

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv suplementace vitamínu D na zvýšení účinnosti
rostlinných alkaloidů ve 3D modelu**

Diplomová práce

Bc. Pavel Kouřimský

Výživa a potraviny

Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv suplementace vitamínu D na zvýšení účinnosti rostlinných alkaloidů ve 3D modelu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2024

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval panu Ing. Ivo Doskočilovi Ph.D. za cenné rady, trpělivost při konzultacích mé diplomové práce, odborné vedení práce a za čas, který mi při psaní práce věnoval.

Vliv suplementace vitamínu D na zvýšení účinnosti rostlinných alkaloidů ve 3D modelu

Souhrn

Alkaloidy z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* mají velkou rozmanitost z hlediska biologické aktivity počínaje antivirovou, protinádorovou, cytotoxickou, antibakteriální, antifungální a analgetickou aktivitou. A právě díky jejich protinádorovým a cytotoxickým vlastnostem se zkoumá jejich cytotoxický vliv a potencionálně synergický účinek s jinými prospěšnými látkami pro člověka. Takovouto sloučeninou by mohl být například vitamín D, který má schopnost ovlivňovat signální dráhy buněčného metabolismu, a může tím ovlivňovat i nádorové buňky.

Cílem práce bylo otestovat synergický účinek vitamínu D s alkaloidy z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* a zjistit, jestli tento společný účinek zvýší jejich vliv na růst nádorových buněk.

Testovány byly extrakty lykorinu a haemanthidinu při koncentracích od 5 μM po 0,625 μM na buněčné linii kolorektálního karcinomu HT29 ve 3D modelu. Zároveň byl testován rozdíl mezi alkaloidy bez přidaného vitamínu D a s přidaným vitamínem D. Experiment byl prováděn po dobu 18 dnů kde prvních 12 dnů byla pořízena fotografie 3D modelu jednou za 2 dny a poté už jenom jednou za 3 dny. Z následných fotografií byl vypočítán objem 3D buněk v mm^3 a porovnána jejich změna s kontrolním vzorkem a také se vzorkem, kde byl pouze vitamín D.

Ze získaných výsledků je patrné, že vliv alkaloidů z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* měl vyšší účinnost na růst nádorových buněk než samotný vitamín D. Statisticky významný rozdíl mezi alkaloidy a vitamínem D nastal u lykorinu ve 12. dni a u haemanthidinu v 10. dni měření. Mezi kontrolním vzorkem a vitamínem D došlo k rozdílu od 10. dne měření. Nebyl pozorován žádný statistický významný rozdíl mezi vzorkem s extraktem s vitamínem D a vzorkem s extraktem bez vitamínu D.

Práce přináší originální výsledky o vlivu vitamínu D na růst buněčné linie HT29 ve 3D modelu a o jeho spolupůsobení s extrakty z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*. Do budoucna by bylo dobré se této problematice podrobněji věnovat.

Klíčová slova: *Amaryllidaceae*; buněčné linie; toxicita; HT29; lykorin; haemanthidin

The effect of vitamin D supplementation on enhanced efficiency of plant alkaloids in a 3D model

Summary

Alkaloids from plants of the *Amaryllidaceae* family have a great diversity in terms of biological activity ranging from antiviral, antitumor, cytotoxic, antibacterial, antifungal, and analgesic activity. And precisely because of their antitumor and cytotoxic properties, their cytotoxic effect and potentially synergistic effect with other beneficial substances for humans is being investigated. Such a compound could for example be vitamin D, which can influence the signalling pathways of cellular metabolism and can thereby also influence tumor cells.

The aim of this work was to test the synergistic effect of vitamin D with alkaloids from plants from the *Amaryllidaceae* family and to find out if their joint effect increases their effect on the growth of tumor cells.

Lycorine and haemanthidine extracts were tested at concentrations from 5 μM to 0.625 μM on the HT29 colorectal cancer cell line in a 3D model. At the same time, the difference between alkaloids without added vitamin D and with added vitamin D was tested. The experiment was carried out for 18 days, where for the first 12 days a photo of the 3D model was taken once every 2 days and then only once every 3 days. From the subsequent photographs, the volume of 3D cells in mm^3 was calculated and their change was compared with the control sample as well as with vitamin D alone.

The obtained results show that the effect of alkaloids from plants from the *Amaryllidaceae* family was more effective on the growth of tumor cells than vitamin D alone. A statistically significant difference between alkaloids and vitamin D occurred for lycorine on the 12th day and for haemanthidine on the 10th measurement day. There was a difference between the control sample and vitamin D from the 10th day of measurement. No statistically significant difference was observed between the sample with vitamin D extract and the sample without vitamin D extract.

The work brings original results about the effect of vitamin D on the growth of the HT29 cell line in a 3D model and about its interaction with extracts from plants from the *Amaryllidaceae* family. In the future, it would be good to focus on this issue in more detail.

Keywords: *Amaryllidaceae*; cell lines; toxicity; HT29; lycorine; haemanthidine

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Nádorová onemocnění	9
3.1.1 Kolorektální karcinom.....	11
3.1.2 Testování cytostatik.....	12
3.1.3 Přírodní látky zpomalující růst nádorových buněk.....	13
3.1.3.1 Amaryllidaceae.....	15
3.2 Vitamín D	20
3.2.1 Vitamín D a nádorová onemocnění.....	21
3.3 Synergické účinky rostlinných alkaloidů s léčivy (a mikronutrienty)	22
4 Metodika	23
4.1 Použité materiály	23
4.2 Metodika experimentů	23
4.2.1 Kultivace buněčných linií.....	23
4.2.2 Příprava sféroidů.....	23
4.2.3 Stanovení cytotoxicity.....	24
4.2.4 Statistické vyhodnocení.....	24
5 Výsledky	25
6 Diskuze	31
7 Závěr	33
8 Literatura	34
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	43
10 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Kolorektální karcinom patří k častým příčinám úmrtí, proto je možnostem léčby a prodloužení života onkologických pacientů věnována zvýšená vědecká pozornost. Jednou z možností je hledání nových účinných látek přírodního původu či charakteru, které by se mohly v léčbě jevit jako perspektivní.

Testování cytotoxicity na 2D modelech nejrůznějších buněčných linií patří k běžně používaným *in vitro* metodám. V poslední době se na testování toxicity stále více používají i 3D modely buněčných linií, které lépe simulují reálné podmínky v těle než 2D modely.

Vitamíny se obecně uplatňují jako podpurná léčba u nejrůznějších onemocnění. Například i vitamín D má schopnost podporovat boj organismu s infekcemi a ovlivňovat buněčný metabolismus.

Rostlinné alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae*, mají již prokázanou účinnost při *in vitro* testech na buněčných liniích se schopností zpomalit růst nádorových buněk. Avšak jedná se pouze o 2D buněčné modely, které plně neodpovídají realitě v lidském organismu. Ve 3D modelu jsou však tyto účinky často vyvráceny. Současně se však ví, že řada pacientů s nádorovým onemocněním trpí nedostatečnou suplementací vitamínu D, která hraje svou roli v nádorových onemocněních. Přídavek vitamínu D do 3D buněčného modelu se současným přidáním alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* by mohl tedy vést ke zvýšení účinnosti těchto alkaloidů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo vytvořit 3D sféroidy z nádorových a zdravých buněk, ke kterým byla přidána předem stanovená koncentrace testovaných alkaloidů z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* a vitamínu D po dobu minimálně 10 dní, a porovnat tuto účinnost s 2D modelem.

Hypotézou práce bylo, že přidavek vitamínu D do 3D buněčného modelu kolorektálního karcinomu se současným přidáním alkaloidů z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* zvýší účinnost těchto alkaloidů.

3 Literární rešerše

3.1 Nádorová onemocnění

Nádor představuje rozsáhlý shluk buněk tvořících souvislou tkáň, vznikající v důsledku nesouměrné a autonomní proliferace buněk. Tento stav nastává povětšinou při selhání autoimunitních mechanismů zajišťujících buněčnou apoptózu. Ta představuje programovanou buněčnou smrt bez vyvolání zpětné reakce v podobě zánětu. Takto vzniklé nádory se dále klasifikují podle biologického chování do dvou kategorií, a to na benigní, což jsou nezhoubné nádory s pomalým růstem, vysokým stupněm diferenciací a absencí metastáz. A na druhý typ v podobě maligních nádorů, což jsou zhoubné nádory s rychlým růstem, nízkou diferenciací a častým metastázováním nejen do sousedních tkání ale například i jiných částí těla (Zámečník, 2019). Toto šíření nádorů je zapříčiněno metastázami, které mají schopnost se takto šířit a představují významný aspekt maligních nádorů (Geiger et Peeper, 2009).

Nejčastěji nádory způsobují komplikace v místě své lokace, kdy se manifestují bolestí, tlakem, krvácením nebo omezením funkce postiženého orgánu, respektive orgánů. Jejich výskyt je možný ve všech tkáních organismu od nervového systému po reprodukční, trávicí soustavy, pokožku a další. Nejčastěji se vyskytující maligní nádory jsou však ty lokalizované v gastrointestinálním traktu v podobě kolorektálních karcinomů. Představují jedno z nejčastějších úmrtí související s nádorovým onemocněním ve světě (Zámečník, 2019). Fáze růstu nádorového onemocnění jsou iniciace, podněcování, progresí a tvoření metastáz. Během iniciace dochází k prvotním změnám DNA. Ve fázi podněcování neboli promoce dochází ke klonální proliferaci abnormálních buněk pomocí promotorů. Progresí je další fází, kde došlo k nahromadění dalších mutací a proliferace se stala autonomní a nepotřebuje už pomoc od promotorů. Během finální fáze růstu dochází k invazi nádorových buněk a tvoření metastáz po těle (McMahon et al., 2017; Ren et al., 2021; Zámečník, 2019).

Nádorová onemocnění se dělí na 4 různá stadia značena buď číselně nebo římskými číslicemi. První stádium je, když je nádor malý a je pouze v orgánu, ve kterém se prvotně objevil. Druhé stádium značí větší nádor než v prvním stádiu, který se ale nezačal šířit do okolních tkání. Když se začne nádor šířit do okolních tkání a v blízkosti lymfatických uzlin se usazující nádorové buňky, tak se jedná o třetí stádium. Nádorové onemocnění čtvrtého stadia zahrnuje nádory, které se rozšířily z prvotního místa růstu do jiného orgánu (Freeman, 2013; Zámečník, 2019).

Podmínky vzniku nádorového onemocnění a nádoru vlastního jsou rozličné, nejčastěji představují kombinaci několika faktorů, a to jak exogenních, tak endogenních včetně genetické predispozice jedince. Klíčovým faktorem exogenního původu v případě kolorektálního karcinomu je strava, zejména konzumace rafinovaných potravin. Dále jsou však rizikovými faktory i kouření a konzumace alkoholu, jakožto i znečištěné životní prostředí například těžkými kovy, radioaktivitou, ale také toxické plyny v atmosféře. V neposlední řadě je pak rizikové i nadměrné vystavení se přímým slunečním paprskům, a zejména UV a ionizujícímu záření, které má významný negativní dopad na zdraví člověka (Irigaray et al., 2007). Podle Sankpal et al. (2012) tvoří životní prostředí téměř 80 % příčin vzniku nádorových onemocnění.

Nicméně rizikovým faktorem je i životní styl člověka a zejména nedostatečná pohybová aktivita, stres nebo různá zánětlivá onemocnění (Irigaray et al., 2007).

Tyto zejména exogenní a endogenní činitelé mají vliv na produkci volných radikálů, které v nadprodukcí mohou vyvolávat oxidační stres (Phaniendra et al., 2015). Oxidační stres je stav, kdy v důsledku kaskádového efektu dochází ke zvýšené produkci vysoce reaktivních sloučenin, které mají schopnost poškozovat živočišné tkáně. Mezi tyto sloučeniny patří dvě hlavní skupiny, a to reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species ROS) a dusíku (RNS), které mohou tvořit volné radikály (Sies et al., 2017). Výživa patří mezi jeden z životně důležitých regulátorů oxidačního stresu a již zmiňovaná dieta má za příčinu vyšší oxidační stres (Saha et al., 2017). Zvýšené množství ROS/RNS může podporovat negativně buněčnou proliferaci, zvýšit genetickou nestabilitu a měnit somatické mutace DNA. Také nadprodukce reaktivních látek jako jsou hydroxylové radikály, peroxid vodíku, superoxidové anionty, hydroperoxydy a oxid dusnatý může zapříčinit oxidaci nukleotidů, proteinů nebo lipidů, a tím způsobit mutaci DNA (Tan et Norhaizan, 2021). V případě, že je množství vzniklých ROS/RNS, respektive celkového oxidačního stresu, dostatečně vysoké na překonání endogenní antioxidační odpovědi, vzniklé poškození nukleových kyselin, lipidů a proteinů může zvýšit genetickou nestabilitu a měnit DNA pomocí mutací. Tyto mutace často vedou ke spuštění samovolného buněčného dělení a tím k iniciaci karcinogeneze. Což v případě, kdy nastane dysregulace onkogenů a genů supresujících nádor vede k rozvoji nádorového onemocnění (Jelic et al., 2021).

Během evoluce vznikly dva mechanismy s cílem redukovat koncentraci volných radikálů v organismu a minimalizovat oxidační poškození. Prvním mechanismem je využití endogenních antioxidačních enzymů jako jsou superoxidodismutáza, glutathionperoxidáza a kataláza (Khan et al., 2010), které mají schopnost zhaset reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) (Kim, 2020). Druhým mechanismem je využití exogenních antioxidantů, které mají schopnost předávat elektron volnému radikálu, a přitom se sami nestanou volným radikálem, čímž přerušují řetězovou radikálovou reakci. Jedná se zejména o sekundární metabolity rostlin, které představují celou řadu biologicky aktivních látek, jejichž zdroje je rostlinná strava (Kapoor et al., 2019).

V současnosti hlavní používanou metodou léčby nádorového onemocnění je použití cytostatik při chemoterapii. Principem fungování cytostatik je jejich schopnost zabránit vzniku dělicího vřeténka v G2/S fázi buněčného cyklu a tím zabránit dělení buňky, respektive její DNA, nebo udržováním nepoškozené DNA. Tímto mechanismem jsou cytostatika schopna zabíjet konstantní počty nádorových buněk, které se nachází v dělicí fázi buněčného cyklu (Blakeley et Grossman, 2012). Přesněji jde o schopnosti ovlivnit inhibici nebo změnu transkripce jedné nebo více nukleofilních skupin, ovlivnit replikaci DNA tím, že se na ni cytostatikum naváže, rozbít jedno vlákno u DNA, narušit syntézu DNA nebo funkci nukleových kyselin, inhibovat mitotické dělicí vřeténko a tím zastavit oddělení chromozomů, interagovat s proteokinázami podílejícími se na regulaci biologických procesů v buňce a také například blokovat extracelulární receptory nádorové buňky (Besse et al., 2012). Jedná se o navození naprogramované smrti nádorových buněk, tím že budou regulovat apoptózu, protože právě porušení funkce apoptózy je jedním z indikátorů nádorového onemocnění (Z. B. Liu et al., 2022). Toto je výlučná funkce cytostatik. Přirozené látky, o kterých bude dále pojednáno,

mohou mít případně i protektivní funkci, ale nemohou být součástí řešení již vzniklého problému.

3.1.1 Kolorektální karcinom

V současné době zaujímá kolorektální karcinom třetí místo z hlediska nejčastěji se vyskytujících zhoubných nádorů a zároveň je celosvětově čtvrtou nejčastější příčinou úmrtnosti spojenou s nádorovým onemocněním (Hnatyszyn et al., 2019), která postihuje všechna pohlaví bez rozdílu. Problematické jsou jeho maligní rysy s významnou recidivitou, kvůli kterým se pacienti jen výjimečně zcela zotaví (Giordano et Tommonaro, 2019). Díky lékařské péči ve vyspělých zemích dochází také k nejvyššímu procentu zaznamenání tohoto typu nádorového onemocnění, a to až k 55 % z celkového počtu zaznamenaných případů výskytu (Hnatyszyn et al., 2019; Mármol et al., 2017).

Rizikovým faktorem pro rozvoj a vývoj kolorektálního karcinomu jakož i dalších nádorových onemocnění je zejména životní styl. Obzvláště ve spojitosti s dietou bohatou na zpracované potraviny, které představují zejména mastné výrobky, případně výrobky s vysokým obsahem cukru (Klement et Paziienza, 2019). Naopak strava bohatá na ovoce, zeleninu a vlákninu má ochranný účinek. Vláknina urychluje střevní motilitu a tím omezuje kontakt sliznice s tráveninou. Fyzická aktivita také přispívá k urychlení střevní motility, a tím snižuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu (Zámečník, 2019). Současně s tím je spojená také problematika minimální pohybové aktivity a sedavého zaměstnání v rámci, kterých dochází k rozvoji obezity v populaci. Současně s tím je spojována i nadměrná konzumace alkoholu včetně užívání tabákových výrobků. Mimo to hrají významnou roli také věk jedince, rodinná anamnéza a predispozice pro daný typ onemocnění včetně místa pobytu (znečištění životního prostředí), jakožto i další chronická, neurogenerativní onemocnění a celá řada dalších (Hnatyszyn et al., 2019; Mármol et al., 2017).

Pravděpodobnost, že se u člověka rozvine kolorektální karcinom se pohybuje přibližně od 4 do 5 %. Tuto pravděpodobnost ovlivňují již zmiňované faktory. Vznik kolorektálního karcinomu je zapříčiněn mutacemi a podle původu je můžeme rozlišit na mutace zděděné (5 %), rodinné (25 %) a sporadické (70 %) neboli náhodné (Mármol et al., 2017). Výskyt sporadicky se vyskytujících mutací při vzniku kolorektálního karcinomu se v posledních letech zvýšil na 75 % (Hnatyszyn et al., 2019).

