlišili, která z buněčných smrtí převládá, kultivovali jsme buňky se SA (u kterého účinkovaly částečně oba inhibitory) v kombinaci s oběma inhibitory – z-VAD-fmk + Nec-1 (Obr. 31). Snížení úmrtnosti buněk v přítomnosti obou inhibitorů bylo podobné jako v přítomnosti samotného Nec-1, což naznačuje, že nekroptóza je dominantní buněčnou smrtí.



Obrázek č. 31: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti SA v koncentraci 1 a 1,5 µg/ml po dobu 45 hodin. Snížení úmrtnosti buněk v přítomnosti obou inhibitorů bylo podobné jak v přítomnosti samotného Nec-1.

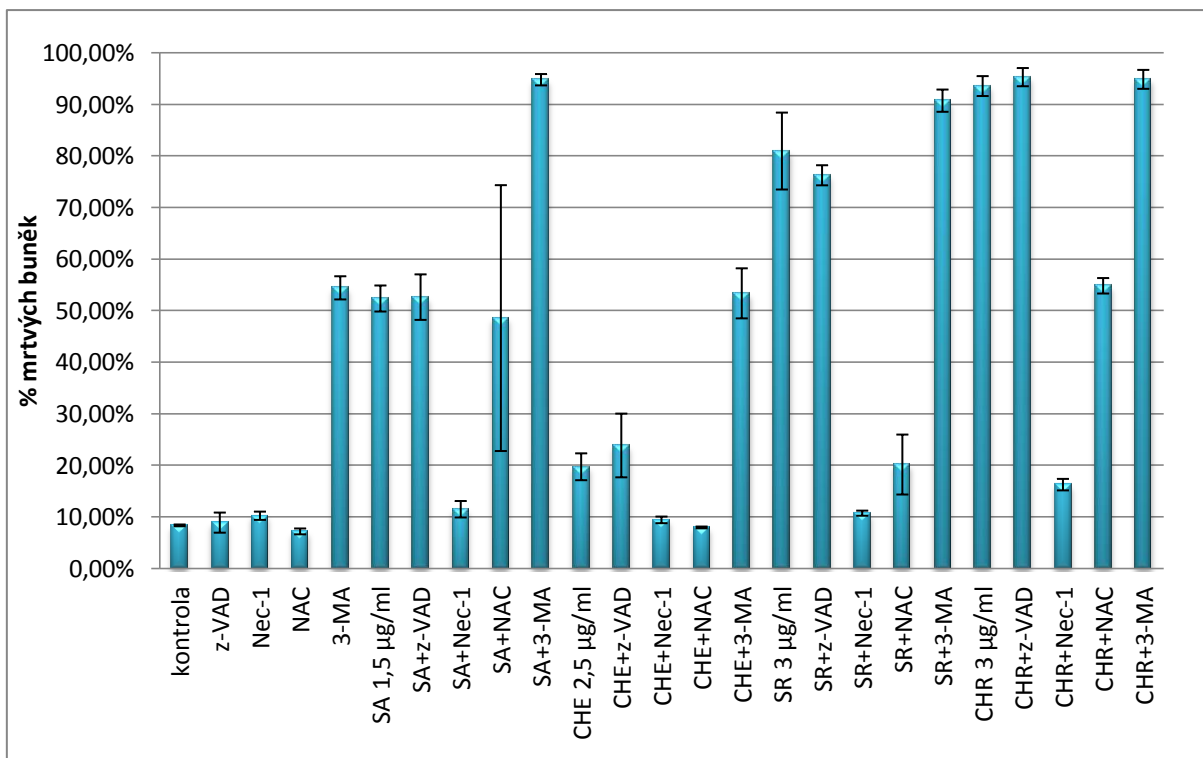
Pro studium apoptózy byly použity dva specifické inhibitory kaspáz – z-IETD-fmk (inhibitor kaspázy-8, která je součástí vnější dráhy) a z-LEHD-fmk (inhibitor kaspázy-9, která je součástí vnitřní mitochondriální dráhy). Buňky linie A-375 byly 3 hodiny preinkubovány s inhibitory kaspáz v koncentraci 20 µM a následně kultivovány v přítomnosti Campt (10 µM), CHE (2,5 µg/ml) a CHR (3 µg/ml). Poté byly značeny PI a cytometricky analyzovány. U CHE a CHR došlo ke snížení procenta mrtvých buněk ve všech kombinacích. U Campt nastalo snížení pouze v případě jeho kombinace se z-VAD-fmk a se z-IETD-fmk, což znamená, že buňky ovlivněné Campt upřednostňují vnější dráhu apoptózy (Obr. 32). Jedná se o prvotní experimenty s těmito inhibitory a je zřejmé, že bude nutné podrobněji otestovat, zda jsou v daných koncentracích účinné.



Obrázek č. 32: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s inhibitory kaspáz a poté kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 μ M, SA 1,5 μ g/ml, SL 1 μ g/ml a CHR v koncentraci 3 μ g/ml po dobu 48 hodin.

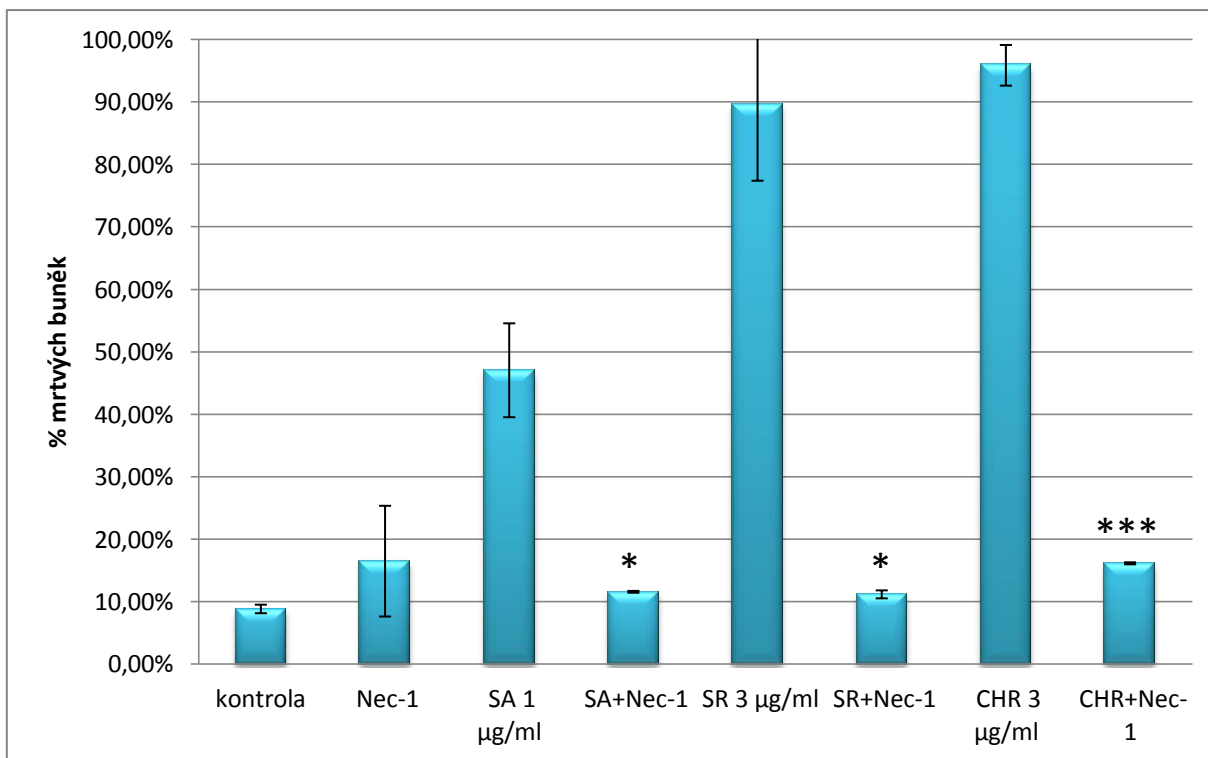
Buněčná linie HeLa

Stejně látky a jejich kombinace s danými inhibitory buněčných smrtí byly použity také v případě buněčné linie HeLa (Obr. 33). Cytometrická analýza ukázala, že u SR došlo ke snížení v kombinaci se z-VAD-fmk i s Nec-1, což znamená, že buněčné smrti se střídají, nicméně nekroptóza se zdá být silnější. U ostatních testovaných alkaloidů došlo ke snížení pouze v kombinaci s Nec-1 (potvrzené snížením v kombinaci s NAC), což naznačuje indukci nekroptózy.



Obrázek č. 33: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk HeLa značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti SA v koncentraci 1,5 µg/ml, CHE 2,5 µg/ml, SR a CHR v koncentraci 3 µg/ml po dobu 48 hodin. Ke snížení procenta mrtvých buněk došlo u všech alkaloidů pouze v kombinaci s Nec-1.

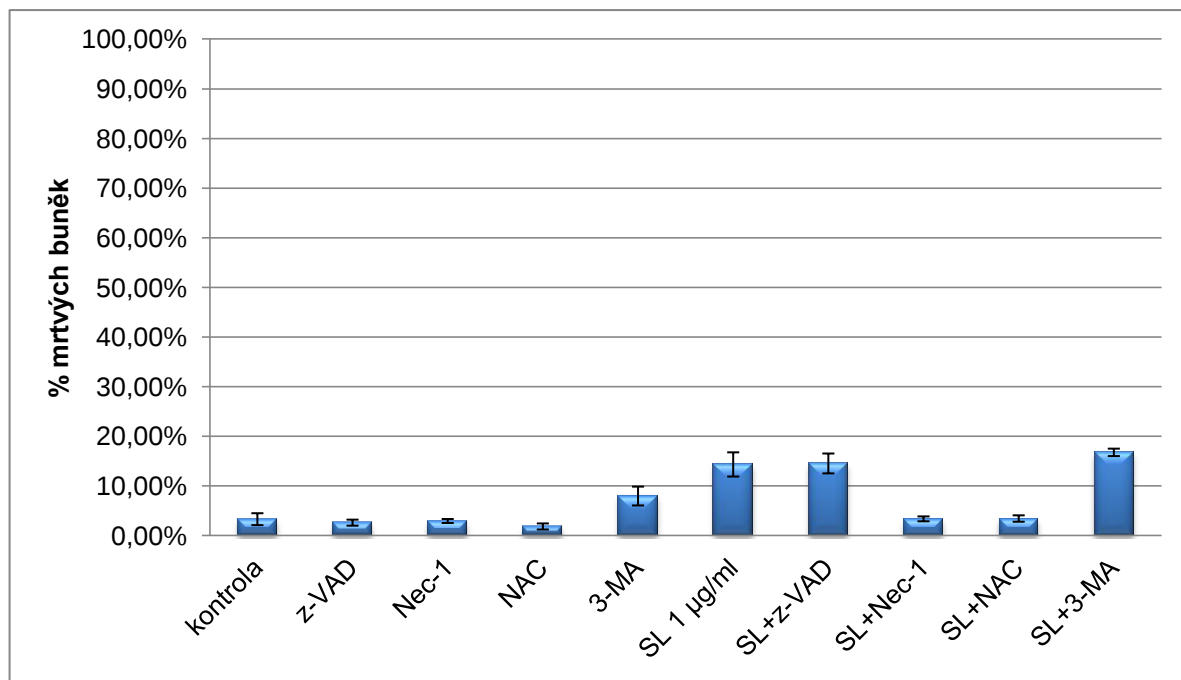
Experiment byl opět proveden v několika opakováních a v následujícím grafu (Obr. 34) je znázorněno statisticky významné snížení v kombinaci s Nec-1 u všech studovaných alkaloidů.



