

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**MODULACE ÚČINNOSTI CYTOSTATIK V NÁDOROVÝCH
BUŇKÁCH POMOCÍ SESKVITERPENŮ**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2016

Markéta Šmatová

„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 ráda poděkovala Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, pomoc a trpělivost při vypracování této diplomové práce. Za spolupráci a cenné rady při experimentech bych také ráda poděkovala Mgr. Martinovi Ambrožovi.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Markéta Šmatová

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

Název diplomové práce: Modulace účinnosti cytostatik v nádorových buňkách pomocí seskviterpenů

Oxaliplatina (OxPt) patří mezi cytostatika běžně používaná při standardní chemoterapeutické léčbě kolorektálního karcinomu. Úspěšný výsledek chemoterapeutické léčby je však často omezen nežádoucími účinky OxPt na zdravou tkáň a vznikem rezistence nádorových buněk na terapii. Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda mohou seskviterpeny ovlivnit antiproliferační aktivitu oxaliplatiny. Seskviterpeny jsou přírodní látky, které jsou hlavními složkami rostlinných silic. V lidském organismu vykazují širokou škálu biologických účinků, zejména antibakteriální, antifungální, imunomodulační, protizánětlivé, antirevmatické, antioxidantní, antivirové a protinádorové. V naší práci byl potvrzen antiproliferační účinek seskviterpenů, konkrétně α -humulenu (HUM), karyofylen-oxidu (CAO), valencenu (VAL) a *trans*-nerolidolu (NER), na buněčných liniích kolorektálního karcinomu SW-620 a Caco-2. Při testování kombinací OxPt s jednotlivými seskviterpeny byl prokázán synergický účinek seskviterpenů CAO, VAL a částečně HUM s OxPt v buněčné linii Caco-2. HUM, VAL a NER byly schopny prokazatelně zvýšit pro-oxidační působení OxPt v buněčné linii Caco-2. Z výsledků lze usoudit, že jedním z možných mechanismů synergického působení VAL a HUM v kombinaci s OxPt je právě schopnost zvýšit pro-oxidační působení OxPt na buňky. U kombinace CAO s OxPt předpokládáme spíše jiný mechanismus synergického působení, protože CAO zvyšoval pro-oxidační působení OxPt jen málo. V našich experimentech se seskviterpeny VAL, CAR a HUM ukázaly jako látky potenciálně vhodné do kombinační terapie s OxPt. Tyto látky má tedy smysl dále testovat a v budoucnu by se mohly v terapii kolorektálního karcinomu uplatnit.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Markéta Šmatová

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

Title of diploma thesis: Modulation of cytostatics efficacy in cancer cells by sesquiterpenes

Oxaliplatin (OxPt) belongs between the cytostatics regularly used during standard chemotherapy treatment of colorectal cancer. The successful treatment of colorectal cancer is often limited by various side effects of OxPt on healthy tissue as well as by the possible development of drug-resistance. The main aim of this thesis is to find out if, sesquiterpenes can affect the antiproliferative activity of OxPt. Sesquiterpenes, natural substances, are the main component of essential oils. In human organism, sesquiterpenes have a wide variety of biological effects especially antibacterial, antifungal, immunomodulatory, inflammatory, antirheumatic, antioxidant, antiviral and antitumor. Our study confirmed the antiproliferative effects of sesquiterpenes α -humulen (HUM), caryophyllene-oxide (CAO), valencene (VAL) and *trans*-nerolidol (NER) in cell lines of colorectal cancer SW-620 and Caco-2. Testing of combinations of OxPt with each sesquiterpenes proved synergistic effects of sesquiterpenes CAO, VAL and partially HUM with OxPt in cell line Caco-2. It was also proven that HUM, VAL, and NER increased the pro-oxidative action OxPt in the cell line Caco-2. Based on these results, we suppose that the ability to increase the pro-oxidative effect of OxPt on cells represents one of the possible mechanisms of VAL and HUM synergism with OxPt. CAO and OxPt combination has probably different mechanism of synergy as CAO has little effect on pro-oxidative activity of OxPt. In our experiments, sesquiterpenes VAL, CAR and HUM showed the promising potential for their use in combination therapy with OxPt. These substances are suitable for further testing and they could be potentially used for the treatment of colorectal cancer in future.

Obsah

OBSAH	6
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 CHARAKTERISTIKA NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ	9
2.1.1 <i>Kolorektální karcinom</i>	10
2.1.2 <i>Epidemiologie</i>	10
2.1.3 <i>Patogeneze kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni</i>	12
2.1.4 <i>Prevence kolorektálního karcinomu</i>	13
2.1.5 <i>Diagnostika</i>	14
2.1.6 <i>Možnosti léčby</i>	15
2.2 OXALIPLATINA.....	16
2.3 PŘÍRODNÍ LÁTKY	17
2.4 TERPENY	18
2.4.1 <i>Syntéze terpenů</i>	19
2.4.2 <i>Charakteristika seskviterpenů</i>	19
2.4.3 <i>Oxidační stres a seskviterpeny</i>	20
2.4.4 <i>Karyofylen-oxid</i>	23
2.4.5 <i>α-Humulen</i>	25
2.4.6 <i>Nerolidol</i>	26
2.4.7 <i>Valencen</i>	28
2.5 BUNĚČNÉ LINIE	29
2.5.1 <i>Kultivace buněk</i>	30
2.5.2 <i>Caco-2</i>	31
2.5.3 <i>SW-620</i>	31
3 CÍL PRÁCE	32
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	33
4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE	33
4.3 METODIKA	34
4.3.1 <i>Kultivace vybraných buněčných linií</i>	34
4.3.1.1 <i>Kultivační médium</i>	34
4.3.1.2 <i>Rozmrazování buněk</i>	35
4.3.1.3 <i>Pasážování adherentních buněk</i>	35
4.3.2 <i>Ovlivňování buněk testovanými látkami</i>	36
4.3.2.1 <i>Stanovení koncentrace buněčné suspenze a nasazování buněk</i>	36
4.3.2.2 <i>Příprava roztoků testovaných látek</i>	38
4.3.2.3 <i>Expozice buněk</i>	39
4.3.2.4 <i>Zamrazování buněk</i>	39
4.3.3 <i>Metodika testu cytotoxicity/antiproliferačního účinku</i>	40
4.3.3.1 <i>NRU test</i>	40
4.3.3.2 <i>MTT test</i>	41
4.3.3.3 <i>Vyhodnocování výsledků</i>	41
4.3.4 <i>Detekce reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí DCF</i>	42
5 VÝSLEDKY	43
5.1 ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT	43
5.2 STANOVENÍ OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE OXALIPLATINY	43

5.3	STANOVENÍ OPTIMÁLNÍCH KONCENTRACÍ JEDNOTLIVÝCH SESKVITERPENŮ	43
5.4	BUNĚČNÁ LINIE SW-620	43
5.4.1	<i>Vliv OxPt na proliferaci buněk SW-620</i>	44
5.4.2	<i>Vliv seskviterpenů na proliferaci buněk SW-620.....</i>	44
5.4.3	<i>Vliv kombinace OxPt a seskviterpenů na proliferaci buněk SW-620.....</i>	46
5.5	BUNĚČNÁ LINIE CACO-2 - PROLIFERUJÍCÍ.....	48
5.5.1	<i>Vliv OxPt na proliferaci buněk Caco-2</i>	48
5.5.2	<i>Vliv seskviterpenů na proliferaci buněk Caco-2.....</i>	50
5.5.3	<i>Vliv kombinace OxPt a seskviterpenů na proliferaci buněk Caco-2.....</i>	52
5.6	BUNĚČNÁ LINIE CACO-2 - DIFERENCOVANÁ.....	54
5.7	VLIV SESKVITERPENŮ A OXPT NA TVORBU ROS.....	55
5.8	ZHODNOCENÍ VZÁJEMNÉHO Vlivu OXPT A SESKVITERPENŮ	59
5.8.1	<i>SW-620</i>	60
5.8.2	<i>Caco-2 proliferující</i>	62
6	DISKUZE.....	64
7	ZÁVĚR.....	68
8	SEZNAM ZKRATEK.....	70
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72

1 Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny nemocnosti a úmrtnosti lidí na celém světě (web 1). Rakovina byla poprvé popsána před tisíci lety, ale existovala již mnohem dříve (Borges Dias et al. 2015). Léčba tohoto onemocnění však není doposud zcela pod kontrolou a to i přes obrovské pokroky ve výzkumu a pochopení biologických procesů, které vedou k rozvoji rakoviny (Modzelewska et al. 2005). Běžně používaná chemoterapeutika s sebou přináší kromě léčebného účinku i řadu nežádoucích účinků a žádné z nich není pro terapii zcela ideální. Klasická chemoterapeutika působí na všechny buňky lidského těla a kromě nádoru porušují i ostatní zdravou tkáň. Díky hlubšímu poznání struktury a pochodů, které probíhají na povrchu a uvnitř buněk, byly do terapie zavedeny biologické léky. Biologická léčba neboli cílená terapie patří mezi nejmodernější způsob léčby rakoviny, jehož cílem není poškození DNA jako u většiny cytostatik, ale je zaměřen na regulační a signální kaskády. Tyto látky mají však také celou řadu nežádoucích účinků (web 2, Mladěnka 2014b).

Izolace a vyhodnocování chemických látek přírodního původu představuje jednu z nejstarších a nejúčinnějších strategií pro vývoj nových chemoterapeutických látek. Více než 50 % léků schválených na léčbu rakoviny v posledních dvou desetiletích 20. století pocházelo z přírodních zdrojů (Huang et al. 2012). Látky byly izolovány z rostlin, mořských živočichů a mikroorganismů.

Velkou skupinu přírodních látek, které jsou intenzivně zkoumány, představují terpeny. Doposud bylo identifikováno více než 30 000 těchto sloučenin a u řady z nich byl již prokázán jejich farmaceutický význam. Terpeny se nacházejí v rostlinách, kde tvoří významnou složku silic, ze kterých jsou pak izolovány. Tyto látky jsou řazeny do několika skupin podle jejich chemických struktur, velkou část těchto látek představují právě seskviterpeny, u nichž byla v mnoha případech prokázána antiproliferační aktivita na nádorové buňky bez negativního nebo dokonce prospěšného vlivu na zdravou tkáň (Modzelewska et al. 2005, Ambrož et al. 2015).

2 Teoretická část

2.1 Charakteristika nádorového onemocnění

Nádorová onemocnění můžeme charakterizovat jako multifaktoriální onemocnění, jejichž vzniku předchází souhra mnoha faktorů. Léčba těchto onemocnění je často velmi obtížná a mnohdy nemožná. Prevence je proto nejdůležitějším krokem v boji proti nádorovým onemocněním. Také včasné rozpoznání rakoviny, zajištění potřebné péče a vhodná léčba dává pacientům větší šanci na vyléčení. Léčba onemocnění v časném stádiu je výhodnější i z hlediska ekonomického, protože je léčba nádorových onemocnění velmi drahá a ne vždy úspěšná.

Rakovina je definována jako nekontrolovatelný růst buněk, které pronikají a rozšiřují se do různých částí těla za hranice svého normálního působení. V pozdějších stádiích tvoří metastázy v různě vzdálených částech těla a orgánech od místa vzniku zárodečného bujení (web 3).

Na vzniku rakoviny se podílejí faktory vnitřní, kterým nelze zcela předcházet, např. dědičné změny v genech. Kromě dědičných predispozic je hlavním vnitřním rizikovým faktorem věk. Lidé se díky kvalitní lékařské péči dožívají stále vyššího věku, populace stárne a přibývají tak nemoci, které se objevují častěji ve vyšším věku. Mezi ně patří i rakovina. Právě kolorektální karcinom (CRC) je jedním z onkologických onemocnění, jehož incidence se s věkem výrazně zvyšuje. Buňky jsou schopny většinu vzniklých mutací v molekulách DNA opravit, s přibývajícím věkem však reparační schopnost buněk klesá a dochází ke kumulaci těchto mutací, které mohou následně vést k nádorovému bujení.

V dnešním světě hojnosti jsou pro nás velkým problémem faktory, které na nás působí zvenčí. Největší problém, který je v dnešní době považován za nejčastější příčinu rakoviny, je celkově špatný životní styl a je na každém z nás, jak se k tomuto problému postaví. Více než 30 % úmrtím na rakovinu lze zabránit, pokud se vyhneme rizikovým faktorům, především jednomu z nich – kouření (web 3).

Rakovina je mnohem častějším onemocněním ve vyspělých zemích světa. Nevhodné stravování a s tím související obezita, nízká spotřeba ovoce, zeleniny a nedostatek vlákniny, vysoká konzumace alkoholu, kouření a nedostatek fyzické aktivity, to vše se podílí velkou měrou na vzniku a rozvoji mnoha nádorových onemocnění. Celkový špatný životní styl, považovaný za nejčastější příčinu rakoviny, lze snadno upravit a mnoha nádorovým onemocněním předcházet. Lidé si však tuto hrozbu, která na ně číhá na každém rohu, dostatečně neuvědomují nebo nechtějí uvědomovat (web 3, Stewart et al. 2014).

2.1.1 Kolorektální karcinom

CRC je geneticky podmíněné onemocnění, které je způsobeno nahromaděním mutací ve většině regulačních genů v buňce. Jedná se o vícestupňový proces, který zahrnuje inaktivaci tumor supresorových genů a aktivaci protoonkogenů. Aktivované protoonkogeny (onkogeny) pak narušují normální buněčný růst a diferenciaci. Významnou roli při vzniku CRC představuje mutace *K-ras* genu.

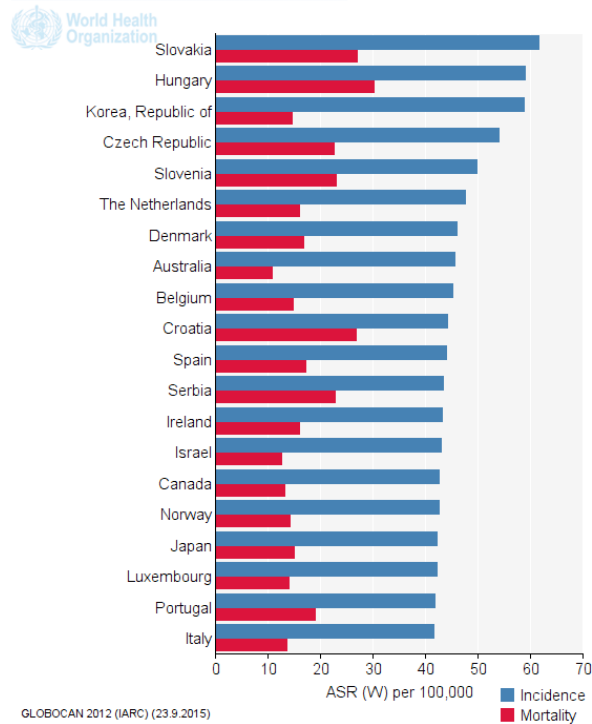
Sporadická forma CRC představuje cca 80 % všech CRC. Menší část, přibližně 15 %, je tvořena familiární a hereditární formou CRC. Jen asi 1 % CRC je způsobeno důsledkem pozdní komplikace idiopatických střevních zánětů, kdy dochází k dysplazii sliznice, která předchází vzniku CRC.

CRC je multifaktoriální onemocnění, na kterém se podílejí faktory genetické, zánětlivé procesy a u sporadické formy CRC jsou to především exogenní faktory, které jsou zodpovědné za mutace genů. Sporadická forma CRC je ve velké míře závislá na věku, jakožto neovlivnitelném rizikovém faktoru (Suchánek et al. 2011, Mahmoud 2015, Holubec 2004).

2.1.2 Epidemiologie

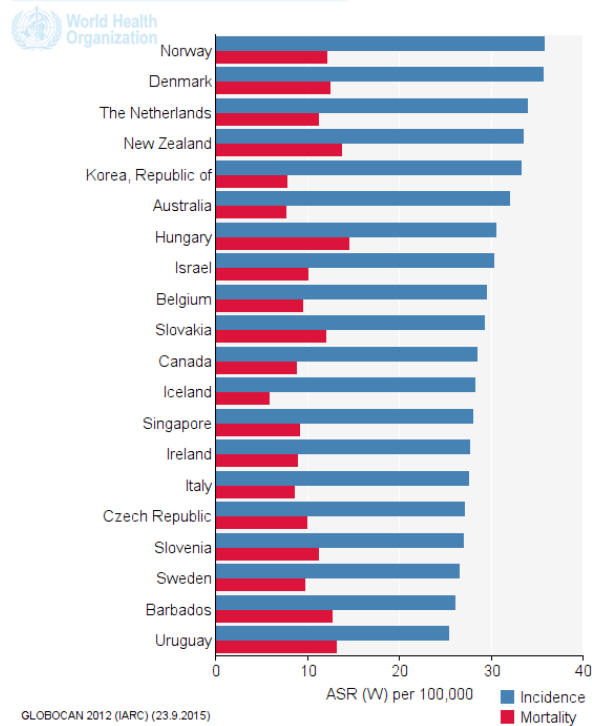
CRC je považován za civilizační onemocnění. Zaujímá přední místa v žebříčku onkologických onemocnění ve všech vyspělých zemích světa. Ve světě v roce 2012 byl CRC třetím nejčastějším zhoubným nádorem u mužů. U žen je CRC 2. nejčastěji diagnostikovaným zhoubným onemocněním (web 4). Česká republika patří mezi země s nejvyšším počtem pacientů s tímto závažným onemocněním. Čeští muži jsou na čtvrtém místě a ženy na místě šestnáctém, co se týče četnosti výskytu tohoto onemocnění v rámci celého světa (viz obr. 1 a obr. 2) (web 4).

International Agency for Research on Cancer **Colorectum: male, all ages**

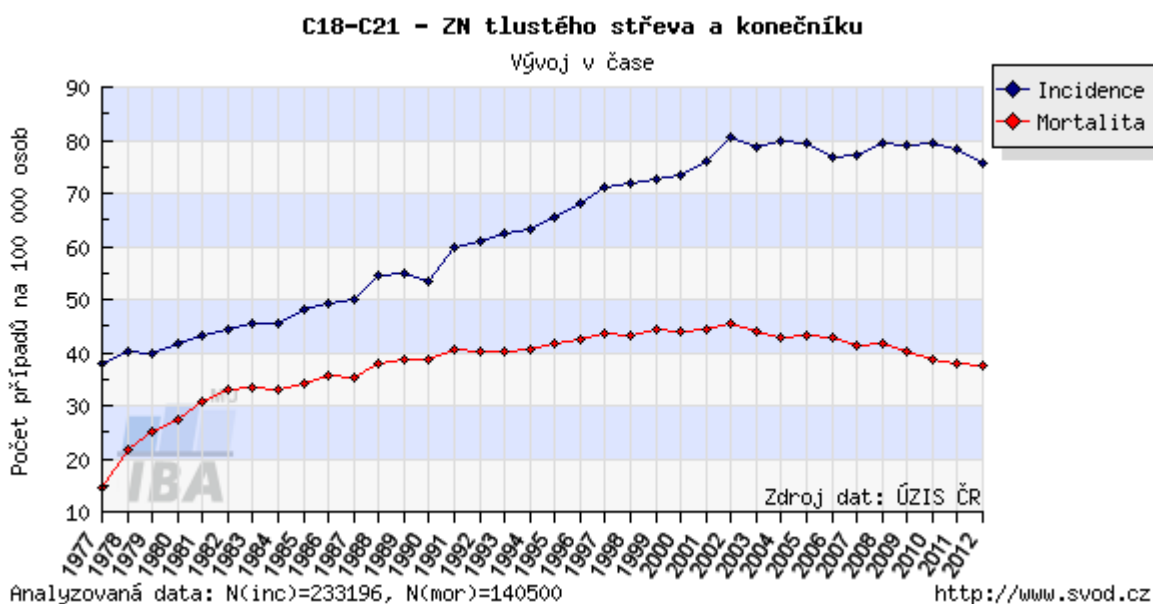


Obr. 1 Srovnání incidence a mortality CRC u mužů v ČR s ostatními zeměmi světa v roce 2012, převzato z webu 4.

International Agency for Research on Cancer **Colorectum: female, all ages**



Obr. 2 Srovnání incidence a mortality CRC u žen v ČR s ostatními zeměmi světa v roce 2012, převzato z webu 4.



Obr. 3 Vývoj incidence a mortality CRC, převzato z webu 5.

Incidence CRC je neustále na vzestupu (viz obr. 2) a to zejména ve vyspělých zemích světa. V roce 2012 byla celková incidence CRC odhadnuta na 1 361 000 nově diagnostikovaných případů a zemřelo 694 000 pacientů (web 4). Nejvíce pacientů s CRC je ve věku 65 let, s prodlužující se střední délkou života se významně zvyšuje i výskyt tohoto onemocnění. Tento rizikový faktor ovlivnit nelze, můžeme však předejít ostatním vnějším rizikovým faktorům. CRC lze považovat za civilizační onemocnění, protože velmi úzce souvisí se způsobem života a stravovacími návyky. Incidence CRC roste, ale mortalita je díky pokrokům ve zdravotnictví, screeningovým programům a diagnostice v posledních letech stabilní (Schneiderová a Bencko 2015).

2.1.3 Patogeneze kolorektálního karcinomu na molekulární úrovni

CRC vzniká postupným hromaděním genetických a epigenetických změn, které vedou k transformaci normálního epitelu tlustého střeva a rekta do adenokarcinomu. Tyto genetické změny mohou být vrozené v případě hereditární formy karcinomu a získané u sporadického karcinomu. Genetické změny zahrnují aktivaci protoonkogenů (*K-ras*), inaktivaci tumor-supresorových genů (*APC*, *DCC*, *p53*) a mutaci genů kódujících opravné systémy (Holubec 2004).

Mutací protoonkogenů vznikají onkogeny, které prostřednictvím svých proteinových produktů narušují normální buněčný růst a diferenciaci. Významným protoonkogenem, který se podílí na vzniku CRC, je *K-ras* gen (Kirstein rat sarcoma), který je součástí několika

signálních drah. Mutací tohoto genu může dojít k trvalé signalizaci a nekontrolované buněčné proliferaci (Ellis a Clark 2000).

Potlačením tumor supresorových genů je usnadněna nádorová transformace. *APC* gen (Adenomatous polyposis coli) je klíčový tumor supresorový gen, který se podílí na jednom z prvních kroků ve stupni vývoje CRC. Genový produkt *APC* interaguje s různými regulačními proteiny se vztahem k buněčné adhezi, jako jsou β -catenin, γ -catenin, axin, conductin, EB1, hDLG a mikrotubulární proteiny. Mutací *APC* genu dochází k porušení signální dráhy, která reguluje aktivitu β -catenin. Nadměrnou aktivitou β -catenin dochází k porušení buněčného cyklu a rozvoji nádoru (Aoiki a Taketo 2007, Kheirelseid et al. 2013, Klener 2002).

Na mutaci genu *APC* navazují další defekty genu *DCC* (Deleted in colorectal cancer) a *p53*. *p53* je považován za důležitý transkripční faktor, který se podílí na udržování stability genomu prostřednictvím řízení buněčného cyklu a apoptózy. Protein *p53* je schopen rozpoznat poškození DNA a vyvolat zástavu buněčného cyklu ve fázi S a G2. *p53* zvyšuje expresi proteinu Bax, který je důležitý pro indukci apoptózy. K apoptóze také může přispět zvýšením produkce ROS vedoucí k oxidačnímu stresu a poškození mitochondrií. Mutací *p53* jsou porušeny jeho regulační schopnosti a je umožněn proces angiogeneze (Kheirelseid et al. 2013, Klener 2002).

Systém MMR (methyl-directed mismatch repair system) je velmi důležitý kontrolní mechanismus v replikaci DNA. Zahrnuje geny *MLH-1* a *MSH-2*, *MSH-6*, *PMS-1*, *PMS-2* a jiné podobně fungující, jejichž proteiny opravují chybné mísení nukleotidů během replikace DNA (Klener 2002, Holubec 2004).

2.1.4 Prevence kolorektálního karcinomu

Prevenci nádorových onemocnění můžeme rozdělit na primární a sekundární. Primární prevence znamená předcházení těmto onemocněním, a to vakcinací proti chronickým infekčním onemocněním, která jsou zodpovědná za vznik rakoviny především v rozvojových zemích, vyhýbáním se nepříznivým vlivům vnějšího prostředí a dodržováním zásad zdravého způsobu života, především eliminací užívání tabákových výrobků, omezením příjmu vysokoenergetických potravin, alkoholu a naopak zvýšením fyzické aktivity. V roce 2002 bylo zjištěno, že 17,8 % (1,9 milionů případů) celosvětového výskytu rakoviny je způsobeno virovými a bakteriálními infekcemi. Nejčastěji se jedná o lidský papillomavirus (HPV), bakterii *Helicobacter pylori* a viry žloutenky typu B a C. Žloutence typu B lze přecházet vakcinací, účinné se zdá být i očkování proti HPV. Touto prevencí bylo

dosaženo snížení výskytu karcinomu děložního hrdla a nádorových onemocnění jater (Parkin 2002).

V rámci sekundární prevence je důležitá včasná diagnostika onemocnění a nastavení vhodné léčby pacienta. Sekundární prevence hraje dnes u nádorových onemocnění velmi významnou roli, a to zejména díky moderním diagnostickým technologiím, které umožňují sledování osob s vysokým rizikem tohoto onemocnění a screening asymptomatických jedinců. Do rizikové skupiny u CRC jsou řazeni pacienti s idiopatickými střevními záněty a hereditárním syndromem, dále jsou sledováni pacienti s pozitivní osobní anamnézou CRC. Díky pravidelnému sledování a screeningu může být CRC zachycen v raném stádiu onemocnění, kdy je velká šance na léčbu a často úplné vyléčení. Prevence představuje nejdůležitější krok v boji proti CRC (Stewart et al. 2014).

2.1.5 Diagnostika

CRC se může poměrně dlouhou dobu utvářet bez jakýchkoliv příznaků u pacienta. První příznaky onemocnění se často objevují až v pokročilejším stádiu rakoviny a možnosti léčby jsou komplikovanější. Je tedy nezbytné zachytit onemocnění ještě před tím, než se první příznaky objeví. V roce 2000 byl v České republice zahájen Národní screeningový program na záchyt CRC v počátečním stádiu, který již prošel celou řadou změn, a jehož výsledky se začínají projevovat na poklesu mortality CRC (web 6, web 7).

