

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

ANTIPROLIFERAČNÍ ÚČINEK OLEJE Z VOSKOVNÍKU  
ČERVENÉHO

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Pavčina Klímová

„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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum

Podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Věře Králové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, pomoc a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce. Za pomoc a ochotu bych také ráda poděkovala Prof. Lence Skálové, Ph.D., RNDr. Veronice Hanušové, Ph.D. a dalším pracovníkům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Pavlína Klímová

Školitel: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Název diplomové práce: Antiproliferační účinek oleje z voskovníku červeného

Voskovník červený, *Myrica rubra*, je ovocný strom rostoucí především v Číně. Používá se i v lidovém léčitelství. Jeho účinky jsou potvrzovány různými studiemi. V poslední době byla izolována silice z listu *Myrica rubra* (MRO) a její protinádorové účinky byly otestovány na několika střevních nádorových liniích. V této práci byl protinádorový efekt silice ověřen pomocí testu s neutrální červení na buněčných liniích SW480, SW620, HT29 a pro srovnání byla použita i nenádorová linie lidských fibroblastů GF 6. Nejcitlivější linií byla HT29, na GF 6 nebylo působení signifikantní. Byla testována také produkce ROS (reactive oxygen species) jako možný mechanismus účinku. Na buňkách linie HT29 byla účinkem silice tvorba ROS výrazně zvýšena, a to v závislosti na její koncentraci. Zkoumali jsme také, která z hlavních obsahových látek by mohla být zodpovědná za cytotoxický účinek silice. Testy byly provedeny se čtyřmi seskviterpeny –  $\alpha$ -humulenem,  $\beta$ -karyofylenem, karyofylen-oxidem a *trans*-nerolidolem. *Trans*-nerolidol snižoval proliferaci buněk HT29 při testu s neutrální červení nejvíce, následoval  $\alpha$ -humulen. Produkce ROS byla také nejvíc zvýšena po ovlivnění *trans*-nerolidolem, u buněk HT29 i u linie GF 6. Cytotoxický účinek silice je ale pravděpodobně zprostředkován kombinací několika obsažených látek. Následovaly testy na zjištění vlivu MRO, *trans*-nerolidolu a  $\alpha$ -humulenu na zastoupení fázi buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Působení silice i seskviterpenů vedlo k určitým změnám buněčného cyklu, ale tyto změny nebyly signifikantní.

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Pavlína Klímová

Supervisor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Supervisor specialist: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Antiproliferative effect of Chinese bayberry oil

Bayberry, *Myrica rubra*, is a fruit tree growing especially in China. It is also used in traditional medicine. There are many studies confirming its biological activities. Lately, *Myrica rubra* essential oil (MRO) was isolated from its leaves and its anticancer properties were tested in several intestinal cancer cell lines. In this study, the anticancer effect of MRO was verified by performing a neutral red uptake test in cell lines SW480, SW620, HT29 and in non-cancerous human fibroblast cell line GF 6 for comparison. HT29 was the most sensitive cell line, contrary to GF 6, which was not affected by MRO. We also tested a possible mechanism of action, a production of reactive oxygen species (ROS). The essential oil significantly elevated the generation of ROS and this effect was concentration dependent. We also searched for the active substances in MRO. We conducted the tests with four sesquiterpenes -  $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene-oxide and *trans*-nerolidol. The neutral red uptake test showed *trans*-nerolidol being the most effective substance in reducing proliferation of HT29, followed by  $\alpha$ -humulene. Also the ROS production was increased mostly by *trans*-nerolidol, in both HT29 and GF 6 cells. However, the cytotoxic effect is probably caused by a combination of constituents of the essential oil. Subsequently, we used flow cytometry to find out if MRO, *trans*-nerolidol and  $\alpha$ -humulene affected a distribution of cell cycle phases. The essential oil as well as sesquiterpenes slightly changed it but the changes were not significant.

## Obsah

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1. Kolorektální karcinom .....	8
2.1.1. Výskyt.....	8
2.1.2. Vznik CRC .....	9
2.1.3. Rizikové faktory vzniku a rozvoje CRC .....	13
2.1.4. Příznaky CRC.....	14
2.1.5. Screening CRC .....	15
2.1.6. Prognóza CRC .....	16
2.1.7. Terapie CRC.....	17
2.2. Voskovník červený.....	18
2.2.1. Taxonomie.....	18
2.2.2. Charakteristika druhu .....	18
2.2.3. Obsahové látky .....	19
2.3. Silice z listu <i>Myrica rubra</i> .....	22
2.3.1. Seskviterpeny .....	23
2.4. Další zástupci čeledi <i>Myricaceae</i> .....	30
3. CÍL PRÁCE .....	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	32
4.1. Materiál a chemikálie.....	32
4.2. Pomůcky a přístroje.....	32
4.3. Vybrané buněčné linie.....	33
4.4. Metody .....	34
4.4.1. Kultivace buněk.....	34
4.4.2. Příprava zkoušených roztoků .....	35
4.4.3. Test cytotoxicity s neutrální červení.....	36

4.4.4. Detekce ROS – metoda s DCF .....	38
4.4.5. Měření distribuce fází buněčného cyklu průtokovou cytometrií.....	39
4.4.6. Vyhodnocení výsledků .....	41
5. VÝSLEDKY .....	42
5.1. Vliv MRO na proliferaci a životnost buněk.....	42
5.2. Vliv vybraných seskviterpenů na proliferaci a životnost buněk .....	43
5.3. Prooxidační účinek MRO.....	44
5.4. Prooxidační účinek vybraných seskviterpenů .....	46
5.5. Měření buněčného cyklu po ovlivnění MRO.....	48
5.5. Měření buněčného cyklu po ovlivnění vybranými seskviterpeny.....	49
6. DISKUZE .....	51
7. ZÁVĚR .....	55
Seznam zkratk .....	56
Seznam použité literatury .....	57

## 1. ÚVOD

Rakovinná onemocnění představují jednu z nejčastějších příčin úmrtí. Mezi nejobvykleji se vyskytující zhoubné nádory se řadí kolorektální karcinom (CRC). Právě toto onemocnění je v České republice každoročně diagnostikováno u tisíců pacientů. Přestože se možnosti léčby CRC neustále vyvíjí a zlepšují, mortalita CRC je pořád vysoká (web 1). Žádné z používaných léčiv není ideální, nepůsobí spolehlivě na každý CRC a není bez nežádoucích účinků. Proto je třeba intenzivně hledat účinnější a bezpečnější léčiva.

Jedním ze zdrojů nových potencionálních léčiv jsou přírodní látky. Ty mohou být, jestliže se prokáže jejich farmakologické působení, používány jako léčiva buď přímo anebo mohou být chemicky upraveny, takže jsou používány parciálně syntetické látky. V roce 2010 bylo ve světě schváleno 20 nových léčiv v oblasti „malých molekul“, což znamená, že mezi tato léčiva nejsou započítány vakcíny ani tzv. biologická léčiva (velké peptidy nebo proteiny produkované biotechnologicky). Polovinu z oněch 20 léčiv představovaly látky buď přírodní anebo z přírodních látek odvozené. Důležitost přírodních zdrojů se dá demonstrovat i na dalším příkladu. Od čtyřicátých let 20. století do roku 2010 bylo schváleno 206 protinádorových léčiv. Nepočítají-li se mezi ně vakcíny a biologická léčiva, zůstane 175 léčiv. Z nich představovalo 131 léčiv, což je 74,9 %, buď přírodní, nebo přírodními látkami inspirované molekuly. Příkladem používaných protinádorových látek získaných právě z přírodních zdrojů může být vinblastin a vinkristin (Newman a Cragg 2012).

Intenzivně zkoumanou oblast přírodních látek představují rostlinné produkty. Mezi ně patří také silice. Ty jsou v lidovém léčitelství využívány k různým účelům již tisíce let. U některých látek obsažených v silicích již bylo protirakovinné působení dokázáno, například u limonenu, hlavní složky silice *Citrus sinensis*, a jeho metabolitu, perilylalkoholu (Başer a Buchbauer 2010).



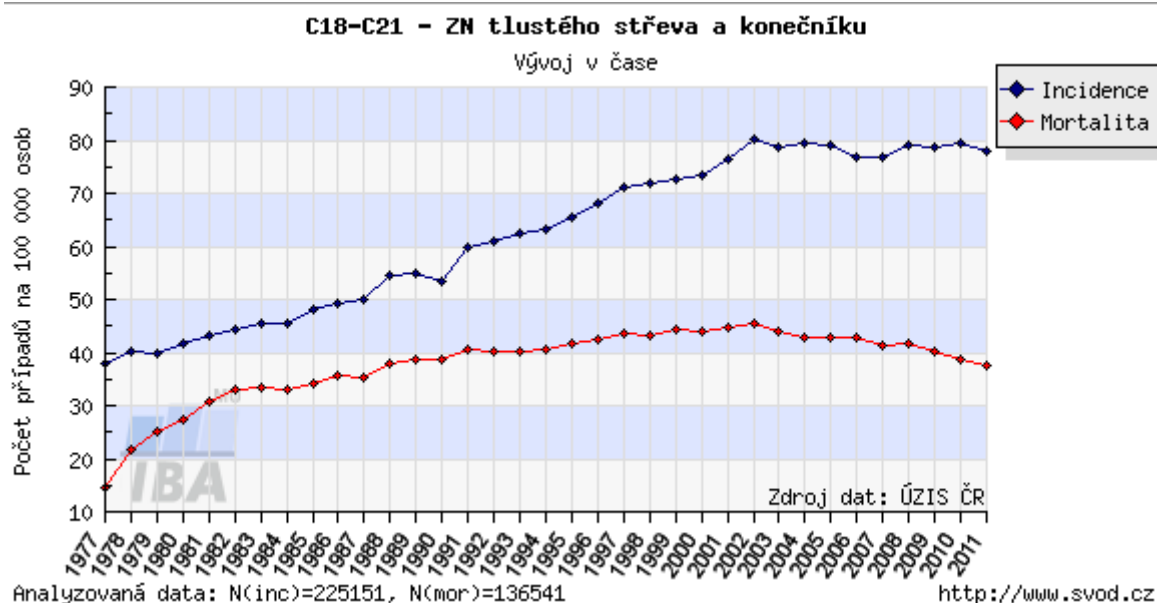
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC) je maligní nádor, který vzniká z buněk epitelu tlustého střeva a konečníku (Holubec 2004).

#### 2.1.1. Výskyt

CRC patří mezi nejčastější zhoubná onemocnění. Podle statistik bylo v roce 2011 v České republice nově hlášeno 8176 nemocných se zhoubným nádorem střeva a konečníku. V témže roce na tato onemocnění zemřelo 3961 lidí. Incidence od konce 70. let výrazně vzrostla a od roku 2001 do roku 2011 se pohybuje mezi 76 a 80 případy na 100 000 osob. Nejvyšší je v Plzeňském kraji (web 1).

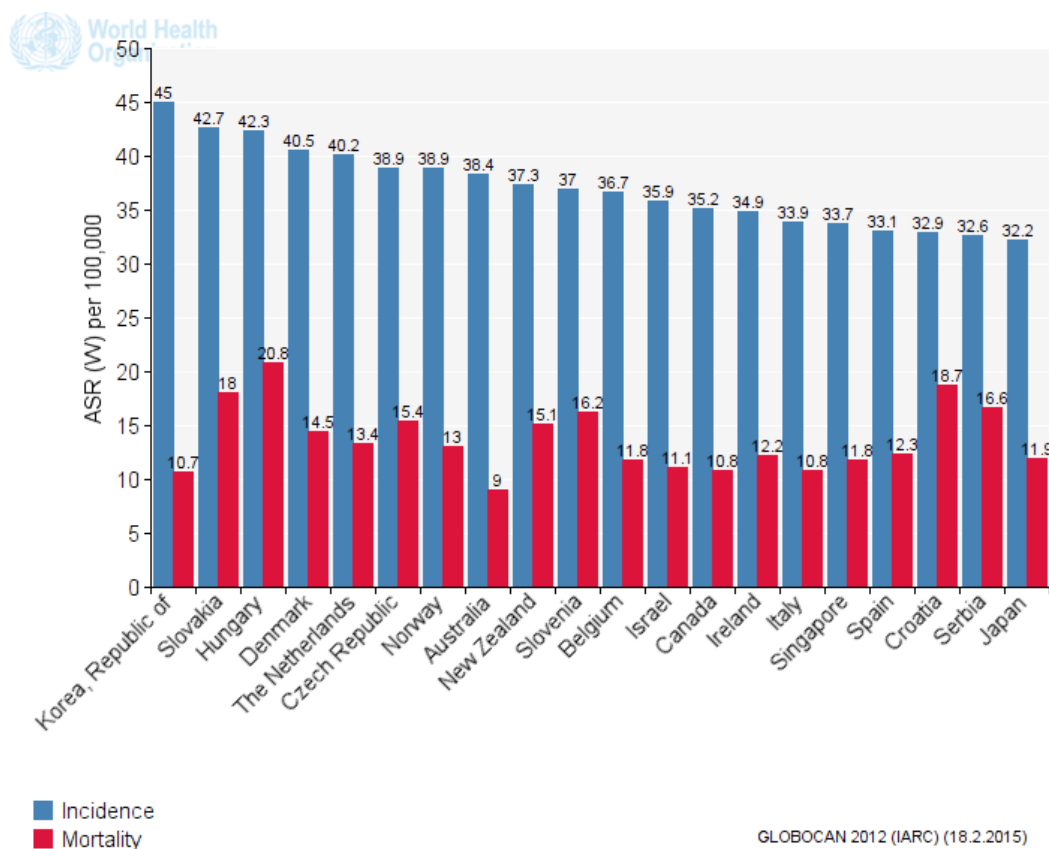


Obr. 1 Incidence a mortalita zhoubných onemocnění tlustého střeva a konečníku v letech 1977 až 2011, převzato z webu 1

Incidence CRC výrazněji stoupá od 50. roku života, nejvyšší je ve věku 70-74 let. Tyto malignity jsou v České republice častější u mužů, u kterých bylo v roce 2011 hlášeno 4755 nových případů zhoubných onemocnění tlustého střeva a konečníku, kdežto u žen 3421 (web 1).

Podle statistik GLOBOCAN 2012 jsou ve světě kolorektální nádory třetí nejčastější nádory u mužů a druhé nejčastější u žen. U mužů jsou frekventovanější

nádory plic a prostaty, u žen mají nejvyšší incidenci nádory prsu. Česká republika je na šestém až sedmém místě na světě z hlediska incidence, první je Korea, dále Slovensko, Maďarsko, Dánsko a Nizozemsko (web 2).



Obr. 2 Porovnání incidence a mortality kolorektálního karcinomu v různých zemích světa v počtech případů na 100 000 osob, rok 2012, převzato z webu 2

### 2.1.2. Vznik CRC

První detekovatelnou změnou kolorektální tkáně je aberantní kryptový fokus (ACF) (Kheirleisid et al. 2013). Jedná se o oblast střeva tvořenou rozšířenými kryptami, které jsou vystlané proliferujícím epitelem vyznačujícím se úbytkem obsahu mucinu (Holubec 2004). Makroskopicky se genetické změny na začátku nejčastěji projeví vznikem polypu. Polypy jsou útvary různého typu, liší se svým vzhledem, vlastnostmi a i rizikem zvrhnutí se v maligní nádor. Častým typem jsou adenomatózní polypy, benigní nádory, které se ve většině případů nepřemění na maligní. Adenomy rostou pomalu. S velikostí a dobou růstu se ovšem zvyšuje riziko zvrhnutí na adenokarcinom vlivem postupně kumulovaných mutací důležitých genů. K tomu dochází u méně než 10 % adenomů. Ale těchto 10 % představuje více než 95 % všech kolorektálních nádorů. Na karcinom se přemění zhruba za 8-10 let, pokud se nejedná se o onemocnění

nazývajícím se hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC), kdy se tato doba zkracuje na 2-3 roky. Karcinom dále roste a v poslední fázi metastazuje, nejčastěji do jater a plic. Kromě adenomů a adenokarcinomů se, méně často, objevují např. karcinoidy, maligní lymfomy nebo sarkomy (Holubec 2004, Jablonská 2000, web 3, web 4).

V roce 1990 Fearon a Vogelstein publikovali hypotézu, že za vznikem CRC stojí čtyři hlavní události. Tou první je mutace *APC* genu a tvorba adenomu. V dalším kroku mutuje i *K-RAS* a adenom roste. Poté dochází ke změnám na dlouhém raménku chromozomu 18 a adenom se dále vyvíjí. Čtvrtou hlavní událostí je inaktivace p53 a z adenomu vzniká adenokarcinom. V dnešní době je jasné, že mechanismus je složitější. Udává se, že ke tvorbě karcinomu je třeba alespoň 8-10 mutací (Jablonská 2000, Kanthan et al. 2012, Kheirleisid et al. 2013).

Ke vzniku CRC dochází vlivem mnoha změn v genomu. Tyto změny mohou být přítomny již v zárodečných buňkách jedince a přenášet se dědičně, v tom případě se jedná o dědičné syndromy. U jiných osob není přítomna zárodečná mutace, ale pravděpodobnost onemocnění CRC je zvýšena, protože se již tato choroba mezi jejich pokrevními příbuznými vyskytla. Tyto dvě skupiny představují 15-40 % postižených CRC. Ostatní pacienti nemají v rodinné anamnéze žádný výskyt CRC, jejich forma CRC je sporadická. Vyskytuje se v 60-85 % případů (Holubec 2004, Seifert 2012, Kheirleisid et al. 2013).

Na molekulární úrovni dochází ke změnám v genech nebo chromozomech. Z hlediska genů jsou klíčové tumor-supresorové geny, protoonkogeny a geny pro opravu chybného párování bazí. Produkty tumor-supresorových genů mají za úkol tlumit buněčnou proliferaci a v případě potřeby indukovat apoptózu buňky. Mutace se u těchto genů projeví až po zasažení obou alel. Tyto mutace mohou být zděděny, ale vznikají i během života. V případě dědičných mutací potomek získá 1 mutovanou alelu a s ní i vysokou pravděpodobnost, že bude mít dané onemocnění. Naproti tomu protoonkogeny a jejich produkty podporují buněčné dělení a růst a brání apoptóze. Dojde-li k mutaci alespoň u jedné alely protoonkogenu, vzniká onkogen. Taková mutace vzniká během života jedince a nemůže být dědičná (Jablonská 2000).

Příkladem tumor-supresorového genu je *APC* gen (adenomatous polyposis coli) nacházející se na dlouhém raménku chromozomu 5. Kóduje APC protein. Tento protein ve spolupráci s dalšími brání nadměrnému růstu a dělení buněk, ovlivňuje jejich adhezi, migraci a má úlohu i v chromozomální segregaci. Je součástí komplexu proteinů, díky

kterému je degradován  $\beta$ -katenin. Ten podporuje transkripci genů růstových faktorů, cyklinu D1 aj. Při mutaci *APC* genu je  $\beta$ -katenin neustále aktivní a transkripce oněch genů je tedy nadměrná. Méně časté jsou případy, kdy je *APC* gen v pořádku a mutuje  $\beta$ -katenin, čímž se stává odolným vůči odbourání (Kheirelseid et al. 2013, Kanthan et al. 2012, Markowitz a Bertagnolliová 2009). Mutace *APC* genu patří k prvním změnám probíhajícím při vzniku nádoru v kolorektu. Je přítomna až u 70 % sporadických adenokarcinomů. Také je zodpovědná za familiární adenomatózní polypózu (FAP), dědičný syndrom, při kterém dochází ke tvorbě polypů v kolon v nižším věku než u ostatní populace a také ve větším množství, mohou jich být stovky až tisíce. Mutací v *APC* genu bylo již určeno více než 700. Nejčastější je delece 5 nukleotidů. Tyto mutace většinou způsobí, že je APC protein příliš krátký a nemůže správně fungovat (Kheirelseid et al. 2013, web 4, web 5). Závažnost onemocnění závisí na konkrétní mutaci. Objevuje se i méně závažná varianta FAP, Gardnerův syndrom. *APC* gen je mutován i u zhruba dvou třetin pacientů s Turcotovým syndromem. U těchto nemocných se kromě polypů objevují i mozkové nádory. Taktéž u malého procenta aškenázských Židů je v pozici 1307 APC proteinu nahrazen isoleucin lysinem, což u nich zvyšuje riziko rakoviny kolon (web 5).

Dalším tumor-supresorem je protein p53. Jeho gen se nachází na krátkém raménku chromozomu 17. Tomuto proteinu se pro jeho funkci přezdívá strážce genomu. Při poškození DNA se aktivuje a indukuje produkci proteinu p21, který následně zastaví buněčný cyklus. Buňka tak dostane možnost poškození opravit. Pokud to není možné, dojde k apoptóze. Mutace genu *p53* se vyskytují až u 50 % všech primárních lidských nádorů. Co se týče kolorektálních nádorů, mutace *p53* jsou detekovány spíše u adenokarcinomů než u adenomů. Předpokládá se tedy, že jsou spojené s transformací na maligní stádium (Kheirelseid et al. 2013).