Obrázek č. 34: Studium typu buněčné smrti. Statisticky významný výsledek (experiment byl několikrát opakován) cytometrické analýzy buněk HeLa značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s inhibitorem nekroptózy a poté kultivovány v přítomnosti SA v koncentraci 1 µg/ml, SR a CHR v koncentraci 3 µg/ml po dobu 48 hodin. Ve všech kombinacích alkaloidů s nekrostatinem došlo ke statisticky významnému snížení procenta mrtvých buněk. Data jsou průměrnými hodnotami ze tří nezávislých pokusů. * $p < 0,05$ buňky ovlivněné samotným SA vs. buňky ovlivněné kombinací SA a Nec-1. * $p < 0,05$ buňky ovlivněné samotným SR vs. buňky ovlivněné kombinací SR a Nec-1. *** $p < 0,005$ buňky ovlivněné samotným CHR vs. buňky ovlivněné kombinací CHR a Nec-1.

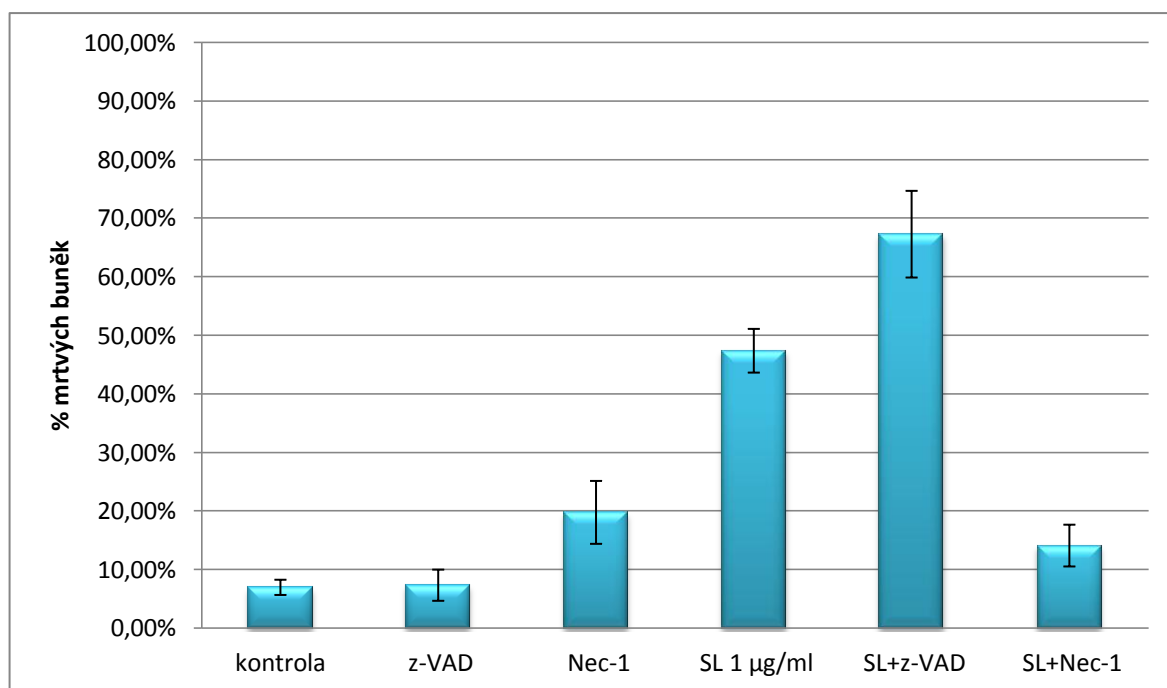
4.3.1.4 SL jako induktor nekroptózy ve srovnání s kaptotecinem jako induktorem apoptózy

V následujících experimentech byl použit SL, o kterém bylo v předchozích pracích z naší laboratoře popsáno, že indukuje nekroptózu a Campt jako známý induktor apoptózy. Efekt SL na buňky A-375 byl podrobně popsán v předchozí práci (Hammerová *et al.*, 2012). Buňky A-375 byly preinkubovány s inhibitory po dobu 3 hodin a ovlivněny SL (Obr. 35). Po značení PI byla provedena cytometrická analýza. Daná koncentrace alkaloidu nebyla v tomto experimentu pro buňky příliš toxická, tudíž procento mrtvých buněk bylo nízké a výsledky nejsou příliš výrazné. Přesto je vidět snížení úmrtnosti buněk pouze v kombinaci s Nec-1 a NAC, což potvrzuje nekroptózu indukovanou SL u melanomové buněčné linie A-375.



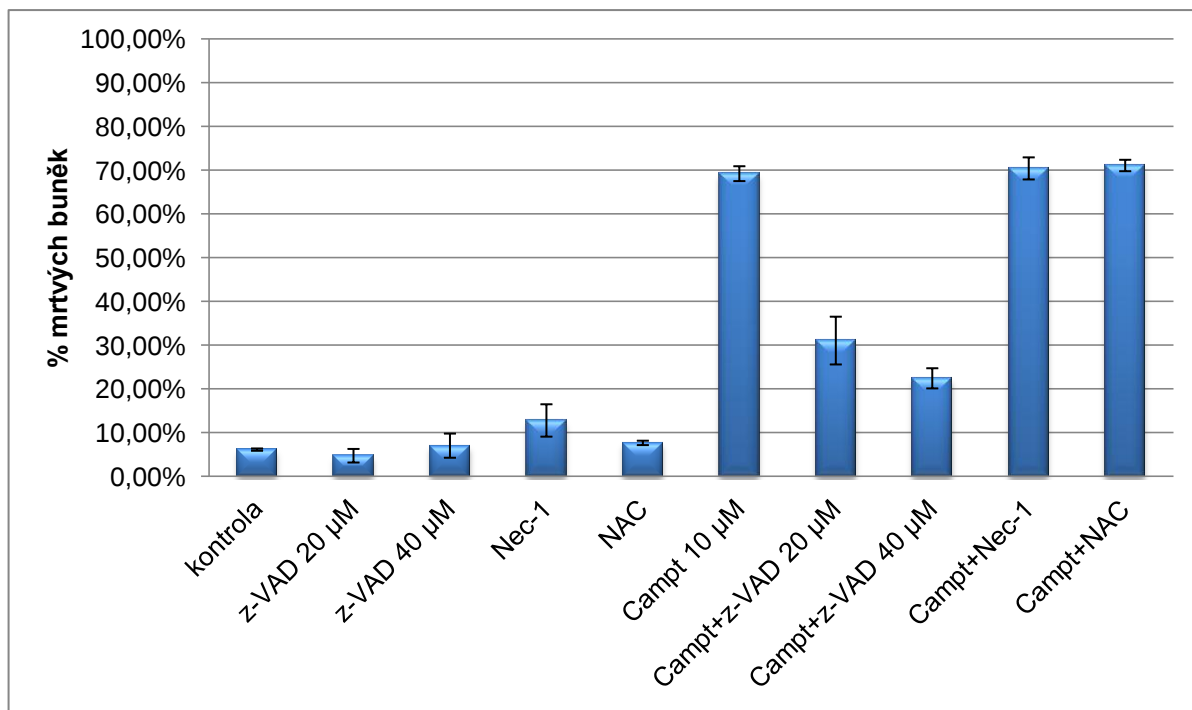
Obrázek č. 35: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti SL v koncentraci 1 µg/ml po dobu 48 hodin. Ke snížení procenta mrtvých buněk došlo pouze v kombinaci s Nec-1 a NAC.

Stejný experiment byl proveden na buněčné linii HeLa (Obr. 36), kde došlo opět ke snížení pouze v kombinaci s Nec-1, což znamená, že SL vyvolává nekroptózu také u buněčné linie HeLa.



