

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



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

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Barbora Čížková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

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

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "*In vitro* anti-proliferační aktivita polosyntetických analog 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 13. 4. 2017

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph. D. za odborné vedení práce, vstřícnost při konzultacích a cenné rady, díky nimž se mi podařilo tuto práci zkompletovat. Dále bych ráda poděkovala týmu ADINACO Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, který pod vedením doc. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph. D. připravil analoga alkaloidů pro tuto práci. V neposlední řadě patří dík i mé rodině za pomoc a podporu nejen při psaní této práce.

# ***In vitro* anti-proliferační aktivita polosyntetických analog alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae***

## **Souhrn**

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí, v rámci celého světa se jedná až o 8,2 milionu pacientů ročně (údaj z roku 2012). Předpoklad do budoucna hovoří o nárůstu případů onkologických onemocnění až o 75 %. Alkaloidy rostlin *Amaryllidaceae* jsou z předchozích výzkumů známy svou anti-proliferační aktivitou, kterou lze využít v léčbě nádorových onemocnění. Synteticky připravené alkaloidy mohou taktéž vykazovat biologickou aktivitu a jejich úpravou lze účinky látek původních zvýšit.

Z tohoto důvodu se i tato práce věnuje testování anti-proliferační aktivity polosyntetických analog. Výzkum byl prováděn pomocí testu MTT na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 v porovnání se zdravou střevní buněčnou linií FHs 74Int. Testováno bylo celkem 24 synteticky připravených alkaloidů, které byly porovnávány se standardem vinorelbinem, což je alkaloid v léčbě nádorových onemocnění již využívaný.

Z 24 vzorků, které byly testovány, pouze u analog skulerinu jeho tři rozdílná analoga dosáhla hodnot  $IC_{50}$   $7,24 \pm 0,37 \mu M$ ,  $8,62 \pm 0,86 \mu M$  a u třetího z nich se jednalo o hodnoty  $1,98 \pm 0,55 \mu M$  vůči buněčné linii Caco-2. U buněčné linie HT-29 byla zaznamenána hodnota  $IC_{50} > 10 \mu M$ . Žádný efekt nebyl zaznamenán ani na zdravé buněčné linii FHs 74Int. Z dosažených hodnot je patrné, že analoga skulerinu mají selektivní účinek vůči nádorovým buněčným liniím na rozdíl od ostatních vzorků, které vykazovaly hodnoty  $IC_{50}$  pro všechny buněčné linie  $IC_{50} > 10 \mu M$ .

Analoga skulerinu se jeví jako potencionálně účinné látky, které jsou vhodné pro další podrobné testování jejich protinádorového účinku.

**Klíčová slova:** cytotoxicita, buněčné linie, Caco-2, HT-29, alkaloidy, *Amaryllidaceae*, analoga

# ***In vitro* antiproliferative activity of semi-synthetic analogues alkaloid from the plant family *Amaryllidaceae***

## **Summary**

Oncological diseases are one of the leading causes of death, throughout the whole world it is up to 8.2 million patients a year.(as of 2012). There is a hypothesis for the future, that the incidence of cancer will increase by 75 %. Alkaloids of *Amaryllidaceae* family are known from the previous research for its anti-proliferative activity which can be used in treatment of oncological diseases. Synthetically prepared alkaloids can also exhibit a biological activity and it is possible to increase the effect by modifying the original substance.

This is the reason why the aim of this thesis focuses on testing the anti-proliferative activity of semisynthetic analogues. This research was carried out by MTT test against cell line of colorectal carcinoma Caco-2 and HT-29 in comparison with healthy intestinal cell line FHs 74Int. Altogether it was tested 24 synthetically prepared alkaloids that were compared to the standard vinorelbine which is already used in cancer treatment.

Only three different analogues of scoulerine from 24 tested samples reached the values of  $IC_{50}$   $7.24 \pm 0.37 \mu\text{M}$ ,  $8.62 \pm 0.86 \mu\text{M}$  and  $1.98 \pm 0.55 \mu\text{M}$  against the colorectal carcinoma cell line Caco-2. Against the colorectal carcinoma cell line HT-29 was measured the value of  $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ . Moreover, there was registered no activity against healthy intestinal cell line FHs 74Int. The obtained results show selective effect of scoulerine analogues against cancer cell lines unlike the rest of tested samples which exhibit the value of inhibition concentration for all the cell lines  $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ .

The analogues of scoulerine appear to become potentially active substances which are suitable for further detailed research of their antitumor effect.

**Keywords:** cytotoxicity, cell lines, Caco-2, alkaloids, *Amaryllidaceae*, analogues

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Nádorová onemocnění .....</b>	<b>5</b>
3.1.1	Příčiny vzniku nádoru.....	6
<b>3.2</b>	<b>Nádorové buňky .....</b>	<b>8</b>
3.2.1	Apoptóza.....	9
3.2.2	Nekróza.....	9
<b>3.3</b>	<b>Léčba nádorových onemocnění .....</b>	<b>11</b>
3.3.1	Historie .....	11
3.3.2	Deriváty přírodních látek.....	11
3.3.3	Druhy léčby .....	13
3.3.3.1	Kurativní (radikální) léčba .....	15
3.3.3.2	Nekurativní léčba .....	15
<b>3.4</b>	<b>Alkaloidy .....</b>	<b>16</b>
3.4.1	Charakteristika.....	16
3.4.2	Využití alkaloidů v medicíně.....	16
3.4.3	Anti-proliferační aktivita alkaloidů .....	18
3.4.4	Alkaloidy indukující apoptózu .....	19
<b>3.5</b>	<b>Čeľad' <i>Amaryllidaceae</i> a její alkaloidy .....</b>	<b>20</b>
3.5.1	Charakteristika čeledi .....	20
3.5.2	Biosyntéza alkaloidů .....	20
3.5.3	Využití v praxi .....	22
3.5.4	Typy alkaloidů.....	22
3.5.4.1	Lykorinový typ .....	22
3.5.4.2	Homolykorinový typ.....	25
3.5.4.3	Galanthaminový typ.....	25
3.5.4.4	Haemanthaminový a krinanový typ .....	26
3.5.4.5	Tazettinový typ .....	27
3.5.4.6	Pankratistatinový typ .....	28
3.5.5	Syntetické deriváty alkaloidů .....	30
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>33</b>

<b>4.1</b>	<b>Materiál.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Kultivace buněčných linií.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Cytotoxicita (MTT).....</b>	<b>35</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistické vyhodnocení .....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>45</b>
<b>9</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>46</b>

# 1 Úvod

Onkologická onemocnění jsou jedny z nejčastějších příčin úmrtí v rozvinutých zemích a podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny se předpokládá v rozvinutých zemích světa do roku 2030 zvýšení výskytu nádorových onemocnění o více než 75 %. Celosvětově se počet úmrtí dle dat WHO z roku 2012 pohybuje okolo 8,2 milionů pacientů ročně, v rámci Evropy se jedná o zhruba 2 miliony obětí onkologických onemocnění za rok. V České republice došlo ve stejném roce k 290 případům úmrtí vztažených na 100 000 osob. Třetím nejčastějším typem nádorového onemocnění, na nějž v České republice zemřelo v roce 2012 přibližně 40 pacientů na 100 000 obyvatel, je kolorektální karcinom. Právě na buňkách tohoto karcinomu byly testovány alkaloidy rostlin *Amaryllidaceae*, kterými se zabývá tato práce. Vývoj léků z potencionálně léčivých rostlin hraje důležitou roli v léčbě nádorových onemocnění a představuje podstatnou část nových léčiv využitých během posledních 50 let, kdy jsou k tomuto využívány především sekundární metabolity rostlin a jejich deriváty.

Mezi takové patří i čeleď amarylkovité (*Amaryllidaceae*), jedná se o okrasné cibulovité rostliny, jejichž výskyt je typický pro tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky a zároveň jsou rovněž velmi hojně pěstovány k okrasným účelům i v České republice, především narcisy (*Narcissus*), bledule (*Leucojum*) a sněženky (*Galanthus*).

V současné době je výzkum zaměřen na izolaci nových alkaloidů z této čeledi a přípravu nových polosyntetických derivátů, které by mohly zvyšovat jejich účinnost při léčbě nádorových onemocnění.



## 2 Cíl práce

Cílem práce je otestování polosyntetických analog 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 normálních střevních buněk buněčné linie FHs 74Int.

Hypotézou je, že některé látky mají silnou anti-proliferační aktivitu a jsou tedy vhodnými kandidáty pro návazný farmaceutický výzkum.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Nádorová onemocnění

Onkologická onemocnění jsou jedny z nejčastějších příčin smrti v rozvinutých zemích a bohužel se jejich narůstající počet zdá být nevyhnutelný. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny, která spadá pod WHO, se předpokládá v rozvinutých zemích světa do roku 2030 zvýšení výskytu rakoviny o více než 75 %. Ačkoli byly v posledních letech učiněny pokroky v chápání i léčbě rakoviny, stále dochází k úmrtí pacientů trpících rakovinou, a to kvůli odporu rakovinných buněk k léčbě. Tyto rezistentní buňky řídí růst buněk a šíření maligních buněk do životně důležitých orgánů (Havelek *et al.*, 2014a, Mellor and Callaghan, 2008).

Přítomnost nádoru bývá posuzována dle nádorových markerů, neboli onkomarkerů, což jsou chemické substance vyskytující se v nádoru nebo produkované nádorem, popřípadě hostitelem. U zdravého jedince se tyto substance nevyskytují vůbec, nebo se jedná o mnohem nižší koncentrace v porovnání s jedincem trpícím rakovinou. Obecně bývají markery rozdělovány dle jejich biologické funkce na markery buněčných adhezí, cytokeratinové markery, enzymové markery, hormonální markery, markery sdružené s imunokompetentními a transportními procesy (Adam *et al.*, 2011, Kaušitz, 2006).

Markery, které lze měřit v periferní krvi či jiných tělních tekutinách, jsou nazývány cirkulující nádorové markery. Strukturně se tyto markery řadí mezi proteiny a glykoproteiny a jejich funkce i význam pro nádorovou buňku nejsou ve většině případů známy. Koncentrace nádorových markerů v plazmě či v tělních tekutinách je závislá na velikosti nádoru, intenzitě sekrece daného markeru buňkami a metabolické degradaci molekul markeru. V případě vyléčení jedince, tedy pokud dojde k odstranění maligní nemoci, koncentrace markerů v krvi klesnou k normě zdravého jedince, popřípadě vymizí úplně (Adam *et al.*, 2011).

Celosvětově se v letech 1990 až 2001 snížila úmrtnost na onkologická onemocnění o 17 % u lidí ve věku od 30 do 69 let, zatímco u lidí starších 70 let se úmrtnost naopak o 0,4 % zvýšila (Lopez and Murray, 1996, World Health, 2002).

### 3.1.1 Příčiny vzniku nádoru

V zemích s nízkými a středně vysokými finančními příjmy jsou hlavními příčinami úmrtí na rakovinu kouření, požívání alkoholu a nízký příjem ovoce a zeleniny. Jak je vyobrazeno v tabulce č. 1, v bohatších zemích světa se k hlavním příčinám, kouření a pití alkoholu, řadí ještě nadváha a obezita (Danaei *et al.*, 2005).

**Tabulka č. 1:** Vliv vybraných faktorů (v procentech) na úmrtnost u onkologických onemocnění (Danaei *et al.*, 2005).

	BOHATÉ ZEMĚ	CHUDÉ A STŘEDNĚ BOHATÉ ZEMĚ	CELOSVĚTOVĚ
Kouření	29	18	21
Alkohol	4	5	5
Nízká konzumace ovoce a zeleniny	3	6	5
Nadváha a obezita	3	2	2
Nedostatek pohybové aktivity	2	2	2

Buňky lidského těla jsou nepřetržitě vystavovány oxidačnímu stresu. Tento oxidační stres je způsoben působením volných radikálů, které jsou exogenního a endogenního původu. Volné radikály se vyskytují ve dvou základních formách, volné kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Species; ROS) a volné dusíkové radikály (Reactive Nitrogen Species; RNS). K volným radikálům bývá řazen i singletový kyslík, peroxid vodíku a kyselina chlorná. Exogenní a environmentální zdroje oxidace se vztahují k expozici organismu ionizujícímu záření, mezi něž patří  $\gamma$ -záření, rentgenové záření nebo kosmické záření. Dále se k exogenním vlivům řadí  $\alpha$ -částice radonové přeměny, oxidující chemikálie a UVA sluneční záření. Mezi endogenní neboli intracelulární faktory jsou řazeny vlivy přírodního původu počínající u buněčné signalizace a u metabolických procesů během zánětu končící (Altieri *et al.*, 2008, Cadet *et al.*, 2010, De Bont and Van Larebeke, 2004, Sedelnikova *et al.*, 2010).

Poškození DNA způsobené endogenními faktory může často dosahovat horších následků než při působení vlivů exogenních, jako například vystavení organismu působení nízkých dávek ionizující radiace, která významně přispívá k akumulaci mutací v buňkách a tkáních (Epe, 2002, Jackson and Loeb, 2001, Pollycove and Feinendegen, 2003). Častější bývá poškození pomocí reaktivních forem kyslíku a reaktivními formami dusíku, které mohou

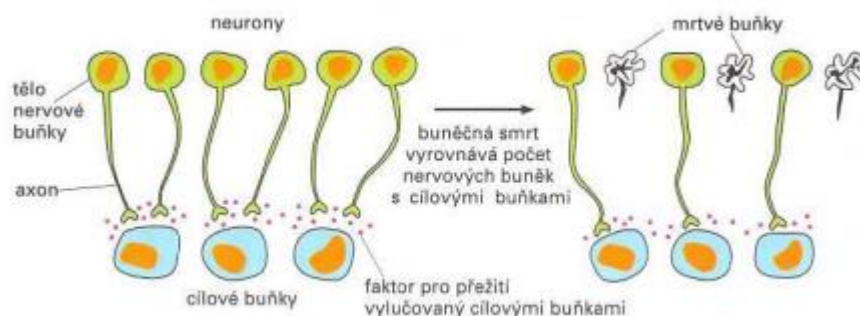
indukovat primární poškození buněk. ROS/RNS vznikají na intracelulární úrovni jako přirozený vedlejší produkt oxidativního metabolismu buněk. Jedním z producentů jsou i mitochondrie, kdy jsou ROS produkovány jako vedlejší produkt respirace (1 - 5 % spotřebovaného O<sub>2</sub>). Mitochondrie jsou brány jako hlavní zdroj kontinuální produkce volných radikálů, které jsou obvykle podceňovány kvůli chronické expozici podnětovým faktorům zapříčiňujícím vznik volných radikálů (Georgakilas *et al.*, 2010). Například v případě viru hepatitidy vzniká spojení mezi chronickou infekcí a indukcí oxidačního stresu. U různých skupin je množství virů spojováno se zvýšeným oxidačním stresem, poškozením DNA a mírou mutagenity. Tento vysoký intracelulární stav oxidace virových infekcí je způsoben klesajícím počtem antioxidantních enzymů, jako jsou katalázy, glutathionperoxidázy, stejně tak i vysokou hladinou hydroxylových radikálů. Přestože existují četné rozdíly mezi exogenním a endogenním poškozením buňky, ale tou hlavní odlišností je míra a složitost poškození DNA (Cadet *et al.*, 2010, Epe, 2002, Georgakilas, 2008, Georgakilas *et al.*, 2010, Jackson and Loeb, 2001, Lim *et al.*, 2008, Pollycove and Feinendegen, 2003, Sedelnikova *et al.*, 2010). Negativní působení volných radikálů, označované pojmem oxidační stres, bývá často primární příčinou vzniku celé řady onemocnění, mezi nimiž hrají podstatnou roli onemocnění nádorová (Li *et al.*, 2013, Yan *et al.*, 2013).

## 3.2 Nádorové buňky

Většina klinicky se projevujících nádorů má svůj původ v transformovaných normálních buňkách člověka. Mnoho z identifikovaných nádorových antigenů má navíc MHC (z anglického. Major Histocompatibility Complex, tedy hlavní histokompatibilní komplex) asociované peptidové fragmenty shodné s vlastními proteiny, což přináší problémy ohledně optimální stimulace T-lymfocytů proti nádorovým buňkám v prevenci i při léčbě. Úsilí vyvinout účinnou nádorovou terapii pomocí T-lymfocytů je pak tedy velmi obtížné a pomalé (de Aquino *et al.*, 2015).

