

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Interakce benzo[c]fenantridinových alkaloidů s  
biomolekulami

Vypracoval: Bc. Michal Biler

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.

Děkuji vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a hodně trpělivosti a ochoty spolupracovat během trvání celé diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat Ing. Janu Vackovi, Ph.D. za cenné rady týkající se alkaloidů a Prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za rady týkající se nukleových kyselin.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením Doc. RNDr.  
Martina Kubaly, Ph.D. a za použité literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne .....

.....

Michal Biler

## SOUHRN

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy jsou látky vykazující širokou biologickou a fyziologickou aktivitu. Tyto látky se využívají jako biopesticidy, v boji proti paradentóze, mají nemalý význam při apoptotických procesech, v léčbě rakovinných buněk, ovlivňují řadu enzymů a mají mnoho dalšího využití. Při interakci těchto látek s DNA může docházet ke kovalentní vazbě nebo nekovalentním interakcím, kde rozlišujeme mezi interkalací nebo vazbou do žlábků. Pro charakterizaci strukturních analogů chelerytrinu a sanguinarinu, tedy NK-109 a redukované formy NK-109, byly využity metody fluorescenční spektroskopie a spektrofotometrie. Byla proměřena fluorescenční a absorpční spektra pro různé koncentrace DNA a různé koncentrace zkoumaných alkaloidů, na základě kterých byly zjištěny cenné informace – rozpustnost v daných rozpouštědlech, závislost fluorescence alkaloidu na přítomnosti metanolu a stechiometrie vazby na DNA.

## ABSTRACT

Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids are compounds, which exhibit a wide range of biological and physiological activities. These species are used as biopesticides, against periodontitis, they have a significant role in apoptotic processes, in the treatment of cancer cells, they affect a variety of enzymes and have many other applications. The interaction of these compounds with DNA may be covalent bond or non-covalent interaction, where we distinguish intercalation process and binding into the groove. For characterization of the chelerythrine and sanguinarine analogs termed NK-109 and reduced form of NK-109, we utilized the fluorescence spectroscopy and spectrophotometry. We analyzed fluorescence and absorption spectra for different concentrations of DNA and various concentrations of alkaloids. This study revealed valuable information about a solubility in some solvents, dependence of fluorescence on methanol presence and DNA-binding stoichiometry.

## OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK .....	8
2.	ÚVOD .....	9
3.	ALKALOIDY .....	10
3.1.	Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy .....	12
3.2.	Fyzikálně-chemické vlastnosti benzo[c]fenantridinových alkaloidů .....	14
3.3.	Biologická a fyziologická aktivita alkaloidů .....	16
3.4.	Biotransformace alkaloidů .....	18
4.	NUKLEOVÉ KYSELINY .....	19
4.1.	Vlastnosti DNA .....	20
4.2.	Formy DNA .....	21
4.3.	Vazba malých molekul na DNA .....	22
4.3.1.	Interkalace .....	23
4.3.2.	Molekuly vážící se do žlábků .....	24
5.	INTERAKCE ALKALOIDŮ S BIOMOLEKULAMI .....	25
5.1.	Interakce sanguinarinu s proteiny .....	25
5.2.	Interakce benzo[c]fenantridinových alkaloidů s DNA .....	26
5.2.1.	Interakce DNA s chelerytrinem a sanguinarinem .....	26
5.2.2.	Interakce DNA s nitidinem .....	27
6.	MATERIÁLY A METODY .....	28
6.1.	Chemikálie .....	28
6.2.	Vazba alkaloidů na DNA .....	28
6.2.1.	Hledání vhodného rozpouštědla .....	29
6.2.2.	Měření absorbance .....	29
6.2.3.	Excitační a emisní spektra .....	29
7.	VÝSLEDKY .....	30
7.1.	Interakce NK-109 s metanolem .....	30
7.2.	Rozpustnost v rozpouštědlech .....	31
7.3.	Závislost fluorescence redukované formy na přítomnosti metanolu ...	32
7.4.	Absorpční spektra – NK-109 .....	33
7.5.	Absorpční spektra – redukovaná forma NK-109 .....	37
8.	DISKUSE .....	41

9. ZÁVĚR .....	44
10. SEZNAM LITERATURY .....	45

## 1. SEZNAM ZKRATEK

A, G, U, C, T	adenin, guanin, uracil, cytosin, thymin
BSA	hovězí sérový albumin
CHE	chelerytrin
CNS	centrální nervová soustava
DHSG	dihydrosanguinarin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EtBr	etidium bromid
KBA	kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy
NaBH <sub>4</sub>	tetrahydridoboritan sodný
NI	nitidin
NK-109	1-hydroxy-2-methoxy-12-methyl- [1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2-c]fenantridin-12-ium chlorid
Redukovaná forma NK-109	2-methoxy-12-methyl-12,13-dihydro- [1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2-c]fenantridin-1-ol
RNA	ribonukleová kyselina
SG	sanguinarin
THF	tetrahydrofuran
Topo	topoizomerasa



## 2. ÚVOD

Alkaloidy jsou přírodní látky obsažené zejména v rostlinách. V této práci se zabýváme alkaloidy, které patří do skupiny benzo[c]fenantridinových alkaloidů, jež jsou odvozeny od sanguinarinu a chelerytrinu. Všechny tyto alkaloidy se vyskytují v čeledích rostlin makovitých (*Papaveraceae*), zemědýmovitých (*Fumariaceae*), routovitých (*Rutaceae*) (Dostál J., Slavík J., 2002) a pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*) (Vavrečková C., Ulrichová J., 1994). Alkaloidy mají široké spektrum uplatnění, např. v zemědělském průmyslu, ve farmacii či v lidovém léčitelství pro svou biologickou a fyziologickou aktivitu, pro protirakovinný účinek, antimikrobiální a protizánětlivý účinek, pro schopnost vyvolat apoptosu, mají antiplakový účinek, antioxidantní účinky a další (Maiti M., Kumar G. S., 2007), (Deroussent A. a kol., 2010). V organismu podléhají tyto látky metabolickým přeměnám. Proto je neméně důležité zkoumat fyzikálně-chemické vlastnosti a interakce s biomolekulami nejen samotných alkaloidů, ale i jejich metabolitů. Z hlediska chemické struktury je nejvýznamnější a nejreaktivnější místo kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů iminiová vazba mezi kationtem dusíku a atomem uhlíku  $C=N^+$  (Dostál J., Slavík J. 2002).

DNA je dvouvláknová makromolekula, která se skládá ze čtyř typů nukleotidových podjednotek a která je nositelkou genetické informace (Alberts B. a kol., 2007). Interakce malých molekul s DNA může být kovalentní (změny bází, zlomy řetězce DNA atd.) nebo nekovalentní (interkalace, vazba do žlábků) (Neidle S., 2008). Cílem zkoumání těchto interakcí je porozumět jim na molekulární úrovni a zdokonalit a zefektivnit chemoterapeutickou léčbu, aby měla vyšší účinnost, menší toxicitu a aby byla zacílena na specifickou sekvenci DNA.

Tato diplomová práce si klade za cíl:

- 1) Seznámit se s benzo[c]fenantridinovými alkaloidy a jejich užitím v tradiční medicíně.
- 2) Proměřit základní fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných alkaloidů.
- 3) Proměřit interakci těchto alkaloidů s nukleovými kyselinami.

### 3. ALKALOIDY

Alkaloidy jsou skupiny přírodních látek, které obsahují atom dusíku ve své molekule a které jsou produkovány během metabolismu u rostlin. Rostliny obsahující tyto alkaloidy jsou hojně využívány jako součást tradiční čínské medicíny a lidového léčitelství (Zdařilová A. a kol., 2006). Zdrojem alkaloidů není jen samotná rostlina, ale v dnešní době se dají připravit i synteticky.

Množství daného alkaloidu v rostlině je limitováno nejen druhem rostliny, ale také vegetačním obdobím, ročním obdobím, teplotou či denní dobou, ve které je tato rostlina sbírána (Tomé F., Colombo M. L., 1995). Můžeme říct, že obsah alkaloidů je obecně až o několik řádů vyšší v kořenové části rostliny ve srovnání s nadzemní částí a nejvyšší produkce alkaloidů dosahuje rostlina na konci svého vegetačního růstu (Pěňčíková K. a kol., 2011).

Podle struktury můžeme alkaloidy rozdělit na (Staněk J., 1957):

- alkaloidy odvozené od pyridinu a piperidinu
  - nikotin (hlavním alkaloidem z listů tabáku, který stimuluje CNS)
  - piperin (obsažen v pepři)
- alkaloidy odvozené od tropanu
  - atropin (použití v očním lékařství, rozšiřuje zornice, získává se z kořene rulíku zlomocného)
  - kokain (z koky pravé - kokový keř, lokálně anestetický účinek, vyvolává halucinace, utlumuje únavu, zvyšuje fyzickou aktivitu)
- alkaloidy odvozené od fenanthrenu
  - morfin (alkaloid izolovaný z opia - z makovic máku setého, způsobuje ospalost, použití v medicíně k tlumení bolesti)
  - heroin
  - kodein (v malých dávkách tlumí kašel)
- alkaloidy odvozené od chinolinu a isochinolinu
  - chinin (izolován z kůry chinovníku červeného, působí na určitá stádia původce malárie)

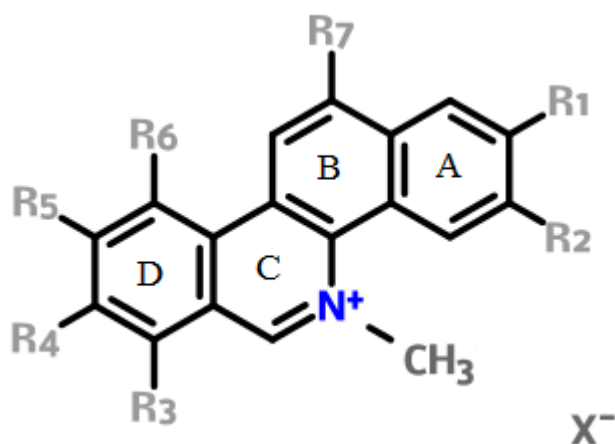
- papaverin (zástupce isochinolinových alkaloidů, získáván z opia)
- alkaloidy odvozené od indolu a imidazolu
  - reserpin (v tropických a subtropických oblastech využíván domorodci jako lék proti hadímu uštknutí, proti bodnutí hmyzem, v lékařství ke snížení krevního tlaku)
  - strychnin
- alkaloidy odvozené od purinu
  - kofein (nachází se v kávových bobech, čajových listech, v semenech koly)
- alkaloidy námelové

V této práci se budeme zabývat alkaloidy, které patří do skupiny isochinolinových alkaloidů vyskytujících se v čeledích rostlin makovitých (*Papaveraceae*), zemědýmovitých (*Fumariaceae*) a routovitých (*Rutaceae*) (Dostál J., Slavík J., 2002), pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*), dříšťálovitých (*Berberidaceae*) (Vavrečková C., Ulrichová J., 1994) a dalších. Hlavní podskupinou této skupiny alkaloidů jsou benzo[c]fenantridinové alkaloidy s hlavními zástupci sanguinarinem a chelerytrinem, od nichž jsou odvozeny alkaloidy NK-109 a redukovaná forma NK-109, které byly studovány v této práci. Sanguinarin je pak hojně zastoupen u severoamerické byliny krevnice kanadské (*Sanguinaria canadensis* L.), vlašťovičnicku větším (*Chelidonium majus*) a okecku srdčitém (*Macleaya cordata*) (Dvořák Z., Šimánek V., 2007), (Dostál J., Slavík J., 2000).

