

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



***In vitro* anti-proliferační aktivita alkaloidů čeledi
*Amaryllidaceae***

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kristýna Panenková

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

Konzultant: Ing. Ivo Doskočil

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „*In vitro* anti-proliferační aktivita alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*“ jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi za rady při zpracování teoretické části a odborné vedení při části výzkumné. Mé poděkování patří také Světlaně Panenkové, Ivaně Pilařové a Liboru Pilařovi za podporu, Lucii Lhotské za cenné rady a zejména Ondřeji Pilařovi za podporu a péči při zpracování této práce.

***In vitro* anti-proliferační aktivita alkaloidů čeledi**

Amaryllidaceae

Souhrn

Přírodní fytochemikálie jsou v současné době využívány při léčbě mnoha onemocnění. Nádorová onemocnění jsou právě jedním z nich a jsou řazena mezi ta nejčastější a zároveň nejzávažnější. Fytochemikálie v podobě cytostatik jsou využívány při chemoterapeutické léčbě nádorových onemocnění. Mezi cytostatika by do budoucna mohly být řazeny také některé alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* (Amarylkovité), jejichž testování na selektivní cytostatický účinek na nádorové buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 a na normální buněčné linie lidského střevního epitelu FHs 74 Int je předmětem této práce.

Celkem bylo testováno 17 alkaloidů izolovaných z rostlin *Chlidanthus fragrans*, *Zephyranthes robusta* a *Nerine bowdenii*. Významnou anti-proliferační aktivitu prokázaly zejména alkaloidy z rostliny *Zephyranthes robusta* a to konkrétně haemanthamin s hodnotami $IC_{50} = 0,99 \pm 0,14 \mu\text{M}$ pro nádorové buňky Caco-2, $0,59 \pm 0,01 \mu\text{M}$ pro nádorové buňky HT-29 a $19,47 \pm 8,86 \mu\text{M}$ pro normální buňky FHs 74 Int, lykorin s hodnotami $IC_{50} = 0,99 \pm 0,08 \mu\text{M}$ pro nádorové buňky Caco-2, $1,2 \pm 0,01 \mu\text{M}$ pro nádorové buňky HT-29 a $22,68 \pm 0,09 \mu\text{M}$ pro normální buňky FHs 74 Int a haemanthidin s hodnotami $IC_{50} = 3,29 \pm 0,91 \mu\text{M}$ pro nádorové buňky Caco-2, $1,72 \pm 0,11 \mu\text{M}$ pro nádorové buňky HT-29 a $11,63 \pm 0,86 \mu\text{M}$ pro normální buňky FHs 74 Int.

Z těchto výsledků je patrná selektivita vůči buněčným liniím kolorektálního karcinomu. Z tohoto důvodu jsou tyto testované alkaloidy vhodné k dalšímu testování a studiu jejich biologické aktivity vůči nádorovým buňkám v podmínkách *in vitro* i *in vivo*.

Klíčová slova: alkaloidy, *Amaryllidaceae*, cytotoxicita, buněčné linie, Caco-2, HT-29, FHs 74 Int

In vitro* anti-proliferation activity alkaloids the *Amaryllidaceae

Summary

Natural phytochemicals are currently used in the treatment of many diseases. Cancers are just ones of them and they are ranked among the most common and the most serious. Phytochemicals in the form of cytostatics are used in chemotherapeutic treatment of cancer. In future there could be included among cytostatics also some alkaloids from the family of *Amaryllidaceae*, whose testing for a selective cytostatic effect on tumor cell lines of colorectal carcinoma Caco-2 and HT-29 and on normal cell lines of human intestinal epithelial FHs 74 Int is a subject of this thesis.

There were tested 17 alkaloids isolated from plants of *Chlidanthus fragrans*, *Zephyranthes robusta* and *Nerine bowdenii*. Particularly alkaloids from plant *Zephyranthes robusta* namely haemanthamine with this values: $IC_{50} = 0.99 \pm 0.14 \mu\text{M}$ for tumor cells, Caco-2, $0.59 \pm 0.01 \mu\text{M}$ for tumor cells HT-29 and $19.47 \pm 8.86 \mu\text{M}$ for normal cells FHs 74 Int, Lycorine with values $IC_{50} = 0.99 \pm 0.08 \mu\text{M}$ for tumor cells Caco-2, $1.2 \pm 0.01 \mu\text{M}$ for tumor cells HT-29 and $22.68 \pm 0.09 \mu\text{M}$ for normal cells FHs 74 Int and Haemanthidin with values $IC_{50} = 3.29 \pm 0.91 \mu\text{M}$ to tumor cells Caco-2, $1.72 \pm 0.11 \mu\text{M}$ to tumor cells HT-29, and $11.63 \pm 0.86 \mu\text{M}$ for normal cells FHs 74 Int proved a significant anti-proliferative activity.

From these results there is evident the selectivity against colorectal cancer cell lines. For this reason, those tested alkaloids are suitable for further testing and for study of their biological activity against tumor cells in the terms of *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Alkaloids, *Amaryllidaceae*, cytotoxicity, cell line, Caco-2, HT-29, FHs 74Int

Seznam použitých zkratk:

AML	Acute myeloid leukemia
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DRs	Death receptors
EMT	Epiteliálně-mezenchymální tranzice
FBS	Fetální bovinní sérum
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IARC	International Agency for Research on Cancer
LDL	Low-density lipoprotein
MTT	Methylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PBS	Phosphate buffer saline
PCa	Prostate cancer
RFA	Radiofrekvenční ablace
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
TNF	Tumor necrosis factor
WHO	World Health Organisation

1 Obsah

1	Obsah	7
2	Úvod	9
3	Cíl práce.....	10
3.1	Hypotéza	10
4	Literární rešerše.....	11
4.1	Volné radikály a antioxidanty	11
4.1.1	Oxidační stres a lidské zdraví	11
4.1.2	Ateroskleróza	12
4.1.3	Diabetes mellitus.....	12
4.1.4	Zánětlivá onemocnění střev	13
4.1.5	Nádorová onemocnění	13
4.2	Nádorová onemocnění tlustého střeva	16
4.3	Buněčná smrt.....	17
4.3.1	Nekróza	17
4.3.2	Apoptóza	18
4.4	Historie léčby nádorových onemocnění	19
4.5	Léčba nádorových onemocnění v současnosti	22
4.5.1	Chirurgické odstranění nádoru.....	22
4.5.2	Radioterapie	22
4.5.3	Chemoterapie	23
4.5.4	Fytochemikálie jako součást léčby	26
4.6	Alkaloidy a jejich význam v anti-proliferační aktivitě	27
4.6.1	Vinca alkaloidy	28
4.6.2	Alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	30
4.7	<i>Amaryllidaceae</i>	34
4.7.1	<i>Chlidanthus Fragrans</i>	34

4.7.2	<i>Zephyranthes robusta</i>	35
4.7.3	<i>Nerine bowdenii</i>	35
5	Materiál a metodika	36
5.1	Materiál	36
5.1.1	Caco-2	36
5.1.2	HT-29	37
5.1.3	Normální střevní buňky FHs 74 Int	37
5.1.4	Extrahované alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	38
6	Metodika	42
6.1	Kultivace buněčných tkání Caco-2, HT-29, FHs 74 Int.....	42
6.2	Izolace testovaných alkaloidů	43
6.3	Test cytotoxicity (MTT).....	43
7	Statistické vyhodnocení výsledků	45
8	Výsledky	46
9	Diskuze	50
10	Závěr	54
11	Seznam použité literatury	55
	Seznam tabulek	66
	Seznam grafů	67

2 Úvod

I přes značné pokroky v medicíně patří nádorová onemocnění mezi jednu z hlavních příčin úmrtí v lidské populaci 21. století. Ročně je diagnostikováno přes 14 milionů případů různých druhů nádorových onemocnění. Do roku 2025 toto číslo podle WHO vzroste až na 19 milionů diagnostikovaných ročně. V České republice onemocní některým typem nádorového onemocnění každý třetí obyvatel a každý čtvrtý na toto onemocnění i umírá.

Konvenční léčba nádorového onemocnění spočívá v operativním odstranění nádorové tkáně. Tato metoda však nemusí vést k odstranění veškeré poškozené tkáně. V takovém případě je využívána radioterapie nebo chemoterapie, u kterých je nejčastěji využito fytochemikálií s léčebnými biologickými účinky. Ty inhibují buněčné dělení tím, že zabraňují vzniku dělicího vřeténka. Mezi nejznámější a nejčastěji využívané fytochemikálie patří bezesporu vinca-alkaloidy obsažené v rostlinách rodu *Vinca Rosea* (Barvínek lékařský) nebo v rostlině *Catharanthus roseus* (Katarantus růžový), obsahující více než 70 různých alkaloidů, a mnoha dalších rostlinách.

Skupinou látek, kterým je poslední dobou věnována vědecká pozornost, jsou alkaloidy obsažené v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae*. Ty jsou známé díky svému obsahu jedinečných alkaloidů s velkou strukturální rozmanitostí. Do současné doby bylo izolováno okolo 500 rozdílných alkaloidů, patřících do této čeledi. Z doposud testovaných a vyzkoušených alkaloidů je nejznámějším galanthamin. Ten je schválený k léčbě Alzheimerovy choroby, u které blokuje receptory nikotin acetylcholinu a pankratiatin s protinádorovou aktivitou. Testování alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* na anti-proliferační aktivitu je předmětem této práce.

3 Cíl práce

Cílem práce je testování alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* na jejich možnou anti-proliferační aktivitu *in vitro* pomocí buněčných modelů kolorektálního karcinomu buněčné linie Caco-2 a HT-29. A dále testování normálních střevních buněk buněčné linie FHs 74 Int.

3.1 Hypotéza

Hypotézou je, že mezi doposud netestovanými alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae* by mohl figurovat jeden, případně více alkaloidů, mající anti-proliferační účinek na rakovinné buňky *in vitro* a byly by tak vhodné pro další testování.

4 Literární rešerše

4.1 Volné radikály a antioxidanty

Z chemického pohledu se za volné radikály považuje jakákoliv vysoce reaktivní molekula, atom či iont s jedním nebo více nepárovými elektrony ve valenčním obalu, který je schopen samostatné existence a dovede vytvářet řetězové reakce (Heunks and Dekhuijzen, 2000, Kasper and Burghardt, 2015). Základní formy volných radikálů jsou volné kyslíkové radikály (Reactive oxygen species; ROS) a volné dusíkové radikály (Reactive nitrogen species; RNS). Mezi volné radikály patří taktéž hydroxylový radikál, oxid dusnatý (NO) (Halliwell and Gutteridge, 2015, Fang et al., 2002). Jako volné radikály působí i singletový kyslík, peroxid vodíku a kyselina chlorná (Pietta, 2000).

Bylo zjištěno, že oxidace je důležitou součástí biologických procesů, včetně oxidační fosforylace v mitochondriích, buněčné signalizace, fagocytózy a dalších. Na těchto činnostech se podílejí enzymy (patří sem např. hydrogen nikotinamid adenin nukleotid fosfát (NADPH) oxidáza, xantin oxidáza, cyklooxygenáza, nebo endoteliální syntéza NO, které katalyzují vznik volných radikálů (Li et al., 2014). Volné radikály mohou snadno zahájit peroxidaci membránových lipidů, nebo se na ní podílejí, což vede k akumulaci peroxidů lipidů (Elmastaş et al., 2006, Gülçin, 2010). Jsou také schopny poškozovat důležité biomolekuly, jako jsou proteiny, lipidy nebo nukleové kyseliny. Poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA) může vést až k mutaci (Halliwell and Gutteridge, 1990). I přesto, že volné radikály způsobují buněčné poškození, jsou v mnoha biologických reakcích, jak už bylo uvedeno, nepostradatelné. K zabránění jejich negativních projevů je proto třeba, aby byly udrženy rovnováze prostřednictvím tzv. antioxidantů (Halliwell and Gutteridge, 2015).

4.1.1 Oxidační stres a lidské zdraví

Negativní působení volných radikálů je označováno jako oxidační stres (Valko et al., 2007). Účinky oxidačního stresu jsou náhodné povahy. Do dnešní doby bylo zaznamenáno okolo 150 různých poruch lidského zdraví a specifických onemocnění, které byly částečně zapříčiněny oxidačním stresem, nebo ve kterých hrál oxidační stres primární roli v jejich vzniku (MacLean et al., 1992; Halliwell, 1994; (Yan et al., 2013, Li et al., 2013). Oxidační

stres je faktorem pro vznik aterosklerózy, kdy dochází k produkci ROS, v endoteliální hladké svalovině a v buňkách adventicie (Cai and Harrison, 2000).

Vzhledem k významu, majícím ROS u cévních onemocnění, vznikl značný zájem o jejich enzymatické zdroje, které zprostředkovávají produkci volných radikálů v cévních tkáních. Zdá se, že významnou úlohu zde hraje xantin oxidáza, NADPH, mitochondriální zdroje a syntéza NO (Ohara et al., 1993; White et al., 1996; Griending et al., 2000; Ballinger et al., 2002; Laursen et al. 2001).

Oxidační stres ale také často vzniká jako důsledek onemocnění, kdy dochází ke zvýšené produkci ROS a RNS (Rahal et al., 2014). Podle současných názorů hraje oxidační stres významnou roli v etiopatogenezi onemocnění, jako jsou ateroskleróza, diabetes mellitus 1. i 2. typu, zánětlivá onemocnění střev jako je Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, nebo rakovina (Kasper and Burghardt, 2015; Žák et al., 2011; Spitz et al., 2004).

4.1.2 **Ateroskleróza**

Pojmem ateroskleróza rozumíme cévní onemocnění, pro něž je charakteristické zesílení cévní stěny v důsledku ukládání nízkodenzitního lipoproteinu (Low-density lipoprotein; LDL), následkem čehož dochází k postupnému zamezení průtoku krve. Omezený přístup krve postihuje zejména mozek a srdce a může tak dojít k infarktu myokardu nebo mrtvici. Za následek ale může mít i gangrény končetin (Ross, 1993). Možnosti prevence a léčby spočívají ve snížení LDL, kdy snížení hladiny LDL už o 1 mmol/l snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a dochází také ke snížení oxidace fosfolipidů (Cholesterol Treatment Trialists; Navab et al., 2004).

4.1.3 **Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus (DM) je heterogenní skupinou chronických onemocnění, jejichž společným základním rysem je hyperglykemie. Podkladem je absolutní nebo relativní nedostatek inzulínu, který má za následek komplexní poruchu metabolismu sacharidů, lipidů a bílkovin (Souček et al., 2005). Diabetes mellitus je rozdělován na diabetes mellitus 1. a 2. typu. Pro DM 1. typu je charakteristický rychle probíhající zánik B-buněk, který vede

k absolutnímu nedostatku inzulínu, což podmiňuje nutnost jeho substituce. DM 2. typu je zase charakterizován kombinací tkáňové inzulínové rezistence a porušené sekrece inzulínu, přičemž kvalitativní podíl obou poruch může být rozdílný (Rybka, 2007).

Diabetes mellitus (DM) je onemocnění, které je charakterizováno zvýšeným oxidačním stresem. Ten hraje významnou roli v jeho etiopatogenezi a má klíčový význam pro vznik a rozvoj diabetických komplikací. U DM je známo několik pramenů zvýšeného oxidačního stresu: 1. neenzymové zdroje, tj. zejména hyperglykémie, 2. zdroje enzymové, kde vznikají RONS v důsledku enzymů, hlavně NAD(P)H oxidázy, xantinoxidázy acyklooxygenázy a 3. mitochondriální elektronový řetězec v průběhu oxidativní fosforylace (Žák et al., 2011).

4.1.4 Zánětlivá onemocnění střev

Mezi zánětlivá onemocnění střev řadíme ulcerózní kolitida a Crohnovu nemoc. Obě tyto nemoci se vyznačují chronickou a recidivující imunitní aktivací a záněty v gastrointestinálním traktu. Obecně je zánětlivé onemocnění střev způsobeno dysfunkcí imunitního systému v gastrointestinálním traktu a je doprovázeno pronikáním zánětu do střevní sliznice (Brandtzaeg et al.). Avšak konkrétní cesty, jak toto buněčné poškození vzniká, doposud nejsou známy. Bylo potvrzeno, že určitou roli ve vzniku zánětlivých onemocnění střev mají ROS. Právě oxidační stres, je proto považován za spouštěč těchto zánětlivých onemocnění (Spitz et al., 2004). To potvrdily i studie, které prokázaly zvýšenou tvorbu ROS a RNS, včetně superoxidů, peroxid vodíku a dalších, ve sliznici tlustého střeva u zvířecích modelů (Pavlick et al., 2002, Tanida et al., 2011).

