

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



PROTINÁDOROVÁ AKTIVITA
SESKVITERPENŮ

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Kristýna Válková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2015

.....

Poděkování

Děkuji Doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za vedení a spolupráci při vypracování mé bakalářské práce.

OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	5
2 IZOPRENOIDY	6
2.1 Terpenoidy	6
3 ZERUMBON	8
3.1 Protinádorové účinky zerumbonu <i>in vitro</i>	8
3.2 Protinádorové účinky zerumbonu <i>in vivo</i>	16
4 FARNESOL	19
4.1 Inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy farnesolem <i>in vitro</i>	19
4.2 Inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy farnesolem <i>in vivo</i>	21
4.3 Příklady mechanismů apoptózy vyvolané farnesolem	24
4.3.1 Účinek farnesolu na HMG-CoA-reduktázu	24
4.3.2 Inhibice CDP-cholinové dráhy	25
4.3.3 Stres endoplazmatického retikula a inhibice NF- κ B signální dráhy	26
4.3.4 Farnesoidní X receptor	27
4.3.5 Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS)	27
5 ZÁVĚR	29
6 SEZNAM ZKRATEK	30
7 SEZNAM LITERATURY	31

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

V dnešní době je rakovina jedním z hlavních celosvětových problémů veřejného zdravotnictví. Její dvě hlavní charakteristiky jsou nekontrolovatelný růst buněk a jejich metastazování. Incidence rakoviny v ČR se pohybuje kolem 6 850 případů jak u mužů, tak u žen. Nejčastějším typem rakoviny u mužů je rakovina prostaty, u žen je to rakovina prsu. Avšak muži nejčastěji umírají na rakovinu plic. Mortalita způsobená rakovinou je u mužů 15 400 úmrtí za rok, u žen je to 12 200 úmrtí (WHO 2014).

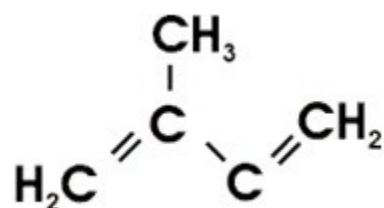
Přírodní produkty představují bohatý zdroj látek, které našly uplatnění v různých oblastech terapie onemocnění, včetně léčby rakoviny. Proto dnes vědci usilovně hledají nové sloučeniny rostlinného původu s protinádorovým účinkem. Účinné látky, které jsou obsažené v extraktech léčivých rostlin, patří mezi sekundární metabolity rostlin. Příkladem takových sloučenin jsou terpeny s izoprenoidní strukturou. Mnoho terpenů má biologickou aktivitu a jsou používány pro léčbu celé řady onemocnění. Podle počtu izoprenoidních jednotek se dělí do několika skupin: monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny atd. (Kuttan et al. 2013).

Skupina prof. Skálové se na katedře biochemických věd v posledních letech věnuje i výzkumu biologické aktivity seskviterpenů izolovaných ze silice stromu *Myrica rubra*. Tato silice vykazala významnou antiproliferační aktivitu v několika střevních nádorových liniích (Langhansová et al. 2014). Rovněž její hlavní obsahové látky (např. karyofylenoxid, trans-nerolidol, valencen) působí cytotoxicky na buňky nádorových linií a netoxicky na nenádorové buňky (např. hepatocyty, fibroblasty). V kombinaci s chemoterapeutikem doxorubicinem zvýšila silice z *Myrica rubra* i některé izolované seskviterpeny jeho antiproliferační a prooxidační aktivitu v nádorových buněčných liniích. Cílem mé práce bylo popsat protinádorové účinky vybraných seskviterpenů zerumbonu a farnesolu.

2 IZOPRENOIDY

Izoprenoidy jsou organické sloučeniny, které zastávají velmi rozmanité role ve fyziologických procesech rostlin a živočichů. Vyskytují se zde jako vitamíny a prekurzory pohlavních hormonů. Mají také řadu komerčních využití (např. příchutě, rozpouštědla, suroviny pro chemické látky) (Eastman a Kluger 2015).

Pětiuhlíkatá jednotka, která se nazývá izopren (Obr. 1), představuje základní stavební kámen izoprenoidů. Izopren (2-methyl-1,3-butadien) je rozvětvený nenasycený uhlovodík, což znamená, že obsahuje jednu nebo více dvojných vazeb mezi atomy uhlíku. Izopren má ve své molekule dvě dvojně vazby. Izoprenoidy jsou tvořeny dvěma a více izoprenovými jednotkami. Na kostru izoprenoidu mohou být připojeny různé funkční skupiny (např. hydroxylové $-OH$, karbonylové $-CHO$). Ty přispívají k rozmanitosti izoprenoidů (Eastman a Kluger 2015).

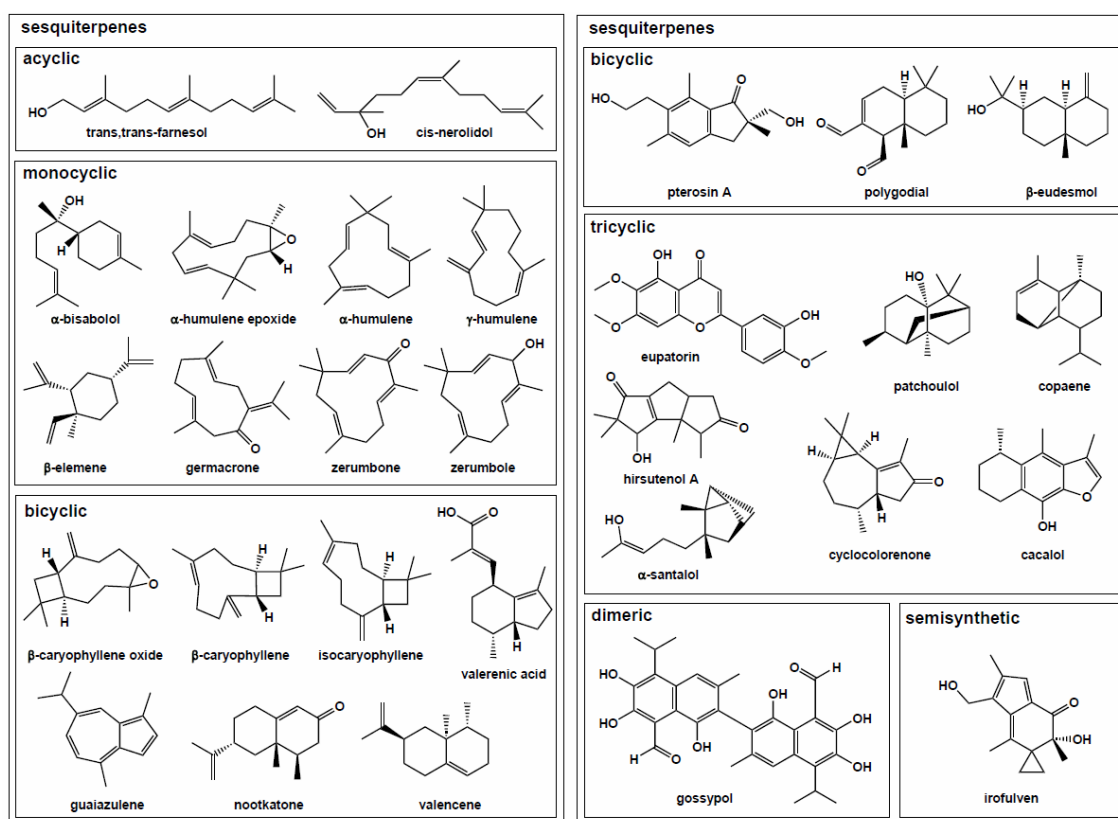


Obr. 1 Struktura izoprenu

2.1 Terpenoidy

Název terpen výslovně odkazuje na přirozeně se vyskytující sloučeniny, které jsou deriváty jedné izoprenové jednotky. Často však bývají s izoprenoidy zaměňovány. Slovo terpen je odvozeno od terpentýnu, který je tvořen směsí izoprenoidů (původně pryskyřice). Nejmenší terpenové molekuly obsahují 10 atomů uhlíku a nazývají se monoterpeny ($C_{10}H_{16}$). Větší molekuly prodloužené o jednu jednotku izoprenu se nazývají seskviterpeny ($C_{15}H_{24}$). Následují diterpeny ($C_{20}H_{32}$), triterpeny ($C_{30}H_{48}$), tetraterpeny ($C_{40}H_{64}$) atd. (Eastman a Kluger 2015).

Monoterpeny a seskviterpeny tvoří hlavní složku rostlinných silic. Terpeny s vyšší molekulovou hmotností jsou méně těkavé a mají tedy vyšší teplotu varu. Jsou izolovány z přírodních zdrojů destilací s vodní párou nebo extrakcí (Eastman a Kluger 2015). Seskviterpeny se vyskytují ve formě acyklických, mono-, bi-, tri- a tetracyklických systémů (Obr. 2). Zástupci acyklických seskviterpenů, rovněž nazývaných farnesany, jsou odvozeny přímo od základní struktury – farnesolu. Cyklické struktury odvozené od farnesylpyrofosfátu vznikají působením různých specifických cykláz. Zatím bylo identifikováno jen několik z nich, ale předpokládá se, že se jich v přírodě vyskytuje velké množství vzhledem k existenci 80 základních strukturálních typů cyklických seskviterpenů. Další strukturální změny, oxidace, degradace a dimerizace umožňují vznik tisíců strukturálně odlišných seskviterpenů a jejich derivátů (Bártíková et al. 2014).