V případě, že se u člověka objeví kolorektální karcinom, existují různé způsoby, jak toto onemocnění léčit. Jedním z prvních způsobů je chirurgický zákrok s následnou chemoterapií, ale bohužel pacienti s metastázemi mají historicky špatnou prognózu (Hossain et al., 2022). Obecně jsou způsoby léčby nádorového onemocnění již zmiňovaná chirurgie a chemoterapie, radiační terapie a systémová léčba, cílené terapie, hormonální terapie a imunoterapie. 84 % případů kolorektálního karcinomu prvního nebo druhého stádia se léčí pouze operací bez chemoterapie, zato dvě třetiny pacientů třetího stádia kolorektálního karcinomu podstupují adjuvantní chemoterapii. Pacienti s kolorektálním karcinomem mají pravděpodobnost přežití do 5 let ze 65 %. Z toho u pacientů prvního stádia je pravděpodobnost 91 % a u druhého stádia 82 %. U pacientů se čtvrtým stádiem kolorektálního karcinomu je to ale pouze 12 % (Miller et al., 2019). Významnou roli v prevenci hraje screening tzv. okultního krvácení, který významně přispívá k včasné diagnostice a tím zlepšuje prognózu onemocnění (Murphy et al., 2020).

3.1.2 Testování cytostatik

K testování vlivu cytostatik se mohou použít různé *in vitro* metody. Základní metodou pro posouzení životaschopnosti po podání je využití tetraziolových solí, a nejvíce využívanou je MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetraazolium bromid) (Tolosa et al., 2015). Případně se mohou používat i další metody jako je například WST-1 ve kterém je použita sodná sůl 4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonátu. U této metody zjistíme aktivitu superoxiddismutázy (SOD), která katalyzuje rozklad ROS a tím chrání buňku. Jedná se o ve vodě rozpustnou sůl, takže je následně možné ještě s buňkami pracovat (Peskin et Winterbourn, 2000). Tyto metody využívají stanovení toxicity na buněčných mitochondriích a zkoumají jejich metabolickou aktivitu (Guertler et al., 2011). Nicméně nám neřeknou o účinku testované látky na zbytek organel v buňce. Je tedy vhodné využít i některé z dalších metod jako je například LDH, kdy se měří cytoplazmatická laktátdehydrogenáza (Marzęda et al., 2022). Jsou i další metody testování založené na různých buněčných funkcích (Adan et al., 2016). Například ty, které se zaměřují na integritu membrán a testují její propustnost buď do buňky nebo z buňky ven. Používají se k tomu radioaktivní nebo fluorescenční markery anebo se jedná o vitální barviva, která obarví pouze mrtvé buňky. Zástupci těchto barviv jsou například trypanová modř anebo fluorogenní barviva, která se vážou na DNA (Cho et al., 2008; Riss et al., 2019). Další možnosti testování jsou například test ATP, test sulhorhodaminu B, klonogenního přežití buněk a Ramanova mikrospektroskopie (Adan et al., 2016).

Všechny tyto testy se provádějí na tkáňových kulturách v monovrstvě a na tkáních, které chceme otestovat. Například buněčné linie s označením HT29 jsou buňky kolorektálního karcinomu. Výhody použití tkáňových kultur u testování cytotoxických látek jsou jejich extrémní citlivost na dané toxické látky, jednoduchost oproti jiným metodám, možnost zkoumání interakce na buněčné nebo dokonce na molekulární úrovni a provádění velkého množství testů zároveň. Hlavní výhodou je ale to, že to je jediná možnost, jak testovat tyto látky na lidských buňkách (Pizzoferrato et al., 1994; Shahi Thakuri et Tavana, 2017). Navzdory všem výhodám tkáňových kultur pěstovaných na monovrstvě, nelze tyto výsledky plně převést do klinických studiích (Habanjar et al., 2021), a ne vždy předpovídají přesné výsledky v následném pokusu na zvířatech (Shahi Thakuri et Tavana, 2017). Jedná se hlavně o jejich limitaci z hlediska jejich okolního prostředí, kde na jedné straně je médium a na druhé je plastové dno a tím pádem žádný vzájemný kontakt buněk, jako je v *in vivo* podmínkách (Rychecký et al., 2017).

Naštěstí došlo jednomu z největších pokroků v testování na tkáňových kulturách, a to k zavedení trojrozměrných kultivačních systémů (Ravi et al., 2015). První model trojrozměrné kultury byl popsán už v roce 1992 pány Petersenem a Bissellem (Petersen et al., 1992). Jedná se o jeden z největších pokroků z toho důvodu, že takto vypěstované buňky jsou ještě blíže k reálným *in vivo* podmínkám (Ravi et al., 2015), neboť jsou schopné lépe napodobit prostředí nádorů díky buněčné interakci a komunikaci (Habanjar et al., 2021), než již zmiňované tkáňové kultury pěstované v monovrstvě. Výrobu trojrozměrné buněčné kultury lze rozdělit na dva hlavní způsoby. Buď s použitím nějakého pomocného materiálu jako „lešení“ anebo bez něho, kde díky schopnosti buněk se spojovat, vzniká shluk buněk kulovitěho tvaru označovaného za

sféroid (Rychecký et al., 2017). Sféroidy se dají vytvořit různými způsoby například metodou visuté kapky, pomocí hydrogelů nebo tekutých kuliček (Białkowska et al., 2020; Rychecký et al., 2017). Metoda visuté kapky nepotřebuje žádné specifické vybavení, ale má určitá omezení a negativa. Jedná se o nízkou propustnost, takže přidávání sloučenin a výměna média mohou být dosti náročné, jak na provedení, tak na čas. Nejjednodušší provedení této metody je umístit kapku na víko kultivační misky, kde po obrácení budou buňky shluknuty a zkoncentrovány na dně kapky díky mikrogravitaci. Při použití hydrogelů se buňky naočkují do hydrogelu, který není adhezivní a má prohlubně. Díky tomu je upřednostněno samovolné shlukování a vznikají tím sféroidy (Białkowska et al., 2020). Vytvoření tekutých kuliček pro vytvoření sféroidů je velice prosté. Jedná se o nanesení kapky vody na hydrofobický prášek skládající se z malých částic, které se válením kapky v tomto prášku rovnoměrně rozmístí po celém povrchu kapky. Takto vzniklá tekutá kulička má vlastnosti jak tekuté kapky, tak měkkého ale pevného objektu. Vytvořený obal z prachových částic přináší výhodu ve využití sféroidů jako mikroreaktorů nebo bioreaktorů, protože vytváří bariéru od vnějšího prostředí, a tím redukuje riziko biohazardu například při testování krve. Zároveň ovlivňování a přidávání činidel je také velmi jednoduché, jelikož lze provést buď spojením dvou kuliček dohromady anebo vpíchnutím injekční stříkačkou (Rychecký et al., 2017).

Při použití pomocných materiálů typu „lešení“, jako jsou přírodní nebo syntetické biomateriály skládající se z peptidů, polysacharidů, nukleových kyselin nebo polyhydroxyalkanoátů, mohou vznikat dva typy struktur. Jedním je kulovitý sféroid a druhým je struktura podobná netkané textilií nebo houbovitému tvaru. U sféroidů při použití pomocného materiálu nějakého hydrogelu je nevýhoda horší separace buněk od hydrogelu, a tím pádem malá opakovatelnost. U trojrozměrných kultur tvaru vlákna nebo houby je naopak výhoda jejich účinná proliferace a migrace buněk na skeletu, což je dobře uplatnitelné pro imunohistochemickou analýzu (Nii et al., 2020).

Sféroidy se nejčastěji používají na studování chování pevných nádorů. Důvodem je to, že u nich vzniká nekrotické jádro, stejně jako u nádorových buněk (Rychecký et al., 2017). V případě sféroidů nádorových buněk je jejich hlavní výhoda podobnost v těsném kontaktu buňky na buňku, interakcí matrice s buňkou, omezení difúze živin a kyslíku do buňky. Toto vše vede k vytvoření proliferativních až nekrotických buněk, hypoxii a omezení difúze léčiva do nádorových buněk (Shahi Thakuri et Tavana, 2017). Dále také sféroidy lépe charakterizují buněčnou heterogenitu, stupeň pH, obecně jejich soudržnost a interakci mezi jednotlivými buňkami, chemické a fyzikální vlivy a profil exprese genů. Tímto mohou sféroidy fungovat jako přesný a důvěryhodný model při výzkumu nádorových onemocněních, nádorového mikroprostředí, migrace a invaze nádorů, pro screening a objevování léků, imunitních reakcí atd. (Gheytanchi et al., 2021). Právě tyto problémy jsou řešeny v rámci diplomové práce.

3.1.3 Přírodní látky zpomalující růst nádorových buněk

V boji proti nádorovému onemocnění lze využít i přírodní látky, ne jenom konvenční léčiva. Mnoho přírodních látek je schopno sloužit jako chemoprotektivní činidla proti nádorovým onemocněním vyskytujícím se po celém světě (Reddy et al., 2003). Chemoprotektivní činidla mají funkci buď blokující nebo potlačující. Blokující funkce omezuje mutagenní iniciaci a odvrací karcinogen od dosažení cílového místa k potřebné metabolické

aktivaci. Zato potlačující funkce brání nádorové přeměně iniciované buňky (Gairola et al., 2021). Chemoprotektivní činidla jsou nejčastěji silné antioxidanty, jako jsou flavonoidy, terpenoidy, fenolové sloučeniny anebo reaktivní skupiny s ochrannou vlastností, polysacharidy a v neposlední řadě i alkaloidy. Většinu zmiňovaných látek můžeme zařadit do sekundárních metabolitů rostlin (Liu et al., 2022; Reddy et al., 2003). Najdeme je převážně v ovoci, zelenině a samozřejmě i v rostlinných výtažcích a bylinách (Reddy et al., 2003; Sobolewska et al., 2021). Zároveň jsou schopné narušit několik procesů nebo narušit signální dráhy a tím přispět k likvidaci nádorových buněk (Sobolewska et al., 2021). S těmito jejich vlastnostmi se v klinických studiích ukázaly jako potenciální adjuventy k chemoterapeutickým léčivům (Gairola et al., 2021; Sobolewska et al., 2021).

Mezi nejznámější zástupce přírodních látek s protinádorovým účinkem patří například **resveratrol**. Resveratrol je polyfenolová sloučenina existující v izomerech *cis* a *trans*. Na resveratrol můžeme narazit ve slupce a v semenech hroznového vína, také v červeném víně (Gairola et al., 2021), brusinkách, borůvkách, jahodách a v některých bylinách (Sobolewska et al., 2021). Uvádí se, že resveratrol má dlouhý seznam zdravotních benefitů, počínaje od posílení imunity, zpomalení růstu stárnutí, předcházení nebo zmírnění cukrovky a kardiovaskulárních onemocnění až po nádorová onemocnění (Gairola et al., 2021; Ren et al., 2021). Svoji účinnost prokázal hlavně u nádorových onemocnění spojených se špatnou dietou a následnou obezitou, od nádorového onemocnění jater až po kolorektální karcinom (Carter et al., 2014). V *in vitro* pokusu na buněčné linii HT29, což je linie kolorektálního karcinomu, prokázal antiproliferační schopnosti (Gairola et al., 2021).

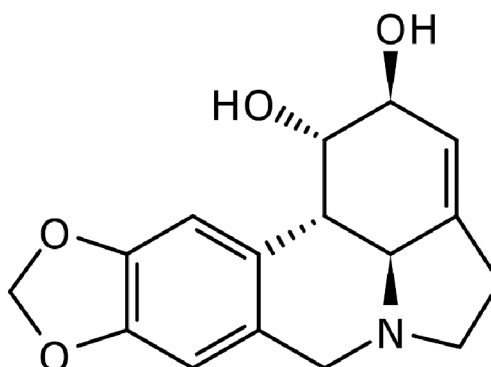
Další velmi známý zástupce sekundárních metabolitů s protinádorovými vlastnostmi je **kurkumin**. Jedná se o polyfenolovou sloučeninu, která se extrahuje z oddenků rostliny *Curcuma longa*. Už v roce 1815 bylo zjištěno, že kurkumin má velmi dobrou biologickou aktivitu, jako jsou antioxidační, antivirový, protizánětlivý a antimikrobiální efekt (Giordano et Tommonaro, 2019). Jelikož je chronický zánět spojen se vznikem nádorového onemocnění, jsou jeho protizánětlivé vlastnosti velice prospěšné v působení proti těmto onemocněním. Dále pomáhá v působení tak, že reguluje cytokiny a ROS, čímž jsou vysvětleny jeho protizánětlivé vlastnosti (Zoi et al., 2021). V léčbě kolorektálního karcinomu měl kurkumin svůj terapeutický vliv na signální dráhy buněk (Giordano et Tommonaro, 2019). V experimentu na tkáňové kultuře HT29 měl kurkumin inhibiční efekt na růst tkáně, díky jeho schopnosti potlačit signální dráhy buněk (Liu et al., 2015).

Inhibici růstu nádorových buněk mohou způsobit také rostlinné alkaloidy. Rostlinné alkaloidy jsou jedním z nejhojnějších metabolitů, které jsou běžně produkovány rostlinami jako toxiny. Z 27 000 různých alkaloidů jich má přes 17 000 různé léčivé vlastnosti, včetně protinádorových vlastností (Habli et al., 2017). Mezi tyto vlastnosti patří indukce zastavení buněčného cyklu ve fázi G0/G1, již zmiňovaná inhibice růstu, indukce vnitřní a vnější apoptózy, protizánětlivé reakce, inhibice metastáz a další (Efferth et Oesch, 2021). Tyto jejich účinky byly prokázány jak *in vitro*, tak také *in vivo* (Mondal et al., 2019). Všechny procesy, kterými jsou rostlinné alkaloidy účinné v boji proti nádorovému onemocnění jsou díky jejich vlivu na signální dráhy buněk, které umí regulovat. Nejenže umí regulovat přenosy signálu, ale umí také potlačit karcinogenezi, čímž je možné jejich využití jako chemoprotektivních léků (Efferth et Oesch, 2021).

3.1.3.1 Amaryllidaceae

Jedněmi z takovýchto rostlinných alkaloidů mohou být například rostlinné alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae*, které vykazují velkou rozmanitost z hlediska biologické aktivity (Ding et al., 2017; M. He et al., 2015). Jedná se o víceleté byliny s cibulí. Tato čeleď je známá velkým zdrojem farmakologicky aktivních alkaloidů (Roy et al., 2018). Čeleď *Amaryllidaceae* čítá přibližně 75 různých rodů a z toho 1 100 druhů můžeme přirozeně nalézt v subtropických a tropických oblastech nebo ve velmi teplých oblastech mírného pásma. Prvním a nejznámějším alkaloidem izolovaným z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* je lykorin (Ding et al., 2017; He et al., 2015). Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* jsou klasifikovány do 14 různých skupin podle strukturních stavby, a to na lykorin, norbelladin, homolykorin, krinin, haemanthamin, galanthamin, tazettin, montanin, fenantridon, fenantridin, plikamin, gracilin, galanthindol, a poslední skupinou jsou smíšené alkaloidy (Ding et al., 2017). Jejich biologická aktivita je velice rozmanitá včetně antivirové, protinádorové, cytotoxické, antibakteriální, antifungální a analgetické (He et al., 2015; Saltan Çitoğlu et al., 2012).

Lykorin je pyrrolifenantridinový alkaloid (Obrázek 1), který můžeme nalézt v různých rostlinách čeledi *Amaryllidaceae* (Roy et al., 2018). Nejčastěji ho můžeme nalézt v *Lycoris radiata*, (L'Her.) Herb. 1819, *Leucojum aestivum* L. 1759 (česky bledule letní) a třeba i v *Ammocharis coranica* Ker Gawl 1816 (Lin et al., 1995).



Obrázek 1: Strukturní vzorec lykorinu

Vrijssen et al., (1986) prvně prokázali antivirovou aktivitu lykorinu na buněčné linii epiteliálních buněk HeLa. Jeho antivirová aktivita byla pozorována na myších a způsobená díky schopnosti inhibice replikace viru, a také tím, že je lykorin schopen ovlivnit translaci, a to přesněji zablokováním elongace polyproteinu (Jiangning Liu et al., 2011). Dále prokázal antivirovou aktivitu s hodnotou 50% maximální efektivní koncentrace $15,7 \pm 1,2$ nM proti viru SARS-CoV (S. Y. Li et al., 2005).

Bendaif et al. (2018) testovali antibakteriální aktivitu na 8 zástupcích jak gramnegativních, tak i na grampozitivních bakterií. Vyšlo jim, že lykorin prokázal účinnost proti většině testovaných bakterií, obzvláště proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobactercloacae*, ale žádnou aktivitu v případě *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*. Žádnou aktivitu lykorinu u těchto kmenů lze nejspíš vysvětlit jeho degradací způsobenou právě těmito kmeny.

Lykorin prokázal ale i antifungální vlastnosti. Zhao et al. (2021) pozorovali jeho antifungální aktivitu na *Botrytis cinerea*, která napadá ovoce a zeleninu po sklizni a tím snižuje

jejich výnos. Jeho účinek byl pozorován jak *in vitro*, tak *in vivo* a v obou případech byl závislý na dávce a byl schopen inhibovat růst a klíčení plísně. Ke zpomalení růstu došlo při koncentraci 1 mmol/l a k úplné inhibici růstu při koncentraci 5 mmol/l. Při koncentraci 400 mg/l inhiboval lykorin růst a také tvoření spor u *Magnaporthe oryzae* (Qiao et al., 2023). Nejen proti *Botrytis cinerea* a *Magnaporthe oryzae* prokázal antifungální aktivitu, ale také proti *Candida sp.*, kdy jeho minimální inhibiční koncentrace byla nižší než u jiných testovaných extraktů (Silva et al., 2022). Jelikož je lykorin využíván v lidské medicíně a prokázal inhibiční vlastnosti na růst určitých plísní, lze ho využít i jako ekologickou alternativu místo syntetických fungicidů (Zhao et al., 2021).