### 3.1. Kwartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy

Kwartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy (KBA) můžeme rozdělit do čtyř základních podskupin podle toho, jaké skupiny resp. jejich kombinace se vyskytují na základním tetracyklickém skeletu. Podle toho, zda se v molekule vyskytuje hydroxylová, methoxylová nebo methyldioxylová skupina (Dostál J., Slavík J., 2000), (Vavrečková C., Ulrichová J., 1994) je dělíme na (viz Obr. 1 a Tabulka 1):

- 1) 2, 3, 7, 8 – tetrasubstituované alkaloidy – sanguinarin (SG), chelerytrin (CHE), fagaridin, isofagaridin
- 2) 2, 3, 8, 9 – tetrasubstituované – nitidin, avicin, fagaronin
- 3) Pentasubstituované – sanguilutin, sanguirubin, chelirubin, chelilutin, 10-hydroxysanguinarin a 10-hydroxychelerytrin
- 4) Hexasubstituované alkaloidy – makarpin a 12-hydroxychelirubin (viz obr. 1)

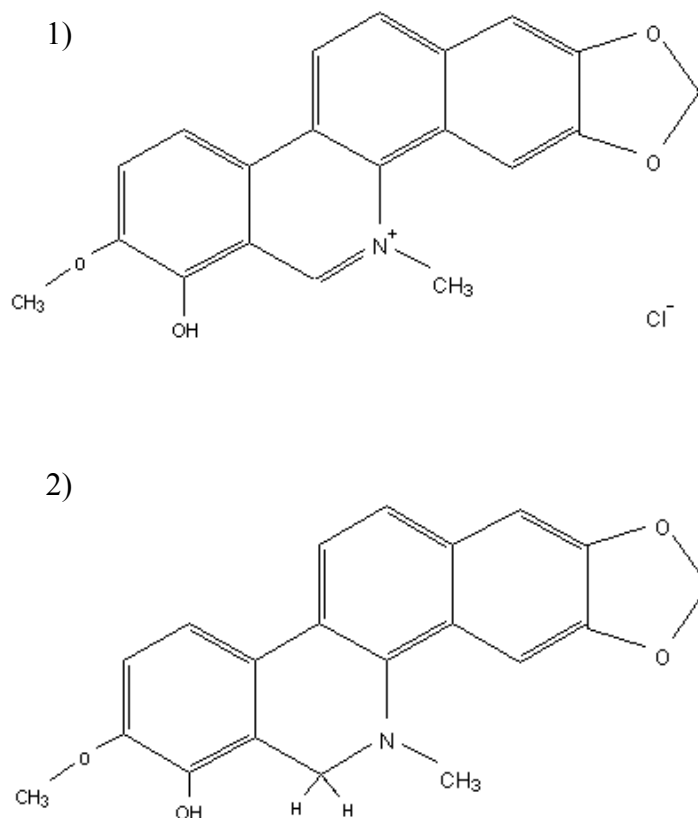


Obr. 1 – Základní schéma kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů. Upraveno podle Vavrečkové C., Ulrichové J. (1994)

Tabulka 1 – Přehled základních kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů

Alkaloid	Postranní skupina
Chelerytrin	$R1 + R2 = OCH_2O, R3 = R4 = OCH_3, R5 = R6 = R7 = H$
Sanguinarin	$R1 + R2 = R3 + R4 = OCH_2O, R5 = R6 = R7 = H$
Fagaridin	$R1 + R2 = OCH_2O, R3 = OH, R4 = OCH_3, R5 = R6 = R7 = H$
Isofagaridin	$R1 + R2 = OCH_2O, R3 = OCH_3, R4 = OH, R5 = R6 = R7 = H$
Nitidin	$R1 + R2 = OCH_2O, R3 = R6 = R7 = H, R4 = R5 = OCH_3$
Avicin	$R1 + R2 = R4 + R5 = OCH_2O, R3 = R6 = R7 = H$
Fagaronin	$R1 = OH, R2 = R4 = R5 = OCH_3, R3 = R6 = R7 = H$
Sanguilutin	$R1 = R2 = R3 = R4 = R6 = OCH_3, R5 = R7 = H$
Sanguirubin	$R1 = R2 = R6 = OCH_3, R3 + R4 = OCH_2O, R5 = R7 = H$
Chelirubin	$R1 + R2 = R3 + R4 = OCH_2O, R5 = R7 = H, R6 = OCH_3$
Chelilutin	$R1 + R2 = OCH_2O, R3 = R4 = R6 = OCH_3, R5 = R7 = H$
10-hydroxysanguinarin	$R1 + R2 = R3 + R4 = OCH_2O, R5 = R7 = H, R6 = OH$
10-hydroxychelerytrin	$R1 + R2 = OCH_2O, R3 = R4 = OCH_3, R5 = R7 = H, R6 = OH$
Makarpin	$R1 + R2 = R3 + R4 = OCH_2O, R5 = H, R6 = R7 = OCH_3$
12-hydroxychelirubin	$R1 + R2 = R3 + R4 = OCH_2O, R5 = H, R6 = OCH_3, R7 = OH$

Alkaloidy studované v této práci vznikly demetylací SG nebo CHE. Jedná se o alkaloid NK-109 s postranními skupinami:  $R1 + R2 = OCH_2O, R3 = OH, R4 = OCH_3, R5 = R6 = R7 = H$  (viz Obr. 2) a redukovanou formu alkaloidu NK-109, která se od NK-109 liší nepřítomností kladně nabitého atomu dusíku (viz Obr. 2).



Obr. 2 – Vzorce studovaných alkaloidů, 1) NK-109, 2) redukovaná forma NK-109

### 3.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti benzo[c]fenantridinových alkaloidů

Nejreaktivnější místo na molekule KBA je oblast nazývaná iminiová vazba. Jedná se o dvojnou vazbu mezi atomem dusíku a atomem uhlíku v poloze 6 ( $C=N^+$ ). Při nižších hodnotách pH se alkaloidy obecně nacházejí ve formě kvartérního kationtu, který pak alkalizací přechází do formy označované jako pseudobáze. Pro pojem pseudobáze můžeme použít také pojmy jako nenabitá forma alkaloidu, alkanolamin nebo 6-hydroxy-5,6-dihydroderivát (Zdařilová A. a kol., 2006). Změna struktury alkaloidu vede samozřejmě ke změnám vlastností. Nabitá forma kvartérního kationtu je polární, barevná a ve vodě rozpustná. Pseudobáze je naopak bezbarvá a ve vodě nerozpustná (Dostál J., Slavík J., 2002).

Ve vodných roztocích existuje reverzibilní rovnováha mezi kvartérní formou a pseudobází (Slaninová I., 2001). Tato rovnováha je popisována jako acido-bazická

rovnováha s danou rovnovážnou konstantou, která určuje hodnotu pH, ve které jsou dvě formy alkaloidu v rovnováze. Za fyziologického pH (7,2 – 7,4) prochází forma pseudobáze přes buněčnou membránu. Uvnitř buňky pak přechází patrně v důsledku nižšího pH na formu kvartérního kationtu, který se v hlavní míře podílí na biologických účincích alkaloidu v buňce (Zdařilová A. a kol., 2006).

KBA podléhají řadě chemických modifikací. Mezi hlavní reakce, kterým mohou alkaloidy podléhat, jsou reakce s (Vavrečková C., Ulrichová J., 1994):

- $K_3Fe(CN)_6$  za vzniku 6-oxoderivátu
- $NaBH_4$  za vzniku 5, 6-dihydroderivátu
- nukleofilním činidlem (adice do polohy C-6) vzniká 6-substituovaný dihydro benzo[c]fenanthridinový alkaloid nebo dimerní benzo[c]fenanthridinový alkaloid
- reakcí s koncentrovanou NaOH vzniká dihydro- nebo 6-oxo-derivát
- reakcí s  $H^+$  vzniká O-demethyl derivát (C-7,8)
- za zvýšené teploty ( $\Delta t > 200\text{ }^\circ\text{C}$ ) vzniká N-demethyl derivát
- amoniakem dává vznik směs N- a O- dimerů

Vazba mezi atomy N5-C6 je za biologických podmínek snadno zredukovatelná a tudíž snadno metabolizovatelná. Proto byly připraveny analogy alkaloidu NK-109 za účelem zlepšení tohoto nedostatku. Připravené deriváty se substituentem na pozici 6 se staly sice zcela rezistentní vůči biologické redukci, ale stále nejsou optimální, protože vykazují nízkou účinnost inhibice buněčného růstu. Deriváty se substituentem na poloze 8 potlačují biologickou redukci a vykazují vysokou cytotoxickou aktivitu. Naopak 5-deriváty byly redukovány ještě snadněji než samotný NK-109 (Nakanishi T. a kol., 2000).

Ve vodném prostředí je SG v rovnováze mezi nabitou kvartérní formou a neutrální formou – pseudobází s hodnotou  $pK_a = 8,06$ . Nabitá forma sanguinarinu existuje při pH 1 – 6 a její nenabitá forma nad pH 8,5. Tyto dvě formy vykazují při pH 7,5 fluorescenci s vlnovou délkou excitace/emise 475/590 nm a 327/418 nm. Po redukci iminiové vazby vzniká dihydrosanguinarin (DHSG) s maximy v excitačních/emisních spekter při 327/446 nm (Janovská M. a kol., 2009). NK-109 se vyznačuje excitační vlnovou délkou

322–331,6 nm, které přísluší vlnová délka emise 411,4–419 nm, a excitační vlnovou délkou 383–394,2, jejíž emisní pás je v rozmezí vlnových délek 427,8–463 nm v závislosti na použitém rozpouštědle. Redukovaná forma NK-109 se vyznačuje vlnovou délkou excitace/emise 319,8–328,8/443,4–463,4 v závislosti na použitém rozpouštědle (Biler, 2011). Můžeme pozorovat podobnost spekter DHSG s redukovanou formou NK-109 a SG s NK-109.

Z Kamlet–Taftovy analýzy bylo zjištěno, že spektra redukované formy NK-109 jsou ovlivněna především polaritou rozpouštědla, avšak nemalý vliv má také schopnost alkaloidu přijímat protony. Oba pásy excitace u NK-109 jsou značně ovlivněny polaritou solventu. Z Lippert–Matagovy rovnice pak byla vypočtena závislost Stokesova posuvu na polarizabilitě rozpouštědla. Pro redukovanou formu NK-109 platí, že s rostoucí polaritou roste Stokesův posuv, což je typické pro  $\pi \rightarrow \pi^*$  přechod. Pro NK-109 při excitační/emisní vlnové délce 322–331,6/411,4–419 nm je typický  $n \rightarrow \pi^*$  přechod, tedy s rostoucí polarizabilitou se zmenšuje rozdíl mezi vlnovou délkou emise a excitace (Biler, 2011).

Demetylace může značně ovlivnit hodnotu  $pK_a$ . Z emisních spekter byla určena hodnota acido-bazické rovnovážné konstanty  $pK_a = 9,88$  pro NK-109 a z absorpčních spekter byla pro redukovanou formu NK-109 určena hodnoty  $pK_a = 6,16$  (Biler, 2011).

### **3.3. Biologická a fyziologická aktivita alkaloidů**

Biologická aktivita kvartérních alkaloidů je výsledkem působení alkaloidu na různé cíle uvnitř buňky. Mezi hlavní cíle můžeme zařadit RNA, DNA, proteiny, enzymy, které se nachází např. v procesech jako je replikace, oprava DNA (topoisomerasy, polymerasy). Mezi hlavní biologické aktivity patří protirakovinný účinek, antimikrobiální a protizánětlivý účinek, vyvolání apoptosy, antiplakový účinek, antioxidantní účinky a další (Maiti M., Kumar G. S., 2007), (Deroussent A. a kol., 2010).

Hojně jsou tyto látky využívány v běžně dostupných produktech, např. Santoin, Sangrovit či Fungicit Qwel<sup>TM</sup>. Zubní pasta a ústní voda Santoin je používána pro svůj antimikrobiální a protizánětlivý účinek schopný neutralizovat sирné látky (Walmart Santoin zubní pasta 100 ml proti paradentóze). Sangrovit je využíván jako krmné



aditivum pro hospodářská zvířata zvyšující účinnost trávicích enzymů s antibakteriálním účinkem. Chelerytrin (CHE) a sanguinarin (SG) také nacházejí uplatnění v boji proti rostlinným i živočišným škůdcům jako biopesticidy. (Zdařilová A. a kol., 2006).

SG a CHE pronikají do buněčné membrány ve formě nepolární nenabitě neutrální pseudobáze. Interakce těchto molekul s organelami a jinými vnitrobuněčnými cíly v buňce závisí na propustnosti a na distribuci uvnitř (Belyaeva T. a kol, 2003). Tyto alkaloidy mají nemalý význam při apoptotických procesech, kde hraje hlavní roli kaspasový systém. Pokud kaspasa není aktivní, existuje ve formě pro-kaspasy. Ta obsahuje část, která je udržuje v neaktivní formě a která se při jejich aktivaci odštěpí (Lawen A., 2003). SG je schopen aktivovat enzym kaspasu a indukovat apoptosu třemi různými způsoby (Malíková J. a kol, 2006), (Zdařilová A. a kol., 2006):

- 1) regulace jaderného transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který reguluje expresi velké skupiny genů zahrnutých do regulace apoptosy
- 2) pozastavení buněčného cyklu v G1 fázi
- 3) působení na mitochondrie a uvolnění cytochromu *c*, což má za následek aktivaci pro-kaspasy

KBA také ovlivňují topoizomerasy. Topoizomerasy jsou jaderné enzymy, které hrají roli při topologii DNA. Topoizomerasa I (Topo I) mění stupeň rozvíjení DNA tím, že dělá zlomy v jednom řetězci, po kterém následuje ligace. Topoizomerasa II (Topo II) naopak dělá dočasné přerušení obou vláken dvojité šroubovice následované opět ligací. (Alberts B. a kol., 2007). V nedávné době byly objeveny další dvě topoizomerasy. Topo III se podílí na regulaci rekombinace a Topo IV hraje roli při segregaci nově vzniklých replikovaných chromosomů (Maiti M., Kumar G. S., 2010).

