

KVARTÉRNÍ ISOCHINOLINOVÉ ALKALOIDY SANGUINARIN A CHELERYTHRIN. ÚČINKY IN VITRO A IN VIVO

ADÉLA ZDAŘILOVÁ^a, JANA MALÍKOVÁ^b,
ZDENĚK DVOŘÁK^a, JITKA ULRICHOVÁ^a
a VILÍM ŠIMÁNEK^a

^aÚstav lékařské chemie a biochemie, ^bÚstav patologie,
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3,
775 15 Olomouc
jitkaulrichova@seznam.cz

Došlo 18.11.05, přijato 12.12.05.

Klíčová slova: kvartérní benzo[c]fenanthridiny, biologická aktivita, interakce, DNA, bílkoviny, biotransformace, bezpečnost, nežádoucí účinky

Obsah

1. Úvod
2. Chemické vlastnosti
3. Biologická aktivita
 - 3.1. Cytotoxicita a apoptóza
 - 3.2. Interakce s DNA a genotoxicita
 - 3.3. Interakce s bílkoviny
 - 3.4. Antimikrobiální aktivita
 - 3.5. Vliv na základní fyziologické funkce
 - 3.6. Metabolické transformace
4. Nežádoucí účinky
5. Závěr

Článek je přehledem výsledků studií o účincích sanguinarinu a chelerythrinu na metabolismus buňky a živý organismus, které byly publikovány v posledních 10 letech. Je diskutován molekulární mechanismus biologické aktivity obou alkaloidů a jsou uvedeny názory na možné směry jejich budoucího výzkumu.

1. Úvod

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA), sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE), se vyskytují v řadě druhů čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae. Hlavním zdrojem SA (13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-1,3-dioxolo[4,5-i]fenanthridinium chloridu) a CHE (1,2-dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]fenanthridinium chloridu) jsou *Sanguinaria*

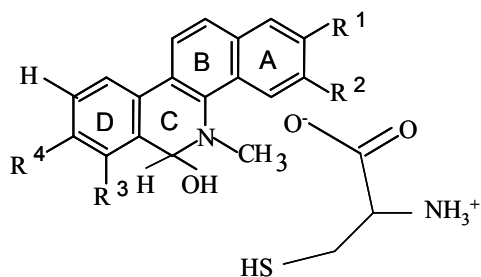
canadensis L. (krevnice kanadská), *Chelidonium majus* L. (vlaštovičník větší) a *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., z nichž byly izolovány ve formě kvartérních solí¹. SA a CHE jsou považovány za fytoalexiny, sekundární metabolity chránící rostlinu před patogenními mikroorganismy. Výchozími aminokyselinami v biosyntéze KBA jsou tyrosin a fenylalanin, důležitými meziproducty jsou protopiny, posledním mezistupněm dihydroderiváty, které jsou oxidovány benzo[c]fenanthridinoxidásoou na kvartérní soli².

Sanguinarin a chelerythrin vykazují široké spektrum biologické aktivity, která závisí na zvoleném biologickém modelu, pH, iontové síle a oxidoredukčním statutu prostředí³. Mají protizánětlivý účinek srovnatelný s indomethacinem⁴ a výraznou antibakteriální aktivitu⁵. Směsi sanguinarinu a chelerythrinu, na trhu nabízené jako sanguiritrin (alkaloidový extrakt *M. cordata*) a sanguinaria (alkaloidový extrakt z rhizomů *S. canadensis*), jsou aktivními složkami přípravků ústní hygieny s prokázaným antiplakovým účinkem, resp. aditiva do krmiva hospodářských zvířat prodávaného v EU pod názvem SANGROVIT[®] (PHYTOBIOTICS Futterzusatzstoffe GmbH, Německo). Nicméně SA, CHE a jejich dihydroderiváty jsou považovány za toxické složky oleje semen rostlin rodu *Argemone*. Po jeho požití dochází u savců k akutnímu oxidačnímu stresu a jsou postiženy všechny životně důležité orgány. U lidí je tato otrava známa jako „epidemic dropsy syndrom“ (cit.^{6,7}). S benzo[c]akridinem, jediným v literatuře uváděným metabolitem KBA u živočichů, je spojována genotoxicita SA a CHE. Oba alkaloidy jsou pro své potenciální terapeutické, ale také jim přisuzované toxické účinky, stále atraktivními pro základní a aplikovaný výzkum v experimentální toxikologii a farmakologii. Tento článek shrnuje dosavadní poznatky o molekulárním mechanismu působení SA a CHE na buněčné modely a některé druhy savců.

2. Chemické vlastnosti

Ve vodném prostředí jsou SA a CHE v rovnováze mezi formou kvartérního kationu a formou 6-hydroxy-5,6-dihydroderivátu (tzv. pseudobáze či alkanolaminu), dále jen 6-hydroxydihydroderivátu^{8,9}. V aprotickém prostředí se tvoří bimolekulární aminoacetyly, jejichž struktura byla určena z ¹H, ¹³C NMR spekter¹⁰ a rentgenovou strukturní analýzou¹¹. Za fyziologického pH (7,2–7,4) procházejí alkaloidy buněčnou membránou ve formě 6-hydroxydihydroderivátu, který je v cytoplasmě v rovnováze s kvartérním kationem⁴. Rychlost průniku obou alkaloidů do buňky se liší v závislosti na velikosti rovnovážné konstanty tvorby 6-hydroxydihydroderivátu¹². 6-Hydroxydihydroderiváty reagují se sloučeninami substituovanými thiolovou skupinou, např. L-cysteinem, vratnou nevazebnou

interakcí (obr. 1) (cit.^{13,14}). Ve fosfátových puffech jsou oba alkaloidy omezeně rozpustné a dochází k jejich agregaci^{15,16}. Pro stanovení sanguinarinu a chelerythrinu



- 6-hydroxydihydrosanguinarin $R^1+R^2 = \text{OCH}_2\text{O}$,
 $R^3+R^4 = \text{OCH}_2\text{O}$
 6-hydroxydihydrochelerythrin $R^1+R^2 = \text{OCH}_2\text{O}$,
 $R^3 = R^4 = \text{OCH}_3$

Obr. 1. Nevazebná interakce 6-hydroxydihydrosanguinarinu a 6-hydroxydihydrochelerythrinu s cysteinem¹³

3. Biologická aktivita

3.1. Cytotoxicita a apoptóza

V tabulce I jsou uvedeny druhy buněk, na kterých byl testován toxický účinek SA a CHE (cit.^{19–31}). SA a CHE vykazovaly na všech buněčných modelech toxicitu závislou na čase a koncentraci. U řady buněk byla při toxických koncentracích alkaloidů pozorována vakuolizace. Cytotoxicita může být snížena řadou faktorů jako např. fetálním bovinním sérem v médiu, vzrůstajícím pH či přítomností exogenní potkaní S9 jaterní mikrosomální frakce¹⁹. Porovnání uváděných hodnot IC_{50} v tab. I nemá velkou vypovídající hodnotu zejména z důvodů nejednotně prováděných experimentů (různá doba inkubace buněk s testovanými látkami, použití rozdílných metod hodnocení životnosti). Z kvalitativního srovnání je však zřejmé, že CHE vykazuje nižší toxicitu než SA a není výrazný rozdíl v účinku obou alkaloidů na normální a nádorovou buňku.

Tabulka I
Cytotoxicita sanguinarinu a chelerythrinu

Typ buněk	IC_{50} [μM]	Alkaloid	Lit.
<i>Normální buňky</i>			
S-G gingivální epitelální buňky	7,6	SA	19
Gingivální buňky (PGC)	9	SA	19
HGF-1 gingivální fibroblasty	10,9	SA	19
Normální lidské fibroblasty	1,6	SA	20
HaCaT lidské keratinocyty	0,3 / 2,2	SA / CHE	21,22
Lidské epidermální keratinocyty (NHEKs)	> 10	SA	23
Lidské hepatocyty	71 / > 100	SA / CHE	24
Prasečí hepatocyty	47 / 83	SA / CHE	24
Potkaní hepatocyty	25 / 50	SA / CHE	25
<i>Nádorové buňky</i>			
Lidská promyelocytická leukemie HL-60	28 / 58	SA / CHE	26
Lidská nádorová buněčná linie HeLa	2,2 / 16,2	SA / CHE	12
Nádorové KB buňky	6,4	SA	19
Nádorové prsní adenokarcinomy (MCF7)	3,3	SA	20
Prostatické adenokarcinomy (PC3)	1,1	SA	20
Buněčná linie karcinomu tračníku (DLD-1)	1,4	SA	20
Lidská plicní nádorová buněčná linie (A 549)	1,9	SA	20
Lidské melanomy (M4Beu)	1,8	SA	20
Lidské buňky karcinomu kůže (A431)	2	SA	23
Buňky děložního čípku (HPV)	1,7	SA	27
HeLa S3	0,16/1,24 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	SA / CHE	28
Lidská prostatická linie LNCaP	1	SA	29
Lidská prostatická linie DU145	1	SA	29
Primární lidská uveální nádorová buněčná linie (OCM-1)	2,7 / 6,7 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	SA / CHE	30
Leukemická buněčná linie (K562)	5,5	SA	31
Leukemická buněčná linie (U937)	5	SA	31