Protinádorová aktivita lykorinu byla poprvé objevena už v roce 1976 a to Jimenez et al. (1976). K dnešnímu dni byla již udělána spousta studií zaměřená na způsoby, jakými protinádorová aktivita lykorinu funguje. Hlavně se jedná o schopnost ovlivnit určité geny nebo signální dráhy v buňce, indukovat apoptózu, inhibovat proliferaci a také inhibovat růst nádoru (Cao et al., 2013; Xiao et al., 2022).

K inhibici proliferace došlo po 24 hodinách po ošetření lykorinem na buněčných liniích MDA-MB-231 a MCF-7 (jedná se o buněčné linie karcinomu prsu). Byly naměřeny hodnoty inhibiční koncentrace, při které přežije 50% buněk (IC50) u linie MDA-MB-231 rovny $1,87 \pm 0,49 \mu\text{M}$ a u linie MCF-7 $7,76 \pm 1,16 \mu\text{M}$. Pro objasnění tohoto mechanismu bylo zkoumáno zastoupení buněk v daném buněčném cyklu. Bylo zjištěno, že lykorin inhiboval proliferaci díky zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M (Sun et al., 2023). Inhibice proliferace byla pozorována po ošetření $10 \mu\text{M}$ a po 24 hodinách také na buněčných liniích nádoru plic (A549 a H1299).

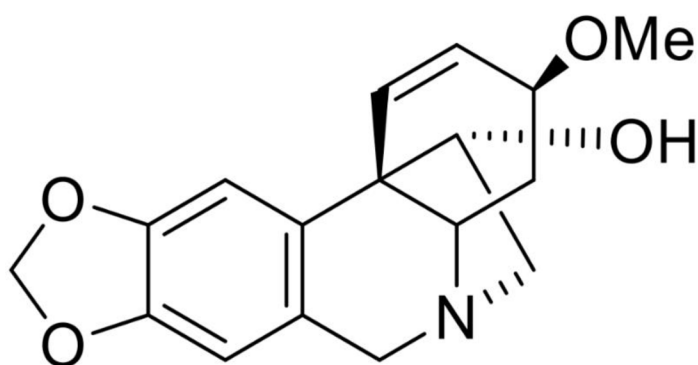
Dále byla vyzkoušena výrazná podpora apoptózy v porovnání s kontrolní skupinou u stejných buněčných linií. Tyto výsledky poukazují na vliv lykorinu na buněčný růst (Li et al., 2019). Indukce apoptózy nastala také na již zmiňovaných buněčných liniích karcinomu prsu, a to díky lykorinem změněnému potencionálu na membráně buněk (Sun et al., 2023). K podobným výsledkům došlo také u buněčné linie DU145 a PC3M což jsou buněčné linie karcinomu prostaty. Došlo také k zastavení buněčného cyklu mezi fázemi G2 a M po ošetření lykorinem a k indukci apoptózy. Dále bylo prokázáno snížení migrace nádorových buněk na těchto buněčných liniích, a dokonce v *in vivo* experimentu na myším modelu došlo u jiné buněčné linie, ale stejného typu nádoru, RM-1 k významnému potlačení růstu nádoru (Jie Liu et al., 2022).

Na buněčné linii, zmiňované už u kurkuminu a resveratrolu, HT29, a také na dalších liniích kolorektálního karcinomu (HCT8, CT-26 a HCT116) došlo po aplikaci $20 \mu\text{M}$ lykorinu po 48 hodinách k velké inhibici růstu. Inhibice růstu byla u HT29 78,01 %, u HCT8 77,97 %, u CT-26 70,50 % a u HCT116 72,97 %. Při aplikaci stejného množství lykorinu na tři z těchto čtyř linií (HT29, CT-26 a HCT116) byla pozorována také apoptóza. U linie HT29 bylo 44,97 % buněk které prošly apoptózou, u CT-26 to bylo 32,86 % a u linie HCT116 41,73 %.

Schopnost vytvářet metastáze, a tedy migrovat po lidském organismu je velkým problémem u léčení nádorových onemocněních. Proto byla testována schopnost lykorinu tomu předejít a na předchozích třech liniích kolorektálního karcinomu bylo prokázáno ovlivnění migrace lykorinem (Gao et al., 2021). Na stejné buněčné linii HT29 a zároveň i na buněčné linii kolorektálního karcinomu Caco-2 také testovali lykorin Doskočil et al. (2015), kteří zkoumali jeho cytotoxicitu v porovnání s cytotoxicitou na zdravé buněčné linii FHs 74 Int. U HT29,

naměřili $IC_{50}=1,2 \pm 0,0 \mu M$ a na Caco-2 $IC_{50}=0,99 \pm 0,08 \mu M$, což jsou mnohem nižší hodnoty v porovnání s naměřenými hodnotami na FHs 74 Int kde bylo $IC_{50}=22,7 \pm 0,1 \mu M$.

Další alkaloid, který můžeme nalézt v rostlinách z čeledi *Amaryllidaceae* je **haemanthamin**. Haemanthamin, jakož i později zmiňovaný heamanthidin, mají charakteristickou strukturu viz Obrázek 2 (Ding et al., 2017). Následně má α -orientovaný 5,10b-ethanový můstek, čímž se rozlišuje od krininových alkaloidů. Rozdíl mezi haemanthaminem a haemanthidinem, je v 6-hydroxy derivátu u haemantihidinu (Cahlíková et al., 2021). Haemanthamin můžeme izolovat například ze *Zephyranthes ajax* Spreng, 1899, *Pancreatium maritimum* L. 1753 (Masi et al., 2022; Nguyen et al., 2019). Stejně jako lykorin prokazuje haemanthamin antivirovou, protinádorovou, a také protizánětlivou aktivitu, a může fungovat jako antimalarikum nebo jako lék na Alzheimerovu nemoc (Nguyen et al., 2019; Uher et al., 2022).



Obrázek 2: Strukturální vzorec haemanthaminu

Antivirovou aktivitu prokázal haemanthamin například inhibicí replikace patogenního viru ptačí chřipky H5N1 (He et al., 2013) a také efektivně inhiboval replikaci viru HIV-1 v *in vitro* podmínkách na buněčné linii MT4 (T-lymfocyty) (Szlávik et al., 2004).

Využití haemanthaminu jako antimalarika testovali Cedrón et al. (2012) v *in vitro* podmínkách na kmeni *Plasmodium falciparum*, kde naměřili hodnotu IC_{50} u haemanthaminu $1,3 \pm 0,2 \mu M$.

Schopnosti haemanthaminu ovlivnit nádorová onemocnění jsou různá. Největší potenciál prokázal jako inhibitor růstu a také jako induktor apoptózy a cytotoxicity (Habartová et al., 2016; Uher et al., 2022).

Inhibici růstu buněk prokázal na buněčné linii A2780, což je buněčná linie rakoviny vaječníku, při koncentraci $10 \mu M$ po 24 hodinách měl inhibici na 53 % růstu v porovnání s kontrolou. Velmi podobný výsledek, a to 54 %, prokázal také na zdravé buněčné linii plic MRC-5 (Seifrtová et al., 2017). Na stejných buněčných liniích při stejné koncentraci ale po 48 hodinách naměřili Uher et al. (2022) nižší hodnoty, tím pádem větší vliv na růst. Na linii A2780 naměřili procentuální růst v porovnání s kontrolou (100 %) $30 \pm 5 \%$ a na linii MRC-5 $32 \pm 2 \%$. Inhibici růstu měřili také na dalších liniích. Nejmenší hodnotu procentuálního růstu zaznamenali na linii MOLT-4 (linie T lymfoblastů) s výsledkem $1 \pm 1 \%$ růstu a nejvyšší naměřili na linii PANC-1 (linie nádoru slinivky břišní) s hodnotou $42 \pm 3 \%$. Na linii HT29 naměřili druhou nejvyšší hodnotu a to $37 \pm 6 \%$.

Haemanthamin indukoval apoptózu v závislosti na dávce, a to na buněčné linii Jurkat (buněčná linie leukémie). Po aplikaci $20 \mu M$ haemanthaminu došlo po 24 hodinách k 9% brzké

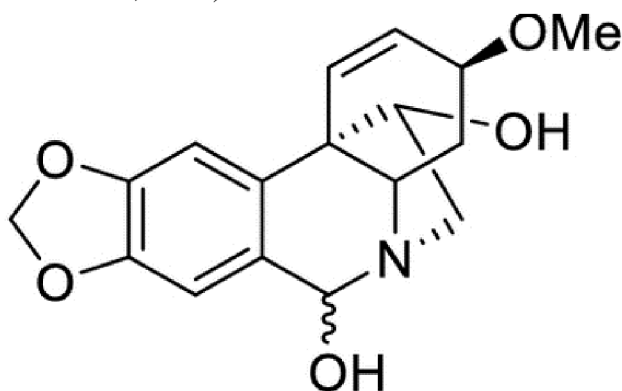
apoptóze a k 28% pozdní apoptóze. Tyto výsledky ukazují na možnosti použití haemanthaminu jako cytotoxického činidla (Havelek et al., 2014).

K indukci apoptózy přispívá zastavení buněčného cyklu. Při koncentraci 5 μM haemanthaminu došlo k nárůstu buněk ve fázi G1 na 55 % v porovnání s kontrolou kde bylo 44 % a ve fázi G2/M na 21 % oproti kontrole 14 %. S tím souvisel pokles ve fázi S oproti kontrole, a to na 24 % v porovnání ku 42 % u kontrolních buněk (Havelek et al., 2014). K ovlivnění buněčného cyklu došlo také na buněčné linii A549 (buněčná linie nádoru plic) po ošetření 10 μM . Po 24 hodinách došlo k velkému vzrůstu buněk ve fázi G1 na 70 %, přičemž kontrola měla 64 % a ve fázi S došlo k poklesu na 13 % v porovnání s kontrolou kde bylo 19 % (Uher et al., 2022).

Ovlivněním syntézy proteinů, jako je inhibice translačních ribozomů, způsobuje haemanthamin cytotoxicitu buněk. Ale to nemusí být jediný způsob. Haemanthamin také stabilizuje protein p53, což je transkripční faktor regulující geny podstatné pro ukončení buněčného cyklu, buněčné smrti a opravě DNA (Doskočil et al., 2015; Pellegrino et al., 2018). Tímto je schopen u nekontrolovatelně množící se buňky ovlivnit její smrt.

Své cytotoxické účinky prokázal haemanthamin na řadě buněčných linií. Uher et al. (2022) testovali jeho cytotoxicitu za použití LDH testu na 10 různých liniích od buněčné linie kolorektálního karcinomu (HT29), po linii nádoru plic (A549) až po linii leukémie (Jurkat). Hodnoty IC_{50} naměřili nejnižší u linie MOLT-4 (linie T lymfoblastů) s hodnotou $1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a nejvyšších hodnotu $2,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ u linie PANC-1 (linie nádoru slinivky břišní). Hodnoty IC_{50} na zmiňovaných liniích byly u HT29 $2,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$, u A549 $1,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ a u linie Jurkat $2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Při použití MTT testu naměřili Doskočil et al. (2015) na stejné buněčné linii HT29 hodnotu cytotoxicity $\text{IC}_{50}=0,59 \pm 0,01 \mu\text{M}$ a na jiné linii kolorektálního karcinomu Caco-2 hodnotu $\text{IC}_{50}=0,99 \pm 0,14 \mu\text{M}$. Zároveň byl testován i cytotoxický efekt na zdravé buněčné linii FHs 74 Int, kde byla cytotoxicita naměřena mnohonásobně vyšší než na nádorových buňkách. Hodnota IC_{50} byla $19,5 \pm 8,9 \mu\text{M}$.

Haemanthidin (Obrázek 3) je alkaloid strukturou velice podobný haemanthaminu s rozdílem toho, že jde o 6-hydroxyderivát. Má též prakticky stejné účinky v inhibici růstu buněk a jejich životaschopnosti, antivirové vlastnosti, ovlivnění apoptózy a ovlivnění buněčného cyklu (Doskočil et al., 2015; Havelek et al., 2014; Masi et al., 2022; Pellegrino et al., 2018; Van Goietsenoven et al., 2010).



Obrázek 3: Strukturální vzorec haemanthidinu

Inhibice růstu byla pozorována na různých buněčných liniích reprezentujících různé tkáně a byla stanovena jejich hodnota GI_{50} , která reprezentuje koncentraci dané látky, která sníží

celkový růst o 50 %. Jednalo se o buněčné linie A2780 (karcinom vaječníku), SW1573 (karcinom plic), T-47D (karcinom prsu) a WiDr (karcinom střev). Pro buněčnou linii A2780 bylo $GI_{50}=1,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$, pro linii SW1573 bylo $GI_{50}=2,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$, pro linii T-47D bylo $GI_{50}=1,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$ a pro linii WiDr bylo $GI_{50}=2,7 \pm 2,0 \mu\text{M}$ (Cedron et al., 2015).

Schopnost haemanthidinu inhibovat životaschopnost buněk byla testována na velkém počtu a typů buněčných linií. Na buněčné linii A549 (linie nádoru plic) dosahoval haemanthidin hodnot inhibiční koncentrace (IC_{50}) $4,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Na linii OE21 (karcinom jícnu) s hodnotou $IC_{50}=3,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$, na dvou různých buněčných liniích tkáně mozku Hs683 (fibroblasty) dosáhl hodnot $IC_{50}=4,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a na U373 (pleomorfní astrocytomy) $IC_{50}=3,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$. U dvou buněčných linií melanomu kůže, jedné lidské (SKMEL) druhé myši (B16F10), měl haemanthidin hodnoty IC_{50} pro SKMEL $4,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a pro B16F10 $3,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Van Goietsenoven et al., 2010). Velmi podobných výsledků dosahoval také na liniích kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2 kde na linii HT29 byla naměřena hodnota $IC_{50}=1,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ a na linii Caco-2 hodnota $IC_{50}=3,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Tyto hodnoty byly v porovnání se zdravou linií střev FHs 74 Int 3-6krát menší. U linie FHs 74 Int byla hodnota $IC_{50}=11,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (Doskočil et al., 2015). I když jsou si haemanthamin a haemanthidin velmi podobné a rozdíl ve struktuře je minimální, tak výsledky cytotoxicity a inhibice růstu jsou odlišné v některých případech až dvojnásobně. Van Goietsenoven et al., (2010) měřili hodnoty IC_{50} na již zmiňovaných 6 různých liniích (A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL a B16F10) jak pro haemanthamin, tak pro haemanthidin a průměrné hodnoty z těchto buněčných linií jsou pro haemanthamin $6,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ a pro haemanthidin $3,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Také u linie AGS (adenokarcinom žaludku) byly naměřeny hodnoty IC_{50} haemanthaminu o polovinu vyšší než u haemanthidinu a to $7,5 \mu\text{M}$ pro haemanthamin a $5,0 \mu\text{M}$ pro haemanthidin po 24 hodinách (Masi et al., 2022). Za to Doskočil et al. (2015) zjistili, že větší účinnost má naopak haemanthamin na buněčných liniích karcinomu střev (HT29 a Caco-2). I ve vztahu k zdravé lidské tkáni střev (FHs 74 Int) byl haemanthamin ($IC_{50}=19,5 \pm 8,9 \mu\text{M}$) méně toxický než haemanthidin ($IC_{50}=11,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$).

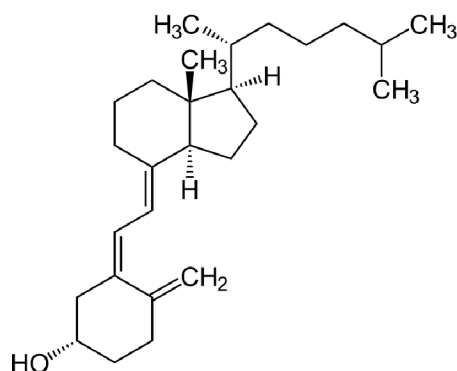
Antivirová aktivita byla již prokázána jak u lykorinu, tak u haemanthaminu a haemanthidinu. Masi et al. (2022) měřili kompletní virovou inhibici haemanthidinu a naměřili hodnotu efektivní koncentrace $EC_{50}=12,7 \mu\text{M}$. Haemanthidin měl vliv na apoptózu v závislosti na koncentraci. Buněčná linie leukémie (Jurkat) měla bez ošetření haemanthidinem 2 % dřívější apoptózy a po ošetření haemanthidinem při koncentraci $5 \mu\text{M}$ měla dřívější apoptózu 7 % a u koncentrace $10 \mu\text{M}$ 18 %, u $15 \mu\text{M}$ 21 % a u koncentrace $20 \mu\text{M}$ 25 %. Míra pozdní apoptózy byla po ošetření stejnými koncentracemi ve stejném pořadí 5 % (bez haemanthaminu), 11 % ($5 \mu\text{M}$), 18 % ($10 \mu\text{M}$), 18 % ($15 \mu\text{M}$) a 18 % ($20 \mu\text{M}$). V porovnání s haemanthaminem měl haemanthidin větší procento indukované apoptózy, což zároveň koreluje s jeho vyšší cytotoxicitou (Havelek et al., 2014).

K ovlivnění buněčného cyklu došlo při koncentraci $15 \mu\text{M}$ haemanthidinu, přičemž došlo k nárůstu ve fázi G2/M v porovnání s kontrolou. Ošetřené buňky byly z 22 % v této fázi, kontrola ze 14 %. Zároveň při stejné koncentraci došlo ke snížení počtu buněk v S fázi na 33 % a u koncentrace $5 \mu\text{M}$ na 23 % oproti kontrole kde bylo 42 % buněk v této fázi (Havelek et al., 2014).