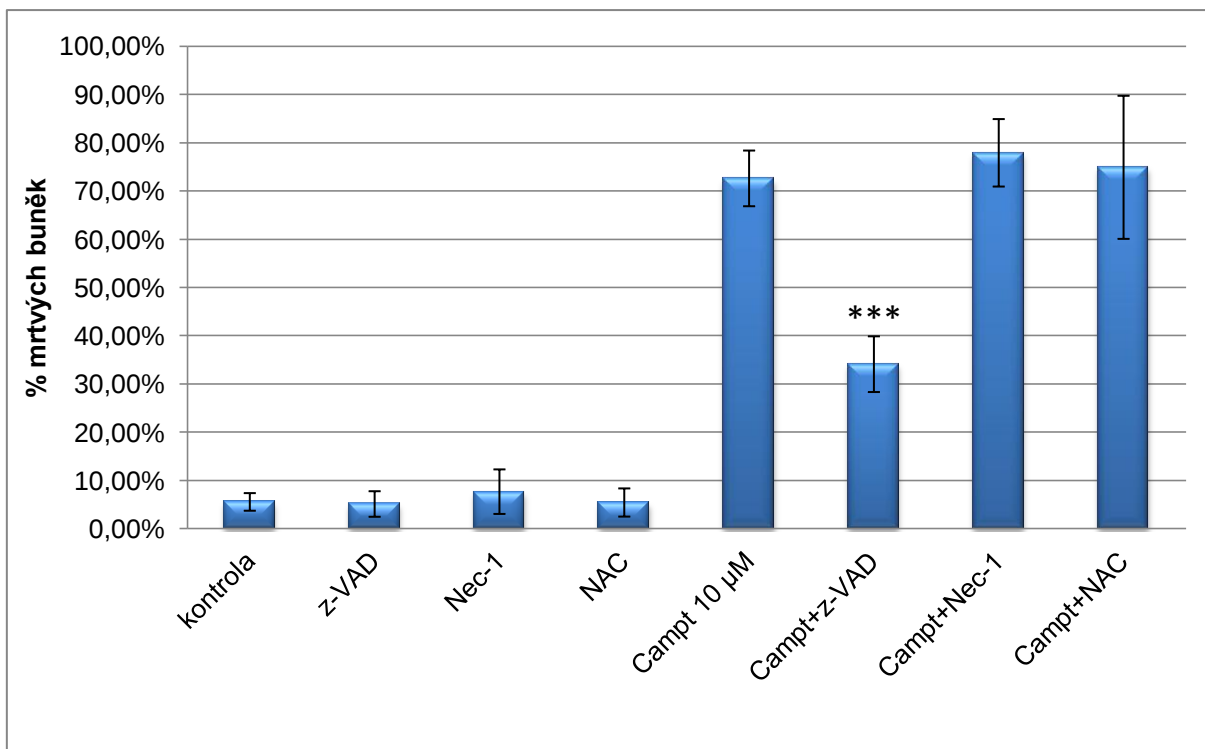
Obrázek č. 36: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk HeLa značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti SL v koncentraci 1 µg/ml po dobu 48 hodin. Ke snížení procenta mrtvých buněk došlo pouze v kombinaci s Nec-1.

SL se jeví jako zajímavá látka pro studium nekroptózy. Jako protipól SL, o kterém na základě předchozích výsledků předpokládáme, že způsobuje výhradně nekroptózu, jsme použili Campt, který je typickým induktorem apoptózy. Buňky A-375 byly po preinkubaci s inhibitory ovlivněny Campt (Obr. 37). Cytometrickou analýzou bylo zjištěno snížení procenta mrtvých buněk pouze v kombinaci se z-VAD-fmk. Byla tedy potvrzena apoptóza indukovaná Campt.



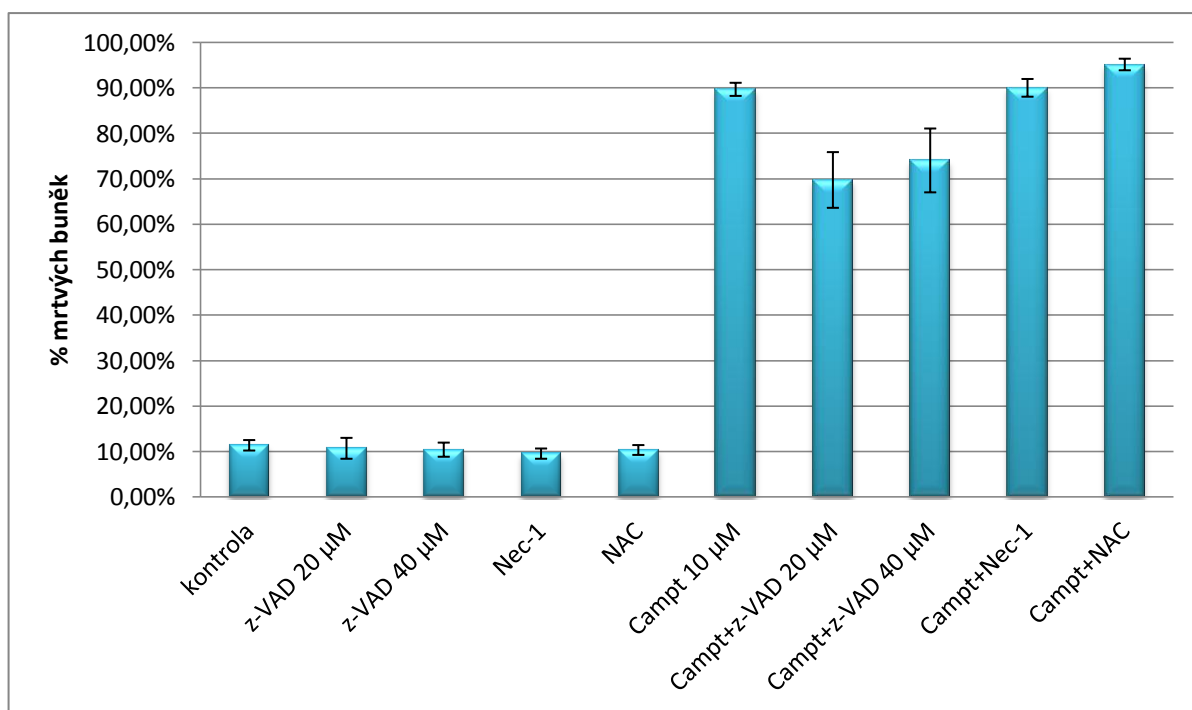
Obrázek č. 37: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 µM po dobu 48 hodin. Ke snížení procenta mrtvých buněk došlo pouze v kombinaci s inhibitorem apoptózy z-VAD-fmk.

Experiment byl několikrát zopakován a výsledek byl potvrzen statisticky významným snížením buněčné smrti pouze po preinkubaci s inhibitorem apoptózy, z-VAD-fmk (Obr. 38).



Obrázek č. 38: Studium typu buněčné smrti. Statisticky významný výsledek (experiment byl několikrát opakován) cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 µM po dobu 48 hodin. Ke statisticky významnému snížení procenta mrtvých buněk došlo pouze v kombinaci s inhibitem apoptózy z-VAD-fmk. Data jsou průměrnými hodnotami ze tří nezávislých pokusů. ***p < 0,005 buňky ovlivněné samotným Campt vs. buňky ovlivněné kombinací Campt a z-VAD-fmk.

Stejný experiment byl opět proveden také u buněčné linie HeLa (Obr. 39), kde jsme dosáhli stejných výsledků, tedy poklesu procenta mrtvých buněk pouze v kombinaci se z-VAD-fmk, což znamená, že Campt vyvolává apoptózu také u buněčné linie HeLa.

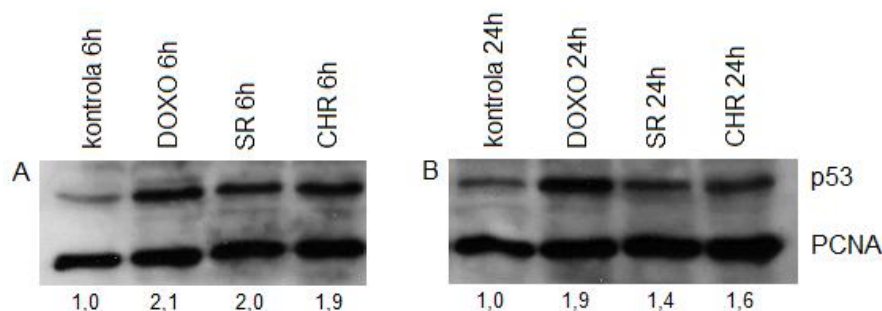


Obrázek č. 39: Studium typu buněčné smrti. Výsledek cytometrické analýzy buněk HeLa značených PI. Buňky byly nejdříve preinkubovány 3 hodiny s příslušnými inhibitory buněčných smrtí a poté kultivovány v přítomnosti Campt v koncentraci 10 µM po dobu 48 hodin. Ke snížení procenta mrtvých buněk došlo pouze v kombinaci s inhibitorem apoptózy z-VAD-fmk.

Experimenty potvrdily, že Campt indukuje výhradně apoptotickou na kaspázách závislou buněčnou smrt, zatímco pro SL je typická nekroptóza, buněčná smrt na kaspázách nezávislá.

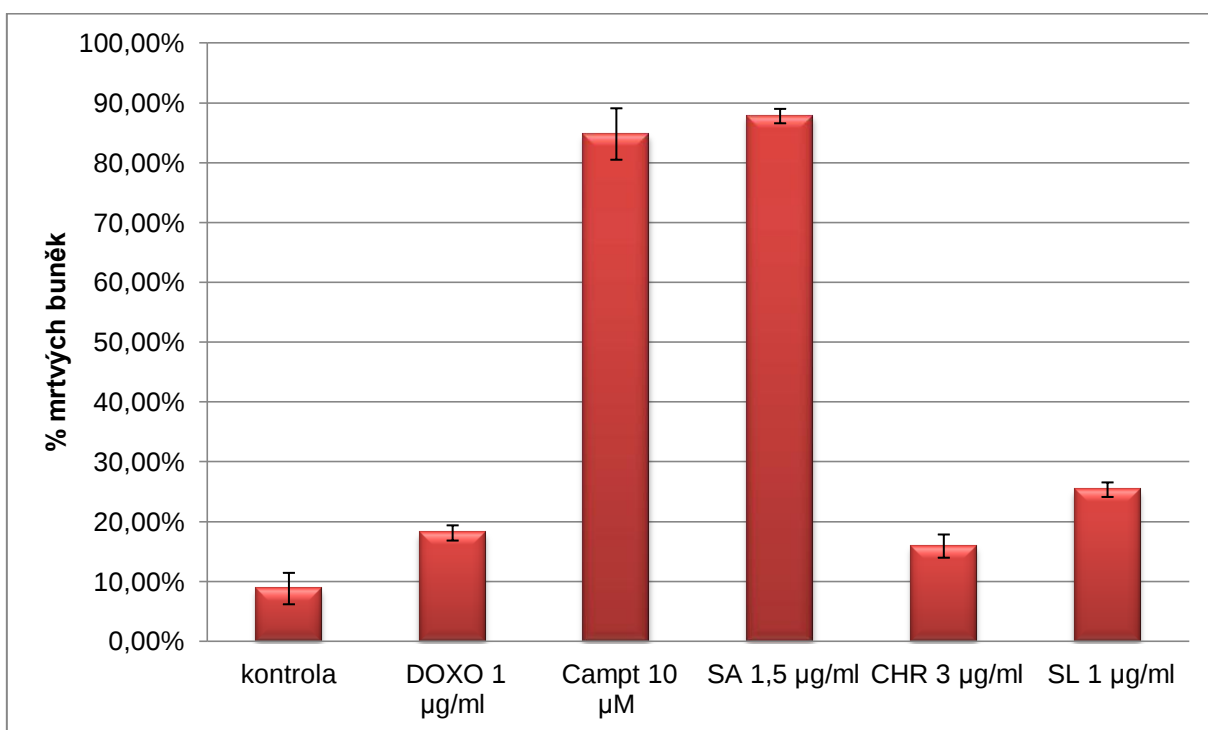
4.3.2 Úloha proteinu p53 v odpovědi buněk na účinek KBA

Protein p53 je jedním z nejvýznamnějších tumor supresorových proteinů, který je mutován ve více než 50 % různých typů nádorů. Nefunkčnost tohoto proteinu bývá často příčinou zvýšené odolnosti nádorových buněk k účinku cytostatik. Protein p53 hraje klíčovou roli v reakci na poškození DNA. p53 byl detekován u všech vzorků (Obr. 40). K mírnému zvýšení hladiny p53 (stabilizaci) oproti kontrole došlo působením SR a CHR, avšak efekt byl menší než v případě DOXO, který zde sloužil opět jako pozitivní kontrola.



