

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



***In vitro* antiproliferační aktivita isochinolinových
alkaloidů**

Diplomová práce

Autor práce: Alžběta Maryšková

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* antiproliferační aktivita isochinolinových alkaloidů" 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 poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za jeho přátelský přístup, odborné vedení, četné konzultace a cenné rady v průběhu mého studia. Dále bych ráda poděkovala za příjemnou spolupráci a odborný dohled doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D., Mgr. Daniele Hulcové, Mgr. Kateřině Breiterové a celému vědeckému týmu ADINACO z Farmaceutické fakulty Karlovy univerzity v Hradci Králové. Děkuji také své rodině za jejich ochotu a vstřícnost zkontrolovat tuto práci a jejich všestrannou podporu během celého mého studia.

***In vitro* antiproliferační aktivita isochinolinových alkaloidů**

Souhrn

Nádorová onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích a druhou nejčastější v zemích rozvojových. V současné době výskyt různých typů nádorových onemocnění stále stoupá a je to dáno hlavně stárnoucí populací a nevhodným životním stylem. Toto onemocnění vzniká samovolným růstem nádorových buněk, u kterých došlo k porušení apoptózy a rozvinutí nekontrolovatelné proliferace. Takto změněné buňky se mohou rozšiřovat do celého těla prostřednictvím mízního a krevního systému. Je tedy snaha hledat účinné látky, které by měly antiproliferační efekt, zabránily by růstu nádorových buněk a byly by tak použitelné během léčby nádorových onemocnění. V současné době je výzkum zaměřen na běžně se vyskytující látky v přírodě s potenciálním antiproliferačním účinkem. Mezi takové látky patří i isochinolinové alkaloidy. V dnešní medicíně se z isochinolinových alkaloidů používá hlavně morfin a kodein pro jejich analgetické účinky a vinkristin s vinblastinem, které mají protinádorovou aktivitu.

Cílem této práce bylo zjistit antiproliferační vliv 46 různých druhů isochinolinových alkaloidů na lidské nádorové buňky kolorektálního karcinomu Caco-2 a hepatocelulárního karcinomu Hep-G2 v porovnání se zdravými lidskými plicními fibroblasty MRC-5. Ke stanovení této aktivity bylo použito klasické metody MTT využívající soli tetrazol bromidu.

Hledaná antiproliferační aktivita byla zjištěna pouze u pěti alkaloidů a to scoulerinu, který prokázal IC_{50} u Caco-2 buněk $6,44 \pm 0,87 \mu\text{M}$ a na buněčných liniích Hep-G2 $4,57 \pm 0,42 \mu\text{M}$, berbaminu (IC_{50} na Hep-G2 buňkách $4,56 \pm 0,32 \mu\text{M}$), parfamidinu (IC_{50} na Hep-G2 buňkách $8,74 \pm 0,29 \mu\text{M}$), aromolinu (IC_{50} na Caco-2 buňkách $5,85 \pm 0,14 \mu\text{M}$) a bersavin hydrochloridu (IC_{50} na Caco-2 buňkách $2,84 \pm 0,72 \mu\text{M}$ a na Hep-G2 buňkách $3,43 \pm 0,26 \mu\text{M}$). Ostatní zkoumané isochinolinové alkaloidy neprokázaly cytotoxicitu ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$) na testovaných buněčných liniích.

Námi pozitivně identifikované látky je tedy vhodné podrobit dalšímu přesnějšímu studiu. Jedná se především o posouzení jejich mechanického účinku v buňkách zdravých i nádorových a to nejen v podmínkách *in vitro*, ale i *in vivo*.

Klíčová slova: Cytotoxicita, buněčné linie, Caco-2, Hep-G2, alkaloidy

***In vitro* antiproliferative activity of isoquinoline alkaloids**

Summary

Cancer is the leading cause of death in developed countries and the second most common in developing countries. Unfortunately, currently the incidence of various types of cancer is increasing and it is mainly due to an aging population and unhealthy lifestyle. This disease is the result of spontaneous growth of tumor cells where apoptosis is not functional and there by induces uncontrolled proliferation. These transformed cells can spread throughout the body, through the lymphatic system and blood. An effort is put into finding effective substances which would have antiproliferative effect and prevent the growth of tumor cells, thus they would be useful during the cancer treatment. Currently, the research focuses on substances commonly occurring in the nature with potential antiproliferative activity. These substances include isoquinoline alkaloids. In contemporary medicine the mainly used isoquinoline alkaloids are morphine and codeine for their analgetic effect and vincristine with vinblastine which have antiproliferative effect.

The aim of this work was to determine the antiproliferative effect of the 46 different kinds of isoquinoline alkaloids on human tumor cells of colorectal carcinoma Caco-2 and hepatocellular carcinoma Hep-G2 compared to the normal human lung fibroblasts MRC-5. To determine this activity the classical method MTT, using salt of tetrazolbromide, was used.

Antiproliferative activity was observed only in five alkaloids; scoulerin which showed IC_{50} values of Caco-2 cells $6.44 \pm 0.87 \mu\text{M}$ and Hep-G2 $4.57 \pm 0.42 \mu\text{M}$ berbamin (IC_{50} Hep-G2 cells $4.56 \pm 0.32 \mu\text{M}$) parfumidin (IC_{50} Hep-G2 cells $8.74 \pm 0.29 \mu\text{M}$) aromolin (IC_{50} Caco-2 cells $5.85 \pm 0.14 \mu\text{M}$) and bersavin hydrochloride (IC_{50} Caco-2 cells $2.84 \pm 0.72 \mu\text{M}$ and on Hep-G2 cells $3.43 \pm 0.26 \mu\text{M}$). Other analysed isoquinoline alkaloids did not prove cytotoxicity ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$) in the tested cell lines.

Our positively identified substances should be subjected to a further precise study of their mechanical effect on healthy as well as cancer cells not only *in vitro* but also *in vivo*.

Keywords: cytotoxicity, cell lines, Caco-2, Hep-G2, alkaloids

Obsah

1 Úvod.....	3
2 Cíl práce a hypotéza.....	4
3 Literární rešerše	5
3.1 Nádorová onemocnění ve světě a v České republice	5
3.2 Nádorové onemocnění.....	7
3.3 Karcinogeneze	10
3.4 Obecné postupy léčby nádorového onemocnění.....	12
3.4.1 Léčba melanomu	12
3.5 Alkaloidy	14
3.5.1 Isochinolinové alkaloidy	15
3.5.1.1 Jednoduché báze	16
3.5.1.2 Benzyliochinolinové alkaloidy	16
3.5.1.3 Aporfinové alkaloidy	17
3.5.1.4 Protoberberinové alkaloidy	18
3.5.1.5 Protopinové alkaloidy.....	19
3.5.1.6 Alkaloidy ftalidisochinolinové	20
3.5.1.7 Fenanthrenisochinolinové alkaloidy.....	21
3.5.2 Léčebné účinky isochinolinových alkaloidů.....	24
3.5.3 Interakce alkaloidů s buněčnými komponentami	26
3.5.3.1 Interakce s DNA	27
3.5.3.2 Interakce s mikrotubuly	28
4 Materiál a metodika.....	30
4.1 Materiál.....	30
4.2 Metodika	30
4.2.1 Příprava extraktů	30
4.2.2 Kultivace buněčných linií	32
4.2.3 Cytotoxicita (MTT- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan).....	32
4.2.4 Statistické vyhodnocení	32
5 Výsledky	33
6 Diskuze	38
7 Závěr.....	43

8 Seznam použitých zkratk	44
9 Seznam obrázků a tabulek	45
10 Seznam použité literatury	46

1 Úvod

Látky rostlinného původu jsou nezastupitelnou součástí léčby nejrůznějších lidských chorob už tisíce let a to včetně nádorových onemocnění. V současnosti je využíváno 60 % cytostatik, které pochází z rostlin, mořských organismů nebo jsou z přírodních zdrojů odvozené (Cragg and Newman, 2005). V padesátých letech 20. století byl objeven protinádorový potenciál *Vinca* alkaloidů a podofylotoxinů, který odstartoval zkoumání rostlinných extraktů a jejich antiproliferační aktivity. V dalších desetiletích se začaly využívat jako protinádorová léčiva rostlinného původu taxany a deriváty kamptotecinu. Poté však začal zájem o rostlinné látky s terapeutickým potenciálem v léčbě nádorových onemocnění upadat. Bylo to z důvodu zjištění špatné rozpustnosti a výrazné toxicity vůči nádorovým i zdravým buňkám. Díky rozvoji technologií v devadesátých letech se výzkum rostlinných látek s cytotoxickými vlastnostmi znovu obnovil a dnes je zaměřen na zvýšení terapeutických účinků a jejich cílené působení pouze v nádorových buňkách (Turcotte and Giaccia, 2010).

Mezi takové látky patří i isochinolinové alkaloidy, které jsou sekundárními metabolity rostlin například čeledí *Papaveraceae* (mákovité), *Fumariaceae* (zemědýmovitě), *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité) a *Rutaceae* (routovité). Isochinolinové alkaloidy vykazují antifungální, antimikrobiální, protizánětlivé a antiproliferační účinky. Ve farmacii se nejvíce používají morfin, kodein, vinblastin nebo vinkristin. Poslední jmenované alkaloidy se využívají pro jejich silnou protinádorovou aktivitu (Panzer *et al.*, 2001).

Dnes je nádorové onemocnění nejběžnějším onemocněním ve světě. Jenom v České republice se od roku 2004 rozšířilo o 22 % a v roce 2014 zde na něj zemřelo 27 000 lidí (Siegel *et al.*, 2013). Léčba nádorových buněk je velmi komplikovaná a pro pacienta i velmi náročná. Všechny léčebné metody se snaží zlikvidovat nádorové buňky, přičemž ale většinou ničí i ty zdravé. Proto je důležité objevit látku, která dokáže selektovat buňky a účinkovat pouze na nádorové. Isochinolinové alkaloidy tento potenciál mají (Dong *et al.*, 2004).

2 Cíl práce a hypotéza

Cílem práce je otestování doposud netestovaných isochinolinových alkaloidů na jejich možnou antiproliferační aktivitu *in vitro* pomocí buněčných modelů kolorektálního karcinomu buněčné linie Caco-2 a hepatocelulárního karcinomu Hep-G2.

Hypotézou je, že některé druhy isochinolinových alkaloidů mohou mít antiproliferační aktivitu a jsou vhodné pro další podrobné testování.

3 Literární rešerše

3.1 Nádorová onemocnění ve světě a v České republice

Nádorová onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích a druhou v zemích rozvojových. V současné době diagnóza nádorového onemocnění stále stoupá z důvodu nárůstu stárnoucí populace a životního stylu lidí (Siegel *et al.*, 2014). Mezi nejběžnější nádorové onemocnění ve světě patří gastrointestinální (Xin *et al.*, 2015) a to zejména jeho maligní stav, který se nazývá kolorektální karcinom. Incidence pro rok 2012 ve světě byla odhadnuta na celkem 1 360 602 nově diagnostikovaných nádorů kolorekta a v Evropě na 447 136 nádorů (tab. 1) (Ferlay, 2013). Největším rizikem vzniku kolorektálního karcinomu jsou genetické faktory, životní styl a prostředí.

U většiny pacientů není tento karcinom diagnostikován v jeho raném stádiu, je poměrně odolný vůči chemoterapii a i díky přítomnosti a množení metastáz zde existuje pouze 12% přežití období pěti let (Diaz *et al.*, 2015).

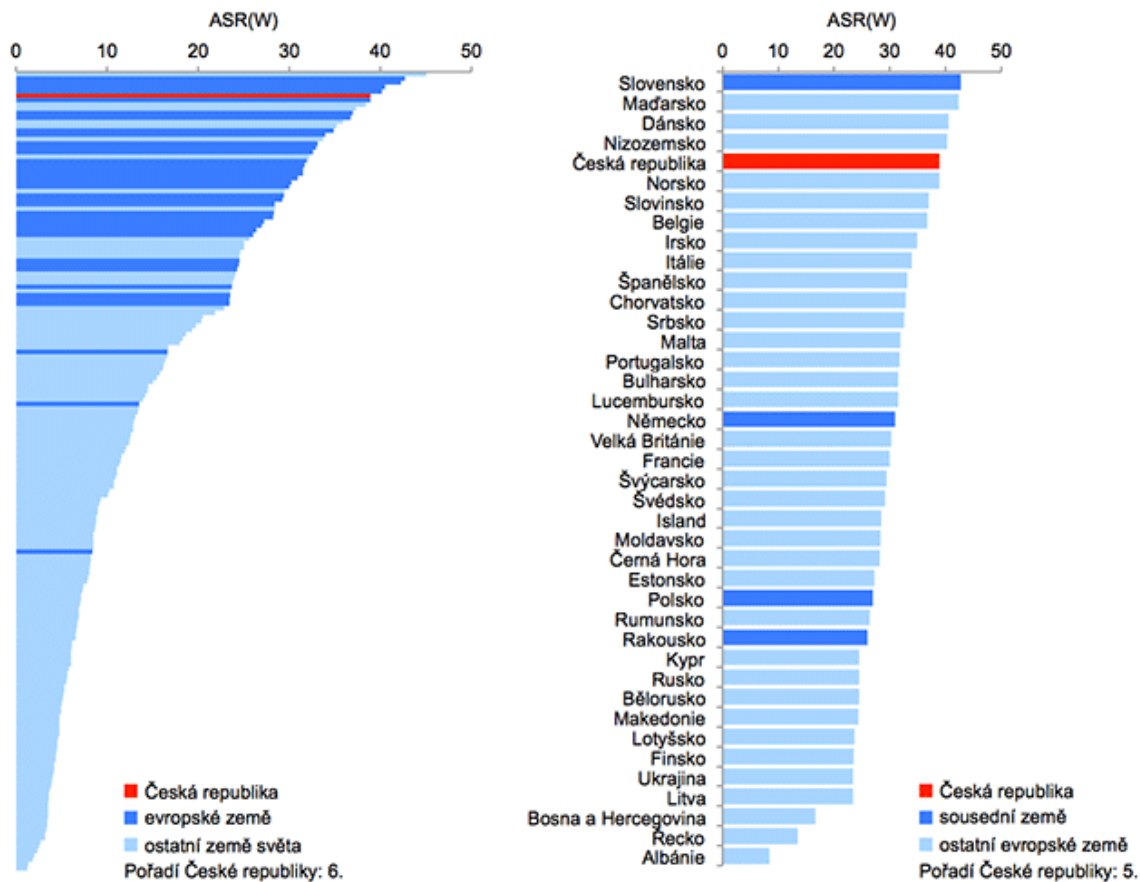
Tab. 1: Epidemiologie kolorektálního karcinomu ve světě

Parametr	Muži	Ženy	Celá populace
Incidence Počet novotvarů	746 298	614 304	1 360 602
Mortalita Počet úmrtí	373 639	320 294	693 933
Prevalence Pacienti žijící 5 let od diagnózy	1 953 431	1 590 151	3 543 582
Kumulativní riziko vzniku nádoru Od 75 let	2,36 %	1,57 %	1,95 %

Zdroj: Ferlay, 2013

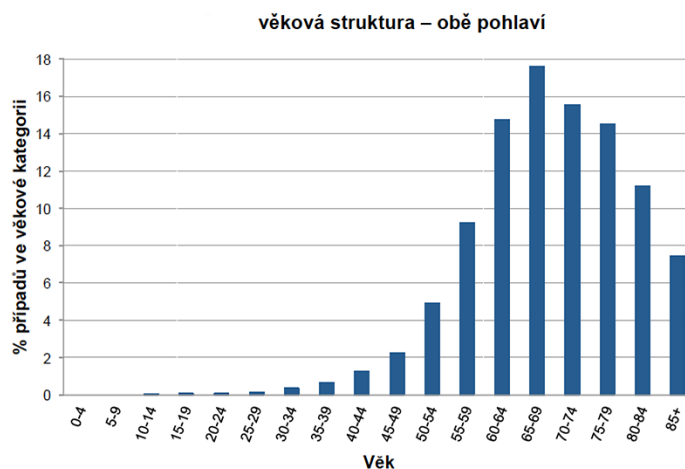
Z níže uvedených dat (obr. 1) je patrné, že kolorektálním karcinomem trpí především Evropané. Česká populace je ve světovém měřítku šestou a v evropském pátou nejzatíženější zemí kolorektálním karcinomem hned za Slovenskem, Maďarskem, Dánskem a Nizozemím. U mužů je kolorektální karcinom diagnostikován jako druhé nejčastější nádorové onemocnění u žen jako třetí nejčastější. Z tabulky č. 1 rovněž vyplývá, že kumulativní riziko vzniku nádorů po 75. roce života u mužů roste více než u žen. Právě tento věk je typický pro českého

pacienta s kolorektálním karcinomem, přesto 20 % lidí diagnostikovaných je mladší šedesáti let a tedy v produktivním věku (obr.2) (NOR, 2015).



Obr. 1: Incidence nádorů tlustého střeva a konečníku v mezinárodním srovnání

Zdroj: Ferlay, 2013



Obr. 2: Podíl případů ve věkové kategorii (analyzováno období 2009–2013)

Zdroj: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2015

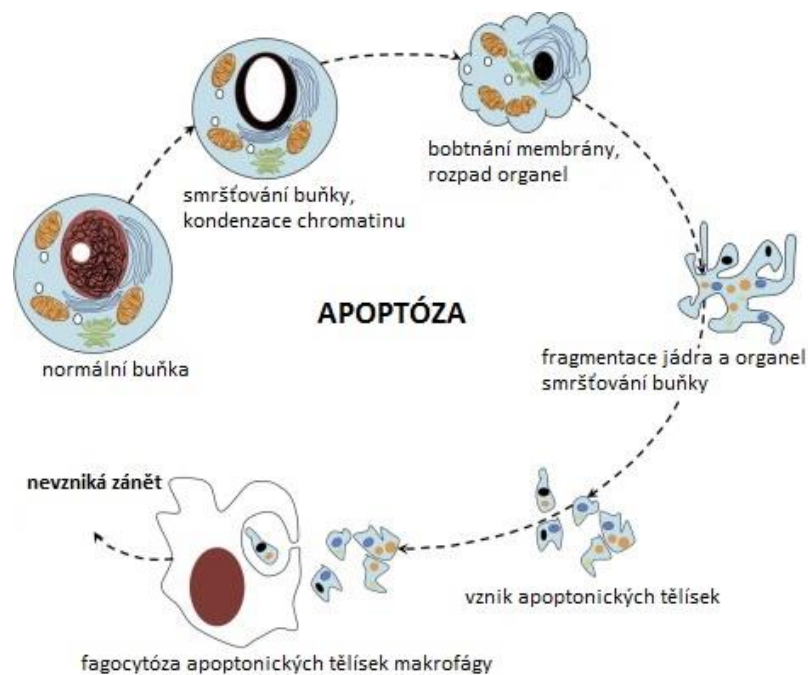
3.2 Nádorové onemocnění

Nádorové onemocnění vzniká díky nekontrolovanému růstu nádorových buněk, které se postupně šíří do okolních tkání, mízního a krevního systému až metastázuje v orgánech (Petruželka and Konopásek, 2003). Nádorová onemocnění jsou zapříčiněna genetickou změnou na buněčné úrovni nejčastěji během buněčného dělení. Genetické změny buněk jsou příčinou nečinnosti signálních drah, které regulují buněčné dělení. Mutace těchto buněk mohou dospět až k samovolné proliferaci a vzniku nádorového onemocnění (Kufe *et al.*, 2003). K těmto změnám dochází v důsledku exogenních a endogenních faktorů (Adam *et al.*, 2003a).

