

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**PŮSOBENÍ TRANS-NEROLIDOLU A VALENCENU NA OVARIÁLNÍ
NÁDOROVÉ BUŇKY**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2016

Bc. Martina Zajdlová

Prohlášení

„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

Poděkování

Chtěla bych poděkovat školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za její odborné rady, trpělivost a připomínky. Dále děkuji doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za cenné rady a instrukce při plánování a vlastním provádění experimentů. Mé poděkování patří také Mgr. Martinu Ambrožovi za pomoc a podporu při provádění experimentů a dále za jeho zkušené rady při interpretaci výsledků. Děkuji také Mgr. Miloslavu Macháčkovi za ochotu při získávání mikroskopických fotografií buněk. Nakonec bych ráda poděkovala i všem ostatním pracovníkům katedry biochemických věd, kteří byli ochotní při vypracování této práce jakýmkoliv způsobem pomoci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Martina Zajdlová

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

Název diplomové práce: Působení trans-nerolidolu a valencenu na ovariální nádorové buňky

Trans-nerolidol a valencen patří mezi seskviterpeny, které představují velkou skupinu sekundárních metabolitů rostlin. V praxi se s nimi můžeme setkat v potravinářském nebo parfémovém průmyslu, tvoří ale také součást tradiční čínské medicíny. V poslední době jsou studovány biologické účinky seskviterpenů, které zahrnují např. účinky protizánětlivé nebo protinádorové. Doxorubicin je jedno z nejdůležitějších cytostatických léčiv a jsou studovány různé možnosti zlepšení jeho efektivity a snížení nežádoucích účinků. Jednou z těchto možností je kombinační terapie s přírodními látkami, např. ze skupiny seskviterpenů.

Cílem této práce bylo zhodnotit antiproliferační účinek doxorubicinu, trans-nerolidolu a valencenu na ovariální nádorové buněčné linie SK-OV-3 a A2780. Dále bylo cílem otestovat možný prooxidační potenciál doxorubicinu a terpenů, měřením produkce ROS. Pomocí výpočtu kombinačních indexů jsme zhodnotili vzájemný vztah mezi doxorubicinem a terpeny. Studovali jsme také možný vliv terpenů na zvýšení akumulace doxorubicinu do nádorových buněk a na jeho distribuci uvnitř buněk.

Výsledky prokázaly antiproliferační účinek doxorubicinu, trans-nerolidolu i valencenu. Citlivější ke všem testovaným látkám byla linie A2780. Ke zvýšení produkce ROS došlo vlivem doxorubicinu na linii SK-OV-3 a vlivem valencenu na linii A2780. Trans-nerolidol působil s doxorubicinem synergicky na obou buněčných liniích. Valencen působil synergicky pouze na linii A2780. Trans-nerolidol způsobil zvýšenou akumulaci doxorubicinu do buněk obou linií.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Martina Zajdlová

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

Title of diploma thesis: The effect of trans-nerolidol and valencene in ovarian cancer cells

Trans-nerolidol and valencene belong to sesquiterpenes, which present a large group of secondary plant metabolites. In practice, we can encounter them in the food or perfume industry. However, they are also used in traditional Chinese medicine. Recently, the biological activities of sesquiterpenes, which include e.g. anti-inflammatory or antineoplastic activities, were studied. Doxorubicin is one of the most important cytostatic drugs and various ways to improve its effectiveness and reduce side effects are being studied. One such usage is in combination therapy with natural substances, e.g. with sesquiterpenes.

The aim of this study was to test antiproliferative effects of doxorubicin, trans-nerolidol and valencene on ovarian cancer cell lines SK-OV-3 and A2780. We also assayed the possible pro-oxidant potential of doxorubicin and terpenes by measuring the production of ROS. In addition, we evaluated the interaction between doxorubicin and terpenes by quantification of combination indexes. We also studied the possible effect of the terpenes on the accumulation of doxorubicin in cancer cells and its distribution within the cells.

Results showed the cytotoxic effects of doxorubicin, trans-nerolidol and valencene. Cell line A2780 was more sensitive to all tested substances. Doxorubicin in line SK-OV-3 and valencene in line A2780 increased ROS production. Trans-nerolidol acted synergistically with doxorubicin in both cell lines. Valencene had synergic effect only in line A2780. Trans-nerolidol increased the accumulation of doxorubicin in the cells of both lines.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Nádory vaječníků	9
2.1.1 Výskyt	9
2.1.2 Etiopatogeneze.....	10
2.1.3 Rizikové faktory vzniku	11
2.1.4 Prevence a diagnostika	12
2.1.5 Terapie.....	13
2.1.5.1 Chemoterapie	13
2.1.5.2 Cílená léčba	15
2.2 Seskviterpeny.....	17
2.2.1 Struktura a její vztah k účinku	17
2.2.2 Biologické účinky	20
2.2.2.1 Protizánětlivé účinky.....	20
2.2.2.2 Protinádorové účinky	21
2.2.3 Vztah seskviterpenů a ROS	23
2.2.4 Valencen.....	25
2.2.5 Trans-nerolidol.....	27
2.3 Doxorubicin	29
3. CÍL PRÁCE	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1 Materiál a chemikálie	32
4.2 Přístroje a zařízení.....	32
4.3 Buněčné linie	33
4.4 Metody.....	34
4.4.1 Rozmrazování buněčných linií	34
4.4.2 Pasážování buněk.....	34
4.4.3 Počítání buněk.....	35
4.4.4 Stanovení cytotoxicity pomocí Neutral Red Uptake (NRU) testu.....	36
4.4.5 Detekce ROS pomocí DCF testu	37
4.4.6 Příprava vzorku pro HPLC analýzu	38
4.4.7 HPLC analýza akumulace doxorubicinu	39
4.4.8 Stanovení kombinačního indexu.....	39
4.4.9 Fluorescenční mikroskopie.....	39

5.	VÝSLEDKY	40
5.1	Stanovení antiproliferační aktivity doxorubicinu	40
5.2	Stanovení antiproliferační aktivity valencenu a trans-nerolidolu	41
5.3	Prooxidační působení doxorubicinu a terpenů.....	44
5.4	Akumulace doxorubicinu	46
5.5	Kombinační index	48
5.6	Fluorescenční mikroskopie.....	50
6.	DISKUZE.....	51
7.	ZÁVĚR	54
8.	Seznam zkratk.....	55
9.	Seznam literatury.....	57

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění stále patří mezi hlavní příčiny úmrtí v ČR i ve světě. Z gynekologických nádorů představuje karcinom vaječníků onemocnění s nejvyšší úmrtností. Kvůli dlouhému asymptomatickému období a nesnadné diagnostice je u žen často objeven až v pozdních stádiích a prognóza je tak špatná. V léčbě se kromě klasické chemoterapie dnes již standardně využívá i moderní cílené terapie, přesto však dochází až u 70 % pacientek k recidivám (Povýšil & Šteiner, 2007; Majirsky et al., 2013; web 3). Dosavadní terapie se proto jeví jako neuspokojivá a je nutné hledat nové možnosti léčby nejen karcinomu vaječníků, ale i ostatních neméně závažných nádorových onemocnění.

Rostliny jsou bohatým zdrojem nových potenciálně účinných léčivých látek. Strukturní rozmanitost rostlinných látek vedla k celé řadě úspěšných objevů na poli vývoje léčiv. Jenom v oblasti protinádorových léčiv bylo v posledních letech až 50 % nově schválených léčivých látek přírodního původu (Huang et al., 2012). Například paklitaxel, který se původně získal z keře tisu krátkolistého (*Taxus brevifolia*), je dnes spolu s platinovými deriváty standardem v léčbě karcinomu vaječníků (web 3).

Mezi největší a nejrozmanitější skupinu přírodních látek patří terpeny, které jsou v rostlinách produkovány většinou jako tzv. sekundární metabolity. Slouží jako atraktanty pro opylovače nebo naopak jako ochrana rostliny. V silicích rostlin jsou nejvíce zastoupeny monoterpeny a seskviterpeny. Silice jsou často využívány v lidovém léčitelství nebo v tradiční čínské medicíně (Huang et al., 2012; Bártíková et al., 2014). Právě seskviterpenům je přisuzována celá řada biologických účinků včetně protizánětlivých, protinádorových, cytotoxických, antibakteriálních a dalších. Artemisinin, používaný v klinické praxi k léčbě malárie, je asi nejznámější látka ze skupiny seskviterpenů (Irmgard M, 2011).

Doxorubicin patří mezi vůbec nejdůležitější protinádorová léčiva. Jeho efektivita ale není vždy dostatečná a zvýšení dávek vede k závažné kardiotoxicitě. Proto je potřeba hledat nové možnosti zlepšení jeho efektivity a zároveň omezení toxického působení (Hanušová et al., 2011). Nadějnou strategií by mohla být kombinace doxorubicinu s přírodními látkami, například právě ze skupiny seskviterpenů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nádory vaječníků

Nádory ovarii vznikají v různých částech vaječníků a z hlediska histologie se rozdělují na tři typy: nádory vycházející z povrchového epitelu ovaria, nádory z germinálních buněk a nádory z ovariálního stromatu. Nádory z povrchového (tzv. mülleriánského) epitelu představují asi 70 – 90 % všech nádorů vaječníků a dají se dále rozdělit podle typu nádorových buněk na serózní, mucinózní, endometroidní a světlobuněčné (Povýšil & Šteiner, 2007; Halámková et al., 2014).

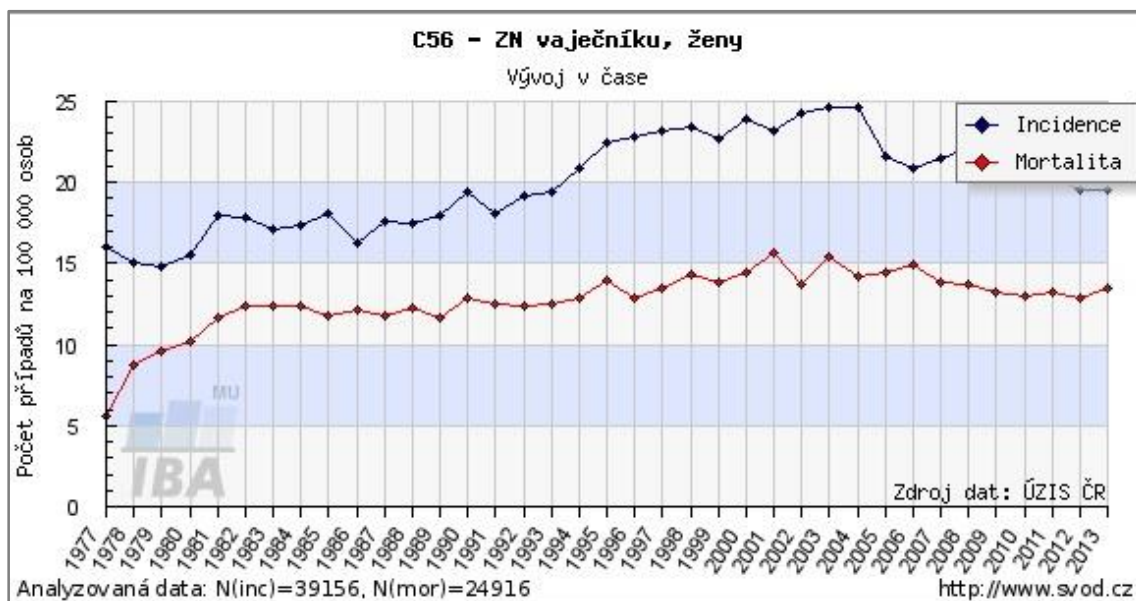
2.1.1 Výskyt

Nádory vaječníků jsou nejčastějším typem gynekologických nádorů u žen. 80 % nádorů ovaria je benigních a vyskytují se v mladším a středním věku. Maligní nádory vaječníků se vyskytují především ve starším věku (nejvyšší incidence je mezi 60. a 70. rokem) a následují v četnosti hned za karcinomem endometria. V minulosti ho výrazně převyšoval ještě karcinom děložního čípku, jeho incidence však díky zavedení pravidelných preventivních cytologických vyšetření výrazně klesla. V úmrtnosti na gynekologické nádory figuruje ovariální karcinom dlouhodobě na prvním místě (web 1; Halámková et al., 2014; Povýšil & Šteiner, 2007). Postupné zvětšování nádoru v břišní dutině zůstává většinou dlouhou dobu bez příznaků, a proto je až u dvou třetin pacientek nádor diagnostikován v pokročilém stádiu, tedy se špatnou prognózou. I po absolvování radikálního chirurgického zákroku a následné chemoterapie, dochází u 40 % ke vzniku recidiv již v prvních dvou letech po operaci a celkem relabuje až 70 % nádorů (Majirsky et al., 2013).

Incidence dosahovala svého maxima v roce 2003, kdy činila asi 25 případů na 100 000 obyvatel a zároveň mortalita dosahovala počtu 15 případů na 100 000 obyvatel. Od roku 2009 pak incidence i mortalita mírně klesá a dostáváme se na hodnotu incidence přibližně 19 případů a mortality 13 případů na 100 000 obyvatel, což jsou hodnoty naposledy dosažené okolo roku 1993 (Obr. 1).

Analýza Globocan z roku 2012 řadí Českou republiku ve výskytu ovariálního karcinomu celosvětově na 15. místo. ČR zaznamenala posun z 11. místa, na kterém figurovala v analýze z roku 2008 (web 1). Bohužel tento posun není ani tak způsoben

výrazným poklesem v incidenci v ČR, ale spíš mírným zvýšením incidencí v některých ostatních zemích, např. v Estonsku, na Maltě nebo v Rusku (web 2).



Obr. 1 Incidence a mortalita zhoubných onemocnění vaječníků v letech 1977 – 2013, převzato z web 1.

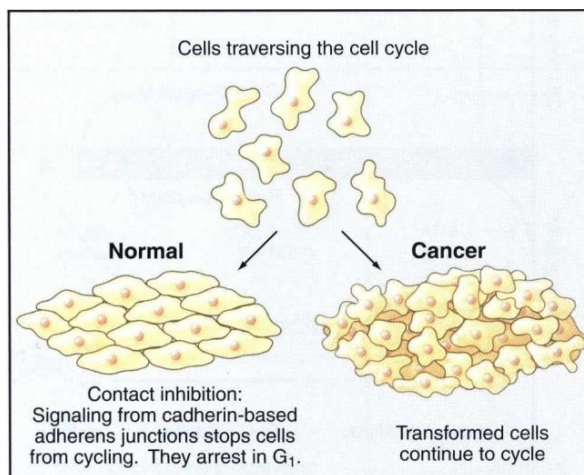
2.1.2 Etiopatogeneze

Nádorová onemocnění obecně jsou způsobena změnami na úrovni buněk, které začnou nekontrolovaně růst a poškozovat okolní tkáň. Buněčný cyklus je za normálních okolností vysoce regulován a jakékoliv odchylky od normálního dělení a růstu jsou citlivými kontrolními mechanismy zachyceny. I když se může zdát, že jsou nádorová onemocnění velmi častá, ve skutečnosti jsou velmi vzácná, pokud si představíme množství 10^{14} buněk v lidském těle, tak jenom velice nepatrný zlomek buněk se přemění v buňky rakovinné (Pollard & Earnshaw, 2008).