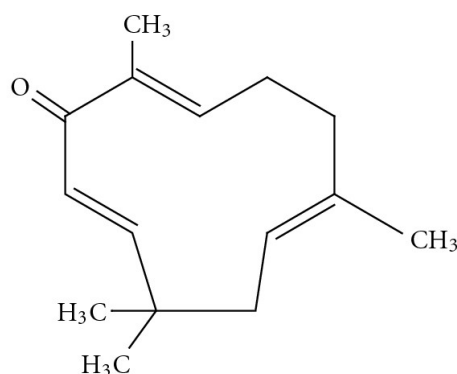


Obr. 2. Klasifikace seskviterpenů s příklady k jednotlivým strukturálním třídám. Převzato z práce Bártíková et al. (2014).

V dalším textu detailně popisuji protinádorovou aktivitu dvou vybraných seskviterpenů zerumbonu a farnesolu. Zvolila jsem je proto, jelikož mě zaujalo velké množství jejich protinádorových účinků a množství provedených studií.

3 ZERUMBON

Mezi různými sekundárními metabolity (alkaloidy, terpenoidy, fenolické sloučeniny a glykosidy) izolovanými z celé řady rostlinných zdrojů tvoří terpenoidy největší třídu s více než 25 000 členy. Mnoho terpenoidů vykazuje terapeutický potenciál jako antibakteriální, antivirové, antimalarické, antiparazitické, antihyperglykemické, protizánětlivé a protinádorové látky. Takovou terpenoidní sloučeninou, která má obrovský potenciál v prevenci a léčbě rakoviny, je zerumbon (Obr. 3). Zerumbon je cyklický jedenáctičlenný seskviterpen izolovaný z oddenků tropické rostliny *Zingiber zerumbet*. Antiproliferativní aktivita *Z. zerumbet* je způsobena především zerumbonem, což je hlavní cytotoxická látka této rostliny. I když přesný molekulární mechanismus potenciálních protirakovinných účinků této sloučeniny stále není objasněn, existují však studie, které uvádějí, že zerumbon může modulovat řadu důležitých molekulárních cílů (např. transkripční faktor NF- κ B, proapoptotický protein Bax, antiapoptotický protein Bcl-2), a to jak pro prevenci tak léčbu rakoviny (Prasanna et al. 2012, Sakinah et al. 2007).



Obr. 3 Struktura zerumbonu

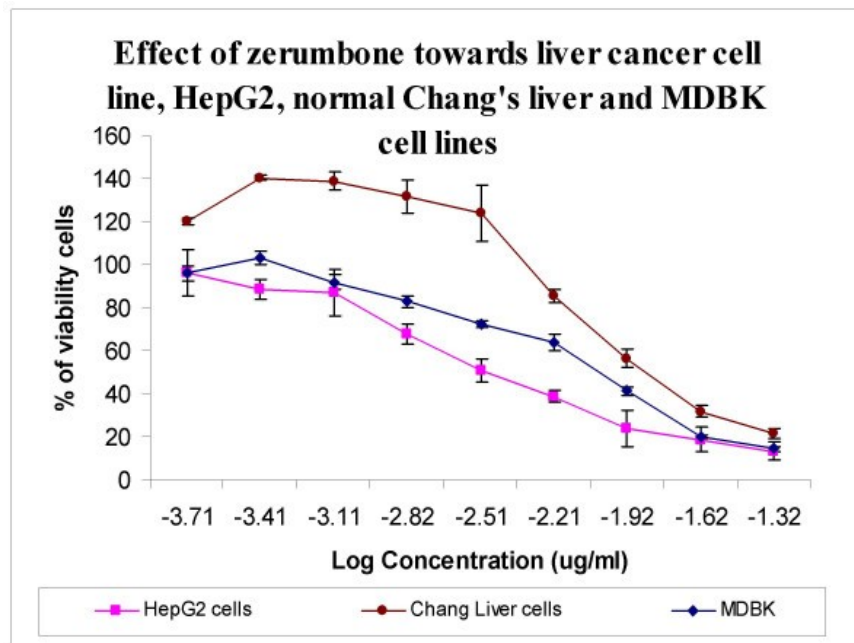
3.1 Protinádorové účinky zerumbonu *in vitro*

In vitro studie s použitím různých nádorových buněčných linií dosud poskytly důležité informace o potenciálních molekulárních cílech zerumbonu. Zerumbon v nádorových buňkách vystavených působení 12-*O*-tetradecanoylforbol-13-acetátu inhiboval tvorbu superoxidového radikálu enzymy NADPH-oxidázou a xantinoxidázou

v závislosti na použité koncentraci. Na druhou stranu strukturní analog zerumbonu α -humulen, kterému chybí karbonylová funkční skupina, nevykazoval žádný významný antiproliferační účinek, což ukazuje na zásadní význam karbonylové skupiny pro biologické funkce zerumbonu. Výzkumníci také pozorovali na dávce závislou inhibici proliferace lidských buněčných linií střevního adenokarcinomu po léčbě zerumbonem. Naproti tomu antiproliferační účinky zerumbonu vůči nenádorovým buňkám (např. lidským epiteliálním buňkám a fibroblastům tlustého střeva) byly mnohem slabší, což ukazuje selektivitu sloučeniny vůči rakovinným buňkám. Tento seskviterpen rovněž indukoval apoptózu. Tyto výsledky jasně ukazují potenciál zerumbonu ovlivnit současně několik činností v nádorových buňkách (Prasannan et al. 2012).

Byla navržena hypotéza, že celá řada těchto účinků je způsobena díky ovlivnění aktivity/exprese nukleárního faktoru-kappa B (NF- κ B) tímto seskviterpenem. Avšak zerumbon v testované dávce 20 μ M neměl významný vliv na expresi NF- κ B v myších makrofázích RAW264.7. Předpokládalo se, že mnohé z pozorované *in vitro* činnosti zerumbonu může být vysvětleno jeho schopností inhibovat hlavní transkripční faktor NF- κ B. Některé geny regulované NF- κ B hrají klíčovou roli v proliferaci, přežití a metastazování nádorových buněk. NF- κ B může být aktivován podněty jako cigaretový kouř, kyselina okadaová a peroxid vodíku. Účinky zerumbonu na aktivaci NF- κ B byly pozorovány v žaludečních nádorových buňkách, v nichž je NF- κ B konstitutivně aktivován, jak bylo zjištěno v předběžných studiích. Aktivita NF- κ B byla v kontrole zvýšena 0,1% dimetylsulfoxidem, který sloužil jako rozpouštědlo zerumbonu v ostatních vzorcích. Tato zvýšená aktivita byla inhibována zerumbonem v koncentraci $\geq 5 \mu$ M (Prasannan et al. 2012, Tsuboi et al. 2013).

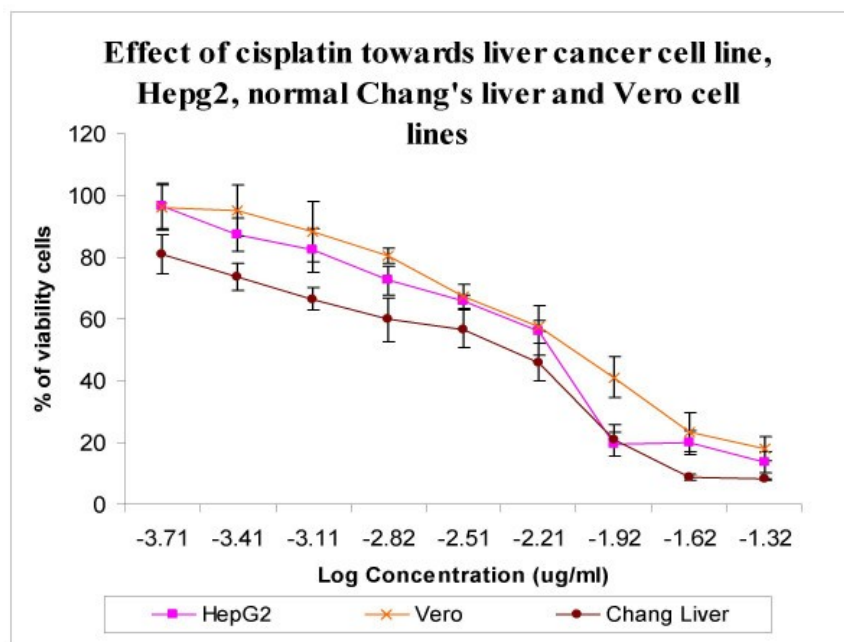
Antiproliferační aktivita zerumbonu, která byla pozorována v mnoha nádorových buněčných liniích, je zřejmě způsobena zejména schopností tohoto seskviterpenu indukovat apoptózu. Byla popsána antiproliferační aktivita zerumbonu v buněčné linii lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2). Autoři studie pozorovali mírnou selektivitu v antiproliferační aktivitě zerumbonu pro buňky rakoviny jater ve srovnání s nemaligními jaterními buňkami (Obr. 4) (Prasannan et al. 2012).



Obr. 4 Účinky zerumbonu na životaschopnost jaterních nádorových buněk HepG2 a nenádorových jaterních buněk Chang a MDBK. Převzato z práce Sakinah et al. (2007).

