

## ALKALOIDY ROSTLIN ČELEDI AMARYLLIDACEAE JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

MARKÉTA DALECKÁ<sup>a</sup>, RADIM HAVELEK<sup>a</sup>,  
KAREL KRÁLOVEC<sup>a</sup>, LENKA BRŮČKOVÁ<sup>a</sup>  
a LUCIE CAHLÍKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, <sup>b</sup> Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

dalecka.marketa@seznam.cz, radim.havelek@upce.cz,  
karel.kralovec@upce.cz, lenka.bruckova@upce.cz,  
cahlikova@faf.cuni.cz

Došlo 19.7.13, přijato 9.8.13.

**Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.**

**Klíčová slova:** alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, protinádorová aktivita, indukce apoptózy

### Obsah

1. Úvod
2. Biologická a protinádorová aktivita alkaloidů čeledi Amaryllidaceae
  - 2.1. Lykorinový typ
  - 2.2. Homolykorinový typ
  - 2.3. Haemanthaminový a krinanový typ
  - 2.4. Tazettinový typ
  - 2.5. Pankratistatinový typ
  - 2.6. Galanthaminový typ
3. Závěr

### 1. Úvod

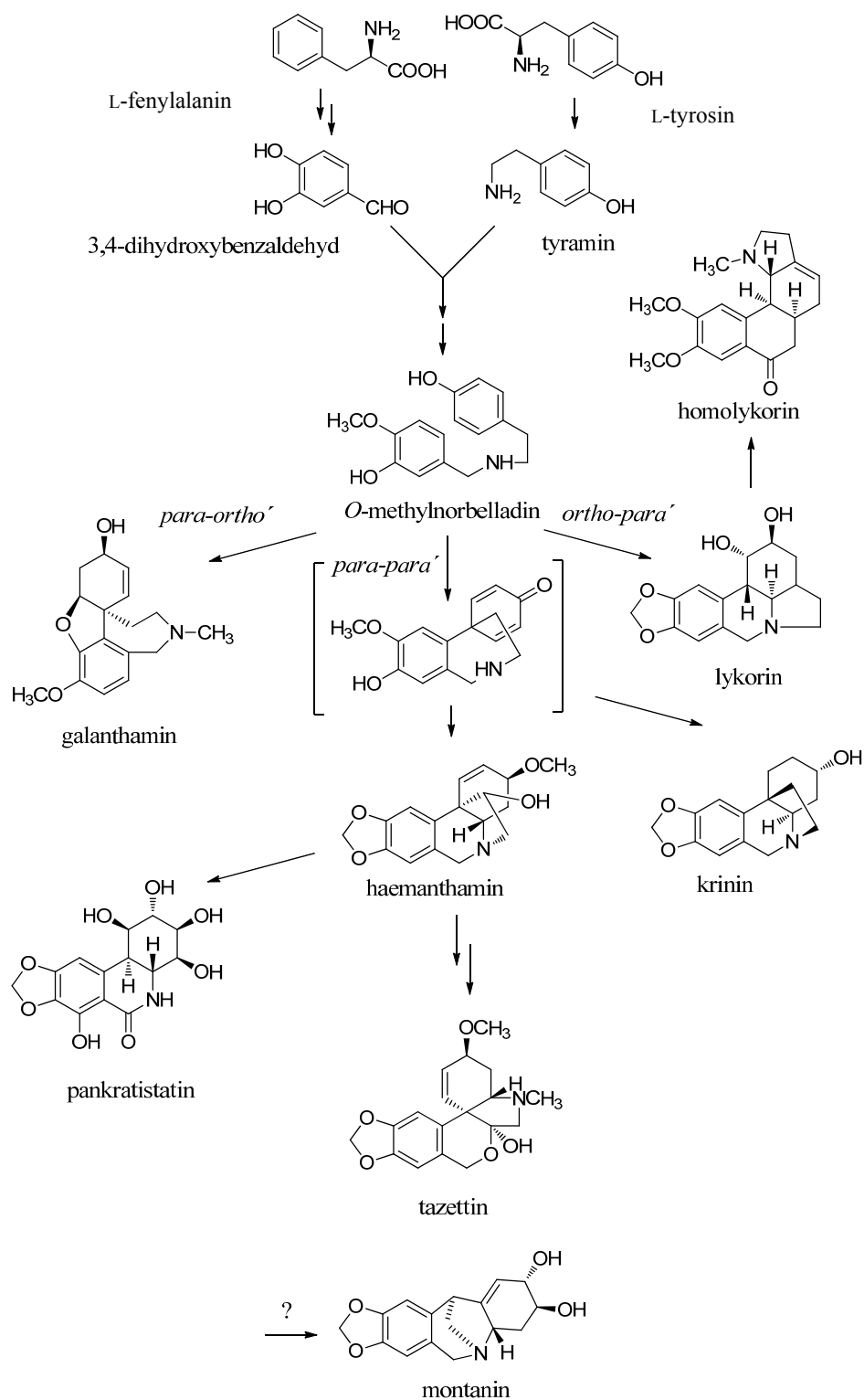
Rostliny čeledi Amaryllidaceae (Amarylkovité) jsou cibulovité krytosemenné rostliny, jejichž výskyt je typický pro tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky a zároveň jsou hojně pěstovány k okrasným účelům. Zástupce v podobě narcisů (*Narcissus*), bledulí (*Leucojum*) a sněženek (*Galanthus*) je možno nalézt i v České republice. Čeleď zahrnuje více než 1000 druhů rostlin klasifikovaných do 65 rodů<sup>1</sup>. V poslední době je této čeledi věnována vědeckou komunitou pozornost díky obsahu biologicky cenných alkaloidů rozmanité chemické struktury a biologického účinku. První dokumentované lékařské využití rostlin z čeledi Amaryllidaceae se datuje do doby působení Hippokrata z Kóu, který již ve 4. století před Kristem použil extrakt z narcisu *Narcissus poeticus*

na bázi olejové emulze k léčbě nádorů v oblasti dělohy<sup>2</sup>. Do dnešní doby bylo izolováno a strukturně popsáno na 500 alkaloidů vyskytujících se jednotlivě, nebo ve skupinách napříč celou čeledí Amaryllidaceae. Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, avšak v nejvyšším množství je najdeme v cibuli. Řada z izolovaných alkaloidů má výrazné účinky na aktivitu fyziologicky významných enzymů, byla rovněž prokázána aktivita antibakteriální a antivirotická. V čeledi najdeme také mnoho zástupců s účinkem cytotoxickým k eukaryotickým buňkám a to nejen k buňkám zdravým, ale především nádorově transformovaným. Kromě rostlin čeledi Amaryllidaceae bylo mnoho biologicky významných alkaloidů nalezeno také u řady druhů čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae. Mezi nevýznamnější patří benzofenanthridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin, které vykazují široké spektrum biologických aktivit, včetně významných proapoptotických a protinádorových účinků<sup>3</sup>.