Základním diagnostickým vyšetřením jsou imunochemické testy na okultní krvácení do stolice (TOKS) a kolonoskopie. Tato sekundární prevence je určena pro osoby ve věku od 50 do 54 let, které by měly jednou ročně podstoupit TOKS. U osob starších 55 let je doporučován TOKS jednou za dva roky nebo je prováděna jednou za deset let kolonoskopie. Kolonoskopie je považována za zlatý standard v diagnostice CRC a měla by tedy vždy následovat při zjištění positivity TOKS. Kolonoskopie dnes předčila i dříve prioritní irigografii, která je však dnes používána jen zřídka. Výhodou kolonoskopie je také možnost provedení biopsie, či odstranění nalezeného polypu speciálním přístrojem připojeným na kolonoskop (web 8, web 9).

Dále je potřeba sledovat pacienty, kteří mají vysoký předpoklad vzniku CRC. K těmto pacientům je potřeba přistupovat individuálně v závislosti na charakteru rizikového faktoru. Asymptomatický jedinec s genetickými predispozicemi zjištěnými z anamnestických a genealogických studií by měl co nejdříve podstoupit genetické vyšetření. U pacientů, kteří trpí Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou, může velmi snadno dojít ke zvratu zánětlivého charakteru onemocnění a rozvoji karcinomu, proto je nezbytné věnovat této

možné nádorové transformaci zvýšenou pozornost při léčbě těchto idiopatických střevních zánětů. Stejně tak je potřeba sledovat pacienty, u kterých jsou nalezeny střevní polypy (web 9, Holubec 2004).

Další metody zjištění CRC jsou již méně používané pro diagnostiku, ale uplatňují se v průběhu léčby CRC. Zobrazovací metody mají význam spíše až po diagnostice CRC nejčastěji kolonoskopií. Mohou nám pomoci určit stádium nemoci, bližší lokalizaci nádoru a jeho případné prorůstání a šíření do okolní tkáně a orgánů. Mezi tyto metody, které zobrazují detailněji střevní stěnu, patří počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR). Endosonografie má význam především při zjišťování stádia u karcinomu rekta. Pozitronová emisní tomografie (PET) je schopna odhalit vzdálené metastázy. Angiografie může pomoci při chirurgickém odstraňování nádoru (Suchánek et al. 2011).

Zjišťování přítomnosti nádorových markerů, které jsou v organismu produkovány během nádorového bujení buňkami nádoru nebo jako celková reakce organismu, je využíváno spíše k zachytu recidivy či progresu onemocnění, sledovány jsou především před- a pooperační hodnoty při zjišťování efektu terapie. Jejich zvýšená nebo snížená hladina však nemusí vždy souviset s nádorovým onemocněním. Klasické biochemické parametry zjištěné z krve a moči se uplatní až v pozdním stádiu CRC, jen zřídka je CRC diagnostikován například zjištěním sekundární anémie (Holubec 2004).

2.1.6 Možnosti léčby

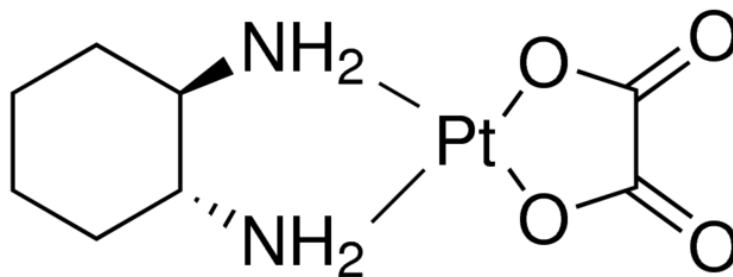
Léčba CRC je závislá na stádiu tohoto nádorového onemocnění. Chirurgické odstranění nádoru je jednou ze základních metod léčby a často zajistí úplné vyléčení. Systémová terapie bývá téměř vždy součástí komplexní léčby karcinomu. Její použití má význam nejen v pooperační terapii k zabránění návratu onemocnění, ale často se používá u neoperabilních nádorů ke zmenšení nádoru či metastáz, které je možno následně chirurgicky odstranit. Systémová terapie má také význam v paliativní léčbě, kdy může pacientům prodloužit život. Nově jsou do terapie zaváděny biologické léky - bevacizumab, cetuximab a panitumumab, často jsou součástí léčby paliativní. Při zahajování paliativní léčby je důležité zhodnotit stav pacienta a nastavit strategii tak, aby během terapie byly vystřídány všechny účinné látky (5-fluorouracil, oxaliplatin, irinotekan, bevacizumab a cetuximab nebo panitumumab).

Konvenční terapie bývá zahájena režimem 5-fluorouracil/leukovorin/irinotekan (FOLFIRI) či 5-fluorouracil/leukovorin/oxaliplatin (FOLFOX4). Tyto dvě kombinační terapie se liší zejména spektrem nežádoucích účinků. Nejčastější nežádoucí účinky režimu s OxPt jsou neutropenie a poškození nervů. U režimu FOLFIRI dochází k těžkým průjmům

a riziko neutropenie bývá vyšší. Bevacizumab je používán pouze v kombinaci s chemoterapií, cetuximab je možno podávat v monoterapii i v kombinaci s cytostatiky, panitumumab zatím lze používat pouze v monoterapii. Ani tyto biologické léky nejsou zcela bezpečné a po jejich podání se vyskytují různé nežádoucí účinky jako hypertenze, proteinurie až nefrotický syndrom, zvýšené riziko krvácení a trombóz, zhoršení hojení ran u bevacizumabu, který však v kombinační terapii zvyšuje průnik chemoterapeutik do nádoru a zesiluje účinek cytostatik (Bücher 2008, Alcindor a Beauger 2011).

2.2 Oxaliplatina

Oxaliplatina (OxPt), (*SP-4-2*)-[(1*R*,2*R*)-cyklohexan-1,2-diamin- κ^2N,N'](oxalato- κ^2O^1,O^2) platnatý komplex (Český lékopis 2009) (viz obr.4), je chemoterapeutikum patřící do skupiny alkylačních látek (Hartl et al. 2012). Tento novější analog platinových cytostatik je odvozen od cisplatiny nahrazením atomů chloru molekulou oxalátu (Adam et al. 2011). OxPt v kombinaci s 5-fluorouracilem a leukovorinem je jednou z nejpoužívanějších kombinací v terapii CRC (Bücher 2008).



Obr. 4 Strukturální vzorec oxaliplatiny, převzato z webu 10

OxPt vytváří můstky mezi dvěma molekulami DNA nebo i ve vláknu téže molekuly. Nejčastějším vazebným místem je atom dusíku v poloze 7 purinové báze guaninu, může se však vázat i na dusík adeninu či cytosinu (Hartl et al. 2012).

Předpokládaný mechanismus účinku OxPt po expozici buněk CRC spočívá v zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M a indukci apoptózy. Apoptotická kaskáda vyvolaná OxPt je charakterizována translokací proapoptického proteinu Bax do mitochondrií, uvolnění cytochromu *c* do cytosolu a aktivací kaspázy 3 (vnitřní cesta aktivace apoptózy). Díky cílené inaktivaci Bax a tumor supresorového proteinu p53, která vedla v buněčné linii HCT116 k výrazně zvýšené rezistenci nádorových buněk na působení OxPt, bylo prokázáno, že jak p53, tak Bax jsou důležitými determinanty buněčné odpovědi na různá chemoterapeutická činidla (Arango et al. 2004, Bunz et al. 1999). Tumor supresorový gen p53 reguluje expresi pro-apoptického Bax-proteinu (Becker 2005, Toshiyuki a Reed 1995).

Ve většině případů CRC nacházíme v tomto genu p53 mutaci. Jeho funkční protein reaguje na různé pro-apoptické stimuly a hraje významnou roli v citlivosti nádorových buněk na různá chemoterapeutická činidla. V závislosti na mutaci p53 a typu nádorových buněk může být citlivost na různá chemoterapeutická činidla buď zvýšena, nebo snížena. U některých druhů CRC může OxPt vyvolat aktivaci apoptózy vnější cestou vytvořením komplexu Fas ligand/Fas receptor a následné aktivaci kaspázy 8 (Arango et al. 2004).

Citlivost nádorových buněk CRC může též ovlivnit transkripční faktor NF- κ B (nukleární faktor kappa B), který zvyšuje proliferaci nádorových buněk a způsobuje odolnost proti apoptóze indukované působením chemoterapeutika (Garg a Aggarwal 2012, Orłowski a Baldwin 2002). Tato teorie byla potvrzena v roce 2003 v článku Rakitina a kol., kde bylo zjištěno, že snížením transkripční aktivity NF- κ B dochází ke zvýšení citlivosti buněk CRC na cytotoxické účinky OxPt.

OxPt má však limitované použití v terapii a to zejména kvůli jejím nežádoucím účinkům na zdravou tkáň a vzniku rezistence nádorových buněk na terapii (Prakash et al. 2013, Arango et al. 2004).

2.3 Přírodní látky

Přírodní produkty zůstávají nadále významným zdrojem nových léčiv. Příroda skrývá celou řadu látek, jejichž struktura není doposud známa, nebo nejsou známy všechny účinky látek již známých. Rakovina je onemocnění, které představuje celosvětový problém, může postihnout kohokoliv a kdykoliv. Dosud neexistuje účinná prevence a možnosti léčby jsou omezené. Existuje celá řada chemoterapeutik, která jsou schopna účinně bojovat s nádorovými buňkami, ale zároveň ničí i buňky tělu vlastní a oslabují organismus natolik, že pacient následkům léčby podlehne. Výzkum je proto zaměřen na použití látek, které působí specificky na nádorové buňky (protilátky), a na látky, které by mohly ovlivnit účinek „klasických“ chemoterapeutik ve smyslu účinnějšího a specifičtějšího působení na nádorové buňky a zároveň by chránily buňky tělu vlastní (přírodní látky) (Prakash et al. 2013).

Protirakovinné účinky přírodních látek byly poprvé objeveny a zkoumány v roce 1950 u vinca alkaloidů a u izolovaného cytotoxicky působícího podofylotoxinu (Bhanot et al. 2011).

Vinca alkaloidy přímo inhibují mitózu, a proto se někdy označují jako „vřeténkové jedy“. Používají se převážně k léčbě lymfomů a některých forem leukémie. Podobný mechanismus účinku vykazují i další přírodní látky – taxany, které stabilizují mikrotubuly a

brání tak jejich depolymerizaci. Mezi tyto látky patří paklitaxel a docetaxel, využívány při léčbě karcinomu prsu a ovária. Derivát podofylotoxinu, etoposid, vykazuje účinky při léčbě malobuněčného karcinomu plic. Společně s dalšími přírodními látkami kaptotekany jsou řazeny mezi inhibitory topoisomeras. Irinotekan a topotekan mají význam u CRC a ovariálního karcinomu (Hartl et al. 2012).

Přírodní produkty jsou často významným zdrojem látek, které se uplatňují při léčbě různých onemocnění. Tyto látky jsou také v různém množství zastoupeny v naší každodenní stravě. Mezi látky potlačující zánětlivý proces, který vede k transformaci, hyperproliferaci a vyvolání karcinogeneze, patří například kurkumin, genistein, resveratrol, dialylsulfid, alicin, lykopen, kapsaicin, gingerol, silymarin, katechiny, eugenol, isoflavony, saponiny, fytoosteroly, inositol hexafosfát, vitamin C, D-limonen, lutein, kyselina listová, beta karoten, vitamin E, flavonoidy, rostlinné silice a další. Špatné stravovací návyky se podílejí ve vysoké míře na vzniku a vývoji obzvláště CRC, proto bychom měli do jídelníčku zařadit pravidelnou konzumaci ovoce a zeleniny, které obsahují velké množství antioxidantních látek, čímž chrání buňky lidského těla a významně snižují výskyt některých typů rakoviny (Bhanot et al. 2011).

2.4 Terpeny

Terpeny představují rozmanitou skupinu přírodních látek, jejichž základní uhlíkový skelet se skládá ze dvou a více isoprenových jednotek a řadíme je tedy mezi isoprenoidy. Spojováním těchto jednotek vznikají monoterpeny (C₁₀), seskviterpeny (C₁₅), diterpeny (C₂₀), triterpeny (C₃₀), tetraterpeny (C₄₀) a polyterpeny. Terpeny jsou lipofilní sloučeniny, které mohou být alifatické i cyklické, uhlíkaté i kyslíkaté a jsou od nich odvozovány další složitější sloučeniny, jako jsou steroly. V rostlinách tvoří terpeny jednu z hlavních složek silic (Hubík et al. 1989, Brehm-Stecher et al. 2003).

Isoprenoidy mají v rostlinách jednak funkci primárních metabolitů (steroly, karotenoidy, regulátory růstu), které tvoří strukturní složku membrán a zajišťují její integritu, jsou zodpovědné za fotoprotekci, a jsou proto esenciální při vývoji a růstu rostlin. Výzkum je však zaměřen spíše na druhou skupinu isoprenoidů patřících mezi sekundární metabolity rostlin. Význam sekundárních metabolitů rostlin není doposud ještě zcela probádaný, jejich význam je především v komunikaci rostliny-rostlina, rostlina-predátor, rostlina a vnější prostředí (Chappell 1995).

2.4.1 Syntéze terpenů

Biosyntéza terpenů zahrnuje poměrně složitou kaskádu chemických reakcí. Základní stavební jednotka všech isoprenoidů je C5 prekurzor IPP (isopentenylidifosfát) a jeho isomer dimethylallyldifosfát (DMAPP), jejichž syntéza probíhá u vyšších rostlin nezávisle na sobě dvěma možnými cestami v různých částech buňky. V cytosolu probíhá klasická mevalonová syntéza (MVA) kondenzací tří molekul acetyl-CoA (C2) za vzniku HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A), kdy působením HMG-CoA reduktázy vzniká mevalonát, ze kterého je fosforylací a dekarboxylací generována molekula IPP (C5). V plastidech je molekula IPP generována methylerythritol fosfátovou cestou syntézy (MEP), kdy IPP vzniká kondenzací pyruvátu (C3) a glycerinaldehyd-3-fosfátu (C3) za vzniku meziproductu methylerythritol fosfát (MET). Předpokládá se, že IPP syntetizovaný v cytosolu poskytuje prekurzor pro farnesyldifosfát (FPP, C15), který tvoří základ pro seskviterpeny a triterpeny, zatímco IPP vzniklý v plastidech poskytuje prekurzor pro geranildifosfát (GPP, C10) a geranylgeranyldifosfát (GGPP, C20), pro syntézu mono-, di-, a tetra-terpenů. Častěji se však tyto dráhy prolínají v souvislosti s konkrétní rostlinou a IPP vzniklé dvěma možnými syntézami často poskytuje prekurzor pro isoprenoidy vzniklé jak v cytosolu, tak v plastidech.

Tyto reakce jsou katalyzovány prenytransferasami. GDP synthasa katalyzuje kondenzaci IPP a DMAPP za vzniku GDP. FDP synthasa postupně přidává dvě molekuly IPP do DMAPP a vzniká FDP, prekurzor seskviterpenů a triterpenů, a GGDP synthasa přidáním tří molekul IPP vytváří C20 difosfát, prekurzor pro diterpeny a tetraterpeny (Cheng et al. 2007). Tyto reaktivní meziproducty (GPP, FPP, GGPP) spolu mohou dále kondenzovat a tvořit prekurzory pro steroidy a karotenoidy, mohou poskytovat prekurzory látek neterpenoidního charakteru, například proteiny. Reakce, jako je oxidace, redukce, isomerizace, konjugace a další sekundární transformace, pak dávají vznik různým specifickým reakčním skupinám v molekule terpenů, které pak zodpovídá za charakter účinku daného terpenu (Hubík et al. 1989).

Terpeny obsahující nepolární funkční skupiny umožňují zvýšenou permeabilitu lipofilních léčiv, naopak polární funkční skupiny v terpenech umožňují zvýšenou permeabilitu pro léčiva hydrofilnější (Williams et al. 2012).

2.4.2 Charakteristika seskviterpenů

Seskviterpeny představují početnou skupinu terpenů různých struktur, jsou to sloučeniny acyklické, mono-, bi-, tri-, a tetracyklické. Biosyntéza seskviterpenů je zpravidla

lokalizována v cytosolu, kde je syntetizována molekula IPP a její isomer DMAPP, jejichž kondenzací vzniká GPP, přidáním další molekuly IPP dostaneme FPP, což je C15 prekurzor pro syntézu seskviterpenů (Cheng et al. 2007).

Acyklické seskviterpeny jsou katalyzovány přímo ze základní struktury FPP, cyklické deriváty jsou pak tvořeny specifickými cyklásami. Další specifické přestavby a reakce - oxidace, degradace a dimerizace - poskytují mnoho různých struktur seskviterpenů a jejich derivátů (Bártíková et al. 2014).

Seskviterpeny jsou vysoce lipofilní sloučeniny, díky čemuž mohou ovlivňovat některé biotransformační enzymy (cytochrom P450) a to ve smyslu indukce či inhibice příslušného enzymu (Bártíková et al. 2014). Lipofilita seskviterpenů je velmi důležitý parametr pro použití těchto látek v terapii.

Seskviterpeny jsou hlavní složkou rostlinných silic, které vykazují širokou škálu biologických účinků a to zejména antibakteriální, antifungální, imunomodulační, protizánětlivé, antirevmatické, antioxidační, antivirové (herpes virus simplex-HSV-1) a protirakovinné účinky (Park et al. 2011).

Seskviterpeny vykazují slibné protizánětlivé, antiparazitické a protinádorové účinky, na druhé straně však mohou na buňky a organismus působit nepříznivě až cytotoxicky. Struktura, koncentrace, metabolismus a typ buněk ovlivňuje účinek seskviterpenů, převážně ve smyslu jejich antioxidačního či pro-oxidačního působení (Bártíková et al. 2014).

2.4.3 Oxidační stres a seskviterpeny

Reaktivní formy kyslíku (ROS) se nacházejí ve všech živých organismech a hrají významnou roli v mnohých fyziologických funkcích (energetický metabolismus, buněčná signalizace a fagocytóza) (Bártíková et al. 2014). K ROS řadíme např. superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxid (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH^{\bullet}) a volný radikál oxidu dusnatého (NO^{\bullet}). V organismu jsou ROS produkovány mitochondriálním dýchacím řetězcem, NADPH-oxidasou (NOX), lipooxygenasou (LOX), xantin-oxidasou (XO), cytochromy P450 (CYP), zánětem, či exogenními zdroji (UV, radiační záření, pesticidy), nebo vznikají reakcí katalyzovanou tranzitními ionty např. Fentonovou reakcí (Lee et al. 2013).

Organismus je schopen se proti těmto volným radikálům do určité míry bránit. Přesáhne-li však pro-oxidační působení antioxidační kapacitu buněk, dojde k oxidačnímu stresu, který má za následek poškození či smrt buňky a rozvíjejí se různá onemocnění.

ROS interagují a modifikují chemické vlastnosti biomolekul uvnitř buňky, což vede k oxidaci nukleových kyselin, peroxidaci lipidů a denaturaci proteinů. V důsledku poškození genomu a hromadění mutací dochází ke vzniku genetické heterogenity v rakovinných buňkách a ty tak získávají značné výhody pro přežití a expanzi. Nejčastěji jsou poškozeny geny, které za normálních okolností vznikající mutace opravují. Výsledkem primárního oxidačního poškození DNA báze je molekula 8-oxo-guanin, která slouží jako marker pro detekci. Sekundární poškození DNA je způsobeno konečným produktem peroxidace lipidů malondialdehydem (MDA), který se může kovalentně vázat na guanin a vytvářet tak MDA-DNA adukt (Lee et al. 2013).

Díky existenci různých úrovní antioxidační obrany je možné předcházet vzniku nadměrného množství ROS, odstraňovat vzniklé ROS a reparačními mechanismy opravovat již poškozené biomolekuly (Lee et al. 2013).

Mechanismus přímého neenzymatického odstranění ROS spočívá v přítomnosti molekul a proteinů vychytávajících reaktivní kovy, které katalyzují produkci ROS. Látky, které se chovají jako tzv. „scavengerové“ molekuly (karoteny, vitamin C, polyfenoly), se vyznačují strukturální podobností a to přítomností konjugovaného systému, díky čemuž snadno poskytují elektrony a mají tak vysokou redukční kapacitu. Látky obsahující ve struktuře katechol či galoyl jsou schopné vychytávat tranzitní kovy a zabránit tak produkci hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí (Lee et al. 2013).

Nepřímou antioxidační aktivitu zajišťují indukovatelné antioxidační či jiné cytoprotektivní enzymy, které jsou většinou regulovány transkripčním faktorem Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2), který rozeznává promotorovou sekvenci antioxidačního responsivního elementu (ARE). Mezi nejvýznamnější antioxidační systémy patří systém glutathionový, který redukuje disulfidové vazby vzniklé oxidací thiolové skupiny ROS, a thioredoxinový systém umožňující obnovení funkce proteinu, který byl touto oxidací poškozen. Nezastupitelnou roli v recyklaci redukovaného glutathionu (GSH) a thioredoxinu hraje NADPH a enzymy, které se podílejí na jeho produkci (Bártíková et al. 2014, Lee et al. 2013).

Vysoké hladiny ROS mohou stimulovat transkripční faktor NF- κ B, jehož aktivace vede k vyvolání prozánětlivé reakce a dalšímu zhoršení redoxního potenciálu (Lee et al. 2013). Mezi oxidačním stresem, zánětem a nádorovým onemocněním existuje úzká souvislost, a tak látky s protizánětlivým působením mohou najít své uplatnění i v terapii rakoviny (Rahman et al. 2014).

V nádorových buňkách se NF- κ B podílí na regulaci buněčné proliferace, regulaci apoptózy, podpoře angiogeneze a stimulaci metastazování. Seskviterpeny mohou inhibovat NF- κ B, což vede k usmrcování nádorových buněk a potlačení jejich růstu.

Seskviterpeny mohou mít jak antioxidantní, tak pro-oxidační vlastnosti, které souvisejí s jejich strukturou, koncentrací, metabolismem a především závisí na typu buněk a podmínkách prostředí, které mohou být fyziologické či patologické (Bártíková et al. 2014).

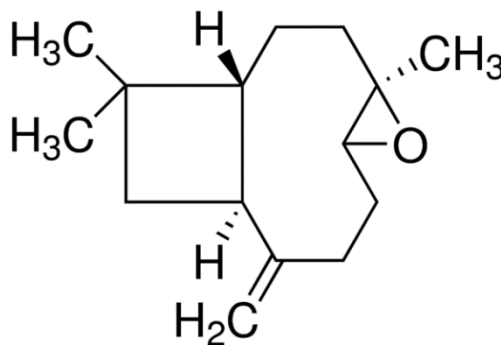
Seskviterpeny jako antioxidanty mohou chránit zdravé buňky různými mechanismy jako je přímé vychytávání ROS, chelatace kovových iontů, posílení obranného antioxidantního systému či tlumení zánětu. Bylo prokázáno, že antioxidantní aktivita seskviterpenů závisí na jejich struktuře, kdy nejvyšší antioxidantní aktivitu vykazoval gossypol díky své polyfenolové struktuře. Acyklické seskviterpeny (trans, trans-farnesol, cis-nerolidol) vykazovaly výrazně slabší antioxidantní aktivitu a monocyklické seskviterpeny jako HUM nevykazovaly antioxidantní aktivitu vůbec. Kromě přítomnosti hydroxylové skupiny jsou za antioxidantní aktivitu zodpovědné α , β -nenasycené karbonylové skupiny (vernodalol, vernolid) (Bártíková et al. 2014).

Látky s antioxidantními vlastnostmi se v protinádorové terapii uplatňují v menší míře. Ačkoli potlačením ROS signalizace antioxidanty by mohlo dojít k potlačení růstu nádoru, působí antioxidanty spíše opačně a chrání nádorové buňky před oxidativním poškozením a mohou snižovat ROS zprostředkovanou protinádorovou aktivitu protinádorových látek, včetně paklitaxelu, bortezomibu (Alexandre et al. 2009).

Seskviterpen zerumbon izolovaný ze zázvoru (*Zingiber zerumbet*) byl zkoumán jako látka schopná zvýšit radiosenzitivitu buněk CRC. Zerumbon zvýšil radiací indukovanou zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M a radiací indukovanou apoptózu, ačkoliv sám o sobě apoptózu indukuje jen nevýznamně. Schopnost zerumbonu zvýšit radiací indukované poškození DNA není zprostředkováno ROS, ale vyčerpáním buněčného GSH, které bylo pozorováno u buněk HCT116 a HT29. Podmínkou biologické aktivity zerumbonu je přítomnost α , β -nenasycené karbonylové skupiny v jeho struktuře. Analog humulen, který postrádá právě tuto funkční skupinu, schopnost radiosenzitizace nevykazuje (Deorukhkar et al. 2015).

2.4.4 Karyofylen-oxid

Karyofylen-oxid (CAO), (1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimethyl-9-methylen-5-oxatricyklo[8.2.0.0^{4,6}]dodekan (web 10) (viz obr. 5), je oxidovaná forma bicyklického seskviteprenu β -karyofylenu a je součástí silic mnoha rostlin, které se využívají jako poživatiny či v léčitelství. CAO izolovaný ze silice guave (*Psidium guajava*), oregana (*Origanum vulgare L.*), skořice (*Cinnamomum spp.*), hřebíčku (*Eugenia caryophyllata*) a černého pepře (*Piper nigrum L.*) inhibuje růst a indukcí apoptózy potlačením PI3K/AKT/mTOR/S6K1 a aktivací MAPK



(mitogen-activated protein kinase) zprostředkovanou produkcí ROS v lidských

Obr. 5 Strukturální vzorec karyofylen oxidu, převzato z webu 10

buňkách karcinomu prsu a prostaty. Obě tyto signální kaskády se podílejí na buněčné proliferaci, přežívání, angiogenezi a metastazování nádorových buněk. Aktivace AKT (proteinkinasa B) může pozitivně regulovat NF- κ B, což vede k transkripci antiapoptotických genů a nádor se může rozvíjet a metastazovat (Testa et al. 2001, Park et al 2011).

CAO obsahuje reaktivní exocyklickou methylenovou a epoxidovou funkční skupinu, které umožňují CAO vytvářet kovalentní vazby se sulfhydrylovými skupinami a aminoskupinou různých proteinů a bází DNA, což umožňuje CAO modulovat více signálních kaskád v nádorových buňkách (Wink 2008).