Nádorová onemocnění nejvíce ovlivňují exogenní faktory. Nejvýznamnějším z těchto faktorů je užívání tabáku, které zvyšuje úmrtnost až o 30 %. Mezi významné exogenní vlivy dále patří výživa a s ní spojená energetická bilance, obezita, nedostatečná fyzická aktivita a v neposlední řadě vystavování se nadměrnému UV záření a chemickým karcinogenům (naftylamin, N-nitrosamin). Mezi silné karcinogeny rovněž patří i alkoholické nápoje (Irigaray *et al.*, 2007; Sankpal *et al.*, 2012). Veškeré tyto podněty mají za následek vznik oxidačního stresu, který může vyústit v narušení správného fungování apoptózy. Během oxidačního stresu dochází k působení reaktivních forem kyslíku (ROS - reactive oxygens species) a dusíku (RNS – reactive nitrogen species), například ze superoxidu nacházejícího se v dýchacím řetězci mitochondrií vznikne hydrogen peroxid. Další možností je vliv hydroxylových radikálů a nepřímý vliv enzymů monoaminoxidázy, které mohou pozměňovat a narušovat purinové a pyrimidové báze, což má za následek poškození DNA (Matés *et al.*, 2010). Změny DNA zapříčiněné ROS se mohou projevit ve formě mutací, delecí, amplifikací genu nebo transkripce DNA (Matés *et al.*, 2008). Změny DNA mohou působit také jako signální molekuly buněčné proliferace, jelikož jejich genovou aktivací napomáhají metastázám nádorů (Ishikawa *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2012).

Mezi endogenní faktory ovlivňující nádorové onemocnění patří především geneticky vrozené mutace, které se vyskytují v každé buňce organismu a vytváří tak základ pro nádory. Dědičného původu bývá 5–10 % z diagnostikovaných nádorových onemocnění (Adam *et al.*, 2003a). Mezi další endogenní faktory patří změny v hormonálním a imunitním systému a poruchy metabolismu (Cohen and Lawson, 1995).

Zde je nutno poznamenat, že jediná mutace obyčejné buňky nemůže vytvořit buňku maligní. Proces onkogenní transformace je vícestupňový a často je jen příčinou stárnutí buněk nebo nedostatečnou opravou vzniklých chyb v DNA (Adam *et al.*, 2003a), které se objevují v přibližné frekvenci 10^{-5} až 10^{-6} , z tohoto důvodu může porucha normální buněčné apoptózy vést ke zvyšující se kumulaci zmutovaných buněk vedoucích až k patogenezi (Cohen and Lawson, 1995).



Obr. 3: Průběh apoptózy

Upraveno dle: Abou-Ghali and Stiban (2015)

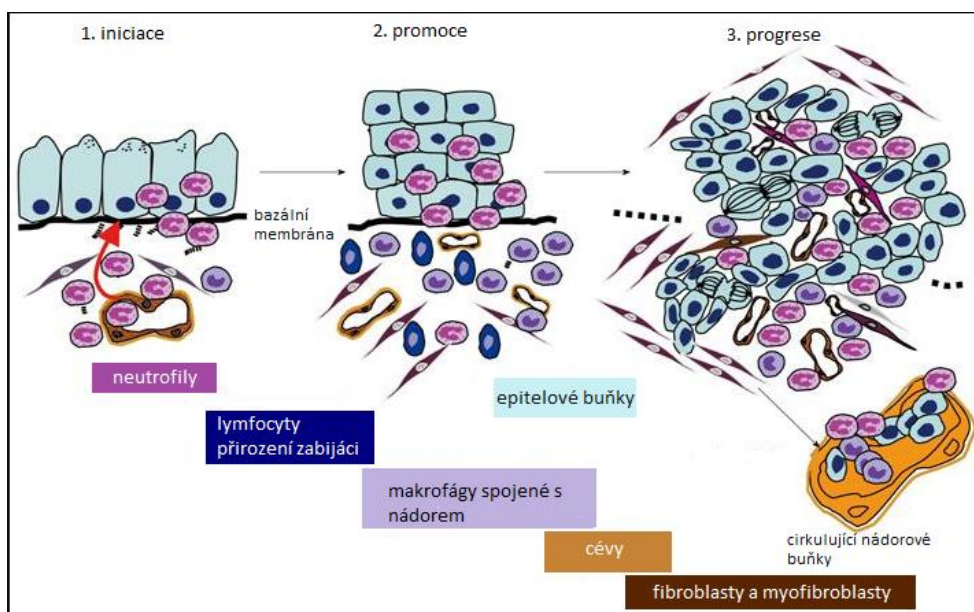
Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která nevyvolává zánět. Je zprostředkována cystein dependentními aspartáty, což jsou specifické proteázy (kaspázy). U zdravého dospělého člověka projde apoptózou okolo 10 miliónů buněk denně (Curtin and Cotter, 2003). Apoptóza je důležitá pro udržení homeostázy organismu, zachování velikosti a tvaru tkáně (Los *et al.*, 1999), k odstranění buněk, které byly infikované, nefunkční nebo měly narušenou DNA (Kinloch *et al.*, 1999). Během apoptózy dojde k mnohým morfologickým změnám buňky (obr. 3). Buňka se může smršťovat, nebo dojde k zahuštění cytoplazmy, rozpadu jádra, kapalnění chromatinu, bobtnání membrány nebo dělení DNA. Poté dojde k rozdělení celé buňky na tzv. apoptotická tělíška, která jsou složená mnohdy z funkčních organel, cytoplazmatických částí a buněčné nebo plazmatické membrány. Membrána zabraňuje úniku

intracelulárních látek, které by mohly způsobit zánět. Plazmatická membrána je z vnější strany složená z fosfatidylserinu, který přitahuje makrofágy a dochází tak k fagocytóze (Elmore, 2007).

V minulosti se vědci domnívali, že nádorové onemocnění může vzniknout jediným negativním zásahem do buňky. Dnes se již odhaduje, že ke vzniku plně maligní buňky je zapotřebí 4–8 různých genetických nebo epigenetických změn dané buňky. Proces, který probíhá při vzniku plně maligní buňky, se nazývá karcinogeneze (Adam *et al.*, 2003a; Irigaray *et al.*, 2007).

3.3 Karcinogeneze

Karcinogeneze je vícestupňový proces, který zahrnuje iniciaci, propagaci a progresi. Iniciace se vyznačuje tvorbou preneoplastických buněk, které vznikají nevratnou genotoxickou mutací, způsobenou chemickými, fyzikálními nebo biologickými karcinogeny. Tyto mutace se většinou vyskytují u genů, které řídí buněčný cyklus, diferenciaci buněk, apoptózu a opravy DNA, což vede k dalšímu rozšíření buněk s touto genetickou změnou (Vincent and Gatenby, 2008). Promoční fáze zahrnuje nárůst buněk a to buď selektivním množením dceřiných buněk nebo poklesem apoptózy. V rámci této fáze tak postupně dochází k nahromadění mutací a zvýšení nerovnováhy genetických a epigenetických změn. Třetím krokem je progresse, kdy se začínají projevovat genetické změny, jako je například změna počtu homologních sad chromozomů nebo porušení jejich integrity. Tímto dochází k přechodu buněk z preneoplastického stavu do stavu nádorového. Produkující buňky ztrácí svoji diferenciaci a navrací se k nezralé formě buněk. Vzniká nerovnováha mezi buněčnou proliferací, apoptózou a samoregulací (obr. 3) (Pitot, 2007; Vincent and Gatenby, 2008).

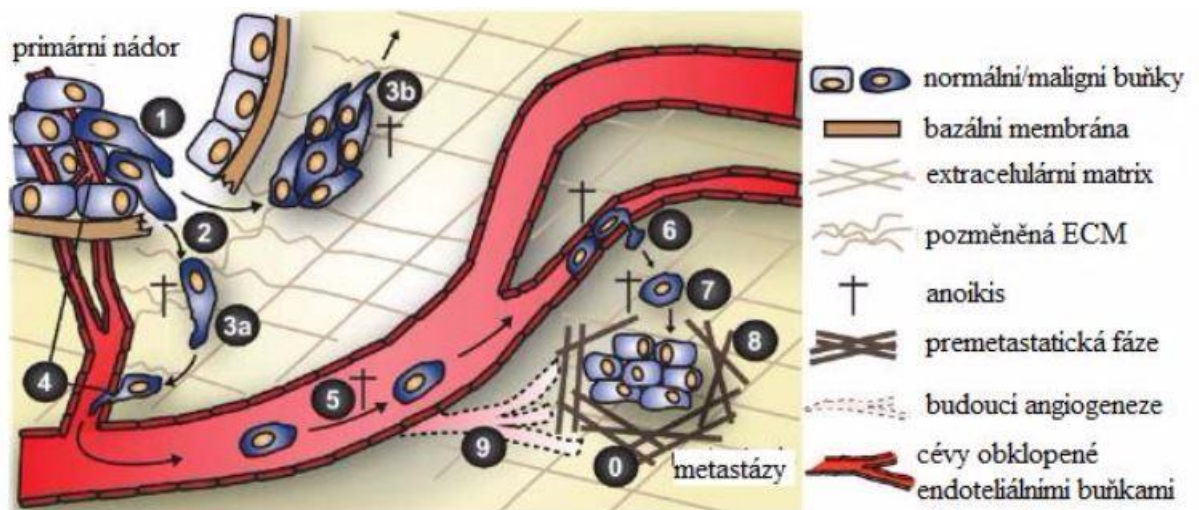


Obr. 4: Karcinogeneze v trávicím ústrojí

Upraveno dle: Hofman (2010)

Nádory se vyvíjejí a rostou podle jejich přístupu ke krevnímu řečišti, kde získávají základní živiny společně s kyslíkem, za současného vyloučení odpadních produktů metabolismu buněk. Proliferující (bující) premaligní léze neprodukuje růstové faktory jako nádor (angiogeneze) a tím se snižuje rychlost jejich množení. Angiogenními se buňky stávají až během středních fází karcinogeneze, kdy dochází k takzvanému „skoku“ („angiogenic switch“) (Hoff and Machado, 2012). Z primárního nádoru jsou schopné se uvolnit buňky pouze invazivní. Tyto buňky pak kolonizují v jiné části těla (Geiger and Peeper, 2009).

Metastatická kaskáda zahrnuje několik kroků. Nejprve primární, epitelové a neoplastické léze projdou bariérou bazální membrány. Poté se nádorové buňky disociují, až dochází k invazi do sousední tkáně, krve a lymfatických cév. Tak mohou nádorové buňky putovat krevním řečištěm nebo lymfatickou cestou do nového místa, kde dojde k jejich uchycení a nekontrolovatelnému bujení za vzniku mikrometastáz (sekundární nádory) viz. obr. 5 (Chambers *et al.*, 2002; Gatenby and Gillies, 2008).



Obr. 5: Metastatická kaskáda

Upraveno dle Geiger a kolektiv (2009) 0 sekundární nádor, který je před zahájením své metastáze, 1) invazivní buňky primárního nádoru, 2) roztržení bazální membrány a extracelulární matrix (ECM) usnadňující invazi, 3) jednotlivé (3a) nebo kolektivní (3b) šíření nádorových buněk, 4) vstup nádorových buněk do cévy, 5) transport buněk do kapilárního řečiště, kde se zastavují (6), 7) vyvázané nečinné nádorové buňky, 8) zahájení růstu sekundárního nádoru, 9) remodelace ECM a novotvorba krevních kapilár (angiogeneze); anoikis=buněčná smrt.

3.4 Obecné postupy léčby nádorového onemocnění

Léčba nádorového onemocnění je zaměřena především na zničení nebo odstranění lidských buněk, u kterých došlo k poruše apoptózy nebo ke zvýšené proliferaci. Při likvidaci nádorových buněk však dochází k poškození nebo zničení zdravých buněk a tkání. To je jedním ze závažných problémů při léčbě onkologického onemocnění, protože ničení zdravých buněk a tkání zhoršuje kvalitu života léčeného pacienta (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Existují dva způsoby léčby onkologického onemocnění: protinádorové a podpůrné. V protinádorové léčbě je cílem úplné nebo alespoň částečné odstranění nádorových buněk za pomoci chirurgie, radioterapie nebo medikamentózní léčby. Při léčbě pacienta je možné všechny tyto postupy kombinovat. Pro zlepšení života pacientů s nevléčitelným nádorem je pak aplikovaná podpůrná léčba (Kim *et al.*, 2013).

Protinádorovou léčbu můžeme dále rozdělit na kurativní a nekurativní. Kurativní léčba chce dosáhnout úplného odstranění nádoru, nejčastěji prostřednictvím chirurgického zákroku a dále pomocí chemoterapie nebo radioterapie. Nekurativní léčba se snaží ničit nádorové buňky a tím prodloužit život pacienta nebo zmírnit jeho bolesti. Nejčastěji využívanou léčbou je chemoterapie, která je velmi náročná nejen pro pacienta, ale také pro jeho blízké. Vědci stále pracují na nových a šetrnějších léčebných postupech (Adam *et al.*, 2003b; Klener and Klener Jr, 2010).

3.4.1 Léčba melanomu

Melanom velmi rychle metastázuje a je velmi odolný vůči cytotoxickým látkám. Jednou z hypotéz vysvětlujících tyto vlastnosti melanomu je, že melanom vzniká z vysoce pohyblivých buněk, které jsou více odolné a je u nich výrazně nižší pravděpodobnost spontánní apoptózy *in vivo* ve srovnání s jinými typy nádorových buněk (Soengas e Lowe, 2003). A jelikož většina chemoterapeutických léků funguje na základě indukce apoptózy v buňce, je maligní buňka právě díky menší pravděpodobnosti apoptózy rezistentní vůči lékům a léčebným terapiím jako je chemoterapie, radioterapie a imunoterapie (Tarhini and Agarwala, 2006).

Existuje několik kooperčních podpůrných terapií, jako je například imunoterapie interferonem- α (IFN- α) a interleukinem-2 (IL-2). Účinnost těchto terapií je však stále předmětem diskuzí (Mumberg *et al.*, 1999). Pro léčbu pokročilého melanomu je možno použít chemoterapeutické činidlo dakarbazin (DTIC) společně s léky jako je karmustin (BiCNU), paclitaxel (Taxol), temozolomid a cisplatina (Tarhini and Agarwala, 2006). V minulosti bylo testováno i mnoho jiných imunoterapeutických látek, ale žádné nevykazovaly dostatečnou účinnost. Až nedávné pokusy s převodem lymfocytů přinesly slibné výsledky, kdy u dvou ze sedmnácti pacientů došlo k úplnému vymizení příznaků a projevů nemoci po dobu osmnácti měsíců. Celkové přežití pacientů s touto terapií však není statisticky významné (Morgan *et al.*, 2006).

Další vlastností rakovinných buněk je jejich větší závislost na hyperaktivních cestách, než je tomu u buněk zdravých. Rakovinné buňky tedy mohou být více citlivé k inhibici těchto cest než normální buňky, což vede k novým terapeutickým možnostem (Smalley and Eisen, 2003).

3.5 Alkaloidy

Alkaloidy jsou rozsáhlá skupina sekundárních metabolitů, které se skládají z organických dusíkatých bází v negativním oxidovaném stavu. Vyskytují se zejména v rostlinách. Doposud byly alkaloidy prokázány ve 186 čeledích rostlin (Dewick, 2002), ze kterých bylo izolováno a identifikováno přes 10 000 alkaloidů mnoha různých struktur a tudíž patří mezi nejpočetnější skupinu přírodních produktů. Většina známých alkaloidů byla izolována z listů, kůry, kořenů a semen rostlin. Další velká skupina alkaloidů byla identifikována v mechu, houbách a některých bakteriích. Některé se podařilo izolovat dokonce i z živočišných zdrojů (Velíšek and Cejpek, 2008).

Všechny tyto izolované alkaloidy mají tu vlastnost, že jsou velmi reaktivně biologicky aktivní již při velmi nízkých koncentracích. Toho rostlina využívá při své obraně před patogeny a býložravci. Tyto vlastnosti jsou také atraktivní pro farmaceutický průmysl, který využívá řadu alkaloidů k léčbě nádorových onemocnění (Chen *et al.*, 2005; Velíšek e Cejpek, 2008).

Pro přehlednost byly alkaloidy původně řazeny podle způsobu jejich izolace. V současnosti je známa jejich biosyntéza a třídí se podle hlavní kruhové struktury obsahující dusík. Existují tři hlavní skupiny alkaloidů: pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy (tab. 2). Jejich klasifikaci tedy určuje aminokyselina, která poskytuje dusík a základní část alkaloidu. Například ornitin je základem pro pyrolidinové a tropanové alkaloidy, lysin je součástí piperidinových a chinolizidinových alkaloidů, kyselina nikotinová zase pyridinovým alkaloidům. Z tyrozinu dokážeme vyprodukovat fenyletylaminy, tetraisoquinolinové alkaloidy a jiné (Dewick, 2002; Velíšek and Cejpek, 2008). Základní aminokyseliny nemusí být nutně derivátem alkaloidů. Mohou vznikat aminací jiného typu sloučeniny, která je derivátem acetátu, fenylalaninu, terpenu nebo steroidu. Alkaloidy málokdy nalezneme volné. Většinou tvoří soli s organickými kyselinami, například s jablečnou kyselinou, citrónovou nebo chelidonovou. Mohou však tvořit i estery nebo amidy. Některé alkaloidy rostlin se mohou vázat na cukry a vznikají tak glykosidy (Hubík *et al.*, 1989; Dewick, 2002; Velíšek e Cejpek, 2008).