Řada prací se zabývala studiem účinku SA a CHE na indukci apoptózy u normálních a nádorových buněčných linií^{23,29,30}. Apoptóza je nejstudovanější typ programované buněčné smrti (PCD). Jako PCD je označována buněčná smrt závislá na signálech nebo řízených aktivitách uvnitř umírající buňky. Při apoptóze ztrácí buňka nejprve asymetrii fosfolipidů v membráně, dochází ke kondenzaci chromatinu, redukci velikosti jádra, štěpení internukleosomové DNA, svraštění buňky, vydouvání membrány a rozpadu buňky na apoptotická tělíška obklopená zbytky membrány. Ty jsou v konečné fázi fagocytovány bez vzniku zánětlivé reakce. Naproti tomu při nekróze dochází k ireverzibilnímu poškození buňky a nitrobuňkový obsah se vyplavuje do okolí buněk, kde navodí zánětlivou reakci a úplný rozpad buňky. Tyto uvedené dva základní typy buněčné smrti nejsou jediné, nicméně sled morfologických a biochemických změn v procesu apoptózy a nekrózy je pro ně charakteristický a v podstatě u všech typů buněk podobný. Signální dráhy vedoucí k apoptóze je možné rozdělit na dvě skupiny: (i) vnitřní dráhu, která zprostředkovává většinu proapoptických signálů, vycházejících především z mitochondrií a je řízena vzájemným působením molekul rodiny Bcl-2 a (ii) vnější dráhu, jejíž spouštěcí mechanismus se děje aktivací receptorů na plasmatické membráně buněk. Výsledkem induktivního působení obou drah je aktivace specifických proteolytických enzymů kaspas.

Indukce apoptózy vyvolaná SA byla pozorována u buněčné linie A431 odvozené od lidského karcinomu kůže²³, lidských prsních (MCF-7) (cit.²⁰) a prostatických (PC-3, DU145, LNCaP) (cit.^{20,29}) nádorových buněčných linií, buněk melanomu (M4Beu) (cit.²⁰), děložního čípku²⁷, leukemické buněčné linie (U937) a myeloidních (ML-1a) buněk³², lidské leukemické buněčné linie (K562, JM1) (cit.^{33–35}), lidských immortalizovaných keratinocytů (HaCaT) (cit.²²) a fibroblastů²⁰. Apoptotická aktivita CHE byla pozorována v primárních kulturách potkaních neonatálních ventrikulárních myocytů³⁶, u lidských neuroblastomů (SH-SY5Y), prsní nádorové buněčné linie (MCF7) a buněčné linie karcinomu tračniku (HCT116) (cit.³⁷).

Mechanismy buněčné smrti vyvolané SA studoval na buňkách děložního čípku Ding a spol.²⁷. Účinek alkaloidu byl koncentračně závislý a indukoval buněčnou smrt. SA aplikovaný v koncentracích 2–4 μM vyvolal apoptózu doprovázenou aktivací kaspasy-3, koncentrace 8–17 μM způsobily onkózu, buněčnou smrt vyznačující se otokem, vakuolizací, zpuchřováním a zvýšenou permeabilitou cytoplasmatické membrány, při které nedochází k aktivaci kaspasy-3 (cit.²⁷). Stejně účinky měly SA a CHE na primární lidskou uveální nádorovou buněčnou linii (OCM-1) (cit.³⁰). Zatímco apoptóza byla pozorována při koncentraci SA a CHE 1,0 a 1,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, buněčná smrt způsobená nekrozou byla patrná u obou alkaloidů při koncentraci 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.³⁰). Studie inhibičního účinku SA na proliferaci linií melanomových (M4Beu), prsních (MCF-7) a prostatických (PC3) buněk a normálních lidských fibroblastů ukázala, že není výrazný rozdíl mezi toxicitou alkaloidu na nádorovou a zdravou buňku ($\text{IC}_{50} = 0,9\text{--}3,3 \mu\text{M}$

(cit.²⁰). Rychlá apoptotická reakce po aplikaci SA byla pravděpodobně vyvolána předčasným a kritickým vyčerpáním redukovaného glutathionu (GSH) reakcí alkaloidu s GSH a následnou aktivací kaspasy-3/7. Na základě těchto výsledků se autoři domnívají, že signální dráha zahrnující vyčerpání GSH s následnou indukcí apoptózy, by mohla být novým cílem v protinádorové terapii²⁰. Inkubace lidských immortalizovaných keratinocytů HaCaT se SA vedla k významnému poklesu antiapoptotického proteinu Bcl-2 a nárůstu proapoptotického Bax proteinu²². Bcl-2 tvoří s Bax proteinem heterodimer a tím může své proapoptotické účinky neutralizovat^{38,39}. Proteiny rodiny Bcl-2 (např. Bax, Bad, Bid) mají schopnost regulovat uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií do cytosolu⁴⁰. Chan a spol.³⁷ označili CHE za inhibitor skupiny proteinů rodiny Bcl-2. Chelerythrin inhiboval BH3 doménu peptidové vazby Bcl-X_L-Bak ($\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$) a tím způsobil uvolnění cytochromu *c* nejen z intaktních, ale i z izolovaných mitochondrií³⁷. U kultivovaných neonatálních kryších srdečních myocytů indukoval CHE buněčnou smrt doprovázenou vznikem reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) s charakteristickými znaky apoptózy, včetně buněčného svraštění, externalizace fosfatidylserinu či aktivace kaspas³⁶. Typická apoptotická smrt myocytů byla indukována v koncentračním rozmezí 6–30 μM , jež se užívá k zablokování aktivity proteinkinasy C (PKC) u srdečních myocytů. CHE vyvolal uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií, které bylo inhibováno antioxidantem *N*-acetyl-L-cysteinem. To potvrdilo, že ROS mohou zprostředkovávat uvolnění cytochromu *c* vyvolané CHE. Chelerythrin může sloužit jako modelová látka k objasnění mechanismů signalizace včetně apoptózy³⁶.

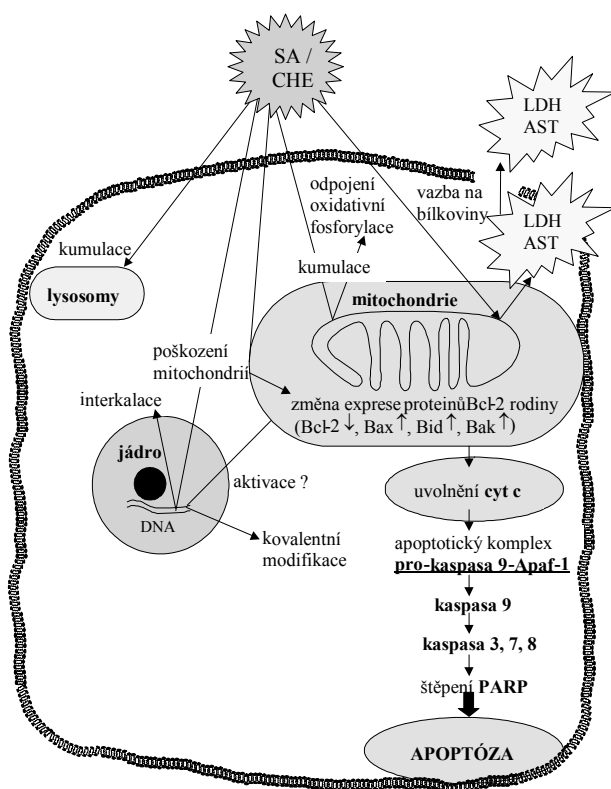
Mezi faktory ovlivňující apoptózu patří také protein NF- κB (cit.³⁵). Jedná se o jaderný transkripční faktor, který reguluje expresi cytokinů, proteinů buněčné adheze a dalších produktů genů, které se podílí na septickém šoku, ateroskleróze, zánětu, buněčné proliferaci a virové replikaci. V souvislosti s těmito poznatky byly zkoumány vztahy proteinů Bax, Bcl-2 a NF- κB uplatňující se během apoptózy indukované SA u lidských leukemických buněčných linií (K562) a (JM1) (cit.^{33–35}). Buňky K562 po aplikaci 1,5 a 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ SA změnilly svou morfologii na morfologii dvou různých forem buněčné smrti. U 1,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ SA se projevila klasická morfologie apoptózy, 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ způsobilo buněčnou smrt podobnou onkóze s typickým zpuchřováním cytoplasmatické membrány (BCD). Nižší koncentrace SA indukovala apoptózu u buněk K562 zvýšením exprese Bax, aktivací kaspasy-3 a snížením proteinu NF- κB , zatímco vyšší koncentrace alkaloidu způsobila BCD snížením exprese Bax a zvýšením exprese proteinu NF- κB . Použití stejných koncentrací SA u buněk JM1 vyvolalo expresi Bcl-2 (cit.^{33–35}). Výsledky získané s buňkami K562 prokázaly, že protein Bax a aktivace kaspasy-3 působí proapoptoticky, zatímco aktivace NF- κB má opačný účinek. Nicméně mechanismus, kterým NF- κB inhiboval apoptózu, nebyl zcela vysvětlen³⁵. Chaturvedi a spol.³² studovali účinek SA a CHE na regulaci aktivace