Rakovinné buňky bývají charakterizovány především následujícími dědičnými vlastnostmi. První z nich je možnost rozmnožování rakovinných buněk bez přítomnosti podnětů k dělení. Buňky vykazující tuto vlastnost nadměrně proliferují, avšak zůstávají hromadně ve shlucích na jednom místě. Je zde možnost vytvoření nádoru, který bývá v tomto případě označován jako benigní, tedy jej lze obvykle chirurgicky kompletně vyjmout. Druhou vlastností je schopnost rakovinných buněk kolonizovat oblasti, které jsou vyhrazené pro specifické buňky. V případě schopnosti buněk pronikat do okolní tkáně může docházet k vzniku nádorů maligních. Ty se mohou od primárního nádoru osamostatnit a vstoupit do krevního či lymfatického řečiště a poté vytvářet nádory sekundární (metastázy) na dalších místech těla. Kombinací těchto dvou vlastností typických pro rakovinné buňky dochází ke vzniku nádorového onemocnění (Alberts *et al.*, 1998).

To spočívá ve dvou typech poruch, kdy je apoptóza, proces vyznačující se zvláštními morfologickými charakteristikami a biochemickými mechanismy, závislá na podnětech buněk celého organismu, čímž je zajištěno přežívání buněk pouze na potřebných místech a ve správný čas (Elmore, 2007). Ve tkáních dospělého člověka tak buněčná smrt vyvažuje buněčnou proliferaci, je tedy díky zmíněným procesům zabráněno jak nadměrnému růstu tkáně, tak i jejímu zmenšování. Buňky odumírající v důsledku akutního poranění většinou zvětšují svůj objem, praská jejich jádro, organely i plazmatická membrána a vylévají buněčný obsah do svého okolí a způsobují tak zánětlivou reakci (Wyllie *et al.*, 1980). Tento proces bývá nazýván nekrózou buněk, blíže specifikovanou v kapitole 3.2.2. Opačným případem jsou buňky, které procházejí programovanou buněčnou smrtí, při níž dochází k vymírání buněk plánovaně bez poškozování svých sousedů. Takto je popsán průběh apoptózy (podrobněji popsané v kapitole 3.2.1), při níž se buňka zmenšuje a kondenzuje (Alberts *et al.*, 1998).



**Obrázek č. 1:** Příklad buněčné smrti u nervových buněk, kdy je množství vyvíjejících se nervových buněk přizpůsobeno díky buněčné smrti počtu buněk cílových (Alberts *et al.*, 1998).

### 3.2.1 Apoptóza

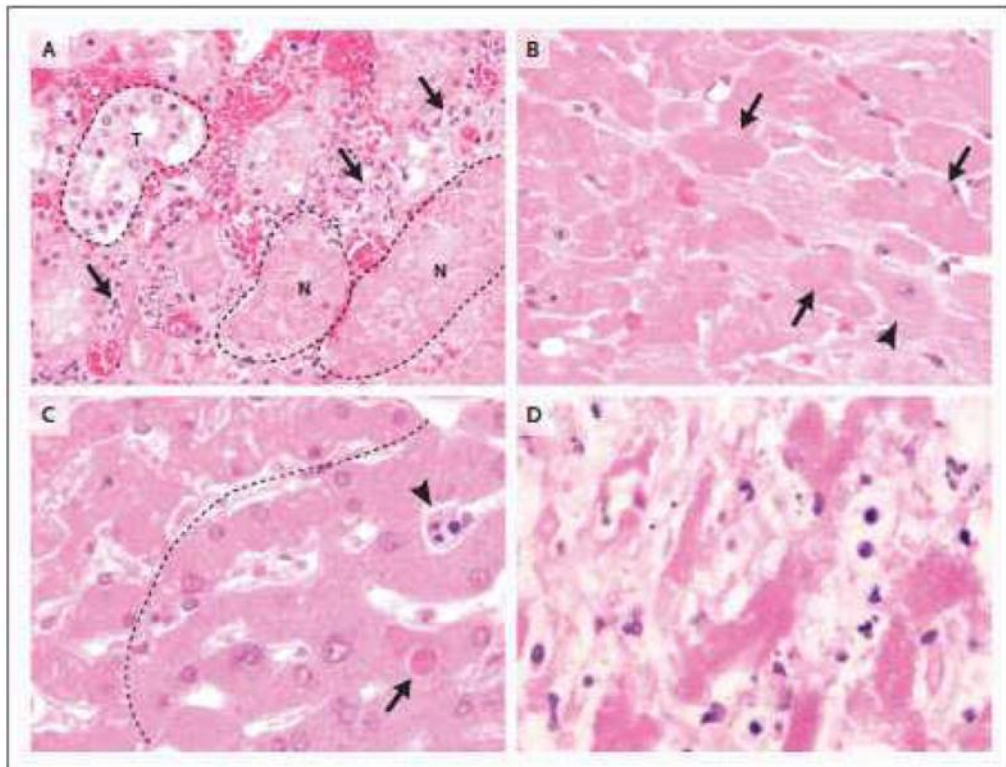
Apoptóza, někdy označována jako programovaná buněčná smrt, je považována za nezbytnou součást různých procesů, včetně normální obměny buněk, správného vývoje a funkce imunitního systému, embryonálního vývoje a chemicky vyvolané buněčné smrti (Elmore, 2007). Je založena na štěpení cytoskeletárních proteinů proapoptických specifických aspartátových proteáz (kaspáz), způsobujících selhání subcelulárních struktur. Apoptóza je morfologicky charakterizována kondenzací chromatinu, marginalizací, fragmentací DNA, bobtnáním cytoplazmatické membrány, smršťováním buněk a nakonec fragmentací buněk do membránově vázaných, organely obsahujících, těl, nazývaných apoptická tělíska (Wyllie *et al.*, 1980). Apoptická tělíska jsou téměř okamžitě rozpoznána a odstraněna fagocytózou za pomoci makrofágů nebo jiných sousedních buněk. Apoptóza je zodpovědná za fyziologické odstranění nežádoucích buněk, což jsou hlavně buňky poškozené nebo stárnoucí, které se nacházejí ve zralých tkáních. Proces apoptózy zajišťuje i eliminaci buněk v rámci přestavby tkání během vývoje (Adams and Cory, 2007, Benedetti *et al.*, 1988a, Benedetti *et al.*, 1988b, Green and Kroemer, 2005, Marsden and Strasser, 2003, Strasser, 2005).

### 3.2.2 Nekróza

Termín nekróza je odvozen od řeckého slova „*Necros*“, což znamená mrtvola (Hotchkiss *et al.*, 2009). V procesu nekrózy dochází k časně ztrátě celistvosti plazmatické membrány, která umožňuje příliv extracelulárních iontů a tekutin, výsledné buňky i organelových otoků. Naopak u apoptózy je integrita plazmatické membrány zachována

až do její pozdní fáze (Festjens *et al.*, 2006, Golstein and Kroemer, 2007, Malhi *et al.*, 2006, Zong and Thompson, 2006).

Nekrózu lze nejlépe detekovat na buněčných a organelových výčnělcích nebo v prasklině na povrchu membrány při náhodném úniku intracelulárního obsahu pomocí světelného či elektronového mikroskopu (Lemasters, 2005, Majno and Joris, 1995, Robbins *et al.*, 1979).



**Obrázek č. 2: Apoptická a nekrotická buněčná smrt** (Hotchkiss *et al.*, 2009). A – Porovnání relativně neporušeného kanálku (T) s ukázkovými odumřelými kanálky (N). Za povšimnutí stojí i rozhraní mezi životaschopnými a odumřelými kanálky (označeno šipkami), kde se v hojné míře nachází apoptické buňky, pravděpodobně neutrofilního charakteru a mononukleární zánětlivé buňky; B - Při vyšším zvětšení jsou jasněji viditelné charakteristické znaky nekrózy. U nekrotických buněk, znázorněných v horní části obrázku, dochází ke ztrátě jaderného detailu nebo k celkové absenci jádra. Zatímco životaschopné kardiomyocyty, nacházející se v pravé dolní části pole B, reprezentují normální jaderné buňky; C – V této části obrázku se nachází hepatocyty, které v pozici nad a vlevo od přerušované čáry vykazují změny typické pro rané stadium nekrózy, včetně vakuolizace hypereozinofilní cytoplazmy a ztráty jaderného detailu. Šipky v druhé části obrázku poukazují na zánětlivé buňky a hepatocyty se zhuštěnými a fragmentovanými jádry označujícími apoptózu; D - Hepatocyty vykazující již pokročilejší fázi nekrózy, které zřetelně postrádají ohraničení buněk nebo rozpoznatelné jádro. Produkty apoptózy jsou buňky a buněčné fragmenty smísené s hepatocyty.

### 3.3 Léčba nádorových onemocnění

#### 3.3.1 Historie

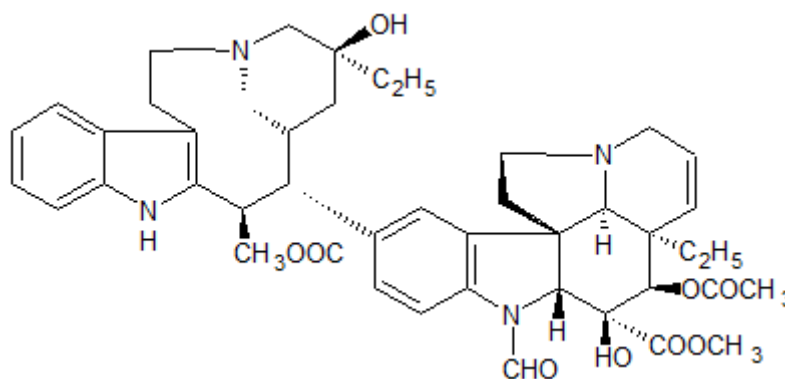
Počátky léčby nádorových onemocnění spočívají v rostlinných přípravcích a jejich počátek není jednoznačně vymezen, zatímco první zmínky o novodobém způsobu léčení těchto onemocnění lze nalézt ve 40. letech 20. století. Tehdy se jednalo o pozorování námořníků během 2. světové války, kteří byli zasaženi yperitem. U jednoho z nich došlo k výrazné hypoplasii lymfoidních a myeloidních buněk, čehož si všimli pánové Gilman (1963), Goodman *et al.* (1984) a následně byla vyvinuta různá analoga tohoto bojového plynu, resp. dusíkaté yperity. Některé z nich se používají dodnes. Jako počátek systematického screeningu nových léčiv je považován rok 1955, kdy byl spuštěn tzv. „The National Chemotherapy Program“ pod záštitou amerického National Cancer Institute. Dalším důležitým mezníkem v historii léčby onkologických onemocnění byla v roce 1962 nově syntetizovaná látka ze skupiny derivátů nitrosomočoviny – karmustin. U této látky byla zjištěna aktivita proti leukémii u myší. Tento objev byl obzvlášť pokrokový především proto, že vzniklé léčivo prochází hematoencefalickou bariérou, čímž byla umožněna i terapie velmi obtížně léčitelných nádorů centrálního nervového systému, tedy maligních gliomů. Karmustin také inhibuje glutathionreduktázu, enzym jehož úkolem je udržování vysoké hladiny redukovaného glutathionu v cytosolu, což vede k buněčné smrti (Baguley and Kerr, 2001, Chabner and Roberts, 2005, DeVita and Denham, Gilman, 1963, Goodman *et al.*, 1984, Oktábec and Jampílek, 2013).

#### 3.3.2 Deriváty přírodních látek

Pro léčbu onkologických onemocnění jsou využívány alkaloidy rostliny *Catharanthus roseus* (starším názvem *Vinca rosea*, česky barvínkovec růžový) náležící do čeledi *Apocynaceae*. Z více jak 30 alkaloidů poskytnutých touto rostlinou byla ve studii společnosti Eli Lilly (1963) prokázána protinádorová aktivita u vinblastinu, vinleurosínu, vinkristinu a vinrosidinu. Tímto byly položeny základy nové skupiny protinádorových léčiv spadajících do vinka alkaloidů. Tyto vinka alkaloidy fungují jako cytostatika, jejichž mechanismus účinku byl objeven v roce 1968. Princip účinku spočívá v možnosti vazby na bílkovinu dělicího vřeténka, nazývanou tubulin, čímž se ruší schopnost polymerace a inhibují tak mitózu během metafáze buněčného cyklu (Hartl *et al.*, 2009, Klener and Klener jr, 2010).

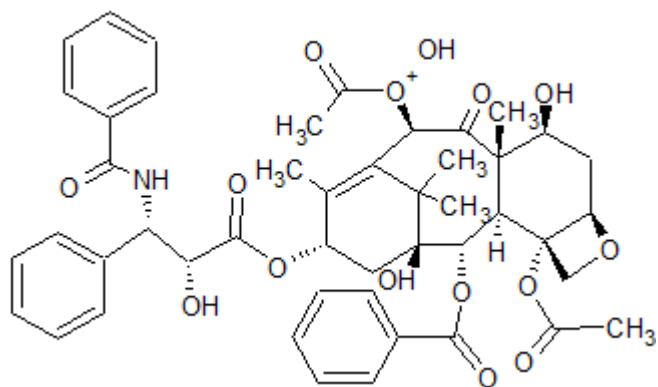


V závislosti na typu alkaloidu je mitóza nejčastěji přerušována v G2/S fázi buněčného cyklu (Enoch and Nurse, 1991). Mimoto mohou vinka alkaloidy také ovlivňovat syntézu RNA a DNA, cyklický adenosinmonofosfát, lipidovou biosyntézu nebo transportní ATPázu (Gietzen *et al.*, 1982, Johnson *et al.*, 1963, Klener and Klener jr, 2010, Oktábec and Jampílek, 2013).



Obrázek č. 3: Vinkristin

Druhou velmi významnou skupinou protinádorových léčiv jsou taxany, které taktéž patří mezi cytostatika. Roku 1964 byla provedena izolace z kůry stromu *Taxus brevifolia* (tis západomořský) z čeledi *Taxaceae* a zároveň byla zjištěna cytotoxická aktivita jedné z neznámějších protinádorových látek, kterou je paklitaxel. Po dlouhém testování byla aktivita paklitaxelu v roce 1984 potvrzena a došlo k zařazení této látky do klinických studií a roku 1992 byl registrován pro léčbu karcinomu ovaríí. V dnešní době je paklitaxel získáván polosyntetickou cestou z prekurzoru 10-deacetylbatatinu, který bývá izolován z jehlic tisu červeného (*Taxus baccata*). Taxany a vinka alkaloidy mají podobné místo účinku, taxany však inhibují depolymeraci mikrotubulů dělicího vřeténka, čímž stabilizují mikrotubuly již vytvořené a urychlují tvorbu mikrotubulů nových, k čemuž dochází v profázi mitózy (Farber *et al.*, 1948, Fu *et al.*, 2009, Goodman and Walsh, 2001, Klener and Klener jr, 2010, Oktábec and Jampílek, 2013).



Obrázek č. 4: Paklitaxel

### 3.3.3 Druhy léčby

Léčba maligních chorob bývá pro pacienty mnohem větší zátěží v porovnání s léčbou jiných onemocnění, jelikož onkologická léčba je zaměřena proti vlastním lidským buňkám, které se transformovaly v buňky nádorové, proto dochází při léčbě skoro vždy k ničení či poškozování některých fyziologických buněk a tkání, tedy k závažnějším nežádoucím účinkům. Tím se dočasně, v některých případech i trvale, zhoršuje kvalita života nemocného jedince. Z hlediska cíle, o který je usilováno protinádorovou léčbou, bývá léčení děleno na kurativní a nekurativní (Adam *et al.*, 2011).

Možností léčby nádorových onemocnění je několik, jedná se o chirurgický zákrok, léčbu pomocí radiace, chemoterapie, hormonů nebo imunoterapie. V rámci celosvětového měřítko je každé osmé úmrtí zapříčiněné nádorovým onemocněním. Způsobuje více smrtelných nemocí než AIDS, tuberkulóza a malárie dohromady. Nejčastější onemocnění vedoucí k úmrtí jsou znázorněna v následující tabulce č. 2, rozdělena dle zastoupení v rozvojových zemích světa, v rozvinutých zemích a souhrnně v rámci celého světa (Mathers *et al.*, 2008).

**Tabulka č. 2:** Porovnání počtu úmrtí (v tisících), včetně procentuálního vyjádření, na 15 nejčastějších příčin smrti v rozvojových a rozvinutých zemích i v rámci celosvětového měřítka. Údaje uvedené v tabulce shrnují rok 2004 (Mathers *et al.*, 2008).