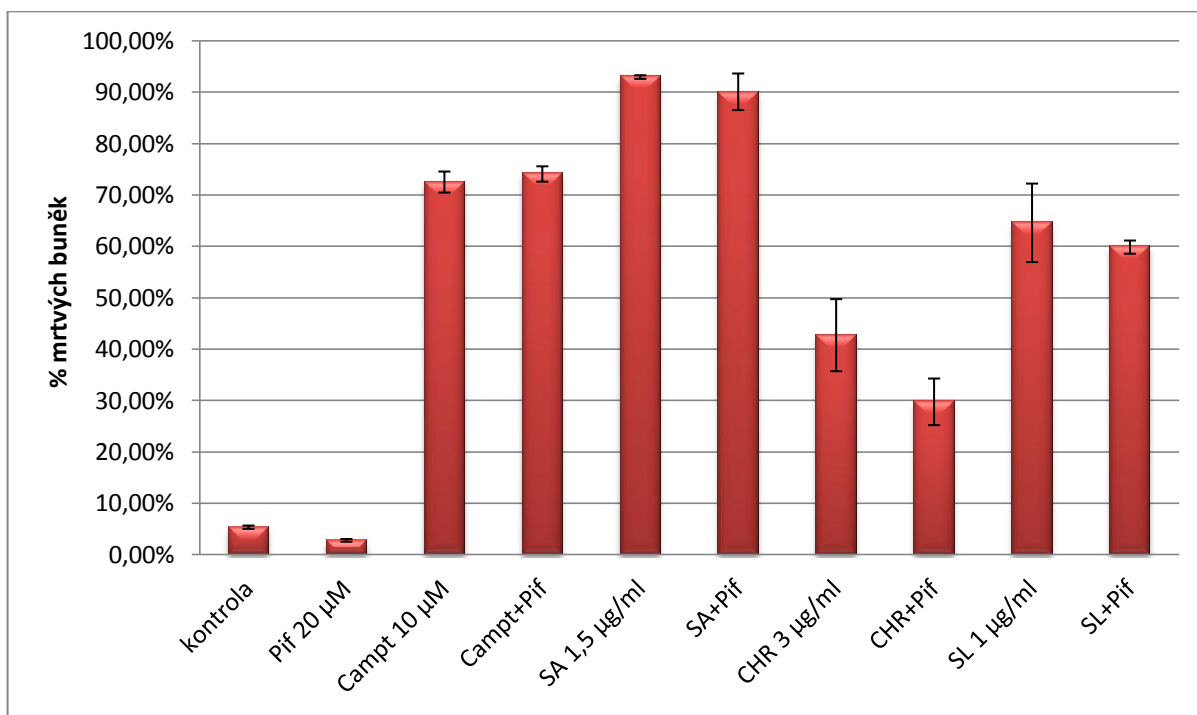
Obrázek č. 40: WB analýza proteinu p53. Výsledek WB analýzy proteinu p53 detekovaného po 6 (A) a 24 (B) hodinách. Byly použity buňky linie A-375, které byly kultivovány v přítomnosti DOXO v koncentraci 1 µg/ml a SR a CHR v koncentraci 3 µg/ml. Protein p53 byl separován na 10% gelu a byl detekován u všech vzorků. Nejvyšší hladina p53 je u DOXO, zvýšená také u SR a CHR.

A-375-p53DD je buněčná linie, jejíž gen p53 je vyřazen z funkce. U těchto buněk byl proveden cytometrický test cytotoxicity (Obr. 41). Ve srovnání s ostatními výsledky jsou buňky A-375-p53DD citlivější než mateřská buněčná linie A-375.



Obrázek č. 41: Cytotoxicita indukovaná vybranými izochinolinovými alkaloidy. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375-p53DD značených PI. Buňky byly ovlivněny DOXO v koncentraci 1 µg/ml, Camppt 1 µM, SL 1 µg/ml a CHR v koncentraci 3 µg/ml. Nejvíce toxický je CHR v koncentraci 3 µg/ml, následovaný SR ve stejné koncentraci. Nejvíce toxický je Camppt a SA. Srovnání buněčných linií A-375 a A-375-p53DD na Obr. 12.

Pifithrin je inhibitor p53. V kombinacích testovaných látek s tímto inhibitorem je pozorovatelné mírné snížení toxicity CHR v koncentraci 3 µg/ml, což by naznačovalo roli p53 v odpovědi buněk na CHR (Obr. 42).



Obrázek č. 42: Cytotoxicita indukovaná vybranými izochinolinovými alkaloidy. Výsledek cytometrické analýzy buněk A-375 značených PI. Buňky byly preinkubovány 90 minut v přítomnosti Pif a kultivovány s Campt v koncentraci 10 µM, SA 1,5 µg/ml, SL 1 µg/ml a CHR v koncentraci 3 µg/ml. Výsledek nebyl statisticky potvrzen.

5 DISKUZE

KBA a KPA patří do velké skupiny izochinolinových alkaloidů. Jejich zástupci vykazují významné biologické vlastnosti. Diplomová práce je zaměřena především na studium minoritních alkaloidů, jejichž vlastnosti jsou málo známy.

Zatímco majoritní KBA SA a CHE jsou dobře prostudovány, informace o biologických aktivitách minoritních alkaloidů jsou velmi omezené. SA a CHE jsou látky, které mají celou řadu biologických účinků. Mezi ty nejvýznamnější patří účinky antiproliferační a antiapoptotické, které byly popsány u různých typů nádorových buněk, včetně melanomové buněčné linie (Kemeny-Beke *et al.*, 2006; Serafim *et al.*, 2008; Hammerová *et al.*, 2011; 2012). Proto jsou diskutovány jako potenciální cytostatika. Mnoho autorů popsalo schopnost těchto alkaloidů indukovat apoptózu u různých typů buněk (Ahsan *et al.*, 2006; Kemeny-Beke *et al.*, 2006; Malikova *et al.*, 2006; Slaninová *et al.*, 2007). Bylo prokázáno, že cytotoxická aktivita KBA (především SA a CHE) souvisí s jejich schopností interagovat s DNA a s tvorbou dvouřetězcových zlomů (Kaminskyy *et al.*, 2006).

Během posledních let bylo publikováno mnoho zajímavých informací o cytotoxicitě SA a CHE (Vavrečková *et al.*, 1996; Panzer *et al.*, 2000; Šimánek *et al.*, 2003). Biologickými aktivitami minoritních KBA se zabýváme především v naší laboratoři. Slaninová *et al.* (2001) popsali cytotoxický efekt SA, CHE, SL a CHL u buněčné linie HeLa. V této práci jsme testovali 5 KBA (SA, CHE, SR, CHR, SL) a 2 KPA (BER, KOP). Zjistili jsme zásadní rozdíl v toxicitě zástupců těchto 2 skupin izochinolinových alkaloidů. Nejvíce toxickými minoritními alkaloidy na buňky A-375 byly SR a CHR ($IC_{50} = 0,5$). Alkaloidy ze skupiny KPA nebyly toxické ani v desetinásobné koncentraci. Proto jsme podrobněji studovali pouze KBA a zaměřili jsme se na minoritní alkaloidy SR a CHR. Buňky linie HL-60 byly k účinkům KBA citlivější. SR a CHR vykazovaly výraznou toxicitu již v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Tato linie byla srovnána s linií HL-60 MDR nadprodukující P-glykoprotein, která byla k účinku alkaloidů mnohem méně citlivá. Je tedy pravděpodobné, že alkaloidy jsou podobně jako cytostatika pumpovány ven z buňky prostřednictvím ABC transportérů.

Srovnání účinků KBA prokázalo, že navzdory velké podobnosti v jejich chemické struktuře se mechanismus indukce smrti buněk liší. U celé řady buněčných linií byla prokázána schopnost SA, CHE a chelidoninu indukovat apoptózu (Ding *et al.*, 2002; Adhami *et al.*, 2003; Kemeny-Beke *et al.*, 2006; Malikova *et al.*, 2006; Ahsan *et al.*, 2007; Slaninová

et al., 2007; Slunská *et al.*, 2010), u buněčné linie A-375 schopnost SL indukovat na kaspázách nezávislou buněčnou smrt, nekroptózu (Hammerová *et al.*, 2011; 2012).

V současnosti je diskutováno několik typů programované buněčné smrti (Galluzzi *et al.*, 2012). Schopnost vyvolat neapoptotickou buněčnou smrt je zajímavá především z hlediska terapie nádorů rezistentních k apoptóze. Proto jsme se zaměřili na studium mechanismu buněčné smrti a kladli jsme si otázku, zda alkaloidy indukují apoptózu, nekroptózu nebo autofagii. K tomuto studiu byly použity inhibitory smrti: z-VAD-fmk, Nec-1, 3-MA a inhibitor ROS NAC.

Nekroptóza byla objevena jako buněčná smrt, ke které dochází při bloádě funkce kaspáz pankaspázovým inhibitorem z-VAD-fmk. Stává se pak tedy hlavní formou buněčné smrti (Degterev *et al.*, 2005). Necrostatin-1 byl identifikován jako účinný inhibitor nekroptózy, a to díky jeho schopnosti zablokovat kinázovou aktivitu RIP1 kinázy, která spolu s RIP3 kinázou hraje v nekroptóze klíčovou roli. Pro indukci nekroptózy je zásadní produkce ROS (Fiers *et al.*, 1999). Proto byl pro potvrzení nekroptózy použit NAC, jenž inhibuje produkci ROS.