Specifickou biosyntetickou cestou amarylkovitých alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta, která vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu. L-Tyrosin se mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-hydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vzniká 4'-O-methylnorbelladin. Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká sedm základních skeletů, které jsou pojmenovány dle svého hlavního reprezentanta. Jmenovitě se jedná o lykorinový (lykorin), galantaminový (galantamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), haemanthaminový (haemanthamin) a krinanový (krinin) typ<sup>4,5</sup>. Biosyntetická cesta vedoucí k montaninovému (montanin) strukturnímu typu nebyla doposud spolehlivě vysvětlena<sup>6</sup>. K hlavním typům je také řazen belladinový typ (O-methylbelladin), ze kterého vychází vlastní biosyntéza amarylkovitých alkaloidů (obr. 1, cit.<sup>4,7</sup>). Dle strukturních odlišností se alkaloidy řadí do devíti základních skupin. Na základě této klasifikace má každá skupina svého reprezentanta, kterými jsou: lykorin, krinin, haemanthamin, pankratistatin, galanthamin, tazettin, homolykorin, montanin a norbelladin<sup>4</sup>. Dle těchto základních struktur je pojmenována celá skupina alkaloidů.

### 2. Biologická a protinádorová aktivita alkaloidů Amaryllidaceae

Mezi jeden z nejdůležitějších účinků alkaloidů čeledi Amaryllidaceae patří jejich protinádorová aktivita indukci apoptózy<sup>2,8,9</sup>. Výraznou výhodou je navíc jejich vysoká selektivita pro nádorové buňky a relativně nízká toxicita k zástupcům buněk zdravých nebo buněk klidových<sup>10,11</sup>. Účinek jednotlivých alkaloidů je závislý především na jejich struktuře. Velmi prospěšnou vlastností je



Obr. 1. Biosyntetická cesta hlavních strukturních typů amaryllidových alkaloidů

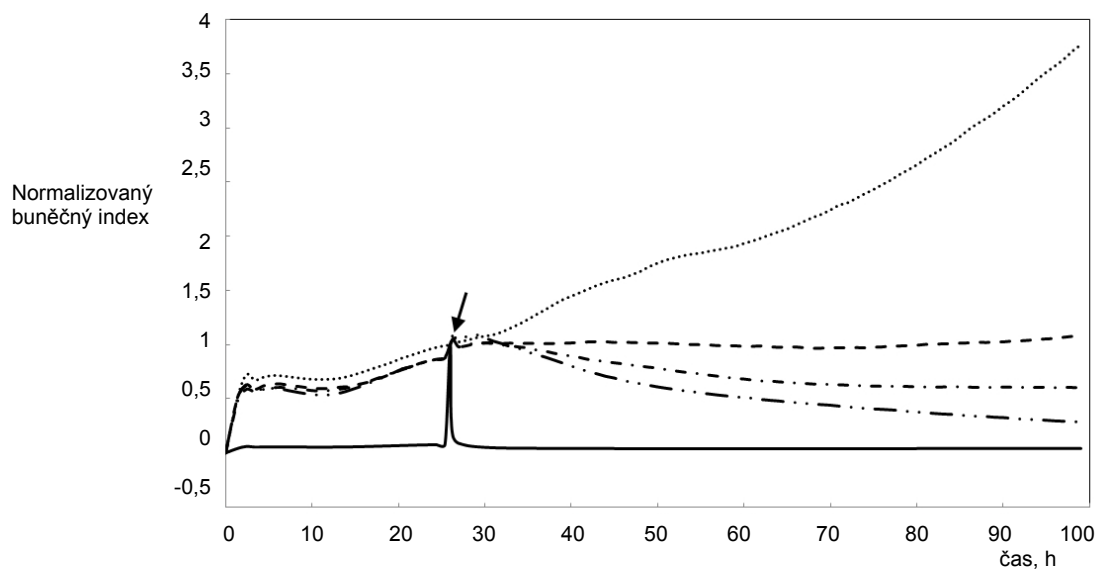
schopnost inhibovat činnost enzymu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy<sup>12–14</sup>. Aplikace inhibitorů cholinesteras je dnes nejužívanější postup v terapii Alzheimerovy choroby (AD). Hledání nových účinnějších inhibitorů je proto v centru pozornosti mnoha výzkumných skupin. Jednou z těchto výzkumných skupin je také pracovní skupina ADINACO, vedená prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Pracovní skupina ADINACO se věnuje hledání potenciálních látek využitelných v terapii AD. Intenzivně jsou studovány zejména alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae<sup>15</sup>. Řada alkaloidů má další medicínsky významné vlastnosti, především zde zmíníme účinky antivirové, antimykotické, antibakteriální a analgetické<sup>16</sup>. V současnosti byla připravena syntetická analoga některých amaryllidových alkaloidů, což umožňuje výrazně rozšířit možnosti studia těchto látek<sup>17</sup>. Tato práce si klade za cíl přehledně shrnout biologicky významné alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae potenciálně využitelné při terapii nádorových onemocnění. Budou diskutovány i další farmaceuticky významné vlastnosti, které mohou vhodně přispět k celkové terapii i k terapii lokálně se vyskytujících zhoubných nádorů.