Studovaný alkaloid NK-109 má široké uplatnění v léčbě rakovinných buněk. Vykazuje dokonce protirakovinné účinky proti lidským rakovinným liniím, které jsou resistantní k jiným chemoterapeutikům. Při experimentech *in vivo* prováděných na kultuře lidských rakovinných buněk (HeLa S3) se zjistilo, že aktivita této látky byla podobná jako pro nitidin a byla větší než pro jiné alkaloidy (CHE, SG, fagaridin, dihydro-NK-109). Aktivita ostatních alkaloidů byla nízká ve srovnání s NK-109, což

naznačuje, že amoniová oblast a 7-OH skupina jsou důležité pro protirakovinnou aktivitu. NK-109 také inhibuje topoizomerasu II. (Nakanishi T. a kol., 1999).

Experimenty s transplantovaným myším nádorem P-388 *in vivo* ukázaly, že SG a CHE jsou vysoce toxické a indukují buněčnou smrt při dávce 25 mg/kg. Naopak statisticky významná dávka pro NK-109 je 50 mg/kg a NK-109 je tedy o něco méně toxický ve srovnání s výše uvedenými alkaloidy. Při dávce 3x větší je sice pozorovatelné snížení váhy způsobené působením na trávicí systém, ale nakonec dojde k obnovení váhy (Nakanishi T. a kol., 1999).

### **3.4. Biotransformace alkaloidů**

SG a CHE jsou sekundární metabolity chránící rostlinu před patogenními mikroorganismy. Biotransformace je proces probíhající v buňkách organismů, během níž je přeměněna jedna látka na látku druhou. V první fázi biotransformace dochází k redukci, oxidaci a hydrolytické reakci za účasti reduktas a oxidas a dochází k demetylenaci a demetylaci. Těmito reakcemi vznikají dihydrometabolity a hydroxymetabolity, které jsou pak konjugací převedeny na konjugované metabolity. Ty jsou pak exkretovány z organismu ven (Ulrichová J., 2005).

Při biosyntéze KBA jsou výchozími aminokyselinami tyrosin a fenylalanin. Důležitými meziprodukty jsou pak protopin a dihydroderiváty, které jsou oxidovány benzo[c]fenantridinoxidasou na kvartérní soli (Zdařilová A. a kol., 2006).

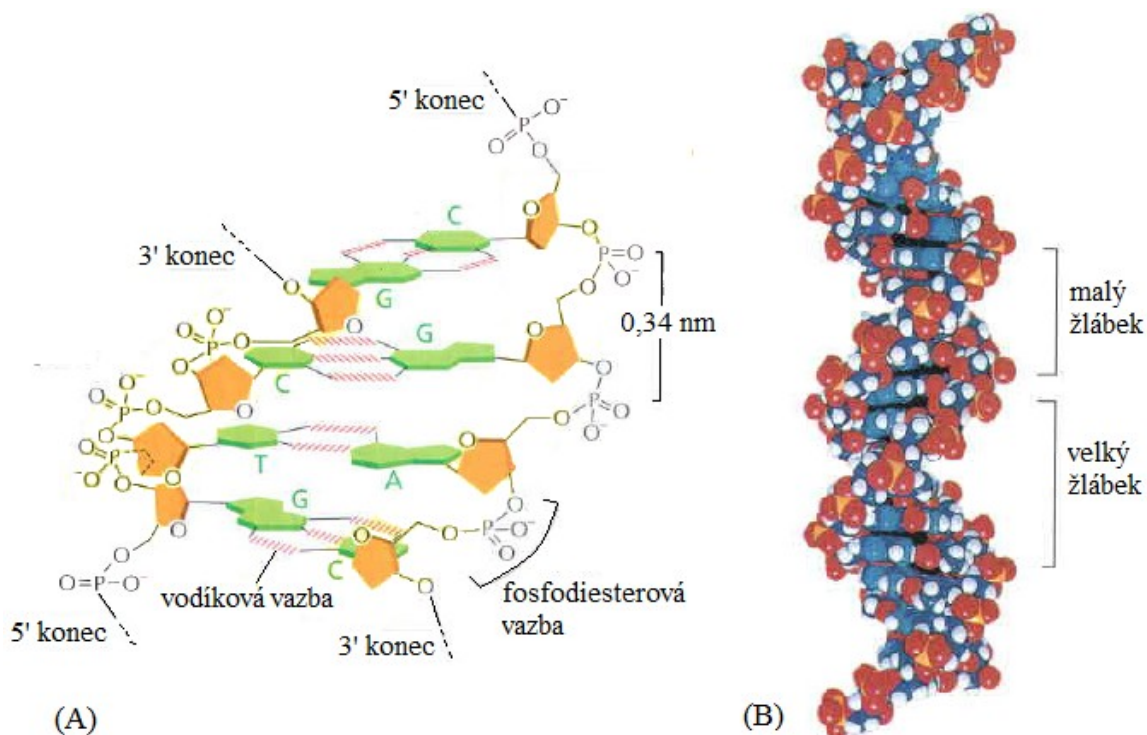
## 4. NUKLEOVÉ KYSELINY

Buňka uchovává svou dědičnou informaci v podobě dlouhých polymerních řetězců skládajících se z nukleotidů. Nukleotidy jsou obecně složeny z pětiuhlíkatého cukru, fosfátové skupiny a báze, kterou můžeme charakterizovat jako heterocyklickou sloučeninu obsahující mimo atomy uhlíku také atomy dusíku. Báze dělíme do dvou skupin. Jsou to purinová báze, kde řadíme adenin (A) a guanin (G) a pyrimidinová báze, kde patří uracil (U), cytosin (C) a thymin (T).

Báze je připojena k uhlíku prostřednictvím N-glykosidové vazby. Nukleotidy jsou pak spojeny fosfodiesterovou vazbou mezi 5' a 3' uhlíkem a dávají vzniku nukleové kyseliny (viz obr. 3).

Mezi nukleové kyseliny řadíme ribonukleovou kyseliny (RNA) obsahující báze A, G, C a U a deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), jejíž struktura byla poprvé publikována Watsonem a Crickem v roce 1953 a která obsahuje báze A, G, C a T.

(Alberts B. a kol, 2007)



**Obr. 3** – Modely DNA. A – prostorový model DNA (zelené molekuly – báze, oranžové molekuly – cukr); B – model DNA ukazující malý a velký žlábek (tmavě modrá – uhlík, světle modrá – dusík, bílá – vodík, červená kyslík, žlutá – fosfor). Upraveno podle Albertse B. a kol. (2007)

#### 4.1. Vlastnosti DNA

U eukaryotických organismů je DNA, jakožto nositelka genetické informace, uložena v chromozomech převážně v buněčném jádře. Jedná se o vláknitou makromolekulu, která se skládá ze dvou dlouhých lineárních řetězců složených ze čtyř typů nukleotidových podjednotek a vytváří tak dvoušroubovici, která je antiparalelní. Jednotlivé báze jsou spojeny vodíkovými můstky na základě komplementarity bází - dvě vodíkové vazby mezi A a T a tři vodíkové vazby mezi C a G (Alberts B. a kol, 2007).

Deoxyribóza se v nukleotidu vyskytuje v cyklické formě a na její 1' uhlík je připojena nukleová báze a 3' a 5' uhlíky jsou využity na vazbu s fosfátovou skupinou. Zbytek kyseliny fosforečné je důvodem toho, proč má DNA celkový náboj záporný.

DNA je dobře rozpustná ve vodě. Její stabilita závisí např. na typu rozpouštědla, na iontové síle, na teplotě, na obsahu GC a AT párů a dalších. Zvýšením teploty DNA denaturuje a vznikají jednovláknové řetězce. DNA absorbuje v UV oblasti s maximem absorpce při 260 nm (Neidle S., 2002). Může být replikována (za vzniku kopií molekul DNA), a nebo transkribována (za vzniku RNA řetězců). Jedná se o jedinou molekulu, jejíž narušení může být odstraněno pomocí opravných mechanismů.

## 4.2. Formy DNA

Rozlišujeme několik forem DNA. Mezi ty hlavní patří A-DNA, B-DNA a Z-DNA, jejichž základní charakteristiky můžeme vidět v Tabulce 2 (Alberts B. a kol, 2007), (Neidle S., 2002).

Tabulka 2 – Konformace DNA, pb – pár bází

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
vínutí šroubovice	pravotočivá	pravotočivá	levotočivá
počet pb na jeden závit (zvýšení na jeden závit)	11 (2,8 nm)	10,4 (3,4 nm)	12 (4,46 nm)
vzdálenost mezi dvěma pb	0,254 nm	0,338 nm	0,363 nm
malý žlábek šířka / hloubka	široký, velmi mělký 1,11 / 0,26 nm	úzký, hluboký 0,6 / 0,82 nm	velmi hluboký, úzký 0,2 / 1,38 nm
velký žlábek šířka / hloubka	hluboký, úzký 0,22 / 1,3 nm	široký, hluboký 1,16 / 0,85 nm	zploštělý na povrchu 0,88 / 0,37 nm
průměr	2,6 nm	2 nm	1,8 nm

B-DNA je přirozená forma DNA vyskytující se za fyziologických podmínek v buňce. Páry bází má téměř kolmo k ose šroubovice. Průměr B-DNA je 2 nm. Uvnitř šroubovice se nacházejí spárované báze, tzn. že báze jsou ve středu, následovány cukernými zbytky. Fosfátové skupiny jsou pak na periferii.

A-DNA se vyskytuje při nízké relativní vlhkosti. Roviny spárovaných bází jsou skloněny vzhledem k ose helixu. Báze jsou vytlačeny více k okraji a cukr-fosfátová páteř je na okraji. Její průměr je o 0,6 nm větší než B-DNA. Tato forma je nejkratší a nejširší.

Z-DNA je jako jediná forma DNA levotočivá. Je delší a tenčí než B-DNA. Báze jsou umístěny daleko od osy helixu. Cukr-fosfátová páteř je v nepravidelném zig-zag tvaru. Z-DNA je nejdelší a nejštíhlejší.

Malý a velký žlábek se u jednotlivých konformací DNA liší svou hloubkou a šířkou. U B-DNA se malý a velký žlábek liší především svou hloubkou. A-DNA má hluboký velký žlábek a mělký malý žlábek. Naopak Z-DNA má malý žlábek hluboký. Jednotlivé formy se také liší konformací glykosidové vazby a konformací cukerného zbytku (deoxyribózy).

(Alberts B. a kol, 2007), (Neidle S., 2002).

### **4.3. Vazba malých molekul na DNA**

Interakci malých molekul s DNA můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. Jsou to (Neidle S., 2008):

- 1) nekovalentní vazby, které jsou reversibilní. Především se jedná o elektrostatickou interakci mezi pozitivním nábojem molekuly a negativním záporným nábojem fosfátové skupiny DNA. Obvykle se rozlišuje mezi interkalací a vazbou do žlábků.
- 2) kovalentní interakce, které jsou ireversibilní. Můžeme zde zahrnout různé změny bází, alkylace, zlomy řetězce DNA vedoucí k mutacím.

### 4.3.1. Interkalace

Hypotéza interkalace byla vyslovena Leonardem Lermanem v 60. letech (Lerman L. S., 1961). Navrhnul, že planární molekuly s heteroaromatickým kruhem, který se vyskytuje u řady antibiotik, antibakteriálních látek a látek používaných proti rakovině, se vmezeří mezi dva sousední páry bází dvoušroubovice. Takovýto heteroaromatický kruh má obvykle 3 spojené šestičlenné kruhy, které mají přibližně stejnou velikost jako pár bází.

Interkalátory se klasifikují na klasické, které jsou planární a neklasické, které jsou méně studovány a které jsou co do své velikosti větší a nemusí být rovinné a aromatické. Molekuly, které mají větší tloušťku (např. steroidní hormony) a které jsou větší než pár bází (tzn. než 0,36 nm), nejsou schopny interkalace. Avšak DNA se může rozvinout díky rotaci fosfodiesterové vazby a díky změně konformace cukerného zbytku. Takto se vytvoří dutina a páry bází jsou separovány. Tvar a velikost dutiny je pak závislý na stupni rozvolnění. Maximální velikost rozvinutého místa pro interkalace je 0,8 nm (šířka) a 1,2 – 1,4 nm (délka). Potom i tyto neklasické interkalátory se mohou vmezeřit (Hendry L. B. a kol., 2007).

