

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

***In vitro* toxické účinky derivátů *Amaryllidaceae* alkaloidů  
na buňky střevního epitelu**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc.Sára Horáková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

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

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "*In vitro* toxické účinky derivátů *Amaryllidaceae* alkaloidů na buňky střevního epithelu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za spolupráci při zpracování diplomové práce.

# ***In vitro* toxické účinky derivátů *Amaryllidaceae* alkaloidů na buňky střevního epithelu**

## **Souhrn**

Onkologická onemocnění jsou jednou z hlavních příčin celosvětové úmrtnosti. Za rok 2018 bylo diagnostikováno 18 milionů nových případů a evidováno 9,5 milionů úmrtí. Dle dostupných prognóz má navíc každoročně stoupat počet nově diagnostikovaných pacientů. To může souviset nejen se znečištěným životním prostředím, ale i s nezdravým životním stylem a stárnutím populace. V rámci statistik patří Česká republika na první příčky ve výskytu kolorektálního karcinomu, který patří mezi nejčastější nádorová onemocnění s relativně vysokým procentem úmrtnosti. Vysoká míra výskytu je způsobena kombinací nezdravého životního stylu, genetické predispozice a vnějších faktorů, jako jsou věk, pohlaví či rasová příslušnost. Rostoucí trendy výskytu jsou spojovány s nadměrným příjmem živočišných tuků, nízkou spotřebou vlákniny, nedostatkem fyzické aktivity a obezitou. Největším problémem tohoto nádorového onemocnění je pozdní diagnostika nemoci, odolnost pacienta vůči léčbě a přítomnost metastáz. Z tohoto důvodu se hledají přírodní nebo syntetické látky, které mohou mít potencionálně protinádorový efekt. Z předchozího základního výzkumu je patrné, že alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* působí toxicky na lidské nádorové buněčné linie včetně kolorektálního karcinomu. U těchto sekundárních metabolitů je významná jejich vysoká selektivita pro nádorové buňky a poměrně nízká toxicita k zdravým či klidovým buňkám. Také bylo zjištěno, že příprava jejich polosyntetických nebo syntetických derivátů může vést k objevení nových analogů se srovnatelnou či ještě vyšší úrovní cytotoxické aktivity.

Na základě těchto poznatků se tato práce zabývá novými deriváty *Amaryllidaceae* alkaloidů na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29. Pro určení selektivity byla použita buněčná linie tenkého střeva FHS 74Int. Cytotoxická aktivita 38 synteticky připravených derivátů byla testována pomocí MTT testu využívající tetraziolové soli tetrazol bromidu k jeho redukci v mitochondriích živých buněk na nerozpustný formazán.

Z našich výsledků vyplývá, že pouze u čtyř derivátů lze hovořit o tom, že působí cytotoxicky. Konkrétně se jedná o derivát galanthaminu ( $IC_{50}$  u buněčné linie Caco-2  $6,07 \pm 2,87 \mu\text{M/ml}$ ), pankracinu ( $IC_{50}$  na HT29 buňkách  $8,20 \pm 0,91 \mu\text{M/ml}$ ), ambellinu ( $IC_{50}$  na HT29 buňkách  $3,23 \pm 0,17 \mu\text{M/ml}$  a na Caco-2 buňkách  $1,86 \pm 0,32 \mu\text{M/ml}$ ) a haemanthaminu ( $IC_{50}$  na HT29 buňkách  $2,43 \pm 0,13 \mu\text{M/ml}$  a na Caco-2 buňkách  $0,78 \pm 0,18 \mu\text{M/ml}$ ). U ostatních testovaných derivátů nebyla cytotoxicita prokázána ( $IC_{50} > 10 \mu\text{M/ml}$ ).

Navzdory tomu, že u některých derivátů byla zjištěná hodnota  $IC_{50}$  nižší než  $10 \mu\text{M/ml}$ , nejedná se stále o látky s výrazným toxickým účinkem na nádorové buněčné linie, a kromě derivátu haemanthaminu, zde není výrazný potenciál pro jejich případné využití.

**Klíčová slova:** *Amaryllidaceae*; Caco-2; cytotoxicita; FHS 74Int; nádorová onemocnění; střevní epithel

# ***In vitro* toxic effects of *Amaryllidaceae* alkaloid derivatives on intestinal epithelial cells**

## **Summary**

Cancer is one of the leading causes of mortality worldwide. In 2018 18 million new cases were diagnosed and 9,5 million deaths were recorded. In addition, according to available forecasts, the number of newly diagnosed patients should increase every year. This can be related not only to a polluted environment, but also to an unhealthy lifestyle and an aging population. In addition, the Czech Republic ranks among the first in the occurrence of colorectal cancer, which is one of the most common cancers with a relatively high mortality rate. The high occurrence is due to a combination of unhealthy lifestyles, genetic predisposition and external factors such as age, gender or race. Rising incidence trends are associated with excessive intake of animal fats, low fiber consumption, lack of physical activity and obesity. The biggest problems with this cancer are late diagnosis of the disease, the patient's resistance to treatment and the presence of metastases. For this reason, there is an effort to look for natural or synthetic substances that can have a potential antitumor effect. From previous basic research, it is clear that alkaloids of plants of the *Amaryllidaceae* family are toxic to human tumor cell lines, including colorectal cancer. These secondary metabolites are characterized by their high selectivity for tumor cells and relatively low toxicity to healthy or resting cells. Furthermore, it was found that the preparation of their semi-synthetic or synthetic derivatives may lead to the discovery of new analogues with comparable or even higher levels of cytotoxic activity.

Based on these findings, this work deals with new derivatives of *Amaryllidaceae* alkaloids on Caco-2 and HT29 colorectal cancer cell lines. The FHS 74Int small intestine cell line was used to determine selectivity. Cytotoxic activity of 38 synthetically prepared derivatives was tested by MTT test using tetrazolium salt tetrazole bromide to a reduction in the mitochondria of living cells into an insoluble form and inflammation.

The results show that only four derivatives can cause cytotoxicity. Specifically it is a derivative of galanthamine ( $IC_{50}$  in the cell line Caco-2  $6,07 \pm 2,87 \mu\text{M}/\text{ml}$ ), pancracine ( $IC_{50}$  on HT29 cells  $8,20 \pm 0,91 \mu\text{M}/\text{ml}$ ), ambelline ( $IC_{50}$  on HT29 cells  $3,23 \pm 0,17 \mu\text{M}/\text{ml}$  and on Caco-2 cells  $1,86 \pm 0,32 \mu\text{M}/\text{ml}$ ) and haemanthamine ( $IC_{50}$  on HT29 cells  $2,43 \pm 0,13 \mu\text{M}/\text{ml}$  and on Caco-2 cells  $0,78 \pm 0,18 \mu\text{M}/\text{ml}$ ). On the other tested derivatives weren't demonstrated any cytotoxicity ( $IC_{50} > 10 \mu\text{M}/\text{ml}$ ). Although the  $IC_{50}$  value of less than  $10 \mu\text{M}$  was found for some derivatives, apart from the haemanthamine derivative, there is no significant potential for their eventual use, because they are still not the substances with a significant toxic effect on tumor cell lines.

**Keywords:** *Amaryllidaceae*; Caco-2; cytotoxicity; FHS 74Int; cancer; intestinal epithelium

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Nádorová onemocnění</b>	<b>9</b>
3.1.1	Charakteristika	10
3.1.2	Kolorektální karcinom	11
<b>3.2</b>	<b>Léčba nádorových onemocnění</b>	<b>13</b>
3.2.1	Prevence výživou	14
3.2.2	Alternativní a doplňková medicína	14
3.2.3	Chirurgický zákrok	15
3.2.4	Radioterapie	16
3.2.5	Imunoterapie	16
3.2.6	Chemoterapie	17
3.2.7	Fytochemikálie v terapii nádorových onemocnění	18
<b>3.3</b>	<b>Alkaloidy</b>	<b>21</b>
3.3.1	Obecná charakteristika	21
3.3.2	Alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	22
3.3.3	Typy alkaloidy čeledi <i>Amaryllidaceae</i>	24
3.3.4	Syntetické deriváty	29
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Kultivace buněčných linií</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>MTT cytotoxický test</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Statistické vyhodnocení</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b>	<b>41</b>

## 1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin celosvětové úmrtnosti. Dle dat WHO z roku 2018 bylo evidováno 9,5 milionu úmrtí. Třetím nejvíce diagnostikovaným nádorovým onemocněním je kolorektální karcinom (KK). V Evropě se jedná o druhou nejčastější malignitu, přičemž nejvyšší míra výskytu je v zemích střední a východní Evropy. Česká populace patří v mezinárodním měřítku mezi nadprůměrně zatížené tímto onemocněním. Jedná se zde o velmi závažný problém, přičemž výskyt a úmrtnost mají vzestupnou tendenci (Suchánek et al. 2014). I přesto, že stále dochází k pokrokům v prevenci i léčbě onemocnění, úmrtí pacientů jsou velmi četná, a to především kvůli rezistenci nádorových buněk vůči léčbě (Mellor & Callaghan 2008). Dalším problémem léčby onkologických onemocnění je nedostatečně cílené působení na nádorové buňky. Tyto faktory představují velkou hrozbu a je usilováno o objevení látky, která dokáže buňky selektovat a neničit i ty zdravé (Zhao et al. 2018)

Přírodní produkty vždy hrály velmi významnou roli při objevování a vývoji nových léků pro léčbu řady onemocnění. Zvláště zřejmé je to právě u nádorových onemocnění, kde více než 60 % léčiv je přírodního původu (Kotecha et al. 2016). Potenciálním zdrojem pro vývoj protinádorových léčiv jsou i sekundární metabolity rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Vzhledem k tomu, že jsou tyto alkaloidy z přírodních zdrojů izolovány pouze v malém množství, je snahou příprava jejich polosyntetických či syntetických derivátů z důvodu možnosti snadnějšího zisku ve více znatelných koncentracích. Zároveň je cílem zvýšená účinnost takto připravených látek (Evidente & Kornienko 2009).

Právě cytotoxický účinek derivátů *Amaryllidaceae* alkaloidů byl testován *in vitro* na buňkách kolorektálního karcinomu v rámci této diplomové práce. Vývoj léků z rostlinných látek s terapeutickým potenciálem hraje důležitou roli v léčbě nádorových onemocnění. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi aktivní pole výzkumu, jsou pravděpodobné další pokroky.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je testování derivátů alkaloidů *Amaryllidaceae* na panel buněk střevního epithelu, který obsahuje, jak nádorové, tak zdravé buněčné linie. A následně stanovit selektivitu jednotlivých derivátů a jejich potencionální zařazení do dalších fází testování.

Hypotézou je, že deriváty alkaloidů *Amaryllidaceae* mají cytotoxický účinek a selektivně působí na buňky kolorektálního karcinomu.



### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Nádorová onemocnění

Pod pojem nádorové onemocnění spadá více než 100 různých druhů karcinomů, přičemž každý je způsoben jiným souborem genetických změn (Mendelsohn et al. 2015). Jedná se o vícestupňový proces, který je způsoben buněčnými změnami v důsledku endogenních či exogenních podnětů. Právě k exogenním příčinám se řadí „nesprávný“ životní styl, jak dokazují epidemiologické údaje, kdy společně s nevhodnou stravou jsou zodpovědné za 20-80 % úmrtí souvisejících s nádorovým onemocněním (Idehen et al. 2017). Do této skupiny se dále řadí kouření, požívání alkoholu, nadváha či obezita (Danaei et al. 2005). Za endogenní činitele jsou považovány věk, pohlaví a rasová příslušnost. U řady nádorových onemocnění se může jednat i o genetickou vadu, kdy dochází při dělení buňky ke změně genetické informace v důsledku působení fyzikálních karcinogenů, jako jsou ionizující nebo ultrafialové záření, či chemických, kdy se jedná například o N-nitrosamin či naftylamin (Bertram 2000). Další možností vzniku je přímé působení volných radikálů na buňky, čímž je vyvoláván oxidační stres. Tím se rozumí nerovnováha mezi tvorbou volných radikálů a antioxidační ochranou. Při buněčném oxidativním metabolismu dochází k produkci přirozených vedlejších produktů – volných radikálů. Mezi nejčastěji produkováné patří volné radikály kyslíku (reactive oxygen species-ROS) stejně tak jako volné radikály dusíku (reactive nitrogen species-RNS). Za hlavní místo vzniku ROS/RNS se považují mitochondrie (Georgakilas et al. 2010).

ROS/RNS mají zejména negativní roli při vzniku celé řady chorob, ale mohou být pro tělo dokonce prospěšné. V nízkých koncentracích obvykle ROS/RNS ovlivňují buněčnou signalizaci. Tím přispívají nejen k řízení toku krve prostřednictvím vazodilatace cév jako je tomu v případě oxidu dusnatého (NO), ale jsou také účinné v boji s infekcemi, kdy imunitní buňky produkují volné radikály jako NO a superoxid za účelem usmrcení virů a bakterií. Na druhou stranu nadprodukce ROS/RNS vede k poškození nukleových kyselin, lipidů a proteinů vedoucí ke vzniku celé řady onemocnění. Jedná se především o kardiovaskulární choroby jako je ischemická choroba srdeční. Dále také schizofrenie, různá neurodegenerativní onemocnění jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba a v neposlední řadě různá nádorová onemocnění (Manoharan et al. 2016).

ROS/RNS jsou zapojeny do všech tří fází vývoje nádorových onemocnění: zahájení, propagace a progres. Účinek oxidačního stresu na odpovídající stupeň karcinogeneze je přímo úměrný typu a reaktivitě radikálu, jejichž vlivem dochází k modifikaci v DNA a RNA, což vede k následujícímu poškození. ROS jsou zásadní při transdukcii intracelulárního signálu v mnoha buněčných odpovědích, jako je zánět, proliferace, diferenciaci, angiogeneze, stárnutí a apoptóza (Andonova et al. 2015). Zejména zvýšená proliferace je z globálního hlediska společně s neschopností buněčné apoptózy charakteristická pro nádorové onemocnění (Chaveli-López 2014). Buněčná apoptóza je nezbytný mechanismus pro řízení buněčné smrti a normální vývoj spojený s potlačením onkogeneze. Tento mechanismus je v nádorových buňkách narušen nebo plně vyřazen. Z tohoto důvodu se indukce apoptózy v nádorových buňkách jeví jako významná pro účinnost chemoterapeutik (Jiang & Hu 2009).

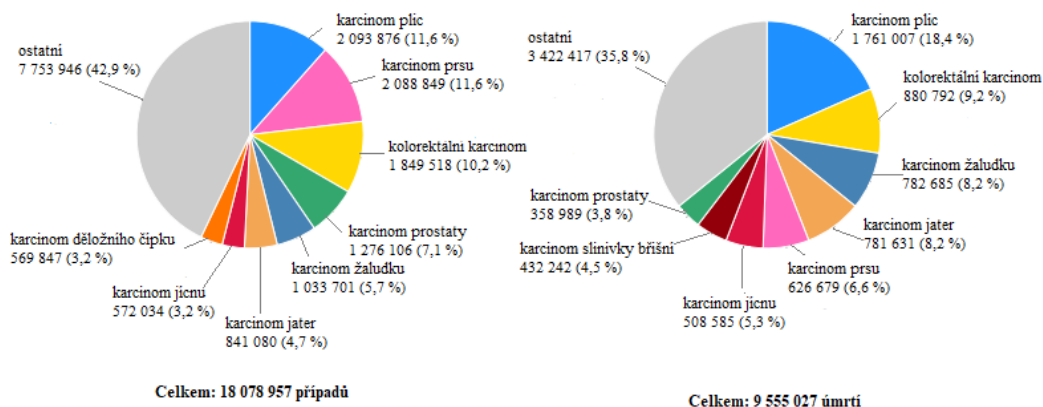
### 3.1.1 Charakteristika

Onkologická onemocnění jsou jednou z hlavních příčin celosvětové úmrtnosti, přičemž v roce 2018 bylo diagnostikováno na 18 milionů nových případů a evidováno 9,5 milionů úmrtí (WHO 2018). Poměr uzdravených pacientů se díky přesnější diagnostice, zlepšení léčebných strategií a podpůrné péči zvyšuje (Mendelsohn et al. 2015). Přesto v mnoha rozvojových zemích světa je situace v přežitelnosti pacientů s onkologickým onemocněním velmi tristní v porovnání s vyspělou částí světa. Tento nepříznivý trend je způsoben zejména díky pozdní diagnostice a zejména omezenému přístupu ke včasné a správné léčbě (Jemal et al. 2011).

I přesto, že stále dochází k pokrokům v prevenci a léčbě nádorových onemocnění, úmrtí pacientů je velmi četné, a to zejména kvůli rezistenci nádorových buněk vůči léčbě. Buňky, které jsou rezistentní k léčbě, se dále šíří jako maligní buňky do životně důležitých orgánů, což je označováno jako metastáze (Mellor & Callaghan 2008). Během tohoto složitého a vysoce selektivního procesu opouštějí nádorové buňky své primární místo různými cestami, jako jsou krev a lymfatické cévy. Přesto ne všechny nádorové buňky metastazují. Schopnost metastáze je závislá jak na vlastnostech nádorové buňky, tak na faktorech odvozených z mikroprostředí nádoru. Vedle metastáz jsou zde další základní znaky nádorového onemocnění, a to konkrétně neomezený replikační potenciál, soběstačnost v růstových signálech, necitlivost na růstové inhibitory, vyhýbání se programované buněčné smrti, schopnost vyvíjet krevní cesty, tkáňová invaze a zánět (Mantovani 2009).

Obecně je nádor tkáň, která nadměrně roste nezávisle na regulačních mechanismech organismu (Mendelsohn et al. 2015). Nádory se dělí na benigní, které rostou pomalu, jsou neinvazivní, dobře diferenciované, nemetastazují a obsahují málo dělicích se buněk. Opakem jsou nádory maligní, kdy se jedná o rychle rostoucí, špatně diferenciované, invazivní, neopouzdřené, obsahující mnoho dělicích větének a tvořící metastázy (Huether & McCance 2012). Dále mohou být nádory rozděleny dle typu tkáně, ze které vznikají. Existuje několik druhů, a to konkrétně karcinomy (z epiteliálních buněk), sarkomy (pojivové tkáně), lymfomy (lymfatické tkáně), myelomy (plazmatické buňky) a leukémie (krvetvorné buňky) (Mittra et al. 2015).