## 2.1. Lykorinový typ

Prvním izolovaným alkaloidem čeledi Amaryllidaceae byl v roce 1877 lykorin získaný z *Narcissus pseudonarcissus*<sup>4</sup>. Alkaloidy spadající do lykorinového strukturálního typu patří mezi nejznámější a z pohledu cytotoxicity pravděpodobně k nejúčinnějším. Hlavním zástupcem této skupiny je lykorin (obr. 1). Jedná se o pyrrollofenanthridinový cyklický alkaloid, jehož strukturu poprvé detailně popsal Nagakawa a spol. v roce 1956 (cit.<sup>18</sup>).

Lykorin má rozmanité biologické vlastnosti. U rostlin se jeho působení vyznačuje schopností inhibovat syntézu kyseliny askorbové prostřednictvím potlačení aktivity terminálního enzymu galaktodehydrogenasy, který přeměňuje L-galaktono- $\gamma$ -laktón na kyselinu askorbovou<sup>19</sup>. Lykorin je účinný proti celé řadě virů, jako je poliovirus<sup>20</sup>, vaccinia virus pravých neštovic<sup>21</sup> a SARS-asociovaný coronavirus<sup>22</sup>. Navíc vykazuje antimykotickou aktivitu proti *Saccharomyces cerevisiae*<sup>23</sup> a má fatální vliv na životní cyklus parazitického prvoka *Trypanosoma brucei*<sup>24</sup>.

Nejdůležitější vlastností z našeho pohledu je jeho protinádorová aktivita, která byla prokázána *in vivo* u myšního melanomu BL6 a Lewisova plicního karcinomu<sup>25</sup> a také *in vitro* na HeLa buňkách a mnoha dalších typech nádorových buněk jako jsou CEM, K562, MCF-7, G-361 a BJ (cit.<sup>1</sup>). Během studia lykorin vykazoval vysokou cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám rezistentních k apoptóze již v mikromolárních koncentracích<sup>2</sup>. Při testování lykorinu na p53-negativní linii lidských leukemických promyelocytů HL-60 *in vitro* byla pozorována jeho aktivita vyvolávající zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a následná indukce apoptózy doprovázená zvýšenou aktivitou kaspas -3, -8, -9 (cit.<sup>26</sup>). Rozsáhlejší testování lykorinu bylo provedeno na myších s těžkým imunodeficientem SCID, kterým byly po utlumení krvetvorby expozicí ionizujícímu záření implantovány buňky HL-60. Během experimentů byla prokázána inhibice růstu buněk promyelotické leukémie *in vivo* po podávání lykorinu (5 mg/kg/den i. p) s minimem závažných vedlejších účinků na zdravé buňky organismu<sup>25</sup>. Další experimenty prokazující protinádorovou aktivitu lykorinu byly uskutečněny na buňkách lidského mnohočetného myelomu (KM-3), kde expozice lykorinu nao-



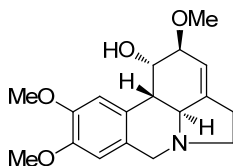
Obr. 2. Analýza buněčné proliferace v reálném čase. Křivky znázorňující proliferaci buněk SK-BR-3 po působení jednotlivých koncentrací lykorinu. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO (*dimethylsulfoxid*) a jako pozitivní kontrola 5% DMSO. Změna proliferace SK-BR-3 buněk je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu zaznamenaného přístrojem xCELLigence. Data křivek znázorňují průměr z triplicátu. Čas přidání jednotlivých koncentrací lykorinu, pozitivní a negativní kontroly je označen šipkou; ....0,1% DMSO, -- 5  $\mu$ M lykorin, - · - 10  $\mu$ M lykorin, - · · · 50  $\mu$ M lykorin, — 5% DMSO

pak vedla k akumulaci buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Zástava buněčného cyklu u buněk KM-3 nevedla k úspěšné reparaci poškození DNA a buňky následně aktivovaly apoptózu<sup>27</sup>. Rovněž v našem experimentu s použitím adherentních buněk adenokarcinomu prsu SK-BR-3 a systému xCELLigence byl pozorován cytotoxický a antiproliferační mechanismus působení lykorinu (obr. 2).

Jaké jsou současné poznatky o apoptotickém působení lykorinu na molekulární úrovni? Lykorin indukuje apoptózu vnitřní mitochondriální cestou, kdy dochází k „down“ regulaci proteinu Mcl-1 u nádorových buněk K562, U937 a HL-60 (cit.<sup>28</sup>). Tento protein patří do rodiny proteinů Bcl-2, které mají rozhodující vliv na regulaci apoptózy. Protein Mcl-1 inhibuje apoptózu interakcí s proapoptickými proteiny Bim, Bak a Bid. Nadměrnou expresi proteinu Mcl-1 můžeme pozorovat u myeloidních progenitorových buněk. Zvýšenou expresí Mcl-1 je zde zajištěna odolnost nádorových buněk vůči apoptóze vyvolané běžnými chemoterapeutiky, tudíž lze předpokládat dobrou odpověď tohoto typu buněk k působení lykorinu<sup>29</sup>. Při studiu působení lykorinu v různých koncentracích na buněčnou linii HL-60 došlo k dávkově závislému zvýšení exprese inhibitoru cyklin-dependentní kinasy p21a TNF- $\alpha$ . Zároveň došlo k „down“ regulaci molekulárních cílů p21 regulujících buněčný cyklus, komplexu proteinu Cdk1 a Cyclinu B, Cdk2 a Cyclinu E. Buněčná smrt následně vyvolána lykorinem vedla k masivnímu uvolnění cytochromu c, čímž nelze vyloučit programovanou buněčnou smrt mitochondriální cestou<sup>30</sup>.

Do skupiny alkaloidů lykorinového typu spadají i další látky podobné struktury. Z biologicky nejzajímavějších uvedme karanin, pseudolykorin, anhydrolykorin, 1,2-epoxylykorin, 1-*O*-acetyllykorin, lykorin-2-on, amarbellisin a galanthin (obr. 3).