4.1.5 Nádorová onemocnění

Onkologická onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích a zvýšení jejich prevalence je pravděpodobně nevyhnutelné. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC), která je součástí Světové zdravotnické organizace (WHO), očekává zvýšení výskytu rakoviny ve vyspělých zemích do roku 2030 o více než 75 % (Doskočil et al., 2015). V České Republice v roce 2010 zemřelo na zhoubné novotvary 15 667 mužů a 12 167 žen. Nových případů bylo nahlášeno celkem 82 606. Z tohoto

celkového počtu nových případů převažuje vznik novotvarů u mužů, u kterých bylo zaznamenáno 42 933 případů. U žen bylo zaznamenáno 39 673 případů (Dienstbier and Skala, 2014).

Rakovina je genetická porucha, pro niž je charakteristická nadměrná buněčná proliferace. K této genetické poruše zpravidla dochází v jediné buňce, jež prošla několika buněčnými děleními s mutacemi (Nowell, 1976). Během dělení je genetická informace obsažena v buňce změněna. K těmto změnám dochází náhodně, jednorázově působením jedné či více škodlivin, nebo na základě zděděné změny genetické informace (Bertram, 2000; Dienstbier and Skala, 2014). Ke spontánnímu poškození genu dochází vzácně, většinou totiž vzniká působením četných zevních faktorů – tzv. mutagenů, resp. kancerogenů. Mezi kancerogenní faktory řadíme fyzikální (ionizující a ultrafialové záření), chemické (azobarviva, arzen, cigaretový kouř, alkohol) a biologické (viry, bakterie) faktory (Dienstbier and Stáhalová, 2012). Způsobené genetické modifikace způsobují nečinnost signálních drah, které regulují buněčné dělení. Tato mutace může vést až k samovolné proliferaci a rakovině (Kufe et al., 2003). Odhaduje se, že je třeba 6 buněčných dělení ke vzniku nádorů (Cho and Vogelstein, 1992).

Vznik a růst nádoru má několik stádií. Počáteční změna, v rámci které probíhá prvotní nádorová transformace buňky, je označována jako stadium iniciace. Zahájení dělení této buňky je označováno jako stadium promoce a třetím stadiem - stadiem růstu nádoru, je progrese (Vokurka et al., 2014). Nádory rostou zpočátku v místě svého vzniku (Abrahámová et al., 2000). Jakmile se jedna nádorově transformovaná buňka začne opakovaně dělit, vzniká klon nádorových buněk. Počet nádorových buněk by byl, v ideálním případě, navyšován geometrickou řadou (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, atd.). Při generační době 12 hodin by tak nádor, vážící jeden kilogram, vznikl asi za dvacet dnů. Růst nádoru je ale obvykle výrazně pomalejší. Je zpomalován především potřebou výživy a dodávky kyslíku (Vokurka et al., 2014). Růst nádorových buněk ale není ovlivněn pouze autonomní a neregulovatelnou proliferací, ale velmi významným faktorem je též inhibice programované smrti – apoptózy, která u některých typů nádorových onemocnění hraje dokonce významnější úlohu než vystupňovaná proliferace (Klener and Klener, 2013). Stimulace růstu může být také následkem působení specifických růstových faktorů nebo hormonů. Velký význam má ve stadiu progrese také vytvoření cévního zásobení v procesu zvaném nádorová angiogeneze (Vokurka et al., 2014). Nádory se ve finální fázi mohou prorůst do okolních

orgánů, šířit se lymfatickými cestami do uzlin nebo proniknout do krve a krevním oběhem se šířit do vzdálených orgánů, kde mohou zakládat dceřiná ložiska – metastázy (Abrahámová et al., 2000).

4.2 Nádorová onemocnění tlustého střeva

Přibližně pětina ze všech zhoubných nádorů (druhů rakoviny) u člověka vzniká v trávicím ústrojí. Rakovina tlustého střeva, spolu s rakovinou esovité kličky – sigmoidea, rekta a řitního kanálu je třetím nejčastějším nádorem u mužů, po rakovině plic a prostaty a čtvrtým u žen. V naprosté většině se jedná o kolorektální karcinom, tedy karcinom v přímé oblasti mezi esovitou kličkou a řitním kanálem (Skala, 2015).

Vznik kolorektálního karcinomu je ve většině případů důsledkem komplexního působení faktorů nesprávného životního stylu. K nim je řazen nadbytek tuků v potravě, nevhodná forma přípravy masa (uzení, grilování, smažení), kouření, konzumace alkoholu, nebo nedostatek zeleniny a ovoce v jídelníčku. Geneticky podmíněný vznik rakoviny tohoto typu činí pouze asi 5 % nádorů (Dienstbier and Stáhalová, 2012). Zvýšené riziko vzniká u jedinců, u jejichž pokrevních příbuzných se vyskytlo onemocnění zhoubným nádorem tlustého střeva nebo konečníku, případně i jiné další nádory. Nádory tlustého střeva a konečníku mohou mít také původ v jiných nezhooubných onemocněních, lokalizovaných do této oblasti (Abrahámová et al., 2000).

Z benigních nádorů se v tlustém střevě vyskytují polypózní adenomy (adenomatózní polypy), které se zde vyskytují v mnohem větší míře než v tenkém střevě nebo žaludku. Jejich velikost může být různá. V současné době endoskopické vyšetření odhalí i velmi malé, tzv. přisedlé (sesilní) polypy (Mačák and Mačáková, 2004). Polypózní adenomy obvykle nejsou větší než několik milimetrů, jsou rozesety po výstelce tlustého střeva buď jednotlivě, nebo v celých polích, kde jich může být značné množství. Jejich množství stoupá s přibývajícím věkem. U osob běžné populace (tj. bez zvýšeného rizika vzniku tohoto nádoru) se vyskytují v 33 % u 50letých a v 50 % u 70letých osob. Tyto polypózní adenomy se, pokud nejsou odstraněny, mohou později přeměnit ve zhoubný nádor. Vyšší výskyt kolorektálního karcinomu je také u osob trpících Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou (Abrahámová et al., 2000).

Mezi projevy karcinomu tlustého střeva jsou řazeny krevní ztráty (enteroragie, anémie, okultní krvácení), změna rytmu vyprazdňování, dyskomfort, nadýmání, subileus, ileus, nechutenství, slabost, hmotnostní úbytek a hmatná rezistence v břiše (Lukáš, 2005).

4.3 Buněčná smrt

Smrt je na úrovni buněčné i v průběhu plnohodnotného života celého organismu naprosto běžným jevem (Kuchynka et al., 2007). Buněčná smrt je nedílnou součástí různých biologických procesů, u mnohobuněčných organismů se vyskytuje jako běžný proces v celé řadě vývojových a homeostatických kontextů. Představuje včasný a vhodný osud pro mnoho, nebo dokonce většinu buněk vzniklých v některých orgánových systémech. Tímto procesem je určena velikost, vzorování a funkce mnoha tkání (Stanger, 1996; Zakeri and Ahuja, 1997).

Buněčná smrt se vyskytuje spontánně, nebo v reakci na vnější podněty, a lze ji do značné míry dělit podle jejich morfologických a biochemických funkcí na apoptózu a nekrózu (Cho et al., 2010).

4.3.1 Nekróza

Nekróza byla, na rozdíl od apoptózy, definována jako pasivní a nechtěný zánik buněk, k němuž došlo neuspořádaně a neregulovaně. Na rozdíl od apoptózy má nekróza odlišné morfologické znaky a je doprovázena rychlou permeabilitou plasmatické membrány (Cho et al., 2010). Nejčasnější známky nekrózy buňky se projevují na buněčných organelách (Mačák and Mačáková, 2004). Je vyvolávána většinou toxickým, tepelným či mechanickým zevním vlivem, který vyvolává rozvrat iontové intracelulární homeostázy, což vede k dilataci endoplazmatického retikula, poškození mitochondrií, zduření buňky a posléze k ruptuře plasmatické membrány a definitivnímu zániku buňky (Otomar et al., 2011). Smrt buňky se ale projevuje také změnami jádra. Zmenšení jádra a zhuštění chromatinu je označováno jako pyknóza, jeho rozpad na drobné fragmenty se nazývá karyorexe či karyorrhesis a rozpuštění jádra je označováno jako karyolýza (Mačák and Mačáková, 2004).

Některá data ukazují, že na rozdíl od nekrózy způsobené velmi extrémními podmínkami, existuje mnoho případů, kdy tato forma buněčné smrti může být normální fyziologická a regulovaná, eventuálně mohou různé podněty (ischemie, teplo, ozáření aj.) vyvolat u stejné buněčné populace současně apoptózu i nekrózu, případně může za určitých podmínek představovat dobře zorganizovaný záložní mechanismus apoptózy (Proskuryakov et al., 2003; Cho et al., 2010).

4.3.2 Apoptóza

Buňky mnohobuněčného organismu jsou součástí vysoce organizovaného systému. Počet buněk v tomto systému je přísně regulován, nejen pouze řízením rychlosti buněčného dělení, ale také řízením rychlosti buněčné smrti. Pokud již buňky nejsou potřebné, samy sebe usmrtí aktivací intracelulárního programu smrti. Tento proces se proto nazývá programovaná buněčná smrt, ačkoli je více známá jako apoptóza (Alberts et al., 2002). Apoptóza hraje důležitou roli při fyziologické kontrole růstu i při homeostáze. Může být spuštěna takzvanými receptory smrti (DRs) bez jakýchkoliv nežádoucích účinků. DRs jsou členy faktoru nádorové nekrózy (TNF), superrodiny receptorů, známé svým zapojením v signalizaci apoptózy, nezávislé na p53 tumor supresorovém genu (Mahmood and Shukla, 2010).

Tumor supresorový gen p53/TP53, respektive jeho produkt – p53 transkripční faktor, je klíčový a nezastupitelný mediátor a částečně i efektor indukce apoptózy v odpovědi na signály genotoxického stresu (poškození DNA) a onkogenní signalizace (aberrantní itogenní stimuly) (Klener and Klener, 2010). Jeho inaktivace je nezbytná pro tvorbu většiny lidských nádorů. Tato skutečnost učinila p53 cenným cílem pro základní i aplikovaný výzkum (Vogelstein et al., 2010).

Pokusy ovlivnit přirozený jev programované buněčné smrti pramení ze skutečnosti, že je redukována (u rakoviny), nebo zvýšena (u neurodegenerativních chorob) při mnohých klinických stavech. Proto by chemikálie, kterými by mohla být modifikována programovaná buněčná smrt, mohly být potenciálně vhodnými léčivými (Thatte et al., 2000).

4.4 Historie léčby nádorových onemocnění

Z biologického hlediska představuje rakovina abnormální růst buněk, které díky postupné akumulaci defektů v jejich DNA překonávají inhibiční kontrolní body našeho těla. Na základě tohoto neoddělitelného spojení s naším genomem je rakovina jako nemoc patrně stejně stará jako existence našeho druhu (Tiwari and Roy, 2011). Nejstarší písemné zmínky o rakovině byly ale nalezeny v egyptském papyru Edwina Smithe, datovaného do cca 3000 př. n. l., a papyru George Eberse, napsaným cca 1500 let př. n. l., objevenými v 19. století (Tiwari and Roy, 2011; Faguet 2014). Ebersův papyrus obsahuje první zmínky o nádorech měkkých tkání a lipomech, a zahrnuje také odkazy na možné rakoviny kůže, dělohy, žaludku a rekta. Léčbu prováděli Egypťané za pomoci kauterizace, nožů, soli a také arzenové pasty, tzv. egyptské masti. Sumerové, Číňané, Indové, Peršané a Hebrejci byli v té době nakloněni spíše léčbě bylinnými přípravky, jako jsou čaje, ovocné šťávy, fíky a vařené zeli. V pokročilém stádiu nemoci byla ale využívána pasta obsahující železo, měď, síru a rtuť (Hajdu, 2011).

V Řecko - Římské popsal Hippokrates z Kósu ve svém díle Corpus Hippocraticum nemoci produkující hmotu, tzv. onkos a slovo karkinos, popisující vředovité a nehojící se hrudky. Léčba byla dělena podle závažnosti onemocnění na dietu a odpočinek pro mírná onemocnění a projímadla, těžké kovy a operace pro onemocnění závažná (Faguet 2014). Aulus Celsus zase ve své De Medicina popsal několik druhů povrchové rakoviny, ale také rakoviny viscerálních a parenchymálních orgánů, jako je žaludek, tlusté střevo, játra nebo slezina. U rakoviny doporučoval rychlou a agresivní chirurgickou léčbu (Hajdu, 2011). Galén, Hippokratův nejvýznamnější nástupce, jako první rozeznal arteriální a žilní krev, klasifikoval hrudky a výrůstky do kategorií od nejvíce benigní až po ty maligní, popsal 4 převažující tělní tekutiny (žluč, krev, hlen a černá žluč) a vznik rakoviny popsal jako důsledek nadbytku černé žluči v různých částech těla. Galénovy a Hippokratovy zásady se staly základem všech lékařských znalostí pro dalších 1500 let (Faguet 2014).

V 16. století Andreas Vesalius, posedlý Galenovými spisy a myšlenkami, začal jako první vytvářet přesné anatomické mapy lidského těla a při pitvách narazil také na všechny Galénovy typy tělních tekutin, kromě černé žluči, jejíž existenci vyvrátil. Vyvrátil tak i teorii o vzniku nádorů v důsledku jejího hromadění (Gutkind and Kennedy, 2013). Ne však úplně. Jako lokalizovaný projev nadměrné černé žluči, způsobenou melancholií, vnímali někteří lidé rakovinu ještě dokonce i v tak nedávné době, jakou je 19. století (Tiwari and Roy, 2011).

V Evropě během 18. století přispěla k vědeckému poznání rakoviny řada jednotlivců. Claude Gedron, lékař královské rodiny ve Francii, pohlížel na rakovinu jako na lokální, nikoli systémové onemocnění, k jehož léčbě prosazoval chirurgické odstranění. Rozsáhlejší chirurgický zákrok, jako je odstranění regionálních lymfatických uzlin, prosazovali Francouzští chirurgové Henry Le Dran a Jean Louis Petit. Ti také odsoudili dosud používané kaustické masti jako neúčinné (Olson, 1989).

Rakovina byla ale považována za nevléčitelnou až do konce 19. Století (Tiwari and Roy, 2011). V průběhu 20. století začala být rakovina dávána do spojitosti s populační expozicí tabáku, se stravou, s chemikáliemi v prostředí a dalšími exogenními faktory. Po opakovaném potvrzení těchto spojení byla poprvé zvažena možnost, že rakovině, tak jako mnohým infekčním onemocněním té doby, může být zabráněno. První zásadní průlom v identifikaci ovlivnitelných rizikových faktorů rakoviny byla dokumentace spojení rakoviny plic s kouřením tabáku (Greenwald and Dunn, 2009). Porovnání významných milníků v poznání rakoviny a světové historických milníků je zaznamenáno v Tabulce 1.

Výskyt rakoviny se výrazně zvýšil v posledních desetiletích a to v souvislosti s rychle stárnoucí populací a, zejména v uplynulém půlstoletí, se zdravím ohrožujícím chování běžné populace a zvýšenému výskytu karcinogenů ve spotřebitelských výrobcích a v životním prostředí (Faguet 2014).