Další studie ukázala, že CAO potencuje apoptózu indukci tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α). Potlačením tohoto faktoru dochází k invazi nádorových buněk zprostředkovanou aktivací transkripčního faktoru NF- κ B. TNF- α stimuluje expresi genů a vzniklé produkty se podílejí na antiapoptóze (IAP1, IAP2, Bcl-2, Bcl-xL a survivin), proliferaci (COX-2, cyclin D1 a c-Myc), invazi (MMP 9, ICAM-1) a angiogenezi (VEGF), ovlivnění buněk CAO vede k potlačení jejich exprese. Tato genová produkce je opět regulována prozánětlivým transkripčním faktorem NF- κ B. Předpokládá se tedy, že inhibice NF- κ B je jedním z hlavních mechanismů účinku, kterými CAO potencuje TNF- α -indukovanou apoptózu a potlačuje invazi buněk (Kim et al. 2014).

NF- κ B reguluje expresi survivinu, IAP1, IAP2, Bcl-2, Bcl-xL a nadměrná exprese těchto genových produktů v různých druzích rakoviny byla spojena s přežíváním nádoru, chemorezistencí a radiorezistencí (Aggarwal 2004).

Schopnost CAO podílet se na kontrole exprese prozánětlivých cytokinů, oxidu dusnatého (NO) a prostaglandinu E2 (PGE2) produkovaných lipopolysacharidy (LPS) aktivovanými makrofágy již byla prokázána ve studii Tunga a kol. (2008).

Ve studii Kima a kol. (2014) byly zjištěny inhibiční účinky CAO na konstitutivní a indukovatelný transkripční faktor a důležitý přenašeč signálů STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) a to indukcí proteinové tyrosinové fosfatázy SHP-1, která způsobí inhibici aktivace proteinových kináz c-Src a JAK 1/2, čímž dojde k potlačení STAT3 exprese v nádorových buňkách. Touto inhibicí se sníží přežívání buněk a je potlačena exprese různých genových produktů zodpovědných za proliferaci (cyklin D1, cyklin E), antiapoptózu (Bcl-xL, Survivin, IAP-1, IAP-2), invazi (MMP-9, COX-2) a angiogenezi (VEGF). Vliv CAO na potlačení konstitutivní aktivace STAT3 byl prokázán u buněčných linií mnohočetného myelomu (U266, MM1 .S), rakoviny prsu (MDA-MB231) a prostaty (DU145). Kromě potlačení proliferace, indukce apoptózy a potlačení invaze nádorových buněk má CAO potenciál snižovat rezistenci některých nádorů na léčbu chemoterapeutiky.

Účinek proti roztočům vykazoval CAO izolovaný ze silice listů *P. cattleianum*. Tento účinek byl prokázán proti *D. farinae* a *D. pteronyssinus* a CAO vykazoval vyšší účinek než benzyl benzoát a DEE (diethyltoluamid). Přírodní extrakty oproti syntetickým látkám proti roztočům nemají negativní vliv na životní prostředí a lidské zdraví (Oh et al. 2014).

Potenciální protizánětlivé účinky proti buněčné linii Jurkat (T-akutní lymfoblastická leukémie) a buňkám neuroblastomu (IMR-32) byly zjištěny u CAO izolovaného z *Aegle Marmelos*. Pomocí PCR v reálném čase byla zjištěna potlačená exprese antiapoptotických genů (*bcl-2*, *mdm-2*, *cox-2* a *c-myb*) a naopak zvýšená exprese genů podílejících se na apoptóze (*bax*, *BAK1*, *caspase-8*, *caspase-9* a *ATM*). Metodou in silico bylo zjištěno, že CAO může vykazovat silné protizánětlivé účinky modulací 15-lipoxygenasy. Modulací 15-lipoxygenasy může CAO indukovat apoptózu u lymfomu a neuroblastomových buněk (Sain et al. 2014).

Mechanismus gastroprotektivního působení CAO testovaného na potkanech pravděpodobně souvisí s faktory, které chrání žaludeční sliznici, jako je oxid dusnatý (NO), prostaglandiny a sulfhydrylové sloučeniny. Ve srovnání s NSA, která při dlouhodobém užívání způsobují gastrointestinální poškození, působí CAO protizánětlivě, analgeticky a navíc gastroprotektivně (Sánchez-Mendoza et al. 2014).

Analgetické a protizánětlivé působení CAO bylo popsáno v článku Chavana a kol. (2010), kde se předpokládá, že CAO inhibicí centrálních receptorů bolesti vykazuje centrální

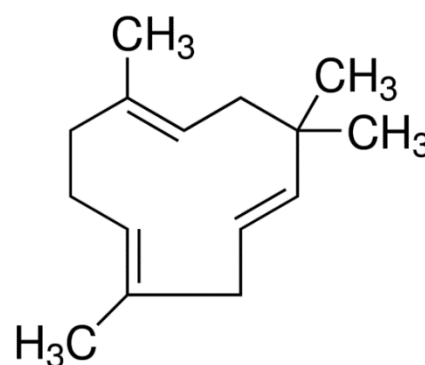
analgetický účinek, zatímco analgetický účinek periferní vychází z inhibice cyklooxygenasy a/nebo lipoxygenasy, s čímž souvisí protizánětlivý účinek CAO.

CAO je hlavní aromatickou sloučeninou konopí, díky čemuž je využíván u psů vyhledávajících narkotika (Peč a Dušek 2009).

2.4.5 α -Humulen

α -Humulen (HUM), trans, trans, trans-2,6,6,9-tetramethylcykloundeka-1,4,8-trien, je monocyklický seskviterpen také znám jako α -karyofylen (web 10) (viz obr. 6).

Protirakovinné účinky silice z jedle balzámové (*Abies balsamea*) byly zkoumány na několika buněčných nádorových liniích (MCF-7, PC-3, A549, DLD-1, M4BEU, CT-26). Účinnost silice byla prokázána u všech testovaných buněk. Během analýzy silice pomocí GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry) bylo zjištěno, že za cytotoxicitu na nádorové buňky je zodpovědná jedna z jeho složek – HUM. Mechanismus účinku silice a HUM spočívá ve snížení buněčného obsahu GSH a zvýšení produkce ROS (Legault et al. 2003).



Obr. 6 Strukturální vzorec α -humulenu, převzato z webu 10

Preventivní a terapeutické protizánětlivé účinky HUM byly zkoumány na experimentálním modelu alergického zánětu dýchacích cest. Pro tento pokus byla použita imbrední myši populace BALB/c a HUM vykazoval vyšší účinnost podaný ve formě aerosolu než podaný perorálně. Jako pozitivní kontrola pro tento pokus byl použit dexamethason a budesonid. Množství eozinofilů v bronchoalveolární lavážní tekutině se v přítomnosti HUM výrazně snížilo. Výsledky ukázaly, že mechanismus protizánětlivého působení HUM je spojen s modulací hladiny Th1/Th2 potlačením exprese adhezivních molekul (P-selektin), redukcí hladin interleukinu-5 (IL-5), eotaxinu (CCL11) a leukotrienu (LT)B4 v bronchoalveolární lavážní tekutině, to vše prostřednictvím inhibice transkripčního faktoru NF- κ B a AP-1 (aktivační protein). Na základě toho se HUM řadí mezi potenciální látky vhodné k terapii astmatu a souvisejících zánětlivých a alergických onemocnění (Rogerio et al. 2009).

Hlavní účinnou složkou zodpovědnou za protizánětlivé působení silice izolované z *Cordia verbenacea* jsou dva seskviterpeny (-)-trans-karyofylen a HUM. Tyto seskviterpeny výrazně snižovaly otok tlapek u myši, který byl vyvolán faktorem aktivujícím destičky, bradykininem a ovoalbuminem. HUM byl schopen snížit tvorbu edému

způsobenou histaminem. Obě sloučeniny měly významný inhibiční efekt na karagenem indukovaný otok tlapek u myši a potkanů. Protizánětlivý účinek těchto látek pravděpodobně souvisí s inhibicí aktivace a/nebo uvolňováním prozánětlivých mediátorů jako je bradykinin, faktor aktivující destičky, histamin, interleukin-1 β (IL-1 β), TNF- α a PGE2. Obě látky také snižují expresi indukovatelné synthasy oxidu dusnatého (iNOS) a COX-2, které se podílejí na rozvoji zánětu. Předpokládaný mechanismus protizánětlivých vlastností těchto látek probíhá přes regulaci exprese prozánětlivých proteinů, pravděpodobně inhibicí aktivace NF- κ B. Protizánětlivý účinek seskviterpenů byl porovnáván s účinky dexamethasonu, který představoval pozitivní kontrolu (Fernandes et al. 2007).

Efekt HUM na akutní zánětlivou odpověď vyvolanou LPS v potkaních tlapkách byl zkoumán v článku Medeiros et al. (2007). Působením HUM a trans-karyofylenu došlo k redukci migrace neutrofilů a aktivace NF- κ B indukované LPS. Pouze HUM významně snížil nárůst hladiny cytokinů TNF- α a IL-1 β a *in vivo* up-regulaci bradykinin B1 receptorů vyvolanou LPS. Právě tyto prozánětlivé cytokiny jsou zodpovědné za up-regulaci B1 receptorů v různých tkáních za různých podmínek a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Passos et al. 2004).

Seskviterpen γ -humulen izolovaný ze silice *Emilia sonchifolia* (L.) DC byl zkoumán pro své proapoptotické působení u lidského CRC HT29 buněk. V léčbě CRC je považována za hlavní cíl terapie vnější dráha apoptózy. Předpokládá se, že HUM stimuluje shlukování tzv. „receptorů smrti“ DR4/DR5 a přes protein FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain) dochází k aktivaci kaspáz, konkrétně kaspázy-8 a kaspázy-3, což vede k indukci apoptózy v buňkách HT29 (Yu-Hsuan et al. 2011).

2.4.6 Nerolidol

Nerolidol (NER), ((E)-3,7,11-trimethyldodeka-1,6,10-trien-3-ol) (viz obr. 7) také známý jako peruviol, je čirá světle žlutá kapalina vůní připomínající růže a jablka (Lapczynski et al. 2008, McGinty et al. 2010).

Po chemické stránce se jedná o alifatický seskviterpenický alkohol s hydrofobním charakterem řetězce, který se vyskytuje v silicích extrahovaných z různých rostlin ve dvou izomerních formách *cis* a *trans* (Ferreira et al. 2012).

Díky hydrofobnímu charakteru může NER snadno přecházet přes plazmatickou membránu a může interagovat s intracelulárními proteiny či s prostředím uvnitř organel (Park et al. 2009).

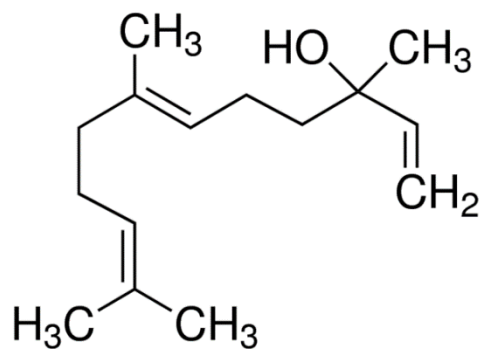
NER je běžně používán v kosmetice a jeho detergenční vlastnosti jsou využívány v čistících prostředcích. Vykazuje účinky antioxidační, antinociceptivní a antiulcerózní. NER působí proti bakteriím a houbám. Vzhledem k jeho

antiparasitickým vlastnostem byly zkoumány jeho účinky na léčbu leishmaniózy, zjištěny byly také jeho antitrypanozomální a antimalarické účinky stejně jako inhibiční účinek na růst babézií (Silva et al. 2014).

Jeden z možných mechanismů působení NER na buňku je zásah do energetického metabolismu buňky, který je zprostředkován především mitochondriemi. Mitochondrie jsou dobrým modelem pro studium cytotoxických xenobiotik, neboť negativní působení na mitochondriální bioenergetiku zcela koreluje s toxicitou pozorovanou na buněčných kulturách a organismu jako celku. Výsledky studie ukázaly, že NER testovaný na izolovaných jaterních mitochondriích zvýšil aktivitu respiračního systému a snížil efektivitu oxidativní fosforylace a to mechanismem enzymové inhibice ATP-syntasy a tedy poklesu syntézy ATP. Tento děj je závislý na koncentraci NER, zde se účinek projevil při testovaných koncentracích 1,2 a 2,4 μM . V přítomnosti NER byla dále zjištěna snížená mitochondriální propustnost a to díky jeho antioxidačním vlastnostem a schopnosti snížit mitochondriální transmembránový elektrický potenciál. Při působení NER na nádorové buněčné linie HepG2 (buňky hepatomu) došlo pak k indukci buněčné smrti a zastavení růstu nádorových buněk (Ferreira et al. 2012).

Anthelmintická aktivita racemického NER byla zkoumána *in vitro* jako nová potenciálně aktivní přírodní látka při léčbě schistosomiázy. Léčba tohoto onemocnění je závislá pouze na jediném v současné době dostupném léku, prazikvantelu ze skupiny chinolinových derivátů (Silva et al. 2014).

NER redukoval motorickou aktivitu motolic a způsobil jejich smrt. Místem působení NER je také ochranný obal (tegumentum) motolice. Působením NER dochází k morfologickým změnám tegumenta, dochází k jeho rozvolňování, ztenčování a olupování, čímž parazit ztrácí svoji přirozenou ochranu a umírá (Silva et al. 2014). Inhibiční aktivita NER byla prokázána také u leishmaniózy. (E)-nerolidol, který představuje jednu z hlavních



Obr. 7 Strukturální vzorec *trans*-nerolidolu, převzato z webu 10

složek silice extrahované z listů *P. clausenianum*, potlačuje růst promastigótní formy *Leishmania amazonensis* a působí inhibičně na enzym argininasu *L. amazonensis*, díky čemuž dochází ke snížené produkci oxidu dusnatého (NO) v infikovaných makrofázích, který je zodpovědný za cytotoxicitu a imunologické mechanismy vyvolané štěpením argininu argininasou parazita. Tato silice je též schopna zasahovat do interakce parazita a buněk hostitele, čímž se snížilo procento infikovaných buněk (Marques et al. 2011).

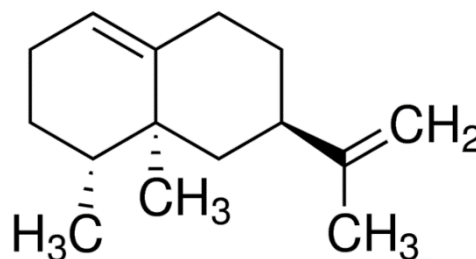
Díky přirozené lipofilně se mohou terpenoidní látky kumulovat uvnitř biologických membrán a ovlivňovat tak jejich strukturní i funkční vlastnosti. Seskviterpeny NER, farnesol, bisabolol a apriton mohou narušit normální bariérové funkce bakteriální buněčné membrány, což umožní snadnější průnik antibiotických nebo antimikrobiálních látek do těchto buněk. Antibiotika proti *Staphylococcus aureus*, která byla v tomto výzkumu používána, byla vybrána na základě jejich klinické významnosti. Tato heterogenní skupina antibiotik byla vybrána bez ohledu na jejich strukturální podobnost či specifické působení, jejich společnou vlastností je pouze působení na cytoplazmatickou membránu. Z toho vyplývá nespecifický mechanismus působení seskviterpenů na zvýšení propustnosti plazmatické membrány bakteriálních buněk pro antibiotika (Brehm-Stecher et al. 2003).

Aktivita NER jako akcelerantu transdermální penetrace léčiv byla popsána v článku Williamse a kol. (2012), který se zabýval výzkumem akcelerantů penetrace. NER zvýšil přístup 5-fluorouracilu přes kůži v pokusech *in vitro* více než dvacetinásobně (Cornwell 1994). Mechanismus účinku terpenů jako akcelerantů spočívá v narušení organizovaných lipidních struktur a v interakci s intracelulárními proteiny (Hrabálek et al. 1999).

2.4.7 Valencen

Valencen (VAL), (3R,4aS,5R)-4a,5-dimethyl-3-isopropenyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaftalen (web 10) (viz obr. 12) je čirá žlutá tekutina nacházející se u různých druhů rostlin, nejčastěji jako součást silice (web 10).

Antialergické účinky oddenku šáchoru hlíznatého (*Cyperus rotundus*) byly zjišťovány v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Antialergická aktivita byla prokázána u jeho seskviterpenických složek, zejména VAL silně inhiboval 5-lipoxygenasu (5-LOX), která katalyzuje produkci leukotrienů z kyseliny arachidonové a je považována za enzym, který vyvolává alergickou odpověď. Kromě toho



Obr. 8 Strukturální vzorec valencenu, převzato z webu 10

inhiboval β -hexosaminidasu uvolňovanou z aktivovaných buněk kryší bazofilní leukémie (RBL), které jsou oblíbenou buněčnou linií pro studie žírných buněk (Tsujimura et al. 1995). Během alergické reakce je β -hexosaminidasa spolu s histaminem uvolňována z IgE aktivovaných žírných buněk. VAL inhibuje degranulaci β -hexosaminidasy inhibicí Lyn fosforylace v IgE-stimulovaných buňkách (Jin et al. 2011, Kim et al. 2008).

VAL a nootkaton izolované z oddenků šáchoru hlíznatého (*Cyperus rotundus*) vykazovaly protizánětlivý účinek v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Podle článku Tsoyie a kol. (2011) spočívá mechanismus účinku protizánětlivé aktivity těchto seskviterpenů ve zvýšené expresi hemoxygenasy (HO-1) a s tím související inhibice exprese iNOS a produkce NO a HMGB1 (mediátor prozánětlivých cytokinů) v LPS-aktivované myší makrofágové buněčné linii RAW264.7. HO-1 je enzym, který se uplatňuje v odbourávání hemu, tvorbě železa, biliverdinu a oxidu uhelnatého. HMGB1 poskytuje ochranu proti tkáňovému poškození a poranění způsobené ischemií a sepsí. Jeho nedostatek vede ke zvýšení citlivosti k oxidačnímu stresu. Také samotná produkce CO vykazuje na buňky antiproliferační účinky (Viklický et al. 2008). VAL a nootkaton jsou silnými induktory HO-1, proto mají potenciální použití v terapii systémových zánětlivých onemocněních jako je sepse (Tsoyi et al. 2011).

Hepatoprotektivní účinky VAL byly testovány společně s dalšími seskviterpeny na homogenátu potkaních jater. Jako pozitivní antioxidační kontrola byla použita kyselina askorbová. Všechny seskviterpeny, kromě HUM snížily hladinu toxického malondialdehydu, který vzniká jako produkt z endogenní a indukované peroxidace lipidů. Účinek jednotlivých seskviterpenů, které vykazují hepatoprotektivní aktivitu, závisí na jejich strukturních a chemických vlastnostech, jako je tvar, větvení molekuly, symetrie a přítomnost elektronegativních fragmentů (Vinholes et al. 2014).

2.5 Buněčné linie

Buněčné kultury, jako zdroj biologického materiálu, představují jeden z významných modelů v pokusech *in vitro*. Poskytují nástroj pro biochemii a molekulární biologii zabývající se výzkumem jednotlivých typů rakoviny a umožňují nám porozumět fyziologii normálních i nádorových buněk. Získané údaje z těchto studií je nutno brát s rezervou. Musíme si uvědomit, že rakovina je velmi komplexní onemocnění a výzkum na buněčných liniích je velmi zjednodušený. Výsledky získané na buněčných kulturách ne vždy zcela

odpovídají hodnotám, které bychom získali v pokusech na živém organismu (Langdon 2012).

Každý buněčný model má své jisté výhody i nevýhody ve srovnání s ostatními typy biologických modelů. Buněčné linie lze poměrně snadno izolovat a kultivací získat velké množství homogenního materiálu. Nemusíme se potýkat s etickými problémy při usmrcení nebo poškození buněčných linií, jako tomu je při práci se zvířaty či pokusech na lidech. Je však třeba neustále myslet na to, že pracujeme s modelem *in vitro*, který nemusí vždy odrážet podmínky *in vivo*. Izolované buněčné linie postrádají komunikaci s ostatními tkáněmi a orgány uvnitř organismu. Na základě toho dochází často ke změně fenotypu kultivovaných buněk. Buňky jsou vytrženy ze svého přirozeného prostředí, které nikdy zcela *in vitro* nenahradíme, mění se jejich morfologie, mění se exprese genů, citlivost na různé podněty je odlišná.

První nádorová buněčná linie HeLa byla izolována v roce 1951 z maligního karcinomu děložního čípku 31leté negroidní ženy (ATCC) (web 11). Díky širokému používání této buněčné linie v mnoha výzkumných laboratořích jsou dnes HeLa buňky jedním z nejčastějších kontaminantů jiných buněčných linií, proto je nutné čistotu buněčné linie ověřovat. Mikroskopické zhodnocení buněk je málo specifické. Větší přínos k odlišení jednotlivých buněčných kultur poskytují imunochemické metody (Langdon2012).

2.5.1 Kultivace buněk

Buněčné linie pěstované *in vitro* vyžadují pro své přežití a proliferaci vhodné podmínky, které by měly co nejvíce napodobit jejich fyziologické prostředí v organismu. Nejprve je potřeba získat primární kulturu buněk izolací z laboratorního zvířete nebo člověka. Buňky rozlišujeme podle tkáně, ze které jsou izolovány, na normální a nádorové. Tyto buněčné linie mají odlišné nároky na pěstování a přežívání. Buněčná linie nádorových buněk je obvykle odolnější, lze ji snadněji pěstovat a udržovat při životě. Nádorové buňky se rychleji množí a nedochází u nich k buněčnému stárnutí. Důležité je i stáří buněk, embryonální buňky mají více „elánu“ a pěstují se lépe, snadněji se však mění jejich fenotyp.

Pasážování buněk je důležitý proces, který zajišťuje buňkám dostatečné množství živin a prostor pro přežití a proliferaci. Buňky se exponenciálně množí až do okamžiku, než se začnou vzájemně dotýkat nebo přerůstat přes sebe. Tehdy se buněčný růst zastaví. Buňky je proto potřeba pasážovat ještě dříve, než dojde k tomuto přerůstání buněk. Obvykle je pasážujeme při konfluenci 70-80 % - buňky vytvořily hustou monovrstvu na kultivačním povrchu. Většinou se jedná o buňky adherentní, které se pěstují na vhodném kultivačním

povrchu. Nejčastěji se jedná o povrch polystyrénové kultivační lahve. Některé buňky je nutné pěstovat v suspenzi, aby si zachovaly své vlastnosti (web 12).

Pro optimální růst buněk je nutná údržba podmínek fyzikálního prostředí. Většina savcích buněk preferuje teplotu $36,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Udržení vhodného pH média zajišťuje přítomnost vyšší koncentrace CO_2 v atmosféře inkubátoru, obvykle obsahuje 5% CO_2 . Relativní vlhkost atmosféry by měla být kolem 90 %, aby nedocházelo k odpařování vody z média a následnému zvýšení hladiny solí, které by eventuálně způsobily lýzu buněk. Tyto parametry prostředí jsou schopny zajistit speciální inkubátory, ve kterých jsou buňky pěstovány. Inkubátor by měl také zamezit možné kontaminaci kultur bakteriemi či kvasinkami (Langdon 2012).

2.5.2 Caco-2

Caco-2 je buněčná linie lidských epiteliálních buněk kolorektálního adenokarcinomu. Nádorové buňky byly izolovány z lidské nádorové tkáně 72letého muže, bělocha. Jedná se o buňky adherentní (ATCC) (web 11).

2.5.3 SW-620

SW-620 je buněčná linie lidských epiteliálních buněk. Nádorové buňky pochází z lymfatické uzliny, z metastázy kolorektálního adenokarcinomu karcinomu SW-480. Buňky byly izolovány od 51letého muže, bělocha. Jedná se o buňky adherentní (ATCC) (web 11).

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- Zhodnocení antiproliferační aktivity OxPt na buněčných liniích SW-620, Caco-2 (proliferující a diferencované).
- Zhodnocení antiproliferační aktivity jednotlivých seskviterpenů na buněčné linie SW-620 a Caco-2.
- Porovnání antiproliferační aktivity samotné OxPt a kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny na buněčných liniích SW-620 a Caco-2.
- Porovnání vlivu jednotlivých seskviterpenů na produkci ROS u buněčné linie Caco-2.
- Ovlivnění produkce ROS vyvolané OxPt přidáním jednotlivých seskviterpenů na buněčné linii Caco-2.
- Zjištění vzájemného působení OxPt a jednotlivých seskviterpenů v buněčné linii SW-620 a Caco-2 pomocí programu CalcuSyn.

4 Experimentální část

4.1 Biologický materiál a chemikálie

Buněčná linie Caco-2 – ATCC (Wessen, SRN)

Buněčná linie SW-620 – ATCC (Wessen, SRN)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

EMEM - Eagle's Minimum Essential Medium – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

FBS – fetální bovinní sérum – Lonza (Praha, ČR)

Glutamin – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

H₂DCFDA - 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát

NEAA – MEM non essential amino acid solution – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

NR - neutrální červeň – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Oxaliplatina – FN HK, (Hradec Králové, ČR)

PBS - Phosphate Buffered Saline – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Pen/Strep - penicilin/streptomycin – Lonza (Praha, ČR)

Terpeny – α -humulen, karyofylen oxid, trans-nerolidol, valencen – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromidu (MTT) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Trypsin – EDTA – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.2 Pomůcky a přístroje

centrifuga – Eppendorf 5810R

CO₂ inkubátor – HeraCell

laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C.

mikroskop – Nikon Eclipse TS 100

mrazicí box – HeraFreeze

spektrometrický a spektrofluorimetrický analyzátor – Tecan Infinite M 200

třepačka – IKA MS2 Minishaker

Lednice, vodní lázeň, kultivační lahev, mikrotitrační destička, plastové nádobky, kádinky, odměrné válce, sterilní plastové pipety (5 ml, 10 ml, 25 ml), automatické pipety, pipetovací

špičky, Bürkerova počítací komůrka, mikrozkušavky, stojánek na zkumavky, rukavice, počítač.

4.3 Metodika

4.3.1 Kultivace vybraných buněčných linií

Kultivace obou vybraných buněčných linií probíhala v inkubátoru za podmínek vhodných k růstu a proliferaci buněk. Optimální podmínky byly zajištěny při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a relativní vlhkost dosahovala 90 %. Buňky byly udržovány pravidelným pasážováním, které bylo prováděno dvakrát týdně, obvykle v pondělí a ve čtvrtek.