Všechny výše uvedené vykazují protinádorovou aktivitu, avšak podle pilotních experimentů je nejúčinnější amarbellisin a pseudolykorin s hodnotou IC<sub>50</sub> méně než 10  $\mu$ M během 72 hodin dlouhého působení na nádorové buněčné linie<sup>2</sup>. Pseudolykorin inhibuje proteosyntézu ve stadiu formace peptidové vazby a jeho cytotoxický účinek je zprostředkován apoptózou. Apoptóza linie leukemických buněk Jurkat byla potvrzena i působením kongenerů 1-*O*-acetyllykorinu, lykorin-2-onu (cit.<sup>8</sup>). Amarbellisin zatím podrobněji prozkoumán není. Naopak více prozkoumaný alkaloid ze skupiny lykorinu ungeremin působí cytotoxicky vazbou na lidskou topoisomerasu I, II $\alpha$  (cit.<sup>31</sup>). Zajímavostí však je, že z pohledu cytotoxické aktivity na nádorové linie se nevyrovná protějškům lykorinu,



Obr. 3. Strukturální vzorec galanthinu

pseudolykorinu a amarbellisinu<sup>2</sup>. V našem experimentu byl pozorován pokles viability buněk SK-BR-3 po delším časovém působení galanthinu ve vyšších koncentracích (obr. 4).

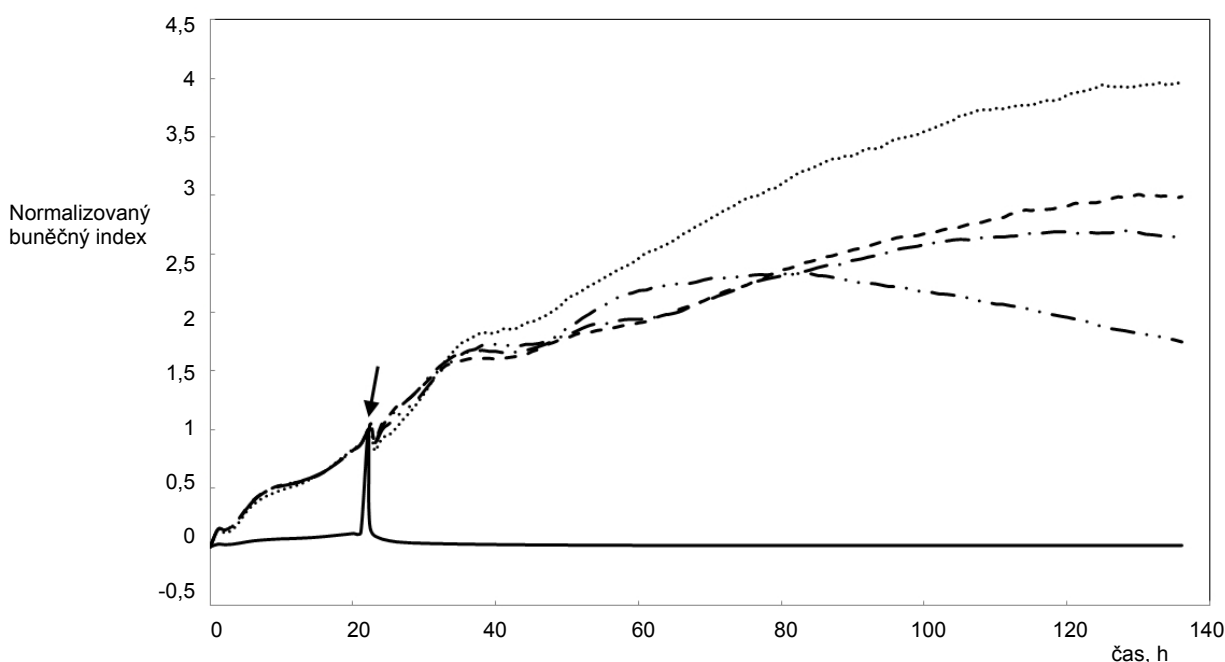
## 2.2. Homolykorinový typ

Do této strukturální skupiny se řadí celá řada alkaloidů, ale jen některé mají výraznou biologickou aktivitu. Tyto alkaloidy jsou odvozeny od 2-benzopyrano-[3,4-g]indolu. Homolykorin, 8-*O*-dimethylhomolykorin, lykorenin a hippeastrin bohužel vykazují cytotoxický efekt i k nenádorovým primárním buňkám myších fibroblastů LMTK. Na druhou stranu inhibují růst některých nádorových buněk, lidského jaterního karcinomu HepG2 a leukemických buněk MOLT-4 (cit.<sup>32</sup>). K dalším biologickým účinkům patří aktivita hippeastrinu proti *Herpes simplex*<sup>33</sup> a jeho antimykotický účinek zejména vůči *Candida albicans*<sup>4</sup>.

## 2.3. Haemanthaminový a krinanový typ

Do této skupiny se řadí haemanthamin, haemathidin, krinamin, maritidin a papyramin. Všechny zmíněné alkaloidy mají rozdílnou schopnost inhibovat růst různých typů nádorových buněk<sup>1,2,32,34–36</sup>. Zmíněné látky jsou odvozené od ethanofenanthridinu<sup>37</sup>.

Mezi vůbec nejúčinnější alkaloidy této skupiny patří haemanthamin (obr. 1), haemathidin a krinamin, které působí cytotoxicky na nádorové buňky<sup>2,9</sup>. Ze studie osmi přírodních a dvou syntetických alkaloidů krinanového typu vyplývá schopnost pouze krinaminu a haemanthaminu selektivně iniciovat apoptózu u nádorových buněk potkaního hepatocelulární karcinomu 5123tc a zároveň nepůsobit cytotoxicky vůči linii lidských embryonálních buněk ledvin HEK 293T ve stejných koncentracích. Na základě této studie byla stanovena účinná dávka k indukci apoptózy u 50 % nádorových buněk na 12,5  $\mu$ M pro krinamin a 15  $\mu$ M pro haemanthamin<sup>9</sup>. Mechanismus apoptotického účinku u těchto alkaloidů byl dosud prostudován jen minimálně. Haemanthamin pravděpodobně inhibuje proteosyntézu tím, že blokuje vznik peptidové vazby v kroku, kdy se peptidyltransferasa váže na 60S podjednotku ribosomu<sup>38</sup>. Později byla prokázána inhibice růstu buněk myšího lymfomu L5178 prostřednictvím tvorby komplexu haemanthaminu s RNA (cit.<sup>36</sup>). V nedávné době byla prokázána indukce apoptózy u p53-negativní T-lymfoblastové leukémie Jurkat. Expozice haemanthaminu po dobu 24 hodin vyvolala pozdní apoptózu (buňky Annexin V a propidium jodid dvojité pozitivní) u 4  $\pm$  1 % po působení v koncentraci 1  $\mu$ M, resp. 22  $\pm$  1 % po působení v koncentraci 25  $\mu$ M (cit.<sup>7</sup>). Bližší informace o molekulární podstatě účinku haemanthaminu nejsou dosud známy. Nově studovaný, avšak méně známý krinanový alkaloid, distichamin se ukázal jako toxický k nádorovým buňkám MCF-7, HeLa, G-361, K562, BJ a CEM. U lidských buněk akutní T-lymfoblastické leukémie CEM dávkově závisle indukoval zvýšenou aktivitu kaspasy -3 a -7. V dávkovém rozmezí 1–20  $\mu$ M vždy v závislosti na apli-



