

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Cytotoxické účinky derivátů *Amaryllidaceae* alkaloidů
na lidské buněčné linie**

Diplomová práce

Autor práce: Filip Andree

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Cytotoxické účinky derivátů *Amaryllidaceae* alkaloidů na lidské buněčné linie " jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za přístup, rady, pevné nervy a vedení, díky nimž se mi podařilo tuto diplomovou práci dopsat. Dále bych rád poděkoval rodině za podporu a shovívavost.

Cytotoxické účinky derivátů *Amaryllidaceae* alkaloidů na lidské buněčné linie

Souhrn

Nádorová onemocnění se celosvětově řadí jako třetí nejčastější příčina úmrtí. Za rok 2020 tomuto druhu onemocnění podlelo téměř 10 milionů pacientů s předpokladem každoročního navyšování počtu jak nově diagnostikovaných, tak zemřelých. Z tohoto důvodu je snaha hledat nová alternativní farmaka k již používaným. Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* jsou producenty řady alkaloidů, u kterých byla zjištěna antiproliferační aktivita i u nádorových buněčných linií, proto mohou být v budoucnu jedním z druhů léčby těchto onemocnění. Pro zvýšení jejich účinnosti se připravují jejich deriváty, u kterých se předpokládá možná zvýšená biologická aktivita.

Na základě těchto tvrzení bylo testováno 30 derivátů galanthaminu na jejich cytotoxickou aktivitu na buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2, HT-29 a normální buňky tenkého střeva linie FHs 74Int. Pomocí tetrazol bromidu byla stanovena hodnota IC_{50} .

Jak ukazují výsledky, tak 13 z 27 derivátů galanthaminu může působit cytotoxicky na linie kolorektálního karcinomu. Nejvyšší cytotoxickou aktivitu prokázal derivát AM-29 (IC_{50} buněčné linie HT-29 $1,36 \pm 0,11 \mu\text{M}$ a linie Caco-2 $1,90 \pm 0,76 \mu\text{M}$) a derivát AM-21 (IC_{50} pro linie HT-29 $2,76 \pm 0,01 \mu\text{M}$).

Výsledky ukazují, že některé deriváty mohou mít v budoucnu jistý potenciál pro tvorbu nových chemoterapeutických farmak. A je vhodné se jim věnovat dále jak po stránce biologické aktivity, tak po strukturní, kdy znamenají solidní základ pro další úpravy v jejich struktuře.

Klíčová slova: *Amaryllidaceae*; Caco-2; cytotoxicita; FHs 74Int; nádorová onemocnění; střevní epithel

Cytotoxic effects of *Amaryllidaceae* alkaloid derivatives on human cells line

Summary

Cancer is the third leading cause of death worldwide. In 2020, almost 10 million patients succumbed to this type of disease, with the assumption of an annual increase in the number of both newly diagnosed and deceased. For this reason, there is an effort to find new alternative drugs to those already used. Plants of the Amaryllidaceae family are producers of a number of alkaloids in which antiproliferative activity has also been found in tumor cell lines, so they may be one of the treatments for these diseases in the future. To increase their effectiveness, their derivatives are prepared, which are expected to have possible increased biological activity.

Based on these claims, 30 galanthamine derivatives were tested for their cytotoxic activity on Caco-2, HT29 colorectal cancer cell lines and normal FHs 74Int intestinal cell lines. The IC_{50} value was determined using tetrazole bromide.

As the results show, 13 of the 27 galanthamine derivatives may be cytotoxic to colorectal cancer lines. The highest cytotoxic activity was demonstrated by the AM-29 derivative (IC_{50} of the HT-29 cell line $1.36 \pm 0.11 \mu\text{M}$ and the Caco-2 line $1.90 \pm 0.76 \mu\text{M}$) and the derivative AM-21 (IC_{50} for HT-29 lines $2.76 \pm 0.01 \mu\text{M}$).

The results show that some derivatives may have some potential for the development of new chemotherapeutic drugs in the future. And it is appropriate to pay attention to them both in terms of biological activity and structural, when they provide a solid basis for further adjustments in their structure.

Keywords: *Amaryllidaceae*; Caco-2; cytotoxicity; FHs 74Int; cancer, intestinal epithelium

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	8
3. Literární rešerše	9
3.1. Výskyt nádorových onemocnění.....	9
3.1.1 Příčiny vzniku nádorového onemocnění	10
3.1.2 Kancerogeneze	11
3.1.3 Apoptóza	12
3.2 Rizikové faktory vzniku kolorektálního karcinomu	12
3.3 Rizikové faktory vzniku hepatokarcinomu	14
3.4 Léčba nádorových onemocnění	15
3.4.1 Historie léčby	15
3.4.2 Současná léčba	16
3.4.3 Chirurgický zákrok.....	17
3.4.4 Radioterapie	18
3.4.5 Imunoterapie.....	18
3.4.6 Chemoterapie	18
3.4.7 Deriváty přírodních látek při léčbě onkologických onemocnění	19
3.4.8 Chemoterapeutické látky rostlinného původu.....	19
3.5 Alkaloidy	21
3.5.1 Alkaloidy indukující apoptózu	22
3.5.2 Antiproliferační alkaloidy	23
3.5.3 Jiné protinádorové mechanismy	24
4. Amaryllidaceae	24
4.1 Charakteristika čeledi <i>Amaryllidaceae</i>.....	24
4.2 Alkaloidy <i>Amaryllidaceae</i>	25
4.2.1 Biosyntéza alkaloidů	25
4.2.2 Rozdělení alkaloidů čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	26
5. Materiál a metodika.....	33
5.1. Materiál.....	33
5.2 Kultivace buněčných linií.....	33
5.3 Cytotoxicita.....	34
5.4 Statistické vyhodnocení.....	34
6. Výsledky	35
7. Diskuze	38
8. Závěr	40
9. Seznam použité literatury	41
Zkratky	51

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí po celém světě. Z celkového počtu více než 19 milionu nových případů představuje kolorektální karcinom třetí nejčastěji se vyskytující druh nádorového onemocnění s 2 miliony pacienty a úmrtností 33 %, hepatokarcinom je pak 4. nejčastěji se vyskytující s 1 milionem pacientů a úmrtností až 90 %. V příštích letech se očekává značný nárůst případů nádorových onemocnění, do roku 2035 by mohlo jít až o 50% růst. Díky stále se zdokonalujícím metodám léčby by počty obětí onemocnění měly klesat.

Z tohoto důvodu je snahou hledat potencionální protinádorově účinné látky. Tyto potencionální látky se hledají nejčastěji v rostlinách a derivátech odvozených od přírodních látek. Mezi zdroje takto aktivních látek patří i čeleď *Amaryllidaceae*, která je významným zdrojem rostlin bohatých na rostlinné alkaloidy, u kterých již byla prokázána protinádorová aktivita a které mají v praxi značné využití. Tyto rostliny ale také obsahují řadu látek, u kterých není terapeutický efekt významný. Z tohoto důvodu je snaha látky synteticky připravovat a upravovat tak jejich chemickou strukturu pro získání účinných látek s využitím nejen při léčbě nádorových onemocnění.

Práce byla zaměřena na antiproliferační aktivitu proti buňkám kolorektálního karcinomu linií HT-29 a Caco-2, kvůli pandemické situaci způsobené Covid-19 neproběhl výzkum na buněčných liniích hepatocelulárního karcinomu.

2. Cíl práce

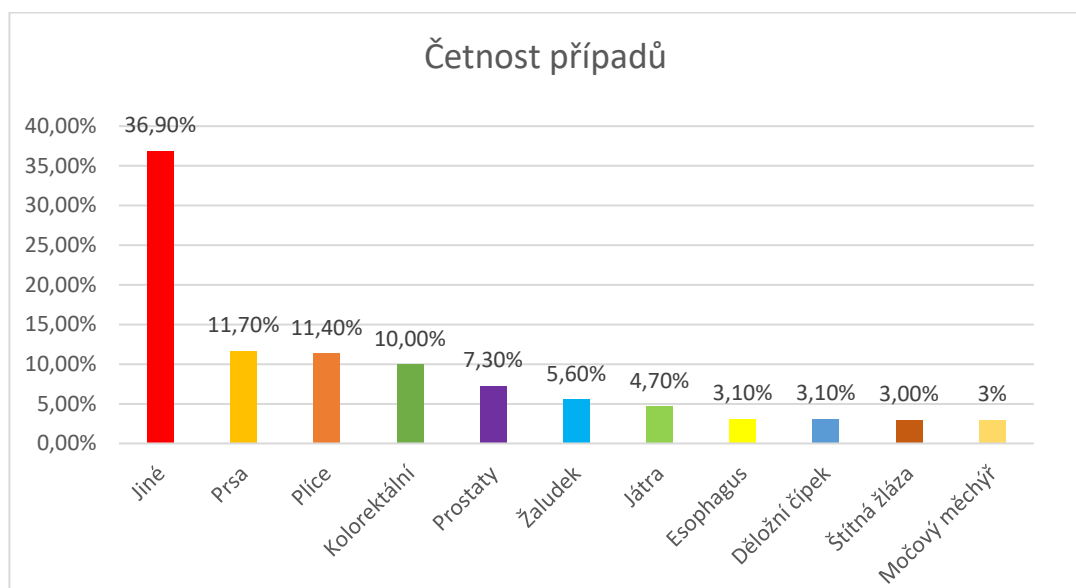
Hypotéza: Deriváty alkaloidů *Amaryllidaceae* mají cytotoxický účinek a mají selektivní účinek.

Cílem diplomové práce je testování derivátů alkaloidů *Amaryllidaceae* na panel buněk střevního epitelu, který obsahuje jak nádorové, tak zdravé buněčné linie. A následně stanovit selektivitu jednotlivých derivátů a jejich potencionální zařazení do dalších fází testování.

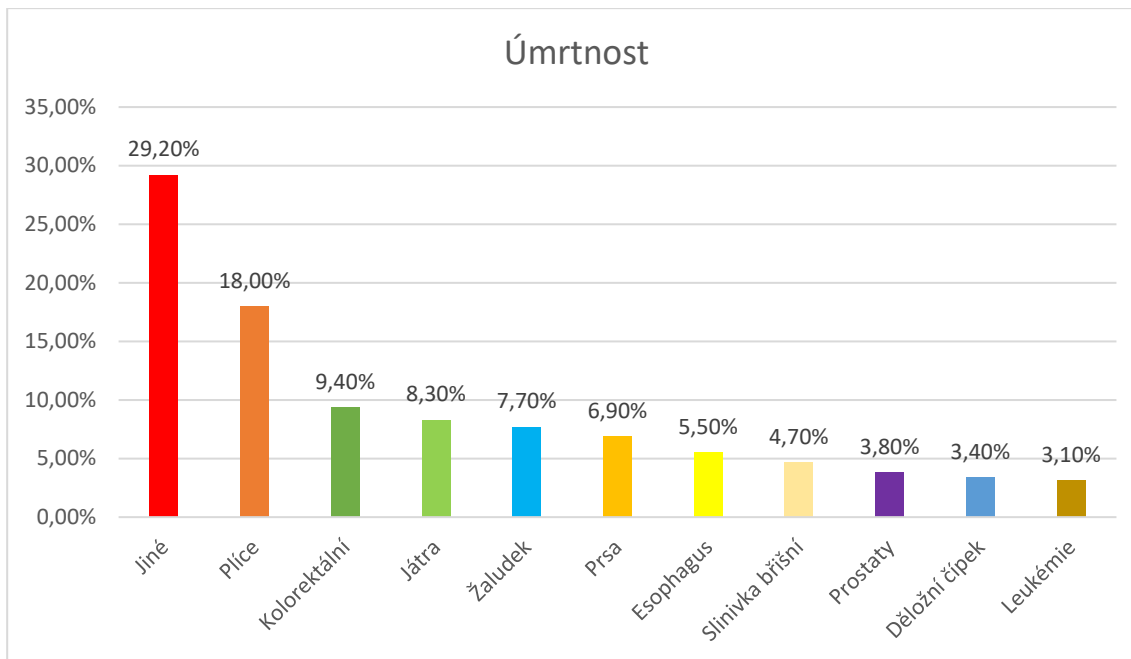
3. Literární rešerše

3.1. Výskyt nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění představující jednu z nejčastějších příčin úmrtí v rozvinutých (26 %) a druhou nejčastější příčinu (45 %) úmrtí v zemích třetího světa, celosvětově se počty pacientů, zasažených tímto druhem onemocněním stále zvyšují (@CFR_org 2020). Mezinárodní agentura pro výzkum nádorových onemocnění (International Agency for Research on Cancer, IARC) předpokládá v příštích 10 letech až 70% zvýšení výskytu onkologických onemocnění. Nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním je rakovina plic, která je následována rakovinou prsu a rakovinou gastrointestinálního traktu, kde se jedná nejčastěji o kolorektální karcinom (KK) (obr. 1). Přestože byl v posledních letech zaznamenán velký pokrok v oblastech prevence, chápání i léčby nádorových onemocnění, stále je velké množství pacientů, kteří tomuto typu onemocnění podlehnou zejména z toho důvodu, že jsou nádorové buňky rezistentní k použitému druhu léčby, spočívající zejména v použití cytostatik (obr.2) (Mellor & Callaghan 2008). Tyto rezistentní buňky mohou často představovat problém, jelikož se mohou volně šířit do dalších orgánů (Mellor & Callaghan 2008; Havelek et al. 2014).



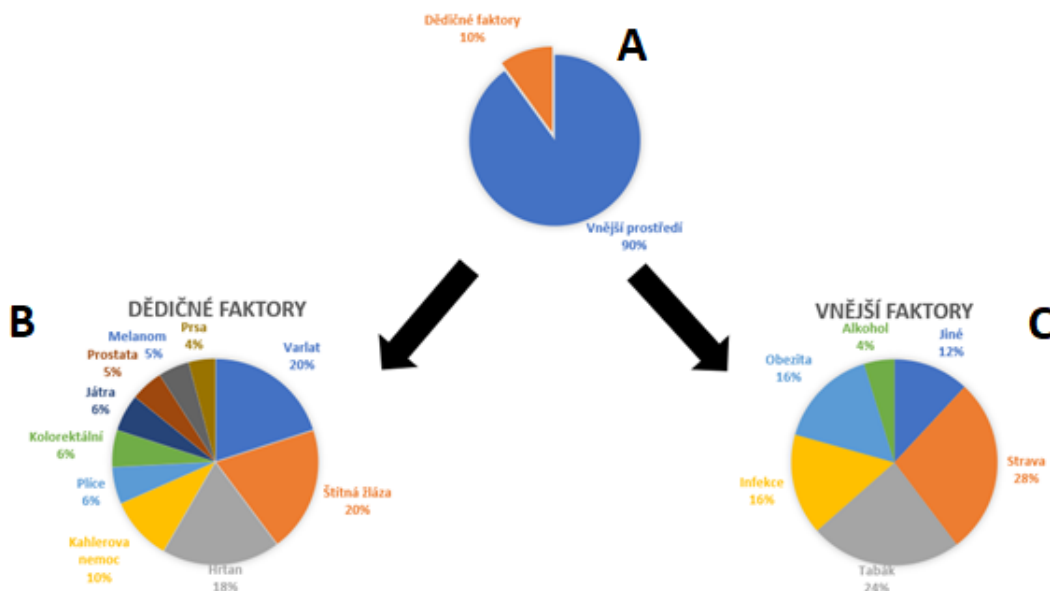
Obrázek č. 1: Četnost případů na jednotlivá onkologická onemocnění (Sung et al. 2021)



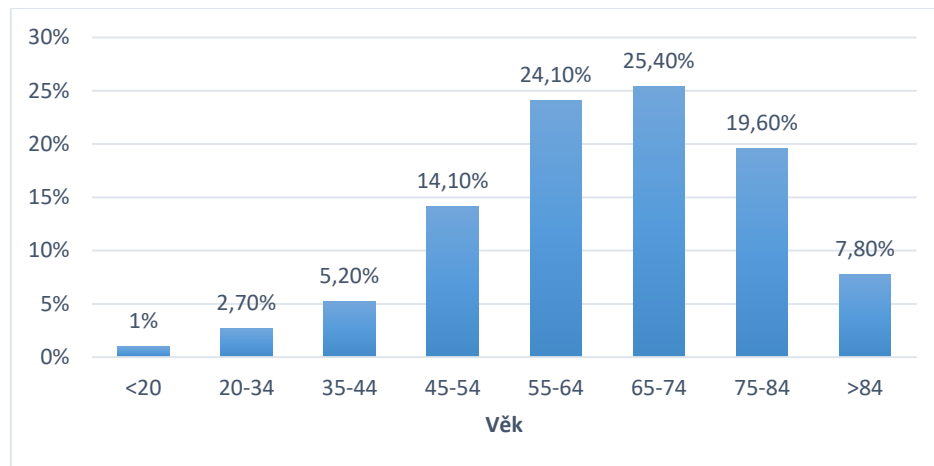
Obrázek č. 2: Úmrtnost na jednotlivá onkologická onemocnění (Sung et al. 2021)

3.1.1 Příčiny vzniku nádorového onemocnění

Celosvětově jsou hlavními příčinami (z 90 %) vzniku onkologických onemocnění zejména kouření, konzumace alkoholu, nízký příjem vlákniny, ovoce a zeleniny (obr. 3) a vyšší věk (obr. 4). V bohatších zemích jsou pak dalšími příčinami obezita s nízkou mírou pohybové aktivity. Zbýlých 10 % představují genetické příčiny (Anand et al. 2008).



Obrázek č. 3: Graf A představuje procentuální porovnání mezi vnějšími a genetickými faktory vzniku onkologických onemocnění. Graf B zobrazuje, které orgány jsou nejčastěji postiženy onkologickými onemocněními díky genetickým předpokladům. Graf C představuje porovnání vnějších činitelů na vznik onkologických onemocnění (Anand et al. 2008).



Obrázek č. 4: Graf představuje zvyšování rizika onkologických onemocnění při zvyšování věku (cancer.gov 2015)

Zejména kouření a pití alkoholu, ale i další faktory mají za následek vznik oxidačního stresu, který neustále působí na tělní buňky prostřednictvím exogenních volných radikálů. Nejvýznamnějšími z nich jsou reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a reaktivní formy dusíku (RNS – reactive nitrogen species) (Holeček 2010). Nicméně kromě exogenních volných radikálů působí i endogenní volné radikály, jejichž zdrojem jsou procesy uvnitř organismu, např. reakce zánětlivých procesů (Storz 2005; Holeček 2010; Cadet & Wagner 2014).

ROS/RNS podporují buněčnou proliferaci, přežívání, buněčnou migraci a poškození DNA vedoucí ke vzniku nádoru (Storz 2005). Poškození DNA začíná změnami v chromozomech, které vedou k hromadění mutací (alterací) genů pro řízení proliferace, diferenciaci a apoptózy buněk (Holeček 2010). Díky tomu jsou nádorové buňky růstově soběstačné a mohou se šířit dále po organismu bez toho, aby byly zastaveny signály pro zastavení růstu, mohou se neomezeně dělit a vyhýbat se apoptóze. V případě, že se buňky budou dělit a shlukovat pohromadě na jednom místě, hovoříme o nezhoubném / benigním nádoru, který je ostře ohraničen, netvoří metastázy a je možné jej chirurgicky odstranit. Pokud ale dochází k uvolňování buněk do okolních tkání, pak hovoříme o zhoubném / maligním nádoru. Šířením nádorových buněk do dalších tkání mohou vznikat sekundární nádory, tzv. metastázy (Douglas Hanahan 2019).