Tabulka 1: Časové porovnání poznatků o rakovině s historickými milníky

Rok	Historie v medicíně	Rok	Světová historie
3000 př. n. l.	Popsána rakovina prsu	3000 př. n. l.	Stavba Stonehenge
1500 př. n. l.	Rostlinná a minerální terapie a arzenoterapie; popsán tumor měkkých tkání	1500 př. n. l.	Zajetí Židů v Egyptě
375 př. n. l.	Zavedení pojmů rakovina, karcinom, scirrhus a condyloma; povědomí o rakovině kůže, úst, žaludku a prsu; léčba kauterizací	377 př. n. l.	Stavba hradeb okolo Říma
50 n. l.	Chirurgická léčba rakoviny; rakovina prsu v podpaží, lymfédém ramene, rakovina jater, tlustého střeva a sleziny; rozdělení rakoviny na povrchovou a hlubokou; neoperabilní rakovina léčena směsí medu, vaječných bílků a zelí	43 n. l.	Římská invaze do Británie
79 n. l.	Bylinné či jiné prostředky k vnitřnímu užití před a po operaci; vydána kniha o léčivech	68 n. l.	Sebevražda císaře Nera
138 n. l.	Ulcerózní a neulcerózní rakovina dělohy	132 n. l.	Vynález seismografu v Číně.
200 n. l.	Zavedení pojmu sarkom, žlutá a černá žluč a humorální teorie; první lékárna v Římě	200 n. l.	Afghánistán napaden kmenem Hunů
403 n. l.	Identifikována nekróza u rakoviny	403 n. l.	Itálie napadena Vizigóty
562 n. l.	Popsána rakovina děložního čípku, vulvy a konečníku; masektomie	571 n. l.	Narození proroka Mohammeda
690 n. l.	Popsána rakovina střeva; bezbolestnost rakoviny	691 n. l.	Dokončena stavba Skalního dómu
932 n. l.	Obstrukce žlučových cest a střeva	933 n. l.	Araby založen Alžír
1037 n. l.	Polypektomie drátěnou smyčkou	1023 n. l.	V Číně vytištěny první papírové bankovky
1080 n. l.	Lékařská škola ve městech Salerno a Montpellier	1066 n. l.	Ovládnutí Anglie Normany
1106 n. l.	Pouštění žilou před chirurgickým zákrokem; neprováděny extenzivní zákroky	1110 n. l.	Založena univerzita v Paříži
1163 n. l.	Rakovina jícnu; ezofageální kanyla v případě striktury jícnu pro podávání výživy; rektální obstrukce; hysterektomie	1149 n. l.	Založena univerzita v Oxfordu
1163 n. l.	Holistická léčba	1163 n. l.	Postaven Notre Dame v Paříži
1215 n. l.	Papež zakazuje operace	1215 n. l.	Magna charta
1296 n. l.	Rakovina lokálně invazivní, široká excize, rakovina nosohltanu; lividní nádory jsou neoperabilní, anestezie opiem	1295 n. l.	Návrat Marca Pola do Itálie
1315 n. l.	Klinické oddělení benigních a maligních nádorů prsu; chirurgové se učí regionální anatomii	1314 n. l.	Dante Alighieri - Božská Komédie
1320 n. l.	Zjednodušení terminologie – scirrhus a karcinom jsou totožné pojmy označující rakovinu; rozdělení rakoviny podle velikosti, místa a hloubky; teorie externích karcinogenů v Anglii	1319 n. l.	Trestní stíhání za vykrádání hrobů
1368 n. l.	Léze rozdělovány na teplé a studené, nádory řazeny mezi studené; dieta a očištná léčba	1369 n. l.	V Paříži postavena Bastilla
1390 n. l.	Anorektální nádory jsou pevné a nevléčitelné	1388 n. l.	Skoti poraženi Angličany na Chevy Chase

(Hajdu, 2011)

4.5 Léčba nádorových onemocnění v současnosti

4.5.1 Chirurgické odstranění nádoru

Základním léčebným procesem kolorektálního karcinomu je chirurgický výkon (Skala, 2015). Terapie je rozdělena do dvou typů – radikální a paliativní operace. Radikální operace znamená odstranění nádoru i s částí okolní zdravé tkáně, odstranění regionálních mízních uzlin a popřípadě i vzdálených ložisek metastáz. Paliativní chirurgický výkon je operace, při které je resekován prvotní nádor, bez možnosti odstranění mnohočetných druhotných ložisek (Slezáková et al., 2010). Operační řešení je indikováno vždy, když se zdá možné kompletní odstranění nádoru, to dává šanci na vyléčení a prognóza těchto pacientů je výrazně příznivější než pacientů ošetřených primárně paliativními metodami (Krška et al., 2014).

Chirurgický výkon se různí v souvislosti s umístěním a rozsahem konkrétního nádoru. V případě rakoviny tlustého střeva záleží na tom, zda se nádor nachází v oblasti tračníku, tedy v horním oddílu tlustého střeva. V tomto místě ho lze často chirurgicky odstranit bez nutnosti stomie. Radikální chirurgické odstranění nádoru lokalizovaného do dolní části tlustého střeva se ale bez stomie obvykle neobejde. Chirurgické výkony se uplatňují také při odstranění jaterních či plicních metastáz kolorektálního karcinomu, v případě že jsou operabilní. Je tak možné prodloužit délku a zlepšit kvalitu života pacienta (Skala, 2015).

4.5.2 Radioterapie

Radioterapie společně s chirurgickou léčbou mají zásadní význam pro vyléčení malignity, protože zajišťují lokální kontrolu nádoru. V průběhu nemoci je radioterapie indikována minimálně u poloviny všech onkologických pacientů (Krška et al., 2014). U karcinomů vyšších oddílů tlustého střeva se ale radioterapie, kvůli vysoké senzitivitě, a tedy možnosti poškození tenkého střeva zářením, téměř nevyužívá. Velmi prospěšná je naopak při postižení nižších oddílů tlustého střeva, a to zejména v kombinaci s chirurgickým výkonem. Stejně jako metody intervenční radiologie (radiofrekvenční ablace – RFA, chemoembolizace, embolizace portální žíly před operací jaterních metastáz, aj.) se uplatňuje i při metastatickém postižení jater (Skala, 2015).

V kurativní léčbě se radioterapie uplatňuje jak samostatně, tak v kombinaci s chirurgií a se systémovou léčbou. Samostatná, ale i v kombinaci se systémovou léčbou má kurativní

efekt u celé řady nádorů, a to z toho důvodu, že je schopná navodit lokální / regionální eradikaci malignity. Obecně vzato se samostatná radioterapie využívá v kurativní léčbě vybraných nádorů v časném stádiu, zatímco v kombinaci s chemoterapií či hormonální terapií u lokálně pokročilých nádorů (Krška et al, 2014).

4.5.3 Chemoterapie

Pojem chemoterapie znamená podávání léků, jež jsou produkty chemické syntézy. Chemoterapeutika jsou tedy používána jak k léčbě onkologických, tak k léčbě jiných onemocnění, jako jsou onemocnění virová, plísňová nebo parazitární. V onkologii se pod pojmem chemoterapie rozumí podávání léků (cytostatik) s potenciálem zabít buňky – cytotoxickým účinkem (Vorlíček et al., 2012).

Chemoterapie je dnes standardní součástí léčby u pokročilejších stádií choroby (Skala, 2015). Podle mechanismu ovlivnění dělení rozeznáváme několik skupin léků s rozdílným způsobem zásahu do množení buněk. Větší intenzity léčebného efektu je často dosaženo současným či následným použitím více cytostatických léků, tzv. kombinovanou chemoterapií. Kombinací více druhů léků se také snižuje následná rezistence abnormálních buněk vůči léčbě. Obdobný efekt má nejen změna účinných preparátů, ale i změna dávkování (Svoboda and Filip, 2004). Použití chemoterapie jako hlavní léčebné metody je omezeno řadou faktorů. Zásadní roli hraje citlivost nádoru k chemoterapii, která závisí na podílu proliferujících buněk v nádoru. Mezi nejcitlivější nádory patří ty, jejichž výchozí zdravá tkáň má vysokou proliferační aktivitu. V onkologii je mezi ně řazen například choriokarcinom, který dosahuje až 90% chemokurability (Cibula and Petruželka, 2009).

Pestrá škála zkoušených léčebných režimů nicméně svědčí o tom, že samostatná léčba chemoterapií má omezené možnosti (Skala, 2015).

Cytostatika

Cytostatická léčiva jsou používána při terapii nádorových onemocnění. Jedná se o značně nehomogenní skupinu, a to jak z hlediska chemické struktury, tak reakčního mechanismu. Přehled hlavních skupin cytostatik zobrazuje Tabulka 2. Mechanismus účinku

těchto léčiv spočívá v inhibici proliferace rychle se dělících buněk nádoru, čehož dosahují přímou reakcí s DNA, změnou molekuly nukleotidů, inhibicí topoizomeráz nebo narušením správné funkce mikrotubulů (Šídlová et al., 2011). Přehled mechanismů účinku a cytostatik, které jimi působí, můžeme vidět v Tabulce 2.

Lüllmann et al. (2007) popisuje cytostatika jako cytotoxické látky, které zvláště účinně postihují buňky připravující se na buněčné dělení. Cytostatika tedy přednostně poškodí rychle se dělící maligní buňky. Takto vyvolaná porucha buněčného dělení nezbrzdí jen proliferaci, ale může vyvolat i apoptózu. Z velké části neovlivněny zůstávají pomalu se dělící tkáně, tedy většina zdravých tkání. Totéž ale platí i na pomalu se dělící maligní tkáň. Podle studie Šídlová et al. (2011) ale působení cytostatik není selektivní, a proto jsou tyto látky potenciálně karcinogenní, mutagenní a teratogenní pro všechny eukaryotické organismy.

Cytostatika mohou být syntetického původu, nebo se jedná o deriváty látek získaných z rostlin či plísní (Vorlíček et al., 2012). Asi nejvýznamnější skupinou rostlinných protinádorových léčiv je skupina vinca alkaloidů a jejich analogů, s označením L01CA. Ty jsou původně izolované z rostlin *Vinca rosea* (Barvínek růžový) a *Catharanthus roseus* (Barvínkovec růžový) z čeledi toješťovité (Oktábec and Jampílek, 2013).

Tabulka 2: Přehled hlavních skupin cytostatik

Hlavní skupina cytostatik	Podskupina
Alkylační látky	analoga dusíkatých yperitů alkylsulfonáty ethylenaminy deriváty nitrosomočoviny epoxidy jiné alkylační látky
Deriváty kyseliny listové Různé alkaloidy a rostlinná léčiva	Vinca alkaloidy a analoga deriváty podofylotoxinu deriváty kolchicinu taxany jiné rostlinné alkaloidy a přírodní léčiva
Cytotoxická antibiotika	aktinomyciny antracykliny a příbuzné látky jiná cytotoxická antibiotika
Komplexotvorné látky ze skupiny platinových cytostatik Methylhydraziny	

(Oktábec and Jampílek, 2013)

Tabulka 3: Rozdělení cytostatik podle mechanismu účinku**Léčiva poškozující DNA**

- Kovalentní vazbou na DNA (alkylující látky, např. cyklofosfamid),
- Uvolněním reaktivní platiny (např. cisplatina),
- Interkalací (např. antibiotikum doxorubicin),
- Inhibicí topoizomerázy (inhibicí topoizomerázy II: epipodofylotoxiny, např. etoposid; inhibitory topoizomerázy I, např. topotekan).

Látky ovlivňující syntézu DNA

- **Inhibice syntézy stavebních jednotek DNA**
 - Inhibice reduktázy kyseliny dihydrolistové (metotrexát),
 - Inhibice ribonukleotidové reduktázy (např. hydroxykarbamid),

- **Zabudování falešných stavebních jednotek DNA**

- Antimetabolity purinu (např. azathioprin),
- Antimetabolity pyrimidinu (např. 5-fluoruracil).

Látky působící interakcí s mikrotubuly (s mitotickým vřeténkem)

- Inhibice polymerizace tubulinu (např. vinblastin),
- Tvorba nenormálních mikrotubulů a inhibice depolymerizace (taxoidy: např. paklitaxel).

Látky působící dalšími mechanismy (např. asparagiáza)**Látky ovlivňující regulační mechanismy organismu**

- Hormony, interferony, interleukiny, monoklonální protilátky.

(Lüllmann et al., 2004)

4.5.4 **Fytochemikálie jako součást léčby**

Přírodní látky jsou nejvýznamnějším zdrojem léčiv po celou dobu naší historie. Jejich dominantní role ve složení chemoterapeutik potvrzuje fakt, že přibližně 74 % protinádorových látek jsou buď přírodní produkty, nebo produkty z nich odvozené (Tan et al., 2006).

V současné době je důraz kladen nejen na samotnou léčbu nádorových onemocnění, ale také na jejich prevenci. Mezi fytochemikálie přijímané ve stravě nepatří totiž jen minerální látky, vitaminy a stopové prvky, ale také bioaktivní složky, jako jsou fenolové sloučeniny a alkaloidy, které vykazují velký potenciál při léčbě mnoha onemocnění, včetně rakoviny, a to pomocí genetických a epigenetických modifikací (Shukla et al., 2014). Podle Scarpa and Ninfali (2015) patří mezi fytochemikálie, sloužící jako chemopreventivní činidla s nejvýznamnějším efektem na snižování proliferační aktivity nádorových buněčných linií epigalokatechin-3-galát (EGCG), kurkumin, resveratrol, lykopen, extrakty granátového jablka, luteolin, genistein, piperin, β -karoten a sulforafan. Kromě těchto činidel mají chemopreventivní potenciál i jiné přírodní látky, a to například kyselina gallová, lupeol, betulinová kyselina, ginsenosidy, oleanolová kyselina, ginkgolid B a složky granátového jablka kyanidin, delfinidin a petunidin.

Současná léčba pokročilého lidského karcinomu je založena na kombinaci léků s odlišným mechanismem účinku, jejichž kombinační strategie může proti-rakovinné účinky a cytotoxicitu zesilovat (Ho and Cheung, 2014). V roce 1965 byla Frei et al. publikována práce, ve které ukazují prospěšnost kombinační terapie u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií. Pacientům byl podáván merkaptopurin, methotrexát, prednison a vinkristin v tzv. POMP režimu (Purinethol® (merkaptopurin), Oncovin® (vinkristin), methotrexát, prednison) a závěry byly jasné: kombinací léčiv je možno dosáhnout kompletní remise lépe než monoterapií. Studie naznačují, že rakovinný růst může být účinně inhibován také kombinací fytochemikálií, působících odlišnými cestami (Ho and Cheung, 2014).

Protinádorové látky odvozené z rostlin mohou na nádorové buňky působit prostřednictvím přímého cytotoxického účinku, nebo prostřednictvím jiných mechanismů, jako je inhibice proteáz účastnících se růstu a šíření nádoru (Taylor et al., 2006)., viz kapitola Cytostatika.

4.6 Alkaloidy a jejich význam v anti-proliferační aktivitě

Mezi biologicky aktivními molekulami, pocházejícími z přírodních zdrojů, zauímají alkaloidy významné postavení, a to zejména díky jejich rozsáhlému léčivému účinku, jakým je účinek protinádorový, antimikrobiální a řada dalších. Izolace a stanovení alkaloidů v rostlinném materiálu se proto stala velmi aktuálním tématem (Kulp and Bragina, 2013).

Chemická diverzita alkaloidů představuje velkou skupinu sloučenin zodpovědných za ochranu rostlin, vyznačujících se atomem dusíku v heterocyklickém kruhu (Tako and Rook, 2013). Předpokládá se, že alkaloidy vznikly v důsledku obranných mechanismů rostlin proti býložravcům či parazitům, nebo mohou být také odpadními látkami (Laryšová et al., 2015). V rostlinách bylo identifikováno přibližně 12 000 alkaloidů, distribuovaných celou řadou tříd. Některé z nich vykazují pozoruhodné účinky při léčbě lidských onemocnění (Tako and Rook, 2013). Jejich biosyntéza je ale pro rostlinu energeticky náročná a vyžaduje účast specifických enzymů (Laryšová et al., 2015). Biosyntetické dráhy různých kategorií alkaloidů často začínají od prekurzorů odvozených z aminokyselin, ale mají nezávislý evoluční původ (Tako and Rook, 2013).