Mezi inaktivované antionkogeny patří také *TGF- $\beta$*  (transforming growth factor  $\beta$ ) a *DCC* (deleted in colorectal cancer). Inaktivace *DCC* genu není při vzniku CRC moc důležitá, pouze podporuje růst nádoru. Naproti tomu inaktivující mutace *TGF- $\beta$*  a jeho signalizace se objevují v době, kdy dochází k závažné dysplazii nebo ke vzniku karcinomu (Kheirelseid et al. 2013, Markowitz a Bertagnolliová 2009).

Jedním z důležitých onkogenů je K-RAS (Kirstein rat sarcoma) protein. Patří do rodiny RAS proteinů. Další izoformy jsou H-RAS a N-RAS. Tyto proteiny se účastní buněčné signalizace. Jejich působením dojde k aktivaci cesty mitogen-aktivovaných protein kinas, což vede např. k proliferaci buněk. Mutace v *K-RAS* bývají nejčastěji

bodové a vyskytují se ve zhruba 40 % CRC (Kheirelseid et al. 2013, Markowitz a Bertagnolliová 2009, Kanthan et al. 2012). Mutace se objevují i v další signální dráze, spojené s fosfatidylinositol-3-kinasou (PI3K). Mutace jedné z podjednotek, p110 $\alpha$ , je přítomna u asi jedné třetiny CRC. Méně častá je mutace proteinu PTEN (phosphatase and tensin homolog) inhibujícího tuto signální dráhu (Kanthan et al. 2012, Markowitz a Bertagnolliová 2009).

U některých genů nedochází pouze k mutacím, ale i k epigenetickým změnám, které mění expresi těchto genů bez změny v sekvenci DNA. Mezi tyto změny patří např. nadměrná methylace DNA, která inaktivuje zde umístěný gen. Methylace nukleotidů se zvyšuje s rostoucím věkem nebo třeba u lidí s chronickými záněty. Příkladem nadměrné methylace je methylace promotoru *MLH1* genu, jednoho z genů důležitých pro opravu chybného párování bazí (mismatch repair, MMR). První lidský MMR gen byl objeven v roce 1993, byl to gen *MSH2*. Další MMR geny jsou např. *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* a již zmiňovaný *MLH1* (Jablonská 2000, Holubec 2004). Při replikaci DNA se objevuje 1 chyba přibližně na 10<sup>7</sup> nukleotidů. Po opravě chybného párování se tato chybovost snižuje na 1 chybu na 10<sup>9</sup> replikovaných nukleotidů (Kheirelseid et al. 2013, Alberts et al. 1998). Při inaktivaci MMR genů se tedy zvyšuje frekvence výskytu mutací DNA. Mezi rizikovější oblasti DNA patří tzv. mikrosatelitové repetice. Jsou to krátké opakující se sekvence 1-10 nukleotidů. DNA polymeráza zde dělá chyby častěji než v jiných místech DNA, a tak při poškození MMR genů dochází ke zkrácení nebo prodloužení mikrosatelitových repetic. Tento jev se nazývá mikrosatelitová nestabilita. V tumorech s mikrosatelitovou nestabilitou jsou často mutované geny *TGF- $\beta$ RII*, *EGFR* (geny pro receptory TGF- $\beta$  a EGF) a *BAX*, které ve svých sekvencích obsahují mikrosatelitové repetice (Kanthan et al. 2012, Kheirelseid et al. 2013).

Nefunkční MMR geny se objevují v 15 % případů sporadických CRC. Jsou typické i u pacientů s HNPCC, jinak nazývaným Lynchův syndrom. Zde se jedná o zárodečnou mutaci jedné alely a somatickou inaktivaci druhé alely těchto genů. Inaktivace obou alel je nutná stejně jako u tumor-supresorových genů (Kanthan et al. 2012, Kheirelseid et al. 2013). Pacienti s HNPCC mívají CRC dříve než normální populace a trpí i na další nádory, např. dělohy, žaludku aj. Nepolypózní v tomto případě neznámá, že nemají vůbec žádné polypy, ale že počet polypů je u nich nízký (Jablonská 2000).

K nestabilitě dochází také na úrovni chromozomů. Objevuje se u 50–85 % CRC. Projevuje se ztrátou nebo získáním části chromozomu či změnou v počtu chromozomů, aneuploidií. Jednou z příčin je nesprávné oddělení chromozomů při buněčném dělení. To může být důsledkem mutace *APC* genu, který se podílí na zajištění správného přichycení chromozomů k mikrotubulům. Příkladem chromozomální nestability je ztráta dlouhého raménka chromozomu 18, kde je umístěn gen *DCC* a také geny podílející se na signalizaci proteinu TGF- $\beta$ . K tomuto jevu dochází u zhruba 70 % CRC (Kanthan et al. 2012).

Při metastazování buněk karcinomu hrají roli prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>), EGF (epidermal growth factor) a VEGF (vascular endothelial growth factor). Během vývoje adenomu je množství PGE<sub>2</sub> často zvýšené v důsledku vyšší exprese cyklooxygenasy 2 (COX2), k čemuž dochází u dvou třetin CRC. Také může dojít k inaktivaci 15-prostaglandindehydrogenasy, enzymu důležitého pro odbourání PGE<sub>2</sub>. Bývá inaktivní u 80 % kolorektálních adenomů a karcinomů. Jedním z efektů působení PGE<sub>2</sub> je aktivace EGFR a PI3K. EGF způsobuje růst střevních buněk přes signalizační dráhy s RAS proteiny a PI3K. Podporuje invazivitu karcinomu. VEGF je důležitý pro angiogenezi (Kanthan et al. 2012, Markowitz a Bertagnolliová 2009).

### **2.1.3. Rizikové faktory vzniku a rozvoje CRC**

Při vzniku onkologických onemocnění hraje největší roli životní styl. Významným faktorem nejen pro CRC je strava. Riziko představuje jak nadměrná konzumace negativně působících potravin, tak i nedostatečná konzumace těch prospěšně působících. Riziko CRC se zvyšuje častou konzumací červeného masa, např. hovězího, vepřového nebo jehněčího. Je ještě větší, je-li toto maso upraveno grilováním či smažením. Ke karcinomu přispívá i nadměrný příjem živočišných tuků, kdy dochází ke zvýšenému vylučování žlučových kyselin do střev. Ty mohou po kontaktu s epitelem způsobovat jeho nadměrnou proliferaci. To ovšem neplatí pro konzumaci ryb (Seifert 2012, Jablonská 2000, Adam et al. 2011). Pravděpodobně pozitivně působí vláknina, ale hodnocení jejího vlivu je problematické, a také česnek. Pouze omezené důkazy jsou pro luštěniny, foláty a selen (Adam et al. 2011). Nejistý je i protektivní účinek vápníku, který chrání pravděpodobně díky neutralizaci žlučových kyselin (Holubec 2004).

Negativně působí častá konzumace alkoholu, při čemž riziko roste od dávky 30 g za den, a kouření. Předpokládá se, že kouření způsobuje 29-38 % všech nádorů

v Evropě (Adam et al. 2011). Dalšími obecnými riziky, nejen pro CRC, jsou obezita a s ní související nedostatek pohybové aktivity. Poslední dva uvedené rizikové faktory jsou časté u osob s onemocněním diabetes mellitus 2. typu, u kterého je incidence CRC také vyšší. Mezi onemocnění, která také mohou přispět k CRC, patří střevní záněty, ulcerózní kolitida a Crohnova choroba. Při nich jsou častější dysplazie epitelu, které mohou vést k CRC (Seifert 2012, web 4).

Vyšší riziko CRC může být spojeno i s předchozím prodělaným nádorovým onemocněním, např. s rakovinou dělohy, varlat nebo CRC spojenými s ozařováním pánve, nebo pokud se CRC nebo kolorektální adenomy vyskytly u blízkých příbuzných (Seifert 2012, web 4).

Výskyt CRC je vyšší u osob starších 50 let, neboť jsou exponovány negativním vlivům delší dobu než mladí lidé a dochází ke kumulaci mutací. Pokud se CRC vyskytuje u osob mladších, bývá zde souvislost s dědičným onemocněním typu FAP nebo HNPCC. U těchto osob je nutné častější sledování než u běžné populace (Jablonská 2000, web 4).

Je tedy zřejmé, že CRC se dá předcházet správným životním stylem – vhodným stravováním, dostatkem fyzické aktivity, nekouřením a v neposlední řadě pravidelným absolvováním screeningových testů, jako je test na přítomnost okultního krvácení do stolice (TOKS) a kolonoskopie (Seifert 2012, web 6).

#### **2.1.4. Příznaky CRC**

Kolorektální karcinomy se obvykle ze začátku neprojevují žádnými příznaky. Později se mohou začít objevovat různé symptomy, ale záleží na konkrétním pacientovi a konkrétním karcinomu. Jedním z příznaků je krev ve stolici, která, pokud není zřejmá, může být detekována TOKS. Pokud je krvácení přítomno delší dobu, dojde k anémii a objeví se s ní související symptomy – únava a slabost. U nemocného se střídá zácpa, která je typická pro levostranně umístěné nádory, a průjemy. Může mít pocit nucení na stolici, ale po vyprázdnění nemá pocit úlevy. Nespecifickým symptomem je bolest břicha a nadýmání. Většinou až u pokročilých nádorů pacient ztrácí na váze (web 4, web 7).

### 2.1.5. Screening CRC

Screening je vyhledávání nemocných ale asymptomatických osob, případně osob s rizikem onemocnění, pomocí různých testů nebo metod, které mají usnadnit rozpoznávání těchto jedinců v populaci (Seifert 2012).

Mezi screeningové testy na výskyt CRC nebo kolorektálních polypů, které se používají v České republice, patří TOKS nebo kolonoskopické vyšetření. TOKS by měl být prováděn každý rok nebo dva od 50 let do 55 let, od 55 let s možností výběru mezi kolonoskopií, která by se měla opakovat po 10 letech, a TOKS, který by se měl opakovat každé dva roky (Seifert 2012).

Jsou dva typy TOKS, guajakový a imunochemický. Guajakový test je založen na pseudoperoxidasové aktivitě hemoglobinu. Z toho důvodu jsou při testování nutná dietní opatření – nevhodné jsou např. prejt a jelito, protože mohou obsahovat zvířecí krev, nebo křen. Testuje se 6 vzorků z 3 odběrů stolice. Senzitivita testu se pohybuje mezi 19-50 %, ale vyšší je při opakování testu. Specifita testu je 96-98 %. Guajakový test je levný a snadno proveditelný, proto se v dnešní době používá nejčastěji. Další test, imunochemický, je založen na reakci hemoglobinu se specifickou protilátkou, nemusí se tudíž dodržovat taková dietní opatření jako u předchozího testu. Provádí se pouze z jednoho vzorku stolice (Seifert 2012, Adam et al. 2011). Jak guajakový, tak imunochemický test ale potřebují k prokázání polypu nebo karcinomu krev. Krvácí ale jen polypy větší než dva cm nebo až CRC (Adam et al. 2011).

I nekrvácějící polypy ale může zachytit další screeningová metoda, kolonoskopie. Je při ní zkontrolováno jak rektum, tak i tlusté střevo. Při tomto vyšetření má lékař možnost okamžitě odstranit přítomné polypy a předejít tak dalším problémům. Nevýhodou této metody jsou vyšší finanční náklady než u TOKS, nižší ochota pacientů podstoupit toto vyšetření a riziko krvácení a perforace střeva, které je ovšem velmi malé (Seifert 2012).



## 2.1.6. Prognóza CRC

Prognóza pacientů závisí na stádiu, ve kterém je CRC diagnostikován. Bylo vytvořeno několik systémů klasifikace, z nichž nejpoužívanější je TMN staging. Vytvořila ho American Joint Committee on Cancer (AJCC). T (z anglického tumour - nádor) značí, jak moc se nádor rozrostl. N (z anglického node – uzlina) určuje postižení lymfatických uzlin. M (z anglického metastasis – metastáza) znamená přítomnost metastáz v těle. K těmto písmenům jsou přiřazena čísla, která udávají závažnost postižení, viz Tab. 1 (web 4).

Dle TMN klasifikace se karcinomy zařazují do stádia 0 až IV. Také se z pozorování nádorových buněk pod mikroskopem hodnotí, jak moc se buňky liší od normálních buněk tkáně. Podle toho jsou potom označovány buď G1, což značí buňky podobné normálním, G2 nebo G3, kdy už jsou buňky odlišné, anebo G4, kdy jsou již velmi abnormální. Toto rozřazení se nazývá grading (web 4).

Dále se kolorektální karcinomy třídí dle Dukesovy klasifikace, která je nejstarší. U typu A je postižena mukosa, příp. submukosa nebo až muscularis propria, u typu B už karcinom prorůstá skrz muscularis propria, u typu C jsou postiženy lymfatické uzliny. Typ D byl přidán později, při něm jsou již přítomny metastázy (Holubec 2004).

Tab. 1 TMN klasifikace

Tx	není dostatek informací pro popis rozsahu tumoru
Tis	tzv. karcinom in situ, postižena je pouze mukosa
T1	postižena je i submukosa
T2	postižena je i muscularis propria
T3	postiženy jsou vnější vrstvy střeva, ale tumor se zatím nedostal skrz serosu
T4a	tumor prorostl skrz serosu
T4b	tumor prorostl skrz serosu a dostává se i do přilehlých tkání
Nx	není dostatek informací
N0	přilehlé lymfatické uzliny jsou bez nálezu nádorových buněk
N1a	nádorové buňky se nacházejí v 1 okolní lymfatické uzlině
N1b	nádorové buňky jsou ve 2-3 blízkých lymfatických uzlinách
N1c	nádorové buňky nebyly nalezeny v lymfatických uzlinách, ale v oblastech tuku blízko nich
N2a	postiženo je 4-6 lymfatických uzlin
N2b	postiženo je 7 a víc lymfatických uzlin
M0	bez metastáz
M1a	metastázy jsou přítomny v jednom vzdáleném orgánu nebo v jedné vzdálených lymfatických uzlinách
M1b	metastázy jsou ve více vzdálených orgánech nebo lymfatických uzlinách nebo ve vzdálené části peritonea

### 2.1.7. Terapie CRC

Léčba kolorektálního karcinomu je u každého pacienta volena individuálně, závisí na vlastnostech konkrétního karcinomu. Základem jsou chirurgické postupy, ozařování, chemoterapie a v posledních letech i biologická léčba (web 19).

Doporučené postupy pro české onkology jsou shrnuty v tzv. Modré knize. U stadia 0 je dostačující chirurgické odstranění karcinomu. U stadia 1 (T1, příp. T2, N0, M0), odpovídajícímu Dukesovu typu A, se také využívá chirurgické řešení. Další stádium (T3, příp. T4, N0, M0), podle Dukese typ B, je opět řešeno chirurgicky. Zde ale následuje chemoterapie, která se liší podle toho, jestli se jedná o karcinom rekta nebo kolon. Pokud se k chemoterapii používá i radioterapie, potom se jedná o tzv. konkomitantní léčbu (Holubec 2004). V některých případech je nutné před operací karcinom zmenšit, takže chemoterapie a případně i ozařování operaci předchází - léčba je neoadjuvantní. Stejně postupy se používají i u stadia 3 (T1-T4, N1, N2, M0), Dukesova typu C. U posledního, čtvrtého stádia, kdy jsou přítomny metastázy, je v případě neoperovatelného tumoru užívána paliativní chemoterapie, biologická léčba a léčba metastáz (web 19).

Léčiva, aplikovaná při chemoterapii kolorektálního karcinomu, se používají buď samostatně anebo v kombinacích. V monoterapii je možné podat kapecitabin (analog pyrimidinových nukleotidů), irinotekan (cytostatikum inhibující topoizomerasu I), 5-fluorouracil (analog pyrimidinových nukleotidů) a oxaliplatinu (cytostatikum vázající se na DNA). Pro pojmenování kombinací léčiv jsou užívány zkratky – FOLFIRI (irinotekan, 5-fluorouracil a leukovorin), XELIRI (kapecitabin, irinotekan), FOLFOX (oxaliplatina, 5-fluorouracil, leukovorin), XELOX (kapecitabin, oxaliplatina), FLOX (oxaliplatina, 5-fluorouracil, leukovorin - ale v jiném dávkování než FOLFOX) a FU/FA (5-fluorouracil, leukovorin). Monoterapie i kombinace mají přesně dané dávkování, způsob podání (bolus nebo kontinuální podání) a opakování cyklu (web 19, Mladěnka 2013a).

Nežádoucí účinky se u jednotlivých chemoterapeutik různí, patří mezi ně např. ztráta vlasů, nechutenství, stomatitida, nevolnost a zvracení, průjem, změny v krevním obraze a s tím související infekce a únava (web 4).

Biologická léčba se používá u posledního stádia CRC, a to v kombinaci s chemoterapií, což je častější, nebo v monoterapii. Mezi užívaná léčiva patří cetuximab a panitumumab (protilátky zaměřené na signální kaskádu EGF), bevacizumab

(protilátka zaměřená na VEGF), regorafenib (inhibitor proteinkinás) a aflibercept (rekombinantní fúzní protein vážící se na ligandy VEGFR). Cetuximab ani panitumumab nelze použít, pokud jsou mutované geny *K-RAS* a *N-RAS*, protože je EGF signální kaskáda spuštěna i přesto, že je EGFR blokován. Tyto onkogeny jsou mutované u zhruba poloviny pacientů. Před nasazením cetuximabu a panitumumabu je tedy nutný test na přítomnost této mutace (web 19, Mladěnka 2013b).

Přestože je biologická léčba zaměřena na struktury exprimované v nádorových buňkách ve větší míře než v buňkách zdravých, vyskytují se u ní závažné nežádoucí účinky. U regorafenibu, afliberceptu a bevacizumabu je to například krvácení a gastrointestinální perforace. Často se objevují vyrážky. Při léčbě cetuximabem k tomu dochází u více než 80 % pacientů (web 14).

## 2.2. Voskovník červený

### 2.2.1. Taxonomie

Voskovník červený, *Myrica rubra* (web 8), je jedním z druhů čeledi *Myricaceae*. Do této čeledi jsou zařazeny jednodomé nebo dvoudomé stromy či keře. Jejich listy jsou jednoduché, mají střídavé uspořádání a obsahují siličné žlázy. Plody jsou buď peckovice anebo nažky (web 9).

Čeď *Myricaceae* zahrnuje rody *Comptonia*, *Morella* a *Myrica*. Mnoho druhů, které byly dříve řazeny do rodu *Myrica*, bylo přejmenováno a přesunuto do rodu *Morella*. V literatuře je u některých zástupců nejednotné označování a jsou používány obě varianty – např. *Myrica faya/Morella faya* nebo *Myrica rubra/Morella rubra* (web 10, web 11).

### 2.2.2. Charakteristika druhu

*Myrica rubra*, anglicky bayberry (waxberry) a čínsky Yangmei (Kang et al. 2012), je ovocný strom. Přirozeně roste v Číně. Mezi místním obyvatelstvem je velmi oblíben pro své chutné plody. Ty se buď konzumují přímo, čerstvé či sušené, nebo se používají na výrobu džusů, džemů a dalších zavařenin, popř. sladkostí. Z toho důvodu je strom komerčně hojně pěstován a představuje ekonomicky hodnotnou rostlinu. Hlavními provinciemi z hlediska produkce jsou Zhejiang, která je také nejvýznamnější

z hlediska množství kultivarů a kvality plodů, Jiangsu, Fujian, Gongdong, Jiangxi, Anhui, Hunan a Guizhou (He et al. 2004). Určeno bylo 305 kultivarů, např. Biji, Dongkui, Ding-ao, Shuimei a Wandao (Kang et al. 2012). Kultivary se od sebe liší především barvou plodů, dobou zrání plodů a vzrůstem stromu (He et al. 2004).



Obr. 3 Plody *Myrica rubra*, převzato z webu 21

Jako každá rostlina, potřebuje i *Myrica rubra* ke svému růstu vhodné podmínky. Roste pouze tam, kde teplota neklesá pod 9°C. Nejvíce se tomuto stromu daří, dosahují-li průměrná roční teplota hodnoty 14°C. Vhodné je vlhké a stinné prostředí. Dostatek vláhy je důležitý především v červnu, a to pro kvalitu i množství plodů. *Myrica rubra* může růst i v neúrodné půdě horských oblastí – díky symbióze s mikroorganismem rodu *Frankia* umožňující fixaci dusíku z půdy. Strom je odolný ke škůdcům, nemocem i smogu (He et al. 2004).

V Číně je *Myrica rubra* využívána k různým účelům déle než 2000 let (Sun et al. 2013). Většina publikované literatury je tedy v čínštině, tudíž tato rostlina není v zahraničí moc známá (He et al. 2004).

*Myrica rubra* se také, ale v menší míře, pěstuje v Thajsku, Japonsku, Jižní Koreji, na Filipínách, v Evropě a Americe, především pro okrasné účely (He et al. 2004).