Příčina smrti	Rozvojové země		Rozvinuté země		Celosvětově	
	Úmrtí	%	Úmrtí	%	Úmrtí	%
Kardiovaskulární onemocnění	7342	14,5	1563	19,3	8923	15,1
Zhoubný novotvar	5255	10,4	2154	26,6	7424	12,6
Cerebrovaskulární onemocnění	4949	9,8	757	9,4	5712	9,7
Infekce dolních cest dýchacích	3910	7,7	305	3,8	4177	7,1
Perinatální komplikace	3141	6,2	35	0,4	3180	5,4
Chronická obstrukční plicní nemoc	2737	5,4	285	3,5	3025	5,1
Průjmová onemocnění	2148	4,2	14	0,2	2163	3,7
HIV/AIDS	2018	4,0	20	0,2	2040	3,5
Tuberkulóza	1448	2,9	15	0,2	1464	2,5
Dopravní nehoda	1158	2,3	114	1,4	1275	2,2
Diabetes mellitus	914	1,8	221	2,7	1141	1,9
Malárie	888	1,8	0	0,0	889	1,5
Sebevražda	707	1,4	118	1,5	844	1,4
Cirhóza jater	655	1,3	116	1,4	772	1,3
Nefritida a nefróza	611	1,2	126	1,6	739	1,3
<b>Celkem</b>	<b>50582</b>	<b>100,0</b>	<b>8095</b>	<b>100,0</b>	<b>58772</b>	<b>100,0</b>

### 3.3.3.1 Kurativní (radikální) léčba

Cílem kurativní léčby je úplné uzdravení jedince, tedy dokonalé odstranění nemoci, bez ohledu na okolní zdravou tkáň. Provádí se v případech, kdy charakter a rozsah nádoru, i celkový stav nemocného, dávají předpoklad pro úplné odstranění nádoru z organismu. Kurativní léčbou se většinou rozumí souhrn opatření zahrnujících chirurgický zákrok s kombinací léčiv.

Samotná chemoterapie může mít kurativní cíl u omezeného počtu onkologických onemocnění. Jedná se o akutní leukémii, některé maligní nehodgkinské lymfomy a Hodgkinův lymfogramulom, nádory varlat, trofoblastický karcinom u ženy, některé solidní nádory u dětí. Samotná radioterapie může být taktéž použita s kurativním cílem především u epidermálních karcinomů a karcinomu děložního čípku ve 2. a 3. stadiu, kdy by operace mohla prognózu zhoršit (Adam *et al.*, 2011).

### 3.3.3.2 Nekurativní léčba

Nekurativní léčebný postup přichází na řadu v případech, kdy není možné dosáhnout úplného vyléčení, a to z důvodu stupně pokročilosti nemoci, její přirozené rezistence na léčbu či celkový stav pacienta. V současné době lze dle Adama *et al.* (2011) u 30 až 40 % pacientů trpících nádorovým onemocněním nabídnout pouze nekurativní léčbu. Toto číslo vzroste, připočteme-li pacienty, u kterých již kurativní léčba proběhla, ovšem došlo k recidivě nemoci. V těchto situacích dochází k vyléčení jen u velmi malého počtu pacientů.

## 3.4 Alkaloidy

### 3.4.1 Charakteristika

Pojmem alkaloidy jsou označovány dusíkaté báze rostlinného původu, které jsou zároveň sekundárními metabolity rostliny a pravděpodobně zde plní především ochrannou funkci. Vylučování alkaloidů jakožto detoxikačních produktů dusíkatých látek nemá pro rostlinu takový význam. Moderní výzkum alkaloidů byl zahájen Friedrichem Wilhelmem Sertürnerem, který jako první dokázal izolovat alkaloid ze surového přírodního produktu. Po více než deseti letech vedl tento objev vědce k izolaci řady dalších základních látek z jiných fyziologicky aktivních přírodních produktů. Tím, kdo jako první pojmenoval takto izolované rostlinné látky výrazem alkaloidy, byl farmaceut Dr. W. Meißner, kterému se tyto sloučeniny jevily jako „like alkali“, z čehož vznikl pojem alkaloidy. Až v pozdějších letech bylo ovšem prokázáno, že je zásaditost způsobena přítomností atomu dusíku. V dalších dekádách bylo označení „alkaloid“ opakovaně změněno a ani dnes není tento pojem přesně definován (Aniszewski, 2015, Mothes *et al.*, 1985, Staněk, 1957).

Velmi obtížné bylo také určení chemické struktury izolovaných alkaloidů. Tak tomu bylo až do poloviny 20. století, kdy se milníkem v historii výzkumu alkaloidů stala jejich první úspěšná syntéza. Prvním uměle syntetizovaným alkaloidem byl v roce 1886 koniin, jež je obsažen v rostlině bohlavu (*Conium maculatum*) a izolován byl již roku 1827. Mezi další alkaloidy, které již byly dříve izolovány, patří nikotin, objevený v roce 1828, ovšem syntetizován až roku 1904, chinin, izolovaný v roce 1820 a syntetizovaný roku 1944 (Woodward and Doering, 1944), morfin, izolovaný roku 1806 (tedy úplně první izolovaný alkaloid), ale syntetizován až roku 1952 a strychnin izolovaný v roce 1818, syntetizovaný roku 1954. Od té doby se zvýšil zájem o výzkum alkaloidů a dnes jich je známo a charakterizováno až 7000 (Mothes *et al.*, 1985, Staněk, 1957).

### 3.4.2 Využití alkaloidů v medicíně

Izolace a charakterizace farmakologicky významných sloučenin z léčivých rostlin pokračuje od již zmíněné historie do dnešních dní. Pro vývoj nových léčiv bylo použito množství metod syntetické chemie, kombinatorické chemie a molekulárního modelování izolujících aktivní sloučeniny z rostlin či jiných přírodních zdrojů (Geysen *et al.*, 2003, Ley and Baxendale, 2002, Lombardino and Lowe, 2004). I přes vzrůstající zájem, který v poslední

době právě molekulární modelování, kombinatorická chemie a další techniky syntetické chemie zaznamenaly, důležitým zdrojem nových léků jsou stále přírodní produkty a zejména léčivé rostliny (Butler, 2004, Newman *et al.*, 2000, Newman *et al.*, 2003). V letech 2001 a 2002 tvořily přibližně čtvrtinu celosvětově nejprodávanějších léků přírodní produkty nebo produkty od nich odvozené (Balunas and Kinghorn, 2005, Butler, 2004, Kinghorn, 2001).

Vývoj léků z léčivých rostlin hraje důležitou roli v moderní medicíně zabývající se léčbou nádorových onemocnění. Většina léčiv využitých během posledních 50 let byla založena na využití sekundárních metabolitů rostlin a jejich derivátů (Butler, 2004, Newman *et al.*, 2000, Newman *et al.*, 2003). Z protinádorových léčiv dostupných na trhu v letech 1940 a 2002 celých 40 % bylo tvořeno produkty přírodního původu nebo deriváty přírodních produktů, dalších 8 % bylo považováno za napodobeninu takových výrobků (Newman *et al.*, 2003). Látky s protinádorovým účinkem, které jsou aktuálně užívané v klinické praxi, jsou rozdělovány do čtyř hlavních skupin, vinka (nebo *Caranthus*) alkaloidy, epipodofylotoxiny, taxany a kamptotheciny (Van der Heijden *et al.*, 2004). Vinka alkaloidy a jejich několik polosyntetických derivátů brzdí mitózu ve fázi metafáze pomocí specifické vazby na tubulin, což vede k vlastní depolymerizaci (Okouneva *et al.*, 2003).

Podofylotoxin byl izolován z pryskyřice *Podophyllum peltatum* L. (*Berberidaceae*), byla u něj však zjištěna vysoká toxicita při testech na myších a z tohoto důvodu byly připraveny deriváty, které se staly prvním klinicky schváleným lékem pod názvem etoposid. Epipodofylotoxiny váží tubulin, což způsobuje zlomy DNA během fáze G2 buněčného cyklu pomocí ireverzibilně inhibující DNA topoizomerázy II (Gordaliza *et al.*, 2004). Taxany, včetně paklitaxelu a jeho derivátů, tvoří vazbu s tubulinem, aniž by při tom došlo k depolarizaci nebo jakémukoliv zásahu do sestavy tubulinu (Horwitz, 2004, Schiff *et al.*, 1979). Kamptothecin byl nejprve izolován z rostliny jménem *Camptotheca acuminata* Decne (*Nyssaceae*), ale vykazoval nepřipustnou myelosupresi (Cragg and Newman, 2004, Wall and Wani, 1996). Poté, co byla zjištěna schopnost kamptothecinu selektivně inhibovat topoizomerázu I, což je enzym aktivně se podílející na štěpení a opětovném spojení DNA, zájem o využití kamptothecinu pro možnou léčbu nádorových onemocnění stoupl (Cragg and Newman, 2004).

V roce 2002 kamptotheciny a taxany společně tvořily přibližně třetinu světového trhu zabývající se léky proti nádorovým onemocněním (Oberlies and Kroll, 2004). Bylo syntetizováno množství derivátů všech čtyř zmíněných tříd sloučenin, některé z nich jsou

využívány v klinické praxi, ovšem každý z těchto přírodních produktů pomohl k významným biologickým objevům (Balunas and Kinghorn, 2005).

### 3.4.3 Anti-proliferační aktivita alkaloidů

Studie provedené autory Bharat *et al.* (2013) Rossignol *et al.* (2008) prokazují anti-proliferační aktivitu některých alkaloidů a především jejich analog v lidském organismu. Například meridianiny, sloučeniny odvozené od indolu, jsou známé svou anti-proliferační aktivitou a mají několik syntetických analog s biologickou aktivitou. Dalším alkaloidem zabraňujícím nádorovému bujení je krebanin izolovaný z hlíz *Stephania venosa* rostoucí v Thajsku. Ten vykazuje anti-proliferační aktivitu vůči lidským leukemickým buňkám (HL-60, U937 a K562), fibrosarkomovým buňkám HT1080 a karcinomu děložního hrdla KB-3-1 a KB-VI. Vzhledem k výše uvedeným efektům je tento alkaloid předpokládán pro použití v chemoterapii (Wongsirisin *et al.*, 2012). Anti-proliferační účinky vůči buněčné linii RM-1 rakoviny prostaty u myši byly pozorovány po podání berberinu a kofeinu (Wang *et al.*, 2012). Současné podávání těchto alkaloidů vedlo k urychlenému usmrcení nádorových buněk.

U benzofenanthridinového alkaloidu sanguinarinu byla zjištěna aktivita zabraňující růstu nádorových buněk u melanomu buněčné linie B16, proto může být sanguinarin využit pro léčbu rakoviny kůže (De Stefano *et al.*, 2009). Co se týče mnohočetného myelomu buněčné linie RPMI 8226, silnou anti-proliferační aktivitou jsou vyznačovány extrakty kořene kulčiby dávivé (*Strychnos nux-vomica* L.) obsahující především alkaloidy strychnin a brucin (Rao *et al.*, 2009).

V současné době jsou vyvíjeny nové anti-proliferační alkaloidy pomocí chemické syntézy. Chaudhary *et al.* (2013) uvádí, že právě 8 takových sloučenin bylo syntetizováno a jejich protinádorová aktivita byla testována na 60 různých buněčných liniích. Některé z nich jsou slibnými pro budoucí využití. Tento směr studií je upřednostňován množstvím laboratoří. Ve studii autorů Du *et al.* (2013) byl testován analog přírodního alkaloidu kurkuminu, u něhož byla v porovnání s aktivitou kurkuminu prokázána mnohem vyšší anti-proliferační aktivita. V budoucnu by mohl být použit i pro praktické klinické účely (Aniszewski, 2015).

#### 3.4.4 Alkaloidy indukující apoptózu

V léčbě nádorových onemocnění bývá využíváno indukce apoptózy k zastavení jejich rozvoje. A jsou to právě alkaloidy, které mohou napomoci vzniku apoptózy, například alkaloid trigonellin, který je zodpovědný za zvýšení citlivosti pankreatických rakovinných buněk na apoptózu v důsledku snížení proteazomální exprese genu a proteazomové aktivity (Arita *et al.*, 2013). Bis-indolové alkaloidy tabemaelegantin B a tabemaelegantin C, izolované z africké léčivé rostliny *Tabernaemontana elegans*, jsou též známy jako potenciální induktory apoptózy lidských buněk karcinomu tlustého střeva buněčné linie HCT116 (Mansoor *et al.*, 2013). V posledních letech je z mořských organismů izolováno množství alkaloidů, které také ukazují schopnost vyvolat apoptózu. Například aplidin, starším názvem plitidepsin, je alkaloid získávaný z mořských pláštěnců *Aplidium albicans* a je významný pro svou schopnost vyvolávat oxidační stres v rakovinných buňkách prostřednictvím změny homeostázy glutathionu. Aplidin také zajišťuje mnoho činností, které hrají roli ve zvyšování účinku apoptózy (Aniszewski, 2015, Barboza *et al.*, 2012).



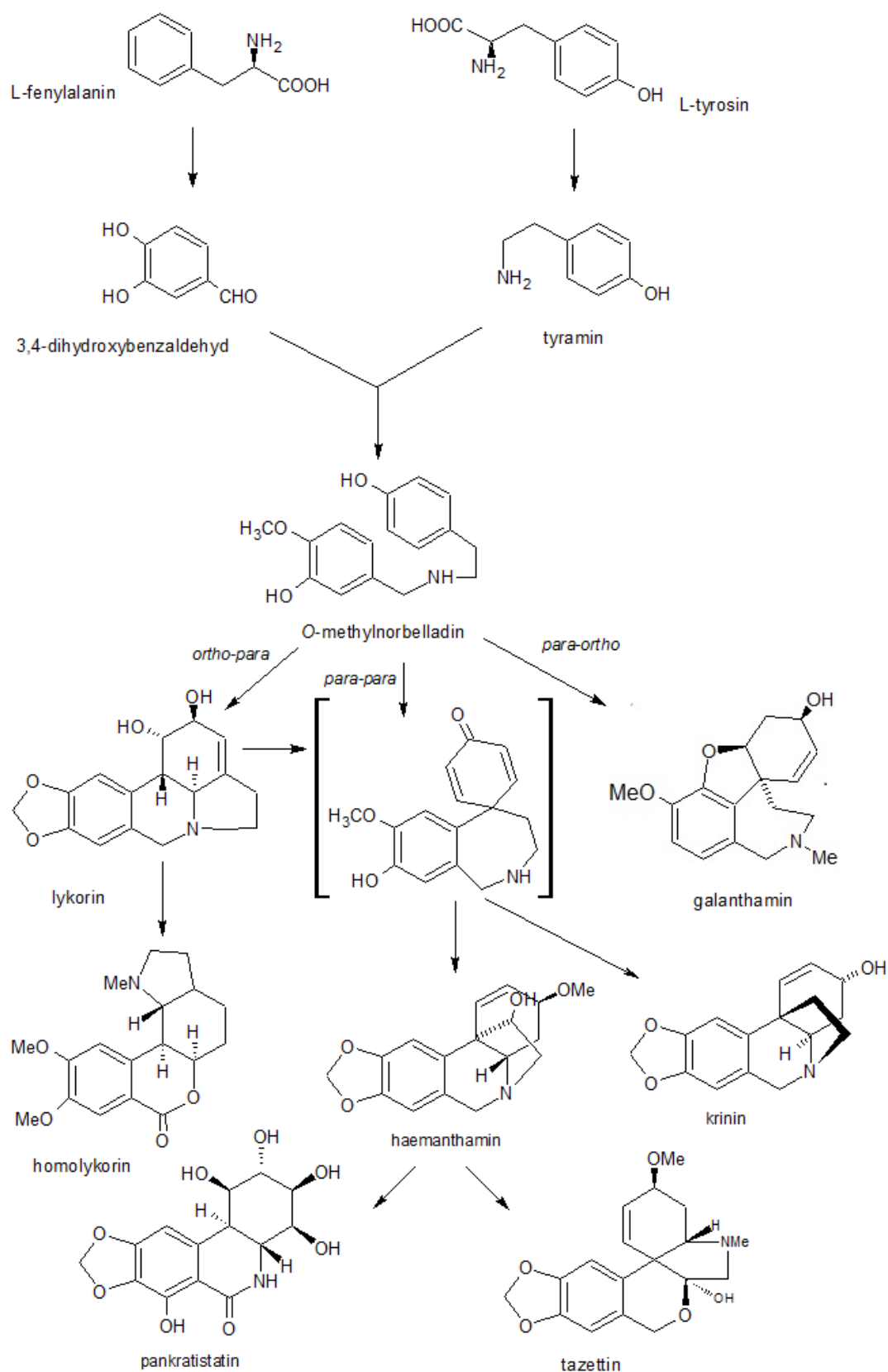
## 3.5 Čeleď *Amaryllidaceae* a její alkaloidy

### 3.5.1 Charakteristika čeledi

Čeleď *Amaryllidaceae* je jedna z největších čeledí okrasných cibulovitých rostlin, jejichž výskyt je typický pro tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky a zároveň jsou rovněž velmi hojně pěstovány k okrasným účelům i v České republice, především narcisy (*Narcissus*), bledule (*Leucojum*) a sněženky (*Galanthus*) (Chase *et al.*, 2009). Alkaloidy rostlin čeledi amarylkovitých si již velmi dlouho drží přední pozici v historii přírodních produktů chemie díky své strukturní podobnosti esenciálním aminokyselinám, fenylalaninu a metabolitům příbuzným tyrosinu (Fennell and Van Staden, 2001). Největší množství alkaloidů se nachází v cibuli, ale tyto dusíkaté látky obsahuje celá rostlina. Kromě čeledi *Amaryllidaceae* velké množství biologicky významných alkaloidů obsahují také rostliny z čeledí *Fumariaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae* a *Rutaceae* (Zdařilová *et al.*, 2006).