Alkaloidy se nacházejí v různých částech 15-20 % cévnatých rostlin (v semenech, listech, kořenech, kůře aj.), u určitých druhů mechů, hub a bakterií, ale také u některých bezobratlých živočichů (stonožek, brouků, motýlů, korýšů) a obratlovců (žab, mloků aj.). Alkaloidy některých druhů hmyzu a jiných živočichů bývají často rostlinného původu, ale mohou být rovněž syntetizovány *de novo* (Velíšek and Hajšlová, 2009). Bylo nalezeno mnoho biologicky významných alkaloidů u řady čeledí *Fumariaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae* a také u rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Mezi celkově nevýznamnější alkaloidy patří benzofenantridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin, které vykazují široké spektrum biologických aktivit, včetně významných pro-apoptických a protinádorových účinků (Dalecká et al., 2013).

Rostlinné alkaloidy představují nevelkou skupinu protinádorových léčiv izolovaných z rostlin (Vorlíček et al., 2012). K prototypickým alkaloidům s proti-rakovinným účinkem patří zejména alkaloidy izolované z rostliny *Vinca rosea* (Barvínek lékařský), tzv. vinca alkaloidy (Klener and Klener, 2013).

4.6.1 **Vinca alkaloidy**

Vinca alkaloidy byly poprvé izolovány z *Vinca rosea* L. (Barvínek lékařský). Jedná se o běžně používaná chemoterapeutika při léčbě rakoviny (Tsuruo et al., 1981). Ze stálezelené rostliny *Vinca rosea* se získávají dva příbuzné alkaloidy – vinblastin (vincaleukoblastin) a vinkristin. Vinorelbin a další jsou semisynteticky získané vinca alkaloidy (Lüllmann et al., 2004). Cytostatického účinku dosahují vinca alkaloidy poškozením buněčných mikrotubulů (Cibula and Petruželka, 2009).

Jako chemoterapeutikum je využíván zejména novější preparát vinorelbin. Vinblastin a vinkristin jsou využívány zejména k léčbě krevních chorob (Vorlíček et al., 2012). Nicméně jejich vedlejší účinky představují podle některých lékařů závažný problém a proto bylo vyvinuto mnoho strategií pro snížení toxicity těchto látek a zvýšení jejich terapeutické účinnosti, jako například léčiva uložená v liposomech, léčiva s navázaným polyethylenglykolem na povrchu liposomu, chemicky nebo peptidicky modifikovaná léčiva, nebo kombinace chemoterapeutik (Lee et al., 2015). Nežádoucí účinky jsou obdobné u všech preparátů této skupiny. Patří mezi ně neurotoxicita ve formě polyneuropatií, poškození tkání při paravazaci, nebo alergické reakce (Vorlíček et al., 2012).

Vinca alkaloidy jsou látky široce využívané u několika různých typů malignit. Avšak rakovinné buňky si proti těmto látkám postupem času vytvoří rezistenci a proto je nezbytný vývoj a výzkum nových látek s lepší účinností (Schutz et al., 2011).

Vinblastin

Vinblastin je vinca alkaloid, který je se váže na tubulin a inhibuje tvorbu mikrotubulů v buňkách. Léčba za pomoci vinblastinu vede k tvorbě agregátů parakrystalů v buňkách, které jsou tvořeny neprodyšně uzavřenými tubulinovými molekulami. Soustavy mitotických vřetének v ošetřovaných buňkách jsou narušeny a progresse buněčného cyklu je zastavena ve fázi mitózy (Nakamura and Ishigaki, 2014). Díky tomu má toto DNA - neinterkalační činidlo široké uplatnění při léčbě rakoviny člověka. Bylo ale také zjištěno, že vinblastin může být příčinou cytogenotoxicity (Geriyol et al., 2015). Vinblastin je doporučen zejména k léčbě maligních lymfomů, testikulárního karcinomu a Hodgkinovy choroby (Martínková, 2007; Klener and Klener, 2013).

Molekula vinblastinu je také jednou z důležitých molekul, používaných pro přípravu léčiv na bázi nanočástic, které jsou cíleně selektivní pro rakovinné buňky, a jak se zdá, jsou také účinné jen s mírnými vedlejšími účinky (Ale et al., 2011). Účinek vinblastinu byl testován ve studii Klockner et al., (1991) kde byla předmětem zkoumání léčba patnácti pacientů s pokročilým stádiem rakoviny urotelu. Léčba probíhala za pomoci několika chemoterapeutik, včetně vinblastinu. Výsledné údaje ukázaly, že vinblastin je účinný a subjektivně dobře tolerovaný u pokročilého uroteliálního karcinomu.

Vinkristin

Za nejvíce neurotoxický vinca alkaloid je považován vinkristin, který způsobuje axonální neuropatii přerušením mikrotubulů a tím i poškození axonálního transportu. Klinicky se stav projevuje především poškozením senzitivních nervů, i když vinca alkaloidy ničí i nervy motorické. Mezi první příznaky patří brnění a svalové křeče (Cibula and Petruželka, 2009). Přesto se stal nepostradatelnou součástí mnoha chemoterapeutických kombinací u hematologických malignit i solidních nádorů, jako jsou karcinomy prsu nebo varlat (Klener and Klener, 2013). Vinkristin je toxický i vůči trávicímu traktu a při extravazální aplikaci vyvolává podkožní nekrózy. Je indikován k léčbě karcinomu prsu, lymfomů a v kombinaci i k indukční léčbě akutní lymfatické leukemie (Martínková, 2007).

Vinorelbin

Vinorelbin je semisyntetický vinca alkaloid zastavující progresi buněčného cyklu, což vede k akumulaci buněk v mitóze. Vykazuje menší aktivitu vůči axonálním mikrotubulům než ostatní vinca alkaloidy, což může být důvod nižší neurotoxicity spojené s terapií vinorelbinem (Curran and Plosker, 2002). Vinorelbin, neboli Navelbin, doznal uplatnění v kombinované terapii karcinomu prsu, plic a ovaria. Ve srovnání s vinkristinem má nižší neurotoxicitu a jeho další výhodou je i možnost perorální aplikace (Klener and Klener, 2013). U pokročilého karcinomu prsu prokázal vinorelbin dobrou odpověď u 40-50 % nemocných (Martínková, 2007).

Ve studii Curran and Plosker (2002) vykazoval vinorelbin *In vitro* vyšší účinek proti buněčným liniím nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) než vinblastin, vindesin nebo vinkristin. *In vivo* u modelového nemalobuněčného plicního karcinomu vykazoval vinorelbin vyšší účinek než vinkristin a vinblastin a byl minimálně tak účinný jako vindesin.

4.6.2 Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Protinádorové vlastnosti rostlin, patřících do čeledi *Amaryllidaceae* byla známá již ve čtvrtém století před naším letopočtem, kdy Hippokrates z Kósu použil olej z rostliny *Narcissus poeticus L.* (Narcis bílý) k léčbě děložních nádorů. Tyto rostliny produkují velké množství rozmanitých alkaloidů a příbuzných metabolitů s proti-rakovinným potenciálem, který je předmětem zkoumání pro mnohé výzkumné skupiny po celém světě (Luchetti et al., 2012).

Druhy rostlin této čeledi mají dlouhou historii v pěstování a šlechtění jakožto okrasné cibuloviny, ale také ve výzkumu zaměřeném na jejich rozmanitost v obsahu alkaloidů a jejich složení (Tacos and Rook, 2013). Je známo, že produkují strukturálně jedinečné alkaloidy se širokou škálou zajímavých fyziologických účinků, jako je inhibice acetylcholinesterázy, imunostimulační aktivita, nebo protinádorové a antivirové účinky. Tyto alkaloidy jsou omezeny pouze na tuto čeleď (Cahlíková et al., 2013).

Mezi jeden z nejvýznamnějších účinků těchto alkaloidů patří jejich protinádorová aktivita indukci apoptózy. Výraznou výhodou je navíc jejich vysoká selektivita pro nádorové

buňky a relativně nízká toxicita k zástupcům buněk zdravých nebo buněk klidových (Dalecká et al., 2013).

Nejvíce známé jsou alkaloidy *Amaryllidaceae* díky galanthaminu, selektivnímu a reverzibilnímu inhibitoru acetylcholinesterázy, která zvyšuje hladinu acetylcholinu v mozku, a je tak využíván při léčbě Alzheimerovy choroby (Cahlíková et al., 2013). Dalšími alkaloidy, jež jsou nadějnými kandidáty na léky proti rakovině, jsou pankratistatin a narciklasin. Ty působí inhibičně na růst lidských nádorových buněk (Forgo a Hohman, 2005). Nicméně i další alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* vykazují velmi slibné výsledky při jejich testování, jakožto potenciálních léků. Jejich další klinický vývoj je ale omezen jejich omezenou klinickou dostupností (Talos and Rook, 2013).

Na rozdíl od farmakologických a fytochemických dat, které jsou dostupné, jsou ekologické, fyziologické a molekulární aspekty *Amaryllidaceae* a jejich alkaloidů málo prozkoumanou oblastí. Totožnost genů odpovědných za biosyntézu jejich alkaloidů je v současnosti zcela neznámá. Porozumění biosyntéze alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* by značně prospělo vylepšit design šlechtitelských programů k produkci kultivarů, optimalizovaných pro výrobu farmaceuticky cenných látek, a pomohlo by také ve využívání biotechnologických postupů (Talos and Rook, 2013).

Specifickou biosyntetickou cestou amarylkovitých alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta, která vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu. L-Tyrosin se mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-hydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vzniká 4'-O-methylnorbelladin (Dalecká et al., 2013). Vzhledem k tomu, že alkaloidy *Amaryllidaceae* zahrnují množství strukturálně odlišných skupin, byly tyto alkaloidy rozřazeny do několika typů podle jejich chemického skeletu. Jedná se o typ lykorinový, krinanový, homolykorinový, galanthaminový, motaninový, pankratistatinový, buflavinový a cheryllinový (Havelek et al., 2014). K hlavním typům je také řazen belladinový typ (*O*-methylbelladin), ze kterého vychází vlastní biosyntéza amarylkovitých alkaloidů (Dalecká et al., 2013). Z pohledu této studie vykazují nejvýznamnější biologickou aktivitu následující typy.

Lykorinový typ

Alkaloid lykorin byl prvním izolovaným alkaloidem čeledi *Amaryllidaceae*, a to v roce 1877 z rostliny *Narcissus pseudonarcissus*. Alkaloidy spadající do lykorinového strukturního typu patří mezi nejznámější a z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k nejúčinnějším. Hlavním zástupcem této skupiny je lykorin (Dalecká et al., 2013). Nahromaděné důkazy ukazují, že lykorin nejen že vykazuje silné farmakologické účinky u mnoha chorob, včetně protileukemických, protinádorových, anti-angiogenních, anti-virových, anti-bakteriálních, protizánětlivých a anti-maláriických, ale působí také mnoha dalšími biologickými funkcemi, jako je inhibice acetylcholinesterázy a topoizomerázy, potlačení biosyntézy kyseliny askorbové, a řízení cirkadiánního rytmu. Pozoruhodné je, že lykorin vykazuje četné farmakologické účinky u různých chorob a to s velmi nízkou toxicitou a mírnými vedlejšími účinky (Cao et al., 2013).

Na základě studií se uvádí, že lykorin působí selektivně smrtícím účinkem na nádorové buňky, závislým ale na typu nádorových buněk. Inhibuje růst leukemických Molt 4 buněk, růst buněk děložního čípku HeLa inhibuje obtížněji a na buňky hepatomu HepG2 má účinek pouze slabý (Liu et al., 2009). Zároveň vykazuje dobrou účinnost proti hepatitidě typu C, kde ovšem jeho cytotoxicita představuje závažný bezpečnostní problém. Proto je v současné době zkoumán vztah mezi strukturou a aktivitou lykorinových analogů s cílem identifikovat příbuznou sloučeninu se srovnatelným účinkem inhibice hepatitidy C, avšak s menší cytotoxicitou (Chen et al., 2015).

Galanthaminový typ

Alkaloidy spadající do této skupiny mají jako strukturní základ dibenzofuran. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je z medicínského hlediska galanthamin (Dalecká et al., 2013). Jedná se o alkaloid čeledi *Amaryllidaceae*, objevený v roce 1953. Tato sloučenina je primárně izolovaná z narcisu (*Narcissus spp.*), sněženky (*Galanthus spp.*) a bledule letní (*Leucojum aestivum*) (Kilgore et al., 2014). V současné době je galanthamin jako jediný komerčně produkováný lék z pěstovaných rostlin (Tako and Rook, 2013).

Galanthamin je využíván k léčbě příznaků Alzheimerovy choroby prostřednictvím inhibice acetylcholinesterázy a vazbě na nikotinový receptor. (Kilgore et al., 2014).

Bylo prokázáno, že terapie této neurodegenerativní choroby galanthaminem vede k zlepšení kognitivních, funkčních i behaviorálních symptomů. Alkaloid galanthamin je látka bez jakýchkoliv známek cytotoxického působení (Dalecká et al., 2013).

Krinanový typ

Někdy je tato skupina rozdělena na haemanthaminový a krinanový typ. Tyto dva typy mají ale společný původ, jsou odvozeny od 5,10b-ethanophenanthridinu (Rahman, 1998). Krinanová skupina *Amaryllidaceae* byla mezi prvními z těchto sloučenin, vykazující zajímavý cytotoxický potenciál proti nádorovým buněčným liniím. Nicméně mechanismus cytotoxického účinku a anti-proliferační aktivity ještě není zcela jasná (Havelek et al., 2014). Do této skupiny jen řazen haemanthamin, haemathidin, krinamin, maritidin a papyramin (Rahman, 1998). Všechny zmíněné alkaloidy mají rozdílnou schopnost inhibovat růst různých typů nádorových buněk. Mezi vůbec nejúčinnější alkaloidy této skupiny patří haemanthamin, haemathidin a krinamin, které působí cytotoxicky na nádorové buňky (Dalecká et al., 2013). Bylo prokázáno, že haemanthamin vykazuje výraznou cytotoxickou aktivitu proti celé řadě různých typů nádorových buněk, jako jsou lidské leukemické buňky MOLT-4, jaterní nádorové buňky HepG2, „nesmrtelné“ buněčné linie HeLa, buněčné linie prsního karcinomu MCF7, lymfoblastoidní buněčné linie CEM, lidské erytroleukemické buňky K562, lidské fibroblasty BJ, buněčné linie lidského adenokarcinomu plic A549, buněčné linie karcinomu jícnu OE21, Hs683 a U373 buněčné linie lidského gliomu, buněčné linie melanomu SK MEL a B16F10. Haemanthidin má slibné cytotoxické vlastnosti vůči A549, OE21, Hs683, U373, SK MEL, B16F10 a multirezistentním L5178 buňkám myšího lymfomu (Havelek et al., 2014).

4.7 *Amaryllidaceae*

Rostliny z čeledi *Amaryllidaceae* jsou cibulovité krytosemenné rostliny, jejichž výskyt je typický pro tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky, ale zástupce v podobě narcisů (*Narcissus*), bledulí (*Leucojum*) a sněženek (*Galanthus*) je možné nalézt i v České republice. Tato čeleď zahrnuje více než 1000 druhů rostlin, klasifikovaných do 65 rodů (Dalecká et al., 2013).

Jsou známé nejen pro své okrasné vlastnosti, ale také díky alkaloidům, které produkují. Tyto alkaloidy představují velkou a stále se rozšiřující skupinu isochinolinových alkaloidů. Isochinolinové alkaloidy představují jednu z nejširších tříd sekundárních metabolitů rostlinné říše. Isochinolinové alkaloidy jsou biosynteticky odvozeny z aromatických aminokyselin, konkrétně z molekul fenylalaninu nebo tyrosinu. Přes více než 2500 známých struktur, dělá z isochinolinových alkaloidů velkou skupinu bioaktivních látek, jejichž vlastnosti jsou značně variabilní. V současné době je známo více než 500 alkaloidů této čeledi, s definovanými chemickými strukturami. Alkaloidy této čeledi jsou předmětem mnoha studií, zahrnují širokou škálu chemických struktur a mají významné biologické účinky jako například antimalarické, cytotoxické, anti-HIV-1 účinky, mají schopnost inhibovat činnost enzymu acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy a antivirové, antimykotické, antibakteriální nebo analgetické účinky (Havelek et al., 2014; Dalecká et al., 2013; Kulhánková et al., 2013).