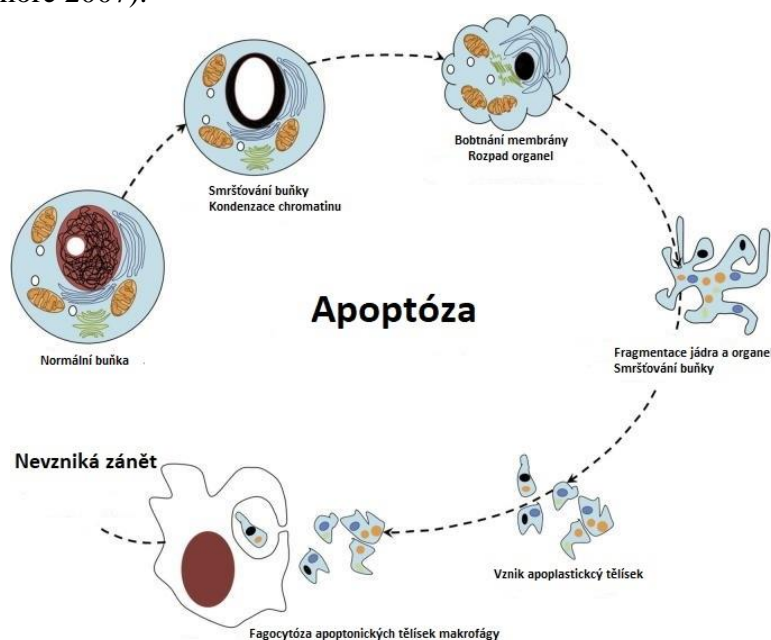
3.1.2 Kancerogeneze

Nádorová onemocnění vznikají složitým procesem – kancerogenezí. Je to komplexní vícestupňový proces, který je také často popisován jako somatický vývoj, který se skládá z iniciace, propagace a progresu. Při iniciaci dochází k vytváření preneoplastických buněk, které vznikají nevratnou mutací, nejčastěji způsobenou biologickými, chemickými nebo fyzikálními karcinogeny. Tyto mutace se nejčastěji vyskytují u genů, které přímo ovlivňují cytogenezi, apoptózu a opravy DNA, díky čemuž dochází k šíření buněk s touto genetickou změnou. V promoční fázi dochází k nárůstu počtu buněk a to buď poklesem apoptózy nebo selektivním množением dceřiných buněk (Lynne Eldridge 2020). V této fázi tedy dochází k nahromadění mutací a zvýšení nerovnováhy genetických a epigenetických změn. Progrese je třetím krokem kancerogeneze, kde se postupně projevují genetické změny. Tímto dochází

k přeměně zdravé buňky na buňku nádorovou. Produkované buňky již nejsou diferenciovány a dochází k abnormálnímu buněčnému dělení (Gatenby & Gillies 2008).

3.1.3 Apoptóza

Apoptóza (obr. 5) je naprogramovaná buněčná smrt, kdy staré a nepotřebné buňky odumírají a jsou nahrazovány buňkami novými. Ve zdravém organismu je apoptóza v rovnováze s buněčnou proliferací, při onkologických onemocněních tomu tak ale není, převládá zde buněčná proliferace (Adams & Cory 2007; Wang et al. 2019). Apoptóza probíhá díky specifickým proteázám – kaspázám. Při buněčné apoptóze dojde v buňce k mnoha změnám, dochází ke smršťování buňky, rozpadu jejího jádra, zahuštění cytoplazmy, zkapalnění chromatinu nebo bobtnání membrán. Poté dochází k rozdělení celé buňky za účasti apoptického tělíska, které je složeno z často ještě funkčních organel, cytoplazmy, plazmatické a buněčné membrány, které pak brání úniku intracelulárních látek a způsobení zánětu. Membrána má na své vnější straně fosfatidylseriny, což jsou látky, které přitahují makrofágy. Poté dochází k fagocytóze (Elmore 2007).

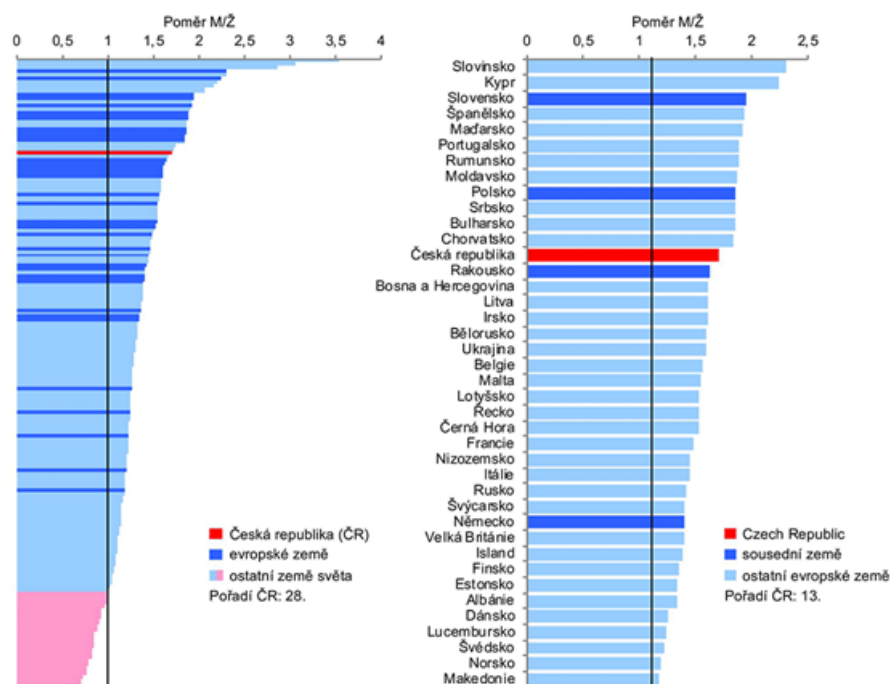


Obrázek č. 5: Schéma apoptózy (Abou-Ghali & Stiban 2015).

3.2 Rizikové faktory vzniku kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom (KK) je heterogenní onemocnění, které se vyskytuje v tlustém střevě a konečniku a je charakterizováno řadou genomových a epigenomových změn (Zhang et al. 2014; Sinicope et al. 2015; Lee et al. 2017). Je to celosvětově třetí nejčastější typ onkologického onemocnění a čtvrtá nejčastější příčina úmrtí (obr. 6). Je třetím nejčastějším onkologickým onemocněním pro muže a druhým nejčastějším onemocněním pro ženy (Siegel et al. 2015). V roce 2020 přibylo 1 900 000 nových případů KK, z toho se předpokládalo, že nemoc nepřežije zhruba 935 000 pacientů (Sung et al. 2021). Do roku 2035 se předpokládá růst onemocnění asi o dalších 50 %, úmrtnost by ale měla v rozvinutých státech klesat přibližně na 27 % (Araghi et al. 2018). Toto je velký posun, protože na začátku 20. století byla šance na přežití u léčených onkologických pacientů byla zhruba 50% a neléčení pacienti měli šanci na

přežití pouze 34 % (Wyard 1925). Mezi nejpostiženější země patří země evropské, mezi hlavními jsou to pak Slovinsko, Kypr, Slovensko a Španělsko.



Obrázek č. 6: Incidence nádorů tlustého střeva a konečníku v mezinárodním srovnání (Freddie Bray BSc 2019)

Vznik KK je poměrně dlouhý proces. Prekursorem onemocnění je vznik displastického kolorektálního adenomu a následně benigního polypu ze žláznatého epitelu tlustého střeva, kde dochází ke změně buněk, které vyúsťují ve vývoj karcinomu. Přesný důvod, proč kolorektální karcinom vzniká, zatím není zcela znám. Předpokládá se, že se vyvíjí prostřednictvím adenomo-karcinomové sekvence, což je termín k popisu postupné progresse z adenomatózního polypu na nádorové onemocnění (Shivaram K.Bhat 2015). Existují rizikové faktory, které mohou vznik ovlivnit. Vnější faktory ovlivňují až 90 %, zbylých 10 % je ovlivněno geneticky (Kolligs 2016).

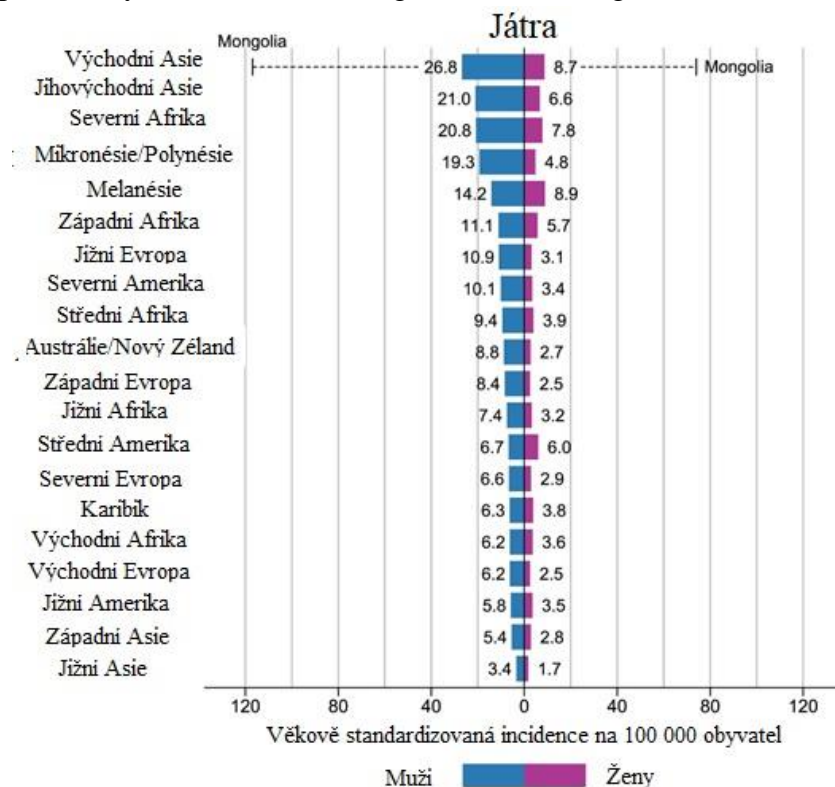
Analýzou bylo zjištěno, že průměrná doba od prvních příznaků a diagnostiky KK je asi 2 týdny. Podle statistik mívají pacienti 3 až 4 symptomy. Mezi nejčastější patří krvácení z konečníku (58 %), bolesti břicha (52 %) a změna střevního vstřebávání – průjem nebo zácpa a hubnutí. Většina pacientů má pozitivní okultní testy stolice (Majumdar et al. 1999; Hamilton et al. 2005; Jellema et al. 2010)

Rizikovými faktory pro vznik KK je především obezita, kdy jedinci s vysokým BMI (body mass index, index tělesné hmotnosti) mohou mít zvýšené riziko nemoci o 50-70 %, závislost mezi BMI a KK byla prokázána jako lineární závislost (Gerhardsson de Verdier et al. 1990; Johnson et al. 2013; Golshiri et al. 2016). Dalšími rizikovými faktory je příjem potravin s vysokým obsahem tuku, vysoký příjem masa, nízký příjem vlákniny, vitamínu C, vápníku a selenu, vysoký příjem alkoholu a kouření, které může zvýšit prevalenci KK až o 20 % (Poynter et al. 2009; Tárraga López et al. 2014). Dědičné faktory zaujímají asi 10% riziko vzniku KK, především se jedná o familiární adenomatózní polypózu, Lynchův syndrom a Peutz – Jeghersův syndrom (Half et al. 2009; Chae & Jeon 2014; Sehgal et al. 2014; Kolligs 2016).

Jelikož rozvoj kolorektálního karcinomu trvá řadu let, lze rozmachu zabránit především včasnou detekcí a odstranění již přítomných adenomů. K detekci se využívají screeningové metody, především test okultního krvácení ve stolici (Kolligs 2016). K těmto testům řadíme testy FOBT (fecal occult blood test, fekální okultní krevní testy) a FIT (fecal immunochemical test, fekální imunochemické testy hemoglobinu). Všechny testy fungují na principu detekce i mikroskopického množství krve (Kolligs 2016). Dalšími metodami jsou sigmoidoskopie, kolonoskopie a její modifikace, kdy je střevo vyšetřeno endoskopem (Cunningham et al. 2010).

3.3 Rizikové faktory vzniku hepatokarcinomu

Nádorová onemocnění jater zahrnující hepatocelulární karcinom (HCK) (vyskytuje se u 75 – 85 % případů) a intrahepatální cholangiokarcinom (zahrnující 10 – 15 % případů) je čtvrtým nejčastějším důvodem úmrtí na nádorová onemocnění a dokonce druhým nejčastějším důvodem úmrtí u mužů. Podle Sung et al. (2021) bylo v roce 2020 diagnostikováno 906 000 nemocných, z nichž 830 000 pacientů zemřelo. Počet pacientů se každým rokem zvyšuje. V oblastech s nízkým výskytem onemocnění je nádorové onemocnění jater diagnostikováno 4× častěji u mužů, zatímco v oblastech s vysokou prevalencí je diagnostikováno mužům až 8× častěji. Mezi státy s vysokou prevalencí řadíme především málo rozvinuté státy východní a jihovýchodní Asie (obr. 7), kde je tamní populace vystavena zvýšené míře rizikových faktorů, jako je chronická infekce virem hepatitidy B (HBV) nebo virem hepatitidy C (HCV), potravinám kontaminovaných aflatoxiny, zvýšenému příjmu alkoholu, obezitě, kouření a diabetu 2. typu (McGlynn et al. 2015; Wong et al. 2017; Singh et al. 2018).



Obrázek č. 7: Incidence hepatokarcinomu mezinárodní porovnání mezi muži a ženami (Freddie Bray BSc 2019)

HCK je výsledkem mnoha různých etiologických faktorů, jako jsou HBV, HCV, alkohol, aflatoxiny, vrozené a získané metabolické nemoci. Karcinom může pocházet ze zralých

jaterních buněk nebo progenitorových buněk. Molekulární základ progresí HCK se proto může lišit v závislosti na různých faktorech (Hani Alotaibi 2016).

Hlavním mechanismem vzniku nádoru je ztráta kontroly nad buněčným cyklem, což je obecný rys pozorovaný u všech nádorových buněk. Tato ztráta kontroly vede ke zvýšené multiplikační tendenci, hyperplazii a následné tvorbě nádoru (Michalopoulos 2010). Dalšími mechanismy je ztráta kontroly nad stárnutím buňky (Paradis et al. 2001), dysregulace apoptózy (Eguchi et al. 2014), zánět jater způsobený cytokiny a hepatokarcinogeneze (Singh et al. 2018).

K detekci přítomnosti nádorového onemocnění včetně HCK i KK jsou využívány nádorové markery (onkomarkery), což jsou chemické látky produkované nádorem či hostitelským organismem nebo látky obsažené v nádoru (Urban et al. 2011). U zdravých jedinců nejsou tyto látky obsaženy, případně jsou obsaženy v daleko menších koncentracích než u onkologicky nemocných lidí. Tyto markery jsou nejčastěji glykoproteiny nacházející se v tělních tekutinách, jako je periferní krev a plasma, jedná se tedy o cirkulující nádorové markery (Cingelova et al. 2014). Jejich koncentrace závisí na velikosti nádoru, metabolické degradaci molekul markeru a intenzitě sekrece daného markeru buňkami. Přesný význam onkomarkerů zatím není znám, pokud ale dojde k vyléčení jedince, jejich koncentrace v organismu klesne zpět na normální hodnotu nebo zmizí úplně (Urban et al. 2011; Cingelova et al. 2014; Nagpal et al. 2016). Nejdůležitějším biomarkerem HCK je považován α -fetoprotein (Tatarinov 1988). Je to glykoprotein zodpovědný za přenos steroidů, bilirubinu, mastných kyselin, flavanoidů, těžkých kovů aj. (Mizejewski 2001). Jeho hladina je vysoká ve 12-16 týdnu stáří plodu (3 g/l), následně dochází k rychlému poklesu jeho hladiny a v séru jsou detekovány pouze stopové koncentrace (Debruyne & Delanghe 2008). Zvýšenou hladinou tohoto biomarkeru ale také můžeme přisoudit cirhóze jater nebo chronické hepatitidě (Yoo et al. 2020). Stejně důležitým biomarkerem je Des-y-karboxyprothrombin (DKP), což je abnormální forma protrombinu indukovaná vitamínem K. Tento biomarker indukuje maligní transformaci buněk HCK (Naraki et al. 2002). Dalšími důležitými biomarkery jsou Antigen spinocelulárního karcinomu (Pozzan et al. 2014), Golgiho protein 73, což je specifický membránový protein, který je exprimován i ve zdravých játrech biliárními epiteliálními buňkami, při chronických onemocněních jater ale jeho exprese prudce stoupá (Block et al. 2005; Yang et al. 2015) a Glypican-3, což je glykoprotein na povrchu buněk, ve kterých jsou uloženy heparansulfátové glykosaminoglykanové řetězce kovalentně spojeny s proteinovým jádrem, který je nadměrně exprimován ve tkáních HCK (Guo et al. 2020).

3.4 Léčba nádorových onemocnění

3.4.1 Historie léčby

Počátky léčby nádorových onemocnění se datují do 30. let 20. století, kdy bylo pozorováno, že vojáci, kteří byli vystaveni působení hořčičného plynu (yperitu) zaznamenali snížené hladiny leukocytů v krvi. Navrhnout účinnou léčbu se snažil již v roce 1943 Gilman, kdy využil první chemoterapeutickou látku pro léčbu lymfomů - dusíkatý yperit. Následně byly syntetizovány další protinádorové látky – cyklofosamid a chlorambucil (Goodman et al. 1946). Poté byl vyvinut značný počet léků, které ale nefungovaly dlouhodobě (Pearson & Eliel 1949). Proto bylo roku 1955 založeno Národní servisní centrum pro chemoterapii nádorových onemocnění (USA), jehož účelem bylo testovat látky proti nádorovým onemocněním. Dalším důležitým

objevem byla látka karmustin, látka účinkující proti leukemii myší. Objev byl převratný především proto, že látka byla schopna projít hematoencefalickou bariérou, což vedlo k možnosti léčby i špatně dostupných nádorů například v centrální nervové soustavě (Devita et al. 1970; DeVita et al. 1975; Arruebo et al. 2011).