### 3.5.2 Biosyntéza alkaloidů

Specifická biosyntetická cesta amarylkovitých alkaloidů bývá nazývána tzv. norbelladinová cesta, která vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu, kde se L-tyrosin mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z těchto dvou látek postupně po několika reakčních stupních vzniká 4'-*O*-methylnorbelladin a z něho v závislosti na způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká sedm základních skeletů (viz obrázek č. 5), které jsou pojmenovány podle svého hlavního zástupce. Jedná se o lykorinový typ (lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), haemanthaminový (haemanthamin) a krinanový typ (krinin). Biosyntetická cesta vedoucí k montaninovému (montanin) strukturnímu typu doposud nebyla dokonale vysvětlena. Mezi hlavní typy je řazen také belladinový typ (*O*-methylbelladin), z něhož vychází biosyntéza amarylkovitých alkaloidů (Bastida *et al.*, 2011, Cedrón *et al.*, 2010, Tahchy *et al.*, 2010).



**Obrázek č. 5:** Biosyntetická cesta vzniku hlavních typů alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* (Dalecká *et al.*, 2013).

### 3.5.3 Využití v praxi

Již ve čtvrtém století před naším letopočtem byly rostliny čeledi *Amaryllidaceae* používány v lidovém léčitelství. Mezi prvními, kdo využil léčivého potenciálu těchto rostlin, byl Hippokrates z řeckého ostrova Kos, který použil olej z narcisu (*Narcissus poeticus* L.) k léčbě nádorového onemocnění. Později byly z této čeledi izolovány stovky strukturně odlišných alkaloidů. Tyto alkaloidy se vyznačují velkou různorodostí biologické aktivity, například protinádorové, antivirové, cytotoxické, protizánětlivé a DNA-vazebné aktivity. Limitujícím faktorem pro rozsáhlejší studium alkaloidů s protinádorovým účinkem a jejich použití je náročná izolace z přírodních zdrojů, proto se v současné době výzkum zaměřuje na přípravu syntetických analog s terapeuticky podobnými, popř. ještě lepšími, vlastnostmi (Dalecká *et al.*, 2013, Hartwell, 1967, Sener *et al.*, 2003).

Prvním izolovaným alkaloidem této čeledi byl v roce 1877 lykorin, jehož struktura byla popsána později a to až v roce 1956. Lykorin je nejčastěji se vyskytující amaryllkovitý alkaloid a typický zástupce lykorinové skupiny *Amaryllidaceae*, která zahrnuje přes 70 příbuzných přírodních fenanthridinů (Cook and Loudon, 1952, Hoshino *et al.*, 1998, Nakagawa *et al.*, 1956).

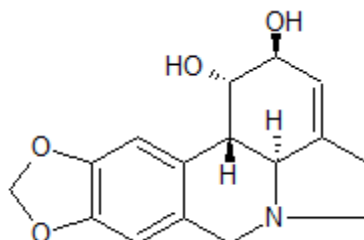
Amaryllkovité alkaloidy nejsou zdaleka plně prozkoumané, jen od července roku 2012 do června 2015 bylo izolováno a identifikováno celkem 54 nových alkaloidů z různých druhů rostlin této čeledi, a to především rodu *Lycoris*, *Zephyranthes*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Pancreatum*, *Boophane*, *Crinum* a *Hippeastrum* (Jin, 2016).

### 3.5.4 Typy alkaloidů

#### 3.5.4.1 Lykorinový typ

Alkaloidy spadající do lykorinového strukturního typu patří k nejznámějším a z hlediska cytotoxicity pravděpodobně i k nejúčinnějším. Hlavním zástupcem této skupiny je již výše zmíněný lykorin, což je pyrolofenanthridinový cyklický alkaloid, jehož strukturu, znázorněnou na obrázku č. 6, poprvé popsal v roce 1956 (Nakagawa *et al.*) Tento alkaloid disponuje značnou rozmanitostí biologických vlastností. Mezi ně patří schopnost inhibovat syntézu kyseliny askorbové u rostlin potlačením aktivity terminálního enzymu galaktodehydrogenázy, který přeměňuje L-galaktono- $\gamma$ -lakton na kyselinu askorbovou. Lykorin je účinný proti některým virům, jako je poliovirus, vaccinia virus pravých neštovic

a SARS-asociovaný koronavirus. Kromě toho taktéž vykazuje antimykotickou aktivitu proti *Saccharomyces cerevisiae* a má destruktivní vliv na životní cyklus parazitického prvoka *Trypanosoma brucei* (Arrigoni *et al.*, 1975, Del Giudice *et al.*, 2005, Deng *et al.*, 2007, Hwang *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2007, Mackey *et al.*, 2006).



Obrázek č. 6: Lykorin

Do skupiny alkaloidů lykorinového typu patří další látky obdobné struktury, z biologického hlediska nejzajímavějšími z nich jsou karanin, pseudolykorin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-*O*-acetyllykorin, lykorin-2-on, amarbelisin a galanthin. Tyto uvedené alkaloidy vykazují také protinádorovou aktivitu, z nichž je podle dosavadních studií nejúčinnější amarbelisin a pseudolykorin (Van Goietsenoven *et al.*, 2010).

Lykorin byl aktivně zkoumán jak v podmínkách *in vitro*, tak i *in vivo* u různých preklinických modelů nádorových onemocnění u lidí. Z výsledků vyplynulo, že lykorin obecně je anti-proliferací činitel, který je schopen být i proapoptickým činitelem citlivých rakovinných buněk. Je také nutno dodat, že léčebný potenciál lykorinu byl prokázán na řadě myši trpících lidskými typy nádorových onemocnění, jako HL-60 leukémií, LLC plicním karcinomem (Lewis Lung Carcinoma) a Hey1B karcinomem vaječníků (Cao *et al.*, 2013, Dasari and Tchounwou, 2014, Liu *et al.*, 2007, Min *et al.*, 2001). Lykorin byl ovšem prokázán jako léčebný i u Alzheimerovy choroby (McNulty *et al.*, 2010) a malárie (Sener *et al.*, 2003).

Ve studii autorů Dasari *et al.* (2014) byl lykorin testován v množství terapeutických koncentrací, kdy tento alkaloid nevyvolává apoptózu buněčných linií, ale vykazuje cytostatické účinky prostřednictvím narušení struktury aktinového cytoskeletu. (Lamoral-Theys *et al.*, 2009). Dále byly zkoumány C1 a C2alkylethery lykorinu syntetizované pomocí přímé alkylace lykorinu C1,C2bisalkoxidu s hydridem sodným v dimethylformamidu při pokojové teplotě. Bylo zjištěno, že za těchto podmínek nebyla kvarternizace dusíku

konkurenceschopná a ve většině případů byly produkty reakce snadno oddělitelné směsi C1 a C2 dietherů a C2 monoetherů v proměnlivých množstvích (Dasari *et al.*, 2014).

Následující tabulka č. 3 shromažďuje vybrané struktury derivátů alkaloidu lykorinu syntetizovaných právě ve studii Dasari *et al.* (2014). Tyto sloučeniny byly hodnoceny na základě jejich rostoucí inhibice v podmínkách *in vitro* za použití kolorimetrické metody MTT na panelu šesti rakovinných buněčných linií. Tři z těchto buněčných linií poukazují na různé úrovně rezistence vůči apoptóze, což je demonstrováno na lidském T98G glioblastomu (Branle *et al.*, 2002), lidském A549 nemalobuněčném karcinomu plic (NSCLC) (Mathieu *et al.*, 2004) a lidském melanomu SKMEL-28 (Mathieu *et al.*, 2009). Zbývající tři linie jsou reprezentovány modely nádorů citlivých vůči apoptóze, jako je lidský Hs683 anaplastický oligodendrogliom (Branle *et al.*, 2002), lidský prsní adenokarcinom MCF-7 (Frolova *et al.*, 2013) a myší melanom B16F10 (Mathieu *et al.*, 2009). Touto analýzou bylo zjištěno, že lykorin, stejně jako většina jeho aktivních derivátů, nerozlišuje mezi rakovinnými buněčnými liniemi na základě kritéria citlivosti k apoptóze a prokazuje srovnatelný potenciál u obou typů buněk. Navíc byl takto potvrzen i samotný závěr této studie, a to že indukce apoptózy není primárním mechanismem zodpovědným za anti-proliferační aktivitu v této skupině testovaných sloučenin, alespoň co se týče solidních nádorů (Lamoral-Theys *et al.*, 2009).

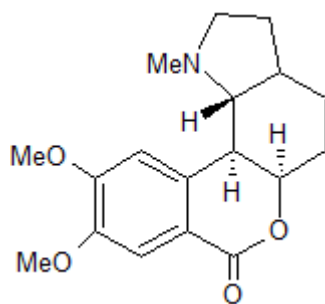
**Tabulka č. 3:** Struktury vybraných syntetizovaných C1, C2 etherů, jejich koncentrace a výsledky *in vitro* testování na buněčných liniích (Dasari *et al.*, 2014).

Log P	Struktura	Hodnoty GI <sub>50</sub> za podmínek <i>in vitro</i> (μM)						
		Karcinom		Gliom			Melanom	
		A549	MCF7	T98G	Hs683	SKMEL	B16F10	Průměr
-0,8	Lykorin	3,0	10,9	5,2	2,1	3,7	2,6	4,6
7,2	C1-silyl ether	5,9	31	16	40	32	9	22,3
7,7	C2-alkyl ether	4,2	19	13	23	25	8,7	15,4
-0,4	C1-methyl ether	43	>100	64	>100	>100	39	>50

Log P je součet hodnot fragmentů přítomných v molekule; GI<sub>50</sub> je koncentrace 50 % maximální inhibice buněčné proliferace, která by měla být použita jako cytostatické činidlo (na rozdíl od cytotoxických). Buněčné linie: A549 – nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC); MCF-7 – prsní adenokarcinom; T98G – glioblastom; Hs683 – anaplastický oligodendrogliom; SKMEL – melanom; B16F10 – myší melanom

### 3.5.4.2 Homolykorinový typ

Alkaloidy zařazené do této skupiny jsou odvozeny od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu a přesto, že sem náleží velké množství alkaloidů, výraznou biologickou aktivitu vykazují jen některé z nich. Dle autora Weniger *et al.* (1995) homolykorin (viz obrázek č. 7), 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin vykazují cytotoxický efekt, avšak i k primárním nenádorovým buňkám myších fibroblastů LMTK. Navíc byla zjištěna i inhibice lidského jaterního karcinomu HepG2 a leukemických buněk MOLT-4. Co se týče dalších biologických účinků, autoři Renard-Nozaki *et al.* (1989) u homolykorinové skupiny alkaloidů objevili aktivitu proti *Herpes simplex*, kterou vykazoval hippeastrin, a antimykotický účinek proti *Candida albicans* popsány v práci Bastidy *et al.* Z roku 2011 (Bastida *et al.*, 2011, Dalecká *et al.*, 2013, Renard-Nozaki *et al.*, 1989, Weniger *et al.*, 1995).

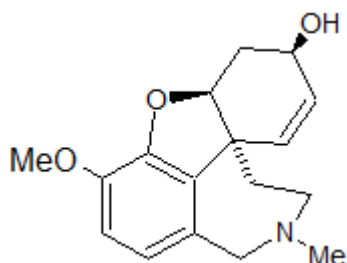


Obrázek č. 7: Homolykorin

### 3.5.4.3 Galanthaminový typ

Dalším z nejznámějších alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* je alkaloid s dibenzofuranovým základem, galanthamin, zobrazený na obrázku č. 8, který je možné izolovat z mnoha druhů rostlin této čeledi. Farmakologický potenciál této látky byl zaznamenán například dle Irwina a Smithe (1960), kteří prokázali anticholinesterázovou aktivitu galanthaminu. Navíc, Dal-Bianco *et al.* (1991) dokázali pozitivní efekt tohoto alkaloidu v léčbě Alzheimerovy choroby. Galanthamin zvyšuje koncentraci acetylcholinu v oblastech mozku, ve kterých chybí cholinergní neurony tak, že by se v budoucnu mohl používat v léčbě Alzheimerovy choroby ke zmírnění bolestí. Ve východní Evropě je galanthamin používán v anestetické praxi, aby neutralizoval neuromuskulární blokády

způsobené tubokurarinem. Kromě toho se galanthamin chová mírně analepticky, má však i analgetické účinky, rovnající se svou silou morfinu, čehož je využíváno v očních kapkách, které snižují nitrooční tlak. Také byl součástí léčby neurologických poruch. Pro účely medicíny bývá galanthamin izolován z rostlinných materiálů, především z *Leucojum aestivum* L., protože celková chemická syntéza galanthaminu v průmyslovém měřítku není ekonomická. Biosyntéza galanthaminu neprobíhá jen v zájmu vědeckém, ale mohla by se stát záchytným bodem na cestě k proveditelnosti biotechnologické produkce tohoto alkaloidu. Znalost biosyntetické dráhy galanthaminu by spolu se současnými možnostmi genové technologie mohla umožnit využívání klonů (Dal-Bianco *et al.*, 1991, Eichhorn *et al.*, 1998, Irwin and Smith, 1960, Zupko *et al.*, 2009).



Obrázek č. 8: Galanthamin

#### 3.5.4.4 Haemanthaminový a krinanový typ

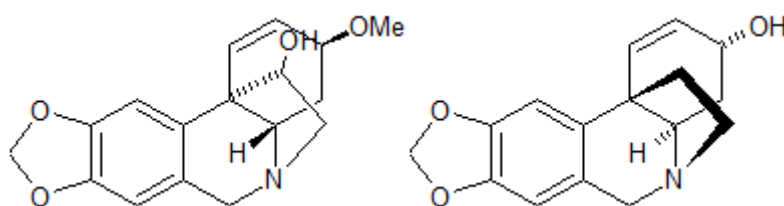
Tyto 2 skupiny jsou často řazeny k sobě vzhledem k tomu, že jak haemanthamin, tak i krinin (struktury obou zobrazeny na obrázku č. 9), jsou alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* odvozené od molekuly 5,10- $\beta$ -ethanofenantridinu. Nejúčinnějšími alkaloidy této skupiny jsou haemanthamin, haemanthidin a krinamin. První dva zmíněné alkaloidy tvoří sloučeniny se substituční hydroxy skupinou na pozici C6. Bylo prokázáno, že rostliny čeledi *Amaryllidaceae* mají schopnost enzymaticky přeměnit haemanthamin na haemanthidin, bez možnosti zpětné změny (Bastida *et al.*, 2011, Jimenez *et al.*, 1976).

Haemanthamin je alkaloid, u něhož byla prokázána cytotoxická aktivita u několika buněčných linií, jako MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF-7, CEM, K562, G-36, lidských fibroblastů BJ, A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL a B16F10 (Havelek *et al.*, 2014b). Pomocí 2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazinyl radikálového testu byla stanovena

antioxidační aktivita haemanthaminu (Oloyede *et al.*, 2010). Dalším testováním Hohmanna *et al.* (2002), které bylo založeno na interakci haemanthaminu s RNA a DNA, byl prokázán silný inhibiční účinek k buňkám myšního melanomu L5178.