4.7.1 *Chlidanthus Fragrans*

Rod *Chlidanthus* zahrnuje deset druhů cibulovin. Většina z nich má svůj původ a domovinu v Peruánských Andách, ale vyskytují se i v tropické Jižní Africe. Botanický název *Chlidanthus Fragrans* pochází z řečtiny a lze ho přeložit jako „jemný květ“ (Cahlíková, 2013, Boit, 1956). Rostlinu *Chlidanthus fragrans* je možné nalézt v Jižní Americe, zejména v Peru. Roste ve vlhkých i suchých oblastech na mírně písčité půdě. V létě nese výrazně žluté květy, široké přibližně 7,5 cm a dlouhé 10 -12 cm, s citronovou vůní (Ellis, 2001).

4.7.2 *Zephyranthes robusta*

Rod *Zephyranthes* pochází z oblasti Amerických Antil a zahrnuje zhruba 60 druhů rostlin. Některé z těchto druhů jsou pro své četné zdravotní účinky hojně využívány v lidovém léčitelství v mnoha zemích. Jako příklad můžeme uvést odvar z listů *Z. candida*, ten byl používán v Jižní Americe jako lék na diabetes mellitus, druh *Z. parulla* byl zase v historii Peru využíván při léčbě nádorů, a v Číně bylo k léčbě rakoviny prsu využíváno druhu *Z. rosea* (Kulhánková et al., 2013).

4.7.3 *Nerine bowdenii*

Rod *Nerine* se do Evropy dostal počátkem 20. století a pochází z různých stanovištních a klimatických podmínek jižní Afriky. V Kapsku začíná vegetovat koncem chladné a deštivé subtropické zimy a kvete až na podzim. Vytrvalé cibule překonávají chladné a suché období klidu. Cibule schopná květu mají obvod alespoň 12 cm a jsou složeny nejméně z 10 až 20 dužnatých suknic. Tvorba květů počíná už 18 měsíců před jejich rozkvetem a nakvétat začne *Nerine* na konci vegetace. Po odkvětu zasychají rostlinám listy, zatímco kořeny zůstávají živé (Kobza, 2009).

5 Materiál a metodika

5.1 Materiál

K testování byly využity buněčné tkáně adenokarcinomu tlustého střeva Caco-2, HT-29, a lidských primárních buněk FHs 74 Int. Buněčné tkáně byly pořízeny z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Ke kultivaci bylo dále využito Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), které bylo obohaceno o penicilin a streptomycin (10.000 jednotek/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu), 1% hydrogenuhličitan sodný, 1% pyruvát sodný, 1% neesenciální aminokyseliny, 10% fetální bovinní sérum (FBS). Dále byl využit fosfátový pufr (Phosphate buffer saline – PBS) a trypsin. Vše od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ke kultivaci byly využity kultivační láhve s plochou 75 cm² a 96jamkové mikrotitrační destičky od firmy Nunc (UK).

5.1.1 Caco-2

Caco-2 je nejlépe popsaná a nejčastěji používaná buněčná linie z modelů buněčných kultur (Hilgendorf et al., 1999). Byla izolována z kolorektálního karcinomu 72letého muže kavkazského původu. Tato buněčná linie je schopna růst adherentně na pevných površích a mikroporézních membránách (Grajek a Olejnik, 2004). Buněčné linie Caco-2 jsou využívány *in vitro* jako model lidských střevních epiteliálních buněk, a to díky jejich funkční i fyzické podobnosti (Wong and Ustunol, 2006). Pěstované *in vitro*, za standardních kultivačních podmínek, a v nepřítomnosti induktorů diferenciaci, spontánně vykazují znaky strukturální a funkční diferenciaci a polarizace (Pinto et al., 1983), a mezi sebou tvoří těsné spoje, čímž se podobají normálním střevním epiteliálním buňkám. Na hranici mikrokulků také vykazují struktury připomínající kartáčový lem (Wong and Ustunol, 2006).

Od ostatních buněčných linií stejného původu se liší tím, že se za obvyklých podmínek buněčné kultivace po 2–3 týdnech spontánně diferencuje do monovrstev polarizovaných buněk, jejichž struktura je typická pro enterocyty, s jádrem nacházejícím se v bazální části, s hustým zastoupením mitochondrií a s kartáčovým lemem v apikální části. Díky tomuto typu konstrukce jsou Caco-2 buněčné linie využívány jako model linie enterocytů v *in cellulo* kulturách (Artursson and Karlsson, 1991; Grajek and Olejnik, 2004).

5.1.2 HT-29

HT-29, kontinuální buněčná linie, je odvozená od primárního lidského adenokarcinomu tračníku 44leté ženy bílé pleti kavkazského původu (Grajek and Olejnik, 2004; Lipská, 2009) *V in cellulo* kulturách je jeho morfologie typická pro epitelové buňky, avšak netvoří kartáčový lem. Velká část buněčné populace HT-29 je tvořena pohárkovými buňkami, takže produkuje velké množství mucinu. Jejich struktura zahrnuje mikrokly, fylamenta, silně vakuolizované mitochondrie, endoplazmatické retikulum s volnými ribozomy, kapénky lipidů a velké množství lysozomů (Grajek and Olejnik, 2004).

Buňky HT-29 si v této dlouhodobé kultuře podržely schopnost syntetizovat hlavní antigeny nádorů tračníku – karcinoembryonální antigen a nespecifické zkříženě reagující antigeny i membránový tkáňový autoantigen, a dosud vykazují příslušnost k původní krevní skupině „dárkyně“ nádoru (Lipská, 2009).

5.1.3 Normální střevní buňky FHs 74 Int

FHs 74 Int jsou buňky epiteliální buněčné linie lidského tenkého střeva a jsou využívány jako model enterocytů pro tetování *in vitro* (Jesh et al., 2009).

Medium pro kultivaci buněčných tkání Caco-2 a HT-29:

450 ml DMEM,
50 ml FBS,
5 ml hydrogenuhličitan sodný,
5 ml pyruvát sodný,
5 ml neesenciální aminokyseliny,
5 ml penicilin a streptomycin.

Medium pro kultivaci buněčných tkání FHs 74 Int:

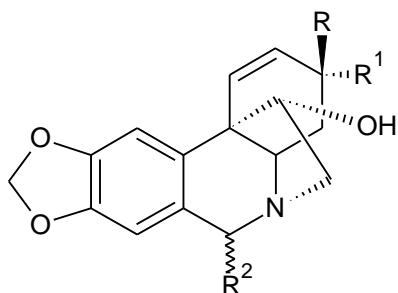
450 ml DMEM,
50 ml FBS,

5 ml neesenciální aminokyseliny,
 30 ng/ml epidermálního růstového faktoru,
 5 ml penicilin a streptomycin.

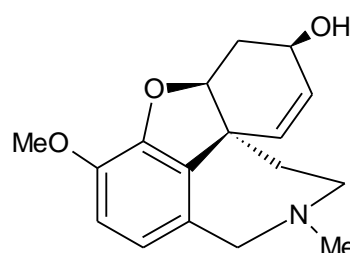
5.1.4 Extrahované alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Izolace testovaných alkaloidů z rostlin *Chlidanthus fragrans*, *Zephyranthes robusta* a *Nerine bowdenii*, použitých v této práci, provedla výzkumná skupina ADINACO na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Tyto vzorky byly poskytnuty v rámci spolupráce s pracovištěm KMVD.

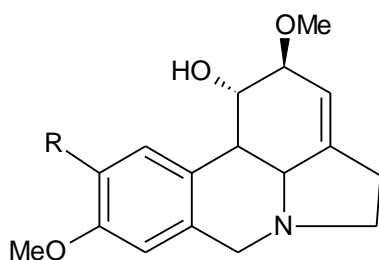
Z rostlin druhu *Zephyranthes robusta* byly izolovány alkaloidy haemanthamin (Obr. 1), haemanthidin (Obr. 1), hamayn (Obr. 1), galanthamin HBr (Obr. 2), 9-O-demethylgalanthin (Obr. 3), galanthin (Obr. 3), lykorin (Obr. 4) a tazettin (Obr. 5).



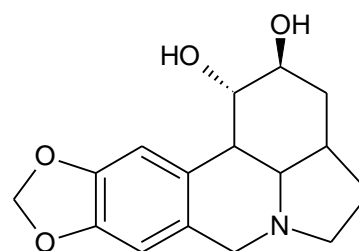
Obrázek 1: R= OMe, R¹= H, R²= H Haemanthamin
 R= OMe, R¹= H, R²=OH Haemanthidin
 R= H, R¹= OH, R²= H Hamayn



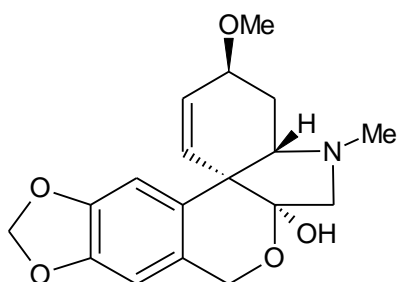
Obrázek 2: Galanthamin



Obrázek 3: R= OMe Galanthin
 R= OH 9-O-demethylgalanthin

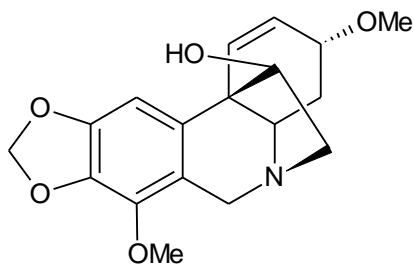


Obrázek 4: Lycorin

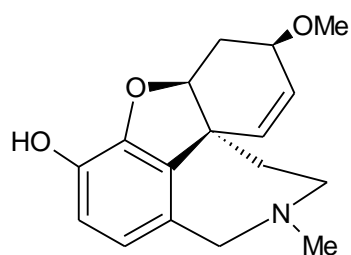


Obrázek 5: Tazettin

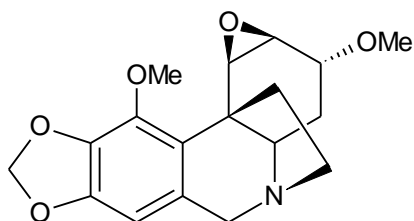
Z rostlin druhu *Chlidanthus fragrans* byly izolovány alkaloidy ambellin (Obr. 6), chlidanthin (Obr. 7) a undulatin (Obr. 8).



Obrázek 6: Ambellin

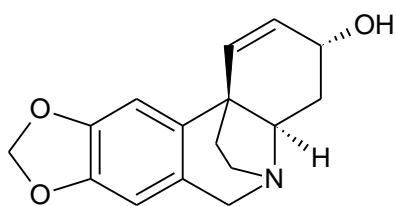


Obrázek 7: Chlidanthin

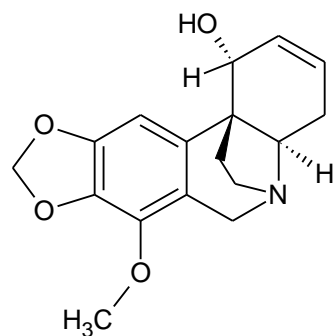


Obrázek 8: Undulatin

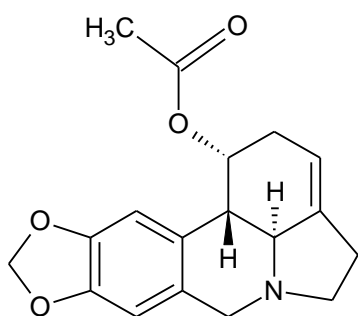
Z rostlin druhu *Nerine bowdenii* byly izolovány alkaloidy krinin (Obr. 9), bufanamin (Obr. 10), acetylkarantin (Obr. 11), karantin (Obr. 12) a bufanisin (Obr. 13).



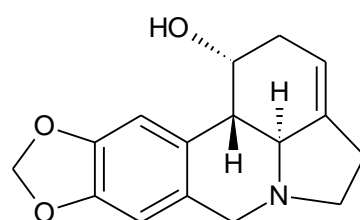
Obrázek 9: Krinin



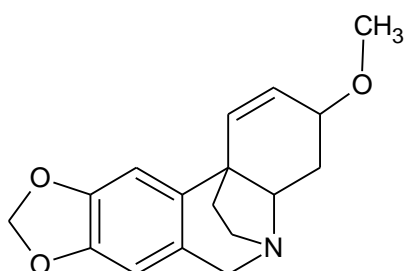
Obrázek 10: Bufanamin



Obrázek 11: Acetylkaranin

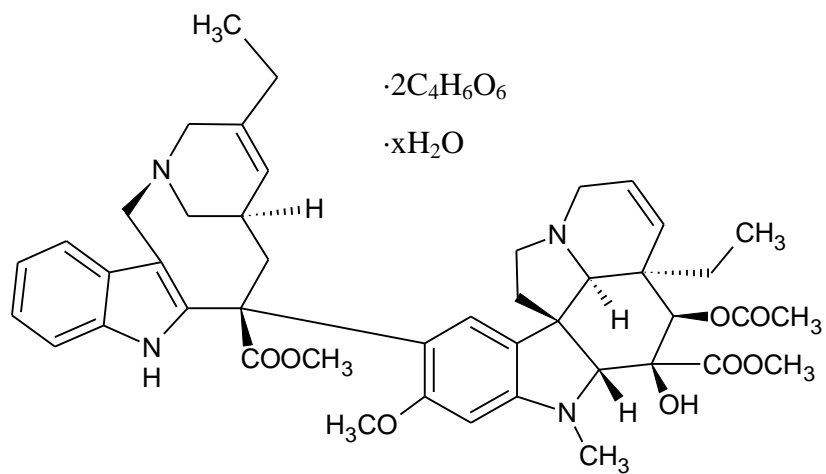


Obrázek 12: Karanin



Obrázek 13: Bufanisin

Jako pozitivní kontrola byl použit semisyntetický vinca alkaloid Vinorelbin (Obr. 14) od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).



Obrázek 14: Vinorelbine ditartrate salt hydrate

6 Metodika

Veškeré práce probíhaly ve sterilním prostředí laminárního boxu typu „biohazard II“ a zároveň byl veškerý spotřební materiál sterilní a využitý jednorázově.

6.1 Kultivace buněčných tkání Caco-2, HT-29, FHs 74 Int.

Jako modely nádorových buněk střevního epitelu byly použity buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 pocházejících z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Tyto buněčné linie byly kultivovány v kultivačních láhvích o velikosti plochy 75 cm² a to za přítomnosti 1 ml DMEM media (Dulbecco's modified Eagle's medium), doplněného o 10% roztok FBS (fetální bovinní sérum), 1% roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 1% roztoku pyruvátu sodného, 1% roztok penicilinu a streptomycinu a 1% roztoku neesenciálních aminokyselin. Veškerá činidla pochází od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Lidské primární buňky FHs 74 Int, stejně jako Caco-2 a HT-29, pochází z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Kultivovány byly v kultivačních láhvích o velikosti plochy 75 cm², a to za přítomnosti DMEM media, doplněného o 10% fetální bovinní sérum, 1% roztok hydrogenuhličitanu sodného, 1% roztok pyruvátu sodného, 1% neesenciálních aminokyselin, 30 ng/ml epidermálního růstového faktoru, 1% roztok penicilinu a streptomycinu (10.000 jednotek/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu). Všechna činidla pochází od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Kultivační láhve s buněčnými liniemi Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou, obsahující 95 % vzduchu a 5 % CO₂, a teplotou 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny. Buňky byly 7. den sklizeny pomocí trypsinu a následně byly po dobu 10 minut centrifugovány při 200 × g. Bylo odstraněno staré medium a buňky byly naředěny novým mediem. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a dány k 15 ml nového DMEM, media, v kultivační láhvi, pro další kultivaci. Buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 byly děleny každých 7 dní, lidské primární buňky FHs 74 Int každé 4 týdny. Pro tuto studii byly použity buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int v maximálním rozsahu 20 pasáží a v exponenciální fázi růstu.

6.2 Izolace testovaných alkaloidů

Izolace testovaných alkaloidů z rostlin *Chlidanthus fragrans*, *Zephyranthes robusta* a *Nerine bowdenii*, použitých v této práci, provedla výzkumná skupina ADINACO na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Tyto vzorky byly poskytnuty v rámci spolupráce s pracovištěm KMVD.