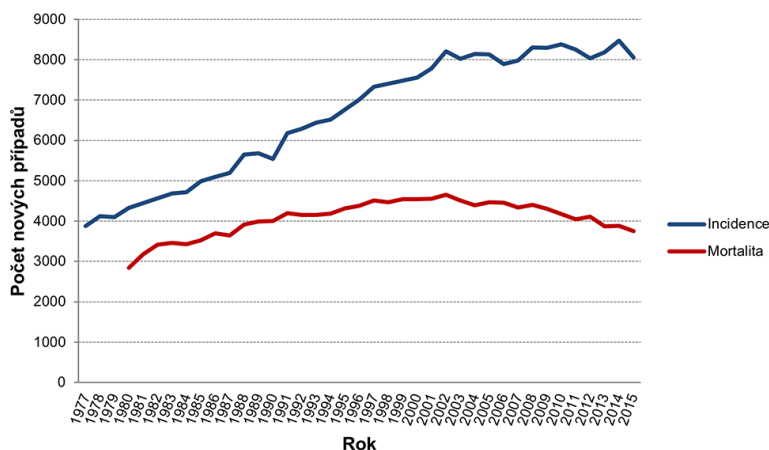
Celosvětově nejčastějším nádorem je karcinom plic, který byl v minulosti typický pro populaci s vyšším věkem. V dnešní době je věková hranice posunuta do nižších věkových skupin, což je příkládáno zvyšující se spotřebě tabákových výrobků. Mezi další známé rizikové faktory karcinomu plic patří expozice karcinogenům spojené s povoláním jedince či z životního prostředí, jako jsou azbest, arsen, radon a polycyklické aromatické uhlovodíky (Torre et al. 2015). V roce 2018 byl karcinom plic zodpovědný za 18,4 % úmrtí. Dalším v pořadí, při přihlédnutí k počtu úmrtí, je kolorektální karcinom (9,2 %), přičemž v České republice se jedná o druhý nejčastější typ nádorového onemocnění vůbec. Poté následují karcinom žaludku (8,2 %), karcinom jater (8,2 %), karcinom prsu (6,6 %), karcinom jícnu (5,3 %), karcinom slinivky břišní (4,5 %) a karcinom prostaty (3,8 %) (graf č.1) (WHO 2018).



**Graf 1:** Rozdělení nádorových onemocnění dle incidence a úmrtí (WHO 2018).

### 3.1.2 Kolorektální karcinom

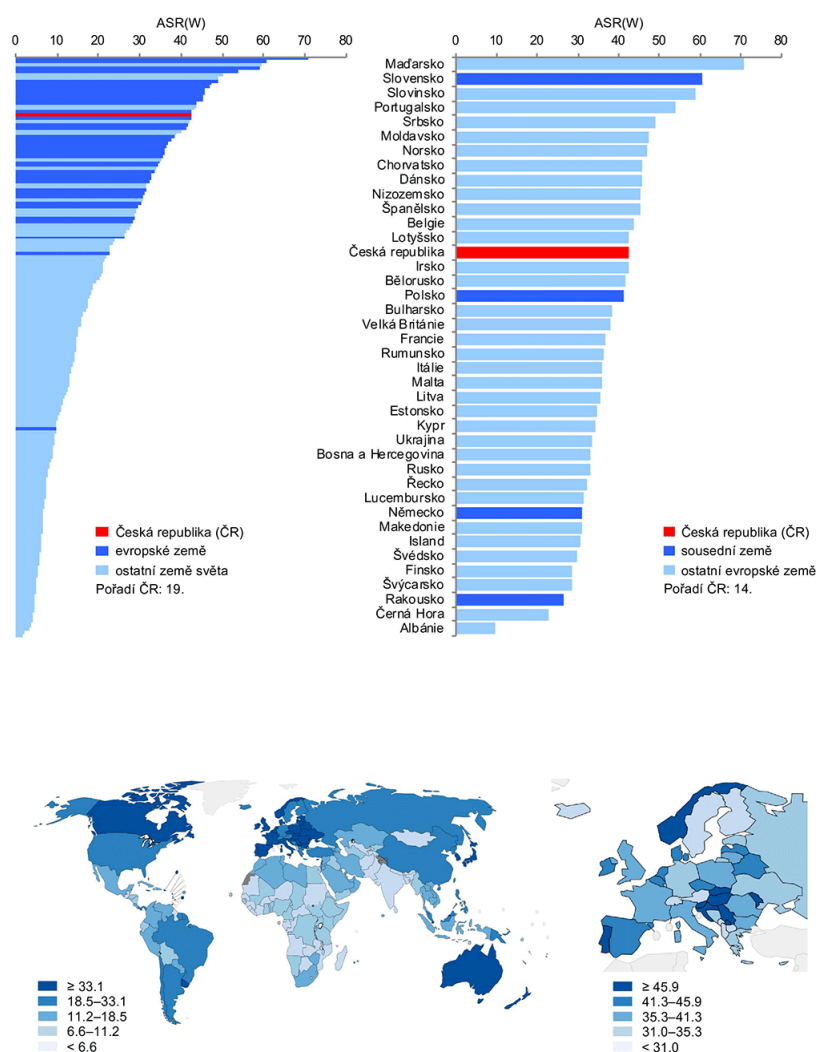
Celosvětově je kolorektální karcinom (KK) třetím nejvíce diagnostikovaným nádorovým onemocněním a druhou nejčastější malignitou v Evropě. Nejvyšší míra výskytu je v zemích střední a východní Evropy, což je způsobeno kombinací společných vnějších rizikových faktorů spojených s nezdravým životním stylem a genetickou predispozicí. Kolorektální karcinom představuje v České republice vážný zdravotní problém a výskyt i úmrtnost neustále rostou i přes pokroky klinické onkologie (Suchánek et al. 2014). Česká populace patří v mezinárodním měřítku mezi nadprůměrně zatížené tímto onemocněním, a to zejména muži. V incidenci zhoubných KK stojí česká populace mužů ve světě na 19. místě a v Evropě na 14. místě (obrázek č.1), ženami je pak obsazeno 28-29. místo ve světě a 18.-19. místo v Evropě (obrázek č.2). Ročně je zde diagnostikováno zhruba 8000 pacientů s téměř 50% úmrtností (graf č.2) (NOR 2015). Ta je způsobena zejména pozdním nástupem příznaků s čímž souvisí i opožděná diagnostika. Většina onkologických pacientů je léčena klasickou cestou obsahující chirurgickou resekci s následnou adjuvantní chemoterapií. Bohužel doba a kvalita života u těchto pacientů je krátká a obecně špatná (Weekes et al. 2009).



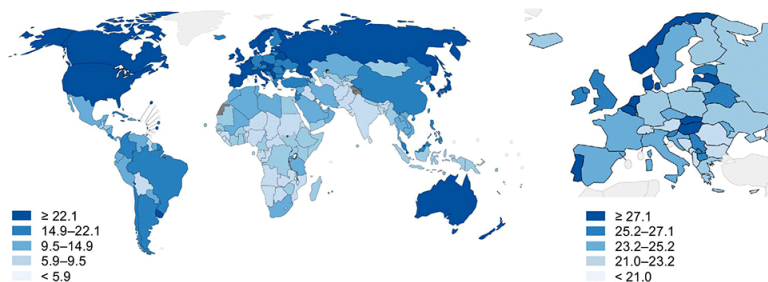
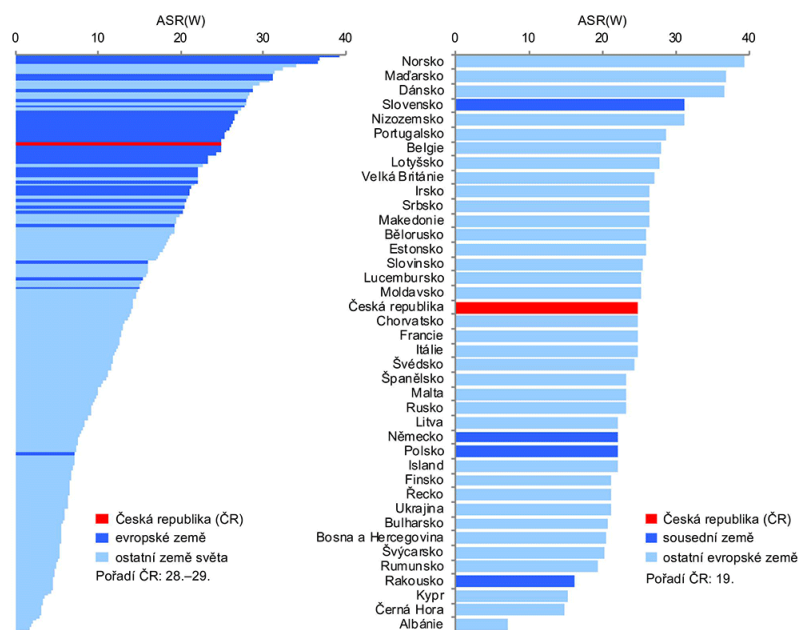
**Graf 2:** Incidence a úmrtnost na kolorektální karcinom v České republice (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Národní onkologický registr (NOR) 2015. Dostupné z <http://uzis.cz/>)

Preventivní opatření pro KK zahrnují udržování správné tělesné hmotnosti, fyzickou aktivitu, minimalizaci spotřeby průmyslově zpracovaného masa, alkoholu a zamezení kouření.

Dále je u rizikových skupin doporučován pravidelný screening detekující různé polypy na střešní sliznici, které je možné odstranit dříve než se z nich stanou nádory v pokročilém stádiu. Případně lze tímto preventivním vyšetřením detekovat KK v rané fázi, kdy je léčba obvykle méně rozsáhlá a úspěšnější (Torre et al. 2015). Screening KK se dělí do dvou širokých kategorií, a to konkrétně na testy stolice (okultní krev a exfoliační testy DNA) a na strukturální vyšetření (flexibilní sigmoidoskopie, kolonoskopie a počítačová tomografická kolonografie). Testy stolice primárně odhalují přímo nádorová onemocnění. Oproti tomu strukturální vyšetření detekují jak nádorová onemocnění, tak i premaligní léze. Za nejpřesnější test včasné detekce polypu je považována kolonoskopie (Quintero et al. 2012). Ovšem na druhou stranu tento vysoce citlivý screeningový způsob vyžaduje zkušeného examinátora, je finančně náročný a ve srovnání s jinými testy představuje pro pacienta větší riziko (Torre et al. 2015).



**Obrázek 1:** Incidence nádorů tlustého střeva a konečnicku v mezinárodním srovnání u mužů. ASR(W) - počet nově diagnostikovaných nádorů na 100 000 osob věkově standardizovaný na světový věkový standard (Ferlay et al. 2018)



**Obrázek 2:** Incidence nádorů tlustého střeva a konečníku v mezinárodním srovnání u žen. ASR(W) - počet nově diagnostikovaných nádorů na 100 000 osob věkově standardizovaný na světový věkový standard (Ferlay et al. 2018)

### 3.2 Léčba nádorových onemocnění

Onkologická onemocnění se léčí převážně multimodálním způsobem, kdy je využito více léčebných postupů současně. Druh léčby závisí na typu a rozsahu nemoci. Dalším aspektem, který je třeba v léčebném plánu zohlednit, je celkový zdravotní stav pacienta (Mitra et al. 2015). V závislosti na typu nádoru a stupni jeho pokročilosti existují tři typy postupu léčby, konkrétně se jedná o kurativní, paliativní či symptomatickou protinádorovou léčbu.

V případě kurativní léčby je cílem úplné odstranění nádoru. Oproti tomu u paliativní léčby je snaha o potlačení či odstranění obtíží, které souvisí s růstem nádoru, přičemž není soustředěna na úplné vyléčení nemoci. Jedná se zejména o prodloužení života jedince s pokročilým onemocněním při zachování nejvyšší možné kvality života v dlouhodobém i krátkodobém horizontu. Symptomatická léčba neovlivňuje průběh onemocnění, nýbrž jen zmírňuje doprovázející obtíže pacienta (Siegel et al. 2012).

Při léčbě onkologických onemocnění lze aplikovat léčebné metody, jako jsou chirurgický zákrok, radioterapie, chemoterapie, biologická terapie, pod kterou lze řadit hormonální terapii

či imunoterapii. Další možností léčby nádorových onemocnění je alternativní medicína (Block et al. 2015).

Léčba nádorového onemocnění je pro pacienty velmi náročná z několika mnoho důvodů. Je důležité si uvědomit, že pacienti, kteří podstoupili léčbu a zotavili se z nádorového onemocnění, se musí vypořádat s dlouhodobými účinky léčby včetně obav z recidivy dané nemoci. Je uváděno, že nadváha a obezita souvisí s větší pravděpodobností návratu daného onemocnění. Rovněž kouření po léčbě zvyšuje riziko recidivy. Oproti tomu snížení nebezpečí návratu onemocnění je spojováno se zvýšenou fyzickou aktivitou a stravou bohatou na ovoce, zeleninu a celozrnné výrobky, která však obsahuje omezené množství tuku, průmyslově zpracovaného masa a jednoduchých cukrů (Siegel et al. 2012).

### 3.2.1 Prevence výživou

Výživa je pro pacienty s nádorovým onemocněním důležitá a významná zejména z důvodu prevence. Jako prevence před vznikem nádorových onemocnění včetně KK je konzumace ovoce, zeleniny, vlákniny a vyhýbání se příjmu nadměrnému tuku (Cassileth & Deng 2003). Ovoce a zelenina je bohatá na biologicky aktivní látky, konkrétně antioxidanty, které mají schopnost zhaset volné radikály a tím působit preventivně při vzniku nádorových onemocnění (Griffiths et al. 2016). U řady antioxidantů byl pomocí *in vitro* metod zjištěn selektivní účinek na nádorové buněčné linie se schopností indukovat buněčnou proliferaci (Martín et al. 2016). Obdobné výsledky byly zaznamenány i v *in vivo* podmínkách. Z výsledků epidemiologické studie dle Borek (2004) je patrné, že příjem potravin bohatých na antioxidanty přímo souvisí se snížením rizika vzniku nádorových onemocnění. Je také důležité, aby pacienti přijímali antioxidanty během léčby, kdy se tím může zvýšit její účinnost. Jejich přísun je doporučován i po léčbě, kdy antioxidanty mají vliv na zlepšení celkového zdravotního stavu (Ladas et al. 2004).

Borek (2004) prokázal, že antioxidanty, jako jsou vitamin E a C zlepšují nežádoucí vedlejší účinky spojené s poškozením normálních buněk volnými radikály při léčbě nádorových onemocnění, jako jsou fibróza a mukozitida. Ovšem všechny antioxidanty nelze považovat za rovnocenné při hodnocení jejich možného dopadu na chemoterapii a nelze očekávat, že bude mít stejný dopad na aktivitu všech chemoterapeutik (Conklin 2004). Mezi antioxidanty, které nejsou tvořeny metabolismem a jsou přijímány potravou, tzv. exogenní antioxidanty, patří právě askorbát, tokoferol a karotenoidy, jejichž hlavním zdrojem jsou zejména ovoce a zelenina. Vedle těchto exogenních antioxidantů jsou známy i antioxidanty endogenní, jako jsou například superoxiddismutasa, kalasa či glutathion (Khan et al. 2014; Chahal et al. 2018).

Léčba mnoha onemocnění je také vysoce závislá na přírodních látkách, které mohou být použity jako šablony pro budoucí protinádorová léčiva (Doskočil et al. 2015). V posledních letech bylo mnoho biologicky aktivních složek izolováno z řady čínských bylin, přičemž u nich byla potvrzena protinádorová aktivita. Z toho důvodu je hledání nových cytostatik v rostlinné říši stále významnějším směrem výzkumu (Chen et al. 2016).

### 3.2.2 Alternativní a doplňková medicína

Doplňková léčba, jak už název napovídá, se běžně používá jako doplněk k běžné léčbě nádorových onemocnění. Jedná se o podpůrná opatření, která potlačují příznaky a přispívají i k lepšímu psychickému stavu nemocného. Zdá se, že toto spojení je pro pacienty stále více

atraktivnější. V průběhu času se některé doplňkové terapie začlenily do běžné péče a vytvářejí integrativní onkologii-syntézu tradiční léčby s racionálními doplňkovými terapiemi.

Oproti tomu alternativní terapie je využívána především namísto tradiční léčby. To je obzvláště problematické, jelikož opožděná terapie může snížit možnost remise. Mohou být také potenciálně škodlivé a extrémně nákladné (Cassileth & Deng 2003). Navíc velká část z alternativních metod léčby nemá ověřenou účinnost a často ani není popsán jejich mechanismus účinku (Gale 2014). Společným rysem napříč alternativními terapiemi je důraz na dosažení harmonického stavu mysli a těla. Ošetřující onkolog by měl být obeznámen s konkrétní léčbou pacienta a měl by ho nasměrovat ke spolehlivým zdrojům informací (Cassileth & Deng 2003).

Mezi alternativní léčbu nádorových onemocnění se řadí různé diety a doplňky stravy jako jsou alkalická dieta, makrobiotická strava, ketogenní způsob stravování či metabolické terapie (Zick et al. 2018). Jejich zastánci tvrdí, že daná strava může onemocnění léčit, i přestože žádná studie doposud nepotvrdila, že dieta sama o sobě vyléčit nádorové onemocnění dovede. Někteří pacienti a alternativní lékaři se domnívají, že velké dávky či intravenózní infuze vitamínu C mohou být proti nádorovým onemocněním účinné. Tato teorie plyne z události z roku 1968, kdy laureát Nobelové ceny Linus Pauling vytvořil termín „orthomolekulární“, který popisuje léčbu nemocí právě vysokým příjmem živin (Reczek & Chandel 2015). Ovšem tvrzení, že vysoké dávky vitamínu C mohou nádorové onemocnění vyléčit bylo studii (Creagan et al. 1979; Moertel et al. 1985) krátce nato vyvrácené.

Další alternativní terapií onkologických pacientů je homeopatie neboli homeopatická medicína, která vznikla v Německu v 18. století. Vychází z teorie similiánského principu - „jako léky podobné“. Jedná se o sériové ředění a intenzivní třepání látky, aby se dosáhlo její účinnosti. Pacienti věří, že vlastní léčebný proces těla je stimulován těmito vysoce zředěnými látkami získanými z rostlin, minerálů nebo zvířat. Účinnost je však nepravděpodobná z důvodu extrémního zředění účinných látek. Doposud provedené studie neprokazují důkaz, že by homeopatické léky měly přínos pro zdravotní stav pacientů s nádorovým onemocněním (Unlu et al. 2017)

Pro paliativní léčbu je využívána hudební terapie, která má přínos pro snížení úzkosti, deprese a bolesti pacienta (Krishnaswamy & Nair 2016). Hudební terapie zajišťují profesionální hudebníci a hudební terapeuté, kteří jsou vyškoleni k řešení psychosociálních i klinických problémů, kterým čelí pacienti i jejich přímé okolí (Bradt et al. 2014).

V neposlední řadě mají v alternativní léčbě zastoupení také duchovní léčení a chiropraktická terapie (Cassileth & Deng 2003).