Tab. 2: Přehled alkaloidů v potravinách

Struktura (základní skeleton)	Prekurzor	Významná skupina	Příklad
Pravé alkaloidy			
Pyridin, Piperidin, Pyrrolidin	Arg, Lys, Orn, kys. nikotinová	Tabákové alkaloidy	nikotin, normikotin, anatabin, anabasin,
Pyrrolizidin	Lys, Phe	Pepřové alkaloidy	piperin
Chinolizidin	Arg, Ile, Leu, Orn, Val, Thr	Alkaloidy rodu <i>Senecio</i>	senecionin
Chinolin	Lys	Lupinové alkaloidy	lupanin, lupinin, spartein
	Trp, kys. mevalonová	Alkaloidy rodu <i>Cinchona</i>	chinin, chinidin, cinchonidin
Protoalkaloidy			
Kapsaicinoidy (Vanillylamidy)	Leu, Phe, Val, malonyl-CoA	Alkaloidy rodu <i>Capsicum</i> (paprika)	kapsaicin, nordihydrokapsaicin, homodihydrokapsaicin
Pseudoalkaloidy			
Purin	Puriny	Alkaloidy v kávě, čaji a kakau	kofein, theobromin
Steroidní (terpenoidní) glykoalkaloidy	kys. mevalonová	Glykoalkaloidy v bramborách a rajčatech	solanin, tomatin

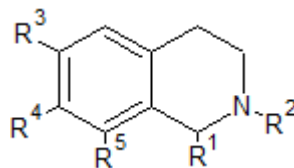
zdroj: Velíšek a kolektiv (2008)

3.5.1 Isochinolinové alkaloidy

Isochinolinové alkaloidy jsou rozšířenou skupinou látek sekundárního metabolismu. Prekurzorem těchto alkaloidů je aminokyselina tyrozin a prekurzorem tyrozinu je fenylalanin. Eliminací amoniaku z dané struktury získáme skořicovou kyselinu nebo v redukované formě hydroskořicovou kyselinu, která je součástí fenylethylisochinolinových alkaloidů (Bentley, 1998). Bohatým zdrojem isochinolinových alkaloidů jsou čeledi *Papaveraceae* (mákovité), *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité), *Berberidaceae* (dřišťálovité), *Menispermaceae* (lunoplodovité), *Fumariaceae* (zemědýmovitě), *Rutaceae* (routovité) a jiné. Isochinolinové alkaloidy se dále dělí podle své struktury (Dewick, 2002).

3.5.1.1 Jednoduché báze

Jednoduché báze isochinolinových alkaloidů jsou odvozeny od 1, 2, 3, 4-tetrahydroisochinolinu (obr. 6) a nachází se v rostlinách z čeledí *Opunciaceae* (opunciovité), *Chenopodiaceae* (merlíkovité), *Viciaceae* (vikvovité) a *Papaveraceae* (mákovité). Mezi nejznámější sloučeninu patří hydrokotarnin, který byl izolován z opia máku setého z čeledi *Papaveraceae* (Staněk, 1957).



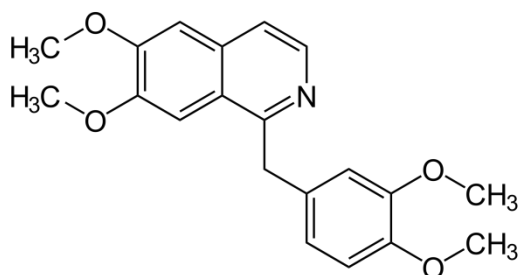
Obr. 6: 1, 2, 3, 4-tetrahydroisochinolin

3.5.1.2 Benzyloisochinolinové alkaloidy

Všechny benzyloisochinolinové alkaloidy jsou odvozené od 1-benzyloisochinolinu. Výjimkou jsou papaverin a xanthalin, které jsou odvozené od plně aromatické struktury. Benzyloisochinolinové alkaloidy vykazují antimikrobiální, antimalarické a cytotoxické účinky a lze je izolovat z čeledí *Papaveraceae* (mákovitých), *Fumariaceae* (zemědýmovitých), *Berberidaceae* (dřišťálovitých), *Ranunculaceae* (priskyřníkovitých) a dalších (Staněk, 1957).

Mezi tyto alkaloidy patří papaverin (obr. 7), který tvoří bezbarvé krystalky a v opiu máku setého tvoří 1 % obsahu. Papaverin vzniká dehydrogenací meziproductu norlaudanosu. Ostatní látky z této skupiny se dají také izolovat z opia, ale jsou obsaženy v téměř nedatovatelných koncentracích, že o nich není známo mnoho informací a jejich využití je minimální. Zacyklením papaverinu vzniká plně aromatický protoberberinový skelet (Grycová *et al.*, 2007). Papaverin nemá účinky na centrální nervovou soustavu, ale působí pozitivně na křeče hladkého svalstva, cévy, bronchy, střeva, močové cesty a žlučové cesty. Dokáže snížit dráždivost a vodivost v myokardu inhibicí fosfodiesterázy a snížením nitrobenčkové koncentrace kalcia (Bruneton, 1995; Dewick, 2002). Papaverin se používá v léčbě střevní, žlučové a ledvinové koliky, dále stimuluje erekci u pacientů s poraněnou páteří. Kontraindikací mohou být poruchy srdečního rytmu, nitrolebeční hypertenze a kojení (Schiff Jr, 2002).

Dalšími benzylochinolinovými alkaloidy jsou laudanin a laudanin, Laudanosin je jed způsobující křeče a působící na extrapyramidový systém a střední mozek. Laudanin je rovněž křečový jed (Hrdina *et al.*, 2004).



Obr. 7: Papaverin

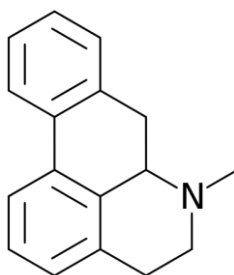
3.5.1.3 Aporfinové alkaloidy

Aporfinové báze mají až 500 zástupců příbuzných struktur v čeledích *Papaveraceae* (mákovité), *Menispermaceae* (lunoplodovité), *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité) a dalších (Grycová *et al.*, 2007). Aporfinové alkaloidy mají jako základní strukturu aporfin (obr. 8), který vzniká radikálovým párováním aromatických jader benzylochinolinů (Staněk, 1957). Vykazují široké spektrum biologických vlastností. Některé z nich mají vliv na adrenergní a serotonergní přenosy, jiné mají zase vazodilatační účinek. Byla prokázána také antioxidační, antimikrobiální, antivirální a cytotoxická aktivita (Hošťálková *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 1999). Dva z aporfinových alkaloidů jsou na trhu jako farmaceutické výrobky. Jedním z nich je boldine, izolovaný z listů a kůry stromu *Peumus boldus* (boldovník vonný), který má antioxidační účinky a napomáhá produkci žluči při zažívacích poruchách (Bruneton, 1995). Druhým je apomorfin, který se používá k léčbě Parkinsonovy choroby a k léčbě erektilní dysfunkce (Picada *et al.*, 2003).

Mezi aporfinové alkaloidy patří magnoflorin, který se dá izolovat z rostliny *Clematis parviloba* z čeledi pryskyřníkovitých. Magnoflorin je nejběžnější přirozeně se vyskytující kvartérní aporfinový alkaloid (Dwuma-Badu *et al.*, 1980). Magnoflorin byl zájmem mnoha studií a výzkumy potvrdily jeho protizánětlivé účinky se schopností snižovat horečku (Küpeli *et al.*, 2002; Luebbert *et al.*, 2011) a antioxidační aktivitu (Račková *et al.*, 2004). Antifungální aktivita magnoflorinu byla vyzkoumána u *Penicillium avellaneum*, *Candida albicans*,

C. glabrata, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* *Trichosporon beigeli* a *Pyricularia oryzae* (Espinel-Ingroff et al., 1999).

Příkladem aporfinových alkaloidů je také glycin, který se užívá proti kašli a bronchiálnímu astmatu (Maridass and De Britto, 2008). Můžeme se s ním setkat i v pleťových krémech, kde redukuje tuk v obličeji (Gusakova *et al.*, 1998). Získáváme ho z *Glaucium flavum* (rohatce žlutého) nebo *Glaucium corniculatum* (rohatce růžkatého). Dalším příkladem je roemerin, který se dá izolovat z *Papaver rhoeas* (mák vlčí), isokorydin a magnoflorin, který se vyskytuje v *Chelidonium majus* (vlastovičnick větší) (Staněk, 1957).



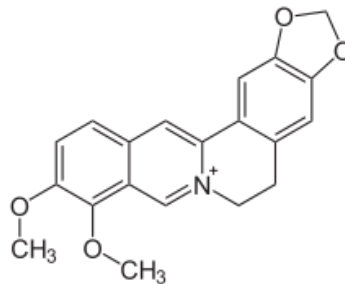
Obr. 8: Aporfin

3.5.1.4 Protoberberinové alkaloidy

S protoberberinovými alkaloidy se v přírodě setkáváme velmi často. Například v rostlinách rodu *Corydalis* (dymnivka), *Berberis* (dřišťál), *Fumacia* (zemědým), *Chelidonium* (vlastovičnick) a jiných (Staněk, 1957). Protoberberinové alkaloidy se často vyskytují v přítomnosti benzofenanthridových alkaloidů, proto se tyto látky a jejich biologická aktivita často zkoumá společně. Protoberberinové alkaloidy mohou mít mnoho struktur. Ze 75 % se vyskytuje v kvartérní formě a zbytek protoberberinů se nachází v tetrahydroformě. Kvartérní forma může dále reagovat za vzniku dihydroprotoberberinu (Grycová *et al.*, 2007).

Ukázkovým příkladem protoberberinových alkaloidů je berberin (obr. 9), který se nachází hlavně ve vlastovičnicku větším a máku vlčím ve formě soli chelidonové kyseliny, jablečné kyseliny a citrónové kyseliny (Grycová *et al.*, 2007). Berberin se obecně nejvíce nachází ve šťávách (4 %), poté v nezralých plodech (1,5 %) a v kořeni (1,4 %), nejméně se ho nachází v nati (0,5 %). Bylo zjištěno v pokusech na krysách, že berberin má toxické účinky,

kteře se projevují ztrátou mobility a zhoršením dýcháním. Byla stanovena letální dávka (LD₅₀) > 10,4 g/kg (Kheir *et al.*, 2010) . Zároveň existuje podezření, že je mutagenní a karcinogenní (Moravcová, 2006). V protikladu k těmto negativním účinkům jsou jeho protizánětlivé vlastnosti. Studie Čerňákové a kolektivu (2002) zabývající se vlivem berberinu na 17 mikroorganismů včetně dvou gram-negativních bakterií zjistily, že citlivost mikroorganismů klesala následovně: *Staphylococcus aureus* (IC₅₀ 14,6 mg/l) > *Pseudomonas aeruginosa* > *Escherichia coli* > *Bacillus subtilis* (IC₅₀ 143 mg/l) > *Zoogloeana migera* > *Candida albicans* > *Saccharomyces cerevisiae* (IC₅₀ 574 mg/l) > *Aureobasidium pullulans* > *Trichoderma viride* > *Mycrosporium gypseum* > *Aspergillus niger* > *Fusarium nivale* > *Penicillium chrysogenum* > *Trichoderma viride* (IC₅₀ 809 mg/l). Berberin se také dále zkoumá jako lék na cukrovku (Zhang, H. *et al.*, 2010). Díky svým schopnostem zastavit růst buňky už v G1 fázi je potenciálním lékem rakoviny, leukemie (Lin *et al.*, 2006) a Alzheimerovy choroby (Asai *et al.*, 2007). Zatím se u všech zmíněných nemocí projeví pozitivní výsledky.



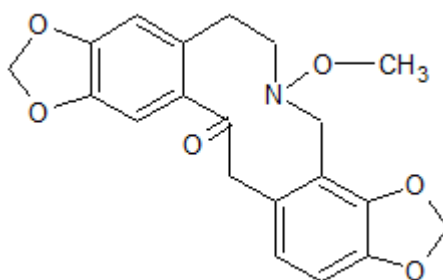
Obr. 9: Berberin

3.5.1.5 Protopinové alkaloidy

Ačkoliv mají protopinové alkaloidy přibližně jen 16 zástupců, tak se hojně vyskytují v rostlinách ve směsi s jinými alkaloidy. Nejčastěji se vyskytují v čeledích rostlin *Papaveraceae* (mákovité), *Fumariaceae* (zemědýmovitě), *Berberidaceae* (dřišťálovité) a *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité) (Staněk, 1957). Tyto alkaloidy se v přírodě vyskytují ve dvou formách a to ve formě báze nebo soli. Mají příznivý vliv na kardiovaskulární systém. Mezi protopinové alkaloidy patří například protopin (obr. 10) a stylopin (Toušek *et al.*, 2005).

Protopin můžeme nalézt v *Papaver somniferum* (mák setý), *Glaucium corniculatum* (rohatec růžkatý) a v *Chelidonium majus* (vlastovičnick větší)(Staněk, 1957). Dalším protopinovým alkaloidem je allokryptopin, který ve vysokých dávkách způsobuje ochrnutí nebo lokální umrtvení (Hrdina *et al.*, 2004). Nalezneme ho v máku setém, rohatci žlutém nebo vlastovičnicku větším (Staněk, 1957)

Protopin a stylopin jsou základními surovinami pro výrobu léku Ukrainu, který se používá k léčbě poruchy žláz s vnitřní sekrecí (Nowicky, 2002). Tento lék se rovněž používá k léčbě rakoviny ve Velké Británii a ve východních zemích, hlavně v bývalém Sovětském svazu, kde je znám jako jediný lék proti rakovině, který nezabíjí zdravé buňky (Ernst and Schmidt, 2005).

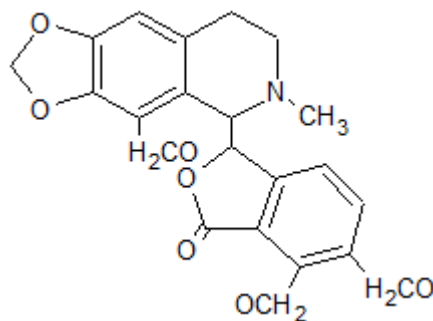


Obr. 10: Protopin

3.5.1.6 Alkaloidy ftalidisochinolinové

Mezi ftalidisochinolinové alkaloidy patří narkotin (obr. 11), kterému se také jinak říká noskapin. Je jedním z opiových alkaloidů, který se dá v čisté formě izolovat z máku setého. Jedná se o krystalickou látku, která je ve vodě málo rozpustná. V máku setém se nachází v množství 0,008–0,276 %. Nejčastěji využívaný narkotin se získává z opia, kde je obsažen v množství od 0,76–6,4 % (Staněk, 1957). Tato koncentrace ale se sušením opia klesá. Ve srovnání s morfiem má mnohem menší narkotické a analgetické účinky. V lékařství se používá k tlumení kašle a při nervových onemocněních nebo při křečích (Marhold, 1986).

Dalšími ftalidisochinolinovými alkaloidy jsou narkotolin, narcein a nornarcein. Všechny se dají izolovat z opia. Narkotolinu je v opiu cca 0,001 % a narceinu 0,1–0,2 %. Narcein má hypnotické a sedativní účinky. Jsou slabší než u morfia, ale kombinací obou látek se účinek zesílí (Staněk, 1957).

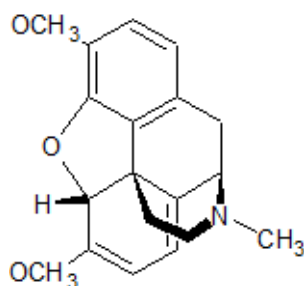


Obr. 11: Narkotin

3.5.1.7 Fenanthrenisochinolinové alkaloidy

Fenanthrenisochinolinové báze se nejčastěji získávají z máku setého, kde jsou největší částí účinných látek v opiu (Staněk, 1957). Nejznámějším zástupcem těchto bází je morfin, dalšími jsou kodein, thebain (obr. 12) a polysyntetický heroin, který můžeme připravit acetylací morfinu (Tomko *et al.*, 1999).

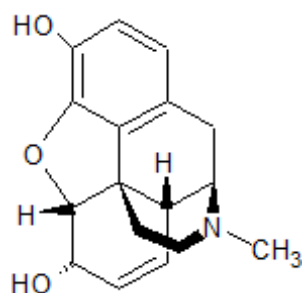
Dalším fenanthrenisochinolinovým alkaloidem je oripavin, který je obsažen v máku z 0,15 % (Staněk, 1957). Je velmi toxický a proto se v lékařství nevyužívá, ale jeho metylací získáváme thebain a z něho můžeme získat kodein (Tomko *et al.*, 1999). Jedná se tedy o alkaloid, který nám souží jako surovina pro výrobu různých léčiv a analgetik při chronických i akutních bolestech (Lee *et al.*, 1999; Leppert, 2009).



Obr. 12: Thebain

Samotný thebain nepůsobí proti vedení bolestivých podnětů (Aceto *et al.*, 1999), ale je součástí buprenofinu a eucodalu, které se používají v léčbě závislosti na alkoholu a předávkování opiáty (Berenyi *et al.*, 2009). Thebain je velmi toxický. Dokáže inhibovat cholinesaterázu, stimulovat centrální nervovou soustavu a odvádět histamin z tkání (Hrdina *et al.*, 2004). Thebain dokážeme izolovat jen z mladé rostlinky. Stárnutím se z něj stává isothebain (Staněk, 1960).

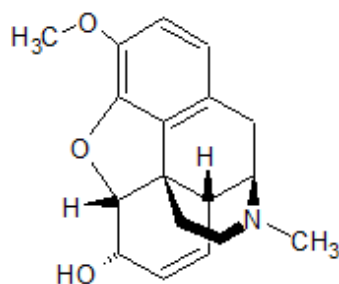
Morfin je nejdůležitější účinnou látkou opia. Pokud je podáván ústy, pak se do krevního řečiště dostane jen 15–25 % v původní podobě. Morfin metabolizuje na dva druhy glukoronidů: morfin-3-O-glukuronid, který nemá analgetické účinky a morfin-6-O-glukuronid, který má déletrvající analgetické účinky než samotný morfin. Glukoronidy se vylučují ledvinami a v těle vydrží několik hodin (Dewick; Lüllmann and Klaus, 2002). Morfin dokáže potlačit útrpnou bolest, ale vnímání místa bolesti ne (Lüllmann and Klaus, 2002). Jelikož inhibuje tvorbu enkefalinů, po vysazení morfinu nejsou jejich receptory obsazeny a dochází ke vzniku fyzické závislosti. Morfin má mnoho dalších účinků na lidské tělo např.: snižuje dechovou frekvenci, snižuje vyplavování endokrinních hormonů (testosteronu, kortisolu...), zvyšuje koncentraci prolaktinu a antidiuretického hormonu (Bruneton, 1995; Kalant, 1997; Leppert, 2009). Morfin (obr. 13) se nevyužívá jen jako analgetikum, ale také v případě akutního plicního edému, kdy odstraňuje hypoventilaci a zlepšuje krevní oběh (Lüllmann and Klaus; Sweetman, 2002). Má mnoho kontraindikací a při chronickém používání dochází ke zhoršení paměti, poklesu tvorby spermií u mužů, anémii, nechutenství, snížené imunitě apod. (Kalant, 1997).