Interkalátory můžeme dále rozdělit na (Neidle S., 2002), (Neidle S., 2008):

- jednoduché; skládají se pouze z chromoforu, který se interkaluje a který často nese pozitivní náboj. Řadíme zde např. proflavin nebo etidium bromid (EtBr), který rozvolňuje DNA o 26°. EtBr je molekula, která se používá jako fluorescenční sonda pro detekci nukleových kyselin.
- složité; mohou se vázat na postranní řetězce, cukr nebo jednotky peptidů jako např. daunomycin
- interkalátory vázící se do velkého žlábků; jsou to látky, které interagují se skupinami umístěnými ve velkém žlábků DNA, např. komplex rhodia.
- bis-interkalátory, kde můžeme zařadit např. echinomycin a triostin. Tyto látky mají dva chromofory, které jsou schopny se simultánně interkalovat na dvě místa ve dvoušroubovicové DNA (dsDNA). Oba jsou spojené cyklickým oligopeptidem. Umožňují vazbu o větší vazebné síle k DNA a zvětšují specifičnost vazby. Ve srovnání s mono-interkalátory více rozvíjejí helix.

DNA interkalátory se využívají v chemoterapeutické léčbě. Strukturální modifikace mohou vést k funkčním změnám, často inhibují DNA replikaci a transkripci.

#### **4.3.2. Molekuly vážící se do žlábků**

Malé molekuly, které se neinterkalují do DNA, se mohou vázat do malého žlábků. Tyto látky se váží k molekule DNA s přibližně stejnou afinitou jako interkalátory, ale na rozdíl od nich neruší strukturu DNA. Mohou působit jako blokátory transkripce nebo jako inhibitory enzymů DNA topoizomeras. Topoisomerasa I (Topo I) a topoisomerasa II (Topo II) jsou enzymy, které mění topologii struktury DNA. Topo I dělá zlomy na jednom řetězci a Topo II dělá zlomy na obou řetězcích duplexu (Alberts B. a kol, 2007).

Obecně mají tyto látky jeden nebo více pozitivních nábojů, obsahují aromatický kruh, v 3D struktuře mají většinou zakřivenou strukturu do tvaru půlměsíce a mají donorovou vodíkovou vazbu. Obsahují heteroaromatické kruhy. Můžeme zde zařadit např. netropsin, distamycin, které se přednostně váží do malého žlábků na A-T sekvence s rozdílnou stechiometrií vazby (Wemmer D. E., Dervan P. B., 1997).



## 5. INTERAKCE ALKALOIDŮ S BIOMOLEKULAMI

### 5.1. Interakce sanguinarinu s proteiny

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa je transmembránový protein zodpovědný za transport  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iontů přes plasmatickou membránu. Energie potřebná pro tento proces je získávána hydrolýzou ATP. Transport iontů probíhá na základě změny konformace mezi dvěma stavy. Konformaci E2 je zaujímana při vysoké koncentraci draslíku (tzn. že má nízkou afinitu pro ATP a vysokou pro  $\text{K}^+$ ) a konformace E1 je typická pro vysokou koncentraci sodíku. Byla zkoumána interakce sanguinarinu (nabité i neutrální formy) s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasou (Janovská<sup>1</sup> M. a kol., 2010), přičemž můžeme pozorovat různá fluorescenční spektra v závislosti na vodném či aprotickém prostředí. Vodné prostředí simuluje interakci na povrchu proteinu, aprotické simuluje naopak interakci ve vazebné kapse proteinu. Výsledky ukázaly, že enzym v konformaci E1 je schopný na sebe vázat jak nabitou tak i neutrální formu SG, zatímco enzym v konformaci E2 může navázat pouze nabitou formu SG. Pomocí zhášení fluorescence bylo dále zjištěno, že vazebné místo na E1 je umístěno na povrchu enzymu pro obě formy, ale vazebné místo na E2 je od solventu chráněno. Dihydrosanguinarin (DHSG) nevykazuje žádnou interakci s pumpou (Janovská<sup>2</sup> M. a kol., 2010).

Jiná publikace se zabývala interakcí SG s hovězím sérovým albuminem (BSA). BSA je globulární multifunkční transportní protein, který je zastoupen v krevní plasmě a který je složen ze tří strukturně si podobných jednotek (I, II, III) a každá se pak skládá ze dvou poddomén (A, B). Ze zhášení fluorescence bylo zjištěno, že nabitá i neutrální forma SG tvoří silný komplex s BSA, přičemž neutrální forma má vyšší afinitu k BSA ve srovnání s nabitou iminiovou formou. (Hossain M. a kol., 2011).

Další studie se zabývaly výzkumem, na jaký motiv aminokyselinové sekvence daného peptidu se NK-109 navazuje. Bylo zjištěno, že vazebný motiv pro tento alkaloid je PNxxxxP (P – prolin, N – asparagin, x – jakákoliv aminokyselina) (Morohashi K. a kol., 2005).

## 5.2. Interakce benzo[c]fenanthridinových alkaloidů s DNA

Pro zkoumání interakcí alkaloidů s DNA můžeme využít řady metod. Mezi ty základní patří např. cyklická polarografie, polarizační měření (Junfen Li a kol., 2012), kalorimetrické metody – isotermální titrační kalorimetrie, diferenční skenovací kalorimetrie (Hossain M., Kumar G. S., 2010), spektroskopie cirkulárního dichroismu, absorpční a fluorescenční spektroskopie (Hossain M. a kol., 2011), kapalná chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Psotová J. a kol., 2006) a další. V této práci se věnujeme zejména dvěma z uvedených metod a to absorpční spektroskopii a fluorescenční spektroskopii. Ve spektrech můžeme pozorovat tyto změny:

- hyperchromní efekt – zvýšení intenzity absorpce
- hypochromní efekt – snížení intenzity absorpce
- hypsochromní posun – posun spektra do modra (ke kratším vlnovým délkám)
- bathochromní posun – posun spektra do červena (k delším vlnovým délkám) (Valeur B., 2002)

Malé látky mohou interagovat s biomolekulami různými způsoby. Nejčastějšími způsoby jsou kovalentní a nekovalentní interakce (viz kapitola 4.3.).

Cílem zkoumání interakce alkaloidů s DNA je porozumět těmto dějům na molekulární úrovni a zdokonalit a zefektivnit chemoterapeutickou léčbu, aby měla vyšší účinností a menší toxicitou a aby byla zacílena na specifické místo/sekvenci DNA.

### 5.2.1. Interakce DNA s chelerytrinem a sanguinarinem

Při interakci chelerytrinu nebo sanguinarinu s jednořetězcovou DNA (ssDNA) nedochází k žádným významným změnám a tudíž nedochází k interkalaci (Junfen Li a kol., 2012), jako tomu je u dvouřetězcové DNA.

Oba alkaloidy, chelerytrin i sanguinarin, tvoří stabilní komplex s DNA z telecího brzlíku (ctDNA). Byla proměřena fluorescenční spektra těchto alkaloidů při pH 5,40, kde se zjistilo, že při vazbě CHE na DNA se fluorescence zvyšuje, kdežto při stejné interakci se SG je fluorescence zhasena. Afinita CHE k DNA je asi 3x slabší než afinita

SG k DNA. Může to být způsobeno skutečností, že SG má více planární strukturu než CHE a proto je umožněna silnější vazba na ctDNA. Interakce probíhá mechanismem interkalace, přičemž CHE interkaluje do C, D kruhu, zatímco SG interkaluje do A, B kruhu (viz obr. 1). Stechiometrie je pro oba alkaloidy stejná a to 5 nukleotidů na jednu molekulu SG nebo CHE (Junfen Li a kol., 2012).

Při studiu absorpčních spekter komplexu DNA s nabitou formou SG byl pozorován batochromní posun. Při stejné interakci s nenabitou formou SG nebyly pozorovány žádné významné změny. Při velkých koncentracích DNA byla pozorována změna nenabité formy na formu iminiovou. Tento jev je vysvětlován jako posun rovnováhy (Li-Ping Bai a kol., 2006). Tzn. že schopnost interkalovat vykazuje pouze kvartérní forma SG, zatímco pseudobáze tuto vlastnost nevykazuje, protože tato struktura není zcela planární. (Sen A., Maiti M., 1994)

SG způsobuje při interakci s DNA její rozvíjení o úhel  $27^\circ$  (Maiti M., Kumar G. S., 2010). Iminiová forma SG se váže k DNA interkalací s vyšší afinitou na sekvence bohaté na GC páry (Nandi R., Maiti M., 1985).

### **5.2.2. Interakce DNA s nitidinem**

Nitidin (NI) je další alkaloid patřící do skupiny KBA. Využívá se v boji proti leukémii a způsobuje inhibici topoizomerasy I a topoizomerasy II. Stejně jako CHE je i NI cytotoxický, vykazuje protirakovinný účinek a s DNA interaguje prostřednictvím interkalace. Fluorescenční měření ukázala, že po navázání nitidinu na DNA je fluorescence zhasena. Obdobně jako CHE a SG, tak i NI se preferenčně váže na sekvence bohaté na GC páry. Největší preferenci ke GC párům má SG, pak CHE a pak NI (Li-Ping Bai, 2006).

## 6. MATERIÁL A METODY

### 6.1. Chemikálie

Alkaloid NK-109 (1-hydroxy-2-methoxy-12-methyl-[1,3]dioxolo [4',5':4,5]benzo[1,2-c]phenantridin-12-ium chloride) a dvouvláknová DNA z telecího brzlíku byly získány z Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Redukovaná forma NK-109 (2-methoxy-12-methyl-12,13-dihydro-[1,3]dioxolo[4',5':4,5] benzo[1,2-c]phenantridin-1-ol) byla připravena reakcí NK-109 s NaBH<sub>4</sub> v poměru 2:1 (w/w). Zásobní roztoky alkaloidů byly připraveny o koncentraci 1 mM, resp. 100 μM, a byly nejdříve připraveny rozpuštěním v metanolu (Lachner), pak v destilované vodě. Zásobní roztok DNA byl připraven o koncentraci 10 μg/μl.

V experimentech jsme používali Tris pufr (Fluka) o koncentraci 20 mM a hodnotě pH 7,41, HCl (Lachner), NaCl (Lachema) o celkové koncentraci v kyvetě 20 mM, dále kyselinu ethylendiamintetraoctovou – EDTA (Fluka) o koncentraci roztoku v kyvetě 1 mM a tetrahydrofuran (Fluka), dioxan (Lachema), etanol a isopropanol (Lachner).

### 6.2. Vazba alkaloidů na DNA

Experimenty jsme prováděli pro 4 různé koncentrace DNA. Pro NK-109 byly celkové koncentrace DNA v kyvetě 0; 0,13; 0,25 a 0,37 μg/μl, pro redukovanou formu NK-109 byly celkové koncentrace 0; 0,02; 0,05 a 0,07 μg/μl. Měření pro nenulové koncentrace DNA jsme 3x opakovali.

Spektra byla dále proměřována pro 15 různých koncentrací NK-109. Výsledná koncentrace tohoto alkaloidu v kyvetě se pohybovala od 2 – 100 μM. Pro redukovanou formu NK-109 byla spektra měřena pro 9 – 13 různých koncentrací alkaloidu (dle použité koncentrace DNA) o výsledné koncentraci alkaloidu v kyvetě od 1 – 22 μM.

Po každém přidavku alkaloidu k roztoku pufru s DNA jsme daný roztok inkubovali při 37 °C po 7 min. Pro přesné stanovení celkové koncentrace alkaloidu v kyvetě, jsme

po každém přidavku alkaloidu a po každé inkubaci provedli zvážení na laboratorních vahách (A&D Company, Limited, Japan; přesnost 0,1 mg).

### **6.2.1. Hledání vhodného rozpouštědla**

Po zjištění, že metanol, jakožto rozpouštědlo, ve kterém se dané alkaloidy rozpouští, není vhodné, bylo zapotřebí najít jiného rozpouštědla. Po smíchání dané chemikálie s alkaloidem (v případě nerozpuštění alkaloidu), bylo rozpouštědlo odpařeno Ar (resp. He) proudem vzduchu při zvýšené teplotě (40 – 50 °C).