O haemanthidinu a jeho protinádorové aktivitě je známo o něco méně v porovnání s haemanthaminem. Starší studie zabývající se biologickou aktivitou této látky prokázaly, že haemanthidin disponuje slibnými cytotoxickými vlastnostmi působícími proti buněčným liniím A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL, B16F10 i proti myším lymfomovým buňkám typu L5178, které jsou rezistentní na celou řadu léků (Hohmann *et al.*, 2002, Van Goietsenoven *et al.*, 2010). Dále vykazuje haemanthidin také vlastnosti protizánětlivé (Çitoğlu *et al.*, 1998), analgetické, které mají vyšší aktivitu než kyselina acetylsalicylová (Tanker *et al.*, 1996), a působí proti parazitům (Herrera *et al.*, 2001, Sener *et al.*, 2003).

Krinamin byl testován v práci Kima *et al.* (2006), v níž byl prokázán vliv tohoto alkaloidu na transkripční faktor, který je indukovaný hypoxií (nedostatkem kyslíku v metabolismu), tzv. HIF-1 $\alpha$  faktorem. Tento faktor aktivuje transkripci genů podílejících se na klíčových aspektech biologie nádorových onemocnění včetně angiogeneze (tvorby krevních kapilár), přežívání buněk a metabolismu glukózy. Pro některé nádory je charakteristická nadprodukce HIF-1 $\alpha$  a bylo prokázáno, že inhibicí HIF-1 $\alpha$ , kterou podporuje právě krinamin, je možné zmírnit, nebo dokonce potlačit růst těchto nádorů.



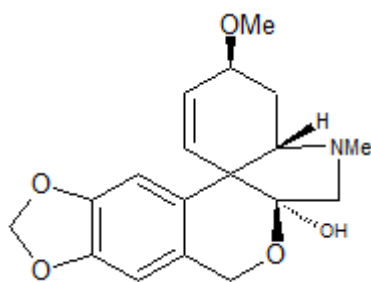
Obrázek č. 9: Haemanthamin (vlevo) a krinin (vpravo)

#### 3.5.4.5 Tazettinový typ

Od haemanthaminového a krinanového typu alkaloidů se tento odlišuje přítomností *N*-methylové skupiny. Tazettin je mírně aktivní proti určitým nádorovým buněčným liniím a mírnou cytotoxicitu prokázal i při testování proti fibroblastickým buněčným liniím typu



LMTK. Tento alkaloid, zobrazený na obrázku č. 10, je významný také pro svou mírně hypotenzní a antimalarickou aktivitu, navíc i interakci s DNA. Jeho chemicky labilní prekurzor nazývaný pretazettin je o něco zajímavější než samotný tazettin, a to především díky své protivirové a protinádorové aktivitě. Pokud dojde k stereochemickému přeskupení pretazettinu na tazettin, biologické vlastnosti tohoto prekurzoru jsou do značné míry inaktivovány. Protinádorové vlastnosti pretazettinu působí proti fibroblastickým buněčným liniím LMTK, dále pretazettin inhibuje růst HeLa buněk, působí proti pokročilým formám leukémie Rauscherova typu a Lewisově karcinomu plic. Amarylkovité alkaloidy jsou účinné proti lymfatickým buňkám MOLT-4 a pretazettin patří mezi nejaktivnější z nich. Ve vztahu k DNA, pretazettin velmi silně inhibuje aktivitu reverzní transkriptázy různých onkogenních virů pomocí vazby na enzym (Bastida *et al.*, 2011, Furusawa *et al.*, 1975, Furusawa *et al.*, 1980, Rigby *et al.*, 1998).



Obrázek č. 10: Struktura alkaloidu nazývaného tazettin

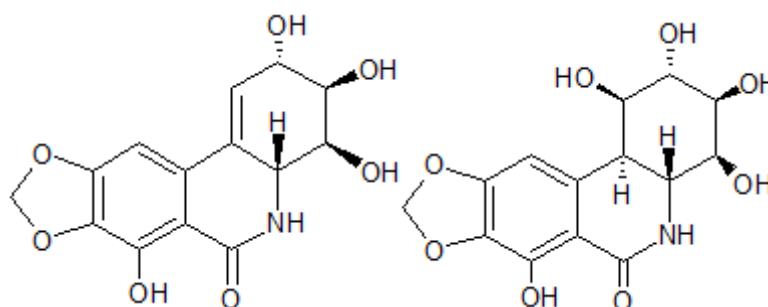
#### 3.5.4.6 Pankratistatinový typ

Alkaloidy náležící mezi pankratistatinový typ spojuje přítomnost molekuly fenanthridinu, od které jsou všechny odvozeny. Z hlediska cytotoxické aktivity se k slibným alkaloidům řadí narciklasin a pankratistatin, oba znázorněné na obrázku č. 11 (Dalecká *et al.*, 2013).

Narciklasin byl poprvé získán z cibulí rostlin rodu *Narcissus*, a to v roce 1967. Později byl prokázán jeho protinádorový a antimitotický účinek na buňky eukaryotních organismů, který je srovnatelný s antimitotickým účinkem kolchicinu (Ceriotti, 1967). Narciklasin také ovlivňuje buněčné dělení ve stadiu metafáze a inhibuje syntézu bílkovin v eukaryotických

ribozómech prostřednictvím přímé interakce velké podjednotky 60S a inhibicí peptidové vazby tím, že brání navázání na konci 3' donoru do centra peptidyl-transferázy. Tento alkaloid také zpomaluje syntézu DNA a inhibuje cytotoxicitu indukovanou kalprotektinem při více než 10× nižší koncentraci v porovnání s lykorinem. Mezi další vlastnosti narciklasinu patří zabránění růstu HeLa buněk, antileukemické účinky a také působí proti mnoha nádorovým buňkám, jako jsou lidské a myší lymfocytární leukémie, rakoviny hrtanu, děložního čípku a Ehrlichovým nádorovým buňkám (Pettit *et al.*, 1993). Ve studiích *in vivo* byla prokázána vyšší protinádorová aktivita hemisyntetického derivátu narciklasinu na lidských modelech ortotopických gliomů u myši než při podávání netoxického narciklasinu jak nitrožilní, tak orální cestou. U solidních nádorů nebyl zjištěn žádný efekt (Ingrassia *et al.*, 2009).

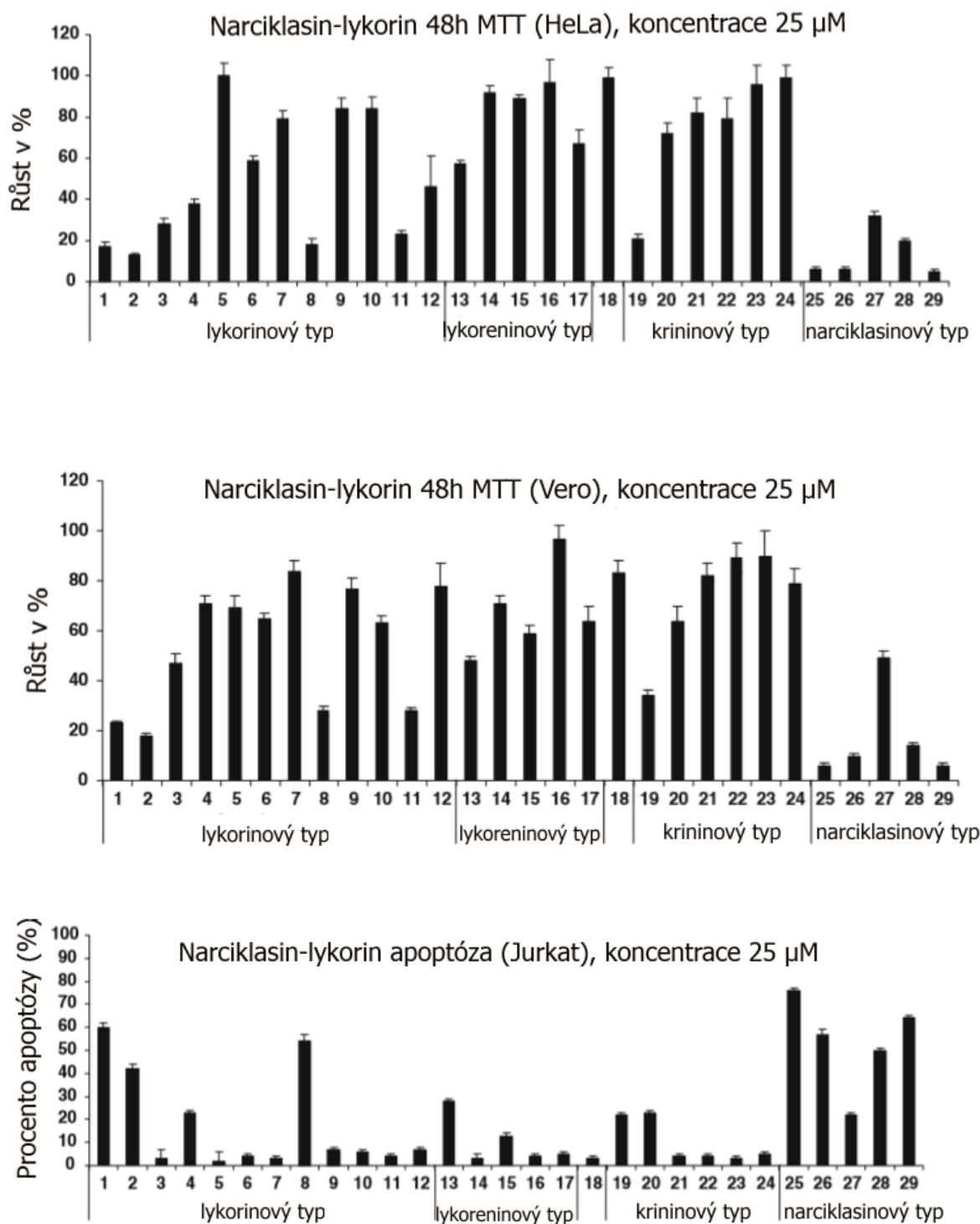
Zkoumán byl taktéž vliv pankratistatinu vůči nádorovým i zdravým buňkám (McLachlan *et al.*, 2005). Výsledky naznačují, že pankratistatin částečně indukuje v rakovinných buňkách apoptózu, pravděpodobně působící v mitochondriích. V dalších studiích zabývajících se vztahy mezi strukturou a aktivitou sloučenin příbuzných pankratistatinu, byla zjištěna protirakovinná účinnost a specifita 2 příbuzných přírodních alkaloidů. Obě tyto sloučeniny postrádají polyhydroxylovaný prvek pankratistatinu, namísto toho obsahují methoxy skupinu substituovanou ve struktuře krininu. Z těchto výsledků vyplývá, že kostra fenanthridinu v přírodních alkaloidech čeledi *Amaryllidaceae*, může být významným společným prvkem selektivity vůči rakovinným buňkám (Siedlakowski *et al.*, 2008).



**Obrázek č. 11:** Struktura narciklasinu (vlevo) a pankratistatinu (vpravo)

### 3.5.5 Syntetické deriváty alkaloidů

Vzhledem k náročnosti získávání alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* a jejich pěstování, se v poslední době více testuje možnost syntetické přípravy těchto alkaloidů a zvýšení účinnosti látek takto připravených pro léčbu především nádorových onemocnění. Tak tomu bylo i ve studii autorů Evidente a Kornienko (2009), kteří testovali celkem 29 amarylkovitých alkaloidů a jejich derivátů příslušících do 5 nejznámějších skupin těchto látek. Deriváty 1-*O*-acetyllykorin (2), 1,2-*O,O'*-diacetyllykorin (3), lykorin-2-on (4), 1,2-*O,O'*-diacetyl- $\alpha$ -dihydrolykorin (5), N-methyllykorin jodid (6) a lykoren (7) byly pomocí chemických modifikací připraveny z lykorinu, zatímco pseudolykorin (8), galanthin (9), norpluvin (10), amarbelisin (11) a ungeremin (12) byly izolovány z jiných rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Deriváty tetraacetylnarciklasin (26), C10b-*R*-dihydroxypankratistatin (27), *cis*-dihydronarciklasin (28), *trans*-dihydronarciklasin (29) byly připraveny chemicky z alkaloidu narciklasinu. Právě deriváty lykorinu a narciklasinu byly syntetizovány za účelem určení strukturních charakteristik schopných vyvolat protinádorovou aktivitu a s cílem nalézt deriváty se zvýšenou aktivitou a specifíčností. Za použití HeLa, Vero a Jurkat buněčných linií byla hodnocena anti-proliferační a apoptózu vyvolávající aktivita. Jako HeLa buněčné linie byly použity deriváty lidského cervikálního adenokarcinomu, Vero představoval epitel ledvin odvozený z jedné africké opice a jako model pro lidské leukemické buňky byla zkoumána Jurkat buněčná linie. Výše zmíněné alkaloidy, jejich deriváty a analoga byly pro tuto studii připraveny v koncentracích 5, 25 a 1,25  $\mu$ M. Výsledky jsou vyobrazeny v následujících grafech.



**Obrázek č. 10:** Hodnocení protirakovinné aktivity alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*, jejich analog a syntetických derivátů pomocí MTT na buněčné linii HeLa (první graf), na Vero buněčné linii (prostřední graf) a apoptický test alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*, jejich analog a syntetických derivátů za pomoci Annexinu V, propidium jodidu, na buněčné linii Jurkat (Evidente and Kornienko, 2009).

Pro zachování cytotoxického účinku syntetických derivátů, konkrétně lykorinu, na nádorové buněčné linii, je velmi důležité ponechání strukturního uspořádání alkaloidu (lykorinu), tedy konformační volnost v kruhu C, stereochemie na spojení kruhů C/D a ponechání diolové skupiny na kruhu C (Kim *et al.*, 2015). Jak bylo prokázáno v rámci porovnání struktury lykorinu a pseudolykorinu, při modifikaci kruhu A dochází ke vzniku sloučenin se sníženou protirakovinnou aktivitou. Ve studii Lamoral-Theys *et al.* (2009) byl pseudolykorin shledán méně toxickým vůči nádorovým buněčným liniím. Vyskytly se i případy, kdy pseudolykorin vykazoval aktivitu vůči zdravým buňkám. Pokud dojde k substituci na kruhu A zároveň s kruhem C, výsledný produkt opět vykazuje nižší cytotoxickou aktivitu než původní látka. Z toho vyplývá, že pro ponechání účinku u syntetických derivátů je nezbytná přítomnost methyendioxykupiny na kruhu A (Cahlíková *et al.*, 2013, Lamoral-Theys *et al.*, 2009).

Co se týče kruhu B, jeho oxidací dochází ke vzniku cyklického amidu, což způsobuje inaktivitu proti testovaným liniím (Evdokimov *et al.*, 2011). Při kvarternizaci atomu dusíku, což je jiná možnost změny struktury v rámci kruhu B, taktéž došlo ke snížení aktivity v porovnání s lykorinem (Evidente *et al.*, 2009, Evidente and Kornienko, 2009, Lamoral-Theys *et al.*, 2009). Pokud dojde u lykorinu k derivatizaci na atomu dusíku, vzniklý lykorin hydrochlorid, který s hodnotami  $IC_{50}$  (množství potřebné k inhibici 50 % buněk)  $< 5 \mu M$  prokazoval cytotoxickou aktivitu vůči testovaným nádorovým liniím a na buněčné linie normálních lidských fibroblastů s hodnotami  $IC_{50} > 100 \mu M$  nepůsobil (Cao *et al.*, 2013, Lamoral-Theys *et al.*, 2009).

Výsledky naznačují, že syntetická příprava alkaloidů je jednou z možných cest při hledání potencionálně účinných látek. Zároveň se zabývá otázkou, jak zvýšit účinnost původních látek při léčbě nádorových onemocnění.

## 4 Metodika

### 4.1 Materiál

Pro testování polosyntetických analog alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* byly použity buněčné linie střevního karcinomu Caco-2, HT-29 a zdravá lidská buněčná linie FHs 74Int, které byly zakoupeny z European Collection of Cell Culture (ECACC). Ke kultivaci buněčných linií Caco-2 a HT-29 bylo dále použito Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM), pro normální linii FHs 74Int se jednalo o Hybri-Care Medium ATCC 46-X, média byla obohacena o 10% fetální bovinní sérum (FBS), 1% neesenciální aminokyseliny, 1% hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, roztok penicilínu (10 000 MJ) a streptomycinu (100 mg), trypsin, fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline - PBS), epidermální růstový faktor (EGF) a pro vyhodnocení 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT). Výše zmíněný materiál byl zakoupen u společnosti Sigma-Aldrich (CZ). Dimethylsulfoxid (DMSO) byl zakoupený u společnosti Lach-Ner (CZ). Kultivační láhve o ploše 75 cm<sup>2</sup>, sérologické pipety a 96-jamkové mikrotitrační destičky byly pořízeny od Thermo Fisher (UK).