Lykorin a haemanthidin byly vybrány na následné testování ve 3D modelu na nádorových buňkách kolorektálního karcinomu, kvůli jejich protinádorovým a cytotoxickým vlastnostem.

3.2 Vitamín D

Vitamín D je označení pro skupinu příbuzných lipofilních 9,10-sekosteroidů a nejznámější z nich jsou vitamín D₃ (cholecalciferol) (Obrázek 4) a vitamín D₂ (ergocalciferol). Lidské tělo je schopné syntetizovat vitamín D₃ pomocí UV záření o vlnové délce 280-320 nm v buňkách pokožky z provitaminu D₃ (7-dehydrocholesterol). Tento způsob získávání vitamínu D₃ pokrývá jenom část doporučené denní dávky (Velíšek et Hajšlová, 2009).



Obrázek 4: Strukturální vzorec vitamínu D₃

Vitamín D₃ sám o sobě není biologicky aktivní. Po jeho navázání na transportní protein DBP (protein vázající vitamín D) je transportován do jater kde dochází k jeho enzymatické hydroxylaci na 25-hydroxyvitamín D₃ neboli kalcidiol anebo zkráceně 25(OH)D₃. Následně je transportován znovu pomocí DBP do ledvin. V ledvinách v proximálním tubulu dochází k jeho finální hydroxylaci na 1,25(OH)₂D₃. Tímto vzniká hormonálně aktivní forma vitamínu D₃ (Christakos et al., 2015; Lehmann et Meurer, 2010). Tato hydroxylace je moderována hlavně enzymy cytochromu P450 (CYP) CYP11A1 v játrech a enzymy CYP27B1 a CYP24A1 v ledvinách (Christakos et al., 2015; Trump et Aragon-Ching, 2018).

Vitamín D₂ si lidské tělo neumí syntetizovat samo, naproti tomu rostliny a houby ho syntetizovat umí, a to prostřednictvím UVB záření, takže příjem vitamínu D₂ musí být buď skrz potravu anebo suplementací (Bikle, 2014; Lehmann et Meurer, 2010). Vitamín D₂, stejně jako D₃, není biologicky aktivní. Ale díky jejich velké podobnosti, dochází ke stejné hydroxylaci pomocí enzymů cytochromu P450, za vzniku hormonálně aktivní formy vitamínu D₂, 1,25(OH)₂D₂ (Jones, 2012).

Doporučená denní dávka je často udávána v mezinárodních jednotkách (IU), kde v tomto případě se 1 IU rovná 0,025 µg vitamínu D₃ nebo D₂, protože oba typy mají stejnou biologickou aktivitu. Lidský organismus potřebuje denně 2,5-10 µg vitamínu D (100-400 IU/den), který je z části krytý syntézou v buňkách pokožky anebo příjmem z potravin například z masa, mléčných výrobků, ryb, ale také z mrkve, špenátu, zelí, hub a kvasinek. Obsah vitamínu D v sušině je v masu 3 µg/kg, v játrech 2-11 µg/kg, v mléce 1 µg/kg, ve smetaně 4 µg/kg, v másle 10-20 µg/kg, v sýru 8 µg/kg, v mořských rybách 50-450 µg/kg a ve vejcích 30-50 µg/kg. Dále v mrkvi je obsah vitamínu D 0,7 µg/kg, v zelí a špenátu je 0,1 µg/kg, v houbách může být od 2 µg/kg u pěstovaných žampionů až po 130 µg/kg u divoce rostoucích hub a u kvasinek 600-1500 µg/kg. Hlavní uplatnění vitamínu D je v metabolismu vápníku a fosforu, ale zároveň má také úlohu v imunitním systému (Velíšek et Hajšlová, 2009).

3.2.1 Vitamín D a nádorová onemocnění

Stimulací imunitního systému je vitamín D schopný reagovat proti infekcím bakteriálního původu, jako je třeba tuberkulóza, dále byla pozorována funkce reagovat obecně na infekci, na akutní infekci a také mít efekt na autoimunitu. Vitamín D má přirozeně podporující vliv na vrozenou imunitu (Carlberg et Muñoz, 2022).

Mezi další účinky vitamínu D v rámci imunitního systému patří modulace signálních drah buněčného metabolismu. To může vést k ovlivnění růstu, diferenciaci, aktivace, deaktivace anebo dokonce apoptózy některých typů imunitních buněk (Hart et al., 2011). A to v důsledku shody signálních drah pro indukci růstu u imunitních, tak nádorových buněk (Sever et Brugge, 2015). Důsledkem toho může být významná role vitamínu D a jeho význam v apoptóze a protizánětlivé aktivitě nádorových buněk (Carlberg et Muñoz, 2022). Efekt vitamínu D v rámci těchto procesů byl prokázán v řadě studií (Dou et al., 2016; Giammanco et al., 2015; Trump et Aragon-Ching, 2018) společně s inhibicí růstu, zastavením buněčného cyklu ve fázi G0/G1, podporou diferenciaci, a to jak v *in vitro* a také i v *in vivo* podmínkách. Vliv na apoptózu byl pozorován u nádorového onemocnění prostaty, prsu, vaječníků a kolorektálního karcinomu (Giammanco et al., 2015).

Již v roce 1980 vznikla prvotní hypotéza, že vitamín D hraje významnou úlohu v nádorových onemocněních a může představovat faktor, který snižuje riziko vzniku nádorového onemocnění, a i případné úmrtí související s tímto onemocněním (Keum et al., 2019). Epidemiologické studie Feldman et al. (2014) a Holick (2006) prokázaly, že nízký příjem vitamínu D nebo nízký příjem slunečního záření, obecně nízké hladiny vitamínu D v těle, jsou hlavním důvodem ke zvýšenému množství běžných nádorových onemocnění. Přes 3000 studií, včetně skoro 300 epidemiologických studií toto tvrzení podporují. Udávají že vyšší hladiny 25(OH)D jsou spojeny s nižší incidencí různých nádorových onemocnění a vyšší hladiny 1,25(OH)₂D s nižším výskytem karcinomu prostaty, s občasnými výjimkami (Garland et al., 2009). Nekonzistentních výsledků bylo též zjištěno u karcinomu močového měchýře, kde vitamín D je schopný inhibovat proliferaci a indukovat apoptózu nádorových buněk (Zhang et al., 2015). Ale velmi podobné prospěšné výsledky jsou též u vitamínu D přijímaného v potravě a také syntetizovanému pomocí slunečního záření. Zároveň všechny *in vitro* studie, které prováděly testy na tkáňových liniích případně kulturách, pozorovaly vliv metabolitů vitamínu D, 1,25(OH)₂D a do určité míry také 25(OH)D, na inhibici růstu maligních buněk (Garland et al., 2009). Nejen u karcinomu prostaty prokázaly epidemiologické studie prospěšný efekt vitamínu D, ale také u prevence karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu. Jeho prospěšný efekt je způsoben hlavně schopností zprostředkovat diferenciaci buněk, jejich apoptózu a inhibici angiogeneze metastáz (Zhang et al., 2015). Tento prospěšný vliv potvrzuje metaanalýza Ma et al. (2011) kde hladina 25(OH)D v krvi a příjem vitamínu D byly nepřímo spojeny s relativním rizikem vzniku kolorektálního karcinomu. Relativní riziko je poměr mezi skupinou exponovanou danému riziku ku skupině bez expozice danému riziku. Míra relativního rizika pro příjem vitamínu D byla 0,88 (0,80-0,96) a pro hladinu 25(OH)D v krvi byla 0,67 (0,54-0,80).

V jedné indické studii, kde pozorovali deficienci vitamínu D u pacientů s nádorovým onemocněním, zjistili spojitost mezi nimi. U dvou třetin pozorovaných lidí, která čítala 252 pacientů, z toho bylo 56 % ženy, byla zjištěna deficeience vitamínu D. Zároveň zjistili, že

nejvíce náchylní byli pacienti s nádorovým onemocněním horní části trávicího traktu, prsu, kolorektálního karcinomu a vaječnicků a větší deficiencie byla sledována u žen, než u mužů (Pandey et al., 2020).

Obecně jsou důkazy o prospěšnosti a účinnosti vitamínu D nekonzistentní nebo nedostačující, abychom mohli posoudit poměr mezi přínosy a škodami. Bylo prokázáno, že vitamín D nemá velký protektivní vliv na riziko všech malignit, ale projevuje se jako ochranný prostředek pro některé druhy nádorových onemocněních jako jsou karcinom močového měchýře a kolorektální karcinom (Mondul et al., 2017).

3.3 Synergické účinky rostlinných alkaloidů s léčivy (a mikronutrienty)

Alkaloidy z rostlin z čeledě *Amaryllidaceae* prokázaly synergické účinky s konvenčními chemoterapeutiky. Po podání alkaloidů došlo k zesílení cytostatických účinků konvenčních léčiv jako jsou cisplatin, doxorubicin a paklitaxel na nádorové buňky (Jhuly Martins de Paiva et al., 2024). Tyto autoři dále uvádí, že jejich synergický účinek je schopnost snížit chemorezistenci nádorových buněk, a tím zvýšit účinnost léčiv, na které mají nádorové buňky rezistenci. Sancha et al. (2022) se zabývali synergickými účinky specifických alkaloidů z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*. U homolykorinu bylo zjištěno, že má podpůrný efekt u konvenčního léčiva etoposidu. Zjistili to ošetřením buněčné linie MDA-MB-231 (nádorové onemocnění prsu) 1,5 μM homolykorinem spolu s etoposidem v koncentracích 0,8, 1,5 a 3 μM po dobu 48 hodin. Zároveň nepozorovali žádné synergické účinky po ošetření stejného množství homolykorinu i etoposidu na buněčné linii HFF-1 (netumorogenní fibroblast předkožky). Sancha et al. (2024) testovali deriváty lykorinu a homolykorinu na nádorových buňkách vaječníku (HOC/ADR). Po kombinaci s protinádorovým léčivem doxorubicinem došlo až k 35 \times zvýšení citlivosti na léčiva. Toto zjištění potrhuje jejich potenciál jako obraceče vícelékové rezistence. Navíc deriváty lykorinu a homolykorinu vykazovaly buď žádnou nebo velmi malou až střední cytotoxicitu na buňky, kromě lykorinu, který dosáhl hodnot IC_{50} při koncentraci 1,2-2,5 μM . Další specifický alkaloid z *Amaryllidaceae*, jonquailine, prokázal synergické účinky s již zmiňovaným paklitaxelem. Po jejich společném použití měl jonquailin antiproliferační účinky na nádorové buňky plic, které měly resistenci na léčiva (Karakoyun et al., 2019).

Synergické či jiné účinky biologicky aktivních látek obsažených v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae* se složkami stravy, zejména s mikronutrienty, nejsou doposud v literatuře popsány. Protože jsou ale informace, že zvýšený příjem vitamínu D působí pozitivně při léčbě nádorových onemocnění a látky z rostlin *Amaryllidaceae* vykazují cytotoxické účinky, je tato práce zaměřena na zkoumání spolupůsobení biologicky aktivních látek obsažených v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae* a vitamínu D na nádorové buňky.

4 Metodika

4.1 Použité materiály

Testované extrakty alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* (A = extrakt lykorinu, B = extrakt haemanthidinu), byly poskytnuty farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Jejich příprava byla dle (Doskočil et al., 2015). Vitamin D₃ (1 α ,25-dihydroxycholecalciferol, kalcitriol, 99%) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (CZ).

Pro testování extraktů byla použita buněčná linie kolorektálního karcinomu HT29. Tato linie byla zakoupena z European Collection of Cell Culture (ECACC). Eagle's minimum essential medium (EMEM) bylo koupeno od American Type Culture Collection (ATCC) (US), kultivační médium Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM), neesenciální aminokyseliny, pyruvát sodný, hydrogenuhličitan sodný, roztok penicilin-streptomycinu, trypsinu a fosfátový pufr (PBS) byly zakoupeny od Biowest (Biowest, USA), fetální bovinní sérum (FBS) od Sigma-Aldrich (CZ), 3 (4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetraazolium bromid (MTT), který byl získán od Thermo fisher scientific (US). Dimethylsulfoxid (DMSO) a etanol (EtOH) byly zakoupeny od Lach-Ner (CZ). Nucleon Sphera 96-jamkové destičky, 96-jamková mikrotitrační destička, kultivační láhve a serologické pipety byly pořízeny od ThermoFisher (UK). Čtečka mikrotitračních destiček Tecan SPARK byla od firmy Tecan (Švýcarsko).

4.2 Metodika experimentů

4.2.1 Kultivace buněčných linií

Buněčná linie HT29 byla kultivována v kompletním růstovém mediu složeném z DMEM s přídavkem 10 % FBS, 1 % roztokem penicilinu a streptomycinu, 1 % hydrogenuhličitanem sodným, 1 % pyruvát sodným, 1 % neesenciálními aminokyselinami. Buněčná linie byla kultivována až do 90% konfluency v |CO₂ inkubátoru s 5 % CO₂ a vlhčenou atmosférou. Po dosažení požadované konfluency v kultivační láhvi byla buněčná monovrstva propláchnuta pomocí PBS a následně bylo přidáno 5 ml 1% trypsinu na dobu přibližně 3 minut, než došlo k uvolnění buněk. Následně bylo přidáno 5 ml kompletního růstového media na zastavení procesu trypsinizace. Následně byla suspenze převedena do 15ml zkumavky typu Falcon a centrifugována po dobu 10 minut a 200 × g. Následně byl odstraněn supernatant a buněčná peleta byla rozpuštěna v 5 ml kompletního růstového media.

Poté bylo odebráno 50 μ l suspenze a smíchána se stejným objemem tropanové modře. Následně ze suspenze bylo odebráno 10 μ l a přeneseno na chip, kde došlo ke spočítání životaschopnosti pomocí EVETM automatické čtečky buněk (NanoEntek) (Kouřimský, 2022; Rubešová, 2022). Na závěr bylo vypočtené potřebné ředění na získání buněčné suspenze o koncentraci 1000 buněk 100 μ l.

4.2.2 Příprava sféroidů

Příprava sféroidů byla provedena dle Rubešová (2022), kde bylo založení sféroidů podle postupu dle (Gupta, 2020) s jistými úpravami. Získaná buněčná suspenze o koncentraci 1000 buněk na 100 μ l byla pipetována do speciální destičky s kulatým dnem určené na práci se

sféroidy. Destička byla následně centrifugována po dobu 5 minut a $250 \times g$ a poté velmi opatrně přenesena do CO₂ inkubátoru s 5% CO₂ a vlhčenou atmosférou, kde byla takto kultivována po dobu 72 hodin. Následně byla destička vyfocena pomocí inverzního mikroskopu ZEEIS s kamerou Axio 305color. Po pořízení fotografií z jednotlivých jamek bylo z jamek odebráno 100 μ l starého média a přidáno 100 μ l nového media obsahujícího 2 \times koncentrace testovaných složek. Kalcitriol byl přidán v množství 140 nM a finální koncentraci 70 nM. Koncentrace přidaného vitamínu D byla stanovena dle Ahn et al. (2008) a Pludowski et al. (2018). Testované látky byly ve finální koncentraci 5; 2,5; 1,25 a 0,625 μ M. Tento proces se opakoval každý druhý den, kdy byly pořízené fotografie a odebráno 100 μ l starého media a nahrazeno stejným objemem s testovanými látkami. Takto byly pořizovány fotografie celkem 12 dní a poté dvakrát jednou za 3 dny, dohromady tedy 18 dnů. Následně byly fotografie analyzovány pomocí programu Fiji ImagenJ. Velikost sféroidů byla vypočítána dle Pühr et al. (2018).

4.2.3 Stanovení cytotoxicity

Současně se sféroidy byla stanovena cytotoxicita dle Doskočil et al. (2016), kdy byly otestovány totožné alkaloidy. Byl k tomu použit test dle Mosmannem (1983) využívající tetraziolovou sůl MTT. Buněčná linie HT29 byla vysazena na 96-jamkové destičky v hustotě $2,5 \times 10^3$ /ml. Po 24 hodinové inkubaci bylo odstraněno původní médium a nahrazeno 100 μ l nového EMEM obsahující vzorek rozpuštěný sériovým ředěním v koncentraci 10-0,625 μ g/ml. Destička byla následně inkubována dalších 72 hodin.

Po uplynutí 72 hodin bylo původní médium se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 μ l nového EMEM obsahující MTT v koncentraci 1 mg/ml po dobu 2 hodin. Poté bylo médium s MTT odstraněno a nahrazeno 100 μ l DMSO. Absorbance byla následně změřena při 555 nm pomocí spektrofotometru Tecan SPARK (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko) a byl spočítán procentuální podíl života schopnosti (hodnota IC₅₀) ve srovnání s neošetřenou kontrolou.

4.2.4 Statistické vyhodnocení

Získaná data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Statistické výpočty byly provedeny pomocí programů Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) a Statistica v.12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). K vyhodnocení rozdílů mezi vzorky byla použita dvoufaktorová analýza rozptylů (ANOVA) s následným post-hoc Scheffeho testem a hladinou pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky

V práci byl pozorován vliv suplementace vitamínu D na zvýšení účinnosti alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* na buněčné linii kolorektálního karcinomu HT29 ve 3D modelu a současně i porovnání s klasickou 2D metodou testování využívající MTT.

Pro porovnání cytotoxického účinku alkaloidů na 3D modelu byla sledována cytotoxicita stejných extraktů na modelu 2D za stejných podmínek. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1, která uvádí hodnoty inhibiční koncentrace (IC_{50}) kdy dochází k 50% inhibici jednotlivých alkaloidů s přidáním anebo bez přidání vitamínu D. Alkaloidy s vitamínem D dosahovaly vyšších hodnot inhibiční koncentrace než extrakty bez přidaného vitamínu D.