### **6.2.2. Měření absorbance**

Měření absorpčních spekter bylo prováděno na spektrofotometru Specord 250 Plus (Analytik Jena, Germany). Pro oba alkaloidy byla spektra proměřována pro vlnové délky 300 – 600 nm. Rychlost skenování byla zvolena na 1 nm/s. Data byla měřena s krokem 1 nm. Šířka spektrálního pásu byla pro všechna měření 1 nm. Optická dráha v kyvetě byla 0,4 cm pro NK-109 a 1 cm pro redukovanou formu NK-109. Pozadí bylo měřeno pro čistý pufr (bez alkaloidu), resp. pro pufr s DNA (opět bez alkaloidu).

### **6.2.3. Excitační a emisní spektra**

Excitační a emisní spektra byla proměřována na spektrofluorometru F4500 (Hitachi, Japan) pro redukovanou formu NK-109. Rychlost skenování byla zvolena na 240 nm/min se šířkou excitačních a emisních štěrbin 10 nm. Emisní spektrum redukované formy NK-109 s pufrem, resp. s pufrem a DNA, bylo měřeno pro vlnovou délku excitace 325 nm. Excitační spektra byla měřena pro vlnovou délku emise 450 nm. Pro uvedené vlnové délky emise a excitace bylo proměřeno také pozadí čistého pufru, resp. pufru s DNA, a následně bylo toto pozadí od spektra roztoků alkaloidu odečteno.

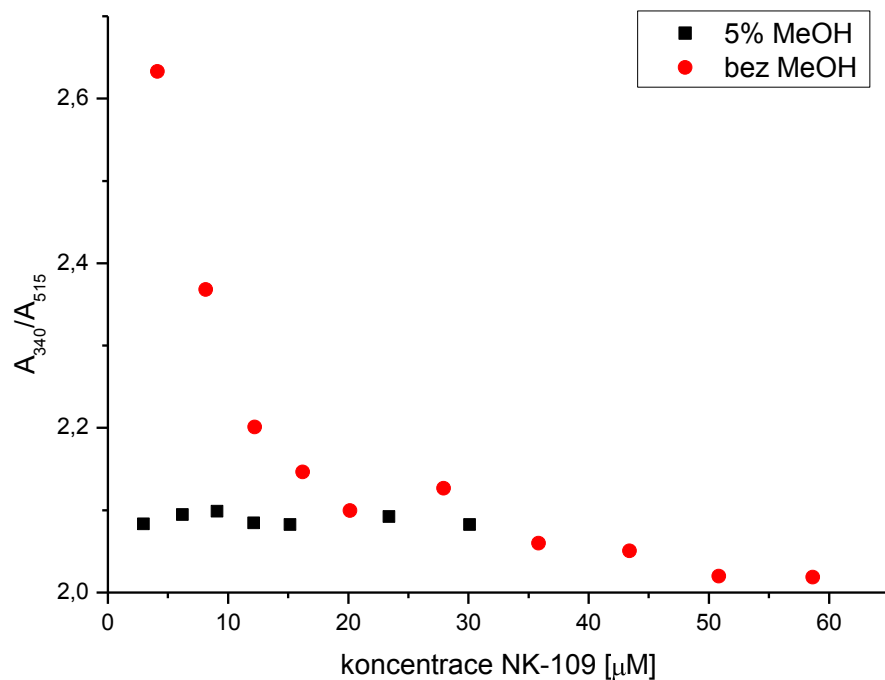
## 7. VÝSLEDKY

Prvotní experimenty ukázaly, že neredukovanou formu NK-109 bude vhodnější studovat pomocí absorpční spektroskopie, zatímco pro studium redukované formy bude lepší využití fluorescenční spektroskopie. Níže uvedené výsledky, které prokázaly specifickou interakci obou forem s metanolem, však vedly k tomu, že jsme také redukovanou formu studovali pouze pomocí absorpční spektroskopie.

### 7.1. Interakce NK-109 s metanolem

Alkaloid NK-109 byl rozpuštěn v metanolu a byla proměřena jeho absorpční spektra bez přídavku DNA pro různé koncentrace alkaloidu. Pro spektrum byly charakteristické dva absorpční pásy při vlnových délkách 340 nm a 515 nm. Jejich podíl můžeme sledovat na obr. 4 (červené body). Jelikož v pufru není DNA, ale jen sledovaný alkaloid, předpokládáme konstantní hodnotu. Avšak dosažený výsledek vykazuje systematický pokles.

Po přídavku 5% metanolu do pufru a po opětovném proměření absorpčních spekter uvedený pokles nepozorujeme (viz obr. 4, černé body). Proto můžeme usuzovat, že NK-109 specificky interaguje s metanolem, resp. dochází ke specifické interakci mezi molekulami alkaloidu a OH-skupinou metanolu, a proto je nutné zvolit jiné rozpouštědlo, ve kterém bychom NK-109 rozpustili.



Obr. 4 – Závislost podílů absorbancí na koncentraci NK-109.  $A_{340}/A_{515}$  – podíl absorbancí při vlnových délkách 340 a 515 nm

## 7.2. Rozpuštěnost v rozpouštědlech

NK-109 není rozpustný v těchto rozpouštědlech:

- tetrahydrofuran (THF)
- dioxan
- isopropanol

NK-109 je rozpustný v:

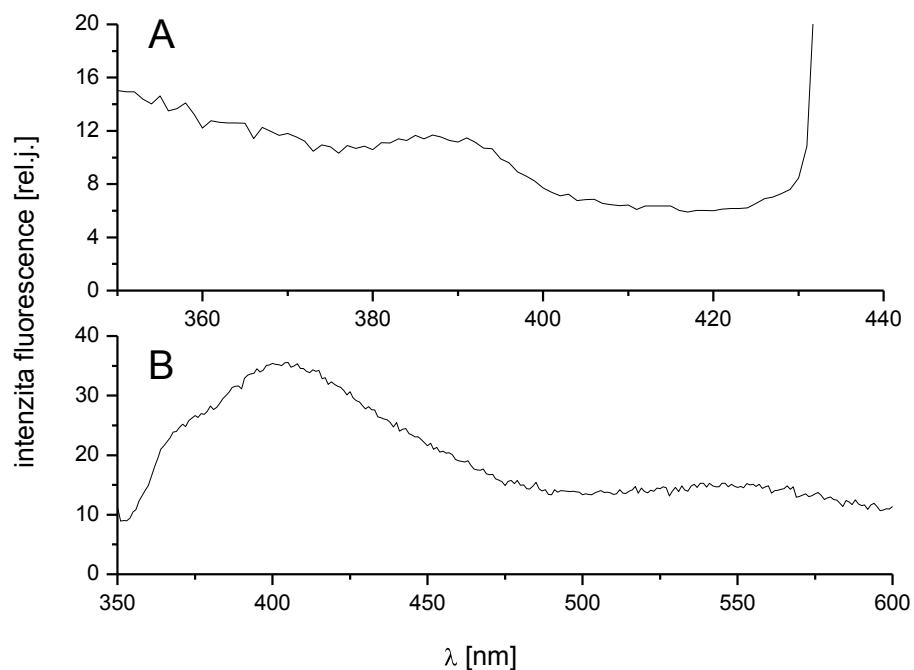
- metanolu
- etanolu
- destilované vodě ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Kvůli specifickým interakcím s OH-skupinou (metanol, etanol) nemůžeme měření v těchto rozpouštědlech realizovat. Všechna měření jsme proto prováděli s alkaloidem rozpuštěným v destilované vodě.

Neredukovaná forma NK-109 byla rozpuštěna přímo v  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 7.3. Závislost fluorescence redukované formy na přítomnosti metanolu

Po rozpuštění alkaloidu NK-109 v destilované vodě a po reakci s  $\text{NaBH}_4$  za vzniku redukované formy jsme proměřili excitační a emisní spektrum. Alkaloid nevykazoval fluorescenci. Po přidavku DNA stále roztok fluorescenci nevykazoval. Avšak pokud jsme k tomuto roztoku přidali metanol, fluorescence již byla patrná (viz. Obr. 5).



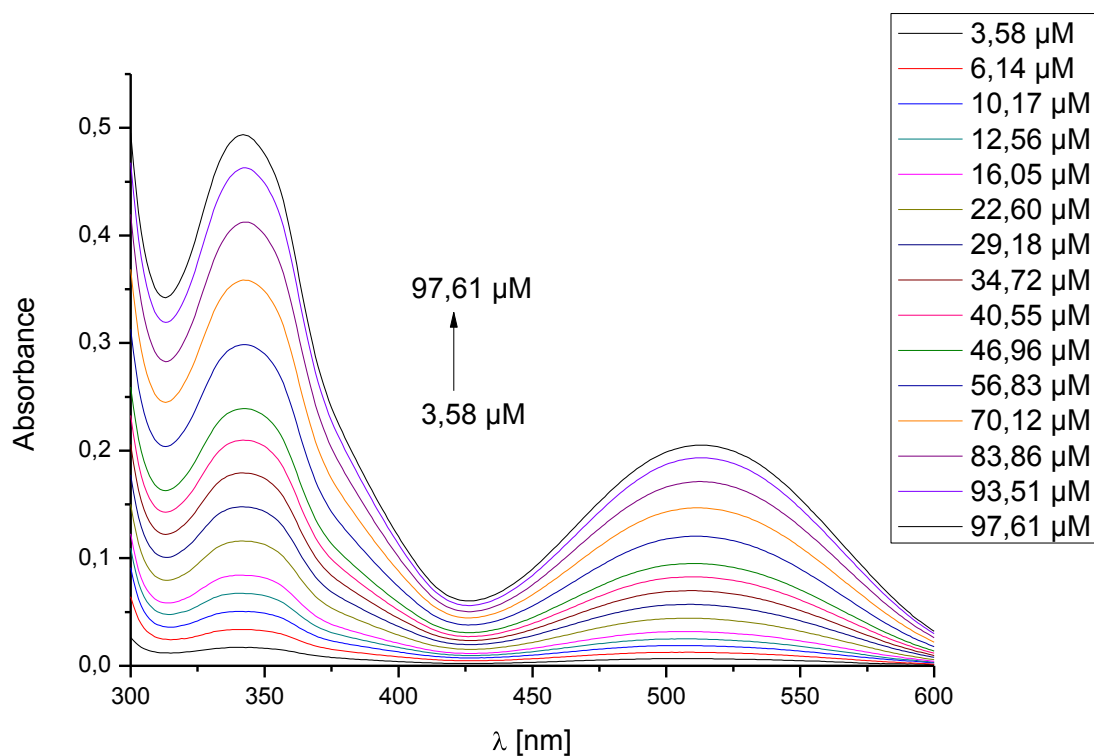
Obr. 5 – Excitační (A) a emisní (B) spektra pro redukovanou formu NK-109,  $\lambda$  – vlnová délka



#### 7.4. Absorpční spektra – NK-109

Byla proměřena absorpční spektra alkaloidu NK-109 se čtyřmi různými koncentracemi DNA – 0; 0,13; 0,25 a 0,37  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Tvar charakteristického spektra pro 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA s postupným titrováním alkaloidu NK-109 od 3,58 do 97,61  $\mu\text{M}$  můžeme sledovat na obr. 6. Můžeme pozorovat, že se zvyšující se koncentrací DNA v roztoku, hodnoty absorbancí klesají ve srovnání se spektry naměřené pro 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA a rozdíl mezi spektry bez DNA a s DNA se zvětšuje.

Na obr. 7 je ukázána závislost hodnot absorbancí pro 340 nm a 515 nm pro všechny naměřené koncentrace DNA. Regresní rovnice pro spektra bez DNA pro 340 nm má tvar  $y = 0,0046x + 0,03$  s korelačním koeficientem  $r = 0,998$ , pro 515 nm má regresní rovnice tvar  $y = 0,0024x + 0,016$  s korelačním koeficientem  $r = 0,998$ .