### 3.2.3 Chirurgický zákrok

Cílem chirurgického zákroku při léčbě nádorových onemocnění je kurativní efekt, tedy léčebný záměr. Méně často je určen pro paliativní léčbu příznaků. V roce 2015 více než 80 % případů nádorového onemocnění vyžadovalo chirurgický zákrok (Sullivan et al. 2015). Jedná se o primární způsob léčby maligních onemocnění dolního gastrointestinálního traktu a standardní resekce je terapií, která je nutná pro včasnou léčbu nádorového onemocnění. S pokračujícím stádiem se šance na vyléčení samotným chirurgickým zákrokem zmenšuje a v těchto případech je zapotřebí aplikovat multimodální způsob (Akgül et al. 2014). Dalším případem, kdy je zvolena léčba chirurgicky je karcinom prsu u žen v raném stádiu. Zákrokem

je odstraněn pouze nádor, který byl detekován v prsu či jeho bezprostředním okolí, neřeší však nezjištěná ložiska v důsledku kterých může dojít k životu ohrožující recidivě (Abe et al. 2005). Ukázalo se, že adjuvantní terapie zvyšují pravděpodobnost vyléčení u chirurgicky léčených pacientů, u nichž je vysoké riziko recidivy ( Akgül et al. 2014).

#### 3.2.4 Radioterapie

Radioterapie neboli léčba ionizujícím zářením je aplikována pro její paliativní a kurativní efekt. V boji s nádorovým onemocněním je účinná zejména díky schopnosti selektivně zacílit na nádory a snaže co nejméně zasáhnout okolní tkáň. Poškozuje DNA nádorových buněk, což vede k jejich omezení či zastavení proliferace (Formenti & Demaria 2013). Ovšem vyvolává nejen přímé cytotoxické účinky na nádorové buňky, ale také je touto léčbou ovlivňováno mikroprostředí nádoru tak, aby vykazovalo silnou protinádorovou imunitní odpověď (Weichselbaum et al. 2017).

Radioterapie je nedílnou součástí koncepcí multimodální léčby. Často je zařazena do léčby před i po chirurgickém zákroku z důvodu eliminace reziduí. Velmi často je také užívána společně s chemoterapií, se kterou má synergický účinek, jelikož chemoterapie zvyšuje citlivost nádoru na radiační záření (Yao et al. 2019). Je také aplikována starým a slabým onkologicky nemocným pacientům jako alternativa chirurgického zákroku či chemoterapie, které jsou pro jejich tělo větší zátěží. Samostatným léčebným postupem může být i u pokročilých neoperovatelných nádorů (Lancellotta et al. 2018). Nejčastějšími vedlejšími účinky léčby jsou únava, nevolnost, zvracení, nechutenství, průjemy a kožní změny (Ruhlmann et al. 2017). Dalším negativem léčby je recidiva nemoci u 15-20 % pacientů do 30 let po počáteční diagnóze, což je spojováno zejména s kumulativními dávkami záření (Emadi 2011).

#### 3.2.5 Imunoterapie

Cílená biologická léčba je nejmodernější onkologickou terapií s velkým potenciálem do budoucna. Imunoterapie je zacílena na imunitní systém, nikoli na samotný nádor. Znamená to, že do ostatních tkání v lidském těle zasahuje minimálně, což výrazně eliminuje nežádoucí účinky této terapie. Je součástí standardních léčebných postupů u řady pacientů s onkologickým onemocněním, jako jsou karcinom tlustého střeva, prsu, plic, ledvin, jater a zhoubné onemocnění krve. Ovšem léčba není účinná proti všem typům nádorových onemocnění. Vědci se snaží identifikovat biomarkery, které by mohly vést k způsobům, jak zvýšit účinnost imunoterapie (Farkona et al. 2016).

Tento způsob léčby je v současné době předmětem mnoha studií. Negativem je skutečnost, že mechanismus působení není zcela znám, ovšem u většiny případů dochází k pozitivním výsledkům. Couzin-Frankel (2013) uvádí, že pacienti s pokročilým melanomem, kterým byla podávána protilátka, žili průměrně 10 měsíců ve srovnání s pacienty, kteří žili 6 měsíců bez ní. Dle Pardoll et al. (2012) je tato léčba schopna u pacientů s refrakterním onemocněním nádor zmenšit a u dalších pacientů se prodloužila dobažití nad rámec toho, co bylo očekávané.



### 3.2.6 Chemoterapie

Chemoterapie zůstává i přes veškeré pokroky v léčbě nádorových onemocnění jednou z nejpoužívanějších léčebných metod, a to buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými typy léčby (Chaveli-López 2014). Nejčastěji je zařazena po chirurgickém zákroku či po radioterapii z důvodu destrukce zbylých nádorových buněk, což vede k snížení rizika výskytu metastáz, kdy se jedná o tzv. adjuvantní chemoterapii. V opačném případě se chemoterapie aplikuje bezprostředně před operací, aby se nádor zmenšil a byl lépe operovatelný. U některých pacientů může být chemoterapie jedinou léčbou, kterou podstoupí (Bosset et al. 2006). Cílem této léčebné metody je kurativní nebo paliativní účinek na nádorové onemocnění. Pacientům jsou podávána protinádorová léčiva, tzv. cytostatika. Cytostatika jsou farmaceutické přípravky, které jsou cytotoxické či cytostatické. Cytostatika jsou schopna zastavit buněčné dělení a ničit buňky poškozením jejich genetické informace. Působí různými mechanismy na syntézu nukleových kyselin a poškozují je nebo ničí mikrotubuly při mitóze a navozují apoptózu. Dle mechanismu účinku je lze dělit na ty, co inhibují replikaci DNA, jako jsou antimetabolity, inhibitory topoizomeráz či látky působící alkylačním nebo interkalačním mechanismem. Druhou skupinou jsou látky, které inhibují mitózu, konkrétně taxany (paklitaxel, docetaxel) a vinka-alkaloidy (vinkristin, vinblastin, vinorelbin) (Chaveli-López 2014).

Způsob aplikace může být nitrožilní, infuzí či perorálně v pravidelných cyklech. Při léčbě chemoterapií bývají zasaženy i zdravé tkáně, jelikož cytostatika nepůsobí dostatečně selektivně. Nenarušují výhradně jen buňky nádorové, ale působí i rychle se množící zdravé buňky, jako jsou buňky kostní dřeně, buňky vlasových folikulů, ústní a gastrointestinální sliznice (Muhamad et al. 2018). Léčba chemoterapií je doprovázena dalšími vedlejšími účinky projevující se nevolností, zvracením, průjmem, imunosupresí a myelosupresí v důsledku které dochází k poklesu červených i bílých krvinek (Wu et al. 2005). To vše negativně ovlivňuje fyzické zdraví, kvalitu života a emoční stav jedince. Zvládnutí těchto vedlejších účinků může vést k snížení dávky chemoterapie, což se může projevit sníženou mírou přežití (Pearce et al. 2017).

Dalším možným negativem je rezistence nádorových buněk k chemoterapeutickým látkám, která snižuje účinnost protinádorových léků. Rezistence může být vrozená či získaná schopnost nádorových buněk a je jedním z nejnaléhavějších hlavních témat z oblasti léčby nádorových onemocnění. Může vzniknout v důsledku několika faktorů souvisejících s hostitelem či nádorem samotným. Důsledkem rezistence na chemoterapii je vyšší riziko úmrtnosti léčeného jedince (Sui et al. 2013; Alfarouk et al. 2015).

Velký potenciál ke snížení výše zmíněných negativ má dodávání protinádorových látek prostřednictvím nanočástic. Začleněním chemoterapeutických látek do nanočástic na bázi lipidů, konkrétně liposomů, které jsou považovány za všestranný nosič léků, může pomoci zlepšit jejich specifitu vůči nádorovým buňkám. V důsledku toho je redukován vliv nežádoucích vedlejších účinků protinádorových léčiv na normální buňky a zároveň zvyšována jejich protinádorová účinnost. Dále může dojít k prodloužení doby oběhu protinádorových léčiv a tím k zvýšení jejich dostupnosti (Yingchoncharoen et al. 2016). Zhao et al. (2018) uvádí, že chemoterapie zprostředkovaná nanotechnologiemi je proto v současné době trendem klinického výzkumu, který může vést k pozoruhodně zvýšené terapeutické účinnosti s malými vedlejšími účinky na zdravé tkáně.

### 3.2.7 Phytochemikálie v terapii nádorových onemocnění

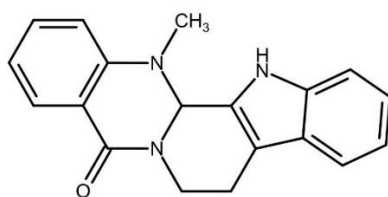
Přírodní produkty vždy hrály velmi významnou roli při objevování a vývoji nových léků pro léčbu řady onemocnění. Zvláště zřejmé je to u nádorových onemocnění, kde více než 60 % léčiv je přírodního původu. Chemoprevence zahrnuje použití různých přírodních nebo biologických činidel k inhibici nebo reverzi růstu nádoru. Phytochemikálie z léčivých rostlin jsou sloučeniny schopné ovlivnit buněčnou proliferaci a regulaci buněčného cyklu. Obvykle se také účastní mnoha signálních drah, které jsou narušeny při iniciaci, proliferaci a množení nádorů (Kotecha et al. 2016). Rostliny z čeledi *Amaryllidaceae* jsou již od starověkého Řecka známy svými léčivými a toxickými účinky. Právě z tohoto důvodu je usilováno o izolaci jejich aktivních složek, které jsou odpovědné právě za protinádorovou aktivitu a následnou syntetickou přípravu (Ingrassia et al. 2008).

Mezi sloučeniny s protinádorovým účinkem patří například evodiamin izolovaný z ampáku routoplochého (*Evodia rutaecarpa*), vinka-alkaloidy izolované z brčálu (*Vinca L.*) a barvínkovce růžového (*Catharanthus roseus*), kamptothecin izolovaný z kůry kamptotěky ostrolisté (*Camptotheca acuminata*), paklitaxel izolovaný z tichomořského tisů (*Taxus brevifolia*) a indirubin izolovaný z indigovníku (*Indigofera*) (Cassileth & Deng 2003).

#### **Evodiamin**

Evodiamin, přirozeně se vyskytující chinolinový alkaloid, je hlavní složkou ampáku routoplochého (*Evodia rutaecarpa*), přičemž je izolován z jeho plodů. V tradiční čínské medicíně se využívá již řadu let k léčbě gastrointestinálních poruch, bolesti hlavy, amenorey a poporodního hemoragie. Bylo prokázáno, že má antinociceptivní, protizánětlivý, vazodilatační, termoregulační, uterotonický a antiproliferační účinek (Jiang & Hu 2009).

Evodiamin má protinádorový potenciál inhibicí proliferace různých nádorových buněčných linií, včetně nádorových buněk děložního čípku, pankreatu, nosohltanu, kolorektálního karcinomu, plicního karcinomu, melanomu, leukemických T-lymfocytů, nádorových buněk prostaty, vaječníků a prsu (Hu et al. 2018). Dalším způsobem, jak evodiamin vykazuje protinádorovou aktivitu, je indukce apoptózy a snížení invaze a metastázování nádorových buněk. Evodiamin tedy představuje velmi nadějný chemoterapeutický činidlo (Chen et al. 2010). Jak uvádí Chien et al. (2014), podávání evodiaminu významně inhibuje proliferaci buněk kolorektálního karcinomu a indukuje zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M v závislosti na dávce. V *in vivo* studii na myších bylo zjištěno, že podávání evodiaminu indukuje apoptózu a zároveň zmenšuje objem nádoru (Sui et al. 2016). Ovšem pro zvýšení antiproliferačních účinků musí být evodiamin syntetizován, jelikož jeho deriváty mají zvýšenou biologickou dostupnost a jejich užití jako terapeutického léčiva je účinnější, než je tomu u čisté přírodní látky (Hu et al. 2018).



**Obr.3:** Evodiamin

## Vinka-alkaloidy

Vinka-alkaloidy jsou izolovány z brčálu (*Vinca L.*) a katarantu růžového (*Catharanthus roses*). V 50. letech 20. století byly poprvé objeveny kanadskými vědci Robertem Noblem a Charlesem Thomasem Beerem. Původně byly považovány za hypoglykemická činidla. Ovšem tato hypotéza byla zamítnuta, jelikož studie *in vivo* (Johnson et al. 1963) na králicích nepozorovala žádné snížení hladiny cukru v krvi. O pár let později bylo (Johnson 1968) prokázáno, že jsou tyto sloučeniny schopny vyvolat myelosupresi na xenograftových myších modelech leukémie. To tedy napomohlo k zjištění, že vykazují protinádorový efekt (Moudi et al. 2013; Martino et al. 2018). Byly to vůbec první přírodní látky, které se v protinádorové terapii začaly užívat. Ovšem z rostliny bylo možné izolovat jen velmi malé množství, proto začala být hledána možnost, jak připravit tyto látky synteticky.

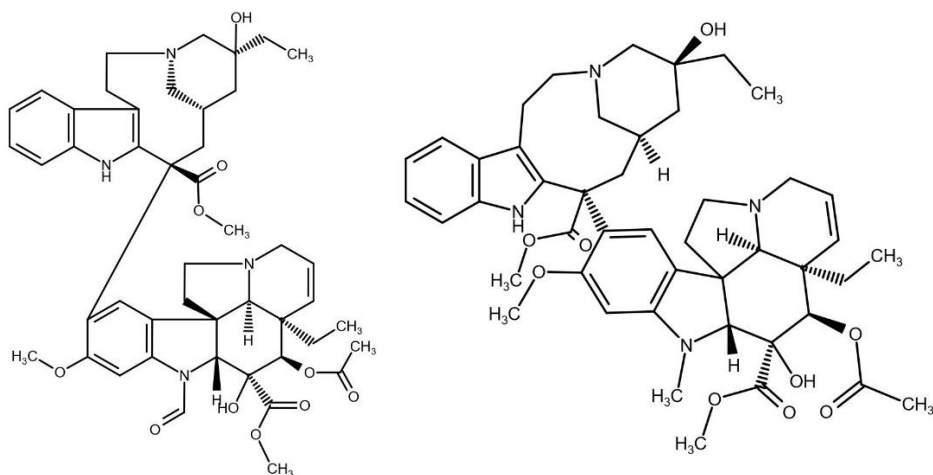
V klinickém použití existují dva hlavní vinka-alkaloidy-vinblastin a vinkristin. Jedná se o dimerické alkaloidy terpenoidního charakteru, které se od sebe strukturně liší pouze jednou funkční skupinou na indolovém dusíku, přičemž u vinblastinu se jedná o methylovou a u vinkristinu o formylovou. Jejich cytostatická aktivita spočívá ve specifické vazbě na bílkovinu dělicího vřeténka, tubulin, která je nezbytná pro buněčné dělení. To vede k tomu, že se buněčný cyklus zastaví v metafázi a dochází k apoptóze (Okouneva et al. 2003).

Vinblastin je nedílnou součástí léčebných režimů pro karcinom varlat, karcinom prsu, Hodgkinových i ne-Hodgkinových lymfomů. Nevýhodou tohoto léčiva jsou vedlejší účinky, které mají za následek poškození kostní dřevě a v důsledku toho hematotoxicitu. Jsou jím poškozeny bílé krvinky a pacient může trpět nevolností, zvracením, zácpou, dušností, bolestí na hrudi či horečkou (Klener & Klener 2013).

Oproti tomu vinkristin je vůči krvi toxický méně. Používá se v kombinované léčbě Hodgkinova lymfomu, sarkomů, karcinomů a leukémií. Až u 90 % dětských pacientů trpících akutní lymfoidní leukémií nedochází po léčbě vinkristinem k návratu onemocnění. Jeho použití je, ale značně omezeno neurotoxicitou. Dále se může vyskytnout nevolnost, zvracení či potlačení aktivity kostní dřevě (Moudi et al. 2013).

Souhrnně mají tato chemoterapeutická činidla, zaměřující se na mikrotubuly, vysoký terapeutický potenciál. Ovšem vykazují i řadu výše zmíněných vedlejších účinků. Zejména neurotoxicita představuje v terapii nádorových onemocnění velmi významnou překážku. Právě proto jsou stále vyvíjeny a zkoumány nové léčebné strategie, které by snížily toxicitu a naopak zvýšily terapeutický účinek. Mimo to jsou hledány i syntetické deriváty, které by vykazovaly vyšší účinnost a lepší farmakokinetické vlastnosti (Martino et al. 2018).

Také z hlediska vysoké toxicity výše zmíněných vinka-alkaloidů bylo vytvořeno několik semisyntetických derivátů, které vykazují toxicitu nižší. Jedná se o vinorelbin, který je schválen k léčbě nemalobuněčného karcinomu plic, a vindesin jako chemoterapeutikum maligního melanomu (Moudi et al. 2013).

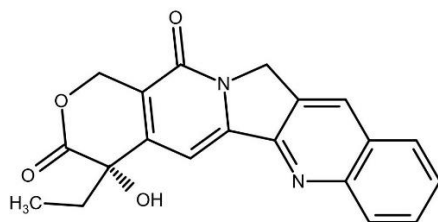


Obr.4: Vinkristin a vinblastin

### Kamptohecin

Kamptohecin je alkaloidem izolovaným z kůry čínského stromu kamtoteky ostrolisté (*Camptotheca acuminata*). První izolace tohoto alkaloidu s vysokým cytotoxickým účinkem byla provedena roku 1966 (Hatefi & Amsden 2002). V současné době je známým mechanismem účinku kamptohecinu schopnost inhibovat aktivitu DNA topoisomerázy 1, která tak způsobuje poškození DNA a smrt nádorových buněk v důsledku neschopnosti buněk dokončit replikaci DNA. Během posledních pěti desetiletí bylo syntetizováno a testováno několik tisíc analogů kamptohecinu, většina z nich je však pro normální tkáň vysoce toxická nebo má jiné nevýhody, což je činí nevhodnými kandidáty na léčbu nádorových onemocnění (Ling et al. 2015).

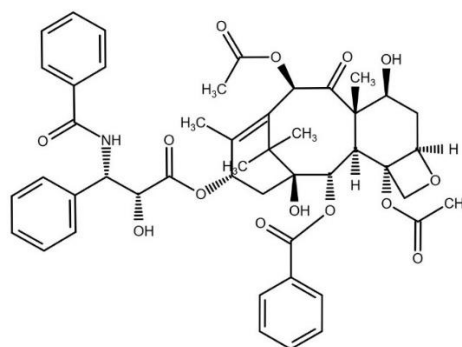
K dnešnímu dni jsou pro terapii nádorových onemocnění schváleny pouze dva analogy kamptohecinu-topotekan a irinotekan. Topotekan je využíván v léčbě malobuněčného plicního karcinomu a karcinomu vaječníků. Irinotekan se používá pro léčbu kolorektálního karcinomu (Sun et al. 2016).



Obr.5: Kamptohecin

### Paklitaxel

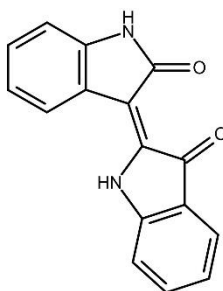
Paklitaxel, alkaloid řadící se do taxanů, je izolován z kůry tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*) a je využíván v medicíně jako cytostatikum. Působí jako vřetenkový jed a tím brání dělení nádorových buněk (Lavelle et al. 1995; Giovinazzi et al. 2013). Jsou známy jeho nežádoucí účinky jako nevolnost, neutropenie nebo periferní neuropatie (Lyseng-Williamson & Fenton 2005). Polysyntetickým derivátem je docetaxel, který je využíván zejména v léčbě karcinomu prsu a vaječníků (Singla et al. 2002).