Většina typů nádorů je způsobena chybou v kontrole proliferace buněk a to konkrétně v G_1 fázi buněčného cyklu. To můžeme jednoduše pozorovat při kultivaci buněčných linií v kultivačních lahvích v laboratoři. Normální zdravé buňky postupně zcela pokryjí povrch lahve a vytvoří tzv. monovrstvu (monolayer). Signální kaskády, kterých se mimo jiné účastní např. kadheriny, pak vedou k tomu, že jsou buňky ve svém buněčném cyklu zastaveny a dále už se nedělí. Tomuto procesu se říká kontaktní inhibice (Obr. 2). Rakovinné buňky tuto kontrolu postrádají, a proto se dělí nekontrolovaně dále

i potom, co zcela pokryjí dno kultivační nádoby a tzv. přerůstají (Pollard & Earnshaw, 2008).

Nádorové buňky vykazují abnormální aktivitu typicky ve dvou skupinách genů. První skupinou genů jsou tzv. onkogeny. Jejich proteinové produkty jsou regulátory buněčného cyklu a růstu buněk a při jejich nepřiměřené aktivaci může dojít k nádorové transformaci buněk. Patří sem například gen pro Ras protein, cyklin D nebo Cdk4. Druhou skupinou genů jsou tzv. tumor supresorové geny. Jejich proteinové produkty fungují jako inhibitory produktů onkogenů anebo negativní zpětnou vazbou regulují buněčnou proliferaci. Inaktivací těchto genů může dojít k nádorové transformaci



Obr. 2 Narušení kontroly růstu a dělení u nádorové buňky, převzato z Pollard & Earnshaw, 2008

buněk. Mezi známé tumor supresorové geny patří např. gen pro Rb protein nebo geny spojené s nádory prsu a vaječníků BRCA1, BRCA2 (Adam et al., 2011; Pollard & Earnshaw, 2008).

Nádory vaječníků jsou asi jen v 5 – 10 % případů geneticky podmíněny. Až z 80 % jsou tyto dědičné nádory tvořeny mutací ve výše zmíněných tumor supresorových genech BRCA1 a BRCA2. Nosičky mutace pro gen BRCA1 mají celoživotní riziko vzniku karcinomu vaječníků 26 – 54 %, pro gen BRCA 2 je to riziko 10 – 23 %. Mají tedy přibližně 10 – 30x vyšší riziko než běžná populace a to nejen pro karcinom vaječníků, ale i pro karcinom prsu. Většina nádorů vaječníků však vzniká spontánně, bez pozitivní rodinné anamnézy (Jančárková et al., 2008; Adam et al., 2011; Majirský et al., 2013).

2.1.3 Rizikové faktory vzniku

Mezi rizikové faktory vzniku ovariálního karcinomu patří některé obecné faktory vzniku nádorových onemocnění, jako jsou obezita, kouření nebo kontakt s azbestem, ale i některé specifické faktory pro tento druh rakoviny. Nízký věk v době první menstruace, nuliparita nebo pozdní nástup menopauzy zvyšují riziko vzniku tohoto onemocnění. Jedním z možných vysvětlení je opakované poškození a hojení povrchového epitelu

ovaria při každém menstruačním cyklu a s tím spojená proliferace buněk a zvýšená exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) (Majirský et al., 2013). Riziko vzniku ovariálního karcinomu se naopak snižuje při multiparitě, kojení, užívání hormonální antikoncepce nebo po některých chirurgických zákrocích jako je profylaktické odstranění vaječnicků, bilaterální podvázání vejcovodů nebo odstranění dělohy (Ledermann et al., 2013).

2.1.4 Prevence a diagnostika

Žádné vyšetření nemá zatím dostatečnou citlivost a selektivitu pro detekci časných stádií ovariálního karcinomu. Zobrazovací metody ani krevní testy nejsou tak v současné době pro ženy s průměrným rizikem doporučovány. Význam preventivních opatření se uznává pouze pro omezenou skupinu žen s vysokým rizikem, nosičky genetických mutací (Majirský et al., 2013).

Citlivost a přesnost palpačního vyšetření pánve je z hlediska detekce počátečních stádií karcinomu vaječnicků velmi nízká. Takovýto typ vyšetření obecně dokáže odhalit až pokročilá stádia onemocnění.

Abdominální ultrasonografie se sice pro detekci karcinomu vaječnicků rutinně používá, specifita ale i senzitivita této metody je však také nízká. Vaginální ultrasonografie je metodou citlivější, dokáže detekovat už malé změny na vaječnicích, a lze ji tak považovat za metodu vhodnou pro ženy s vysokým rizikem vzniku onemocnění (Adam et al., 2011).

Bohužel běžná frekvence gynekologických vyšetření je pro včasnou diagnózu často nedostatečná. Nádory vaječnicků rychle progredují a problémem je také velmi časná tvorba metastáz v dutině břišní, které tvoří už i malé nádory. Proto i interval 6 měsíců může být už příliš dlouhý, což výrazně zvyšuje technickou, organizační a finanční náročnost jakéhokoliv screeningu.

Vyšetření onkogenních markerů (CA 125, HE 4, ROMA I, ROMA II) není natolik citlivé, aby se dalo doporučit pro rutinní preventivní kontroly. Používá se v diferenciální diagnostice nebo jej mohou podstoupit ženy s vysokým rizikem vzniku karcinomu v kombinaci s ultrasonografickým a klinickým vyšetřením. Např. u markeru CA 125 se fyziologické hodnoty v laboratoři pohybují kolem 28 – 30. Jejich zvýšení na hodnoty okolo 100 už signalizuje nějaké změny, ale původcem změn může být také např. endometrióza. Hodnoty v řádu tisíců jsou naopak už jednoznačně průkazné, ale bohužel

již signalizují přítomnost pokročilého stadia karcinomu (Fínek J, 2012; Adam et al., 2011).

2.1.5 Terapie

Doporučené léčebné postupy vydává každý rok Česká onkologická společnost v tzv. Modré knize. Tento dokument nemá povahu zákona, jeho cílem je zejména přispět k racionalizaci onkologické léčby (web 3).

Základním léčebným postupem je chirurgická radikální operace, při které se odstraní děloha (hysterektomie), oba vaječníky a vejcovody (adnexektomie), lymfatické uzliny v pánevní oblasti (lymfadenektomie) a červovitý výběžek přívěsku slepého střeva (apendektomie). Cílem chirurgického výkonu je maximální cytoredukce a tím dosažení nulového pooperačního residua. Residuum již od velikosti 1 cm má nepříznivý vliv na prognózu onemocnění (Fínek J, 2012).

Po chirurgickém zákroku se doporučuje navázat adjuvantní chemoterapií. Jedinou výjimku tvoří nádory zachycené ve velmi časném stádiu, u kterých postačí pouze chirurgické řešení. Ostatní typy nádorů ovarií se léčí většinou kombinací cytostatik platiny a paklitaxelu. V případě recidivy se používají další cytostatika, jako např. doxorubicin (web 3; Halámková et al., 2014).

Radioterapie má v léčbě karcinomu vaječníků pouze omezený význam. V primární léčbě není využívána vůbec. V léčbě relabujícího onemocnění se používá pouze k ozáření fokální recidivy onemocnění.

2.1.5.1 Chemoterapie

Nádory vaječníků se obecně považují za chemosenzitivní, jednotlivé histologické typy se však mohou výrazně lišit svým biologickým chováním a v citlivosti na cytostatika. Až u 70 – 85 % patientek dochází k recidivám a odpověď na další linii léčby je krátkodobá. Objektivním faktorem, který predikuje výsledek dalších linií léčby, je čas od ukončení primární léčby do recidivy, či další progresse onemocnění – TFI – treatment free interval. Pokud je TFI delší než 6 měsíců, hovoříme o chemosenzitivním onemocnění. V jiných případech se jedná o chemorezistentní onemocnění. Pokud dojde k relapsu mezi 6. až 12. měsícem, hovoříme o parciálně senzitivním onemocnění (Halámková et al., 2014; Fínek J, 2012).

2.1.5.2 Cílená léčba

Novou éru v onkologii přináší zavádění látek se selektivním účinkem na některé skupiny nádorových buněk a tím snížení toxicity vůči buňkám těla vlastním. Zatímco klasická cytostatika působí poměrně nespecificky na proliferaci, dělení a apoptózu buněk, cílená léčba může selektivně zasáhnout do procesů jako je angiogeneze, invazivita, metastazování nebo diferenciacie. Tato široká skupina farmak je někdy nepřesně označována jako biologická léčba (Klener P, 2010).

Významný pokrok v léčbě ovariálního karcinomu přinesl bevacizumab, který byl v ČR uveden na trh v roce 2011. Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti růstovému faktoru cévního endotelu (VEGF). Nově vzniklý nádor do velikosti 2 mm je vyživován difuzí, pokud ale dosáhne větší velikosti, začne trpět hypoxií a následně produkovat právě VEGF, což nastartuje neoangiogenezi (novotvorbu cév) směrem k nádorovému ložisku. Novotvořené cévy jsou nezralé, křivolaké a propustné, způsobují zvýšení intersticiálního tlaku v nádorové tkáni, a tím usnadňují pronikání nádorových buněk (tlakový gradient přes nedokonalou cévní stěnu) do cirkulace, a tím umožňují metastazování, přičemž zhoršují účinnost chemoterapie. U karcinomu vaječníků je prokázána vysoká vaskularizace i výrazná exprese VEGF. Bevacizumab se váže na VEGF, a brání tak jeho vazbě na receptor endotelových buněk, což vede k regresi nádorových cév a jejich normalizaci (Klener P, 2010; Majirský et al., 2013).

Bevacizumab prošel několika klinickými studiemi, zaměřených na léčbu karcinomu vaječníků. Asi nejvýznamnější byla randomizovaná dvojitě zaslepená studie GOG 0218, která prokázala významné prodloužení přežití bez progresu při pokračující léčbě s bevacizumabem ve srovnání se samotnou chemoterapií. Standardem primární léčby ovariálního karcinomu se tak stává kombinace platina, paklitaxel a bevacizumab, s kterým se pokračuje ještě v monoterapii následujících 15 měsíců po skončení terapie kombinací. Dle Modré knihy se bevacizumab využívá i pro léčbu relabujících nádorů, podle citlivosti nádoru k platině se podává v kombinaci s karboplatinou a gemcitabinem, nebo v případě rezistence k platině v kombinaci s paklitaxelem, topotekanem nebo doxorubicinem (web 3; Fínek J, 2012; Majirský et al., 2013).

Další látka pro cílenou terapii, která má místo v léčbě ovariálního karcinomu je olaparib. Na trh byl uveden na konci roku 2014 a je indikován v monoterapii k udržovací léčbě dospělých pacientek s relabujícím serózním epitelálním karcinomem vaječníku, vejcovodu, nebo primárně peritoneálním s mutací BRCA, citlivým na léčbu platinou,

u nichž došlo k relapsu, a které odpovídají (úplně nebo částečně) na chemoterapii založenou na platině (web 3).

Olaparib je inhibitor poly(ADP-ribose)polymerasy (PARP), což je enzym, účastnící se oprav DNA a tím udržování genomové stability buňky. Právě pacientky s mutací BRCA (1 i 2) jsou indikací olaparibu a to z důvodu genomové nestability nádorových ovariálních buněk. PARP patří do superrodiny enzymů, které jsou aktivovány poškozením DNA. Ve zdravé buňce jsou BRCA i PARP zapojeny do procesu oprav poškozené DNA. V případě mutace BRCA závisí oprava DNA buněk především na PARP. Pokud je však i PARP inhibován, objevují se dvojitě zlomy DNA během replikace, dochází k následné chromozomální nestabilitě, zástavě buněčného cyklu a apoptóze buňky. Inhibice PARP u nádorových buněk s mutacemi BRCA tak vede k potlačení schopnosti opravy DNA a následné podání chemoterapie zlepšuje efekt cytotoxické léčby a vede současně k zániku defektních buněk BRCA1 a BRCA2. Analýzy *in vitro* naznačují, že kombinace inhibitorů PARP a chemoterapie může mít synergické účinky. Inhibitory PARP však vykazují významný protinádorový efekt i v monoterapii. Vzhledem k relativní uniformitě chování ovariálních karcinomů s mutací BRCA a nově zkoušeným preparátům s lepším efektem právě u nositelek mutací BRCA1 a 2, by testování těchto genů mělo být do budoucna bráno v úvahu při stanovení strategie komplexní terapie pacientek s ovariálním karcinomem, zatím však není jeho rutinní součástí (web 3; Halámková et al., 2014).

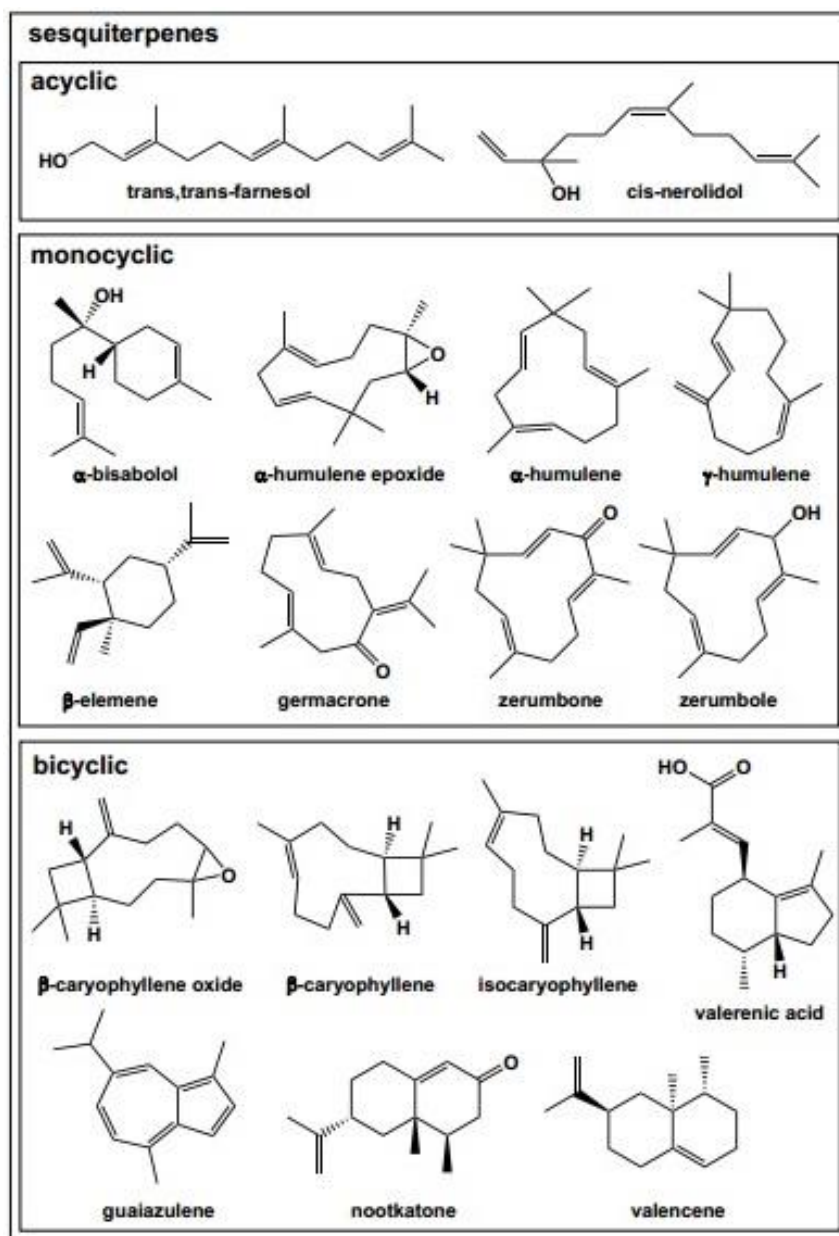
2.2 Seskviterpeny

Seskviterpeny tvoří velkou skupinu sekundárních metabolitů rostlin, především z čeledi *Asteraceae* a je jim přisuzována celá řada biologických účinků včetně protizánětlivého nebo protinádorového účinku. Kromě čeledi *Asteraceae* byly objeveny i v mnoha dalších čeledích rostlin (*Apiaceae*, *Magnoliaceae*, *Lauraceae*) a dokonce i v některých vodních organismech. Tyto zdroje seskviterpenů jsou k nalezení v podstatě celosvětově a lidská populace nebo i zvířata se se seskviterpeny setkává díky přímému kontaktu s rostlinou, ve formě tradičních přírodních přípravků nebo i v doplňcích stravy. Seskviterpeny tvoří také součást tradiční čínské medicíny (Amorim et al., 2013; Li-Weber M, 2013).