4.3.1.1 Kultivační médium

Kultivační médium zajišťuje výživu buněk pěstovaných v podmínkách *in vitro*. Synteticky připravená média obsahují celou řadu látek potřebných pro správný růst a diferenciaci buněk. Mezi nejvýznamnější složky základního kultivačního média patří aminokyseliny, glukóza, vitaminy a anorganické soli. Dále je potřeba zajistit buňkám prostředí se stabilním pH, což je umožněno přidáním vhodného pufrovacího systému do média. Základní kultivační médium může být obohaceno přídavkem krevního séra, které obsahuje především růstové faktory, hormony, bílkoviny zajišťující transport, vitaminy, stopové prvky a látky zajišťující adhezi buněk. Složení jednotlivých složek v séru se mění individuálně s každým jednotlivcem, ze kterého je krevní sérum izolováno. Může tedy docházet k určitým odchylkám v růstu a proliferaci buněk. Krevní sérum může být také zdrojem celé řady infekcí a kontaminací buněčné linie. Tyto problémy řeší bezsérová média, která mají jednotlivé složky přesně definovány a tak je zajištěno vždy stejné složení kultivačního média a zároveň nehrozí riziko kontaminace. Nevýhodou tohoto kultivačního média je jeho vysoká cena (web 12, Langdon 2012).

- **Kultivační médium: Caco-2**

Hlavní složku kultivačního média pro buněčnou linii Caco-2 tvoří EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), ze kterého bylo sterilně odebráno 62,5 ml a původní lahev byla doplněna 50 ml inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS), 5 ml neesenciálních mastných kyselin (NEAA), 5 ml 2mM L-glutaminu, 2,5 ml roztoku penicilinu a

streptomycinu (Pen/Strep). Dobře promíchané hotové médium je potřeba uchovávat v temnu při teplotě 4 °C.

- ***Kultivační médium: SW-620***

Základní složkou kultivačního média pro buněčnou linii SW-620 je DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s vysokou hladinou glukózy (4,5 g/l), obohacené o L-glutamin, hydrogenuhličitan sodný a pyruvát sodný.

V laminárním boxu bylo z tohoto základu sterilně odebráno pipetou 55,5 ml a přidáno 50 ml 10% inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS), 5 ml HEPES (kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová) pufru a 500 µl gentamicinu o koncentraci 50 µg/ml. Všechny složky kultivačního média byly řádně promíchány a skladovány v temnu při teplotě 4 °C.

4.3.1.2 Rozmrazování buněk

Při rozmrazování zamražených buněk je důležité, aby tento proces proběhl co nejrychleji. Nezahřáté kultivační médium (12 ml) bylo napipetováno do 15 ml zkumavky. Do zamrazovací zkumavky byla přidána část nezahřátého média a rozpuštěná část suspenze byla odsáta a přidána ke zbytku média. Tento proces byl opakován do úplného rozpuštění suspenze. Zhomogenizovaná suspenze byla umístěna na 5 minut na centrifugu při laboratorní teplotě. Vzniklý supernatant byl odsát a peleta resuspendována v 15 ml čerstvého média. Do kultivační lahve bylo nasazeno 15 ml suspenze a ponecháno v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Druhý den bylo potřeba vyměnit kultivační médium.

4.3.1.3 Pasážování adherentních buněk

Pasážování buněk je nutno provádět ve sterilním prostředí laminárního boxu. Nejprve bylo nutné si do laminárního boxu připravit všechny potřebné pomůcky a chemikálie. Veškeré činnosti se odehrávaly uvnitř tohoto prostoru pro zachování maximální sterility.

Z kultivační lahve bylo slito původní médium do odpadní kádinky a buňky opláchnuty dvakrát 7 ml PBS pufru (Phosphate Buffered Saline). Buněčná kultura byla opláchnutím zbavena dvojmocných iontů a zbytku média. Byly přidány 2 ml 0,25% trypsinu-EDTA (T-E), který byl před použitím umístěn na 15 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C. Trypsin byl rozprostřen po celém povrchu lahve a půl minuty inkubován za mírného pohybu s kultivační lahví ze strany na stranu. Odstraněním hořčíku a vápníku a následné přidání

proteasy způsobí uvolnění buněk z povrchu kultivační lahve. 1,2 ml T-E bylo odstraněno a kultivační lahev s rozvolněnými buňkami byla vložena na 2-3 minuty do inkubátoru. Buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem. Pokud většina z nich měla kulovitý tvar, byly sklepnuty rychlým pohybem kultivační lahve o dlaň ruky. Celý povrch kultivační lahve byl opláchnut 4 ml kultivačního média se sérem, abychom zabránili dalšímu narušení bílkovinných struktur buněk. Sérum obsahuje některé antiproteasy, které zastavují další působení T-E.

Vzniklá suspenze byla několikrát zhomogenizována opakovaným nasáváním a vypouštěním pipetou. Z homogenní suspenze bylo odebráno 0,7 ml buněčné linie Caco-2 a 0,4 ml SW-620 do čisté sterilní kultivační lahve. Stejná kultivační lahev může být použita maximálně na dvě pasáže. Suspenze buněk byla doplněna 12-13 ml čerstvého kultivačního média a buňky byly vráceny zpět do inkubátoru. Uzávěr kultivační lahve byl ponechán mírně pootvřený, aby byla zajištěna správná ventilace plynů mezi oběma prostředími. Odebírané množství buněčné suspenze bylo uzpůsobeno rychlosti růstu buněk. Zbytek homogenní suspenze buněk byl vylit do odpadní kádinky, nebo byly buňky nasazeny na pokus. Kultivační médium a PBS bylo nutné před použitím předeřát ve vodní lázni.

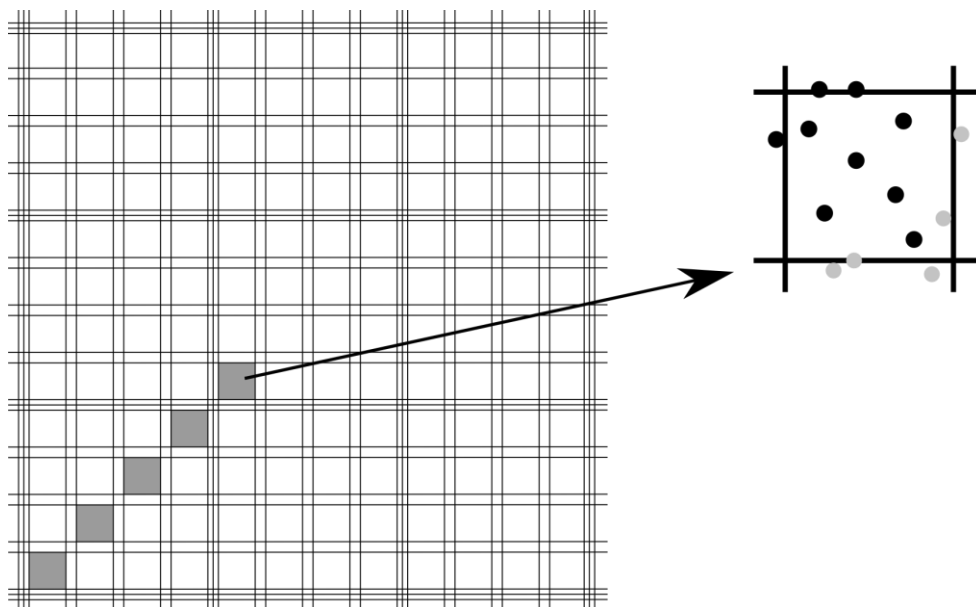
4.3.2 Ovlivňování buněk testovanými látkami

Ovlivňování buněk bylo prováděno na buňkách, které dosáhly po nasazení na 96 jamkovou destičku konfluenci 80-90 %. Buňky byly ovlivňovány předem připravenými roztoky testovaných látek o stanovených koncentracích. Do každé jamky v destičce, která obsahovala 100 μ l buněčné suspenze, bylo pipetováno 100 μ l roztoku testovaných látek. Poté byla destička s ovlivněnými buňkami umístěna zpět do inkubátoru a po stanovených časových intervalech byly buňky vyhodnoceny. Výsledky byly vyhodnoceny po 24, 48 a 72 hodinách inkubace.

4.3.2.1 Stanovení koncentrace buněčné suspenze a nasazování buněk

Určení koncentrace buněk v suspenzi získané při pasážování je potřeba provádět před každým nasazováním buněk na 96 jamkovou destičku. Zajistí se tak přibližně stejná koncentrace buněk v destičkách při jednotlivých pokusech, destička musí být buňkami dostatečně porostlá. Množství buněk ve 100 μ l buněčné suspenze se spočítá pomocí Bürkerovy komůrky. Počítací komůrka představuje síť devíti čtverců s šestnácti menšími čtverečky uvnitř každého čtverce.

Suspenze byla podle potřeby naředěna na koncentraci 5000 buněk/ 100 μ l. Na 96 jamkovou destičku bylo napipetováno 100 μ l zhomogenizované naředěné suspenze do každé jamky, do krajních jamek byla přidána místo suspenze sterilní voda. Destičky s buňkami se nechaly 24 hodin kultivovat v inkubátoru. Buňky v destičce by měly za tuto dobu dosáhnout konfluence asi 70-80 %.



Obr. 9 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Obě poloviny Bürkerovy komůrky byly naplněny 9 μ l buněčné suspenze získané při pasážování buněk. Pod mikroskopem byly buňky v jednotlivých čtvercích spočítány. Z každé poloviny Bürkerovy komůrky bylo vybráno vždy pět stejných čtverců v úhlopříčce. Započítány byly pouze buňky nacházející se uprostřed čtverců, nebo buňky, které ležely či se dotýkaly pravého a dolního okraje jednotlivých čtverců. Zjištěný počet buněk v deseti čtvercích je pak použit při výpočtu (viz obr. 9).

Výpočet koncentrace buněk v neředěné suspenzi:

$$c = \frac{x}{10} * 16$$

Výpočet ředění buněčné suspenze na požadovanou koncentraci:

$$y = 5 * \frac{V}{c}$$

c koncentrace buněk v neředěné suspenzi (počet buněk $*10^3/100\mu$ l)

x počet buněk získaných z Bürkerovy komůrky

y množství koncentrované suspenze k naředění [ml]

V požadovaný objem naředěné suspenze [ml]

Získaná buněčná suspenze v požadované koncentraci byla rozpipetována do jednotlivých jamek, do každé jamky bylo pipetováno 100 μ l suspenze. Do krajních jamek bylo napipetováno 50 μ l sterilní vody a destička byla umístěna na 24 hodin do inkubátoru.

4.3.2.2 Příprava roztoků testovaných látek

Roztoky testovaných látek o různých koncentracích byly připravovány ze zásobních roztoků těsně před provedením pokusu. Ředění na požadované koncentrace bylo prováděno v laminárním boxu. Testovanými látkami byly OxPt, seskviterpeny a jejich kombinace. Dále byl připraven 10% roztok DMSO, který sloužil jako pozitivní kontrola. Negativní kontrola při vyhodnocování látek rozpustných ve vodě (OxPt) byla tvořena samotným kultivačním médiem. Pro vzorky, které byly ředěny v DMSO, byl jako negativní kontrola použit 0,1% roztok DMSO odpovídající koncentraci DMSO obsažené ve vzorcích s terpeny. Jamky bez buněk sloužily jako tzv. slepý vzorek.

Ze zásobního koncentrovaného roztoku OxPt 5 mg/ml byly připravovány vlastní roztoky, se kterými byly následně prováděny pokusy na buňkách. Pro buněčnou linii Caco-2 byly připraveny zásobní roztoky OxPt o koncentracích 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM a 4 mM, zásobní roztoky terpenů o koncentracích 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml a 75 mg/ml. U SW-620 byl připraven pouze jeden vlastní zásobní roztok OxPt o koncentraci 125 μ M, ostatní koncentrace expozičních roztoků byly ředěny přímo ze zásobního roztoku OxPt 5 mg/ml. Koncentrace zásobních roztoků terpenů pro buněčnou linii SW-620 byly u VAL a HUM 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml. Pro CAO a NER byly připravovány zásobní roztoky o koncentracích 1 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml. Koncentrovaný roztok OxPt byl v laminárním boxu naředěn sterilní vodou na příslušné koncentrace. Zásobní koncentrované roztoky HUM, VAL a NER byly ředěny na příslušné koncentrace v DMSO, CAO byl ředěn v 96% ethanolu. Nejprve byla do mikrozkuvek napipetována sterilní voda, DMSO nebo ethanol a poté postupně připipetována OxPt či terpen. Každá koncentrace byla pipetována vždy čistou špičkou pipety, aby nedošlo k naředění zásobního koncentrovaného roztoku. Po přidání expoziční látky byla každá mikrozkuvka průběžně promíchána na třepačce. Vlastní zásobní roztoky byly uchovávány v lednici při 4 °C.

4.3.2.3 Expozice buněk

Buňky byly po 24 hodinách inkubace v 96 jamkové destičce zkontrolovány pod mikroskopem. Při dosažení konfluence 80-90 % mohly být buňky vystaveny expozici zkoušených látek. Předem připravené vlastní zásobní roztoky byly vyndány z lednice a ponechány 15 minut při laboratorní teplotě. Před přípravou ovlivňovacích roztoků bylo potřeba každou mikrozkušavku protřepat na třepačce. V laminárním boxu bylo do mikrozkušavek napipetováno požadované množství předem zahřátého kultivačního média. Následně byly do mikrozkušavek připipetovány expoziční látky v příslušných koncentracích a na třepačce promíchány. Před přípravou ovlivňovacích roztoků bylo potřeba vždy spočítat potřebné množství jednotlivých koncentrací těchto roztoků kultivačního média a expoziční látky. Do mikrozkušavek byla připravena také pozitivní a negativní kontrola, opět v požadovaném množství. Výsledné koncentrace roztoků působících na buňky jsou zaznamenány v Tab. 1.

Tab. 1 Koncentrace roztoků působících na buňky

Caco-2		SW-620			
OxPt [μ M]	terpeny [μ g/ml]	OxPt [μ M]	HUM, VAL [μ g/ml]	OxPt [μ M]	CAO, NER [μ g/ml]
0,1	6,25	5	25	0,2	1
0,5	12,5	10	50	2	10
1	25	15	75	5	25
2	50	20	100	10	50
3	75	25	125	15	75
		30	150	20	100

4.3.2.4 Zamrazování buněk

Na rozdíl od rozmrazování buněk je důležité, aby ochlazování probíhalo pomalu. Do buněčné suspenze se přidává vhodné kryoprotektivum, aby nedošlo při zamrazování k poškození buněk vznikajícími krystaly vody. V tomto případě byl použit DMSO (10%). Suspenze se obohatí o FBS a pozvolna se mrazí (-1 °C/min). Buňky je pak možno dlouhodobě uchovávat v tekutém dusíku.

Při pasáži byla suspenze buněk naředěna na 3-5 milionů buněk/1,2 ml. Buněčná suspenze o objemu 1,2 ml byla napipetována do zamrazovacích zkumavek o objemu 1,5 ml. K suspenzi bylo přidáno 150 μ l FBS a 150 μ l DMSO. Zkušavka se suspenzí byla několikrát promíchána a umístěna do zamrazovacího kontejneru (NALGENE, Sigma C1562) naplněného isopropanolem. Kontejner byl uložen do mrazicího boxu, kde dochází ke

gradientovému zamrazování. Zamrazenou suspenzi je možné nejdříve za 2 hodiny přenést do tekutého dusíku, kde je dlouhodobě uchovávána.

4.3.3 Metodika testu cytotoxicity/antiproliferačního účinku

Testy cytotoxicity a antiproliferačního účinku zjišťují celkový počet životaschopných buněk. Buňky, které po nasazení na 96 jamkovou destičku dosáhly konfluence 80-90 %, byly ovlivněny testovanými látkami o různých koncentracích. Po 48 a 72 hodinách bylo provedeno vyhodnocení cytotoxického a antiproliferačního účinku jednotlivých látek. Pomocí NRU a MTT testu byl vyhodnocován pokles životaschopnosti u Caco-2 buněk, buňky SW-620 byly vyhodnoceny pouze provedením NRU testu.

4.3.3.1 NRU test

Neutral Red Uptake Test (NRU) je jedním z nejpoužívanějších testů pro zjišťování počtu živých buněk. Metoda je založena na schopnosti živých buněk inkorporovat a vázat neutrální červeně. Toto supravitální barvivo penetruje buněčnou membránou pasivní difuzí a hromadí se v lysozomech, kde je vázáno pomocí elektrostatických hydrofóbních vazeb na anionické či fosfátové skupiny lysosomální matrix. Při fyziologickém pH nemá barvivo žádný náboj, což mu umožní proniknout membránou buňky. Uvnitř lysozomu je nižší pH než v okolní cytoplazmě, barvivo tak získá náboj a je v lysosomu zadržováno. Buněčná smrt nebo poškození membrány lysozomu způsobí narušení protonového gradientu a barvivo se začne z lysozomu uvolňovat. Zachycené barvivo v životaschopných buňkách se pak extrahuje okyseleným roztokem ethanolu a pomocí spektrofotometru je změřena absorbance rozpuštěného barviva. Díky této metodě je možné rozlišit živé a poškozené či mrtvé buňky (Repetto et al. 2008).

Po stanovené době expozice buněk bylo z destiček pipetou odsáto veškeré expoziční médium a přidáno 200 μ l roztoku neutrální červeně rozpuštěné v médiu. Výsledná koncentrace roztoku by měla být 40 μ g/ml, zásobní roztok má koncentraci 3,3 mg/ml. Před přípravou tohoto roztoku je potřeba médium a neutrální červeně nahřát na teplotu 37 °C ve vodní lázni.

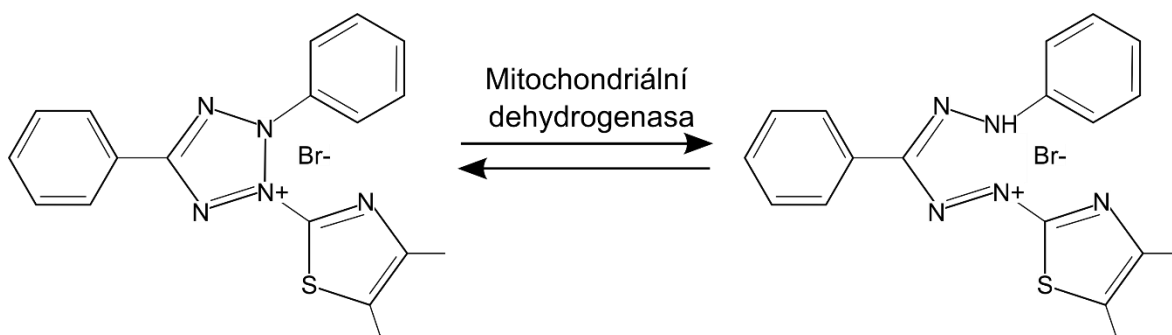
Destičky byly vloženy do inkubátoru a inkubovány 2-3 hodiny. Po uplynutí této doby byl roztok neutrální červeně odsát a k buňkám přidáno 100 μ l fixačního roztoku (1 g/100ml CaCl_2 v 0,5% roztoku formaldehydu). Destičky byly ponechány 15 minut při pokojové teplotě. Fixační roztok byl slit rychlým překlopením destičky a bylo připipetováno 200 μ l

lyzačního roztoku (1% CH₃COOH v 50% EtOH). Destička s lyzačním roztokem byla umístěna na třepačku, kde během třiceti minut došlo k úplnému uvolnění neutrální červeně. Zbarvení suspenze v jednotlivých jamkách odpovídá počtu buněk, které přežily expozici. Absorbance se odečítá při vlnové délce 540 nm na Tecanu. Hodnoty absorbance v jamkách s vyšším množstvím rozpuštěného barviva, kde přežilo více buněk, jsou vyšší.

4.3.3.2 MTT test

Tato metoda je založena na schopnosti živých buněk převést pomocí mitochondriálních dehydrogenas žluté solubilní barvivo 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré jehlicovité krystaly) (viz obr. 10). Produkt neprochází přes plazmatickou membránu a hromadí se v buňce. Schopnost buněk redukovat MTT na formazan poskytuje informaci o integritě mitochondriální membrány a životaschopnosti buněk. Přidáním silného detergentu se začne formazan z buňky uvolňovat a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (Skowroń 2015).

Po dostatečné expozici buněk OxPt a terpeny bylo na jamku přidáno 25 µl předeřátého (37 °C) roztoku MTT (3mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid/ 1 ml PBS). Destička byla umístěna na 1-2 hodiny do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Rychlým překlopením destičky bylo odstraněno expoziční médium s MTT a přidáno 50 µl lyzačního roztoku na jamku, včetně slepých vzorků (0,08M HCl-isopropanol). Buňky s lyzačním roztokem byly ponechány 30 minut na třepačce, kde se postupně zcela rozpustily. Nakonec byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan při vlnové délce 570 nm a 690 nm.



Obr. 10 Redukce MTT na formazan pomocí mitochondriální dehydrogenasy

4.3.3.3 Vyhodnocování výsledků

Hodnoty absorbance získané ze spektrofotometru Tecan v programu Magellan byly převedeny do Microsoft Office Excelu 2013 a dále zpracovávány. Nejprve bylo nutné vypočítat průměr absorbancí v 6 jamkách se stejným expozičním médiem a průměr blanku

(6 jamek bez buněk). Pro vyhodnocení bylo potřeba odečíst hodnoty absorbancí jednotlivých koncentrací expozičního média od hodnoty blanku. Hodnoty absorbancí pak byly přepočteny na procenta, absorbance kontrolních neovlivněných vzorků představovala 100 %. Dále byla stanovena směrodatná odchylka a procento směrodatné odchylky jednotlivých získaných hodnot. Každý experiment byl proveden třikrát a z těchto hodnot byl získán konečný výsledek.

4.3.4 Detekce reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí DCF

Detekce ROS byla provedena pomocí 2',7'-dichlorodihydrofluoresceinu diacetátu (H₂DCFDA) rozpuštěného v DMSO. Esterifikovaná forma H₂DCFDA snadno proniká přes buněčnou membránu. Působením intracelulárních esteráz a ROS dojde k odštěpení acetátových skupin a H₂DCFDA se mění na vysoce fluorescenční fluorescein.

Cílem vlastního experimentu bylo zjistit a porovnat pro-oxidační působení samotné OxPt a kombinací tohoto cytostatika s jednotlivými terpeny. Pokus byl proveden na nádorové buněčné linii Caco-2, samotné buňky bez ovlivnění cytostatiky a terpeny sloužily jako negativní kontrola (Sochor 2011, Owusu-Ansah 2008, Roesslein 2013, Sochor 2011).

Buňky byly nasazeny na 96 jamkovou destičku a inkubovány 48-96 hodin. Za tuto dobu by měla konfluence dosáhnout 90 %. Z buněk bylo odstraněno veškeré médium a přidány testované látky ředěné v PBS. Destička byla vložena na 12 hodin do inkubátoru. Před ukončením inkubace (30 minut) bylo přidáno 100 µl 10 µM H₂DCFDA rozředěného v PBS do výsledné koncentrace 5 µM. H₂DCFDA je nutné chránit před světlem, proto bylo ředění a pipetování prováděno ve tmě. Destička zabalená do obalu byla vložena na 30 minut do inkubátoru. Uspořádání zkoušených roztoků na destičce při experimentech je patrné z Tab. 2.

Tab. 2 Uspořádání zkoušených roztoků na destičce při detekci ROS pomocí DCF

blank	kontrola	OxPt 0,5	HUM 10	+OxPt 0,5	CAO 10	+OxPt 0,5	NER 10	+OxPt 0,5	VAL 10	+OxPt 0,5
blank	kontrola	OxPt 0,5	HUM 10	+OxPt 0,5	CAO 10	+OxPt 0,5	NER 10	+OxPt 0,5	VAL 10	+OxPt 0,5
blank	kontrola	OxPt 0,5	HUM 10	+OxPt 0,5	CAO 10	+OxPt 0,5	NER 10	+OxPt 0,5	VAL 10	+OxPt 0,5
blank	kontrola	OxPt 0,5	HUM 10	+OxPt 0,5	CAO 10	+OxPt 0,5	NER 10	+OxPt 0,5	VAL 10	+OxPt 0,5
blank	OxPt 1	OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4
blank	OxPt 1	OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4
blank	OxPt 1	OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4
blank	OxPt 1	OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4	+OxPt 1	+OxPt 4

5 Výsledky

5.1 Zpracování naměřených dat

Každý provedený experiment byl vždy nejméně třikrát opakován. Získané hodnoty byly zprůměrovány a spolu s odpovídající směrodatnou odchylkou zaznamenány do příslušných grafů. Pro vyhodnocování dat byl použit MS Office Excel a program CalcuSyn.

5.2 Stanovení optimální koncentrace oxaliplatiny

Nejprve byla stanovena základní koncentrační řada OxPt, která byla postupně upravována podle výsledků z prováděných experimentů. Pro buněčnou linii SW-620 byla vytvořena základní koncentrační řada OxPt v rozmezí od 0,1 do 100 μM . Postupným upravováním hodnot byla získána výsledná koncentrační řada OxPt o hodnotách 0,2; 2; 5; 10; 15; 20; 25 a 30 μM . Pro buněčnou linii Caco-2 byla vytvořena základní koncentrační řada v rozmezí od 0,1 do 4 μM . Výsledná koncentrační řada OxPt pak byla 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 μM . Koncentrace OxPt a jednotlivých seskviterpenů použité pro kombinační testy byly vybrány v souladu s Chou-Talalay metodou.

5.3 Stanovení optimálních koncentrací jednotlivých seskviterpenů

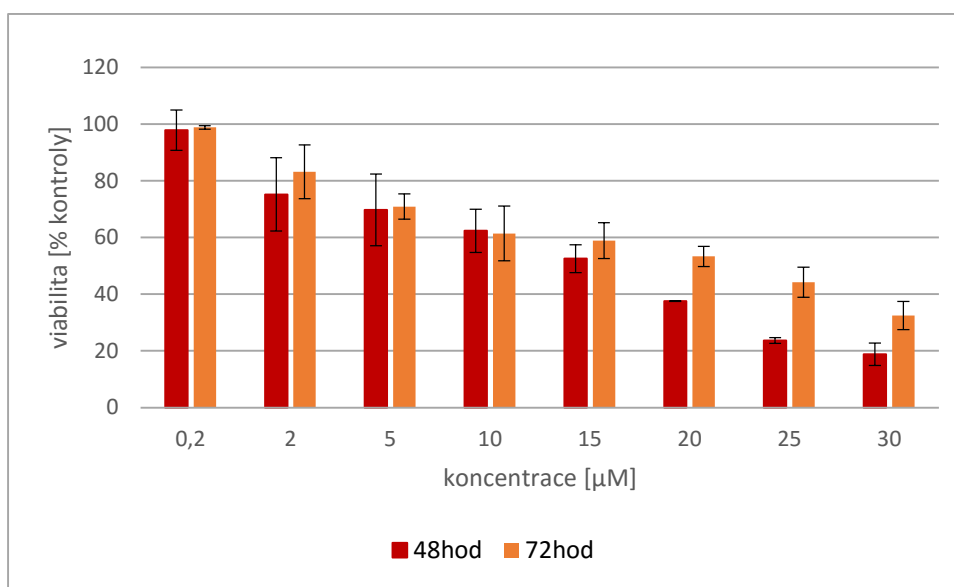
Pro stanovení koncentrační řady jednotlivých seskviterpenů pro buněčnou linii SW-620 byly testovány koncentrace od 1 do 200 $\mu\text{g/ml}$. Na základě citlivosti buněk na jednotlivé seskviterpeny byly sestaveny dvě výsledné koncentrační řady, jedna pro HUM a VAL (25; 50; 75; 100; 125; 150 $\mu\text{g/ml}$), druhá pro CAO a NER (1; 10; 25; 50; 75; 100 $\mu\text{g/ml}$). Buněčná linie Caco-2 vykazovala vyšší citlivost, a proto testované koncentrace byly nižší, od 1 do 100 $\mu\text{g/ml}$. Výsledná koncentrační řada byla společná pro všechny testované seskviterpeny (6,25; 12,5; 25; 50; 75 $\mu\text{g/ml}$). Koncentrace OxPt a jednotlivých seskviterpenů použité pro kombinační testy byly vybrány v souladu s Chou-Talalay metodou.