Obr.6: Paclitaxel

## Indirubin

Indirubin, izomer indiga, lze využít k léčbě chronických onemocnění díky jeho protizánětlivým a protinádorovým účinkům (Sethi et al. 2006). Byla také prokázána jeho antileukemická účinnost při léčbě chronické myeloidní leukémie, kdy více než 50 % léčených pacientů vykazovalo částečnou nebo úplnou remisi. Toxicita indirubinu byla nízká a vedlejší příznaky, pociťované zhruba polovinou účastníků, byly mírné bolesti břicha, průjem a nevolnost. Ve třech případech byla hlášena reverzibilní plicní arteriální hypertenze a srdeční nedostatečnost (Blažević et al. 2015). Modifikace indirubinu vedla k vytvoření nových protinádorových sloučenin se silným inhibičním potenciálem. Některé deriváty, konkrétně N-ethyl-indirubin, 5-halogen-indirubins, a N-methylisoindigotin (meisoindigo), vykazují vyšší inhibiční aktivitu než indirubin sám (Eisenbrand et al. 2004; Blažević et al. 2015). Ve studii dle Kim et al. (2007) bylo prokázáno, že nové deriváty indirubinu, konkrétně 5'-nitroindirubinoxim, 5'-fluorindirubinoxim a 5'-trimethylacetaminoindirubinoxim, účinně zastavily růst nádoru inhibicí proliferace buněk a indukci apoptózy. Tato zjištění poskytují potenciální hodnotu derivátů indirubinu jako nových kandidátů na protinádorová činidla.



Obr.7: Indirubin

### 3.3 Alkaloidy

#### 3.3.1 Obecná charakteristika

Alkaloidy jsou jednou z nejrozmanitějších skupin ze sekundárních metabolitů živých organismů. Obvykle jsou syntetizovány především rostlinami, méně pak živočichy a mikroorganismy. Vyskytují se v celé rostlině, avšak nejvíce jsou obsaženy v cibuli. V rostlinách plní zejména ochrannou funkci. Z důvodu jejich charakteristické hořké chuti jsou dokonalými odpuzujícími prostředky proti bezobratlým živočichům i obratlovcům (Matsuura & Fett-Neto 2015). Již před více než 20 lety Roberts & Wink (1998) zjistili, že jedinou

vyjímkou jsou husy, které jsou k této chuti tolerantní. Dále jsou alkaloidy rostlinami vylučovány jako detoxikační produkty dusíkatých látek. Ovšem to není pro rostlinnou říši natolik významné.

Termín alkaloid byl poprvé představen v roce 1819 německým chemikem Carlem Friedrichem Wilhelmem Meißnerem k charakterizaci látek, které považoval za alkalické (like alkali). Později bylo zjištěno, že se z chemického hlediska jedná o organické látky, které jsou zásadité z důvodu přítomnosti atomů dusíku vznikajících při přeměně aminokyselin (Güven et al. 2010).

První izolace těchto terapeuticky účinných látek byla provedena na začátku 19. století. V současnosti je známo více než 10 000 přírodních sloučenin, které jsou mezi alkaloidy řazeny. Často se jedná o látky špatně rozpustné ve vodě, zatímco v organických rozpouštědlech, jako jsou ethanol, benzen, ether a chloroform, je rozpustnost vysoká (Aniszewski 2015). Některé rostliny produkující alkaloidy jsou známy pro jejich halucinogenní a euforické vlastnosti. Ovlivňují nervovou soustavu a mohou být aplikovány jako drogy. Konkrétně se jedná například o rostlinu rudodřev koka (*Erythroxylon Coca*), z jejíchž listů je získáván kokain (Akwe 2017). Další návykovou látkou ze skupiny alkaloidů je morfin získávaný ze šťávy nezralých makovic máku setého (*Papaver somniferum*), přičemž acetylací obou hydroxylových skupin morfinu vzniká heroin (Dinis-Oliveira 2019).

Další zástupci alkaloidů mohou být vysoce toxické. Jejich původní historické využití bylo jako jedy v případě vražd, eutanázie či poprav. Ovšem krátce nato bylo zjištěno, že v malých dávkách mohou být využívány jako léčiva. Tento fakt je znám již stovky let, přičemž jsou alkaloidy dodnes v medicíně využívány a léky obsahující alkaloidy stále vyvíjeny pro klinické použití. Také jsou účinné například v boji proti leukémii, malárii, nádorovým onemocněním či Parkinsonově chorobě. Z těchto důvodů je tato skupina sloučenin velmi významná a vědecky zkoumána (Aniszewski 2015).

### 3.3.2 Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Alkaloidy se vyskytují minimálně u 25 % vyšších rostlin. Lze tedy říci, že každá čtvrtá rostlina z této podříše obsahuje alkaloid (Aniszewski 2015). Mezi vyšší rostliny se mimo jiné řadí i čeleď *Amaryllidaceae*. Jedná se o cibulovité krytosemenné rostliny. Do této čeledi patří více než 1000 druhů. Vyskytují se zejména v tropických a subtropických oblastech jižní Afriky a Jižní Ameriky. Na našem území se můžeme setkat s rostlinami z rodů sněženek (*Galanthus*), narcisů (*Narcissus*) a bledulí (*Leucojum*). Během posledních let jsou prováděny studie zkoumající čeleď *Amaryllidaceae* zejména díky obsahu biologicky cenných alkaloidů rozmanité chemické struktury a biologického účinku, které jsou považované jako potenciální léčiva nádorových onemocnění (Dalecká et al. 2013).

#### **Biologická aktivita alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae***

Alkaloidy vyskytující se v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae* mají široké farmakologické a fyziologické účinky, zejména protinádorové, antimikrobiální, antivirové, protizánětlivé, včetně inhibičních na acetylcholinesterázu (AChE) (Ding et al. 2016).

Inhibitory AChE, enzymu podílejícího se na metabolické hydrolýze acetylcholinu (ACh) při cholinergních synapsích, zvyšují koncentraci a dobu trvání synaptického účinku ACh. Aplikace inhibitorů je jedna z neužívanějších strategií při léčbě Alzheimerovy choroby

(Hoshino 1998; Ding et al. 2016). Elgorashi et al. (2006) uvádí, že vysoce účinným alkaloidem z čeledi *Amaryllidaceae* při inhibici AChE je galanthamin.

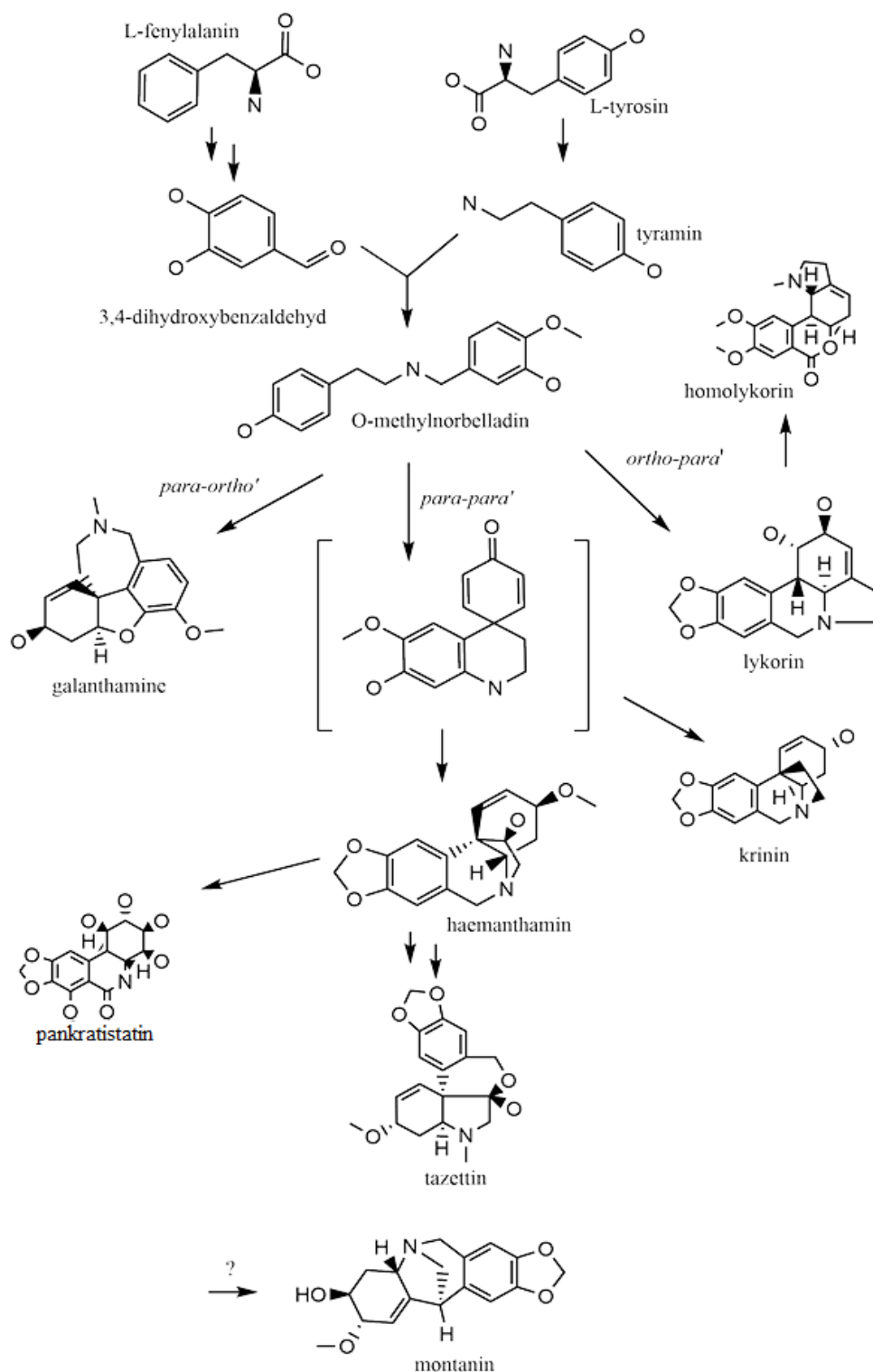
Antivirová aktivita alkaloidů *Amaryllidaceae* a jejich derivátů je dle D'Aiuto et al. (2018) způsobena blokováním virové DNA polymerázové aktivity (inhibicí syntézy virové DNA), nikoliv přímou inaktivací extracelulárních virů. Bylo prokázáno, že vykazují inhibiční účinky proti virům, jako jsou viry způsobující japonskou encefalitidu, žlutou zimnici, horečku dengue či *Herpes simplex* 1. typu (Gabrielsen et al. 1992; Dalecká et al. 2013).

Dále jsou alkaloidy *Amaryllidaceae* známy pro svoji protizánětlivou aktivitu (Ding et al. 2016). Ve studii dle Yui et al. (2001) bylo zjištěno, že u otoků vyvolaných karagenanem, vykazoval alkaloid haemanthidin protizánětlivé vlastnosti. Při dávce 100 mg/kg inhiboval otok o 36,5 % ve srovnání s 29,1 % u indometacinové kontroly. Dalším alkaloidem vykazujícím tento efekt je lykorin. Ovšem je méně účinný než výše zmíněný haemanthidin. U něj bylo evidováno zmenšení otoku pouze o 20,1 %.

Obecně jsou alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* nejznámější pro cytotoxický účinek k buňkám, které jsou nádorově transformované. Jejich protinádorová aktivita vychází zejména z toho, že mají schopnost indukovat apoptózu (Nair & Staden 2018). Také je u nich významná jejich vysoká selektivita pro nádorové buňky a poměrně nízká toxicita k zdravým či klidovým buňkám. Nejvyšší antiproliferační aktivitu z alkaloidů z *Amaryllidaceae in vitro* prokazují haemanthamin a lykorin. Po podání jejich jednorázové dávky 10  $\mu$ M byla průměrná hodnota procenta růstu (growth percentil-GP) u lykorinu i u haemanthaminu rovna 21 % oproti neošetřeným kontrolním buňkám (100 %). Ovšem v následném testování *in vivo* haemanthamin neprokázal statisticky významné snížení velikosti nádoru u Ehrlichova tumoru u myši. Efekt haemanthaminu začal být pozorován až při dávce 30 mg/kg, což představuje nejvyšší toxikologickou hranici u zdravých myších jedinců (Havelek et al. 2017). Doskočil et al. (2015) uvádí, že právě výše zmíněné alkaloidy, jako jsou haemanthamin a lykorin, lze považovat za perspektivní protinádorové léky vhodné pro další semisyntetickou modifikaci a studium závislosti mezi jejich strukturou a aktivitou.

### **Biosyntéza alkaloidů *Amaryllidaceae***

Specifickou biosyntetickou cestou amarylkovitých alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta vycházející z aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu, kdy je L-fenylalanin přeměněn na 3,4-dihydroxybenzaldehyd a L-tyrosin na tyramin. Po několika reakčních stupních z těchto produktů vzniká 4'-O-methylnorbelladin, což je klíčový meziprodukt této biosyntetické dráhy. Dle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká sedm základních skeletů, které jsou pojmenovány podle svého nejvýznamnějšího zástupce. Konkrétně se jedná o typ lykorinový (lykorin, galanthin), galantaminový (galantamin, narwedín), tazettinový (tazettin, 3-epimakronin), pankratistatinový (pankratistatin, narciklasin), homolykorinový (homolykorin, hippeastrin), haemanthaminový (haemanthamin, epimaritidin) a krininový (krinin, bulbispermin). Biosyntetická cesta k montaninovému (montanin, pankracin) strukturnímu typu nebyla zatím kompletně objasněna. Posledním typem je belladinový (O-methylbelladin) typ, ze kterého vychází vlastní biosyntéza alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* (Dalecká et al. 2013).



**Obr. 8:** Biosyntetická cesta hlavních strukturních typů alkaloidů *Amaryllidaceae* (Dalecká et al. 2013)

### 3.3.3 Typy alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae*

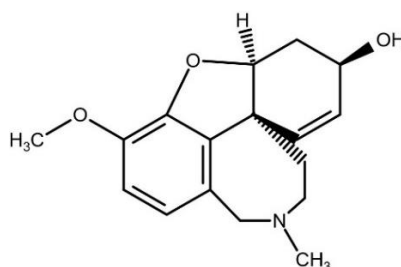
#### **Galanthaminový typ**

Alkaloidy galanthaminového typu mají jako strukturní základ dibenzofuran. Z medicínského významu je nejdůležitějším zástupcem galanthamin, který byl poprvé izolován z cibule sněženky (*Galanthus woronowii*) na počátku 50.let minulého století bulharskými



farmakology (Dalecká et al. 2013). Dále se hojně vyskytuje v bledulích (*Leucojum L.*) a narcisech (*Narcissus L.*). Dnes je již možná jeho chemická syntéza a je využíván zejména k léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba. Je prokázáno, že léčba této nemoci galanthaminem vede ke zlepšení kognitivních, funkčních i behaviorálních symptomů. V roce 2005 byl americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration-FDA) schválen jako lék (Pellegrino et al. 2018). Řadí se mezi klinicky užívané léčivo ve formě hydrobromidu a nejčastěji je dostupný pod komerčními produkty Nivalin, Razadyne a Reminyl, přičemž snášenlivost pacientů je relativně dobrá (Dalecká et al. 2013). Nežádoucí účinky, jako jsou nevolnost, zvracení, průjemy, bolesti hlavy, závratě, poruchy spánku či kolísání krevního tlaku, souvisí s periferními cholinergními projevy galanthaminu (Krejčová & Ševelová 2003).

Jedná se o reverzibilní, kompetitivní inhibitor acetylcholinesteráz. Pomáhá udržovat vyšší hladinu acetylcholinu, která je nezbytná k přenosu signálů v mozku (Roberts 1998). Je natolik specifický, že má minimální schopnost ovlivnit butyrylcholinesterasu. Galanthamin také allostericky moduluje presynaptické i postsynaptické nikotinové receptory, což posiluje cholinergní přenos informací (Ding et al. 2016). Působí protizánětlivě imunomodulací a snížením uvolňování zánětlivých cytokinů (Jiráček 2005).



Obr.9: Galanthamin

### Haemanthaminový a krininový typ

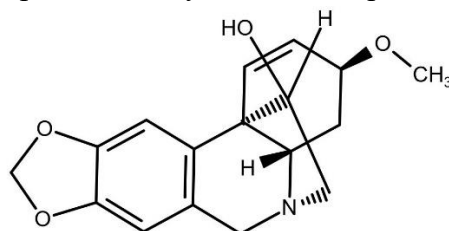
Tyto dvě skupiny jsou k sobě řazeny z důvodu, že haemanthamin i krinin jsou alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* odvozené od molekuly 5,10- $\beta$ -ethanofenanthridinu. Tyto dva typy jsou odlišné pouze v konfiguraci 5,10b-ethanového můstku. Do skupiny haemanthaminového typu patří vedle haemanthaminu alkaloidy, jako jsou vittatin, krinamin, haemanthidin či bulbispermin. Ke krininovému typu se kromě krininu řadí bufanisin, bufanidrin a undulatin. (Bastida et al. 2011).

Každý z těchto výše uvedených alkaloidů má odlišnou schopnost inhibovat růst nádorových buněk. Mezi nejúčinnější z této skupiny se řadí haemanthamin, který je jedním z nejvíce rozšířených alkaloidů vyskytujících se v čeledi *Amaryllidaceae* vůbec (Dalecká et al. 2013). Objevuje se zejména v cibulích rodu bělokvět (*Haemanthus*) a narcis (*Narcissus*). Oproti výše zmíněnému galanthaminu neovlivňuje aktivitu cholinesteráz. Je považován za protinádorové činidlo díky jeho schopnosti selektivní iniciace apoptózy nádorových buněk, přičemž nepůsobí cytotoxicky na zdravé buňky. Také působí na syntézu proteinů, biogenezi ribosomu a stabilizuje p53 v nádorových buňkách, což znamená, že je schopen zabíjet nádorové buňky účinněji než léčiva, která inhibují pouze syntézu proteinu nebo biogenezi ribosomu. Haemanthamin podporuje například podstatnou stabilizaci p53 v buňkách karcinomu tlustého střeva (Pellegrino et al. 2018). Ovšem mechanismus cytotoxické a antiproliferační aktivity není

dosud zcela známý (Havelek et al. 2014). Haemanthamin i jeho hydroxyderivát haemathidin vykazují i jiné biologické účinky, konkrétně antiparazitické a protizánětlivé. Haemathidin má navíc analgetické účinky s aktivitou vyšší než acetylsalicylová kyselina. O protinádorové aktivitě haemanthidinu je známo méně informací v porovnání s haemanthaminem (Cedron et al. 2012; Dalecká et al. 2013).