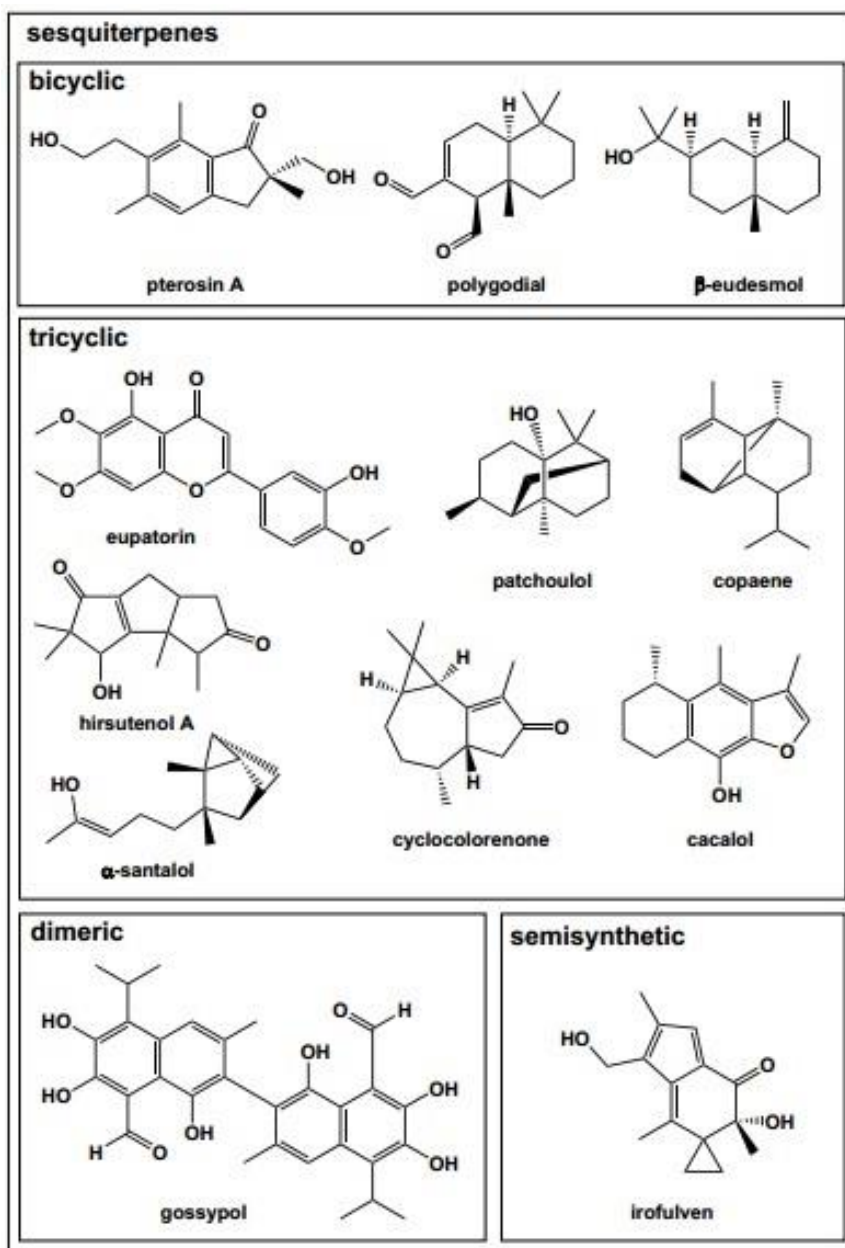
2.2.1 Struktura a její vztah k účinku

V roce 1992 bylo známo okolo 3500 struktur seskviterpenů, v roce 2006 přes 5000 struktur a toto číslo dále roste. Seskviterpeny jsou podskupinou terpenů, které tvoří jednu z největších skupin přírodních produktů, čítající desítky tisíc chemicky odlišných látek. Uplatnění nacházejí díky svým vlastnostem kromě farmaceutického průmyslu také v potravinářství nebo při výrobě parfému. Jedná se proto o skupinu látek s velmi rozmanitými vlastnostmi (Huang et al., 2012; Amorim et al., 2013).

Terpeny se skládají z jednotlivých izoprenových jednotek. Izopren je systematicky 2-methyl-buta-1,3-dien, tedy molekula složená z 5 atomů uhlíku. Podle počtu jednotek izoprenů se terpeny dělí do pěti skupin: monoterpeny (10C), seskviterpeny (15C), diterpeny (20C), triterpeny (30C) a tetraterpeny (40C). Tato práce se zaměřuje na seskviterpeny, které se podle struktury dají rozdělit na acyklické a cyklické (Obr. 4a, 4b). Acyklické, někdy nazývané farnesany, vycházejí přímo ze struktury farnesolu. Z farnesyl difosfátu je poté odvozena celá řada cyklických derivátů. Z hlediska funkčních skupin se u seskviterpenů vyskytují alkoholy, ketony, epoxidy, laktony a další. Laktony se podle své struktury dále dělí na germacranolidy, guaianolidy, eudesmanolidy, pseudeguaianolidy, elemanolidy a další (Huang et al., 2012; shrnuto v Bártíková et al., 2014).

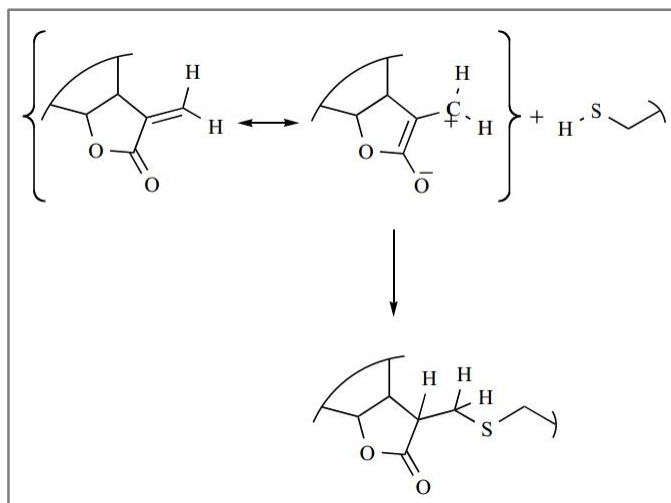


Obr 4a. Struktura vybraných seskviterpenů, převzato z Bártíková et al., 2014



Obr 4b. Struktura vybraných seskviterpenů, převzato z Bártíková et al., 2014

Široké spektrum biologických účinků je zajištěno především reakcí jejich α,β -nenasyčené karbonylové skupiny (např. α -metylen- γ -lakton nebo α,β -nesubstituovaný cyklopentenon). Ta reaguje s nukleofily prostřednictvím adice Michaelova typu (Obr. 5). Hlavním místem, kde seskviterpeny takto reagují, jsou thiolové skupiny (SH) aminokyseliny cysteinu, které se mohou nacházet v enzimech nebo jiných proteinových strukturách buněk. Tímto zásahem může docházet k narušení funkce makromolekul a redoxních reakcí (Amorim et al., 2013).



Obr. 5 Reakční mechanismus Michaelovy adice thiolové skupiny cysteinu k α -methylen- γ -laktonové skupině seskviterpenů, převzato z Irmgard M, 2011

2.2.2 Biologické účinky

U seskviterpenů byla prokázána celá řada biologických účinků, zahrnující protizánětlivé, protinádorové, antibakteriální, antivirové, protiplísňové, antiparazitární (včetně antimalarického působení), antiulcerózní, antidepressivní, antialergické nebo hepatoprotektivní účinky (shrnuto v Bártíková et al., 2014; Amorim et al., 2013).

2.2.2.1 Protizánětlivé účinky

Velký přínos, co se týče protizánětlivých účinků seskviterpenů, přinesla práce Halla a kolektivu již z roku 1979, která popsala několik různých seskviterpenů, které potlačovaly zánět v různých *in vivo* modelech. Zajímavostí je, že seskviterpen helenalin vykazoval větší protizánětlivý efekt než klasická látka ze skupiny nesteroidních antiflogistik – indometacin (Hall et al., 1979). Postupem času se zjišťoval mechanismus protizánětlivého působení seskviterpenů. Různé výzkumné skupiny různými biochemickými metodami prokázaly zapojení seskviterpenů do inhibice enzymů a/nebo uvolnění mediátorů, spojených se zánětlivým procesem. Podle konkrétní struktury seskviterpeny inhibují migraci neutrofilů do místa zánětu, exocytózu catepsinu G, uvolnění histaminu z mastocytů. Dále snižují aktivitu fosfolipasy A2 a leukotriensyntasy C4. Enzym cyklooxygenasa byl *in vitro* inhibován pouze v molárních koncentracích, které nejsou fyziologicky dosažitelné. Navíc nepřítomnost vedlejších účinků, jako jsou

krvácející ulcerace žaludku, které se typicky vyskytují u NSAID, naznačuje, že seskviterpeny ovlivňují jinou dráhu vedoucí k protizánětlivému účinku, než je inhibice syntézy kyseliny arachidonové (Hall et al., 1980; Irmgard M, 2011). V 90. letech 20. století bylo prokázáno, že seskviterpeny působí protizánětlivě hned v zárodku zánětlivého procesu a to konkrétně na transkripčním faktoru NF- κ B (nukleární faktor kappa aktivující B-buňky), který inhibují už v mikromolárních koncentracích (Bork et al., 1997; Wong et al., 1999).

Transkripční faktor NF- κ B hraje zásadní roli v regulaci imunitní odpovědi buňky. Reguluje expresi zánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF- α), chemokinů (IL-8), imunoreceptorů, adhezivních molekul, proteinů akutní fáze a řady enzymů (např. cyklooxygenasa II, indukovatelná NO-syntasa) (Pahl HL, 1999). Svojí regulací také zasahuje do nádorové transformace, protože reguluje řadu genů, účastní se buněčného cyklu, apoptózy, metastazování a angiogeneze. Představuje tak potenciální propojení mezi zánětlivou reakcí a rakovinou (Lee et al., 2007).

Seskviterpeny patří mezi první přírodní látky, u kterých byla prokázána inhibice NF- κ B. Parthenolid přímo inhibuje NF- κ B, vazbou na p65 podjednotku a alkyací dvou cysteinových molekul (Cys38, Cys120). Zároveň zasahuje i do funkce regulačního proteinu p53 a tím podporuje zastavení buněčného cyklu a prodělání apoptózy. Tímto dvojím mechanismem představuje velmi zajímavou možnost uplatnění v praxi a je prozatím jedním z mála seskviterpenů, který se dostal až do klinických hodnocení (Irmgard M, 2011; Amorim et al., 2013).

2.2.2.2 Protinádorové účinky

Přírodní látky jsou nepostradatelným zdrojem nových protinádorových léčiv. V posledních letech bylo přes 50 % nových cytostatik přírodního původu (Huang et al., 2012).

U některých seskviterpenů byl prokázán antiproliferační účinek prostřednictvím mechanismu indukce apoptózy, zásahu do buněčného cyklu nebo inhibicí proliferace a angiogeneze. Navzdory různým cílům zásahu do funkce nádorových buněk, většinu z nich ovlivňují prostřednictvím regulace aktivity výše zmíněného transkripčního faktoru NF- κ B a změnami v expresi proteinů, zapojených do této signální dráhy (Kim et al., 2006).

Schopnost seskviterpenů indukovat apoptózu je spojená s regulací kaspas a dalších proapoptotických nebo antiapoptotických proteinů. Například β -karyofylen oxid (Obr. 4a) snižoval expresi antiapoptotických genů (bcl-2, mdm2, COX-2, c-myb) a zvyšoval expresi proapoptotických genů (bax, bak 1, caspasa-8, caspasa-9) v některých buněčných modelech *in vivo*. U parthenolidu bylo posledními studiemi zjištěno, že indukuje apoptózu v řadě lidských nádorových buněk, prostřednictvím aktivace mitochondriální dráhy apoptózy, což bylo detekováno uvolněním cytochromu c a poruchou funkce kaspasové aktivity (Kim et al., 2012; shrnuto v Bártíková et al., 2014).

Ovlivnění proliferace, neoangiogeneze a s tím spojené metastazování nádorových buněk je regulováno hned v zárodku pomocí NF- κ B. Seskviterpeny mohou modulací této signální dráhy zabránit expresi některých adhezivních molekul, nutných pro rozšíření nádorových buněk (např. ICAM-1, ELAM-1), dále snížit expresi VEGF, který je nezbytný pro neoangiogenezi a dalších enzymů, které jsou zodpovědné za invazivitu a metastazování nádorů (např. COX-2, MMP-9). Například gossypol (Obr. 4b) efektivně inhiboval expresi adhezivní molekuly ICAM-1 prostřednictvím suprese NF- κ B a tím snížil adhezi a invazivitu nádorových buněk lidského karcinomu prsu (Moon et al., 2011; shrnuto v Bártíková et al., 2014).