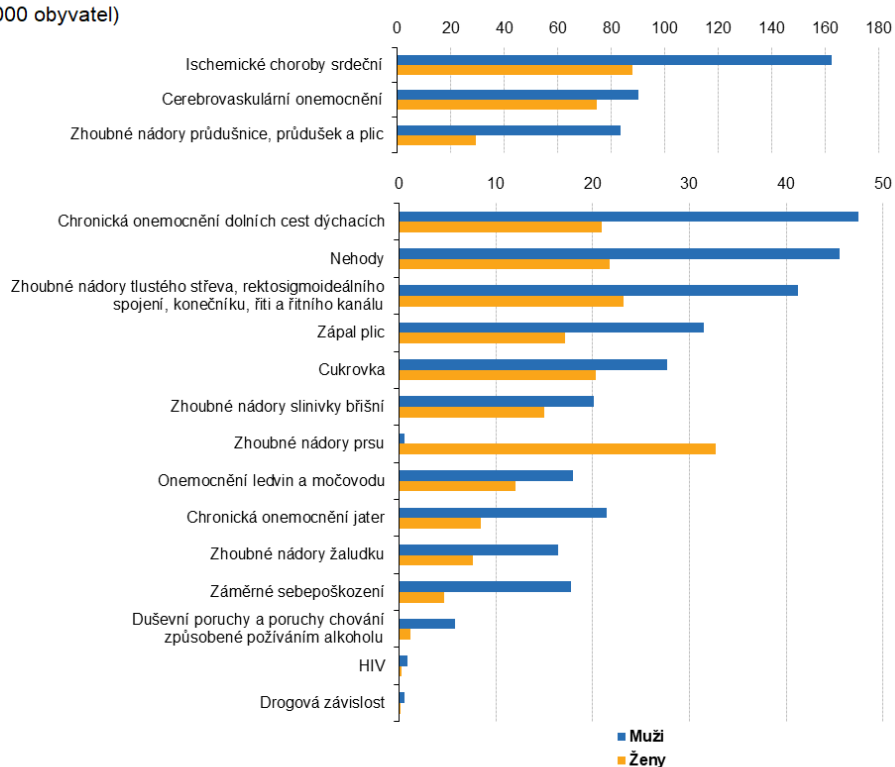
3.4.2 Současná léčba

Léčba onkologických onemocnění je pro pacienty často daleko větší zátěží, než je léčba jiných chorob, a to především proto, že léčba je zaměřena proti vlastním lidským buňkám transformovaným v buňky nádorové. Při léčbě velmi často dochází i k poškození okolních zdravých tkání a buněk, řada chemoterapeutik působí nefrotoxicky, neurotoxicky, hepatotoxicky i jinak, což mohou být závažné vedlejší účinky, které mohou vést ke zhoršení kvality života pacienta po léčbě (Ramirez et al. 2009; Liu et al. 2021). Díky moderním technologiím se daří vymýšlet nové způsoby, jak léčbu zefektivnit při minimu vedlejších účinků.

Mezi hlavní léčebné procesy zahrnujeme chirurgická řešení, chemoterapii, radioterapii, imunoterapii, hormonální léčbu, nově pak můžeme léčit pomocí biologické terapie, laserové terapie, hypertermie či fotodynamické terapie (Arruebo et al. 2011), další možností pak může být například alternativní medicína. Podle záměru můžeme léčbu rozdělit na léčbu kurativní, paliativní a symptomatickou. Při kurativní léčbě je snaha pacienta vyléčit, předpokládá se, že se nádor do 5 let nevrátí. Tato možnost léčby je možná pouze u některých druhů onkologických onemocnění, jako je leukemie, rakovina varlat či trofoblastické karcinomy (van den Bergh et al. 2013; Le Bian et al. 2020). Druhou možností je léčba paliativní, při které je snaha zbavit pacienta projevů onemocnění a zpomalit či zastavit růst nádoru. Léčba je předepisována u pacientů, kteří jsou ve špatném nutričním stavu nebo mají špatnou funkci ledvin, jater či srdce (Dabetic & Zivkovic 2010; Palma et al. 2019). Posledním záměrem je léčba symptomatická, při které již není naděje na úplné vyléčení či zmírnění růstu nádoru. Tato léčba se soustředí především na potlačování bolesti a jiných komplikací způsobených růstem nádoru (Molassiotis et al. 2017; Pignataro et al. 2017). I přes mnohé možnosti léčby, nádorová onemocnění patří hned po kardiovaskulárních onemocněních k nejsmrtelnějším onemocněním v rozvojových i rozvinutých zemích (obr. 8).

Příčiny úmrtí — standardizovaná úmrtnost, EU-27, 2016

(na 100 000 obyvatel)



Pozn.: Údaje pro muže i ženy vyjadřují průměrné hodnoty. Pověšimněte si rozdilu v měřítku mezi oběma komponenty údajů.

Obrázek č. 8: Příčiny úmrtí v EU (Eurostat 2021)

3.4.3 Chirurgický zákrok

Chirurgický zákrok je jedním z hlavních prvků kurativní léčby nádorových onemocnění, v některých případech je ale zákrok využíván i jako léčba paliativní. Odhaduje se, že chirurgický zákrok je vyžadován u 62–80 % pacientů, ale méně než čtvrtina pacientů je operována včas. Včasný chirurgický zákrok je přitom hlavním předpokladem pro úspěšné vyléčení pacienta. Cílem chirurgických zákroků je snaha o odstranění nádoru, blízké zdravé tkáně, případně i blízkých lymfatických uzlin. Nejvyšší úspěchy při léčbě touto metodou jsou docíleny u nezhoubných a pevných nádorů. V dnešní době už mají chirurgové řadu možností, jak operace provádět (Zafar et al. 2019). Kromě vyřezávání zasažených tkání je možné využít řady jiných technik. První z nich je kryochirurgie, při které je nádor zničen extrémním chladem způsobeným kapalným dusíkem nebo argonovým plynem, tato technika se využívá při léčbě raného stádia rakoviny kůže nebo při rakovině děložního čípku (He et al. 2019). Druhou technikou je využití laseru, kdy dochází prořiznutí tkáně silným proudem světla. Lasery jsou vhodné na velmi přesné operace, což je využíváno při léčbě nádorů na povrchu těla nebo na vnitřní výstelce orgánů jako jsou bazocelulární, cervikální, jícnový, malobuněčný plicní nebo vaginální karcinom (Guimaraes et al. 2018). Hypertermie je třetí technikou, při které jsou malé oblasti tělesné tkáně vystavovány vysokým teplotám, které mohou poškodit či zabít nádorové buňky, nebo zvýšit jejich citlivost na záření a jiné chemoterapeutické látky. Hypertermie zatím není široce dostupná, zatím je pouze studována v klinických studiích (Zhao et al. 2021). Bohužel se při chirurgických zákrocích nejde zcela vyhnout pooperačním bolestem závislejících nejčastěji na rozsáhlosti operace a infekci, která může být zapříčiněna špatnou péčí o operovanou ránu, nebo při špatné hygieně na operačním sále.

3.4.4 Radioterapie

Radiační terapie je léčba ionizujícím zářením a je využívána jak pro kurativní, tak i paliativní způsob léčby. Při léčbě nádorových onemocnění je účinná především díky její schopnosti působit přesně na nádory, okolní zdravé tkáně jsou zasahovány jen velmi málo. Při vysokých dávkách radiačního záření dochází k zabití nádorových buněk, nebo poškození jejich DNA což zpomaluje jejich růst. Pokud je DNA poškozena neopravitelně, u nádorové buňky dochází k zastavení buněčného dělení a následné smrti. Je důležité si uvědomit, že radiační terapie nefunguje hned, ale je potřeba několikadenní až několika týdenní léčby, než dojde k dostatečnému poškození DNA buněk, takto poškozené buňky mohou dále umírat i několik měsíců po ukončení terapie (Chen & Kuo 2017). Radiační terapie se dělí na dva druhy – terapii vnější a interní. Při vnější terapii pacient dochází na ošetření k přístroji, který lokálně ozařuje místo nádoru, a je využívána při léčbě řady nádorů (Dobberfuhl 2019). Při interní terapii je pacientovi vložen do děla zdroj záření blízko léčeného nádoru. Tato terapie je pak vhodná především pro léčbu nádorů hlavy, krku, prsu, prostaty, očí (Wasan et al. 2017). Vedlejšími účinky mohou být únava, zvracení či nevolnosti. Negativem tohoto způsobu léčby je 15 – 20 % recidiva u pacientů do 30 let od počáteční diagnózy (Berk & Alfonso 2020).

3.4.5 Imunoterapie

Imunoterapie je cílený druh léčby, při kterém je pomáháno imunitnímu systému bojovat s nádorovými onemocněními. Tento druh léčby tedy nebojuje s nádorem přímo. Díky tomu dochází jen k minimálnímu poškození zdravých tkání, díky čemuž je eliminována většina nežádoucích účinků. Imunitnímu systému můžeme dodávat inhibitory imunitních kontrolních bodů, což vede k blokaci imunitních kontrolních bodů, čímž je imunitním buňkám umožněno silněji reagovat na buňky nádorové. Další možností je přenos T-buněk, dávkování monoklonálních protilátek nebo využití vakcíny očkováním. Tyto typy léčby jsou využívány při léčbě karcinomů tlustého střeva, plic, prsu nebo jater. Bohužel zatím nebyl mechanismus způsobu boje s nádorovými buňkami přesně prozkoumán a proto je imunoterapie spíše minoritní způsob léčby v porovnání s chirurgickými řešeními nebo radioterapií (Hegde & Chen 2020).

3.4.6 Chemoterapie

I přes veškeré pokroky a využívání nových technologií zůstává chemoterapie jako jedna z nejvyužívanějších léčebných metod pro léčbu nádorových onemocnění. Bývá využívána samostatně, nebo v kombinaci s jinými druhy léčby, nejčastěji je ale využívána spolu s chirurgickým zákrokem nebo radioterapií (López-Galindo et al. 2006). Nejčastěji bývá zařazena až po těchto druzích léčby, je totiž schopna destruovat zbylé nádorové buňky, což vede ke snížení rizika výskytu metastáz. V tomto případě hovoříme o adjuvantivní chemoterapii (Sparano et al. 2018). V některých případech ale bývá chemoterapie zařazena i před operací, a to především kvůli zmenšení nádoru a lepší operovatelnosti. U některých pacientů ale zůstává chemoterapie jedinou možností léčby. Při těchto případech bývá léčba jak kurativní, tak i paliativní. Pacientům jsou předepisována cytostatika, tedy farmaka, která mají cytostatický, nebo cytotoxický účinek (Schirrmacher 2019). Chemoterapeutika jsou pacientům většinou podávána v nitrožilní formě, infuzně nebo perorálně. Bohužel chemoterapeutika nejsou schopna být zcela selektivní a zasahují i rychle rostoucí zdravé tkáně, jako jsou vlasové

folikuly, buňky kostní dřeně nebo gastrointestinální sliznice (Muhamad et al. 2018). Dalšími nežádoucími vedlejšími účinky pak jsou nevolnosti, průjemy a zvracení (Ma et al. 2020). Dalším negativem je i rezistence nádorových buněk na chemoterapeutické látky, což snižuje jejich účinnost. Tato rezistence může být vrozená nebo získaná a je předmětem zkoumání mnoha studií (Wang et al. 2018; Bahar et al. 2019; Cui et al. 2020). Důsledkem rezistence je snížení léčitelnosti nádoru a vyšší riziko úmrtí.

V poslední době je pozornost zaměřována na dodávání chemoterapeutických látek pomocí nanočástic. Začleněním do nanočástic na bázi lipidů se může zlepšit specifický účinek na nádorové buňky. Díky tomu může být redukován vliv nežádoucích účinků na zdravé buňky a zvýšen terapeutický efekt na buňky nádorové (Li et al. 2019; Dong et al. 2020).

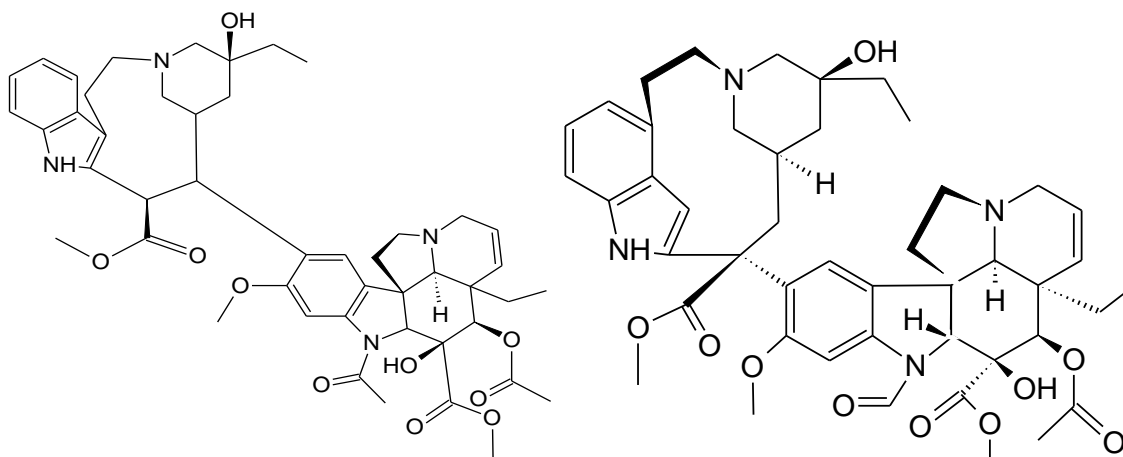
3.4.7 Deriváty přírodních látek při léčbě onkologických onemocnění

Přírodní látky jsou zřejmě nejdůležitějším zdrojem protinádorových látek. Uvádí se, že až 60% podíl všech protinádorových látek jsou látky přímo přírodní, nebo látky od nich derivované. Těchto látek bylo od roku 1940 schváleno více než 140 (Demain & Vaishnav 2011) a v dnešní době jich je pravděpodobně více. Zdrojem těchto přírodních látek jsou především mikrobi, houby a rostliny tvořící antracykliny, enediiny, indolokarbazoly, izoprenoidy a jiné, které mají řadu mechanismů podporující léčbu nádorových onemocnění (Neumann et al. 2008). Mezi hlavní funkční mechanismy můžeme uvést indukci apoptózy štěpením DNA zprostředkovaním inhibice topoizomerázy I nebo II, mitochondriální permeabilizaci, inhibici klíčových enzymů účastnících se signální transdukce a inhibici nádorem indukované angiogeneze (Demain & Vaishnav 2011).

3.4.8 Chemoterapeutické látky rostlinného původu

Jak již bylo výše napsáno, rostliny jsou jedním z významných zdrojů protinádorových látek. Od roku 1961 bylo jako protinádorové léčivo schváleno 9 látek – vinblastin, vinkristin, etoposid, teniposid, taxol, navelbin, docetaxel, kamptotecin, topotekan a irinotekan (Dholwani et al. 2008; Carqueijeiro et al. 2020), dále bylo popsáno mnoho látek s chemoprotektivní funkcí jako je kurkumin, fytoKANABINOIDY, strigolaktony a jiné (Fridlender et al. 2015).

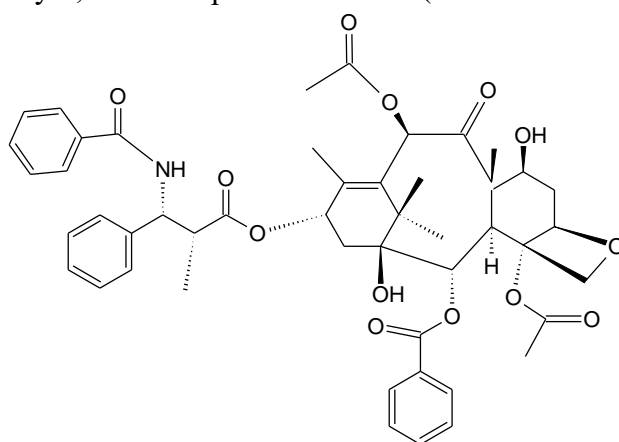
Nejčastěji používané protinádorové alkaloidy získáváme z rostliny *Caranthus roseus* (dříve *Vinca rosea*, barvínkovec růžový), rostliny, která produkuje až 30 různých metabolicky aktivních alkaloidů, z nichž při léčbě nejdůležitější jsou alkaloidy známé jako vinka alkaloidy - vinblastin a vincristin (obr. 9). S těmito alkaloidy se při chemoterapii můžeme setkat již od 60. let. Protinádorové účinky jsou vyvolány interferencemi s funkcemi mikrotubulů a inhibicí angiogeneze. Dochází k depolymerizaci mikrotubulů a destabilizaci mitotických vřeten, což nakonec vede k cytostatickému účinku a později k buněčné smrti (Zhang et al. 2017). Vinka alkaloidy mají také schopnost ovlivňovat syntézu DNA i RNA, transportní ATPázu nebo lipidovou biosyntézu (Mistry et al. 2019; Rajdova et al. 2020). Klinická účinnost vinka alkaloidů byla prokázána u širokého spektra nádorových onemocnění jako jsou hematologické malignity, solidní nádory, nádorová onemocnění zárodečných buněk či neuroblastomu (Manohar et al. 2016). Ačkoliv ale mají tyto alkaloidy významnou klinickou aktivitu, u mnoha typů nádorů je jejich účinnost omezena díky rezistenci na léky (Zhang et al. 2017).



Obrázek č. 9: Molekula vinblastinu vlevo a vinkristinu vpravo

Druhou látkou, považovanou za jednu z nejúčinnějších a nejpoužívanějších přírodních látek, je taxol (obr. 10), známý též jako paklitaxel. Tento alkaloid byl objeven v kůře *Taxus brevifolia* (tis tichomořský) (Demain & Vaishnav 2011). Pro léčbu jednoho pacienta bylo potřeba využít účinnou látku z jehlic šesti více než 100 let starých stromů (Horwitz 1994), proto se dnes vyrábí polysyntézou taxoidů různých druhů tisů, především ale *Taxus chinensis* (tis čínský). Těchto toxoidních sloučenin je zřejmě více než 350. Kvůli velkému zájmu o toto léčivo je snaha syntetizovat taxoly i z jiných rostlin, než pouze z tisů. Jako možná náhrada se jeví syntéza z hub, například *Taxomyces adreanae*, *Pestalotiopsis microspora*, *Tubercularia* sp. a *Phyllosticta citricarpa* (Demain & Vaishnav 2011).

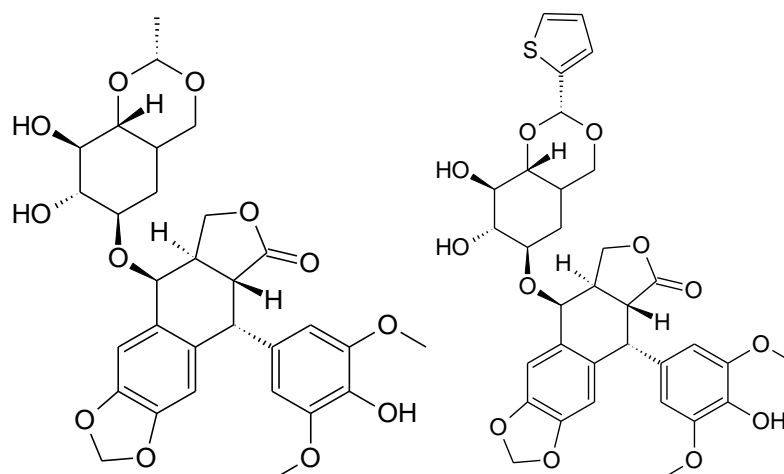
Mechanismus, kterým taxol působí na nádorové buňky, byl poznán v roce 1979 a dodnes je považován za jedinečný. Na rozdíl od jiných protinádorových léčiv, která fungují na principu zamezení hromadění tubulinů do mikrotubulů a tím zabránění buněčnému dělení, taxol funguje opačně. Podporuje shromažďování tubulinů do mikrotubulů, následně zabraňuje jejich disociaci, čímž je blokována progresse buněčného cyklu, což předchází mitóze a inhibuje buněčný růst (Weaver 2014; Sabzehzari et al. 2020). V roce 1992 byl paklitaxel schválen pro léčbu pokročilého karcinomu vaječníků (Swain et al. 1995) a od té doby je také využíván při léčbě rakoviny prsu, kolorektálního karcinomu, rakovině konečníku, spinocelulárnímu karcinomu močového měchýře, rakovině plic nebo AIDS (Chen & Shi 2016).