Obr. 4. **Analýza buněčné proliferace v reálném čase.** Křivky znázorňující proliferaci buněk SK-BR-3 po působení jednotlivých koncentrací galanthinu. Jako negativní kontrola bylo použito 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola 5% DMSO. Změna proliferace SK-BR-3 buněk je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu zaznamenaného přístrojem xCELLigence. Data křivek znázorňují průměr z triplikátu. Čas přidání jednotlivých koncentrací galanthinu, pozitivní a negativní kontroly je označen šipkou; ..... 0,1% DMSO, --- 10  $\mu\text{M}$  galanthin, - · - 50  $\mu\text{M}$  galanthin, - - - 200  $\mu\text{M}$  galanthin, — 5% DMSO

kované dávce vedl k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu a indukoval expresi proteinu p53 (cit.<sup>1</sup>). Haemanthamin a haemathidin jsou zajímavé alkaloidy i z pohledu biologických účinků. Hydroxyderivát haemanthaminu haemathidin má antiparazitické, protizánětlivé a analgetické účinky s aktivitou vyšší než kyselina acetylsalicylová<sup>39–42</sup>.

#### 2.4. Tazettinový typ

V této strukturální skupině se nacházejí deriváty odvozené od 2-benzopyrano-[3,4-c]indolu. Tazettin (obr. 1) vykazuje jen mírnou cytotoxickou aktivitu proti primárním buňkám fibroblastické linie LMTK a bohužel taky velice slabou aktivitu na leukemické buňky Rauscher<sup>43</sup>. Tyto výsledky jsou ve shodě s našimi daty analýzy cytotoxicity pomocí měření hodnoty elektrické impedance u buněk SK-BR-3 přístrojem xCELLigence (obr. 5).

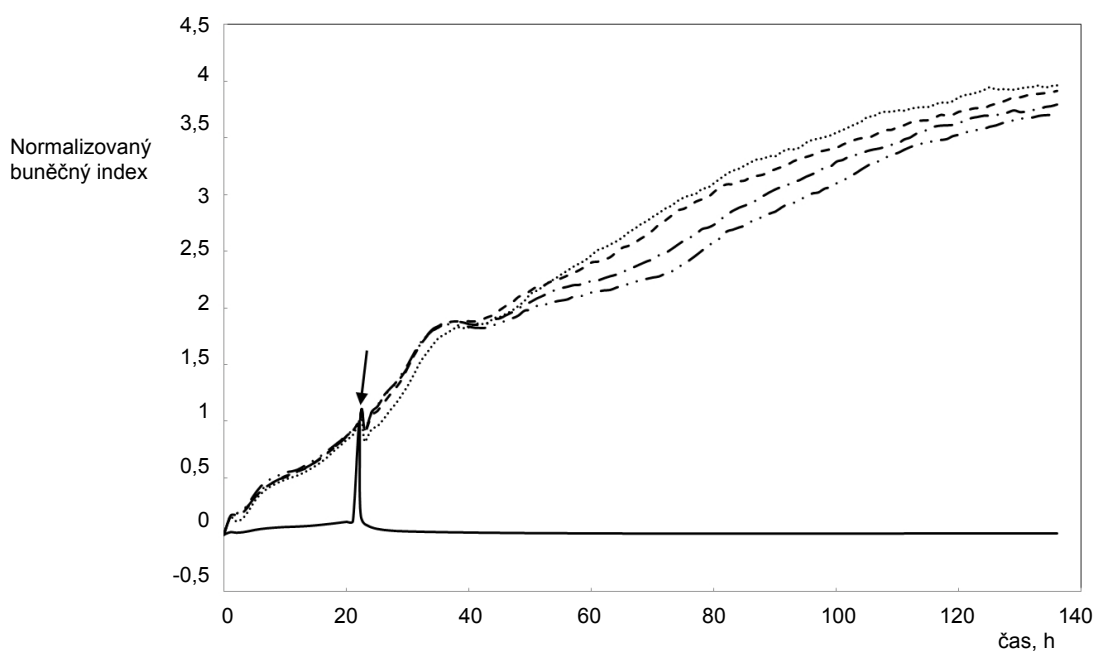
Naopak mnohem účinnější než tazettin je jeho biosyntetický prekurzor pretazettin. Tato látka patří mezi nejaktivnější alkaloidy účinné proti T-lymfoidním buňkám MOLT-4. Během *in vitro* experimentů vykazoval vysokou aktivitu na buňky Rauscher leukemie, Lewisova karcinomu a spontánní AKR lymfocytární leukemie<sup>34</sup>. Byla prokázána inhibice růstu HeLa buněk po expozici pretazettinem<sup>37</sup>. Pretazettin inhibuje aktivitu P-glykoproteinu, produktu MDR1 genu a dále zvyšuje aktivitu doxorubicinu u rezistentních forem myších leukemií<sup>44</sup>. Pretazettin inhi-

buje vazbou enzymu aktivitu RNA-dependentní DNA polymerasy u rozdílných typů onkogenních virů a je účinný proti *Herpes simplex* a flavivirům<sup>4,45</sup>. Časné práce rovněž popisují inhibici proteosyntézy eukaryotických buněk potlačením tvorby peptidové vazby<sup>46</sup>.