5.4 Buněčná linie SW-620

Buněčné linie SW-620 byla za stejných kultivačních podmínek kultivována snadněji než buněčná linie Caco-2, buňky se rychleji množily a měly větší tendenci k přerůstání. V porovnání s Caco-2 vykazovaly však nižší citlivost na OxPt i seskviterpeny. Antiproliferační aktivita buněk se projevovala až při vyšších koncentracích OxPt i seskviterpenů.

5.4.1 Vliv OxPt na proliferaci buněk SW-620

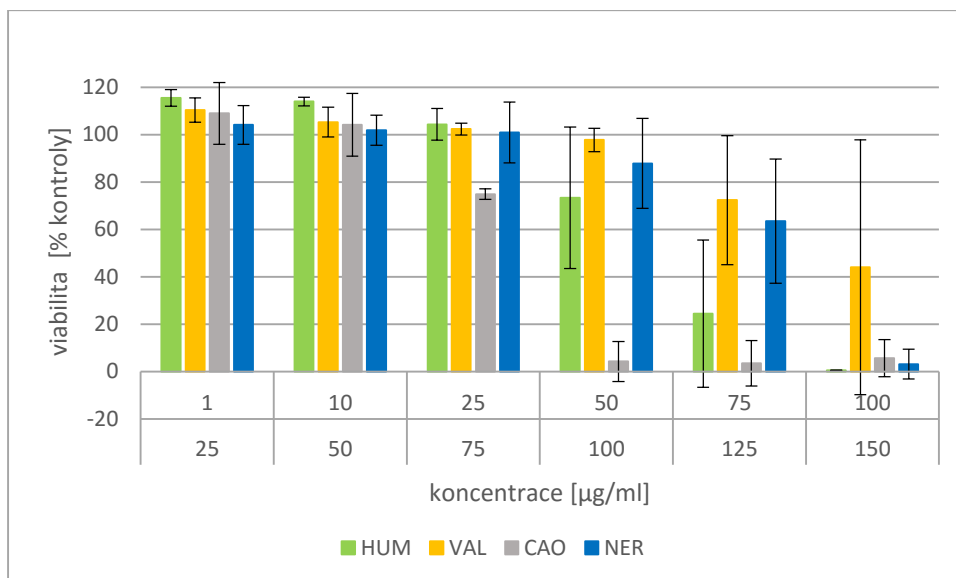
Z naměřených hodnot byl získán graf závislosti viability buněk [% kontroly] na koncentraci OxPt (μM). Po 48- a 72-hodinové inkubaci byl zaznamenán významný dávkově závislý antiproliferační účinek OxPt na buněčnou linii SW-620. Po 48-hodinové inkubaci byl antiproliferační účinek na buňky vyšší, při delší inkubaci se přežívající buňky ještě množily a naměřený antiproliferační účinek byl o něco nižší (viz obr. 11).



Obr. 11 Antiproliferační účinek OxPt na buněčnou linii SW-620. Buňky byly vyhodnoceny po 48- a 72-hodinové inkubaci metodou NRU. Data uváděná jako procento kontrolních buněk (100 %) představují průměr z 3 nezávislých experimentů.

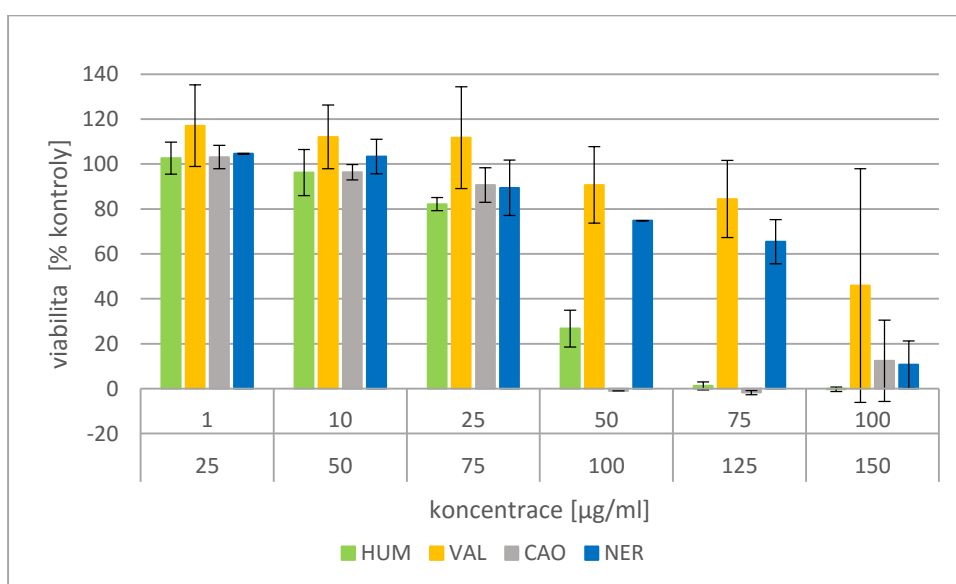
5.4.2 Vliv seskviterpenů na proliferaci buněk SW-620

Z naměřených hodnot byl získán graf závislosti viability buněk [% kontroly] na koncentraci jednotlivých seskviterpenů ($\mu\text{g/ml}$). Buňky vykazovaly na HUM a VAL nižší citlivost, proto byly používány roztoky těchto seskviterpenů o vyšší koncentraci než u CAO a NER.



Obr. 12 Porovnání antiproliferačního účinku jednotlivých seskviterpenů na buněčnou linii SW-620. HUM a VAL o koncentracích 25-150 µg/ml, CAO a NER o koncentracích 1-100 µl/ml. Buňky byly vyhodnoceny po 48-hodinové inkubaci NRU metodou.

Po 48-hodinové inkubaci buněčné linie SW-620 s jednotlivými seskviterpeny byl zaznamenán dávkově závislý antiproliferační účinek na buňky. Z grafu (viz obr. 12) je patrné, že největší antiproliferační aktivita byla naměřena u CAO.



Obr. 13 Porovnání antiproliferačního účinku jednotlivých seskviterpenů na buněčnou linii SW-620. HUM a VAL o koncentracích 25-150 µg/ml, CAO a NER o koncentracích 1-100 µl/ml. Buňky byly vyhodnoceny po 72-hodinové inkubaci NRU metodou.

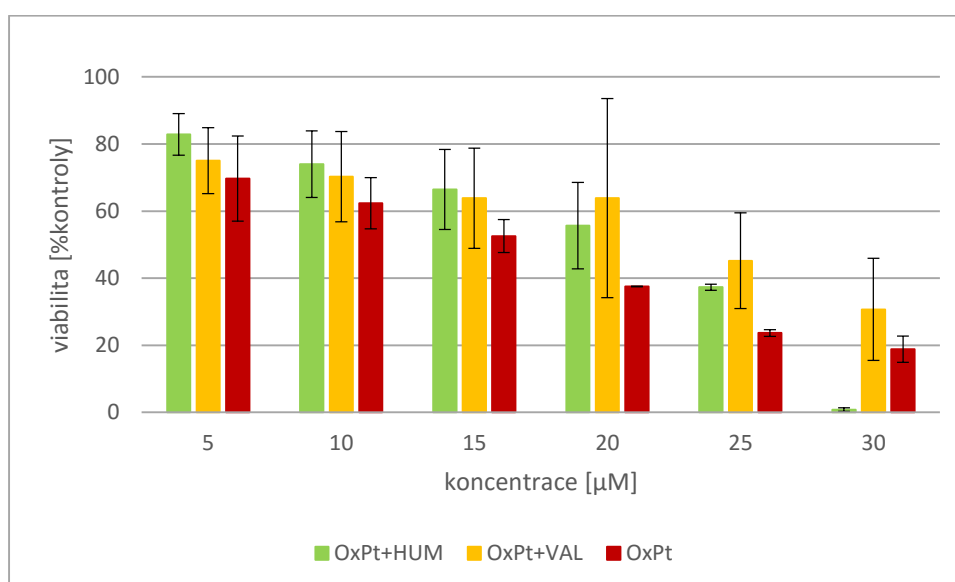
Po 72-hodinové inkubaci buněčné linie SW-620 s jednotlivými seskviterpeny nebyla zaznamenána výrazná změna antiproliferačního účinku na buňky v porovnání s antiproliferační aktivitou po 48-hodinové inkubaci (viz obr. 13).

Tab. 3 Hodnoty IC_{50} OxPt a jednotlivých seskviterpenů testovaných na buněčné linii SW-620 po 48- a 72-hodinové inkubaci. Hodnoty byly vypočteny v programu CalcuSyn.

IC_{50}	SW - 620	
	48	72
OxPt [μ M]	10,3	17,1
CAO [μ g/ml]	27,9	48,8
HUM [μ g/ml]	109,6	88,8
NER [μ g/ml]	69,3	63,4
VAL [μ g/ml]	143,3	152,9

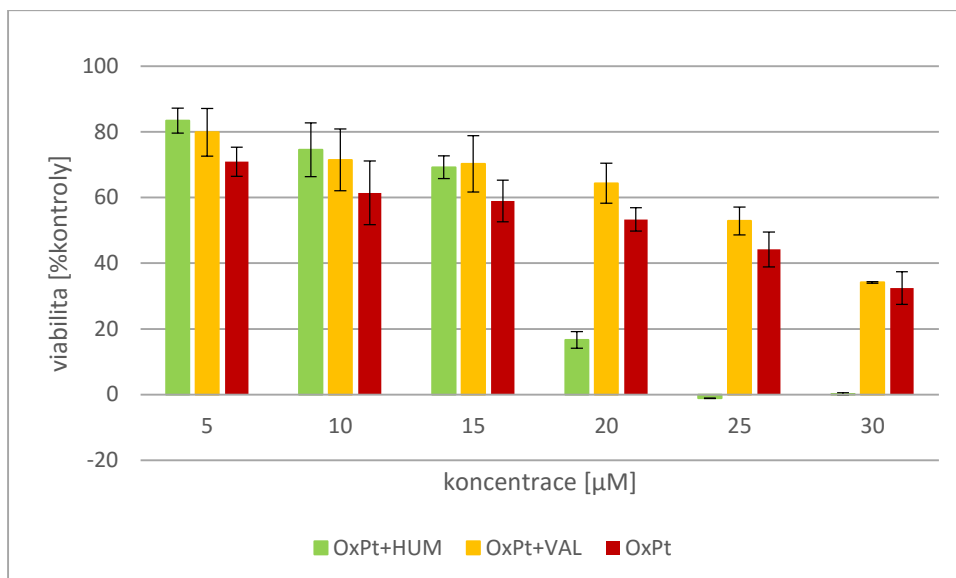
5.4.3 Vliv kombinace OxPt a seskviterpenů na proliferaci buněk SW-620

Z naměřených hodnot byl získán graf závislosti viability buněk [% kontroly] na koncentraci kombinace OxPt (μ M) s jednotlivými seskviterpeny (μ g/ml).



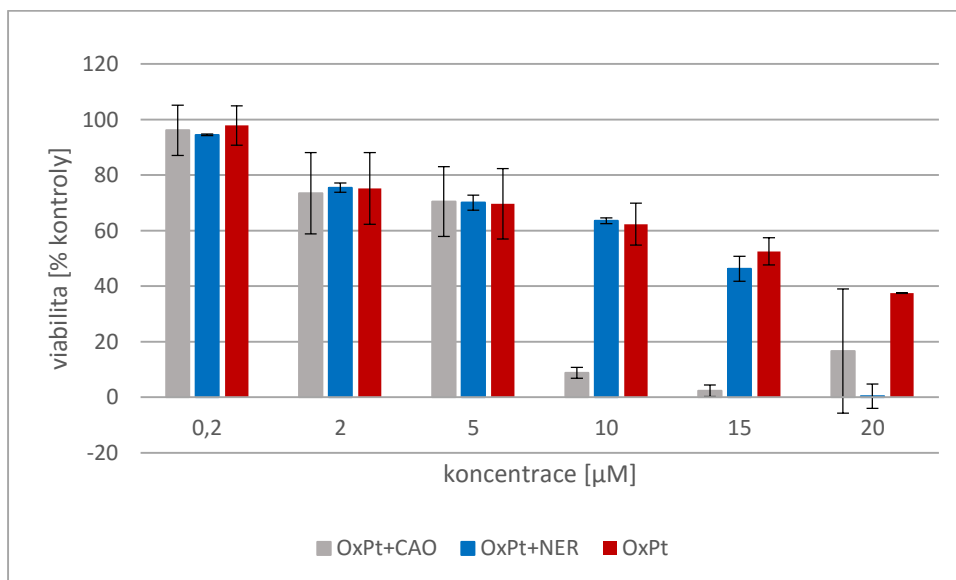
Obr. 14 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (5; 10; 15; 20; 25; 30 μ M) a kombinace OxPt s HUM (25; 50; 75; 100; 125; 150 μ g/ml) a OxPt s VAL (25; 50; 75; 100; 125; 150 μ g/ml) na buněčnou linii SW-620. Buňky byly vyhodnoceny po 48-hodinové inkubaci NRU metodou.

Z naměřených hodnot je patrné, že kombinace OxPt s VAL neměla vyšší antiproliferační účinek než samotná OxPt. Po 48-hodinové inkubaci kombinací OxPt s HUM došlo ke zvýšení antiproliferačního účinku v porovnání s antiproliferačním účinkem samotné OxPt pouze u nejvyšší koncentrace kombinace OxPt (30 μ M) s HUM (150 μ g/ml) u buněčné linie SW-620 (viz obr. 14).



Obr. 15 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (5; 10; 15; 20; 25; 30 µM) a kombinace OxPt s HUM (25; 50; 75; 100; 125; 150 µg/ml) a OxPt s VAL (25; 50; 75; 100; 125; 150 µg/ml) na buněčnou linii SW-620. Buňky byly vyhodnoceny po 72-hodinové inkubaci NRU metodou.

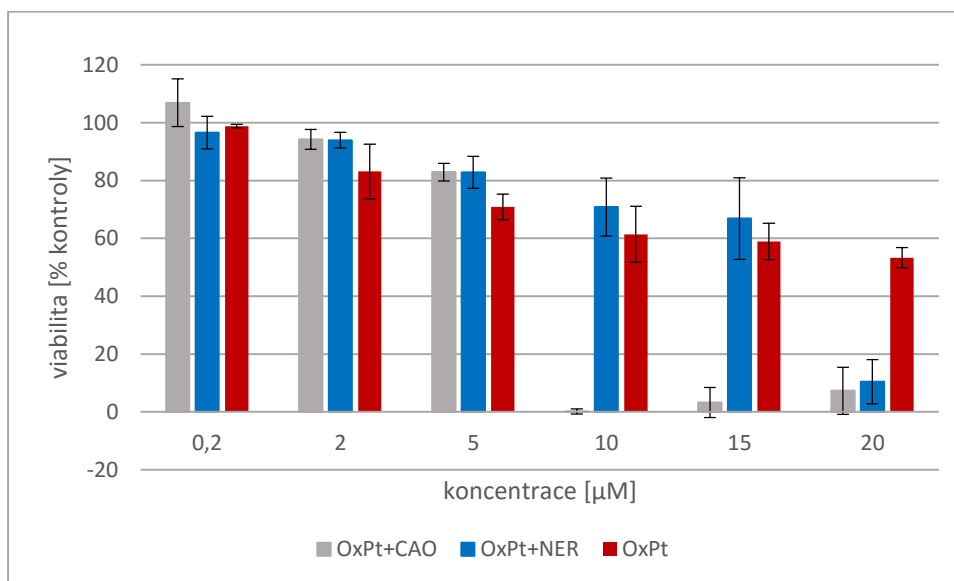
Po 72-hodinové inkubaci vykazovala kombinace HUM (100; 125; 150 µg/ml) s OxPt (20; 25; 30 µM) ve vyšších koncentracích vyšší antiproliferační účinek než samotná OxPt na buněčnou linii SW-620 (viz obr. 15). V porovnání s inkubací po 48 hodinách došlo k mírnému nárůstu buněk, které přežily působení testovaných látek.



Obr. 16 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (0,2; 2; 5; 10; 15; 20 µM) a kombinace OxPt s CAO (1; 10; 25; 50; 75; 100 µg/ml) a OxPt s NER (1; 10; 25; 50; 75; 100 µg/ml) na buněčnou linii SW-620. Buňky byly vyhodnoceny po 48-hodinové inkubaci NRU metodou.

Po 48-hodinové inkubaci vykazovala kombinace CAO (50; 75; 100 µg/ml) s OxPt (10; 15; 20 µM) vyšší antiproliferační aktivitu než samotná OxPt. Kombinace NER (75 µg/ml)

s OxPt (20 μM) vykazovala vyšší antiproliferační aktivitu v porovnání se samotnou OxPt až při nejvyšší testované koncentraci na buněčnou linii SW-620 (viz obr. 16).



Obr. 17 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (0,2; 2; 5; 10; 15; 20 μM) a kombinace OxPt s CAO (1; 10; 25; 50; 75; 100 $\mu\text{g/ml}$) a OxPt s NER (1; 10; 25; 50; 75; 100 $\mu\text{g/ml}$) na buněčnou linii SW-620. Buňky byly vyhodnoceny po 72-hodinové inkubaci NRU metodou.

Po 72-hodinové inkubaci buněčné linie SW-620 s OxPt a kombinacemi OxPt s CAO a OxPt s NER (viz obr. 17) byly zjištěny obdobné antiproliferační účinky na buňky jako po 48-hodinové inkubaci.

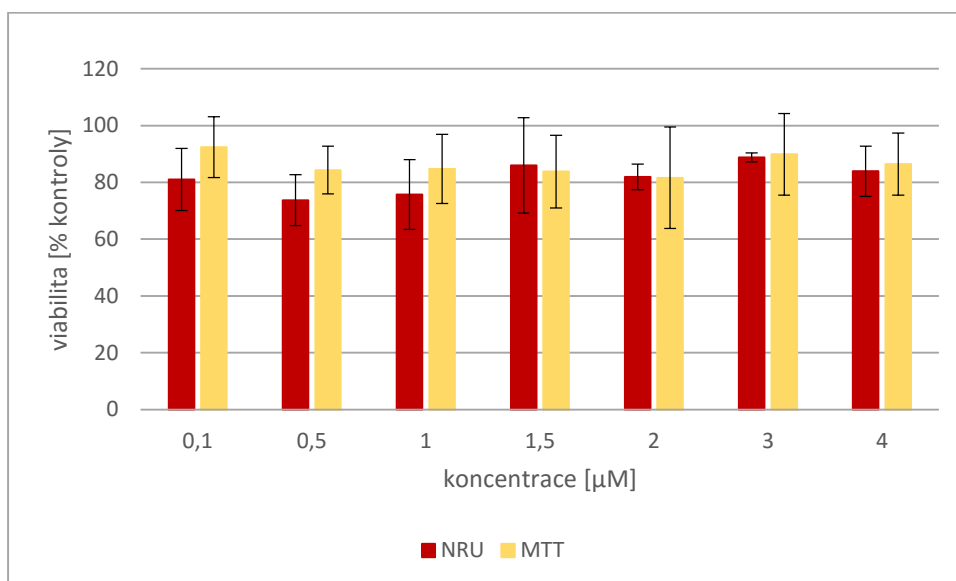
5.5 Buněčná linie Caco-2 - proliferující

Buněčná linie Caco-2 porůstala kultivační lahev a mikrotitrační destičku pomaleji oproti buněčné linii SW-620, ale citlivost na OxPt a jednotlivé seskviterpeny byla podstatně vyšší. Pro vyvolání antiproliferačního účinku byly použity nižší koncentrace seskviterpenů než u SW-620. Výsledky antiproliferačního působení jednotlivých látek na buňky byly vyhodnocovány dvěma metodami NRU a MTT s výjimkou testování samotných seskviterpenů, které byly vyhodnocovány pouze metodou NRU.

5.5.1 Vliv OxPt na proliferaci buněk Caco-2

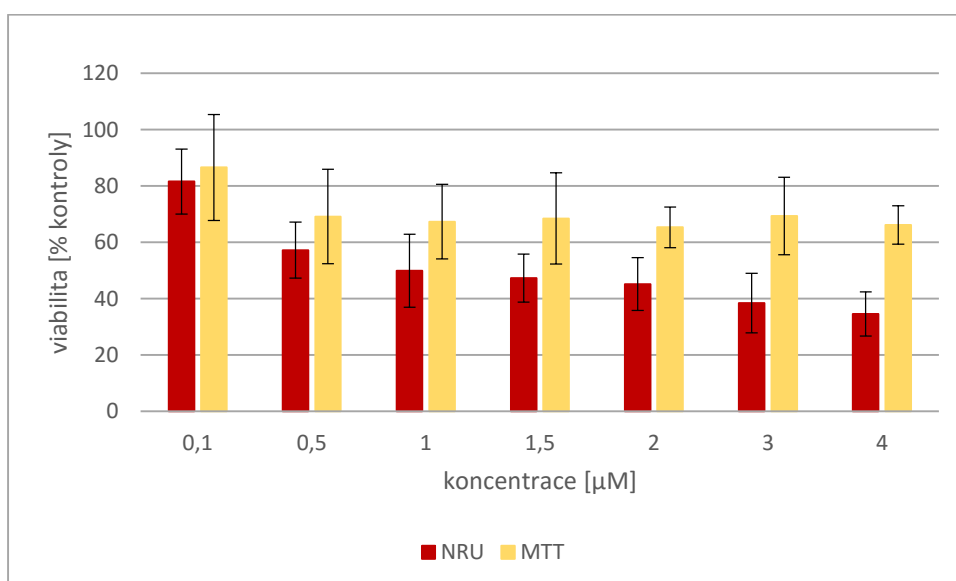
Z naměřených hodnot byl získán graf závislosti viability buněk [% kontrola] na koncentraci OxPt [μM] po 24-, 48-, 72-hodinové inkubaci.

Po 24-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 s různými koncentracemi OxPt nebyly na buňkách prokázány cytotoxické/antiproliferační účinky metodou NRU ani MTT (viz obr. 18). Další experimenty s 24-hodinovou dobou inkubace již nebyly prováděny.



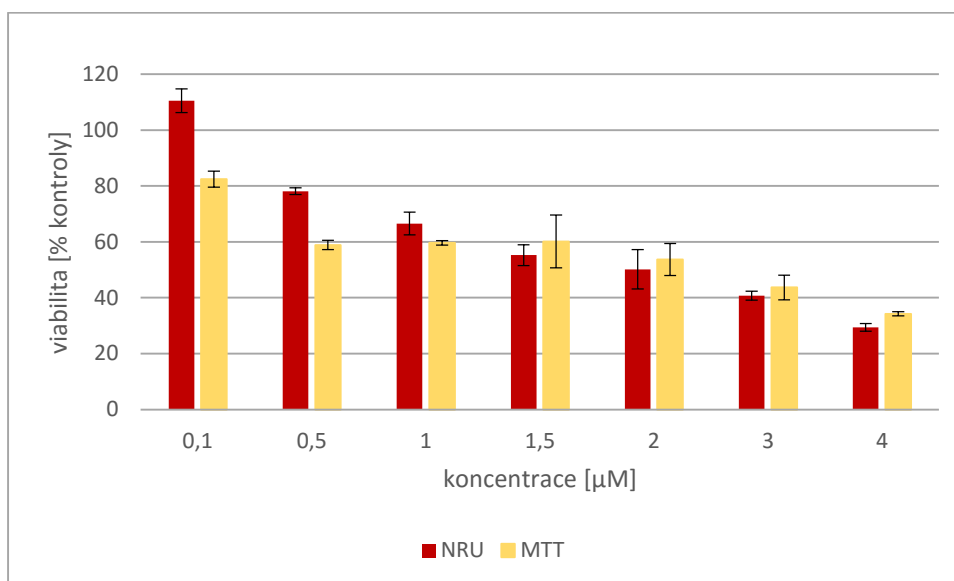
Obr. 18 Antiproliferační účinek OxPt na buněčnou linii Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 24 hodinové inkubaci metodou NRU a MTT. Data uváděná jako procento kontrolních buněk (100 %) představují průměr z 3 nezávislých experimentů.

Po 48-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 s různými koncentracemi OxPt byl zjištěn dávkově závislý antiproliferační účinek na buňky metodou NRU. Při vyhodnocování počtu živých buněk metodou MTT nebyla antiproliferační aktivita OxPt dávkově závislá (viz obr. 19).



Obr. 19 Antiproliferační účinek OxPt na buněčnou linii Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 48 hodinové inkubaci metodou NRU a MTT. Data uváděná jako procento kontrolních buněk (100 %) představují průměr z 3 nezávislých experimentů.