Obrázek č. 10: Molekula taxolu

Dalšími protinádorovými sloučeninami jsou etoposid a teniposid (obr. 11), látky izolované z rostliny *Podophyllum peltatum* (naholist štitnatý). Obě látky jsou inhibitory topoizomerázy

II, enzymu, který se podílí na růstu eukaryotických buněk (Bender et al. 2008). Etoposid je schválen pro léčbu rakoviny plic, choriokarcinomu, rakovině vaječníků a varlat, teniposid je používán k léčbě maligních lymfomů, rakovině močového měchýře nebo nádorů centrálního nervového systému (Demain & Vaishnav 2011).



Obrázek č. 11: Molekula etoposidu (vlevo) a teniposidu (vpravo)

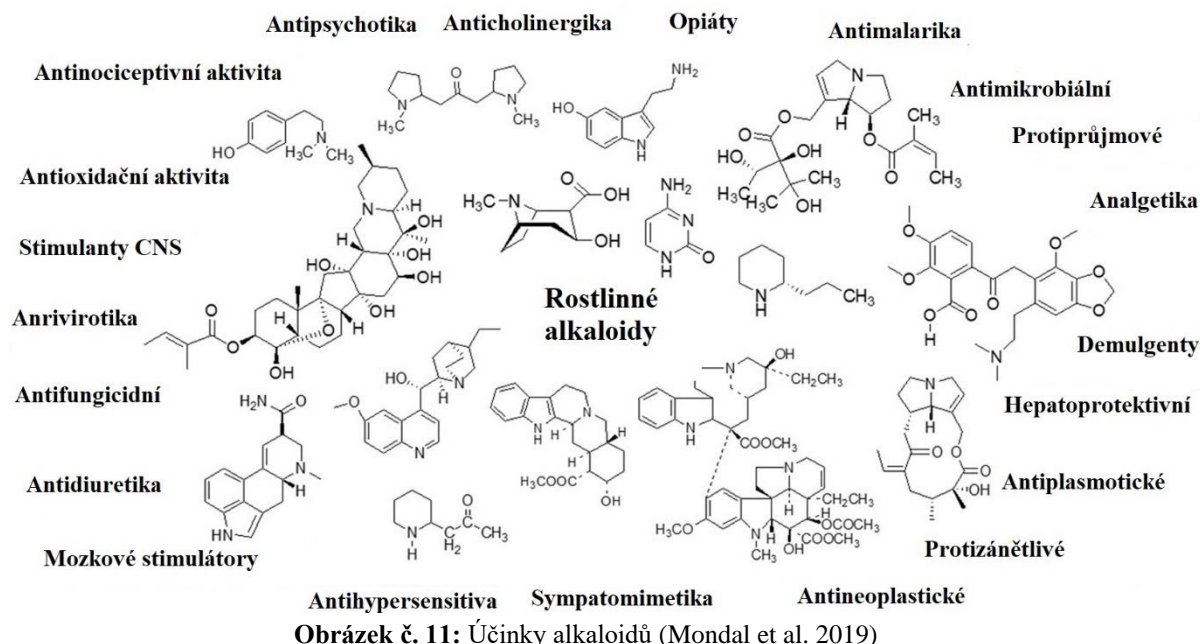
3.5 Alkaloidy

Alkaloidy představují různorodou skupinu látek, biomolekul odvozených od aminokyselin nebo od transaminace, které se nacházejí po celém světě. Jedná se o sekundární produkty metabolismu nejčastěji vyšších rostlin, jsou ale známy i alkaloidy tvořeny endogenním či exogenním metabolismem živočichů, hub či bakterií. Sekundárními metabolity označujeme látky, které nemají vliv na růst, vývoj či rozmnožování organismu, mají ale vliv na obranu organismu proti predátorům, nemocem, parazitům, jiné naopak pomáhají ke zvýšení šancí úspěšného rozmnožení (Jing et al. 2014). Protože je funkce alkaloidů různorodá, v některých případech mohou na člověka působit léčivě či jinak blahodárně, jiné mohou i při velmi malých dávkách působit jako smrtelný jed (Prasanta Dey a 2020). Chemicky jsou alkaloidy skupina sloučenin skládajících se z atomů uhlíku, dusíku a vodíku, dále mohou obsahovat atomy síry, výjimečně pak atomy bromu, chloru či fosforu. Jsou to krystalické nepolární alkalické látky, špatně rozpustné ve vodě, zahrnující více než 3000 různých sloučenin (Mondal et al. 2019). Jsou děleny na 2 základní skupiny – heterocyklické a exocyklické, z nichž významnější jsou alkaloidy heterocyklické. Ty můžeme dále dělit podle jejich skeletu, biosyntetických prekursorů a vlastností na alkaloidy:

- a) odvozené od ornitinu – pyrolidinové, tropanové a pyrolizidinové alkaloidy
- b) odvozené od lysinu – piperidinové a chinolizidinové alkaloidy
- c) odvozené od nikotinové kyseliny – pyridinové alkaloidy
- d) odvozené od fenylalaninu – tetrahydroisochinolinové a benzyltetrahydroisochinolinové alkaloidy
- e) odvozené od tryptofanu – indolové alkaloidy.
- f) odvozené od anthranilové kyseliny – chinolinové a akridinové alkaloidy.
- g) odvozené od histidinu – imidazolové alkaloidy.
- h) odvozené od mevalonové kyseliny – terpenové a steroidní alkaloidy

i) deriváty xantinu – purinové alkaloidy (Debnath et al. 2018)

Díky vysoké variabilitě vlastností můžeme alkaloidy používat v medicíně k léčbě řady onemocnění (obr. 11). Mezi nejpoužívanější můžeme zařadit např. efedrin, chinin, cholin, kodein, kofein a mnoho dalších. Některé alkaloidy mají také antiproliferační aktivitu, nebo jsou schopny indukovat apoptózu, což je využíváno při léčbě nádorových onemocnění (Mondal et al. 2019).



3.5.1 Alkaloidy indukující apoptózu

Apoptóza má důležitou roli při přežití mnohobuněčných organismů – proces přirozené obnovy organismu. Jakákoliv nevratná porucha v regulátorech apoptického aparátu vede k tumorigenezi. Vyhýbání se apoptóze je považováno za jeden z deseti charakteristických znaků onkologických onemocnění, proto můžeme každou látku indukující apoptotické signální proteiny považovat za slibný lék při léčbě nádorových onemocnění (Hanahan & Weinberg 2011).

Alkaloidy poškozující DNA

Buňky jsou schopny chránit svou DNA dvěma způsoby. První možností je okamžitá oprava DNA, v případě, že se tak nestane, dochází k inaktivaci buněk ukrývajících poškozené genomy. Oba mechanismy jsou nezbytné pro udržení buněčné stability, protože poškození DNA je velmi často spojeno s mutacemi, což může vést k maligní transformaci (Jackson & Bartek 2009). Dozorovací aparát, známý jako kontrolní body, je schopen zastavit postup buněčného cyklu, dokud nedojde k opravě. Pokud je DNA poškozena nevratně, dochází k apoptóze (Greenbaum 2004). Nádorové buňky si postupem času vyvinuly schopnost překonávat kontrolní body a pokračovat ve svém dělení i s poškozenou DNA (Mills et al. 2018). Dráha PI3k / Akt je jednou z několika proliferačních drah, která podporuje normální progresi buněčného cyklu modulací cyklinů a pro-apoptických proteinů. Nadměrně exprimovaný Akt tedy vede k abnormálním proliferativním a antiapoptickým signálům, které iniciují transformaci maligních nádorů. Mnoho cytotoxických látek tedy cílí na DNA a Akt dráhu buď přímo, nebo nepřímo, aby blokovalo buněčnou proliferaci a indukovalo apoptózu

(Fruman & Rommel 2014). Jako takové se alkaloidy, které podporují apoptózu indukovaním poškození DNA, jeví jako skvělá volba pro léčbu rakoviny (Habli et al. 2017). Alkaloidy s těmito schopnostmi jsou především s tímto mechanismem jsou zahrnuty v tabulce č.1.

Tabulka č. 1: Vliv vybraných alkaloidů na nádorová onemocnění (Habli et al. 2017)

Alkaloid	Typ nádorového onemocnění
Katachunin	Leukémie
Subditin	Nádory prostaty
Rohitukin	Nádory prsou, vaječníků, plic
Hirsutin	Nádory prsou

Apoptické alkaloidy – aktivátory kaspáz

Cysteinové asparatické proteázy, známé jako „kaspázy“, specificky štěpí své substrátové proteiny na aspartátové zbytky během apoptózy v samo-amplifikační kaskádě. Kaspázy jsou důležitými činiteli v naprogramovaných drahách buněčné smrti. Při zjištění poškození DNA, cytotoxickými látkami, produkcí ROS, aberantní expresí onkogenů nebo aktivací p53 kaspázy aktivují apoptický aparát (Prokhorova et al. 2015).

Tabulka č. 2: Mechanismus působení vybraných alkaloidů na nádorová onemocnění (Habli et al. 2017)

Alkaloid	Mechanismus účinku	Onemocnění
Liriodenin	Štěpení kaspáz -3 a -9 Odtok cytochromu C Zvýšená exprese p53 a BAX	Nádor vaječníků Laringokarcinom
Kryptolepin	Zvýšení exprese p53 a p21	Osteokarcinom Renální adenokarcinom Leukémie Histiocitic lymfom
Clausenidin	Štěpení kaspáz -3 a -9 Odtok cytochromu C Zvýšená exprese BAX	Kolorektální karcinom
Catachunin	Štěpení kaspáz -3 a -9 Aktivace kaspáz -3 a -9 Odtok cytochromu C Zvýšená exprese BAX	Leukémie
Brucin	Zvýšená exprese BAX Snížená exprese Bcl-2	Hepatocelulární karcinom Hepatokarcinom Kolorektální karcinom
Subditin	Štěpení kaspáz -3 a -9 Odtok cytochromu C Zvýšená exprese p53 a BAX	Nádory prostaty
Rohitukin	Štěpení kaspáz -3 a -9 Odtok cytochromu C	Nádory hrudníku? Breast Nádory vaječníků Hepatokarcinom
Tabernaegantinin B a C	Štěpení kaspáz -3 a -8	Kolorektální karcinom

3.5.2 Antiproliferační alkaloidy

Antiproliferační aktivitou rozumíme aktivitu látek, které brání v dělení buněk. Některé alkaloidy mají schopnost působit na kontrolní body a tím způsobovat zastavení buněčného cyklu, přičemž může dojít k opravě poškozené genetické informace buňky, nebo může dojít

k urychlení přechodu buňky k apoptóze (Visconti et al. 2016). Příklady látek fungujících na tomto principu jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka č. 3: Mechanismus působení vybraných antiproliferačních alkaloidů (Habli et al. 2017)

Název	Fáze působení	Druh nádorového onemocnění	Zdroje
Noskapiin	G2/M	Rakovina prsu, plic, KK	(Sajadian et al. 2015)
Liriodenin	S	Rakovina vaječníků, prsu	(Schelz et al. 2016)
Clausenidin	G0/G1	KK	(Waziri et al. 2016)
Cryptolepin	G1/S/G2	Adenokarcinom plic, osteokarcinom, leukémie	(Zhu & Gooderham 2006)
Brucin	G0/G1	KK, rakovina plic	(Zheng et al. 2013)

Druhým mechanismem způsobujícím snižování proliferace buněk je snižování hodnoty nukleárního faktoru – Kappa B (NF- κ B), faktoru, který se jinak podílí na aktivaci genů vedoucích k přežití a proliferaci buněk (Neidle 2016). Potlačení této dráhy pomocí hirsutinu či tomatinu může vést cytostatickým účinkům při nádorech prsů, prostaty nebo plic (Lee et al. 2011; Lou et al. 2015)

3.5.3 Jiné protinádorové mechanismy

Kromě výše popsaných mechanismů věda zkoumá stále nové interakce, kterými by mohly alkaloidy bojovat s nádorovými onemocněními. Může to být například tvorba G-kvadruplexů β -karbolinovými alkaloidy, látek, které mají regulační funkce na důležitých onkogenech, mohou tak působit protinádorově například proti leukémii, rakovině prostaty či žaludku (Neidle 2016; Wang et al. 2016). Dalším mechanismem je inhibice proteinů, například proteinu HER2, při jehož zvýšené expresi byl pozorován rychlejší růst buněk rakoviny prsu. Jako účinné činidlo snižující expresi tohoto proteinu se ukazuje alkaloid hirsutin (Lou et al. 2015).

Rezistence na léčiva je při léčbě nádorových onemocnění vážný problém, dochází k ní prostřednictvím regulace nebo aktivace určitých proteinů kazety ATP (ABC), které desenzitivují rakovinné buňky vůči terapeutikům. Účinky inhibující ABC proteiny, konkrétně nejdůležitější protein P-gp má alkaloid pretazzetin izolovaný z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*, což může být dobrý podpůrný prostředek pro jiné léky při léčbě nádorových onemocnění (Wink et al. 2012)

4. Amaryllidaceae

4.1 Charakteristika čeledi *Amaryllidaceae*

Čeď *Amaryllidaceae* (amarylkovité) je taxonomicky řazena jako chřestotvárné, jednoděložné, krytosemenné cévnaté rostliny. Jsou to zpravidla vytrvalé pozemní byliny využívané k dekorativním účelům. Stavbou můžeme čeď charakterizovat tvorbou cibulí, zřídka oddenků, pozorujeme listy čárkovité, někdy páskovité, nejčastěji však v přízemní růžici (stvol), květy jsou oboupohlavné ve vzorci P 3+3 A 3+3 G (3), někdy je přítomná pakorunka, květenství pak nejčastěji tvoří okolík, hlávkou či vrcholík, plody jsou bobule nebo tobolek. Čeď zahrnuje zhruba 75 rodů a 1100 druhů rozšířených převážně v tropické a subtropickém podnebném pásmu, kde jsou rostliny pěstovány především jako okrasné rostliny (Zhong Jin 2020). Hlavními zástupci v našem (mírném) podnebném pásmu jsou sněženka podsněžník (*Galanthus nivalis*), bledule jarní (*Leucojum vernalis*), narcis bílý (*Narcissus poeticus*), česnek

(*Allium*) (Chase et al. 2009). Tradiční použití rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* v lidové medicíně sahá už do čtvrtého století před naším letopočtem, kdy byl využíván olej z narcisu *Narcissus poeticus* k léčbě nádorů dělohy (Kohelová et al. 2019). Hlavními sekundárními metabolity *Amaryllidaceae* jsou alkaloidy, kterých bylo rozpoznáno už 600 (Desgagne-Penix 2020). Vyznačují se jedinečným uspořádáním skeletu a širokým spektrem biologických aktivit, jako jsou aktivity protinádorové (JJ & J 2014; Nair & Staden 2014; Havelek et al. 2017), antimalarické (Cho et al. 2018), protizánětlivé (Zhan et al. 2016) či antimikrobiální (Locarek et al. 2015). Největší množství účinných látek se nachází v cibuli rostlin, přesto v menší míře jsou ale látky obsaženy i ve zbytku rostliny.

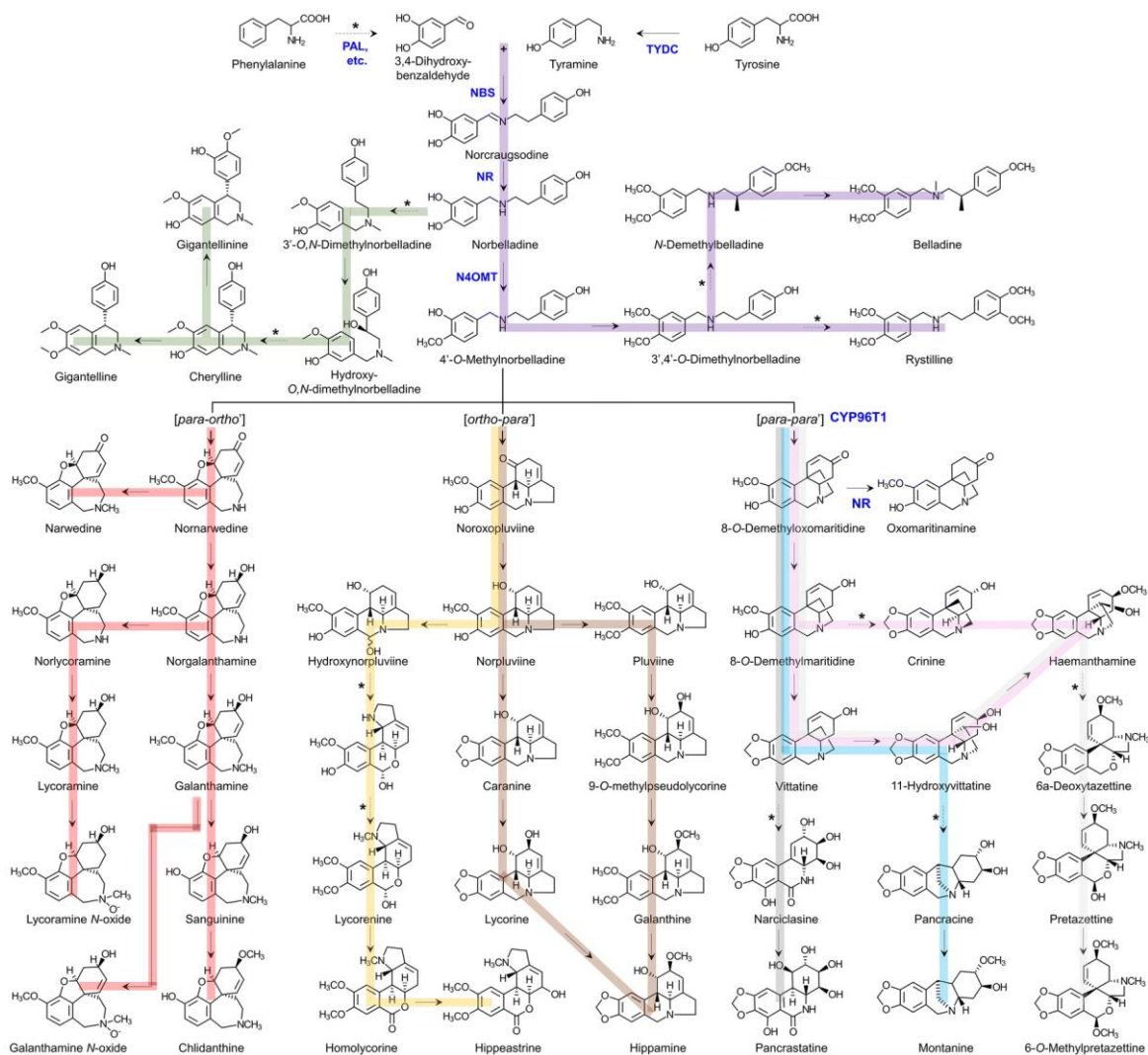
4.2 Alkaloidy *Amaryllidaceae*

Rostliny čeledi *Amaryllidaceae* jsou mimo jiné zdrojem biologicky velmi aktivních alkaloidů, kterých je více než 150 druhů patřících do 36 rodin, které můžeme seskupit do 12 různých typů podle stavby heterocyklického kruhu (Kornienko & Evidente 2008; Cimmino et al. 2017). Jedinečné účinky těchto alkaloidů poskytly první stavební kameny pro výzkum léčiv na bázi fotochemikálií. Výzkum účinnosti alkaloidů začal roku 1877 kdy byl poprvé izolován alkaloid lykorin z rostliny *Narcissus pseudonarcissus*. Bylo prokázáno, že alkaloidy amarylkovitých rostlin mohou působit protinádorově (Nair & Staden 2014; Havelek et al. 2017), antimalaricky (Cho et al. 2018), protizánětlivě (Zhan et al. 2016), antivirotický (Kornienko & Evidente 2008), antimikrobiálně (Locarek et al. 2015), protiplísňově, analgeticky či cytotoxicky (He et al. 2015). Na druhou stranu několik členů čeledi *Amaryllidaceae* může působit toxicky – způsobují bolesti hlavy, nevolnosti, závratě, nepravidelnosti srdečního rytmu, poruchy zraku a dermatitidu (Louw et al. 2002). Účinné látky jsou přítomny v celé rostlině, největší množství je ale koncentrováno v podzemních orgánech (cibuli) rostlin.