Obr. 13: Morfin

Kodein je nejpoužívanějším opiovým alkaloidem a pravděpodobně i nejvíce užívaným lékem (Leppert, 2009; Toušek *et al.*, 2005). V opiu je kodein v relativně malém množství, proto se musí vyrábět semisynteticky z morfinu. Jeho analgetické účinky jsou oproti morfiu jen 1 : 10. Používá se tedy na zmírnění bolesti díky synergickému efektu s kyselinou acetylsalicylovou, paracetamolem nebo ibuprofenem. Léčí dýchací cesty tím, že zvyšuje práh citlivosti na impulzy vedoucí ke kašli. Dále se používá pro léčbu bolesti hlavy nebo úrazů provázených bolestí. Samotný kodein má na člověka lehce euforizující účinky a je považován za prekurzor drogy (Dewick, 2002; Lüllmann and Klaus). V těle je kodein metabolizován v játrech demethylací na morfin (5–10 %) a kodein-6-glukoronid (70 %) nebo se také může přeměnit na narkodein (10 %) a hydromorfin (1 %) (Yuan *et al.*, 2005).

Existují případy i předávkování kodeinem, kde dostávali pacienti 75 mg/den ústně po dobu čtyř dnů. Objevily se příznaky jako ztráta vědomí, respirační deprese. Jako příčina byla zjištěna zvýšená aktivita CYP2D6 (enzym odpovědný za metabolismus tramadolu). Dalšími faktory bylo selhání ledvin a inhibice CYP3A4 (enzym inhibující tvorbu narkotinu) (Gasche *et al.*, 2004). V současné době se při onkologických onemocněních podává šumivá tableta 3–4× denně obsahující 30 mg kodeinu a 500 mg paracetamolu, který zvyšuje účinnost podávaných analgetik. (Jarosz *et al.*, 2007).



Obr. 14: Kodein

3.5.2 Léčebné účinky isochinolinových alkaloidů

Isochinolinové alkaloidy jsou malou, ale rozšířenou skupinou bioaktivních produktů v přírodě. Mají důležitou roli v sekundárním metabolismu rostlin. U některých byl prokázán antimikrobiální, antibakteriální, antimykotický a protinádorový účinek (Bournine *et al.*, 2013; Nepali *et al.*, 2014; Vicario *et al.*, 2003). Některé účinky námi zkoumaných alkaloidů jsou probrané v tabulce 3. Vysoké farmakologické aktivní vlastnosti vykazují isochinolinové N-oxidové alkaloidy. Mají často pozitivní účinky na nervovou soustavu a gastrointestinální trakt (Bentley, 2005; Sato, 2013).

Dva z aporfinových alkaloidů můžeme dnes najít na trhu jako farmaceutické výrobky léčící nejen střevní potíže, ale i hepatobiliární dysfunkce (Bruneton, 1999; Gerwick *et al.*, 2001). Jedním z nich je boldine (Hostettmann *et al.*, 1998), izolovaný z listů a kůry jihoamerického stromu *Peumus boldus* (boldovník vonný) (Gerwick *et al.*, 2001). Apomorfin je jako syntetický alkaloid používán také k léčbě Parkinsonovy choroby a erektilní dysfunkce (Picada *et al.*, 2003). Má i antiplasmodiální účinky.

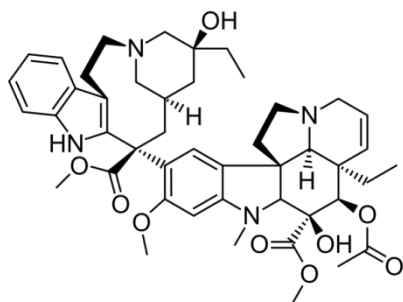
Wright a kolektiv (2000) uvídí, že mají některé z bisbenzylichonilových alkaloidů silný účinek proti *Plasmodium falciparum* a *Entamoeba histolica*. Největší antiplasmodiální aktivitu (IC_{50} 3,08 μ M) měl corydine a jeho N-methyl analog, který byl 7 \times méně aktivní. Výsledky výzkumu naznačily, že sekundární amino a fenolický substituent mohou zlepšit *in vitro* antiplasmodiální aktivitu apomorfinů. Z protoberberinové skupiny mají nejvyšší antiplasmodiální aktivitu dehydrodiscretin (IC_{50} 0,64 μ M) a berberin (IC_{50} 0,97 μ M). Kaneda a kolektiv (1991) publikovali, že berberin je schopný inhibice *E. histolica*, *Giardia lamblia* a *Trichosomas vaginalis in vitro* v koncentraci 1 mg/ml.

Isochinolinové alkaloidy jsou schopné interagovat s DNA, RNA a jejich enzymy. Mohou zasáhnout do přepisu, opravy, replikace DNA, RNA nebo mohou inhibovat enzymy jako je DNA polymeráza, RNA polymeráza, reverzní transkriptáza, topoizomeráza a telomeráza (Gilca *et al.*, 2010).

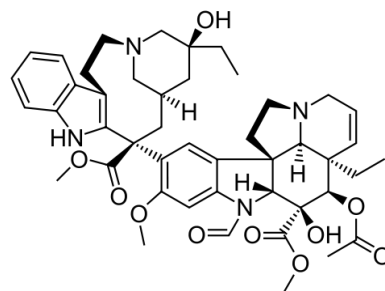
Syntetický derivát fagaroninu a fagaridinu má schopnost inhibovat topoizomerázu II, indukovat zlomy v DNA a apoptózu (Fukuda *et al.*, 1996). Vykázal cytotoxickou aktivitu *in vitro* i *in vivo* u některých lidských nádorových linií, které jsou rezistentní na doxorubicin, cisplatin i etoposid (Kanzawa *et al.*, 1997). Aby tento syntetický derivát byl v těle méně

eliminován, tak byl methylován (Nakanishi *et al.*, 2000). Výzkum prokázal silný protinádorový efekt *in vivo* na modelech lidského karcinomu žaludku, tlustého střeva, plic a slinivky (Guo *et al.*, 2007).

V protinádorové terapii se využívají také *Vinca* alkaloidy, které jsou izolovány hlavně z *Vinca rosea* (barvínkovec růžový). V této rostlině bylo objeveno více než 40 alkaloidů a u čtyř byla zaznamenána významná biologická aktivita. Jedná se o vinkristin, vinblastin, vinrosidin a leurosín (Klener; 2010). Ve farmacii se uplatňují hlavně vinblastin a vinkristin. V protinádorové terapii se ovšem také používají polosyntetické deriváty vinblastin, vindesin a vinorelbin. Všechny tyto látky působí inhibičně *in vitro* na sestavování mikrotubulů, ale liší se v toxicitě (Verdier-Pinard *et al.*, 1999). I když mají fyzikální a chemické vlastnosti podobné, tak jejich účinek na lidský organismus je jiný (Klener, 2010). Už v roce 1975 vědci Lee a kolektiv uvedli, že vinblastin indukuje stabilní tubulinové dimery. Ty pak dimerizují do tetramerů. *Vinca* alkaloidy dokáží inhibovat polymerizaci tubulinu, RNA polymerázu a zastavit buněčný cyklus v metafázi mitózy. Vinblastin a vinkristin podobně jako paklitaxel a kolchicin indukují aktivaci některých mitogenů aktivovaných proteinkinázou (Mcdaid and Horwitz, 2001). Vinblastin a vinkristin je hojně využíván při léčbě onkologických onemocnění a při identifikaci abnormalit během mitózy. Vinkristin je součástí léčby lymfoblastické leukémie, maligních lymfomů, mnohočetných myelomů, neuroblastomu a karcinomů prsu a plic. Bohužel mezi vedlejší účinky patří neurotoxicita a obrna hladkého svalstva, která se projevuje střevními obtížemi. Vinkristin (obr. 15) svým působením na buněčné membrány usnadňuje přístup cytostatik do buněk. Vinblastin (obr. 16) nemá tak rozsáhlé pole působnosti jako vinkristin, ale je také součástí léčby maligních lymfomů, Hodgkinovy nemoci, rakoviny varlat, vaječnicků, prsu a plic. Bývá doporučován v kombinaci s chemoterapií (Klener; 2010).



Obr. 16: Vinblastin



Obr. 15: Vinkristin

Tab. 3: Námi zkoumané isochinolinové alkaloidy a jejich účinky

Isochinolinový alkaloid	Účinek/ inhibice	Koncentrace	Zdroj
Protopin	<i>Plasmodium falciparum</i>	1,50 µg/ml (IC ₅₀)	(Wangchuk <i>et al.</i> , 2010)
	Cytotoxický efekt	33.81 µM (ED ₅₀)	(Chen <i>et al.</i> , 1999)
		8.850 µM (ED ₅₀)	
		21.41 µM (ED ₅₀)	
Bulbocapnin	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	>25 µM (IC ₅₀)	(Hoet <i>et al.</i> , 2004)
	Karcinom děložního čípku	>80 µM (IC ₅₀)	
Boldin	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	>25 µM (IC ₅₀)	
	Karcinom děložního čípku	>80 µM (IC ₅₀)	
Isocorydin	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	>25 µM (IC ₅₀)	
	Karcinom děložního čípku	>80 µM (IC ₅₀)	
Scoulerin	<i>Plasmodium falciparum</i>	1,04±0,08 µM (IC ₅₀)	(Wangchuk <i>et al.</i> , 2010)
	Cytotoxický efekt	2,25 µM (ED ₅₀)	(Chen <i>et al.</i> , 1999)
		1,920 µM (ED ₅₀)	
		0,860 µM (ED ₅₀)	
Tetrahydropalmatin	Cytotoxický efekt	10,75 µM (ED ₅₀)	
		24,37 µM (ED ₅₀)	
		6,200 µM (ED ₅₀)	
Berberin hydrochlorid	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	100 µg/ml (MIC)	(Zhang, D. <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Edwardsiella ictalury</i>	300 µg/ml (MIC)	
	<i>Escherichia coli</i>	400 µg/ml (MIC)	

IC₅₀ - inhibice buněčné proliferace o 50 %, ED₅₀ – minimální dávka s 50% účinností, MIC – minimální inhibiční koncentrace

3.5.3 Interakce alkaloidů s buněčnými komponentami

Alkaloidy jsou báze obsahující dusík, které jsou produkovány během metabolismu u většiny vyšších rostlin. Velké množství alkaloidů má potenciál tvořit molekulární komplexy a struktury. Nukleové kyseliny tvoří komplexy se třemi skupinami alkaloidů, které zahrnují berberin a protoberberinové skupiny, sanguinarin ze skupiny benzofenanthridinové a aristololaktam-b-Dglukosid z čeledi *Aristolochia* (Himes, 1991).

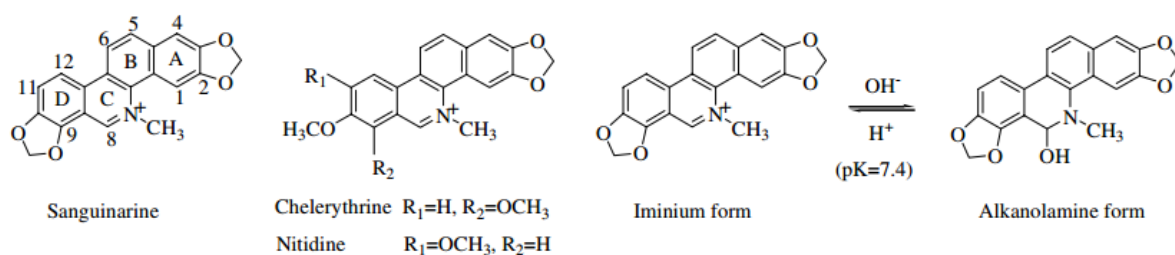
Protinádorová aktivita mnoha malých organických molekul vzniká v důsledku jejich interakce s DNA. Mezi takové biologicky aktivní molekuly pocházejících z přírodních zdrojů patří právě alkaloidy. Jsou u nich zjištěné léčivé účinky a to nejenom protinádorové, ale i antimikrobiální (Chen *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2006). Je to zapříčiněno hlavně jejich reakcemi s nukleofilními a aniontovými zbytky aminokyselin peptidů a proteinů (Schmeller *et*

al., 1997). Dále mohou reagovat a společně s DNA vytvářet molekulární komplex, inhibovat proteinkinázu C, Ca^{2+} dependentní proteinkinázu C, cyklickou AMP dependentní proteinkinázu a fosfolipid-dependentní proteinkinázu C (Wang *et al.*, 1997).

3.5.3.1 Interakce s DNA

Látky, které interagují s DNA, musí být schopné se vmezeřit mezi obě vlákna DNA. Mezi takové látky patří např.: antracyklinová antibiotika, alkylační činidla, antimetabolity a inhibitory topoizomeráz a některé alkaloidy (Bhadra and Kumar, 2011). Alkaloidy mohou s DNA interagovat dvojitým typem: ireverzibilně kovalentně nebo reverzibilně nekovalentně. Kovalentní interakce jsou ireverzibilní, jelikož způsobují mutace. Patří mezi ně modifikace bází, alkylace, křížové vazby nebo zlomy řetězců. Naopak mezi nekovalentní interakce patří interkalace, která je reverzibilní. Tímto způsobem například interagují s DNA kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy. Tím že se alkaloid dostane mezi báze DNA, tak se vlákna dvoušroubovice lehce rozbalí, prodlouží a ustálí. Tato interakce mění vlastnost a funkci DNA, která může vést k cytotoxickému účinku (Maiti and Kumar, 2007).

Příkladem silným DNA interkalátorem je sanguinarin, který se řadí mezi kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (Maiti *et al.*, 1982). Bylo zjištěno, že sanguinarin vykazuje pozoruhodnou pH dependentní strukturální rovnováhu mezi iminovou formou (s nábojem) a alkanolaminovou formou (bez náboje). Jak ukazují spektrofotometrické experimenty s pH 5,2 a pH 10,4, tak fyzikálně-chemické vlastnosti se v těchto pH DNA nemění (Nandi *et al.*, 1985; Maiti *et al.*, 2002). Bylo dokázáno, že jedině iminiová forma v sanguinarinu se váže na DNA interkalací (Maiti *et al.*, 2002) a to mezi vazby guaninu a cytosinu (Nandi *et al.*, 1985). Samotná alkanolaminová forma se nemůže vázat na DNA, ale má schopnost se přeměnit na nabitou iminiovou formu, která už se v DNA může vyskytovat ve vysoké koncentraci. Sanguinarin se od chelerythrinu a nitidinu odlišuje jen změnou substituentů na aromatickém jádru D (obr. 17). Chelerythrin a nitidin se běžně využívají v čínské medicíně na léčbu leukémie a působí také jako inhibitory topoizomerázy. Léky najdeme pod názvy HerbaChelidonii ("BaiQu-Cai"v čínštině) a Radix ZanthoxyliNitidi ("Rudi-Jin-Niu"v čínštině)(Prado *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1993). Nitidin i chelerythrin vykazují cytotoxicitu a protinádorový účinek (Chang *et al.*, 2003; Cabrespine *et al.*, 2005).

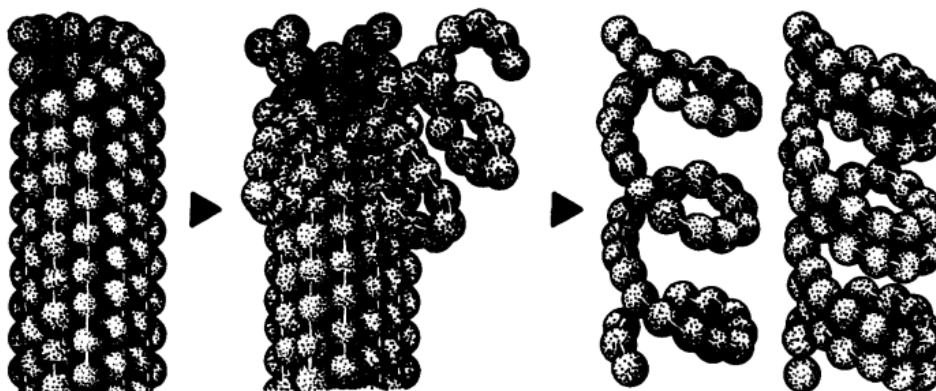


Obr. 17: Chemické struktury tří kvarterních benzofenanthridinových alkaloidů a dvou forem sanguinarinu.

3.5.3.2 Interakce s mikrotubuly

Cytostatika se vyznačují svým působením na mikrotubuly, které způsobuje zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M. Mezi nejběžnější cytostatika odvozená od alkaloidů patří vinblastin a vinkristin. Ty navodí depolymeraci mikrotubulů. Naopak polymeraci způsobují paclitaxel a docetaxel, které jsou také cytostatickými alkaloidy (Slaninova *et al.*, 2001; Wolff and Knipling, 1993).

Vinblastin způsobuje přeměnu mikrotubulů ve spirále protofilament. Léčivo se naváže podél stěny mikrotubulů, což vede k oddělení protofilament a rozmotání cívky (obr. 18). Existují ale i jiná možná vysvětlení této přeměny. Vazebná místa mohou být k dispozici pouze na konci mikrotubulů, kde se rozevírají. Což pak může při navázání léčiva vést k zipovému efektu (Erickson, 1975; Warfield and Bouck, 1974).



Obr. 18: Rozpojení alkaloidy jedno nebo dvou spirálovitých mikrofilament

Zdroj: Donoso (1979)

Výzkumy uvádějí, že i kvartérní benzofenanthridinové alkaloidy interagují s mikrotubuly (Slaninova *et al.*, 2001; Wolff and Knipling, 1993). U buněčné linie adenokarcinomu děložního krčku, ke kterému byl přidán sanguinarin, chelerytrin, sanguilutin a chelilutin v nižších koncentracích, bylo zjištěno zúžení sítě mikrotubulů. Naopak vyšší koncentrace a delší časy expozice alkaloidů způsobily úplnou depolarizaci mikrotubulů. Mikrotubulární síť nejvíce ovlivnil sanguinarin. Je to způsobeno pravděpodobně jeho vysokou planaritou tedy snadnou prostupností přes membrány (Slaninova *et al.*, 2001).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Buněčné kultury Caco-2, Hep-G2 a MRC-5 byly zakoupeny z European Collection of Cell Culture (ECACC). Dulbecco Modified Egles Medium- high glucose (DMEM; Caco-2 a Hep-G2), Eagle's minimum essential medium (EMEM; MRC-5) fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, penicilín, streptomycin, trypsin, fosfátový pufr (PBS), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) byly získány od Sigma-Aldrich (CZ). Dimethylsulfoxid (DMSO) zakoupen u Lach-Ner (CZ), kultivační láhve, serologické pipety a 96-jamkové destičky byly pořízeny od ThermoFisher (UK).