Z rostlin druhu *Chlidanthus fragrans* byly izolovány alkaloidy ambellin, chlidanthin, undulatin. Z rostlin druhu *Zephyranthes robusta* byly izolovány alkaloidy haemanthamin, haemanthidin, hamayn, galanthamin HBr, 9-O-demethylgalanthin, galanthin, lycorin, tazettin. Z rostlin druhu *Nerine bowdenii* byly izolovány alkaloidy bufanisin, karantin, 1-O-acetylbulbisin, acetylcaranin, bufanamin a krinin. Čistota extrahovaných látek byla podle NMR ≥ 95 %.

6.3 Test cytotoxicity (MTT)

Buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int byly naředěny na koncentraci $2,5 \times 10^3$ a následně pipetovány do 96jamkových destiček v množství 200 μ l. Po 24 hodinách bylo odstraněno staré medium a přidáno 100 μ l nového media spolu s testovanými vzorky alkaloidů v koncentracích 0.01–100 μ l/ml u nádorových buněčných liniích Caco-2 a HT-29 a 3.12–100 μ l/ml u normálních buněk lidského střevního epitelu FHs 74 Int. Takto ošetřené buňky s testovanými vzorky alkaloidů byly inkubovány po dobu 72 hodin. Po této době bylo medium se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 μ l čistým medium s MTT v koncentraci 1 μ g/ml. Po 2 hodinách v inkubátoru s řízenou atmosférou, teplotou 37 °C a za přítomnosti 5 % CO₂, bylo medium s MTT odstraněno a nahrazeno 100 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid). Následně byla u vzorků měřena absorbance při 555 nm a 720 nm jako referenční hodnoty. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno v porovnání s kontrolou, ve které byly buňky bez ošetření testovanými látkami.

Životaschopnost testovaných buněk byla testována pomocí testu cytotoxicity MTT podle Mosmann (1983). Jedná se o kolorimetrickou metodu, kde je využito barvivo 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT). Tato metoda umožňuje kvantifikaci životaschopnosti buněk podle jejich schopnosti mitochondriální

dehydrogenázy kyseliny jantarové u živých buněk redukovat žluté barvivo MTT na modrý nerozpustný formazan.

Výsledky jsou porovnány oproti kontrole a zaznamenány pomocí IC_{50} , tedy množství testované látky, potřebné k inhibici 50 % buněk. Za účinnou je považována látka, jejíž hodnota $IC_{50} < 10 \mu M$ (Taylor et al., 2014)

7 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Grafy byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism.

8 Výsledky

Bylo testováno 17 alkaloidů z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* na jejich schopnost inhibovat buněčnou proliferaci. Cytotoxická aktivita byla současně testována na modelu epiteliálních buněk kolorektálního karcinomu Caco-2 a na buněčných liniích kolorektálního karcinomu HT-29. Pro posouzení selektivního účinku na nádorové buněčné linie byly použity normální buňky střevního epitelu FHs 74 Int. Jako pozitivní kontrola byl dále použit semisyntetický vinca alkaloid Vinorelbine ditartrate salt hydrate.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3 a zaznamenány v hodnotách $\mu\text{M/ml}$ uvedené pro IC_{50} , což je hodnota značící množství testované látky, potřebné k inhibici proliferace u 50 % buněk Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int.

Tabulka 4: Výsledky cytotoxicity

	Cytotoxicita					
	Caco-2		HT-29		FHs 74 Int	
	$\mu\text{M/ml}$		$\mu\text{M/ml}$		$\mu\text{M/ml}$	
	(IC_{50})		(IC_{50})		(IC_{50})	
	průměr ^a	\pm SD ^c	průměr ^a	\pm SD ^c	průměr ^a	\pm SD ^c
Ambelin	74,09	\pm 1,10	50,18	\pm 1,17	89,82	\pm 6,46
Galanthamin HBr	61,43	\pm 1,56	49,27	\pm 2,38	67,63	\pm 7,7
Haemanthamin	0,99	\pm 0,14	0,59	\pm 0,01	19,47	\pm 8,86
Tazettin	22,83	\pm 3,29	23,37	\pm 1,97	71,11	\pm 5,19
Galanthin	58,86	\pm 1,00	50,48	\pm 1,1	>100	
Haemanthidin	3,29	\pm 0,91	1,72	\pm 0,11	11,63	\pm 0,86
Hamayn	17,23	\pm 0,93	12,36	\pm 0,30	53,31	\pm 7,25
Lykorin	0,99	\pm 0,08	1,2	\pm 0,01	22,68	\pm 0,09
Chlidanthin	72,93	\pm 2,35	52,66	\pm 1,19	78,11	\pm 0,00
Undulatin	51,71	\pm 1,08	53,39	\pm 2,21	70,43	\pm 6,82
Krinin	64,54	\pm 17,78	50,84	\pm 1,42	>100	
Bufanamin	53,52	\pm 0,68	47,59	\pm 2,18	>100	
Acetykaranin	29,45	\pm 0,59	19,23	\pm 1,16	66,07	\pm 6,78
9-O-demethylgalanthin	38,84	\pm 2,25	25,64	\pm 0,28	76,58	\pm 12,66
1-O-acetylbulbisin	33,39	\pm 2,85	47,94	\pm 1,57	61,32	\pm 8,8
Karanin	64,43	\pm 4,48	46,56	\pm 1,81	>100	
Bufanisin	8,59	\pm 0,15	5,32	\pm 1,7	22,78	\pm 2,61
Vinorelbine ditartrate salt hydrate	0,03	\pm 0,00	n.t.^b		3,98	\pm 0,26

^a Výsledky jsou zaznamenány jako středová hodnota \pm směrodatná odchylka ze tří nezávislých opakování.

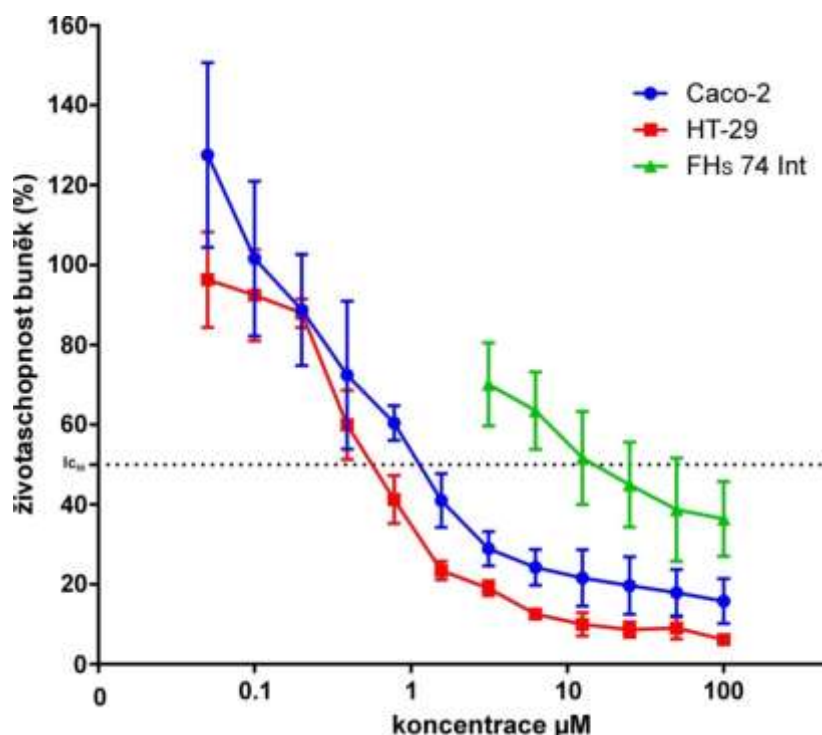
^b Nepodařilo se otestovat

^c Směrodatná odchylka

Vinorelbine ditartrate salt hydrate použitý jako pozitivní kontrola stanovil IC_{50} pro Caco-2 buněčnou linii hodnotu $0,03 \pm 0,00 \mu\text{M}$, hodnota IC_{50} pro HT-29 nebylo možné naměřit a IC_{50} pro FHs 74 Int byla $3,98 \pm 0,26 \mu\text{M}$, což je přibližně 100x více, než u nádorových buněk. Je vidět pozitivní trend v selektivním účinku pozitivního standardu.

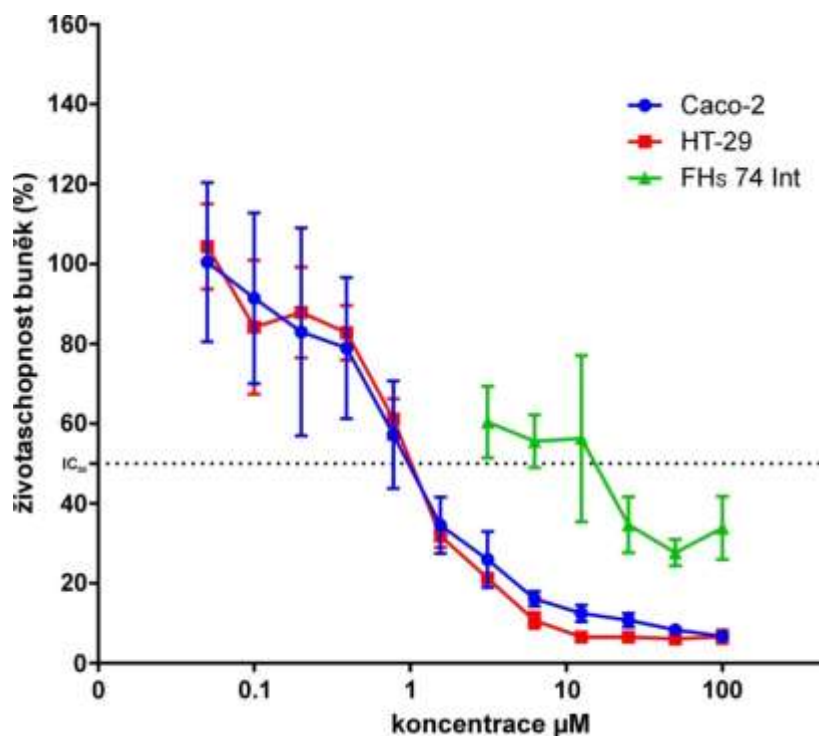
Z výsledků je patrné, že některé z testovaných alkaloidů vykazují výrazně nižší cytotoxickou aktivitu ke zdravým buňkám, a zároveň ne o mnoho nižší cytotoxickou aktivitu k buňkám rakovinným, než je tomu u použitého pozitivního standardu. Pro výsledky této studie jsou významné alkaloidy, jejichž výsledné hodnoty IC_{50} se, pro buněčné linie kolorektálního karcinomu, pohybují do $10 \mu\text{M}$. Pro normální buňky střevního epitelu jsou žádoucí co možná největší hodnoty IC_{50} .

Významných výsledků bylo dosaženo zejména u alkaloidů izolovaných z rostliny *Zephyranthes robusta*. Z ní izolovaný alkaloid Haemanthamin vykazuje významný cytotoxický účinek, jak je patrné z Tabulky 3, a to u obou nádorových buněčných linií, Caco-2 – $0,99 \pm 0,14 \mu\text{M}$, HT-29 – $0,59 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Naopak na normální buněčné linie FHs 74 Int působí velmi mírně cytotoxicky, $IC_{50} = 19,47 \pm 8,86 \mu\text{M}$ ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$), jak můžeme vidět v Grafu 1.



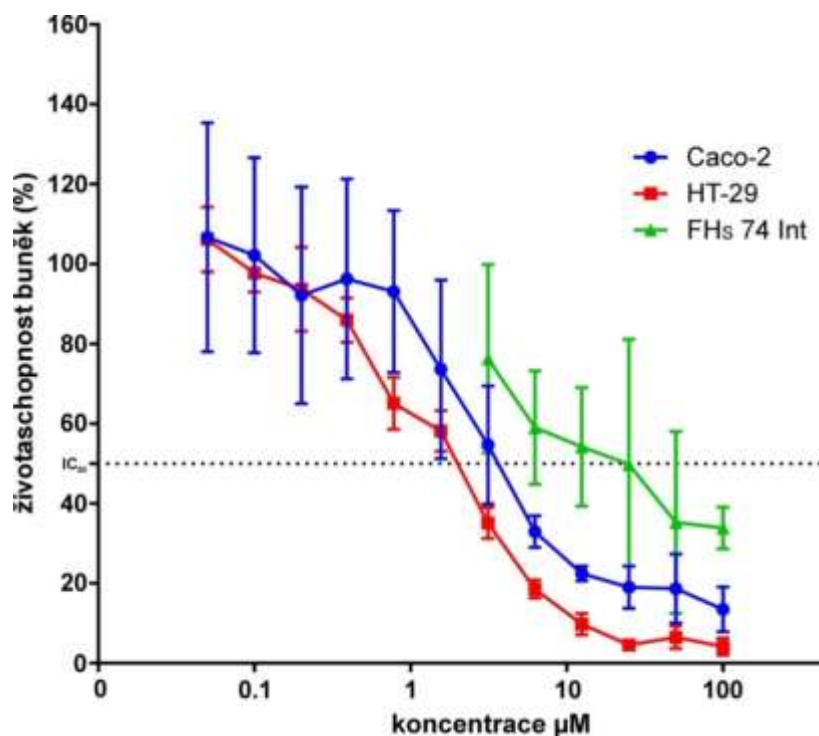
Graf 1: Cytotoxický účinek haemanthaminu na buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int. Graf ukazuje závislost životaschopnosti buněk na koncentraci haemanthaminu. Hodnoty zobrazují průměr hodnot a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých testování pro každý typ buněk.

Lycorin, alkaloid izolovaný z rostliny *Zephyranthes robusta*, má na buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 stejný účinek, jako předchozí Haemanthamin $IC_{50} = 0,99 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (Tab. 3). Jeho účinek na druhý typ nádorových buněčných linií HT-29 je $IC_{50} = 1,2 \pm 0,01 \mu\text{M}$, jak vidíme v Grafu 2, čímž lze zařadit mezi alkaloidy s vysokou selektivitou k nádorovým buňkám. Cytotoxický účinek na normální buňky FHs 74 Int je velmi nízký, IC_{50} je pro tyto buňky $22,68 \mu\text{M} \pm 0,09 \mu\text{M}$. Tyto hodnoty řadí Lycorin mezi alkaloidy s nejlepšími výsledky.



Graf 2: Cytotoxický účinek lycorinu na buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int. Graf ukazuje závislost životaschopnosti buněk na koncentraci lycorinu. Hodnoty zobrazují průměr hodnot a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých testování pro každý typ buněk.

Alkaloid Haemanthidin, izolovaný z rostliny *Zephyranthes robusta*, vykazuje také velmi nízké hodnoty IC_{50} na buňky kolorektálního karcinomu (Tab. 3), pro Caco-2 je $IC_{50} = 3,29 \pm 0,91 \mu\text{M}$ a pro HT-29 je $IC_{50} = 1,72 \pm 0,11 \mu\text{M}$. Tento alkaloid působí pouze mírně cytotoxicky na normální buňky FHs 74 Int, jeho hodnota $IC_{50} = 11,63 \pm 0,86 \mu\text{M}$, jak je patrné z Grafu 3.



Graf 3: Cytotoxický účinek haemanthidinu na buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int. Graf ukazuje závislost životaschopnosti buněk na koncentraci haemanthidinu. Hodnoty zobrazují průměr hodnot a směrodatnou odchylku ze tří nezávislých testování pro každý typ buněk.

Jak je patrné z hodnot zaznamenaných v Tabulce 3, menší významnosti, z pohledu výsledků, bylo dosaženo u alkaloidu Bufanisinu, izolovaného z rostliny *Nerine bowdenii*, jehož hodnoty pro Caco-2 jsou $IC_{50} = 8,59 \mu M \pm 0,15$, pro HT-29 jsou $5,32 \pm 1,7 \mu M$ a pro FHs 74 Int jsou $22,78 \pm 2,61 \mu M$. Tyto hodnoty ovšem nedosahují takové významnosti, jako již zmiňovaný Haemanthamin, Lycorin a Haemanthidin. Zbylé testované alkaloidy dosahují u nádorových buněčných linií velmi vysokých hodnot, takže je lze pro cíl této studie považovat za nevýznamné. Hodnoty popisná statistiky těchto alkaloidů jsou zaznamenány v Tabulce 3.