Tabulka II

Interakce sanguinarinu a chelerythrinu se signálními molekulami zapojenými v apoptóze

Signální molekula	Účinek	Alkaloid	Lit.
Apaf-1	↑	SA	22
*Bak	↑	SA	22
*Bax	↑	SA	22, 33
*Bax/Bcl-2 (poměr)	↑	SA	22
*Bcl-2	↓	SA	22
*Bid	↑	SA	22
BH ₃ peptidová vazba (Bcl-X _L -Bak)	↓	CHE	37
Kaspasa-3	↑	SA / CHE	20, 22, 27, 36
Kaspasa-7	↑	SA	20, 22
Kaspasa-8	↑	SA	22
Kaspasa-9	↑	SA / CHE	22, 36
NF-κB	↓	SA	31, 32
TNF (IκBα, p65)	↓	SA	32

* Proteiny rodiny Bcl-2 patří mezi regulátory apoptózy. Tato rodina proteinů se skládá jak z inhibitorů, tak z promotorů programované buněčné smrti. U savců bylo identifikováno nejméně 15 členů rodiny, další byly identifikovány u virů. Mezi antiapoptotické proteiny patří Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-w, proapoptotické proteiny jsou Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bik a Bid. Bcl-2 reguluje také aktivaci kaspasových proteas, které jsou zodpovědné za konečnou efektorovou fázi apoptózy. ↑ aktivace, ↓ inhibice



Obr. 2. Působení sanguinarinu a chelerythrinu na buněčné orgány a indukcii apoptózy

NF-κB u lidské myeloidní (ML-1a) a leukemické (U937) buněčné linie a u normálních lidských fibroblastů. Buňky byly vystaveny působení tumorového nekrotizujícího faktoru α (TNF-α), který aktivoval NF-κB. Účinkem SA (5 μM) byla aktivace NF-κB zcela inhibována. SA blokoval aktivaci NF-κB indukovanou nejen TNF-α, ale také interleukinem-1, forbolmyristylacetátem a kyselinou okadaovou. Aktivaci vyvolanou peroxidem vodíku a/nebo ceramidem SA neinhiboval. Jednou z možností, jak SA brání aktivaci NF-κB, by mohla být inhibice fosforylace a degradace IκBα inhibiční podjednotky NF-κB. CHE neměl na buňky ovlivněné TNF-α srovnatelný účinek³². SA blokoval vazbu aktivovaného NF-κB do promotorové oblasti DNA (cit.^{31,32}). SA a CHE překvapivě vyvolávaly v HeLa buňkách rychlou a intenzivní jadernou translokaci heterodimeru p50/p65 (aktivní forma NF-κB) (cit.⁴¹). Nicméně NF-κB nebyl i přes svou přítomnost v jádře transkripčně aktivní. Tato pozorování jsou z hlediska mechanismu účinku podobná výsledkům Duvoix a spol.³¹, ale pouze částečně shodná s výsledky Chaturvediho a spol.³². V práci⁴¹ byl pozorovaný jev vysvětlen současnou indukcí jaderné translokace glukokortikoidního receptoru působením SA a CHE. Homodimer GR/GR interaguje s p50/p65 a výsledným stavem jsou transkripčně neaktivní GR i NF-κB. V souvislosti s ovlivněním aktivace NF-κB byla zjištěna schopnost SA inhibovat Na⁺/K⁺-ATPasu^{42,43}. Bylo prokázáno, že ouabain, inhibitor Na⁺/K⁺-ATPasy, nemá žádný účinek na aktivaci faktoru NF-κB vyvolanou TNF-α. Tedy SA neinhibuje aktivaci NF-κB cestou blokáce ATPasy (cit.³²).

Výsledky těchto studií dostatečně prokázaly, že oba

alkaloidy indukují apoptotické faktory (tab. II). Úplné objasnění mechanismu jejich vlivu na apoptózu by mohlo přispět k potenciálnímu terapeutickému použití těchto látek. Účinky SA a CHE na buňku jsou schématicky znázorněny na obr. 2.

3.2. Interakce s DNA a genotoxicita

Mezi možné cíle SA a CHE v buňce patří jaderná a mitochondriální DNA. *In vitro* oba alkaloidy interkalují do DNA (souborně v cit.⁴⁴). SA a CHE patří do skupiny hydrofobních kationů, které se v průběhu aktivace membrány hromadí na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány, kde neutralizují negativní náboj a dochází k odpojení oxidativní fosforylace. Analýza ¹H-NMR potvrdila, že SA se interkaluje do DNA izolované z telecího brzlíku⁴⁵. Termodynamická charakterizace interakce SA s DNA vyhodnocená kombinací dat z absorpčních a fluorescenčních spekter ukázala, že vazba SA s DNA je závislá na iontové síle, základním složení roztoku a sekvenci párů nukleotidů⁴⁶. Interakce SA s DNA, homo- a heteropolymery AT byla charakterizována negativní změnou entalpie a pozitivní změnou entropie, zatímco vazba s homo- a heteropolymery GC byla vyjádřena negativní změnou entropie a entalpie. Das a spol.⁴⁷ studovali interakci SA s B-, Z-, a H^L-formami DNA pomocí cirkulárního dichroismu a spektrofotometricky. Dřívější studie uvádějí, že SA ve formě kvartérního kationtu se váže na B-formu DNA interkalací, přednostně na sekvence bohaté na GC (cit.⁴⁶), zatímco 6-hydroxydihydroderivát se na DNA neváže^{48,49}. SA neinteraguje s formami Z- a H^L-DNA, ale mění je na B-formu. Studie^{47,50} potvrdily, že v molekule DNA při interakci SA s GC sekvencemi dochází ke konformačním změnám. Metodou kapilární zónové elektroforézy bylo prokázáno, že za fyziologického pH nedochází ke kovalentní vazbě SA a CHE na DNA a individuální nukleotidy. Jejich vzájemná interakce je založena na vzniku ne vazebných komplexů pomocí slabé intermolekulární síly⁵¹. Kombinací spektrofluorometrické, spektrofotometrické a viskozimetrické metody byla studována interakce SA s RNA (cit.⁵²). Alkaloid se vázal na A- a protonizovanou formu RNA a jejich vzájemná interakce byla exotermickým procesem; vazba SA na protonizovanou formu byla pevnější.

Genotoxicita látky vylučuje její použití jako aktivní složky v humánních, resp. veterinárních přípravcích. U SA a CHE nebyl dosud možný genotoxický účinek věrohodně vyhodnocen. Studie *in vitro* neprokázaly genotoxicitu KBA (cit.^{53–55}), zatímco výsledky ze studií *in vivo* jsou rozporuplné^{56–60}. Genotoxicita KBA byla testována na lidských lymfocytech a lidské hepatomové linii HepG2 pomocí mikrojaderného testu v cytokineticém bloku, a to v přítomnosti a/nebo nepřítomnosti exogenní S9 frakce z potkaních jater. SA nezpůsobil indukcii aktivity jaderek ani v lidských lymfocytech, ani v buňkách HepG2 (cit.⁵⁴). SA nevykazoval genotoxicitu při použití SOS chromotestu (zkouška genotoxicity upraveným laboratorním protokolem *Escherichiae coli* PQ37) v přítomnosti a/nebo

nepřítomnosti exogenní S9 frakce z potkaních jater⁵³. Výsledky byly porovnávány s Amesovým testem, který rovněž byl negativní. Metodou „³²P-postlabeling“ byly nalezeny modifikované nukleotidy po inkubaci DNA se SA a CHE v přítomnosti mikrosomální frakce z potkaních jater indukované β-naftoflavonem⁵⁵. Tento výsledek nevyloučil, ale ani nepotvrdil genotoxicitu obou alkaloidů. U myši, kterým byl intraperitoneálně podán SA v dávce 10 mg kg⁻¹, bylo zjištěno poškození chromosomů u buněk kostní dřene⁵⁶. Intraperitoneální podání alkaloidu myším v dávkách 5,4 a 10,8 mg kg⁻¹ vedlo k poškození DNA v buňkách kostní dřene a v leukocytech⁵⁷. Topická aplikace 6 mg ml⁻¹ SA na kůži u myši způsobila poškození DNA buněk epidermu prokázané metodou „Comet assay“ (cit.⁵⁸). V pokusech prováděných na prasatech⁵⁹ a potkanech⁶⁰, kdy v krmivu byla podávána denní dávka směsi SA a CHE (6:2) 10 mg kg⁻¹ po dobu 90, resp. 109 dnů, nebylo metodou „³²P-postlabeling“ nalezeno žádné poškození jaterní DNA. Stejně výsledky byly získány u potkanů, kde byl účinek na DNA hepatocytů navíc hodnocen metodou „Comet assay“ a stanovením 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu jako parametru oxidačního poškození DNA. Rozdílné výsledky v experimentech *in vivo* je možné vysvětlit pouze způsobem aplikace KBA. Poškození DNA nalezené po intraperitoneálním podání KBA nelze vztáhnout na účinek alkaloidů aplikovaných externě. Při podání stejné dávky KBA *per os* jsou reálné hladiny alkaloidů ve vnitřním prostředí nesrovnatelně nižší a rozdílná je také jejich metabolisace.