#### 2.5. Pankratistatinový typ

Alkaloidy této skupiny jsou deriváty odvozené od molekuly fenanthridinu. Nejslibnější látky z pohledu cytotoxické aktivity jsou narciklasin (obr. 6) a pankratistatin (obr. 1).

Narciklasin je alkaloid, který byl poprvé získán v roce 1967 z cibulí zástupců rodu *Narcissus*. Účinek narciklasinu byl původně popsán jako antimitotický s efektem na buňky eukaryotních organismů srovnatelným s působením kolchicinu<sup>47</sup>. Dalším studiem působení narciklasinu bylo zjištěno, že se váže na ribozomální podjednotku 60S, kde inhibuje peptidyltransferasu, čímž brání vzniku peptidové vazby v nově vznikajícím proteinu<sup>37</sup>. Analogicky jako některá běžně používaná cytostatika, narciklasin pravděpodobně interaguje nebo tvoří komplexy s molekulou DNA živočišných buněk<sup>48</sup>. Studie z nedávné doby pak prokázala indukci apoptózy u buněk lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a buněk karcinomu prostaty PC-3 zprostředkovanou receptory smrti (death receptor 4 – DR4), která zároveň byla doprovázena aktivací kaspas -8 a -9. Zajímavostí bylo, že narciklasin byl více než 250krát účinnější

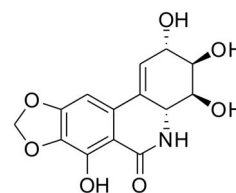


Obr. 5. Analýza buněčné proliferace v reálném čase. Křivky znázorňující proliferaci buněk SK-BR-3 po působení jednotlivých koncentrací tazettinu. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO a jako pozitivní kontrola 5% DMSO. Změna proliferace SK-BR-3 buněk je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu zaznamenaného přístrojem xCELLigence. Data křivek znázorňují průměr z triplikátu. Čas přidání jednotlivých koncentrací tazettinu, pozitivní a negativní kontroly je označen šipkou; .....0,1% DMSO, --- 1  $\mu\text{M}$  tazettin, - · - 10  $\mu\text{M}$  tazettin, - · · 50  $\mu\text{M}$  tazettin, — 5% DMSO

k nádorovým buňkám, než k primárním buňkám lidských fibroblastů Ccd-25-Lu (cit.<sup>11</sup>). Z dalších biologicky významných účinků zmiňme baktericidní aktivitu proti *Corynebacterium fascians*, antifungální aktivitu proti *Candida albicans* a antivirovou aktivitu proti RNA virům hemoragické horečky reprezentovaných flaviviry a bunjaviry<sup>49</sup>.

Pankratistatin byl poprvé izolován z cibule havajské lilie *Hymenocallis littoralis*. První poznatky o jeho cytotoxické aktivitě byly dokumentovány v roce 1993 Pettitem a spol., kteří provedli základní typizaci cytotoxické aktivity pomocí doporučení NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA). Testy byly provedeny na panelu 60 buněčných linií, které zahrnovaly nádorově transformované zástupce buněk derivovaných z tkání plic, střeva, ovarii, ledvin, mozku, melanomu a buněk akutní myeloidní leukémie. Během experimentů bylo prokázáno, že pankratistatin inhibuje růst HeLa buněk, má vysoce cytotoxický vliv proti zástupcům leukemických buněk a je rovněž účinný proti celé řadě dalších typů nádorů. Nadějným výsledkem byla dobrá aktivita proti buněčnému modelu melanomu, který se často vyznačuje rezistencí vůči proapoptickým stimulům<sup>50</sup>. V posledních letech se ukazuje vysoká selektivita působení pankratistatinu. Expozice pankratistatinu v koncentraci 1  $\mu\text{M}$  vedla o 48 hodin později k masivní apoptóze leukemických buněk pacientů nezávisle na typu zkoumané hematologické malignity. Zároveň ve stejném experimentálním uspořádání pankratistatin nevykazoval cytotoxický efekt na mononukleární buňky periferní krve zdravých dárců<sup>10</sup>. Tento efekt se znovu potvrdil

o rok později *in vitro* a *in vivo* studiem pankratistatinu na dvou typech nádorových buněk kolorektálního karcinomu, p53 – mutovaných HT-29 a p53 – wild-type HCT116 ve srovnání se zdravými fibroblasty střeva CCD-18Co. Pankratistatin zde působil cytotoxicky indukci apoptózy selektivně jen vůči nádorovým buňkám. Apoptóza u nádorových buněk byla způsobena poklesem mitochondriálního membránového potenciálu bez detegovatelné tvorby dvouvláknových zlomů DNA. Podkožně lokalizované nádory buněk HT-29 u Nu/Nu myši reagovaly na podávání pankratistatinu v dávce 3  $\text{mg kg}^{-1}$  signifikantním zmenšením bez současného zaznamenání toxického efektu na játra a ledviny experimentálních objektů<sup>51</sup>. Paralelně byl potvrzen cytotoxický efekt pankratistatinu na dvou experimentálních zástupcích karcinomu prostaty, buněčné linii LNCaP a DU145 s nevýznamným efektem na zdravé lidské fibroblasty HDF. Působení pankratistatinu bylo zprostředkováno apoptózou a buněčnou autofagií doprovázenou kolapsem mitochondriálního membránového potenciálu buněk. Experimenty byly provedeny v analogickém



Obr. 6. Strukturální vzorec narckiklasinu

experimentálním uspořádání *in vivo* s výbornou odpovědí u myši s xenografty rakoviny prostaty<sup>52</sup>.