Zásah seskviterpenů do regulace buněčného cyklu souvisí také s NF- κ B, který dále ovlivňuje expresi cyklinu D1, který je nejlépe prostudovaný. Seskviterpeny prokázaly ovlivnění buněčného cyklu na různých úrovních, kromě snížení exprese cyklinu D1 je to i snížení exprese cyklinu A, B1 a cyklin-dependentní kinasy, zástava buněčného cyklu ve fázi G2/M nebo G0/G1. Z konkrétních látek bylo snížení exprese cyklinu D1 objeveno např. u β -karyofylen oxidu, zerumbonu nebo farnesolu. Zástavu buněčného cyklu ve fázi G0/G1 způsobil parthenolid, který zároveň i inhiboval proliferaci buněk (shrnutí v Bártíková et al., 2014).

Většina seskviterpenů nakonec nebude pravděpodobně natolik účinná samostatně, aby se dala použít jako jediná protinádorová terapie. Pochopení mechanismů jejich působení však otvírá dveře pro možné kombinace seskviterpenů s klasickými protinádorovými léčivými. Nádorové buňky mají často indukované signální dráhy vedoucí přes transkripční faktor NF- κ B, který seskviterpeny umí inhibovat. To by mohlo napomoci například při překonání chemorezistence nádorů k cytostatikům a celkové senzitivizaci nádorových buněk k chemoterapii (Irmgard M, 2011; shrnuto v Bártíková et al., 2014). Konkrétní kombinace látek už byly s pozitivními výsledky testovány v nádorových buněčných liniích. Parthenolid a β -karyofylen zvýšil citlivost

buněk k cytotoxickému účinku paklitaxelu. Zerumbon zlepšil cytotoxický efekt doxorubicinu a cisplatinu (shrnutí v Bártíková et al., 2014). Silice z listů voskovníku červeného (která se skládá z řady seskviterpenů) potencoval cytotoxický efekt doxorubicinu (Ambrož et al., 2016).

2.2.3 Vztah seskviterpenů a ROS

Integrita genomu je zásadní pro správnou DNA replikaci a genovou expresi v buňkách. Jedním ze způsobů narušení genomové stability je oxidační stres, který vzniká v přítomnosti reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS zahrnují superoxidový anionový radikál, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a radikál oxidu dusnatého a svým působením modifikují makromolekuly uvnitř buněk. Tím mohou způsobit oxidativní poškození bazí DNA, peroxidaci lipidů nebo denaturaci proteinů, což v konečném důsledku může vést k poruše normálních fyziologických funkcí buněk, stárnutí buněk, apoptóze nebo nádorové transformaci (Lee et al., 2013).

Na druhou stranu existuje možnost využití prooxidačního působení některých látek v léčbě různých typů nádorů. Ke vzniku nádoru přispívá oxidativní stres a produkce ROS a nádorové buňky zároveň produkují více ROS, než zdravé buňky. Jsou ale také paradoxně náchylnější k dalšímu zvýšení produkce ROS, protože jsou často deficientní v hlavních antioxidačních enzymech. Pokud v nádorové buňce dojde k překročení určitého limitu pro ROS, může dojít k její apoptóze. Tím by se mohl elegantně vyřešit problém selektivity protinádorové terapie, protože právě tyto buňky by byly náchylnější k prooxidačnímu působení více než zdravé buňky, které se pomocí svého antioxidačního systému dokáží s určitou mírou ROS vyrovnat (Schumacker PT, 2006; Lee et al., 2013).

V buňkách existuje několik obranných mechanismů proti oxidativnímu poškození. V první řadě stojí látky, které přímo vychytávají vzniklé volné radikály (tzv. radical scavengers), patří sem např. vitamin E a C nebo tripeptid glutathion. Dalším mechanismem je chelatace volných iontů kovů, které by tzv. Fentonovou reakcí generovaly další radikály. Mezi tyto látky patří např. ferritin, transferin nebo ceruloplasmin. Další úroveň ochrany před oxidativním poškozením jsou antioxidační enzymové systémy, zahrnující např. superoxid-dismutasu (SOD), katalasu (CAT) nebo glutathion-peroxidasu (GPx). Tento antioxidační systém je indukovatelný v reakci na oxidativní stres, ale i řadou přírodních látek (Lee et al., 2013).

U seskviterpenů byl prokázán protektivní účinek před oxidativním stresem u zdravých buněk na různých úrovních. Bylo zaznamenáno jak přímé vychytávání ROS, tak chelatace kovových iontů nebo zvýšená činnost antioxidantních systémů. Zároveň některé seskviterpeny působí prooxidačně a to třeba pouze v nádorových buňkách (shrnuto v Bártíková et al., 2014).

Možnost přímého vychytávání ROS seskviterpeny je dána jejich schopností poskytnout elektron a tím uplatnit antioxidantní účinek. Například gossypol v testech prokázal silnou schopnost vychytávat volné radikály, efektivněji než butylhydroxytoluen (BHT), který se používá jako antioxidant v potravinářském průmyslu. Methyloací jedné nebo obou hydroxylových skupin gossypolu se antioxidantní aktivita výrazně snížila, což naznačuje, že schopnost vychytávat volné radikály závisí na přítomnosti hydroxylových skupin. Tricyklický seskviterpen kakalol (Obr. 4) byl v antioxidantním působení až 3x účinnější než BHT. Na druhou stranu některé seskviterpeny neprokázaly žádný nebo jen slabý antioxidantní účinek, např. farnesol, zerumbon nebo α -humulen. Zdá se, že pro vychytávání volných radikálů je nezbytná přítomnost α,β -nenasycené karbonylové skupiny a hydroxylové skupiny.

Schopnost chelatace volných iontů kovů a tím předcházení tvorby volných radikálů byla pozorována např. u parthenolidu. Ten měl srovnatelný chelatační účinek jako flavonoidy apigenin a luteolin. Tato schopnost je přisuzována přítomnosti laktonové skupiny (shrnuto v Bártíková et al., 2014).

Indukce enzymového antioxidantního systému v buňkách byla pozorována u řady přírodních látek, včetně seskviterpenů. Látky mohou aktivovat nejen transkripční faktor Nrf2, který odpovídá za transkripci celé řady genů, zapojených v antioxidantní ochraně buňky, ale i některé další transkripční faktory jako např. ARE, Keap1. Aktivace těchto faktorů vede ke zvýšené expresi různých antioxidantních systémů, jako je glutathion-S-transferasa, glutathion-reduktasa, glutathion-syntasa, NADPH-chinonoxidoreduktasa, hem-oxygenasa a další (Lee et al., 2013; shrnuto v Bártíková et al., 2014). Zajímavé je, že některé seskviterpeny se chovají jinak v normálních buňkách a v nádorových buňkách. Například parthenolid v buňkách normálního epitelu prostaty způsobil zvýšenou produkci glutathionu, což znamená, že působil jak antioxidant. V buňkách nádoru prostaty ale vykazoval opačné, tzn. prooxidační působení, které se mimo jiné projevilo snížením exprese antioxidantních systémů nádorové buňky, jako je katalasa a superoxid-dismutasa (Sun et al., 2010).

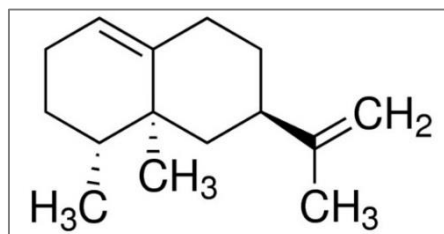
Prooxidační působení je jedním z mechanismů u klasických protinádorových léčiv, jakou jsou např. vinblastin, doxorubicin nebo cisplatin. U těchto látek bylo mimo jiné popsáno zvýšení produkce peroxidu vodíku v buňkách, pravděpodobně kvůli aktivaci NADPH-oxidasy a tím indukce apoptózy těchto buněk. I seskviterpeny vykazují za určitých podmínek prooxidační působení a tím se stávají potenciálně slibnou protinádorovou terapií. Obecně indukují seskviterpeny oxidační stres buď přímou tvorbou nebo podporou tvorby volných radikálů, nebo inhibicí antioxidantních obranných mechanismů buněk. Jestli se bude látka chovat prooxidačně závisí na okolním prostředí, především na redoxním stavu buňky. Nádorové buňky se zvýšenou produkcí ROS se tak stávají potenciálním cílem tohoto působení (Lee et al., 2013; shrnuto v Bártíková et al., 2014). Z konkrétních seskviterpenů bylo prooxidační působení objeveno např. u artemisininu, u kterého je toho působení mimochodem také mechanismem antimalarického účinku, u parthenolidu, deoxyelefantopinu, gossypolu, tansigarginu a dalších (shrnut v Bártíková et al., 2014). Také silice z voskovníku červeného, která se skládá z řady seskviterpenů (β -karyofylen, α -humulen, humulen epoxid, valencen a další) prokázala prooxidační účinek u nádorových buněk střevního epitelu a zároveň se chovala jako mírný antioxidant u normálních zdravých buněk, konkrétně u fibroblastů (Ambrož et al., 2016).

2.2.4 Valencen

Valencen se svým patnáctiuhlíkovým skeletem řadí mezi bicyklické seskviterpeny. Systematicky je to (3R,4aS,5R)-4a,5-dimethyl-3-isopropenyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaftalen (web 4).

Valencen je přítomný v silicích řady rostlin, jeho největší komerční význam však plyne z přítomnosti v silicích citrusových plodů. Je jednou z látek, zodpovědných za charakteristické ovocné/dřevité aroma citrusů, a proto se průmyslově využívá jako potravinářské aditivum a také při výrobě parfémů. Jeho roční spotřeba činí až 10 000 kg (Liu et al., 2012; Frohwitter et al., 2014).

Valencen je syntetizován z FPP (farnesyl pyrofosfát) prostřednictvím valencen-syntasy, která patří do rodiny seskviterpen-syntas, katalyzující přeměnu FPP na lineární a cyklické



Obr. 6 Struktura valencenu, převzato z web 4

seskviterpeny. Rutinně je valencen pro průmyslové užití nyní získáván pomocí destilace s vodní parou přímo z citrusových plodů. To není ale příliš vhodné z praktického hlediska, protože valencen je pouze jednou z řady látek přítomných v silici. Vyvinula se tak celá řada biotechnologických postupů získávání valencenu, které zahrnují mimo jiné vložení genu pro valencen-syntasu do určitého organismu, který pak dovede valencen sám syntetizovat. Produkce pomocí této genové modifikace byla popsána jak v bakteriích, kvasinkách, tak i houbách, konkrétně např. v bakterii *Corynebacterium glutamicum* nebo houbě *Schizophyllum commune* (Frohwitter et al., 2014; Scholtmeijer et al., 2014).

U valencenu jako seskviterpeny se dají předpokládat různé biologické účinky vyplývající z jeho struktury.

Byl popsán protialergický účinek, způsobený inhibicí produkce leukotrienů a také inhibicí hypersenzitivní reakce pozdního typu. Protialergický účinek byl pozorován *in vitro* i *in vivo* (Jin et al., 2011).

Studovaly se také protizánětlivé účinky valencenu. Ukázalo se, že dovede indukovat enzym hem-oxygenasa 1 (HO-1), zodpovědný za celou řadu imunomodulačních a cytoprotektivních účinků. Indukce HO-1 byla spojená s inhibicí indukovatelné NO-syntasy (iNOS), která má významné prooxidační a s tím spojené prozánětlivé vlastnosti. Inhiboval také uvolnění HMBG1, což je cytokin produkovaný v pozdní fázi zánětu. Zvyšoval také celkové přežívání myši, u kterých byl zánět indukovaný. Těmito účinky valencen prokázal potenciální využití v protizánětlivé léčbě (Tsoyi et al., 2011).

Valencen prokázal také určitou antioxidační aktivitu, ta byla však slabší v porovnání s kompletním složením silice z *Citrus sinensis*. Cytotoxický účinek na buňkách HeLa byl signifikantní, hodnota IC₅₀ se pohybovala pod koncentrací 20 µg/ml. Z toho se dá odvodit potenciální protinádorový účinek valencenu. Naopak v testech antimikrobiální aktivity neprokázal valencen účinek proti žádnému z testovaných kmenů *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium citrinum* ani *Aspergillus niger* (Liu et al., 2012). Valencen také působil cytotoxicky na nádorové buňky CaCo-2 a zároveň neovlivnil viabilitu hepatocytů. Zvýšil také prooxidační působení doxorubicinu v nádorových buňkách CaCo-2 a působil synergicky s doxorubicinem v nádorových buňkách. (Ambrož et al., 2015).

Testoval se také hepatoprotektivní účinek, založený na antioxidační aktivitě u několika strukturně odlišných seskviterpenů, včetně valencenu. Při hodnocení endogenního antioxidačního účinku valencen prokázal určitý účinek, ale některé

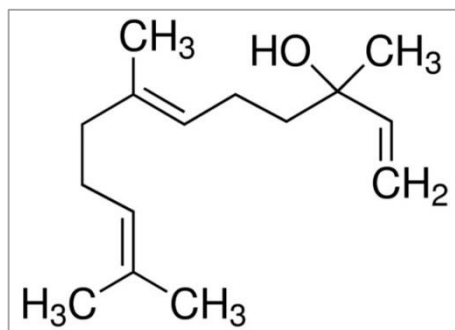
seskviterpeny vykazovaly účinek větší (např. cis-nerolidol), některé naopak účinek žádný (α -humulen). Při hodnocení hepatoprotektivního účinku za použití hydrofobního oxidantu vykazovaly obecně seskviterpeny vyšší účinek než pozitivní kontrola (kyselina askorbová) a valencen patřil do skupiny se spíše nižší redukční aktivitou (Vinholes et al., 2014).

Nedávný výzkum prokázal protektivní účinky valencenu proti UV záření. Konkrétní mechanismus spočíval v inhibici vápníkových iontových kanálů TRPV1 a ORAI1, které jsou spojovány s melanogenezí, stárnutím kůže a prozánětlivou reakcí. Valencen také snižoval UV-indukovanou syntézu melaninu v buňkách melanomu. Z toho důvodu může být valencen vnímán jako potenciální látka, využitelná jak v kosmetice, proti stárnutí kůže a tvorbě vrásek, tak v terapii nebo prevenci nádorových onemocnění, spojených s UV zářením (Nam et al., 2016).

2.2.5 Trans-nerolidol

Trans-nerolidol, někdy označovaný synonymem peruviol, patří mezi acyklické seskviterpeny. Je jedním ze stereoizomerů seskviterpenického alkoholu nerolidolu. Systematický název je (E)-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodekatrien-3-ol (web 5, Lapczynski et al., 2008).

Nerolidol je žlutá kapalina s květinovou vůní a nachází se v silicích rostlin z různých čeledí. Vyskytuje se v některých rostlinách, používaných v tradiční čínské medicíně např. v keři *Myrica rubra* nebo stromu *Dalbergia odorifera* a dále například často v čeledi *Piperaceae*, ale i dalších.



Obr. 7 Struktura trans-nerolidolu, převzato z web 5

Tvoří jednu z hlavních složek čaje oolong (*Camellia sinensis*) (Lapczynski et al., 2008; Li et al., 2014; Ambrož et al., 2016; Péres et al., 2010; Sheibani et al., 2016). Pro jeho typickou vůni, připomínající jablko a růži, se průmyslově používá nejen při výrobě parfémů a kosmetiky (šampony, mýdla apod.), ale i v čisticích prostředcích. Ročně činí jeho spotřeba okolo 10 – 100 tun (Lapczynski et al., 2008).