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava extraktů

Isochinolinové alkaloidy: (-)-californidineiodid, (-)-eschscholtzin, (-)-caryachin, (-)-O-methylcaryachin a (+)-N-methylaurotetanin byly izolovány z nadzemních částí a kořenů *Eschscholtzia californica* (sluncovka kalifornská, obr. 19); protopin, allocryptopin a (-)-stylopin nadzemních částí a kořenů *Chelidonium majus* (vlastovičnick větší, obr. 20); (+)-bulbocapnin, (+)-canadin, (+)-canadalin, (-)-corycavamin, (±)-corycavidin, (+)-corynolin, (+)-corydin, (-)-corypalmin, (+)-isocorydin, (-)-isocorypalmin, (-)-sinoacutin, (+)-tetrahydropalmin, (-)-scoulerin, (+)-thaliktricin a (+)-corydalin z hlízy *Corydalis cava* (dymnivka dutá, obr. 21); (-)-platycerin, a (-)-munitagenin z nadzemních částí *Argemone platyceras* (obr. 22); cryptopin, (-)-fumaricin, (+)-dihydrofumarilin, (-)-O-methylfumarofycin, (+)-fumarilin, (+)-parfumin, (+)-parfumidin, (±)-O-methylfumarofin, (+)-bicuculin a (-)-sinactin z celé rostliny *Fumaria officinalis* (zemědým lékařský, obr. 23); (+)-pallidinehydrochlorid, (+)-laurotetaninehydrochlorid, (+)-norisocorydinehydrochlorid a (+)-boldin z listů *Peumus boldus* (boldovník vonný, obr. 24); 8-oxoberberin, (+)-berbamin, berberin hydrochlorid, (+)-aromolin a (+)-obamegin z kůry kořenů *Berberis vulgaris* (dřišťál obecný, obr. 25) a (-)-canadin a hydrastin pocházející z komerčních extraktů *Hydrastis canadensis* (vodilka kanadská, obr. 26). Jako standard byl použit komerčně dostupný vinorelbin. Čistota všech testovaných sloučenin, ověřená spektroskopii nukleární magnetické

resonance (NMR), byla ≥ 95 %. Isochinolinové alkaloidy použité v této práci byly připraveny na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové skupinou AMAMICO (Chlebek *et al.*, 2016).



Obr. 19:
Eschscholtzia californica



Obr. 20:
Chelidonium majus



Obr. 21:
Corydalis cava



Obr. 22:
Argemone platyceras



Obr. 23:
Fumaria officinalis



Obr. 24:
Peumus boldus



Obr. 25:
Berberis vulgaris



Obr. 26:
Hydrastis canadensis

4.2.2 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie kolorektálního karcinomu v podobě buněčných linií Caco-2 byly pěstovány v DMEM mediu s 10% FBS, 1% roztokem penicilinu a streptomycinu, 1% hydrogenuhličitanem sodným, 1% pyruvátém sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami. Buněčné linie MRC-5 a Hep-G2 byly kultivovány v EMEM mediu s 10% FBS, 1% roztokem penicilinu (10 000 MJ) a streptomycinu (100 mg), 1% neesenciálními aminokyselinami, glutaminem (2 mM (MRC-5) respektive 4 mM (Hep-G2)). Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm²) s 15 ml příslušného media, které byly vloženy do inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5 % CO₂ a teplotou 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny. Buňky byly po sedmidenní kultivaci propláchnuty pomocí PBS, aby bylo odstraněno staré medium. Následně bylo přidáno 5 ml tripsinu na dobu 3 minut. Po 3 minutách byl trypsin neutralizován pomocí 1 ml media. Následně byla buněčná monovrstva seškrábána pomocí buněčné škrabky a přepipetována do 15 ml zkumavky typu Falcon. Takto byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 200 × g. Bylo odstraněno staré medium a buňky byly naředěny v novém mediu. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a dány k 15 ml nového media v kultivační láhvi pro další kultivaci. Zbytek buněk byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky a naředěn na koncentraci $2,5 \times 10^3$ buněk/ml suspenze.

4.2.3 Cytotoxicita (MTT- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan)

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 medium a přidáno 100 µl nového media spolu s testovanými vzorky v daných koncentracích (0,004–10 µM/ml). Takto byly testované vzorky s buňkami inkubovány po dobu 72 h. Po této době bylo medium se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 µl čistého media s MTT (1 µg/ml). Po 2 hodinách v CO₂ inkubátoru bylo medium s MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm a 720 nm jako referenční hodnoty. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno v porovnání s kontrolním vzorkem, kde byly buňky bez přidání testovaných látek.

4.2.4 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. Statistické vyhodnocování bylo provedeno v Excelu.

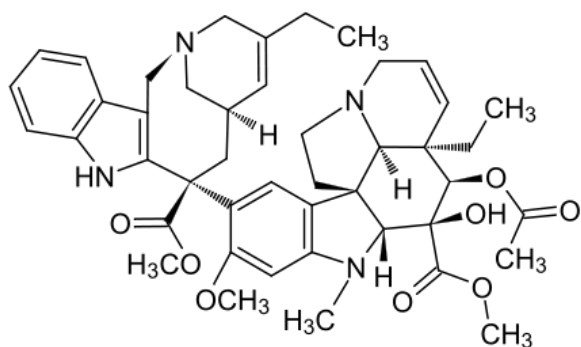
5 Výsledky

V této práci byla stanovena *in vitro* koncentrace 46 isochinolinových alkaloidů způsobující 50% inhibici (IC₅₀) buněk epitelu lidského kolorektálního karcinomu Caco-2 a hepatocelulárního karcinomu Hep-G2. Koncentrace byla navyšována až do 10 μM po 72 hodin a analyzována pomocí MTT testu. Ke zjištění selektivní cytotoxicity byly použity zdravé lidské plicní fibroblasty MRC-5. Jako pozitivní kontrola byl použit semisyntetický *Vinca* alkaloid vinorelbin (obr. 27). Naměřené hodnoty IC₅₀ jsou shrnuty v tabulce 4. Jediným alkaloidem, který vykazoval silnou cytotoxicitu na obě testované nádorové linie, byl scoulerin. IC₅₀ u Caco-2 buněk byla 6,44 ± 0,87 μM a na buněčných liniích Hep-G2 byla IC₅₀ a 4,57 ± 0,42 μM (obr. 36). Cytotoxický potenciál na buněčné linii Hep-G2 prokázal alkaloid berbamin IC₅₀ 4,56 ± 0,32 μM (obr. 34) a parfamidin IC₅₀ 8,74 ± 0,29 μM (obr. 32). Aromolin byl mírně cytotoxický na buněčné linii Caco-2 o IC₅₀ 5,85 ± 0,14 μM (obr. 29). Scoulerin, aromolin a berbamin bohužel prokázaly svou cytotoxicitu i na buněčné linii MRC-5. Bersavin hydrochlorid měl cytotoxický účinek na všech buněčných liniích (obr. 30). Jeho IC₅₀ na Caco-2 buňkách byla 2,84 ± 0,72 μM a na Hep-G2 buňkách 3,43 ± 0,26 μM. Bersavin hydrochlorid prokázal z vybraných alkaloidů největší selektivitu vůči zdravým buňkám MRC-5 přibližně v koncentraci 4–7 μM. Ostatní zkoumané isochinolinové alkaloidy nejsou cytotoxické (IC₅₀ > 10 μM) na testovaných buněčných liniích (tab. 4).

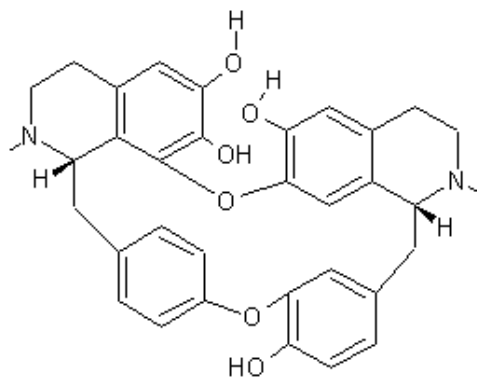
Tab. 4: Cytotoxicita námi zkoumaných alkaloidů

Isochinolinové alkaloidy	Caco-2	HEP-G2	MRC-5
	μM/ml	μM/ml	μM/ml
	průměr ± SD	průměr ± SD	průměr ± SD
(+)-corypalmin	>10	>10	>10
(+)-corydalin	>10	>10	>10
(-)-scoulerin	6,44 ± 0,87	4,57 ± 0,42	3,21 ± 0,43
(-)-caryachin	>10	>10	>10
(+)-corynolin	>10	>10	>10
(-)-stylopin	>10	>10	>10
(-)-isocoryplamin	>10	>10	>10
(+)-canadalin	>10	>10	>10
allocryptopin	>10	>10	>10
O-methylcaryachin	>10	>10	>10
(±)-corycavidin	>10	>10	>10
(+)-isocorydin	>10	>10	>10

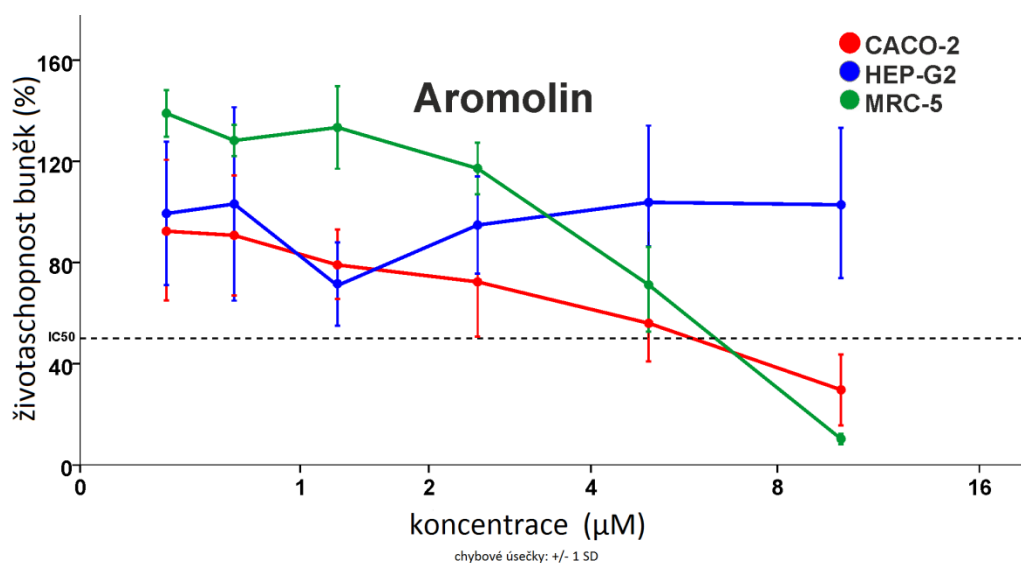
Isochinolinové alkaloidy	Caco-2	HEP-G2	MRC-5
	μM/ml	μM/ml	μM/ml
	průměr ± SD	průměr ± SD	průměr ± SD
(+)-canadin	>10	>10	>10
(+)-corydalin	>10	>10	>10
(-)-canadin	>10	>10	>10
(+)-dihydrofumarilin	>10	>10	>10
(+)-N-methylaurotetanin	>10	>10	>10
(-)-fumaricin	>10	>10	>10
(+)-parfumin	>10	>10	>10
(-)-sinactin	>10	>10	>10
(+)-fumarilin	>10	>10	>10
(±)-O-methylfumarofin	>10	>10	>10
Cryptopin	>10	>10	>10
(+)-bucuculin	>10	>10	>10
(-)-O-methylfumarofycin	>10	>10	>10
8-oxoberberin	>10	>10	>10
(+)-berbamin	>10	4,56 ± 0,32	4,91 ± 0,49
(-)-pallidine hydrochlorid	>10	>10	>10
(+)-bersavin hydrochlorid	2,84 ± 0,72	3,43 ± 0,26	8,36 ± 0,14
norisocorydin hydrochlorid	>10	>10	>10
(+)-laurotetanin hydrochlorid	>10	>10	>10
(-)-murarin hydrochlorid	>10	>10	>10
(+)-thalictricavin	>10	>10	>10
(-)-platycerin	>10	>10	>10
(-)-munitagenin	>10	>10	>10
Protopin	>10	>10	>10
(+)-corydin	>10	>10	>10
(-)-sinoacutin	>10	>10	>10
(-)-corycavamin	>10	>10	>10
(+)-bulbocapnin	>10	>10	>10
(-)-californidin iodid	>10	>10	>10
(+)-boldin	>10	>10	>10
berberin hydrochlorid	>10	>10	>10
(-)-eschscholzin	>10	>10	>10
(+)-parfumidin	>10	8,74 ± 0,29	>10
(+)-aromolin	5,85 ± 0,14	>10	8,54 ± 1,26
(+)-obamegin	>10	>10	7,64 ± 2,23
hydrastin	>10	>10	>10
tetrahydropalmatin	>10	>10	>10
vinorelbin	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,03	0,01 ± 0,00



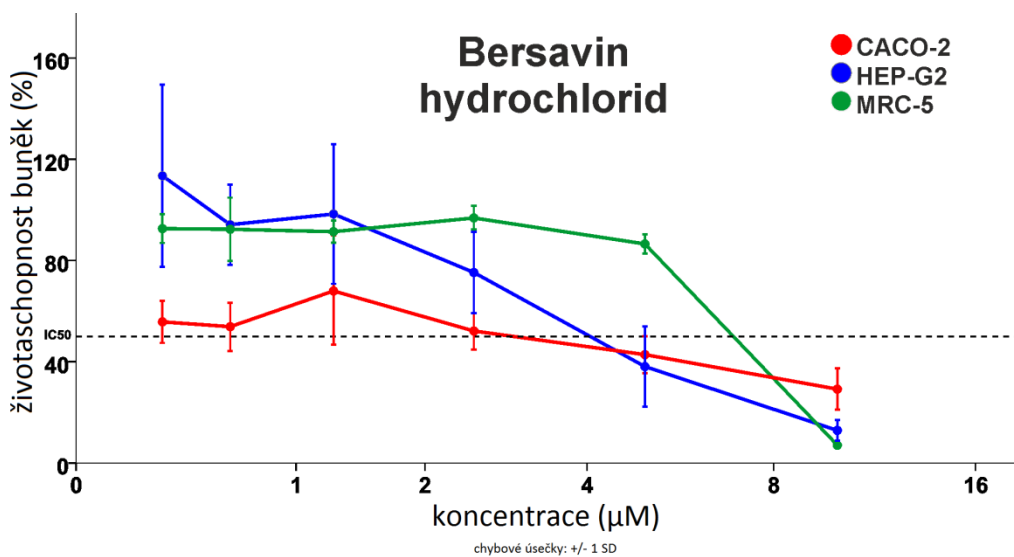
Obr. 27: Vinorelbín



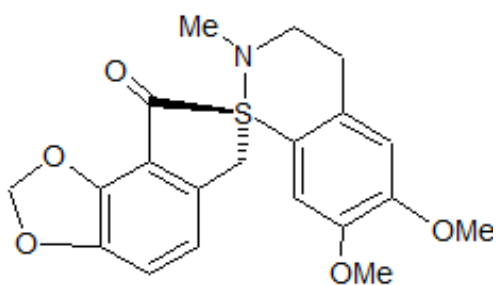
Obr. 28: Aromolin



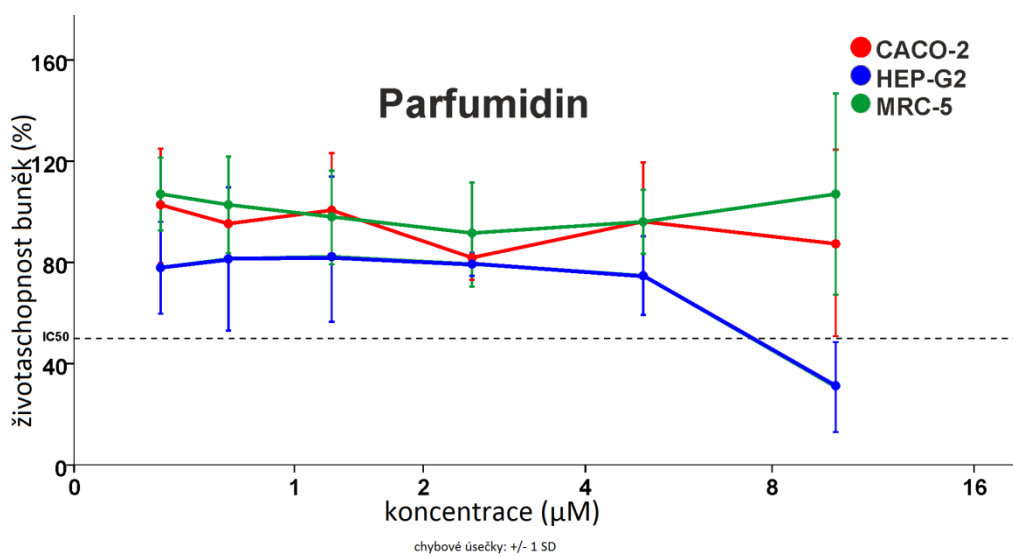
Obr. 29: Křivka cytotoxicity závislá na dávce aromolinu za použití MTT testu na Caco-2, Hep-G2 a MRC-5 buňkách. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů ± SD.



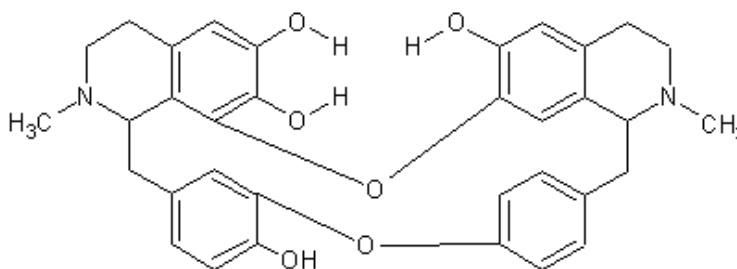
Obr. 30: Křivka cytotoxicity závislá na dávce bersavin hydrochloridu za použití MTT testu na Caco-2, Hep-G2 a MRC-5 buňkách. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů ± SD.