4.2.1 Biosyntéza alkaloidů

Biosyntéza alkaloidu v rostlinách většinou začíná kondenzací dvou derivátů aminokyselin za vzniku prekurzoru jako vstupního bodu do komplexní biosyntetické dráhy. Následuje řada reakcí, jako jsou formace vazeb, přeskupování, zánik či přidání funkčních skupin. Všechny alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* jsou vždy složeny z aminokyselin L-fenylalanin a L-tyrosin, které se mění na 3,4-dihydroxybenzaldehyd a L-tyramin. Ty tvoří norbelladin, základní strukturu pro tvorbu jiných alkaloidů (Singh et al. 2019).

Hlavní biosyntetické dráhy jsou zobrazeny na obrázku číslo 12. Fialová dráha vede k produkci norbelladinu, zelená k cherylinu, červená ke galantinu, žlutá k lykoretinu, hnědá k lykorinu, růžová ke krininu nebo haemanthinu, tmavě šedá k pankrastinu, modrá k montatninu a světle šedá k tazettinu (Desgagne-Penix 2020)

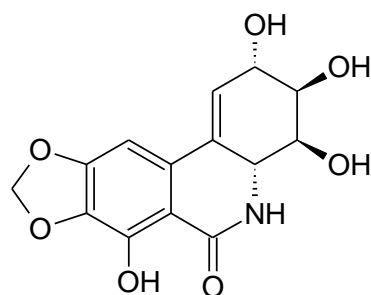


Obrázek č. 12: Biosyntéza alkaloidů rostlinami *Amaryllidaceae* (Desgagne-Penix 2020)

4.2.2 Rozdělení alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*

Lykorinové alkaloidy

Lykorinové alkaloidy, patřící do podskupiny pyrollofenanthridinových alkaloidů, jsou jedny z nejznámějších a nejvyužívanějších alkaloidů, zdá se totiž, že jsou i neúčinnější. Hlavním zástupcem je lykoricin (obr. 13), polární krystalická látka (Elgorashi et al. 2006), která se vyskytuje v mnoha druzích amarylkovitých rostlin, nejhojněji je ale obsažena v rostlinách *Lycoris radiata*, *Leucojum aestivum*, *Hymenocallis littoralis*, *Hippeastrum littoralis* a *Hippeastrum equestre* (Lin et al. 1995). Lycoricin lze také získat chemickou syntézou. Lycoricin má svou jedinečnou stavbou antivirotické, antibakteriální, antiparazitické, protizánětlivé a především protinádorové účinky působící na celou řadu nádorových onemocnění, jako je leukémie, nádorové onemocnění prostaty, nádorové onemocnění prsu, nádorové onemocnění močového měchýře, kolorektální karcinom a hepatokarcinom (Roy et al. 2018). Jeho úspěšnost tkví ve schopnostech různými mechanismy indukovat apoptózu (Czabotar et al. 2014; Zeng et al. 2017), indukovat zástavu buněčného cyklu ve fázi G0/G1 nebo G2/M (Bertoli et al. 2013), způsobuje smrt nekrotických buněk (Luo et al. 2015), inhibuje autofagii (Mishima et al. 2015) a invazi metastáz (Yuan et al. 2015).

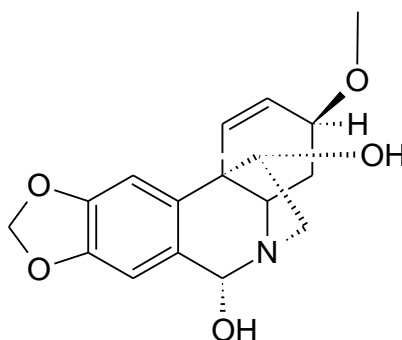


Obrázek č. 13: Lykorin

Dalšími důležitými alkaloidy lykorinového typu jsou narciclastin izolovaný z cibulí narcisů s významnou cytotoxickou aktivitou (Van Goietsenoven et al. 2013), ungeremin, zefbetain a amabelisin s významnou antibakteriální aktivitou (Evidente et al. 2004; Schrader et al. 2013).

Haemanthaminový a krininový typ

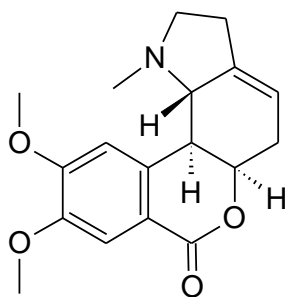
Krininové alkaloidy, patřící do podskupiny ethanofenanthridinových alkaloidů, byly objeveny a zkoumány v roce 1985. Skupina je zastoupena velkým počtem různých alkaloidů, z nichž nejhojněji zastoupeny jsou alkaloidy haemanthaminin, haemanthidin (obr. 14) a krinamin. Všechny tyto látky mají schopnost působit cytotoxicky na nádorové buňky, a přitom neohrožovat zdravé buňky lidského těla. Přesný mechanismus, jakým krininové alkaloidy působí na nádorové buňky zatím není znám, zdá se ale, že jsou schopny inhibovat proteosyntézu blokací peptidové vazby (Van Goietsenoven et al. 2010; Cimmino et al. 2017; Dalecká et al. 2019). Dalšími zástupci této skupiny jsou vittatin a hydroxyvittatin s antimikrobiální aktivitou (Evidente et al. 2004), delagoensin sloužící při zánětech močových cest (Cimmino et al. 2017),



Obrázek č. 14: Molekula haemanthidinu

Homolykorinový typ

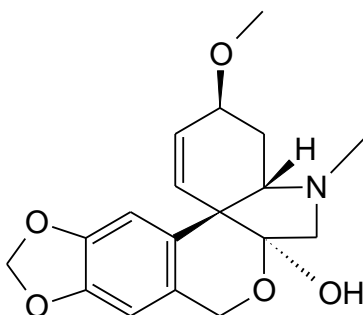
Homolykorinové alkaloidy, odvozeniny 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu, jsou poměrně početně zastoupená skupina. Bohužel nebyla pozorována významná biologická aktivita, homolykorin (obr. 15), 8-O-dimethylhomolykorin a lykorenin dokonce vykazují cytotoxickou aktivitu i k nenádorovým buňkám. Tyto látky jsou ale schopny inhibovat růst hepatokarcinomálních buněk a leukemických buněk (Cimmino et al. 2017; Dalecká et al. 2019).



Obrázek č. 15: Molekula homolycorin

Tazzetinový typ

Tazzetinové alkaloidy, patřící do podskupiny 2-benzopyrano-[3,4-c] indolu, jsou látky tvořené rostlinami rodů *Galanthus*, *Crinum*, *Euharis* a *Hippeastrum*. Významnými zástupci jsou tazzetin (obr. 16) s jeho prekurzorem pretazzetinem. Látky jsou si velmi podobné, rozdílné jsou pouze v jedné poloze hydroxylové skupiny na C-6 a C-8 (Ding et al. 2017). Tato malá změna ve struktuře má za následek rozdílné bioaktivní vlastnosti. Zatímco tazzetin je látka s antimalarickými vlastnostmi a slabou cytotoxickou aktivitou, pretazzetin má vlastnosti protivirové i protinádorové (Cimmino et al. 2017). Nádorovou aktivitu látka vykazuje především proti T-lymfoidním buňkám MOLT-4, *in vitro* vykazuje vysokou aktivitu na buňky Rauscherovy leukémie, Lewisovu karcinomu a spontánní lymfocytární leukémie (Dalecká et al. 2019). Pretazzetin je schopen inhibovat vazbou enzymu RNA-dependentní DNA polymerázy u rozdílných typů onkogenních virů, dále je účinný proti Herpes virům a flavivirům (Dalecká et al. 2019).

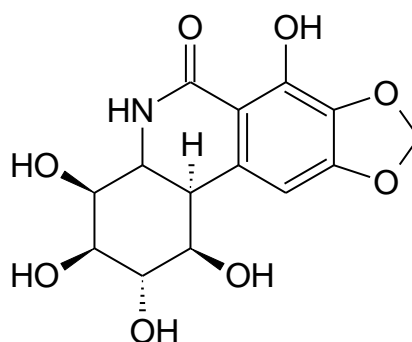


Obrázek č. 16: Molekula tazzetinu

Pankrastinový typ

Pankrastinové alkaloidy jsou odvozené od molekuly fenanthridinu (Ding et al. 2017). Cytotoxicky neaktivnější zástupci skupiny jsou narciklastin a pankratistatin (obr. 17). Narciklastin se získává z cibulí rostlin rodu *Narcissus*. Tento alkaloid má antimitotické účinky díky inhibici peptidyltransferázy. Studie Dumont et al. (2007) prokázala indukcii apoptózy u adenokarcinomu prsu a karcinomu prostaty zprostředkovanou receptory DR4 (death receptor 4) doprovázenou aktivací kaspáz -8 a -9. Narciklastin vykazuje vysokou selektivitu – je až 250× účinnější na nádorové buňky, než k buňkám lidským. Narciklastin je také bakteriocidní, antifungální a antivirotický (Kornienko & Evidente 2008; Dalecká et al. 2019).

Druhým zajímavým zástupcem skupiny je pankratistatin izolovaný z rostliny *Hymenocallis littoralis*. Jeho cytotoxická aktivita byla odhalena již roku 1993 Pettitem a spol. na buňky leukémie a jiné nádorové onemocnění (Dalecká et al. 2019).



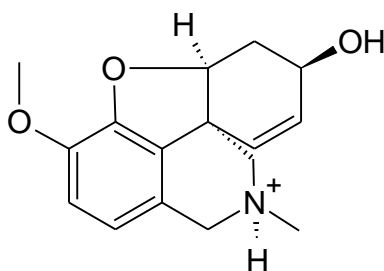
Obrázek č. 17: Molekula pankratistatinu

Galanthaminový typ

Galanthaminové alkaloidy jsou odvozeny od molekuly dibenzofuranu. Nejdůležitějším zástupcem této skupiny je galanthamin (obr. 18), alkaloid, který byl poprvé izolován z rostliny sněžěnka podsněžník (*Galanthus elwesii*). Tato látka je využívána při léčbě Alzheimerovy choroby, neurogenerativního onemocnění způsobujícího progresivní kognitivní pokles (Saito et al. 2019). Tato nemoc bývá způsobena nerovnováhou mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a antioxidačními obrannými mechanismy, což způsobuje vznik oxidačního stresu, který vede k poškození buněk a tkání a vzniku zánětů (Kvietys & Granger 2012; Cheignon et al. 2018). Galanthamin je zde využíván jako inhibitor acetylcholinesterázy, což napomáhá při zachování kognitivních a globálních funkcí (Corey-Bloom 2003). Vznik chronických zánětů je jedním z hlavních předpokladů vzniku nádorových onemocnění. Studie Reijmen et al. (2018) zjistila, že vagální imunomodulační účinky, známé jako cholinergní protizánětlivé cesty, jsou spojeny s působením acetylcholinu (ACh), převládajícího neurotransmiteru parasympatického systému. Různé druhy imunitních buněk, jako jsou lymfocyty, makrofágy, žírné buňky, dendrické buňky a buňky odvozené kostní dřeně jako jsou buňky lymfoidní a myeloidní exprimují cholinacetyltransferázy (ChAT), transportéry cholinu, acetylcholinesterázy (AChE), nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR) a produkují acetylcholin, což vede ke správné funkci cholinergního systému. Proto je pravděpodobné, že cholinergní systém na imunitních buňkách hraje významnou roli v regulaci imunitní odpovědi. Expresse nAChR byla pozorována v nádorových buňkách, což naznačuje přímou potenciální roli bloudivého nervu při progresi nádorových onemocnění. Tato studie tedy předpokládá, že nervus vagus může mít schopnost zpomalovat tumorigenezi protizánětlivými vlastnostmi zprostředkovanými prostřednictvím ACh a receptoru $\alpha 7$ nACh, měnit tak mikroprostředí nádoru a měnit protinádorovou imunitu. Receptor $\alpha 7$ nACh je ligandový iontový kanál, jehož aktivace vede ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů faktoru nádorové nekrosy (FNN-a) a interleukinu IL-1B a IL-6. Kromě toho se aktivace $\alpha 7$ nACh receptoru podílí na antinociceptivních účincích, dále se pak podílí na zánětech tlustého střeva a přecitlivělosti spojené s ucerózní kolitidou. Jelikož je galanthamin znám jako inhibitor acetylcholinesterázy, pozitivní alosterický modulátor receptoru $\alpha 7$ nACh a slabý kompetitivní a reverzibilní inhibitor cholinesterázy ve všech oblastech těla, začala studie Sammi et al. (2018) zkoumat jeho schopnost na modulaci neoplastického poškození tlustého střeva hlodavců vyvolaného podáváním dávky dimethylhydrazinu. Tato studie prokázala, že krysám, kterým byl podáván pouze dimethylhydrazin (20mg/kg) značně se zvýšila tepová frekvence, avšak byla snížena variabilita tepové frekvence, pokud byl ale krysám podáván dimethylhydrazin (20mg/kg) spolu

s galanthaminem (4mg/kg), pak zůstala tepová frekvence i variabilita tepové frekvence stejná, jako u zdravých krys. Dále bylo prokázáno, že krysám, kterým byl podáván pouze dimethylhydrazin, kleslo pH ve střevech a značně se zvýšil počet aberantních kryptových ložisek, oproti tomu krysám, kterým byl podáván dymethylhydrazin spolu s galanthaminem zůstalo pH i počet aberantních kryptových ložisek podobný, jako u zdravých krys. Podávání dymethylhydrazinu také zvedlo hladinu malondialdehydu, který je brán jako jeden z ukazatelů míry oxidačního stresu, oproti zdravým krysám. U krys, kterým byl podáván galanthamin, byla hladina malondialdehydu blízka hladině zdravých krys. Závěrem tato studie předpokládá, že výše zmíněné účinky jsou důsledkem inhibice AChE, zlepšení regulace receptoru $\alpha 7nACh$ a zlepšení cholinergní neurotransmise, což jsou účinky stimulace bloudivého nervu.

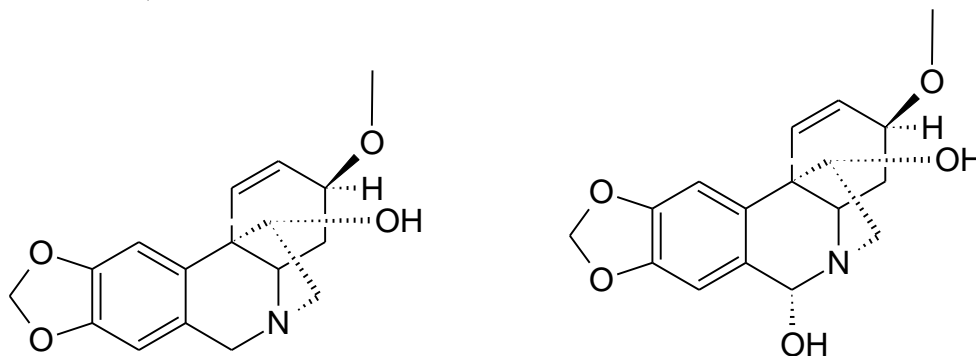
Dále byl galanthamin schopen snižovat přírůstek hmotnosti a příjem potravy u ztučnělých myši (Pavlov et al. 2009) a má schopnosti pomáhat při léčbě diabetes mellitus 1. typu (Hanes et al. 2015).



Obrázek č. 18: Molekula galanthaminu

4.2.3. Deriváty alkaloidů *Amaryllidaceae*

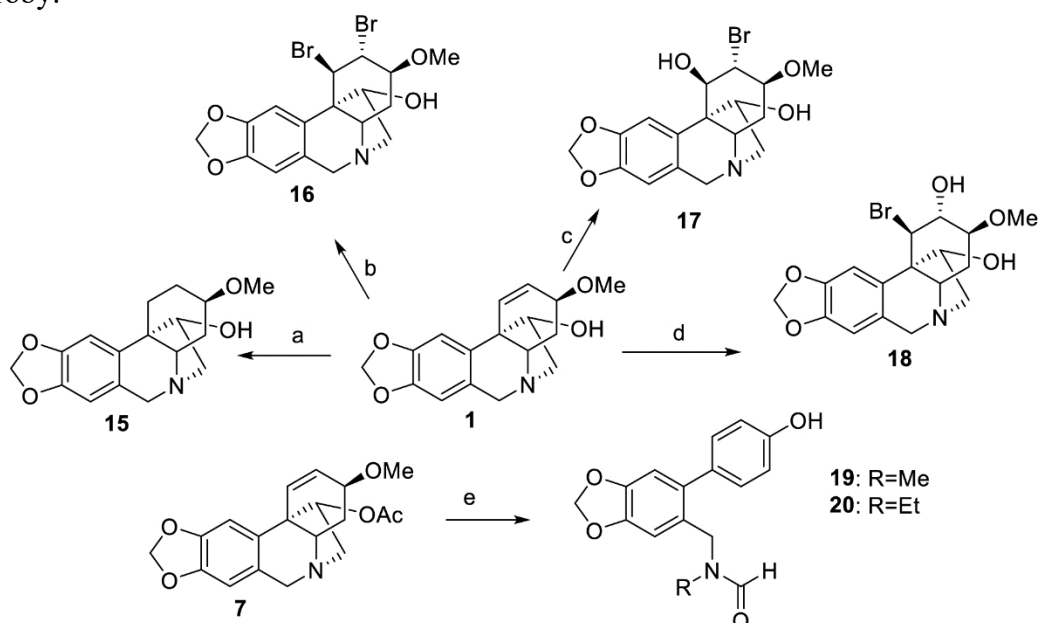
Pojmem derivát označujeme sloučeniny, které vychází ze stejné sloučeniny náhradou jednoho nebo více atomů. Tyto sloučeniny i přes svou podobnost mohou mít podobné, ale i jiné vlastnosti. Modelovým příkladem mohou být deriváty haemanthidin (HAD) a haemanthamin (HAE). Oba alkaloidy řadíme mezi alkaloidy haemanthaminového typu, HAE se od HAD liší pouze v absenci jedné hydroxylové skupiny (Obr. č. 19). HAE je jedna z nejhojněji zastoupených látek v rostlinách *Amaryllidaceae* a lze jej izolovat až v gramových množstvích (Hulcova et al. 2019), zatímco HAD je v rostlinách izolován v podstatně menších množstvích a to především ve formě izomerů (Kulhankova et al. 2013). Obě látky vykazují silnou cytostatickou a cytotoxickou aktivitu u řady nádorových buněk, jako jsou buňky cervikálního karcinomu, karcinomu prsu, hepatocelulárnímu karcinomu, kolorektálnímu karcinomu a jiných (Cahlikova et al. 2020).