3.3. Interakce s bílkovinami

Biologická aktivita KBA byla vždy spojována s jejich inhibičním účinkem na fyziologicky důležité enzymy. Mechanismem vysvětlujícím inhibici enzymů je adice nukleofilních skupin bílkoviny na iminiovou vazbu kvartérní formy SA, resp. CHE. Inhibici lze potlačit přidáním GSH, dithiothreitolu (DTT) či jiné protektivní SH-látky. V tabulce III jsou uvedeny pouze ty enzymy, pro které byla změřena buď IC₅₀ nebo hodnota K_i se SA/CHE. V dalším textu jsou zmíněny studie, u kterých byl inhibiční účinek alkaloidu prokázán pouze kvalitativně. SA a CHE inhibovaly prasečí pankreatickou a lidskou slinnou alfa-amylasu⁶¹. SA inhiboval enzymovou aktivitu kinasy, která fosforyluje specifický protein –44 kDa přítomný v mitochondriální frakci potkaního srdce⁶². Inhibiční účinky SA a CHE byly testovány také na membránových proteasách, které neobsahují skupinu SH, aminopeptidase N a dipeptidylpeptidase IV. Tyto enzymy se účastní procesu buněčné aktivace a diferenciaci^{63,64}. Modelem byly C6 potkaní nádorové buněčné linie. Za zvolených experimentálních podmínek byly alkaloidy přítomny ve formě 6-hydroxydihydroderivátů, které jsou formou tvořící ne vazebné komplexy s bílkovinami¹³. SA a CHE inhibovaly aktivitu obou enzymů. Hovězí albumin při pH 7,4 snižoval jejich inhibiční účinek.

Vliv SA na svalové bílkoviny byl rovněž studován na

Tabulka III
Inhibice enzymů sanguinarinem a chelerythrinem

Enzymy	IC ₅₀ (K _i) [μM]	Alkaloid	Lit.
Acetylcholinesterasa	10,9 ^a ; 35,0 ^b ; 81 ^c ; 10 ^d ; >160 ^e / 9,4 ^b (1,5 ^a); >160 ^e	SA / CHE	65–69
Acetylcholintransferasa	0,28 ^o	SA	65
Alaninaminotransferasa	3,4 ^f / 4,0 ^f	SA / CHE	70
Aminooxidasa I, II	(600) ^g / (900) ^g	SA / CHE	71
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	6,0-6,5 ^h	SA	72
Butyrylcholinesterasa	17,4 ⁱ ; 24,0 ^e / 14 ^e	SA / CH	65,73
Cytochrom P450 1A2	(2) ^{j,k}	SA	74
Dekarboxylasa L-aromatických aminokyselin	(120) ^l / 580 ^l	SA / CHE	75
Diaminooxidasa	5,0 ^e	SA	76
Elastasa	16 ^m ; 6,2 ⁿ	SA	77
Glutamátdekarboxylasa	(70) ^b	SA	78
5-Lipoxigenasa	0,4 ^p / 0,8 ^p	SA / CHE	79
12-Lipoxigenasa	13 ^r / 33 ^r	SA / CHE	79
MKP-1	10	SA	80
Monoaminooxidasa	24,5 ^s	SA	81
Myosin „light chain“ kinasa	158 ^t	SA	82
NADPH-oxidasa	8,3 ^u	SA	83
NADPH:cytochrom P450-reduktasa	21,8 ^k	SA	83
Proteinkinasa C	217 ^b ; 16 ^f / 25 ^f	SA / CHE	82,84
Ca ²⁺ -dependentní proteinkinasa	41 ^v	SA	82
Cyklická AMP-dependentní proteinkinasa	6,0 ^f	SA	82

^a *Electrophorus electricus*, ^b potkaní mozek, ^c lidský erytrocyt, ^d čistý enzym, ^e lidská plasma, ^f potkaní játra, ^g *Aspergillus niger*, ^h srdeční sval morčete, ⁱ koňské sérum, ^j lidské rekombinantní, ^k lidské jaterní mikrosomy, ^l myši fibroblasty, ^m slinivka břišní, ⁿ lidský hlen, ^o telecí mozek, ^p telecí neutrofil, ^r myši keratinocyt, ^s myši mozek, ^t ptačí předžaludek, ^u postgranulární frakce diferencovaných HL-60, ^v pšeničný klíček

třech izolovaných tkáních hlodavců – aortě, bránici a myokardu. SA uvolňoval hladké svalstvo izolované aorty potkana po kontrakci iniciované fenylefrinem (PE) (cit.⁸⁵). Účinek SA lze vysvětlit inhibicí tvorby inositol-1,4,5-trifosfátu a influxu iontů Ca²⁺. SA inhiboval kontrakci v rozmezí 0,3–10 μM. Kontrakce aorty indukovaná ionty K⁺ byla pozorována až při koncentracích SA 10–100 μM. Inhibiční účinek SA byl potlačen DTT, pravděpodobně ochranou skupin SH na klíčových molekulách regulujících svalovou kontrakci. Na rozdíl od hladkého svalu, SA pozitivně ovlivňoval kontraktilitu příčně pruhovaného svalstva bránice izolované z myši, pravděpodobně v důsledku přímého působení na Ca²⁺ kanál sarkoplasmatického retikula (SR). SA indukované uvolnění Ca²⁺ ze SR bylo blokováno působením rutheniové červeně a DTT (cit.⁸⁶). Pozitivně inotropní účinek SA byl zaznamenán na srdečním svalstvu izolovaném z potkana⁸⁷. SA indukovaná kontrakce byla potlačena preinkubací myokardu s La³⁺ nebo Ca²⁺ ionty. V kultuře kardiomyocytů SA zvyšoval influx Ca²⁺, který byl inhibován preinkubací s La³⁺ ionty. SA indukovaný influx Ca²⁺ iontů nebyl inhibován preinkubací s blokátory Ca²⁺ kanálu amiloridem, diltiazemem, nifedipinem, verapamilem, manganem a niklem. Kontraktilní účinek SA je pravděpodobně spojen s influxem Ca²⁺ iontů přes La³⁺

senzitivní iontové kanály. Intoxikace organismu SA by mohla vyvolat infarkt myokardu⁸⁷.

SA, resp. CHE byly testovány jako ligandy na několika membránových receptorech. Hodnoty jejich IC₅₀ jsou uvedeny v tabulce IV. Vazba SA na angiotensinový AT₁ receptor (K_i = 1,29 μM) (cit.⁸⁸) je možným vysvětlením, proč je v lidovém léčitelství používán k léčbě vysokého krevního tlaku extrakt z kořenů *Bocconia frutescens* L. (cit.^{89,90}). Interakce SA s tímto receptorem je však ireverzibilní a nekompetitivní⁹¹.