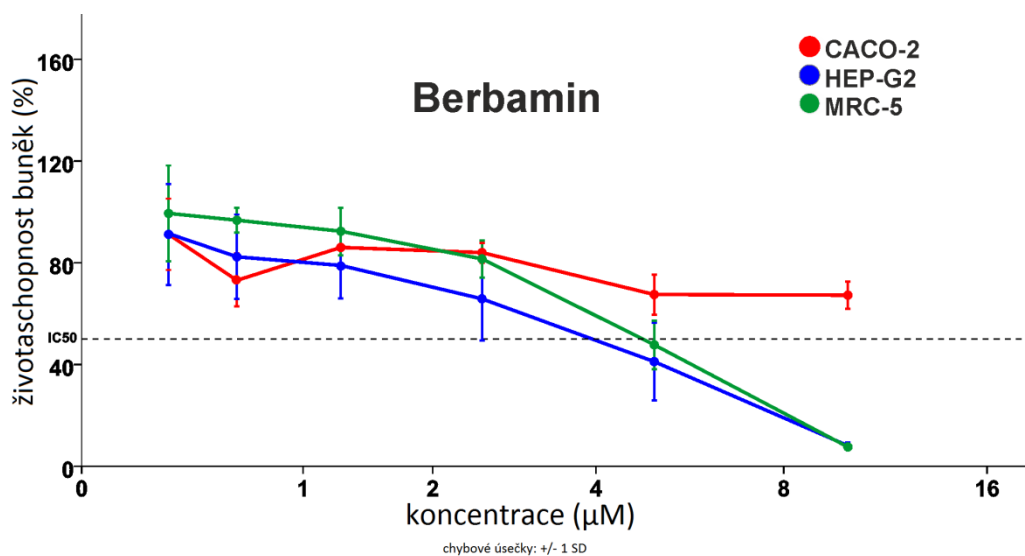
Obr. 31: Parfumidin



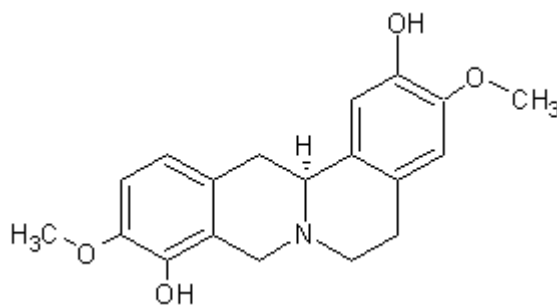
Obr. 32: Křivka cytotoxicity závislá na dávce parfumidinu za použití MTT testu na Caco-2, Hep-G2 a MRC-5 buňkách. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů ± SD.



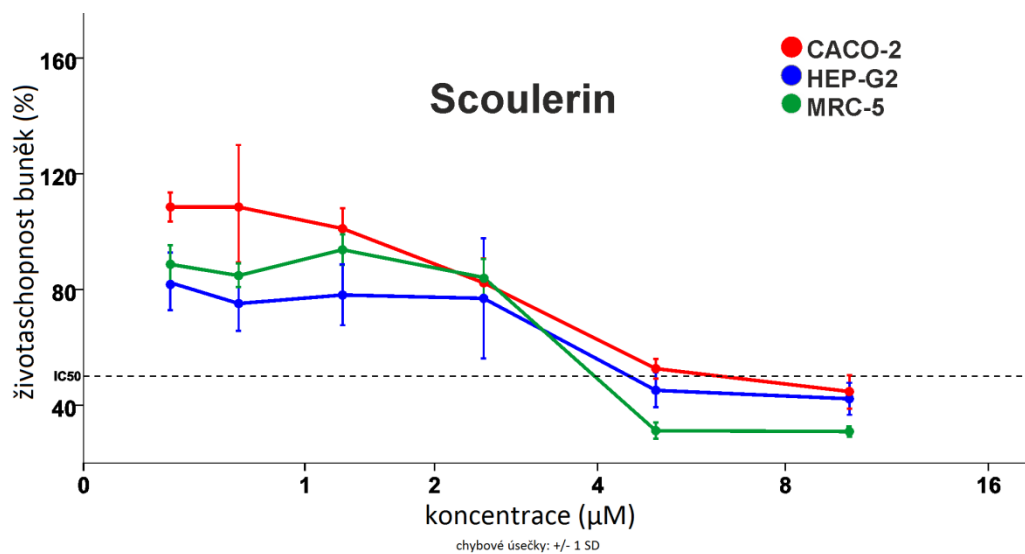
Obr. 33: Berbamin



Obr. 34: Křivka cytotoxicity závislá na dávce berbaminu za použití MTT testu na Caco-2, Hep-G2 a MRC-5 buňkách. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů ± SD.



Obr. 35: Scoulerin



Obr. 36: Křivka cytotoxicity závislá na dávce scoulerinu za použití MTT testu na Caco-2, Hep-G2 a MRC-5 buňkách. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů ± SD.

6 Diskuze

Nádorová onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí. American Cancer Society spočítala, že za rok 2013 zemřelo na různé druhy rakoviny 2,4 milionů američanů. V České republice o rok později zemřelo na zhoubné novotvary cca 27 000 osob. Za posledních několik let se výskyt nádorových onemocnění zvýšil v České republice o 22 %. Jednou z příčin je to, že se lidé dožívají vyššího věku a s věkem také narůstá pravděpodobnost onemocnění rakovinou. Dalšími důvody jsou genetika a životní styl (Siegel *et al.*, 2013; UZIS, 2015).

Rakovina je onemocnění, kde se abnormální buňky dělí a mají schopnost napadat okolní zdravou tkáň. Dokážou se dostat do dalších částí těla přes krevní řečiště a lymfatické cesty, kde se opět dělí a napadají zdravé buňky. Rakovina se může vyskytovat v nejrůznějších částech těla. Karcinom se například objevuje v kůži nebo tkáních, které lemují nebo pokrývají vnitřní orgány. Zhoubný nádor se rozšiřuje od kostí, chrupavek, tuku, svalů, cév nebo jiné pojivové a podpůrné tkáně. Leukémie je rakovina, která začíná v krvetvorné tkáni, jako je kostní dřeň, kde produkuje velký počet abnormálních krevních buněk. Lymfom a mnohočetný myelom jsou rakoviny imunitního systému. V mozku a míše začíná rakovina centrální nervové soustavy. Adrenokortikální karcinom se nachází ve vnější vrstvě nadledvin. Myomy jsou nádory nacházející se v děloze žen (Waring, 1981). Každý rok je diagnostikováno touto nemocí kolem 10 000 američanek (Smith *et al.*, 2015). Dalšími častými rakovinami jsou rakovina prsu, močového měchýře, plic a kolorekta (Siegel *et al.*, 2013).

Zlepšení léčby a zvýšení pravděpodobnosti přežití rakoviny závisí na včasné detekci, chirurgii, radioterapii a chemoterapii. Chemoterapie se využívá spolu s léky, které mohou zničit nádorové buňky. Jedná se o cytotoxické látky, které ovlivňují dělicí se buňky (Crowe, 2002). Nové klinicky účinné protinádorové léky jsou antibiotika a rostlinné alkaloidy, které dokáží narušit strukturu duplexní bDNA, což má vliv na interakci s proteiny a tedy na replikaci DNA, opravy i transkripce. Zkoumání mechanismu účinku sloučenin rostlinného původu s nízkou toxicitou zůstává důležitým aspektem při hledání nových a účinnějších protinádorových léků (Kuo *et al.*, 2004; Newman e Cragg, 2007).

Isochinolinové alkaloidy, zejména protoberberinové a benzofenantridinové skupiny, mají široké spektrum biologické účinnosti a využívají se už stovky let v čínské a ajurvédské medicíně (Bhakuni and Jain, 1986).

Mezi nejzkoumanější protoberberinové alkaloidy patří berberin, který se nachází v kořenech *Hydrastis canadensis* (vodilka kanadská), *Berberis* (dřišťál) nebo *Anemopsis californica*. Berberin dokázal o koncentraci 5–75 μM zastavit G_0/G_1 fázi buněčného cyklu snížením účinků cyklin-dependentních kináz (Mantena *et al.*, 2006). Berberin je schopný se vázat na DNA, kde může inhibovat DNA topoizomerázy II a opravy DNA, což přispívá k cytotoxickému účinku nádorových buněk. Tento alkaloid má také účinek na syntézu DNA. Rovněž dokáže inhibovat prodloužení telomer, což také vede k poškození nádorových buněk (Serafim *et al.*, 2008). Creasey a kolektiv prokázali už v roce 1979 protinádorovou aktivitu *in vitro* berberinu proti sarkomu buněk S180, kde inhiboval biosyntézu DNA, RNA a proteinů při 40 $\mu\text{g/ml}$. Berberin indukoval apoptózu na leukemických L1210 a hystiocytárních U937 nádorových buňkách (Letasiova *et al.*, 2005). Podle Wu a kolektivu (1999) dokáže berberin vyvolat apoptózu i lidských leukemických buněk HL60 při koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ a regulovat hladinu nukleofosminu s B23 mRNA o koncentraci berberinu 15 $\mu\text{g/ml}$. (Mantena *et al.*, 2006) poprvé prokázal i vliv berberinu na nádorové buňky epidermu A431, kde snížil životaschopnost buněk o 3–77 % a indukoval buněčnou smrt v 3–51 % buněk v dávce 5 až 75 μM . El-Wahab a kolektiv (2013) zkoumali účinky berberinu na buněčných liniích nádorových buněk prsu MCF7, jater HepG-2 a tlustého střeva Caco-2, kde se inhibice projevila při koncentracích od 1–100 $\mu\text{g/ml}$ v tomto pořadí.

Díky všem těmto vědeckým publikacím a projevy účinku byl berberin použit jako podpůrné léčivo k léčbě rakoviny prsu v kombinaci s léky nebo zářením. Kromě toho byl berberin arsenitý podáván s cisplatinou a evdiaminem, což zvýšilo cytotoxické účinky na mnoho typů buněk zhoubného nádoru (Kuo *et al.*, 2011). U použití kombinace berberinu a vinkristinu se prokázal lepší účinek léčby hepatomu (Wang *et al.*, 2014). Také kombinace konvenčních radioterapií a berberinu vykazuje synergický cytotoxický účinek plicních nádorových buněk u myší (Peng *et al.*, 2008).

Dalším protoberberinovým alkaloidem je berbamin, který byl použit i v této práci. Účinek berbaminu byl zkoumán již v roce 1987 na lidských nádorových buňkách CHR-24, které jsou rezistentní vůči léčivům jako je vinkristin, aktinomycin D, daunomycin nebo

adriamycin (Shiraishi *et al.*, 1987). Po použití berberinu začala daná léčiva na tyto buňky částečně účinkovat. Stejně tak byl berbamin zkoumán na erytroleukemické buněčné linii K562, která je rezistentní vůči adriamycinu. Inhibiční koncentrace berbaminu IC_{50} byla na tuto buněčnou linii $8,9 \mu\text{M/ml}$, což je cca $2 \times$ více než u Hep-G2 jaterní nádorové buněčné linie, kde byla $IC_{50} 4,56 \pm 0,32 \mu\text{M/ml}$. I v případě buněčné linie K562 berbamin dokázal zvýšit chemosenzitivitu adriamycinu a díky jeho působení na P-glykoprotein a survivin došlo k apoptóze. Berbamin dokáže zvýšit intracelulární koncentraci adriamycinu v buňkách a tím zvýšit jeho účinnost (Han *et al.*, 2003). Jeho protirakovinné účinky byly také prokázány u chronické myeloidní leukémie (CML), kde byl berbamin schopen selektivně indukovat buněčnou smrt CML buněk, Filadelfského chromosomu (Ph) i buněk, které jsou rezistentní vůči léku Gleevec. Tento lék funguje na principu blokace BCR/ ABL (molekulární marker pro chronickou myeloidní leukémii) tyrosin kinázou (Dong *et al.*, 2004). Berbamin inhiboval proliferaci buněk na buněčné linii KU812, kde se vyskytovaly buňky chronické myeloidní leukémie. Inhibice byla závislá v čase na dávce s hodnotami IC_{50} při 24, 48 a 72 hodinách 5,83; 3,43 a $0,75 \mu\text{g/ml}$ v daném pořadí. Zde došlo k indukci zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 a buněčnou apoptózu (Liang *et al.*, 2011). Podobný vliv měl i na buněčné linie leukémie NB4, kdy koncentrace IC_{50} $3,860 \mu\text{g/ml}$ ve 48 hodinách byla o $0,43 \mu\text{g/ml}$ vyšší než u předchozí linie KU812 (He *et al.*, 2006).

Podle našich i následujících výsledků má berbamin vliv i na nádorové buňky jater. Buněčná linie SMMC7721 byla vystavena $25 \mu\text{g/ml}$ berbaminu a po 12, 24 a 48 hodinách byla zkoumána apoptóza. Po 12 hodinách prošlo buněčnou smrtí 13 % buněk, po 24 hod 52 % a po 48 hod 68 % buněk. Předpokládá se, že berbamin zde vyvolal ztrátu mitochondriálního transmembránového potenciálu a aktivoval kaspázu, která dokáže spustit proces apoptózy a zastavit buněčný cyklus ve fázi G0/G1 (Wang *et al.*, 2007). Zajímavé je, že námi používaná buněčná linie Hep-G2 s lidskými buňkami je na berbamin cca $10 \times$ citlivější než totožná buněčná linie s buňkami myši, kde IC_{50} vyšlo $34,5 \pm 0,5 \mu\text{M/ml}$, kdežto na lidských buňkách IC_{50} vyšla $4,56 \pm 0,32 \mu\text{M/ml}$ (Wang *et al.*, 2009).

Další důležitou skupinou isochinolinových alkaloidů jsou benzofenanthridinové alkaloidy, které se vyskytují převážně v rostlinách čeledi *Papaveraceae* (mákovité), *Rutaceae* (routovité) a *Fumariaceae* (zemědýmovitě). V této skupině alkaloidů je pro svůj protinádorový účinek nejznámější sanguinarin (Adhami *et al.*, 2004), který dokáže indukovat apoptózu (Chmura *et al.*, 2000) a má cytotoxické účinky (Cabrespine *et al.*, 2005). Rostliny,

kteře obsahují velké množství sanguinarinu, jsou široce používány v čínské a lidové medicíně k léčbě rakoviny a dalších nemocí. Jeho možné protirakovinné účinky lze přičíst jeho vazbě na chromozomální DNA. Studie ukázaly, že jeho iminová a alkanolaminová forma je závislá na pH (Maiti *et al.*, 2002). Alkanolamin má větší celulórní dostupnost díky jeho větší lipofilitě (Dubois *et al.*, 1996). Babich a kolektiv (1996) zkoumali vliv sanguinarinu na proliferaci buněk po dobu 1–3 dnů. Bylo zjištěno, že koncentrace sanguinarinu významně ovlivňovala proliferaci buněk. Po 3 dnech při 5,1 μM sanguinarinu nebyl pozorován žádný nárůst nádorových buněk, což je srovnatelná koncentrace s námi studovanými alkaloidy aromolinu s IC_{50} 5,85 $\mu\text{M}/\text{ml}$ u Caco-2 buněk nebo scoulerinu 4,57 $\mu\text{M}/\text{ml}$ u Hep-G2 buněk. Sanguinarin má vliv na buněčnou linii děložního čípku HeLa, kdy IC_{50} byla 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Slaninova *et al.*, 2001), lymfom primárního výpotku (Hussain *et al.*, 2007), karcinom pankreatu, karcinom bronchu (Larsson *et al.*, 2006), rakoviny prsu (Kim *et al.*, 2008) a rakoviny tlustého střeva (Matkar *et al.*, 2008). Je to důsledkem snadného proniknutí sanguinarinu buněčnou membránou díky tvorbě nepolární pseudobáze a vysokému stupni molekulární planarity (Slaninova *et al.*, 2001). Byla prokázána i indukce apoptózy doprovázející tvorbou reaktivních forem kyslíku, které k usmrcení buněk napomáhaly (Kim *et al.*, 2008). Sanguinarin je schopen způsobit jedno a dvouvláknový zlom DNA, který také zabraňuje proliferaci (Matkar *et al.*, 2008).

Zkoumané alkaloidy v této práci patří mezi ty méně známé a zatím nedostatečně probádané. Nejsilnější cytotoxicitu na buněčnou linii lidského kolorektálního karcinomu Caco-2 a hepatocelulárního karcinomu Hep-G2 měl scoulerin. IC_{50} u Caco-2 buněk byla $6,44 \pm 0,87 \mu\text{M}$ a na buněčných liniích Hep-G2 byla IC_{50} $4,57 \pm 0,42 \mu\text{M}$. Bohužel zde nebyla prokázána výrazná selektivita ke zdravým buňkám plicních fibroblastů MRC-5. Cytotoxický potenciál na buněčné linii Hep-G2 prokázal alkaloid berbamin IC_{50} $4,56 \pm 0,32 \mu\text{M}$ a parfumidin IC_{50} $8,74 \pm 0,29 \mu\text{M}$. Parfumidin na rozdíl od berbaminu účinkoval selektivně vůči MRC-5 buňkám, proto by mohl být předmětem dalšího zkoumání. Aromolin byl mírně cytotoxický na buněčné linii Caco-2 o IC_{50} $5,85 \pm 0,14 \mu\text{M}$. Scoulerin, aromolin a berbamin bohužel prokázaly svou cytotoxicitu i na buněčné linii MRC-5. Bersavin hydrochlorid měl cytotoxický účinek na všech buněčných liniích.

Ostatní zkoumané isochinolinové alkaloidy nejsou cytotoxické ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$) na testovaných buněčných liniích. Je to pravděpodobně zapříčiněné tím, že tyto alkaloidy nejsou schopné interagovat s DNA buňkami (Bai *et al.*, 2006), reagovat s nukleofilními

a aniontovými zbytky aminokyselin peptidů nebo proteinů (Schmeller *et al.*, 1997), ani nemají vliv na molekulární komplex s DNA, jelikož nejsou schopné interkalace (Maiti *et al.*, 1982). Mezi další možné mechanismy účinku, které u těchto alkaloidů chybí, jsou inhibice proteinkinázy C, Ca²⁺-dependentní proteinkinázy C, cyklické AMP-dependentní proteinkinázy, případně fosfolipid-dependentní proteinkinázy C (Wang *et al.*, 1997). Tyto všechny možnosti mohly vést k cytotoxicitě. Může to být dáno chemickými a fyzikálními vlastnostmi látek, koncentrací nebo nešťastným výběrem buněčných linií (Nandi *et al.*, 1985).

Některé ze zmíněných alkaloidů jsou potenciálními farmaky. Pak je nutné vyloučit případnou mutagenitu a toxicitu pro celý organismus. Studie *in vitro* zatím neprokázaly genotoxicitu alkaloidů (Kevekordes *et al.*, 1999; Kevekordes *et al.*, 2000), zatímco studie *in vivo* na zvířecích modelech už se ve svých výsledcích odlišují (Ansari *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2005; Kosina *et al.*, 2004; Stiborová *et al.*, 2002;). Rozdílné výsledky studií *in vivo* mohou být dány různými způsoby aplikace, odlišnými metabolismy zvířat a rozdílem vlivu čistých alkaloidů a extraktů, ve kterých se vyskytuje řada dalších jiných látek.