Nerolidol a nebo přímo trans-nerolidol vykazují různé biologické účinky. Byly zaznamenány antiulcerózní účinky, antioxidační efekt, antibakteriální působení nebo cytotoxické působení k nádorovým buňkám (Sheibani et al., 2016).

Silice z rostliny *Baccharis dracunculifolia* vykazovala antiulcerózní účinek na zvířecích modelech akutních gastrických lézí, které byly indukované alkoholem, indometacinem nebo zvýšeným stresem. U všech případů silice, jejíž hlavní složku tvoří nerolidol, prokázala antiulcerózní působení v koncentracích 250 a 500 mg/kg (Klopell et al., 2007).

Antimikrobiální aktivitu vykazovala silice ze semen rostliny *Momordica charantia*, ve které jako hlavní složka dominuje trans-nerolidol. Nejvyšší citlivost se prokázala pro *Staphylococcus aureus*, kde minimální inhibiční koncentrace (MIC) činila 125 µg/ml. Naopak nízká inhibiční aktivita se ukázala pro bakterii *Escherichia coli* a kvasinku *Candida albicans*, kde minimální inhibiční koncentrace přesahovala 500 µg/ml (Brace et al., 2008).

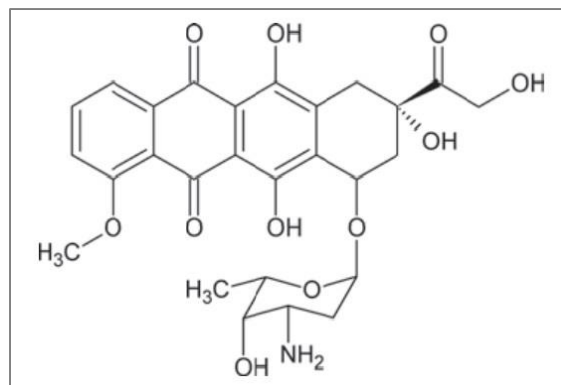
U trans-nerolidolu byla zaznamenána cytotoxická aktivita vůči různým buněčným nádorovým liniím, např. k linii adenokarcinomu ledvin, karcinomu prostaty, melanomu, karcinomu prsu nebo střevnímu adenokarcinomu (Sperotto et al., 2013; Ambrož et al., 2015). Silice rostliny *Piper gaudichaudianum*, někdy také nazývané Jaborandi, obsahuje jako hlavní složku trans-nerolidol. V lidovém léčitelství jsou listy této rostliny používány např. proti bolesti zubů, pro jejich protizánětlivé účinky nebo proti jaterním poruchám. U extraktu z listů byl prokázán protizánětlivý a analgetický účinek. Prokázal se jeho cytotoxický účinek na *Saccharomyces cerevisiae*, zároveň však nezpůsobil mutagenitu. Mechanismus cytotoxického účinku byl pravděpodobně způsobený generací ROS a s ním spojené jednovláknové zlomy DNA (Sperotto et al., 2013). Trans-nerolidol působil také cytotoxicky na nádorové buňky střevního epitelu, zároveň však neovlivnil viabilitu normálních zdravých buněk hepatocytů. Při kombinaci s cytostatikem doxorubicinem, prokázal trans-nerolidol synergické působení a zároveň zvyšoval akumulaci doxorubicinu do nádorových buněk (Ambrož et al., 2015).

U nerolidolu byl také studován vliv na buněčnou energetiku a to prostřednictvím ovlivnění mitochondrií. Ukázalo se, že nerolidol pravděpodobně přímo interaguje s F_1F_0 -ATPasou dýchacího řetězce v mitochondriích, což vede ke snížení obsahu ATP v buňce. Tento efekt byl přímo úměrný koncentraci nerolidolu. Nerolidol také zastavoval proliferaci buněk hepatocelulárního jaterního karcinomu a snižoval jejich životaschopnost, pravděpodobně právě kvůli snížení efektivity buněčné energetiky (Ferreira et al., 2012).

2.3 Doxorubicin

Doxorubicin je antracyklinové protinádorové antibiotikum, produkované bakterií rodu *Streptomyces peucetius*. Protinádorová antibiotika mají také antibakteriální účinek, ale pro jejich poměrně vysokou toxicitu se k léčbě infekcí nepoužívají (Adam et al., 2011; Lincová & Farghali, 2002).

Doxorubicin má červenou barvu, díky antrachinonovému jádru v jeho struktuře (Obr. 8). Podává se pouze parenterálně a původní molekula i jeho metabolity se vylučují především žlučí. Mezi jeho nejčastější indikace patří hematologické maligní onemocnění, jako mnohočetné myelomy, ne Hodgkinovy lymfomy. K léčbě akutních forem leukémie se používá spíše nepatrně odlišná látka daunorubicin. Doxorubicin se používá i v léčbě celé řady solidních nádorů, např. karcinomu prsu, vaječníků, bronhogenního karcinomu plic, osteosarkomu a dalších (Adam et al., 2011; Lincová & Farghali, 2002).



Obr. 8 Struktura doxorubicinu, převzato z Hanušová et al., 2011

Mechanismus účinku doxorubicinu je velmi komplexní. Dříve se uváděl jen základní interkalační mechanismus účinku, který se dá vysvětlit včleněním čtyřčlenné planární struktury molekuly do řetězců DNA, kde vyvolá jejich zlomy. Na tyto zlomy v DNA má vliv i ovlivnění funkce topoizomerasy II, což je enzym v buňce, který zejména při replikaci štěpí obě vlákna DNA (Lüllmann et al., 2004). Následně však byly objeveny i další potenciální mechanismy účinku, které spočívají mimo jiné v tvorbě volných radikálů, které vedou k oxidačnímu stresu, v ovlivnění funkce tumor supresorového genu p53, v peroxidaci lipidů nebo v ovlivnění uvolňování cytochromu C z mitochondrií (Hanušová et al., 2011; Minotti et al., 2004).

Protinádorová léčba doxorubicinem je často nedostatečná, zvýšení dávkování je však limitováno vznikem systémových nežádoucích účinků, především kardiotoxicity, která je typická pro celou skupinu antracyklinových antibiotik (Adam et al., 2011; Hanušová et al., 2011). Vznik kardiotoxicity je závislý na dávce a jako hlavní mechanismus vzniku se předpokládá účinek volných kyslíkových radikálů, které se uvolňují při nitrobuněčných reakcích antracyklinů. Roli zde však hraje i ovlivnění některých vápníkových kanálů a tím vznik kalciového přetížení buňky. To, proč jsou

toxicitou ovlivněny hlavně kardiomyocyty, spočívá pravděpodobně v jejich snížené antioxidační aktivitě. Antioxidační enzymy jako superoxid-dismutasa nebo glutathion-reduktasa jsou v kardiomyocytech chudě zastoupeny, a proto jsou právě tyto buňky citlivé k oxidačnímu poškození (Poprach et al., 2008).

Pro zlepšení efektivity doxorubicinu a zároveň snížení jeho toxicity byly vyvinuty různé systémy, které zlepšují jeho terapeutické použití. Příkladem může být liposomální enkapsulace doxorubicinu nebo jeho navázání na konkrétní protilátky, peptidy nebo syntetické polymery (Hanušová et al., 2011). Perspektivní strategií by mohla být také kombinovaná terapie doxorubicinu s přírodními látkami. Z těchto látek můžeme zmínit např. seskviterpeny. Monocyklický seskviterpen zerumbon nebo bicyklický seskviterpen β -karyofylen potencoval *in vivo* cytotoxický účinek doxorubicinu na nádorové buňky při použití v kombinaci (shrnutí v Bártíková et al., 2014). Také seskviterpeny β -karyofylen oxid, valencen a trans-nerolidol zvyšovaly efektivitu doxorubicinu při cytotoxickém účinku na nádorové buňky, jejich účinek ve vztahu k doxorubicinu byl synergický (Ambrož et al., 2015).

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- stanovit antiproliferační aktivitu doxorubicinu v buněčných liniích SK-OV-3 a A2780
- stanovit antiproliferační aktivitu valencenu a trans-nerolidolu v buněčných liniích SK-OV-3 a A2780
- zjistit vliv doxorubicinu, valencenu a trans-nerolidolu na produkci ROS buněčnými liniemi SK-OV-3 a A2782
- určit kombinační indexy testovaných látek a tím zjistit vzájemný vztah mezi doxorubicinem a testovanými terpeny
- studovat vliv terpenů na intracelulární koncentraci doxorubicinu a jeho distribuci v buněčných kompartmentech

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a chemikálie

Buněčná linie SK-OV-3 – Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta UK HK

Buněčná linie A2780 – Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta UK HK

DMSO (dimethylsulfoxid) – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

Doxorubicin – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

FBS (fetální bovinní sérum) – inaktivované (30 min, 56 °C), Lonza (Praha, ČR)

H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát) – Life Technologies (Praha, ČR)

Kultivační médium McCoy (McCoy's 5a Medium modified) – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

Kultivační médium RPMI (RPMI 1640) – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

PBS (phosphate buffered saline) – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

Penicilin/streptomycin – Lonza (Praha, ČR)

Roztok neutrální červeně – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

Trypsin – Lonza (Praha, ČR)

Valencen, trans-nerolidol – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.2 Přístroje a zařízení

laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C

CO₂ inkubátor – HeraCell

mrazicí box (-80 °C) – HeraFreeze

mikroskop – Nikon Eclipse TS100-F

invertovaný fluorescenční mikroskop - Nikon Eclipse Ti-E

vodní lázeň – Memmert

spektrofotometrický a spektrofluorimetrický analyzátor – Tecan Infinite M 200

zamrazovací kontejner – Nalgene, Sigma C1562

třepačka na mikrotitrační destičky – IKA MS2 Minishaker
analytické váha – Scaltec SBC 22
kapalinový chromatograf – Agilent 1290 Series

4.3 Buněčné linie

Obě buněčné linie nám byly poskytnuty Ústavem lékařské biologie a genetiky LFHK. Jedná se o lidské nádorové linie ovariálního karcinomu. V experimentu byl využit rozdíl v citlivosti k cytotoxickým látkám, konkrétně k doxorubicinu.

SK-OV3

SK-OV-3 je lidská buněčná linie izolovaná v roce 1973 z ascitické tekutiny 64leté europoidní pacientky, trpící adenokarcinomem vaječníků. Morfologicky jde o epiteliální buňky rostoucí adherentně. Buněčná linie je rezistentní k řadě cytotoxických látek, zahrnující difterický toxin, cis-platinu a doxorubicin (web 6, web 7).

Složení kultivačního média:

450 ml McCoy's 5a Medium modified
50 ml inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS)
2,5 ml roztoku penicilinu/streptomycinu

A2780

A2780 je lidská nádorová buněčná linie ovariálního karcinomu. Byla izolovaná z nádorové tkáně neléčené pacientky. Buňky vykazují epiteliální morfologii. Rostou adherentně v monovrstvě. Od této buněčné linie byly odvozeny dvě další – A2780cis, která je rezistentní k cis-platině, a A2780ADR, která je rezistentní k adriamycinu (komerční označení doxorubicinu) (web 8).

Složení kultivačního média:

450 ml RPMI 1640 medium
50 ml inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS)
5 ml L-glutaminu
2,5 ml roztoku penicilinu/streptomycinu

4.4 Metody

4.4.1 Rozmrazování buněčných linií

Buněčné kultury jsou dlouhodobě skladovány zamrazené v tekutém dusíku. Před další prací s buňkami je tak nutné je rozmrazit a převést do kultivačního média. Postup rozmrazování byl stejný u obou buněčných linií, pouze s odlišným kultivačním médiem.

Do 15ml zkumavky bylo napipetováno 12 ml nezahřátého příslušného kultivačního média. Zkumavka se zmrazenými buňkami byla po vyjmutí z tekutého dusíku umístěna na 1-2 minuty do vodní lázně (37 °C) a následně byly buňky přeneseny do zkumavky s médiem. Po homogenizaci a centrifugaci (70 g, 5 minut) byla peleta resuspendována v 15 ml nového média. Suspenze byla přenesena do kultivační lahve (75 cm²) a umístěna do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Po 24 hodinách bylo vyměněno kultivační médium. Po dosažení 70-80% konfluency již následovala běžná pasáž.

4.4.2 Pasážování buněk

Obě buněčné kultury patří mezi tzv. adherentní, to znamená, že rostou na vhodném povrchu (např. polystyrenová kultivační lahev), který postupně zcela pokrývají a tím vyčerpávají i živiny z kultivačního média. Z toho důvodu je nutné po nějakém čase buňky přemístit do nové kultivační lahve s čerstvým médiem. Tento proces se nazývá pasážování a provádí se potom, co buňky porostou dno kultivační lahve přibližně ze 70-80 %.

Celý proces pasážování se odehrával v laminárním boxu, podle zásad pro aseptickou práci. Před vlastním pasážováním byly všechny používané roztoky zahřáty ve vodní lázni na 37 °C.

Kultivační láhev s buňkami byla nejprve zkontrolována pod mikroskopem a poté přenesena do laminárního boxu. Médium bylo opatrně slito do odpadní kádinky a buňky byly dvakrát opláchnuty 7 ml PBS (tento krok je nutný pro správnou funkci následného trypsinu). Byly přidány 2 ml trypsinu-EDTA a kývavým pohybem se rozprostřely po dnu kultivační lahve. Po asi půl minutě byly 2/3 trypsinu-EDTA odsáty a kultivační lahev se vložila na 3-10 minut do inkubátoru. Buňky se musely pravidelně kontrolovat pod mikroskopem a až většina zaujala kulovitý tvar, což znamenalo, že se uvolnily od dna

lahve, byly ještě sklepnuty prudkým pohybem do dna lahve. Následně byly buňky spláchnuty 4 ml kultivačního média a postupným nasáváním a vypouštěním pipetou byla buněčná suspenze homogenizována. Čerstvé kultivační médium s obsahem FBS zastaví účinek trypsinu a zároveň dodá buňkám nový přísun živin. Homogenní buněčná suspenze pak byla napipetována do nové sterilní kultivační lahve (u linie SK-OV-3 1-1,5 ml, u linie A2780 0,5-1 ml) a množství bylo doplněno kultivačním médiem do 13 ml. Kultivační lahev pak byla přenesena do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) a buňky se nechaly znovu růst.

Buňky byly takto pasážovány pravidelně 2x týdně, většinou v pondělí a ve čtvrtek.

4.4.3 Počítání buněk

Počet buněk v buněčné suspenzi vzniklé při pasážování je nezbytné zjistit pro další experimenty nebo i nasazení buněk do nových kultivačních lahví. K počítání buněk byla používána Bürkerova komůrka.

Pipetou bylo odebráno 9 µl zhomogenizované neředěné buněčné suspenze a byla naplněna první polovina Bürkerovy komůrky, stejně byla naplněna i druhá polovina a komůrka byla umístěna pod mikroskop. Podle počtu buněk byly počítány buňky buď v 16 čtvercích, nebo v 5 čtvercích v úhlopříčce, a tomu byl pak přizpůsoben výpočet. Byly vždy počítány buňky ležící uvnitř čtverce anebo na jeho horní nebo pravé straně. Buňky ležící na spodní nebo levé straně nebyly počítány.