9 Diskuze

Přes značné pokroky v medicíně patří nádorová onemocnění mezi jednu z hlavních příčin úmrtí v lidské populaci 21. století. Jejich zhoubný efekt se opírá o jejich schopnost růstu a tvorby metastáz, a to bez jakékoliv kontroly (Hu et al., 2015). Většina ze syntetických inhibitorů buněčné proliferace ale vykazuje nepříznivé vedlejší účinky a navíc je jejich výroba velmi nákladná. Z těchto důvodů je v současné době trendem přiklánět se k fytochemikáliím s významnou biologickou aktivitou, které jsou široce dostupné a mají menší vedlejší účinky. Tyto fytochemikálie buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými fytochemikáliemi vykazují slibné výsledky u různých typů nádorů (Shukla et al, 2014).

V této studii byly testovány alkaloidy izolované ze tří druhů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* na antiproliferační aktivitu a selektivitu vůči buněčným liniím kolorektálního karcinomu. Výsledky ukázaly zejména tři významné alkaloidy, které mají značný potenciál. Ukázalo se, že všechny testované alkaloidy, u nichž byla naměřena významná hodnota, pocházely z jednoho druhu rostliny této čeledi, a to konkrétně ze *Zephyranthes robusta*. V porovnání s kontrolou, již byl již využíváný vinca alkaloidy vinorelbin, dosahovaly alkaloidy haemanthamin, haemanthidin a lykorin podobných hodnot IC_{50} u nádorových buněk a výrazně vyšších hodnot u buněk normálního zdravého epitelu. To znamená, že by při jejich případném využití pro léčbu nádorových onemocnění kolorektálního karcinomu, mohly mít tyto alkaloidy srovnatelné účinky na nádorové buňky. Zároveň by ale mohly způsobovat menší poškození buněk zdravých, v porovnání z již využívaným Vinorelbinem. Alkaloidy haemanthamin, haemanthidin a lykorin byly již dříve testovány pro své cytostatické a cytotoxické účinky u různých typů nádorových buněčných linií.

Lykorin, přírodní alkaloid extrahovaný z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*, ukázal rozmanité farmakologické účinky (Li et al., 2012). Ve studii Hu et al. (2015) byl testován jako případný inhibitor růstu a metastazování hormonálně refrakterního karcinomu prostaty (PCa). Testování probíhalo na čtyřech typických nádorových buněčných liniích karcinomu prostaty PC-3M, LNCaP, 22RV1 a DU145. Zároveň byl lykorin testován také na normálních lidských immortalizovaných epiteliálních buňkách prostaty PNT1A. Všechny tyto buňky byly podrobeny testu MTS, což je test životaschopnosti buněk pomocí 3-(4,5- dimethylthiazol- 2- yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4- sulfophenyl)-2H- tetrazolium). Test je založen na principu redukce tetrazoliové směsi životaschopnými

buňkami do intenzivně zbarveného produktu. Množství vzniklého barevného formazanu je pak přímo úměrný počtu životaschopných buněk. Výsledky pro nádorové buňky $IC_{50} = 5 - 10 \mu M$, což značí vysokou toxicitu. Na normální lidské epiteliální buňky prostaty PNT1A mělo působení Lykorinu pouze malý vliv. Kromě MTS proliferčního testu, byl také proveden migrační a invazní test s použitím buněčné linie karcinomu prostaty PC-3M, známým pro svou vysokou maligní mobilitu. Bylo zjištěno, že lykorin inhibuje nejen proliferaci, ale i migraci, invazi a přežití různých buněčných linií PCa, indukuje apoptózu a buněčnou smrt a dokáže zvrátit proces epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) nádorových buněčných linií prostaty.

Akutní myeloidní leukémie (AML) představuje skupinu agresivních hematologických malignit, jejichž léčba zaujímá prioritní postavení, vzhledem k vysoké úmrtnosti, ve výzkumu leukémie. Léčba za pomoci léku s obsahem lykorinu vedla ve studii Liu et al. (2009) k inhibici přežívání a indukci apoptózy u lidských leukemických buněčných linií. Klíčovým mechanismem usmrcení leukemických buněk je aktivace apoptózy pomocí tzv. receptorů smrti (DRs) nebo prostřednictvím mitochondriálních drah. Oba způsoby jsou zajištěny rodinou proteinů Bcl-2. Členem této rodiny je i Mcl-1, protein odvozený od leukemie myeloidních buněk 1 (Myeloid-cell leukemia 1). Mcl-1 je přísně regulovaný protein, který ochraňuje buňku před apoptózou (Menoret et al., 2010) a může hrát důležitou roli pro přežití různých nádorových buněk. Cíleným snižováním regulace Mcl-1 prostřednictvím siRNA spouští apoptózu u leukemických buněk, zatímco jeho zvýšená exprese u některých buněk přispívá k malignímu fenotypu. Liu et al. (2009) testovali lidské leukemické buněčné linie K562, U937, HL-60, 6T-CEM a K562/G01 s přidáním zvyšující se koncentrace lykorinu. Po 72 hodinách od ošetření snížil lykorin přežití všech pěti typů buněčných linií, $IC_{50} = 1,5 - 5,5 \mu M$. Životaschopnost normálních lidských buněčných linií PBMNCs nebyla významně ovlivněna, $IC_{50} > 50 \mu M$. Vliv lykorinu byl závislý nejen na dávce, ale i na době jeho působení.

Hypotézou studie Lamoral-Theys et al. (2009) ale je, že indukce apoptózy prostřednictvím lykorinu a jeho analogů není hlavním mechanismem, kterým tyto sloučeniny vykazují protinádorové účinky. Testováno bylo 22 sloučenin lykorinu pro *in vitro* protinádorovou aktivitu a to na čtyřech typech rakovinných buněčných linií, které reprezentují různé úrovně odolnosti proti pro-apoptotickým stimulům a dvou typech rakovinných buněčných liniích citlivých na tyto apoptózu indukující podněty. Jako zástupce odolných

buněk byly zvoleny modely buněčné linie glioblastomu astrogliálního původu U373, buněčné linie A549 nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC), buněčné linie karcinomu jícnu OE21 a buněčné linie lidského melanomu SKMEL-28. Jako buněčné linie citlivé na pro-apoptické podněty byly zvoleny buněčné linie anaplastického oligodendroglionu Hs683 a buněčné linie myšího melanomu B16F10. Data ukazují, že lykorin vykazuje výraznou růstovou inhibiční aktivitu vůči všem testovaným rakovinným buněčným liniím bez ohledu na to, zda jsou rakovinné buňky odolné nebo citlivé na pro-apoptické stimuly. Nicméně, aktivita byla významně ovlivněna strukturální modifikací v rámci fenanthridinového skeletu, jak bylo zjištěno pomocí hodnot IC_{50} lykorinových analogů.

Alkaloidy čeledi *Amarillidaceae* kromě cytotoxické aktivity vykazují také významné antivirové účinky. Bylo zjištěno, že narciklasin, pankratisatin a lykorin vyvíjí značné inhibiční účinky na Flaviviry a Bunyaviry a lykorin má silné antivirové účinky i na poliovirus, Coxsackie viry, Semliki forest virus, spalničky a virus Herpes simplex typu 1. Antivirový účinek lykorinu byl testován také na inhibici replikace HIV-1 na lidských T-buněčných liniích MT4, a to ve studii Szlavik et al. (2004). Kromě lykorinu byly otestovány také alkaloidy homolykorin a 2-O-acetylcholin izolované z Bledule jarní (*Leucojum vernum*) a další alkaloidy *Amaryllidaceae* haemanthamin a trisphaeridin. Cytotoxicita sloučenin v neinfikovaných buňkách byla hodnocena pomocí MTT testu a thymidinového inkorporačního testu. Antivirová aktivita byla stanovena pomocí testu antigenu p24 a testování reverzní transkriptázy na pevné fázi. Výsledky ukázaly, že alkaloidy lykorin, homolykorin, haemanthamin a trisphaeridin účinně inhibují HIV-1 replikaci *in vitro*.

Krinanová skupina, včetně alkaloidů **haemnanthaminu a haemanthidinu** byla mezi prvními ze sloučenin *Amaryllidaceae*, vykazující zajímavý cytotoxický potenciál proti nádorovým buněčným liniím. Zkoumání účinků haemanthaminu a haemanthidinu na indukci apoptózy a regulaci buněčného cyklu u lidských leukemických p-53 negativních Jurkat buněčných linií bylo primárním cílem studie Havelek et al. (2014). Testování účinků haemanthaminu a haemanthidinu probíhalo paralelně s dobře zavedenou protinádorovou léčebnou pomocí metody využívající gama záření, jako pozitivní kontrolou. Výsledky ukazují, že ošetření haemanthaminem a haemanthidinem snižuje životaschopnost buněk a mitochondriální membránový potenciál, a vede k poklesu procenta živých buněk v S fázi buněčného cyklu. Oba *Amaryllidaceae* alkaloidy hromadí buňky přednostně v G1 a G2 fázi buněčného cyklu. Ošetření haemanthaminem a haemanthidinem také indukuje apoptózu

buněk. Apoptotický účinek haemanthaminu a haemanthidinu na Jurkat leukemické buňky je výraznější než u gama záření a haemanthidin vykazoval vyšší aktivitu než haemanthamin. Na rozdíl od gama záření, expozice haemanthaminu a haemanthidinu zcela nezastavila buněčný cyklus 24 hodin Jurkat leukemických buněk.

Haemanthamin a haemanthidin, spolu s dalším *Amaryllidaceae* alkaloidem krinanového typu bulbisperminem a jeho kongenery, byly testovány ve studii Luchetti et al. (2012) na cytotoxickou aktivitu u apoptóze-rezistentních gliových buněk. Autoři již dříve zjistili, že některé alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*, jako je narciklasin nebo lykorin, neindukují apoptózu v rakovinných buňkách, ale vykazují spíše cytostatické účinky cílením na aktinový cytoskelet. Cílem studie bylo prokázat obdobné účinky i u alkaloidů již zmíněných. Inhibice růstu buněčných linií byla měřena kolorimetricky pomocí testu MTT a to u pěti buněčných linií. Ty zahrnovaly dva modely odolné vůči pro-apoptickým stimulům: lidské U373 a T98G buněčné linie glioblastomu (GBM, astrogliálního původu), dva modely k apoptóze citlivých buněčných linií: lidské buněčné linie Hs683 anaplastického oligodendrogliomu a buněčné linie HeLa lidského cervikálního adenokarcinomu a jeden model buněčných linií U87 lidského glioblastomu, u kterých nebyla rezistence k apoptóze doposud testována. Výsledky ukázaly, že vybrané látky bulbispermin, haemanthamin, haemanthidin, a syntetické deriváty bulbisinu nerozlišují mezi rakovinnými buněčnými liniemi na základě jejich citlivost k apoptóze, a že alkaloid bulbispermin výrazně zvyšuje hladinu polymerovaného aktinu v buňkách gliomu Hs683, což naznačuje žádoucí cytostatické účinky bulbisinu cílením na aktinový cytoskelet nádorových buněk.

Çitoğlu et al. (1998) testovali ve své studii protizánětlivé účinky haemanthidinu a lykorinu, izolovaných z rostliny *Sternbergia clusiana* čeledi *Amaryllidaceae*. Testování probíhalo metodou karagenanem indukovaného otoku zadních tlapek u šesti myší v každé skupině. Jako referenční protizánětlivý přípravek byl použit Indomethacin. Bylo vypočteno procento inhibice otoku. Při dávce 25 mg/kg inhiboval lykorin otok z 5,7 % a haemanthidin z 23,8 %, při dávce 50 mg/kg inhiboval lykorin otok z 11,4 % a haemanthidin z 30,1 % a při dávce 100 mg/kg inhiboval lykorin otok z 20,1 % a haemanthidin z 36,5 %. Výsledky ukazují vysoký protizánětlivý účinek haemanthidinu a v koncentraci 100 mg/kg byl jeho protizánětlivý účinek dokonce vyšší než u Indomethacinu, jehož hodnoty byly 20,2 % při 25 mg/kg, 27,4 % při 50 mg/kg a 29,1 % při 100 mg/kg.

10 Závěr

Cílem práce bylo otestovat vybrané alkaloidy z čeledi *Amarillidaceae* na jejich možnou anti-proliferační aktivitu *in vitro* na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2, H-29 a na normálních střevních buňkách FHs 74 Int. Ze 17 testovaných alkaloidů vykazovaly dobrou anti-proliferační aktivitu a zároveň selektivitu k nádorovým buněčným liniím zejména tři alkaloidy. Konkrétně haemanthamin, haemanthidin a lykorin, všechny z rostliny *Zephyranthes robusta*. Dobrých, avšak o něco horších výsledků, než u již zmíněných alkaloidů, bylo dosaženo u alkaloidu bufanisinu z rostliny *Nerine bowdenii*. Tyto alkaloidy dosahovaly podobných hodnot jako k léčbě nádorových onemocnění již využívaný vinorelbin, který byl použit jako kontrola. Zároveň ale byly výrazně šetrnější ke zdravým buňkám střevního epitelu, což by mohlo způsobovat menší poškození okolní tkáně při léčbě nádoru. Než ale bude možné jejich využití jako léčebného preparátu, je třeba dalšího rozsáhlého testování.

11 Seznam použité literatury

Abrahámová J., Boublíková L., Kordíková D. 2000. Rakovina tlustého střeva a konečníku. Praha. Nakladatelství TRITON, s.r.o. 20 s. ISBN 80-7254-133-1.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Garland Science. New York. ISBN-10: 0-8153-3218-1.

Ali I., Rahis-Uddin, Salim K., Rajora A. K., Rather M. A., Wani W. A., Haque A. 2011. Advances in Nano Drugs for Cancer Chemotherapy. Current Cancer Drug Targets 11 (2), 135-146.

Altaner Č. 2008. Buněčná a molekulární biologie rakoviny. Praha. Radix. 127 s. ISBN 978-80-86031-85-9.

Artursson P., Karlsson J. 1991. Correlation between oral drugs absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 175(3), 880-885.

Ballinger S. W., Patterson C., Knight-Lozano C. A., Burow D. L., Conklin C. A., Hu Z., Reuf J., Horaist C., Lebovitz R., Hunter G. C. 2002. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. Circulation 106, 544-549.

Bertram J. S. 2000. The molecular biology of cancer. Molecular Aspects of Medicine 21, 167-223.

Boit H.-G. 1956. Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). Chemische Berichte 89, 1129-1134.

Brandtzaeg P., Haraldsen G., Rugtveit J. 1997. Immunopathology of human inflammatory bowel disease. Springer 18 (4), 555-589.

Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kuča K., Opletal L. 2013. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. Natural Product Communications 8/11, 1541-1544.

- Cai H., Harrison D. G. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research* 87, 840-844.
- Cao Z. F., Yang P., Zhou Q. S. 2013. Multiple biological functions and pharmacological effect of lycorine. *Science China-Chemistry* 56 (10), 1382-1391.
- Chen D., Cai J., Cheng J., Jing CH., Yin J., Jiang J., Peng Z., Hao X. 2015. Design, Synthesis and Structure-Activity Relationship Optimization of Lycorine Derivatives for HCV Inhibition. *Scientific Reports* 5.
- Cho K. R., Vogelstein B. 1992. Genetic alterations in the adenoma–carcinoma sequence. *Cancer* 70, 1727-1731.
- Cho Y. S., Park S. Y., Shin H. S., Chan F. K. M. 2010. Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. *Molecules and Cells* 29 (4), 327-332.
- Cholesterol Treatment Trialists, C. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *The Lancet* 380, 581-590.
- Cibula D., Petruželka L. 2009. *Onkogynekologie*. Praha. Grada. 616 s. ISBN 978-80-247-2665-6.
- Curran M. P., Plosker G. L. 2002. Vinorelbine - A review of its use in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *Drugs & Aging* 19 (9),695-731.
- Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L. 2013. Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* 107, 701-708.
- Dienstbier Z., Skala E. 2014. *Co bychom měli vědět o rakovině*. Praha. Liga proti rakovině Praha. 48 s. ISBN 978-80-260-7710-7.
- Dienstbier Z., Stáhalová V. 2012. *Onkologie pro laiky*. Praha. Liga proti rakovině Praha. 129 s. ISBN 978-80-86031-65-1.

- Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L. 2015. Cytotoxic activities of *Amaryllidaceae* alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 13, 394-398.
- Ellis B. W. 2001. *Taylor's Guide to Bulbs: How to Select and Grow 480 Species of Spring and Summer Bulbs*. New York. Houghton Mifflin Company. 420 s., ISBN-13: 978-0618068906.
- Elmastaş M., Gülçin İ., Beydemir Ş., İrfan Küfrevioğlu Ö., ABOUL-ENEIN H. Y. 2006. A study on the *in vitro* antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis L.*) fruit extracts. *Analytical letters* 39, 47-65.
- Faguet G. B. 2015. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer* 136, 2022-2036.
- Fang Y.-Z., Yang S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Forgo, P., Hohmann, J. 2005. Leucovernine and Acetylleucovernine, Alkaloids from *Leucojum vernum*. *Journal of Natural Products* 68, 1588.
- Frei E., Karon M., Levin R. H., Freireich E. J., Taylor R. J., Hananian J., Selawry O., Holland J. F., Hoogstra B., Wolman I. J., Abir E., Sawitsky A., Lee S., Mills S. D., Burgert E. O., Spurr C. L., Patterso R. B., Ebaugh F. G., James G. W., Moon J. H. 1965. Effectiveness of Combinations of Antileukemic Agents in Inducing and Maintaining Remission in Children with Acute Leukemia. *Blood – The Journal of Hematology* 26 (5), 642.
- Geriyol P., Basavanneppa H. B., Dhananjaya B. L. 2015. Protectig effect of caffeine against vinblastine (an anticancer drug) induced genotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology* 38 (2), 188-195.
- Grajek W., Olejnik A. 2004. Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 13 (54), 5-24.
- Greenwald P., Dunn B. B. 2009. Landmarks in the History of Cancer Epidemiology. *Cancer Research* 69 (6), 2151-2162.

- Griendling K. K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research* 86, 494-501.
- Gutkind L., Kennedy P. 2013. *An Immense New Power to Heal: The Promise of Personalized Medicine*. Under Press. 320 s. ISBN 978-1937163068.
- Gülçin İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11, 210-218.
- Hajdu S. I. 2011. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer* 117, 1097-1102.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet* 344, 721-724.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology* 186, 1-85.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2015. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, USA.
- 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 (4), 479-490.
- Heunks L. M. A., Dekhuijzen P. N. R. 2000. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. *Thorax* 55, 704-716.
- Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regårdh C. G., Lipka E., Amidon G. L., Langguth P. 1999. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *Journal of Pharmaceutical sciences*. 89 (1), 63-75.
- Ho J. W. S., Cheung M. W. M. 2014. Combination of Phytochemicals as Adjuvants for Cancer Therapy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 9 (3), 297-302.

Hu M. C., Peng S. H., He Y. D., Qin M., Cong X. N., Xinh Y. J., Liu M. Y., Yi Z. F. 2015. Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget* 6 (17), 15348-15361.

Jesh E. D., Seo J. M., Carr T. P., Lee J.-Y. 2009. Sitosterol reduces messenger RNA and protein expression levels of Niemann-Pick C1-like 1 in FHs 74 Int cells. *Nutrition Research* 29, 859-866.

Kasper H., Burghardt W. 2015. *Výživa v medicíně a dietetika* (11. ed.). Praha. Grada. 592 s. ISBN: 978-8024745336 .

Kilgore M. B., Augustin M. M., Starks C. M., O'Neil-Johnson M., May G. D., Crow J. A., Kutchan T. M. 2014. Cloning and Characterization of a Norbelladine 49-O-Methyltransferase Involved in the Biosynthesis of the Alzheimer's Drug Galanthamine in *Narcissus sp. aff. pseudonarcissus*. *Plos one* 9 (7).

Kitnar O., *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. 2011. Praha. Grada. 790 s. ISBN 978-80-247-3068-4.

Klener P. jr., Klener P. 2013. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha. Grada. 200 s. ISBN 978-80-247-4171-0.

Klockner J., Pont J., Schumer J., Pruger J., Kienzer H. 1991. Carboplatin, methotrexate and vinblastin (Carbo-MV) for advanced urothelial cancer – A phase-II Trial. *American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials* 14 (4), 328-330.

Kobza F. 2009. *Rychlení cibulovin, hlíznatých květín a dřevin*. Praha. Grada. 93 s. ISBN 978-80-247-2619-9.

Krška Z., Hoskovec D., Petruželka L. 2014. *Chirurgická onkologie*. Praha, Grada. 904 s. ISBN 978-80-247-4284-7.

Kuchynka P. 2007. *Oční lékařství*. 1.vyd. Praha. Grada. 768 s. ISBN 978-80-247-1163-8.

Kufe D. W., Pollock R. E., Weichselbaum R. R., Bast R. C., Gansler T. S., Holland J. F., Frei, E. 2003. *Holland-Frei cancer medicine*.

Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., KUNEŠ J., Opletal L. 2013. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and Their Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. *Chemistry & Biodiversity* 10, 1120-1127.

Kulp M., Bragina O. 2013. Capillary electrophoretic study of the synergistic biological effects of alkaloids from *Chelidonium majus* L. in normal and cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 3391-3397.

Lamoral-Theys D., Andolfi A., van Goietsenoven G., Cimmino A., La Calve B., Wauthoz N., Megalizzi V., Gras T., Bruyere C., Dubois J., Matheu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A. 2009. Lycorine, the Main Phenanthridine *Amaryllidaceae* Alkaloid, Exhibits Significant Antitumor Activity in Cancer Cells That Display Resistance to Proapoptotic Stimuli: An Investigation of Structure-Activity Relationship and Mechanistic Insight. *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (20), 6244-6256.

Laryšová A., Endlová L., Vrbovský V., Navrátilová Z. 2015. Analýza alkaloidů v makovině metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. *Chemické listy* 109, 229-234.

Laursen J. B., Somers M., Kurz S., Mccann L., Warnholtz A., Freeman B. A., Tarpey M., Fukai T., Harrison D. G. 2001. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103, 1282-1288.

Lee C.-T., Huang Y.-W., Yang C.-H., Huang K.-S. 2015. Drug Delivery Systems and Combination Therapy by Using Vinca Alkaloids. *Current Topic in Medicinal Chemistry* 15 (15), 1491-1500.

Li H., Horke S., Förstermann, U. 2013. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences* 34, 313-319.

Li H., Horke S., Förstermann, U. 2014. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 237(1). 208-219.

Li L., Dai H. J., Ye M., Wang S. L., Xiao X. J., Zheng J., Chen H. Y., Luo Y. H., Liu J. 2012. Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition. *Cancer Cell International* 12 (49).

- Liu X. S., Jiang J. K., Jiao X. Y., Wu Y. E., Lin J. H., Cai Y. M. 2009. Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Letters* 274 (1), 16-24.
- Lipská L., Visokai V. 2009. Recidiva kolorektálního karcinomu: komplexní přístup z pohledu chirurga. Praha. Grada. 431 s. ISBN 978-80-247-3026-4.
- Luchetti G., Johnston R., Mathieu V., Lefranc F., Hayden K., Andolfi A., Lamoral-Theys D., Reisenauer M. R., Champion C., Pelly S. C., van Otterlo W. A. L., Magedov I. V., Kiss R., Evidente A., Rogelj S., Kornienko A. 2012. Bulbispermine: A Crinine-Type *Amaryllidaceae* Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity toward Apoptosis-Resistant Glioma Cells. *CHEMMEDCHEM* 7 (5), 815-822.
- Lukáš K. 2005. Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry. 1. vyd. Praha. Grada. 288 s. ISBN 80-247-1283-0.
- Lüllmann H., Mohr K., Hein L. 2007. Barevný atlas farmakologie. Praha. Grada. 372 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. 2004. Farmakologie a toxikologie. Praha. Grada. 725 s. ISBN 80-247-0836-1.
- MacLean, I., Lowdell, M., Blake, D., Lunec, J., Archer, J. 1992. Absence of a specific effect of free radicals on HLA-B27. *Annals of the rheumatic diseases*. 51(8). 963-964.
- Mačák J., Mačáková J. 2004. Patologie. Praha. Grada. 347 s. ISBN 978-80-247-0785-3.
- Mahmood Z., Shukla Y. 2010. Death receptors: Targets for cancer therapy. *Experimental Cell Research* 316 (6), 887-899.
- Martínková J. 2007. Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Praha. Grada. 380 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
- Menoret E., Gomez-Bougie P., Surget S., Trichet V., Oliver L., Pellat-Dedeunynck C., Amiot M., 2010. Mcl-1 (128-350) fragment induces apoptosis through direct interaction with Bax. *FEBS Letters* 584 (3), 487-492.

- Nakamura Y., Ishigaki Y. 2014. Immunostaining and time-lapse analysis of vinblastine-included paracrystal formation in human A549 cells. *Oncology Letters* 8 (6), 2387-2392.
- Navab M., Ananthramaiah G. M., Reddy S. T., Van Lenten B. J., Ansell B. J., Fonarow G. C., Vahabzadeh K., Hama S., Hough G., Kamranpour N. 2004. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis the oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of lipid research* 45, 993-1007.
- Nowell P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Ohara Y., Peterson T. E., Harrison, D. G. 1993. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *Journal of Clinical Investigation* 91, 2546.
- Oktábec Z., Jampílek J. 2013. Stručná historie chemoterapie. *Chem. listy* 107, 151-159.
- Olson J. S. 1989. *The History of Cancer: An Annotated Bibliography*. New York. Greenwood Press. 426 s. ISBN 0313258899.
- Pavlick K. P., Laroux F. S., Fuseler J., Wolf R. E., Gray L., Hoffman J., GRISHAM, M. B. 2002. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 311-322.
- Pietta P.-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* 63, 1035-1042.
- Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.-D., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assamann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biology of the Cell*. 47 (3), 323-330.
- Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., GABAI V. L. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 283, 1-16.
- Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international* 2014.

- Rahman A. ur. 1998. *Studies in Natural Products Chemistry: Structure and Chemistry (Part F)*. Elsevier. 1364 s. ISBN: 978-0-444-50105-9.
- Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Rybka J. 2007. *Diabetes mellitus - komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy*. 1. vyd. Praha. Grada. 317 s. ISBN 978-80-247-1671-8.
- Scarpa E.-S., Ninfali P. 2015. Phytochemicals as Innovative Therapeutic Tools against Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (7), 15727-15742.
- Schutz F. A. B., Bellmunt J., Rosenberg J. E., Choueiri T.K. 2011. Vinflunine: drug safety evaluation of this novel synthetic vinca alkaloid. *Expert Opinion on Drug Safety* 10 (4), 645-653.
- Shukla S., Meeran S. M., Katiyar S. K. 2014. Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Cancer Letters* 355, 9–17.
- Skala E. 2015. *Rakovina tlustého střeva*. Praha. Liga proti rakovině Praha. 24 s. ISBN 80-239-3597-6.
- Slezáková L. 2010. *Ošetřovatelství v chirurgii II*. 1. vyd. Praha. Grada. 268 s. ISBN 978-80-247-3130-8.
- Souček M., Špinar J., Svačina P. 2005. *Vnitřní lékařství pro stomatology*. 1. vyd. Praha. Grada. ISBN 80-247-1367-5.
- Spitz D. R., Azzam E. I., Li J. J., Gius D. 2004. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews* 23, 311-322.
- Stanger B. Z. 1996. Looking beneath the surface: The cell death pathway of Fas/APO-1 (CD95). *Molecular Medicine* 2 (1), 7-22.
- Svoboda V., Filip S. 2004. *Protinádorová léčba – CHEMOTERAPIE: přínos vaší aktivní spolupráce*. 3. dopl. vyd., Granet HK spol. s.r.o., Hradec Králové. 38 s. ISBN 80-902574-2-9.

Szlavik L., Gyuris A., Minarovits J., Forgo P., Molnar J, Hohmann J. 2004. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Planta Medica* 70 (9), 871-873.

Šídlová P., Podlipná R., Vaněk T. 2011. Cytostatická léčiva v životním prostředí. *Chem. listy* 105, 8-14.

Takos A. M., Rook F. 2013. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of *Amaryllidaceae* Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 11713-11741.

Tan G., Gyllenhaal C., Soejarto D. D. 2006. Biodiversity as a Source of Anticancer Drugs. *Current Drugs Targets* 7 (3), 265-277.

Tanida S., Mizoshita T., Mizushima T., Sasaki M., Shimura T., Kamiya T., Kataoka H., Joh, T. 2011. Involvement of oxidative stress and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in inflammatory bowel disease. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 48, 112-116.

Taylor P. G., Cesari I. M., Arsenak M., Ballen D., Abad M. J., Fernandez A., Milano B., Ruiz M. C., Williams B., Michelangeli F. 2006. Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. *Pharmaceutical Biology* 44 (5), 349-362.

Thatte U., Bagadey S., Dahanukar S. 2000. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cellular and Molecular Biology* 46 (1), 199-214.

Tiwari A. K., Roy H. K. 2011. Progress against cancer (1971–2011): How far have we come? *Journal of Internal Medicine* 271, 392-399.

Tsuruo T., Iida H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. 1981. Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia *in Vivo* and *in Vitro* through Enhanced Cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil. *Cancer research* 41, 1967-1972.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.

- Velíšek J., Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin 2*, 3. vydání. Tábor. Nakladatelství OSSIS. 664 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- Vogelstein B., Sur S., Prives C. 2010. p53: The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers. *Nature Education* 3(9).
- Vokurka M. 2014. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. Praha. Karolinum. 306 s. ISBN 978-80-246-2032-9.
- Vorlíček J. Abrahámová J., Vorlíčková H. 2012. *Klinická onkologie pro sestry: 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha. Grada. 450 s. ISBN 978-80-247-3742-3.
- White C. R., Darley-USmar V., Berrington W. R., McAdams M., Gore J. Z., Thompson J. A., Parks D. A., Tarpey M. M., Freeman, B. A. 1996. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 8745-8749.
- Wong C., Ustunol Z. 2006. Mode of Inactivation of Probiotics Bacteria Affects Interleukin 6 and Interleukin 8 Production in Human Intestinal Epithelial-like Caco-2 Cells. *Journal of Food Protection*. 69, 2285-2288.
- Yan M. H., Wang X., Zhu, X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 90-101.
- Zakeri Z. F., Ahuja H. S. 1997. Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. *Mutation Research-fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 396, 149-161.
- Žák A., Macášek J. 2011. *Ateroskleróza: nové pohledy*. 1. vyd. Praha. Grada. 20 s. ISBN 978-80-247-3052-3.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Časové porovnání poznatků o rakovině s historickými milníky	21
Tabulka 2: Přehled hlavních skupin cytostatik	25
Tabulka 3: Rozdělení cytostatik podle mechanismu účinku	25
Tabulka 4: Výsledky cytotoxicity	46

Seznam obrázků

Obrázek 1: Haemanthamin, haemanthidin, hamayn.....	38
Obrázek 2: Galanthamin.....	38
Obrázek 3: Galanthin, 9-O-demethylgalanthin.....	38
Obrázek 4: Lycorin.....	38
Obrázek 5: Tazettin.....	39
Obrázek 7: Chlidanthin.....	39
Obrázek 8: Undulatin	39
Obrázek 9: Krinin.....	40
Obrázek 10: Bufanamin.....	40
Obrázek 11: Acetylkaranin.....	40
Obrázek 12: Karanin.....	40
Obrázek 13: Bufanisin.....	40
Obrázek 14: Vinorelbine ditartrate salt hydrate.....	41

Seznam grafů

Graf 1: Cytotoxický účinek haemanthaminu na buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int..	47
Graf 2: Cytotoxický účinek lycorinu na buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int..	48
Graf 3: Cytotoxický účinek haemanthidinu na buňky Caco-2, HT-29 a FHs 74 Int..	49