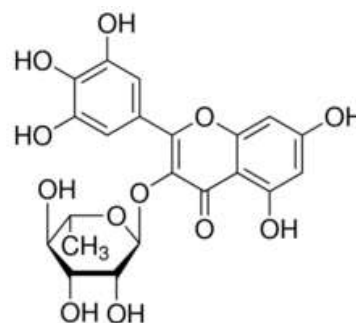
### 2.2.3. Obsahové látky

*Myrica rubra* obsahuje množství různých obsahových látek. V následujícím textu jsou zmíněny pouze některé z nich. Intenzivně zkoumanou skupinou látek jsou flavonoidy. Strukturně se jedná o deriváty fenylochromanu (Siatka 2012). V *Myrica rubra* se nacházejí v plodech, listech i kůře. Kromě nich budou zmíněny i diarylheptanoidní glykosidy, sloučeniny obsahující dva aryly spojené sedmi uhlíkatým řetězcem. Ty jsou obsaženy v listech a kůře. Příklady těchto látek jsou v Tab. 2.

**Tab. 2** Příklady látek zmiňovaných v následujícím textu a jejich zařazení mezi flavonoidní sloučeniny nebo mezi diarylheptanoidní glykosidy

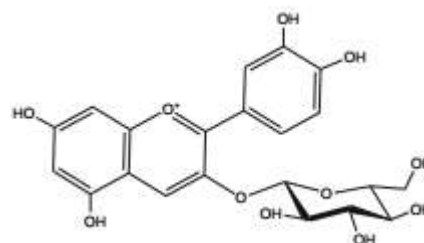
Flavonoidy	Myricitrin Cyanidin-3- <i>O</i> -glukosid Kvercetin-3- <i>O</i> -glukosid Prodelfinidin B-2 3,3'-di- <i>O</i> -galát
Diarylheptanoidní glykosidy	<i>S</i> -myricanol 5- <i>O</i> -β-D glukopyranosid

Mezi flavonoidy patří např. myricitrin, který má antioxidační schopnosti a působí protizánětlivě (Shimosaki et al. 2011). Aglykonem myricitrinu je myricetin. Myricetin je obsažen v plodech, listech i kůře *Myrica rubra*. Má např. schopnost tlumit aktivitu acetyl-CoA:arylalkylamin-N-acetyltransferasy, enzymu účastnícího se tvorby melatoninu. Má tedy potenciální využití u lidí s poruchami cirkadiálního rytmu (Shin et al. 2013).



**Obr. 4** Vzorec myricitrinu, převzato z webu 20

Dalšími flavonoidními sloučeninami plodů *Myrica rubra* je skupina látek označovaných jako anthocyany. Jsou to rostlinná barviva (Siatka 2012). Anthocyany mají antioxidační účinky a mají tedy možné využití v léčbě či prevenci onemocnění, která souvisí s oxidativním stresem (rakovina, srdečně cévní onemocnění) (Qin et al. 2011). Díky obsahu anthocyanů, jako je cyanidin-3-*O*-glukosid (C3G), mají zralé plody *Myrica rubra* kultivaru Biqi červenou barvu. Barvy plodů *Myrica rubra* a i obsah anthocyanů se u jednotlivých kultivarů liší, u kultivaru Fenghong jsou růžové, u Shuijing bílé. Záleží také na zralosti plodu (Sun et al. 2013). Při testování extraktu z plodu s vysokým obsahem C3G byly prokázány dobré antidiabetické účinky – zvyšoval glukózovou toleranci, díky zvýšení tvorby inzulínu snižoval glykémii a chránil β buňky (Sun et al. 2013). C3G byl také testován na buněčných liniích SGC7901, AGS, BGC823 (lidské žludeční nádorové linie). Po jeho 24 hodinovém působení bylo pozorováno snížení



**Obr. 5** Vzorec cyanidin-3-*O*-glukosidu, převzato z práce Suna et al. 2013

proliferace a adherence buněk, pyknóza jádra a smrštění buněčné membrány (apoptóza). C3G inhiboval expresi matrixové metaloproteinasy 2, enzymu podílejícího se na metastazování nádorů pomocí štěpení extracelulární matrix (Sun et al. 2012).

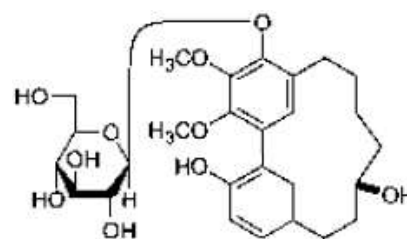
Ethanolový extrakt získaný z plodů *Myrica rubra*, obsahující flavonoidní sloučeniny, měl *in vitro* schopnost vychytávat volné radikály. *In vivo*, při pokusu na potkanech, byla zjištěna indukce antioxidantních enzymů, superoxid-dismutasy a katalasy, a zvýšení hladiny glutathionu. Navíc se snížil výskyt ACF (Yang et al. 2011).

Další využití plodů *Myrica rubra* je v lidovém léčitelství. Používají se při průjemových onemocněních. Studie dokládají antibakteriální účinky obsahových látek. C3G, myricetin deoxyhexosid, kvercetin deoxyhexosid a kvercetin-3-*O*-glukosid potlačuje množení bakterií rodu *Salmonella* a *Shigella*, častých bakteriálních původců průjmů (web 15). Kvercetin navíc tlumí peristaltiku tenkého střeva (Yao et al. 2011).

Čerstvé plody kromě flavonoidních látek dále obsahují vitaminy, cukry, organické kyseliny, draslík a stopové prvky (Fe, Mn, Zn, Cu, Mg) (He et al. 2004).

Kromě plodů se flavonoidy, jak už bylo řečeno, vyskytují i v kůře *Myrica rubra*. Příkladem je prodelfinidin B-2 3,3'-di-*O*-galát (PB233'OG). Působí antiproliferačně na buňky lidského nemalobuněčného karcinomu plic (A-549). Dochází při tom ke zvýšení tvorby p21/WAF1 (protein tlumící aktivitu některých cyklin dependentních kinas), Fas/APO-1 receptoru a Fas ligandu (FasL), navíc, pravděpodobně díky proteinu p21/WAF1, i k zastavení buněčného cyklu ve fázi G0/G1 (Kuo et al. 2004a). Buňky MCF-7 (lidský adenokarcinom prsu) reagují na PB233'OG taktéž zvýšenou expresí Fas/APO-1 receptoru a FasL, důsledkem je cytotoxicita (Kuo et al. 2004b). PB233'OG má i účinek proti viru herpes simplex typu 2 (Sun et al. 2013).

V kůře se také nachází diarylheptanoidní glykosidy bifenylového typu, např. *S*-myricanol 5-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosid. Byl testován jejich účinek proti uvolnění histaminu. Silně působily aglykony (myricanol, myricanon, myricanen A, myricanen B) a flavonoid myricetin, glykosidy byly slabé (Matsuda et al. 2002). Myricanol 11-*O*- $\beta$ -D-glukopyranosid a 4



Obr. 6 Diarylheptanoidní glykosid myricanol glukosid, převzato z práce Matsuda et al. 2002

další obsažené diarylheptanoidní glykosidy vykazovaly dobrou schopnost inhibice melanogeneze a zároveň nízkou toxicitu při testu na buňkách myšního melanomu (B16). Jiné testované látky, myricanol, myricanon a myricitrin, působily silně toxicky (Akazawa et al. 2010). Další zástupce diarylheptanoidů, rubanol, působil cytotoxicky na

buňky Bre-04 (lidský karcinom prsu), Lun-06 (lidský karcinom plic) a Neu-04 (lidský neurom) (Sun et al. 2013).

Kůra se v lidovém léčitelství používá při průjmech, jako antidotum při otravě arsenem (He et al. 2004), na některá onemocnění kůže a popáleniny (Morikawa 2006). Využití ale nachází i při barvení nebo v koželužnictví (Sun et al. 2013), a to díky obsahu taninů (He et al. 2004).

Extrakty z kůry i z listu mají schopnost vychytávat volné radikály, a to především díky fenolickým sloučeninám. Při pokusu na buňkách MDCK inhiboval extrakt z listu množení viru chřipky (Sun et al. 2013).

### **2.3. Silice z listu *Myrica rubra***

Silice jsou těkavé, intenzivně vonící směsi přírodních rostlinných látek olejovité konzistence (Hubík et al. 1986). Nejfrekventovaněji obsaženou skupinou látek jsou terpenoidní sloučeniny, které jsou značně strukturně rozmanité. Rostliny, které silice produkují, se tímto způsobem pravděpodobně snaží chránit před škůdci nebo přitahovat hmyz, který dané rostliny opyluje. Silice se získávají z různých rostlinných částí (květů, listů, plodů i kůry) nejčastěji pomocí destilace nebo lisování za studena. První použití přístroje pro izolaci silice je datováno okolo roku 3500 před naším letopočtem. Tyto těkavé směsi byly ve starověku využívány pro léčení, sloužily jako koření a jako suroviny pro výrobu parfémů. V Egyptě byly používány při mumifikacích. V dnešní době nacházejí uplatnění v potravinářství, kosmetickém a chemickém průmyslu, ve farmacii, aromaterapii a lidovém léčitelství. Silice byly systematicky zkoumány od 19. století. V dnešní době je známo, že silice mají z medicínského hlediska řadu významných biologických účinků např. antimikrobní, kdy působí jak na bakterie, tak na viry i houby, protinádorové, protizánětlivé, antioxidační i prooxidační, stimulují trávení a diurézu a dokonce podporují rozpad žlučnickových a ledvinových kamenů. Přisuzuje se jim i působení na lidskou psychiku, některé údajně působí zklidnění a některé stimulují, ale hodnocení takovýchto účinků je značně problematické. Silice jsou využívány i u zvířat, např. jako antiparazitika a repelenty (Bártíková et al. 2014, Başer a Buchbauer 2010).

Protinádorový účinek silic by mohl být založen na jejich antioxidační a s ní související antimutagenní schopnosti, dále na schopnosti posilovat imunitu jedince a indukovat jeho vlastní detoxifikační enzymy, např. glutathion-S-transferasu (GST) a

UDP-glukuronyltransferasu, u zdravých buněk (Bhalla et al. 2013). Naopak, jedná-li se o buňky nádorové, pro organismus je ochranné antiproliferační působení, jejich prooxidační účinek a deplece antioxidantních enzymů vedoucí k apoptóze buněk (Sperotto et al. 2013).

Silice z listu *Myrica rubra* (MRO) byla získána z čerstvých listů destilací vodní parou. Složení bylo následně analyzováno pomocí GCxGC-TOFMS. Bylo zjištěno, že hlavní složkou silice jsou seskviterpeny, konkrétně  $\beta$ -karyofylen (43,2%),  $\alpha$ -humulen (21,6%), valencen (6%),  $\beta$ -karyofylen-oxid (2,6%) a *trans*-nerolidol (1,9%). Byly otestovány antiproliferační účinky této silice. Na buňky střevních nádorových linií HCT8, Caco2, HT29, SW620 a SW480 působila cytotoxicky, ale tento účinek se neprojevil u nenádorových buněk potkaních hepatocytů. Dále byla zjištěna zvýšená aktivita kaspáz 8, 9, 3 a 7 (Langhansová et al. 2014).

### 2.3.1. Seskviterpeny

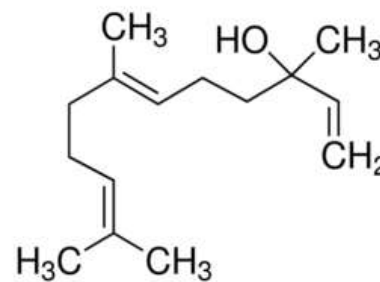
Seskviterpeny jsou podskupinou terpenoidů. Terpenoidy jsou sloučeniny tvořené z izoprenových jednotek. Jedna izoprenová jednotka obsahuje 5 uhlíkových atomů. Seskviterpeny jsou ze tří izoprenových jednotek, mají tedy 15 atomů uhlíku. Jednotky jsou navzájem spojeny tak, že buď tvoří lineární řetězce anebo kruhy. Některé terpeny obsahují i kyslíkové atomy. V tom případě se jedná např. o alkoholy, ketony nebo aldehydy (Paduch et al. 2007).

Seskviterpeny se objevují v rostlinách, houbách i v bezobratlých živočiších (Bártíková et al. 2014). Jejich zástupci působí např. antioxidantně, antibakteriálně, protizánětlivě a protirakovinně (Vinhole et al. 2014). Také byly pro svou schopnost měnit uspořádání lipidů a interagovat s proteiny *stratum corneum* zkoušeny jako akceleranty transdermální penetrace (pro usnadnění prostupu léčiv přes kůži) (Hrabálek et al. 1999). Jejich výhodou je nízká systémová toxicita a pouze malé dráždění kůže. Příkladem takové látky je nerolidol (Paduch et al. 2007).



### 2.3.2.1. *Trans-nerolidol*

Systematický název *trans-nerolidolu* je (*E*)-3,7,11-trimethyldodeka-1,6,10-trien-3-ol, triviálně se také označuje jako peruviol nebo melaleucol (Lapczynski et al. 2008). *Trans-nerolidol* jedním ze stereoisomerů seskviterpenického alkoholu nerolidolu. Ze struktury vyplývá, že se jedná o látku hydrofobní. Díky této vlastnosti snadno přechází přes plazmatické membrány (McGinty et al. 2010).



Obr. 7 Strukturální vzorec *trans-nerolidolu*, převzato z webu 20

*Trans-nerolidol* je světle žlutá až žlutá kapalina. Má slabou květinovou vůni, jako růže a jablko. Byla povolena FDA do kosmetických přípravků jako látka pro posílení vůně, takže ji můžeme najít např. v toaletních vodách, šamponech, ale i v čistících prostředcích a detergentech (Lapczynski et al. 2008). Celosvětově se jí spotřebuje více než 10 tun ročně (McGinty et al. 2010). *Trans-nerolidol* působí proti *Microsporium gypseum* (antifungální úč.), je aktivní proti larvám červů druhu *Anisakis*, proti prvokům *Leishmania amazonensis* a *Plasmodium falciparum* (u nichž inhibuje biosyntézu isoprenoidů), dále se jedná o antiulcerózum (Aboulaila et al. 2010, Sperotto et al. 2013). Cytotoxicita *trans-nerolidolu* byla zjišťována na kmenech *Saccharomyces cerevisiae* a signifikantní byla od koncentrace 25 µg/ml. Zároveň se prokázalo, že tato látka není mutagenní. Po působení *trans-nerolidolu* bylo patrné zvýšení produkce ROS (reactive oxygen species) (Sperotto et al. 2013). Účinek *trans-nerolidolu* byl také testován na izolovaných jaterních mitochondriálních frakcích. Došlo ke snížení aktivity ATPasy, tudíž i k poklesu ATP. Tento efekt byl závislý na koncentraci *trans-nerolidolu* (Ferreira et al. 2012). Při pokusu na buňkách HepG2 (buňky hepatomu) došlo k potlačení proliferace buněk, snížila se jejich životaschopnost, zvýšila se aktivita dýchacího řetězce a snížila se efektivita fosforylace (Ferreira et al. 2012). Nerolidol (nespecifikovaný izomer) tlumil růst i u buněk B16. V kombinaci s farnesolem byl účinek větší, dohromady látky vedly i k apoptóze buněk (Tatmanová a Moová 2002).

*Trans-nerolidol* je kromě MRO obsažen v silicích dalších rostlin, např. *Ocimum basilicum*, kde se jedná o hlavní složku silice (Bhalla et al. 2013), nebo *Piper gaudichaudianum*. *Piper gaudichaudianum*, *Piperaceae*, je keř rostoucí v Brazílii, Argentýně a Paraguayi, nazývaný také „Jaborandi“. Používá se v lidovém léčitelství. Nálevy z listů a čerstvé listy na bolest zubů, kořeny na onemocnění jater a na záněty. Extrakt z listů má fungicidní, analgetické a antiflogistické účinky (Sperotto et al. 2013).

Silice vykazuje cytotoxické působení na buňky V79 (buněčná linie plicních fibroblastů odvozená z čínských křečků). V tomto účinku hrají důležitou roli ROS (Péres et al. 2009). V silici jsou obsaženy především terpeny, nejvíc *trans*-nerolidol (22,06 %) a  $\alpha$ -humulen (21,32 %) (Sperotto et al. 2013).

Další rostlinou, ve které se nerolidol vyskytuje, je *Chamaecyparis obtusa*, cypřišek tupolistý z čeledi *Cupressaceae*. Je jednou ze složek silice zodpovědných za její účinek proti *Trichophyton mentagrophytes* (antifungální působení) (web 16, Park et al. 2009).

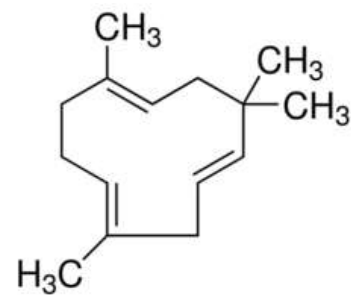
*Momordica charantia*, čeleď *Cucurbitaceae*, je plazivá rostlina pěstovaná po celém světě jako zelenina. Lidově se používá např. pro své antidiabetické, antivirové, antimikrobní, a anthelmintické vlastnosti. Silice ze semen působí antimikrobně (*Staphylococcus aureus*) a hlavní účinnou složkou je *trans*-nerolidol, který tvoří 61,6 % silice (Braca et al. 2008).

Silice rostliny *Piper aduncum*, čeleď *Piperaceae*, působila toxicky při testu na škůdci *Tetranychus urticae* (česky sviluška chmelová), také je odpuzovala. V silici se v různém množství, v závislosti na původu vzorku, vyskytuje *trans*-nerolidol,  $\alpha$ -humulen a  $\beta$ -karyofylen.  $\beta$ -karyofylen a *trans*-nerolidol způsobily při fumigačním testu největší mortalitu, *trans*-nerolidol také tohoto škůdce nejvíc odpuzoval (Araújo et al. 2012).

Druhý izomer nerolidolu, *cis*-nerolidol, působí jako antioxidant. Neutralizuje hydroxylové radikály, jakožto donor  $H^+$  buď z hydroxylové skupiny nebo z allylové části. Antioxidační aktivita *cis*-nerolidolu je vyšší než u kyseliny askorbové. V pokusu s terc-butylhydroperoxidem chránil buňky Caco2 až do intervalu 24 hodin, po delším působení působil cytotoxicky (Vinhos et al. 2014). Stejně jako další oxidovaný seskviterpen linalool působí totiž také jako prooxidační látka. Strukturně se jedná o terciální alkoholy obsahující allyl (Ruberto a Baratta 2000).

#### 2.3.2.2. $\alpha$ -humulen

Systematickým názvem se jedná o *trans, trans, trans*-2,6,6,9-tetramethylcykloundeka-1,4,8-trien (web 20). Izoloval ho v roce 1895 Chapman ze silice chmelu (*Humulus lupulus*), podle toho získal svůj název. Někdy se také označuje jako  $\alpha$ -karyofylen (Simonsen 1932).



Obr. 8 Strukturní vzorec  $\alpha$ -humulenu, převzato z webu 20

Kromě silice *Myrica rubra* se  $\alpha$ -humulen vyskytuje ve vysoké koncentraci (téměř 50 %) v chmelové silici, jak je již uvedeno výše. Jeho deriváty přispívají k typickému aromatu piva. V silicích ostatních rostlin se vyskytuje v daleko menším množství (Steenackers et al. 2015). Lze ho najít např. v rostlině *Piper gaudichaudianum* (viz výše) (Sperotto et al. 2013), *Callicarpa americana* (Bhalla et al. 2013), *Siphonochilus aethiopicus* (Noudogbessi et al. 2013), *Eugenia caryophyllata* (Zheng et al. 1992) a *Croton flavens* (Sylvestre et al. 2006).

Jedná se o slabý antioxidant (Ruberto a Baratta 2000). Díky svým protizánětlivým vlastnostem, kdy snižuje množství eosinofilů a celkových leukocytů v tekutině z bronchoalveolární laváže, tlumí aktivaci NF $\kappa$ B (nukleární faktor  $\kappa$ B), a tak snižuje i množství prozánětlivých cytokinů, má možné využití v léčbě astmatu (Rogerio et al. 2009). Působí cytotoxicky na celou řadu buněk - A-549, HeLa, HT29, DLD-1, M4BEU (buňky melanomu), ACHN (buňky renálního adenokarcinomu), LNCaP (buňky hormon dependentního karcinomu prostaty), C32 (buňky amelanotického melanomu), PC-3 (buňky karcinomu prostaty) a MCF-7 a potlačuje růst Caco2 (Vinholes et al. 2014, Sperotto et al. 2013). Možný mechanismus účinku spočívá v depleci glutathionu a v produkci ROS (Sperotto et al. 2013). Naopak v jiné studii na MCF-7, C32 a ACHN se  $\alpha$ -humulen ukázal jako neaktivní (Loizzoová et al. 2007).

*Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*), *Myrtaceae*, česky hřebíčkovce kořený (web 17), je strom rostoucí v tropech, např. v Tanzánii, Indonésii (pochází z Moluckého souostroví) a Srí Lance. Silice se používá v parfumériích, potravinářství a medicíně. Byly v ní zjištěny seskviterpeny –  $\beta$ -karyofylen,  $\beta$ -karyofylen-oxid,  $\alpha$ -humulen – a jiné látky. Tyto seskviterpeny indukovaly v pokusu na myších GST (v játrech a mukose tenkého střeva), jeden z enzymů zodpovědných za odstraňování xenobiotik (možných karcinogenů) z těla (Zheng et al. 1992).