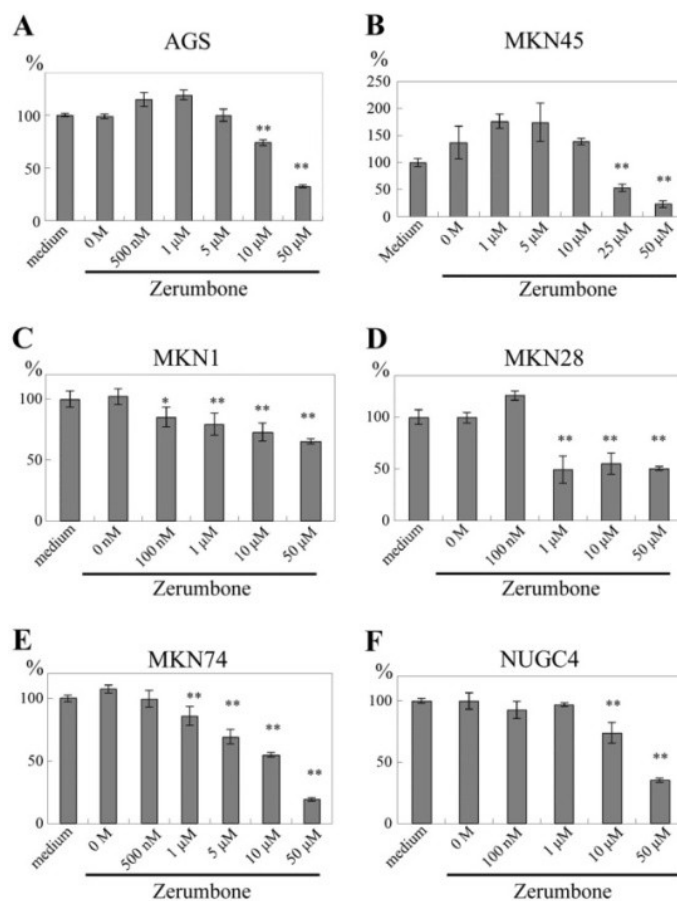
Obrázek 4 ukazuje, že zerumbon vykazoval antiproliferační účinek vůči buněčné linii jaterního karcinomu, která byla testována v závislosti na koncentraci. Hodnota IC_{50} , což je koncentrace studované látky potřebná k inhibici 50% růstu buněk, byla pro zerumbon $3,45 \pm 0,026 \mu\text{g/ml}$. Zerumbon také inhiboval proliferaci nemaligních jaterních buněk Chang a MBDK s hodnotami IC_{50} $10,96 \pm 0,059 \mu\text{g/ml}$ respektive $10,02 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ (Sakinah et al. 2007).

V další studii bylo použito léčivo cisplatina, která také vykazuje protinádorovou aktivitu. Cisplatina, která se běžně používá k léčbě rakoviny vaječníků, močového měchýře a varlat, měla inhibiční účinek na maligní jaterní buňky s hodnotou IC_{50} $7,23 \pm 0,036 \mu\text{g/ml}$ (Obr. 5). Bylo zjištěno, že rovněž působí i na nenádorové jaterní buňky Vero a Chang s hodnotami IC_{50} $9,06 \pm 0,044 \mu\text{g/ml}$ a $7,08 \pm 0,073 \mu\text{g/ml}$ (Sakinah et al. 2007). Rozdíl v jejich účincích je patrný. U zerumbonu je jasný rozdíl mezi účinky na maligní a nemaligní buňky, zatímco u cisplatin se antiproliferační účinky mezi nádorovými a nenádorovými liniemi téměř neliší.



Obr. 5 Účinky cisplatinu na životaschopnost jaterních nádorových buněk HepG2 a nenádorových jaterních buněk Vero a Chang. Převzato z práce Sakinah et al. (2007).

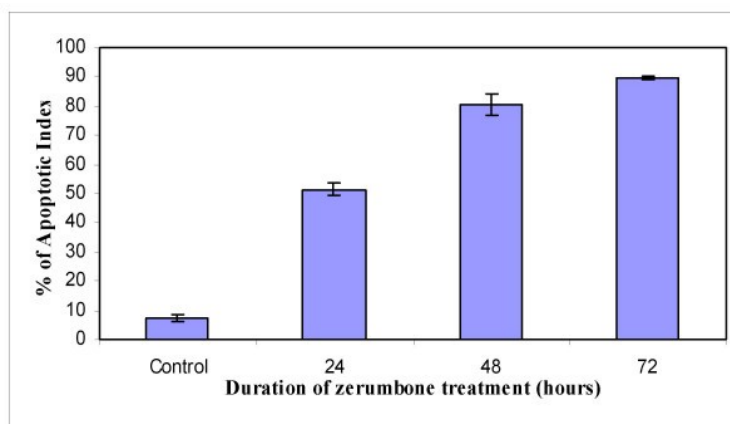
Antiproliferační aktivita zerumbonu byla dále zkoumána u buněk karcinomu žaludku (Obr. 6). Zerumbon inhiboval buněčnou proliferaci v koncentraci vyšší než 10 µM. Zerumbon také inhiboval proliferaci jiných žaludečních nádorových buněčných linií v závislosti na dávce. Např. MKN45 buňky byly inhibovány zerumbonem v koncentraci ≥ 25 µM, MKN1 buňky již v koncentraci ≥ 100 nM, MKN28 buňky v koncentraci ≥ 1 µM atd. (Tsuboi et al. 2013).



Obr. 6 Účinky zerumbonu na proliferaci několika linií žaludečních nádorových buněk. Převzato z práce Tsuboi et al. (2013).

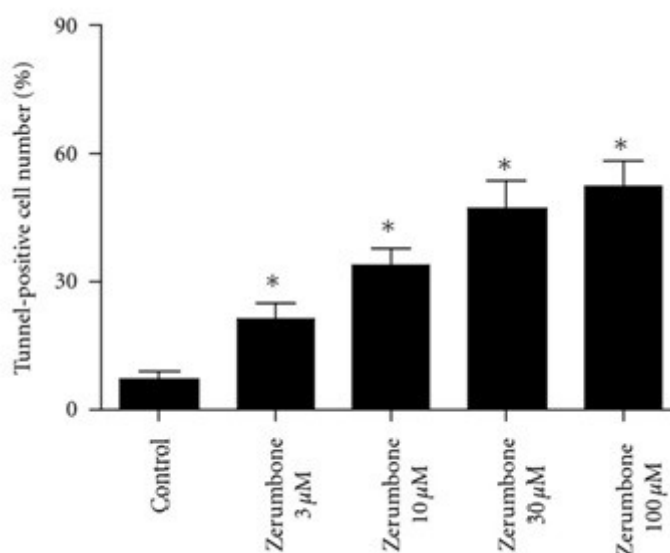
Pro objasnění antiproliferační aktivity byly jaterní nádorové buňky HepG2 ošetřeny zerumbonem v dávce 3,45 µg/ml a průběžně se sledovalo, zda sloučenina vyvolá buněčnou smrt prostřednictvím apoptózy. Jako pozitivní kontrola sloužila cisplatina. Buňky ošetřené zerumbonem po dobu 24 hodin ukázaly aktivní apoptózu a fragmentovanou DNA značenou fluorescenčně. Na začátku byla intenzita žluté fluorescence slabá. Ke zvýšení fluorescence došlo po 48 hodinách, kdy více buněk podlelo apoptóze. Po 72 hodinách vykazovaly membrány buněk blebbing (tj. tvorba cytoplazmatických výběžků) a přítomnost apoptotických tělísek. Na apoptózu také poukazují typické oligonukleozomální žebříky, což naznačuje, že DNA ošetřených buněk byla fragmentována na 180 až 200 základních dvojic nukleozomálních multimerů. Ten samý jev vykazovaly buňky ošetřené cisplatinou, ale intenzita žluté fluorescence nebyla tak jasná jako fluorescence u buněk ošetřených zerumbonem. Procentuální podíl apoptotických buněk se po ošetření zerumbonem zvýšil o 50 % po 24 hodinách a o 80 % po 48 hodinách (Obr. 7). Neošetřené buňky, které sloužily jako

kontrola, ukázaly pouze 6 % buněčné smrti prostřednictvím apoptózy (Sakinah et al. 2007).



Obr. 7 Apoptóza indukovaná v jaterních HepG2 buňkách po ošetření zerumbonem (%), v závislosti na čase. Převzato z práce Sakinah et al. (2007).

Ošetření buněk karcinomu pankreatu PANC-1 zerumbonem po dobu 24 h vyvolalo zřetelné apoptotické morfologické změny jaderného chromatinu, jeho smršťování, kondenzaci a fragmentaci jádra buňky. Naopak pankreatické buňky PANC-1 bez ošetření zerumbonem vykazovaly intaktní jaderné struktury (Obr. 8) (Zhang et al. 2012).