Vedle výše zmíněných alkaloidů se do této skupiny řadí i krinamin. Ten je schopen inhibovat transkripční faktor, tzv. HIF-1 $\alpha$ , což vede k zmírnění či potlačení růstu nádorů. HIF-1 $\alpha$  totiž aktivuje transkripci genů, které se podílejí na klíčových aspektech nádorových onemocnění, jako jsou angiogeneze a přežívání buněk (Kim et al. 2006). Ačkoliv mechanismus toho, jak krinamin ovlivňuje nádorové buňky, zůstává do značné míry neznámý, hromadící se důkazy naznačují, že to může být slibné protinádorové činidlo (Khumkhong et al. 2019).

Jak již bylo zmíněno do krininového typu se řadí i alkaloid bufanisin. Ve studii dle Vaněčková et al. (2016) byla testována jeho cytotoxická aktivita na buněčných liniích kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2 a zdravých buňkách tenkého střeva FHS 74Int. Bylo vyhodnoceno, že působí cytotoxicky k oběma buněčným liniím kolorektálního karcinomu (IC<sub>50</sub> na HT29 buňkách 5,3  $\pm$  1,7  $\mu$ M/ml a na Caco-2 buňkách 8,6  $\pm$  0,2  $\mu$ M/ml). U zdravé buněčné linie cytotoxicky nepůsobil (IC<sub>50</sub> 22,8  $\pm$  2,6  $\mu$ M/ml). Ve stejné studii na totožných buněčných liniích byl testován i alkaloid stejného strukturního typu krinin. U této látky bylo zjištěno, že cytotoxickou aktivitu nevykazuje k žádné uvedené buněčné linii. U všech linií prokázal inhibiční koncentraci vyšší než 50  $\mu$ M/ml. Při přihlídnutí k této studii lze tedy bufanisin hodnotit jako potenciálně lepším protinádorovým léčivem v porovnání s krininem.



Obr.10: Haemanthamin

### **Lykorinový typ**

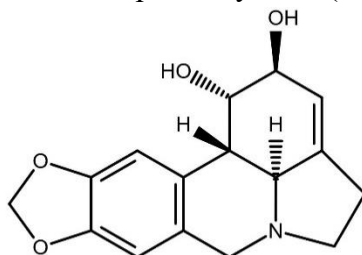
Alkaloidy řadící se k lykorinovému strukturnímu typu patří z hlediska cytotoxicity pravděpodobně k nejúčinnějším. Hlavním zástupcem této skupiny je lykorin, který byl v roce 1877 vůbec prvním izolovaným alkaloidem čeledi *Amaryllidaceae*. V řadě rostlin čeledi *Amaryllidaceae* se vyskytuje v majoritním zastoupení. Díky tomu je snadno dostupný v takovém množství, které je potřebné pro přípravu polysyntetických derivátů. Jedná se o pyrollofenanthridinový cyklický alkaloid s četnými biologickými vlastnostmi, jako je například antivirotická a antimykotická (Dalecká et al. 2013).

Velmi významná je zejména jeho protinádorová aktivita, která byla prokázána *in vitro* ve studii dle Chase et al. (2009) na HeLa buňkách a dalších nádorových buněčných liniích jako jsou CEM, K562, MCF-7, G-361 a BJ. Dle Dalecké et al. (2013) byl cytotoxický a antiproliferační účinek prokázán také na adherentních buňkách adenokarcinomu prsu SK-BR-3. Lykorin je schopen vykazovat vysokou cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám rezistentních k apoptóze již od mikromolárních koncentrací (Goietsenoven et al. 2010). Dle Tram et al. (2002) lze inhibici růstu buněk promyelotické leukémie *in vivo* prokázat po podávání lykorinu (5mg/kg/den) s minimem vedlejších účinků na zdravé buňky organismu.

Protinádorovou aktivitu prokázal i proti buňkám myšního melanomu BL6 a Lewisova plisního karcinomu (Dalecká et al. 2013).

Lykorin cílí na nádorové buňky více mechanismy. Působí zejména jako silný induktor apoptózy, přičemž apoptózu spouští pomocí vnitřní (mitochondriální) i vnější (receptorové) kaskády (McNulty et al. 2009). Lykorin také zastavuje buněčný cyklus v G0/G1 či G2/M fázi, což je závislé na typu nádorových buněk. Tento fakt vede k zabránění dalšího buněčného dělení. Dalším mechanismem je programovaná nekróza s následnou smrtí nádorových buněk a inhibice autofagie, která fyziologicky slouží k odstraňování poškozených organel. Negativem tohoto mechanismu je ovšem to, že u rozvinutých nádorů může chránit nádorové buňky před působením cytostatik. Lykorin je také schopen inhibovat metastazování nádoru (Roy et al. 2018).

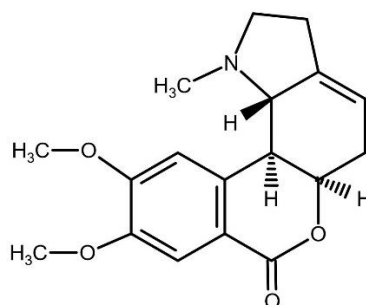
Do skupiny lykorinového typu se vedle výše zmíněného lykorinu řadí i další alkaloidy, které mají podobnou strukturu. Z biologického hlediska nejzajímavějšími z nich jsou karanin, pseudolykorin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-O-acetyllykorin, lykorin-2-on, amarbelisin a galanthin. Všechny zmíněné látky vykazují také protinádorovou aktivitu, přičemž za nejúčinnější jsou považovány amarbelisin a pseudolykorin (Goietsenoven et al. 2010).



Obr.11: Lykorin

### Homolykorinový typ

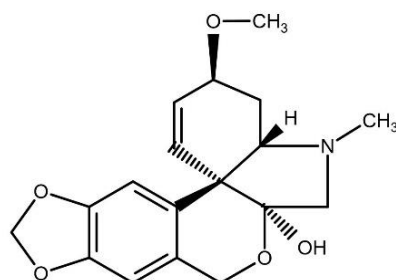
Alkaloidy této skupiny jsou odvozené od 2-benzopyrano[3,4-g]indolu vznikajícího ortho-para cyklizací norbelladinu (Bastida et al. 2011). Přestože se jedná o početnou skupinu, biologickou aktivitu vykazující jen někteří zástupci. Weniger et al. (1995) uvádějí, že homolykorin, 8-O-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin vykazují cytotoxický efekt. Ovšem i k primárním nenádorovým buňkám myších fibroblastů LMTK. Dále bylo zjištěno, že inhibují růst nádorových buněk, konkrétně lidského jaterního karcinomu Hep-G2 a leukemických buněk MOLT-4.



Obr.12: Homolykorin

### Tazzetinový typ

Zástupci této skupiny jsou deriváty odvozené od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu. Tazzetin vykazuje jen mírnou cytotoxickou aktivitu proti určitým nádorovým buňkám. Jeho biosyntetický prekurzor pretazzetin je značně účinnější, a to zejména díky protivirové a protinádorové aktivitě. Vykazuje nejvyšší aktivitu proti lymfatickým buňkám MOLT-4, přičemž se jedná o neaktivnější alkaloid, který je proti nim účinný. Dále působí proti buňkám Rauscherovy leukémie a Lewisova karcinomu plic a inhibuje růst HeLa buněk. Je také účinný proti *Herpes simplex* a flavivirům (Bidlack 2013).



Obr.13: Tazzetin

### Pankratistatinový typ

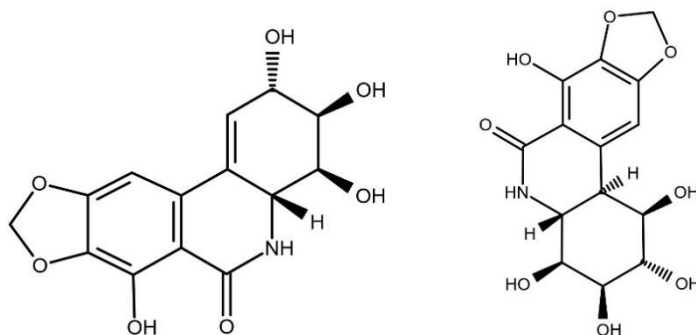
Alkaloidy řadící se do této skupiny jsou deriváty odvozené od fenanthridinu. Zástupci vykazující největší cytotoxickou aktivitu jsou narciklasin a pankratistatin.

Pankratistatin byl poprvé izolován z cibule havajské lilie (*Hymenocallis littoralis*). První zmínka o jeho cytotoxicitě je datována na rok 1993, kdy byla provedena základní typizace cytotoxické aktivity (Dalecká et al. 2013). Studie dle Pettit et al. (1993) byla provedena na panelu buněčných linií zahrnující nádorově transformovaná buňky, které byly derivované z tkání plic, střeva, ledvin, mozku, melanomu a buněk akutní myeloidní leukémie. Bylo prokázáno, že pankratistatin inhibuje růst HeLa buněk, působí cytotoxicky vůči leukemickým buňkám a je účinný proti řadě nádorových buněk, přičemž nejvyšší aktivitu vykazoval vůči buněčnému modelu melanomu. Zároveň nebyl prokázán cytotoxický účinek na mononukleární buňky periferní krve zdravých dárců. Tento účinek byl znovu potvrzen ve studii dle Griffin et al. (2011a) *in vitro* i *in vivo* na dvou typech nádorových buněk kolorektálního karcinomu p53 – mutovaných HT29 a p53 – wild-type HCT116 ve srovnání se zdravými fibroblasty střeva CCD-18Co. Pankratistatin zde působil cytotoxicky indukcí apoptózy selektivně jen vůči nádorovým buňkám. Podkožně lokalizované nádory buněk HT29 u myši reagovaly na podávání pankratistatinu v dávce 3 mg/kg signifikantním zmenšením bez současného zaznamenání toxického efektu na játra a ledviny experimentálních objektů. Paralelně byl také potvrzen cytotoxický efekt pankratistatinu na nádorové buňky karcinomu prostaty (Griffin et al. 2011b).

Druhým zástupcem, jak již bylo výše zmíněno, je narciklasin, který byl poprvé izolován roku 1967 z cibulí narcisů (*Narcissus*). Původně mu byl připisován antimitotický účinek podobně jako je tomu u kolchicinu (Ceriotti 1967). Obdobně jako některá běžně používaná cytostatika, narciklasin nejspíše interaguje nebo tvoří komplexy s molekulou DNA živočišných buněk. Dumont et al. (2007) zjistili, že je tento alkaloid schopen indukovat apoptózu u buněk lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a buněk karcinomu prostaty PC-3. Po 18 hodinách po ošetření 1  $\mu$ M narciklasinem byly pozorované dramatické morfologické změny nádorových

buněk srovnatelné s buněčnou smrtí. Ve studii dle Goietsenoven et al. (2010) byl narciklasin testován *in vivo* na těžko léčitelném mozgovém nádoru. Byly implantovány melanomové buňky VM-48 do mozku imonudeficientních myší. Zvířata léčená narciklasinem (1 mg/ kg) vykazovala významný terapeutický přínos, který byl dokonce o něco silnější než u zavedeného chemoterapeutického činidla temozolomidu. Fuchs et al. (2015) uvádí, že kromě cytotoxického účinku narciklasin může působit i protizánětlivě.

Mimo tyto zástupce skupina zahrnuje další látky příbuzné narciklasinu a pankratistatinu, které jsou v rostlinách minoritně zastoupeny. Jedná se o narciklasin-tetraacetát, cisdihydronarciklasin, trans-dihydronarciklasin a C10b-Rhydroxypankratistatin. Vzhledem k tomu, že uvedené látky jsou ve svých přírodních zdrojích zastoupeny jen v malém procentuálním podílu, tak jejich izolace a následné testování je komplikované (Dalecká et al. 2013).



**Obr.14:** Narciklasin a pankratistatin

### 3.3.4 Syntetické deriváty

Alkaloidy jsou díky svým fyziologickým vlastnostem již od počátku používání bylinných léčiv velmi oblíbenými (Wink 2015). Na začátku 19. století bylo zahájeno zkoumání těchto látek, přičemž se jejich biologická aktivita začala postupně objevovat a získávat uznání v oblasti medicíny, čímž se stala jednou z hlavních složek několika protinádorových léčiv. Díky jejich širokému spektru struktur jsou alkaloidy základem pro extrakci a syntézu stovek léků, které se používají k boji proti různým onemocněním (Zenk & Juenger 2007).

Alkaloidy jsou schopné modulovat klíčové signální dráhy podílející se na proliferaci, buněčném cyklu a metastázování, což z nich činí hlavní složky několika klinických protinádorových látek (Millimouno et al. 2014). V případě alkaloidů získaných z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* je jejich účinnost využívána zejména při potlačování onkogeneze. Je zajímavé, že mechanismy, kterými tyto sekundární metabolity působí, jsou četné a účinné různými způsoby proti nádorovým buňkám (Habli et al. 2017). Vzhledem k tomu, že jsou tyto alkaloidy izolovány pouze v malém množství z přírodních zdrojů, je snaha o vyvinutí úplné syntézy těchto alkaloidů a jejich derivátů, aby byla možnost snadnějšího zisku ve více znatelných množstvích. Zároveň je cílem zvýšená účinnost takto připravených látek (Evidente & Kornienko 2009).

Jejich syntézy jsou složitými vícestupňovými procesy (Ingrassia et al. 2008). U syntetických derivátů je pro zachování cytotoxického účinku vůči nádorovým buněčným liniím zásadní neporušení strukturního uspořádání alkaloidu. Konkrétně se jedná o konformační volnost v kruhu C, stereochemii na spojení kruhů C/D a zachování diolové skupiny na kruhu

C. Také při modifikaci kruhu A dochází ke vzniku sloučenin s nižší protinádorovou aktivitou, přičemž právě přítomnost methylenedioxy skupiny na tomto kruhu je zásadní (Kim et al. 2015).

Nižší účinnost látek získané modifikací kruhu A byla zkoumána na struktuře lykorinu a pseudolykorinu, přičemž bylo prokázáno, že pseudolykorin je méně toxický vůči nádorovým buňkám a oproti tomu působil cytotoxicky na buňky zdravé (Lamoral-Theys et al. 2009).

Evdokimov et al. (2011) uvádí, že z lykorinu oxidací kruhu B vzniká cyklický amid laktam. Ovšem tato změna v molekule není pro protinádorovou aktivitu žádoucí. U sloučeniny 6-oxolykorin byla zjištěna neaktivita proti nádorovým buněčným liniím ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) ve srovnání se samotným lykorinem, který na stejné nádorové buňky aktivitu vykazoval při mnohem nižších koncentracích ( $IC_{50} 0,9-8,5 \mu M$ ). Dalšími deriváty lykorinu, u kterých zůstává cytotoxický účinek na nádorové linie lidského glioblastomu U373 zachován ( $IC_{50} 0,6 \mu M$ ;  $IC_{50} 0,03 \mu M$ ) jsou 1-O-benzoyllykorin a 1,2-bis-allyllykorin (Evdokimov et al. 2011). Vedle těchto derivátů, u kterých je protinádorová aktivita nižší nebo stejná než u samotného lykorinu, jsou i takové, které jsou naopak účinnějšími. Mezi ně patří například hydrochlorid lykorinu (LH), který je schopen účinně potlačovat metastazující melanom C8161, přičemž citlivost nádorových buněk je 15krát vyšší než buněk nezhoubných (Liu et al. 2012). Cao et al. (2013) provedli studii, v níž byla zkoumána protinádorová aktivita na vysoce invazivní buněčné linii karcinomu vaječníků Hey1B. V tomto případě LH účinně inhiboval mitotickou proliferaci Hey1B buněk ( $IC_{50} 1,2 \mu M$ ) s velmi nízkou toxicitou, což mělo za následek zastavení buněčného cyklu při přechodu  $G_2/M$ . Dále bylo zjištěno, že potlačil neovaskularizaci dominantních buněk ovariálního karcinomu *in vivo* u myši. Z výsledků tedy vyplývá, že LH je potenciálním kandidátem na léčbu karcinomu vaječníků. Dalším derivátem, který je účinnější než samotný lykorin, je ungeremin. Jedná se o slibnou cytotoxickou sloučeninou, která aktivací kaspáz zprostředkovává apoptózu a zvyšuje produkci ROS (Mbaveng et al. 2019) Bylo zjištěno, že má velmi selektivní účinek na buňky lidského lymfomu MOLT4 ( $IC_{50} 0,7 \mu M$ ) (Barthelmes et al. 2001).

Dalšími alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae*, které jsou klíčové pro tvorbu syntetických derivátů k léčbě nádorových onemocnění jsou haemanthamin a krinin. I zde je pro zvýšení cytotoxického účinku zásadní vztah struktura-účinek. Bylo prokázáno, že cytotoxická aktivita je spojena s přítomností  $\alpha$ -C2 můstkem, přičemž alkaloidy s  $\beta$ -C2 můstkem tuto aktivitu nevykazují. Také volný hydroxyl v poloze C-11, přítomnost methylenedioxy skupiny na kruhu A a neporušení fenantridinového jádra jsou farmakologickými požadavky na tuto aktivitu (McNulty et al. 2007). Sloučeniny se zvýšenou cytotoxicitou mohou vznikat oxygenací. Tímto procesem vzniká distichamin, u které lze tento potenciál sledovat. Nair et al. (2012) provedli studii, ve které zkoumali jeho cytotoxickou aktivitu proti akutní lymfoblastické leukémii a dalším nádorovým buněčným liniím K562, MCF7, HeLa, G-361 a BJ. U všech vykazoval protinádorovou aktivitu v rozmezí od  $IC_{50} 2,2 \mu M$  do  $IC_{50} 14,7 \mu M$ , přičemž u HeLa buněk byla  $IC_{50}$  hodnota nejnižší. Dalším  $\beta$ -krinanovým alkaloidem je haemanthidin, který vykazuje slibné cytotoxické vlastnosti proti buněčným nádorovým liniím *in vitro* i *in vivo* u myši proti lymfomovým buňkám. Proti Jurkat buňkám vykazuje srovnatelnou aktivitu jako haemanthamin. V obou případech se jedná o sloučeniny, které inhibují buněčnou proliferaci a jsou schopny zastavit buněčný cyklus. Zástupcem  $\alpha$ -krinanového alkaloidu je například bulbispermin. Luchetti et al. (2012) zjistili, že koncentrace  $10 \mu M$  značně inhibuje proliferaci

glioblastomových buněk T98G rezistentních na apoptózu. Také dospěli k závěru, že má silnou cytotoxickou aktivitu i vůči leukemickým HL-60 buňkám.