### 4.2 Metodika

Vzorky alkaloidů byly připraveny na katedře etnofarmakologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové týmem ADINACO, který vzorky připravil dle (Cedron *et al.*, 2012). Jako standard byl použit komerčně dostupný vinorelbin, který je běžně používán v léčbě nádorových onemocnění.

**Tabulka č. 4:** Analyzované sloučeniny, jejich označení a molekulární hmotnost.

OZNAČENÍ	LÁTKA	M <sub>R</sub>
LC-15	Acetylambelin	373,406
LC-20	1,2-di- <i>O</i> -acetyllykorin	371,14
LC-26	1,2-di- <i>O</i> -propionyllykorin	399,17
LC-31	Analog skulerinu	411,45
LC-32	Analog skulerinu	439,51
LC-33	Analog skulerinu	523,29
JB-1	Analog haemanthaminu	450,45
JM-1	Analog haemanthaminu	371,43
JM-2B	Analog haemanthaminu	474,33
JM-4A	Analog haemanthaminu	465,50
JM-5B	Analog haemanthaminu	473,45
HN-255	Analog haemanthaminu	405,45
HN-256B	Analog haemanthaminu	439,89
HN-257	Analog haemanthaminu	489,89
JM-2A	Analog haemanthaminu	371,43
5/126	Vinkaminorin	354,49
5/127	Vinkaminorein	354,49
5/154	Hippeastrin	315,33
5/156	Minovincin	352,43
6/001	Homolykorin	315,36
6/002	Masonin	299,32
6/008	Lykorenin	317,38
6/009	Odulin	301,34
6/013	Tetrahydromasonin	303,35

### 4.3 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie kolorektálního karcinomu v podobě buněčných linií Caco-2 a HT-29, byly pěstovány v DMEM médiu s 10% FBS, 1% roztok penicilinu a streptomycinu, 1% hydrogenuhličitanu sodného a 1% pyruvátu sodného, 1% neesenciálních aminokyselin. Normální buněčná linie lidského střeva FHs 74Int byla kultivována v Hybri-Care Médium ATCC 46-X s 30 ng/ml epidermálního růstového faktoru (EGF), 10% FBS, 1% roztok penicilinu a streptomycinu. Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm<sup>2</sup>) s 15 ml příslušného média, které byly vloženy do inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5% CO<sub>2</sub> a teplotou 37 °C, médium bylo měněno každé dva dny. Po 7 denní kultivaci byly buňky propláchnuty pomocí PBS za účelem odstranění starého média. Následně bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu 3 minut. Po 3 minutách byl trypsin neutralizován pomocí 1 ml média. Následně byla buněčná monovrstva seškrábána pomocí buněčné škrabky a přepipetována do 15 ml zkumavky typu Falcon. Dále byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 200 × g. Následně bylo odstraněno staré médium a buňky byly ředěny v novém médiu. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml média s buňkami, které bylo následně přidáno k 15 ml nového média, v kultivační láhvi, a proběhla další kultivace. Zbytek buněk byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky a naředěn na koncentraci  $2,5 \times 10^3$  buněk/ml suspenze.

### 4.4 Cytotoxicita (MTT)

Připravená buněčná suspenze o koncentraci  $2,5 \times 10^3$  buněk/ml byla pipetována do 96-jamkové destičky v množství 200 µl. Po 24 hodinách bylo odstraněno staré médium a přidáno 100 µl nového média spolu s testovanými vzorky v daných koncentracích (10 – 0,005 µM/ml). Takto byly testované vzorky s buňkami inkubovány po dobu 72 hodin. Po této době bylo médium se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 µl čistého média s MTT (1 µg/ml). Po 2 hodinách v CO<sub>2</sub> inkubátoru bylo médium s MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno pomocí porovnání s kontrolou, která obsahovala buňky prostě testovaných látek. Výsledné hodnoty, shrnuté v tabulce č. 5, jsou zaznamenány pomocí inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) odpovídající množství testované látky, která je potřebná k inhibici 50 % buněk. Dle Taylor *et al.* (2014) lze za cytotoxicky účinné látky považovat ty, u nichž byly zjištěny hodnoty IC<sub>50</sub> < 10 µM.



## 4.5 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka, statistické vyhodnocení bylo provedeno v GraphPad Prism.

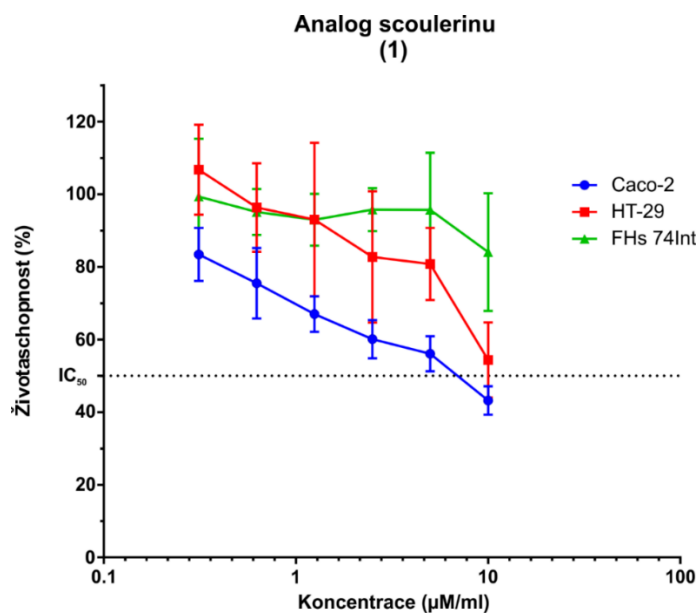
## 5 Výsledky

V rámci této diplomové práce bylo testováno na lidských buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 celkem 24 nově připravených analog alkaloidů rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* a jejich schopnost inhibovat růst na buněčných liniích. Pro srovnání byla použita lidská střevní buněčná linie FHs 74Int. Z námi testovaných vzorků vykazovala toxicitu na buněčné linii kolorektálního karcinomu Caco-2 pouze analoga skulerinu, kdy byly u prvního z nich zaznamenány hodnoty  $IC_{50}$   $7,24 \pm 0,37 \mu\text{M/ml}$ , u druhého se jednalo o hodnoty  $8,62 \pm 0,86 \mu\text{M/ml}$  a poslední z nich vykazoval hodnoty  $1,98 \pm 0,55 \mu\text{M/ml}$ . Na nádorové linii HT-29 však toxicita nebyla zaznamenána a hodnoty  $IC_{50}$  byly  $> 10 \mu\text{M/ml}$ . Z výsledků zobrazených na následujících grafech je patrné, že je zde nadějný selektivní účinek vůči zdravým střevním buňkám, kdy testované látky s  $IC_{50} > 10 \mu\text{M/ml}$  nevykazovaly toxicitu vůči buněčné linii FHs 74Int. Ostatní testované látky byly taktéž analyzovány pro hodnoty  $IC_{50} > 10 \mu\text{M/ml}$ . Jako standard pro posouzení cytotoxické aktivity byl použit vinka alkaloid vinorelbin, který je běžně využívaným prostředkem v léčbě nádorových onemocnění. U vinorelbinu byla pro buněčnou linii Caco-2 naměřena hodnota  $IC_{50}$   $0,04 \mu\text{M}$ . U buněčné linie FHs 74Int hodnota  $IC_{50}$  dosahovala  $0,4 \mu\text{M}$  a byl zde shledán nepatrný selektivní účinek na nádorovou buněčnou tkáň.

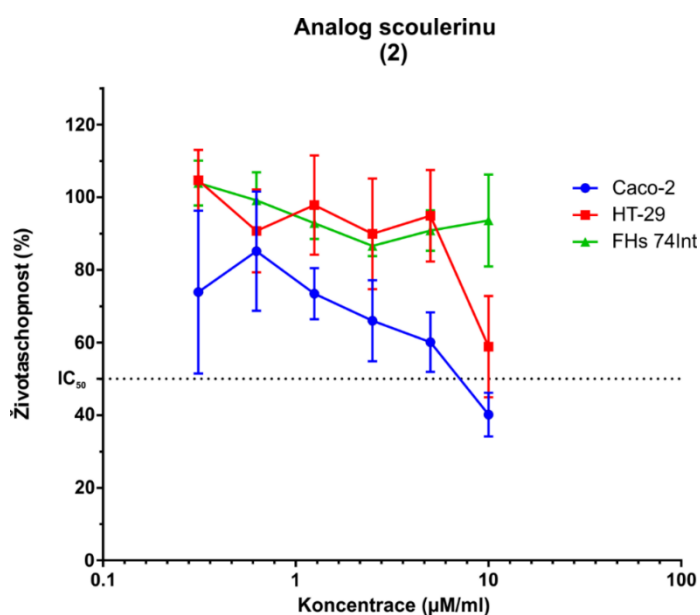
**Tabulka č. 5:** Hodnoty IC<sub>50</sub> námi testovaných sloučenin pro jednotlivé buněčné linie.

Látka	Caco-2	HT-29	FHs 74Int
	IC <sub>50</sub> (μM/ml) (průměr ± SD)		
Acetylbambesin	>10	>10	>10
1,2-di-O-acetyllykorrin	>10	>10	>10
1,2-di-O-propionyllykorrin	>10	>10	>10
Analog skulerinu	7.24 ± 0.37	>10	>10
Analog skulerinu	8.62 ± 0.86	>10	>10
Analog skulerinu	1.98 ± 0.55	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Analog haemanthaminu	>10	>10	>10
Vincaminorin	>10	>10	>10
Vincaminorein	>10	>10	>10
Hippeastrin	>10	>10	>10
Minovincin	>10	>10	>10
Homolykorrin	>10	>10	>10
Masonin	>10	>10	>10
Lykorenin	>10	>10	>10
Odulin	>10	>10	>10
Tetrahydromasonin	>10	>10	>10
Vinorelbin	0.04 ± 0.01	n.d	0.40 ± 0.10

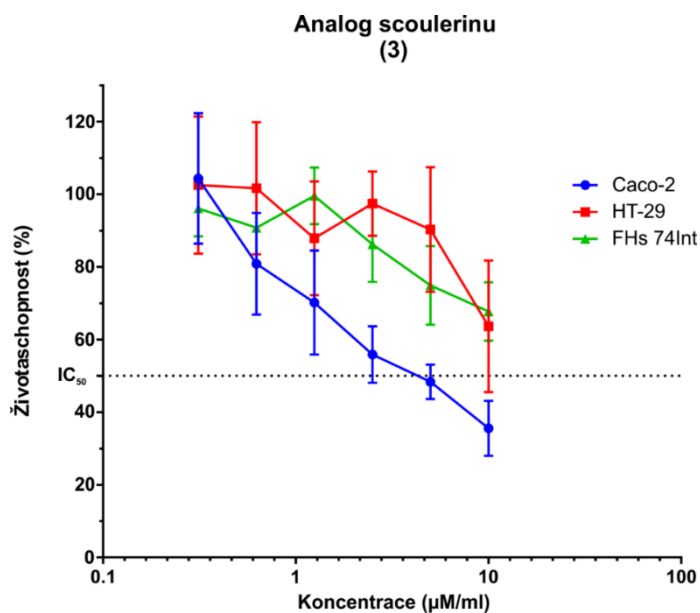
Caco-2, HT-29 – buněčné linie kolorektálního karcinomu; FHs 74Int – zdravá střevní buněčná linie;  
 IC<sub>50</sub> – maximální inhibiční koncentrace, která způsobí 50% růst specifické biologické funkce; SD – směrodatná odchylka; n.d. – nebylo detekováno



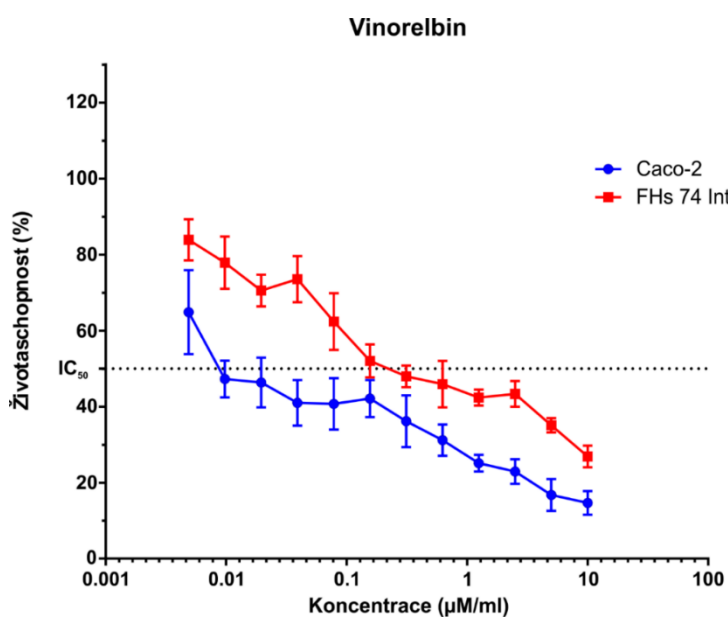
**Graf č. 1:** Křivky znázorňují cytotoxickou aktivitu prvního z testovaných analog skulerinu ( $M_R = 411,45$ ) vyjádřenou hodnotou  $IC_{50}$  v závislosti na koncentraci připravených polosyntetických analog, která byla vyhodnocena pomocí testu MTT, a to vůči buněčnému kolorektálnímu karcinomu Caco-2 a HT-29 a v porovnání s účinky na zdravou střevní buněčnou linii FHs 74Int. Výsledné hodnoty jsou uvedené jako jejich průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.



**Graf č. 2:** Křivky znázorňují cytotoxickou aktivitu druhého z testovaných analog skulerinu ( $M_R = 439,51$ ) vyjádřenou hodnotou  $IC_{50}$  v závislosti na koncentraci připravených polosyntetických analog, která byla vyhodnocena pomocí testu MTT, a to vůči buněčnému kolorektálnímu karcinomu Caco-2 a HT-29 a v porovnání s účinky na zdravou střevní buněčnou linii FHs 74Int. Výsledné hodnoty jsou uvedené jako jejich průměr  $\pm$  směrodatná odchylka



**Graf č. 3:** Křivky znázorňují cytotoxickou aktivitu posledního z testovaných analog skulerinu ( $M_R = 523,29$ ) vyjádřenou hodnotou  $IC_{50}$  v závislosti na koncentraci připravených polosyntetických analog, která byla vyhodnocena pomocí testu MTT, a to vůči buněčnému kolorektálnímu karcinomu Caco-2 a HT-29 a v porovnání s účinky na zdravou střevní buněčnou linii FHs 74Int. Výsledné hodnoty jsou uvedené jako jejich průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.



**Graf č. 4:** Křivky znázorňují životaschopnost buněk (v %) závislou na koncentraci komerčně dostupného vinorelbinu, který byl v této práci použit jako kontrola a byl taktéž vyhodnocen pomocí testu MTT, a to vůči buněčnému kolorektálnímu karcinomu Caco-2 v porovnání s účinky na zdravé střevní buněčné linii FHs 74Int.

## 6 Diskuze

V posledních letech dochází k lepšímu chápání onkologických onemocnění s využíváním moderních technologií i cílenému užívání léků. Přesto však ke snížení výskytu ani k úspěšnější léčbě nedochází (Aggarwal and Shishodia, 2006). Dlouhou historii v léčbě nádorových onemocnění tvoří především rostliny (Hartwell and Bellizzi, 1982). Díky pokrokům v technologii u diagnostických metod jsou nyní opět testovány některé rostlinné sloučeniny, jejichž zkoumání nebylo dříve úspěšné. S tím stoupá využití derivátů těchto přírodních sloučenin se slibnými předpoklady pro použití při léčbě nádorových onemocnění (Cragg and Newman, 2005).

Z námi testovaných 24 vzorků byla antiproliferační aktivita prokázána pouze u 3 syntetických analogů alkaloidu skulerinu. Všechny tyto 3 látky vykazovaly toxicitu vůči buněčné linii kolorektálního karcinomu Caco-2 a nepůsobily na buňky zdravé střevní buněčné linie FHs 74Int.