U buněk A-375 byla toxicita SA, SR a CHR snížena v přítomnosti inhibitoru kaspáz z-VAD-fmk. V kombinaci s Nec-1 (nebo s NAC, který byl použit pro potvrzení indukce nekroptózy) došlo ke snížení toxicity SA, CHE, SR a CHR. Při použití Nec-1 došlo úplnému snížení toxicity, zatímco v kombinaci se z-VAD-fmk se jednalo pouze o mírné snížení. Nekroptóza je pravděpodobně silnější a rychlejší buněčnou smrtí. Je tedy pravděpodobné, že na tyto alkaloidy může buňka odpovědět spuštěním obou buněčných smrtí – apoptózy i nekroptózy. Zda k tomu dochází současně nebo buněčné smrti alternují v případě zablokování jedné z nich je otázka, kterou jsme se snažili zodpovědět kultivací buněk se SA v kombinaci s oběma inhibitory (z-VAD-fmk, Nec-1). V tomto experimentu kombinace obou inhibitorů snížila buněčnou smrt přibližně stejně jako Nec-1 samotný, což by potvrzovalo výraznější účast nekroptózy. Z experimentů vyplývá, že buňka se vydá cestou nekroptózy, působí-li na ni vysoce toxická koncentrace daného alkaloidu. Jedná-li se o koncentraci nižší, může proběhnout apoptóza. Je ovšem také možné, že účinek Nec-1 není zcela specifický pouze pro nekroptózu. Některé studie ukázaly, že tento inhibitor může za určitých podmínek zablokovat taky apoptózu, která může souviset s aktivitou kinázy RIP1 (Wang *et al.*, 2008; Remijsen *et al.* 2014). Zásadní úlohu nekroptózy ovšem nepřímo potvrzují výsledky s NAC, který toxicitu alkaloidů ovlivňuje podobně jako Nec-1.

Studovali jsme také úlohu autofagie. V kombinaci s inhibitorem autofagie (3-MA) došlo v případě SR a CHR k navýšení procenta mrtvých buněk, což značí protektivní roli autofagie. Autofagie může být jak mechanismem buněčné smrti, tak dráhou buněčného přežití, kdy chrání buňku před hromaděním poškozených organel, ztrátou interakce s extracelulární matrix a nepříznivými podmínkami prostředí (Codogno and Meijer, 2005; Rashmi *et al.*, 2008; Scarlatti *et al.*, 2009). Ve většině případů se jedná o stresovou adaptační dráhu, která vede k přežití buněk. Hammerová *et al.* (2012) prokázali protektivní roli autofagie SL u buněk maligního melanomu. Po ovlivnění buněk tímto alkaloidem došlo v přítomnosti inhibitoru autofagie k navýšení procenta mrtvých buněk.

U buněk linie HeLa došlo ke snížení toxicity SA, CHE, SR a CHR pouze v přítomnosti Nec-1, potvrzeného také snížením v kombinaci s NAC. Navýšení toxicity v kombinaci s 3-MA nastalo rovněž u všech alkaloidů, jedná se tedy opět o protektivní roli autofagie. Je zajímavé, že z-VAD-fmk u této buněčné linie neovlivňoval buněčnou smrt po účinku ani jednoho z testovaných alkaloidů.

Z výše zmíněných výsledků, ale i z výsledků Hammerové *et al.* (2011; 2012), je zřejmé, že jednotlivé KBA i přes značnou podobnost molekulární struktury vykazují různé buněčné smrti. U SL bylo prokázáno, že u melanomové linie A-375 vykazuje vždy na kaspázách nezávislou buněčnou smrt, nekroptózu (Hammerová *et al.*, 2011; 2012). SL se tedy jeví zajímavý i z obecného hlediska studia mechanismu buněčné smrti. Proto jsme jeho účinek srovnávali s Campt, typickým induktorem apoptózy. Campt je inhibitor topoizomeráz používaný jako protinádorové léčivo, narušuje transkripci, indukuje zlomy DNA a u dělicích se buněk preferenčně spouští apoptózu (Liu *et al.*, 2000; Li a Liu, 2001). U obou buněčných linií A-375 a HeLa byla potvrzena indukce výhradně apoptózy. z-VAD-fmk snižoval buněčnou smrt, ale ne zcela na úroveň kontroly, zatímco Nec-1 buněčnou smrt nesnižoval v žádném z experimentů. U SL jsme u buněk A-375 potvrdili nekaspázovou buněčnou smrt. U buněk HeLa došlo také ke snížení pouze v kombinaci s Nec-1. Je tedy pravděpodobné, že nekroptóza je hlavní formou buněčné smrti po účinku SL.

Apoptóza je regulovaný proces, který zahrnuje změny v expresi genů a drah, které souvisí s upregulací proapoptotických nebo downregulací antiapoptotických proteinů. Mnoho autorů popsalo zvýšení exprese proapoptotických zástupců Bcl-2 proteinové rodiny (Bax, Bak, Bad, Bid); (Weerasinghe *et al.*, 2001; Reagan-Shaw *et al.*, 2006; Ahsan *et al.*, 2007), snížení exprese antiapoptotických členů (Bcl-2, Bcl-xL a Mcl-1); (Adhami *et al.*, 2003; Reagan-Shaw *et al.*, 2006; Ahsan *et al.*, 2007; Serafim *et al.*, 2008) či zvýšení hladiny

proapoptotického faktoru Apaf-1 (Adhami et al, 2003) po účinku KBA. U studovaných KBA SR a CHR došlo k poklesu hladiny antiapoptotického faktoru XIAP, hladiny antiapoptotických proteinů Bcl-xL a Mcl-1 zůstaly nezměněny. U Campt (který byl použit jako pozitivní kontrola) došlo k poklesu u XIAP i Bcl-xL.

Biologická aktivita KBA souvisí s interakcemi alkaloidů s buněčnými komponentami. Jak již bylo zmíněno, KBA interagují s DNA. Proto jsme zjišťovali, zda dochází k poškození DNA, a to detekcí γ H2AX, jehož průkaz souvisí s přítomností dvouřetězcových zlomů. Po účinku všech alkaloidů jsme γ H2AX pomocí WB prokázali. Otázkou je, zda jeho přítomnost je příčinou nebo důsledkem apoptózy. Dosud nebylo u většiny KBA přesně stanoveno, zda poškození DNA předchází apoptóze nebo je jejím důsledkem. Výjimkou je CHL, kde bylo nejdříve zjištěno štěpení kaspázy-3 a až poté fosforylace H2AX (Hammerová *et al.*, 2011). Naše výsledky ukazují, že SR a CHR vyvolaly fosforylaci H2AX po 3 hodinách, zatímco štěpení kaspázy-3 se nám u nich ve sledovaných časech prokázat nepodařilo. Poškození DNA a pozitivita γ H2AX může být způsobena rovněž produkcí ROS, kterými je provázena nekroptóza. Nemůžeme tedy s jistotou říct, že apoptóza je indukovaná poškozením DNA.

V souvislosti s interakcemi s DNA a s jejím možným poškozením je významná úloha proteinu p53. Výsledky předchozí studie z naší laboratoře ukázaly, že odpověď buněk na SA, CHE, SL a CHL je nezávislá na p53 (Hammerová *et al.*, 2011). Naše výsledky naopak ukazují, že po účinku SR a CHR na buňky linie A-375 byla hladina p53 stabilizována. Citlivost buněčné linie A-375-p53DD (s nefunkčním proteinem p53) k testovaným alkaloidům byla srovnatelná nebo dokonce vyšší s mateřskou linií A-375. Avšak u buněk A-375 ovlivněných inhibitorem p53 Pifithrinem (blokuje transaktivační potenciál p53) bylo pozorováno snížení procenta mrtvých buněk, což by znamenalo, že p53 má úlohu v indukci buněčné smrti. Z hlediska vlivu na jednotlivé buněčné linie je zřejmé, že efekt alkaloidů na různé linie se liší v závislosti na typu linie, ne na funkčnosti p53.

Výsledky diplomové práce potvrdily výrazný antiproliferační efekt KBA, včetně minoritních alkaloidů SR a CHR. Bylo prokázáno, že SR a CHR jsou podobně jako SA a CHE schopny indukovat jak apoptózu, tak nekroptózu u melanomové buněčné linie A375. U buněk HeLa dochází k indukci pouze na kaspázách nezávislé buněčné smrti, nekroptózy. Dále bylo prokázáno, že SL způsobuje výhradně nekaspázovou buněčnou smrt nejenom u buněk melanomů, ale i u linie HeLa. Je tedy zajímavou látkou pro studium mechanismu nekroptózy. Schopnost vyvolat nekroptózu nebo oba typy buněčné smrti je významná z hlediska terapie nádorů rezistentních k apoptóze.

6 SOUHRN

Diplomová práce „Účinek vybraných izochinolinových alkaloidů na nádorové buňky“ je zaměřena na studium antiproliferačních a cytotoxických účinků a mechanismů buněčné smrti vybraných izochinolinových alkaloidů (KBA i KPA). Jedná se o alkaloidy minoritní, jejichž vlastnosti nejsou příliš známé. Experimenty bylo dosaženo těchto výsledků:

- KBA vykazují vysokou antiproliferační a cytotoxickou aktivitu. Nejvíce toxickými alkaloidy u buněčné linie A-375 byly SR a CHR. Alkaloidy skupiny KPA nebyly toxické ani v desetinásobné koncentraci.
- Z hlediska vlivu na jednotlivé buněčné linie je zřejmé, že se efekt alkaloidů na různé linie liší v závislosti na typu linie.
- Buňky linie HL-60 byly k účinkům KBA nejcitlivější. Tato linie byla srovnána s rezistentní linií HL-60 MDR, jejíž citlivost byla mnohem nižší, což naznačuje, že alkaloidy jsou pumpovány ven z buňky prostřednictvím ABC transportérů.
- Protein p53 hraje patrně roli v odpovědi buněk na SR a CHR. Po jejich účinku byla u buněčné linie A-375 hladina proteinu p53 stabilizována a v kombinaci s Pifithrinem, inhibítozem p53, se úmrtnost buněk snižovala.
- SR a CHR jsou stejně jako SA a CHE schopny indukovat apoptózu i nekroptózu u buněčné linie A-375. Nekroptóza je pravděpodobně silnější a rychlejší buněčnou smrtí. U buněčné linie HeLa dochází pouze k indukci nekroptózy.
- Potvrdili jsme nekroptózu indukovanou SL u buněčné linie A-375. Bylo prokázáno, že i u buněk HeLa je tato nekaspázová buněčná smrt hlavní formou buněčné smrti po účinku SL.
- SL je patrně induktorem výhradně nekaspázové buněčné smrti a může být tedy vhodnou látkou pro studium mechanismu této smrti.
- Byla prokázána protektivní role autofagie v odpovědi buněk na testované KBA u buněčných linií A-375 a HeLa.