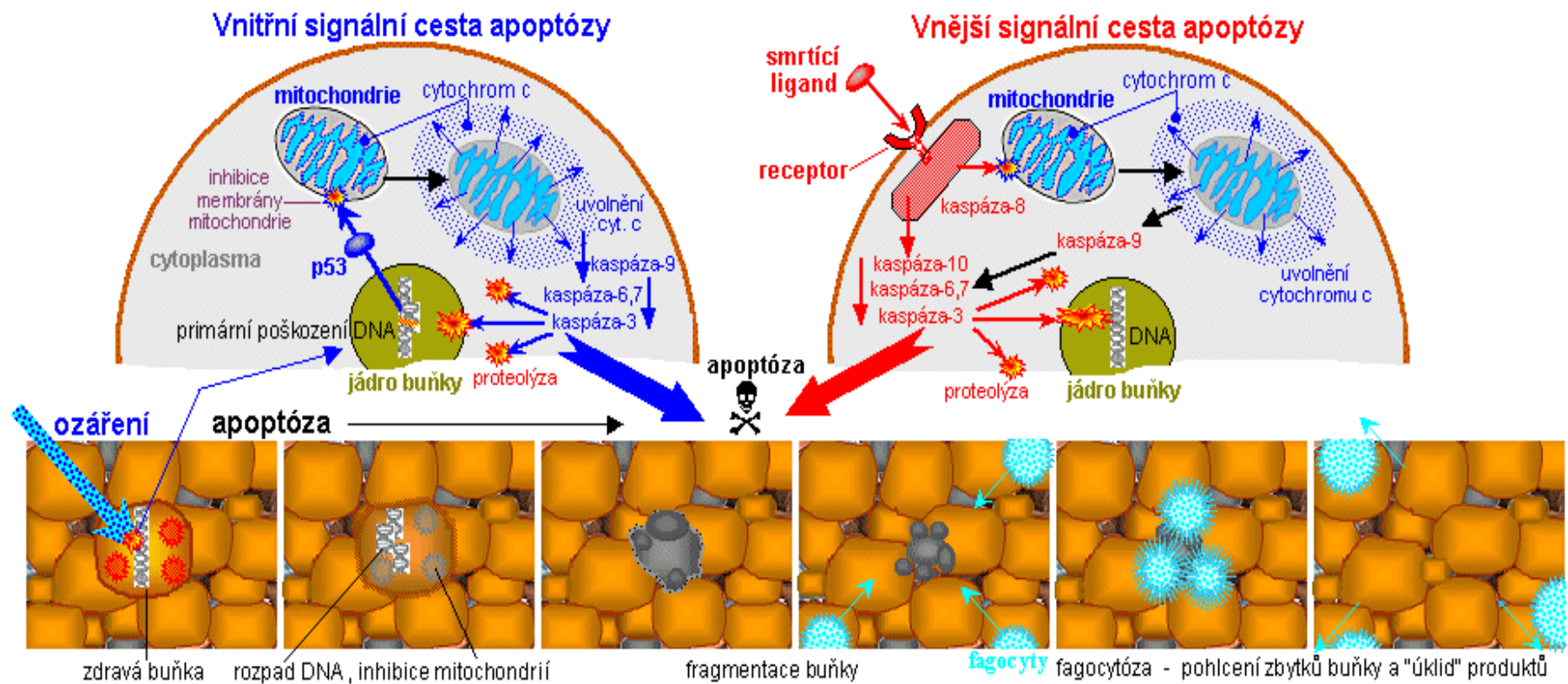


Obr. 8 Apoptóza způsobená zerumbonem (%) v buňkách karcinomu pankreatu PANC-1 v závislosti na dávce. Převzato z práce Zhang et al. (2012).

Pro určení, které apoptotické proteiny jsou regulovány zerumbonem a podílejí se na expresi proteinů p53, Bax a Bcl-2, byly použity jaterní nádorové buňky HepG2 ošetřené zerumbonem (3,45 µg/ml) po dobu 0, 3, 6, 12 a 48 hodin pomocí Western blott analýzy. V buňkách se zvýšila exprese proapoptického proteinu Bax a snížila se exprese antiapoptických proteinů Bcl-2. Regulace exprese proteinu Bax zerumbonem byla potvrzena imunobarvením. Nicméně exprese proteinu p53 nevykazovala po celou dobu působení zerumbonu žádné významné změny. Výsledek naznačuje, že apoptóza vyvolaná zerumbonem může být zprostředkována prostřednictvím Bax a Bcl-2 proteinů v jaterních nádorových HepG2 buňkách. Je však třeba zjistit, zda jsou tato zjištění platná obecně pro všechny typy nádorových buněk nebo pouze pro tento specifický typ nádorových buněk (Sakinah et al. 2007).

Mezi účinky zerumbonu patří také indukce vysokého intracelulárního redoxního potenciálu, který může inhibovat proliferaci nádorových buněk. Cytotoxický účinek zerumbonu na rakovinné buňky je přičítán přítomnosti α,β -nenasycené karbonylové skupiny v jeho struktuře, která hraje důležitou roli v interakci sloučeniny s různými cíli v buňce. Intracelulární glutation účinně odstraňuje α,β -nenasycenou karbonylovou skupinu zerumbonu tvorbou Michaelova aduktu, čímž se zvýší intracelulární redoxní potenciál, což vede k inhibici šíření rakovinných buněk. Nicméně průměrný intracelulární redoxní potenciál nenádorových buněk je nižší než u rakovinných. Tento rozdíl by mohl být důvodem, proč zerumbon neindukuje proliferaci nenádorových buněk. Vzhledem k tomu, že je úzká souvislost mezi nádory, záněty a oxidačním stresem, je možné, že protizánětlivé nebo antioxidační sloučeniny by mohly také působit jako antikarcinogenní činidla (Rahman et al. 2014).

Kaspázy jsou základními enzymy signální dráhy apoptózy, která má dvě cesty - vnější a vnitřní, též mitochondriální (Obr. 9). Kaspáza-3, která je aktivována kaspázou-8, hraje klíčovou roli ve vnější cestě přes receptory smrti, zatímco kaspáza-9 je významná ve vnitřní mitochondriální dráze. Tyto kaspázy byly testovány v souvislosti s nalezením mechanismu navození apoptózy v buňkách ošetřených zerumbonem. V této studii byla aktivita kaspázy-3 a kaspázy-9 výrazně zvýšena s časem. Nedošlo však k žádnému zvýšení aktivity kaspázy-8 ve stejném období léčby. Výsledky tedy naznačují, že zerumbon indukuje apoptózu prostřednictvím vnitřní dráhy (Hosseinpour et al. 2014).



Obr. 9 Nahoře: Vnitřní a vnější signální dráhy apoptózy, Dole: Morfologické změny buňky v průběhu apoptózy. Převzato z práce Ullmann V. (2015).

Zerumbon může také zvýšit protirakovinné účinky TNF (tumor nekrotizující faktor) příbuzného ligandu indukujícího apoptózu (TRAIL) s upregulací TRAIL receptorů smrti DR5 a DR4 v celé řadě nádorových buněk. TRAIL ligand reguluje zabíjení nádorových buněk prostřednictvím pěti různých receptorů, ale pouze dva z nich, DR4 a DR5, jsou transmembránové receptory a zprostředkovávají apoptózu. Zapojení DR4 a DR5 receptorů vede k aktivaci kaspázy-8, což pak vede k aktivaci kaspázy-9 a kaspázy-3. TRAIL-indukovaná apoptóza je regulována reaktivními formami kyslíku (ROS). Výzkumníci pozorovali, že preinkubace buněk HCT116 lidského kolorektálního karcinomu s *N*-acetylcysteinem či glutationem, které vychytávají ROS, snižuje zerumbonem vyvolanou upregulaci DR4 a DR5 v závislosti na dávce. Kromě toho u předběžného ošetření *N*-acetylcysteinem bylo zjištěno několik zmírňujících účinků léčby zerumbonem, jako je např. zvýšení buněčné smrti vyvolané TRAIL, zvýšení aktivity kaspázy-3 a kaspázy-8 atd. Vše ukazuje na potenciální roli ROS v indukci TRAIL receptorů smrti pomocí zerumbonu (Prasanna et al. 2012, Yodkeeree et al. 2009).

Nedávno bylo zjištěno, že zerumbon způsobuje zesílení proteinu tepelného šoku 27 (HSP27) s inhibicí monomerní formy proteinu v lidském adenokarcinomu plic. Zvýšená exprese HSP27 byla pozorována v různých nádorových buňkách a členové této rodiny proteinů byli podezříváni jako jedni z původců odolnosti rakovinných buněk proti ozařování a chemoterapeutickým činidlům. Zjistilo se, že zerumbon se vmezeřil mezi disulfidové vazby v HSP27 dimerech a toto zesílení změnilo normální dimerizaci proteinu. Bylo zjištěno, že α,β -nenasyčené karbonylové skupiny v zerumbonu jsou důležité pro toto zesílení. U strukturálních analogů zerumbonu α -humulenu a 8-hydroxyhumulenu nemohlo dojít k tomuto zesílení. Při předběžném ošetření zerumbonem před vystavením záření bylo zjištěno, že inhibuje vazebnou afinitu HSP27 s apoptotickými molekulami a cytochromem c a indukuje senzibilizaci buněk (Prasanna et al. 2012).

3.2 Protinádorové účinky zerumbonu *in vivo*

Ačkoli zerumbon má protinádorový potenciál, jeho aplikaci v léčbě brání špatná rozpustnost ve vodě, která vede ke špatné biologické dostupnosti této látky. Tato vlastnost zpomaluje jeho absorpci v zažívacím traktu. Špatná absorpce v gastrointestinálním traktu, nejen snižuje biologickou dostupnost zerumbonu, ale také

způsobuje toxicitu vůči sliznicím. Jeden z přístupů k překonání této překážky je začlenit zerumbon do lipidových nosičů, které by zlepšily jeho rozpustnost a biodostupnost. Pevné nanočástice lipidů, nanostrukturované lipidové nosiče (NLC), jsou příkladem nosných systémů na bázi lipidů, které mohou být použity k začlenění léčivé látky. Mají požadované vlastnosti včetně nízké toxicity a řízeného uvolňování, jsou biologicky odbouratelné a s vysokým obsahem léčiva (Hosseinpour et al. 2014).

První publikované *in vivo* studie o zerumbonu uvádějí, že perorální podávání seskviterpenů potlačuje vznik aberantních krypt v tlustém střevě samců potkanů v závislosti na dávce. Následně bylo zjištěno, že perorální podávání zerumbonu způsobilo potlačení účinku dextran síranu sodného, který vyvolává akutní kolitidu u samic myši. Zerumbon také snižuje hladinu zánětlivých biomarkerů na sliznici tlustého střeva myši.