Výsledná koncentrace byla vypočtena podle vzorce:

$$\text{spočítané buňky/počet čtverců, v kterých se počítalo} * 16$$

Výsledek byl přepočten na množství na 1 ml pomocí $* 10^4$

tj. např. při počtu **27** buněk v celkem **32** čtvercích: $27/32 * 16 = 13,5 * 10^4$ buněk/ml

Podle požadovaného množství buněk na experiment nebo na pasážování pak bylo vypočteno potřebné množství neředěné buněčné suspenze a množství média, kterým byl objem doplněn.

4.4.4 Stanovení cytotoxicity pomocí Neutral Red Uptake (NRU) testu

Barvivo neutrální červeň (NR) je supravitální barvivo, což znamená, že se hromadí pouze v živých buňkách. Za normálních okolností může barvivo prostupovat cytoplasmatickou membránou, protože má jeho molekula neutrální náboj. V buňce se hromadí v lyzozomu, kde okolní pH klesá a molekula barviva získává náboj a nemůže tak z lyzozomu uniknout. Živá a nepoškozená buňka udržuje za značné spotřeby energie protonový gradient na membráně lyzozomu. Pokud dojde k poškození nebo úmrtí buňky, tento gradient se ztrácí a barvivo uniká z lyzozomu. Změnu absorbance je možno zachytit pomocí spektrofotometrie.

Do 96jamkové destičky bylo nejprve nasazeno 100 μ l buněčné suspenze o koncentraci 5000 buněk/100 μ l a nechalo se 24 hodin růst (37 °C, 5 % CO₂). Druhý den následovala expozice buněk zkoušenými látkami 100 μ l expozičního média. Bylo testováno 11 různých koncentrací doxorubicinu, 7 různých koncentrací terpenů a 5 různých kombinací doxorubicinu a terpenů (Tab. 1). Každá koncentrace byla vždy inkubována v minimálně 4 paralelních jamkách a celý experiment byl 3x opakován. Sloupec 1 v destičce sloužil jako slepý vzorek, do něho se buňky nenasazovaly a ani nebylo přidáváno expoziční médium.

Tab. 1 Koncentrace testovaných látek při testu NRU

buněčná linie	látka	testované koncentrace při NRU testu							
SK-OV-3	doxorubicin [μ M]	0,05	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2	4
A2780	doxorubicin [μ M]	0,01	0,03	0,05	0,1	0,3	0,5	1	2
SK-OV-3, A2780	valencen [μ g/ml]	1	5	10	25	50	75	100	
SK-OV-3, A2780	trans-nerolidol [μ g/ml]	1	5	10	25	50	75	100	
SK-OV-3	kombinace doxorubicin [μ M] + valencen [μ g/ml]	0,1 + 5	0,2 + 10	0,5 + 25	1 + 50	1,5 + 75			
SK-OV-3	kombinace doxorubicin [μ M] + trans-nerolidol [μ g/ml]	0,1 + 5	0,2 + 10	0,5 + 25	1 + 50	1,5 + 75			
A2780	kombinace doxorubicin [μ M] + valencen [μ g/ml]	0,03 + 5	0,06 + 10	0,15 + 25	0,3 + 50	0,5 + 75			
A2780	kombinace doxorubicin [μ M] + trans-nerolidol [μ g/ml]	0,03 + 5	0,06 + 10	0,15 + 25	0,3 + 50	0,5 + 75			

Odečítání cytotoxicity bylo prováděno vždy 24, 48 a 72 hodin po expozici buněk zkoušenými látkami. Z destičky bylo nejprve vyklepnutím odstraněno expoziční médium a bylo přidáno 200 μ l roztoku neutrální červeně rozpuštěné v zahřátém médiu. K buňkám

A2780 byl přidáván roztok neutrální červeně o koncentraci 40 µg/ml, pro linii SK-OV-3 byla metoda optimalizována na koncentraci NRU 60 µg/ml. Po obarvení byly destičky vráceny do inkubátoru na 2-3 hodiny.

Po inkubaci byl vyklepnutím odstraněn roztok barviva a k buňkám bylo přidáno 100 µl fixačního roztoku (1 g/100 ml CaCl₂ v 0,5% roztoku formaldehydu). Destička se nechala v klidu stát 15 minut při pokojové teplotě.

Následně byl fixační roztok vyklepnutím odstraněn a k buňkám se napipetovalo 200 µl lyzačního roztoku (1% roztok kyseliny octové v 50% roztoku ethanolu). Destička se nechala 30 minut třepat na třepačce (450 rpm, pokojová teplota). Změření uvolněného množství neutrální červeně bylo provedeno spektrofotometricky na přístroji Tecan při 540 nm.

Výsledné hodnoty byly vyhodnoceny jako procenta kontroly.

4.4.5 Detekce ROS pomocí DCF testu

Ke zjištění přítomnosti a množství ROS byl použit buněčný indikátor H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát). H₂DCFDA je látka schopná pronikat buněčnou membránou pasivní difuzí. V buňce dochází k odštěpení obou acetylových skupin buněčnými esterázami. Hydroxylové skupiny jsou pak pomocí ROS oxidovány a vznikne fluorescenční produkt DCF (2',7' - dichlorofluorescein). Vzniklá fluorescence je pak přímo úměrná množství ROS.

H₂DCFDA je látka citlivá na světlo, při manipulaci a skladování je nutné roztoky chránit před světlem. Do 96jamkové destičky byly nasazeny buňky v koncentraci 5000 buněk/100 µl a nechaly se 72 hodin růst (37 °C, 5 % CO₂). Po dosažení dostatečné konfluence buněk (cca 90 %) bylo médium vyklepnutím odstraněno a k buňkám byly přidány testované látky ředěné v PBS. Byly testovány celkem 3 různé koncentrace doxorubicinu a 3 různé koncentrace terpenů (Tab. 2). Buňky se nechaly s testovanými látkami inkubovat 12 hodin. 30 minut před koncem inkubace bylo k buňkám přidáno 100 µl 10µM H₂DCFDA a destička byla na zbylých 30 minut vložena zpět do inkubátoru zabalená v alobalu (ochrana před světlem). Poté byla změřena fluorescence (excitace 490 nm, emise 530 nm) na přístroji Tecan, při 37 °C, každých 5 minut, po dobu jedné hodiny, tj. celkem 13 cyklů.

Tab. 2 Testované koncentrace při testu DCF

buněčná linie	látko	testované koncentrace při DCF testu		
SK-OV-3, A2780	doxorubicin	0,1 μM	1 μM	5 μM
SK-OV-3, A2780	valencen	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
SK-OV-3, A2780	trans-nerolidol	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$

4.4.6 Příprava vzorku pro HPLC analýzu

HPLC analýza sloužila ke stanovení akumulace doxorubicinu uvnitř buněk.

Do 12jamkové destičky byly nasazeny buňky v koncentraci 8000 buněk/100 μl (600 μl na jednu jamku) a nechaly se růst 48 hodin (37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2). K buňkám bylo poté přidáno 600 μl testovaných látek řaděných v příslušném médiu. Celkem byly testovány 2 koncentrace samotného doxorubicinu a 2 různé kombinace doxorubicinu s terpenem (Tab. 3). Každá koncentrace se inkubovala v 1 jamce a celý experiment se 2x zopakoval. Po uplynutí 3 hodin bylo všechno médium od buněk opatrně odsáto a jamky byly opláchnuty 500 μl PBS. Do každé jamky bylo přidáno 100 μl lyzačního pufru (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton, pH 7,4) a buňky se nechaly lyzovat při pokojové teplotě 15 minut. Tím došlo k uvolnění doxorubicinu z buněk. Poté bylo do jamek přidáno 300 μl ledového methanolu a směs z každé jamky byla přenesena do mikrozkušavky a promíchána na třepače. Následovalo centrifugování mikrozkušavek při 10 000 g, 10 minut, 4 $^{\circ}\text{C}$, při kterém se oddělily vysrážené proteiny. Supernatant z jednotlivých mikrozkušavek byl přefiltrován přes 0,22 μm filtr a filtrát byl uchováván při -80 $^{\circ}\text{C}$ pro pozdější analýzu. Před vlastním měřením se vzorky nechaly vytemperovat na pokojovou teplotu a následně byly přepipetovány do vialek.

Tab. 3 Testované koncentrace při HPLC analýze

buněčná linie	látko	testované koncentrace při HPLC analýze			
SK-OV-3, A2780	doxorubicin [μM]	6	9		
SK-OV-3, A2780	kombinace doxorubicin [μM] + valencen [$\mu\text{g/ml}$]	6 + 10	6 + 50	9 + 10	9 + 50
SK-OV-3, A2780	kombinace doxorubicin [μM] + trans-nerolidol [$\mu\text{g/ml}$]	6 + 10	6 + 50	9 + 10	9 + 50

4.4.7 HPLC analýza akumulace doxorubicinu

Analýza množství akumulovaného doxorubicinu byla provedena na přístroji Agilent 1290 Series a byla použita kolona Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 x 50 mm, 1,8 μm). Mobilní fáze byla tvořena z 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitrilu v poměru 76 : 24. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,0 ml/min. Analýza probíhala při teplotě 30 °C. Pro detekci byl použit fluorescenční detektor ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$). Výstupem z HPLC analýzy bylo množství akumulovaného doxorubicinu v ng.

4.4.8 Stanovení kombinačního indexu

Ke zhodnocení a kvantifikaci antiproliferativního účinku kombinací doxorubicinu s jednotlivými terpeny byl použit software CalcuSyn, který je založen na metodě Chou-Talalaye (Chou TC, 2006). Do programu byly zadávány hodnoty získané při testech cytotoxicity pomocí NRU, jednotlivé kombinace doxorubicinu a terpenů (Tab. 1). Výsledná simulace definuje vzájemný vztah mezi látkami a je získána pomocí závislosti CI (kombinačního indexu) na F_a (ovlivněné frakce buněk). Pokud je $CI = 1$, vztah mezi látkami se kvantifikuje jako aditivní, pokud je $CI < 1$ tak jako synergický a pokud je $CI > 1$ tak jako antagonický.

4.4.9 Fluorescenční mikroskopie

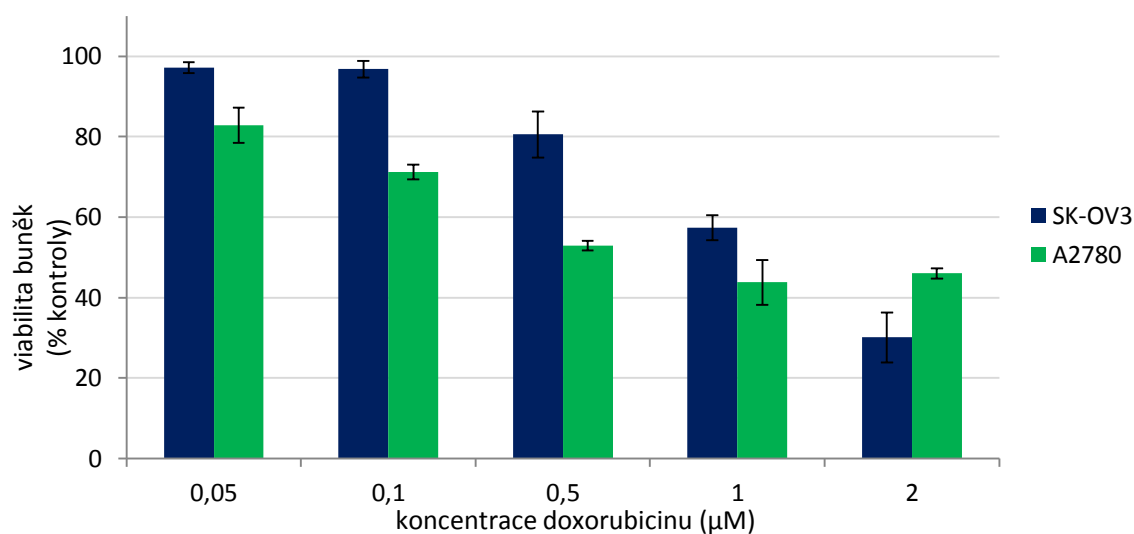
Fluorescenční mikroskopie sloužila k pozorování distribuce doxorubicinu uvnitř buněk a zhodnocení účinku jednotlivých terpenů na jeho akumulaci do buněk. Byla testována koncentrace doxorubicinu 9 μM a poté vždy jedna kombinace s terpenem (valencen i trans-nerolidol 50 $\mu\text{g/ml}$).

Buňky byly nasazeny na Petriho misky vhodné pro konfokální mikroskopii v množství 2 ml/misku a o koncentrace 8000 buněk/100 μl a nechaly se 72 hodin růst v inkubátoru (37 °C, 5 % CO_2). Po inkubaci byly k buňkám přidány 2 ml expozičního média a nechaly se opět v inkubátoru přibližně 1 hodinu. Následovalo samotné focení na invertovaném epifluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E V s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5. Foceno bylo pomocí Cy3 filtrového setu a data byla vyhodnocena softwarem NIS Elements AR 4.20.