Biologická aktivita SA by mohla mít spojitost se signálními drahami aryluhlovodíkového receptoru (AhR) a s podrodinou CYP1A cytochromu P450. První úvaha, že účinek SA *in vivo* by mohl být ovlivněn AhR nebo CYP1A enzymy, vycházela z pozorování, že toxicita SA u myši byla výrazně snížena po premedikaci experimentálních zvířat induktorem CYP1A enzymu 3-methylcholanthrenem⁹². Podobný účinek byl popsán *in vitro* (cit.⁷⁴). Cytotoxicita SA v primárních kulturách potkaních hepatocytů a v lidské hepatomové linii HepG2 byla snížena preinkubací s induktory CYP1A, TCDD, 3-methylcholanthrenem a β-naftoflavonem⁷⁴. Po inkubaci SA s potkaními jaterními mikrosomy, které byly izolovány ze zvířat vystavených účinku CYP1A induktorů, byla zazna-

Tabulka IV
In vitro interakce sanguinarinu a chelerythrinu s receptory

Receptor	IC ₅₀ (K _i) [μM]	Alkaloid	Lit.
Angiotensin II-AT ₁	1,90 (1,29) / 9,93 (6,76)	SA / CHE	88
Angiotensin II-AT ₁	4,37 (0,14)	SA	91
Vasopresin V ₁	7	SA	98
α ₁ -Adrenoreceptor	33,6	SA	65
α ₂ - Adrenoreceptor	6,4	SA	65
Nikotinový Ach	11,8	SA	65
Muskarinový	2,4	SA	65
Serotoninový 5-HT ₂	91,7	SA	65

menána produkce reaktivních species, tvořících DNA adukty⁵⁵. Toxicita SA *in vivo/in vitro* může být modulována AhR-závislou CYP1A inducibilní expresí. Bylo popsáno, že SA aktivuje signální a metabolické dráhy závislé na receptoru AhR v lidských keratinocytech⁹³. Autoři popisují indukci AhR-závislé exprese CYP1A a dalších genů účinkem SA. Věrohodnost výsledků publikovaných v této práci byla však zpochybněna⁹⁴. Jiní autoři naopak pozorovali, že SA a CHE neovlivňují aktivitu AhR a exprese CYP1A1 genu^{95,96}. Nicméně oba alkaloidy inhibovaly katalytickou aktivitu CYP1A1 (cit.^{93,95}). V obou studiích byly použity subtoxické koncentrace alkaloidů 0,25 a 0,5 μM, resp. 0,01; 0,1; a 1 μM. Pro koncentrace nad 4 μM se již začínal projevovat inhibiční účinek SA a CHE na proteinkinasu C (PKC). Jelikož funkční PKC je nezbytná pro aktivaci AhR, byl účinek SA a CHE ve vyšších koncentracích na buněčné kultury logicky příčinou inhibice dioxin-závislé aktivity AhR (cit.⁹⁷). Účinná inhibiční koncentrace vs. vlastní cytotoxicita SA a CHE je častým předmětem sporů.

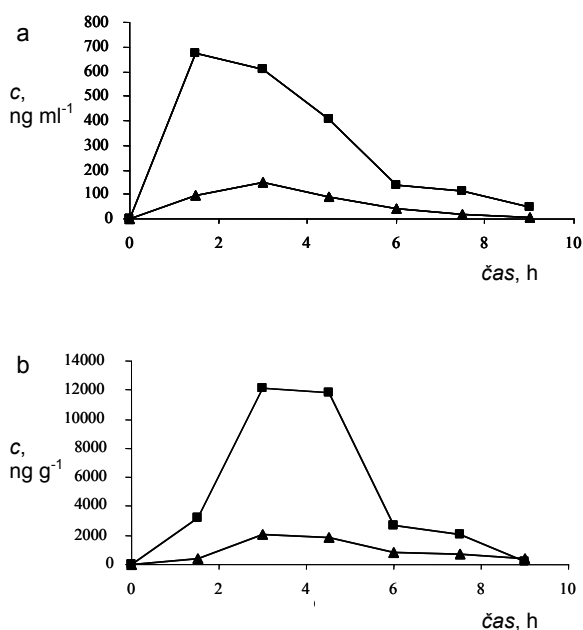
3.4. Antimikrobiální aktivita

V rostlinách mají SA a CHE funkci fytoalexinů. Spektrum jejich antimikrobiální aktivity je čini výjimečnými mezi sekundárními metabolity. Rostliny čeledi Rutaceae byly využívány v rovníkové Africe v ústní hygieně (čisticí dřívka) (cit.^{1,5,99}). Již dříve byla popsána jejich bakteriostatická a baktericidní aktivita vůči gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím^{100–102}, plísním¹⁰³ a kvasinkám¹⁰⁴. Z nedávné doby jsou studie o jejich inhibičních účincích na několik druhů *Mycobacterium*¹⁰⁵, *Helicobacter pylori*¹⁰⁶ a *Trypanosoma brucei*¹⁰⁷.

Zajímavým zjištěním byla inhibiční aktivita dihydroSA/dihydroCHE vůči *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Candida albicans*, srovnatelná s gentamicinem¹⁰⁸. Možným vysvětlením je vyšší lipofilita redukováné formy kvartérního kationu, což umožňuje jeho penetraci přes mikrobiální stěnu a následně může docházet ke zpětné konverzi dihydroderivátu na kvartérní formu. Podobně je vysvětlována větší antimikrobiální účinnost SA vs CHE ve vztahu k hodnotě rovnovážné konstanty tvorby 6-hydroxydihydroderivátů.

3.5. Vliv na základní fyziologické funkce

Široké spektrum účinků SA a CHE popisované v experimentech na buněčných modelech nemůže dát odpověď na působení těchto látek na celý organismus. Je zajímavé, že přes mnohaleté používání extraktů obsahujících KBA v alternativní medicíně a přípravech ústní hygieny bylo publikováno pouze několik studií na zvířatech, které hodnotí vliv SA a CHE na základní fyziologické funkce. Jednotlivé studie^{59,60,92,109} se liší způsobem podání zkoušených látek. Williams a spol.⁹² testovali u myši vliv 3-methylcholanthrenu (3-MC) na poškození jater vyvolané intraperitoneálně aplikovaným SA v jednorázové dávce 10 mg kg⁻¹. Po podání SA došlo u zvířat k výraznému snížení hladiny GSH v krvi, aktivity cytochromu P450, aminopyrin-*N*-demethylasy a alaninhydroxylasy, zatímco aktivity sorbitoldehydrogenasy (SDH) a alaninaminotransferasy (ALT) se zvýšily. Intraperitoneálně podaná dávka SA (20 mg kg⁻¹) myším, premedikovaným 3-MC, nevyvolala pokles hladiny GSH a nevedla ke snížení aktivity cytochromu P450 a aminopyrin-*N*-demethylasy. 3-MC neměl ochranný účinek na alaninhydroxylasy, ale došlo ke snížení sérové SDH a ALT. Velmi problematické výsledky publikoval v roce 1992 Tandon a spol.¹⁰⁹. Po jednorázovém podání SA žaludeční sondou v dávce 10 mg kg⁻¹ potkanům a morčatům bylo sledováno jeho vylučování močí a výkaly po dobu 96 h a stanoven v trávicím traktu a různých orgánech zvířat. V moči a výkalech nebyla přítomnost alkaloidu prokázána po 72 h a jako jediný metabolit byl identifikován benzo[*c*]akridin. SA byl nalezen ve všech orgánech potkanů a morčat s výjimkou sleziny a varlat. V práci Kosiny a spol.⁵⁹ byla prasatům podávána v krmivu směs SA a CHE (6:2) v denní dávce 5 mg kg⁻¹. Po 90 dnech nebyly nalezeny žádné změny u základních parametrů klinické biochemie a prokázáno genotoxické poškození jaterní DNA. Celkový zdravotní stav experimentální skupiny byl shodný s kontrolní skupinou, morfoloické vyšetření tkání byla negativní, z celkového množství stanovených alkaloidů se 98 % vylučovalo výkaly. Ve stejném vedeném experimentu na potkanech (směs SA a CHE v denní dávce 10 mg kg⁻¹ po dobu 109 dnů) byly



Obr. 3. Metabolismus sanguinarinu v plasmě a játrech potkana po jednorázové aplikaci *per os* 10 mg kg⁻¹ (cit.¹¹¹); ▲ SA, ■ DHSA

získány obdobné výsledky⁶⁰. V hepatocytech nebyly nalezeny žádné adukty nukleotidů ani poškození jaderné a mitochondriální DNA. Výsledky obou experimentů nasvědčují tomu, že dlouhodobé podávání KBA nemá toxický účinek na organismus savců.

3.6. Metabolické transformace

Benzo[*c*]akridin se od roku 1961 v literatuře uvádí jako jediný metabolit SA u savců¹¹⁰. Tato potenciálně karcinogenní látka je považována za příčinu oxidačního stresu vyvolaného po požití oleje ze semen *A. mexicana* u lidí a hospodářských zvířat⁴³. Že se může jednat o artefakt, bylo již poukázáno⁹⁴. V nedávné době byla studována metabolická přeměna SA u potkanů^{17,111}. Zvířatům byl podán jednorázově SA sondou v dávce 10 mg kg⁻¹ a stanovena v 30 min intervalech jeho hladina v plasmě a játrech. Vedle SA byl vždy přítomen DHSA, a to ve větším množství než výchozí látka (obr. 3), v moči nebyly obě látky nalezeny. V žádném vzorku nebyla prokázána přítomnost benzo[*c*]akridinu. Psotová a spol.¹⁷ předpokládají, že tvorba DHSA je prvním krokem detoxikace SA v organismu a jeho pozdější eliminace ve formě polárních konjugátů. K redukci SA na DHSA dochází již v trávicím traktu především mikrobiálními reduktasami. Po absorpci obou alkaloidů je SA dále redukován nespecifickými cytosolickými a mikrosomálními reduktasami¹⁷. Experiment s [³H]-SA potvrdil distribuci alkaloidu do všech orgánů potkana

a rovněž, že cca 98 % orálně podávaného SA je vylučováno výkaly¹¹¹.