Vinkristin, vinblastin a ukrain již jsou v některých zemích používány jako podpůrná léčiva nádorových onemocnění, kterým trpí velké procento lidí a na které často umírají. Potenciál podpůrných léčiv onkologického onemocnění mají i další isochinolinové alkaloidy a je jediné dobře, že vědci hledají další ještě neobjevené alkaloidy, zkoumají jejich vlastnosti a vyhledávají jejich využití. V této práci bylo zkoumáno 46 různých isochinolinových alkaloidů, z toho pět (scoulerin, aromolin, barbamin, parfumidin a bersavin hydrochlorid) by mohlo být předmětem dalšího podrobného zkoumání.

7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na testování neznámých isochinolinových alkaloidů, které mají potenciál mít antiproliferční aktivitu vůči nádorovým lidským buňkám. S touto vlastností by se mohly stát součástí podpůrné léčby onkologických onemocnění podobně jako vinkristin, vinblastin nebo ukrain (Boehm *et al.*, 2015; Klener and Klener Jr, 2010).

Byla zkoumána 50% inhibiční koncentrace 46 alkaloidů na buňkách epitelu lidského kolorektálního karcinomu Caco-2 a hepatocelulárního karcinomu Hep-G2. Pro porovnání selektivity vůči zdravým buňkám byly použity plicní fibroblasty MRC-5 a jako pozitivní kontrola byl použit semisyntetický *Vinca* alkaloid vinorelbin.

Pouze pět z testovaných alkaloidů (scoulerin, berbamin, parfumidin, aromolin a bersavin hydrochlorid) mělo antiproliferační vliv na vybrané buněčné linie. Tyto látky jsou vhodné k dalšímu podrobnému zkoumání jejich vlastností a účinků jak na nádorové buňky, tak na buňky zdravé. Tento pokus byl zkoumán v *in vitro* podmínkách. Cílem dalšího zkoumání by mohlo být, jaký vliv by měly tyto alkaloidy v podmínkách *in vivo*.

Najít lék na rakovinu, který by zcela vyléčil nádorové buňky, je snem každého vědce. Co však může udělat každý z nás je tomuto onemocnění předcházet. Každý člověk by měl dbát na své zdraví, svou životosprávu, aktivní pohyb a klidnou mysl. Tak naslouchejme svému tělu a pečujme o něj!

8 Seznam použitých zkratek

B23 – nukleofosmin mRNA

BCR/ABL – molekulární marker pro chronickou myeloidní leukémii

BiCNU – karmustin

CML – chronická myeloidní leukémie

CYP2D6 – enzym odpovědný za metabolismus tramadolu

CYP3A4 – enzym inhibující tvorbu narkotinu

CZ – Česká republika

DMEM – Dulbecco Modified Egles Medium

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DTIC – dakarbazin

ECACC – European Collection of Cell Culture

ECM – extracelulární matrix

ED₅₀ – minimální dávka s 50% účinností

EMEM – Eagle's minimum essential medium

FBS – fetální bovinní sérum

IC₅₀ – inhibice buněčné proliferace o 50 %

IFN- α – interferon- α

IL-2 – interleukin-2

LD₅₀ – letální dávka 50 % testovaných organismů

MIC – minimální inhibiční koncentrace

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

MTT – 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan

NMR – spektroskopie nukleární magnetické resonance

PBS – fosfátový pufr

Ph – Filadelfský chromosom

RNA – ribonukleová kyselina

RNS – reactive nitrogen species/reaktivní formy dusíku

ROS – reactive oxygens species/reaktivní formy kyslíku

UK – United Kingdom/Spojené království

9 Seznam obrázků a tabulek

Seznam obrázků:

Obr. 1: Incidence nádorů tlustého střeva a konečníku v mezinárodním srovnání	6
Obr. 2: Podíl případů ve věkové kategorii (analyzováno období 2009–2013).....	6
Obr. 3: Průběh apoptózy	8
Obr. 4: Karcinogeneze v trávicím ústrojí.....	10
Obr. 5: Metastatická kaskáda.....	11
Obr. 6: 1, 2, 3, 4-tetraisochoinolin	16
Obr. 7: Papaverin	17
Obr. 8: Aporfin	18
Obr. 9: Berberin	19
Obr. 10: Protopin	20
Obr. 11: Narkotin	21
Obr. 12: Thebain	22
Obr. 13: Morfin.....	23
Obr. 14: Kodein	23
Obr. 16: Vinkristin.....	25
Obr. 15: Vinblastin	25
Obr. 17: Chemické struktury tří kvarterních benzofenanthridinových alkaloidů a dvou forem sanguinarinu.....	28
Obr. 18: Rozpojení alkaloidy jedno nebo dvou spirálovitých mikrofilament	28

Seznam tabulek:

Tab. 1: Epidemiologie kolorektálního karcinomu ve světě	5
Tab. 2: Přehled alkaloidů v potravinách	15
Tab. 3: Námi zkoumané isochinolinové alkaloidy a jejich účinky	26
Tab. 4: Cytotoxicita námi zkoumaných alkaloidů	33

10 Seznam použité literatury

- Al-Anati, L. and E. Petzinger 2006. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 29.
- Aleixandre, A. and M. Miguel 2008. Dietary Fiber in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48. 905-912.
- Anjos, D. H. D. S. and M. D. L. A. Rodrigues 2006. Diversity of the infracommunities of strongylid nematodes in the ventral colon of *Equus caballus* from Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 136. 251-257.
- Araki, Y., T. Katoh, A. Ogawa, S. Bamba, A. Andoh, S. Koyama, Y. Fujiyama and T. Bamba 2005. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radical Biology and Medicine*. 39. 769-780.
- Bai, L.-P., Z.-Z. Zhao, Z. Cai and Z.-H. Jiang 2006. DNA-binding affinities and sequence selectivity of quaternary benzophenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine, and nitidine. *Bioorganic and medicinal chemistry*. 14. 5439-5445.
- Balicka-Ramisz, A., B. Pilarczyk, A. Ramisz and A. Cisek 2005. Occurrence of gastrointestinal and pulmonary nematodes of fallow deer (*Dama dama* L.) in North-West Poland. *Acta Parasitologica*. 50. 94-96.
- Bandgar, B. P., S. S. Jalde, B. L. Korbade, S. A. Patil, H. V. Chavan, S. N. Kinkar, L. K. Adsul, S. N. Shringare and S. H. Nile 2012. Synthesis and antioxidant, cytotoxicity and antimicrobial activities of novel curcumin mimics. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 27. 267-274.
- Barbosa, O. F., R. F. Rocha, G. S. Silva, V. E. Soares, V. A. Veronez, G. P. Oliveira and V. J. C. Landim 2001. A survey on Cyathostominae nematodes (Strongylidea, Strongylidae) in pasture bred horses from São Paulo State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 22. 21-26.
- Baruš, V. 1958. Vývojové cykly některých cizopasných hlístic našich koní. *Sborník Vysoké školy zemědělské a lesnické v Brně*.
- Baruš, V. 1962. Helmintofauna koni v Československu. *Československa Parasitologica*. 9. 15-94.
- Baruš, V. 1963. Vývojové cykly některých hlístic z čeledi Trichonematidae Witenberg 1925 v laboratorních a terénních podmínkách. *Československá parazitologie* X.
- Bellion, P., T. Hofmann, B. L. Pool-Zobel, F. Will, H. Dietrich, B. Knaup, E. Richling, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski 2008. Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 6310-6317.

- Bellion, P., M. Olk, F. Will, H. Dietrich, M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski 2009. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53. 1226-1236.
- Borchers, A. T., A. Krishnamurthy, C. L. Keen, F. J. Meyers and M. E. Gershwin 2008. The immunobiology of mushrooms. *Experimental Biology and Medicine*. 233. 259-276.
- Bornsek, S. M., L. Ziberna, T. Polak, A. Vanzo, N. P. Ulrih, V. Abram, F. Tramer and S. Passamonti 2012. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry*. 134. 1878-1884.
- Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Lavoisier publishing.
- Bu, Y. Z., H. X. Niu, R. B. Gasser, I. Beveridge and L. P. Zhang 2009. Strongyloid nematodes in the caeca of donkeys in Henan Province, China. *Acta Parasitologica*. 54. 263-268.
- Burel, S. D., M. C. Favrot, J. M. Fremy, C. Massimi, P. Prigent, L. P. Debongnie and D. Morgavi 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety.
- Burghardt, R. C., Barhoumi, R., Lewis, E. H., Bailey, R. H., Pyle, K. A., Clement, B. A., Phillips, T. D. 1992. Patulin-induced cellular toxicity: a vital fluorescence study. *Toxicology and applied pharmacology*. 112(2). 235-244.
- Burmeister, H. R. 1971. T-2 toxin production by *Fusarium tricinctum* on solid substrate. *Applied microbiology*. 21. 739-742.
- Bye, K. and O. Halvorsen 1983. Abomasal nematodes of the Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus* Vrolik). *Journal of wildlife diseases*. 19. 101-105.
- Calheiros, R., N. F. L. Machado, S. M. Fiuza, A. Gaspar, J. Garrido, N. Milhazes, F. Borges and M. P. M. Marques 2008. Antioxidant phenolic esters with potential anticancer activity: A Raman spectroscopy study. *Journal of Raman Spectroscopy*. 39. 95-107.
- Cole, S. P. C., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (New York, NY)*. 258. 1650.
- Collobert-Laugier, C., H. Hoste, C. Sevin and P. Dorchies 2002. Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. *Veterinary Parasitology*. 110. 77-83.
- Craig, B. H., J. G. Pilkington and J. M. Pemberton 2010. Sex ratio and morphological polymorphism in an isolated, endemic *Teladorsagia circumcincta* population. *Journal of Helminthology*. 84. 208-215.

- Das, M., K. M. Ansari, A. Dhawan, Y. Shukla and S. K. Khanna 2005. Correlation of DNA damage in epidemic dropsy patients to carcinogenic potential of argemone oil and isolated sanguinarine alkaloid in mice. *International journal of cancer*. 117. 709-717.
- Reyes-Gavilan, C. G., A. Suarez, M. Fernandez-Garcia, A. Margolles, M. Gueimonde and P. Ruas-Madiedo 2011. Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated *in vitro* using human gastric and duodenal juices. *Research in Microbiology*. 162. 514-519.
- De Mejia, E. G. and V. I. Prisecaru 2005. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45. 425-445.
- Deiana, M., D. Loru, A. Incani, A. Rosa, A. Atzeri, M. P. Melis, B. Cabboi, L. Hollecker, M. B. Pinna, F. Argiolas, M. Murru and M. A. Dessi 2012. Wine extracts from Sardinian grape varieties attenuate membrane oxidative damage in Caco-2 cell monolayers. *Food Chemistry*. 134. 2105-2113.
- DeNicola, D. B., A. H. Rebar, W. W. Carlton and B. Yagen 1978. T-2 toxin mycotoxicosis in the guinea-pig. *Food and cosmetics toxicology*. 16. 601-609.
- Dewick, P. M. 2002. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley and Sons.
- Dhanani, A. S., S. B. Gaudana and T. Bagchi 2011. The ability of *Lactobacillus* adhesin EF-Tu to interfere with pathogen adhesion. *European Food Research and Technology*. 232. 777-785.
- Dhanasekaran, D., S. Shanmugapriya, N. Thajuddin and A. Panneerselvam. Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals.
- Edds, G. T., Nair, K. P., Simpson, C. F. 1973. Effect of aflatoxin B 1 on resistance in poultry against cecal coccidiosis and Marek's disease. *American journal of veterinary research*. 34(6). 819.
- Elaroussi, M. A., F. R. Mohamed, E. M. El Barkouky, A. M. Atta, A. M. Abdou and M. H. Hatab 2006. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathology*. 35. 263-U9.
- Eriksen, G. S., H. Pettersson and T. Lundh 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology*. 42. 619-624.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [online]. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France) 2013 [cit. 2017-10-02] Dostupné z <<http://globocan.iarc.fr>>.
- Ferrer, E., A. Juan-Garcia, G. Font and M. J. Ruiz 2009. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*. 23. 1504-1509.

- Frizzell, C., D. Ndossi, S. Verhaegen, E. Dahl, G. Eriksen, M. Sørli, E. Ropstad, M. Muller, C. T. Elliott and L. Connolly 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters*. 206. 210-217.
- Gautier, J. C., D. Holzhaeuser, J. Markovic, E. Gremaud, B. Schilter and R. J. Turesky 2001. Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 30. 1089-1098.
- Gawor, J. J. 1995. The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. *Veterinary Parasitology*. 58(1). 99-108.
- Giancarlo, B., B. Elisabetta, C. Edmondo, C. Valeriana and T. Giuseppina 2011. Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC-FLD. *Food Chemistr.* 126. 1278-1282.
- Girish, C. K. and C. Devegowda 2006. Efficacy of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb (R)) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 19. 877-883.
- Gleinser, M., V. Grimm, D. Zhurina, J. Yuan and C. U. Riedel 2012. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. *Microbial Cell Factories*. 11.
- González-Rodríguez, I., L. Ruiz, M. Gueimonde, A. Margolles and B. Sánchez 2013. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letter*. 340. 1-10.
- Gopal, P. K., J. Prasad, J. Smart and H. S. Gill 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 67. 207-216.
- Gouze, M. E., J. Laffitte, G. Dedieu, A. Galinier, J. P. Thouvenot, I. P. Oswald and P. Galtier 2005. Individual and combined effects of low oral doses of deoxynivalenol and nivalenol in mice. *Cellular and Molecular Biology*, 51, OL809-OL817.
- Gouze, M. E., J. Laffitte, P. Pinton, G. Dedieux, A. Galinier, J. P. Thouvenot, N. Loiseau, I. P. Oswald and P. Galtier 2007. Effect of subacute oral doses of nivalenol on immune and metabolic defence systems in mice. *Veterinary Research*. 38. 635-646.
- Grisham, M. B., MacDermott, R. P., Deitch, E. A. 1990. Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation*. 14(6). 669-680.
- Guglielmetti, S., I. Tamagnini, M. Minuzzo, S. Arioli, C. Parini, E. Comelli and D. Mora 2009. Study of the Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to Human Intestinal Cell Lines. *Current Microbiolog.* 59. 167-172.
- Gupta, S., L. M. Rodrigues, A. P. Esteves, A. M. F. Oliveira-Campos, M. S. J. Nascimento, N. Nazareth, H. Cidade, M. P. Neves, E. Fernandes, M. Pinto, N. Cerqueira and N.

- Bras 2008. Synthesis of N-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistr.* 43. 771-780.
- Haeri, A., Z. Khodaii, S. M. H. Ghaderian, A. S. T. Panah and R. A. Najar 2012. Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, HEp-2, and T84 cell lines. *Annals of Microbiology.* 62. 339-344.
- Haller, D., H. Colbus, M. G. Ganzle, P. Scherenbacher, C. Bode and W. P. Hammes 2001. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology.* 24. 218-226.
- He, J. A. and M. M. Giusti 2010. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. In *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 1, eds. M. P. Doyle and T. R. Klaenhammer. 163-187. Palo Alto: Annual Reviews.
- Hedman, R., Pettersson, H., Engström, B., Elwinger, K., Fossum, O. 1995. Effects of feeding nivalenol-contaminated diets to male broiler chickens. *Poultry science.* 74(4). 620-625.
- Hedman, R., A. Thuvander, I. Gadhasson, M. Reverter and H. Pettersson 1997. Influence of dietary nivalenol exposure on gross pathology and selected immunological parameters in young pigs. *Natural toxins.* 5. 238-46.
- Hinney, B., N. C. Wirtherle, M. Kyule, N. Mieth, K.-H. Zessin and P.-H. Clausen 2011. Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitology research.* 108. 1083-1091.
- Hiratochi, M., K. Tatani, K. Shimizu, Y. Kuramochi, N. Kikuchi, N. Kamada, F. Itoh and M. Isaji 2012. Hypouricemic effects of novel concentrative nucleoside transporter 2 inhibitors through suppressing intestinal absorption of purine nucleosides. *European Journal of Pharmacology.* 690. 183-191.
- Hostettmann, K., O. Potterat and J.-L. Wolfender 1998. The potential of higher plants as a source of new drugs. *CHIMIA International Journal for Chemistry.* 52. 10-17.
- Huang, X. F., H. Q. Li, L. Shi, J. Y. Xue, B. F. Ruan and H. L. Zhu 2008. Synthesis of resveratrol analogues, and evaluation of their cytotoxic and xanthine oxidase inhibitory activities. *Chemistry & Biodiversity.* 5. 636-642.
- Huebner, K. D., Wannemecher jr, R. W., Stiles, B. G., Popoff, M. R., Poli, M. A. 2007. Additional toxins of clinical concern. *Medical aspects of biological warfare.* 355-389.
- Ishige, K., D. Schubert and Y. Sagara 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine.* 30. 433-446.
- Isik, S., A. Karagoz, S. Karaman and C. Nergiz 2012. Proliferative and apoptotic effects of olive extracts on cell lines and healthy human cells. *Food Chemistry.* 134. 29-36.

- Iwahashi, Y., H. Hosoda, J. H. Park, J. H. Lee, Y. Suzuki, E. Kitagawa, S. M. Murata, N. S. Jwa, M. B. Gu and H. Iwahashi 2006. Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistr.* 54. 1936-1942.
- Jensen, H., S. Grimmer, K. Naterstad and L. Axelsson 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 153. 216-222.
- Kalant, H. 1997. Opium revisited: a brief review of its nature, composition, non- medical use and relative risks1. *Addiction.* 92. 267-277.
- Kanokmedhakul, S., R. Lekphrom, K. Kanokmedhakul, C. Hahnvajanawong, S. Bua-art, W. Saksirirat, S. Prabpai and P. Kongsaree 2012. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. *Tetrahedron.* 68. 8261-8266.
- Katsikari, A., C. Patronidou, C. Kiparissides and M. Arsenakis 2009. Uptake and cytotoxicity of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in human colon adenocarcinoma cells. *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials.* 165. 160-164.
- Kim, H. M., S. B. Han, G. T. Oh, Y. H. Kim, D. H. Hong, N. D. Hong and I. D. Yoo 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *International Journal of Immunopharmacology.* 18. 295-303.
- Klener, P., & Klener jr, P. 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii.* Grada publishing as.
- Kobuchi, H., F. Virgili and L. Packer 1999. Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: Effect of flavonoids and plant extracts. *Nitric Oxide, Pt C.* 301. 504-513.
- Kockaya, E. A., Selmanoglu, G., Ozsoy, N., Gül, N. 2009. Evaluation of patulin toxicity in the thymus of growing male rats. *Arh Hig Rada Toksikol.* 60. 411-8.
- Konjevic, D., E. Srebocan, A. Gudan, I. Lojkic, K. Severin and M. Sokolovic 2004. A pathological condition possibly caused by spontaneous trichotecene poisoning in Brahma poultry: first report. *Avian Pathology.* 33. 377-380.
- Krogh, P., Axelsen, N. H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyldgaard-Jensen, J., Petersen, O. K. 1974. Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Supplement. Suppl* 246. 1.
- Kubosaki, A., M. Aihara, B. J. Park, Y. Sugiura, M. Shibutani, M. Hirose, Y. Suzuki, K. Takatori and Y. Sugita-Konishi 2008. Immunotoxicity of nivalenol after subchronic dietary exposure to rats. *Food and Chemical Toxicology.* 46. 253-258.
- Kuzmina, T. A., V. A. Kharchenko, A. I. Starovir and G. M. Dvojnjos 2005. Analysis of the strongylid nematodes (Nematoda: Strongylidae) community after deworming of brood horses in Ukraine. *Veterinary parasitology.* 131. 283-290.