Kromě toho bylo zjištěno, že zerumbon potlačuje zranění leukocytů a dermální infiltraci, jakož i aktivační fázi kožních nádorů u myši. Při podávání zerumbonu myším v různých dávkách v iniciační i propagační fázi vzniku nádoru se ukázalo, že zerumbon v koncentraci 0,2 μM snížil výskyt nádoru o 40 % a v koncentraci 2 μM až o 60 %. Tato studie jasně ukazuje terapeutický potenciál zerumbonu v oblasti prevence a léčby kožních nádorů jak při iniciační tak propagační fázi (Prasannan et al. 2012, Murakami et al. 2004).

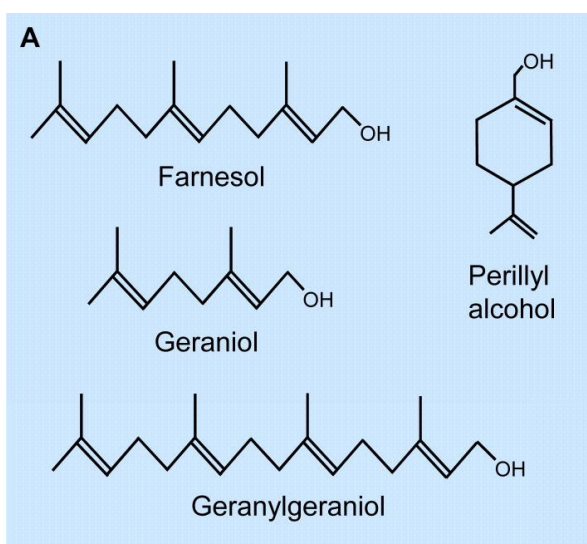
Zerumbon potlačuje cervikální intraepiteliální neoplazii u myši, které byly prenatalně vystaveny působení diethylstilbestrolu, s účinností blízkou se k protirakovinnému léku cisplatině. V důsledku léčby zerumbonem se objevily další významné účinky jako nadměrná exprese proapoptotických proteinů Bax a potlačení exprese proteinů Bcl-2. Srovnatelná účinnost zerumbonu s cisplatinou ukazuje velký potenciál pro alternativní léčbu rakoviny děložního čípku. Publikované údaje zatím ukazují, že zerumbon působí mírně cytotoxicky a genotoxicky v dávkách užívaných pro většinu experimentálních studií. Např. dávka vyšší než 2000 mg/kg byla stanovena jako letální dávka u potkanů po intraperitoneálním podání. Podobně jednotlivě podané dávky 100-200 mg/kg zerumbonu u samic potkanů nevykazovaly žádné toxické účinky vůči jaterní a ledvinové tkáni. Protinádorové účinky zerumbonu byly hlášeny u látek, které vyvolávají nádorové bujení v játrech potkanů (diethylnitrosamin a 2-acetylaminofluren). Bylo zjištěno, že seskviterpeny ochraňují játra potkana před karcinogenními účinky různých sloučenin. Proto byl např. zkoumán účinek zerumbonu na poškození tkání u potkanů vyvolané cisplatinou. Všechny skupiny potkanů dostaly jednu injekci

cisplatinu v dávce 45 mg/kg a některé skupiny dostaly navíc zerumbon v dávce 100 a 200 mg/kg intraperitoneálně 4 dny před injekcí cisplatinu. Všechna zvířata byla usmrcena 16 hodin po injekci cisplatinu. Poté jim byla odebrána krev a byly analyzovány sérové hladiny enzymů (alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy, alkalické fosfatázy) a alfa-fetoproteinu, které byly sníženy. Jaterní tkáň byla použita pro kvantifikaci malondialdehydu a glutationu. Bylo provedeno i histopatologické vyšetření a hodnocení závažnosti lézí. Tato studie ukázala, že zerumbon snížil rozsah poškození jater a jaterních funkcí. Také způsobil snížení koncentrace glutationu (Prasannan et al. 2012, Ibrahim et al. 2009).

Po perorálním podávání zerumbonu (100, 250 a 500 ppm) bylo zjištěno, že významně inhibuje multiplicitu adenokarcinomu tlustého střeva u samců myší. Těmto myším byla injekčně podána jedna dávka azoxymetanu a perorálně jedna dávka dextran síranu sodného, který vyvolává kolitidu. Zerumbon také potlačuje zánět tlustého střeva v závislosti na dávce. Po perorálním podání zerumbonu (250 a 500 ppm) bylo zjištěno, že inhibuje rozmanité plicní adenomy u samic myší. V obou případech mělo podání zerumbonu za následek inhibici nádorové proliferace a NF- κ B a indukci apoptózy (Prasannan et al. 2012).

4 FARNESOL

Izoprenoidy jsou důležité v regulaci buněčné proliferace, apoptózy, diferenciace a biosyntézy lipidů. Dráha izoprenoidů vede k syntéze farnesylpyrofosfátu (farnesyl-PP) a geranylgeranylpyrofosfátu (geranylgeranyl-PP), které jsou zapojeny do prenylace (navázání izoprenoidu na jinou sloučeninu) mnoha proteinů a následně k biosyntéze cholesterolu, sterolů a jiných derivátů cholesterolu. Nesterolový izoprenoid farnesol vzniká defosforylací farnesyl-PP, metabolitu z biosyntetické dráhy cholesterolu. Kromě toho, že jsou produkovány endogenně, farnesol a související izoprenoidy perilyl alkohol a geraniol (Obr. 10) jsou přírodní látky nalezené v mnoha druzích ovoce a aromatických rostlinách včetně citrusů (perilylalkohol, geraniol), šalvěže, máty, muškátového oříšku (perilylalkohol), bazalky (geraniol) a heřmánku (farnesol) (Joo a Jetten 2010).



Obr. 10 Struktura farnesolu a souvisejících izoprenoidů

4.1 Inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy farnesolem *in vitro*

Řada studií ukázala, že farnesol a související izoprenoidy včetně geraniolu a perilylalkoholu inhibují buněčnou proliferaci a indukují apoptózu v širokém spektru nádorových buněk. U nádorových buněk bylo obecně zjištěno, že jsou výrazně citlivější na účinky farnesolu než nenádorové buňky. Například lidské primární T-lymfocyty

nebo monocyty jsou, na rozdíl od leukemických buněk, poměrně odolné vůči farnesolu. Základní mechanismus této rozdílné citlivosti není zatím zřejmý. Leukemické buňky patří mezi nejcitlivější buňky na účinky farnesolu. Farnesol je obvykle účinnější v inhibici proliferace nádorových buněk než odpovídající izoprenoidy nerolidol, geraniol, geranylgeraniol a perilylalkohol. U většiny buněčných typů včetně adenokarcinomu plic, hepatomu, melanomu, lymfoblastické leukémie, kolorektálního karcinomu, spinocelulárního karcinomu a adenokarcinomu pankreatu vyvolají farnesol, geraniol a perilylalkohol zástavu buněčného cyklu. V některých typech buněk byla pozorována přechodná akumulace v G₂ fázi. Při zastavení buněčného cyklu v G₀/G₁ fázi u buněk adenokarcinomu pankreatu bylo prokázáno, že je doprovázeno výrazným zvýšením exprese inhibitorů cyklin-dependentní kinázy (Cdk) a snížením hladiny cyklinu A, cyklinu B1 a hladiny Cdk2 proteinu. Cdk inhibitory hrají důležitou roli v regulaci aktivity cyklin-dependentních kináz a progresi buněčného cyklu. Další testy např. ukázaly, že proliferace buněk karcinomu prostaty byla výrazně snížena způsobem závislým na dávce a na čase. Barvení ukázalo, že kondenzace chromatinu v buňkách ošetřených 60 μM farnesolem byla výrazně vyšší než v kontrole (Park et al. 2014).

Ve většině buněčných typů je inhibice růstu vyvolaná farnesolem, geraniolem, geranylgeraniolem a perilylalkoholem doprovázena apoptózou. Toto tvrzení podporuje nález apoptotických tělísek, aktivace různých kaspáz, DNA fragmentace aj. V lidských buňkách adenokarcinomu plic byla indukce apoptózy farnesolem spojena s aktivací kaspázy-3, -4 a -9, zatímco na kaspázu-8 měl farnesol velmi malý vliv. Pro získání dalších informací o mechanismu, kterým farnesol vyvolává apoptózu, byly porovnány profily genové exprese u buněk ošetřených farnesolem analýzou DNA čipů (microarray analýza). Tato analýza ukázala, že mnohé geny jsou zapojeny do stresu endoplazmatického retikula (ER). Tyto geny včetně kaspáz byly aktivovány během 4 h léčby farnesolem (Joo a Jetten 2010, Joo et al. 2007).