7 SUMMARY

This diploma thesis “The effect of selected isochinoline alkaloids on tumour cells” is focused on study of antiproliferative and cytotoxic effects and cell death mechanisms of selected isoquinoline alkaloids (QBA and QPA). These are minor alkaloids, whose properties are not entirely known. Following results were achieved:

- QBA show high anti-proliferative and cytotoxic activity. SR and CHR were the most toxic alkaloids within the cell line A-375. Alkaloids QPA were not toxic even at concentrations ten times higher.
- In terms of the effect on individual cell line it is clear that the effect of alkaloids on different cell lines varies depending on the type of cells.
- The cell line HL-60 was the most sensitive to the effects of QBA. This line was compared to resistant HL-60 MDR cell line, which sensitivity was much lower. This indicates that alkaloids are pumped out of the cells using ABC transporters.
- p53 is probably involved in the response of cells to SR and CHR. Upon the action of these alkaloids the level of p53 protein on the cell line A-375 was stabilized and the cell mortality decreased in combination with Pifithrin, inhibitor of p53.
- SR and CHR as well as SA and CHE are capable of inducing apoptosis as well as necroptosis on cell line A-375. Necroptosis is probably stronger and faster form of the cell death. Only induction of necroptosis was observed on HeLa cell line.
- Strictly necroptosis induction by SL on A-375 cell line was confirmed and it was demonstrated that also in HeLa cells caspase-independent cell death was the predominant form of the cell death upon SL treatment.
- It is apparent that SL induces exclusively caspase-independent cell death and could therefore be appropriate molecule for study of the mechanism of necroptosis.
- Protective role of autophagy upon QBA treatment was demonstrated in A-375 and HeLa cell lines.

8 LITERATURA

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. *Clin. Cancer Res.* 9: 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. *Mol. Cancer Ther.* 3: 933–940.

Adhikari A., Hossain M., Maiti M., Kumar G. S. 2008. Energetics of the binding of phototoxic and cytotoxic plant alkaloid sanguinarine to DNA: isothermal titration calorimetric studies. *J. Mol. Struct.* 889: 54–63.

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. *Clin. Cancer Res.* 6: 1524–1528.

Ahsan H., Reagan-Shaw S., Eggert D., Afaq F., Mukhtar H., Ahmad N. 2006. Plant alkaloid sanguinarine prevents Ultraviolet B radiation-mediated damages in the skin of SKH1 hairless mouse. *Journal of Investigative Dermatology* 126 (Suppl. 1): 141.

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.

Armstrong B. K., Holman C. D. J. 1987. Malignant melanoma of the skin. *Bulletin of the World Health Organization* 65: 245–252.

Bai L.-P., Zhao Z.-Z., Cai Z., Jiang Z.-H. 2006. DNA-binding affinities and sequence selectivity of quaternary benzophenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine, and nitidine. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 5439–5445.

Bastian B. C., Olshen A. B., LeBoit P. E., Pinkel D. 2003. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *American Journal of Pathology* 163: 1765–1770.

Bataille V. 2000. Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clinical and Experimental Dermatology* 25: 464–470.

Bataille V. 2003. Genetic epidemiology of melanoma. *European Journal of Cancer* 39: 1341–1347.

- Bedikian A. Y., Millward M., Pehamberger H., Conry R., Gore M., Trefzer U., Pavlick A. C., DeConti R., Hersh E. M., Hersey P., Kirkwood J. M., Haluska F. G.** 2006. Bcl-2 antisense(oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J. Clin. Oncol.* 24: 4738-4745.
- Berghe T. V., Linkermann A., Jouan-Lanhouet S., Walczak H., Vandenabeele P.** 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Mol. Cell Biol.* 15: 135–147.
- Bhadra K., Kumar G. S.** 2011. Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: a comparative spectroscopic and calorimetric study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1810: 485–496.
- Bleehen N. M., Newlands E. S., Lee S. M., Thatcher N., Selby P., Calvert A. H., Rustin G. J., Brampton M., Stevens M. F.** 1995. Cancer Research Campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 13: 910-913.
- Clark W. H. Jr.** 1991. Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 10: 83–88.
- Codogno P., Meijer A. J.** 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* 12 Suppl. 2: 1509–1518.
- Colombo M. L., Bugatti C., Mossa A., Pescalli N., Piazzoni L., Pezzoni G., Menta E., Spinelli S., Johnson F., Gupta R. C., Dasaradhi L.** 2001. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Il Farmaco* 56: 403–409.
- Crombie I. K.** 1979. Racial differences in melanoma incidence. *British journal of cancer*, 40: 185–193.
- Curtin J. F., Cotter T. G.** 2003. Apoptosis: historical perspectives. *Essays Biochem.* 39: 1–10.
- Dahl C., Guldberg P.** 2007. The genome and epigenome of malignant melanoma. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 115 (10): 1161–1176.
- Das A., Mukherjee A., Chakrabarti J.** 2004. Sanguinarine: an evaluation of in vivo cytogenetic activity. *Mutat. Res.* 563: 81–87.
- Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M. J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B. A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.**

J., Bigner D. D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J. W., Leung S. Y., Yuen S. T., Weber B. L., Seigler H. F., Darrow T. L., Paterson H., Marais R., Marshall C. J., Wooster R., Stratton M. R., Futreal P. A. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949–954.

Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G. D., Mitchison T. J., Moskowitz M. A., Yuan J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology* 1 (2): 112–119.

Degterev A., Hitomi J., Germscheid M., Ch'en I. L., Korkina O., Teng X., Abbott D., Cuny G. D., Yuan C., Wagner G., Hedrick S. M., Gerber S. A., Lugovskoy A., Yuan J. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 4: 313–321.

Demunter A., Stas M., Degreef H., DeWolf-Peeters C., van den Oord J. J. 2001. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 117: 1483–1489.

Deng A.-J., Hai-Lin Q. 2010. Cytotoxic dihydrobenzophenanthridine alkaloids from the roots of *Macleaya microcarpa*. *Phytochemistry* 71: 816–822.

Dice, J. F. 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 15: 305–309.

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. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1415–1421.

Dolianitis C., Kelly J., Wolfe R., Simpson P. 2005. Comparative performance of 4 dermoscopic algorithms by nonexperts for the diagnosis of melanocytic lesions. *Archives of Dermatology* 141: 1008–1014.

Dostál J., Slavík J. 2002. Some aspects of the chemistry of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 27: 155–184.

Edinger A. L., Thompson C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 663–669.

Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35: 495–516.

Emmert S., Zutt M., Haenssle H., Neumann C., Kretschmer L. 2003. Inefficacy of vindesine monotherapy in advanced stage IV malignant melanoma patients previously treated with other chemotherapeutic agents. *Melanoma Res.* 13: 299–302.

Ernst E., Schmidt K. 2005. Ukrain – a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials. *BMC Cancer* 5: 69.

Esposti D. D., Domart M. C., Sebah M., Harper F., Pierron G., Brenner C., Lemoine A. 2010. Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis. *Autophagy* 6: 172–174.

Farré J. C., Krick R., Subramani S., Thumm M. 2009. Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 522–530.

Feoktistova M., Geserick P., Kellert B., Dimitrova D. P., Langlais C., Hupe M., Cain K., MacFarlane M., Häcker G., Leverkus M. 2011. cIAPs block ripoptosome formation, a RIP1/Caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol. Cell* 43: 449–463.

Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D. M. GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No. 5 Version 2.0. Lyon, France: IARC Press; 2004.

Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18 (54): 7719–7730.

Fitzpatrick T. B. 1971. The biology of pigmentation. *Birth Defects Original Article Series* 8: 5–12.

Galluzzi L., Blomgren K., Kroemer G. 2009. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 481–494.

Galluzzi L., Vanden Berghe T., Vanlangenakker N., Buettner S., Eisenberg T., Vandenabeele P., Madeo F., Kroemer G. 2011. Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 289: 1–35.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., Dawson T. M., Dawson V. L., El-Deiry W. S., Fulda S., Gottlieb E., Green D. R., Hengartner M. O., Kepp O., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M. E., Piacentini M., Rubinsztein D. C., Shi Y., Simon H. U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 19: 107–120.

- Gan B. S., Colcleugh R. G., Scilley C. G., Craig I. D.** 1995. Melanoma arising in a chronic (Marjolin's) ulcer. *Journal of the American Academy of Dermatology* 32: 1058–1059.
- Garbe C, Leiter U.** 2009. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology* 27: 3–9.
- Giehl K.** 2005. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol. Chem.* 386: 193–205.
- Glover D., Ibrahim J., Kirkwood J., Glick J., Karp D., Stewart J., Ewell M., Borden E.** 2003 Phase II randomized trial of cisplatin and WR-2721 versus cisplatin alone for metastatic melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1686). *Melanoma Res.* 13: 619–626.
- Goel V. K., Lazar A. J., Warneke C. L., Redston M. S., Haluska F. G.** 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 126: 154–160.
- Gorden A., Osman I., Gai W., He D., Huang W., Davidson A., Houghton A. N., Busam K., Polsky D.** 2003. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res.* 63: 3955–3957.
- Grange F., Chompret A., Guilloud-Bataille M., Guillaume J. C., Margulis A., Prade M., Demenais F., Avril M. F.** 1995. Comparison between familial and nonfamilial melanoma in France. *Archives of Dermatology* 131: 1154–1159.
- Gray-Schopfer V., Wellbrock C., Marais R.** 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445: 851–857.
- Grycová L., Dostál J., Marek R.** 2007. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* 68: 150–175.
- Guo L., Liu X. J., Nishikawa K., Plunkett W.** 2007. Inhibition of topoisomerase II alpha and G2 cell cycle arrest by NK314, a novel benzo[c]phenanthridine currently in clinical trials. *Mol. Cancer Ther.* 6: 1501–1508.
- Guo L., Liu X., Nishikawa K., Plunkett W.** 2011. DNA-dependent protein kinase and ataxia telangiectasia mutated (ATM) promote cell survival in response to NK314, a topoisomerase IIa inhibitor. *Mol. Pharmacol.* 80: 321–327.
- Habermehl D., Kammerer B., Handrick R., Eldh T., Gruber C., Cordes N., Daniel P. T., Plasswilm L., Bamberg M., Belka C., Jendrosseck V.** 2006. Proapoptotic activity of *Ukrain* is based on *Chelidonium majus L.* alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. *BMC Cancer* 6: 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: 22–35.