V posledních letech jsou ovšem stále více zkoumány protinádorové deriváty pankratistatinu. Bylo zjištěno, že přítomnost 7-hydroxyskupiny a velkého hydrofobního substituentu na C-1 zvyšuje protinádorovou aktivitu. Stejně tak jako zachování amino inositolového motivu (Vshyvenko et al. 2011). V případě odstranění kyslíku v kruhu A, který musí být jiný než v poloze 7 v -OH skupině, se účinnost v porovnání s pankratistatinem sníží 100× a se 7-deoxypankratistatinem 10×. Dle Griffin et al. (2007) je také podstatné *trans* spojení kruhu B/C, oproti tomu *cis* uspořádání kruhu vede ke ztrátě cytotoxické aktivity.

Výše zmíněné charakteristické znaky jsou cílem výzkumu vedoucího k získání látek použitelných v klinické praxi a souhrnně lze říci, že syntetická příprava alkaloidů je jednou z možných cest při hledání potenciálně účinných látek (Evidente & Kornienko 2009). Navíc syntéza alkaloidů *Amaryllidaceae* je velmi aktivním polem výzkumu právě díky jejich biologické aktivitě a potenciálu jako farmaceutických látek. Veškeré snahy o syntézu těchto sloučenin vedly k pochopení vztahu mezi strukturou a aktivitou těchto sloučenin a objevením nových analogů ještě s vyšší úrovní biologické aktivity. Vzhledem k pokračující činnosti v této oblasti jsou pravděpodobné další pokroky (Ghavre et al. 2016).

## 4 Metodika

### 4.1 Materiál

Pro testování extraktů čeledi rostlin *Amaryllidaceae* byly použity buněčné linie střevního karcinomu HT29, Caco-2 a normální lidská buněčná linie FHs 74Int. Tyto buněčné linie byly zakoupeny z American Type Culture Collection (ATCC). Kultivační media Hybri-Care Medium ATCC 46-X (ATCC, USA), Dulbecco Modified Egles Medium (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, roztok penicilínu (10 000 MJ) a streptomycinu (100 mg), trypsin, fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline - PBS), epidermální růstový faktor (EGF), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT), přičemž vše bylo zakoupeno od Sigma-Aldrich (CZ). Dymethylsulfoxid (DMSO) (Lachner, Neratovice CZ), mikrotitrační destičky, serologické pipety a kultivační láhve Nunc (ThermoFischer, UK).

### 4.2 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29 byly pěstovány v DMEM mediu s přídavkem 10% FBS, 1% roztoku penicilinu a streptomycinu, 1% pyruvátu sodného, 1% hydrogenuhličitanu sodného a 1% neesenciálních aminokyselin. Buněčná linie lidského tenkého střeva FHs 74Int byla kultivována v Hybri-Care Mediu (ATCC 46-X) s 30 ng/ml EGF, 10% FBS, 1% roztoku penicilinu a streptomycinu, 1% hydrogenuhličitanu sodného. Buněčné linie byly vždy kultivovány v kultivačních lahvích s 15 ml příslušného media. Takto byly láhve vloženy do inkubátoru při 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C, přičemž medium bylo měněno každé dva dny. Celá kultivace buněk probíhala přibližně po dobu 7 dní, konkrétně do 80-90% konfluence. Při sklizni byla kultivační láhev propláchnuta 1× pomocí PBS, aby došlo k odstranění inhibitorů trypsinu. Poté bylo na dobu 3 minut přidáno 5 ml trypsinu a po uplynutí výše uvedené doby bylo přidáno 5 ml kompletního media obsahující inhibitory trypsinu. V případě nekompletního uvolnění buněk z povrchu láhve byla použita buněčná škrabka. Následně byl obsah přepipetován do centrifugační zkumavky, které byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1063× RCF. Poté bylo slité staré medium bez poškození buněčné pelety, ke které bylo přidáno 5 ml čerstvého media a peleta v něm byla mechanicky rozpuštěna. Z této buněčné suspenze bylo přeneseno 0,5 ml do nové kultivační láhve s 15 ml kompletního media.

### 4.3 MTT cytotoxický test

Ke stanovení cytotoxicity bylo využito tetraziolové soli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazol bromid (MTT) s modifikacemi dle Doskočil et al. (2015). Buněčné suspenze buněk Caco-2, HT29 a FHs-74 byly pipetovány do 96-jamkové destičky v připravených koncentracích. Po 24 hodinách došlo k odstranění starého media a nahrazení čerstvým, které obsahovalo testované vzorky v koncentraci 16-512 µg/ml a byly inkubovány po dobu 72 hodin. Po uplynutí této doby bylo medium odstraněno a nahrazeno DMEM mediem obsahujícím MTT (1 µg/ml), přičemž byly vzorky inkubovány další 2 hodiny při 37°C. Následně byl supernatant odsát a formazanový produkt byl rozpuštěn ve 100 ml DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm s použitím Tecan Infinite M200 spektrometru. Poté byla stanovena inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) jednotlivých vzorků.



Následně jsme vypočetli selektivní index. Selektivní index se vypočítá jako poměr inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) Caco-2 a HT29 ku  $IC_{50}$  normálních buněk linie FHS 74Int. Selektivní index vyšší než 1 značí negativní selektivitu, výsledek nižší než 1 značí pozitivní selektivitu.

#### 4.4 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Statistické vyhodnocování bylo provedeno v Excelu.

## 5 Výsledky

V této diplomové práci byla testována *in vitro* cytotoxická aktivita celkem 38 syntetických derivátů alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* na lidských buněčných liniích střevního karcinomu HT29 a Caco-2. Konkrétně byla zkoumána jejich schopnost inhibovat růst těchto nádorových buněk, přičemž pro porovnání byla použita lidská střevní buněčná linie FHS 74Int. Z testovaných látek vykazovaly toxicitu deriváty galanthaminu, ambellinu, haemanthaminu a izomer pankracinu. Derivát galanthaminu prokázal toxicitu na buněčné linii kolorektálního karcinomu Caco-2 s hodnotou  $IC_{50} 6,07 \pm 2,87 \mu\text{M/ml}$ , na buněčnou linii HT29 a FHS 74Int neměl toxický vliv ( $IC_{50} >10 \mu\text{M/ml}$ ). Naopak u izomeru pankracinu byl zjištěn toxický účinek na HT29 ( $IC_{50} 8,2 \pm 0,91 \mu\text{M/ml}$ ). Na zbývající buněčné linie tato látka neměla toxické účinky ( $IC_{50} >10 \mu\text{M/ml}$ ). Na všechny tři buněčné linie měl toxický účinek derivát ambellinu, přičemž u buněčné linie Caco-2 ( $IC_{50} 1,86 \pm 0,32 \mu\text{M/ml}$ ) byl tento účinek nejvýraznější. Vyšších hodnot bylo dosaženo u HT29 ( $IC_{50} 3,23 \pm 0,17 \mu\text{M/ml}$ ) a u buněčné linie FHS 74 Int byla hodnota  $IC_{50} 5,24 \pm 0,08 \mu\text{M/ml}$ . Selektivní index byl pro buněčnou linii Caco-2 0,35 a HT29 0,62. Dalším derivátem s toxickými účinky byl derivát haemanthaminu, který na nádorové buněčné linie měl ještě výraznější toxické účinky než derivát ambellinu, konkrétně na buněčnou linii Caco-2 ( $IC_{50} 0,78 \pm 0,18 \mu\text{M/ml}$ ), toxický byl také na HT29 ( $IC_{50} 2,43 \pm 0,13 \mu\text{M/ml}$ ). Na normální buňky střevního epithelu FHS 74Int měl derivát rovněž toxický účinek ( $IC_{50} 4,33 \pm 0,45 \mu\text{M/ml}$ ). U tohoto derivátu je selektivní index ještě výraznější, pro buněčnou linii Caco-2 byl 0,18 a u HT29 0,56. Ostatní zkoumané syntetické deriváty alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* na testovaných buněčných liniích cytotoxické nejsou ( $IC_{50} >10 \mu\text{M/ml}$ ) (tab.1).

Tabulka 1: Výsledky stanovení cytotoxicity

Látka	FHS 74Int	HT29	Caco-2	Index selektivity	
	IC <sub>50</sub> (μM/ml) (průměr ± SD)			Caco-2	HT29
derivát galanthaminu	>10	>10	6.07 ± 2.87	n.s.	n.s.
izomer pankracinu	>10	8.20 ± 0.91	>10	n.s.	n.s.
derivát ambellinu	5.24 ± 0.08	3.23 ± 0.17	1.86 ± 0.32	0,35	0,62
derivát haemanthaminu	4.33 ± 0.45	2.43 ± 0.13	0.78 ± 0.18	0,18	0,56

V tabulce jsou uvedeny pouze hodnoty  $IC_{50} <10 \mu\text{M/ml}$ ; Caco-2, HT29-buněčné linie kolorektálního karcinomu, FHS 74Int-zdravá buněčná linie tenkého střeva;  $IC_{50}$ -koncentrace způsobující 50 % inhibici růstu specifické biologické funkce; SD-směrodatná odchylka

Index selektivity-poměr inhibiční koncentrace nádorových buněčných linií ku inhibiční koncentraci zdravých buněk linie. Čím nižší je hodnota selektivního indexu, tím selektivněji derivát působí. Pokud je index selektivity vyšší než 1, je hodnocen jako neselektivní, tzn. působí cytotoxicky i na zdravé buněčné linie; n.s. – selektivní index nelze stanovit

## 6 Diskuze

Nádorová onemocnění jsou v celosvětovém měřítku hlavním zdravotním problémem. Vzhledem k nárůstu stárnoucí populace a nevhodnému životnímu stylu lidí je tato diagnóza stále častější (Siegel et al. 2019). Mezi nejběžnější nádorová onemocnění se řadí kolorektální karcinom, konkrétně je celosvětově třetím nejvíce diagnostikovaným. Dle WHO bylo v roce 2018 zaznamenáno 1 849 518 případů, což činí 10,2 % z celkového počtu. Největším problémem tohoto nádorového onemocnění je pozdní diagnostika nemoci, odolnost pacienta vůči léčbě a přítomnost metastáz (Arvelo et al. 2015). Stále více je znám vznik nádorových buněk rezistentních vůči lékům, což vede stále více k vývoji protinádorových léků s různými mechanismy účinku (Zhi-Xing et al. 2018).

Vedle tradičních způsobů léčby nádorových onemocnění stále dochází k vývoji veškerých moderních technologií. Ovšem i přes tuto skutečnost k výrazně úspěšnějším výsledkům léčby nedochází. Již řadu let jsou předmětem zkoumání přírodní produkty a jejich deriváty se slibným potenciálem pro léčbu nádorových onemocnění (Habartová et al. 2016). Dle Chin et al. (2006) je přibližně 25-28 % všech moderních léčivých přípravků přímo či nepřímo odvozeno od vyšších rostlin, což poukazuje na enormní léčivý potenciál rostlin, které jsou již po tisíc let známy v tradiční medicíně. Omezujícím znakem souvisejícím s mnoha rostlinnými sekundárními metabolity je jejich špatná rozpustnost či biologická dostupnost. Hlavním řešením pro rostlinné látky je použití semisyntetických nebo syntetických analogů. To se uplatňuje i u alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* (Fridlender et al. 2015).

Z námi testovaných 38 vzorků byl *in vitro* toxický účinek prokázán u 4 derivátů alkaloidů, konkrétně haemanthaminu, ambellinu, pankracinu a galanthaminu. Protinádorová aktivita byla testována na lidských buněčných liniích střevního karcinomu HT29 a Caco-2 a na zdravé buněčné linii FHS 74Int.

Dle našich výsledků derivát haemanthaminu vykazoval toxicitu vůči buněčným liniím kolorektálního karcinomu Caco-2 i HT29. Selektivněji působil k buněčné linii kolorektálního karcinomu Caco-2 s inhibiční koncentrací  $0,78 \pm 0,18 \mu\text{M/ml}$  a selektivním indexem 0,18. V případě buněčné linie HT29 bylo při hodnocení cytotoxicity dosaženo vyšších hodnot ( $\text{IC}_{50}$   $4,33 \pm 0,45$  a selektivní index 0,56).

Ve studii Doskočil et al. (2015) byl testován haemanthamin na stejných buněčných liniích jako v této práci. Bylo prokázáno, že vykazuje 20× vyšší inhibiční koncentraci ( $\text{IC}_{50}$   $19,5 \pm 8,9 \mu\text{M/ml}$ ) u zdravé buněčné linie FHS 74 Int v porovnání s nádorovými liniemi kolorektálního karcinomu, konkrétně Caco-2 ( $\text{IC}_{50}$   $0,99 \pm 0,14 \mu\text{M/ml}$ ) a HT29 ( $\text{IC}_{50}$   $0,59 \pm 0,01 \mu\text{M/ml}$ ). V tomto případě se jedná o selektivnější látku vůči nádorovým buněčným liniím než tomu bylo v našem případě. O dva roky později byla ve studii dle Havelek et al. (2017) zkoumána inhibiční koncentrace haemanthaminu na sedmnácti buněčných liniích, konkrétně na HL-60, Jurkat, Molt-4, A549, H1299, Colo-201, HT29, SW-480, AGS, PANC-1, A2780, HeLa, BT-549, MCF-7, MDA-MD-231, SAOS-2 a SK-BR-3. Bylo zjištěno, že ze zkoumaných linií byl haemanthamin nejselektivnější k buňkám kolorektálního karcinomu HT29 ( $\text{IC}_{50}$   $0,3 \pm 0,01 \mu\text{M/ml}$ ).

V případě haemanthaminového a krininového typu alkaloidu je charakteristická přítomnost 5,10b-ethanového můstku, který může být orientován v poloze  $\alpha$  či  $\beta$ .  $\alpha$ -orientace tohoto můstku je předpokladem pro jejich vyšší aktivitu. Dle Kim et al. (2006) je pro

cytotoxickou aktivitu důležitá přítomnost právě  $\alpha$ -C2 můstku. Tuto skutečnost potvrdil ve své studii na  $\alpha$ -C2 přemostěných sloučeninách krinaminu a 3-epi-krinaminu (=haemanthamin). Ovšem ve své studii McNulty et al. (2009) uvádí, že  $\alpha$ -C2 přemostěný alkaloid hamayne vykazuje pouze mírnou cytotoxickou aktivitu proti gastrointestinálním nádorovým buňkám. To může být zapříčiněno funkční skupinou, která je přítomná na C-3. V případě alkaloidu hamayne se jedná o C-3 hydroxyl derivát. Oproti tomu C-3 methoxy deriváty, jako jsou haemanthamin a haemanthidin, cytotoxickou aktivitu vykazovaly. Z toho plyne, že právě umístění hydroxylové skupiny má za následek slabší cytotoxickou aktivitu.

U derivátu haemanthaminu z této práce je selektivní účinek vůči nádorovým buněčným liniím výrazný, a tudíž se jedná o vhodné potenciální léčivo k terapii kolorektálního karcinomu.

Dalším derivátem alkaloidu čeledi *Amaryllidaceae*, který vykazoval cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím z této práce je derivát ambellinu, přičemž se rovněž jedná o alkaloid výše zmíněného typu. V tomto případě nebyla prokázána toxicita jen k nádorovým buněčným liniím Caco-2 ( $IC_{50}$  1,86 $\pm$  0,32  $\mu$ M/ml) a HT29 ( $IC_{50}$  3,23 $\pm$  0,17  $\mu$ M/ml), ale i k zdravé buněčné linii FHS 74Int ( $IC_{50}$  5,24 $\pm$  0,08  $\mu$ M/ml).

Cytotoxicita ambellinu je řadu let testována napříč různými nádorovými liniemi, ale dosud nebyly zjištěny žádné převratné výsledky. Již v roce 1976 byl zkoumán vliv několika alkaloidů na růst lidských epitelových buněk HeLa ve studii dle Jimerez et al. Ambellin byl jedním z nich, přičemž u něj nebyl pozorován žádný inhibiční účinek na růst. V tomto případě byla nejúčinnější sloučeninou  $\alpha$ -krinan haemanthamin. O osm let později byl ambellin předmětem zkoumání v *in vivo* studii dle Petitt et al. (1984), kdy bylo provedeno testování na lymfocytární leukémii na buněčné linii P-388 u myši. Ambellin vykázal jako jediný testovaný alkaloid cytotoxickou aktivitu, a to již při inhibiční koncentraci 1,6  $\mu$ M/ml. Dále byla také zkoumána jeho protinádorová aktivita vůči buněčným liniím MOLT-4 a HepG2, přičemž u obou vykazoval nízkou inhibiční interakci ( $IC_{50}$  > 10  $\mu$ M) (Weniger et al. 1995). K obdobnému výsledku došel Berkov et al. (2011) při zkoumání jeho cytotoxicity v *in vivo* studii na buňkách myšního melanomu BL-6 ( $IC_{50}$  > 100  $\mu$ M). Ve studii dle Vaněčková et al. (2016) byla studována protinádorová aktivita ambellinu na shodných buněčných liniích jako v této diplomové práci. Konkrétně bylo zjištěno, že u všech buněčných linií nepůsobí cytotoxicky ( $IC_{50}$  > 10  $\mu$ M), přičemž nejnižší hodnoty byla dosaženo u nádorové buněčné linie HT29 ( $IC_{50}$  50,2 $\pm$  1,2  $\mu$ M/ml), následně u Caco-2 ( $IC_{50}$  74,1 $\pm$  1,1  $\mu$ M/ml) a nejvyšší  $IC_{50}$  byla zjištěna u zdravé buněčné linie FHS 74Int ( $IC_{50}$  89,8 $\pm$  6,5  $\mu$ M/ml).

Vzhledem k tomu, že rozdíl mezi alkaloidy haemanthaminem a ambellinem je v konformaci ethoxy skupiny, může se způsob cytotoxicity odvíjet právě od této skutečnosti (Luchetti et al. 2012). Navíc v působení na většinu buněčných linií hraje roli poloha 5,10b-etanového můstku, přičemž právě v jeho orientaci se tyto alkaloidy také neshodují, což může působit také na jejich protinádorovou aktivitu (Maříková et al. 2020).

V případě této diplomové práce se jedná o poměrně neočekávatelný výsledek, kdy derivát ambellinu působil cytotoxicky vůči nádorovým liniím Caco-2 a HT29. Ovšem vzhledem k faktu, že hodnota  $IC_{50}$  tohoto testovaného derivátu u buněčné linie Caco-2 byla vyšší než 1  $\mu$ M/ml a u HT29 dokonce vyšší než 3  $\mu$ M/ml nelze tuto látku klasifikovat jako vhodnou k zařazení do dalších fází testování.