4. Nežádoucí účinky

Antimikrobiálních a protizánětlivých účinků SA a CHE je využíváno v přípravcích ústní hygieny. V posledních 5 letech je diskutována bezpečnost při dlouhodobém používání těchto přípravků. KBA byly označeny jako příčina vzniku prekancerózních lézí na sliznici dutiny ústní^{112–115}. Vzhledem k určité podobnosti těchto alkaloidů se známými karcinogeny – polycyklickými aromatickými uhlovodíky by se na možných nežádoucích účincích mohla podílet buď metabolická aktivace, přímá interakce nebo indukovatelnost některé z izoform cytochromu P450, nejpravděpodobněji s CYP1A1 a 1B1 (cit.⁹³). Naproti tomu existují *in vivo* studie mutagenicity, genotoxicity a onkogenetické studie, které tyto nežádoucí účinky nepotvrdily. Rovněž v dlouhodobém experimentu Munro a spol.¹¹⁶ nebyl potvrzen toxický vliv SA na sliznici praseťáku. Výsledky z *in vitro* studií a *in vivo* experimentů neprokazují ani jednoznačně nevyvrácí vztah mezi SA a vznikem leukoplakie. SA v koncentraci 100 a 300 nM inhiboval syntézu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a zvyšoval aktivitu peroxidasy, katalasy a superoxidodismutasy u granulocitních buněk praseťáku, což může negativně ovlivňovat jeho reprodukční schopnosti¹¹⁷.

5. Závěr

Existuje několik důvodů, proč sanguinarin a chelerythrin zůstanou i v blízké budoucnosti předmětem zájmu farmaceutických chemiků a farmakologů. Jejich farmakodynamické účinky jsou pravděpodobně komplexním účinkem všech tří forem, které jsou ve vnitřním prostředí v dynamické rovnováze (schéma 1). Prvním problémem, který musí být objasněn, je tvorba a struktura metabolitů u savců a ověření jejich biologické aktivity. Již nyní je prokázáno, že metabolická transformace SA a CHE začíná v trávicím traktu. Metabolitem SA, který se vylučuje močí, není benzo[*c*]akridin, jak je dosud v literatuře citováno. Znalost metabolických přeměn SA a CHE také přispěje k vysvětlení, co je toxickou látkou/látkami v oleji semen rostlin rodu *Argemone*. Zůstává nezodpovězeno, jakým způsobem KBA reagují s jadernou a/nebo mitochondriální DNA, a které struktury v buňce jsou pro tyto alkaloidy cílové. Odpověď na tuto otázku objasní, zda i velmi nízké koncentrace SA a CHE v organismu mohou mít toxické účinky. Kumulace alkaloidů v tkáních by byla možným vysvětlením pro experimentálně neprokázanou transformaci gingiválních fibroblastů, vedoucí k dysplazii epitelu sliznice dutiny ústní. Pro výrazné změny fluorescence KBA v závislosti na koncentraci vodíkových iontů a jejich rozdílné afinity k buněčným strukturám mohou být SA a CHE použity jako sondy v některých metodách molekuly

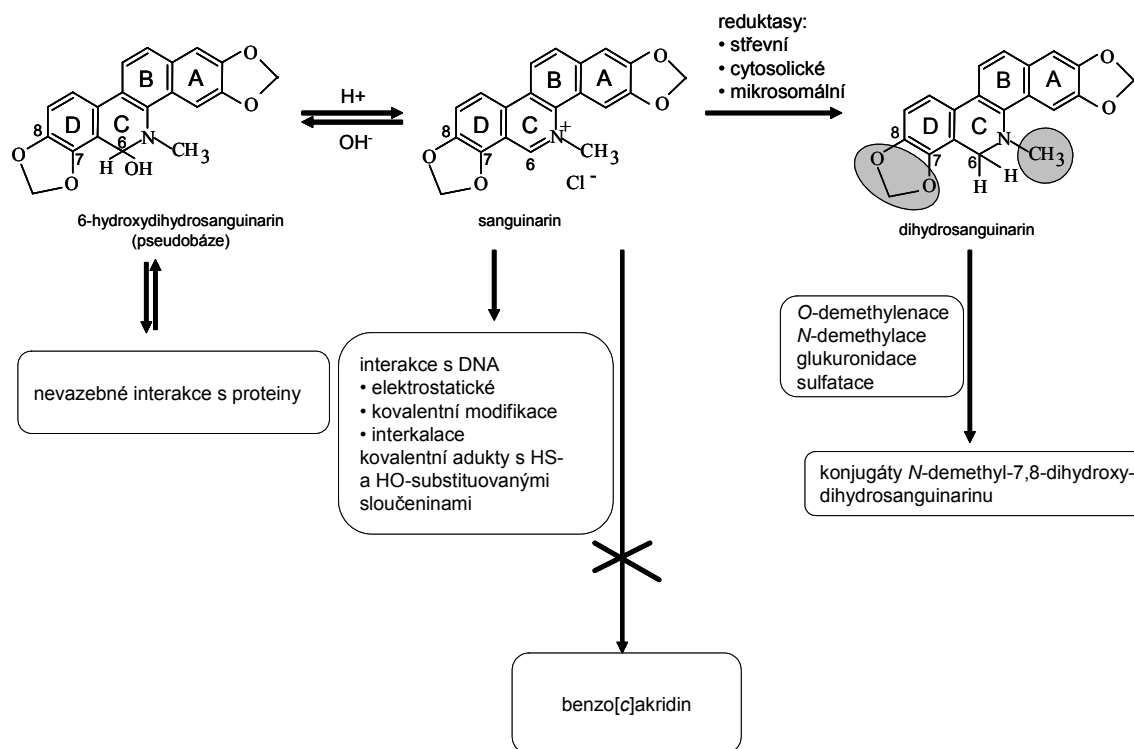


Schéma 1. **Transformace sanguinarinu u živočichů;** Rovnováha mezi sanguinarinem a jeho 6-hydroxydihydroderivátem závisí na pH a prostředí buňky. Střevní, cytosolické a mikrosomální reduktasy přeměňují sanguinarin na dihydrosanguinarin, který je transformován na polární konjugáty a vylučován močí (cit.³)

lární biologie. Oba alkaloidy jsou také, vedle jejich současného využití v kosmetických a veterinárních fytopřípravcích, stále zajímavé pro farmaceutický průmysl pro svou potenciální cytostatickou účinnost.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (6198959216) a je věnována Jaroslavu Vičarovi k jeho životnímu jubileu.

Seznam symbolů a zkratk

AhR	aryluhlovodíkový receptor
ALT	alaninaminotransferasa
Apaf-1	faktor aktivující apoptotické proteasy 1
AST	aspartátaminotransferasa
BCD	buněčná smrt podobná onkóze s typickým zpuchřováním cytoplasmatické membrány (b lister c ell d eath)
CYP	cytochrom P450
GSH	redukováný glutathion
DTT	dithiothreitol
GR/GR	glukokortikoidní receptor – homodimer
CHE	chelerythrin
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50%-ní inhibici

IκBα	enzymu inhibiční podjednotka jaderného faktoru kappa B (NF-κB)
Kaspasa-3,7,9	specifické proteasy (cystein-dependent asp artate-specific proteases)
KBA	kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy
LDH	laktátdehydrogenasa
MKP-1	mitogeny aktivovaná proteinkinasa-fosfataza
3-MC	3-methylcholanthren
NF-κB	jaderný faktor kappa B
PCD	programovaná buněčná smrt (p rogramme c ell d eath)
PE	fenylefrin
PKC	proteinkinasa C
p50/p65	podjednotky jaderného faktoru kappa B (NF-κB)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (r eactive o xygen s pecies)
SA	sanguinarin
SDH	sorbitoldehydrogenasa
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TNF-α	tumorový nekrotizující faktor