*Siphonochilus aethiopicus* je rostlina rostoucí v tropických oblastech Afriky. Odvar z kořenů se tradičně používá k léčbě ženské neplodnosti. Silice z této rostliny obsahuje zejména  $\beta$ -pinen (44,5 %),  $\beta$ -karyofylen (13,4 %) a  $\alpha$ -humulen (11 %). Inhibuje proliferaci buněk MCF-7 (Noudogbessi et al. 2013).

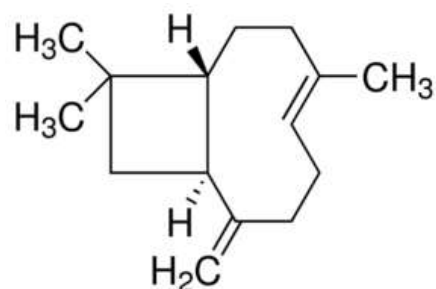
*Croton flavens*, *Euphorbiaceae*, je keř rostoucí na ostrovech v Karibském moři. Lidově se používá např. jako abortifaciens nebo proti menstruačním bolestem. V silici keře z Guadeloupe se nachází především seskviterpeny, např. viridifloren, (*E*)- $\gamma$ -bisabolen,  $\beta$ -karyofylen, v malém množství i  $\alpha$ -humulen. Silice byla testována na

buněčných liniích A-549 a DLD-1. K jejímu cytotoxickému působení přispíval kromě dalších látek právě  $\alpha$ -humulen (Sylvestre et al. 2006).

$\gamma$ -humulen, izomer  $\alpha$ -humulenu, působí cytotoxicky na buňky HT29. Zvyšuje expresi DR5 (death receptors 5) a DR4 a zvyšuje aktivitu kaspázy 8 a kaspázy 3 (Lan et al. 2011).

### 2.3.2.3. $\beta$ -karyofylen

$\beta$ -karyofylen se také nazývá (-)-*trans*-karyofylen nebo *trans*-(1R,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylenbicyclo[7.2.0]undec-4-en (web 20). Jedná se o strukturální izomer  $\alpha$ -humulenu (Steenackers et al. 2015).



Obr. 9 Strukturální vzorec  $\beta$ -karyofylenu, převzato z webu 20

$\beta$ -karyofylen je kromě MRO dále obsažen kupříkladu v *Eugenia caryophyllata* (viz výše), v *Aristolochia elegans*, *Pentadesma butyracea*, *Helichrysum gymnocephalum* a *Citrus aurantifolia*, kde je spíše vedlejší složkou (Bhalla et al. 2013).

Působí protizánětlivě (Fernandesová et al. 2007), slabě antioxidačně (Ruberto a Baratta 2000), neuroprotektivně (Chang et al. 2007), antivirově (herpes simplex virus typ 1) (Astani et al. 2011), antimikrobiálně a lokálně anesteticky (Legault a Pichette 2007).  $\beta$ -karyofylen nemá podle Legaulta a Pichetta (2007) cytotoxické účinky (podle Loizzoové et al. (2007) působí cytotoxicky na buňky ACHN a C32, podle Silvy et al. (2008) i na HT29) a neinhibuje růst buněk. Ovšem v kombinaci s  $\alpha$ -humulenem, který má cytotoxické účinky, dochází k významnému zvýšení cytotoxicity (testováno na buňkách MCF-7).  $\beta$ -karyofylen taktéž potencuje účinek paklitaxelu na buňky MCF-7, DLD-1 a L-929 (myší fibroblasty). Příčinou potence účinku je pravděpodobně zvýšená akumulace  $\alpha$ -humulenu a paklitaxelu v buňce.  $\beta$ -karyofylen se nejspíše shromažďuje v membráně buňky, mění její vlastnosti a usnadňuje tak vstup dalších látek (Legault a Pichette 2007).

*Pentadesma butyracea* je strom rostoucí v Africe na území od Sierra Leone až po Kamerun. Používá se v tradiční medicíně a jako zdroj potravy. Hlavní složkou silice je  $\beta$ -karyofylen (67,4 %). Silice inhibuje proliferaci MCF-7 buněk. Účinek je pravděpodobně způsoben právě  $\beta$ -karyofylenem (Noudogbessi et al. 2013).

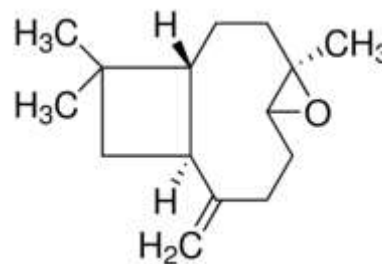
$\beta$ -karyofylen patří mezi nejčastěji se vyskytující seskviterpenoid v rodu *Cannabis*. Působí zde pravděpodobně proti požírání rostlin.  $\beta$ -karyofylen je selektivní agonista CB<sub>2</sub> receptorů, je tedy možné, že hraje určitou roli v závislosti (Russo 2011).

$\beta$ -karyofylen inhibuje růst a vývoj určitých rostlin, např. *Physalis ixocarpa*, čeled' *Solanaceae*. Nejspíše brání biosyntéze karotenoidů, čímž umožní fotooxidaci chlorofylu, způsobí tudíž jeho ztrátu a zabrání tak tvorbě ATP. Obecně se takovýto jev nazývá alelopatie. Znamená, že rostlina (případně jiný organismus) produkuje látky, které následně působí negativně na klíčení a růst jiných rostlin (příp. jiných organismů) (web 18). Tohoto jevu se dá využít v zemědělství (Sánchez-Muñoz et al. 2012).

#### 2.3.2.4. Karyofylen-oxid

Dalšími názvy pro karyofylen-oxid jsou (-)-epoxykaryofylen a (1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimethyl-9-methylen-5-oxatricyklo[8.2.0.0<sup>4,6</sup>]dodekan (web 20). Jedná se o oxidační produkt  $\beta$ -karyofylenu (Rasoanaivo et al. 2013).

Karyofylen-oxid patří mezi nejrozšířenější oxidované seskviterpeny v silicích (Rasoanaivo et al. 2013). Obsažen je například v rostlinách *Salvia sclareoides* (M' Berek et al. 2007), *Feronia elephantum* (Thirugnanasampanan a David 2014), *Serjania yucatanensis* (Polanco-Hernández et al. 2013), *Melissa officinalis*, *Melaleuca stypheloides*, *Psidium guajava*,



Obr. 10 Strukturální vzorec karyofylen-oxidu, převzato z webu 20

*Piper nigrum* a v rodu *Cannabis*. Právě díky karyofylen-oxidu mohou cvičení psi vyčmúchat konopí (Russo 2011).

Karyofylen-oxid inhibuje  $\beta$  sekretasu, což znamená, že působí proti tvorbě senilních plaků u Alzheimerovy choroby (Murata et al. 2014), používá se jako konzervant, působí proti jednom z nejčastějších původců onychomykózy - *Trichophyton rubrum* a *T. mentagrophytes* (Yang et al. 2000). Proti roztočům (*Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus*) má dokonce vyšší účinek než DEET a benzoyl benzoát, používané syntetické akaricidní látky (Oh et al. 2014). Má antiflogistické (Chavan et al. 2010) a antipyretické účinky, *in vitro* také působí antiagregačně (Park et al. 2011). Není mutagenní ani genotoxický, byl uznán bezpečným pro použití v potravinářství pro zvýraznění chuti a vůně (Sotto et al. 2013).

Karyofylen-oxid inhibuje proliferaci některých buněčných linií, např. U266 (buňky mnohočetného myelomu), MM1.S (buňky mnohočetného myelomu citlivého na

melfalan), DU145 (buňky karcinomu prostaty), MDA-MB231 (buňky prsního adenokarcinomu). Působením karyofylen-oxidu dochází ke zvýšení produkce volných radikálů a k inhibici STAT-3. STAT-3 je transkripční faktor zvyšující expresi antiapoptotických genů (Bcl-x1, Bcl-2), cyklinu D1, COX2, VEGF aj. Je nadměrně aktivní u některých typů rakoviny (např. u mnohočetného myelomu) (Kim et al. 2013b). Karyofylen-oxid způsobuje inhibici proliferace a apoptózu u PC-3 a MCF-7 (Park et al. 2011) a zvyšuje účinek paklitaxelu a doxorubicinu na buňky KBM5 (myeloidní leukémie), U266 a DU145. Kromě ovlivnění STAT-3 je inhibována aktivace NFκB, taktéž transkripčního faktoru regulujícího expresi určitých genů a tudíž důležitého pro vznik a růst tumorů (Kim et al. 2013a). Karyofylen-oxid působí mírně cytotoxicky na buňky SK-MEL-28 (buňky melanomu), Hs 578T (buňky karcinomu prsu), MDA-MB-231 a 5637 (buňky karcinomu močového měchýře). Zodpovídá tak pravděpodobně za cytotoxický účinek celé silice, izolované z listu *Heteropyxis dehniae*, čeledi *Heteropyxidaceae*. Kromě karyofylen-oxidu (3,1 %) byl v silici zjištěn např. i linalool (58,3 %), 4-terpineol (9,8 %) a α-terpineol (3,6 %) (Sibanda et al. 2004).

Silice z *Feronia elephantum*, indické rostliny z čeledi *Rutaceae*, obsahuje karyofylen-oxid jako hlavní složku. Bylo prokázáno, že silice působí cytotoxicky na buňky MCF-7 a že má schopnost vychytávat volné radikály. Za účinek je pravděpodobně zodpovědných více látek, nejen karyofylen-oxid (Thirugnanasampandan a David 2014).

Kořeny rostlin *Patrinia scabra* a *P. heterophylla*, čeledi *Valerianaceae*, se používají v tradiční čínské medicíně. Mají sedativní a protinádorové účinky. Silice z kořenů působí cytotoxicky na buňky HO-8910 (buňky ovariálního karcinomu) a Bel-7402 (buňky hepatomu). K účinku může přispívat i přítomný karyofylen-oxid (Sun et al. 2005).

*Serjania yucatanensis* je rostlina rostoucí na Yucatanském poloostrově. V extraktu z listu byl zjištěn triterpen lupenon a seskviterpen karyofylen-oxid. Byl testován jejich účinek na *Trypanosoma cruzi*. Samotný lupenon neměl efekt a karyofylen-oxid byl slabý. Když se ovšem tyto látky smísily v určitém poměru (nejlepší 1:4), měly dobrý trypanocidální účinek (Polanco-Hernández et al. 2013).

Synergistický účinek se objevuje i při určité koncentraci 1,8-cineolu v kombinaci s karyofylen-oxidem, obsažených v silici *Salvia lavandulaefolia*. Při testování inhibiční aktivity acetylcholinesterasy měla tato kombinace větší účinek než silice a další testované složky (Savelev et al. 2003).

## 2.4. Další zástupci čeledi *Myricaceae*

*Myrica rubra* je nejčastěji zkoumaný druh čeledi *Myricaceae*. Zájem je ale věnován i příbuzným rostlinám, jmenovitě druhu *Myrica gale*, *Myrica faya* a *Myrica nagi*.

*Myrica gale* je asi 1 metr vysoký keř domácí v Kanadě. Stejně jako *Myrica rubra* nachází svoje využití v tradiční medicíně. Nálev z listů a plodů se užívá k léčbě žaludečních potíží, silice z listů působí mukolyticky, sušené listy a plody se dají použít jako koření. Z listů tohoto keře byl získán extrakt, jehož hlavními obsahovými látkami byly myrcen, limonen,  $\alpha$ -felandren,  $\beta$ -karyofylen. Extrakt byl testován na buňkách A-549 a na buňkách lidského adenokarcinomu tlustého střeva (DLD-1), při čemž byl zjištěn jeho cytotoxický účinek na tyto nádorové linie (Sylvestre et al. 2005).

*Myrica faya* je vždyzelený keř nebo malý strom přirozeně rostoucí na Kanárských ostrovech, Madeiře a Azorách. Vyskytuje se i na Havaji, kam byla zavlečena portugalskými imigranty v 19. století. Zde se jedná o invazivní druh, který kompetuje s běžnými stromy. Plody jsou malé, na chuť spíše trpké. Používají se k výrobě džemů, likérů nebo k přibarvení domácího vína. Z hlediska obsahových látek jsou nejhojnější flavonoidy. Obsaženy jsou např. glykosidy myricetinu, kaempferolu a kvercetinu. Byla prokázána antioxidační aktivita, u listů vyšší než u plodů (Spínola et al. 2014).

*Myrica nagi* (také *M. esculenta*) je strom rostoucí v oblasti rozkládající se od indických Himalájí po Čínu, Japonsko a Singapur. Opět se jedná o ovocný strom. Plody jsou menší než plody *Myrica rubra*, ale jsou oblíbené pro přímou konzumaci i jako surovina pro přípravu dalších produktů. Obsahují flavonoidy (o něco více než *Myrica rubra*), dále např. kyselinu galovou, anthocyaniny, vitaminy. Také u tohoto druhu byly prokázány antioxidační účinky. Extrakty z plodu byly použity na nádorové linie C33A, HeLa a SiHa (cervikální nádorové buněčné linie) a také na nenádorové linie HEK293 a PBMCs. Vlivem těchto extraktů došlo k dávkově závislé inhibici proliferace nádorových buněk. Na nekarcinogenní buňky extrakt nepůsobil cytotoxicky. Kůra stromu má např. protizánětlivé, anthelmintické, antimikrobní a anxiolytické účinky. V lidovém léčitelství se používá na astma, při bolestech uší, při chronickém kašli, v práškové formě i na vředy. V ajurvédě (tradiční indické medicíně) je užívána jako spazmolytikum, analgetikum a antiflogistikum (Rawat et al. 2011, Saini et al. 2013, Panthari et al. 2013).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- stanovit antiproliferační účinky MRO na buňky SW480, SW620, HT29 a GF 6
- stanovit antiproliferační účinky vybraných seskviterpenů na linii nejcitlivější vůči MRO
- zjistit vliv MRO a vybraných seskviterpenů na produkci ROS v buňkách nejcitlivější linie a nenádorové linie GF 6
- zjistit vliv MRO a vybraných seskviterpenů na buněčný cyklus nejcitlivější linie pomocí průtokové cytometrie



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Materiál a chemikálie

Buněčná linie SW480 – American Type Culture Collection (CCL-228)

Buněčná linie SW620 – American Type Culture Collection (CCL-227)

Buněčná linie HT29 – American Type Culture Collection (HTB-38)

Buněčná linie GF 6 – Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta UK HK

Olej z *Myrica rubra* – Ústav experimentální botaniky AVČR

$\alpha$ -humulen,  $\beta$ -karyofylen, karyofylen-oxid, *trans*-nerolidol – Sigma Aldrich

DMSO (dimethylsulfoxid) – Sigma Aldrich

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) – Sigma Aldrich

FBS (Fetal Bovine Serum) - Gibco

Penicilin/Streptomycin (10 000 U/ml) - Gibco

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution) – PAN Biotech

Trypsin - Gibco

H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) – Life Technologies

Roztok neutrální červeně – Sigma Aldrich

Roztok propidium jodidu/ribonukleázy – Cell Signalling Technology

Běžné chemikálie čistoty p.a.

### 4.2. Pomůcky a přístroje

#### Pomůcky:

kultivační lahve, automatické pipety, skleněné pipety, pipetovací špičky, kádinky, plastová korýtká, počítací komůrky, mikrotitrační destičky, Petriho misky, mikrozkušavky, stojánek na zkumavky, rukavice, stopky, lihové fixy

#### Přístroje a zařízení:

laminární box – Telstar Bio II A/G

mikroskop – CK2 Olympus

termostat – Sanyo CO<sub>2</sub> incubator MCO-18AIC (UV), Sanyo

vodní lázeň – Memmert WNB10

lednice – Brandt Apollo

přístroj na počítání buněk – Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience

vortex – MS2 Minishaker, IKA

třepačka pro mikrotitrační destičky – MTS 2/4 digital, IKA

spektrofotometrický a spektrofluorimetrický analyzátor Tecan Infinite M200 PRO

centrifuga – Allegra TM X-12 R Centrifuge, Beckman Coulter

průtokový cytometr – Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC

### **4.3. Vybrané buněčné linie**

HT29

Jedná se o lidskou buněčnou linii izolovanou z kolorektálního adenokarcinomu v roce 1964. Pacientkou byla běloška ve věku 44 let. Morfologie HT29 je epiteliální, buňky jsou adherentní. Linii lze získat u American Type Culture Collection (ATCC) (web 13).

SW480

Tato buněčná linie je opět lidského původu. Zdrojem byl kolorektální adenokarcinom 50 letého bělocha, dle Dukesovy klasifikace typ B. Morfologie buněk je epiteliální, jsou adherentní. Linii je možné zakoupit u ATCC (web 13).

SW620

Buňky SW620 byly získány z lymfatické uzliny z metastázy kolorektálního adenokarcinomu uvedeného výše (SW480). Izolovány byly ze stejného pacienta o rok později, tzn. od 51 letého pacienta. Dle Dukesovy klasifikace se jedná o typ C. Morfologie je epiteliální, buňky jsou adherentní. Stejně jako u předchozích linií se dá SW620 pořídit u ATCC (web 13).

GF 6

GF 6 jsou buňky normální gingivy (fibroblasty). Odvozeny byly na Ústavu lékařské biologie a genetiky na Lékařské fakultě v Hradci Králové v roce 2006 ze vzorku od 74 leté ženy. Od té doby jsou zde skladovány v tekutém dusíku.

## **4.4. Metody**

### **4.4.1. Kultivace buněk**

#### ***4.4.1.1. Příprava média, DPBS bez iontů a trypsinu***

Kultivace buněčných linií probíhala v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s fetálním bovinním sérem (FBS) a antibiotiky. Do sterilní lahve bylo napipetováno 50 ml FBS a 5 ml roztoku penicilinu/streptomycinu (10000 U/ml) a doplněno DMEM na objem 500 ml.

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution) bez Ca a Mg bylo získáno z 50 ml komerčně dodávaného DPBS bez Ca a Mg doplněných na objem 500 ml sterilní redestilovanou vodou.

Při pasážování buněk byl použit 0,05 % roztok trypsinu s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). 50 ml 0,5 % trypsinu s EDTA bylo napipetováno do sterilní lahve. Bylo přidáno 45 ml DPBS bez Ca a Mg. Byly doplněny do 500 ml sterilní redestilovanou vodou.

#### ***4.4.1.2. Pasážování buněk***

Použité buněčné linie patří mezi adherentní, tj. postupně porůstají povrch kultivační lahve (web 13). Při růstu spotřebovávají živiny z média a po určité době je nutné část buněk přemístit do nové kultivační lahve a do čerstvého média. Proces se nazývá pasážování a provádí se, když buňky porostou dno kultivační lahve asi ze 70 % (Greplová 2013).

Nejprve byly do laminárního boxu nachystány potřebné pomůcky – kádinka na médium, sterilní pipety, sterilní kultivační lahev a lahvička na odpad. Do vodní lázně byl vložen roztok trypsinu s EDTA a médium a nechaly se ohřát na 37°C. Na novou kultivační lahev bylo napsáno datum, název buněčné linie, číslo pasáže a podpis. Mikroskopicky byly zkontrolovány buňky v původní lahvi. V boxu bylo z lahve vylito médium a připipetovány 2 ml roztoku trypsinu. Kýváním lahve se trypsin rozprostřel na dně lahve a byl vylit ven. Takto byl přidán ještě dvakrát s tím, že naposledy nebyl vylit všechn. Nechala se tenká vrstva na pokrytí dna. Byl vložen na 5 minut do inkubátoru.

Pod mikroskopem bylo zkontrolováno, zda se buňky uvolnily ze dna. Bylo přidáno 10 ml média, které inaktivovalo trypsin a poskytlo nové živné prostředí pro růst buněk. 2 ml vzniklé suspenze byly přeneseny do připravené sterilní lahve a doplněny médiem do objemu 10 ml. Lahev byla umístěna do inkubátoru, kde se udržuje teplota 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. Pasážování se provádělo vždy v pondělí a ve čtvrtek.

#### **4.4.1.3. Počítání buněk**

Do jednoho okénka počítací komůrky bylo napipetováno 20  $\mu$ l buněčné suspenze. Počítací komůrka byla vložena do přístroje Cellometer Auto T4. Stejnomený počítačový program po nastavení konkrétní buněčné linie vyhodnotil počet buněk a spočítal, kolik média bylo třeba přidat k určitému objemu buněčné suspenze pro získání požadované koncentrace.

#### **4.4.2. Příprava zkoušených roztoků**

MRO o hmotnosti 100 mg má objem 110  $\mu$ l (Langhansová et al. 2014). Pro následující experimenty bylo nutné připravit zásobní roztoky MRO v DMSO o koncentraci 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml a 100 mg/ml (viz Tab. 3). MRO a připravené roztoky byly uchovávány v lednici při 4°C.

Při experimentech byly připravené zásobní roztoky dále naředěny 1000 x – vždy 5  $\mu$ l roztoku o určité koncentraci a 4,995 ml DMEM pro test cytotoxicity s neutrální červení a průtokovou cytometrií nebo 4,995 ml DPBS pro metodu měření produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Koncentrace DMSO přidaného k buňkám nepřesáhla 0,1 %.