Obr. 6 – Charakteristická spektra alkaloidu NK-109 pro 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA,  $\lambda$  – vlnová délka

Pro lepší názornost a zjištění stavu nasycení, tedy stavu, kdy jsou všechna vazebná místa na DNA obsazena molekulami alkaloidu a kdy už nedochází k dalšímu navazování, odečteme spektrum pro 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA se spektrem pro 0,13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA (resp. 0,25 a 0,37  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA). Na obr. 8 a 9 jsou ukázány zprůměrované hodnoty s odchylkami všech tří opakování, ze kterých můžeme odečíst, že stav nasycení je pro jednotlivé koncentrace DNA následující:

pro 340 nm: - 28  $\mu\text{M}$  (pro 0,13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)

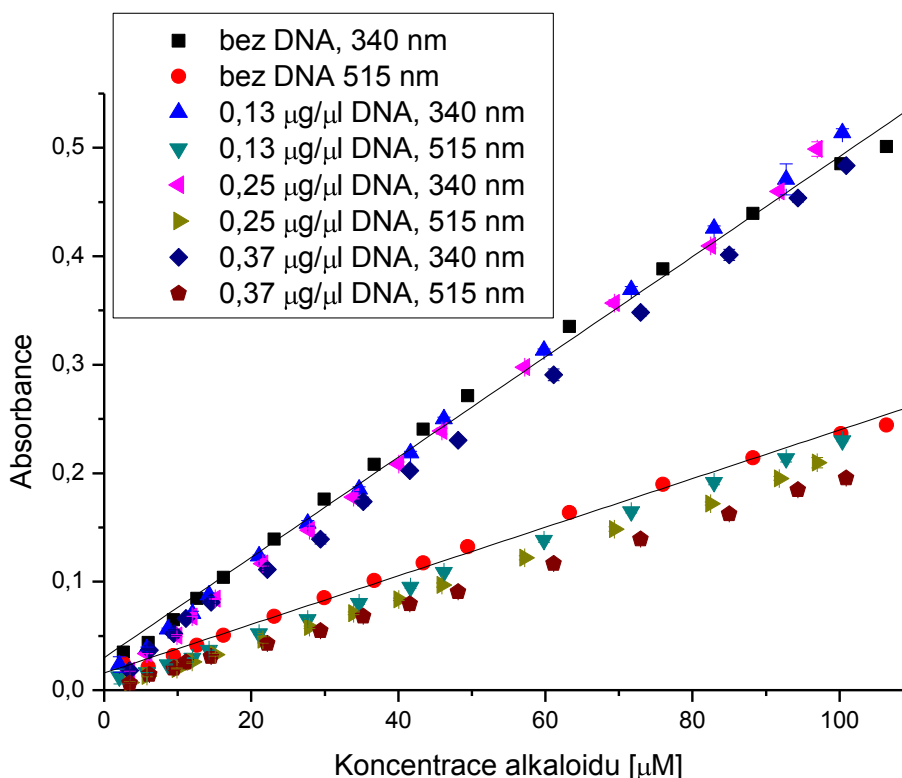
- 50  $\mu\text{M}$  (pro 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)

- 60  $\mu\text{M}$  (pro 0,37  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)

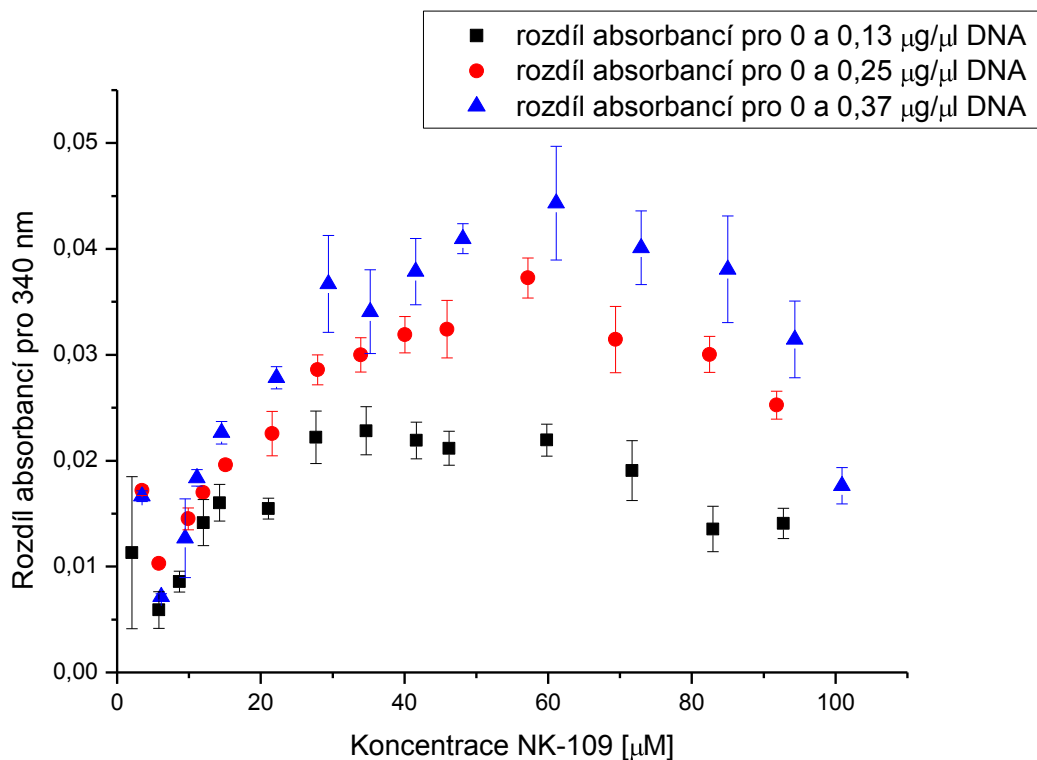
pro 515 nm: - 28  $\mu\text{M}$  (pro 0,13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)

- 57  $\mu\text{M}$  (pro 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)

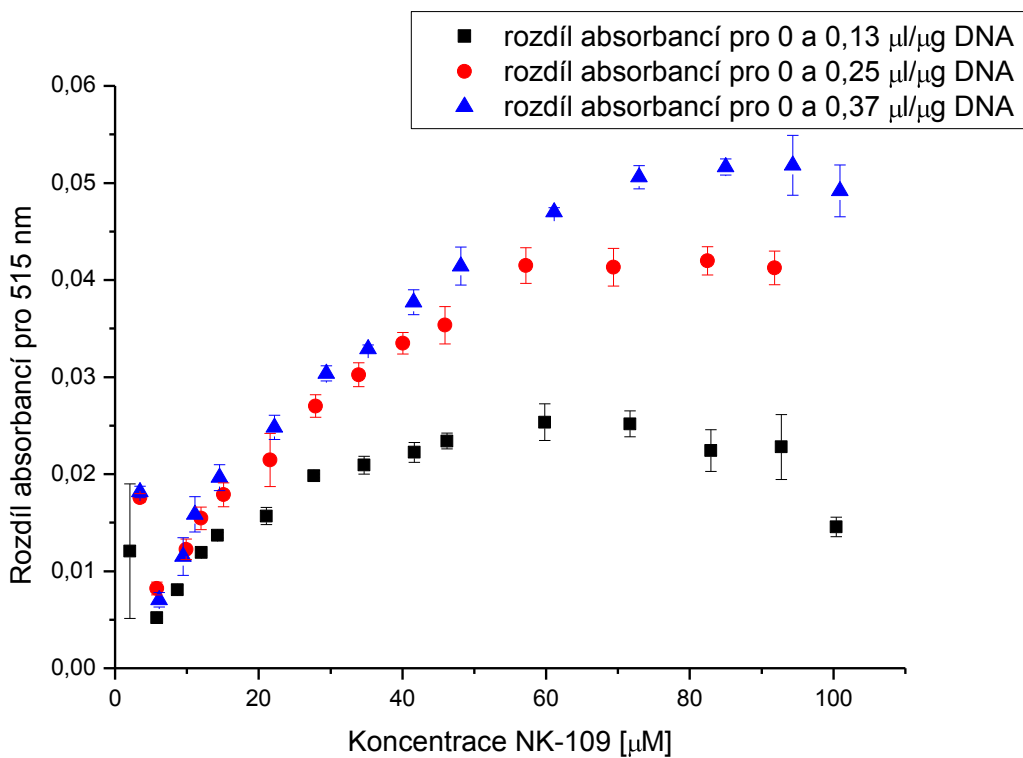
- 73  $\mu\text{M}$  (pro 0,37  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)



Obr. 7 – Závislost absorbance na vlnové délce pro 340 nm (body výše) a 515 nm (body níže) pro všechny koncentrace DNA



Obr. 8 – Závislost rozdílu absorbancí při 340 nm na vlnové délce



Obr. 9 – Závislost rozdílu absorbancí při 515 nm na vlnové délce

Využitím těchto hodnot a na základě znalosti celkového objemu v kyvetě můžeme spočítat látkové množství navázaného stavu na 1 µg DNA využitím vzorce

$$n = \frac{c \cdot V}{M} \quad (1)$$

kde  $n$  je látkové množství,  $c$  koncentrace a  $V$  objem.

pro 340 nm:

- pro 0,13 µg/µl DNA: 22120 pmol na 100 µg DNA » 221,2 pmol na 1 µg DNA

- pro 0,25 µg/µl DNA: 39500 pmol na 200 µg DNA » 197,5 pmol na 1 µg DNA

- pro 0,37 µg/µl DNA: 47400 pmol na 300 µg DNA » 158 pmol na 1 µg DNA

pro 515 nm:

- pro 0,13 µg/µl DNA: 22120 pmol na 100 µg DNA » 221,2 pmol na 1 µg DNA

- pro 0,25 µg/µl DNA: 45030 pmol na 200 µg DNA » 225,2 pmol na 1 µg DNA

- pro 0,37 µg/µl DNA: 57670 pmol na 300 µg DNA » 192,2 pmol na 1 µg DNA

Vyskot uvádí ve svém Přehledu vývojové biologie a genetiky (1999), že 1 pg DNA odpovídá přibližně  $10^9$  párů bází. O něco přesnější hodnotu pak udává J. Doležel (2003) a to 1 pg DNA = 978 Mbp.

Pokud hodnoty v molech převedeme na počet molekul tím, že je vynásobíme Avogadrovou konstantou a následně získané hodnoty dáme do souvislosti s hodnotou od Doležela (2003), dostaneme hodnotu odpovídající, na kolik párů bází se navazuje jedna molekula alkaloidu:

pro 340 nm: - 7,34 (pro 0,13 µg/µl DNA)

- 8,22 (pro 0,25 µg/µl DNA)

- 10,28 (pro 0,37 µg/µl DNA)

pro 515 nm: - 7,34 (pro 0,13 µg/µl DNA)

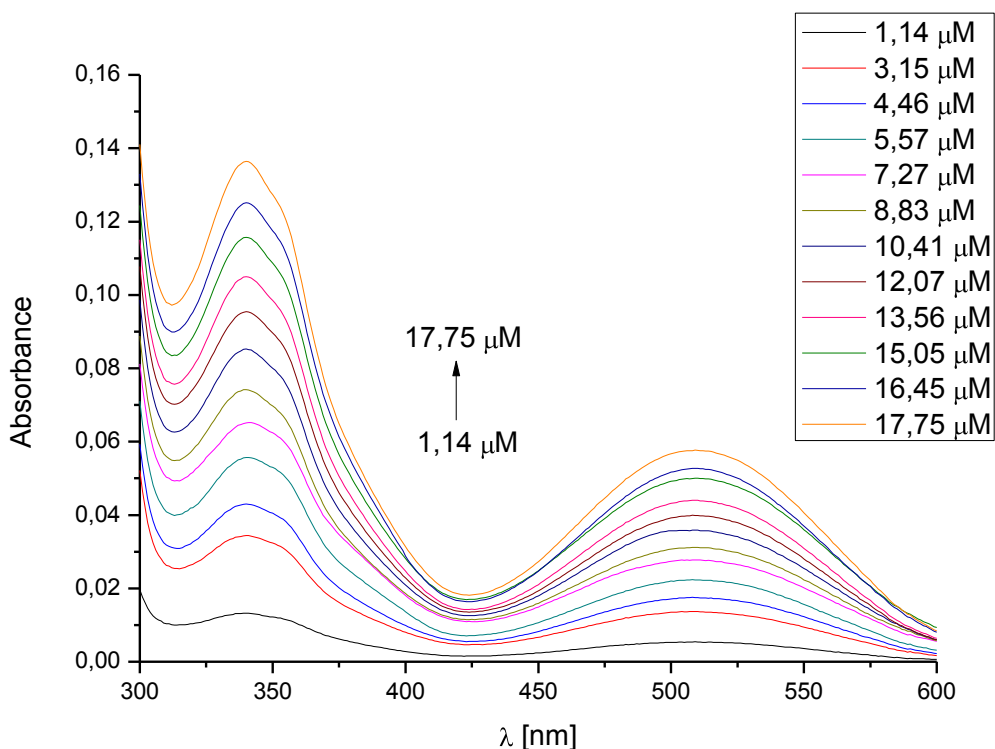
- 7,21 (pro 0,25 µg/µl DNA)

- 8,45 (pro 0,37 µg/µl DNA)