LITERATURA

1. Šimánek V., v knize: *The Alkaloids* (Brossi A., ed.), 26, str. 185. Academic Press, Orlando 1985.
2. Cline S. D., McHale R. J., Coscia C. J.: *J. Nat. Prod.* 56, 1219 (1993).
3. Ulrichová J.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. (Supplement) 149*, 9 (2005).
4. Lenfeld J., Kroutil M., Maršálek E., Slavík J., Preininger V., Šimánek V.: *Planta Med.* 43, 161 (1981).
5. Vavrečková C., Ulrichová J.: *Chem. Listy* 88, 238 (1994).
6. Šimánek V., Vespalec R., Šedo A., Ulrichová J., Vičar J., v knize: *Chemical Probes in Biology* (M. P. Schneider, ed.) NATO Science Series, II. Mathematics, Physics and Chemistry 129, str. 245. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2003.
7. Šimánek V., Zdařilová A., Ulrichová J.: *Ann. Pol. Chem. Soc.* 3, 613 (2004).
8. Dostál J., Slavík J.: *Chem. Listy* 94, 15 (2000).
9. Dostál J., Slavík J., v knize: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ed.) 27, str. 155. Elsevier, Amsterdam 2002.
10. Dostál J., Bochořáková H., Táborská E., Slavík J., Potáček M., Buděšinský M., de Hoffmann E.: *J. Nat. Prod.* 59, 599 (1996).
11. Toušek J., Dommissie R., Dostál J., Žák Z., Pieters L., Marek R.: *J. Mol. Struct.* 613, 103 (2002).
12. Slaninová I., Táborská E., Bochořáková H., Slanina J.: *Cell Biol. Toxicol.* 17, 51 (2001).
13. Barták P., Šimánek V., Vlčková M., Ulrichová J., Vespalec R.: *J. Phys. Org. Chem.* 16, 803 (2003).
14. Vespalec R., Barták P., Šimánek V., Vlčková M.: *J. Chromatogr., B.* 797, 357 (2003).
15. Vespalec R., Vlčková M., Kubáň V.: *Electrophoresis* 26, 3265 (2005).
16. Vespalec R., Vlčková M., Horáková H.: *J. Chromatogr., A.* 1051, 75 (2004).
17. Psotová J., Klejdus B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Chromatogr., B* 830, 165 (2006).
18. Zdařilová A.: *Disertační práce*. Univerzita Palackého, Olomouc 2006.
19. Babich H., Zuckerbraun H. L., Barber I. B., Babich S. B., Borenfreund E.: *Pharmacol. Toxicol.* 78, 397 (1996).
20. Debiton E., Madelmont J. C., Legault J., Barthomeuf C.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 74 (2003).
21. Vavrečková C., Gawlik I., Müller K.: *Planta Med.* 62, 491 (1996).
22. Adhami V. M., Aziz M. H., Mukhtar H., Ahmad N.: *Clin. Cancer Res.* 9, 3176 (2003).
23. Ahmad N., Gupta S., Husain M. M., Heiskanen K. M., Mukhtar H.: *Clin. Cancer Res.* 6, 1524 (2000).
24. Ulrichová J., Dvořák Z., Vičar J., Lata J., Smržová J., Šedo A., Šimánek V.: *Toxicol. Lett.* 125, 125 (2001).
25. Ulrichová J., Walterová D., Vavrečková C., Kamarád V., Šimánek V.: *Phytother. Res.* 10, 220 (1996).
26. Satou T., Akao N., Matsushashi R., Koike K., Fujita K., Nikaido T.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1651 (2002).
27. Ding Z., Tang S. C., Weerasinghe P., Yang X., Pater A., Liepins A.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 1415 (2002).
28. Nakanishi T., Suzuki M., Saimoto A., Kabasawa T.: *J. Nat. Prod.* 62, 864 (1999).
29. Adhami V. M., Aziz M. H., Reagan-Shaw S. R., Nihal M., Mukhtar H., Ahmad N.: *Mol. Cancer. Ther.* 8, 933 (2004).
30. Kemény-Beke A., Aradi J., Damjanovich J., Beck Z., Facskó A., Berta A., Bodnár A.: *Cancer Lett.*, v tisku.
31. Duvoix A., Delhalle S., Blasius R., Schnekenburger A., Morceau F., Fougère M., Henry E., Galteau M. M., Dicato M., Diederich M.: *Biochem. Pharmacol.* 68, 1101 (2004).
32. Chaturvedi M. M., Kumar A., Darnay B. G., Chainy G. B., Agarwal S., Agarwal B. B.: *J. Biol. Chem.* 272, 30129 (1997).
33. Weerasinghe P., Hallock S., Tang S. C., Liepins A.: *Cell Biol. Toxicol.* 17, 371 (2001).
34. Weerasinghe P., Hallock S., Tang S. C., Liepins A.: *Pathol. Res. Pract.* 197, 717 (2001).
35. Weerasinghe P., Hallock S., Liepins A.: *Exp. Mol. Pathol.* 71, 89 (2001).
36. Yamamoto S., Seta K., Morisco C., Vatner S. F., Sadoshima J.: *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1829 (2001).
37. Chan S. L., Lee M. C., Tan K. O., Yang L. K., Lee A. S. Y., Flotow H., Fu N. Y., Butler M. S., Soejarto D. D., Buss A. D., Yu V. C.: *J. Biol. Chem.* 278, 20453 (2003).
38. Chinnaiyan A. M., Orth K., O'Rourke K., Duan H., Poirier G. G., Dixit V. M.: *J. Biol. Chem.* 271, 4573 (1996).
39. Srivastava M., Ahmad N., Gupta S., Mukhtar H.: *J. Biol. Chem.* 276, 15481 (2001).
40. Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269 (1999).
41. Dvořák Z., Vrzal R., Maurel P., Ulrichová J.: *Chem. Biol. Interact.*, v tisku.
42. Bobis G. S.: *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 363, 203 (2001).
43. Das M., Khanna S. K.: *Crit. Rev. Toxicol.* 27, 273 (1997).
44. Faddeeva M. D., Beliaeva T. N.: *Tsitologija* 39, 181 (1997).
45. Saran A., Srivastava S., Coutinho E., Maiti M.: *Ind. J. Biochem. Biophys.* 32, 74 (1995).
46. Sen A., Ray A., Maiti M.: *Biophys. Chem.* 59, 155 (1996).
47. Das S., Kumar G. S., Maiti M.: *Biophys. Chem.* 76, 199 (1999).
48. Sen A., Maiti M.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 2097 (1994).
49. Maiti M., Das S., Sen A., Das A., Kumar G. S., Nandi R. J.: *Biomol. Struct. Dyn.* 20, 455 (2002).
50. Maiti M.: *Ind. J. Biochem. Biophys.* 38, 20 (2001).
51. Vlčková M., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V.: *Electrophoresis* 26, 1673 (2005).