Tabulka 1: Inhibiční koncentrace lykorinu a haemanthidinu na buněčné linii HT29

Látka	IC_{50} (μ M/ml) Průměr \pm SD
Látka A s kalcitriolem	2,29 \pm 0,13
Látka A bez kalcitriolu	2,02 \pm 0,19
Látka B s kalcitriolem	4,92 \pm 0,64
Látka B bez kalcitriolu	4,73 \pm 0,55

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr $IC_{50} \pm$ směrodatná odchylka. A = extrakt lykorinu, B = extrakt haemanthidinu.

Podrobné výsledky naměřených hodnot ze všech jednotlivých měření na 3D modelu jsou uvedeny v Příloze 1. V Tabulce 2 jsou pak uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z těchto výsledků ve všech měřených dnech dohromady. Na základě analýzy rozptylů bylo zjištěno, že kontrolní vzorek se lišil od všech ostatních. Vzorky s přídavkem vitamínu D ve formě kalcitriolu se též odlišovaly od všech ostatních vzorků, kromě vzorku BD s koncentrací 0,625 μ M. Je vidět, že samotný přídavek vitamínu D má vliv na schopnost růstu buněčné linie HT29 ve 3D modelu. Dále je z Tabulky 2 vidět, že oba testované extrakty z rostliny z čeledi *Amaryllidaceae* měly statisticky významně odlišnou schopnost zpomalit růst nádorových buněk, která se zvyšovala s rostoucí koncentrací přidaného extraktu. V některých případech se vzorky o stejné koncentraci extraktu nelišily od vzorků, kde byl přidán vitamín D, v některých případech byly ale zjištěny statisticky významné rozdíly.

Při podrobné dvoufaktorové analýze rozptylu s interakcemi všech vzorků v závislosti na dni měření byly zjištěny, jak statisticky významný vliv dne, vzorku, tak i spolupůsobení obou faktorů. Jelikož se vliv dne ukázal jako nejsilnější faktor ($F=537$) oproti vzorku ($F=397$) byly propočteny rozdíly mezi jednotlivými vzorky v každém daném dni, které jsou pro lykorin uvedeny v Tabulce 3 a pro haemanthidine v Tabulce 4.

Tabulka 2: Výsledky stanovení objemu všech měřených vzorků

Vzorek	Hodnota (mm ³) Průměr ± SD	Vzorek	Hodnota (mm ³) Průměr ± SD
Kontrola	0,01778 ± 0,01400 ^a	Kalcitriol	0,01321 ± 0,00836 ^b
A 5 μM	0,00316 ± 0,00043 ^j	B 5 μM	0,00374 ± 0,00049 ⁱ
A 2,5 μM	0,00506 ± 0,00138 ^{h,i}	B 2,5 μM	0,00568 ± 0,00167 ^h
A 1,25 μM	0,00650 ± 0,00202 ^{g,h}	B 1,25 μM	0,00910 ± 0,00436 ^{e,f}
A 0,625 μM	0,00820 ± 0,00326 ^{f,g}	B 0,625 μM	0,01122 ± 0,00619 ^{c,d}
AD 5 μM	0,00357 ± 0,00069 ^{i,j}	BD 5 μM	0,00352 ± 0,00066 ^{i,j}
AD 2,5 μM	0,00562 ± 0,00193 ^h	BD 2,5 μM	0,00644 ± 0,00237 ^{g,h}
AD 1,25 μM	0,00819 ± 0,00349 ^{f,g}	BD 1,25 μM	0,01069 ± 0,00628 ^{d,e}
AD 0,625 μM	0,00974 ± 0,00458 ^{d,e,f}	BD 0,625 μM	0,01306 ± 0,00859 ^{b,c}

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr objemu ± směrodatná odchylka. Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. A = extrakt lykorinu, B = extrakt haemanthidinu, D = vzorky s přidavkem vitamínu D.

Tabulka 3: Výsledky stanovení objemu vzorků s přidavkem lykorinu a vitamínu D v jednotlivých dnech

Den měření	Den 0	Den 2	Den 4
Vzorek	Hodnota (mm ³) průměr ± SD		
Kontrola	0,00224 ± 0,00025 ^a	0,00392 ± 0,00046 ^a	0,00661 ± 0,00078 ^a
Kalcitriol	0,00263 ± 0,00023 ^a	0,00400 ± 0,00026 ^a	0,00636 ± 0,00045 ^a
A 5 μM	0,00274 ± 0,00017 ^a	0,00274 ± 0,00017 ^{c,d}	0,00321 ± 0,00019 ^d
A 2,5 μM	0,00266 ± 0,00016 ^a	0,00317 ± 0,00025 ^{a,b,c,d}	0,00422 ± 0,00045 ^{c,d}
A 1,25 μM	0,00272 ± 0,00012 ^a	0,00368 ± 0,00011 ^{a,b,c}	0,00543 ± 0,00015 ^{a,b,c}
A 0,625 μM	0,00277 ± 0,00017 ^a	0,00382 ± 0,00026 ^{a,b}	0,00563 ± 0,00044 ^{a,b,c}
AD 5 μM	0,00257 ± 0,00015 ^a	0,00256 ± 0,00017 ^d	0,00315 ± 0,00021 ^d
AD 2,5 μM	0,00243 ± 0,00019 ^a	0,00295 ± 0,00023 ^{b,c,d}	0,00433 ± 0,00043 ^{b,c,d}
AD 1,25 μM	0,00251 ± 0,00019 ^a	0,00342 ± 0,00031 ^{a,b,c,d}	0,00561 ± 0,00042 ^{a,b,c}
AD 0,625 μM	0,00256 ± 0,00036 ^a	0,00369 ± 0,00038 ^{a,b,c}	0,00599 ± 0,00059 ^{a,b}

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr objemu ± směrodatná odchylka. Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. A = extrakt lykorinu, D = vzorky s přidavkem vitamínu D.

Tabulka 3 - pokračování

Den měření	Den 6	Den 8	Den 10
Vzorek	Hodnota (mm ³) průměr ± SD		
Kontrola	0,00999 ± 0,00108 ^a	0,01452 ± 0,00163 ^a	0,01986 ± 0,00192 ^a
Kalcitriol	0,00937 ± 0,00071 ^{a,b}	0,01220 ± 0,00074 ^b	0,01541 ± 0,00082 ^b
A 5 μM	0,00327 ± 0,00029 ^f	0,00347 ± 0,00040 ^g	0,00354 ± 0,00027 ^g
A 2,5 μM	0,00522 ± 0,00045 ^{d,e,f}	0,00559 ± 0,00049 ^{e,f,g}	0,00597 ± 0,00055 ^{e,f,g}
A 1,25 μM	0,00700 ± 0,00032 ^{c,d}	0,00797 ± 0,00030 ^{c,d,e}	0,00842 ± 0,00044 ^{d,e}
A 0,625 μM	0,00796 ± 0,00047 ^{b,c}	0,00933 ± 0,00065 ^{c,d}	0,01063 ± 0,00080 ^{c,d}
AD 5 μM	0,00360 ± 0,00023 ^{e,f}	0,00392 ± 0,00033 ^{f,g}	0,00407 ± 0,00017 ^{f,g}
AD 2,5 μM	0,00569 ± 0,00045 ^{d,e}	0,00660 ± 0,00065 ^{d,e,f}	0,00712 ± 0,00033 ^{e,f}
AD 1,25 μM	0,00788 ± 0,00036 ^{b,c}	0,00996 ± 0,00047 ^{b,c}	0,01111 ± 0,00048 ^{c,d}
AD 0,625 μM	0,00883 ± 0,00063 ^{a,b,c}	0,01086 ± 0,00057 ^{b,c}	0,0134 ± 0,00064 ^{b,c}

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr objemu ± směrodatná odchylka. Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. A = extrakt lykorinu, D = vzorky s přidavkem vitamínu D.

Tabulka 3 - pokračování

Den měření	Den 12	Den 15	Den 18
Vzorek	Hodnota (mm ³) průměr ± SD		
Kontrola	0,02544 ± 0,00313 ^a	0,03759 ± 0,00644 ^a	0,04297 ± 0,00672 ^a
Kalcitriol	0,01842 ± 0,00084 ^b	0,02398 ± 0,00216 ^b	0,02846 ± 0,00130 ^b
A 5 μM	0,00352 ± 0,00022 ^e	0,00324 ± 0,00038 ^d	0,00269 ± 0,00035 ^d
A 2,5 μM	0,00620 ± 0,00050 ^e	0,00648 ± 0,00047 ^{c,d}	0,00601 ± 0,00061 ^{c,d}
A 1,25 μM	0,00810 ± 0,00037 ^{d,e}	0,00807 ± 0,00079 ^{c,d}	0,00712 ± 0,00066 ^{c,d}
A 0,625 μM	0,01115 ± 0,00085 ^{c,d}	0,01171 ± 0,00083 ^{c,d}	0,01080 ± 0,00153 ^{c,d}
AD 5 μM	0,00431 ± 0,00020 ^e	0,00434 ± 0,00031 ^d	0,00365 ± 0,00038 ^{c,d}
AD 2,5 μM	0,00737 ± 0,00036 ^{d,e}	0,00790 ± 0,00063 ^{c,d}	0,00642 ± 0,00062 ^{c,d}
AD 1,25 μM	0,01147 ± 0,00044 ^{c,d}	0,01132 ± 0,00154 ^{c,d}	0,01119 ± 0,00177 ^{c,d}
AD 0,625 μM	0,01406 ± 0,00042 ^c	0,01513 ± 0,00081 ^c	0,01427 ± 0,00049 ^c

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr objemu ± směrodatná odchylka. Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. A = extrakt lykorinu, D = vzorky s přidavkem vitamínu D.

Z Tabulky 3 můžeme vidět, že ve dni 0 není statisticky významný rozdíl mezi vzorky. V 8. dnu dochází ke vzniku statisticky významného rozdílu mezi kontrolním vzorkem a vitamínem D a také mezi ostatními vzorky a kontrolním vzorkem. Tyto rozdíly přetrvávají po zbytek měření. Ke statistickému rozdílu mezi vitamínem D a ostatními vzorky, dochází ve 12. dni. Od 15. dne došlo k vytvoření čtyř statisticky odlišných skupin z toho jedna kontrolní vzorek, druhá vitamín D a zbylé dvě skupiny obsahovaly pouze vzorky s extrakty z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*. Tyto dvě skupiny se lišily v tom, že jedna neobsahuje vzorek A s koncentrací 5 μM a druhá vzorek AD s koncentrací 0,625 μM. Statisticky významný rozdíl mezi vzorkem pouze s rostlinným extraktem a vzorkem s extraktem a přidáním vitamínu D se neprokázal u žádné dvojice vzorků o stejné koncentraci extraktu po celou dobu měření.

Tabulka 4: Výsledky stanovení objemu vzorků s přidavkem haemanthidinu a vitamínu D v jednotlivých dnech

Den měření	Den 0	Den 2	Den 4
Vzorek	Hodnota (mm ³) průměr ± SD		
Kontrola	0,00224 ± 0,00025 ^b	0,00392 ± 0,00046 ^a	0,00661 ± 0,00078 ^a
Kalcitriol	0,00263 ± 0,00023 ^{a,b}	0,00400 ± 0,00026 ^a	0,00636 ± 0,00045 ^a
B 5 μM	0,00281 ± 0,00017 ^{a,b}	0,00326 ± 0,00008 ^{a,b}	0,00394 ± 0,00023 ^{c,d}
B 2,5 μM	0,00248 ± 0,00018 ^{a,b}	0,00351 ± 0,00017 ^{a,b}	0,00477 ± 0,00025 ^{b,c,d}
B 1,25 μM	0,00282 ± 0,00009 ^{a,b}	0,00367 ± 0,00015 ^{a,b}	0,00541 ± 0,00018 ^{a,b,c}
B 0,625 μM	0,00288 ± 0,00005 ^{a,b}	0,00383 ± 0,00019 ^a	0,00607 ± 0,00030 ^{a,b}
BD 5 μM	0,0024 ± 0,00035 ^{a,b}	0,00277 ± 0,00023 ^b	0,00367 ± 0,00033 ^d
BD 2,5 μM	0,00261 ± 0,00015 ^{a,b}	0,00331 ± 0,00024 ^{a,b}	0,00468 ± 0,00048 ^{b,c,d}
BD 1,25 μM	0,00258 ± 0,00008 ^{a,b}	0,00346 ± 0,00017 ^{a,b}	0,00565 ± 0,00054 ^{a,b,c}
BD 0,625 μM	0,00259 ± 0,00023 ^a	0,00379 ± 0,00040 ^a	0,00617 ± 0,00066 ^{a,b}

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr objemu ± směrodatná odchylka. Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, B = extrakt haemanthidinu, D = vzorky s přidavkem vitamínu D.

Tabulka 4 - pokračování

Den měření	Den 6	Den 8	Den 10
Vzorek	Hodnota (mm ³) průměr ± SD		
Kontrola	0,00999 ± 0,00108 ^a	0,01452 ± 0,00163 ^a	0,01986 ± 0,00192 ^a
Kalcitriol	0,00937 ± 0,00071 ^{a,b}	0,01220 ± 0,00074 ^{b,c}	0,01541 ± 0,00082 ^b
B 5 μM	0,00428 ± 0,00022 ^e	0,00428 ± 0,00019 ^{f,g}	0,00395 ± 0,00005 ^e
B 2,5 μM	0,00599 ± 0,00038 ^{d,e}	0,00660 ± 0,00047 ^{e,f,g}	0,00711 ± 0,00051 ^{d,e}
B 1,25 μM	0,00716 ± 0,00025 ^{c,d}	0,00915 ± 0,00031 ^{b,d,e}	0,01093 ± 0,00055 ^{c,d}
B 0,625 μM	0,00824 ± 0,00042 ^{a,b,c,d}	0,01050 ± 0,00056 ^{b,c,d}	0,01311 ± 0,00026 ^{b,c}
BD 5 μM	0,00439 ± 0,00044 ^e	0,00402 ± 0,00030 ^g	0,00388 ± 0,00011 ^e
BD 2,5 μM	0,00628 ± 0,00081 ^{d,e}	0,00745 ± 0,00075 ^{d,e,f}	0,00826 ± 0,00062 ^d
BD 1,25 μM	0,0078 ± 0,00070 ^{b,c,d}	0,01048 ± 0,00097 ^{b,c,d}	0,01309 ± 0,00096 ^{b,c}
BD 0,625 μM	0,00903 ± 0,00094 ^{a,b,c}	0,01222 ± 0,00159 ^b	0,01518 ± 0,00195 ^b

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr objemu ± směrodatná odchylka. Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. B = extrakt haemanthidinu, D = vzorky s přidavkem vitamínu D.

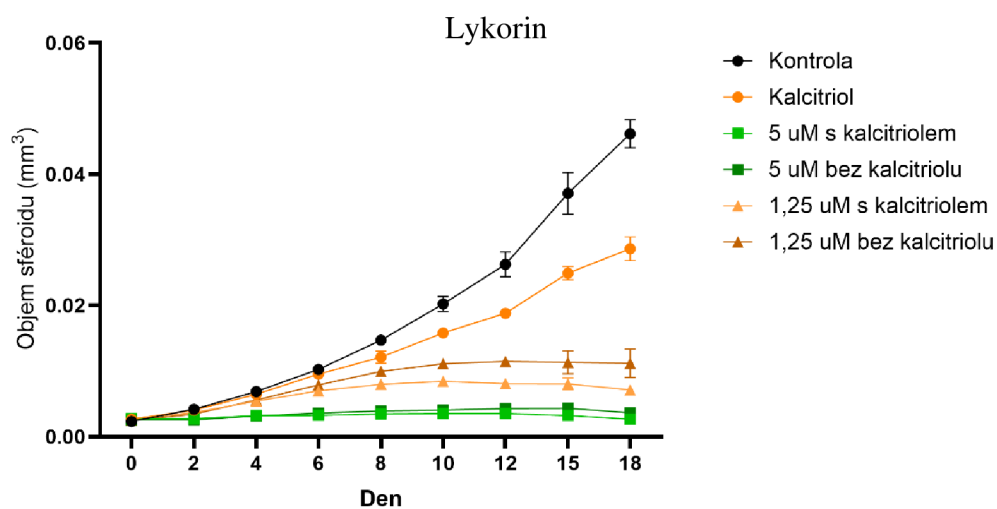
Tabulka 4 - pokračování

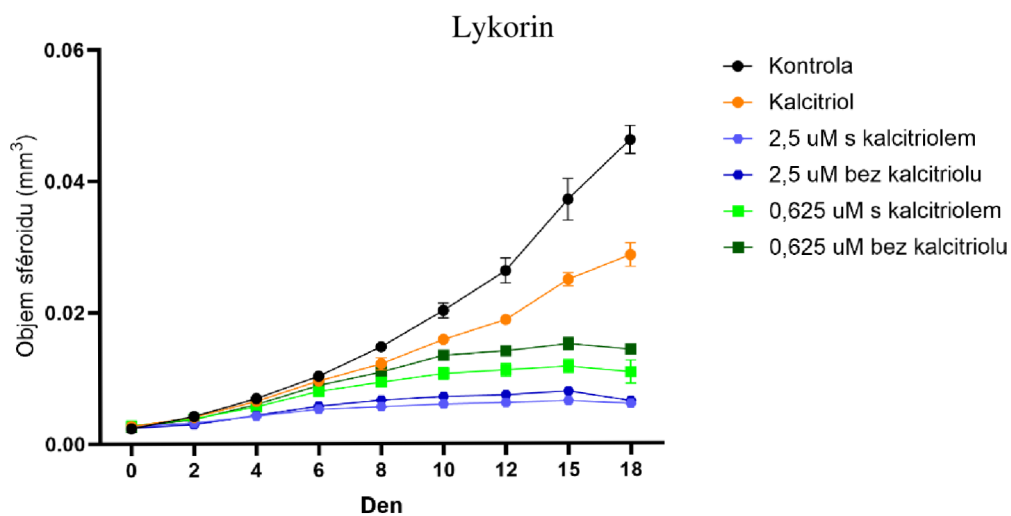
Den měření	Den 12	Den 15	Den 18
Vzorek	Hodnota (mm ³) průměr ± SD		
Kontrola	0,02544 ± 0,00313 ^a	0,03759 ± 0,00644 ^a	0,04297 ± 0,00672 ^a
Kalcitriol	0,01842 ± 0,00084 ^b	0,02398 ± 0,00216 ^{b,c}	0,02846 ± 0,00130 ^b
B 5 μM	0,00375 ± 0,00013 ^e	0,00373 ± 0,00042 ^e	0,00367 ± 0,00021 ^e
B 2,5 μM	0,00714 ± 0,00037 ^{d,e}	0,00714 ± 0,00042 ^e	0,00640 ± 0,00039 ^{d,e}
B 1,25 μM	0,01215 ± 0,00028 ^{c,d}	0,01397 ± 0,00099 ^{b,d,e}	0,01667 ± 0,00043 ^{c,d}
B 0,625 μM	0,01527 ± 0,00098 ^{b,c}	0,01860 ± 0,00123 ^{b,c,d}	0,02252 ± 0,00117 ^{b,c}
BD 5 μM	0,00371 ± 0,00025 ^e	0,00345 ± 0,00023 ^e	0,00337 ± 0,00036 ^e
BD 2,5 μM	0,00839 ± 0,00060 ^{d,e}	0,00913 ± 0,00096 ^{d,e}	0,00832 ± 0,00069 ^{d,e}
BD 1,25 μM	0,01535 ± 0,00117 ^{b,c}	0,01903 ± 0,00206 ^{b,c,d}	0,02149 ± 0,00109 ^{b,c}
BD 0,625 μM	0,01866 ± 0,00242 ^b	0,02466 ± 0,00361 ^b	0,02841 ± 0,00328 ^b

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr objemu ± směrodatná odchylka. Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. B = extrakt haemanthidinu, D = vzorky s přidavkem vitamínu D.