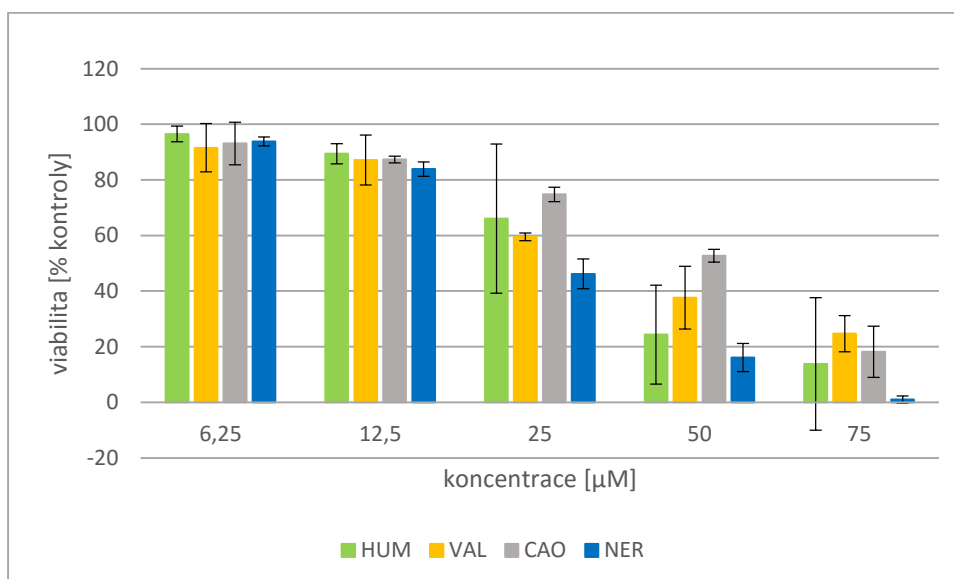
Po 72-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 s různými koncentracemi OxPt byl prokázán dávkově závislý antiproliferační účinek na buňky jak metodou NRU, tak i metodou MTT (viz obr. 20).



Obr. 20 Antiproliferační účinek OxPt na buněčnou linii Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 72 hodinové inkubaci metodou NRU a MTT. Data uváděná jako procento kontrolních buněk (100 %) představují průměr z 3 nezávislých experimentů.

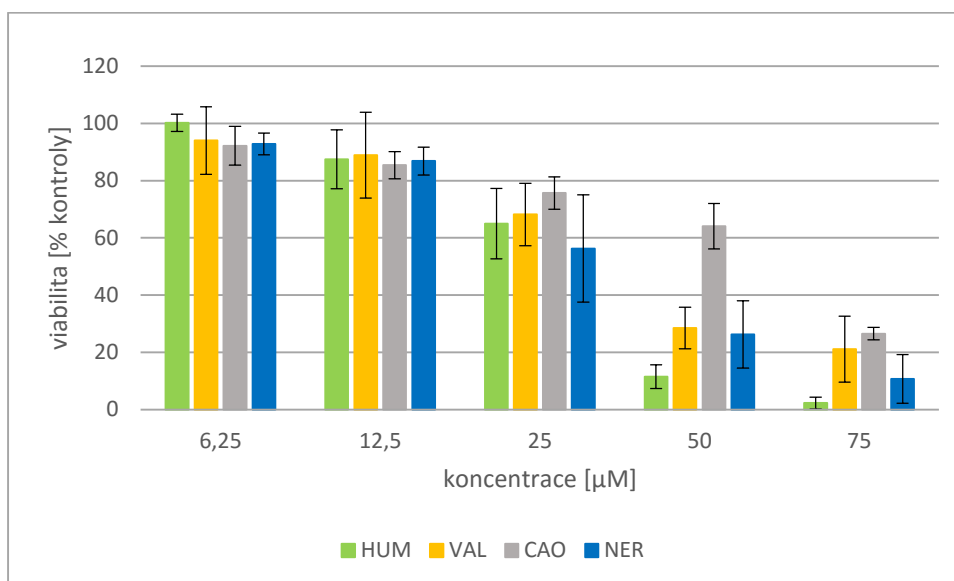
5.5.2 Vliv seskviterpenů na proliferaci buněk Caco-2

Buněčná linie Caco-2 byla citlivější na působení jednotlivých seskviterpenů, proto byly buňky ovlivňovány nižšími koncentracemi než u buněčné linie SW-620. Koncentrace byly u všech seskviterpenů stejné. Výsledky byly hodnoceny metodou NRU.



Obr. 21 Porovnání antiproliferačního účinku jednotlivých seskviterpenů na buněčnou linii Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 48-hodinové inkubaci NRU metodou.

Po 48-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 s jednotlivými seskviterpeny byl zaznamenán dávkově závislý antiproliferační účinek na buňky. Nejcitlivěji buňky reagovaly na NER (viz obr. 21).



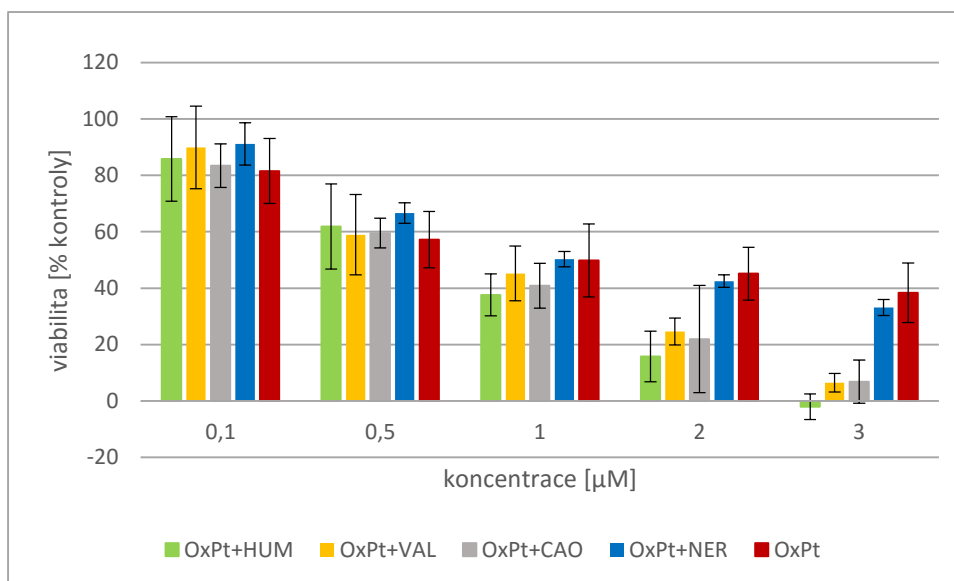
Obr. 22 Porovnání antiproliferačního účinku jednotlivých seskviterpenů na buněčnou linii Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 72-hodinové inkubaci NRU metodou.

Po 72-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 s jednotlivými seskviterpeny nedošlo k žádné výrazné změně antiproliferačního účinku na buňky, pouze HUM vykazoval ve vysokých koncentracích zvýšený antiproliferační účinek (viz obr. 22).

Tab. 4 Hodnoty IC_{50} OxPt a jednotlivých seskviterpenů testovaných na buněčné linii Caco-2 po 48- a 72 hodinové inkubaci. Hodnoty byly vypočteny v programu CalcuSyn.

IC_{50}	CaCo - 2	
	48	72
OxPt [µM]	1,2	1,9
CAO [µg/ml]	44,8	57,7
HUM [µg/ml]	34,5	26,6
NER [µg/ml]	21,4	29,7
VAL [µg/ml]	39,2	37,9

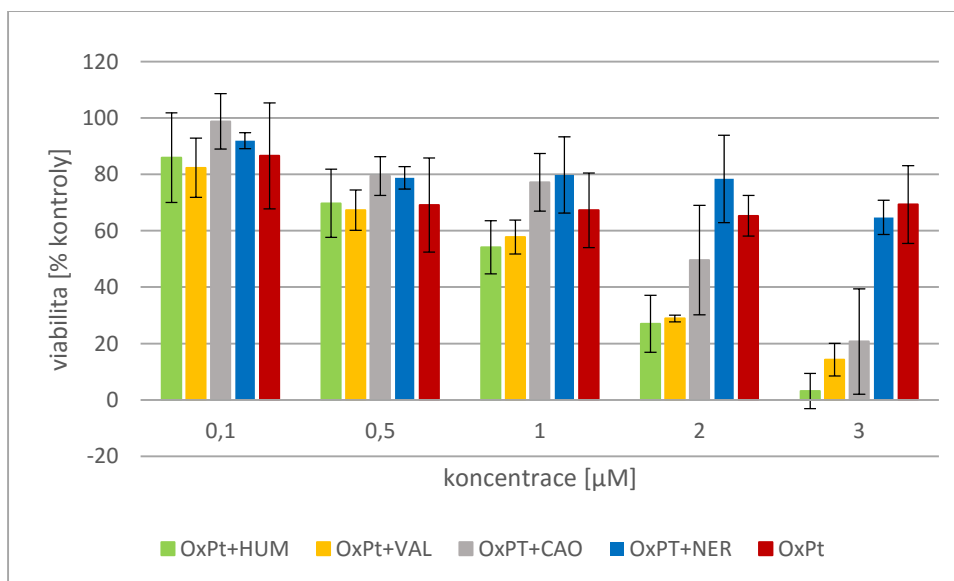
5.5.3 Vliv kombinace OxPt a seskviterpenů na proliferaci buněk Caco-2



Obr. 23 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (0,1; 0,5; 1; 2; 3 µM) a kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny HUM, VAL, CAO, NER (6,25; 12,5; 25; 50; 75 µg/ml). Buňky byly vyhodnoceny po 48-hodinové inkubaci NRU metodou.

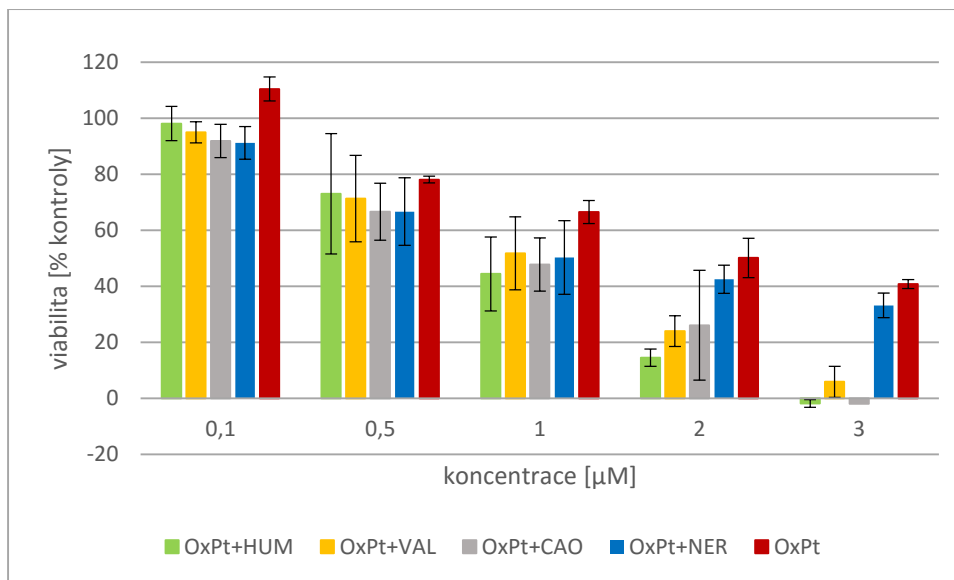
Po 48-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 byl zaznamenán vyšší antiproliferační účinek u kombinací všech seskviterpenů ve vyšších koncentracích s OxPt v porovnání s antiproliferačním účinkem samotné OxPt. Nejvyšší antiproliferační účinek vykazovala kombinace HUM s OxPt (viz obr. 23).

Výsledky vyhodnocovány metodou MTT byly odlišné od výsledků získaných metodou NRU.



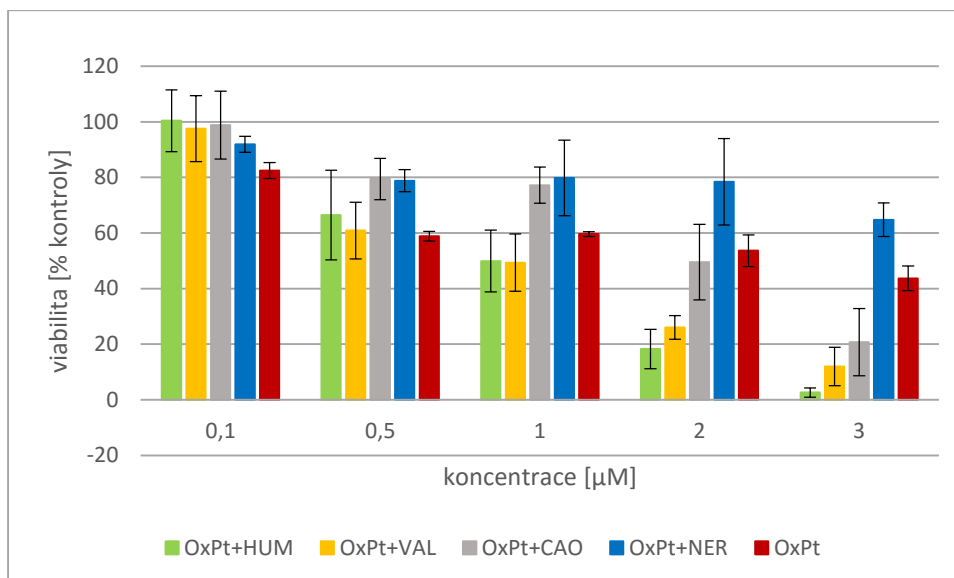
Obr. 24 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (0,1; 0,5; 1; 2; 3 µM) a kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny HUM, VAL, CAO, NER (6,25; 12,5; 25; 50; 75 µg/ml). Buňky byly vyhodnoceny po 48-hodinové inkubaci MTT metodou.

U NER a samotné OxPt nebyl antiproliferační účinek příliš dávkově závislý. Kombinace HUM s OxPt a VAL s OxPt měly vyšší antiproliferační účinek než samotná OxPt při koncentracích 2 a 3 μM OxPt. Kombinace CAO s OxPt vykazovala vyšší antiproliferační účinek v porovnání se samotnou OxPt až při koncentraci 3 μM OxPt (viz obr. 24).



Obr. 25 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (0,1; 0,5; 1; 2; 3 μM) a kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny HUM, VAL, CAO, NER (6,25; 12,5; 25; 50; 75 $\mu\text{g/ml}$). Buňky byly vyhodnoceny po 72-hodinové inkubaci NRU metodou.

Po 72-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 vykazovaly všechny seskviterpeny v kombinaci s OxPt vyšší antiproliferační účinek na buňky než samotná OxPt. Všechny testované látky vykazovaly antiproliferační účinek závislý na dávce. Nejvyšší antiproliferační aktivitu vykazovala kombinace HUM s OxPt, nejnižší kombinace NER s OxPt (viz obr. 25). Výsledky byly vyhodnocovány metodou NRU.

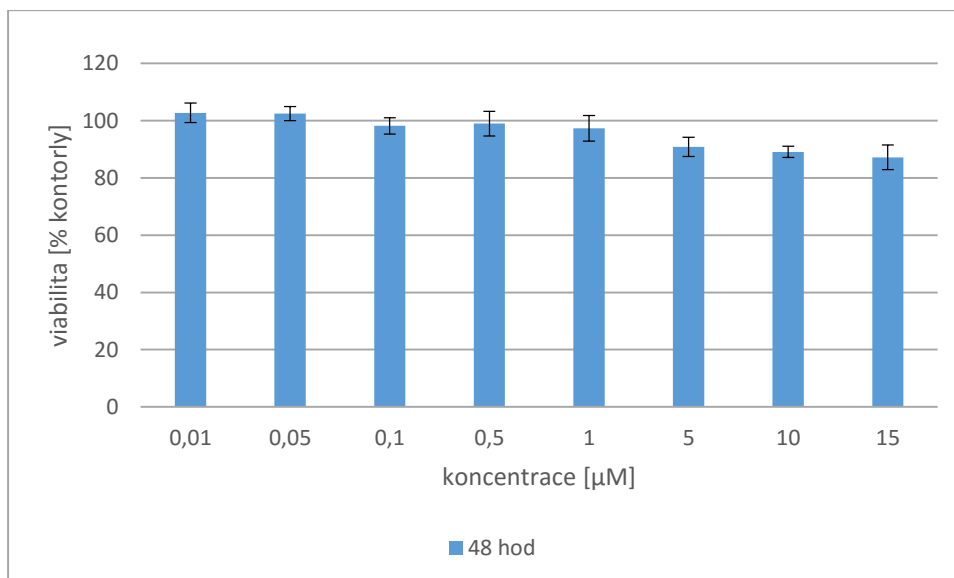


Obr. 26 Porovnání antiproliferačního účinku samotné OxPt (0,1; 0,5; 1; 2; 3 µM) a kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny HUM, VAL, CAO, NER (6,25; 12,5; 25; 50; 75 µg/ml). Buňky byly vyhodnoceny po 72-hodinové inkubaci MTT metodou.

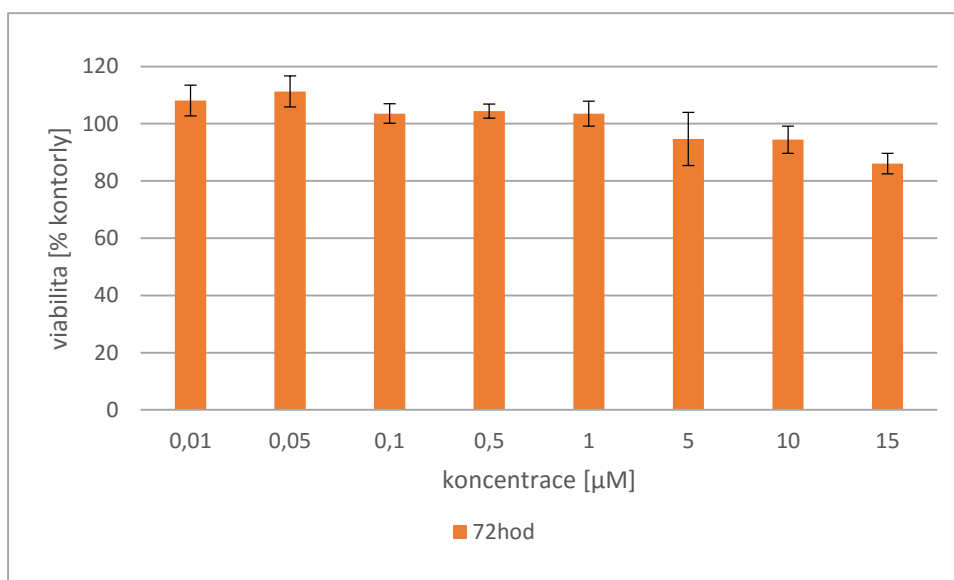
Po 72-hodinové inkubaci buněčné linie Caco-2 byl antiproliferační účinek kombinace HUM a VAL s OxPt dávkově závislý a vyšší než u samotné OxPt od koncentrace 1 µM OxPt. Kombinace CAO s OxPt vykazovala dávkově závislý antiproliferační účinek na buňky, avšak vyšší antiproliferační účinek než samotná OxPt vykazovala až při koncentraci 2 µM OxPt. Kombinace NER s OxPt vykazovala nižší antiproliferační účinek v porovnání se samotnou OxPt (viz obr. 26). Výsledky byly vyhodnocovány metodou MTT.

5.6 Buněčná linie Caco-2 - diferencovaná

Pro porovnání účinku OxPt na nedělící se buňky byly Caco-2 nasazeny na mikrotitrační destičku a inkubovány v termostatu. Po dosažení konfluence byly buňky inkubovány dalších 21 dní při pravidelné výměně kultivačního média 2x týdně. Po diferenciaci buněk k nim byly přidány různé koncentrace OxPt. Výsledky byly vyhodnocovány metodou NRU po 48- a 72-hodinové inkubaci buněk s OxPt.



Obr. 27 Cytotoxický účinek OxPt na nedělicí se linií buněk Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 48-hodinové inkubaci NRU metodou.



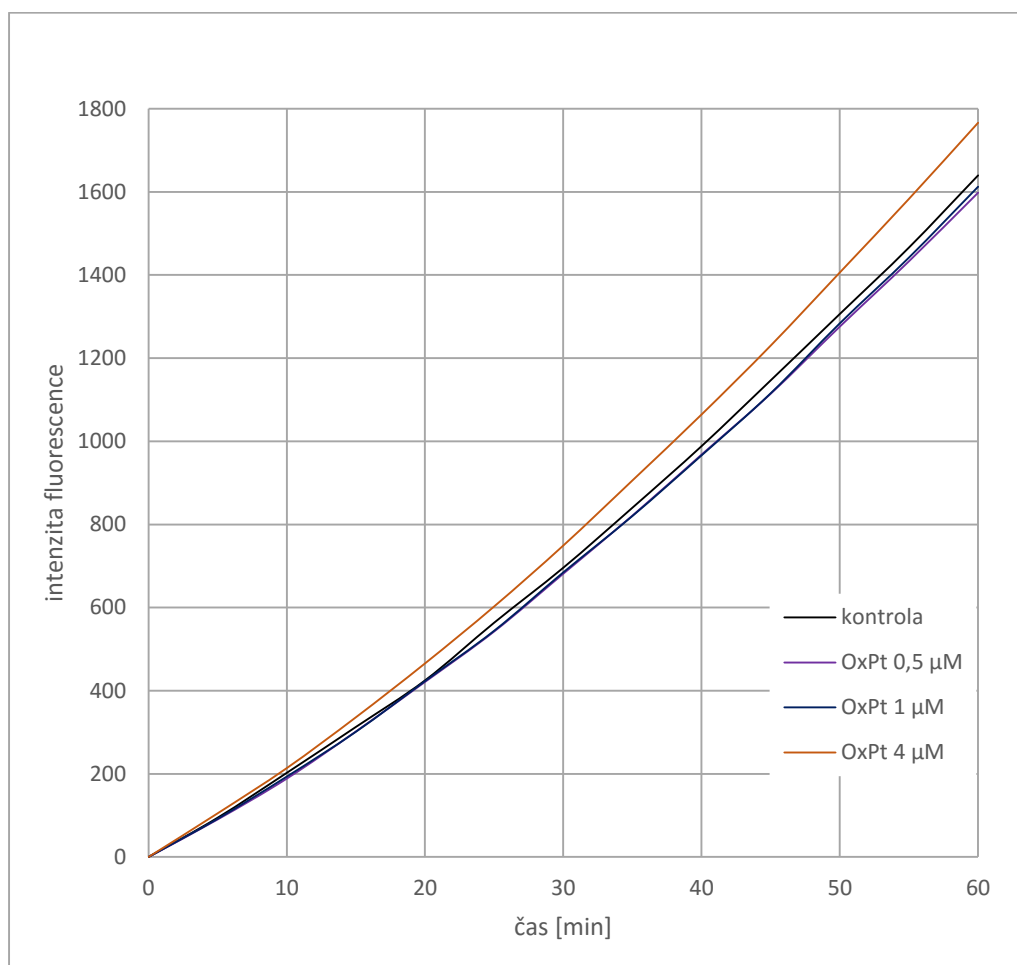
Obr. 28 Cytotoxický účinek OxPt na nedělicí se linií buněk Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 72-hodinové inkubaci NRU metodou.

Z grafů (viz obr. 27 a Obr. 28) je patrné, že viabilita buněk je snížena až při vysokých koncentracích OxPt. Buňky, které se nedělí, vykazují nízkou citlivost na OxPt. Výsledky byly vyhodnoceny po 48- a 72-hodinové inkubaci OxPt s diferencovanou buněčnou linií Caco-2.

5.7 Vliv seskviterpenů a OxPt na tvorbu ROS

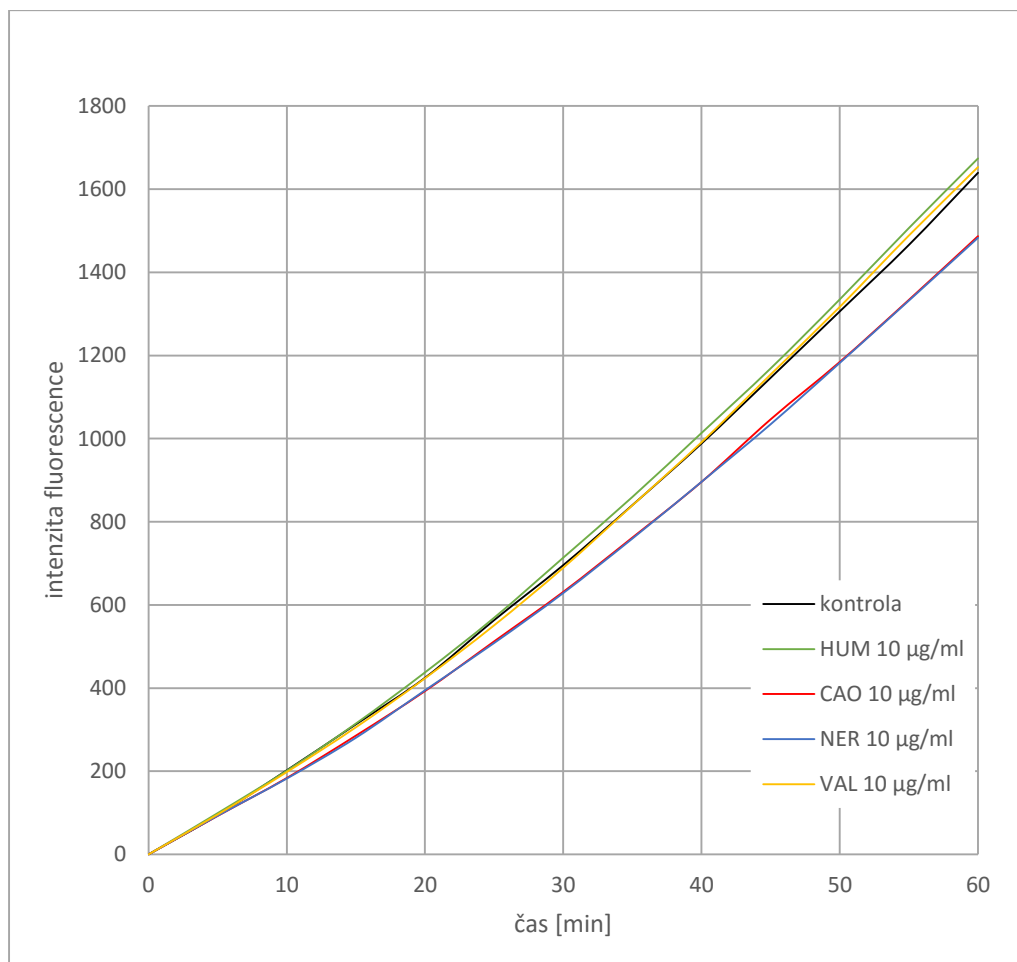
Pro-oxidační působení je jednou z možností cytotoxického působení seskviterpenů na nádorové buňky. Po 12-hodinové inkubaci proliferujících buněk Caco-2 s jednotlivými

látkami byla vyhodnocena produkce ROS metodou DCF. Ovlivnění produkce ROS bylo hodnoceno u samotné OxPt o koncentracích 0,5; 1 a 4 μM , u jednotlivých seskviterpenů o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a u kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny.