Dále byly testovány 4 složky – seskviterpeny  $\alpha$ -humulen (100 mg má objem 112  $\mu$ l),  $\beta$ -karyofylen (100 mg o objemu 111  $\mu$ l), karyofylen-oxid (100 mg o objemu 104  $\mu$ l) a *trans*-nerolidol (100 mg o objemu 114  $\mu$ l). Stejně jako MRO byly zásobní roztoky seskviterpenů uchovávány v lednici a po rozmrazení byly naředěny DMSO. Ze zásobních roztoků byly připraveny roztoky o koncentracích 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml a 100 mg/ml (Tab. 4). Postup ředění byl stejný jako u MRO (viz Tab. 3). Zásobní roztoky byly při pokusech opět naředěny 1000 x kultivačním médiem, případně DPBS.

**Tab. 3 Ředění MRO**

Množství MRO	Množství přidaného DMSO [ $\mu$ l]	Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]
110 $\mu$ l MRO	890	100
150 $\mu$ l o koncentraci 100 mg/ml	50	75
100 $\mu$ l o koncentraci 100 mg/ml	100	50
100 $\mu$ l o koncentraci 50 mg/ml	100	25
40 $\mu$ l o koncentraci 50 mg/ml	160	10
100 $\mu$ l o koncentraci 10 mg/ml	100	5
40 $\mu$ l o koncentraci 5 mg/ml	160	1

**Tab. 4 Příprava roztoků jednotlivých seskviterpenů, koncentrace 100 mg/ml**

Množství seskviterpenů	Množství přidaného DMSO [ $\mu$ l]
112 $\mu$ l $\alpha$ -humulenu	888
111 $\mu$ l $\beta$ -karyofylenu	889
104 $\mu$ l karyofylen-oxidu	896
114 $\mu$ l <i>trans</i> -nerolidolu	886

#### 4.4.3. Test cytotoxicity s neutrální červeň

Neutrální červeň (neutral red - NR) je vitální barvivo, což znamená, že se hromadí pouze v živých buňkách. Při fyziologickém pH je neutrální červeň nenabitá, může pasivně procházet přes buněčnou membránu. Vstupuje do lyzozomu, kde je nižší pH. Získává zde náboj a lyzozom už nemůže opustit. Je-li buňka poškozena nebo dojde-li dokonce k buněčné smrti, lyzozomální membrána ztrácí svoje normální vlastnosti a uvolní barvivo.

Pro tento test byly použity 96 jamkové destičky. Jamky v sloupci 1 sloužily jako slepé vzorky, do nich buňky nebyly nasazeny. Do ostatních sloupců bylo napipetováno 200  $\mu$ l buněčné suspenze tak, aby v každé jamce bylo 6 000 buněk. Destička byla vložena do inkubátoru a buňky se nechaly 24 hodin inkubovat při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Po uplynutí 24 hodin bylo odsáto veškeré médium z 6 prostředních jamek sloupců číslo 3 až 10 (11 u seskviterpenů). Místo něj bylo přidáno 200  $\mu$ l pracovních roztoků testovaných látek, v případě kontroly kultivační médium obsahující 0,1 % DMSO. Roztok kontroly byl napipetován do jamek B-G ve třetím sloupci destičky. Do

jamek B-G čtvrtého až desátého (jedenáctého) sloupce byly napipetovány roztoky testovaných látek ve vzestupné koncentraci, vždy do jednoho sloupce jeden typ roztoku (tj. 6 jamek pro každou koncentraci) – viz Tab. 5 (analogicky u jednotlivých koncentrací seskviterpenů). Nechaly se 72 hodin inkubovat.

Po 72 hodinách bylo odsáto 100  $\mu$ l média z každé jamky. Smícháním 0,5 ml zásobního roztoku NR (který bylo vhodné předem krátce ohřát ve vodní lázni mající 37°C, aby se rozpustily případné krystaly) s 19,5 ml média byl připraven pracovní roztok NR. 100  $\mu$ l roztoku bylo přidáno do každé z ovlivněných jamek a kromě nich i do jamek B-G prvního sloupce se slepými vzorky. Destičky byly vloženy do inkubátoru a nechaly se 3 hodiny inkubovat. Během těchto 3 hodin docházelo k prostupu neutrální červeně do lyzozomů nepoškozených živých buněk.

Po inkubaci bylo fixováno barvivo a lyzovány buňky. Nejprve bylo vyklepnuto médium z destičky. Do sloupce se slepými vzorky a do ovlivněných sloupců bylo přidáno 100  $\mu$ l fixačního roztoku (1 g  $\text{CaCl}_2$ /100 ml v 0,5 % roztoku formaldehydu – ředěný sterilní redestilovanou vodou). Buňky se nechaly 15 minut fixovat při pokojové teplotě. Poté byl celý obsah všech jamek odstraněn vyklepnutím. Dvakrát byly buňky opláchnuty 100  $\mu$ l DPBS bez Ca a Mg. Nakonec bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního roztoku (1 % roztok kyseliny octové v 50 % roztoku ethanolu) – uvolnilo se barvivo z buněk, které nebyly poškozeny testovanými látkami. Destičky se nechaly stát 15 minut při pokojové teplotě, následně se 15 minut třepaly na třepače pro mikrotitrační destičky (550 RPM).

Absorbance byla změřena na přístroji Tecan Infinite M200PRO při 540 nm. Čím více buněk bylo poškozeno nebo usmrceno, tím slabší bylo zabarvení, tudíž i nižší absorbance. Od hodnot naměřených v jamkách s kontrolním roztokem a roztoky testovaných látek byl odečten průměr hodnot slepých vzorků.

**Tab. 5 Členění 96 jamkové destičky pro MRO pro test s NR**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Bl		K	1	5	10	25	50	75	100		
C	Bl		K	1	5	10	25	50	75	100		
D	Bl		K	1	5	10	25	50	75	100		
E	Bl		K	1	5	10	25	50	75	100		
F	Bl		K	1	5	10	25	50	75	100		
G	Bl		K	1	5	10	25	50	75	100		
H												

Bl=blank      K=kontrola (0,1 % DMSO v DMEM)      čísla=koncentrace MRO  
v µg/ml

#### 4.4.4. Detekce ROS – metoda s DCF

Pro zjištění přítomnosti ROS byl použit substrát H<sub>2</sub>DCFDA (2',7' – dichlorodihydrofluorescein diacetát). Jedná se o buněčný indikátor ROS. Pasivní difúzí vstupuje do buňky, kde jsou esterázami odštěpeny oba acetyly. ROS pak způsobí oxidaci hydroxylových skupin, čímž vznikne fluoreskující produkt, DCF (2',7' – dichlorofluorescein) (web 12). Fluorescence je přímo úměrná množství ROS. Excituje se při 485 nm, k emisi dochází při 530 nm.

Byly použity 96 jamkové destičky. Do jamek byla nasazena buněčná suspenze o koncentraci 15 000 buněk/ml. Destička byla vložena do inkubátoru a buňky 24 hodin rostly.

Ze všech jamek bylo odstraněno médium. Bylo přidáno 200 µl roztoků testovaných látek. Ty byly připraveny smícháním 5 µl zásobních roztoků MRO, seskviterpenů nebo DMSO s 4,995 ml DPBS. Sloupec 1 byl ponechán volný, do sloupce 2 (do všech osmi jamek) bylo napipetován roztok kontroly (DMSO). Do dalších sloupců byly napipetovány roztoky MRO v rostoucí koncentraci (1, 5, 10, 25, 50, 75 a 100 µg/ml) nebo roztoky seskviterpenů v rostoucí koncentraci (10, 25, 50 a 100 µg/ml) – viz Tab. 6. Do sloupce 10 (u MRO) nebo do sloupce 11 (u seskviterpenů) bylo napipetováno 200 µl DPBS. Poté byl připraven roztok indikátoru – bylo nutné pracovat při nejnižším možném osvětlení. Ke 4 µl H<sub>2</sub>DCFDA rozpuštěného v DMSO bylo

přidáno 10 ml DPBS. 100 µl tohoto roztoku (10 µM) bylo napipetováno do jamek. Destička se dala na 4 hodiny inkubovat. Poté bylo odebráno ze sloupce 10 (11) 200 µl roztoku a místo něj bylo přidáno 200 µl 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako pozitivní kontrola. Fluorescence DCF byla ihned měřena na Tecanu při 37°C každých 5 minut po dobu jedné hodiny (tj. 13 cyklů).

**Tab. 6 Členění 96 jamkové destičky pro seskviterpeny MRO pro metodu s DCF**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
B		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
C		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
D		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
E		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
F		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
G		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
H		K	10	25	50	100	10	25	50	100	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	

K=kontrola (0,1 % DMSO v DPBS)

čísla=koncentrace seskviterpenů v µg/ml

(dvě látky na jednu destičku)

#### 4.4.5. Měření distribuce fází buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Průtoková cytometrie je metoda často používaná v medicíně a biologii. Touto metodou se testují buňky imunitního systému (autoprotilátky, HLA typizace aj.), určují se typy leukémií, dá se zjistit kinetika buněčného cyklu, měřit apoptóza buněk atd. Mezi hodnocený materiál patří většinou buněčné kultury, krev a kostní dřeň (Roubalová 2012).

Buňky v měřeném materiálu (případně i jiné částice jako např. chromozomy, viry) jsou usměrněny tak, aby po jedné procházely průtokovou komůrkou – zjišťují se tedy vlastnosti jednotlivých buněk. Dojde k ozáření paprskem laseru. Světlo projde systémem filtrů a zrcadel a je detekováno. Získají se dva parametry – „forward scatter“, jehož detektor se nachází ve směru paprsku, a „side scatter“, jehož detektor je uložen kolmo na paprsek. „Forward scatter“ udává velikost částic a „side scatter“ granularitu částic. Kromě těchto parametrů se dá zároveň měřit i fluorescence, neboť laser způsobí také excitaci fluorochromů (značených protilátek navázaných na buňky), pokud jsou



přítomny. Všechny zaznamenané světelné signály jsou převedeny na elektrické. Důležitá je plocha signálu, využívá se ale i šířka či výška. Na základě těchto hodnot se totiž dá určit, zda se jedná o buňku obsahující větší množství DNA nebo o buněčné agregáty (Eckschlager 1999, Roubalová 2012).

Některé cytometry jsou schopné třídit buňky na základě zvolených parametrů. Piezoelektrický krystal způsobí rozpad nosné kapaliny na kapky (jedna kapka obsahuje jednu buňku). Kapkám je udělen kladný nebo záporný náboj, případně zůstanou nenabitě. Podle toho se pak pohybují v elektrickém poli a padají do konkrétních sběrných nádob (Eckschlager 1999).

Při měření kinetiky buněčné cyklu se zjišťuje zastoupení fází buněčného cyklu na základě rozdílného množství DNA. Množství DNA se určí pomocí interkalačního barviva (fluorochromu) propidium jodidu (PI). Toto barvivo neproniká přes membrány živých buněk - před použitím je nutné buňky fixovat. Zde byl použit ethanol. Při jeho užití je zvýšené riziko shlukování buněk. Sníží se pomalým přikapáváním vychlazeného ethanolu a současným mícháním vzorku na vortexu. PI je excitován argonovým laserem (vlnová délka 488 nm) a vyzařuje červené světlo. Použije-li se toho barvivo v nadbytku, je fluorescence úměrná obsahu dvojvláknových nukleových kyselin – kromě DNA i částí RNA. Aby se zabránilo nežádoucí vazbě na RNA, ke vzorku se přidá RNÁsa. Výsledkem analýzy jsou procentuální zastoupení G0/G1 (obsahují stejné množství DNA, nelze je tudíž touto metodou odlišit), S a G2/M (Eckschlager 1999).

Nejprve byly nasazeny do Petriho misek buňky linie HT29. Do jedné misky bylo napipetováno 5 ml buněčné suspenze o koncentraci 30 000 buněk/ml. Misky byly vloženy do inkubátoru a buňky se nechaly 24 hodin růst při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>.

Druhý den bylo ve vodní lázni ohřáno médium a nechaly se roztát pracovní roztoky MRO,  $\alpha$ -humulenu, *trans*-nerolidolu a DMSO. Smísením 5  $\mu$ l MRO nebo *trans*-nerolidolu o různých koncentracích s 4,995 ml DMEM bylo připraveno 5 ml roztoku, kterým byly buňky ovlivněny. Jako kontrola byl použit 0,1 % roztok DMSO v kultivačním médiu. Z misky bylo odpipetováno veškeré médium a bylo přidáno 5 ml přichystaných roztoků. Misky byly vráceny do termostatu a buňky se nechaly inkubovat 24 nebo 48 hodin.

Po skončení inkubace byly buňky připraveny na průtokovou cytometrii. DMEM, DBPS a trypsin byly ohřány ve vodní lázni na 37°C. Z misek bylo vylito médium s testovanými látkami. Buňky byly dvakrát opláchnuty 5 ml DPBS a poté 2 ml trypsinu. Malé množství trypsinu bylo ponecháno v misce. Vzorky byly na 5 minut vloženy do

termostatu. Uvolněné buňky byly resuspendovány v 5 ml DMEM, které inaktivovalo zbytek trypsinu. Suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky. Centrifugovalo se při 1000 RPM při 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl odsát, sediment byl rozklepnut. Bylo přidáno 10 ml DPBS. Vzorek byl opět stočen při 1000 RPM při 4°C po dobu 10 minut. Tekutina byla odsáta a sediment byl rozklepnut, aby se při fixaci netvořily shluky buněk. Zkumavka byla umístěna na vortex a za mírného míchání byly pomalu přikapávány 2 ml vychlazeného 70 % ethanolu. Vzorky byly uloženy do lednice, kde byly skladovány minimálně hodinu, většinou přes noc (případně i delší dobu).

Z centrifugační zkumavky byl odebrán 1 milion buněk do mikrozukavky o objemu 1,5 ml. Centrifugovalo se 5 minut při 300 g. Supernatant byl odsát. Sediment byl resuspendován v 0,5 ml PI/RNÁsy. Mikrozukavka byla vložena do termostatu a nechala se 40 – 50 minut inkubovat při 37°C a 5 % CO<sub>2</sub>. Poté byly vzorky změřeny na průtokovém cytometru.

#### **4.4.6. Vyhodnocení výsledků**

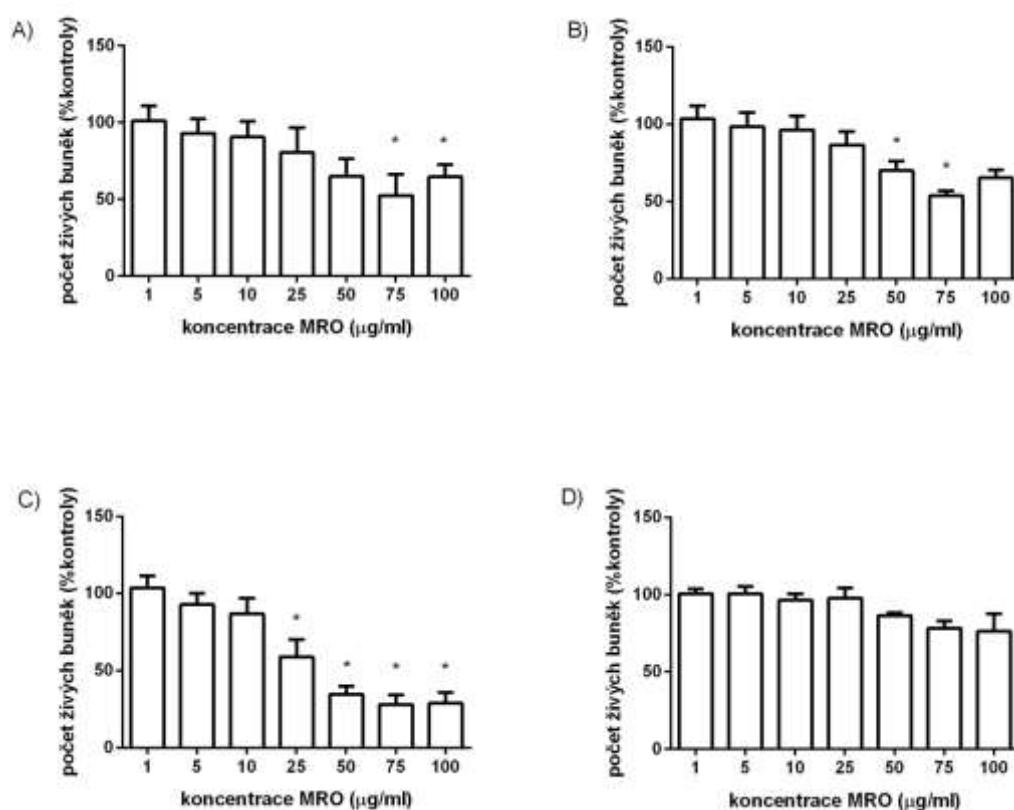
Pro test s NR bylo provedeno celkem 6 nezávislých měření. V každém měření se získalo 6 hodnot pro každou koncentraci. Měření produkce ROS metodou DCF bylo provedeno třikrát a pro každou koncentraci se získalo 8 hodnot. Měření buněčného cyklu bylo provedeno třikrát, nezávisle na sobě. Distribuce fází buněčného cyklu byla vyhodnocena v programu MultiCycle AV for Windows. Statistická analýza všech získaných výsledků byla provedena v programu GraphPad Prism 6.0 metodou ANOVA s následným Dunnettovým testem pro mnohočetná porovnání. Rozdíly v hodnotách byly považovány za statisticky významné od hladiny významnosti  $p \leq 0,05$  %.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Vliv MRO na proliferaci a životnost buněk

Testování vlivu MRO na proliferaci a životnost buněk bylo provedeno na 4 buněčných liniích – SW480, SW620, HT29 a GF 6. Pracovní roztoky MRO, použité pro ovlivnění buněk, byly v koncentracích od 1  $\mu\text{g/ml}$  do 100  $\mu\text{g/ml}$ . Po 72-hodinové expozici byla viabilita buněk stanovena pomocí testu NR.

MRO vykazoval signifikantní antiproliferační účinek u všech nádorových buněčných linií. Nejcitlivější linií byla linie HT29, proto byla použita i v dalších experimentech. První významný pokles životaschopnosti se u HT29 objevil v koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ , u SW620 v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  a u SW480 až v koncentraci 75  $\mu\text{g/ml}$ . U nenádorové linie GF 6 nebyl vliv MRO signifikantní (Obr. 11).



Obr. 11 Vliv MRO v různých koncentracích na počet živých buněk stanovený metodou NR

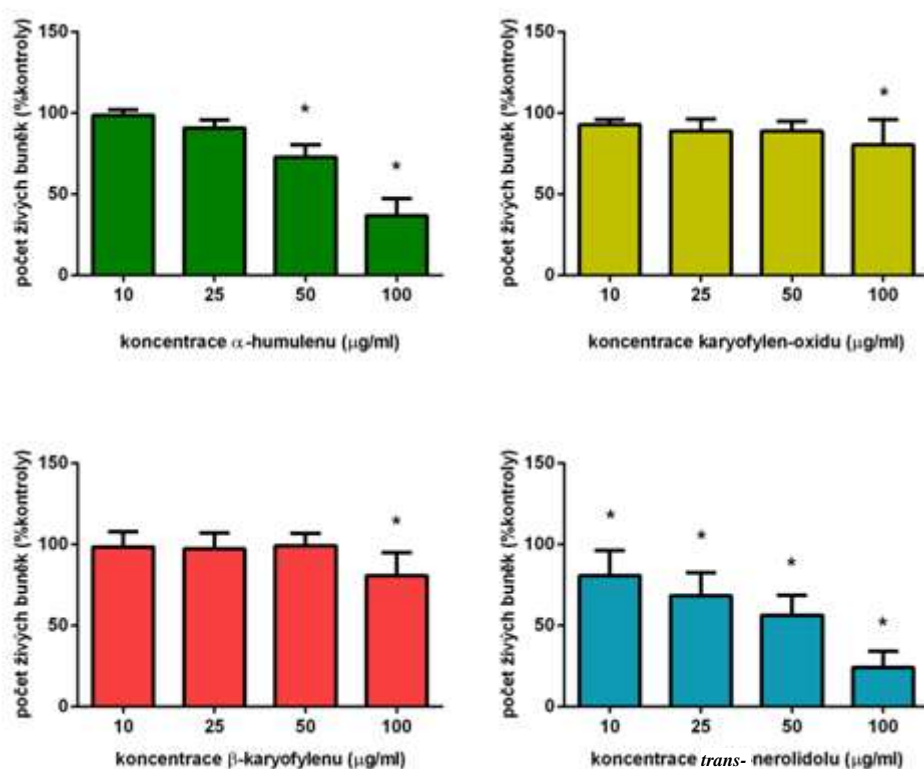
A) SW480    B) SW620    C) HT29    D) GF 6

\* = statisticky významný rozdíl oproti kontrole,  $p \leq 0,05$  %

## 5.2. Vliv vybraných seskviterpenů na proliferaci a životnost buněk

Antiproliferační účinek seskviterpenů byl testován na buněčné linii HT29. Buňky byly ovlivněny 4 seskviterpeny –  $\alpha$ -humulenem, karyofylen-oxidem,  $\beta$ -karyofylenem a *trans*-nerolidolem. Od každého ze seskviterpenů byly použity 4 koncentrace – 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Po 72-hodinové expozici byl počet živých buněk stanoven pomocí testu NR. Výsledky jsou ukázány na Obr. 12.