Skupina alkaloidů z rostlin čeledi Amaryllidaceae narciklasinového typu dále zahrnuje v rostlinách minoritně zastoupené látky příbuzné narciklasinu a pankratistatinu. Za všechny zde uvedeme narciklasin-tetraacetát, *cis*-dihydronarciklasin, *trans*-dihydronarciklasin a C10b-*R*-hydroxypankratistatin. Uvedené látky jsou ve svých přírodních zdrojích zastoupeny jen v malém procentuálním podílu, což dále komplikuje jejich izolaci a následné biologické testování. V nedávno publikované práci Evidente a spol.<sup>8</sup> prokázal cytotoxický efekt zprostředkovaný apoptózou u leukemických buněk Jurkat po působení zmiňovaných alkaloidů. Do této skupiny se ještě řadí alkaloid trisferidin, který má antiretrovirovou aktivitu a ismin, který působí cytotoxicky na buňky MOLT-4 T-lymfoblastické leukemické linie a buňky LMTK4 fibroblastové linie<sup>32</sup>.

## 2.6. Galanthaminový typ

Alkaloidy spadající do této skupiny mají jako strukturní základ dibenzofuran. Nejdůležitějším zástupcem této skupiny z pohledu medicínského významu je galanthamin (obr. 1). Od předešlých alkaloidů se liší zejména svým biologickým účinkem. Galanthamin byl poprvé izolován z cibule sněženky *Galanthus woronowii* a později i z jiných rostlin této čeledi. Fyziologicky významná aktivita tohoto alkaloidu byla náhodně objevena bulharskými farmakology na počátku 50. let minulého století<sup>53</sup>. Od té doby byl galanthamin experimentálně využíván k terapii neurologických poruch jako myasthenia gravis, dětská obrna, různé typy demence nebo paralytické poliomyelitidy. Jeho nejvyužívanější schopností je reverzibilní kompetitivní inhibice acetylcholinesterasy, čehož se využívá zejména v terapii AD (cit.<sup>54</sup>). Bylo prokázáno, že terapie této neurodegenerativní choroby galanthaminem vede k zlepšení kognitivních, funkčních i behaviorálních symptomů. Výhodou galanthaminu je to, že vykazuje až 53× větší selektivitu k AChE než k butyrylcholinesterase<sup>53</sup>. Alkaloid galanthamin je látka absolutně bez známek cytotoxického působení. Dnes patří mezi klinicky využívané léčivo k terapii AD ve formě hydrobromidu a je dostupný nejčastěji pod komerčními produkty Nivalin, Razadyne a Reminyl. Další alkaloidy čeledi Amaryllidaceae s potenciálním terapeutickým využitím v léčbě AD přehledně shrnuje práce jednoho ze spoluautorů<sup>13</sup>.

## 3. Závěr

Rostliny čeledi Amaryllidaceae obsahují celou řadu alkaloidů, které se dají potenciálně využít k terapii různých typů závažných onemocnění. Většina biologicky významných látek je stále ve stádiu preklinického vývoje, což platí také pro nejprozkoumanější ze sloučenin s potenciálem pro terapii nádorových onemocnění, lykoricinu a pankratistatinu. Důležitou vlastností zde popsaných alkaloidů je zejména jejich širší biologická aktivita zahrnující jak účinky antivirotické, antibakteriální, antifungál-

ní, protizánětlivé, analgetické, tak výrazné účinky cytotoxické zprostředkované indukcí apoptózy. Jejich výhodou je opakovaně potvrzená selektivita působení proti nádorovým buňkám s minimem negativních účinků na zdravé buňky organismu. Naopak limitujícím faktorem pro rozsáhlejší studium alkaloidů s protinádorovým účinkem a jejich použití je náročná izolace z přírodních zdrojů, proto se současný výzkum zaměřuje na přípravu syntetických analogů s terapeuticky podobnými, nebo lepšími vlastnostmi. Ačkoliv se jedná o širokou skupinu strukturně a biologicky různorodých látek, jistě si zaslouží hlubší studium a práci výzkumníků.

*Tato práce byla podpořena prostředky z grantu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky ROUTER CZ.1.07/2.3.00/30.0058 a studentského projektu SGFChT07/2013.*

## LITERATURA

- Chase M. W., Reveal J. L., Fay M. F.: *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 132 (2009).
- Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: *J. Nat. Prod.* 73, 1223 (2010).
- Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 30 (2006).
- Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni N. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: *Recent Adv. Pharm. Sci.* 2, 65 (2011).
- El Tahchy A., Boisbrun M., Ptak A., Dupire F., Chrétien F., Henry M., Chapleur Y., Laurain-Mattar D.: *Acta Biochim. Pol.* 57, 75 (2010).
- Cedron J. C., Del Arco-Aguilar M., Estévez-Braun A., Ravelo A. G.: *Alkaloids Chem. Biol.* 68, 1 (2012).
- Jin Z.: *Nat. Prod. Rep.* 26, 363 (2009).
- Evidente A., Kireev A. S., Jenkins A. R., Romero A. E., Steelant W. F., Van Slambrouck S., Kornienko A.: *Planta Med.* 75, 501 (2009).
- McNulty J., Nair J. J., Codina C., Bastida J., Pandey S., Gerasimoff J., Griffin C.: *Phytochemistry* 68, 1068 (2007).
- Griffin C., Hamm C., McNulty J., Pandey S.: *Cancer Cell Int.* 10, 1 (2010).
- Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., Ribaucour F., Thomas S., Roland I., Darro F., Lefranc F., Kiss R.: *Neoplasia* 9, 766 (2007).
- Cahlíková L., Kulhánková A., Urbanová K., Valterová I., Macáková K., Kuneš J.: *Nat. Prod. Commun.* 5, 1201 (2010).
- Cahlíková L., Benešová N., Macáková K., Kučera R., Hrstka V., Klimeš J., Jahodář L., Opletal L.: *Nat. Prod. Commun.* 7, 571 (2012).
- Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: *Chem. Biodiversity* 10, 1120 (2013).