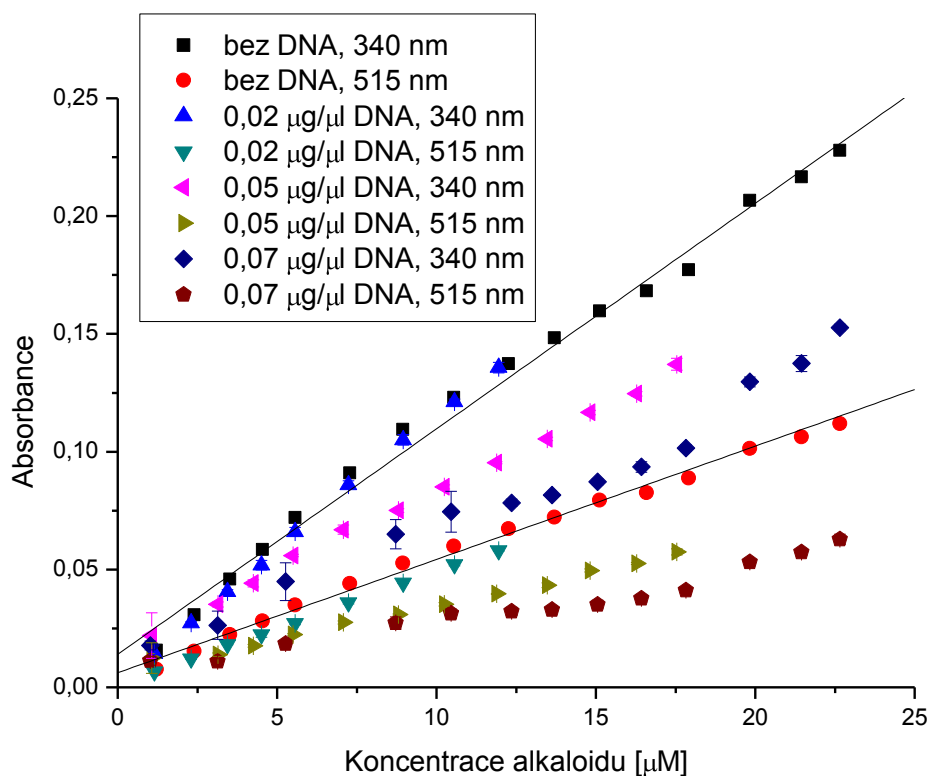
Zprůměrováním všech hodnot pak získáme  $8 \pm 1$ , což je číslo reprezentující stechiometrii vazby alkaloidu na DNA, tedy počet párů bází, na kolik se navazuje jedna molekula alkaloidu.

### 7.5. Absorpční spektra – redukováná forma NK-109

Byla proměřena absorpční spektra redukováné formy alkaloidu NK-109 se čtyřmi různými koncentracemi DNA – 0; 0,02; 0,05 a 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA. Tvar charakteristického spektra pro 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA s postupným titrováním redukováné formy alkaloidu NK-109 od 1,14 do 17,75  $\mu\text{M}$  můžeme sledovat na obr. 10. Obdobně jak tomu bylo u předešlého alkaloidu, i tady můžeme pozorovat pokles hodnot absorbancí se zvyšující se koncentrací DNA v roztoku.



Obr. 10 – Charakteristická spektra redukováné formy alkaloidu NK-109 pro 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA,  $\lambda$  – vlnová délka



Obr. 11 – Závislost absorbance na vlnové délce pro 340 nm (4 křivky umístěné výše) a 515 nm (4 křivky umístěné níže) pro všechny koncentrace DNA pro redukovanou formu NK-109

Na obr. 11 je ukázána závislost hodnot absorbancí pro 340 nm a 515 nm pro všechny naměřené koncentrace DNA. Regresní rovnice pro spektra bez DNA pro 340 nm má tvar  $y = 0,0096x + 0,014$  s korelačním koeficientem  $r = 0,992$ , pro 515 nm má regresní rovnice tvar  $y = 0,0048x + 0,006$  s korelačním koeficientem  $r = 0,994$ .

Zprůměrované hodnoty všech tří opakování můžeme pozorovat na obr. 12 a 13, ze kterých odečteme stav nasycení, obdobně jako jsme to udělali pro neredukovanou formu alkaloidu NK-109. Stav nasycení je pro jednotlivé koncentrace DNA následující:

- pro 340 nm: - 4,5 µM (pro 0,02 µg/µl DNA)  
 - 11,88 µM (pro 0,05 µg/µl DNA)  
 - 16,3 µM (pro 0,07 µg/µl DNA)

- pro 515 nm: - 5,5  $\mu\text{M}$  (pro 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)  
 - 11,88  $\mu\text{M}$  (pro 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)  
 - 17,8  $\mu\text{M}$  (pro 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA)

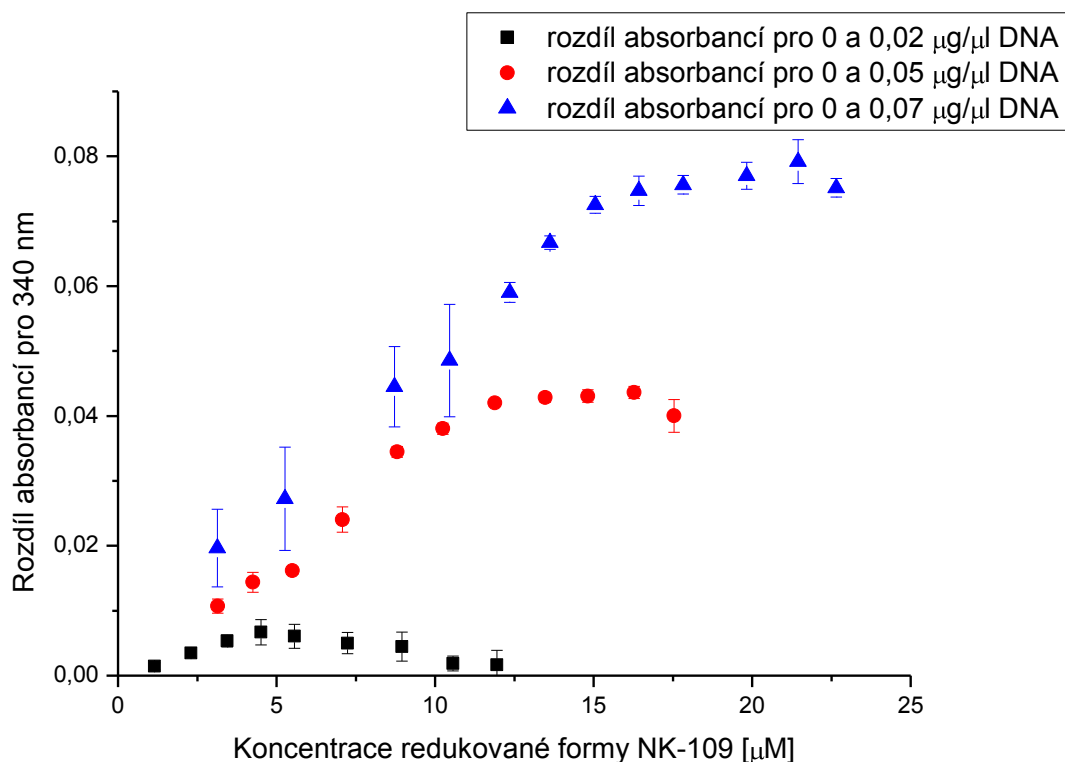
Využitím vztahu (1) vypočteme látkové množství navázaného stavu na 1  $\mu\text{g}$  DNA:

pro 340 nm:

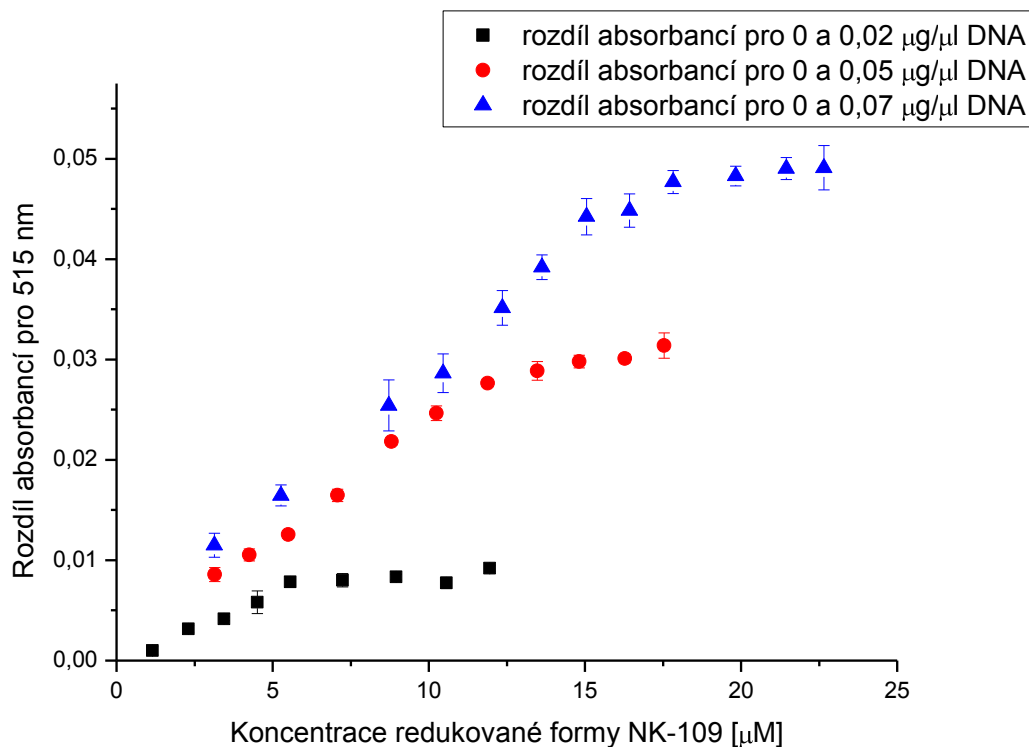
- pro 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA: 2790 pmol na 15  $\mu\text{g}$  DNA » 186 pmol na 1  $\mu\text{g}$  DNA
- pro 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA: 7365,6 pmol na 30  $\mu\text{g}$  DNA » 245,5 pmol na 1  $\mu\text{g}$  DNA
- pro 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA: 10106 pmol na 45  $\mu\text{g}$  DNA » 224,6 pmol na 1  $\mu\text{g}$  DNA

pro 515 nm:

- pro 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA: 3410 pmol na 15  $\mu\text{g}$  DNA » 227,3 pmol na 1  $\mu\text{g}$  DNA
- pro 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA: 7365,6 pmol na 30  $\mu\text{g}$  DNA » 245,5 pmol na 1  $\mu\text{g}$  DNA
- pro 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA: 11036 pmol na 45  $\mu\text{g}$  DNA » 245,2 pmol na 1  $\mu\text{g}$  DNA



Obr. 12 – Závislost rozdílů absorbančí při 340 nm na vlnové délce pro redukovanou formu NK-109



Obr. 13 – Závislost rozdílů absorbancí při 515 nm na vlnové délce pro redukovanou formu NK-109

Po převedení těchto hodnot na počet molekul a porovnáním s hodnotou od Doležela (2003), dostáváme:

pro 340 nm: - 8,73 (pro 0,02 µg/µl DNA)

- 6,62 (pro 0,05 µg/µl DNA)

- 7,23 (pro 0,07 µg/µl DNA)

pro 515 nm: - 7,14 (pro 0,02 µg/µl DNA)

- 6,62 (pro 0,05 µg/µl DNA)

- 6,62 (pro 0,07 µg/µl DNA)

Zprůměrováním všech hodnot pak získáme  $7,2 \pm 0,8$  (číslo reprezentující počet párů bazí, na kolik se navazuje jedna molekula alkaloidu).



## 8. DISKUSE

Alkaloidy podléhají v organismu metabolickým přeměnám. Vzniklé metabolity mohou být stále biologicky aktivní, avšak s jinými vlastnostmi a účinky než původní látka. Proto je neméně důležité studovat nejen prvotní látku ale také její metabolity. Fluorescenční a absorpční spektroskopie umožňují sledovat celou řadu parametrů, ze kterých můžeme zjistit informace o fyzikálně-chemických vlastnostech studovaných alkaloidů a jejich interakcích s biomolekulami. Benzo[c]fenantridinové alkaloidy sanguinarin (SG) a chelerytrin (CHE) se nacházejí v rostlinách užívaných v medicínských oborech a jsou součástí složek řady komerčních přípravků. Jednou z metabolických reakcí, kterou mohou tyto alkaloidy podléhat, je demethylace. Na studovaných molekulách existuje více míst, kde může k demethylaci docházet, a proto byly synteticky připraveny analogy, které by mohly demethylací SG nebo CHE vzniknout.

