

Souhrn

Konvenční radioterapie a chemoterapie zasahují do základních funkcí dělicích se buněk a jsou velmi účinným prostředkem proti rychle proliferujícím nádorovým buňkám. Jsou stále nepostradatelným nástrojem v boji proti rakovině, ovšem jejich zásahy rovněž ovlivňují zdravé buňky a způsobují řadu nežádoucích účinků. Díky nestabilitě genomu nádorových buněk a častým mutacím může docházet ke zvýšené agresivitě a odolnosti k léčbě. Rezistence nádorů vůči léčbě je velmi závažným problémem. Mechanismů, kterými se buňky brání, existuje celá řada. Jednou ze základních příčin rezistence je přirozená schopnost všech buněk opravovat poškozenou DNA. To je na jednu stranu pro život buňky nepostradatelné, na druhou stranu tím snižují efekt chemoterapie či radioterapie, které jsou na principu způsobovat léze DNA založené. Drobné zásahy do signálních drah opravného systému buňky mohou přispět ke zvýšení účinnosti cytotoxické léčby.

DNA-PK je serin/threoninová kinasa, která je aktivována dvouřetězcovými zlomy DNA, jež jsou považovány za nejletálnější typ poškození způsobené radiací a některými chemoterapeutiky. Aktivace této kinasy spouští signální kaskády, které mohou vést k opravě DNA, zástavě buněčného cyklu nebo apoptóze. Inhibicí této kinasy můžeme docílit blokace opravného mechanismu, který byl spuštěn vlivem chemoterapeutika či radiačního záření. Nádorové buňky se vyznačují vysokou mírou proliferace a mají značnou rychlost metabolické aktivity. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobem, kterým je inhibitor schopný zaměřit právě nádorové buňky a ne buňky zdravé.

Cílem disertační práce bylo studium cytotoxického efektu nově syntetizovaných chinazolinových a purinových derivátů *in vitro* za použití panelu nádorových buněčných linií a normálních lidských fibroblastů. Purinové deriváty byly podrobeny screeningu na deseti buněčných liniích a testovány jejich chemosezitizační schopnosti. Cytotoxicita chinazolinových derivátů byla testována na panelu 17 buněčných linií a rovněž byla zkoumána schopnost potencovat účinky standardního chemoterapeutika doxorubicinu. Buněčná proliferace a viabilita byla sledována za pomoci WST-1 testu. Po základním screeningu byl vybrán nejúčinnější inhibitor 14d a nejvhodnější nádorová buněčná linie HT-29 pro detailnější studium molekulárních mechanismů účinku. Za pomoci sledování aktivity kaspas (-3/7, -8 a -9) bylo pozorováno zvýšení apoptotického účinku při kombinaci inhibitoru 14d s doxorubicinem. Vliv na buněčný cyklus byl stanoven průtokovou cytometrií a byla zaznamenána akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu.

Klíčové proteiny účastníci se zástavy růstu či indukce apoptózy byly detekovány elektroforeticky s následným Western blottingem. Cílem bylo vyloučit inhibici proteinů ATM a ATR, které se rovněž účastní opravných mechanismů. Byl sledován protein p53, Chk1 a Chk2. Protein p53, který slouží coby substrát pro ATM, byl vlivem kombinované léčby fosforylován na Ser 15. Dále jsme pozorovali fosforylaci Chk1 na Ser 345 a Chk2 na Thr 68. Jelikož jsou tyto kinasy aktivovány pomocí ATR či ATM, můžeme konstatovat, že námi testovaný inhibitor tyto dráhy neovlivňoval. Výzkumem *in vivo* na samicích outbredních myší byla stanovena maximální tolerovaná dávka. Projevila se relativně nízká toxicita studované látky. Inhibitor 14d se projevil jako velmi atraktivní sloučenina, která může sloužit jako templát pro syntézu dalších léčiv specifických pro inhibici DNA-PK.