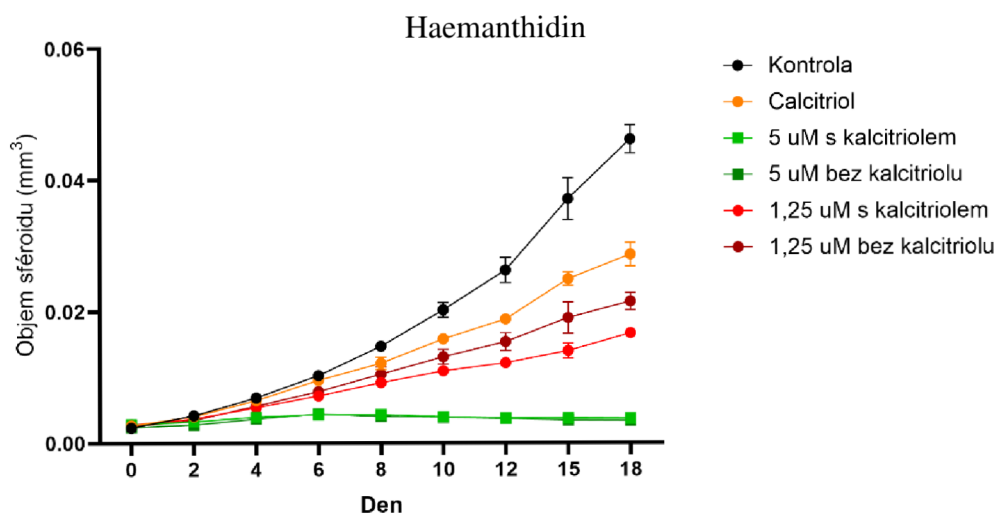
Z Tabulky 4 můžeme vidět, že ve dni 0 došlo ke statisticky významnému rozdílu hodnot u kontrolního vzorku a vzorku BD 0,625 μM. Ke statisticky významnému rozdílu mezi kontrolním vzorkem a vitamínem D dochází v 8. dni. V tom samém dni dochází také ke statisticky významnému rozdílu mezi kontrolním vzorkem a ostatními vzorky. Statisticky významný rozdíl mezi vitamínem D a všemi vzorky se neobjevuje po dobu měření. V 6. dni se ale objevuje statisticky významný rozdíl mezi vzorkem pouze s vitamínem D a vzorky s koncentrací účinné látky vyšší než 2,5 μM. Statisticky významný rozdíl mezi vzorkem s přidáním vitamínu D a bez přidavku se neobjevuje po celou dobu měření.

Grafické znázornění změn objemů sféroidů ošetřených lykorinem a haemanthidinem je na Obrázcích 5 až 8. Pro lepší názornost jsou na Obrázcích 5 a 7 uvedeny hodnoty pro nejvyšší koncentraci 5 μM a pro druhou nejnižší koncentraci 1,25 μM. Na Obrázcích 6 a 8 jsou hodnoty pro nejnižší koncentraci 0,625 μM a pro druhou nejvyšší koncentraci 2,5 μM.

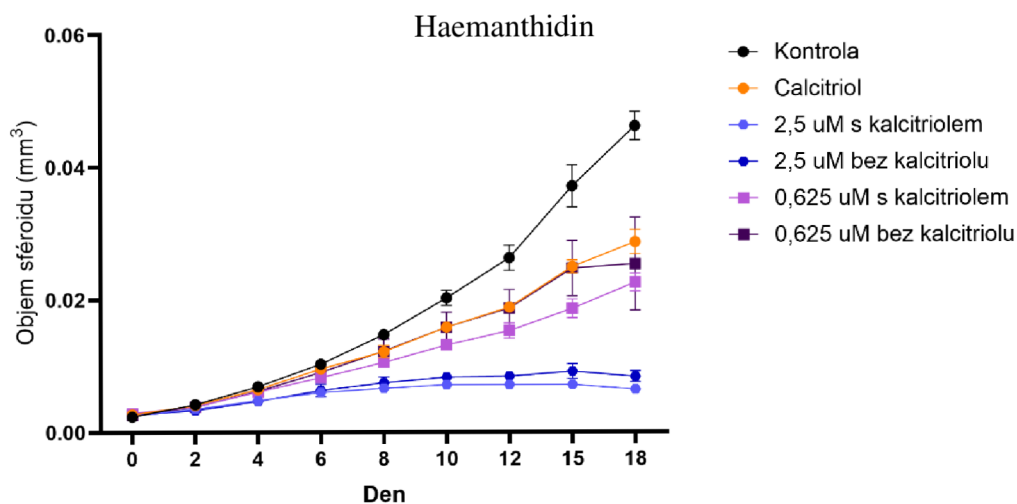
**Obrázek 5:** Graf změn objemů sféroidů v závislosti na dnech



Obrázek 6: Graf změn objemů sféroidů v závislosti na dnech



Obrázek 7: Graf změn objemů sféroidů v závislosti na dnech



Obrázek 8: Graf změn objemů sféroidů v závislosti na dnech

6 Diskuze

V práci byl pozorován vliv suplementace vitamínu D na zvýšení účinnosti alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* na buněčné linii kolorektálního karcinomu HT29 ve 3D modelu a současně porovnání s klasickou 2D metodou testování využívající MTT. Vliv vitamínu D na redukování růstu nádorových buněk se ukázal jako pozitivní a dosahoval statisticky výrazných rozdílů oproti kontrolnímu vzorku. Toto zjištění je v souladu s výsledky Zhang et al. (2015), kteří prokázali vliv vitamínu D na růst buněk kolorektálního karcinomu na 2D modelu. Také Hasan et al. (2019) prokázali účinek vitamínu D na 2D modelu, a dokonce i na 3D modelu, ale na buňkách nádorového onemocnění prsu linie T47D. Efektu vitamínu D dosáhli při koncentraci 50 a 100 μM na 2D modelu, za to u 3D modelu pozorovali efekt jen u koncentrace 100 μM . V našem případě jsme pozorovali vliv vitamínu D na inhibici růstu při koncentraci 70 μM ve 3D modelu na námi testované buněčné linii kolorektálního karcinomu.

Alkaloidy z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* měly vyšší účinnost proti nádorovým buňkám než samotný vitamín D a dosahovaly statisticky významných rozdílů oproti kontrolnímu vzorku. Antiproliferační účinek pozorovali i Doskočil et al. (2015), ale ve 2D modelu na stejné buněčné linii HT29, kde dosáhli hodnot IC_{50} u lykorinu $1,2 \pm 0 \mu\text{M}$ a u haemanthidinu $1,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$. D. D. Liu et al. (2017) též pozorovali inhibiční koncentraci lykorinu a naměřili její hodnotu na 3,35 μM . Havelek et al. (2017) pozorovali hodnotu IC_{50} u haemanthidinu na stejné buněčné linii HT29 a naměřili inhibiční koncentraci $1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

Po přidání vitamínu D k alkaloidům z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* byla pozorována synergická tendence účinku na buněčnou linii kolorektálního karcinomu HT29, ale nebyla statisticky prokázána v žádné ze sledovaných koncentracích. V literárních zdrojích nebylo ale doposud zjištěno, že by se někdo obdobné problematice věnoval. Zjištěné výsledky není možné tedy porovnat s jinými autory. Synergické účinky vitamínu D byly ale pozorovány s jinými látkami než alkaloidy z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*. Yang et al. (2023) zkoumali synergický účinek vitamínu D s alkaloidem neferinem pocházejícím z rostliny z čeledi *Nelumbonaceae* na jiné buněčné linii kolorektálního karcinomu HCT-116. Zjistili, že po přidání 0,1 μM vitamínu D a 5 μM neferinu došlo k indukci buněčné smrti o 50 % než při stejných koncentracích, ale použití zkoumaných látek odděleně. Dále Sha et al. (2013) a Wicks et al. (2019) sledovali synergický účinek vitamínu D s vitamínem A. Sha et al. (2013) pozorovali statisticky významný rozdíl v inhibici růstu na buněčné linii karcinomu prostaty PC-3 po přidání 10 $\mu\text{mol/l}$ vitamínu A a 10 nmol/l vitamínu D oproti buněčné linii ošetřené vitamínem A a vitamínem D nezávisle na sobě. Zato Wicks et al. (2019) testovali jejich synergický vliv na buněčných liniích kolorektálního karcinomu HCT-116 a SW480 a také na buněčných liniích karcinomu žaludku AGS a NCI-N87. Testovali, jak synergický vliv vitamínu D_2 a D_3 a poté i obou vitamínů s vitamínem A. Jejich naměřené hodnoty IC_{50} na všech testovaných buněčných liniích se pohybovaly od 5-6 μM u synergického účinku obou vitamínů D a po kombinaci s vitamínem A dosáhly IC_{50} od 2,6 po 5,6 μM také na všech testovaných liniích.

Práce přináší originální výsledky o vlivu vitamínu D na růst buněčné linie HT29 ve 3D modelu a o jeho spolupůsobení s extrakty z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*. Vliv vitamínu D na růst buněk byl průkazný oproti kontrole, a bylo by dobré do budoucna se této problematice věnovat. Onkologičtí pacienti bývají často vitamín D deficitní, takže by suplementace tímto vitamínem mohla podpořit účinnost jejich léčby.

Také by bylo zajímavé se věnovat vlivu alkaloidů na nádorové buňky a jejich interakcím s jinými případnými léčivy, která jsou podávána onkologickým pacientům. U biologicky aktivních látek z čeledi *Amaryllidaceae* bude také do budoucna důležité testovat jejich případné využití jako léčivo a prověřit jejich účinek v klinických studiích.

7 Závěr

- V práci bylo zjištěno, že přidavek vitamínu D k alkaloidům z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* vede ke zvýšení jejich účinnosti, ale ne na statisticky významné úrovni.
- Bylo též zjištěno, že přidavek samotného vitamínu D má vliv na zpomalení růstu buněk kolorektálního karcinomu.
- Cytotoxický vliv alkaloidů z rostlin z čeledi *Amaryllidaceae* byl silnější, než vliv samotného vitamínu D.
- Alkaloidy rostlin z čeledi *Amaryllidaceae*, u kterých bylo prokázáno zpomalení růstu nádorových buněk ve 2D modelu, zpomalily též růst nádorových buněk ve 3D modelu.

8 Literatura

- Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y. 2016. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 17 (14). 1213–1221.
- Ahn, J., Peters, U., Albanes, D., Purdue, M. P., Abnet, C. C., Chatterjee, N., Horst, R. L., Hollis, B. W., Huang, W. Y., Shikany, J. M., Hayes, R. B. 2008. Serum Vitamin D Concentration and Prostate Cancer Risk: A Nested Case–Control Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 100 (11). 796–804. doi: 10.1093/JNCI/DJN152.
- Bendaif, H., Melhaoui, A., Ramdani, M., Elmsellem, H., Douez, C., El Ouadi, Y. 2018. Antibacterial activity and virtual screening by molecular docking of lycorine from *Pancreaticum foetidum* Pom (Moroccan endemic Amaryllidaceae). *Microbial Pathogenesis*. 115 . 138–145. doi: 10.1016/J.MICPATH.2017.12.037.
- Besse, J. P., Latour, J. F., Garric, J. 2012. Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International*. 39 (1). 73–86. doi: 10.1016/J.ENVINT.2011.10.002.
- Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., Miłowska, K. 2020. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (17). 1–17. doi: 10.3390/IJMS21176225.
- Bikle, D. D. 2014. Chemistry & Biology Review Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemistry & Biology*. 21 . doi: 10.1016/j.chembiol.2013.12.016.
- Blakeley, J., Grossman, S. A. 2012. Chemotherapy with cytotoxic and cytostatic agents in brain cancer. *Handbook of Clinical Neurology*. 104 . 229–254. doi: 10.1016/B978-0-444-52138-5.00017-7.
- Cahlíková, L., Kawano, I., Řezáčová, M., Blunden, G., Hulcová, D., Havelek, R. 2021. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochemistry Reviews*. 20 (1). 303–323. doi: 10.1007/S11101-020-09675-8/METRICS.
- Cao, Z., Yang, P., Zhou, Q. 2013. Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*. 56 (10). 1382–1391. doi: 10.1007/S11426-013-4967-9/METRICS.
- Carlberg, C., Muñoz, A. 2022. An update on vitamin D signaling and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 79 . 217–230. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2020.05.018.
- Carter, L. G., D’Orazio, J. A., Pearson, K. J. 2014. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer*. 21 (3). R209–R225. doi: 10.1530/ERC-13-0171.
- Cedron, J. C., Gutiérrez, D., Flores, N., Ravelo, Á. G., Estévez-Braun, A. 2012. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20 (18). 5464–5472. doi: 10.1016/J.BMC.2012.07.036.
- Cedron, J. C., Ravelo, Á. G., León, L. G., Padrón, J. M., Estévez-Braun, A. 2015. Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 13854–13863. 20 (8). 13854–13863. doi: 10.3390/MOLECULES200813854.
- Ding, Y., Qu, D., Zhang, K. M., Cang, X. X., Kou, Z. N., Xiao, W., Zhu, J. B. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research*. 19 (1). 53–100. doi: 10.1080/10286020.2016.1198332.
- Doskočil, I., Havlík, J., Verlotta, R., Tauchen, J., Veselá, L., Macáková, K., Opletal, L., Kokoška, L., Rada, V. 2016. In vitro immunomodulatory activity, cytotoxicity and

- chemistry of some central European polypores. *Pharmaceutical Biology*. 54 (11). 2369–2376. doi: 10.3109/13880209.2016.1156708.
- Doskočil, I., Hošálková, A., Šafratová, M., Benešová, N., Havlík, J., Havelek, R., Kuneš, J., Královec, K., Chlebek, J., Cahlíková, L. 2015. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*. 13 . 394–398. doi: 10.1016/J.PHYTOL.2015.08.004.
- Dou, R., Ng, K., Giovannucci, E. L., Manson, J. E., Qian, Z. R., Ogino, S. 2016. Vitamin D and colorectal cancer: molecular, epidemiological and clinical evidence. *British Journal of Nutrition*. 115 (9). 1643–1660. doi: 10.1017/S0007114516000696.
- Efferth, T., Oesch, F. 2021. Repurposing of plant alkaloids for cancer therapy: Pharmacology and toxicology. *Seminars in Cancer Biology*. 68 . 143–163. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.12.010.
- Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., Feldman, B. J. 2014. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews Cancer* 2014 14:5. 14 (5). 342–357. doi: 10.1038/nrc3691.
- Freeman, H. J. 2013. Early stage colon cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 19 (46). 8468. doi: 10.3748/WJG.V19.I46.8468.
- Gairola, K., Gururani, S., Bahuguna, A., Garia, V., Pujari, R., Dubey, S. K. 2021. Natural products targeting cancer stem cells: Implications for cancer chemoprevention and therapeutics. *Journal of Food Biochemistry*. 45 (7). e13772. doi: 10.1111/JFBC.13772.
- Gao, L., Feng, Y., Ge, C., Xu, X., Wang, S., Li, X., Zhang, K., Wang, C., Dai, F., Xie, S. 2021. Identification of molecular anti-metastasis mechanisms of lycorine in colorectal cancer by RNA-seq analysis. *Phytomedicine*. 85 . 153530. doi: 10.1016/J.PHYMED.2021.153530.
- Garland, C. F., Gorham, E. D., Mohr, S. B., Garland, F. C. 2009. Vitamin D for Cancer Prevention: Global Perspective. *Annals of Epidemiology*. 19 (7). 468–483. doi: 10.1016/J.ANNEPIDEM.2009.03.021.
- Geiger, T. R., Peeper, D. S. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1796 (2). 293–308. doi: 10.1016/J.BBCAN.2009.07.006.
- Gheytanchi, E., Naseri, M., Karimi-Busheri, F., Atyabi, F., Mirsharif, E. S., Bozorgmehr, M., Ghods, R., Madjd, Z. 2021. Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell International*. 21 (1). 1–16. doi: 10.1186/S12935-021-01898-9/FIGURES/4.
- Giammanco, M., Di Majo, D., La Guardia, M., Aiello, S., Crescimannno, M., Flandina, C., Tumminello, F. M., Leto, G. 2015. Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharmaceutical Biology*. 53 (10). 1399–1434. doi: 10.3109/13880209.2014.988274.
- Giordano, A., Tommonaro, G. 2019. Curcumin and Cancer. *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 2376. 11 (10). 2376. doi: 10.3390/NU11102376.
- Guertler, A., Kraemer, A., Roessler, U., Hornhardt, S., Kulka, U., Moertl, S., Friedl, A. A., Illig, T., Wichmann, E., Gomolka, M. 2011. The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals. *Radiation Protection Dosimetry*. 143 (2–4). 487–490. doi: 10.1093/RPD/NCQ515.
- Gupta, P. K. 2020. *Problem Solving Questions in Toxicology: A Study Guide for the Board and other Examinations* Problem Solving Questions in Toxicology: Springer International Publishing.
- Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., Delort, L. 2021. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 12200. 22 (22). 12200. doi: 10.3390/IJMS222212200.
- Habartová, K., Cahlíková, L., Rezáčová, M., Havelek, R. 2016. The biological activity of alkaloids from the amaryllidaceae: From cholinesterases inhibition to anticancer activity.