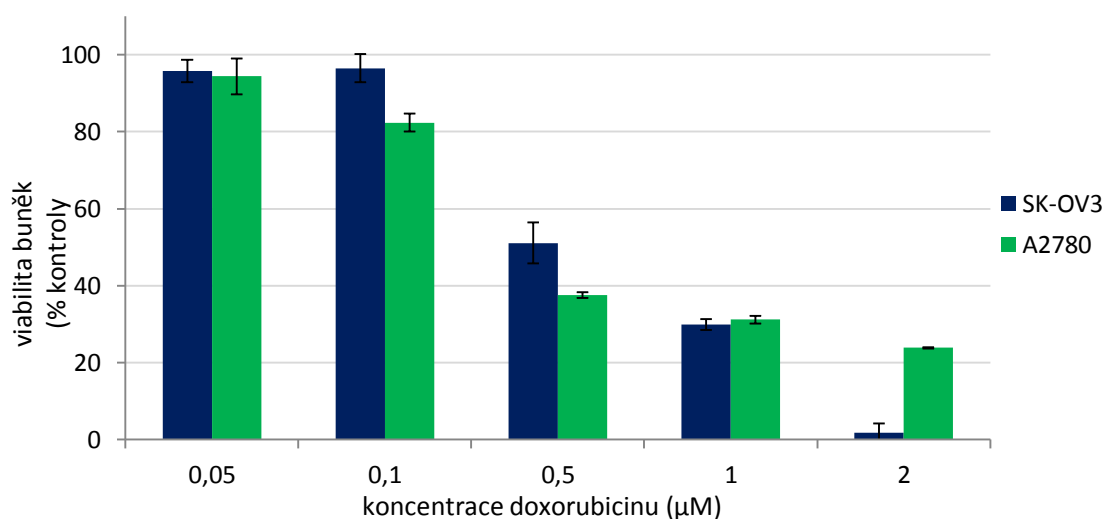
5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovení antiproliferační aktivity doxorubicinu

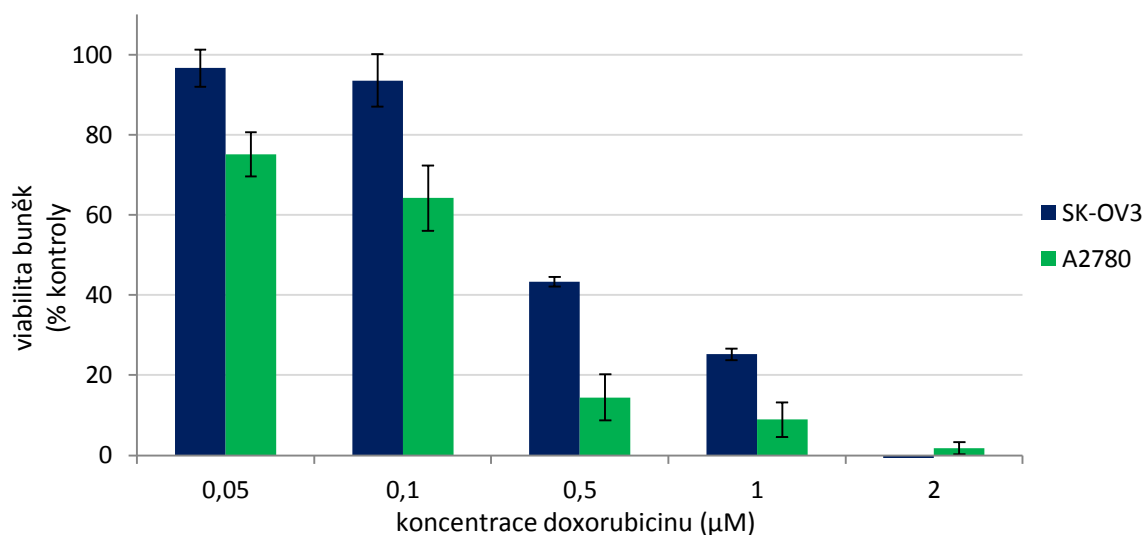
Antiproliferační aktivita doxorubicinu byla stanovena pomocí NRU testu u buněčných linií SK-OV-3 a A2780. Výsledky měření byly zpracovány do grafů jako závislost viability buněk (% kontroly) na koncentraci doxorubicinu. Výsledky byly zaznamenávány vždy po 24, 48 a 72 hodinách od expozice buněk (Obr. 9, 10 a 11).



Obr. 9 Vliv vybraných koncentrací doxorubicinu na proliferaci buněk SK-OV-3 a A2780 po 24hodinové expozici, hodnoceno testem NRU



Obr. 10 Vliv vybraných koncentrací doxorubicinu na proliferaci buněk SK-OV-3 a A2780 po 48hodinové expozici, hodnoceno testem NRU

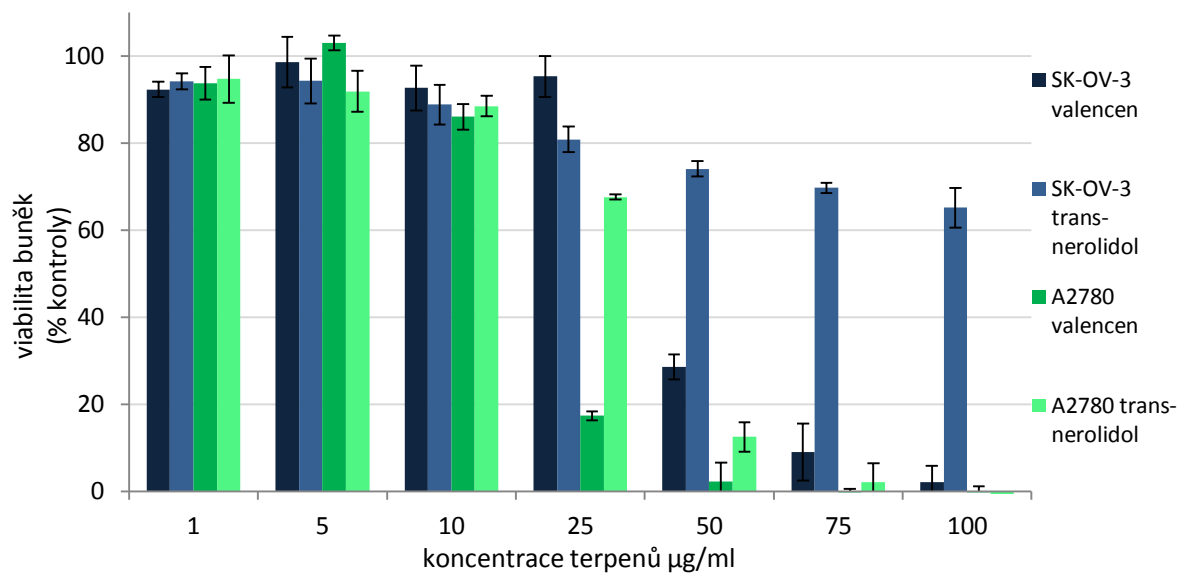


Obr. 11 Vliv vybraných koncentrací doxorubicinu na proliferaci buněk SK-OV-3 a A2780 po 72hodinové expozici, hodnoceno testem NRU

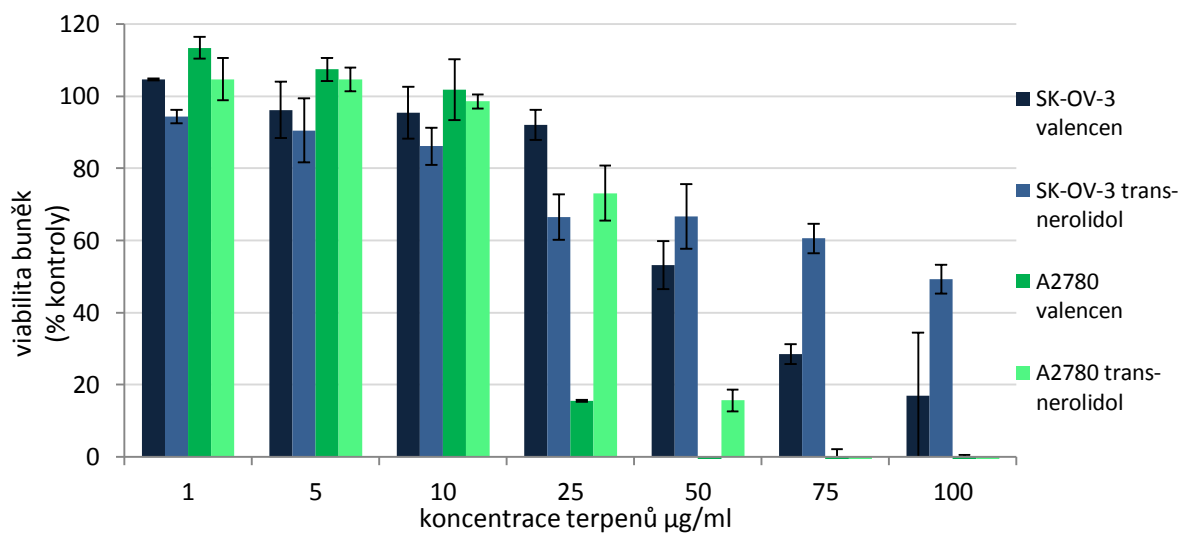
U měření ve všech časech je znatelný rozdíl mezi buněčnými liniemi. Rezistentní linie SK-OV-3 vykazuje vyšší odolnosti vůči doxorubicinu, zejména v nižších koncentracích (0,05 a 0,1 μM doxorubicinu), kde proliferace buněk není téměř ovlivněna. Po 72hodinové expozici vykazuje doxorubicinu od koncentrace 0,5 μM významnou antiproliferační aktivitu vůči oběma liniím.

5.2 Stanovení antiproliferační aktivity valencenu a trans-nerolidolu

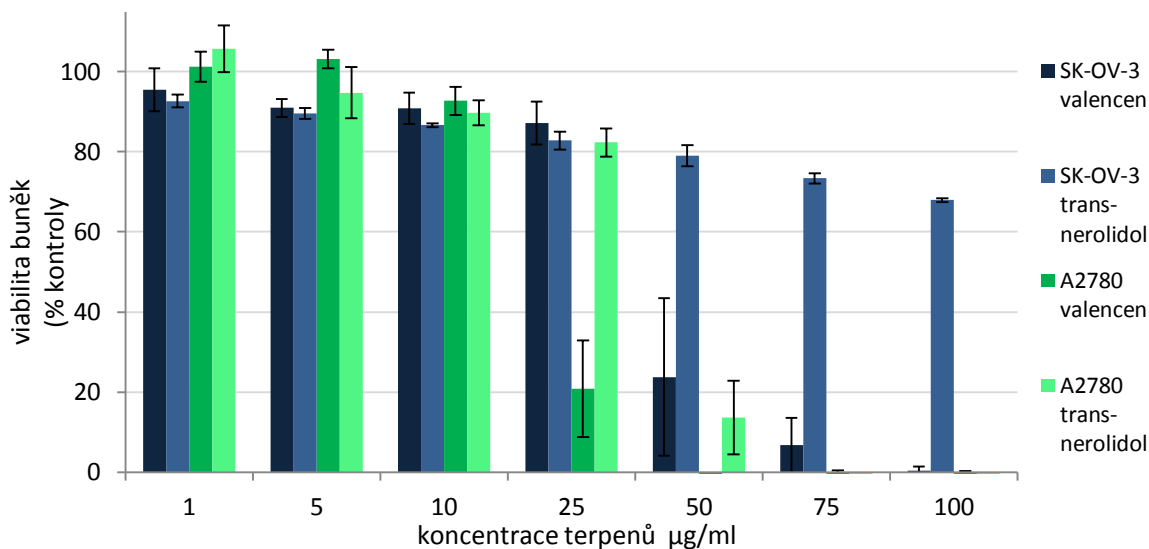
Antiproliferační aktivita obou terpenů byla stanovena pomocí NRU testu u buněčných linií SK-OV-3 a A2780. Výsledky měření byly zpracovány do grafů jako závislost viability buněk (% kontrola) na koncentraci doxorubicinu. Výsledky byly zaznamenávány vždy po 24, 48 a 72 hodinách od expozice buněk (Obr. 12, 13 a 14).



Obr. 12 Vliv valencenu a trans-nerolidolu na proliferaci buněk SK-OV-3 a A2780 po 24hodinové expozici, hodnoceno testem NRU



Obr. 13 Vliv valencenu a trans-nerolidolu na proliferaci buněk SK-OV-3 a A2780 po 48hodinové expozici, hodnoceno testem NRU

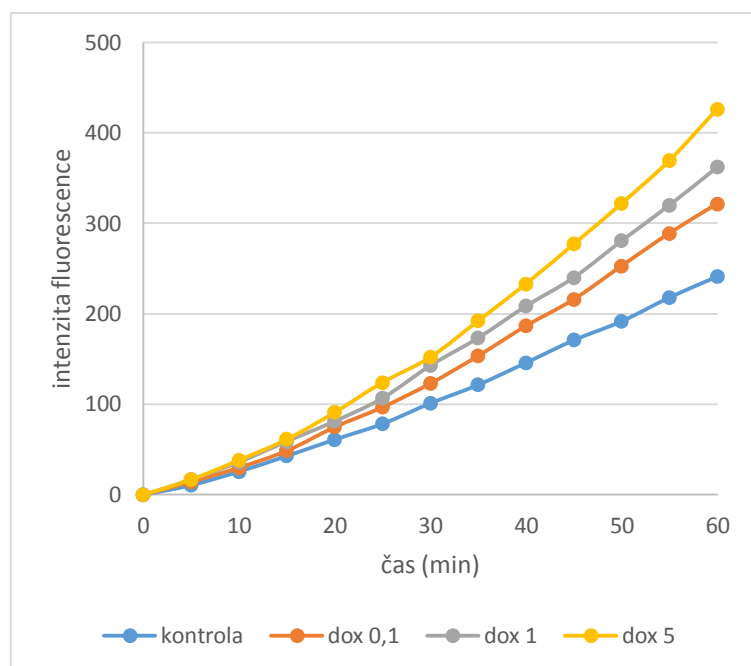


Obr. 14 Vliv valencenu a trans-nerolidolu na proliferaci buněk SK-OV-3 a A2780 po 72hodinové expozici, hodnoceno testem NRU

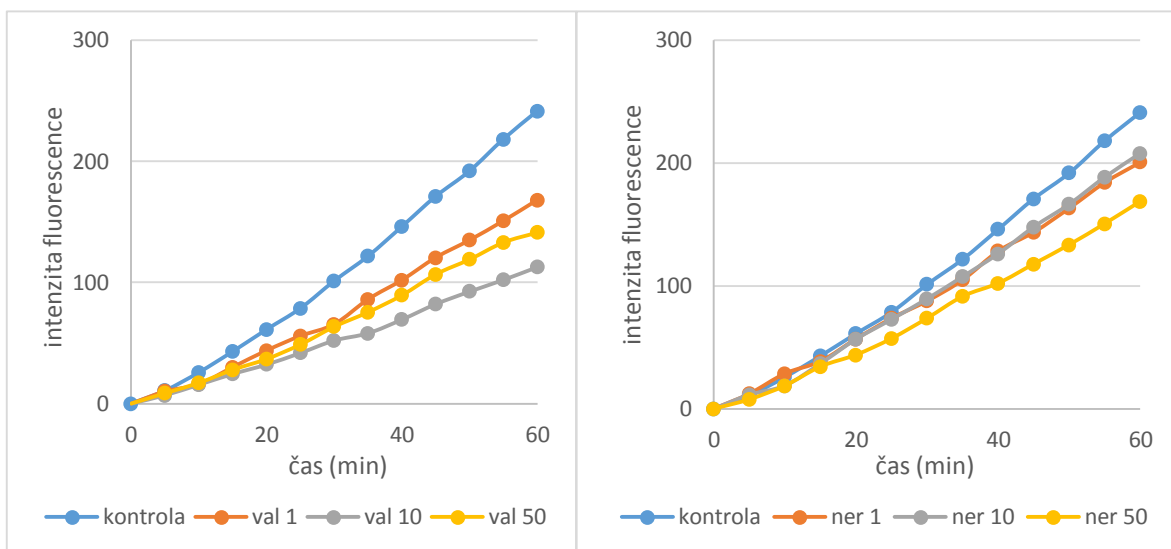
Oba terpeny snižovaly proliferaci buněk SK-OV-3 i A2780 již po 24 hodinách expozice. Buňky A2780 byly v porovnání s SK-OV-3 citlivější k antiproliferační aktivitě obou terpenů, zejména ve vyšších koncentracích. U obou buněčných linií vykazoval vyšší aktivitu valencen. U linie A2780 byl ve všech časech zaznamenán výrazný pokles v proliferaci buněk po působení valencenu mezi koncentracemi 10 a 25 µg/ml. U buněk SK-OV-3 se tento významný pokles proliferace projevil mezi koncentracemi 50 a 75 µg/ml valencenu. U linie A2780 měl valencen vliv na kompletní pokles počtu živých buněk na nulu v koncentraci 50 µg/ml. U linie SK-OV-3 způsobil valencen pokles počtu živých buněk až k nule po 72 hodinách při koncentraci 100 µg/ml. Významný pokles v proliferaci buněk byl po působení trans-nerolidolu u buněk A2780 mezi koncentracemi 25 a 50 µg/ml. U linie SK-OV-3 k výraznému poklesu proliferace pod 50 % kontroly nedošlo ani při nejvyšší koncentraci trans-nerolidolu 100 µg/ml po 72 hodinách. Od koncentrace 75 µg/ml trans-nerolidolu klesl počet živých buněk A2780 ve všech časech až k nule.