- Kuzmina, T. A., V. A. Kharchenko and N. S. Zvegintsova 2007. Comparative study of the intestinal strongylid communities of equidae in the Askania-Nova biosphere reserve, Ukraine. *Helminthologia*. 44. 62-69.
- Lichtenfels, J. R., R. C. Anderson, A. G. Chabaud and S. Willmott 1980. CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. *CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates*. 7.
- Lichtenfels, J. R., L. M. Gibbons and R. C. Krecek 2002. Recommended terminology and advances in the systematics of the Cyathostominae (Nematoda: Strongyloidea) of horses. *Veterinary parasitology*. 107. 337-342.
- Lichtenfels, J. R., V. A. Kharchenko and G. M. Dvojnos 2008. Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary parasitology*. 156. 4-161.
- Lichtenfels, J. R., V. A. Kharchenko, R. C. Krecek and L. M. Gibbons 1998. An annotated checklist by genus and species of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda : Strongyloidea : Cyathostominae) of horses, asses and zebras of the world. *Veterinary Parasitology*. 79. 65-79.
- Lichtenfels, J. R., A. McDonnell, S. Love and J. B. Matthews 2001. Nematodes of the tribe cyathostominae (Strongylidae) collected from horses in Scotland. *Comparative Parasitology*. 68. 265-269.
- Lin, J. W., L. X. Hao, G. X. Xu, F. Sun, F. Gao, R. Zhang and L. X. Liu 2009. Molecular cloning and recombinant expression of a gene encoding a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 25. 383-390.
- Lin, K. W., A. M. Huang, S. C. Yang, J. R. Weng, T. C. Hour, Y. S. Pu and C. N. Lin 2012. Cytotoxic and antioxidant constituents from *Garcinia subelliptica*. *Food Chemistry*. 135. 851-859.
- Linder, N., E. Martelin, M. Lundin, J. Louhimo, S. Nordling, C. Haglund and J. Lundin 2009. Xanthine oxidoreductase - Clinical significance in colorectal cancer and in vitro expression of the protein in human colon cancer cells. *European Journal of Cancer*. 45. 648-655.
- Lopez, P., D. C. Monteserin, M. Gueimonde, C. G. de los Reyes-Gavilan, A. Margolles, A. Suarez and P. Ruas-Madiedo 2012. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells. *Food Research International*. 46. 99-107.
- Louvard, D., Kedinger, M., Hauri, H. P. 1992. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annual review of cell biology*. 8(1). 157-195.
- Love, S., D. Murphy and D. Mellor 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*. 85. 113-121.

- Lu, H., M. Fernández-Franzón, G. Font and M. J. Ruiz. 2013. Toxicity evaluation of individual and mixed enniatins using an in vitro method with CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*. 27. 672-680.
- Lüllman, H. and M. Klaus a Martin Wehling. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání.*
- Macakova, K., L. Opletal, M. Polasek and V. Samkova. 2010. Free-radical Scavenging Activity of some European Polyporales. *Natural Product Communications*. 5. 923-926.
- Maher, S., L. Feighery, D. J. Brayden and S. McClean 2007. Melittin as a permeability enhancer II: in vitro investigations in human mucus secreting intestinal monolayers and rat colonic mucosae. *Pharmaceutical research*. 24. 1346-1356.
- Mair, T. S., D. G. M. Sutton and S. Love 2000. Caecocaecal and caecocolic intussusceptions associated with larval cyathostomosis in four young horses. *Equine Veterinary Journal*. 32. 77-80.
- Mallick, S. K., S. K. Bhutia and T. K. Maiti 2009. Macrophage Stimulation by Polysaccharides Isolated from Barometer Earthstar Mushroom, *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan (Gasteromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 11. 237-248.
- Mally, A., W. Volkel, A. Amberg, M. Kurz, P. Wanek, E. Eder, G. Hard and W. Dekant 2005. Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats. *Chemical Research in Toxicology*. 18. 1242-1252.
- Mfitilodze, M. W. and G. W. Hutchinson 1990. Prevalence and abundance of equine strongyles (Nematoda: Strongyloidea) in tropical Australia. *The Journal of parasitology*. 487-494.
- Milicevic, D., V. Juric, S. Stefanovic, M. Jovanovic and S. Jankovic 2008. Survey of Slaughtered Pigs for Occurrence of Ochratoxin A and Porcine Nephropathy in Serbia. *International Journal of Molecular Sciences*. 9. 2169-2183.
- Mok, D. W. S. and M. C. Mok 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52. 89-118.
- Moravcová, J. 2006. *Biologicky aktivní přírodní látky. Interní studijní pomůcka.*
VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie. 188-121
- Moussavi, M. and M. C. Adams 2010. An In Vitro Study on Bacterial Growth Interactions and Intestinal Epithelial Cell Adhesion Characteristics of Probiotic Combinations. *Current Microbiology*. 60. 327-335.
- Munoz, J. A. M., E. Chenoll, B. Casinos, E. Bataller, D. Ramon, S. Genoves, R. Montava, J. M. Ribes, J. Buesa, J. Fabrega and M. Rivero. 2011. Novel Probiotic *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* CECT 7210 Strain Active against Rotavirus Infections. *Applied and Environmental Microbiology*. 77. 8775-8783.

- Murota, K. and J. Terao 2003. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 417. 12-17.
- Ogbourne, C. P. 1976. The prevalence, relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. *Journal of Helminthology*. 50. 203-14.
- Ohtsubo, K., Ryu, J. C., Nakamura, K., Izumiyama, N., Tanaka, T., Yamamura, H., Ueno, Y. 1989. Chronic toxicity of nivalenol in female mice: 2-year feeding study with *Fusarium nivale* Fn 2B-moulded rice. *Food and Chemical Toxicology*. 27(9). 591-598.
- Orsine, J. V. C., R. V. da Costa and M. Novaes 2012. Mushrooms of the genus *Agaricus* as functional foods. *Nutricion Hospitalaria*. 27. 1017-1024.
- Oueslati, S., R. Ksouri, H. Falleh, A. Pichette, C. Abdelly and J. Legault 2012. Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. *Food Chemistry*. 132. 943-947.
- Pavlov, D., C. M. E. de Wet, W. O. K. Grabow and M. M. Ehlers 2002 Determination of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water. 2nd World Water Congress: Water and Health-Microbiology, Monitoring and Disinfection. 2. 115-121.
- Peng, F., Q. F. Tao, X. M. Wu, H. Dou, S. Spencer, C. Y. Mang, L. Xu, L. L. Sun, Y. Zhao, H. B. Li, S. Zeng, G. M. Liu and X. J. Hao 2012. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. *Fitoterapia*. 83. 568-585.
- Pestka, J. J. 2010. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin Journal*. 3. 323-347.
- Pettersson, H., Hedman, R., Engström, B., Elwinger, K., Fossum, O. 1995. Nivalenol in Swedish cereals 1-occurrence, production and toxicity towards chickens. *Food Additives & Contaminants*. 12(3). 373-376.
- Pichardo, S., D. Gutierrez-Praena, M. Puerto, E. Sanchez, A. Grilo, A. M. Carnean and A. Jos 2012. Oxidative stress responses to carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology in Vitro*. 26. 672-677.
- Placinta, C. M., J. P. F. D'Mello and A. M. C. Macdonald 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 78. 21-37.
- Poapolathep, A., Y. Sugita-Konishi, K. Doi and S. Kumagai 2003. The fates of trichothecene mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X, in mice. *Toxicon*. 41. 1047-1054.
- Quassinti, L., M. Bramucci, G. Lupidi, L. Barboni, M. Ricciutelli, G. Sagratini, F. Papa, G. Caprioli, D. Petrelli, L. A. Vitali, S. Vittori and F. Maggi 2013. In vitro biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniolus olusatrum* L. (Apiaceae). *Food Chemistry*. 138. 808-813.

- Ramsey, Y. H., R. M. Christley, J. B. Matthews, J. E. Hodgkinson, J. McGoldrick and S. Love 2004. Seasonal development of Cyathostominae larvae on pasture in a northern temperate region of the United Kingdom. *Veterinary parasitology*. 119. 307-318.
- Rao, A. V. and L. G. Rao 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 55. 207-216.
- Ray, P. D., B.-W. Huang and Y. Tsuji 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*. 24. 981-990.
- Rees, M. D., E. C. Kennett, J. M. Whitelock and M. J. Davies 2008. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radical Biology and Medicine*. 44. 1973-2001.
- Reid, D. M., M. Montoya, P. R. Taylor, P. Borrow, S. Gordon, G. D. Brown and S. Y. C. Wong 2004. Expression of the beta-glucan receptor, dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *Journal of Leukocyte Biology*. 76. 86-94.
- Reid, G. and J. Burton 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*. 4. 319-324.
- Reinemeyer, C. R., S. A. Smith, A. A. Gabel and R. P. Herd 1984. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the USA. *Veterinary Parasitology*. 15. 75-83.
- Ron, D. and P. Walter 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8. 519-529.
- Round, M. C. 1969. The prepatent period of some horse nematodes determined by experimental infection. *J Helminthol*. 43. 185-192.
- Ruiz, M. J., P. Franzova, A. Juan-García and G. Font 2011. Toxicological interactions between the mycotoxins beauvericin, deoxynivalenol and T-2 toxin in CHO-K1 cells in vitro. *Toxicon*. 58. 315-326.
- Ryu, J. C., Ohtsubo, K., Izumiyama, N., Nakamura, K., Tanaka, T., Yamamura, H., Ueno, Y. 1988. The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*. 11(1). 38-47.
- Sakuma, S., E. Miyoshi, N. Sadatoku, J. Fujita, M. Negoro, Y. Arakawa and Y. Fujimoto 2009. Monochloramine produces reactive oxygen species in liver by converting xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 239. 268-272.
- Salzman, A. L., A. G. Denenberg, I. Ueta, M. Oconnor, S. C. Linn and C. Szabo 1996. Induction and activity of nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial monolayers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 270. G565-G573.

- Sanchez, D., M. Miguel and A. Aleixandre 2012. Dietary Fiber, Gut Peptides, and Adipocytokines. *Journal of Medicinal Food*. 15. 223-230.
- Sanzani, S. M., M. Reverberi, M. Punelli, A. Ippolito and C. Fanelli 2012. Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*. 153. 323-331.
- Sathyabama, S., R. Vijayabharathi, P. B. Devi, M. R. Kumar and V. B. Priyadarisini 2012. Screening for probiotic properties of strains isolated from feces of various human groups. *Journal of Microbiology*. 50. 603-612.
- Schaefer, S., M. Baum, G. Eisenbrand and C. Janzowski 2006. Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50. 413-417.
- Schlatter, J. 2004. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicology Letters*. 153.
- Selmanoglu, G. 2006. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 44. 2019-2024.
- Seruji, N. M. U., H. Y. Khong and C. J. Kutoi 2013. Antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *garcinia nervosa* (clusiaceae). *Journal of Chemistry*.
- Servin, A. L. and M. H. Coconnier 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*. 17. 741-754.
- Siegel, D., D. L. Gustafson, D. L. Dehn, J. Y. Han, P. Boonchoong, L. J. Berliner and D. Ross 2004. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1: Role as a superoxide scavenger. *Molecular Pharmacology*. 65. 1238-1247.
- Silva, A. V. M., H. M. A. Costa, H. A. Santos and R. O. Carvalho 1999. Cyathostominae (Nematoda) parasites of *Equus caballus*; in some Brazilian states. *Veterinary parasitology*. 86. 15-21.
- Smania, A., C. J. S. Marques, E. F. A. Smania, C. R. Zanetti, S. G. Carobrez, R. Tramonte and C. Loguercio-Leite 2003. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*. 17. 1069-1072.
- Smith, H. J. 1976. Strongyle infections in ponies. II. Reinfection of treated animals. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 40. 334.
- Soengas, M. S. and S. W. Lowe 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 22. 3138-3151.
- Sorenson, W. G., Simpson, J., Castranova, V. 1985. Toxicity of the mycotoxin patulin for rat alveolar macrophages. *Environmental research*. 38(2). 407-416.
- Soud-Mensi, G., S. Moukha, T. A. Mobio, K. Maaroufi and E. E. Creppy 2008. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicon*. 51. 1338-1344.

- Speijers, G. J. A., Franken, M. A. M., and Van Leeuwen, F. X. R. 1988. Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastro-intestinal tract. *Food and chemical toxicology*. 26(1). 23-30.
- Stien, A., M. Dallimer, R. J. Irvine, O. Halvorsen, R. Langvatn, S. D. Albon and J. F. Dallas 2005. Sex ratio variation in gastrointestinal nematodes of Svalbard reindeer; density dependence and implications for estimates of species composition. *Parasitology*. 130. 99-107.
- Stoev, S. D., M. Paskalev, S. MacDonald and P. G. Mantle 2002. Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 53.
- Stoev, S. D., S. Vitanov, G. Anguelov, T. Petkova-Bocharova and E. E. Creppy 2001. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin a and penicillic acid. *Veterinary Research Communications*. 25. 205-223.
- Suarez, V. H., Cabaret, J., and Gruner, L. 1995. Morphological polymorphism in the nematode *Teladorsagia circumcincta* in relation to age of larvae, infection mode and lamb characteristics in experimental conditions. *International journal for parasitology*. 25(10). 1173-1177.
- Sugita-Konishi, Y., A. Kubosaki, M. Takahashi, B. J. Park, T. Tanaka, K. Takatori, M. Hirose and M. Shibutani 2008. Nivalenol and the targeting of the female reproductive system as well as haematopoietic and immune systems in rats after 90-day exposure through the diet. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 25. 1118-1127.
- Sweetman, S. C. 2002. *Martindale: The Complete Drug Reference* Pharmaceutical Press. London (UK). 33.
- Takahashi, M., M. Shibutani, Y. Sugita-Konishi, M. Aihara, K. Inoue, G. H. Woo, H. FujiMoto and M. Hirose 2008. A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 46. 125-135.
- Thun, M. J., E. E. Calle, M. M. Namboodiri, W. D. Flanders, R. J. Coates, T. Byers, P. Boffetta, L. Garfinkel and C. W. Heath 1992. Risk-factors for fatal colon cancer in a large prospective-study. *Journal of the National Cancer Institute*. 84. 1491-1500.
- Traversa, D., P. Milillo, H. Barnes, G. von Samson-Himmelstjerna, S. Schurmann, J. Demeler, D. Otranto, R. P. Lia, S. Perrucci and A. Frangipane di Regalbano 2010. Distribution and species-specific occurrence of cyathostomins (Nematoda, Strongylida) in naturally infected horses from Italy, United Kingdom and Germany. *Veterinary parasitology*. 168. 84-92.
- Tyson, J. J., K. Chen and B. Novak 2001. Network dynamics and cell physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2. 908-916.
- Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Národní onkologický registr (NOR) [online] 2015 [cit. 2017-12-01] Dostupné z <<http://www.uzis.cz/register-nzis/nor>>.

- Walle, T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 36. 829-837.
- Williams, K. C. and B. J. Blaney 1994. effect of the mycotoxins, nivalenol and zearalenone, in maize naturally infected with fusarium-graminearum on the performance of growing and pregnant pigs. *Australian Journal of Agricultural Research*. 45.
- Williams, P. P. 1989. Effects of T-2 mycotoxin on gastrointestinal tissues: A Review of in vivo and in vitro models. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 18. 374-387.
- Wolff, J. and L. Knipling 1993. Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry*. 32. 13334-13339.
- Wong, K. H., C. K. M. Lai and P. C. K. Cheung 2009. Stimulation of Human Innate Immune Cells by Medicinal Mushroom Sclerotial Polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 11. 215-223.
- Wong, K. H., Lai, C. K., and Cheung, P. C. 2011. Immunomodulatory activities of mushroom sclerotial polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 25(2). 150-158.
- Woods, J. A., C. Jewell and N. M. O'Brien 2001. Sedanolid, a natural phthalide from celery seed oil: Effect on hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity in HepG2 and CaCo-2 human cell lines. *In Vitro & Molecular Toxicology-a Journal of Basic and Applied Research*. 14. 233-240.
- Wright, D. T., B. M. Fischer, C. M. Li, L. G. Rochelle, N. J. Akley and K. B. Adler 1996. Oxidant stress stimulates mucin secretion and PLG in airway epithelium via a nitric oxide-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 271. L854-L861.
- Xu, B. J. and S. K. C. Chang 2012. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry*. 134. 1287-1296.
- Yan, X. J., B. T. Murphy, G. B. Hammond, J. A. Vinson and C. C. Neto 2002. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 5844-5849.
- Yunus, A. W., A. Blajet-Kosicka, R. Kosicki, M. Z. Khan, H. Rehman and J. Bohm 2012. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Intestinal development, absorptive functionality, and metabolism of the mycotoxin. *Poultry Science*. 91. 852-861.
- Zhang, G. Q., T. Tian, Y. P. Liu, H. X. Wang and Q. J. Chen 2011. A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from a white root fungus *Abortiporus biennis*. *Process Biochemistry*. 46. 2336-2340.
- Zhang, J. S., H. J. Lu and X. F. Wang 2008. MS07116 sodium selenosulfate synthesis and demonstration of its in vitro cytotoxic activity against HepG2, caco2, and three kinds of leukemia cells. *Biological Trace Element Research*. 125. 13-21.

Zhang, W. Y., J. Y. Yang, J. P. Chen, Y. Y. Hou and X. D. Han 2005. Immunomodulatory and antitumour effects of an exopolysaccharide fraction from cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumour-bearing mice. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 42. 9-15.