- Natural Product Communications. 11 (10). 1587–1594. doi: 10.1177/1934578X1601101038.
- Habli, Z., Toumieh, G., Fatfat, M., Rahal, O. N., Gali-Muhtasib, H. 2017. Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms. *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 250. 22 (2). 250. doi: 10.3390/MOLECULES22020250.
- Hart, P. H., Gorman, S., Finlay-Jones, J. J. 2011. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nature Reviews Immunology* 2011 11:9. 11 (9). 584–596. doi: 10.1038/nri3045.
- Hasan, N., Sonnenschein, C., Soto, A. M. 2019. Vitamin D3 constrains estrogen's effects and influences mammary epithelial organization in 3D cultures. *Scientific Reports* 2019 9:1. 9 (1). 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-43308-1.
- Havelek, R., Muthna, D., Tomsik, P., Kralovec, K., Seifrtova, M., Cahlikova, L., Hostalkova, A., Safratova, M., Perwein, M., Cermakova, E., Rezacova, M. 2017. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions*. 275 . 121–132. doi: 10.1016/J.CBI.2017.07.018.
- Havelek, R., Seifrtova, M., Kralovec, K., Bruckova, L., Cahlikova, L., Dalecka, M., Vavrova, J., Rezacova, M., Opletal, L., Bilkova, Z. 2014. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*. 21 (4). 479–490. doi: 10.1016/J.PHYMED.2013.09.005.
- He, J., Qi, W. B., Wang, L., Tian, J., Jiao, P. R., Liu, G. Q., Ye, W. C., Liao, M. 2013. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 7 (6). 922–931. doi: 10.1111/IRV.12035.
- He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X., Hong, X. 2015. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances*. 5 (21). 16562–16574. doi: 10.1039/C4RA14666B.
- Hnatyszyn, A., Hryhorowicz, S., Kaczmarek-Ryś, M., Lis, E., Słomski, R., Scott, R. J., Pławski, A. 2019. Colorectal carcinoma in the course of inflammatory bowel diseases. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 17 (1). 1–9. doi: 10.1186/S13053-019-0118-4/TABLES/1.
- Holick, M. F. 2006. Vitamin D: Its role in cancer prevention and treatment. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 92 (1). 49–59. doi: 10.1016/J.PBIOMOLBIO.2006.02.014.
- Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., Lim, Y. C., Kaderi Kibria, K. M., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W., Hadi, M. A. 2022. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 1732. 14 (7). 1732. doi: 10.3390/CANCERS14071732.
- Cho, M. H., Niles, A., Huang, R., Inglese, J., Austin, C. P., Riss, T., Xia, M. 2008. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. *Toxicology in Vitro*. 22 (4). 1099–1106. doi: 10.1016/J.TIV.2008.02.013.
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G. 2015. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological Reviews*. 96 (1). 365–408. doi: 10.1152/PHYSREV.00014.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0011627520010.JPEG.
- Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., Belpomme, D. 2007. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer:

- An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 61 (10). 640–658. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2007.10.006.
- Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., Srdjenovic, B. U. 2021. Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 17 (1). 22–28. doi: 10.4103/JCRT.JCRT_862_16.
- Jhuly Martins de Paiva, M., Nobre do Nascimento, G. L., Araújo de Melo Damasceno, I., Nordhoff Barcelos Cunha, L., Emanuel de Sousa Pimentel, J., Terezinha Freitas Silva, L., Dias Castro, T., Silveira, D., Lnb, C., Sousa Pimentel, de J., Ltf, S., Castro, T. D., Silveira, D. 2024. Antitumor evaluation of amaryllidaceae alkaloids on cancer cell lines: A literature review. *Electronic Journal of General Medicine*. 2024 (1). 2516–3507. doi: 10.29333/ejgm/14040.
- Jimenez, A., Santos, A., Alonso, G., Vazquez, D. 1976. Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells: Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 425 (3). 342–348. doi: 10.1016/0005-2787(76)90261-6.
- Jones, G. 2012. Metabolism and biomarkers of Vitamin D. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 72 . 243–250. doi: 10.3109/00365513.2012.681892.
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., Singh, J. 2019. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*. 19 . 100182. doi: 10.1016/J.PLGENE.2019.100182.
- Karakoyun, Ç., Masi, M., Cimmino, A., Önür, M. A., Somer, N. U., Kornienko, A., Evidente, A. 2019. A Brief Up-to-Date Overview of Amaryllidaceae Alkaloids: Phytochemical Studies of *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L., Collected in Turkey. *Natural Product Communications*. 14 (8). doi: 10.1177/1934578X19872906/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1934578X19872906-FIG2.JPEG.
- Keum, N., Lee, D. H., Greenwood, D. C., Manson, J. E., Giovannucci, E. 2019. Vitamin D supplementation and total cancer incidence and mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Oncology*. 30 (5). 733–743. doi: 10.1093/ANNONC/MDZ059.
- Khan, M. A., Tania, M., Zhang, D. Z., Chen, H. C. 2010. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*. 22 (2). 87–92. doi: 10.1007/S11670-010-0087-7/METRICS.
- Kim, S. J. 2020. Effects of Chrysanthemi Flos against diabetes and its complications related to insulin resistance. *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. 223–234. doi: 10.1016/B978-0-12-815776-3.00022-X.
- Klement, R. J., Paziienza, V. 2019. Impact of Different Types of Diet on Gut Microbiota Profiles and Cancer Prevention and Treatment. *Medicina* 2019, Vol. 55, Page 84. 55 (4). 84. doi: 10.3390/MEDICINA55040084.
- Kouřimský, P. 2022. In vitro toxicita extraktů Cannabis v rozdílném stupni zralosti na buňky střevního epitelu (BSc. Thesis). Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Lehmann, B., Meurer, M. 2010. Vitamin D metabolism. *Dermatologic Therapy*. 23 (1). 2–12. doi: 10.1111/J.1529-8019.2009.01286.X.
- Li, L., Zhang, Z., Yang, Q., Ning, M. 2019. Lycorine inhibited the cell growth of non-small cell lung cancer by modulating the miR-186/CDK1 axis. *Life Sciences*. 231 . 116528. doi: 10.1016/J.LFS.2019.06.003.
- Li, S. Y., Chen, C., Zhang, H. Q., Guo, H. Y., Wang, H., Wang, L., Zhang, X., Hua, S. N., Yu, J., Xiao, P. G., Li, R. S., Tan, X. 2005. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Research*. 67 (1). 18–23. doi: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2005.02.007.

- Lin, L. Z., Hu, S. F., Chai, H. B., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., Ruangrunsi, N. 1995. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. *Phytochemistry*. 40 (4). 1295–1298. doi: 10.1016/0031-9422(95)00372-E.
- Liu, L. bin, Duan, C. nong, Ma, Z. yi, Xu, G. 2015. Curcumin inhibited rat colorectal carcinogenesis by activating PPAR- γ : an experimental study. *Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi = Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*. 35 (4). 471–475. Získáno z <https://europepmc.org/article/med/26043573>
- Liu, D. D., Guo, Y. F., Zhang, J. Q., Yang, Z. K., Li, X., Yang, B., Yang, R. 2017. Inclusion of lycorine with natural cyclodextrins (α -, β - and γ -CD): Experimental and in vitro evaluation. *Journal of Molecular Structure*. 1130 . 669–676. doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2016.11.018.
- Liu, Jiangning, Yang, Y., Xu, Y., Ma, C., Qin, C., Zhang, L. 2011. Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication. *Virology Journal*. 8 (1). 1–9. doi: 10.1186/1743-422X-8-483/FIGURES/7.
- Liu, Jie, Sun, S., Zhou, C., Sun, Z., Wang, Q., Sun, C. 2022. In vitro and in vivo anticancer activity of Lycorine in prostate cancer by inhibiting NF- κ B signaling pathway. *Journal of Cancer*. 13 (10). 3151. doi: 10.7150/JCA.75597.
- Liu, Z. B., Zhang, T., Ye, X., Liu, Z. Q., Sun, X., Zhang, L. L., Wu, C. J. 2022. Natural substances derived from herbs or plants are promising sources of anticancer agents against colorectal cancer via triggering apoptosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 74 (2). 162–178. doi: 10.1093/JPP/RGAB130.
- Ma, Y., Zhang, P., Wang, F., Yang, J., Liu, Z., Qin, H. 2011. Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: A systematic review of prospective studies. *Journal of Clinical Oncology*. 29 (28). 3775–3782. doi: 10.1200/JCO.2011.35.7566/ASSET/IMAGES/ZLJ9991015290003.JPEG.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., Yoldi, M. J. R. 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 197. 18 (1). 197. doi: 10.3390/IJMS18010197.
- Marzęda, P., Wróblewska-Łuczka, P., Drozd, M., Florek-Łuszczki, M., Załuska-Ogryzek, K., Łuszczki, J. J. 2022. Cannabidiol Interacts Antagonistically with Cisplatin and Additively with Mitoxantrone in Various Melanoma Cell Lines—An Isobolographic Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 6752. 23 (12). 6752. doi: 10.3390/IJMS23126752.
- Masi, M., Di Lecce, R., Mérindol, N., Girard, M. P., Berthoux, L., Desgagné-Penix, I., Calabrò, V., Evidente, A. 2022. Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreaticum maritimum*. *Toxins* 2022, Vol. 14, Page 262. 14 (4). 262. doi: 10.3390/TOXINS14040262.
- McMahon, K. W., Karunasena, E., Ahuja, N. 2017. The Roles of DNA Methylation in the Stages of Cancer. *Cancer Journal (United States)*. 23 (5). 257–261. doi: 10.1097/PPO.0000000000000279.
- Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., Alfano, C. M., Jemal, A., Kramer, J. L., Siegel, R. L. 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 69 (5). 363–385. doi: 10.3322/CAAC.21565.
- Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A. G., Bishayee, A. 2019. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology*. 858 . 172472. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2019.172472.

- Mondul, A. M., Weinstein, S. J., Layne, T. M., Albanes, D. 2017. Vitamin D and Cancer Risk and Mortality: State of the Science, Gaps, and Challenges. *Epidemiologic Reviews*. 39 (1). 28–48. doi: 10.1093/EPIREV/MXX005.
- Murphy, C. C., Sen, A., Watson, B., Gupta, S., Mayo, H., Singal, A. G. 2020. A systematic review of repeat fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 29 (2). 278–287. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0775/69972/AM/A-SYSTEMATIC-REVIEW-OF-REPEAT-FECAL-OCCULT-BLOOD.
- Nguyen, K. V., Laidmäe, I., Kogermann, K., Lust, A., Meos, A., Ho, D. V., Raal, A., Heinämäki, J., Nguyen, H. T. 2019. Preformulation Study of Electrospun Haemanthamine-Loaded Amphiphilic Nanofibers Intended for a Solid Template for Self-Assembled Liposomes. *Pharmaceutics* 2019, Vol. 11, Page 499. 11 (10). 499. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS11100499.
- Nii, T., Makino, K., Tabata, Y. 2020. Three-Dimensional Culture System of Cancer Cells Combined with Biomaterials for Drug Screening. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2754. 12 (10). 2754. doi: 10.3390/CANCERS12102754.
- Pandey, A., Singh, A., Singh, S. 2020. Prevalence of Vitamin D deficiency in treatment-naive individual consecutive cancer patients. *Cancer Research, Statistics, and Treatment*. 3 (1). 25–31. doi: 10.4103/CRST.CRST_113_19.
- Pellegrino, S., Meyer, L., Zorbas, C., Kornienko, A., Lafontaine, D. L. J., Yusupov, M. 2018. The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure*. 26 . 416–425. doi: 10.1016/j.str.2018.01.009.
- Peskin, A. V., Winterbourn, C. C. 2000. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*. 293 (1–2). 157–166. doi: 10.1016/S0009-8981(99)00246-6.
- Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R., Bissell, M. J. 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89 (19). 9064–9068. doi: 10.1073/PNAS.89.19.9064.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30 (1). 11–26. doi: 10.1007/S12291-014-0446-0/FIGURES/2.
- Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C. R., Granchi, D., Lucia 1994. Cell culture methods for testing Biocompatibility. *Clinical Materials*. 15 (3). 173–190. doi: 10.1016/0267-6605(94)90081-7.
- Pludowski, P., Holick, M. F., Grant, W. B., Konstantynowicz, J., Mascarenhas, M. R., Haq, A., Povoroznyuk, V., Balatska, N., Barbosa, A. P., Karonova, T., Rudenka, E., Misiorowski, W., Zakharova, I., Rudenka, A., Łukaszewicz, J., Marciniowska-Suchowierska, E., Łaszcz, N., Abramowicz, P., Bhattoa, H. P., Wimalawansa, S. J. 2018. Vitamin D supplementation guidelines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 175 . 125–135. doi: 10.1016/J.JSBMB.2017.01.021.
- Puhr, M., Hoefler, J., Eigentler, A., Ploner, C., Handle, F., Schaefer, G., Kroon, J., Leo, A., Heidegger, I., Eder, I., Culig, Z., Der Pluijm, G. Van, Klocker, H. 2018. The glucocorticoid receptor is a key player for prostate cancer cell survival and a target for improved antiandrogen therapy. *Clinical Cancer Research*. 24 (4). 927–938. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0989/116469/AM/THE-GLUCOCORTICOID-RECEPTOR-IS-A-KEY-PLAYER-FOR.
- Qiao, S., Yao, J., Wang, Q., Li, L., Wang, B., Feng, X., Wang, Z., Yin, M., Chen, Y., Xu, S. 2023. Antifungal effects of amaryllidaceous alkaloids from bulbs of *Lycoris* spp. against

- Magnaporthe oryzae. *Pest Management Science*. 79 (7). 2423–2432. doi: 10.1002/PS.7420.
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., Paul Solomon, F. D. 2015. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*. 230 (1). 16–26. doi: 10.1002/JCP.24683.
- Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K. D. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 99 (1). 1–13. doi: 10.1016/S0163-7258(03)00042-1.
- Ren, B., Kwah, M. X. Y., Liu, C., Ma, Z., Shanmugam, M. K., Ding, L., Xiang, X., Ho, P. C. L., Wang, L., Ong, P. S., Goh, B. C. 2021. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Letters*. 515 . 63–72. doi: 10.1016/J.CANLET.2021.05.001.
- Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., Vidugiriene, J. 2019. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. *Assay Guidance Manual*. Ziskano z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK540958/>
- Roy, M., Liang, L., Xiao, X., Feng, P., Ye, M., Liu, J. 2018. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 107 . 615–624. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2018.07.147.
- Rubešová, E. 2022. Stanovení toxicity pomocí 3D sféroidů (BSc. Thesis). Czech University of Life Sciences Prague, Prague.
- Rychecký, O., Majerská, M., Král, V., Štěpánek, F., Čejková, J. 2017. Spheroid cultivation of HT-29 carcinoma cell line in liquid marbles. *Chemical Papers*. 71 (6). 1055–1063. doi: 10.1007/S11696-016-0026-2/FIGURES/8.
- Saha, S. K., Lee, S. Bin, Won, J., Choi, H. Y., Kim, K., Yang, G. M., Dayem, A. A., Cho, S. G. 2017. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1544. 18 (7). 1544. doi: 10.3390/IJMS18071544.
- Saltan Çitoğlu, G., Bahadır Acikara, O., Sever Yilmaz, B., Özbek, H. 2012. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia*. 83 (1). 81–87. doi: 10.1016/J.FITOTE.2011.09.008.
- Sancha, S. A. R., Dobiasová, S., Nejedlý, T., Strnad, O., Viktorová, J., Ferreira, M.-J. U. 2024. Lycorine and homolycorine derivatives for chemo-sensitizing resistant human ovarian adenocarcinoma cells. *Phytomedicine*. 126 . 155460. doi: 10.1016/J.PHYMED.2024.155460.
- Sancha, S. A. R., Gomes, A. V., Loureiro, J. B., Saraiva, L., Ferreira, M. J. U. 2022. Amaryllidaceae-Type Alkaloids from *Pancreaticum maritimum*: Apoptosis-Inducing Effect and Cell Cycle Arrest on Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Molecules*. 27 (18). 5759. doi: 10.3390/MOLECULES27185759/S1.
- Sankpal, U. T., Pius, H., Khan, M., Shukoor, M. I., Maliakal, P., Lee, C. M., Abdelrahim, M., Connelly, S. F., Basha, R. 2012. Environmental factors in causing human cancers: emphasis on tumorigenesis. *Tumor Biology* 2012 33:5. 33 (5). 1265–1274. doi: 10.1007/S13277-012-0413-4.
- Seifrtová, M., Havelek, R., Cahlíková, L., Hulcová, D., Mazánková, N., Řezáčová, M. 2017. Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine*. 35 . 1–10. doi: 10.1016/J.PHYMED.2017.08.019.
- Sever, R., Brugge, J. S. 2015. Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 5 (4). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A006098.