Obrázek č. 19: vzorec haemanthaminu vlevo, vzorec haemanthidinu vpravo

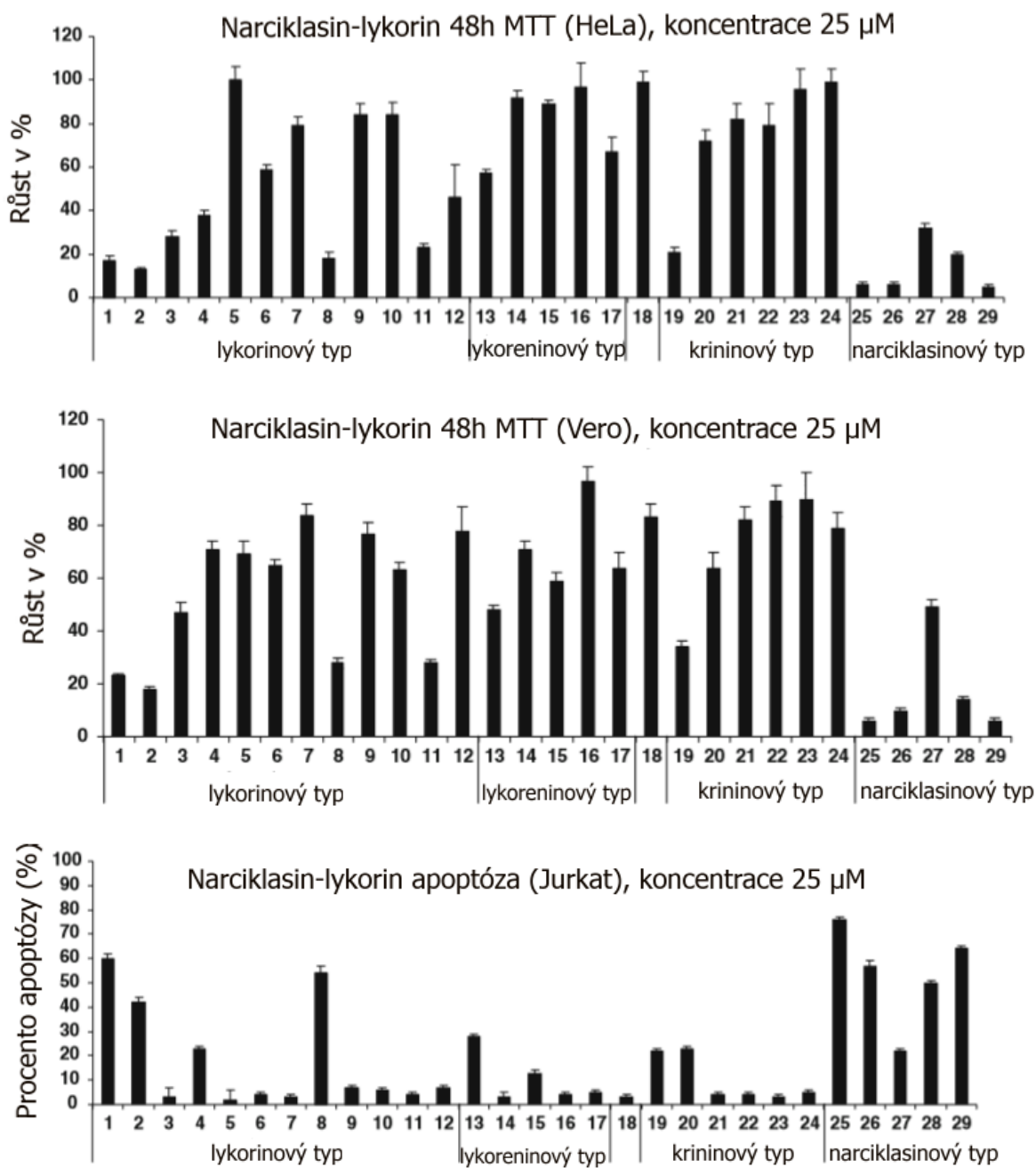
4.2.4 Syntetické deriváty alkaloidů *Amaryllidaceae*

Protože pěstování rostlin čeledi *Amaryllidaceae* a následná izolace a získávání funkčních alkaloidů je poměrně složitý a zdlouhavý proces, věda se začíná zajímat o možnosti výroby těchto alkaloidů synteticky. Kromě samotné výroby jsou snahy zvýšit účinnost těchto derivátů především pro léčbu nádorových onemocnění, ale také například Alzheimerovy choroby. Studie Cahlikova et al. (2020) se zabývala účinností několika syntetických derivátů haemanthaminu (Obr. č. 20). U derivátů byla testována jejich antimalarická a antiproliferační schopnost, dále byl studován potenciál při léčbě Alzheimerovy choroby. Při testech antimalarických vlastností byl pozorován prudký pokles aktivity syntetických derivátů oproti původnímu haemanthaminu či haemanthidinu. Dále syntetické deriváty neměly žádný zásadní význam ani na nádorové buňky. Pro léčbu Alzheimerovy choroby ale deriváty zaznamenaly slibné výsledky, a to především díky inhibiční aktivitě cholinesterázám, která je jednou z příčin této choroby.



Obrázek č. 20: Polosynteticky vyrobené deriváty haemanthaminu využité ve studii (Cahlikova et al.)

Studie Evidente a Kornienko (2009) testovala 29 alkaloidů *Amaryllidaceae* a jejich derivátů. Chemickými modifikacemi lykorinu byly připraveny deriváty 1-*O*-acetyllykorin (2), 1,2-*O,O'*-diacetyllykorin (3), lykorin-2-on (4), 1,2-*O,O'*-diacetyl- α -dihydrolykorin (5), *N*-methyllykorin jodid (6) a lykoren (7), z rostlin *Amaryllidaceae* pak byly izolovány alkaloidy pseudolykorin (8), galanthin (9), norpluvin (10), amarbelisin (11) a ungeremin (12). Z alkaloidu narciklastin byly vytvořeny deriváty tetraacetylnarciklasin (26), C10b-*R*-dihydroxypankratistatin (27), *cis*-dihydronarciklasin (28), *trans*-dihydronarciklasin (29). Antiproliferační aktivita látek byla hodnocena za použití buněčných linií Jurkat (představitel leukemických buněk), HeLa (představitel cervikálního denokarcinomu) a Vero (představitel epitelu ledvin). Alkaloidy a jejich deriváty byly připraveny v koncentracích 5,25 a 1,25 μ M. Výsledky jsou znázorněny na obrázcích č. 21.



Obrázek č. 21: hodnocení protinádorové aktivity alkaloidů *Amaryllidaceae* a jejich syntetických derivátů na buňky HeLa a Vero pomocí MTT testu a apoptický test alkaloidů *Amaryllidaceae* a jejich syntetických derivátů na linii Jurkat (Evidente & Kornienko 2009)

Z výsledků je patrné, že některé syntetické deriváty mohou mít potenciál pro výrobu protinádorově aktivních látek (Evidente & Kornienko 2009).

5. Materiál a metodika

5.1. Materiál

Pro testování antiproliferační aktivity alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* byly vybrány a použity buňky kolorektálního karcinomu linií Caco-2 a HT-29. Pro porovnání byly zvoleny zdravé buněčné linie FHs 74Int. Všechny buněčné linie pro tuto diplomovou práci byly zakoupeny u firmy European Collection of Cell Culture (ECACC). Pro kultivaci linií buněk kolorektálního karcinomu bylo použito médium Dulbecco Modified Egles Medium (DMEM), pro kultivaci linií zdravých buněk bylo použito médium Hybri-care Medium ATCC 46-X. Do všech médií bylo také přidáno 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, roztok penicilinu a streptomycinu, pyruvát sodný, fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline PBS), trypsin, epidermální růstový faktor (EGF). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT) byl využit pro vyhodnocení pokusu. Tato média a další přídavné látky byly koupeny u firmy Sigma-Aldrich (CZ). Dimethylsulfoxid (DMSO) byl koupen u firmy Lach-Ner (CZ). Serologické pipety, kultivační láhve a 96-jamkové destičky byly dodány firmou ThermoFisher (UK). Vzorky použitých alkaloidů, byly připraveny katedrou etnofarmakologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Vzorky byly připraveny dle Cedron et al., 2012. Jako standard byla využita dostupná látka vinorelbin, která se používá při léčbě nádorových onemocnění.

5.2 Kultivace buněčných linií

Nádorové buňky kolorektálního karcinomu linií Caco-2 a HT-29 byly kultivovány v DMEM médiu 10% FBS, 1% roztoků penicilinu a streptomycinu, 1% pyruvátu sodného, 1% hydrogenuhličitanu sodného a 1% neesenciálních aminokyselin. Linie FHs 74Int, tedy normální buněčná linie lidského střeva, byla kultivována v médiu Hybri-Care ATCC 46-X s přídavkem 30 ng/ml epidermálního růstového faktoru (EGF), 10% FBS a 1% roztoku penicilinu a streptomycinu. Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s přídavkem 15 ml výše zmíněného média. Lahve byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Médium bylo měněno vždy po dvou dnech. Po 7 dnech kultivace byly buňky propláchnuty roztokem PBS, díky čemuž došlo k odstranění starého média. Poté bylo na dobu 3 minut přidáno 5ml trypsinu. Po této době byl trypsin neutralizován 1 ml média. Vzniklá buněčná monovrstva byla seškrábnuta buněčnou škrabkou a přepipetována do 15ml zkumavky Falcon. Vzorky byly dále 10 minut centrifugovány při 200 × g. Staré médium bylo následně odstraněno a buňky byly ředěny v médiu novém. Z této suspenze bylo odebráno 0,5 ml média s buňkami, které se přidaly k 15 ml nového média v kultivační lahvi a následovala další kultivace. Ze zbývajících buněčné suspenze bylo odebráno 100 µl buňka přidáno 100 µl tropanové modře. Následně byl vzorek pipetován na sklíčko a obsah živých buněk v 1 ml média byl automaticky spočítán pomocí přístroje Automated cell counter EVE™ od výrobce NanoEntek. Následně byly buňky naředěny na koncentraci 2,5 × 10³ buněk/ml suspenze.

5.3 Cytotoxicita

200 μl připravené buněčné suspenze s koncentrací $2,5 \times 10^3$ buněk/ml bylo pipetováno do 96-jamkové destičky. Po jednom dni bylo staré médium odstraněno a přidáno 100 μl média nového spolu s testovanými vzorky daných koncentrací (10 – 0,31 $\mu\text{M/ml}$). Vzorky s buňkami byly inkubovány 72 hodin. Následně bylo staré médium i se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 μl čistého média s MTT (1 $\mu\text{l/ml}$). Po 2 hodinách v CO_2 inkubátoru bylo médium MTT odstraněno a nahrazeno 100 μl DMSO. Následně byla měřena absorbance při vlnové délce 555 nm. Procentuální zastoupení životaschopných buněk bylo vypočteno pomocí porovnání s kontrolou, která obsahovala buňky bez testovaných látek.

$$\% \text{ životaschopných buněk} = \frac{\text{abs vzorku}}{\text{abs kontrolního vzorku}} \times 100$$

Výsledky v tabulce č. 5, které jsou zaznamenány pomocí IC_{50} (inhibiční koncentrace). Tato hodnota určuje množství testované látky potřebné k inhibici 50 % buněk.

5.4 Statistické vyhodnocení

Výsledky jsou zpracovány jako průměr se směrodatnou odchylkou. Vyhodnocení bylo provedeno ve statistickém programu Microsoft Excel.

6. Výsledky

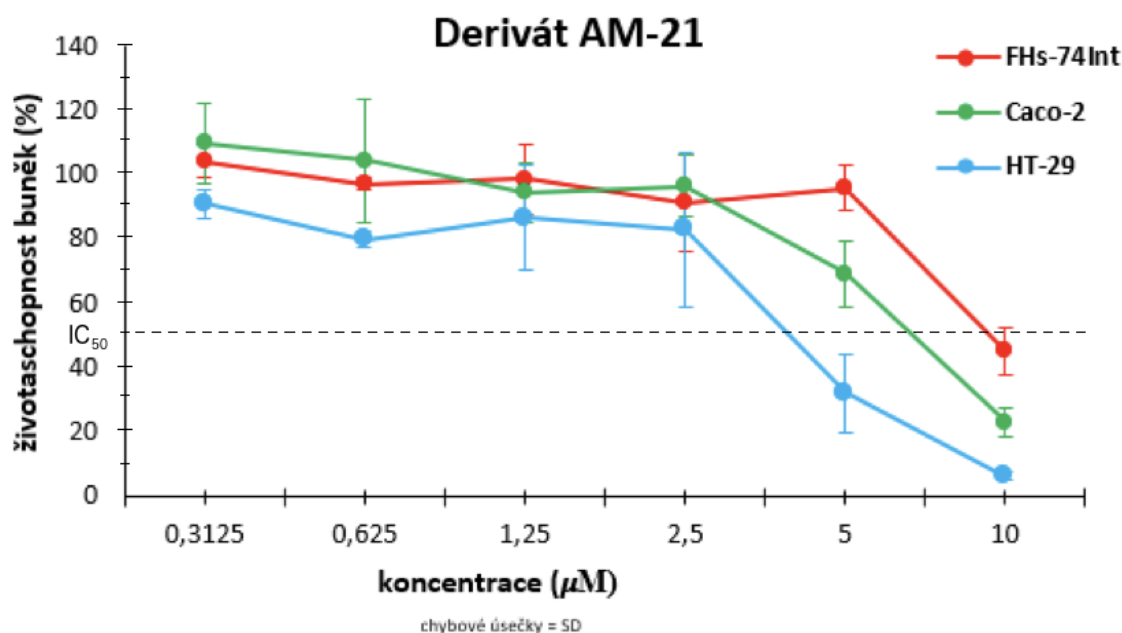
Celkem byla testována inhibiční aktivita 27 nově připravených derivátů galanthamin hydrochloridu a 3 derivátů galanthaminu, alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae*, na buňky lidského kolorektálního karcinomu linií Caco-2 a HT-29. Jako srovnávací skupina byly použity zdravé lidské střevní buňky linie FHs 74Int. Z testovaných vzorků připravených alkaloidů vykazovalo cytotoxickou aktivitu na nádorové buňky obou linií celkem 13 derivátů galanthaminu ze 30 vzorků. Nejvyšší cytotoxicitu prokázaly vzorky s označením AM-29, AM-21 a AM-34. Vzorek AM-29 vykazoval pro linii HT-29 hodnoty IC_{50} $1,36 \pm 0,11 \mu\text{M}$, pro linii Caco-2 vykazoval hodnoty IC_{50} $1,90 \pm 0,76 \mu\text{M}$. Derivát AM-21 vykazoval pro linii HT-29 hodnoty IC_{50} $2,76 \pm 0,01 \mu\text{M}$, pro linii Caco-2 vykazoval hodnoty IC_{50} $5,26 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Derivát AM-34 vykazoval pro linii HT-29 hodnoty IC_{50} $2,79 \pm 0,05 \mu\text{M}$, pro linii Caco-2 vykazoval hodnoty IC_{50} $5,87 \pm 0,64 \mu\text{M}$. Deriváty AM-29 a AM-21 ale bohužel vykazovaly cytotoxickou aktivitu i na zdravé buněčné linie FHs 74Int. Cytotoxickou aktivitu pouze proti linii HT-29 vykazalo 25 ze 30 vzorků derivátů galanthaminu, z nichž nejvyšší cytotoxický účinek prokázaly vzorky AM-29, AM-21 a AM-34. AM-29 vykazoval hodnoty IC_{50} $1,36 \pm 0,11 \mu\text{M/ml}$, AM-5 vykázal hodnoty IC_{50} $2,76 \pm 0,01 \mu\text{M}$ a AM-2 vykázal hodnoty IC_{50} $2,79 \pm 0,005 \mu\text{M}$. Deriváty AM-29 a AM-21 ale bohužel vykazovaly cytotoxickou aktivitu i na zdravé buněčné linie FHs 74Int. Cytotoxickou aktivitu proti nádorovým buňkám linií Caco-2 prokázalo celkem 13 vzorků ze 30 derivátů galanthaminu. Nejlepších výsledků dosáhly deriváty AM-29, AM-4 a AM-20. Vzorek AM-29 vykázal hodnoty IC_{50} $1,90 \pm 0,76 \mu\text{M}$, AM-4 vykázal hodnoty IC_{50} $3,00 \pm 0,00 \mu\text{M}$, vzorek AM-20 vykázal hodnoty IC_{50} $5,17 \pm 1,37 \mu\text{M}$. Derivát AM-29 ale bohužel vykazoval cytotoxickou aktivitu i na zdravé buněčné linie FHs 74Int. Standardem, pro posouzení cytotoxické aktivity byl použit alkaloid vinorelbin, který je běžně využívaným farmakem při léčbě nádorových onemocnění. Hodnoty IC_{50} vinorelbinu pro linii HT-29 činily $0,02 \pm 0,00 \mu\text{M}$, pro linii Caco-2 $0,03 \pm 0,00 \mu\text{M}$ a pro linii FHs 74Int $3,9 \pm 0,02 \mu\text{M}$.