Na aktivitu skulerinu, jinak nazývaného také jako diskretamin, který byl naším testováním vyhodnocen jako nejúčinnější, byla provedena studie Khamis *et al.* (2004). V této studii byl skulerin testován na karcinomu prsu, kde neprokázal výraznou toxicitu, hodnoty  $IC_{50}$  u 4 testovaných typů prsního karcinomu byly  $> 3058 \mu\text{M}$ . Naopak studie Menezes *et al.* (2016) zabývající se vlivem skulerinu na nádorové buněčné linie myšího melanomu B16-F10, lidského střevního karcinomu HepG2, lidské chronické myeloidní leukémie K562, lidské promyelocytární leukémie HL-60, která využila testu Alamar Blue se 72h inkubací a došla k výsledku, že u všech testovaných buněčných linií je hodnota  $IC_{50} < 20 \mu\text{M}$ . Pouze u jaterního heptokarcinomu buněčné linie Hep-G2 byla zjištěna hodnota  $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$ . Tento výsledek můžeme označit jako cytotoxický ( $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$ ) (Doskočil *et al.*, 2015). Stejných výsledků bylo dosaženo i u retikulinu ( $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ ), ze kterého vzniká právě skulerin (Menezes *et al.*, (2016). Aktivitě retikulinu se věnoval Suresh *et al.* (2012), kde ho testovali pomocí metody MTT na buněčné linii HeLa a normální buněčné linii Vero. Hodnota  $IC_{50}$  pro buněčnou linii HeLa byla  $17,4 \mu\text{g/ml}$  a u normální buněčné linie Vero  $22,0 \mu\text{g/ml}$ . Skulerin patří mezi aporfinové alkaloidy, stejně jako norushinsunin, který vykazoval cytotoxicitu s hodnotou  $IC_{50} 7,6 \mu\text{g/ml}$  u HeLa buněk a u buněčné linie Vero hodnotu  $IC_{50} 20 \mu\text{g/ml}$ . Tento rozdíl v cytotoxické aktivitě může být způsoben výskytem hydroxylové skupiny v poloze C7 a mohl by být tedy použit jako prototyp pro vývoj nových syntetických či polosyntetických analogů pro léčbu nádorových onemocnění.

Aporfinové sloučeniny, ať už izolované z rostlin, tak i získané kompletní syntézou, se dostávají do popředí zájmu mnoha vědeckých skupin. Množství molekul této skupiny se vyznačuje cytotoxickými účinky proti nádorovým buňkám při testování *in vitro* a v několika případech byla zaznamenána protinádorová aktivita i *in vivo*.

Výzkum zaměřený na *in vitro* aktivitu aporfinových alkaloidů publikoval Stévigny *et al.* (2005). Ve své studii se zaměřil na 50 sloučenin řazených do skupiny aporfinových alkaloidů a ty následně testoval vůči čtyřem rakovinným buněčným liniím, a to leukemickým buňkám P388, lidskému epidermoidu buněk ústní dutiny KB16, plicnímu karcinomu A549 a kolorektálnímu karcinomu HT-29. Mezi všemi analyzovanými sloučeninami se nacházely dvě, *S*-ovigerin a *S*-*N*-methylovigerin, jejichž cytotoxická aktivita vůči všem čtyřem zmíněným buněčným liniím dosahovala hodnot  $IC_{50} < 4 \mu M$ . Následně byl zkoumán *S*-magnoflorin a *S*-hernovin, s hodnotou  $IC_{50} 0,7 \mu M$  na buněčnou linii P388. Tato hodnota se velmi blíží k cytotoxické aktivitě vinorelbinu ( $IC_{50} = 0,03 \mu M$  pro buněčnou linii Caco-2) (Doskočil *et al.*, 2015), který se již využívá při léčbě nádorových onemocnění. Zajímavostí, která byla výzkumem Stévigny *et al.* (2005) zjištěna, je skutečnost, že *S*-hernovin vykazoval efektivnější cytotoxickou aktivitu s hodnotami  $IC_{50} 0,7 \mu M$  proti buňkám P388,  $20 \mu M$  vůči linii HT-29 a okolo  $45 \mu M$  proti buňkám KB16 i A549, než jeho methylovaný analog *S*-*N*-methylhernovin, který byl neaktivní vůči všem testovaným buněčným liniím, a to kvůli dosažení hodnoty  $IC_{50} > 153 \mu M$ .

Na stejných liniích byla provedena i dřívější *in vitro* studie Chen *et al.* (1997), kdy došlo k potvrzení cytotoxických účinků aporfinových sloučenin pomocí kolorimetrického testu MTT. Mezi zkoumanými sloučeninami se nacházel i magnoflorin, hernovin i methylhernovin, Magnoflorin dosahoval v rámci tohoto výzkumu hodnot  $ED_{50}$  (efektivní dávka, tedy množství léčiva, které vyvolá požadovaný účinek u 50 % exponované populace) na buněčné linii P388  $0,229 \mu g/ml$ , u KB16 neprokázal významnou cytotoxickou aktivitu, jelikož  $ED_{50} > 50 \mu g/ml$ , ale u linií A549 a HT-29 se jednalo o hodnoty  $13,56 \mu g/ml$  a  $13,50 \mu g/ml$ . U hernovinu odpovídal cytotoxický efekt vůči linii P388  $ED_{50} = 0,21 \mu g/ml$ , u buněčné linie KB16  $ED_{50} = 12,89 \mu g/ml$ , u buněk A549  $14,31 \mu g/ml$ , ale co se týče kolorektálního karcinomu, cytotoxicita odpovídala hodnotě  $ED_{50} = 5,99 \mu g/ml$ . Naproti tomu u *N*-methylhernovinu a retikulinu byly výsledné hodnoty  $ED_{50} > 50 \mu g/ml$  vůči všem testovaným buněčným liniím.

Schopnost jak přírodních, tak syntetických připravených derivátů působit toxicky vůči nádorovým buňkám, je obvykle dána možností inhibovat DNA topoizomerázu. Jedná

se o enzym, který se podílí na utváření dvoušroubovicové DNA. Topoizomeráza je rozlišována na topoizomerázu I a II (Gordaliza *et al.*, 2004), kdy topoizomeráza I je schopna měnit stupeň tvorby DNA dvoušroubovice, prostřednictvím vytvoření jednořetězcových zlomů. Zatímco u topoizomerázy II se jedná o tvorbu dvouřetězcových zlomů. Tyto opačné role topoizomerázy I a II poukazují na protichůdné vlastnosti v procesu regulace DNA. Obě zmíněné aktivity jsou nezbytné pro průběh transkripce, replikace DNA a kondenzace chromatinu (Cholewiński *et al.*, 2011).

Další možností účinku je schopnost se vázat na tubulin, kde dochází k interferenci s cytoskeletem díky vazbám na strukturu mikrotubulu podél celé jeho délky. Tubulin představuje důležitou složku, která plní základní funkci v mnoha procesech, především intracelulární transport a dělení buněk. Konkrétně během mitotické fáze - prometáfáze, kdy dochází k propojení sesterských chromatid a jejich uchycení na vřetena mikrotubulů (Shing *et al.*, 2014).

Všechny vinka alkaloidy, tvořené přírodními látkami vinkristinem a vinblastinem, a jejich polosyntetické deriváty vinflunin, vindesin a vinorelbin, vykazují protinádorovou aktivitu právě díky jejich vysoké afinitě k tubulinu, kdy dochází během mitózy pomocí interakce s mitotickým vřeténkem k vyvolání depolymerace (Meininger *et al.*, 1990, Zhou and Rahmani, 1992). Je to skupina látek s výraznou aktivitou působící na více druhů malignit. Zatímco se polosyntetické sloučeniny obvykle váží na mikrotubuly nižší afinitou než přírodní látky, mají mnohem větší aktivitu proti nádorovým buňkám v preklinických modelech (Kruczynski and Hill, 2001). To ovšem neplatí pokaždé, proto je studiu syntetických derivátů v současnosti věnováno velké množství výzkumů.



## 7 Závěr

Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jsou známy svou různorodou biologickou aktivitou, mezi níž vyniká aktivita anti-proliferační, která byla prokázána již u několika alkaloidů této čeledi. Některé z nich se staly nadějnými v možnosti léčby nádorových onemocnění, která jsou v rozvinutých zemích světa stále častějšími příčinami úmrtí. Navíc se pro rok 2030 předpovídá nárůst tohoto onemocnění právě ve zmíněných rozvinutých zemích světa až o 75 %. Z tohoto důvodu se výzkumy poslední doby stále více zabývají otázkou využití alkaloidů v léčbě nádorových onemocnění. Vzhledem k náročné izolaci alkaloidů z rostlin bývá častějším předmětem výzkumů vývoj jejich syntetických analog, u nichž byla taktéž prokázána biologická aktivita, v některých případech i vyšší než u alkaloidů původních. Takovému výzkumu byla věnována i tato práce, v níž byla testována analoga alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* v podmínkách *in vitro* pomocí testu MTT a porovnávána s používaným léčivem, alkaloidem vinorelbinem.

Přestože samotný skulerin, i jeho analoga, byla doposud předmětem jen několika málo výzkumů, vzhledem k těmto výsledkům a stále stoupajícímu zájmu o deriváty alkaloidů v léčbě nejen nádorových onemocnění, by mohl být tento alkaloid v budoucnu více zkoumán.

## 8 Seznam použitých zkratek

ATCC – American Type Culture Collection

ATP - Adenosintrifosfát

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimethylsulfoxid

DNA - Deoxyribonukleová kyselina

ECACC – The European Collection of Authenticated Cell Cultures

ED<sub>50</sub> – Effective Dose; množství léčiva, které vyvolá požadovaný účinek u 50 % exponované populace

EGF – Epidermal Growth Factor

EMEM – Eagle's Minimum Essential Medium

FBS - fetální bovinní sérum

GI<sub>50</sub> – Growth Inhibition; koncentrace 50 % maximální inhibice buněčné proliferace, která by měla být použita jako cytostatické činidlo (na rozdíl od cytotoxických)

IC<sub>50</sub> – Inhibitory Concentration; množství potřebné k inhibici 50 % buněk

MHC – Major Histocompatibility Complex

MTT – Methylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid

NSCLC – Non-small-cell Lung Carcinoma

PBS – Phosphate Buffer Saline

RNA – Ribonukleová kyselina

RNS – Reactive Nitrogen Species

ROS – Reactive Oxygen Species

WHO – World Health Organization

## 9 Seznam literatury

- Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J, Adamová Z, Bačovský J, Bajčiová V, Bednařík O, Blatný J, Büchler T, Crha I. 2011. *Obecná onkologie*. Galén.
- Adams JM, Cory S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current opinion in immunology* 19: 488-496.
- Aggarwal BB, Shishodia S. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology* 71: 1397-1421.
- Alberts B, Bray D, Johnson A. 1998. aj.: *Základy buněčné biologie-Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, Ústí nad Labem, české vydání.
- Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. 2008. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling* 10: 891-938.
- Aniszewski T. 2015. *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications*. Elsevier.
- Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Shoda K, Kawaguchi T, Hirajima S, Nagata H, Kubota T. 2013. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer research* 33: 3185-3193.
- Arrigoni O, Liso RA, Calabrese G. 1975. Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature* 256: 513-514.
- Baguley BC, Kerr DJ. 2001. *Anticancer drug development*. Academic Press.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences* 78: 431-441.
- Barboza NM, Medina DJ, Budak-Alpdogan T, Aracil M, Jimeno JM, Bertino JR, Banerjee D. 2012. Plitidepsin (Aplidin) is a potent inhibitor of diffuse large cell and Burkitt lymphoma and is synergistic with rituximab. *Cancer biology & therapy* 13: 114-122.
- Bastida J, Berkov S, Torras L, Pigni NB, de Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. 2011. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* 2011: 65-100.
- Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. 1988a. A quantitative evaluation of apoptotic bodies in rat liver. *Liver* 8: 172-177.
- Benedetti A, Jézéquel AM, Orlandi F. 1988b. Preferential distribution of apoptotic bodies in acinar zone 3 of normal human and rat liver. *Journal of hepatology* 7: 319-324.

- Bharat N, Irshad M, Rizvi MMA, Fatma T. 2013. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Cyanobacteria. *IJRSET* 2: 4328-4343.
- Branle F, Lefranc F, Camby I, Jeuken J, Geurts-Moespot A, Sprenger S, Sweep F, Kiss R, Salmon I. 2002. Evaluation of the efficiency of chemotherapy in in vivo orthotopic models of human glioma cells with and without 1p19q deletions and in C6 rat orthotopic allografts serving for the evaluation of surgery combined with chemotherapy. *Cancer* 95: 641-655.
- Butler MS. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products* 67: 2141-2153.
- Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. 2010. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 9-21.
- Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benesova N, Chlebek J, Jun D, Novak Z, Macakova K, Kunes J, Kuca K. 2013. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural product communications* 8: 1541-1544.
- Cao Z, Yu D, Fu S, Zhang G, Pan Y, Bao M, Tu J, Shang B, Guo P, Yang P. 2013. Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity. *Toxicology letters* 218: 174-185.
- Cedrón JC, Del Arco-Aguilar M, Estévez-Braun A, Ravelo ÁG. 2010. Chemistry and biology of *Pancreatium* alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 68: 1-37.
- Cedrón JC, Gutiérrez D, Flores N, Ravelo ÁG, Estévez-Braun A. 2012. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* 20: 5464-5472.
- Cerioti G. 1967. Narciclasine: an antimitotic substance from *Narcissus* bulbs. *Nature* 213: 595-596.
- Chabner BA, Roberts TG. 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 5: 65-72.
- Chase MW, Reveal JL, Fay MF. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132-136.
- Chaudhary A, Sharma PP, Bhardwaj G, Jain V, Bharatam PV, Shrivastav B, Roy RK. 2013. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of novel heterocyclic compounds as anti-proliferative agents. *Medicinal Chemistry Research* 22: 5654-5669.

- Chen I-S, Chen J-J, Duh C-Y, Tsai I-L, Chang C-T. 1997. New aporphine alkaloids and cytotoxic constituents of *Hernandia nymphaeifolia*. *Planta medica* 63: 154-157.
- Cholewiński G, Dzierzbicka K, Kołodziejczyk AM. 2011. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacological Reports* 63: 305-336.
- Cook JW, Loudon JD. 1952. Alkaloids of the Amaryllidaceae. *ALKALOIDS* 2: 331-352.
- Cragg GM, Newman DJ. 2004. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *Journal of Natural Products* 67: 232-244.
- Cragg GM, Newman DJ. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology* 100: 72-79.
- Dal-Bianco P, Maly J, Wöber C, Lind C, Koch G, Hufgard J, Marschall I, Mraz M, Deecke L. 1991. Galanthamine treatment in Alzheimer's disease. *Age-associated Neurological Diseases: Springer*, 59-63.
- Dalecká M, Havelek R, Králövec K, Brůčková L, Cahlíková L. 2013. ALKALOIDY ROSTLIN ČELEDI AMARYLLIDACEAE JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ. *Chem Listy* 107: 701-708.
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating g. 2005. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet* 366: 1784-1793.
- Dasari R, Banuls LMY, Masi M, Pelly SC, Mathieu V, Green IR, van Otterlo WAL, Evidente A, Kiss R, Kornienko A. 2014. C1, C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine: Retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 24: 923-927.
- Dasari S, Tchounwou PB. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* 740: 364-378.
- de Aquino MTP, Malhotra A, Mishra MK, Shanker A. 2015. Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer. *Immunology letters* 166: 117-133.
- De Bont R, Van Larebeke N. 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19: 169-185.
- De Stefano I, Raspaglio G, Zannoni GF, Travaglia D, Prisco MG, Mosca M, Ferlini C, Scambia G, Gallo D. 2009. Antiproliferative and antiangiogenic effects of the

- benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochemical pharmacology* 78: 1374-1381.
- Del Giudice L, Massardo DR, Pontieri P, Wolf K. 2005. Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: Null alleles of RTG genes affect resistance to the alkaloid lycorine in rho 0 petites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 354: 9-14.
- Deng L, Dai P, Ciro A, Smee DF, Djaballah H, Shuman S. 2007. Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. *Journal of virology* 81: 13392-13402.
- DeVita VT, Denham C. Davidson, JD & Oliverio, VT (1967). *Clin Pharmacol Ther* 8: 566-577.
- 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.
- Du Z-Y, Wei X, Huang M-T, Zheng X, Liu Y, Conney AH, Zhang K. 2013. Anti-proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin analogue A2. *Archives of pharmacal research* 36: 1204-1210.
- Eichhorn J, Takada T, Kita Y, Zenk MH. 1998. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry* 49: 1037-1047.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35: 495-516.
- Enoch T, Nurse P. 1991. Coupling M phase and S phase: controls maintaining the dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell* 65: 921-923.
- Epe B. 2002. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biological chemistry* 383: 467-475.
- Evdokimov NM, Lamoral-Theys D, Mathieu V, Andolfi A, Frolova LV, Pelly SC, van Otterlo WAL, Magedov IV, Kiss R, Evidente A. 2011. In search of a cytostatic agent derived from the alkaloid lycorine: Synthesis and growth inhibitory properties of lycorine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* 19: 7252-7261.
- Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WFA, Van Slambrouck S, Kornienko A. 2009. Biological evaluation of structurally diverse amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta medica* 75: 501-507.
- Evidente A, Kornienko A. 2009. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews* 8: 449.

- Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester Jr RF, Wolff JA. 1948. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *New England Journal of Medicine* 238: 787-793.
- Fennell CW, Van Staden J. 2001. Crinum species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 78: 15-26.
- Festjens N, Berghe TV, Vandenabeele P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1757: 1371-1387.
- Frolova LV, Magedov IV, Romero AE, Karki M, Otero I, Hayden K, Evdokimov NM, Banuls LMY, Rastogi SK, Smith WR. 2013. Exploring natural product chemistry and biology with multicomponent reactions. 5. Discovery of a novel tubulin-targeting scaffold derived from the rigidin family of marine alkaloids. *Journal of medicinal chemistry* 56: 6886-6900.
- Fu Y, Li S, Zu Y, Yang G, Yang Z, Luo M, Jiang S, Wink M, Efferth T. 2009. Medicinal chemistry of paclitaxel and its analogues. *Current medicinal chemistry* 16: 3966-3985.
- Furusawa E, Irie H, Combs D, Wildman WC. 1980. Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids. *Chemotherapy* 26: 36-45.
- Furusawa E, Suzuki N, Furusawa S, Lee JYB. 1975. Combination chemotherapy of Rauscher leukemia and ascites tumors by Narcissus alkaloid with standard drugs and effect on cellular immunity. *Experimental Biology and Medicine* 149: 771-778.
- Georgakilas AG. 2008. Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge. *Molecular BioSystems* 4: 30-35.
- Georgakilas AG, Mosley WG, Georgakila S, Ziech D, Panayiotidis MI. 2010. Viral-induced human carcinogenesis: an oxidative stress perspective. *Molecular BioSystems* 6: 1162-1172.
- Geysen HM, Schoenen F, Wagner D, Wagner R. 2003. Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 222-230.
- Gietzen K, Wüthrich A, Bader H. 1982. Effects of microtubular inhibitors on plasma membrane calmodulin-dependent Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase. *Molecular pharmacology* 22: 413-420.
- Gilman A. 1963. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *The American Journal of Surgery* 105: 574-578.

- Golstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences* 32: 37-43.
- Goodman J, Walsh V. 2001. *The story of taxol: nature and politics in the pursuit of an anti-cancer drug*. Cambridge University Press.
- Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT. 1984. Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan. *Jama* 251: 2255.
- Gordaliza M, Garcia PA, Del Corral JMM, Castro MA, Gómez-Zurita MA. 2004. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon* 44: 441-459.
- Green DR, Kroemer G. 2005. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *The Journal of clinical investigation* 115: 2610-2617.
- Hartl J, Doležal M, Miletín M, Opletalová V, Zimčík P. 2009. *Farmaceutická chemie IV*. Karolinum, Praha.
- Hartwell G, Bellizzi R. 1982. Clinical investigation of in vivo endodontically treated mandibular and maxillary molars. *Journal of Endodontics* 8: 555-557.
- Hartwell JL. 1967. Plants used against cancer. *A survey Lloydia* 30: 379-436.
- Havelek R, Cmielova J, Kralovec K, Bruckova L, Bilkova Z, Fousova I, Sinkorova Z, Vavrova J, Rezacova M. 2014a. Specific inhibition of Wee1 kinase and Rad51 recombinase: a strategy to enhance the sensitivity of leukemic T-cells to ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Biochemical and biophysical research communications* 453: 569-575.
- Havelek R, Seifrtova M, Kralovec K, Bruckova L, Cahlikova L, Dalecka M, Vavrova J, Rezacova M, Opletal L, Bilkova Z. 2014b. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* 21: 479-490.
- Herrera MR, Machocho AK, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. 2001. Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta medica* 67: 191-193.
- Hohmann J, Forgo P, Molnár J, Wolfard K, Molnár A, Thalhammer T, Máthé I, Sharples D. 2002. Antiproliferative amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis festalis*. *Planta medica* 68: 454-457.



- Horwitz SB. 2004. Personal Recollections on the Early Development of Taxol<sup>®</sup>. *Journal of natural products* 67: 136-138.
- Hoshino O, Murakata M, Ishizaki M, Kametani T, Honda T, Fukumoto K, Ihara M. 1998. Alkaloids. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. 2009. Cell death. *New England Journal of Medicine* 361: 1570-1583.
- Hwang Y-C, Chu JJ-H, Yang PL, Chen W, Yates MV. 2008. Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral research* 77: 232-236.
- Ingrassia L, Lefranc F, Dewelle J, Pottier L, Mathieu V, Spiegl-Kreinecker S, Sauvage S, El Yazidi M, Dehoux M, Berger W. 2009. Structure– activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an Amaryllidaceae isocarbostryl derivative) as potential anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry* 52: 1100-1114.
- Irwin RL, Smith HJ. 1960. Cholinesterase inhibition by galanthamine and lycoramine. *Biochemical pharmacology* 3: 147-148.
- Jackson AL, Loeb LA. 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 477: 7-21.
- Jimenez A, Santos A, Alonso G, Vazquez D. 1976. Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells: comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 425: 342-348.
- Jin Z. 2016. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports* 33: 1318-1343.
- Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP. 1963. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Research* 23: 1390-1427.
- Kaušitz J. 2006. Význam a postavenie nádorových markerov v skriningu, diagnostike a sledovaní pacientov v onkológii. *Onkológia (Bratisl)*: 155-158.
- Khamis S, Bibby MC, Brown JE, Cooper PA, Scowen I, Wright CW. 2004. Phytochemistry and preliminary biological evaluation of *Cyathostemma argenteum*, a Malaysian plant used traditionally for the treatment of breast cancer. *Phytotherapy Research* 18: 507-510.
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA. 2015. PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research: gkv951*.

- Kim YH, Park EJ, Park MH, Badarch U, Woldemichael GM, Beutler JA. 2006. Crinamine from *Crinum asiaticum* var. *japonicum* inhibits hypoxia inducible factor-1 activity but not activity of hypoxia inducible factor-2. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29: 2140-2142.
- Kinghorn AD. 2001. Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53: 135-148.
- Klener P, Klener jr P. 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada Publishing as.
- Kruczynski A, Hill BT. 2001. Vinflunine, the latest Vinca alkaloid in clinical development: a review of its preclinical anticancer properties. *Critical reviews in oncology/hematology* 40: 159-173.
- Lamoral-Theys D, Andolfi A, Van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calvé B, Wauthoz N, Mégalizzi V, Gras T, Bruyère C, Dubois J. 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: 6244-6256.
- Lemasters JJ. 2005. Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 129: 351-360.
- Ley SV, Baxendale IR. 2002. New tools and concepts for modern organic synthesis. *Nature Reviews Drug Discovery* 1: 573-586.
- Li H, Horke S, Förstermann U. 2013. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in pharmacological sciences* 34: 313-319.
- Li Y, Liu J, Tang L-J, Shi Y-W, Ren W, Hu W-X. 2007. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncology reports* 17: 377-384.
- Lim CH, Dedon PC, Deen WM. 2008. Kinetic analysis of intracellular concentrations of reactive nitrogen species. *Chemical research in toxicology* 21: 2134-2147.
- Liu J, Li Y, Tang LJ, Zhang GP, Hu WX. 2007. Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. *Biomedicine & pharmacotherapy* 61: 229-234.
- Lombardino JG, Lowe JA. 2004. The role of the medicinal chemist in drug discovery—then and now. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 853-862.
- Lopez AD, Murray CJL. 1996. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Harvard School of Public Health.

- Mackey ZB, Baca AM, Mallari JP, Apsel B, Shelat A, Hansell EJ, Chiang PK, Wolff B, Guy KR, Williams J. 2006. Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*. *Chemical biology & drug design* 67: 355-363.
- Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146: 3.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. 2006. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43.
- Mansoor TA, Borralho PM, Dewanjee S, Mulhovo S, Rodrigues CMP, Ferreira M-JU. 2013. Monoterpene bisindole alkaloids, from the African medicinal plant *Tabernaemontana elegans*, induce apoptosis in HCT116 human colon carcinoma cells. *Journal of ethnopharmacology* 149: 463-470.
- Marsden VS, Strasser A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annual review of immunology* 21: 71-105.
- Mathers C, Fat DM, Boerma JT. 2008. The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization.
- Mathieu A, Rimmelink M, D'Haene N, Penant S, Gaussin JF, Van Ginckel R, Darro F, Kiss R, Salmon I. 2004. Development of a chemoresistant orthotopic human nonsmall cell lung carcinoma model in nude mice. *Cancer* 101: 1908-1918.
- Mathieu V, Pirker C, Martin de Lassalle E, Vernier M, Mijatovic T, DeNeve N, Gaussin JF, Dehoux M, Lefranc F, Berger W. 2009. The sodium pump  $\alpha 1$  sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. *Journal of cellular and molecular medicine* 13: 3960-3972.
- McLachlan A, Kekre N, McNulty J, Pandey S. 2005. Pancratistatin: a natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis* 10: 619-630.
- McNulty J, Nair JJ, Little JRL, Brennan JD, Bastida J. 2010. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20: 5290-5294.
- Meininger V, Binet S, Chaineau E, Fellous A. 1990. In situ response to vinka alkaloids by microtubules in cultured post-implanted mouse embryos. *Biology of the Cell* 68: 21-29.
- Mellor HR, Callaghan R. 2008. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* 81: 275-300.

- Menezes LRA, Costa COD, Rodrigues ACBdC, Santo FRdE, Nepel A, Dutra LM, Silva F, Soares MBP, Barison A, Costa EV. 2016. Cytotoxic Alkaloids from the Stem of *Xylopia laevigata*. *Molecules* 21: 890.
- Min BS, Gao JJ, Nakamura N, Kim YH, Hattori M. 2001. Cytotoxic Alkaloids and a Flavan from the Bulbs of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 49: 1217-1219.
- Mothes K, Schütte HR, Luckner M, Böhm H. 1985. *Biochemistry of alkaloids*. VCH.
- Nakagawa Y, Uyeo S, Yajima H. 1956. The double bond in lycorine. *SOC CHEMICAL INDUSTRY 14 BELGRAVE SQUARE, LONDON SW1X 8PS, ENGLAND*, p. 1238-1239.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of natural products* 66: 1022-1037.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports* 17: 215-234.
- Oberlies NH, Kroll DJ. 2004. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. *Journal of natural products* 67: 129-135.
- Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. 2003. The Effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Molecular cancer therapeutics* 2: 427-436.
- Oktábec Z, Jampilek J. 2013. *STRUČNÁ HISTORIE CHEMOTERAPIE*. *Chem Listy* 107: 151-159.
- Oloyede GK, Oke MJ, Raji Y, Olugbade AT. 2010. Antioxidant and anticonvulsant alkaloids in *Crinum ornatum* bulb extract. *World journal of chemistry* 5: 26-31.
- Pettit GR, Pettit 3rd GR, Backhaus RA, Boyd MR, Meerow AW. 1993. Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostryls from *Hymenocallis*. *Journal of Natural Products* 56: 1682-1687.
- Pollycove M, Feinendegen LE. 2003. Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage. *Human & experimental toxicology* 22: 290-306.
- Rao PS, Ramanadham M, Prasad MNV. 2009. Anti-proliferative and cytotoxic effects of *Strychnos nux-vomica* root extract on human multiple myeloma cell line–RPMI 8226. *Food and chemical toxicology* 47: 283-288.
- Renard-Nozaki J, Kim T, Imakura Y, Kihara M, Kobayashi S. 1989. Effect of alkaloids isolated from *Amaryllidaceae* on herpes simplex virus. *Research in virology* 140: 115-128.

- Rigby JH, Cavezza A, Heeg MJ. 1998. Total synthesis of ( $\pm$ )-tazettine. *Journal of the American Chemical Society* 120: 3664-3670.
- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. 1979. *Pathologic basis of disease* Saunders. Philadelphia, London, Toronto: 336-341.
- Rossignol E, Debiton E, Fabbro D, Moreau P, Prudhomme M, Anizon F. 2008. In-vitro antiproliferative activities and kinase inhibitory potencies of meridianin derivatives. *Anti-Cancer Drugs* 19: 789-792.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277: 665-667.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. 2010. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704: 152-159.
- Sener B, Orhan I, Satayavivad J. 2003. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* 17: 1220-1223.
- Shing JC, Choi JW, Chapman R, Schroeder MA, Sarkaria JN, Fauq A, Bram RJ. 2014. A novel synthetic 1, 3-phenyl bis-thiourea compound targets microtubule polymerization to cause cancer cell death. *Cancer biology & therapy* 15: 895-905.
- Siedlakowski P, McLachlan-Burgess A, Griffin C, Tirumalai SS, McNulty J, Pandey S. 2008. Synergy of Pancreatistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer biology & therapy* 7: 376-384.
- Staněk J. 1957. *Alkaloidy*. Československé akademie věd.
- Stevigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J. 2005. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 5: 173-182.
- Strasser A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 5: 189-200.
- Suresh HM, Shivakumar B, Shivakumar SI. 2012. Cytotoxicity of aporphine alkaloids from the roots of *Annona reticulata* on human cancer cell lines. *International Journal of Plant Research* 2: 57-60.
- Tahchy AE, Boisbrun M, Ptak A, Dupire F, Chrétien F, Henry M, Chapleur Y, Laurain-Mattar D. 2010. New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta Biochimica Polonica* 57: 75.
- Tanker M, Çitoglu G, Gümünel B, Hener B. 1996. Alkaloids of *Sternbergia clusiana* and their analgesic effects. *International journal of pharmacognosy* 34: 194-197.

- Van der Heijden J, De Jong MC, Dijkmans BAC, Lems WF, Oerlemans R, Kathmann I, Schalkwijk CG, Scheffer GL, Scheper RJ, Jansen G. 2004. Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNF $\alpha$ . *Annals of the rheumatic diseases* 63: 138-143.
- Van Goietsenoven G, Andolfi A, Lallemand B, Cimmino A, Lamoral-Theys D, Gras T, Abou-Donia A, Dubois J, Lefranc F, Mathieu V. 2010. Amaryllidaceae Alkaloids Belonging to Different Structural Subgroups Display Activity against Apoptosis-Resistant Cancer Cells†. *Journal of natural products* 73: 1223-1227.
- Wall ME, Wani MC. 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of ethnopharmacology* 51: 239-254.
- Wang Y, Liu Q, Liu Z, Li B, Sun Z, Zhou H, Zhang X, Gong Y, Shao C. 2012. Berberine, a genotoxic alkaloid, induces ATM-Chk1 mediated G2 arrest in prostate cancer cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 734: 20-29.
- Weniger B, Italiano L, Beck JP, Bastida J, Bergonon S, Codina C, Lobstein A, Anton R. 1995. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta medica* 61: 77-79.
- Wongsirisin P, Yodkeeree S, Pompimon W, Limtrakul P. 2012. Induction of G1 arrest and apoptosis in human cancer cells by crebanine, an alkaloid from *Stephania venosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 60: 1283-1289.
- Woodward RB, Doering WE. 1944. The total synthesis of quinine. *J Am Chem Soc* 66: 849-849.
- World Health O. 2002. The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* 68: 251-306.
- Yan MH, Wang X, Zhu X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine* 62: 90-101.
- Zdařilová A, Malíková J, Dvořák Z, Ulrichová J, Šimánek V. 2006. Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vitro a in vivo. *Chem listy* 100: 30-41.
- Zhou X-J, Rahmani R. 1992. Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs* 44: 1-16.
- Zong W-X, Thompson CB. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes & development* 20: 1-15.

- Zupko I, Rethy B, Hohmann J, Molnar J, Ocsovszki I, Falkay G. 2009. Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In vivo* 23: 41-48.
- Çitoğlu G, Tanker M, Gümüşel B. 1998. Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytotherapy Research* 12: 205-206.