15. Kulhánková A., Cahlíková L., Macáková K., Opletal L.: *Chem. Listy* 105, 405 (2011).
16. Jin Z.: *Nat. Prod. Rep.* 28, 1126 (2011).
17. Hudlicky T., Rinner U., Gonzalez D., Akgun H., Schilling S., Siengalewicz P., Martinot T. A., Pettit G. R.: *J. Org. Chem.* 67, 8726 (2002).
18. Nakagawa Y., Uyeo S., Yayima H.: *Chem. Ind.* 1956, 1238.
19. Arrigoni O., Arrigoni-Liso R., Calabrese G.: *Nature* 256, 513 (1975).
20. Hwang Y. C., Chu J. J., Yang P. L., Chen W., Yates M. V.: *Antiviral Res.* 77, 232 (2008).
21. Deng L., Dai P., Ciro A., Smee D. F., Djaballah H., Shuman S.: *J. Virol.* 81, 13392 (2007).
22. Li Y., Liu J., Tang L. J., Shi Y. W., Ren W., Hu W. X.: *Oncol. Rep.* 17, 377 (2007).
23. Del Giudice L., Massardo D. R., Pontieri P., Wolf K.: *Gene* 354, 9 (2005).
24. Mackey Z. B., Baca A. M., Mallari J. P., Apsel B., Shelat A., Hansell E. J., Chiang P. K., Wolff B., Guy K. R., Williams J., McKerrow J. H.: *Chem. Biol. Drug Des.* 67, 355 (2006).
25. Thi Ngoc Tram N., Titorenkova T. V., St Bankova V., Handjieva N. V., Popov S. S.: *Fitoterapia* 73, 183 (2002).
26. Liu J., Hu W. X., He L. F., Ye M., Li Y.: *FEBS Lett.* 17, 245 (2004).
27. Liu J., Li Y., Tang L. J., Zhang G. P., Hu W. X.: *Bio-med. Pharmacother.* 61, 229 (2007).
28. Liu X. S., Jiang J., Jiao X. Y., Wu Y. E., Lin J. H., Cai Y. M.: *Cancer Lett.* 274, 16 (2009).
29. Perciavalle R. M., Stewart D. P., Koss B., Lynch J., Milasta S., Bathina M., Temirov J., Cleland M. M., Pelletier S., Schuetz J. D., Youle R. J., Green D. R., Opferman J. T.: *Nat. Cell Biol.* 29, 575 (2012).
30. Liu J., Hu J. L., Shi B. W., He Y., Hu W. X.: *Cancer Cell Int.* 10, 1 (2010).
31. Casu L., Cottiglia F., Leonti M., De Logu A., Agus E., Tse-Dinh Y. C., Lombardo V., Sissi C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 7041 (2011).
32. Weniger B., Italiano L., Beck J. P., Bastida J., Ber-goñon S., Codina C., Lobstein A., Anton R.: *Planta Med.* 61, 77 (1995).
33. Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y., Kihara M., Kobayashi S.: *Res. Virol.* 140, 115 (1989).
34. Furusawa E., Irie H., Combs D., Wildman W. C.: *Chemotherapy* 26, 36 (1980).
35. Antoun M. D., Mendoza N. T., Ríos Y. R., Proctor G. R., Wickramaratne D. B., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D.: *J. Nat. Prod.* 56, 1423 (1993).
36. Hohmann J., Forgo P., Molnár J., Wolfard K., Molnár A., Thalhammer T., Máthé I., Sharples D.: *Planta Med.* 68, 454 (2002).
37. Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D.: *Biochim. Biophys. Acta* 425, 342 (1976).
38. Baez A., Vazquez D.: *Biochim. Biophys. Acta* 518, 95 (1978).
39. Çitoğlu G., Tanker M., Gümüsel B.: *Phytother. Res.* 12, 205 (1998).
40. Tanker M., Çitoglu G., Gümüsel B., Hener B.: *Int. J. Pharmacogn.* 34, 194 (1996).
41. Herrera M. R., Machocho A. K., Brun R., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: *Planta Med.* 67, 191 (2001).
42. Sener B., Orhan I., Satayavivad J.: *Phytother. Res.* 17, 1220 (2003).
43. Furusawa E., Furusawa S., Lee J. Y., Patanavanich S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152, 186 (1976).
44. Zupkó I., Réthy B., Hohmann J., Molnár J., Ocsovszki I., Falkay G.: *In Vivo* 23, 41 (2009).
45. Ghosal S., Saini K. S., Razdan S.: *Phytochem.* 24, 2141 (1985).
46. Cordell G. A.: *Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach*. Wiley, New York 1981.
47. Ceriotti G.: *Nature* 213, 595 (1967).
48. Dall'acqua F., Rodighiero C.: *Farmacol. Sci.* 32, 67 (1977).
49. Kornienko A., Evidente A.: *Chem. Rev.* 108, 1982 (2008).
50. Pettit G. R., Pettit G. R. 3rd, Backhaus R. A., Boyd M. R., Meerow A. W.: *J. Nat. Prod.* 56, 1682 (1993).
51. Griffin C., Karnik A., McNulty J., Pandey S.: *Mol. Cancer Ther.* 10, 57 (2011).
52. Griffin C., McNulty J., Pandey S.: *Int. J. Oncol.* 38, 1549 (2011).
53. Greenblatt H. M., Kryger G., Lewis T., Silman I., Sussman J. L.: *FEBS Lett.* 463, 321 (1999).
54. Maelicke A., Samochocki M., Jostock R., Fehrenbacher A., Ludwig J., Albuquerque E. X., Zerlin M.: *Biol. Psychiatry* 49, 279 (2001).

**M. Dalecká<sup>a</sup>, R. Havelek<sup>a</sup>, K. Královec<sup>a</sup>, L. Brůčková<sup>a</sup>, and L. Cahlíková<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biological and Biochemical Sciences, University of Pardubice, Pardubice*, <sup>b</sup>*Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Charles University, Hradec Králové*): **Amaryllidaceae Family Alkaloids as Potential Drugs for Cancer Treatment**

This article summarizes basic information about the Amaryllidaceae alkaloids with cytotoxic and apoptosis-inducing potential in diverse cancer cell lines and tumour xenografts. The review focuses on molecular mechanisms leading to cell death mediated by Amaryllidaceae alkaloids. Since some of them possess high cytotoxic efficiency in cancer cell lines study of Amaryllidaceae alkaloids could generate chemical structures for potential drugs. The biological activities that could be useful especially in topical cancer treatment are indicated. We have tested cytotoxic and antiproliferative activities of lycorine, galanthine and tazetidine in breast adenocarcinoma cells SK-BR-3 using label-free and real-time monitoring of the xCELLigence cell viability system.