- Sha, J., Pan, J., Ping, P., Xuan, H., Li, D., Bo, J., Liu, D., Huang, Y. 2013. Synergistic effect and mechanism of vitamin A and vitamin D on inducing apoptosis of prostate cancer cells. *Molecular Biology Reports*. 40 (4). 2763–2768. doi: 10.1007/S11033-012-1925-0/FIGURES/4.
- Shahi Thakuri, P., Tavana, H. 2017. Single and Combination Drug Screening with Aqueous Biphasic Tumor Spheroids. *SLAS Discovery*. 22 (5). 507–515. doi: 10.1177/2472555217698817.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P. 2017. Oxidative Stress. . doi: 10.1146/annurev-biochem.
- Silva, L. C., Correia, A. F., Gomes, J. V. D., Romão, W., Motta, L. C., Fagg, C. W., Magalhães, P. O., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y. M. 2022. Lycorine Alkaloid and *Crinum americanum* L. (Amaryllidaceae) Extracts Display Antifungal Activity on Clinically Relevant *Candida* Species. *Molecules*. 27 (9). 2976. doi: 10.3390/MOLECULES27092976/S1.
- Sobolewska, A., DunisÅawska, A., Stadnicka, K. 2021. Natural substances in cancer-do they work? *Physical Sciences Reviews*. 8 (9). 2071–2101. doi: 10.1515/PSR-2019-0060/XML.
- Sun, Y., Gu, Y., Gao, X., Jin, X., Wink, M., Sharopov, F. S., Yang, L., Sethi, G. 2023. Lycorine suppresses the malignancy of breast carcinoma by modulating epithelial mesenchymal transition and β -catenin signaling. *Pharmacological Research*. 195 . 106866. doi: 10.1016/J.PHRS.2023.106866.
- Szlávik, L., Gyuris, Á., Minárovits, J., Forgo, P., Molnár, J., Hohmann, J. 2004. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*. 70 (9). 871–873. doi: 10.1055/S-2004-827239/ID/3/BIB.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E. 2021. Oxidative Stress, Diet and Prostate Cancer. *The World Journal of Men's Health*. 39 (2). 195. doi: 10.5534/WJMH.200014.
- Tolosa, L., Donato, M. T., Gómez-Lechón, M. J. 2015. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods in Molecular Biology*. 1250 . 333–348. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26/COVER.
- Trump, D., Aragon-Ching, J. 2018. Vitamin D in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*. 20 (3). 244. doi: 10.4103/AJA.AJA_14_18.
- Uher, M., Hroch, M., Peřinová, R., Havelek, R., Křoustková, J., Řezáčová, M., Muthná, D., Koutová, D., Kuneš, J., Cahlíková, L. 2022. Semisynthetic derivatives of haemanthamine and their in vitro antiproliferative activity evaluation against a panel of human cell lines. *Arabian Journal of Chemistry*. 15 (5). 103746. doi: 10.1016/J.ARABJC.2022.103746.
- Van Goietsenoven, G., Andolfi, A., Lallemand, B., Cimmino, A., Lamoral-Theys, D., Gras, T., Abou-Donia, A., Dubois, J., Lefranc, F., Mathieu, V., Kornienko, A., Kiss, R., Evidente, A. 2010. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products*. 73 (7). 1223–1227. doi: 10.1021/NP9008255/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP-2009-008255_0002.GIF.
- Velišek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin I*. 3. vyd. Tábor. OSSIS.
- Vrijssen, R., Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., Boeye, A. 1986. Lycorine: a eukaryotic termination inhibitor? *Journal of Biological Chemistry*. 261 (2). 505–507. doi: 10.1016/S0021-9258(17)36118-5.
- Wicks, S. M., Mahady, G. B., Lawal, T. O., Patel, S., Raut, N. 2019. Combinations of vitamins A, D2 and D3 have synergistic effects in gastric and colon cancer cells. *Functional Foods in Health and Disease*. 9 (12). 749–771. doi: 10.31989/FFHD.V9I12.646.
- Xiao, H., Xu, X., Du, L., Li, X., Zhao, H., Wang, Z., Zhao, L., Yang, Z., Zhang, S., Yang, Y., Wang, C. 2022. Lycorine and organ protection: Review of its potential effects and molecular mechanisms. *Phytomedicine*. 104 . 154266. doi: 10.1016/J.PHYMED.2022.154266.

- Yang, J., Zhang, Q., Huang, G., Cong, J., Wang, T., Zhai, X., Zhang, J., Qi, G., Zhou, L., Jin, J. 2023. Combined effects of vitamin D and neferine on the progression and metastasis of colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 149 (9). 6203–6210. doi: 10.1007/S00432-022-04552-7/FIGURES/4.
- Zámečník, J. 2019. *Patologie*. 1. vyd. Praha. PRAGER PUBLISHING. ISBN: 978-80-270-6457-1. Získáno z <https://ucebnice-patologie.cz/produkt/patologie/>
- Zhang, H., Wen, X., Zhang, Y., Wei, X., Liu, T. 2015. Vitamin D Deficiency and Increased Risk of Bladder Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 37 (5). 1686–1692. doi: 10.1159/000438534.
- Zhao, S., Guo, Y., Wang, Q., An, B. 2021. Antifungal effects of lycorine on *Botrytis cinerea* and possible mechanisms. *Biotechnology Letters*. 43 (7). 1503–1512. doi: 10.1007/S10529-021-03128-8/METRICS.
- Zoi, V., Galani, V., Lianos, G. D., Voulgaris, S., Kyritsis, A. P., Alexiou, G. A. 2021. The Role of Curcumin in Cancer Treatment. *Biomedicines* 2021, Vol. 9, Page 1086. 9 (9). 1086. doi: 10.3390/BIOMEDICINES9091086.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

1,25(OH)₂D₃ 1,25-hydroxyvitamin D₃
25(OH)D₃ 25-hydroxyvitamin D₃
ANOVA Analýza rozptylu
ATCC American Type Culture Collection
CYP Cytochrom P450
DMSO Dimethylsufoxid
DNA Deoxyribonukleová kyselina
EC₅₀ Účinná koncentrace, polovina maximální účinné koncentrace
ECACC European Collection of Cell Culture
EMEM Eagle's Minimum Essential Medium
EtOH Etanol
FBS Fetální bovinní sérum
GI₅₀ Inhibice růstu, množství k inhibici růstu 50 % buněk
IC₅₀ Inhibiční koncentrace, množství potřebné k inhibici 50 % buněk
IU mezinárodní jednotka
MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
PBS Fosfátový pufr
ROS Reaktivní formy kyslíku
RNS Reaktivní formy dusíku
SARS-CoV Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus
SD Směrodatná odchylka
SOD superoxiddismutáza

10 Samostatné přílohy

Příloha 1: Objemy sféroidů naměřené za celou dobu experimentu

		Koncentrace	0	2	4	6	8	10	12	15	18
Kontrola	1	0,002058	0,003901	0,006261	0,00957	0,014156	0,020107	0,026385	0,038925	0,04412	
	2	0,00245	0,004173	0,006597	0,009971	0,014895	0,020696	0,027412	0,038884	0,045942	
	3	0,002506	0,004428	0,007049	0,010553	0,014879	0,018736	0,023559	0,033414	0,03418	
	4	0,002332	0,004273	0,007628	0,010969	0,014949	0,021419	0,0277	0,040436	0,048414	
	5	0,002577	0,004278	0,007198	0,010166	0,015273	0,020332	0,027644	0,047554	0,049514	
	6	0,002215	0,003946	0,007087	0,011719	0,017507	0,023119	0,029378	0,044157	0,047338	
	7	0,001943	0,003346	0,006035	0,008844	0,012879	0,017498	0,020583	0,027946	0,031264	
	8	0,001868	0,003053	0,004993	0,008127	0,011596	0,016938	0,020849	0,02938		
DMSO 1%	1	0,002611	0,002526	0,002134	0,00226	0,002267	0,002245	0,002272	0,002451	0,001966	
	2	0,002526	0,002495	0,002194	0,002467	0,002191	0,002318	0,002372	0,002474	0,002136	
	3	0,002733	0,002487	0,001997	0,002142	0,001865	0,001938	0,002137	0,002396	0,001717	
	4	0,002511	0,002317	0,002202	0,002334	0,002119	0,002439	0,002648	0,002939	0,001899	
	5	0,002826	0,00268	0,00246	0,002658	0,002421	0,002563	0,002616	0,003002	0,001354	
	6	0,003013	0,002744	0,00257	0,002827	0,002231	0,002759	0,002833	0,00285	0,001814	
	7	0,002497	0,002302	0,002007	0,00233	0,002003	0,002382	0,002581	0,002721	0,001502	
	8	0,00217	0,001876	0,00181	0,001731	0,001681	0,002019	0,002201	0,002231		
Kalcitriol	0,07	1	0,00252	0,003945	0,005844	0,00842	0,01086	0,015521	0,018666	0,024845	0,029818
	2	0,002503	0,003867	0,006159	0,009541	0,012073	0,01567	0,018302	0,024183	0,026058	
	3	0,002887	0,004263	0,00705	0,010182	0,013068	0,016559	0,019612	0,026392	0,029958	
	4	0,002779	0,00407	0,006808	0,010031	0,012451	0,015469	0,018597	0,024298	0,028759	
	5	0,002984	0,004267	0,006607	0,009432	0,012857	0,016127	0,018997	0,024157	0,028244	
	6	0,002657	0,004135	0,006335	0,009811	0,0124	0,014458	0,018059	0,024056	0,027268	
	7	0,00253	0,004011	0,006502	0,009488	0,012689	0,015672	0,018605	0,02528	0,029118	
	8	0,002207	0,003408	0,005593	0,008036	0,011178	0,013832	0,016504	0,018619		
Látka Aa	5	1	0,002603	0,002613	0,003046	0,003221	0,003341	0,003353	0,00341	0,003131	0,002411
	2	0,002688	0,002752	0,003318	0,003017	0,00367	0,003836	0,003717	0,003476	0,002895	
	3	0,002644	0,002573	0,003009	0,003071	0,002892	0,003203	0,003203	0,002679	0,002287	
	4	0,003027	0,003013	0,003479	0,003752	0,00397	0,003787	0,003741	0,003676	0,003147	
Látka Ab	5	5	0,002771	0,002726	0,003226	0,003645	0,004181	0,004291	0,004575	0,004405	0,003345
	6	0,002645	0,002684	0,003446	0,003883	0,004302	0,004117	0,004236	0,004817	0,004184	
	7	0,002517	0,002571	0,003062	0,00363	0,003597	0,003815	0,004395	0,004139	0,003412	
	8	0,002364	0,002278	0,002878	0,003246	0,003583	0,004052	0,004029	0,004016		
Látka Aa	2,5	1	0,00266	0,003007	0,003758	0,004775	0,004999	0,005072	0,005384	0,006075	0,005909
	2	0,002872	0,003595	0,004965	0,005943	0,006355	0,006548	0,006757	0,007236	0,007033	
	3	0,002413	0,002961	0,004038	0,00493	0,005474	0,006054	0,006331	0,006492	0,005616	
	4	0,002685	0,003133	0,004125	0,005214	0,005532	0,006204	0,006325	0,006118	0,005492	
Látka Ab	2,5	5	0,002441	0,002758	0,004123	0,00552	0,006108	0,007107	0,007429	0,007588	0,006045
	6	0,002746	0,003308	0,005048	0,006421	0,007507	0,007305	0,007768	0,00835	0,007298	
	7	0,002281	0,002729	0,003912	0,005203	0,005877	0,006601	0,006789	0,007033	0,005929	
	8	0,002271	0,002998	0,004251	0,005622	0,006889	0,007487	0,007498	0,008618		

Příloha 1: Pokračování

Látka Aa	1,25	1	0,002588	0,003511	0,005208	0,006472	0,007501	0,007707	0,007503	0,00693	0,006297
		2	0,002673	0,003633	0,005412	0,007172	0,007937	0,008408	0,008226	0,007938	0,007499
		3	0,002698	0,003775	0,005631	0,007315	0,008252	0,008742	0,008149	0,008259	0,006703
		4	0,002904	0,003784	0,005466	0,007034	0,008191	0,00881	0,00853	0,009139	0,007985
Látka Ab	1,25	5	0,002552	0,003725	0,005849	0,008208	0,010211	0,011133	0,012044	0,011574	0,009384
		6	0,002779	0,003729	0,006156	0,0081	0,01053	0,011885	0,011636	0,013617	0,0136
		7	0,002461	0,00307	0,005336	0,007927	0,009835	0,010641	0,011357	0,010697	0,010577
		8	0,002248	0,003161	0,005081	0,00729	0,009269	0,010786	0,010843	0,009373	
Látka Aa	0,625	1	0,002541	0,003406	0,004951	0,007143	0,008256	0,00939	0,009711	0,010431	0,009667
		2	0,002906	0,004114	0,006187	0,008297	0,009919	0,010726	0,011652	0,012683	0,013438
		3	0,002688	0,003834	0,005774	0,00821	0,00973	0,011646	0,011833	0,012113	0,010025
		4	0,002962	0,003911	0,005626	0,008181	0,009423	0,010742	0,011419	0,011631	0,01006
Látka Ab	0,625	5	0,003019	0,003955	0,006439	0,009251	0,011212	0,013392	0,013973	0,013883	0,014625
		6	0,002679	0,003985	0,006382	0,009287	0,011206	0,014176	0,014487	0,015808	0,01357
		7	0,002514	0,003777	0,006143	0,009036	0,011168	0,013633	0,014373	0,015872	0,014604
		8	0,002021	0,003045	0,004988	0,007743	0,00987	0,012405	0,013416	0,014946	
Látka Ba	5	1	0,002526	0,003172	0,003681	0,004043	0,004084	0,004007	0,003878	0,004243	0,003774
		2	0,002945	0,003188	0,003757	0,004153	0,004237	0,003876	0,003876	0,00382	0,003873
		3	0,002847	0,003347	0,004207	0,004625	0,004586	0,003958	0,003658	0,003779	0,003715
		4	0,002928	0,003314	0,004133	0,004283	0,004214	0,003976	0,003579	0,003081	0,003327
Látka Bb	5	5	0,002918	0,003156	0,004176	0,005059	0,004476	0,004071	0,00414	0,003825	0,003857
		6	0,002512	0,002732	0,003587	0,004219	0,003989	0,003784	0,003504	0,003219	0,002998
		7	0,002015	0,002605	0,003678	0,004405	0,003974	0,003872	0,003562	0,003345	0,003256
		8	0,002172	0,002603	0,003241	0,003859	0,003638	0,003797	0,003627	0,003391	
Látka Ba	2,5	1	0,002249	0,003325	0,004415	0,005476	0,005818	0,006285	0,006674	0,007262	0,006329
		2	0,002488	0,003729	0,004971	0,005954	0,006843	0,007536	0,00751	0,006742	0,005826
		3	0,002754	0,003631	0,00504	0,006538	0,007068	0,007532	0,007497	0,007768	0,006903
		4	0,002445	0,003367	0,004637	0,005973	0,006666	0,007101	0,006865	0,006771	0,006524
Látka Bb	2,5	5	0,002842	0,003577	0,00533	0,007587	0,008496	0,009194	0,009063	0,010334	0,009101
		6	0,002537	0,003388	0,004852	0,006157	0,007479	0,007957	0,008904	0,009692	0,00743
		7	0,0026	0,003342	0,004509	0,006032	0,007453	0,008391	0,007927	0,008639	0,008442
		8	0,002444	0,002926	0,004019	0,005359	0,006365	0,007501	0,007679	0,007846	
Látka Ba	1,25	1	0,002827	0,003818	0,005129	0,006949	0,009154	0,01001	0,011906	0,012496	0,016555
		2	0,002872	0,003669	0,005605	0,007455	0,00944	0,011333	0,012261	0,014747	0,017288
		3	0,002677	0,003435	0,005364	0,006871	0,008641	0,011338	0,011866	0,013644	0,016083
		4	0,002916	0,003776	0,005529	0,007362	0,009371	0,011058	0,01255	0,014988	0,016773
Látka Bb	1,25	5	0,00262	0,003655	0,006281	0,008412	0,011295	0,013662	0,015829	0,019661	0,021974
		6	0,002679	0,003601	0,006072	0,008439	0,011352	0,01405	0,016714	0,021776	0,022514
		7	0,002469	0,00335	0,005234	0,007628	0,010307	0,013113	0,015335	0,018663	0,019982
		8	0,002558	0,003253	0,005	0,006724	0,008954	0,011524	0,013521	0,016036	

Příloha 1: Pokračování

Látka Ba	0,625	1	0,002838	0,003805	0,005674	0,00782	0,00981	0,012757	0,013871	0,017409	0,020997
		2	0,002942	0,004122	0,006508	0,008899	0,011226	0,013405	0,015592	0,019404	0,022447
		3	0,002826	0,003605	0,006062	0,008278	0,01083	0,013317	0,016595	0,020203	0,024289
		4	0,0029	0,003796	0,00604	0,007947	0,010135	0,012964	0,015022	0,017401	0,022349
Látka Bb	0,625	5	0,002951	0,004442	0,007181	0,010483	0,014297	0,018189	0,022132	0,030207	0,032921
		6	0,002611	0,003697	0,005907	0,008608	0,01062	0,014661	0,016768	0,023416	0,025215
		7	0,00235	0,003686	0,006231	0,009118	0,013224	0,017149	0,019696	0,024835	0,027083
		8	0,002437	0,00335	0,005375	0,007914	0,010741	0,013259	0,016052	0,020198	