Obr. 29 Účinek OxPt na produkci ROS v buněčné linii Caco-2. Výsledky byly vyhodnoceny po 12-hodinové inkubaci metodou DCF.

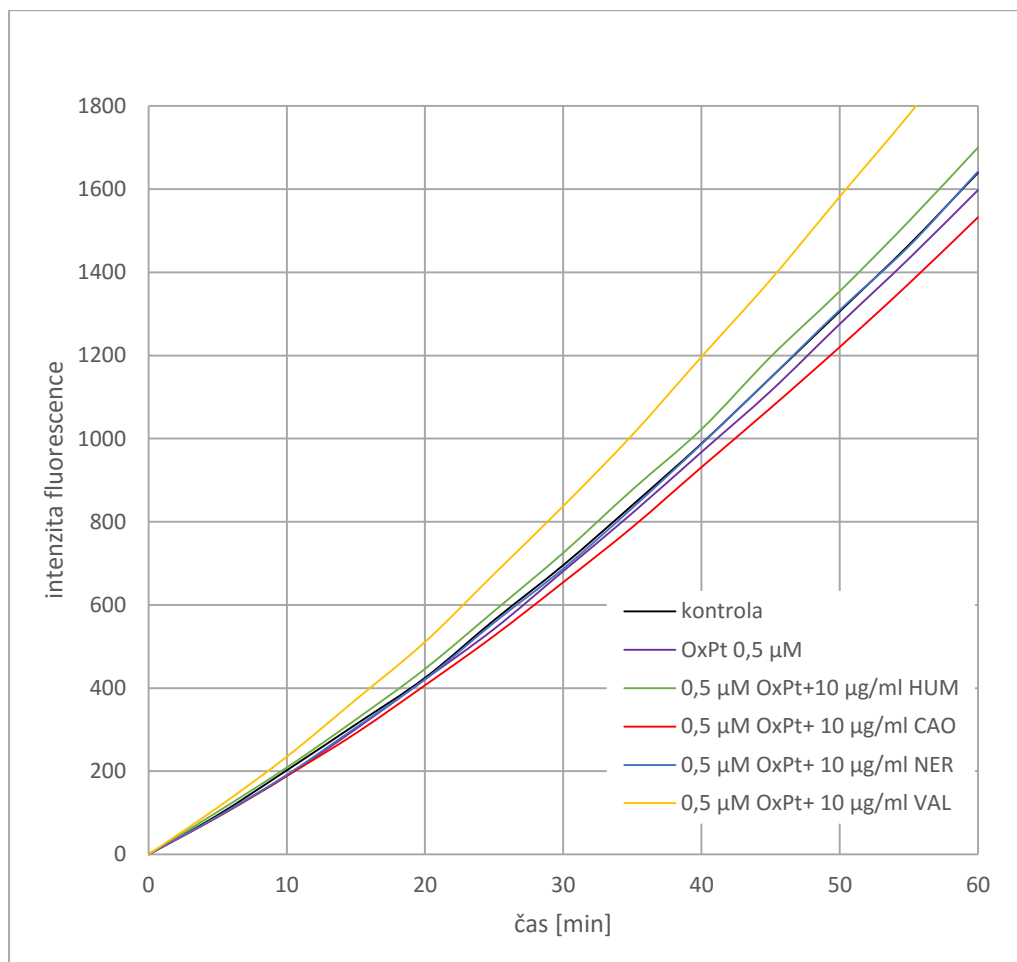
Při porovnání účinku jednotlivých koncentrací OxPt na produkci ROS v buněčné linii Caco-2 byla zjištěna pro-oxidační aktivita až při vyšší koncentraci OxPt 4 μM . Nižší testované koncentrace OxPt (0,5 a 1 μM) produkci ROS neovlivnily (viz obr. 29).



Obr. 30 Účinek jednotlivých seskviterpenů na produkci ROS v buněčné linii Caco-2. Výsledky byly vyhodnoceny po 12-hodinové inkubaci metodou DCF.

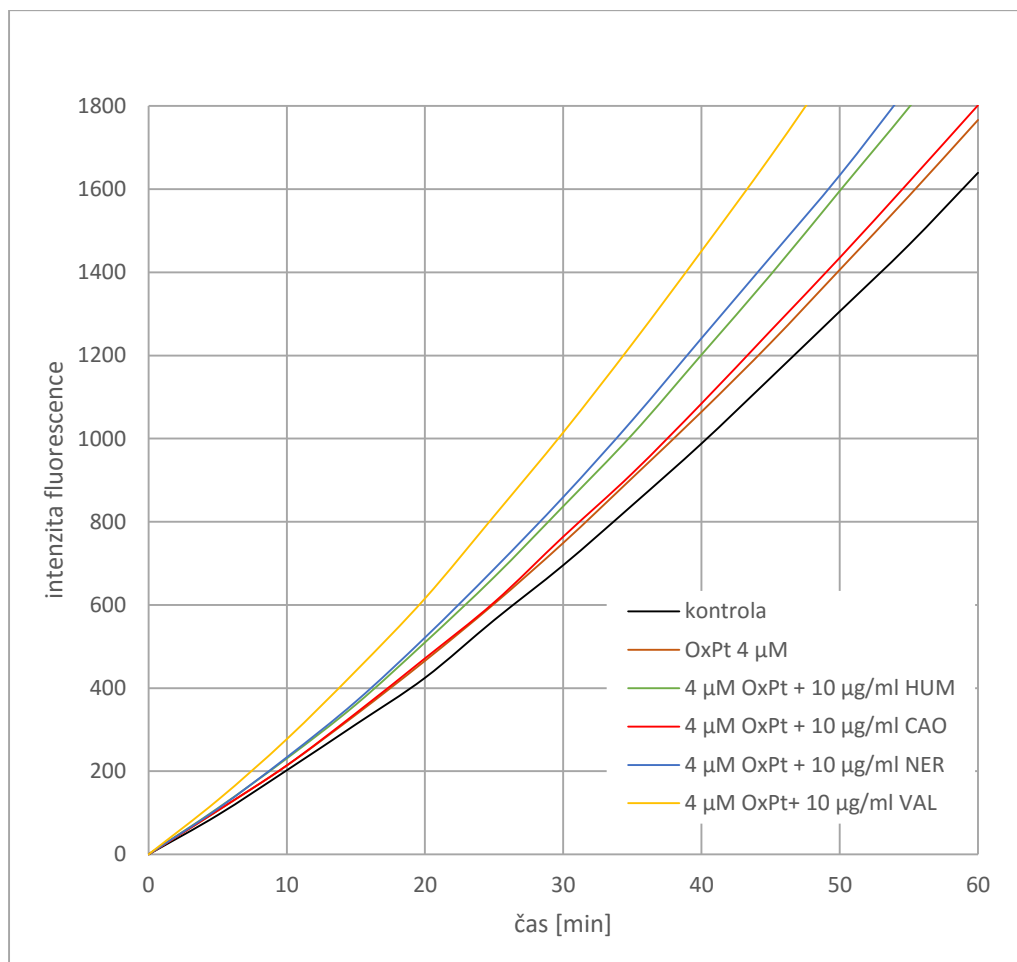
Při hodnocení účinku jednotlivých seskviterpenů na produkci ROS v buněčné linii Caco-2 byla u seskviterpenů CAO a NER prokázána antioxidační aktivita. HUM a VAL tvorbu ROS příliš neovlivnily (viz obr. 30).

Následně byl porovnáván vliv na produkci ROS v Caco-2 buněčné linii samotné OxPt o koncentracích 0,5 a 4 µM a kombinací OxPt s jednotlivými seskviterpeny o koncentracích 10 µg/ml.



Obr. 31 Porovnání účinku samotné OxPt a kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny na produkci ROS v buněčné linii Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 12-hodinové inkubaci metodou DCF.

Kombinace OxPt s VAL vykazovala jasné zvýšení pro-oxidačního působení v buněčné linii Caco-2 oproti pro-oxidačnímu působení samotné OxPt. Kombinace OxPt s CAO vykazovala spíše antioxidační působení na buňky. Kombinace OxPt s NER neměla na produkci ROS téměř žádný vliv (viz obr. 31), v porovnání se samotným NER došlo v kombinaci s OxPt k vymizení jeho antioxidačních vlastností.



Obr. 32 Porovnání účinku samotné OxPt a kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny na produkci ROS v buněčné linii Caco-2. Buňky byly vyhodnoceny po 12-hodinové inkubaci metodou DCF.

Kombinace OxPt o koncentraci 4 μM s jednotlivými seskviterpeny (10 $\mu\text{g/ml}$) prokázala jasné zvýšení pro-oxidační aktivity v buněčné linii Caco-2 oproti působení samotné OxPt. Jediná kombinace OxPt s CAO vykazovala téměř stejné pro-oxidační působení jako samotná OxPt (viz obr. 32). Z grafů lze předpokládat, že potenciační účinek seskviterpenů je závislý na koncentraci OxPt. Tato závislost je dobře viditelná u NER, který sám o sobě vykazoval spíše antioxidační vlastnosti, v kombinaci s OxPt a její zvyšující se koncentrací rostl i pro-oxidační účinek na buňky.

5.8 Zhodnocení vzájemného vlivu OxPt a seskviterpenů

Koncentrace OxPt a jednotlivých seskviterpenů byly vybrány v souladu s Chou-Talalay metodou. Ke kvantitativnímu zhodnocení společného působení OxPt a jednotlivých seskviterpenů na buňky byl použit kombinační index (CI) vypočtený v programu CalcuSyn. Podle zjištěných hodnot CI byl určen vztah OxPt a jednotlivých seskviterpenů. Dvě látky

na sebe mohou působit synergisticky ($CI < 1$), aditivním účinkem ($CI = 1$), či jsou ve vztahu antagonistickém ($CI > 1$) (Chou 2010).

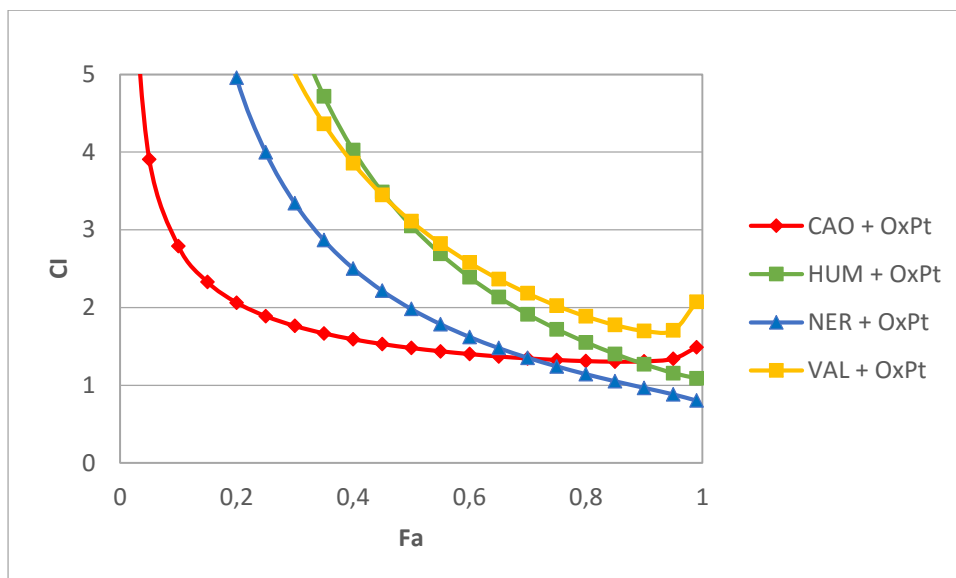
Hodnoty získané v CalcuSynu byly použity k vytvoření grafů závislosti kombinačních indexů (CI) na ovlivněných frakcích buněk (Fa). Fa je parametr popisující počet živých/mrtvých buněk v kombinačních studiích, kdy $Fa = 0$ indikuje stoprocentní životaschopnost buněk a $Fa = 1$ představuje stav, kdy jsou všechny buňky mrtvé (Chou 2006). Důležité je zdůraznit, že synergismus protinádorových látek je pro terapii výhodnější při $Fa > 0,8$ (Chou 2010). Dále byly z CalcuSynu získány IC_{50} jednotlivých látek.

Tab. 5 Kvantitativní zhodnocení společného působení OxPt a jednotlivých seskviterpenů pomocí kombinačního indexu (CI) vypočteného v programu CalcuSyn (převzato z Chou, 2008).

CI	Popis
< 0,1	velmi silný synergismus
0,1 - 0,3	silný synergismus
0,3 - 0,7	synergismus
0,7 - 0,85	mírný synergismus
0,85 - 0,9	nepatrný synergismus
0,9 - 1,1	téměř aditivní
1,1 - 1,2	nepatrný antagonismus
1,2 - 1,45	mírný antagonismus
1,45 - 3,3	antagonismus
3,3 - 10	silný antagonismus
> 10	velmi silný antagonismus

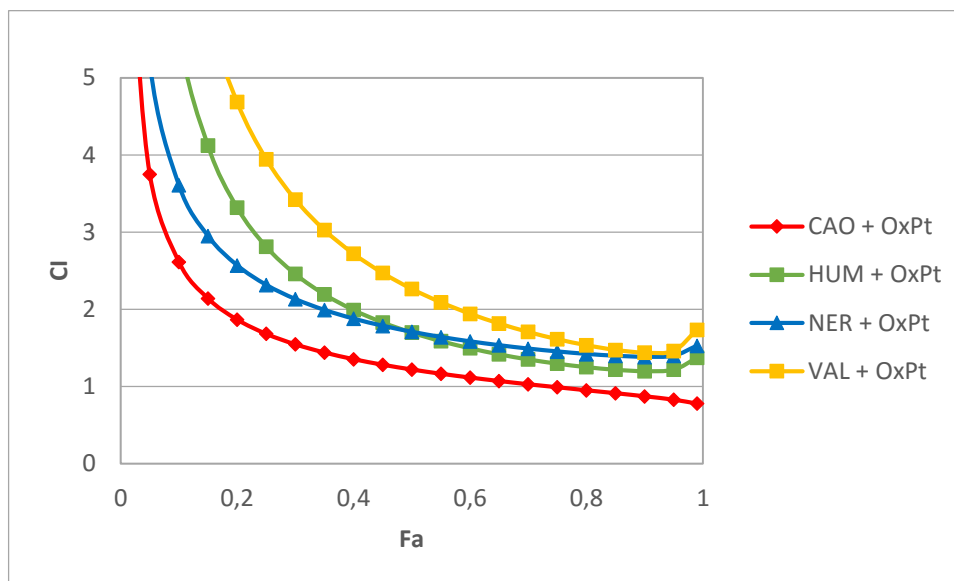
5.8.1 SW-620

OxPt a jednotlivé seskviterpeny byly kombinovány ve fixním koncentračním poměru 1:5.



Obr. 33 Kombinační indexy (CI) OxPt a jednotlivých seskviterpenů v závislosti na ovlivněné frakci buněk SW-620 (Fa). Hodnoty byly získány po 48-hodinové inkubaci buněk s OxPt a seskviterpeny.

Podle Tab. 1 a hodnot z grafu (viz obr. 33) je patrné, že VAL, HUM a CAO vykazovaly spíše antagonistický efekt s OxPt v buněčné linii SW-620 po 48-hodinové inkubaci. NER s OxPt vykazoval mírně aditivní účinek na antiproliferační aktivitu OxPt.

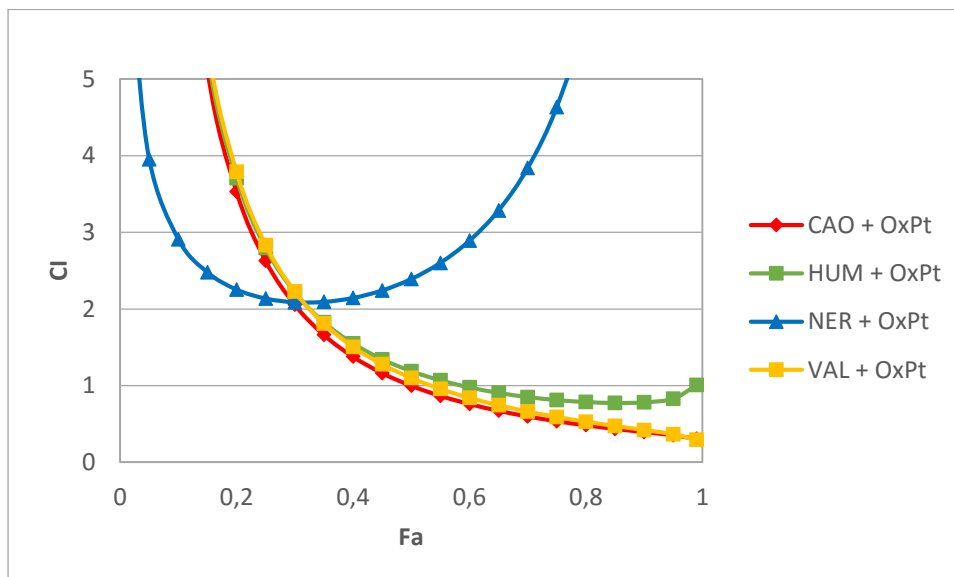


Obr. 34 Kombinační indexy (CI) OxPt a jednotlivých seskviterpenů v závislosti na ovlivněné frakci SW-620 buněk (Fa). Hodnoty byly získány po 72-hodinové inkubaci buněk s OxPt a seskviterpeny.

Podle Tab. 5 a hodnot z grafu (viz obr. 34) je patrný mírný antagonistický účinek VAL a NER s OxPt v buněčné linii SW-620 po 72-hodinové inkubaci. Mírný aditivní účinek byl naměřen u HUM s OxPt a téměř aditivní účinek vykazuje s OxPt CAO.

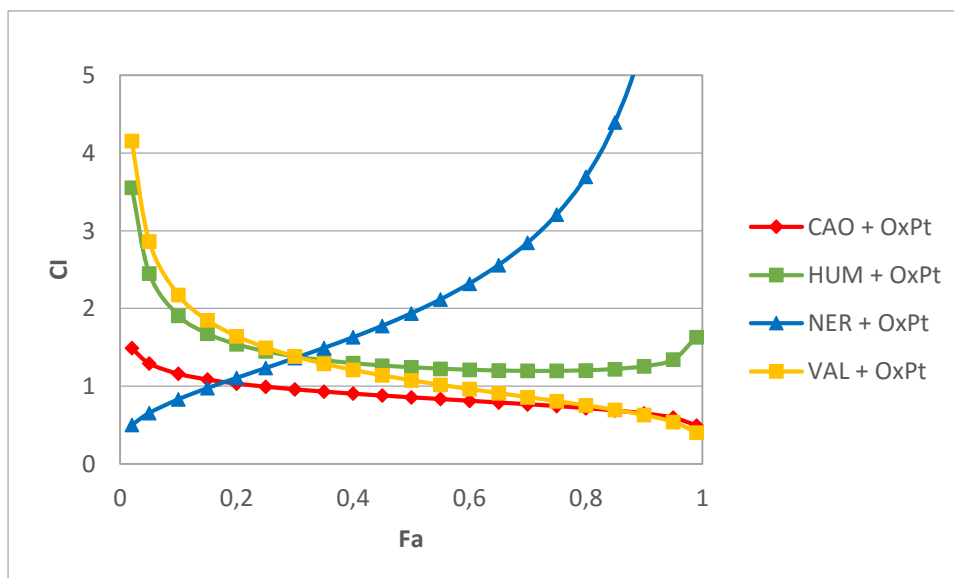
5.8.2 Caco-2 proliferující

Koncentrace OxPt a jednotlivých seskviterpenů byly zadávány do CalcuSynu v poměru 1:25.



Obr. 35 Kombinací indexy (CI) OxPt a jednotlivých seskviterpenů v závislosti na ovlivněné frakci Caco-2 buněk (Fa). Hodnoty byly získány po 48-hodinové inkubaci buněk s OxPt a seskviterpeny.

Podle Tab. 5 a hodnot z grafu (viz obr. 35) je patrný u VAL a CAO s OxPt jasný synergistický účinek v buněčné linii Caco-2 po 48-hodinové inkubaci. Mírnější synergismus vykazuje HUM s OxPt. Naopak NER s OxPt má jednoznačný antagonistický účinek.



Obr. 36 Kombinací indexy (CI) OxPt a jednotlivých seskviterpenů v závislosti na ovlivněné frakci Caco-2 buněk (Fa). Hodnoty byly získány po 72-hodinové inkubaci buněk s OxPt a seskviterpeny.

Podle Tab. 5 a hodnot z grafu (viz obr. 36) je patrný u VAL a CAO s OxPt synergický účinek v buněčné linii Caco-2 po 72-hodinové inkubaci, je však o něco slabší než po

48-hodinové inkubaci buněk. HUM vykazuje spíše aditivní účinek na antiproliferační aktivitu OxPt. NER s OxPt má jednoznačný antagonistický účinek při vysokých hodnotách F_a , při velmi nízkých hodnotách F_a vykazuje však účinek synergický s OxPt.

6 Diskuze

Kolorektální karcinom je jedním z nejrozšířenějších nádorových onemocnění ve světě (web 4) a je často diagnostikován v pozdních stádiích, která vyžadují chemoterapeutickou léčbu. Oxaliplatina patří mezi nejvýznamnější látky používané při standardní chemoterapeutické léčbě kolorektálního karcinomu. Úspěšný výsledek chemoterapeutické léčby je však omezen nežádoucími účinky OxPt na zdravou tkáň a vznikem rezistence nádorových buněk na terapii (Alcindor a Beauger 2011).

Snahou výzkumu je tedy nalézt způsob, který by zvýšil efektivitu OxPt ve smyslu možného snížení terapeutických dávek, kdy dávka OxPt bude dostatečně účinná na buňky karcinomu, ale omezí se její nežádoucí účinky na zdravou tkáň. Jednou z možností je právě kombinace OxPt s přírodními látkami, které mají minimální vliv na zdravou tkáň, ale mohou různými způsoby podpořit účinnost „klasických“ chemoterapeutik.

Potenciační účinek seskviterpenů na antiproliferační aktivitu doxorubicinu byl prokázán ve studii Ambrože a kol. (2015). Ovlivnění antiproliferačního a pro-oxidačního účinku DOX seskviterpeny izolovanými z *Myrica rubra* bylo testováno na buněčné linii Caco-2. Všechny testované seskviterpeny (HUM, VAL, NER, CAO) inhibovaly proliferaci Caco-2 buněk a přitom neovlivňovaly viabilitu hepatocytů, jakožto modelu nenádorových zdravých buněk. CAO, NER a VAL potencovaly účinek klasického chemoterapeutika doxorubicinu zvýšením jeho akumulace v buňkách nádoru. CAO a VAL zvyšovaly pro-oxidační působení DOX na nádorové buňky (Ambrož et al. 2015).

Ve studii Kima a kol. (2014) CAO potencoval apoptózu navozenou široce používanými chemoterapeutiky, jako je paklitaxel a doxorubicin, v buňkách lidského mnohočetného myelomu a rakovinných buňkách prostaty (Kim et al. 2014). CAO používaný v kombinační terapii může též významně potencovat apoptotické účinky různých farmakologických inhibitorů PI3K/AKT (Park et al. 2011).

Kombinace OxPt se seskviterpenem laktonelem parthenolidem byla testována ve studii Fang a kol. (2010), kde díky parthenolidu, přírodního inhibitoru NF- κ B, bylo možné snížit dávky OxPt testované na buňkách lidského adenokarcinomu plic (A549) (Fang et al. 2010). Kombinační terapií lze také minimalizovat riziko vzniku rezistence na léčbu (Prakash et al. 2013, Arango et al. 2004).

Hlavním cílem naší studie bylo zjistit, jak přírodní látky seskviterpeny, konkrétně HUM, VAL, CAO a NER, ovlivňují antiproliferační účinek cytostatika OxPt v buněčných liniích kolorektálního karcinomu SW-620 a Caco-2. V buněčné linii Caco-2 byl také zkoumán vliv

těchto seskviterpenů na pro-oxidační působení OxPt jako jeden z možných mechanismů zvýšení antiproliferačního působení OxPt na nádorové buňky.

Protinádorové účinky seskviterpenů byly zkoumány v různých studiích (Huang et al. 2012, Modzelewska et al. 2005). Nejčastějším mechanismem podílejícím se na jejich protinádorovém působení byla indukce apoptózy, zásah do buněčného cyklu, inhibice proliferace a angiogeneze (Kim et al. 2014, Park et al. 2011).

CAO se může podílet na zvýšení nebo indukci apoptózy různými mechanismy, například aktivací některých signalizačních proteinů (ERK, JNK, p38, MAPK) v buňkách karcinomu nebo může dojít působením CAO ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu a zvýšení produkce ROS v nádorových buňkách, čímž je indukována apoptóza. CAO dále snižuje expresi genových produktů, které zprostředkovávají buněčnou proliferaci (cyklin D1), přežití (bcl-2, bcl-xL, survivin, IAP-1 a IAP-2), metastazování (COX-2), angiogenezi (VEGF) a zvyšuje expresi *p53* a *p21* (Johnston 2009, Park et al 2011).

Kim et al. (2014) předpokládá, že inhibice NF- κ B je jedním z hlavních mechanismů účinku, kterými CAO potencuje TNF- α -indukovanou apoptózu a potlačuje invazi buněk.

V našich experimentech na buňkách kolorektálního karcinomu SW-620 a Caco-2 všechny testované seskviterpeny (HUM, VAL, CAO, NER) vykazovaly antiproliferační aktivitu na obě buněčné linie, zejména při vyšších koncentracích. Buněčná linie Caco-2 byla více citlivá na působení seskviterpenů i OxPt a při dalších experimentech tak mohly být použity nižší koncentrace testovaných látek u linie Caco-2 než u SW-620. Buněčná linie SW-620 vykazovala rozdílnou citlivost na jednotlivé seskviterpeny. Seskviterpeny CAO a NER vykazovaly vyšší citlivost než HUM a VAL, proto byly v kombinačních studiích používány dvě různé koncentrační řady OxPt a seskviterpenů. Každý experiment byl prováděn vždy třikrát a do grafů byly zaznamenávány průměry těchto získaných hodnot. Vysoké směrodatné odchylky ukazují, že výsledky získané v jednotlivých měřeních se značně lišily. Příčinou mohlo být vysrážení seskviterpenů z roztoku, zvláště při vysokých koncentracích (nad 100 μ g/ml), kdy byly seskviterpeny hůře rozpustné v DMSO či v ethanolu a následně v médiu. Odchylky v měření mohly být také způsobeny rozdílnou fází buněčného cyklu buněk při jejich ovlivňování. Při experimentech je důležité, aby destičky byly vždy buňkami stejně porostlé a ovlivňování buněk by mělo proběhnout ve fázi růstu, protože buňky, které se nedělí, vykazovaly nízkou citlivost na ovlivnění, což je patrné na diferencované buněčné linii Caco-2.