Hammerová J., Uldrijan S., Táborská E., Vaculová A. H., Slaninová I. 2012. Necroptosis modulated by autophagy is a predominant form of melanoma cell death induced by sanguilutine. *Biol. Chem.* 393: 647–658.

Han J., Zhong Ch.-Q., Zhang D.-W. 2011. Programmed necrosis: back up to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature Immunology* 12: 1143–1149.

Hanahan D., Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.

Herman B., Gudrun A., Potopalsky A. I., Chroboczek J., Tcherniuk S. O. 2013. Amitozyn impairs chromosome segregation and induces apoptosis via mitotic checkpoint activation. *Plos One* 8 (3) [online]. DOI:10.1371/journal.pone.0057461.

Holy J., Laminy G., Perkins E. 2006. Disruption of nucleocytoplasmic trafficking of cyclin D1 and topoisomerase II by sanguinarine. *BMC Cell Biol.* 7: 13.

Hossain M., Kumar G. S. 2009. DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguinarine versus ethidium: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. *J. Chem. Thermodyn.* 41: 764–774.

Houghton A. N., Viola M. V. 1981. Solar radiation and malignant melanoma of the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 5: 477–483.

Chaabane W., User S. D., El-Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska-Wolny J., Łos M. J. 2013. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61: 43–58.

Chaturvedi M. M., Kumar A., Darnay B. G., Chainy G. B., Agarwal S., Aggarwal B. B. 1997. Sanguinarine (pseudocheilerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, IkBa phosphorylation, and degradation. *J. Biol. Chem.* 272: 30129–30134.

Chen W. H., Qin Y., Cai Z., Chan C. L., Luo G. A., Jiang Z. H. 2005. Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double-stranded DNA. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 1859–1866.

Choi W. Y., Kim G.-Y., Lee W. H., Choi Y. H. 2008. Sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Chemotherapy* 54: 279–287.

Christensen C., Guldberg P. 2005 Growth factors rescue cutaneous melanoma cells from apoptosis induced by knock-down of mutated (V600E) BRAF. *Oncogene* 24: 6292–6302.

Ishikawa T., Saito T., Ishii H. 1995. Synthesis of macarpine and its cytotoxicity – toward a synthetic route for 12-alkoxybenzo[c]phenanthridine alkaloids through aromatic nitrosation under basic condition. *Tetrahedron* 51: 8447–8458.

Jain M. V., Paczulla A. M., Klonisch T., Dimgba F. N., Rao S. B., Roberg K., Schweizer F., Lengerke C., Davoodpour P., Palicharla V. R., Maddika S., Los M. 2013. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J. Cell Mol. Med.* 17: 12–29.

Jantova S., Cipak L., Letasiova S. 2007. Berberine induces apoptosis through a mitochondrial/caspase pathway in human promonocytic U937 cells. *Toxicology In Vitro* 21: 25–31.

Ji X., Sun H., Zhou H., Xiang J., Tang Y., Zhao C. 2012. The interaction of telomeric DNA and C-myc22 G-quadruplex with 11 natural alkaloids. *Nucleic Acid Ther.* 22: 127–136.

Jilaveanu L. B., Aziz S. A., Kluger H. M. 2009. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clinics in Dermatology* 27: 614–625.

Karasarides M., Chiloeches A., Hayward R., Niculescu-Duvaz D., Scanlon I., Friedlos F., Ogilvie L., Hedley D., Martin J., Marshall C. J., Springer C. J., Marais R. 2004 B-Raf is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 23: 6292–6298.

Karim R. Z., Li W., Sanki A., Colman M. H., Yang Y. H., Thompson J. F., Scolyer R. A. 2009. Reduced p16 and increased cyclin D1 and pRb expression are correlated with progression in cutaneous melanocytic tumors. *International Journal of Surgical Pathology* 17: 361–367.

Kaminsky V. O., Lootsik M. D., Stoika R. S. 2006. Correlation of the cytotoxic activity of four different alkaloids, from *Chelidonium majus* (greater celandine), with their DNA intercalating properties and ability to induce breaks in the DNA of NK/Ly murine lymphoma cells. *Central European Journal of Biology* 1(1): 2–15.

Kemeny-Beke A., Aradi J., Damjanovich J., Beck Z., Facsko A., Berta A., Bodnar A. 2006. Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine. *Cancer Letters* 237(1): 67–75.

Kinloch R. A., Treherne J. M., Furness L. M., Hajimohamadereza I. 1999. The pharmacology of apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 35–42.

Klionsky D. J. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 931–937.

Kosina P., Gregorova J., Gruz J., Vacek J., Kolard M., Voge M., Roose W., Naumannf K., Simaneka V., Ulrichovaa J. 2010. Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia* 81: 1006–1012.

Kovář J., Šimek K., Kožoušková E., Klukanová H. 1985. Fluorescence properties of some isoquinoline alkaloids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 50: 1312–1328.

Kroemer G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* 3: 614–619.

Kroemer G., Mariño G., Levine B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell* 40: 280–293.

Li T. K., Liu L. F. 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase targeting drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 53–77.

Liu L. F., Desai S. D., Li T. K., Mao Y., Sun M., Sim S. P. 2000. Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 922: 1–10.

Liu Q., Liu Y., Guo M., Lou X., Yao S. 2006. A simple and sensitive Metod of nonaqueous capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection for the analysis of chelerythrine and sanguinarine in Chinese herbal medicines. *Talanta* 70: 202–207.

Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K. 1999. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10: 629–663.

MacLennan R., Green A. C., McLeod G. R. C., Martin N. G. 1992. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *Journal of the National Cancer Institute* 84: 1427–1432.

Maiti M., Nandi R., Chaudhuri K. 1982. Sanguinarine: a monofunctional intercalating alkaloid. *FEBS Lett.* 142: 280–284.

Maiti M., Nandi R., Chaudhuri K. 1984. Interaction of sanguinarine with natural and synthetic deoxyribonucleic acids. *Indian J. Biochem. Biol.* 21: 158–165.

Maiti M., Kumar G. S. 2007. Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives, *Med. Research Rev.* 27: 649–695.

Malikova J., Zdarilova A., Hlobilkova A., Ulrichova J. 2006. The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell Biology and Toxicology* 22(6): 439–453.

Mansoor T. A., Borralho P. M., Luo X., Mulhovo S., Rodrigues C. M. P., Ferreira M.-J. U. 2013. Apoptosis inducing activity of benzophenanthridine-type alkaloids and 2-arylbenzofuran neolignans in HCT116 colon carcinoma cells. *Phytomedicine* 20: 923–929.

Marks R. 2000. Epidemiology of melanoma. *Clin. Exp. Dermatol.* 25: 459–463.

Marrett L. D., Nguyen H. L., Armstrong B. K. 2001 Trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma in New South Wales, 1983–1996. *Int. J. Cancer* 92: 457–462.

Mertens R., Granzen B., Lassay L., Gademann G., Hess C. F., Heimann G. 1997. Nasopharyngeal carcinoma in childhood and adolescence: concept and preliminary results of the cooperative GPOH study NPC-91. *Cancer* 80: 951–959.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., White, E. 2007. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 7: 961–967.

Mehrpour M., Esclatine A., Beau I., Codogno P. 2010. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298: 776–785.

Meijer A. J., Codogno P. 2009. Autophagy: regulation and role in disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 46: 210–240.

Middleton M. R., Grob J. J., Aaronson N., Fierlbeck G., Tilgen W., Seiter S., Gore M., Aamdal S., Cebon J., Coates A., Dreno B., Henz M., Schadendorf D., Kapp A., Weiss J., Fraass U., Statkevich P., Muller M., Thatcher N. 2000 Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 18: 158-166.

Miller A. J., Mihm M. C. Jr. 2006. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355: 51–65.

Naldi L., Imberti G. L., Parazzini F., Gallus S., La Vecchia C. 2000. Pigmentary traits, modalities of sun reaction, history of sunburns, and melanocytic nevi as risk factors for cutaneous malignant melanoma in the italian population: results of a collaborative case-control study. *Cancer* 88: 2703–2710.

Mizushima N., Komatsu M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728–741.

Nandi R., Debnath D., Maiti M. 1990. Interactions of berberine with poly(A) and tRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1049: 39–42.

Nordlund J. J., Boissy R. E. 2001. The biology of Melanocytes. In: *The Biology of the Skin*. Parthenon Publishing, New York, NY, USA, 113–131.

Oberst A., Dillon C. P., Weinlich R., McCormick L. L., Fitzgerald P., Pop C., Hakem R., Salvesen G. S., Green D. R. 2011. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 471: 363–367.

Palmer J. S., Duffy D. L., Box N. F., Aitken J. F., O’Gorman L. E., Green A. C., Hayward N. K., Martin N. G., Sturm R. A. 2000. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* 66: 176–186.

Palmieri G., Capone M., Ascierto M. L., Gentilcore G., Stroncek D. F., Casula M., Sini M. C., Palla M., Mozzillo N., Ascierto P. A. 2009. Main roads to melanoma. *Journal of Translational Medicine* 7.

Panzer A., Hamel E., Joubert A. M., Bianchi P. C., Seegers J. C. 2000. Ukrain (TM) a semisynthetic *Chelidonium majus* alkaloid derivative, acts by inhibition of tubulin polymerization in normal and malignant cell lines. *Cancer Letters* 160 (2): 149–157.

Pollock P. M., Harper U. L., Hansen K. S., Yudt L. M., Stark M., Robbins C. M., Moses T. Y., Hostetter G., Wagner U., Kakareka J., Salem G., Pohida T., Heenan P., Duray P., Kallioniemi O., Hayward N. K., Trent J. M., Meltzer P. S. 2003. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 33: 19–20.

Qin Y., Pang J. Y., Chen W. H., Cai Z., Jiang Z. H. 2006. Synthesis, DNA-binding affinities, and binding mode of berberine dimers. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 25–32.

Radović-Kovacević V., Pekmezović T., Adanja B., Jarebinski M., Marinković J., Tomin R. 1997. Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo* 125: 132–137.

Rashmi R., Pillai S. G., Vijayalingam S., Ryerse J., Chinnadurai G. 2008. BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene* 27 (10): 1366–1375.