52. Das S., Banerjee A., Sen A., Maiti M.: *Res. Com.* 79, 82 (2000).
53. Kevekordes S., Mersch-Sundermann V., Burghaus C. M., Spielberger J., Schmeiser H. H., Arlt V. M., Dunkelberg H.: *Mutat. Res.* 445, 81 (1999).
54. Kevekordes S., Spielberger J., Burghaus C. M., Birkenkamp P., Zietz B., Paufler P., Diez M., Bolten C., Dunkelberg H.: *Anticancer Res.* 21, 461 (2001).
55. Stiborová M., Šimánek V., Frei E., Hobza P., Ulrichová J.: *Chem. Biol. Interact.* 140, 231 (2002).
56. Das A., Mukherjee A., Chakrabarti J.: *Mutat. Res.* 563, 81 (2004).
57. Ansari K. M., Dhawan A., Khanna S. K., Das M.: *Food. Chem. Toxicol.* 43, 147 (2005).
58. Das M., Ansari K. M., Dhawan A., Shukla Y., Khanna S. K.: *Int. J. Cancer.* 117, 709 (2005).
59. Kosina P., Walterová D., Ulrichová J., Lichnovský V., Stiborová M., Rýdlová H., Vičar J., Krečman V., Brabec M. J., Šimánek V.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 85 (2004).
60. Psotová J., Večeřa R., Zdařilová A., Anzebacherová E., Kosina P., Svobodová A., Hrbáč J., Jirovský D., Stiborová M., Lichnovský V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Food. Chem. Toxicol.*, odesláno.
61. Zajoncová L., Kosina P., Vičar J., Ulrichová J., Peč J.: *Enzyme Inhib. Med. Chem.* 20, 261 (2005).
62. Lombardini J. B., Props C.: *Biochem. Pharmacol.* 51, 151 (1996).
63. Šedo A., Vlašicová K., Barták P., Vespalec R., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Phytother. Res.* 15, 1 (2001).
64. Šedo A., Malík R., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Physiol. Res.* 52, 367 (2003).
65. Schmeller T., Latz-Brüning B., Wink M.: *Phytochemistry* 44, 257 (1997).
66. Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Slavík J., Lenfeld J., Cushman M., Šimánek V.: *Planta Med.* 48, 111 (1983).
67. Kuznetsova L. P., Nikol'skaia E. B., Sochilina E. E., Faddeeva M. D.: *Tsitologiya* 43, 1046 (2001).
68. Kuznetsova L. P., Nikol'skaya E. B., Sochilina E. E., Faddeeva M. D.: *J. Evol. Biochem. Physiol.* 38, 35 (2002).
69. Ulrichová J., Kovář J., Šimánek V.: *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 50, 978 (1985).
70. Walterová D., Ulrichová J., Preininger V., Šimánek V., Lenfeld J., Lasovský J.: *J. Med. Chem.* 24, 1100 (1981).
71. Luhová L., Frébort I., Ulrichová J., Adachi O., Šimánek V., Peč P.: *J. Enzyme Inhibition* 9, 295 (1995).
72. Seifen E., Adams R. J., Riemer R. K.: *Eur. J. Pharmacol.* 60, 373 (1979).
73. Ulrichová J., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: *Planta Med.* 48, 174 (1983).
74. Vrba J., Kosina P., Ulrichová J., Modrianský M.: *Toxicol. Lett.* 151, 375 (2004).
75. Dršata J., Ulrichová J., Walterová D.: *J. Enzyme Inhibition* 10, 231 (1996).
76. Vaidya A. B., Rajagopalan T. G., Kale A. G., Leuine R. J.: *J. Postgr. Med.* 26, 28 (1980).
77. Tanaka T., Matori K., Mineo S., Hirofani M., Furuya T., Kobayashi S.: *Planta Med.* 59, 200 (1993).
78. Netopilová M., Dršata J., Ulrichová J.: *Pharmazie* 51, 589 (1996).
79. Vavrečková C., Gawlik I., Müller K.: *Planta Med.* 62, 397 (1996).
80. Vogt A., Tamewitz A., Skoko J., Sikorski R. P., Giuliano K. A., Lazo J. S.: *J. Biol. Chem.* 280, 19078 (2005).
81. Lee S. S., Kai M., Lee M. K.: *Phytother. Res.* 15, 167 (2001).
82. Wang B. H., Lu Z. X., Polya G. M.: *Planta Med.* 63, 494 (1997).
83. Vrba J., Hrbáč J., Ulrichová J., Modrianský M.: *Chem. Biol. Interact.* 147, 35 (2004).
84. Psotová J., Ducher L., Ulrichová J., Walterová D.: *Chem. Papers* 90, 613 (1996).
85. Hu C. M., Cheng H. W., Cheng Y. W., Kang J. J.: *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 47 (2001).
86. Hu C. M., Cheng H. W., Cheng Y. W., Kang J. J.: *Br. J. Pharmacol.* 130, 299 (2000).
87. Hu C. M., Cheng Y. W., Liao J. W., Cheng H. W., Kang J. J.: *J. Biomed. Sci.* 12, 399 (2005).
88. Caballero-George C., Vanderheyden P. M. L., Apers S., Heuvel H. V., Solis P. N., Gupta M. P., Claeys M., Pieters L., Vauquelin G., Vlietinck A. J.: *Planta Med.* 68, 770 (2002).
89. Matsusaka T., Ichikawa I.: *Annu. Rev. Physiol.* 59, 395 (1997).
90. Caballero-George C., Vanderheyden P. M. L., Solis P. N., Pieters L., Shahat A. A., Gupta M. P., Vauquelin G., Vlietinck A. J.: *Phytomedicine* 8, 59 (2001).
91. Caballero-George C., Vanderheyden P. M. L., Solis P. N., Gupta M. P., Pieters L., Vauquelin G., Vlietinck A.: *Eur. J. Pharmacol.* 458, 257 (2003).
92. Williams M. K., Dalvi S., Dalvi R. R.: *Vet. Hum. Toxicol.* 42, 196 (2000).
93. Karp J. M., Rodrigo K. A., Pei P., Pavlick M. D., Andersen J. D., McTigue D. J., Fields H. W., Mallery S. R.: *Toxicol. Lett.* 158, 50–60 (2005).
94. Dvořák Z., Modrianský M., Šimánek V., Ulrichová J., Vičar J., Vrba J., Walterová D.: *Toxicol. Lett.* 158, 164 (2005).
95. Zdařilová A., Vrzal R., Rypka M., Ulrichová J., Dvořák Z.: *Food. Chem. Toxicol.* 44, 242 (2006).
96. Dvořák Z., Sovadinová I., Bláha L., Giesy J. P., Ulrichová J.: *Food. Chem. Toxicol.*, odesláno.
97. Long W. P., Pray-Grant M., Tsai J. C., Perdew G. H.: *Mol. Pharmacol.* 53, 691 (1998).
98. Granger I., Serradeil-le Gal C., Augereau J. M., Gleye J.: *Planta Med.* 58, 35 (1992).
99. Walterová D., Ulrichová J., Válka I., Vičar J., Vavrečková C., Táborská E., Harkrader R. J., Meyer D. L., Černá H., Šimánek V.: *Acta Univ. Palacký Olomouc, Fac. Med.* 139, 7 (1995).
100. Odebiyi O. O., Sofovora E. A.: *Planta Med.* 36, 204

- (1979).
101. Vichkanova A. A., Rubinchik M. A., Adgina V. V., Fedorchenko T. S.: *Farmakol. Toksikol.* 32, 325 (1969).
 102. Dzin J. L., Socransky S. S.: *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27, 663 (1985).
 103. Hejtmánková N., Walterová D., Preininger V., Šimánek V.: *Fitoterapia* 15, 291 (1984).
 104. Vichkanova S. A., Adgina V. V.: *Microbiol. Zh.* 52, 53 (1990).
 105. Newton S. M., Lau C., Gurcha S. S., Besra G. S., Wright C. W.: *J. Ethnopharmacol.* 79, 57 (2002).
 106. Mahady G. B., Pendland S. L., Stoia A., Chadwick L. R.: *Phytother. Res.* 17, 217 (2003).
 107. Merschjohann K., Sporer F., Steverding D., Wink M.: *Planta Med.* 67, 623 (2001).
 108. Navarro V., Delgado G.: *J. Ethnopharmacol.* 66, 223 (1999).
 109. Tandon S., Das M., Khanna K.: *Drug Metab. Dispos.* 21, 194 (1993).
 110. Hakim S. A. E., Mijović V., Walker J.: *Nature* 189, 201 (1961).
 111. Večeřa R., Klejdus B., Kosina P., Orolin J., Stiborová M., Smrček S., Vičar J., Ulrichová J., Kubáň V., Anzenbacher P., Šimánek V.: *Drug. Metab. Dispos.*, odesláno.
 112. Damm D. D., Curran A., White D. K., Drummond J. F.: *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 87, 61 (1999).
 113. Eversole L. R., Eversole G. M., Kopicik J.: *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 89, 455 (2000).
 114. Anderson K. M., Stoner G. D., Fields H. W., Chacon G. E., Dohar A. L., Gregg B. R., Mallery S. R.: *Oral Oncol.* 41, 200 (2005).
 115. Hong S. J., Jeong S. S., Song K. B.: *Int. Dent. J.* 55, 128 (2005).
 116. Munro I. C., Delzell E. S., Nestmann E. R., Lynch B. S.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 30, 182 (1999).
 117. Bianco F., Basini G., Grasselli F.: *Reprod. Toxicol.*, v tisku.

A. Zdařilová^a, J. Malíková^b, Z. Dvořák^a, J. Ulrichová^a, and V. Šimánek^a (^a*Institute of Medicinal Chemistry and Biochemistry*, ^b*Institute of Pathology, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Quaternary Isoquinoline Alkaloids Sanguinarine and Chelerythrine. *In vitro* and *in vivo* Effects**

Quaternary benzo[*c*]phenanthridine alkaloids (QBA) sanguinarine (SA) and chelerythrine (CHE) are found within the families Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae and Rutaceae. These alkaloids originate from aromatic amino acids tyrosine and phenylalanine. Important intermediates in their biosynthesis are protopines; its last step is the oxidation of dihydro-QBA to QBA with benzo[*c*]phenanthridine oxidase. The strong antimicrobial activity of QBA suggests their function as plant defense secondary metabolites or phytoalexins. If these alkaloids are administered to living organisms such as insects, fish, and mammalian species, they can be absorbed, distributed, retained and/or metabolized as quaternary ammonium compounds, 6-hydroxy dihydro derivatives (pseudobases) and/or dihydro derivatives. In blood and organs, the equilibrium between these forms depends mainly on pH, ionic strength and oxidative capacity of the medium. Their resulting mode of action reflects the sum of reactions of all three chemical structures with cellular components. The formation of dihydro-QBA might be the first step of their detoxication in organism and their subsequent elimination. Benzo[*c*]acridine is not a metabolite of QBA in mammals. This review presents the resulting biological effects of QBA on cells and animals.