Další látkou, která vykazovala cytotoxickou aktivitu byl izomer pankracinu. Je selektivní pouze v případě nádorové buněčné linie HT29 ( $IC_{50}$  8,20  $\pm$  0,91  $\mu$ M/ml), přičemž selektivní

index tohoto derivátu je 0,82, což vypovídá o tom, že se nejedná o příliš významný výsledek ve vztahu k našemu zkoumání. Ve studii dle Breiterová et al. (2020) byla měřena inhibiční koncentrace pankracinu u buněčné linie HT29 stejně tak jako v této diplomové práci. V tomto zkoumání byla naměřena hodnota  $IC_{50}$   $2,60 \pm 0,51 \mu\text{M/ml}$ . Byly zde použity i normální lidské fetální plicní fibroblasty (MRC-5) ke studiu účinku na nenádorové buňky. Ovšem bylo zjištěno, že působí cytotoxicky i na tuto zdravou buněčnou linii ( $IC_{50}$   $5,15 \pm 0,34 \mu\text{M/ml}$ ). Ve studii dle Cedrón et al. (2015) byl zkoumán vztah mezi strukturou a aktivitou pankracinu z výsledků antiproliferační aktivity na kolorektální nádorové buněčné linii WiDr. Byla měřena inhibiční koncentrace u pankracinu, kdy bylo zjištěno, že se nejedná o sloučeninu se slibným cytotoxickým potenciálem vůči těmto nádorovým buňkám ( $IC_{50}$   $9,1 \pm 1,0 \mu\text{M/ml}$ ). Protinádorová aktivita byla zkoumána i u jeho semisyntetických derivátů. V případě nahrazení hydroxylových skupin v kruhu E pankracinu chlorem a methoxyskupinou v daném pořadí došlo k velmi podobnému výsledku ( $IC_{50}$   $7,5 \pm 2,0 \mu\text{M/ml}$ ). Ovšem zavedení methoxyskupiny na C-6 antiproliferativní aktivitu výrazně snížilo ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M/ml}$ ). Z této skutečnosti lze tedy vyvodit, že sterická zábrana na C-6 je důležitým faktorem pro aktivitu této řady sloučenin.

Souhrnně lze uvést, že pankracin je montaninovým typem alkaloidu, přičemž právě tato skupina se jeví jako slibná při hledání nových protinádorových léčiv. Ačkoliv studie (Govindaraju et al. 2018; Masi 2019) prokazují, že mohou účinně potlačit životaschopnost a proliferaci lidských nádorových buněk, přesný mechanismus této cytotoxické aktivity nebyl dosud plně objasněn a stále je předmětem zkoumání.

Dle našich výsledků poslední sloučeninou vykazující cytotoxickou aktivitu je derivát galanthaminu. Působí selektivně k buněčné linii kolorektálního karcinomu Caco-2 ( $IC_{50}$   $6,07 \pm 2,87 \mu\text{M/ml}$ ). Ovšem hodnota  $IC_{50}$  neznázorňuje, že by se jednalo o sloučeninu, která je vhodná k zařazení do terapie nádorových onemocnění. Dle Dalecká et al. (2013) je galanthamin látka absolutně bez známek cytotoxického působení. Tuto skutečnost lze vyvodit i ze studie dle Duy et al. (1997), která byla provedena již před více než 20 lety. U všech testovaných nádorových buněčných linií, konkrétně buněk fibroblastomu (BJ), lymfoblastické leukémie (CEM), melanomu (G-3610), děložního hrdla, myelogenní leukémie (K562) a prsu (MCF7) vykazoval galanthamin inhibiční koncentraci vyšší než  $50 \mu\text{M/ml}$ , což z něj činí látku, která nepůsobí selektivně k těmto buněčným liniím, a tudíž není vhodným potenciálním léčivem při léčbě těchto nádorových onemocnění.

Galanthamin je využíván zejména k léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba. Je znám svým duálním mechanismem. Působí kompetitivně a reverzibilně inhibuje enzym acetylcholinesterázu (AChE), čímž zvyšuje hladinu acetylcholinu (ACh). Dále je schopen působit jako alosterický modulátor nikotinových receptorů, čímž dochází k zesílení vlastního účinku ACh. Používá se ve formě soli (galanthamin hydrobromid), který je významný dobrým vstřebáváním a vysokou biologickou dostupností (Drtinová & Pohanka 2013). Pro vyvolání jeho biologického účinku jsou podstatná místa, jako cyklohexenový kruh s hydroxylovou skupinou, terciální aminoskupina a methoxyskupina. Modifikace těchto míst vede k ovlivnění míry působení, případně může dojít k přechodu na účinek jiný. Například sanguinin (9-O-demethylgalanthamin) vykazuje  $10\times$  větší potenciál inhibovat AChE než samotný galanthamin. Tento fakt je prisuzován výměně methoxyskupiny za hydroxylovou ve struktuře galanthaminu. Díky hydroxyskupině je lepší možnost navázání molekuly na AChE (Konrath et al. 2013). Ovšem vzhledem k tomu, že sanguinin téměř

neproniká přes hematoencefalickou bariérou a jeho výskyt v přírodě není četný, jeho využití v praxi je značně omezeno (Iannello et al. 2014). Dalšími látkami vykazující vyšší inhibiční účinek než galanthamin, konkrétně 5×, jsou jeho N-deriváty. Tato skutečnost je přikládána přítomnosti allylové části na atomu dusíku. V tomto případě je nevýhodou špatná dostupnost v biologickém materiálu (Berkov et al. 2008). Již výše zmíněná přítomnost cyklohexanového kruhu je jednou z nejpodstatnějších částí. U alkaloidů lykoramin a epinorlykoramin, postrádajících dvojnou vazbu cyklohexanového kruhu, byla prokázána ztráta jejich inhibičních schopností (Bastida et al. 2011). Další důležitou částí v molekule galanthaminu je terciární aminoskupina. V případě její absence vzniká epinorgalanthamin, který působí 10× nižší inhibiční aktivitou než samotný galanthamin (López et al. 2002). Vzhledem k tomu, že ve vztahu k biologické inhibiční aktivitě vůči cholinesterázám je galanthamin důkladně prozkoumán, je dnes při testování ostatních látek na tuto aktivitu používán jako standard (Martin et al. 2011).

Galanthamin tedy není příliš vhodným potenciálním léčivem nádorových onemocnění. Ovšem dokud se neobjeví žádné jiné lékové terapie se srovnatelnou nebo lepší klinickou účinností, zůstane galanthamin jedním nejvýznamnějších ze standardních léků při léčbě Alzheimerovy choroby.

Ostatní testované deriváty *Amaryllidaceae* alkaloidů nebyly vyhodnoceny jako toxické ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) na testovaných buněčných liniích. Pravděpodobně je to zapříčiněné hned z několika důvodů. Prvním aspektem, ke kterému je třeba přihlédnout je vztah mezi strukturou a aktivitou (SAR) daného alkaloidu. V případě pozměnění určité části ve struktuře sloučeniny dochází ke změně její aktivity.

Pro zaznamenání cytotoxického působení sloučeniny je vedle její struktury důležitý i její mechanismus účinku. Většina alkaloidů, které mohou být použity v terapii nádorových onemocnění, fungují jako léčiva hlavně tím, že vyvolávají apoptózu prostřednictvím indukce poškození DNA nádorových buněk (Xia et al. 2014). Přírodní i syntetické deriváty působí cytotoxicky díky schopnosti inhibovat DNA topoizomerázu, enzym podílející se na utváření dvoušroubovice DNA. Je známa topoizomeráza I a II, přičemž topoizomeráza I mění stupeň tvorby DNA dvoušroubovice tvorbou jednořetězových zlomů a topoizomeráza II tvoří zlomy dvouřetězové. V obou případech se jedná o proces, který je nutné pro transkripci, replikaci DNA a kondenzaci chromatinu (Cholewiński et al. 2011; Vos et al. 2011). Dále mohou působit cytotoxicky díky navázání na tubulin. Kvůli vazbám na strukturu mikrotubulu podél celé jeho délky dochází k interferenci s cytoskeletem buňky. Tubulin je nezbytný pro mnoho procesů, jako je intracelulární transport a dělení buněk. V případě navázání dochází k blokování buněčného cyklu ve fázi G2/M a následné indukci apoptózy. Ovšem je nutno poznamenat, že látka musí být schopna selektivně indukovat apoptózu u nádorových buněk, nikoliv u buněk zdravých. Vzhledem k tomu, že dle Courbet et al. (2017) jsou nádorové buňky náchylnější kvůli vyšší míře dělení. Je pravděpodobné, že se tento selektivní přístup bude nadále stále více vyvíjet.

Tyto výše zmíněné poznatky lze aplikovat k vysvětlení toho, že část námi testovaných sloučenin nepůsobila cytotoxicky vůči nádorovým buněčným liniím. Pravděpodobně tyto látky nebyly schopny interagovat s DNA nádorových buněk, a tudíž nebylo možné, aby u nich došlo k apoptóze. To může být dáno vlastnostmi dané sloučeniny či její koncentrací. Ovšem je zde

možnost, že by daná látka působila cytotoxicky vůči jiné nádorové buněčné linii, než byly zde použity, konkrétně Caco-2 a HT29.

## 7 Závěr

V rámci této práce bylo zjištěno, že ze zkoumaných 38 derivátů alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* vykazovaly cytotoxickou aktivitu pouze 4 z nich. Navíc tato aktivita nebyla příliš významná, jelikož žádný testovaný derivát se s hodnotou  $IC_{50}$  nepohyboval v koncentracích méně než  $0,5 \mu\text{M/ml}$ . Přesto byl u některých derivátů selektivní účinek vůči nádorovým buněčným liniím výrazný.

I přes takto negativní výsledky by bylo vhodné v testování pokračovat a využít metody využívající 3D buněčné modely, u kterých jsou vzájemné interakce mezi buňkami podstatně jiné než v námi použité 2D metodě, čímž mohou být výsledky negativně ovlivněny.



## 8 Literatura

- Abe O, et al. 2005. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* **366**:2087–2106.
- Adams J, Sibbritt D, Easthope G, Young AF. 2003. The profile of women who consult alternative health practitioners in Australia. *Medical Journal of Australia* **179**: 297-300.
- Ahmedin J, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; *Ca Cancer J Clin* **61**: 69–90.
- Akgül Ö, Cetinkava E, Ersöz S, Tez M. 2014. Role of surgery in colorectal cancer liver metastases. *World J Gastroenterol* **20**: 6113-6122.
- Akwe JA. 2017. Pulmonary Effects of Cocaine Use. *J Lung Pulm Respir Res* **4**: 54-58.
- Alfarouk KO, et al. 2015. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International* **15**: 1-13.
- Andonova L, Georgieva M, Zlatkov A. 2015. Free radicals, oxidative stress, and diseases associated with them. *Pharmacia* **62**:26–39.
- Aniszewski T. 2015. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications* second edition. Elsevier.
- Arvelo F, Sojo F, Cotte C. 2015. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicallscience* **9**:1-20.
- Barthelmes HU, Niederberger E, Roth T, Schulte K, Tang WC, Boege F, Fiebig H-H, Eisenbrand G, Marko D. 2001. Lycobetaine as a selective topoisomerase II $\beta$  poison and inhibits the growth of human tumour cells. *British Journal of Cancer* **85**:1585-1591.
- Bastida J, Berkov S, Torras L, Pigni LB, Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. 2011. Chemical and biological aspects of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* **2**:65-100.
- Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. 2008. N-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **18**: 2263-2266.
- Berkov S, Romani S, Herrera M, Viladomat F, Codina C, Momekov G, Ionkova I, Bastida J. 2011. Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research* **25**: 1686-1692.
- Bidlack WR. 2013. *Studies in Natural Products Chemistry*. *Journal of the American College of Nutrition* **19**:418-419.
- Blažević T, Heiss EH, Atanasov AG, Breuss JM, Dirsch VM, Uhrin P. 2015. Indirubin and Indirubin Derivatives for Counteracting Proliferative Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**:1-12.
- Block KI, et al. 2015. A Broad-Spectrum Integrative Design for Cancer Prevention and Therapy. *Semin Cancer Biol* **35**: 276-304.

- Bosset J-F, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier J-C. 2006. Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. *New England Journal of Medicine* **355**:1114–1123.
- Borek C. 2004. Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integrative Cancer Therapies* **3**: 333-341.
- Bradt J, Potvin N, Kesslick A, Shim M, Radl D, Schriver E, Gracely EJ, Komarnicky-Kocher LT. 2014. The impact of music therapy versus music medicine on psychological outcomes and pain in cancer patients: a mixed methods study. *Support care cancer* **23**: 1261-1271.
- Breiterová K, et al. 2020. *Amaryllidaceae* Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus L. cv. Professor Einstein* and Their Cytotoxic Activity. *Plants* **9**: 1-12.
- Cahlíková L, Vaněčková N, Šafratová M, Breiterová K, Blunden G, Hulcová D, Opletal L. 2019. The Genus *Nerine* Herb. (*Amaryllidaceae*): Ethnobotany, Phytochemistry, and Biological Activity. *Molecules* **24**: 1-16.
- Cao Z, Yu D, Fu S, Zhang G, Pan Y, Bao M, Tu J, Shang B, Guo P, Yang P, Zhou Q. 2013. Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity. *Toxicol Lett* **218**: 174-185.
- Cassileth B, Deng G. 2003. Complementary and Alternative Therapies for Cancer. *The Onkologist* **9**:80-89.
- Cedron JC, Gutiérrez D, Flores N, Ravelo AG, Estévez-Braun A. 2012. Synthesis and antimalarial activity of the new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20**:5464-5472.
- Cedron JC, Ravelo AG, León LG, Padrón JM, Estévez-Braun A. 2015. Antiproliferative and Structure Activity Relationships of *Amaryllidaceae* Alkaloids. *Molecules* **20**: 13854-13863.
- Cerioti G. 1967. Narciclasine: an antimitotic substance from *Narcissus* bulbs. *Nature* **213**: 595-596.
- Chahal A, Saini AK, Chhillar AK, Saini RV. 2018. Natural antioxidants as defense system against cancer. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **11**: 38-44.
- Chase MW, Reveal JL, Fay MF. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families *Amaryllidaceae*, *Asparagaceae* and *Xanthorrhoeaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 132-136.
- Chaveli-López B. 2014. Oral toxicity produced by chemotherapy: A systematic review. - *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* **6**:81-90.
- Chen Y, Yao F, Ming K, Wang D, Hu Y, Liu J. 2016. Polysaccharides from Traditional Chinese Medicines: Extraction, Purification, Modification, and Biological Activity. *Molecules* **21**: 1-23.
- Chen MC, Yu CH, Wang SW, Pu HF, Kan SF, Lin LC, Chi CW, Ho LL, Lee CH, Wang PS.

2010. Anti-proliferative effects of evodiamine on human thyroid cancer cell line ARO. *J Cell Biochem* **110**: 1495-1503.
- Chien C-C, Wu M-S, Shen S-C, Ko C-H, Chen C-H, Yang L-L, Chen Y-C. 2014. Activation of JNK Contributes to Evodiamine- Induces Apoptosis and G<sub>2</sub>/M Arrest in Human Colorectal Carcinoma Cells: A Structure-Activity Study of Evodiamine. *PLoS One* **9**: 1-12.
- Chin Y-W, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. 2006. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* **8**: 239–253.
- Cholewiński G, Dzierzbicka K, Kołodziejczyk AM. 2011. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacological Reports* **63**: 305-336.
- Conklin KA. 2004. Cancer Chemotherapy and Antioxidants. *The Journal of Nutrition* **124**: 3201-3204.
- Courbet A, Bec N, Constant C, Larroque C, Pugnieri M, Massaoudi SE, Zhgaib Z, Khier S, Deleuze-Masquefa C, Gattacceca F. 2017. Imidazoquinoxaline anticancer derivatives and imiquimod interact with tubulin: Characterization of molecular mikrotubule inhibiting mechanisms in correlation with cytotoxicity. *PLoS One* **12**:1-21.
- Couzin-Frankel J. 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* **342**:1432–3.
- Creagan ET, Moertel CG, O'Fallon JR, Schutt AJ, O'Connell MJ, Rubin J, Frytak S. 1979. Failure of High- Dose Vitamin C (Ascorbic Acid) Therapy to Benefit Patients with Advanced Cancer- A Controlled Trial. *N Engl J Med* **301**: 687-690.
- D'Aiuto L, et al. 2018. R430: A potent inhibitor of DNA and RNA viruses. *Scientific Reports* **8**: 1-11.
- Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. 2013. Alkaloidy rostlin čeledi *Amaryllidaceae* jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* **107**: 701-708.
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating g. 2005. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet* **366**:1784-1793.
- Ding Y, Qu D, Zhang K-M, Cang X-X, Kou Z-N, Xiao W, Zhu J-B. 2016. Phytochemical and biological investigations of *Amaryllidaceae* alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* **19**: 53-100.
- Dinis-Oliveira RJ. 2019. Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel. *Journal of Forensic and Legal Medicine* **61**: 128-140.
- Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelek R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková L. 2015. Cytotoxic activities of *Amaryllidaceae* alkaloids

- against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* **13**: 394-398.
- Drtinová L, Pohanka M. 2013. Možnosti využití huperzinu A v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Chemické Listy* **107**: 12-15.
- Dumont P, Ingrassia L, Rouzeau S, Ribaucour F, Thomas S, Roland I, Darro F, Lefranc F, Kiss R. 2007. The *Amaryllidaceae* Isocarbostryril Narciclasine Induces Apoptosis By Activation of the Death Receptor and/or Mitochondrial Pathways in Cancer Cells But Not in Normal Fibroblasts. *Neoplasia* **9**: 766-776.
- Duy HH, Shankar S, Takemoto DJ. 1997. Anticancer activities of 2,5,8,9-substituted 6-oxo-1,2,3,4,5,6-hexahydrophenanthridines on multi-drug-resistant phenotype 1cells. *Anticancer Research* **17**: 2435-2442.
- Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. 2004. Molecular mechanism of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytochemistry. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **130**:627-635.
- Elgorashi EE, Stafford GI, Staden J. 2004. Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of *Amaryllidaceae* Alkaloids. *Planta Med* **70**: 260-262.
- Emadi A. 2011. Cancer returns. *Science Translation Medicine* **3**:94-121.
- Evdokimov NM, Lamoral-Theys D, Mathieu V, Andolfi A, Frolova LV, Pelly SC, Van Otterlo WAL, Magedov IV, Kiss R, Evidente A, Kornienko A. 2011. In search of a cytostatic agent derived from the alkaloid lycorine: synthesis and growth inhibitory properties of lycorine derivatives. *Boorganic and Medicinal Chemistry* **19**: 7252-7261.
- Evidente A, Kornienko A. 2009. Anticancer evaluation of structurally diverse *Amaryllidaceae* alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochem Rev* **8**:449-459.
- Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. 2016. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* **14**: 1-18.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. 2018. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Dostupné z <http://gco.iarc.fr/>
- Formenti SC, Demaria S. 2013. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: A paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* **105**:256-265.
- Fridlender M, Kapulnik Y, Koltai H. 2015. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1-9.
- Fuchs S, Hsieh L, Saarberg W, Saarberg W, Erdelmeier C, Wichelhaus T, Schaefer L, Koch E, Fürst R. 2015. Haemanthus coccineus extract and its main bioactive component narciclasine display profound anti-inflammatory activities *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med*. **19**:1021-1032.
- Gabrielsen B, et al. 1992. Antiviral (RNA) Activity of Selected *Amaryllidaceae* Isoquinoline Constituents and Synthesis of Related Substances. *Journal of Natural Products* **55**: 1569-

1581.