Tabulka č. 5: Výsledky cytotoxicity zkoumaných alkaloidů

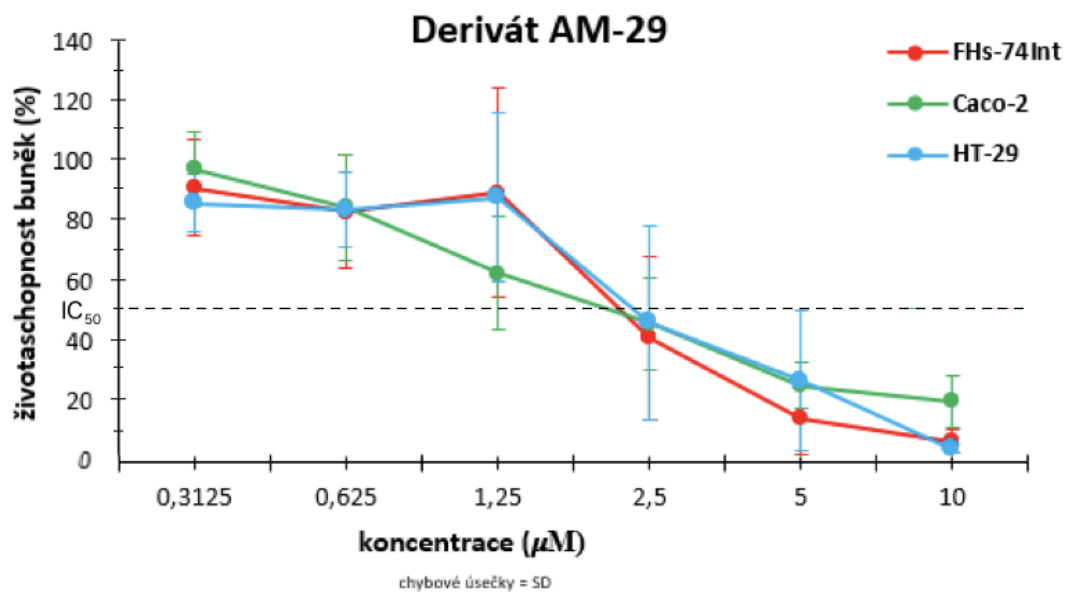
Označení	Látka	HT-29	Caco-2	FHs 74Int
		IC_{50} (průměr \pm SD μM)		
LC-156	Derivát galanthaminu HCl	$7,85 \pm 1,58$	>10	>10
LC-157	Derivát galanthaminu HCl	$5,94 \pm 0,00$	>10	>10
AM-1	Derivát galanthaminu HCl	$6,50 \pm 0,02$	$7,47 \pm 1,82$	>10
AM-2	Derivát galanthaminu HCl	$8,61 \pm 0,73$	>10	>10
AM-3	Derivát galanthaminu HCl	$6,40 \pm 0,02$	>10	>10
AM-4	Derivát galanthaminu HCl	$5,09 \pm 0,36$	$3 \pm 0,00$	>10
AM-5	Derivát galanthaminu HCl	$8,69 \pm 0,97$	>10	>10
AM-6	Derivát galanthaminu HCl	$8,82 \pm 1,18$	>10	>10
AM-7	Derivát galanthaminu HCl	$7,24 \pm 1,76$	>10	>10
AM-9	Derivát galanthaminu HCl	>10	>10	>10
AM-10	Derivát galanthaminu HCl	$6,90 \pm 1,54$	$8,99 \pm 0,00$	>10
AM-11	Derivát galanthaminu HCl	$7,43 \pm 0,32$	>10	>10
AM-12	Derivát galanthaminu HCl	>10	>10	>10
AM-13	Derivát galanthaminu HCl	$4,04 \pm 0,30$	$7,61 \pm 0,48$	>10
AM-14	Derivát galanthaminu HCl	>10	>10	>10
AM-16	Derivát galanthaminu HCl	$3,30 \pm 0,28$	$7,98 \pm 0,91$	>10

Označení	Látka	HT-29	Caco-2	FHs 74Int
		IC ₅₀ (průměr ± SD μM)		
AM-19	Derivát galanthaminu HCl	>10	>10	>10
AM-20	Derivát galanthaminu HCl	3,15 ± 0,22	5,17 ± 1,37	>10
AM-21	Derivát galanthaminu HCl	2,76 ± 0,01	5,26 ± 0,15	9,89 ± 0,16
AM-22	Derivát galanthaminu HCl	6,31 ± 0,99	>10	>10
AM-23	Derivát galanthaminu HCl	5,12 ± 0,00	>10	>10
AM-24	Derivát galanthaminu HCl	6,14 ± 0,40	>10	>10
AM-26	Derivát galanthaminu HCl	7,91 ± 0,48	>10	>10
AM-27	Derivát galanthaminu HCl	5,21 ± 0,18	5,67 ± 1,14	>10
AM-29	Derivát galanthaminu	1,36 ± 0,11	1,90 ± 0,76	5,05 ± 2,85
AM-30	Derivát galanthaminu HCl	6,38 ± 0,05	7,46 ± 1,32	>10
AM-31	Derivát galanthaminu HCl	4,50 ± 0,36	6,94 ± 0,79	>10
AM-32	Derivát galanthaminu HCl	5,12 ± 0,62	7,15 ± 0,12	>10
AM-33	Derivát galanthaminu	>10		>10
AM-34	Derivát galanthaminu	2,79 ± 0,05	5,87 ± 0,64	>10

HT-29, Caco-2 – buněčné linie kolorektálního karcinomu, FHs 74Int – zdravé buněčné linie střeva, IC₅₀ – maximální inhibiční koncentrace, způsobující úmrtí 50 % buněk, SD – směrodatná odchylka



Obrázek č. 22: Graf vyjadřuje vývoj toxicity připraveného derivátu AM-21 na buněčné linie HT-29, Caco-2 a FHs 74Int. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako jejich průměr a směrodatná odchylka ± SD



Obrázek č. 23: Graf vyjadřuje vývoj toxicity připraveného derivátu AM-29 na buněčné linie HT-29, Caco-2 a FHs 74Int. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako jejich průměr a směrodatná odchylka ± SD.

7. Diskuze

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších globálních příčin úmrtí. Podle mezinárodní agentury pro výzkum nádorových onemocnění GLOBOCAN 2020 v minulém roce onemocnělo těmito onemocněními až 19,3 milionu pacientů, z nichž téměř 10 milionů pacientů nádorovým onemocněním podlehl. Kolorektální karcinom je třetím nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním, bývá diagnostikován až u 10 % případů. Tomuto onemocnění pak podlehne až 10 % pacientů. Hepatokarcinom je šestý nejčastější druh nádorového onemocnění, je to však čtvrtý nejčastější důvod úmrtí. V roce 2020 bylo potvrzeno 906 000 případů hepatokarcinomu a této nemoci podlehl 830 000 pacientů, což je úmrtnost více než 90 % (Sung et al. 2021).

Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jsou díky svým cytotoxickým, cytostatickým a selektivním účinkům využívány v léčbě nádorových onemocnění řadu let. Mezi alkaloidy, u kterých byla tato aktivita prokázána a jsou při léčbě nádorových onemocnění běžně používané patří vinkristin, vinblastin nebo vinorelbin (Martino et al. 2018). Rostliny *Amaryllidaceae* obsahují více než 150 druhů alkaloidů, mnohé z nich mají také výše zmíněné účinky, proto jsou podrobeny častému zkoumání a předpokládá se, že mohou mít v budoucnu značný terapeutický potenciál.

V našem výzkumu byla pozornost věnována 27 vzorkům nových derivátů galanthamin hydrochloridu a 3 derivátům galanthaminu. Antiproliferační účinek na linie Caco-2 a HT-29 byl prokázán u 13 vzorků. Bohužel u dvou vzorků byla prokázána i cytotoxicita na zdravé buněčné linie FHs 74Int. Podle našich výsledků některé deriváty galanthamin hydrochloridu vykazovaly cytotoxický účinek vůči liniím HT-29 a Caco-2. Většina derivátů vykazovala cytotoxičtější účinek na linii HT-29 než na linii Caco-2

Studie provedená Doskočil et al. (2015) se zabírala stanovením antiproliferační aktivity 13 různých alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* na nádorové buňky linií HT-29 a Caco-2. Těmito alkaloidy byly α -krinan, β -krinan, galanthamin, lykorin a tazzetin. Pozitivní kontrola byla provedena pomocí vinorelbinu. Autoři došli k závěru, že nejsilněji působícími alkaloidy byly haemanthamin, haemathidin a lykorin. Nejsilnější cytotoxickou aktivitu vykazoval haemanthamin s hodnotou IC_{50} $0,99 \pm 0,14 \mu M$ proti buňkám Caco-2; $0,59 \pm 0,01 \mu M$ proti buňkám HT-29, zároveň s hodnotami $19,5 \pm 8,9 \mu M$ vykazoval zanedbatelnou toxicitu na zdravé buňky FHs 74Int. Lykorin měl také velmi slibné hodnoty IC_{50} , konkrétně $0,99 \pm 0,08 \mu M$ proti buňkám Caco-2, $1,2 \pm 0,0 \mu M$ proti buňkám HT-29, také byla pozorována mírná toxicita IC_{50} s hodnotami $19,5 \pm 8,9 \mu M$ na zdravé buňky FHs 74Int. Jako třetí nejúčinnější alkaloid byl haemathidin s hodnotami IC_{50} $3,3 \pm 0,9 \mu M$ proti buňkám Caco-2 a $0,59 \pm 0,01 \mu M$ proti buňkám HT-29. Bohužel vykazoval s hodnotami IC_{50} $11,6 \pm 0,9 \mu M$ velmi mírnou toxicitu na zdravé buňky FHs 74Int. Touto studií byla mimo jiné zkoumána antiproliferační aktivita galanthaminu, bohužel se výsledky nejevily jako cytotoxické.

Další studie provedená týmem Havelek et al. (2017) se zabývala antiproliferační aktivitou 22 různých alkaloidů (ambellin, galanthamin hydrogenbromid, tazettin, galantin, haemathidin, hamain, lykorin, chlidantin, undulatin, krinin, narwedín, buphamanin, lykoramin, 9-O-demethylgalantin, 1-O-acetylbulbisin, karanin, haemanthamin, homolykorin, krinamidin, masonin, acetylkarantin, 11-O-acetylabelline) na 17 různých buněčných liniích (HL-60, Jurkat, MOLT-4, A549, H1299, COLO-201, HT-29, SW-480, AGS, PANC-1, A2780, HeLa, BT-549,

MCF-7, MDA-MB-231, SAOS-2, NHDF) pomocí WST-1 testu. Touto studií bylo také potvrzeno, že Haemanthamin, lykorin a haemathidin jsou neúčinnější alkaloidy v boji proti buňkám nádorů. Po ošetření nádorových buněk haemanthaminem o koncentraci 10 μM klesla proliferace pod 25 % u 12 ze 17 linií nádorových buněk. Průměrně u všech linií ošetřených haemanthaminem klesla proliferace na 21 %. Nádorovým buňkám ošetřeným roztokem lykorinu o koncentraci 10 μM klesla proliferace pod 25 % u 10 ze 17 buněčných linií, průměrná proliferace u všech linií klesla na 21 %. Třetím neúčinnějším alkaloidem způsobující pokles proliferace byl haemathidin, který způsobil pokles pod 25 % u 8 ze 17 testovaných buněčných linií. Průměrný pokles u všech buněčných linií byl 27 %. Tato studie se také zabývala antiproliferační aktivitou galanthamin hydrobromidu a galantinu. Galanthamin hydrobromid neprokázal příliš velké snížení proliferace nádorových buněk, proliferace u buněk ošetřených tímto alkaloidem klesla na 91 %. U buněk HT-29 byl pozorován největší pokles proliferace na 74 %. U buněk ošetřených galantinem nebyl pozorován žádný průměrný pokles proliferace, pouze u buněk linie HT-29 byl pozorován pokles proliferace na 64 %.

V porovnání s touto diplomovou prací tedy můžeme konstatovat, že polosyntetické deriváty galanthaminu a také polosyntetické deriváty galanthamin hydrochloridu jsou účinnější, než původní sloučenina galanthamin. Dále také můžeme konstatovat, že galanthamin hydrochlorid má vyšší antiproliferační aktivitu než galanthamin hydrobromid, který je evidován jako účinné léčivo proti Alzheimerově chorobě. Vyšší účinnost derivátů galanthaminu si můžeme vysvětlit změnou struktury látek, především pak přidáním hydrochloridu do struktury molekuly.

Tato teorie může být podpořena derivátem obsahujícím hydrochlorid - látkou mefuparib hydrochlorid. Zatímco mefuparib zřejmě nemá terapeutické využití, jeho derivát mefuparib hydrochlorid, velmi dobře rozpustný ve vodě, je posuzován jako inhibitor enzymů PARP (poly (ADP-riboza) polymeráza), což jsou enzymy, které jsou zodpovědné za prozánětlivou aktivitu makrofágů a také za abnormalitu chromozomů způsobených delecemi, translokacemi a inverzemi, což vede k destabilizaci genomu a tvorbě nádorových buněk. Tato látka je schopna díky své stavbě snižovat aktivitu PARP a tím indukovat akumulaci dvouřetězových zlomů DNA a následně zastavovat buněčný cyklus. Studie této látky byla provedena týmem He et al. 2017, který zkoumal antiproliferační aktivitu na nádorových buňkách plic, prsu, vaječnicků, slinivky, děložního hrdla a tlustého střeva. Nejvyšší antiproliferační aktivitu látka prokázala na nádorové buňky prsu linie MDA-MB-436 s hodnotami IC_{50} $0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$ a plicního karcinomu linie V-C8 s hodnotami IC_{50} $0,54 \pm 0,18 \mu\text{M}$. Velmi slibná aktivita byla také prokázána nádorové buňky kolorektálního karcinomu linie HCT-15 s výsledky IC_{50} $2,64 \pm 0,59 \mu\text{M}$.

8. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na testování antiproliferační, cytotoxické a selektivní aktivity nových derivátů galanthaminu a galanthamin hydrochloridu. Tyto vlastnosti jsou základním předpokladem pro vývoj nových podpůrných léčiv pro nádorová onemocnění.

V našem pokusu byla zkoumána hodnota IC_{50} u 30 alkaloidů buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29, selektivní účinek byl zkoumán na buněčné linii FHs 74Int. Celkem 25 námi vybraných derivátů galanthaminu prokázalo svou antiproliferační aktivitu na buňky linie HT-29, na buněčnou linii Caco-2 prokázalo antiproliferační aktivitu 13 derivátů. Antiproliferační aktivita na obě buněčné linie, tedy HT-29 i Caco-2 byla prokázána u 13 vzorků. Bohužel u dvou zkoumaných vzorků byla zjištěna i antiproliferační aktivita na buňky zdravého lidského střeva linie FHs 74Int. I přesto, že antiproliferační aktivita derivátů galanthaminu byla značně nižší, než u jiných alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*, bylo by vhodné nejúčinnější deriváty podrobit dalšímu testování jak na nádorové, tak i na zdravé buněčné linie. Náš pokus byl proveden pouze v *in vitro* podmínkách, další testování by bylo vhodné zaměřit na buňky živých organismů, tedy testování *in vivo*.

9. Seznam použité literatury

- @CFR_org. 2020. The Growing Cancer Threat in Africa | Think Global Health.
- Abou-Ghali M, Stiban J. 2015. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci* **22**:760-772.
- Adams JM, Cory S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* **19**:488-496.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* **25**:2097-2116.
- Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, Arnold M. 2018. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *Int J Cancer*.
- Arruebo, Vilaboa, Sáez-Gutierrez, Lambea, Tres, Valladares, González-Fernández. 2011. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers* **3**.
- Bahar E, Kim JY, Yoon H. 2019. Chemotherapy Resistance Explained through Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Signaling. *Cancers* **11**:20.
- Bender, Jablonksy, Shadid, Romaine, Dunlap, Anklin, Graves, Osheroff. 2008. Substituents on etoposide that interact with human topoisomerase IIalpha in the binary enzyme-drug complex: contributions to etoposide binding and activity. *Biochemistry* **47**.
- Berk L, Alfonso JCL. 2020. Diminishing Returns From Ultrahypofractionated Radiation Therapy for Prostate Cancer In Regard to Vogelius et al. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **108**:834-834.
- Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**:518-528.
- Block TM, et al. 2005. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:779-784.
- Cadet J, Wagner JR. 2014. Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: similarities and differences. *Arch Biochem Biophys* **557**:47-54.
- Cahlikova L, Kawano I, Rezacova M, Blunden G, Hulcova D, Havelek R. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochemistry Reviews*:21.
- cancer.gov. 2015. Risk Factors: Age - National Cancer Institute.
- Carqueijeiro I, Langley C, Grzech D, Koudounas K, Papon N, O'Connor SE, Courdavault V. 2020. Beyond the semi-synthetic artemisinin: metabolic engineering of plant-derived anti-cancer drugs. *Current Opinion in Biotechnology* **65**:17-24.
- Chae HD, Jeon CH. 2014. Peutz-Jeghers syndrome with germline mutation of STK11. *Ann Surg Treat Res* **86**:325-330.
- Chase MW, Reveal JL, Fay MF. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**:132-136.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. 2018. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* **14**:450-464.

- Chen HHW, Kuo MT. 2017. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget* **8**:62742-62758.
- Chen K, Shi WJ. 2016. Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Tumor Biology* **37**:10539-10544.
- Cho N, Du YL, Valenciano AL, Fernandez-Murga ML, Goetz M, Clement J, Cassera MB, Kingston DGI. 2018. Antiplasmodial alkaloids from bulbs of *Amaryllis belladonna* Steud. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **28**:40-42.
- Cimmino A, Masi M, Evidente M, Superchi S, Evidente A. 2017. Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality* **29**:486-499.
- Cingelova S, et al. 2014. [Prognostic markers of advanced non-small cell lung carcinoma - assessing the significance of oncomarkers using data-mining techniques RPA]. *Klin Onkol* **27**:347-352.
- Corey-Bloom J. 2003. Galantamine: A review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *International Journal of Clinical Practice* **57**:219-223.
- Cui CC, Yang JB, Li X, Liu DL, Fu LW, Wang XW. 2020. Functions and mechanisms of circular RNAs in cancer radiotherapy and chemotherapy resistance. *Molecular Cancer* **19**:16.
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. 2010. Colorectal cancer. *Lancet* **375**:1030-1047.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**:49-63.
- Dabetic I, Zivkovic I. 2010. Palliative surgically treatment of unresectable pancreatic head cancer. *European Journal of Medical Research* **15**:223-223.
- Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. 2019. Amaryllidaceae Family Alkaloids as Potential Drugs for Cancer Treatment. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy>.
- Debnath B, Singh WS, Das M, Goswami S, Singh MK, Maiti D, Manna K. 2018. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry* **9**:56-72.
- Debruyne EN, Delanghe JR. 2008. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: New aspects and applications. *Clinica Chimica Acta* **395**:19-26.
- Demain AL, Vaishnav P. 2011. Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology* **4**:687-699.
- DeVita, Canellos, Chabner, Schein, Hubbard, Young. 1975. Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease. *Lancet (London, England)* **1**.
- Devita, Serpick, Carbone. 1970. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Annals of internal medicine* **73**.
- Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. 2008. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian Journal of Pharmacology* **40**:49-58.
- Ding Y, Qu D, Zhang KM, Cang XX, Kou ZN, Xiao W, Zhu JB. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* **19**:53-100.

- Dobberfuhl AD. 2019. Evaluation and treatment of female stress urinary incontinence after pelvic radiotherapy. *Neurourology and Urodynamics* **38**:S59-S69.
- Dong LN, Zhang XL, Cai LL, Zuo FM, Zhao MM, Wang Q, Zhang S, Xu K, Li JJ. 2020. Targeted MRI and chemotherapy of ovarian cancer with clinic available nano-drug based nanoprobe. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **130**:10.
- Douglas Hanahan RAW. 2019. Hallmarks of Cancer.
- Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. 2014. Biomarkers of liver cell death. *Journal of Hepatology* **60**:1063-1074.
- Elgorashi EE, Malan SF, Stafford GI, van Staden J. 2006. Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *South African Journal of Botany* **72**:224-231.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**:495-516.
- Eurostat. 2021. Statistika příčin smrti – Statistics Explained, Available from https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics/cs.
- Evidente A, Andolfi A, Abou-Donia AH, Touema SM, Hammada HM, Shawky E, Motta A. 2004. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* **65**:2113-2118.
- Evidente A, Kornienko A. 2009. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews* **8**:449-459.
- Freddie Bray BSc M, PhD Jacques Ferlay ME Isabelle Soerjomataram MD, MSc, PhD Rebecca L. Siegel MPH Lindsey A. Torre MSPH Ahmedin Jemal PhD, DVM. 2019. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries - Bray - 2018 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library.
- Fridlender M, Kapulnik Y, Koltai H. 2015. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Frontiers in Plant Science* **6**:9.
- Fruman DA, Rommel C. 2014. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* **13**:140-156.
- Gatenby RA, Gillies RJ. 2008. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**:56-61.
- Gerhardsson de Verdier M, Steineck G, Hagman U, Rieger A, Norell SE. 1990. Physical activity and colon cancer: a case-referent study in Stockholm. *Int J Cancer* **46**:985-989.
- Golshiri P, Rasooli S, Emami M, Najimi A. 2016. Effects of Physical Activity on Risk of Colorectal Cancer: A Case-control Study. *Int J Prev Med*.
- Goodman, Wintrobe, Dameshek, Gilman. 1946. NITROGEN MUSTARD THERAPY: Use of Methyl-Bis(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride and Tris(Beta-Chloroethyl)amine Hydrochloride for Hodgkin's Disease, Lymphosarcoma, Leukemia and Certain Allied and Miscellaneous Disorders. *Journal of the American Medical Association* **132**:126-132.
- Greenbaum LE. 2004. Cell cycle regulation and hepatocarcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy* **3**:1200-1207.