Nejúčinnějším seskviterpenem byl *trans*-nerolidol, který způsoboval signifikantní pokles počtu živých buněk již od koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$ . Účinným seskviterpenem byl také  $\alpha$ -humulen, u něhož se statisticky významný rozdíl oproti kontrole projevil od koncentrace 50  $\mu\text{g/ml}$ . Karyofylen-oxid a  $\beta$ -karyofylen se oproti nim jeví jako velmi málo účinné, jejich antiproliferační účinek je nízký a projevuje se až při nejvyšší koncentraci.



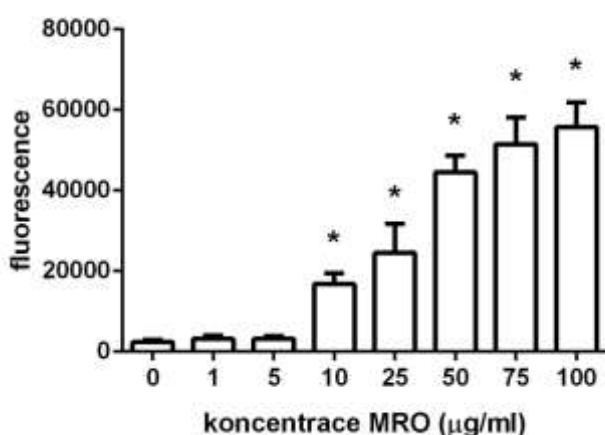
Obr. 12 Viabilita buněk linie HT29 po ovlivnění seskviterpeny  $\alpha$ -humulenem, karyofylen-oxidem,  $\beta$ -karyofylenem a *trans*-nerolidolem v různých koncentracích, stanovená metodou NR

\* = statisticky významný rozdíl oproti kontrole,  $p \leq 0,05$  %

### 5.3. Prooxidační účinek MRO

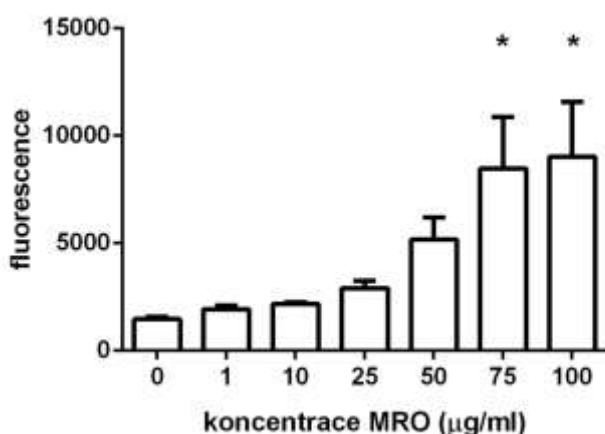
Zvýšená tvorba ROS je jednou z možných příčin cytotoxického působení MRO na buňky. Byla proto zjišťována pomocí metody DCF. Použity byly dvě buněčné linie, HT29 a GF 6. Použité koncentrace pracovních roztoků MRO se pohybovaly od 1  $\mu\text{g/ml}$  do 100  $\mu\text{g/ml}$ . Fluorescence byla měřena po dobu 4 hodin.

Po 4 hodinách byl nárůst hodnot fluorescence u linie HT29 signifikantní již od koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$ . Oproti tomu u nenádorové linie GF 6 byl nárůst signifikantní až od koncentrace 75  $\mu\text{g/ml}$  (Obr. 13 a Obr. 14).



Obr. 13 Produkce ROS buněčnou linií HT29 po ovlivnění MRO, stanovená metodou DCF, čas 4 hodiny po ovlivnění

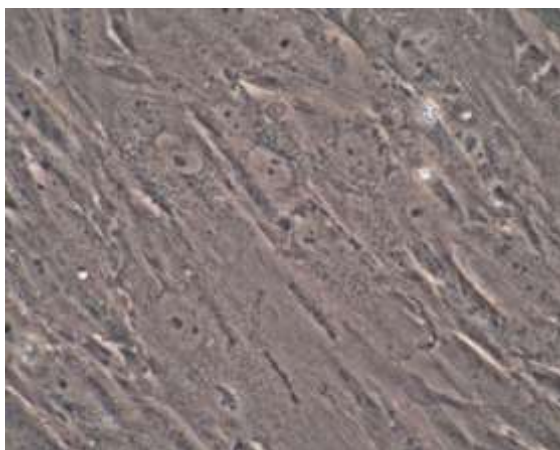
\* = statisticky významný rozdíl oproti kontrole,  $p \leq 0,05$  %



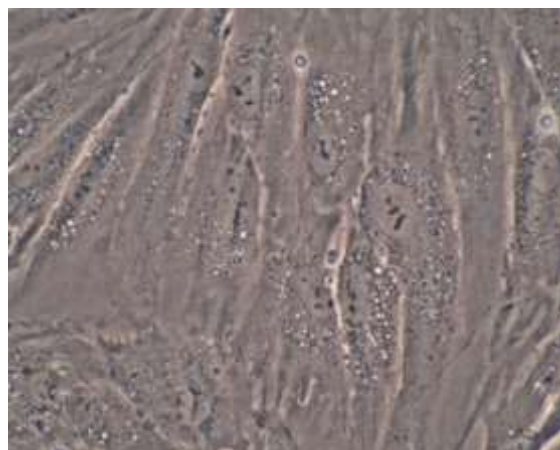
Obr. 14 Produkce ROS buněčnou linií GF 6 po ovlivnění MRO, stanovená metodou DCF, čas 4 hodiny po ovlivnění

\* = statisticky významný rozdíl oproti kontrole,  $p \leq 0,05$  %

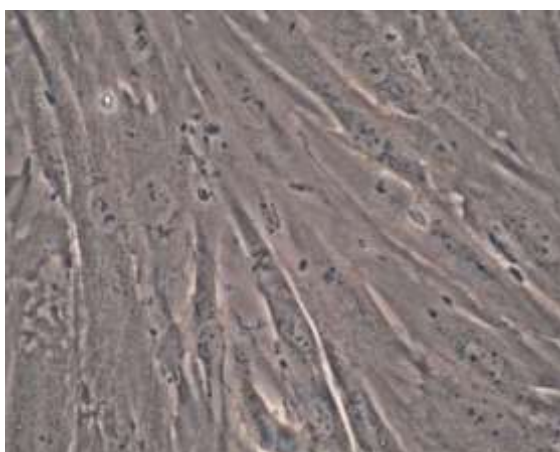
Buňky ovlivněné MRO byly také pravidelně pozorovány pod mikroskopem. MRO indukoval u buněk HT29 a GF 6 tvorbu četných cytoplazmatických vakuol. U buněk GF 6 jsme pozorovali časný nástup vakuolizace s maximem po 4 hodinách od ovlivnění, po němž následoval rychlý pokles. Po 24 hodinách vypadají buňky opět normálně (Obr. 15). U HT29 byla tvorba vakuol zpočátku méně výrazná, ale po 24 hodinách stále přetrvávala (Obr. 16).



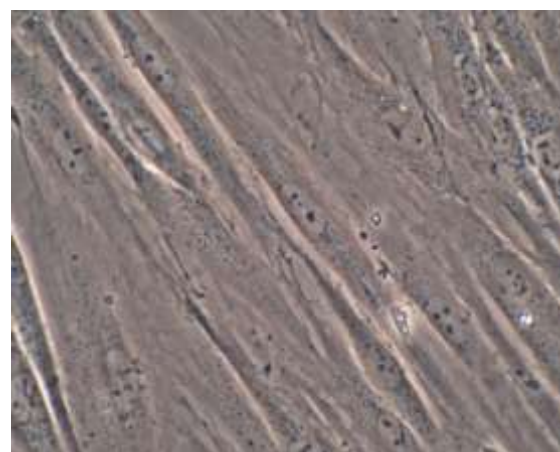
GF 6 kontrola 4 hodiny



GF 6 MRO 50 µg/ml 4 hodiny

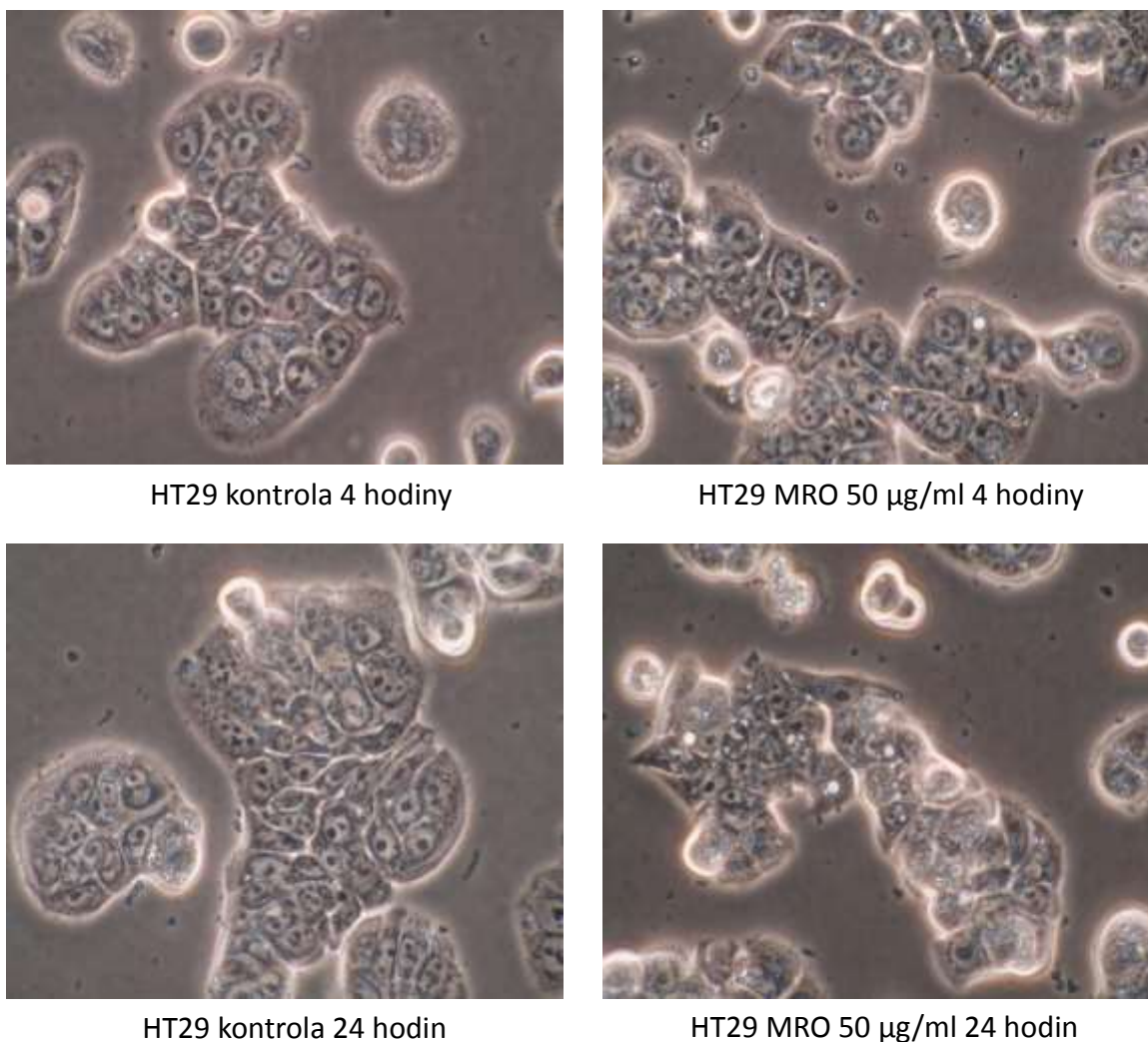


GF 6 kontrola 24 hodin



GF 6 MRO 50 µg/ml 24 hodin

Obr. 15 Fotografie buněk GF 6 z pozorování pod fázově-kontrastním mikroskopem, kontrolních a ovlivněných MRO, po 4 a 24 hodinách. Zvětšení mikroskopu 600x.



Obr. 16 Fotografie buněk HT29 z pozorování pod fázově-kontrastním mikroskopem, kontrolních a ovlivněných MRO, po 4 a 24 hodinách. Zvětšení mikroskopu 600x.

#### 5.4. Prooxidační účinek vybraných seskviterpenů

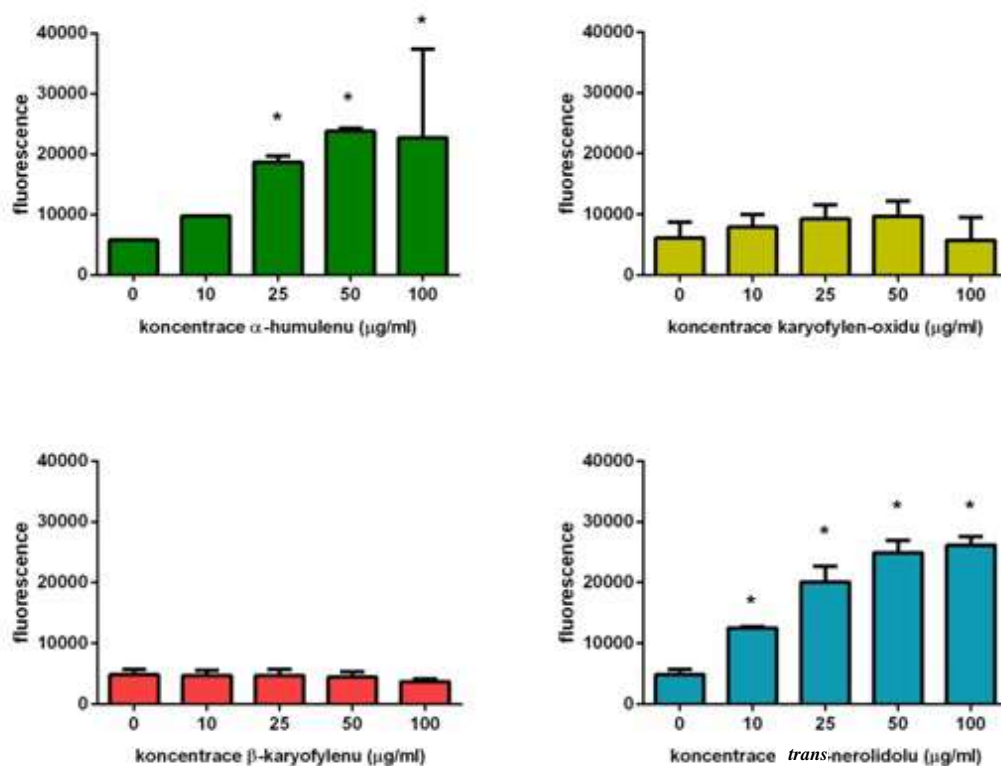
Metodou s DCF byla zjišťována produkce ROS v buňkách ovlivněných jednotlivými seskviterpeny. Nenádorové buňky GF 6 a nádorové buňky HT29 byly ovlivněny 4 seskviterpeny v koncentracích od 10 µg/ml do 100 µg/ml –  $\alpha$ -humulenem, karyofylen-oxidem,  $\beta$ -karyofylenem a *trans*-nerolidolem. Měření fluorescence probíhalo 4 hodiny.

Po celou dobu měření byl zaznamenáván nárůst fluorescence – tj. zvýšení produkce ROS. V případě GF 6 způsobily vysokou produkci ROS  $\alpha$ -humulen (signifikantní od koncentrace 25 µg/ml) a *trans*-nerolidol (signifikantní od koncentrace



10  $\mu\text{g/ml}$ ), viz Obr. 17. Karyofylen-oxid a  $\beta$ -karyofylen nezvyšovaly anebo jen málo zvyšovaly produkci ROS.

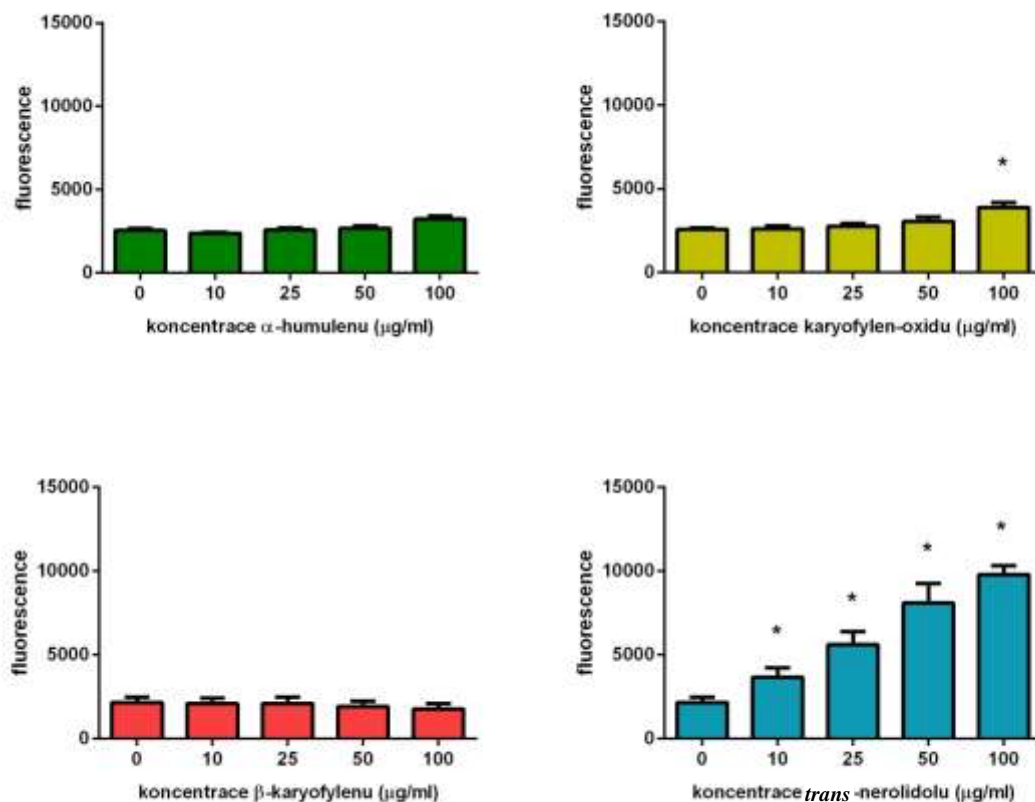
V případě HT29 byl opět nejúčinnější *trans*-nerolidol (signifikantní od koncentrace 10  $\mu\text{g/ml}$ ), viz Obr. 18. Karyofylen-oxid dosáhl statisticky významné zvýšení produkce ROS v koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Působení ostatních seskviterpenů bylo nevýznamné.



Obr. 17 Produkce ROS buňkami linie GF 6 po ovlivnění  $\alpha$ -humulenem, karyofylen-oxidem,  $\beta$ -karyofylenem a *trans*-nerolidolem stanovená metodou DCF, čas 4 hodiny po ovlivnění

\* = statisticky významný rozdíl oproti kontrole,  $p \leq 0,05$  %





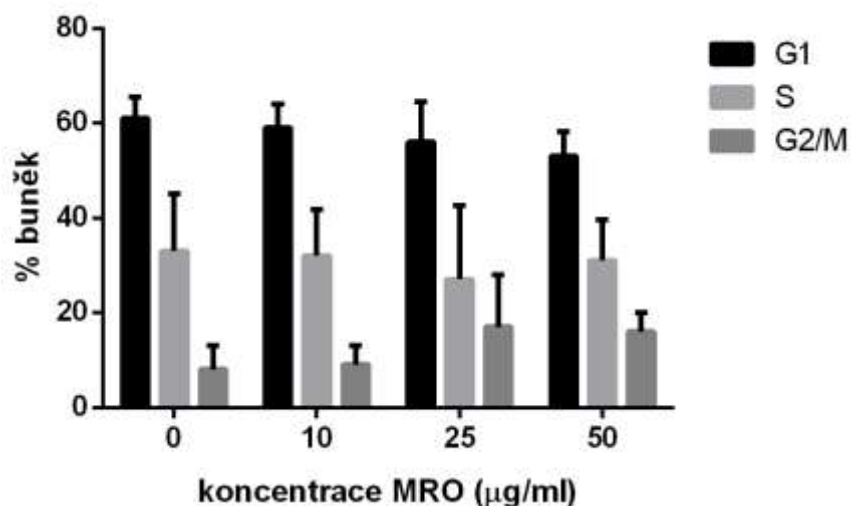
Obr. 18 Produkce ROS buňkami linie HT29 po ovlivnění  $\alpha$ -humulenem, karyofylen-oxidem,  $\beta$ -karyofylenem a *trans*-nerolidolem stanovená metodou DCF, čas 4 hodiny po ovlivnění

\* = statisticky významný rozdíl oproti kontrole,  $p \leq 0,05$  %

### 5.5. Měření buněčného cyklu po ovlivnění MRO

Pomocí průtokové cytometrie byla zjišťována distribuce fází buněčného cyklu a její změny po ovlivnění buněčné linie HT29. Buňky byly ovlivněny MRO v koncentracích 10, 25 a 50  $\mu\text{g/ml}$  a po 48 hodinách od ovlivnění byla provedena cytometrie.