- Gale N. 2014. The Sociology of Traditional, Complementary and Alternative Medicine. *Sociology Compass* **8**: 805-822.
- Georgakilas AG, Mosley WG, Georgakila S, Ziech D, Panayiotidis MI. 2010. Viral-induced human carcinogenesis: an oxidative stress perspective. *Molecular BioSystems* **6**:1162-1172.
- Ghavre M, Froese J, Pour M, Hudlicky T. 2016. Synthesis of *Amaryllidaceae* Constituents and Unnatural Derivates. *Angewandte Chemie International Edition* **55**: 5642-91.
- Giovinazzi S, Bellapu D, Morozov VM, Ishov AM. 2013. Targeting mitotic exit with hyperthermia or APC/C inhibition to increase paclitaxel efficacy. *Cell Cycle* **12**: 2598-2607.
- Goietsenoven G, et al. 2010. *Amaryllidaceae* Alkaloids Belonging to Different Structural Subgroups Display Activity against Apoptosis-Resistant Cancer Cells. *Journal of Natural Products* **73**: 1223-1227.
- Goietsenoven G, et al. 2010. Targetion of eEF1A with *Amaryllidaceae* isocarbostryrils as a strategy to combat melanomas. *FASEB J* **24**: 4575-4584.
- Govindaraju K, Ingels A, Hasan MN, Sun D, Mathieu V, Masi M, Evidente A, Kornienko A. 2018. Synthetic analogues of the montanine-type alkaloids with activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**: 589–593.
- Griffiths K, Aggarwal BB, Singh RB, Buttar HS, Wilson D, Meester F. 2016. Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases* **4**: 28.
- Griffin C, Karnik A, McNulty J, Pandey S. 2011. Pancreatistatin Selectively Targets Cancer Cell Mitochondria and Reduces Growth of Human Colon Tumor Xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **10**: 57-68.
- Griffin C, McNulty J, Pandey. 2011. Pancreatistatin induces apoptosis and autophagy in metastatic prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* **38**: 1549-1556.
- Griffin C, Sharda N, Sood D, Nair J, McNulty J, Pandey S. 2007. Selective cytotoxicity of Pancreatistatin-related natural *Amaryllidaceae* alkaloids: evaluation of the aktivty of two new compounds. *Cancer Cell Int.* **7**: 1–7.
- Güven KC, Percot A, Sezik E. 2010. Alkaloids in marine algae. *Marine Drugs* **8**:269–284.
- Habartová K, Cahlíková L, Řezáčová M, Havelek R. 2016. The Biological Activity of Alkaloids from the *Amaryllidaceae*: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Natural Product Communications* **11**: 1587-1594.
- Habli Z, Toumieh G, Fatfat M, Rahal ON, Gali-Muhtasib H. 2017. Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms. *Molecules* **22**: 250-272.

- Hatefi A, Amsden B. 2002. Camptothecin Delivery Methods. *Pharmaceutical Research* **19**:1389-1399.
- Havelek R, et al. 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.
- Havelek R, Seifrtova M, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L, Dalecká M, Vavrová 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**:479-490.
- He M, Qu C, Gao O, Hu X, Hong X. 2015. Biological and pharmacological activities of *Amaryllidaceae* alkaloids. *RSC Advances* **5**: 16562-16574.
- Hoshino O. 1998. The *Amaryllidaceae* Alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* **51**:323-424.
- Hu X, Li D, Chu C, Li X, Wang X, Jia Y, Hua H, Xu F. 2018. Antiproliferative Effects of Alkaloid Evodiamine and Its Derivates. *Int J Mol Sci* **19**: 1-31.
- Huether SE, McCance KL. 2012 *Understanding pathophysiology* 6th edition. Elsevier.
- Iannello C, Pigni NB, Antognoni F, Poli F, Maxia A, de Andrade JP, Bastida J. 2014. A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancratinum illyricum* L. *Fitoterapia* **92**: 163-167.
- Idehen E, Tang Y, Sang S. 2017. Bioactive phytochemicals in barley. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**:148-161.
- Ingrassia L, Lefranc F, Mathieu V, Darro F, Kiss R. 2008. *Amaryllidaceae* Isocarbostryril Alkaloids and Their Derivatives as Promising Antitumor Agents. *Transl Incol* **1**: 1-13.
- Jiang J, Hu C. 2009. Evodiamine: A Novel Anti-Cancer Alkaloid from *Evodia rutaecarpa*. *Molecules* **14**: 1852-1859.
- Jimenez A, Santos A, Alonso G, Vazquez D. 1976. Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. *Biochimica et Biophysica* **425**: 342-348.
- Jiráček. 2015. Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí. *Čes a slov Psychiat* **111**: 127–132.
- Johnson IS. 1968. Historical background of Vinca alkaloid research and areas of future interest. *Cancer Chemother Rep*. **52**: 455-461.
- Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett P. 1963. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res*. **23**: 1390-1427.
- Khan M, Iqbal A, Joshi A, Ajai K. 2014. ROLE OF ANTIOXIDANTS IN PREVENTION OF CANCER: A REVIEW. *Int J Cur Res Rev* **6**: 80-88.
- Khumkhong P, et al. 2019. Crinamine Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation,

- Migration, and Angiogenesis in Cervical Cancer SiHa Cells. *Biomolecules* **9**: 494-510.
- Kim SA, Kim YC, Kim SW, Lee SH, Min JJ, Ahn SG, Yoon JH. 2007. Antitumor Activity of Novel Indirubin Derivates in Rat Tumor Model. *Clinical Cancer Research* **13**:253-259.
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA. 2015. PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research*: gkv951.
- Kim YH, Park EJ, Park MH, Badarch U, Woldemichael GM, Beutler JA. 2006. Crinamine from *Crinum asiaticum* var. *japonicum* Inhibits Hypoxia Inducible Factor-1 Activity But Not Activity of Hypoxia Inducible Factor-2. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 2140-2142.
- Klener P, Klener P. 2013. Léky přírodního původu a jejich potenciální protinádorový účinek. *Onkologie* **7**: 47-49.
- Konrath EL, Passos CS, Klein-Junior LC, Henriques AT. 2013. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**: 1701-1725.
- Kotecha R, Takami A, Espinoza JL. 2016. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget* **7**: 52517-52529.
- Krejčová G, Ševelová L. 2003. Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy* **72**: 37-44.
- Krishnaswamy P, Nair S. 2016. Effect of Music Therapy on Pain and Anxiety Levels of Cancer Patients: A Pilot Study. *Indian J Palliat Care* **22**: 307-311.
- Ladas JL, Jacobson SJ, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM. 2004. Antioxidants and Cancer Therapy: A Systematic Review. *Journal of Clinical Oncology* **22**: 517-528.
- Lamoral-Theys D, Andolfi A, Van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calvé B, Wauthoz N, Mégalizzi V, Gras T, Bruyère C, Dubois J, Mathieu V, Kornienko A, Kiss R, Evidente A. 2009. Lycorine, the main phenanthridine *Amaryllidaceae* alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**: 6244-6256.
- Lancellotta V, Kovács G, Tagliaferri L, Perrucci E, Colloca G, Valentini V, Aristei C. 2018. Age Is Not a Limiting Factor in Interventional Radiotherapy (Brachytherapy) for Patients with Localized Cancer. *BioMed Research International* **2018**: 1-10.
- Lavelle F, Bissery MC, Combeau C, Riou JF, Vrignaud P, André S. 1995. Preclinical evaluation of docetaxel (Taxotere). *Seminars in Oncology* **22**:3-16.
- Legha SS. 1986. Vincristine Neurotoxicity. *Medical Toxicology* **1**:421-427.
- Ling X, Liu X, Zhong K, Smith N, Prey J, Li F. 2015. FL 118, a novel camptothecin analogue, overcomes irinotecan and topotecan resistance in human tumor xenograft models. *Am J Transl Res.* **7**: 1765-1781.

- Liu R, Cao Z, Tu J, Pan Y, Shang B, Zhang G, Bao M, Zhang S, Yang P, Zhou Q. 2012. Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry. *Pigment Cell & Melanoma Research* **25**: 630-638.
- López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and Narcissus species. *Life Science* **71**: 2521-2529.
- Luchetti G, et al. 2012. Bulbispermine: a crinine-type *Amaryllidaceae* alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells. *ChemMedChem* **7**: 815-822.
- Lyseng-Williamson KA, Fenton C. 2005. Docetaxel. *Drugs* **65**:2513-2531.
- Manoharan S, Guillemain GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. 2016. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**: 1-15.
- Mantovani A. 2009. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature Publishing Group* **457**:36-37.
- Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, Rui M, Siciliano AM, Collina S. 2018. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **28**: 2816-2826.
- Martin J, Kršková Z, Dušek J. 2011. Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. Lékař. 7*: 103-105.
- Martín MA, Goya L, Ramos S. 2016. Preventive Effects of Cocoa and Cocoa Antioxidants in Colon Cancer. *Diseases* **4**, 6.
- Maříková J, et al. 2020. Aromatic Esters of the Crinane *Amaryllidaceae* Alkaloid Ambelline as Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Journal of Natural Products* **83**: 1359-1367.
- Masi M, et al. 2019. Alkaloids isolated from *Haemanthus humilis* Jacq., an indigenous South African *Amaryllidaceae*: Anticancer activity of coccinine and montanine. *S. Afr. J. Bot.* **126**: 277–281.
- Matsuura HN, Fett-Neto AG. 2015. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. *Plant Toxins* **1**: 1-15.
- Mbaveng AT, Bitchagno GTM, Kuete V, Tane P, Efferth T. 2019. Cytotoxicity of ungeremine towards multi-factorial drug resistant cancer cells and induction of apoptosis, ferroptosis, necroptosis and autophagy. *Phytomedicine* **60**: 1-9.
- McNulty J, Nair JJ, Bastida J, Pandey S, Griffin C. 2009. Structure activity studies on the crinine alkaloid apoptosis-inducing pharmacophore. *Nat. Prod. Commun.* **4**: 483-488.
- McNulty J, Nair JJ, Bastida J, Pandey S, Griffin C. 2009. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry* **70**:913-919.
- McNulty J, Nair JJ, Codina C, Bastida J, Pandey S, Gerasimoff J, Griffin C. 2007. Selective



- apoptosis-inducing activity of crinum-type *Amaryllidaceae* alkaloids. *Phytochemistry* **68**: 1068-1074.
- Mellor HR, Callaghan R. 2008. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* **81**: 275-300.
- Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB. 2015. The molecular basis of cancer. The Bangkok Medical Journal 4th edition. Elsevier.
- Millimouno FM, Dong J, Yang L, Li J, Li X. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prev. Res.* **7**: 1081-1107.
- Mitra AK, et al. 2015. NOVEL DELIVERY APPROACHES FOR CANCER THERAPEUTICS. *J Control Release* **219**: 248-268.
- Moertel CG, Fleming TR, Creagan ET, Rubin J, O'Connell MJ, Ames MM. 1985. High-Dose Vitamin C versus Placebo in the Treatment of Patients with Advanced Cancer Who Have Had No Prior Chemotherapy- A Randomized Double- Blind Comparison. *N Engl J Med* **312**: 137-141.
- Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. 2013. Vinca Alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine* **4**:1231-1235.
- Muhamad N, Plengsuriyakarn T, Na-Bangchang K. 2018. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *Int J Nanomedicine* **13**: 3921-3935.
- Nair JJ, Rárová L, Strnad M, Bastida J, Staden J. 2012. Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family *Amaryllidaceae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**: 6195-6199.
- Nair J, Staden J. 2018. Cell cycle modulatory effects of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Life sciences* **213**: 94-101.
- Noble CO, Guo Z, Hayes ME, Marks JD, Park JW, Benz CC, Kirpotin DB, Drummond DC. 2009. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **64**: 741-751.
- Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. 2003. The Effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics<sup>1</sup>. *Molecular cancer therapeutics* **2**: 427-436.
- Pardoll DM. 2012. Immunology beats cancer: a blueprint for successful translation. *Nature Immunology* **13**:1129-1132.
- Pearce A, Haas M, Viney R, Pearson S-A, Haywood P, Brown C, Ward R. 2017. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS One* **12**:1-12.

- Pellegrino, et al. 2018. The *Amaryllidaceae* Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure* **26**:416-425.
- Pettit GR, Backhaus RA, Backhaus RA, Boyd MR, Meerow AW. 1993. Antineoplastic Agents, 256. Cell Growth Inhibitory Isocarbostryrils from *Hymenocallis*. *Journal of Natural Products* **56**: 1682-1687.
- Pettit GR, Melody N, Harald DL. 2004. Antineoplastic Agents. 511. Direct Phosphorylation of Phenpanstatin and Pancratistatin. *Journal of Natural Products* **67**: 322-327.
- Pietrzyk L, Torres A, Maciejewski R, Torres K. 2015. Obesity and Obese-related Chronic Low-grade Inflammation in Promotion of Colorectal Cancer Development. *Asian Pac J Cancer Prev*, **16**: 4161-4168.
- Quintero E, et al. 2012. Colonoscopy versus Fecal Immunochemical Testing in Colorectal-Cancer Screening. *N Engl J Med* **366**: 697-706.
- Reczek CR, Chandel NS. 2015. Revisiting vitamin C and cancer. *Science* **350**: 1317-1318.
- Roberts M, Wink M. 1998. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press, Londýn.
- Roy M, Liang L, Xiao X, Feng P, Ye M, Liu J. 2018. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Journal of Biomedicine and Pharmacotherapy* **107**: 615-624.
- Ruhmann CH, Jahn F, Jordan K, Dennis K, Maranzano E, Molassiotis A, Roila F, Feyer P. 2017. 2016 updated MASCC/ESMO consensus recommendations? Prevention of radiotherapy- induced nausea and vomiting. *Supportive Care in Cancer* **25**: 309-316.
- Sethi G, Ahn KS, Sandur SK, Lin X, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2006. Indirubin Enhances Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis through Modulation of Nuclear Factor-kB Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:23425-23435.
- Siegel R, et al. 2012. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **62**:220–241.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: A cancer journal for Clinicians* **69**:7-34.
- Singla KA, Garg A, Aggarwal. 2002. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics* **235**:179-192.
- Suchánek Š, Majek O, Vojtěchová G, Minaříková P, Rotnaglová B, Seifert B, Minařík M, Kožený P, Dušek L, Zavoral M. 2014. Colorectal cancer prevention in the Czech Republic: time trends in performance indicators and current situation after 10 years of screening. *European journal of cancer prevention* **23**:18-26.
- Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, Wang X, He C, Pan H. 2013. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease* **4**: 1-12.
- Sui H, Zhou L-H, Zhang Y-L, Huang J-P, Liu X, Ji Q, Fu X-L, Wen H-T, Chen Z-S, Deng

- W-L, Zhu H-R, Li Q. 2016. Evodiamine Suppresses ABCG2 Mediated Drug Resistance by Inhibiting p50/ p65 NF-κB Pathway in Colorectal Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* **117**: 1471-1481.
- Sullivan R, et al. 2015. Global cancer surgery: delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. *The Lancet Oncology* **16**: 1193-1224.
- Sun Y, Kang C, Wang M, Zhu J, Jin L, Cheng X. 2016. Nanosized camptothecin conjugates for single and combined drug delivery. *European Journal of BioMedical Research* **2**: 8-14.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet- Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cancer statistics. *ACS Journals* **65**: 87-108.
- Tram NTN, Titorenkova TV, Bankova VS, Handjieva NV, Popov SS. 2002. *Crinum L. (Amaryllidaceae)*. *Fitoterapia* **73**: 183-208.
- Unlu A, Kirca O, Ozdogan M. 2017. Homeopathy and cancer. *Journal of Oncological Sciences* **3**: 77-80.
- Vaněčková N, Hošťálková A, Šafratová M, Kuneš J, Hulcová D, Hrabínová M, Doskočil I, Štěpánková Š, Opletal L, Nováková L, Jun D, Chlebek J, Cahlíková L. 2016. Isolation of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances* **6**: 80114-80120.
- Visconti R, Della MR, Grieco D. 2016. Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**: 153-161.
- Vos SM, Tretter EM, Schmidt BH, Berger JM. 2011. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**: 827-841.
- Vshyvenko S, Scattolon J, Hudlicky T, Romero AE, Kornienko A. 2011. Synthesis of C-1 homologues of pancratistatin and their preliminary biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**: 4750–4752.
- Weekes J, Lam AK, Sebesan S, Ho Y-H. 2009. Irinotecan therapy and molecular targets in colorectal cancer: A systemic review. *World Journal of Gastroenterology* **15**: 3597-3602.
- Weichselbaum RR, Liang H, Deng L, Fu Y-X. 2017. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? *Nature Reviews Clinical Oncology* **14**: 365-379.
- Weniger B, Italiano L, Beck JP, Bastida J, Bergonon S, Codina C, Lobstein A, Anton R. 1995. Cytotoxic activity of *Amaryllidaceae* alkaloids. *Planta medica* **61**: 77-79.
- WHO.2018. World Health Organization – Cancer. Fact sheet. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
- Wink M. 2015. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* **2**: 251-286.
- Wu T, Munro AJ, Guanjian L, Liu GJ. 2005. Chinese medical herbs for chemotherapy side

- effects in colorectal cancer patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **1**:1-24.
- Xia J, Chen J, Zhang Z, Song P, Tang W, Kokudo N. 2014. A map describing the association between effective components of traditional Chinese medicine and signaling pathways in cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Drug Discov. Ther.* **8**: 139–153.
- Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR. 2016. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacol Rev* **68**: 701-787.
- Yao Z, Zhang Y, Xu D, Zhou X, Peng P, Pan Z, Xiao N, Yao J, Li Z. 2019. Research Progress on Long Non-Coding RNA and Radiotherapy. *Med Sci Monit* **25**: 5757-5770.
- Yui S, Mikami M, Mimaki Y, Sashida Y, Yamazaki M. 2001. Inhibition effect of *Amaryllidaceae* alkaloids, lycorine and lycoricidinol on macrophage TNF-  $\alpha$  production. *Yakugaku Zasshi* **121**: 167-171.
- Zenk MH, Juenger M. 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry* **68**: 2757–2772.
- Zhao C-Y, Cheng R, Yang Z, Tian Z-M. 2018. Nanotechnology for Cancer Therapy Based on Chemotherapy. *Molecules* **23**: 1-29.
- Zhi-Xing Q, Jia-Lu H, Xue-Yi Y, Jing-Hong L, Hua-Liang C, Feng X, Pi C, Jian-Guo Z. 2018. Anticancer and Reversing Multidrug Resistance Activities of Natural Isoquinoline Alkaloids and their Structure-activity Relationship. *Current Medicinal Chemistry* **25**: 5088-5114.
- Zick SM, Snyder D, Abrams SI. 2018. Pros and Cons of Dietary Strategies Popular Among Cancer Patients. *Oncology Journal* **32**: 542-547.