- Guimaraes AV, Dedivitis RA, Matos LL, Aires FT, Cernea CR. 2018. Comparison between transoral laser surgery and radiotherapy in the treatment of early glottic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* **8**:7.
- Guo M, Zhang H, Zheng J, Liu Y. 2020. Glypican-3: A New Target for Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. Pages 2008-2021. *J Cancer*.
- Habli Z, Toumieh G, Fatfat M, Rahal ON, Gali-Muhtasib H. 2017. Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms. *Molecules* **22**:22.
- Half E, Bercovich D, Rozen P. 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* **4**:22.
- Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. 2005. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. *Br J Cancer* **93**:399-405.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**:646-674.
- Hanes WM, Olofsson PS, Kwan K, Hudson LK, Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. 2015. Galantamine Attenuates Type 1 Diabetes and Inhibits Anti-Insulin Antibodies in Nonobese Diabetic Mice. *Molecular Medicine* **21**:702-708.
- Hani Alotaibi NA, Kasım Diril,. 2016. Molecular Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma | SpringerLink.
- Havelek, et al. 2017. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-biological interactions* **275**.
- Havelek R, Seifrtova M, Kralovec K, Bruckova L, Cahlikova L, Dalecka M, Vavrova J, Rezacova M, Opletal L, Bilkova Z. 2014. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* **21**:479-490.
- He MM, Qu CR, Gao OD, Hu XM, Hong XC. 2015. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *Rsc Advances* **5**:16562-16574.
- He ZY, Liu P, Zhang SZ, Yan J, Wang MN, Cai ZX, Wang JJ, Dong YP. 2019. A Freezing-Induced Turn-On Imaging Modality for Real-Time Monitoring of Cancer Cells in Cryosurgery. *Angewandte Chemie-International Edition* **58**:3834-3837.
- Hegde PS, Chen DS. 2020. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity* **52**:17-35.
- Holeček V. 2010. Oxidační stres u nádorových onemocnění, *Klinická biochemie a metabolismus* 4/2010. Available from <https://www.google.com/search?q=p%C5%99eklada%C4%8D&oq=p%C5%99e&aqs=chrome..69i59j69i60j69i6112j69i59j69i57.1307j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8> (2010).
- Horwitz. 1994. Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **5 Suppl 6**.
- Hulcova D, et al. 2019. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry* **165**:9.
- Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**:1071-1078.

- Jellema P, van der Windt DA, Bruinvels DJ, Mallen CD, van Weyenberg SJ, Mulder CJ, de Vet HC. 2010. Value of symptoms and additional diagnostic tests for colorectal cancer in primary care: systematic review and meta-analysis. *Bmj* **340**:c1269.
- Jing HT, Liu J, Liu HZ, Xin H. 2014. Histochemical Investigation and Kinds of Alkaloids in Leaves of Different Developmental Stages in *Thymus quinquecostatus*. *Scientific World Journal*:6.
- JJ N, J vS. 2014. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural product communications* **9**.
- Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. 2013. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer Causes Control* **24**:1207-1222.
- Kohelová E, et al. 2019. Derivatives of the β -Crinine Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules*.
- Kolligs FT. 2016. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. Pages 158-164. *Visc Med*.
- Kornienko A, Evidente A. 2008. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* **108**:1982-2014.
- Kulhankova A, Cahlikova L, Novak Z, Macakova K, Kunes J, Opletal L. 2013. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and Their Acetylcholinesterase- and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. *Chemistry & Biodiversity* **10**:1120-1127.
- Kvietys PR, Granger DN. 2012. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **52**:556-592.
- Le Bian AZ, Genser L, Tabchouri N, Fillol C, Laforest A, Tresallet C, Ouaiissi M, Fuks D. 2020. Abdominal lymph node recurrence from colorectal cancer: Resection should be considered as a curative treatment in patients with controlled disease. *Surgical Oncology-Oxford* **35**:206-210.
- Lee DW, et al. 2017. Association between mutations of critical pathway genes and survival outcomes according to the tumor location in colorectal cancer. *Cancer* **123**:3513-3523.
- Lee ST, Wong PF, Cheah SC, Mustafa MR. 2011. Alpha-Tomatine Induces Apoptosis and Inhibits Nuclear Factor-Kappa B Activation on Human Prostatic Adenocarcinoma PC-3 Cells. *Plos One* **6**:14.
- Li HJ, Yan WX, Suo XM, Peng HT, Yang XJ, Li ZH, Zhang JC, Liu DD. 2019. Nucleus-targeted nano delivery system eradicates cancer stem cells by combined thermotherapy and hypoxia-activated chemotherapy. *Biomaterials* **200**:1-14.
- Lin LZ, Hu SF, Chai HB, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Cordell GA, Ruangrunsi N. 1995. LYCORINE ALKALOIDS FROM HYMENOCALLIS-LITTORALIS. *Phytochemistry* **40**:1295-1298.
- Liu YQ, Wang XL, He DH, Cheng YX. 2021. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. *Phytomedicine* **80**:16.
- Locarek M, Novakova J, Kloucek P, Host'alkova A, Kokoska L, Gabrlova L, Safratova M, Opletal L, Cahlikova L. 2015. Antifungal and Antibacterial Activity of Extracts and Alkaloids of Selected Amaryllidaceae Species. *Natural Product Communications* **10**:1537-1540.

- Lou CH, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y. 2015. Selective anticancer activity of hirsutine against HER2-positive breast cancer cells by inducing DNA damage. *Oncology Reports* **33**:2072-2076.
- Louw CAM, Regnier TJC, Korsten L. 2002. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology* **82**:147-154.
- Luo YH, et al. 2015. Lycorine induces programmed necrosis in the multiple myeloma cell line ARH-77. *Tumor Biology* **36**:2937-2945.
- Lynne Eldridge M. 2020. Types and Ratings of Different Carcinogens in Our Environment.
- Ma ZQ, et al. 2020. Utilizing Melatonin to Alleviate Side Effects of Chemotherapy: A Potentially Good Partner for Treating Cancer with Ageing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**:20.
- Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. 1999. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol* **94**:3039-3045.
- Manohar HD, Adiga S, Thomas J, Sharma A. 2016. Adverse drug reaction profile of microtubule-damaging antineoplastic drugs: A focused pharmacovigilance study in India. *Indian Journal of Pharmacology* **48**:509-514.
- Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, Rui M, Siciliano AM, Collina S. 2018. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **28**:2816-2826.
- McGlynn KA, Petrick JL, London WT. 2015. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* **19**:223-238.
- Mellor HR, Callaghan R. 2008. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* **81**:275-300.
- Michalopoulos GK. 2010. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy: Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas. Pages 2-13. *Am J Pathol*.
- Mills CC, Kolb EA, Sampson VB. 2018. Development of Chemotherapy with Cell-Cycle Inhibitors for Adult and Pediatric Cancer Therapy. *Cancer Research* **78**:320-325.
- Mishima Y, et al. 2015. Ricolinostat (ACY-1215) induced inhibition of aggresome formation accelerates carfilzomib-induced multiple myeloma cell death. *British Journal of Haematology* **169**:423-434.
- Mistry N, Abbott D, Wilkison JW, Major A, Haverkos BM, Kamdar M. 2019. Dose Reduction or Omission of Vinca Alkaloids during Initial Chemotherapy Treatment Does Not Impact Outcomes in Patients with Lymphoma. *Blood* **134**:3.
- Mizejewski GJ. 2001. Alpha-fetoprotein structure and function: Relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Experimental Biology and Medicine* **226**:377-408.
- Molassiotis A, Smith JA, Mazzone P, Blackhall F, Irwin RS, Panel CEC. 2017. Symptomatic Treatment of Cough Among Adult Patients With Lung Cancer CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest* **151**:861-874.

- Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, Atanasov AG, Bishayee A. 2019. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology* **858**:16.
- Muhamad N, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K. 2018. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *International Journal of Nanomedicine* **13**:3921-3935.
- Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi MA. 2016. Tumor markers: A diagnostic tool. Pages 17-20. *Natl J Maxillofac Surg*.
- Nair, Staden v. 2014. Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural product communications* **9**.
- Naraki T, Kohno N, Saito H, Fujimoto Y, Ohhira M, Morita T, Kohgo Y. 2002. gamma-Carboxyglutamic acid content of hepatocellular carcinoma-associated des-gamma-carboxy prothrombin. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1586**:287-298.
- Neidle S. 2016. Quadruplex Nucleic Acids as Novel Therapeutic Targets. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**:5987-6011.
- Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. 2008. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. *Chemistry & Biology* **15**:99-109.
- Palma DA, et al. 2019. Stereotactic ablative radiotherapy versus standard of care palliative treatment in patients with oligometastatic cancers (SABR-COMET): a randomised, phase 2, open-label trial. *Lancet* **393**:2051-2058.
- Paradis V, Youssef N, Dargere D, Ba N, Bonvoust F, Deschatrette J, Bedossa P. 2001. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Human Pathology* **32**:327-332.
- Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Qchani K, Chavan S, Al-Abed Y, Tracey KJ. 2009. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behavior and Immunity* **23**:41-45.
- Pearson, Eliel. 1949. Adrenocorticotrophic hormone- and cortisone-induced regression of lymphoid tumors in man; a preliminary report. *Cancer* **2**.
- Pignataro BS, et al. 2017. Oral Rivaroxaban for the Treatment of Symptomatic Venous Thromboembolism in 400 Patients With Active Cancer: A Single-Center Experience. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis* **23**:883-887.
- Poynter JN, et al. 2009. Associations between smoking, alcohol consumption and colorectal cancer, overall and by tumor microsatellite instability status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**:2745-2750.
- Pozzan C, Cardin R, Piciocchi M, Cazzagon N, Maddalo G, Vanin V, Giacomini A, Pontisso P, Cillo U, Farinati F. 2014. Diagnostic and prognostic role of SCCA-IgM serum levels in hepatocellular carcinoma (HCC). *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **29**:1637-1644.
- Prasanta Dey a AKa, Anoop Kumar b, Meenakshi Gupta c, Byung Mu Lee a, Tejendra Bhakta d, Suvakanta Dash d, Hyung Sik Kim. 2020. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids) - ScienceDirect.

- Prokhorova EA, Zamaraev AV, Kopeina GS, Zhivotovsky B, Lavrik IN. 2015. Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**:4593-4612.
- Rajdova A, Vlckova E, Smardova L, Bednarik J. 2020. CHEMOTHERAPY-INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY IN YOUNG ADULTS TREATED WITH VINCA-ALKALOIDS. *Neurology* **94**:3.
- Ramirez, Huestis, Yap, Zyzanski, Drotar, Kodish. 2009. Potential chemotherapy side effects: what do oncologists tell parents? *Pediatric blood & cancer* **52**.
- Roy M, Liang L, Xiao XJ, Feng PF, Ye M, Liu J. 2018. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **107**:615-624.
- Sabzehzari M, Zeinali M, Naghavi MR. 2020. Alternative sources and metabolic engineering of Taxol: Advances and future perspectives. *Biotechnology Advances* **43**:11.
- Saito T, et al. 2019. Early administration of galantamine from preplaque phase suppresses oxidative stress and improves cognitive behavior in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **145**:20-32.
- Sajadian S, Vatankhah M, Majdzadeh M, Kouhsari SM, Ghahremani MH, Ostad SN. 2015. Cell cycle arrest and apoptogenic properties of opium alkaloids noscapine and papaverine on breast cancer stem cells. *Toxicology Mechanisms and Methods* **25**:388-395.
- Schelz Z, Ocsosvzki I, Bozsity N, Hohmann J, Zupko I. 2016. Antiproliferative Effects of Various Furanoacridones Isolated from *Ruta graveolens* on Human Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Research* **36**:2751-2758.
- Schirmacher V. 2019. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology* **54**:407-419.
- Schrader KK, Avolio F, Andolfi A, Cimmino A, Evidente A. 2013. Ungeremine and Its Hemisynthesized Analogues as Bactericides against *Flavobacterium columnare*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:1179-1183.
- Sehgal R, Sheahan K, O'Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC. 2014. Lynch syndrome: an updated review. *Genes (Basel)* **5**:497-507.
- Shivaram K, Bhat JEE. 2015. Colorectal cancer: prevention and early diagnosis. Pages 295-298.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* **65**:5-29.
- Singh A, Menendez-Perdomo IM, Facchini PJ. 2019. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy: an update. *Phytochemistry Reviews* **18**:1457-1482.
- Singh AK, Kumar R, Pandey AK. 2018. Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers. Pages 9-26. *Curr Chem Genom Transl Med*.
- Sinicrope FA, et al. 2015. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* **148**:88-99.
- Sparano JA, et al. 2018. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **379**:111-121.
- Storz P. 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* **10**:1881-1896.
- Sung, Ferlay, Siegel, Laversanne, Soerjomataram, Jemal, Bray. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*.

- Swain SM, Honig SF, Tefft MC, Walton L. 1995. A phase II trial of paclitaxel (Taxol(R)) as first line treatment in advanced breast cancer. *Investigational New Drugs* **13**:217-222.
- Tatarinov YS. 1988. CITATION CLASSIC - DETECTION OF EMBRYO-SPECIFIC ALPHA-GLOBULIN IN THE BLOOD-SERUM OF A PATIENT WITH PRIMARY-CANCER OF THE LIVER. *Current Contents/Clinical Medicine*:14-14.
- Tárraga López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. 2014. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. Pages 33-46. *Clin Med Insights Gastroenterol*.
- Urban P, Bilecova-Rabajdova M, Stefekova Z, Ostro A, Marekova M. 2011. [Overview of potential oncomarkers for detection of early stages of ovarian cancer]. *Klin Onkol* **24**:106-111.
- van den Bergh RCN, Albertsen PC, Bangma CH, Freedland SJ, Graefen M, Vickers A, van der Poel HG. 2013. Timing of Curative Treatment for Prostate Cancer: A Systematic Review. *European Urology* **64**:204-215.
- Van Goietsenoven G, et al. 2010. Amaryllidaceae Alkaloids Belonging to Different Structural Subgroups Display Activity against Apoptosis-Resistant Cancer Cells. *Journal of Natural Products* **73**:1223-1227.
- Van Goietsenoven G, Mathieu V, Lefranc F, Kornienko A, Evidente A, Kiss R. 2013. Narciclasine as well as other Amaryllidaceae Isocarbostryrils are Promising GTP-ase Targeting Agents against Brain Cancers. *Medicinal Research Reviews* **33**:439-455.
- Visconti R, Della Monica R, Grieco D. 2016. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **35**:8.
- Wang, et al. 2016. A Series of β -Carboline Alkaloids from the Seeds of *Peganum harmala* Show G-Quadruplex Interactions. *Organic letters* **18**.
- Wang J, Feng Y, Huo H, Zhang X, Yue J, Zhang W, Yan Z, Jiao X. 2019. NLRP3 inflammasome mediates angiotensin II-induced islet beta cell apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*.
- Wang J, Gao HY, Liu GH, Gu L, Yang C, Zhang FM, Liu TB. 2018. Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8 expression as a predictor of prognosis and resistance in patients with advanced ovarian cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Human Pathology* **82**:239-248.
- Wasan HS, et al. 2017. First-line selective internal radiotherapy plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with liver metastases from colorectal cancer (FOXFIRE, SIFLOX, and FOXFIRE-Global): a combined analysis of three multicentre, randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncology* **18**:1159-1171.
- Waziri PM, Abdullah R, Yeap SK, Omar AR, Kassim NK, Malami I, How CW, Etti IC, Ladidi A. 2016. Clausenidin induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer. *Bmc Complementary and Alternative Medicine* **16**:12.
- Weaver BA. 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* **25**:2677-2681.
- Wink M, Ashour ML, El-Readi MZ. 2012. Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology* **3**:15.

- Wong MCS, et al. 2017. International incidence and mortality trends of liver cancer: a global profile. *Sci Rep*.
- Wyard S. 1925. THE NATURAL DURATION OF CANCER. *Br Med J* **1**:206-207.
- Yang J, et al. 2015. Golgi protein 73 as a biomarker for hepatocellular carcinoma: A diagnostic meta-analysis. Pages 1413-1420. *Exp Ther Med*.
- Yoo J, Lee MW, Lee DH, Lee JH, Han JK. 2020. Evaluation of a serum tumour marker-based recurrence prediction model after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Liver International* **40**:1189-1200.
- Yuan J, Zhang F, Niu RF. 2015. Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. *Scientific Reports* **5**:10.
- Zafar SN, Siddiqui AH, Channa R, Ahmed S, Javed AA, Bafford A. 2019. Estimating the Global Demand and Delivery of Cancer Surgery. *World Journal of Surgery* **43**:2203-2210.
- Zeng H, Fu R, Yan LX, Huang J. 2017. Lycorine Induces Apoptosis of A549 Cells via AMPK-Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-S6K Signaling Pathway. *Medical Science Monitor* **23**:2035-2041.
- Zhan GQ, et al. 2016. Galanthamine, Plicamine, and Secoplicamine Alkaloids from *Zephyranthes candida* and Their Anti-acetylcholinesterase and Anti-inflammatory Activities. *Journal of Natural Products* **79**:760-766.
- Zhang B, et al. 2014. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **513**:382-387.
- Zhang Y, Yang SH, Guo XL. 2017. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **96**:659-666.
- Zhao J, et al. 2021. Risk factors of pleural effusion after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in late-stage and recurrent ovarian cancer. *Annals of Palliative Medicine* **10**:385-391.
- Zheng L, Wang XL, Luo WJ, Zhan YZ, Zhang YM. 2013. Brucine, an effective natural compound derived from *nux-vomica*, induces G1 phase arrest and apoptosis in LoVo cells. *Food and Chemical Toxicology* **58**:332-339.
- Zhong Jin X-HX. 2020. *Amaryllidaceae Alkaloids* | SpringerLink.
- Zhu HJ, Gooderham NJ. 2006. Mechanisms of induction of cell cycle arrest and cell death by cryptolepine in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Toxicological Sciences* **91**:132-139.

Zkratky

$\alpha 7$ nACh – nikotinový acetylcholinový receptor $\alpha 7$
A – andreceum, tyčinky
ACh - acetylcholinu
AChE - acetylcholinesterázy
AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného imunodeficitu
ATP - adenosin trifosfát
BMI – body mass index, index tělesné hmotnosti
DKP - Des-y-karboxyprothrombin
DMEM - Dulbecco Modified Egles Medium
DMSO - Dimethylsulfoxid
DNA - deoxyribonukleotid acid, Deoxyribonukleová kyselina
DR4- death receptor 4, receptor smrti 4
ECACC - European Collection of Cell Culture
EGF - epidermálního růstového faktoru
FBS - fetálního bovinního séra
FIT - fekální imunochemické testy hemoglobinu, fecal immunochemical test
FNN-a - faktoru nádorové nekrosy
FOBT - fekální okultní krevní testy, fecal occult blood test
G – gyneceum, pestíky
HAD – haemanthidin
HAE – haemanthamin
HBC – vir hepatitidy C
HBV – vir hepatitidy B
HCK – hepatocelulární karcinom
ChAT - cholinacetyltransferázy
IARC - International Agency for Research on Cancer, Mezinárodní agentura pro výzkum nádorových onemocnění
IC50 – inhibiční koncentrace, která způsobí úmrtí 50 % buněk
IL-1B - interleukinu typu 1B
IL-6 – interleukin typu 6
KK – kolorektální karcinom
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
nAChR - nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR)
NF- κ B – nukleární faktor kappa B
P – perigon, okvěti
PARP - (poly (ADP-ribóza) polymeráza)
PBS - Phosphate Buffer Saline, fosfátový pufr
RNA - ribonukleová kyselina
RNS - reactive nitrogen species, reaktivní formy dusíku
ROS - reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SD – směrodatná odchylka
 $\alpha 7$ nACh – nikotinový acetylcholinový receptor $\alpha 7$