V kombinační studii na buněčné linii SW-620 byl prokázán nejvyšší potenciační účinek CAO na antiproliferační aktivitu OxPt a to po 48- i 72-hodinové inkubaci. Vyhodnocení

vzájemného vztahu OxPt a jednotlivých seskviterpenů programem CalcuSyn neukázalo u žádné kombinace synergický účinek. Naopak u kombinací VAL a NER s OxPt byl zjištěn spíše antagonistický vztah těchto látek po 72-hodinové inkubaci v buněčné linii SW-620.

U Caco-2 buněčné linie byla antiproliferační aktivita seskviterpenů a OxPt hodnocena dvěma různými metodami. Výsledky získané metodou měření NRU se lišily od výsledků naměřených metodou MTT, zřejmě to souviselo s různými principy těchto metod. Metoda NRU se zdála být citlivější. V buněčné linii Caco-2 po 48- a 72-hodinové inkubaci vykazoval HUM nejvyšší potenciační účinek na antiproliferační aktivitu OxPt. Testováním vzájemného vztahu VAL s OxPt a CAO s OxPt byl prokázán jasný synergický účinek po 48-hodinové inkubaci v buněčné linii Caco-2, synergické působení po 72-hodinové inkubaci bylo o něco slabší. Mírnější synergismus vykazoval HUM s OxPt po 48-hodinové inkubaci. Naopak u kombinace NER s OxPt byl zjištěn jednoznačný antagonistický účinek po 48-hodinové inkubaci. Po 72-hodinové inkubaci vykazoval NER s OxPt jednoznačný antagonistický účinek jen při vysokých hodnotách F_a , při velmi nízkých hodnotách F_a vykazoval s OxPt účinek synergický.

Z výsledků sledování tvorby ROS vlivem seskviterpenů a OxPt bylo zjištěno, že synergismus OxPt a VAL v antiproliferační aktivitě hodnocené na buňkách Caco-2 by mohl být založen na zvýšené produkci ROS v nádorových buňkách. Mírné zvýšení pro-oxidačního působení, které by mohlo také souviset se synergickým působením v antiproliferační aktivitě, bylo zaznamenáno u kombinace OxPt s HUM. Synergismus OxPt s CAO pozorovaný v antiproliferační aktivitě zřejmě souvisí se zvýšenou produkcí ROS jen málo a to až při vysokých koncentracích OxPt (4 μ M). NER s OxPt jsou spíše ve vzájemném antagonistickém vztahu, ačkoliv při vysokých koncentracích OxPt vykazoval zvýšení pro-oxidačního působení OxPt na buňky Caco-2.

Na základě získaných výsledků můžeme předpokládat, že jedním z mechanismů, kterými seskviterpeny potencují antiproliferační aktivitu OxPt, je právě schopnost některých seskviterpenů zvýšit v kombinaci s OxPt produkci ROS v nádorových buňkách.

Pro-oxidační působení OxPt, které bylo v našem experimentu sledováno na buněčné linii Caco-2, se na buňkách projevilo až při vysoké koncentraci OxPt (4 μ M). Kombinací seskviterpenů s OxPt byla snaha zvýšit pro-oxidační působení OxPt, aby bylo možné snížit terapeutické dávky OxPt a snížit tak její nežádoucí účinky na zdravou tkáň.

Pro-oxidační účinek seskviterpenů by mohl být selektivně cytotoxický na buňky nádoru, zatímco normální tkáň by mohla mít zachovanou či zvýšenou antioxidační ochranu. Toto selektivní pro-oxidační působení seskviterpenů v nádorových buňkách již bylo v literatuře

popsáno a mohlo by být způsobeno rozdílnými hodnotami bazálního redoxního potenciálu v rakovinných buňkách a buňkách normální tkáně. Vyšší hladiny iontů kovů a zvýšená endogenní produkce ROS v rakovinných buňkách vyvolává adaptaci intracelulárního redoxního potenciálu na trvalý oxidační stres, což vede k zvýšené potřebě glutathionu (GSH) a dalších antioxidačních molekul. Nicméně toto zvýšení bazální hladiny ROS činí rakovinné buňky ve vysoké míře závislé na antioxidačních systémech jako je GSH. Rakovinné buňky jsou pak daleko citlivější na působení exogenních zdrojů ROS a na inhibici těchto antioxidačních systémů než buňky normální tkáně, které mají nižší intracelulární redoxní potenciál a jsou schopné určité zvýšení produkce ROS díky antioxidačního systému tolerovat (Alexandre et al. 2009).

Tímto způsobem by mohla být zajištěna selektivní cytotoxicita pro-oxidačního působení seskviterpenů na nádorové buňky a díky této vlastnosti se jeví jako látky vhodné pro terapeutické použití v léčbě rakoviny, nejlépe v kombinační terapii s léky vyvolávajícími tvorbu nebo hromadění ROS v nádorových buňkách (Lee et al. 2013, Alexandre et al. 2009).

Toto selektivní pro-oxidační působení některých seskviterpenů na nádorové buňky bylo mimo jiné potvrzeno i předešlou studií Ambrože a kol. (2015). Testované seskviterpeny izolované ze silice *Myrica rubra*, konkrétně β -karyofylen, CAO, HUM, NER a VAL vykazovaly na hepatocyty mírný antioxidační účinek, zatímco na buňky kolorektálního karcinomu Caco-2 působil CAO a VAL výrazně pro-oxidačně.

Schopnost seskviterpenů zvýšit pro-oxidační působení OxPt na buňky Caco-2 však nebude jediný mechanismus, kterým tyto látky mohou potencovat aktivitu OxPt. Odhalení dalších možných mechanismů bude předmětem další studie. Kombinace seskviterpenů a OxPt by mohla být prospěšná chemoterapeutická strategie pro pacienty, kteří netolerují závažné nežádoucí účinky OxPt v terapeutických koncentracích. Pro jejich možné použití v terapii je však nutné tyto látky dále hlouběji zkoumat.

7 Závěr

- OxPt vykazovala antiproliferační aktivitu s hodnotami $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ po 48-hodinové inkubaci a $IC_{50} = 17 \mu\text{M}$ po 72-hodinové inkubaci u buněčné linie SW-620. V proliferujících buňkách Caco-2 byly naměřeny hodnoty $IC_{50} = 1,2 \mu\text{M}$ po 48-hodinové inkubaci a $IC_{50} = 1,9 \mu\text{M}$ po 72-hodinové inkubaci. Buňky, které se nedělí (diferencované buňky Caco-2), vykazovaly nízkou citlivost na OxPt.
- Všechny testované seskviterpeny (HUM, VAL, CAO, NER) vykazovaly dávkově závislou antiproliferační aktivitu na obě buněčné linie, zejména při vyšších koncentracích. Buněčná linie Caco-2 byla více citlivá na působení seskviterpenů i OxPt.
- Největší antiproliferační aktivita v buněčné linii SW-620 byla zjištěna u CAO po 48-hodinové inkubaci ($IC_{50} = 28 \mu\text{g/ml}$) a po 72-hodinové inkubaci ($IC_{50} = 49 \mu\text{g/ml}$).
- Největší antiproliferační aktivita v buněčné linii Caco-2 byla zjištěna u NER po 48-hodinové inkubaci ($IC_{50} = 21 \mu\text{g/ml}$) a u HUM po 72-hodinové inkubaci ($IC_{50} = 27 \mu\text{g/ml}$).
- U buněčné linie SW-620 nebyl prokázán u žádné kombinace OxPt s jednotlivými seskviterpeny synergický účinek. Naopak u kombinací VAL a NER s OxPt byl zjištěn spíše antagonistický vztah těchto látek.
- Jasný synergický účinek byl prokázán v buněčné linii Caco-2 u kombinace VAL s OxPt a CAO s OxPt. Mírnější synergismus vykazoval HUM s OxPt. Naopak u kombinace NER s OxPt byl zjištěn antagonistický účinek.
- Pro-oxidační aktivita OxPt v buněčné linii Caco-2 byla prokázána až při koncentraci OxPt $4 \mu\text{M}$. Nižší testované koncentrace OxPt ($0,5$ a $1 \mu\text{M}$) produkci ROS neovlivnily.
- Při hodnocení účinku jednotlivých seskviterpenů ($10 \mu\text{g/ml}$) na produkci ROS v buněčné linii Caco-2 byla u seskviterpenů CAO a NER prokázána antioxidační

aktivita. HUM a VAL tvorbu ROS příliš neovlivnily.

- Seskviterpeny HUM, VAL a NER (10 µg/ml) prokazatelně zvýšily pro-oxidační působení OxPt (4 µM) v buněčné linii Caco-2.

8 Seznam zkratek

- 5-LOX – lipoxygenasa
AKT – proteinkinasa B
AP-1 – aktivační protein 1
APC – Adenomatous polyposis coli
ARE – antioxidant response element
ATCC – American Tissue Cell Collection – Americká sbírka tkáňových kultur
CAO – karyofylen-oxid
CAO – karyofylen-oxid
COX-2 – cyklooxygenasa 2
CRC – kolorektální karcinom
CYP – cytochrom P450
DCC – Deleted in colorectal cancer
DCF – 2',7'-dichlorofluorescein
DMEM – Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO – dimethylsulfoxid
EDTA – ethylendiamintetraoctová
EMEM – Eagle`s Minimum Essential Medium
FADD – Fas-Associated Protein with Death Domain
FBS – Fetální hovězí sérum
GSH – glutathion
HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HMGB1 – mediátor prozánětlivých cytokinů
HO-1 – hemoxygenasa-1
HUM – α -humulen
IL-1 β – interleukin-1 β -
iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
K-ras – Kirstein rat sarcoma
LPS – lipopolysacharidy
MAPK – mitogen-activated protein kinase
MDA – malondialdehyd
MMR – methyl-directed mismatch repair systém
mTOR – Mammalian Target of Rapamycin

MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NEAA – roztok neesenciálních aminokyselin
NER – *trans*-nerolidol
NF- κ B – nukleární faktor kappa B
NO – oxid dusnatý
Nrf2 – nuclear factor erythroid-2-related factor 2
NRU – test neutrální červení
PBS – fosfátový pufr
pen – penicilin
PGE2 – prostaglandin E2
PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza
ROS – Reactive Oxygen Species
S6K1 – S6 kinasa 1
STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3
strep – streptomycin
T-E – trypsin s kyselinou ethylendianimotetraoctovou
TNF α – tumor nekrotizující faktor α
TOKS – test okultního krvácení do stolice
VAL – valencen
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
ZN – zhoubný nádor

9 Seznam použité literatury

Adam Z., Krejčí M. a Vorlíček J. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén. 2011. ISBN 978-80-7262-715-8.

Aggarwala B. B. Nuclear factor- κ B. *Cancer Cell*. 2004, vol. 6, iss. 3, s. 203-208.

Alcindor T. a Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*. 2011; vol. 18, iss. 1, s. 18-25.

Ambrož M., Boušová I., Skarka A., Hanušová V., Králová V., Matoušková P., Szotáková B. a Skálová L. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules*. 2015, vol. 20, iss. 8, s. 15343-15358.

Aoki K. a Taketo M. M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science*. 2007, vol. 120, iss. 19, s. 3327-3335.

Arango D., Wilson A. J., Shi Q., et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer*. 2004, vol. 91, iss. 11, s. 1931-1946.

Bártíková H., Hanušová V., Skálová L., Ambrož M., Boušová I. a Hogg N. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014, vol. 14, iss. 22, s. 37-49.

Becker H. D. *Chirurgická onkologie*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0720-9.

Bhanot A. a Sharma R. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International Journal of Phytomedicine* 3. 2011, s. 9-26.

Borges Dias R., De Faro Valverde L., Araújo Gurgel Rocha C. a Pereira Bezerra D. Principles of Cancer Pathogenesis and Therapies: A Brief Overview. *Bioactive Essential Oils and Cancer*. 2015, s. 1. ISBN 978-3-319-19143-0.

Brehm-Stecher B. F. a Johnson E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003, vol. 47, iss. 10, s. 3357-3360.

Bücher T. Systémová léčba kolorektálního karcinomu. *Klinická onkologie.* 2008, vol. 12, iss. 3, s. 13-16.

Bunz F., Hwang P. M., Torrance C., et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *Journal of Clinical Investigation.* 1999, vol. 104, iss. 3, s. 263-269.

Cornwell P. A. a Barry B. W. Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil, *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, vol. 46, s. 261–269.

Deorukhkar A., et al. Zerumbone increases oxidative stress in a thiol-dependent ROS-independent manner to increase DNA damage and sensitize colorectal cancer cells to radiation. *Cancer Medicine.* 2015, vol. 4, s. 278–292.

Ellis C. A. a Clark G. The importance of being K-Ras. *Cellular Signalling.* 2000, vol. 12, iss. 7, s. 425-434.

Fang L.-J., Shao X.-T., Wang S., Lu G.-H., Xu T. a Zhou J.-Y. Sesquiterpene Lactone Parthenolide Markedly Enhances Sensitivity of Human A549 Cells to Low-Dose Oxaliplatin via Inhibition of NF- κ B Activation and Induction of Apoptosis. *Planta Medica.* 2010, vol. 76, iss. 3, s. 258-264.

Fernandes E. S., Passos G. S., Medeiros R., Da Cunha F. M., Ferreira J., Campos M. M., Pianowski L. F. a Calixto J. B. 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, iss. 3, s. 228-236.

Ferreira F. M., Palmeira C. M., Oliveira M. M., Santos D., Simões A. M., Rocha S. M., Coimbra M. A. a Peixoto F. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicology in Vitro*. 2012, vol. 26, iss. 2, s. 189-196.

Garg A. a Aggarwal B. Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development. *Leukemia*. 2002, vol. 16, iss. 6, s. 203-208.

Gould G. W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of food protection*. 1996, s. 82-86.

Hartl J. *Farmaceutická chemie IV. 2., nezměn. vyd.* Praha: Karolinum. 2012. ISBN 978-80-246-2129-6.

Holubec L. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby.* Praha: Grada. 2004, 175 s. ISBN 80-247-0636-9.

Hrabálek A., Doležal P., Šklubalová Z., Farsa O. a Krebs A. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická. 1999, vol. 93, iss. 2, s. 107-119.

Huang M., Lu J.-J., Huang M.-Q., Bao J.-L., Chen X.-P. a Wang Y.-T. Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2012, vol. 21, iss. 12, s. 1801-1818.

Hubík J., Dušek J. a Spilková J. *Farmakognosie: Díl 1, Obecná část a primární látky.* Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 1989.

Chappell J. *The Biochemistry and Molecular Biology of Isoprenoid Metabolism.* Plant Physiol. Plant Physiology and Biochemistry Program, University of Kentucky. 1995, vol. 107, s. 1-6.

Chavan M. J., Wakte P. S. a Shinde D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*. 2010, vol. 17, iss. 2, s. 149-151.

Cheng A.-X., Lou Y.-G., Mao Y.-B., Lu S., Wang L.-J. a Chen X.-Y. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007, vol. 49, iss. 2, s. 179-186.

Chou T.-Ch. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*. 2010, vol. 70, iss. 2, s. 440-446.

Chou T.-Ch. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leukemia & Lymphoma*. 2009, vol. 49, iss. 11, s. 2059-2080.

Chou T.-Ch. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*. 2006, vol. 58, iss. 3, s. 621-681.

Jin J. H., Lee D.-U., Kim Y. S. a Kim H.-P. Anti-allergic activity of sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. *Archives of Pharmacal Research*. 2011, vol. 34, iss. 2, s. 223-228.

Johnston R. D. S. Role signální dráhy mTOR u karcinomu prsu rezistentního na endokrinní léčbu – příležitost pro nové strategie kombinované léčby. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. 2009.

Kheirelseid E. A. H., Miller N. a Kerin M. J. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*. 2013, vol. 3, iss. 2, s. 72-80.

Kim Ch., Cho S. K., Kapoor S., et al. B-caryophyllene oxide inhibits constitutive and inducible STAT3 signaling pathway through induction of the SHP-1 protein tyrosine phosphatase. *Molecular Carcinogenesis*. 2014, vol. 53, iss. 10, s. 793-806.

Kim Ch., Cho S. K., Kim K.-D., et al. B-Caryophyllene oxide potentiates TNF α -induced apoptosis and inhibits invasion through down-modulation of NF- κ B-regulated gene products. *Apoptosis*. 2014, vol. 19, iss. 4, s. 708-718.

Kim K., Kim Y., Kim H. Y., Ro J. Y. a Jeoung D. Inhibitory mechanism of anti-allergic peptides in RBL2H3 cells. *European Journal of Pharmacology*. 2008, vol. 581, iss. 1-2, s. 191-203.

Klener P. *Klinická onkologie*. Praha: Galén. 2002. ISBN 80-7262-151-3.

Langdon S. P. *Studyguide for Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* by Simon P. Langdon. 2012. ISBN 9781588290793.

Lapczynski A., Bhatia S. P., Letizia C. S. a Api A. M. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*. 2008, vol. 46, issue 11.

Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A. a Madelmont J. C. Antitumor Activity of Balsam Fir Oil: Production of Reactive Oxygen Species Induced by α -Humulene as Possible Mechanism of Action. *Planta Medica*. 2003, vol. 69, iss. 5, s. 402-407.

Mahmoud N. Colorectal cancer. *BMJ Best Practice*. 2015, vol. 77.

Marques A. M., Barreto A. L. S., Curvelo J. A. Da R., Romanos M. T. V., Soares R. M. De A. a Kaplan M. A. C. Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011, vol. 21, iss. 5, s. 908-914.

McGinty D., Letizia C. S. a Api A. M. Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*. 2010, vol. 48, s. 43-45.

Medeiros R., Passos G. F., Vitor C. E., Koeppe J., Mazzuco T. L., Pianowski L. F., Campos M. M. a Calixto J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*. 2007, vol. 151, s. 618–627.

Ministerstvo zdravotnictví České republiky: *Český lékopis 2009*, Grada. 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.

Mladěnka P. Přednáška Cílená protinádorová farmakoterapie. Hradec Králové. 2014b.

Modzelewska A., Sur S., Kumar S. K. a Khan S. R. Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005, vol. 5, iss. 5, s. 477-499.

Oh M.-S., Yang J.-Y., Kim M.-G. a Lee H.-S. Acaricidal activities of β -caryophylleneoxide and structural analogues derived from *Psidium cattleianum* oil against house dust mites. *Pest Management Science*. 2014, vol. 70, iss. 5, s. 757-762.

Orlowski R. Z. a Baldwin A. S. NF- κ B as a therapeutic target in cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2002, vol. 8, iss. 8, s. 385-389.

Owusu-Ansah E., Yavari A. a Banerjee U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. *Protocol Exchange*. 2008.

Park K.-R., Nam D., Yun H.-M., Lee S.-G., Jang H.-J., Sethi G., Cho S. K. a Ahn K. S. β -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, iss. 2, s. 178-188.

Park M. J., Gwak K. S., Yang I., Kim K. W., Jeung E. B., Chang J. W. a Choi I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*. 2009, vol. 80, iss. 5, s. 290-296.

Parkin D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*. 2006, vol. 118, iss. 12, s. 3030-3044.

Passos G. F., Fernandes E. S., Campos M. M., et al. Kinin B1 Receptor Up-Regulation after Lipopolysaccharide Administration: Role of Proinflammatory Cytokines and Neutrophil Influx. *The Journal of Immunology*. 2004, vol. 172, iss. 3, s. 1839-1847.

Peč J. a Dušek J. Konopí, konopná droga a související léčivé přípravky. *Praktické lékárenství*. 2009, vol. 5, iss. 4, s. 189–193.

Prakash O., Kumar A., Kumar P. a Ajeet. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *American Journal of Pharmacological Sciences*. 2013, vol. 1, iss. 6, s. 104-115.

Rakitina T. V., Vasilevskaya I. A. a O'dwyer P. J. Additive interaction of oxaliplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines results from inhibition of nuclear factor kappaB signaling. *Cancer Res*. 2003, vol. 63, s. 8600–8605.

Repetto G., Del Peso A. a Zurita J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008, vol. 3, iss. 7, s. 1125-1131.

Roesslein M., Hirsch C., Kaiser J.-P., Krug H. a Wick P. Comparability of in Vitro Tests for Bioactive Nanoparticles: A Common Assay to Detect Reactive Oxygen Species as an Example. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, vol. 14, iss. 12, s. 24320-24337.

Rogerio A. P., Andrade E. L., Leite D. F. P., Figueiredo C. P. a Calixto J. B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacolog*. 2009, vol. 158, iss. 4, s. 1074-1087.

Sain S., Naoghare P., Devi S., Daiwile A., Krishnamurthi K., Arrigo P. a Chakrabarti T. Beta Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, Isolated from *Aegle Marmelos*, as the Potent Anti-inflammatory Agents against Lymphoma and Neuroblastoma Cells. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 2014, vol. 13, iss. 1, s. 45-55.

Sánchez-Mendoza M. E., et al. Gastroprotective activity of caryophyllene oxide: the role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014, vol. 4, iss. 9, s. 1-5.

Schneiderová M. a Bencko V. Kolorektální karcinom – současný pohled na rizikové a protektivní faktory, možnosti prevence. *Onkologie*. 2015, vol. 9, iss. 4, s. 178–182.

Silva M., Oliveira G., De Carvalho R., De Sousa D., Freitas R., Pinto P. a Moraes J. Antischistosomal Activity of the Terpene Nerolidol. *Molecules*. 2014, vol. 19, iss. 3, s. 3793-3803.

Skowroń J. a Zapór L. Cytotoxicity of Resorcinol Under Short- and Long-Term Exposure in Vitro. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*. 2015, vol. 10, iss. 2, s. 147-156.

Sochor J., Eckschlager T., Adam V., Stiborová M. a Kizek R. Antioxidační aktivita u nádorových buněk, vliv cytostatika na oxidační status. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. 2011.

Sochor J., Gumulec J., Masařík M., Adam V. a Kizek R. Vliv platinových cytostatik na oxidační stres a životnost buněk. In VII. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. 2011.

Stewart B. W. a Wild C. P. World cancer report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2014. ISBN 978-92-832-0429-9.

Suchánek Š., Vepřeková G., Májek O., Dušek L. a Zavoral M. Epidemiologie, etiologie, screening a diagnostika kolorektálního karcinomu, včetně diagnosticko-terapeutických zákroků na tlustém střevě. *Onkologie*. 2011, vol. 5, iss.5, s. 261–265.

Testa J. R. a Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, vol. 98, iss. 20, s. 10983-10985.

Toshiyuki M. a Reed J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995, vol. 80, iss. 2, s. 293-299.

Tsoyi K., Jang H. J., Lee Y. S., et al. (+)-Nootkatone and (+)-valencene from rhizomes of *Cyperus rotundus* increase survival rates in septic mice due to heme oxygenase-1 induction. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, vol. 137, iss. 3, s. 1311-1317.

Tsujimura T., Furitsu T., Morimoto M., Kanayama Y., Nomura S., Matsuzawa Y., Kitamura Y. a Kanakura Y. Substitution of an Aspartic Acid Results in Constitutive Activation of c-kit Receptor Tyrosine Kinase in a Rat Tumor Mast Cell Line RBL-2H3. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1995, vol. 106, iss. 4, s. 377-385.

Tung Y.-T., Chua M.-T., Wang S.-Y. a Chang S.-T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, iss. 9, s. 3908-3913.

Viklický O., Janoušek L. a Baláž P. *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Praha: Grada. 2008, s. 380. ISBN 978-80-247-2455-3.

Vinholes J., Rudnitskaya A., Gonçalves P., Martel F., Coimbra M. A. a Rocha S. M. Hepatoprotection of sesquiterpenoids: A quantitative structure–activity relationship (QSAR) approach. *Food Chemistry*. 2014, vol. 146, s. 78-84.

Williams A. C. a Barry B. W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, vol. 64, s. 128-137.

Wink M. Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine. *Current Drug Metabolism*. 2008, vol. 9, iss. 10, s. 996-1009.

Yu-Hsuan L., Yang-Chang W., Kai-Wei W., Jing-Gung Ch., Chi-Cheng W., Yuan-Liang Ch., Tian-Shung W. a Jai-Sing Y. Death receptor 5-mediated TNFR family signaling pathways modulate γ -humulene-induced apoptosis in human colorectal cancer HT29 cells. *Oncology Reports*. 2011, vol. 25, iss. 2.

web 1 Cancer. World Health Organization [online]. 2015 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

web 2 Cílená biologická léčba. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [online]. ČOS ČLS JEP, 2016 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/databaze-onkologickych-leciv/cilena-biologicka-lecba/>

web 3 World Health Organization [online]. 2015 [cit. 2015-12-01]. Dostupné z: <http://www.who.int/en/>

web 4 Globocan 2012. [online]. [cit. 2015-09-11]. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

web 5 Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. [online]. [cit. 2015-09-10]. Dostupné z: <http://www.svod.cz/?sec=analyzy>

web 6 Zavoral M., Grega T., Vojtěchová G. a Suchánek Š. Screening kolorektálního karcinomu. In: Postgraduální medicína [online]. 2014 [cit. 2015-12-01]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/screening-kolorektalniho-karcinomu-476638>

web 7 Colorectal Cancer. In: American Cancer Society [online]. 2014, 08/13/2015 [cit. 2015-12-01]. Dostupné z: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf>

web 8 Hofmanová J. Prevence, diagnostika a léčba nádorových onemocnění. Genotoxicita a karcinogeneze [online]. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2012–2013 [cit. 2015-12-01]. Dostupné z: http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/16_prevence.html

web 9 Dušek, L., Zavoral, M., Májek, O., Suchánek, Š., Mužík, J., Pavlík, T., Šnajdrová, L., Gregor, J. Kolorektum.cz – Program kolorektálního screeningu v České republice [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2015. [cit. 2015-12-01]. Dostupný z: <http://www.kolorektum.cz>

web 10 Sigma-Aldrich. [online]. [cit. 2016-2-28]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/>

web 11 ATCC: The Global Bioresource Center [online]. ATCC, 2014 [cit. 2015-12-02]. Dostupné z: http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=cz

web 12 Vejražka M. Buněčné kultury [online], Poslední revize 26.9.2007. [cit. 26-8-2015] Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>