Farnesol byl nedávno identifikován jako molekula produkovaná houbovým patogenem *Candida albicans*. Existuje hypotéza, že syntetický a z *Candidy* pocházející farnesol mohou indukovat apoptózu *in vitro* v ústním spinocelulárním karcinomu. Byla zkoumána buněčná proliferace, apoptóza, mitochondriální degradace a exprese survivinu a kaspáz. Kromě toho byly analyzovány globální profily exprese proteinů pomocí proteomické analýzy. Výsledky ukázaly výrazné snížení proliferace a zvýšení apoptózy v buňkách vystavených farnesolu a kultivačnímu médiu s *C. albicans*. Analýza exprese proteinů současně prokázala snížení hladin survivinu a zvýšené štěpení

kaspáz, zatímco fluorescenční mikroskopie odhalila přítomnost aktivních kaspáz s mitochondriální degradací v exponovaných buňkách. Proteomickou analýzou bylo identifikováno 36 proteinů se změněnou expresí, z nichž 26 se podílí na inhibici karcinogeneze, potlačuje proliferaci a stárnutí. Nejpozoruhodnějších však bylo 10 proteinů, které se podílejí na inhibici apoptózy a proteinů nadměrně exprimovaných u epitelálních karcinomů. Tato studie ukazuje, že farnesol významně inhibuje proliferaci u spinocelulárního karcinomu a podporuje apoptózu *in vitro* prostřednictvím vnější i vnitřní apoptotické signální dráhy. Kromě toho byla poprvé popsána schopnost farnesolu získaného z *Candidy* vyvolat podobnou apoptotickou odpověď přes stejné dráhy. Schopnost farnesolu indukovat apoptózu v rakovinných buňkách je potenciálním nástrojem pro studium progresu nádoru a tato sloučenina je velmi atraktivním kandidátem na terapeutikum (Scheper et al. 2008).

4.2 Inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy farnesolem *in vivo*

Farnesol a další izoprenoidy ukázaly, že vykazují protinádorové a antikarcinogenní účinky *in vivo*. Farnesol, perilylalkohol a geraniol výrazně inhibovaly růst pankreatického adenokarcinomu PC-1 u křečka. Křečci byli krmeni stravou obsahující 20 g geraniolu nebo farnesolu/kg potravy. Tato koncentrace farnesolu a geraniolu způsobila kompletní inhibici růstu pankreatického nádoru. Farnesol i geraniol byly účinnější než perilylalkohol, který inhiboval růst nádoru o 50 % při dávce 40 g/kg potravy. Nicméně farnesol byl asi 7x účinnější při inhibici růstu nádoru než geraniol a perilylalkohol (Burke et al. 1997). Avšak metabolismus těchto látek je poměrně málo známý. U farnesolu bylo popsáno, že v lidských játrech, ledvinách a střevech podléhá glukuronidaci UDP-glukuronosyltransferázou. Substrátová specifita tohoto enzymu by mohla potenciálně vysvětlit rozdíly v účinnosti izoprenoidů *in vitro* a *in vivo*. U potkanů léčených farnesolem byl tento enzym v játrech zvýšený, podobně jako cytochrom P450 a glutation reduktáza. Mnohé z těchto enzymů mohou metabolizovat různá léčiva a karcinogeny. Proto může farnesol změnit metabolismus, účinnost a/nebo toxicitu léčiv, karcinogenů nebo dalších izoprenoidů. Navíc farnesol a perilylalkohol snížily výskyt rakoviny slinivky též u křečků krmených karcinogenem *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)aminem. Hyperplastické pankreatické duktální novotvary vykazovaly po léčbě perilylalkoholem a farnesolem vyšší expresi proapoptotického Bak

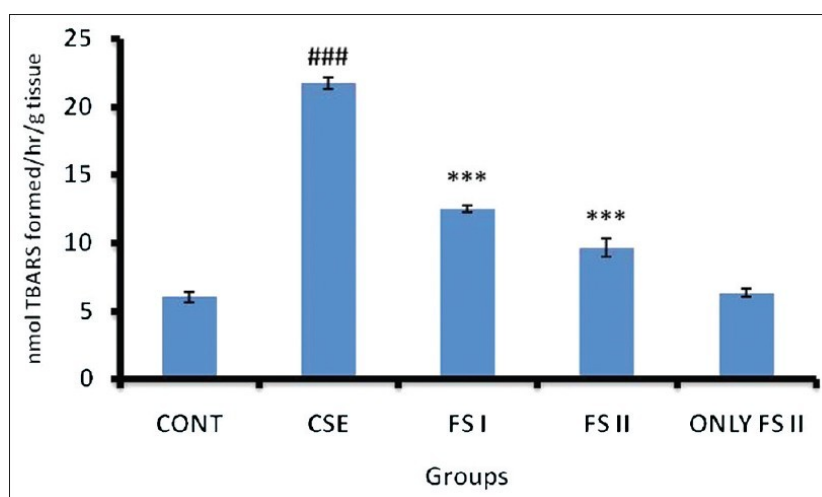
proteinu, vyšší míru apoptózy, sníženou expresi antiapoptotického proteinu Bcl-X a nižší míru syntézy DNA. Inhibiční účinky farnesolu byly také pozorovány na myším modelu karcinomu prostaty. Ve srovnání s kontrolní skupinou, kde nebyl podáván farnesol, byl u skupiny s dávkou farnesolu 50 mg/kg objem nádoru významně snížen (Park et al. 2014).

Protinádorové účinky farnesolu a geraniolu byly také pozorovány v modelu iniciačně-propagační fáze hepatokarcinogeneze u potkanů. Farnesol inhiboval incidenci, tedy průměrný počet, a velikost preneoplastických jaterních lézí. Analýza počtu apoptotických buněk ukázala, že tato inhibice byla alespoň částečně způsobena v důsledku inhibice proliferace a neprokázalo se, že by zahrnovala zvýšenou apoptózu. Dospělo se k závěru, že farnesol může inhibovat počáteční fázi hepatokarcinogeneze pravděpodobně v důsledku inhibice metabolické aktivace dietylnitrosaminu. Léčba farnesolem má také ochranný účinek proti Fe-nitritotrioxové kyselině, která vyvolává oxidační poškození ledvin a časnou renální propagaci tumoru. Kromě toho podávání farnesolu významně potlačilo tvorbu aberantních ložisek a krypt v tlustém střevě potkanů léčených karcinogenem azoxymetanem. Naproti tomu perilylalkohol a geranylgeraniol měly jen malý účinek na tvorbu aberantních krypt. Nedávná studie ukázala, že farnesol má antigenotoxické účinky proti benzo(a)pyrenu a snižuje vznik zlomů DNA a tvorbu DNA aduktů *in vivo*. Tato pozorování jsou v souladu s hypotézou, že funkce farnesolu jako chemopreventivní látky má vliv na iniciační fázi vzniku nádorů.

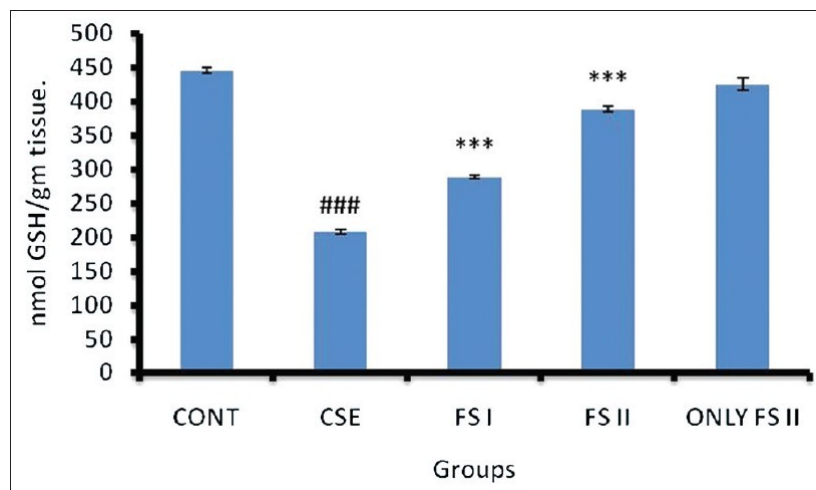
Až dosud nebyly provedeny žádné klinické studie s farnesolem, ale několik studií bylo publikováno s perilylalkoholem. Klinické studie byly provedeny u pacientů s pokročilými malignitami a solidními nádory, zatímco některé studie byly provedeny u pacientů trpících metastazujícím karcinogenem prostaty, pokročilou rakovinou vaječnicků, metastatickým karcinodem prsu a metastatickým kolorektálním karcinodem. U perilylalkoholu nebylo prokázáno, že by měl významnou protinádorovou aktivitu (Joo a Jetten 2010).

Cigaretový kouř obsahuje více než 4 000 chemických látek, z nichž mnohé jsou známými karcinogeny. Mnoho epidemiologických zpráv naznačuje, že kuřáci cigaret jsou ve větším riziku vzniku rakoviny hltnu, žaludku, slinivky břišní, jater, ledvin, močového měchýře, tlustého střeva a prsu, avšak jen málo epidemiologických zpráv vypovídá o roli cigaretového kouře na rozvoj rakoviny prostaty. Proto byly zkoumány účinky farnesolu proti oxidačnímu stresu v buňkách prostaty, který byl vyvolán

extraktem cigaretového kouře u potkanů kmene Wistar. Farnesol se podával sondou (50 mg/kg a 100 mg/kg v kukuřičném oleji) jednou denně po dobu 7 dnů. Sedmý den byl potkanům intratracheální instalací podán extrakt cigaretového kouře, který vyvolal zvýšení peroxidace lipidů (Obr. 11) a xantinoxidázové aktivity (o 134 % proti kontrole), spolu s poklesem obsahu glutationu (Obr. 12) a aktivit antioxidantních enzymů (glutathionperoxidáza, glutathionreduktáza a kataláza) v prostatě. Podání farnesolu v obou koncentracích vedlo k významnému snížení xantinoxidázové aktivity a peroxidace lipidů (Obr. 11) a signifikantnímu zvýšení obsahu glutationu (Obr. 12) a aktivit antioxidantních enzymů. Jak údaje naznačují, farnesol působil v tomto modelu jako účinný obránce proti oxidačnímu poškození prostaty způsobenému cigaretovým kouřem (Lateef et al. 2013).