Alkaloidy SG a CHE tvoří stabilní komplex s DNA. Při rozdílných koncentracích DNA má CHE 4 absorpční pásy při vlnových délkách 267, 316, 338 a 402 nm, zatímco SG má 3 absorpční pásy při vlnových délkách 267, 327 a 470 nm. V přítomnosti DNA vykazují absorpční spektra obou alkaloidů hypochromní efekt a batochromní posun. CHE vykazuje červený posun a můžeme pozorovat 3 dobře definované isobestické body, které indikují přítomnost volného alkaloidu a alkaloidu v komplexu s nukleovou kyselinou. Výsledky pro SG jsou velice podobné, avšak isobestický bod nelze určit (Junfen Li a kol., 2012). Při titraci alkaloidu NK-109 můžeme pozorovat dva absorpční pásy při vlnových délkách 340 a 515 nm. V přítomnosti DNA dochází k hypochromnímu efektu (s rostoucí koncentrací DNA se zvětšuje tento efekt), avšak bez posunu spektra do modra či do červena. Žádný isobestický bod není pozorován. Redukovaná forma NK-109 vykazuje obdobné vlastnosti v absorpčních spektrech jako forma neredukovaná.

Při studiu benzo[c]fenantridinových alkaloidů bývá s výhodou využívána jejich autofluorescence. Emisní spektrum CHE je charakteristické píkem při 570 nm (při excitaci 340 nm). Intenzita fluorescence roste s rostoucí koncentrací DNA a emisní pás je typický modrým posunem o 11 nm. Naopak SG má emisní pás při 589 nm a dochází

ke zhášení intenzity fluorescence při interakci s DNA a k posunu ke kratším vlnovým délkám o 14 nm. Tzn. je pozorován hypsochromní posun v emisních spektrech (Junfen Li a kol., 2012). Emisní spektrum redukované formy NK-109 vykazuje snížení intenzity fluorescence v přítomnosti DNA. Můžeme pozorovat emisi při vlnové délce 405 nm a minoritní pás při 550 nm.

Z poměru absorpčních spekter při vlnových délkách 340 a 515 nm sledujeme závislost NK-109 na přítomnosti metanolu. Experimenty ukázaly, že na absorbanci má vliv specifická interakce tohoto alkaloidu s OH-skupinou metanolu a můžeme pozorovat systematický pokles. Na druhou stranu, jestliže do roztoku přidáme 5% metanol, pozorujeme konstantní hodnotu absorbance. Tento alkaloid nemá schopnost se rozpouštět v tetrahydrofuranu, dioxanu a isopropanolu, zatímco v metanolu, etanolu a destilované vodě se rozpouští. Redukovaná forma NK-109 rozpuštěná v destilované vodě nevykazuje fluorescenci v přítomnosti DNA, avšak po přidavku metanolu můžeme fluorescenci pozorovat, tzn. že přítomnost metanolu má pro tento alkaloid zásadní vliv, kdežto přítomnost DNA vliv na fluorescenci nemá. Z tohoto důvodu jsme od dalších fluorescenčních experimentů s redukovanou formou NK-109 upustili.

Po redukcii NK-109 interakcí s  $\text{NaBH}_4$  vzniká redukovaná forma alkaloidu, která ztrácí dvojnou vazbu mezi kationtem dusíku a atomem uhlíku ( $\text{C}=\text{N}^+$ ). V absorpčních spektrech se tato skutečnost projevuje ztrátou absorpčního pásu v dlouhovlnné oblasti, přičemž je pozorovatelný pouze pás v oblasti krátkovlnné (Biler, 2011). Na obr. 10 můžeme však sledovat dva absorpční pásy – jak v krátkovlnné tak i ve dlouhovlnné oblasti spektra. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že při hledání vhodného rozpouštědla jsme alkaloid rozpustili v etanolu a dioxanu (zjistili jsme jeho nerozpustnost v těchto rozpouštědlech), proto jsme je odpařili a rozpustili v destilované vodě, kde je alkaloid již rozpustný. Je pravděpodobné, že redukovaná forma alkaloidu si ponechala funkční skupiny těchto dvou rozpouštědel a že se tudíž nejedná o čistou redukovanou formu alkaloidu NK-109. Neredukovaná forma NK-109 byla rozpuštěna přímo v  $\text{H}_2\text{O}$ .

Jiné výzkumy SG, CHE a jejich derivátů patřících také do skupiny benzo[c]fenantridinových alkaloidů studovaly jejich interakci s nukleovými kyselinami. Stechiometrie vazby na DNA pro SG a CHE byla zjištěna na 5 nukleotidů na jednu molekulu SG nebo CHE (Junfen Li a kol., 2012). Naše experimenty zjistily

stechiometrii vazby v poměru 1 molekula NK-109 na  $8 \pm 1$  párů bazí a jedna molekula redukované formy NK-109 na  $7,2 \pm 0,8$  párů bazí DNA.

## 9. ZÁVĚR

Alkaloidy mohou v organismu podléhat řadě metabolických transformací, které ovlivňují jejich biologické interakce. Tato diplomová práce si kladla za hlavní cíl proměřit základní fyzikálně-chemické vlastnosti alkaloidu NK-109 a jeho redukované formy a interakci těchto alkaloidů s nukleovými kyselinami. Byla proměřena absorpční a fluorescenční spektra pro 4 různé koncentrace DNA a pro rozdílné koncentrace alkaloidů. Bylo zjištěno, že na absorpci alkaloidu NK-109 má vliv jeho specifická interakce s metanolem. Byla také zjištěna nerozpustnost NK-109 pro rozpouštědla THF, dioxan a isopropanol. Dále byla proměřena závislost redukované formy NK-109 na přítomnosti metanolu a bylo zjištěno, že na fluorescenci tohoto alkaloidu má zásadní vliv pouze jeho specifická interakce s metanolem a nikoliv s DNA. Z titračních experimentů pak byla určena stechiometrie vazby na DNA. NK-109 se navazuje v poměru 1 molekula na  $8 \pm 1$  párů bází a redukovaná forma NK-109 se navazuje v poměru 1 molekula na  $7,2 \pm 0,8$  párů bází DNA.

## 10. SEZNAM LITERATURY

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2007) Molecular biology of the cell. Fifth Edition. Garland Science. New York
2. Belyaeva T., Leontieva E., Shpakov A., Mozhencik T., Faddejeva M. (2003) Sensitivity of lysosomal enzymes to the plant alkaloid sanguinarine: Comparison with other SH-specific agents. *Cell Biology International* 27, 887-895
3. Biler M. (2011), Bakalářská práce - Fluorescenční charakteristika alkaloidů.
4. Deroussent A., Micheline R., Hoellinger H., Cresteil T. (2010), Metabolism of sanguinarine in human and in rat: Characterization of oxidative metabolites produced by human CYP1A1 and CYP1A2 and rat liver microsomes using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52, 391-397
5. Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003). Letter to the editor: Nuclear DNA Content and Genome Size of Trout and Human. *Cytometry Part A* 51A, 127-128
6. Dostál J., Slavík J. (2000), Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech. *Chemické Listy* 94, 15-20
7. Dostál J., Slavík J. (2002), Some aspects of the chemistry of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Studies in Natural Products Chemistry* 27, 155-179
8. Dvořák Z., Šimánek V. (2007), Metabolism of sanguinarine: The facts and the myths. *Current Drug Metabolism* 8, 173-176
9. Hendry L. B., Mahesh V. B., Bransome E. D. Jr., Ewing D. E. (2007), Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals, *Mutation Research* 623, 53-71

10. Hossain M., Kumar G. S. (2010), Thermodynamic profiles of the DNA binding of benzophenanthridines sanguinarine and ethidium: A comparative study with sequence specific polynucleotides. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 42, 1273-1280
11. Hossain M, Khan A. Y., Kumar G. S. (2011), Interaction of anticancer plant alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin, *Plos One* 6, 1-12
12. Janovská M., Kubala M., Šimánek V., Ulrichová J. (2009), Fluorescence of sanguinarine: Fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 235-240
13. Janovská<sup>1</sup> M., Kubala M., Šimánek V., Ulrichová J. (2010), Fluorescence of sanguinarine: Spectral changes on interaction with amino acids. *Physical Chemistry Chemical Physics* 12, 11335-11341
14. Janovská<sup>2</sup> M., Kubala M., Šimánek V., Ulrichová J. (2010), Interaction of sanguinarine and its dihydroderivative with the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Complex view on the old problem. *Toxicology Letters* 196, 56-59
15. Junfen Li, Baohong Li, Yanbo Wu, Shaomin Shuang, Chuan Dong, Martin M. F. Choi (2012), Luminescence and binding properties of two isoquinoline alkaloids chelerythrine and sanguinarine with ctDNA. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 95, 80-85
16. Lawen A. (2003), Apoptosis – an introduction. *BioEssays* 25, 888-896
17. Lerman L. S. (1961), Structural considerations in interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology* 3, 18-30
18. Li-Ping Bai, Zhong-Zhen Zhao, Zongwei Cai, Zhi-Hong Jiang (2006), DNA-binding affinities and sequence selectivity of quaternary benzophenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine, and nitidine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14, 5439-5445
19. Nakanishi T., Suzuki M., Saimoto A., Kabasawa T. (1999), Structural considerations of NK109, an antitumor benzo[c]phenanthridine alkaloid. *Journal of Natural Product* 62, 864-867

20. Nakanishi T., Masuda A., Suwa M., Akiyama Y., Hoshino-Abe N., Suzuki M. (2000), Synthesis of derivatives of NK109, 7-OH benzo[c]phenanthridine alkaloid, and evaluation of their cytotoxicities and reduction-resistant properties. *Bioorganic and Medicinal Letters* 10, 2321-2323
21. Nandi R., Maiti M. (1985), Binding of sanguinarine to deoxyribonucleic acids of differing base composition. *Biochemical Pharmacology* 34, 321-324
22. Neidle S. (2002), *Nucleic Acid Structure and Recognition*, Oxford University Press
23. Neidle S. (2008), *Principles of Nucleic Acid Structure*, Elsevier, UK
24. Maiti M., Kumar G. S. (2007), Molecular aspects on the interaction of protoberberine, benzophenanthridine, and aristolochia group of alkaloids with nucleic acid structures and biological perspectives. *Medicinal Research Reviews* 27, 649-695
25. Maiti M., Kumar G.S. (2010), Polymorphic nucleic acid binding of bioactive isoquinoline alkaloids and their role in cancer. *Journal of Nucleic Acid* 2010, 1-23
26. Malíková J., Zdařilová A., Hlobilková A. (2006), Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis. *Biomedical Papers* 150, 5-12
27. Morohashi K., Yoshino A., Yoshimori A., Saito S., Tanuma S., Sakaguchi K., Sugawara F. (2005), Identification of a drug target motif: An anti-tumor drug NK109 interacts with a PNxxxxP. *Biochemical Pharmacology* 70, 37-46
28. Pěňčíková K., Urbanová J., Musil P., Táborská E., Gregorova J. (2011), Seasonal variation of bioactive alkaloid in *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde. *Molecules* 16, 3391-3401
29. Psotová J., Klejdus B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J. (2006), A liquid chromatographic–mass spectrometric evidence of dihydrosanguinarine as a first metabolite of sanguinarine transformation in rat. *Journal of Chromatography B* 830, 165-172
30. Sen A., Maiti M. (1994), Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. *Biochemical Pharmacology* 48, 2097-2102

31. Slaninová, I., Táborská, E., Bochořáková, H., Slanina, J. (2001) Interaction of benzo[c]phenanthridine and protoberberine alkaloids with animal and yeast cells. *Cell Biology and Toxicology* 17, 51-63
32. Staněk J. (1957), Alkaloidy. Československá akademie věd, Praha
33. Tomé F., Colombo M. L. (1995), Distribution of alkaloids in *Chelidonium majus* and factors affecting their accumulation. *Phytochemistry* 40, 37-39
34. Ulrichová J. (2005), Toxicology of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids, *Biomed. Papers* 149 (Supplement 1), 9-10
35. Valeur B. (2002), *Molecular Fluorescence, Principles and Applications*. WILEY-VCH, Weinheim
36. Vavrečková C., Ulrichová J. (1994), Biologická aktivita kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu. *Chemické Listy* 88, 238-248
37. Vyskot B. (1999), *Přehled vývojové biologie a genetiky*. Biofyzikální ústav genetiky AV ČR, Praha
38. Watson J. D., Crick F. H. C. (1953), Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 4361, 965-967
39. Wemmer D. E., Dervan P. B. (1997), Targeting the minor groove of DNA. *Current Opinion in Structural Biology* 7, 355-361
40. Walmark Santoin zubní pasta 100 ml proti paradentóze, [online], dostupné na: <http://www.lekarna.cz/walmark-santoin-zubni-pasta-120g-proti-paradentoze/>, převzato 2. 4. 2013
41. Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V. (2006), Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vitro a in vivo. *Chemické Listy* 100, 30-41