Se vzrůstající koncentrací MRO byl zaznamenán mírný pokles zastoupení G1 fáze a mírný nárůst v G2/M fázi, ale všechny změny byly nesignifikantní (Obr. 19).

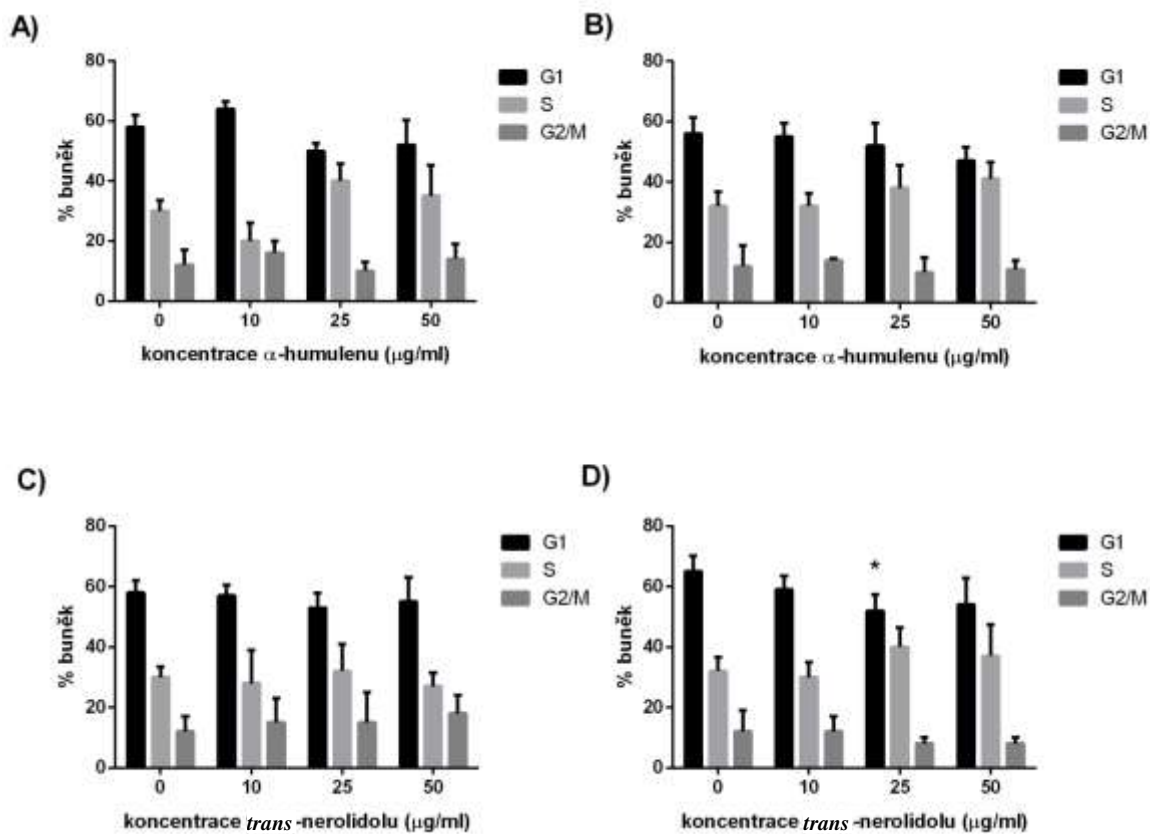


Obr. 19 Distribuce fází buněčného cyklu buněk HT29 48 hodin po ovlivnění MRO

### 5.5. Měření buněčného cyklu po ovlivnění vybranými seskviterpeny

Průtokovou cytometrií byly zjišťovány i případné změny buněčného cyklu po ovlivnění buněk HT29 dvěma dosud nejúčinnějšími seskviterpeny –  $\alpha$ -humulenem a *trans*-nerolidolem. Buňky byly ovlivněny stejnými koncentracemi seskviterpenů jako u MRO (10, 25 a 50 µg/ml). Měření proběhlo po 24 a 48 hodinách od ovlivnění.

U buněk ovlivněných  $\alpha$ -humulenem byl pozorován pokles zastoupení G1 fáze a nárůst v S fázi (výraznější po 48 hodinách), ale rozdíly nebyly signifikantní. U buněk ovlivněných *trans*-nerolidolem také došlo k poklesu G1 fáze (spíše po 48 hodinách), ale signifikantní byla pouze koncentrace 25 µg/ml. Taktéž byl po 48 hodinách zaznamenán mírný, ale nesignifikantní nárůst S fáze (Obr. 20).



Obr. 20 Měření buněčného cyklu na buňkách HT29

A)  $\alpha$ -humulene, 24 hodin

B)  $\alpha$ -humulene, 48 hodin

C) *trans*-nerolidol, 24 hodin

D) *trans*-nerolidol, 48 hodin

\* = statisticky významný rozdíl oproti kontrole,  $p \leq 0,05$  %

## 6. DISKUZE

*Myrica rubra* je ovocný strom známý především mezi obyvatelstvem Číny pro své chutné plody. Využíván je ale i v lidové medicíně, příkladem je využití plodů nebo kůry k léčbě průjmů. Kromě protiprůjmového působení byly u plodů prokázány také antioxidační, antidiabetické a antibakteriální účinky (Yao et al. 2011, Sun et al. 2013, Qin et al. 2011). U extraktů z listů nebo kůry byla zjištěna schopnost vychytávat volné radikály (Sun et al. 2013). Zkoumány byly i protirakovinné účinky obsahových látek. U jednoho z flavonoidů obsažených v plodu, C3G, bylo zjištěno cytotoxické působení na buněčné linie odvozené z nádorů žaludku SGC7901, AGS, BGC823 (Sun et al. 2012). Další flavonoidní sloučenina, PB233'OG, způsobuje apoptózu u buněk A-549 a MCF-7 (Sun et al. 2013). Látka s diarylheptanoidní strukturou, rubanol, působila cytotoxicky na linie Bre-04, Lun-06 a Neu-04. Extrakt z listů inhiboval růst buněk HeLa a P-388 *in vitro* a u buněk P-388 i *in vivo* (Sun et al. 2013). I přes intenzivní výzkum biologických aktivit různých obsahových látek v *Myrica rubra*, zájem nebyl po dlouhou dobu věnován látkám obsaženým v silici z listů *Myrica rubra*. Silice jsou ovšem známé pro řadu biologických účinků a mezi ně patří i protinádorový efekt. Ten byl prokázán např. u silice *Abies balsamea*, *Croton flavens* nebo *Piper gaudichaudianum* (Sperotto et al. 2013, Başer a Buchbauer 2010).

Až v práci Langhansové et al. (2014) byla otestována antiproliferační aktivita MRO na střevních nádorových liniích HCT8, Caco2, HT29, SW620 a SW480. MRO měla při pokusu s NR v závislosti na koncentraci vliv na všechny testované linie, nejvíce na HCT8, Caco2 a HT29. Její IC<sub>50</sub> se u nich pohybovala mezi 30 a 49 µg/ml. Oproti tomu na nenádorové buňky, potkaní jaterní buňky, cytotoxicky nepůsobila (Langhansová et al. 2014). To je v souladu s výsledky zjištěnými v rámci této diplomové práce. Po ovlivnění střevních nádorových liniích HT29, SW480 a SW620 MRO došlo k výraznému snížení proliferace buněk. Na nenádorovou linii gingiválních fibroblastů, GF 6, nebylo cytotoxické působení MRO signifikantní. Nejcitlivější z trojice nádorových linií byly, stejně jako v uvedené studii, buňky HT29, kde byl tento efekt signifikantní od koncentrace 25 µg/ml. U linií SW480 a SW620 při ovlivnění nejvyšší testovanou koncentrací byl překvapivě pozorován nárůst počtu buněk, u HT29 tento nárůst nebyl tak evidentní. K tomuto jevu došlo pravděpodobně v důsledku horší

rozpuštěnosti nejvyšší testované koncentrace MRO v DMSO a následně v médiu, což pravděpodobně způsobilo vypadávání MRO z roztoku.

Buňky HT29, které se v testu s NR projeví jako nejcitlivější, a GF 6, nenádorové buňky použité pro porovnání, byly také po ovlivnění MRO pozorovány pod fázově-kontrastním mikroskopem. V obou typech buněk byla zřejmá zvýšená tvorba vakuol vlivem MRO. Po 24 hodinách bylo množství vakuol u HT29 oproti GF 6 pořád ještě značné, což koresponduje s testem s NR – k většímu poškození a cytotoxickému působení došlo u HT29. Vakuolizace cytoplazmy je častou odpovědí buněk na cytotoxické působení různých látek (Aki et al. 2012). Původ a způsob vzniku cytoplazmatických vakuol není zcela jasný, v řadě případů ale souvisí s autofagií a tvorbou ROS (Bursch et al. 2008). U některých seskviterpenů byly již dříve popsány prooxidační účinky (Ruberto a Baratta 2000, Sperotto et al. 2013). Pro ověření prooxidačních účinků MRO byl proveden test tvorby ROS (pomocí DCF) v nádorových i nenádorových buňkách. Čas, po který byla tvorba ROS měřena, byl vybrán na základě výsledků pozorování pod mikroskopem – v době 4 hodiny po ovlivnění MRO je vakuolizace výrazná, po delší době klesá. V testu s DCF byla zvýšená tvorba ROS potvrzena, u buněk HT29 je signifikantně zvýšena už od koncentrace 10 µg/ml. U buněk GF 6 je nárůst tvorby ROS patrný až od koncentrace 75 µg/ml a to odpovídá i rozdílnému stupni poškození obou buněčných typů. Zdá se tedy, že jedním z mechanismů účinku MRO by mohla být indukce ROS.

Složení MRO bylo analyzováno a uvedeno v práci Langhansové et al. (2014). Mezi nejvíc zastoupené obsahové látky patřil β-karyofylen, α-humulén, β-karyofylenoxid a *trans*-nerolidol. Aby se zjistilo, zda jsou zodpovědné za účinek této silice, byly otestovány jejich antiproliferační vlastnosti, opět na buňkách HT29 pomocí testu s NR. Cytotoxický účinek *trans*-nerolidolu byl již popsán v práci Sperotta et al. (2013) na buňkách *Saccharomyces cerevisiae*. V naší práci vykazoval *trans*-nerolidol antiproliferační účinek, a to ve všech zkoušených koncentracích. Antiproliferační aktivita α-humulenu byla zdokumentována na řadě buněčných linií jako LNCaP, PC-3, A-549, DLD-1, M4BEU, HeLa, HT29 (Sperotto et al. 2013, Silva et al. 2008). Ve studii Silvy et al. (2008) na HT29 bylo  $CD_{50}$ , koncentrace látky nutná pro inhibici proliferace buněk o 50 %,  $24,8 \pm 1,4$  µg/ml a na nenádorové buňky byl jeho efekt menší. α-humulén byl účinný i ve studii Langhansové et al. (2014) na buňkách Caco2,  $IC_{50}$  se pohybovala okolo 30 µg/ml. V souladu s těmito poznatky jsou i naše naměřené výsledky. Signifikantní antiproliferační účinek měl α-humulén od koncentrace

50  $\mu\text{g/ml}$ .  $\beta$ -karyofylen podle Pérese et al. (2009) a Legaulta a Pichetta (2007) nepůsobí antiproliferačně. Naopak ve studii Silvy et al. (2008) na buněčné linii HT29 aktivní byl,  $\text{IC}_{50}$  byla  $40,9 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ . V naší práci byl účinek  $\beta$ -karyofylenu na buňkách HT29 signifikantní až při koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  a jeho účinek nebyl dostatečný pro určení  $\text{IC}_{50}$ . Obdobné údaje jsou i pro karyofylen-oxid. Podle Pérese et al. (2009) neovlivňuje proliferaci buněk, kdežto podle studie Sibandy et al. (2004) na různých buněčných liniích působil mírně cytostaticky. Zde byl efekt karyofylen-oxidu nízký a stejně jako u  $\beta$ -karyofylenu byl signifikantní pouze při nejvyšší koncentraci.

Test s DCF pro detekci tvorby ROS byl proveden i s jednotlivými seskviterpeny. U *trans*-nerolidolu byl již dříve zjištěn jeho prooxidační účinek (Ruberto a Baratta 2000, Sperotto et al. 2013). Tento efekt se potvrdil i při zde prováděných pokusech. V práci Sperotta et al. (2013) autoři předpokládají, že je cytostatický účinek  $\alpha$ -humulenu na použité buněčné linie způsoben právě produkcí ROS a také deplecí glutathionu. Vysoká tvorba ROS byla zjištěna i zde při testu na GF 6, u HT29 nebyla signifikantní. Jelikož byla při testu s MRO na HT29 naměřena vyšší tvorba ROS než u jednotlivých seskviterpenů, je pravděpodobně za účinek zodpovědná kombinace buď těchto obsahových látek, anebo případně i jiných, zastoupených v menším množství. Potenciace cytostatického účinku  $\alpha$ -humulenu  $\beta$ -karyofylenem byla již uváděna v pracích Legaulta a Pichetta (2007) a Bártíkové et al. (2014). Například i u silice z *Croton flavens* je pravděpodobně za antiproliferační účinek zodpovědná kombinace látek, jednou z nich je  $\alpha$ -humulen (Sylvestre et al. 2006).

Zjišťovali jsme také případný vliv MRO a neúčinnějších seskviterpenů na distribuci fází buněčného cyklu u buněk linie HT29. V případě MRO došlo k drobnému nárůstu v G2/M fázi a poklesu v G1 fázi, změny ale nebyly signifikantní. Podobné výsledky jsme získali i v případě *trans*-nerolidolu a  $\alpha$ -humulenu. I zde docházelo v závislosti na koncentraci a době působení k malým změnám v distribuci fází, zejména mírnému nárůstu S fáze, rozdíly ve srovnání s kontrolou však opět nebyly signifikantní. V práci Tatmanové a Moové (2002), kde byl také zjišťován vliv nerolidolu (nespecifikovaný izomer) na buněčný cyklus, a to u buněk B16 a HL60, došlo naopak k nárůstu v G0-G1 fázi a snížení zastoupení S a G2/M fází. Nárůst G0-G1 fáze a pokles v ostatních fázích značí zastavení buněčného cyklu v G0-G1 fázi. Rozpor ve výsledcích zjištěných v této studii a naší práci může být způsoben rozdílnými použitými liniemi - v naší práci byly použity lidské kolorektální buněčné linie, kdežto ve studii Tatmanové a Moové (2002) buňky myšího melanomu a leukemické buňky. Navíc byly v uváděné

práci testovány i směsi nerolidolu s farnesolem, kdy mohl být účinek jednotlivých látek v daných kombinacích potencován.

## 7. ZÁVĚR

- MRO měl významný antiproliferační koncentračně-závislý účinek na všechny testované nádorové linie, tj. SW480, SW620, HT29 i GF 6. Vliv MRO byl nesignifikantní u nenádorové linie GF 6. Nejvyšší efekt měl MRO na buňky HT29.
- Z vybraných seskviterpenů měl na linii HT29 nejsilnější antiproliferační účinek *trans*-nerolidol, který snižoval proliferaci buněk ve všech testovaných koncentracích. Od koncentrace 50 µg/ml měl signifikantní antiproliferační účinek i  $\alpha$ -humulen.  $\beta$ -karyofylen a karyofylen-oxid mají účinek nižší.
- Po ovlivnění linie HT29 MRO došlo ke značnému nárůstu tvorby ROS, opět v závislosti na koncentraci MRO. U buněk GF 6 došlo ke zvýšení tvorby ROS až při vyšších koncentracích ve srovnání s linií HT29.
- Ke zvýšené produkci ROS došlo u buněk GF 6 i vlivem *trans*-nerolidolu a  $\alpha$ -humulenu.  $\beta$ -karyofylen a karyofylen-oxid jsou oproti nim málo účinné. Na buňkách HT29 působí zvýšenou tvorbu ROS *trans*-nerolidol, efekt ostatních testovaných seskviterpenů je nízký.
- U linie HT29 snižuje MRO mírně zastoupení fáze G1 a zvyšuje zastoupení fáze G2/M. Vliv je nesignifikantní.
- *Trans*-nerolidol i  $\alpha$ -humulen snižují zastoupení G1 fáze a zvyšují zastoupení S fáze, a to spíše po 48 hodinách od ovlivnění buněk HT29. Vliv na G1 fázi je signifikantní pouze u *trans*-nerolidolu v koncentraci 25 µg/ml v čase 48 hodin od ovlivnění buněk.



## Seznam zkratek

- ACF – aberantní kryptový fokus  
APC – adenomatous polyposis coli  
ATCC – American Type Culture Collection  
C3G – cyanidin-3-O-glukosid  
COX2 – cyklooxygenasa 2  
CRC – kolorektální karcinom  
DCC – Deleted in colorectal cancer  
DCF – 2',7'-dichlorofluorescein  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution  
EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová  
EGF – epidermální růstový faktor  
EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor  
FAP – familiární adenomatózní polypóza  
FBS - fetální bovinní sérum  
GST - glutathion-S-transferasa  
HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom  
K-RAS – Kirstein rat sarcoma  
MMR – mismatch repair  
MRO – silice *Myrica rubra*  
NFκB - nukleární faktor κB  
NR – neutrální červeň  
PB233'OG – prodelfinidin B-2 3,3'-di-O-galát  
PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub>  
PI - propidium jodid  
PI3K – fosfatidylinositol-3-kinasa  
ROS - reactive oxygen species  
TGF-β – transforming growth factor β  
TMN – tumour, metastasis, node  
TOKS – test na přítomnost okultního krvácení do stolice  
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor  
VEGFR – receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor

## Seznam použité literatury

ABOULAILA, Mahmoud, Thillaiampalam SIVAKUMAR, Naoaki YOKOYAMA a Ikuo IGARASHI. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites. *Parasitology International*. 2010, vol. 59, issue 2, s. 278-282. DOI: 10.1016/j.parint.2010.02.006.

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, 394 s. ISBN 9788072627158. str. 1-16, 31, 76.

AKAZAWA, Hiroyuki, Yukiko FUJITA, Norihiro BANNO, Kensuke WATANABE, Yumiko KIMURA, Aranya MANOSROI, Jiradej MANOSROI a Toshihiro AKIHISA. Three new cyclic diarylheptanoids and other phenolic compounds from the bark of *Myrica rubra* and their melanogenesis inhibitory and radical scavenging activities. *Journal of Oleo Science*. 2010, vol. 59, issue 4, s. 213-221. DOI: 10.5650/jos.59.213.

AKI, Toshihiko, Akina NARA a Koichi UEMURA. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology and Toxicology*. 2012, vol. 28, issue 3, s. 125-131. DOI: 10.1007/s10565-012-9212-3.

ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902-9062-0. str. 200.

ARAÚJO, Mário J. C., Cláudio A. G. CÂMARA, Flávia S. BORN, Marcílio M. MORAES a César A. BADJI. Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. *Experimental and Applied Acarology*. 2012, vol. 57, issue 2, s. 139-155. DOI: 10.1007/s10493-012-9545-x.

ASTANI, Akram, Jürgen REICHLING a Paul SCHNITZLER. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, vol. 2011, s. 1-8. DOI: 10.1093/ecam/nep187.

BARTIKOVA, Hana, Veronika HANUSOVA, Lenka SKALOVA, Martin AMBROZ, Iva BOUSOVA a N. HOGG. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014, vol. 14, issue 22, s. 37-49. DOI: 10.1007/978-3-0348-9074-8\_4.

BAŞER, Kemal Hüsnü Can a Gerhard BUCHBAUER. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2010. ISBN 978-1-4200-635-8. str. 1-5, 83-89, 129, 209-210, 236-239, 246, 297, 323, 552, 843-844, 883.

BHALLA, Yashika, Vinay Kumar GUPTA a Vikas JAITAK. Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, vol. 93, issue 15, s. 3643-3653. DOI: 10.1002/jsfa.6267.

BRACA, Alessandra, Tiziana SICILIANO, Manuela D'ARRIGO a Maria Paola GERMANÒ. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*. 2008, vol. 79, issue 2, s. 123-125. DOI: 10.1016/j.fitote.2007.11.002.

BURSCH, Wilfried, Anneliese KARWAN, Miriam MAYER, Julia DORNETSHUBER, Ulrike FRÖHWEIN, Rolf SCHULTE-HERMANN, Barbara FAZI, Federica Di SANO, Lucia PIREDDA, Mauro PIACENTINI, Goran PETROVSKI, László FÉSÜS a Christopher GERNER. Cell death and autophagy: Cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology*. 2008, vol. 254, issue 3, s. 147-157. DOI: 10.1016/j.tox.2008.07.048.

ECKSCHLAGER, Tomáš. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada-Avicenum, 1999, 169 s. ISBN 80-716-9279-4. str. 1-19, 47-57.

FERNANDES, Elizabeth S., Giselle F. PASSOS, Rodrigo MEDEIROS, Fernanda M. da CUNHA, Juliano FERREIRA, Maria M. CAMPOS, Luiz F. PIANOWSKI a João B. CALIXTO. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*. 2007, vol. 569, issue 3, s. 228-236. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.04.059.