Obr. 11 Vliv farnesolu a extraktu cigaretového kouře (CSE) na koncentraci malondialdehydu v prostatě potkanů kmene Wistar, FS I – farnesol 50 mg/kg, FS II – farnesol 100 mg/kg, ONLY FS II – farnesol 100 mg/kg bez podání CSE. Převzato z práce Lateef et al. (2013).



Obr. 12 Vliv farnesolu a extraktu cigaretového kouře (CSE) na hladinu glutationu v prostatě potkanů kmene Wistar, FS I – farnesol 50 mg/kg, FS II – farnesol 100 mg/kg, ONLY FS II – farnesol 100 mg/kg bez podání CSE. Převzato z práce Lateef et al. (2013).

4.3 Příklady mechanismů apoptózy vyvolané farnesolem

4.3.1 Účinek farnesolu na HMG-CoA-reduktázu

Počáteční studie ukázaly, že inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy má souvislost s inhibičním účinkem farnesolu na 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA- (HMG-CoA) reduktázu. Jedná se o enzym, který přeměňuje HMG-CoA na mevalonát a katalyzuje tak určující krok v biosyntetické dráze izoprenoidů. Mevalonát je použit k syntéze farnesyl-PP, který slouží jako prekurzor biosyntézy cholesterolu a může být převeden na geranylgeranyl-PP a farnesol. U farnesyl-PP i farnesolu bylo prokázáno, že urychlují na dávce závislou degradaci HMG-CoA-reduktázy v buňkách kultivovaných *in vitro*. I když v některých buněčných systémech byla prokázána indukce apoptózy a chemopreventivní účinky farnesolu a geraniolu, vznikající nezávisle na HMG-CoA-reduktáze, v buňkách karcinomu plic je indukce apoptózy farnesolem doprovázena snížením exprese tohoto enzymu. To vedlo k domněnce, že by mezi farnesolem a HMG-CoA-reduktázou mohlo být spojení a že inhibice HMG-CoA-reduktázy by mohla přispět k inhibici růstu nádorových buněk a indukcí apoptózy. Tato interpretace je v souladu s jinými studiemi, které poukazují na souvislost mezi inhibicí HMG-CoA-reduktázy, indukcí apoptózy, potlačením růstu nádoru a snížením rizika rakoviny (Joo a Jetten 2010). Tyto účinky by se mohly vztahovat k inhibici prenylace určitých proto-

onkogenů, jako jsou členové rodiny Ras, kteří hrají klíčovou roli v kontrolování proliferace buněk. Nicméně nebylo prokázáno, že by farnesol inhiboval prenylaci Ras, což naznačuje, že jeho inhibice růstu a indukce apoptózy nesouvisí s ovlivněním prenylace proteinů. Jelikož rychle rostoucí nádorové buňky vyžadují zvýšenou biosyntézu cholesterolu, účinky farnesolu na potlačení růstu těchto buněk se mohou vztahovat k inhibici biosyntézy cholesterolu. Nedávná studie ukázala ještě další mechanismus a prokázala, že inhibice HMG-CoA-reduktázy může vyvolat stres ER, tj. hlavní cestu vedoucí k apoptóze (Joo a Jetten 2010).

Nádory si často vyvinou rezistenci vůči standardní chemoterapii, a proto je u nových látek nezbytně nutné, aby se vyhnuly zkřížené rezistenci vyvolané již zavedenými protinádorovými léčivými. Bylo zkoumáno, zda klasické mechanismy rezistence, jako je např. nádorový supresor genu TP53 nebo onkogen EGFR, hrají roli v odpovědi nádorových buněk na farnesol. Pozoruhodné je, že žádný z těchto genů nevykazoval odolnost vůči farnesolu, což naznačuje, že tato sloučenina může být užitečná pro léčbu jinak rezistentních nádorů. Dále byl použit farmakogenomický přístup k prozkoumání molekulárních determinant citlivosti a rezistence k farnesolu. Mezi kandidáty citlivými k farnesolu byly geny zapojené do apoptózy, regulace transkripce a jiné další skupiny. Skutečnost, že tyto geny nejsou spojeny s rezistencí na tradiční protinádorová léčiva, naznačuje, že farnesol může mít jiný mechanismus účinku, a proto obejde rezistenci vůči chemoterapeutikům (Kueete a Efferth 2013).

4.3.2 Inhibice CDP-cholinové dráhy

Několik studií uvedlo, že v různých typech nádorových buněk je farnesolem indukovaná apoptóza spojena s inhibicí syntézy fosfatidylcholinu (PC). PC hraje důležitou úlohu při udržování struktury membrán a slouží jako prekurzor několika lipidových druhů včetně kyseliny fosfatidové, diacylglycerolu a mastných kyselin, které řídí řadu buněčných procesů včetně proliferace a apoptózy. Biosyntéza CDP-cholinu je katalyzována enzymem fosfocholincytidylyltransferázou, u které bylo prokázáno, že hraje zásadní roli v embryonálním vývoji, buněčné proliferaci a apoptóze. Inhibice tohoto enzymu farnesolem byla potvrzena v mnoha *in vitro* testech (Joo a Jetten 2010, Miguel et al. 1998).

4.3.3 Stres endoplazmatického retikula a inhibice NF- κ B signální dráhy

Endoplazmatické retikulum se podílí na správném složení a úpravě secernovaných a transmembránových proteinů. Pokud dojde vlivem různých faktorů (genetických, faktorů prostředí) k narušení těchto funkcí ER, v lumen ER se začnou hromadit nesložené či chybně složené proteiny. Při tomto stavu, který se označuje jako stres ER, se aktivují signální dráhy zvané „unfolded protein response“ (UPR), vedoucí k znovuoobnovení homeostázy ER a tedy k adaptaci a přežití buňky. UPR dráhy zahrnují aktivaci tří transmembránových proteinů (transkripčního faktoru ATF6, kinázy PERK a IRE1), které spouštějí kaskádu efektorových signálních drah. Pokud není náprava možná, pak UPR signální dráhy spustí apoptózu (Osowski a Urano 2011).

Farnesol inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu u různých typů nádorových buněk karcinomu plic v závislosti na dávce a čase. U analyzovaných izoprenoidů bylo zjištěno, že farnesol byl mezi studovanými izoprenoidy (tj. geraniol, geranylgeraniol, perilylalkohol, farnesol) nejsilnějším induktorem apoptózy v buňkách plicního adenokarcinomu (Joo et al. 2007). Bylo také zjištěno, že farnesol zvyšuje expresi mnoha známých genů indukovaných během stresu ER včetně aktivace např. transkripčního faktoru 3. Tato pozorování naznačují, že farnesolem vyvolaná apoptóza je v těchto buňkách spojena s aktivací stresu ER. Pokud nelze obnovit homeostázu ER, jsou buňky naprogramovány k podstoupení apoptózy. Tato data naznačují, že farnesol může vyvolat aktivaci všech tří stres-senzorových proteinových drah. Přesný mechanismus, kterým farnesol vyvolává stres ER, zatím nebyl objasněn. To vyvolává otázku, zda indukce ER stresu farnesolem souvisí s některým z jeho dalších účinků, jako je inhibice HMG-CoA-reduktázy nebo CDP-cholinové dráhy.

Microarray analýzou bylo zjištěno, že buňky plicního karcinomu léčené farnesolem vykazují výrazně zvýšenou expresi mnoha cílových genů NF- κ B včetně IL-1, IL-6, IL-8 atd., což naznačuje, že farnesol aktivuje NF- κ B signální dráhu. Nedávné studie poskytly mechanistické nahlédnutí do molekulárního mechanismu a ukázaly, že ER stres vyvolává několik signálů, které působí současně snížením hladin inhibitoru NF- κ B a aktivací NF- κ B signalizace. Zdá se pravděpodobné, že aktivace NF- κ B v důsledku ER stresu funguje jako signál kontrolující přežití (Joo a Jetten 2010).

4.3.4 Farnesoidní X receptor

Farnesol je schopný aktivovat nukleární farnesoidní receptor (FXR). Tento receptor je vysoce exprimován v játrech, střevech, ledvinách a kůře nadledvin a reguluje celou řadu genů podílejících se na homeostáze žlučových kyselin, metabolismu lipidů a glukózy. Je aktivován několika konjugovanými a nekonjugovanými žlučovými kyselinami, které se na něj vážou s vysokou afinitou. V případě farnesolu je nutná suprafyziologická koncentrace k aktivaci FXR. Úloha FXR v regulaci růstu, apoptóze a rakovině je stále sporná. Jednotlivé studie zjistily pozitivní korelaci mezi expresí FXR a rakovinou. U FXR agonistů bylo zaznamenáno, že indukují apoptózu v buňkách karcinomu prsu, což naznačuje, že aktivace FXR podporuje apoptózu a může mít ochranné účinky proti vzniku nádoru. I když je farnesol jen slabým aktivátorem FXR, je schopný inhibovat buněčnou proliferaci a indukovat apoptózu u buněk, které neexprimují FXR, což ukazuje, že aktivace FXR není obecným mechanismem v apoptóze vyvolané farnesolem. V poslední době se ukázalo, že FXR se podílí na regulaci proliferace buněk karcinomu prsu. Podání nízkých koncentrací farnesolu mělo mitogenní účinek na estrogenový receptor buněk karcinomu prsu, ale neovlivňovalo růst buněk, které neexprimují estrogenový receptor. Farnesolem stimulovaný růst buněk by mohl být blokován přidáním antiestrogenů, což naznačuje, že mitogenní účinek farnesolu je závislý na aktivaci estrogenového receptoru. Při léčbě farnesolem bylo také zjištěno, že snižuje hladinu estrogenového receptoru, zatímco se zvyšuje hladina progesteronového receptoru a FXR. Bylo tedy prokázáno, že farnesol může podporovat interakci mezi estrogením receptorem a FXR. Nicméně mechanismus, kterým farnesol podporuje tuto interakci, a souvislost se stimulací růstu buněk musí být ještě objasněny (Journe et al. 2008).