Reagan-Shaw S., Breur J., Ahmad N. 2006. Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes. *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (2): 418–429.

Remijsen Q., Goossens V., Grootjans S., Van den Haute C., Vanlangenakker N., Dondelinger Y., Roelandt R., Bruggeman I., Goncalves A., Bertrand M. J. M., Baekelandt V., Takahashi N., Berghe T. V., Vandenabeele P. 2014. Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell Death and Disease* 5: [online]. DOI:10.1038/cddis.2013.531.

Sawai H. 2013. Differential effects of caspase inhibitors on TNF-induced necroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Com.* 432: 451–455.

Scarlatti F., Maffei R., Beau I., Codogno P., Ghidoni R. 2008. Role of non-canonical Beclin-1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 15: 1318–1329.

Scarlatti F., Granata R., Meijer A. J., Codogno P. 2009. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death and Differentiation* 16 (1): 12–20.

Selvi B. R., Pradhan S. K., Shandilya J., Das C., Sailaja B. S., Shankar G. N., Gadad S. S., Reddy A., Dasgupta D., Kundu T. K. 2009. Sanguinarine interacts with chromatin, modulates epigenetic modifications, and transcription in the context of chromatin. *Chem. Biol.* 16: 203–216.

Sen A., Maiti M. 1994. Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. *Biochem. Pharmacol.* 48: 2097–2102.

Sen A., Ray A., Maiti M. 1996. Thermodynamics of the interactions of sanguinarine with DNA, influence of ionic strength and base composition. *Biophys. Chem.* 59: 155–170.

Serafim T. L., Matos J. A., Sardao V. A., Pereira G. C., Branco A. F., Pereira S. L., Parke D., Perkins E. L., Moreno A. J., Holy J., Oliveira P. J. 2008. Sanguinarine cytotoxicity on mouse melanoma K1735-M2 cells--nuclear vs. mitochondrial effects. *Biochemical Pharmacology* 76 (11): 1459–1475.

Schmeller T., Latz-Bruning B., Wink M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44: 257–266.

Schneider J. S., Moore D. H. II, Sagebiel R. W. 1994. Risk factors for melanoma incidence in prospective follow-up: the importance of atypical (dysplastic) nevi. *Archives of Dermatology* 130: 1002–1007.

Schulze-Osthoff K., Bakker A. C., Vanhaesebroeck B., Beyaert R., Jacob W. A., Fiers W. 1992. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.* 267: 5317–5323.

Slaninová I., Tábořská E., Bochořáková H., Slanina J. 2001. Interaction of benzo[c]phenanthridine and protoberberine alkaloids with animal and yeast cells. *Cell Biol. Toxicol.* 17: 51–63.

Slaninová I., Slunská Z., Šinkora J., Vlková M., Tábořská E. 2007. Screening of minor benzo(c)phenanthridine alkaloids for anti-proliferative and apoptotic activities. *Pharm. Biol.* 45: 131–139.

Slaninová I., Slanina J., Tábořská E. 2008. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond; *Chem. Listy* 102: 427–433.

Slaninová I., Pěničková K., Urbanová J., Slanina J., Tábořská E. 2014. Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. *Phytochem. Rev.* 13: 9290–9308.

Slavík J., Slavíkova L. 1960. Alkaloide Der Mohnengewachse (*Papaveraceae*). 17. Über Neue Alkaloide Aus *Sanguinaria-Canadensis* L. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 25 (6): 1667–1675.

Slavík J., Hanuš V., Slavíková L. 1991. Alkaloids of the *Papaveraceae*. 91. Alkaloids from *Stylophorum lasiocarpum* (Oliv.) Fedde. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 56 (5): 1116–1122.

Slunská Z., Gelnarová E., Hammerová J., Tábořská E., Slaninová I. 2010. Effect of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguilutine and chelilutine on normal and cancer cells. *Toxicology In Vitro* 24 (3): 697–706.

Solit D. B., Garraway L. A., Pratilas C. A., Sawai A., Getz G., Basso A., Ye Q., Lobo J. M., She Y., Osman I., Golub T. R., Sebolt-Leopold J., Sellers W. R., Rosen N. 2006. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439: 358–362.

Suffys P., Beyaert R., De Valck D., Vanhaesebroeck B., Van Roy F., Fiers W. 1991. Tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase-A2 activity, but not with arachidonic acid release per se. *Eur. J. Biochem.* 195: 465–475.

Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Tábořská E. 2007. HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family *Papaveraceae*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44: 283–287.

Šimánek V., Vespalec R., Šedo A., Ulrichová J., Vičar J. 2003. Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids – biological activities. In: Schneider M. P. (Ed.). *Chemical Probes in Biology. NATO Science Series, II. Mathematics, Physics and Chemistry* – 129. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 245–254.

Taborska E., Veznik F., Slavikova L., Slavik J. 1978. Alkaloids of *Papaveraceae*. 67. Quaternary Alkaloids of 3 Species of *Dicranostigma* Hook-F Et Thoms. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 43: 1108–1112.

Táborský P., Slaninová I., Táborská E. 2010. Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids: Perspective fluorescence DNA probes. In: Cassiano NM (ed) Alkaloids: properties, application and pharmacological effects. Nova Science Publishers Inc., New York, 81–89.

Tarhini A. A., Agarwala S. S. 2006. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. Dermatol. Ther. 19: 19–25.

Tenev T., Bianchi K., Darding M., Broemer M., Langlais C., Wallberg F., Zachariou A., Lopez J., MacFarlane M., Cain K., Meier P. 2011. The ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. Mol. Cell 43: 432–448.

Thompson C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267: 1456–1462.

Toledo F., Wahl G. M. 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat. Rev. Cancer 6: 909–923.

Tsao H., Zhang X., Fowlkes K., Haluska F. G. 2000. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. Cancer Res. 60: 1800–1804.

Tsao H., Atkins M. B., Sober A. J. 2004. Management of cutaneous melanoma. N. Engl. J. Med. 351: 998–1012.

Tucker M. A., Goldstein A. M. 2003. Melanoma etiology: where are we? Oncogene 22: 3042–3052.

Uong A., Zon L. I. 2010. Melanocytes in development and cancer. Journal of Cellular Physiology 222: 38–41.

Urbanová J., Lubal P., Slaninová I., Táborská E., Táborský P. 2008. Fluorescence properties of selected benzo[c]phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA. Anal. Bioanal. Chem. 394: 997–1002.

Vacek J., Vrublová E., Kubala M., Janovská M., Fojta M., Šimková E., Stýskala J., Skopalová J., Hrbáč J., Ulrichová J. 2011. Oxidation of sanguinarine and its dihydro-derivative at a pyrolytic graphite electrode using ex situ voltammetry. Study of the interactions of the alkaloids with DNA. Electroanalysis 23: 1671–1680.

Valverde P., Healy E., Jackson I., Rees J. L., Thody A. J. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* 11: 328–330.

Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 700–714.

Vavrečková C., Ulrichová J. 1994. Biologická aktivita kvarterních benzo[c]fenantridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerytrinu. *Chem. listy* 88: 238–248.

Vavrečková C., Gawlik I., Miller K. 1996. Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Med.* 62: 397–401.

Vercammen D., Vandenabeele P., Beyaert R., Declercq W., Fiers W. 1997. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* 9: 801–808.

Vercammen, D., Beyaert R., Denecker G., Goossens V., Van Loo G., Declercq W., Grooten J., Fiers W., Vandenabeele P. 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 187: 1477–1485.

Wan P. T., Garnett M. J., Roe S. M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V. M., Jones C. M., Marshall C. J., Springer C. J., Barford D., Marais R. 2004 Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855–867.

Wang B. H., Lu Z. X., Polya G. M. 1997. Inhibition of eukaryote protein kinases by isoquinoline and oxazine alkaloids. *Planta Med.* 63: 494–498.

Wang L., Du F., Wang X. 2008. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133: 693–703.

Weerasinghe P., Hallock S., Liepins A. 2001. Bax, Bcl-2 and NF- κ B expression in sanguinarine induced bimodal cell death. *Exp. Mol. Pathol.* 71: 89–98.

Wellbrock C., Karasarides M., Marais R. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 875–885.

Whiteman D. C., Green A. C. 1999. Melanoma and sun exposure: where are we now? *International Journal of Dermatology* 38: 481–489.

- Whitwam T., Vanbrocklin M. W., Russo M. E., Haak P. T., Bilgili D., Resau J. H., Koo H. M., Holmen S. L.** 2007. Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene* 26: 4563–4570.
- Wirawan E., Berghe T. V., Lippens S., Agostinis P., Vandenabeele P.** 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell Research* 22: 43–61.
- Wolff J., Knipling L.** 1993. Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry* 32: 13334–13339.
- Yamasaki S., Nikaido E., Nakashima R., Sakurai K., Fujiwara D., Fujii I., Nishino K.** 2013. The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs. *Nature communications* 4 (2078): 1–7.
- Yousefi S., Simon H. U.** 2009. Autophagy in cancer and chemotherapy. *Results Probl. Cell Differ.* 49: 183–190.
- Yu R., Mandlekar S., Tan T. H., Kong A. N.** 2000. Activation of p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 275: 9612–9619.
- Yu L., Lenardo M. J., Baehrecke E. H.** 2004. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* 3: 1124–1126.
- Zhang F., Chen B., Xiao S., Yao S.** 2005. Optimatization and comparsion of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. *Sep. Purif. Technol.* 42: 283–290.
- Zhang D. W., Shao J., Lin J., Zhang N., Lu B. J., Lin S. C., Dong M. Q., Han J.** 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325: 332–336.

Internetové zdroje:

1. Autor neuveden. *HerbalExtracts* [online]. [cit. 13.4.2014]. Dostupný na WWW:
<<http://buyherbalextracts.com/plant-extract/macleaya-cordata-extract/>>
2. Carley B. *Elmpost.org* [online]. [cit. 13.4.2014]. Dostupný na WWW:
<<http://www.elmpost.org/trail.htm>>
3. Autor neuveden. *Bylinky* [online]. [cit. 13.4.2014]. Dostupný na WWW:
<<http://www.bylinky.jecool.net/vlastovicnik-vetsi/>>
4. Autor neuveden. *Wikipedia.org* [online]. [cit. 13.4.2014]. Dostupný na WWW:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Dicranostigma>>
5. Autor neuveden. *Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR* [online]. [cit. 30.4.2014]. Dostupný na WWW:
<<http://www.svod.cz>>