FERREIRA, Fernanda M., Carlos M. PALMEIRA, Maria M. OLIVEIRA, Dario SANTOS, Anabela M. SIMÕES, Sílvia M. ROCHA, Manuel A. COIMBRA a Francisco PEIXOTO. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicology in Vitro*. 2012, vol. 26, issue 2, s. 189-196. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.11.009.

GREPLOVÁ, Marta. Buněčné kultury a produkce rekombinantních proteinů. In: [online]. 2013 [cit. 2014-06-16]. Dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/08.%20Bunecne%20kultury.pdf>

HE, X.H., L.G. CHEN, S. ASGHAR, Y. CHEN. Red bayberry (*Myrica rubra*), a promising fruit and forest tree in China. *Journal of American Pomological society*. 2004, vol. 58, s.163-168.

HOLUBEC, Luboš. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 175 s. ISBN 80-247-0636-9. str. 15-31, 41-44, 150.

HRABÁLEK, Alexandr, Pavel DOLEŽAL, Zdenka ŠKLUBALOVÁ, Oldřich FARSA a Aleš KREBS. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 1999, vol. 93, issue 2, s. 107-119.

HUBÍK, Josef, Jaroslav DUŠEK, Alena ŘEZÁČOVÁ a Helena ŠTARHOVÁ. *Obecná farmakognosie - II.: Sekundární látky*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n.p., 1986, 274 s. str. 197.

CHANG, Hyun-Joo, Hyun Jung KIM a Hyang Sook CHUN. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life Sciences*. 2007, vol. 80, issue 9, s. 835-841. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.11.009.

CHAVAN, M.J., P.S. WAKTE a D.B. SHINDE. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*. 2010, vol. 17, issue 2, s. 149-151. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.05.016.

JABLONSKÁ, Markéta. *Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 455 s. ISBN 80-7169-777-x. str. 23-56, 74, 137, 253, 273.

KANG, Wenhui, Yan LI, Yan XU, Wenguang JIANG a Yongsheng TAO. Characterization of aroma compounds in Chinese bayberry ( *Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and olfactometry (GC-O). *Journal of Food Science*. 2012, vol. 77, issue 10, C1030-C1035. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02747.x.

KANTHAN, Rani, Jenna-Lynn SENGER a Selliah Chandra KANTHAN. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: A review. *Pathology Research International*. 2012, vol. 2012, s. 1-14. DOI: 10.1155/2012/597497.

KHEIRELSEID, Elrasheid A. H., Nicola MILLER a Michael J. KERIN. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*. 2013, vol. 03, issue 02, s. 72-80. DOI: 10.4236/ajmb.2013.32010.

KIM, Chulwon, Somi K. CHO, Ki-Dong KIM, Dongwoo NAM, Won-Seok CHUNG, Hyeung-Jin JANG, Seok-Geun LEE, Bum Sang SHIM, Gautam SETHI a Kwang Seok AHN. B-caryophyllene oxide potentiates TNF $\alpha$ -induced apoptosis and inhibits invasion through down-modulation of NF- $\kappa$ B-regulated gene products. *Apoptosis*. 2013a, vol. 19, issue 4, s. 708-718. DOI: 10.1007/s10495-013-0957-9.

KIM, Chulwon, Somi K. CHO, Shweta KAPOOR, Ansu KUMAR, Shireen VALI, Taher ABBASI, Sung-Hoon KIM, Gautam SETHI a Kwang Seok AHN. B-caryophyllene oxide inhibits constitutive and inducible STAT3 signaling pathway through induction of the SHP-1 protein tyrosine phosphatase. *Molecular Carcinogenesis*. 2013b, vol. 53, issue 10, s. 793-806. DOI: 10.1002/mc.22035.

KUO, Po-Lin, Ya-Ling HSU, Ta-Chen LIN a Chun-Ching LIN. Prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra* inhibits proliferation of A549 carcinoma cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. 2004a, vol. 501, 1-3, s. 41-48. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.08.024.

KUO, Po-Lin, Ya-Ling HSU, Ta-Chen LIN, Liang-Tzung LIN a Chun-Ching LIN. Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra* via Fas-mediated pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004b, vol. 56, issue 11, s. 1399-1406. DOI: 10.1211/0022357044625.

LAN, YU-HSUAN, YANG-CHANG WU, KAI-WEI WU, JING-GUNG CHUNG, CHI-CHENG LU, YUAN-LIANG CHEN, TIAN-SHUNG WU a JAI-SING YANG. Death receptor 5-mediated TNFR family signaling pathways modulate  $\gamma$ -humulene-induced apoptosis in human colorectal cancer HT29 cells. *Oncology Reports*. 2011-02-01, vol. 25, issue 2, s. -. DOI: 10.3892/or.2010.1087.

LANGHANSOVA, Lenka, Veronika HANUSOVA, Jan REZEK, Barbora STOHANSLOVA, Martin AMBROZ, Vera KRALOVA, Tomas VANEK, Ji Dong LOU, Zhu Li YUN, Jun YANG a Lenka SKALOVA. Essential oil from *Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Industrial Crops and Products*. 2014, vol. 59, s. 20-26. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.04.018.

LAPCZYNSKI, A., S.P. BHATIA, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*. 2008, vol. 46, issue 11, S247-S250. DOI: 10.1016/j.fct.2008.06.063.

LEGAULT, Jean a André PICHETTE. Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007, vol. 59, issue 12, s. 1643-1647. DOI: 10.1211/jpp.59.12.0005.

LOIZZO, Monica Rosa, Rosa TUNDIS, Federica MENICHINI, Antoine Mikael SAAB, Giancarlo Antonio STATTI a Francesco MENICHINI. Cytotoxic activity of essential oils from *Labiatae* and *Lauraceae* families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer Research*. 2007, vol. 27, 5A, s. 3293-3300.

MARKOWITZ, Sanford D. a Monica M. BERTAGNOLLI. Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009-12-17, vol. 361, issue 25, s. 2449-2460. DOI: 10.1056/NEJMra0804588.

MATSUDA, Hisashi, Toshio MORIKAWA, Jing TAO, Kazuho UEDA a Masayuki YOSHIKAWA. Bioactive constituents of chinese natural medicines. VII. Inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells and absolute stereostructures of three new diarylheptanoid glycosides from the bark of *Myrica rubra*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2002, vol. 50, issue 2, s. 208-215. DOI: 10.1248/cpb.50.208.

M'BAREK, L. Ait, H. Ait MOUSE, A. JAËFARI, R. ABOUFATIMA, A. BENHARREF, M KAMAL, J. BÉCARD, N. EL ABBADI, M. BENSALAH, A. GAMOUH, A. CHAIT, A. DALAL a A. ZYAD. Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus broussonettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007, vol. 40, issue 11, s. 1537-1544. DOI: 10.1590/s0100-879x2007001100014.

MCGINTY, D., C.S. LETIZIA a A.M. API. Addendum to Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*. 2010, vol. 48, S43-S45. DOI: 10.1016/j.fct.2009.11.008.

MLADĚNKA, Přemysl. *Seminář Cytostatika*. Hradec Králové, 2013a.

MLADĚNKA, Přemysl. *Přednáška Cílená protinádorová farmakoterapie*. Hradec Králové, 2013b.

MORIKAWA, Toshio. Search for bioactive constituents from several medicinal foods: hepatoprotective, antidiabetic, and anti-allergic activities. *Journal of Natural Medicines*. 2006, vol. 61, issue 2, s. 112-126. DOI: 10.1007/s11418-006-0105-8.

MURATA, Kazuya, Shinichi MATSUMURA, Yuri YOSHIOKA, Yoshihiro UENO a Hideaki MATSUDA. Screening of  $\beta$ -secretase and acetylcholinesterase inhibitors from plant resources. *Journal of Natural Medicines*. 2014, vol. 69, issue 1, s. 123-129. DOI: 10.1007/s11418-014-0859-3.

NEWMAN, David J. a Gordon M. CRAGG. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012, vol. 75, issue 3, s. 311-335. DOI: 10.1021/np200906s.

NOUDOGBESSI, J.P., L. DELORT, P. CHALARD, H. BILLARD, G. FIGUEREDO, N. RUIZ, J.C. CHALCHAT, D. SOHOUNHLOUE a F.C. CHÉZET. Anti-proliferative activity of four aromatic plants of Benin. *Journal of natural products*. 2013, vol. 6, s. 123-131.

OH, Min-Seok, Ji-Yeon YANG, Min-Gi KIM a Hoi-Seon LEE. Acaricidal activities of  $\beta$ -caryophyllene oxide and structural analogues derived from *Psidium cattleianum* oil against house dust mites. *Pest Management Science*. 2014, vol. 70, issue 5, s. 757-762. DOI: 10.1002/ps.3608.

PADUCH, Roman, Martyna KANDEFER-SZERSZEŃ, Mariusz TRYTEK a Jan FIEDUREK. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2007, vol. 55, issue 5, s. 315-327. DOI: 10.1007/s00005-007-0039-1.

PANTHARI, Preeti, Harendra KHARKWAL, Devi Datt JOSHI a Harsha KHARKWAL. Investigation on *Myrica nagi* leaves: Phytochemical screening and physicochemical evaluation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013, vol. 2, issue 5, s. 2867-2873.

PARK, M.J., K.S. GWAK, I. YANG, K.W. KIM, E.B. JEUNG, J.W. CHANG a I.G. CHOI. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*. 2009, vol. 80, issue 5, s. 290-296. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.03.007.

PARK, Kyung-Ran, Dongwoo NAM, Hyung-Mun YUN, Seok-Geun LEE, Hyeung-Jin JANG, Gautam SETHI, Somi K. CHO a Kwang Seok AHN. B-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*. 2011, vol. 312, issue 2, s. 178-188. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.08.001.

PÉRES, V.F., D.J. MOURA, A.R.M. SPEROTTO, F.C. DAMASCENO, E.B. CARAMÃO, C.A. ZINI a J. SAFFI. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, vol. 47, issue 9, s. 2389-2395. DOI: 10.1016/j.fct.2009.06.035.

POLANCO-HERNÁNDEZ, Glendy, Fabiola ESCALANTE-EROSA, Karlina GARCÍA-SOSA, María E. ROSADO, Eugenia GUZMÁN-MARÍN, Karla Y. ACOSTA-VIANA, Alberto GIMÉNEZ-TURBA, Efraín SALAMANCA a Luis M. PEÑA-RODRÍGUEZ. Synergistic effect of lupenone and caryophyllene oxide against *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, vol. 2013, s. 1-6. DOI: 10.1155/2013/435398.

QIN, Chuan-guang, Yang LI, Weining NIU, Yan DING, Xiaoya SHANG a Chunlan XU. Composition analysis and structural identification of anthocyanins in fruit of waxberry. *Czech Journal of Food Sciences*. 2011, vol. 29, issue 2, s. 171–180.

RASOANAIVO, Philippe, Richard Fortuné RANDRIANA, Filippo MAGGI, Marcello NICOLETTI, Luana QUASSINTI, Massimo BRAMUCCI, Giulio LUPIDI, Dezemona PETRELLI, Luca A. VITALI, Fabrizio PAPA a Sauro VITTORI. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Athanasia brownii* Hochr . (*Asteraceae*) endemic to Madagascar. *Chemistry*. 2013, vol. 10, issue 10, s. 1876-1886. DOI: 10.1002/cbdv.201300147.

RAWAT, Sandeep, Arun JUGRAN, Lalit GIRI, Indra D. BHATT a Ranbeer S. RAWAL. Assessment of antioxidant properties in fruits of *Myrica esculenta*: A popular wild edible species in Indian Himalayan region. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, vol. 2011, s. 1-8. DOI: 10.1093/ecam/neq055.

ROGERIO, Alexandre P., Edinéia L. ANDRADE, Daniela F.P. LEITE, Cláudia P. FIGUEIREDO a João B. CALIXTO. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene  $\alpha$ -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 2009, vol. 158, issue 4, s. 1074-1087. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00177.x.

ROUBALOVÁ, L. Průtoková cytometrie. *bulletin FONS*. 2012, s. 5-9.

RUBERTO, Giuseppe a Maria T BARATTA. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 2000, vol. 69, issue 2, s. 167-174. DOI: 10.1016/s0308-8146(99)00247-2.

RUSSO, Ethan B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 2011, vol. 163, issue 7, s. 1344-1364. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x.

SAINI, Ritu, Veena GARG a Koushalya DANGWAL. Effect of extraction solvents on polyphenolic composition and antioxidant, antiproliferative activities of Himalyan bayberry (*Myrica esculenta*). *Food Science and Biotechnology*. 2013, vol. 22, issue 4, s. 887-894. DOI: 10.1007/s10068-013-0160-3.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, B. Arturo, Maria Isabel AGUILAR, Beatriz KING-DÍAZ, José Fausto RIVERO a Blas LOTINA-HENNSSEN. The sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene and caryophyllene oxide isolated from *Senecio salignus* act as phyto-growth and photosynthesis inhibitors. *Molecules*. 2012, vol. 17, issue 12, s. 1437-1447. DOI: 10.3390/molecules17021437.

SAVELEV, S., E. OKELLO, N.S.L. PERRY, R.M. WILKINS a E.K. PERRY. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2003, vol. 75, issue 3, s. 661-668. DOI: 10.1016/s0091-3057(03)00125-4.

SEIFERT, Bohumil. *Screening kolorektálního karcinomu*. Praha: Maxdorf, 2012, 112 s. Ambulantní gynekologie, sv. 1. ISBN 9788073453091. str. 16-20, 42-63.

SHIMOSAKI, Shunsuke, Yoko TSURUNAGA, Hiroyuki ITAMURA a Morihiko NAKAMURA. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extracts in vitro and in vivo. *Natural Product Research*. 2011, vol. 25, issue 4, s. 374-380. DOI: 10.1080/14786411003774320.



SHIN, Jae-Cheon, Hoe-Yune JUNG, Amaravadhi HARIKISHORE, Oh-Deog KWON, Ho Sup YOON, Kyong-Tai KIM a Bo-Hwa CHOI. The flavonoid myricetin reduces nocturnal melatonin levels in the blood through the inhibition of serotonin N-acetyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013, vol. 440, issue 2, s. 312-316. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.076.

SIATKA, Tomáš. *Přednášky Flavonoidy a Anthocyany*. Hradec Králové, 2012.

SIBANDA, Samson, Grace CHIGWADA, Melvin POOLE, Ephraim T. GWEBU, Joseph A. NOLETTO, Jennifer M. SCHMIDT, Angela I. REA a William N. SETZER. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, vol. 92, issue 1, s. 107-111. DOI: 10.1016/j.jep.2004.02.010.

SILVA, Saulo Luís da, Jamal da Silva CHAAR, Patrícia de Maria Silva FIGUEIREDO a Tomomasa YANO. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazonica*. 2008, vol. 38, issue 1, s. 107-112. DOI: 10.1590/s0044-59672008000100012.

SIMONSEN, J. L. *Terpenes Volume II: The Dicyclic Terpenes, Sesquiterpenes and Their Derivatives*. Cambridge: Cambridge University Press, 1932, xi+627s. str. 528.

SOTTO, Antonella Di, Francesca MAFFEI, Patrizia HRELIA, Francesco CASTELLI, Maria Grazia SARPIETRO a Gabriela MAZZANTI. Genotoxicity assessment of  $\beta$ -caryophyllene oxide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2013, vol. 66, issue 3, s. 264-268. DOI: 10.1016/j.yrtph.2013.04.006.

SPEROTTO, A.R.M., D.J. MOURA, V.F. PÉRES, F.C. DAMASCENO, E.B. CARAMÃO, J.A.P. HENRIQUES a J. SAFFI. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, vol. 57, s. 57-68. DOI: 10.1016/j.fct.2013.03.013.

SPÍNOLA, Vítor, Eulogio J. LLORENT-MARTÍNEZ, Sandra GOUVEIA a Paula C. CASTILHO. Myrica faya: A new source of antioxidant phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, vol. 62, issue 40, s. 9722-9735. DOI: 10.1021/jf503540s.

STEENACKERS, Bart, Luc De COOMAN a Dirk De VOS. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry*. 2015, vol. 172, s. 742-756. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.139.

SUN, Hongxiang, Cuirong SUN a Yuanjian PAN. Cytotoxic activity and constituents of the volatile oil from the roots of *Patrinia scabra* Bunge. *Chemistry*. 2005, vol. 2, issue 10, s. 1351-1357. DOI: 10.1002/cbdv.200590107.

SUN, Chongde, Yixiong ZHENG, Qingjun CHEN, Xianglian TANG, Ming JIANG, Jiukai ZHANG, Xian LI a Kunsong CHEN. Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit. *Food Chemistry*. 2012, vol. 131, issue 4, s. 1287-1294. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.121.

SUN, Chongde, Huizhong HUANG, Changjie XU, Xian LI a Kunsong CHEN. Biological activities of extracts from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2013, vol. 68, issue 2, s. 97-106. DOI: 10.1007/s11130-013-0349-x.

SYLVESTRE, M., J. LEGAULT, D. DUFOUR a A. PICHETTE. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*. 2005, vol. 12, issue 4, s. 299-304. DOI: 10.1016/j.phymed.2003.12.004.

SYLVESTRE, Muriel, André PICHETTE, Angélique LONGTIN, Francine NAGAU a Jean LEGAULT. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, vol. 103, issue 1, s. 99-102. DOI: 10.1016/j.jep.2005.07.011.

TATMAN, Dana a Huanbiao MO. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Letters*. 2002, vol. 175, issue 2, s. 129-139. DOI: 10.1016/s0304-3835(01)00723-6.

THIRUGNANASAMPANDAN, Ramaraj a Delma DAVID. In vitro antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of *Feronia elephantum* Correa. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014, vol. 4, issue 4, s. 290-293. DOI: 10.12980/apjtb.4.2014b878.

VINHOLE, Juliana, Pedro GONÇALVES, Fátima MARTEL, Manuel A. COIMBRA a Sílvia M. ROCHA. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in *in vitro* Caco-2 cell models. *Food Chemistry*. 2014, vol. 156, s. 204-211. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.106.

YANG, Depo, Laura MICHEL, Jean-Pierre CHAUMONT a Joëlle MILLET-CLERC. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*. 2000, vol. 148, issue 2, s. 79-82.

YANG, Zhenfeng, Shifeng CAO a Yonghua ZHENG. Chinese bayberry fruit extract alleviates oxidative stress and prevents 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci development in rat colon

carcinogenesis. *Food Chemistry*. 2011, vol. 125, issue 2, s. 701-705. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.070.

YAO, Wei Rong, He Ya WANG, Shi Tao WANG, Shi Lei SUN, Jie ZHOU a Yun Yun LUAN. Assessment of the antibacterial activity and the antidiarrheal function of flavonoids from bayberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, vol. 59, issue 10, s. 5312-5317. DOI: 10.1021/jf200211m.

ZHENG, Guo-Qiang, Patrick M. KENNEY a Luke K. T. LAM. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*. 1992, vol. 55, issue 7, s. 999-1003. DOI: 10.1021/np50085a029.

web 1 Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. [online]. [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: <http://www.svod.cz/?sec=analyzy>

web 2 Globocan 2012. [online]. [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

web 3 From Polyp to Cancer. [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: [http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS\\_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS\\_Page\\_ID=0B34E9BE-5DE6-4CB4-B387-4158CC924084](http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS_Page_ID=0B34E9BE-5DE6-4CB4-B387-4158CC924084)

web 4 Colorectal Cancer. [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/>

web 5 APC. [online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APC>

web 6 Colon cancer - prevention. [online]. [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/basics/prevention/con-20031877>

web 7 Bowel cancer symptoms. [online]. [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/bowel-cancer/about/bowel-cancer-symptoms>

web 8 Exotické ovoce - plody voskovníku červeného. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/exoticke-ovoce-plody-voskovniku-cerveneho.aspx>

web 9 Myricaceae: description. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://eol.org/pages/4327/details>

web 10 Myricaceae. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://web.uconn.edu/mcbstaff/benson/Frankia/Myricaceae.htm>

- web 11 Morella: classification. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://eol.org/pages/21945/names>
- web 12 H2DCFDA (H2-DCF, DCF). [online]. [cit. 2014-06-10]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D399>
- web 13 ATCC: Cell lines [online]. [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: [http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines.aspx?geo\\_country=cz](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx?geo_country=cz)
- web 14 SÚKL. SPC [online]. [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- web 15 Průjem. [online]. [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/gastroenterologie/novinky/kdyz-vas-vase-streva-prohani-aneb-strevni-chripka-a-jak-na-ni>
- web 16 Atlas květin: Cypřišek tupolistý. [online]. [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.atlasbotani.eu/index.php?detail&cislo=1570>
- web 17 Syzygium aromaticum - hřebíčkovce kořený. [online]. [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/syzygium-aromaticum/>
- web18 Allelopathy. Oxford Dictionaries [online]. [cit. 2015-02-26]. Dostupné z: <http://www.oxforddictionaries.com/definition/english/allelopathy>
- web 19 Modrá kniha: Zhoubný novotvar kolorekta (C18-20). [online]. [cit. 2015-01-22]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/informace-pro-praxi/modra-kniha/5-zhoubny-novotvar-kolorekta-c18-20/>
- web 20 Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- web 21 EFloras.org. [online]. [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: [http://www.efloras.org/general\\_object\\_page.aspx?object\\_id=1541](http://www.efloras.org/general_object_page.aspx?object_id=1541)