4.3.5 Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS)

U farnesolu bylo publikováno zvýšení hladiny ROS a inhibice růstu a vyvolání buněčné smrti u hub a kvasinek, např. *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Kromě inhibice klíčení v *C. albicans* je farnesolem vyvolaná apoptóza doprovázena akumulací ROS, mitochondriální degradací a zvýšenou hladinou aktivovaných kaspáz. V *A. nidulans* způsobil farnesol změny v expresi několika genů. V *S. cerevisiae* byla indukce buněčné smrti farnesolem inhibována

přídavkem antioxidantů, jako je α -tokoferol a *N*-acetylcystein, což ukazuje na spojení mezi buněčnou smrtí a ROS. Zda jsou ROS mediátorem buněčné smrti indukované farnesolem v savčích buňkách je třeba dále studovat. Předběžné výsledky ukazují, že farnesol může zvýšit produkci ROS v závislosti na čase a dávce v lidských buňkách karcinomu plic a v buňkách T-lymfoblastické leukémie. Avšak inhibice tvorby ROS butylhydroxyanisolem, vitamínem C nebo *N*-acetylcysteinem měla malý účinek na farnesolem vyvolanou apoptózu, což naznačuje, že v těchto buňkách produkce ROS není významným faktorem (Joo a Jetten 2010).

5 ZÁVĚR

Zerumbon může ovlivnit různé cesty buněčné signalizace zapojené do rakoviny a tudíž má terapeutický potenciál proti tomuto zákeřnému onemocnění. Jak *in vitro*, tak *in vivo* studie z publikované literatury dosud naznačují, že zerumbon může modulovat mnoho molekulárních cílů, které hrají klíčovou roli v karcinogenezi. Nicméně do budoucna je potřeba podrobnější výzkum pro celkové pochopení mechanismů účinku a jeho potenciálu proti různým druhům rakoviny. Také by mělo být hodnoceno, zda zerumbon může identicky modulovat více prozánětlivých signalizačních kaskád u odlišných typů nádorů. Je zajímavé, že je biologicky dostupný po perorálním podání u potkanů a myší, i když pro jeho farmakokinetické a farmakodynamické profily nejsou k dispozici žádné informace (Prasanna et al. 2012).

Protinádorové a chemopreventivní účinky farnesolu zahrnují několik různých mechanismů, které mohou působit buď ve fázi iniciace, nebo progresu vzniku nádoru. Snížení karcinogenem indukovaných zlomů DNA pomocí farnesolu naznačuje, že jeho protinádorové účinky mohou být důsledkem inhibice iniciační fáze vzniku nádoru. Podobně ochranný účinek proti poškození plic vyvolanému cigaretovým kouřem a oxidačnímu stresu se může vztahovat k inhibici iniciace rakoviny a může vést ke snížení pravděpodobnosti vzniku rakoviny plic. Inhibice buněčného růstu a indukce apoptózy může být součástí mechanismu, kterým farnesol vykazuje protinádorové účinky ve fázi progresu. Bylo také prokázáno, že tato látka indukuje tvorbu ROS a apoptózu v kvasinkách. Je však nutno provést další studie ke stanovení, zda ROS hrají roli v indukci apoptózy v savčích buňkách. Alternativní mechanismy fungování farnesolu zahrnují účinky na několik jaderných signálních drah. Léčba farnesolem také indukuje aktivaci cesty NF- κ B. I když farnesol inhibuje růst buněk a indukuje apoptózu v mnoha buněčných liniích, byly popsány chemopreventivní a protinádorové účinky ve zvířecích modelech a je potřeba provést další studie, aby se zjistilo, zda bude účinný jako chemopreventivní a terapeutický prostředek u člověka (Joo a Jetten 2010).

6 SEZNAM ZKRATEK

Bax, Bak	proapoptotické proteiny
Bcl-2, Bcl-X	antiapoptotické proteiny
Cdk	cyklin dependentní kináza
CDP-cholin	cytidin-5'-difosfocholin
DR4, DR5	receptory smrti
ER	endoplazmatické retikulum
FXR	farnesoidní X receptor
HMG-CoA	3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzymA
HSP27	protein tepelného šoku 27
NF- κ B	nukleární faktor-kappa B
PC	fosfatidylcholin
ROS	reaktivní formy kyslíku
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRAIL	TNF příbuzný ligand indukující apoptózu
UPR	signální dráhy „unfolded protein response“
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

7 SEZNAM LITERATURY

- Bártíková H., Hanušová V., Skálová L., Ambrož M., Boušová I. (2014) Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 14(22): 2478-2494
- Burke Y.D., Stark M.J., Roach S.L., Sen S.E., Crowell P.L. (1997) Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids*. 32(2): 151-156
- Eastman R.H., Kluger R.H. (2015) Isoprenoid [online]. Poslední revize 03.2015 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/296490/isoprenoid>
- Hosseinpour M. et al. (2014) Comparison of Apoptotic Inducing Effect of Zerumbone and Zerumbone-Loaded Nanostructured Lipid Carrier on Human Mammary Adenocarcinoma MDA-MB-231 Cell Line. *Journal of Nanomaterials*. 2014, Article ID 742738, 10 pages
- Ibrahim M.Y. et al. (2009) Attenuation of Cisplatin-Induced Hepatotoxicity in Rats Using Zerumbone. *Research Journal of Biological Sciences*. 4(7): 777-784
- Joo J.H., Jetten A.M. (2010) Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Letters*. 287(2): 123-135.
- Joo J.H., Liao G., Collins J.B., Grissom S.F., Jetten A.M. (2007) Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Research*. 67(16): 7929-7936
- Journe F. et al. (2008) Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation. *Breast Cancer Research and Treatment*. 107(1): 49-61
- Kuete V., Efferth T. (2013) Molecular determinants of cancer cell sensitivity and resistance towards the sesquiterpene farnesol. *Pharmazie*. 68(7): 608-615
- Kuttan G., Pratheeshkumar P., Manu K.A., Kuttan R. (2011) Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharmaceutical Biology*. 49(10): 995-1007
- Langhansova L., Hanusova V., Rezek J., Stohanslova B., Ambroz M., Kralova V., Vanek T., Lou J.D., Yun Z.L., Yang J., Skalova L. (2014) Essential oil from

- Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Industrial Crops and Products*. 59: 20-26.
- Lateef A. et al. (2013) Farnesol protects against intratracheally instilled cigarette smoke extract-induced histological alterations and oxidative stress in prostate of Wistar rats. *Toxicology International*. 20(1): 35-42
- Miguel K., Pradines A., Tercé F., Selmi S., Favre G. (1998) Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 273(40): 26179-26186
- Murakami A. et al. (2004) Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *International Journal of Cancer*. 110(4): 481-490
- Osowski C.M., Urano F. (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in Enzymology*. 490: 71-92
- Park J.S. et al. (2014) Farnesol induces apoptosis of DU145 prostate cancer cells through the PI3K/Akt and MAPK pathways. *International Journal of Molecular Medicine*. 33(5): 1169-1176
- Prasanna R. et al. (2012) Key cell signaling pathways modulated by zerumbone: Role in the prevention and treatment of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 84: 1268-1276
- Rahman H.S. et al. (2014) Biomedical Properties of a Natural Dietary Plant Metabolite, Zerumbone, in Cancer Therapy and Chemoprevention Trials. *BioMed Research International*. 2014:920742, 20 pages
- Sakinah S., Handayani T., Hawariah A. (2007) Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells via modulation of Bax/Bcl-2 ratio. *Cancer Cell International*. 7:4, 11 pages
- Scheper M.A., Shirtliff M.E., Meiller T.F., Peters B.M., Jabra-Rizk J.A. (2008) Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia*. 10(9): 954-963
- Songyan Z., Qiaojing L., Yanju L., Hong Q., Yu L. (2012) Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, induced apoptosis of pancreatic carcinoma cells through p53 signaling pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:936030, 8 pages

- Tsuboi K. et al. (2013) Zerumbone inhibits tumor angiogenesis via NF- κ B in gastric cancer. *Oncology Reports*. 31(1): 57-64
- Ullmann V. (2015) Biologické účinky ionizujícího záření [online]. Poslední revize 03.2015 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/RadiacniOchrana.htm>
- World Health Organization. (2014) Cancer country profiles 2014 [online]. Poslední revize 04.2015 [cit. 2015-03-25]. Dostupné z: <http://www.who.int/cancer/country-profiles/en/#C>
- Yodkeeree S., Bokyung S., Pornngarm L., Bharat B.A. (2009) Zerumbone Enhances TRAIL-Induced Apoptosis through the Induction of Death Receptors in Human Colon Cancer Cells: Evidence for an Essential Role of Reactive Oxygen Species. *Cancer Research*. 69(16): 6581-6589
- Zhang S., Liu Q., Liu Y., Qiao H., Liu Y. (2012) Zerumbone, a Southeast Asian Ginger Sesquiterpene, Induced Apoptosis of Pancreatic Carcinoma Cells through p53 Signaling Pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012:936030, 8 pages