5.3 Prooxidační působení doxorubicinu a terpenů

Tvorba ROS je jedním z mechanismů účinku doxorubicinu. V tomto testu se porovnála tvorba ROS po ovlivnění buněk doxorubicinem a oběma terpeny. Použil se test DCF a buněčné linie A2780 a SK-OV-3. Výsledek byl zpracován do grafů závislosti tvorby ROS (intenzita fluorescence) na čase pro každou buněčnou linii zvlášť (Obr. 15, 16, 17 a 18).

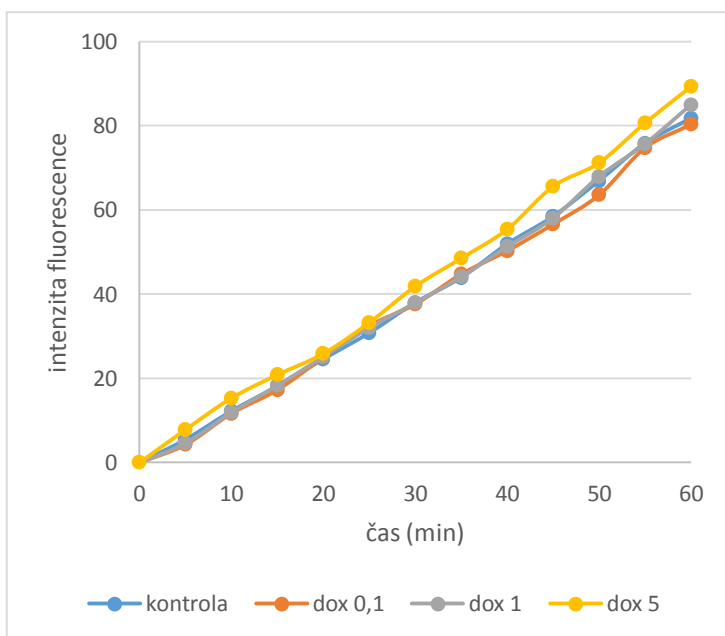


Obr. 15 Produkce ROS buňkami SK-OV-3 po ovlivnění doxorubicinem, hodnoceno testem DCF

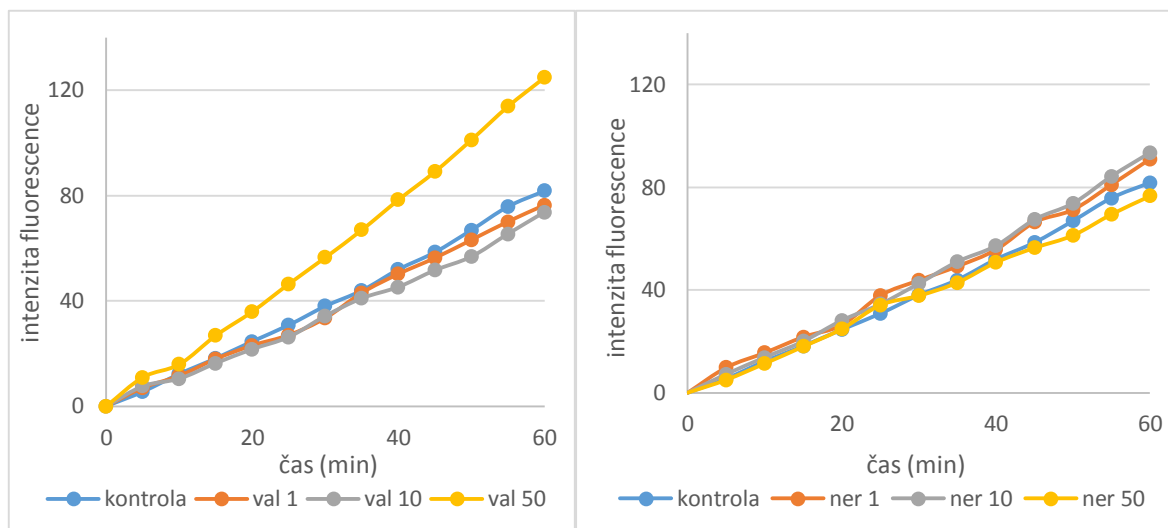


Obr. 16 Produkce ROS buňkami SK-OV-3 po ovlivnění valencenem a trans-nerolidolem, hodnoceno testem DCF

U buněčné linie SK-OV-3 byla pozorována zvýšená tvorba ROS po ovlivnění buněk doxorubicinem oproti kontrole. Prooxidační účinek doxorubicinu byl závislý na koncentraci. Valencen a trans-nerolidol vykazovaly antioxidační působení.



Obr. 17 Produkce ROS buňkami A2780 po ovlivnění doxorubicinem, hodnoceno testem DCF

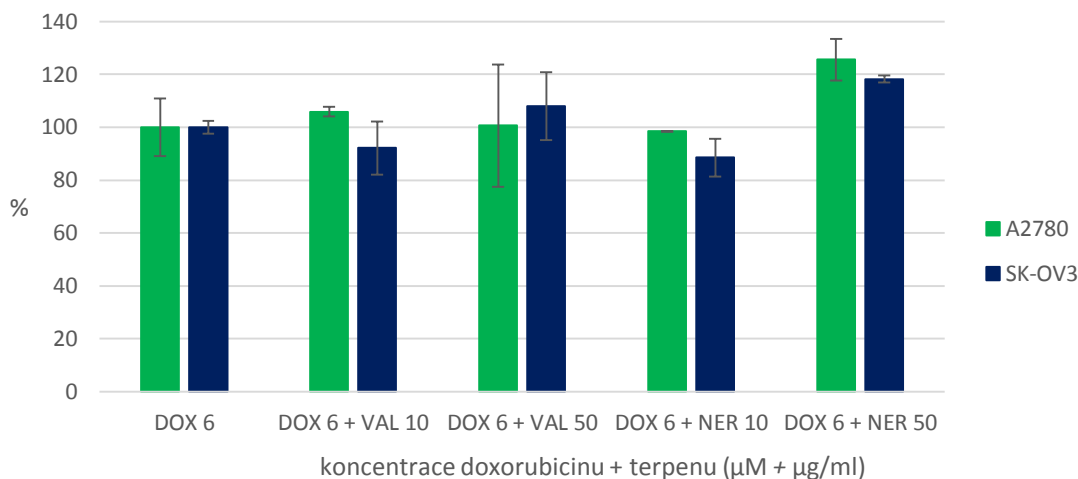


Obr. 18 Produkce ROS buňkami A2780 po ovlivnění valencenem a trans-nerolidolem, hodnoceno testem DCF

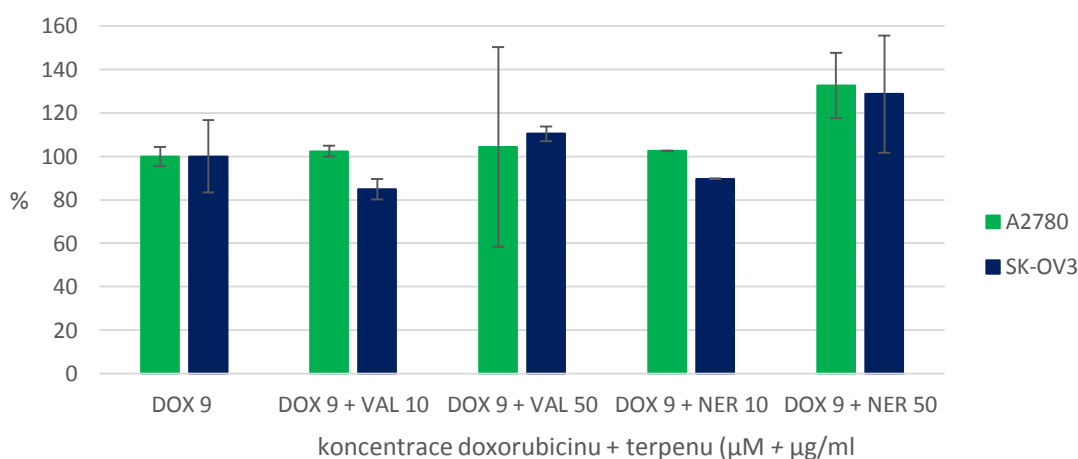
U buněčné linie A2780 byly celkové hodnoty měřené fluorescence nižší než u SK-OV-3. Doxorubicin a trans-nerolidol neovlivňovaly produkci ROS. Valencen v jeho nejvyšší koncentraci byl schopný produkci ROS zvýšit.

5.4 Akumulace doxorubicinu

Byl testován vliv terpenů na akumulaci doxorubicinu do buněk. K vyhodnocení akumulace se využila analýza HPLC, výstupní hodnotou bylo množství akumulovaného doxorubicinu v ng. Měření se provádělo u dvou různých koncentrací doxorubicinu, 6 μM (Obr. 19) a 9 μM (Obr. 20). Výsledky byly zpracovány do grafů, kde samotný doxorubicin je 100 % a kombinace doxorubicinu s terpeny jsou k této hodnotě vztaženy.



Obr. 19 Akumulace doxorubicinu do buněk A2780 a SK-OV-3, hodnoceno pomocí HPLC, koncentrace doxorubicinu 6 μM (= 100 %)

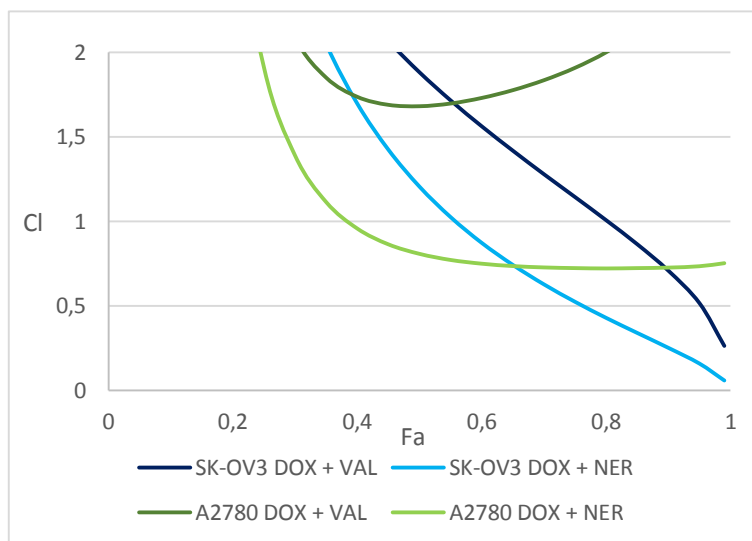


Obr. 20 Akumulace doxorubicinu do buněk A2780 a SK-OV-3, hodnoceno pomocí HPLC, koncentrace doxorubicinu 9 μM (= 100 %)

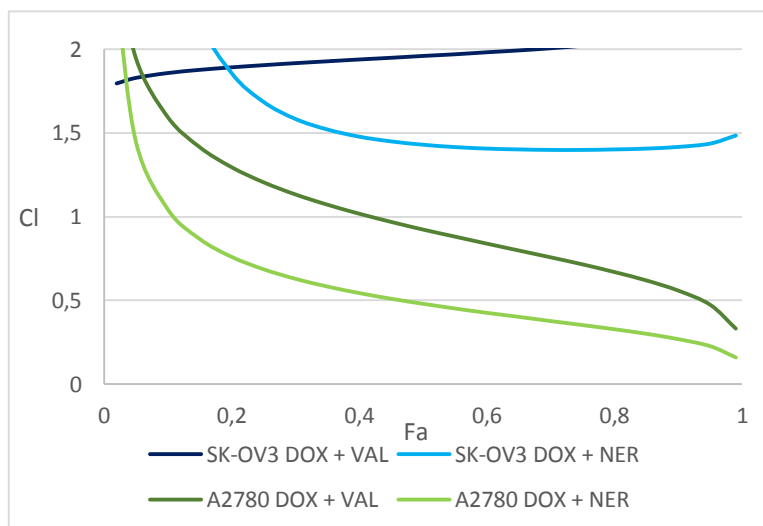
HPLC analýza neprokázala významný nárůst v akumulaci doxorubicinu do buněk při kombinaci s valencenem. Vzhledem k velkým směrodatným odchylkám však není možné vyloučit potenciální účinek. Trans-nerolidol v koncentraci 50 μg/ml způsobil zvýšenou akumulaci doxorubicinu do buněk.

5.5 Kombinační index

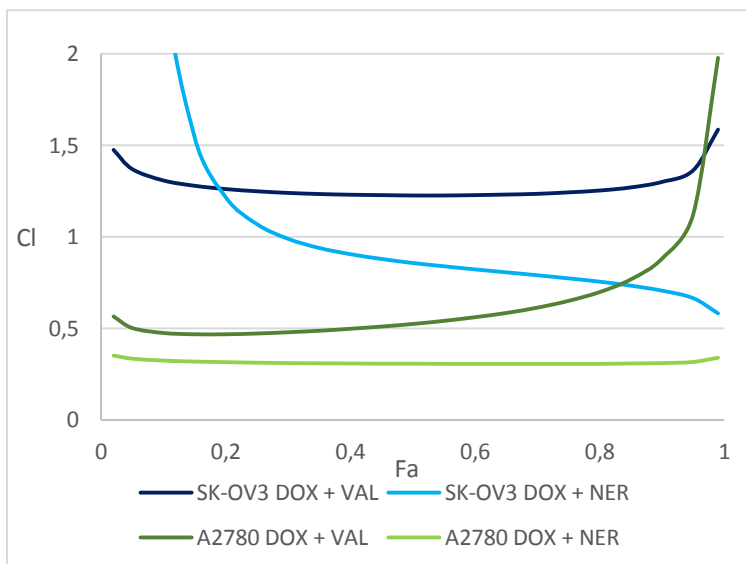
Vzájemný vztah mezi testovanými látkami byl stanoven pomocí software CalcuSyn, podle metody Chou–Talalaye. Do programu byly zadávány hodnoty antiproliferativního účinku doxorubicinu v kombinaci s valencenem nebo trans-nerolidolem, zjištěné v testu NRU. Výstupem je vztah kombinačního indexu (CI) na ovlivněné frakci buněk (Fa) (Obr. 21, 22 a 23).



Obr. 21 Závislost kombinačního indexu na ovlivněné frakci buněk po 24hodinové inkubaci, hodnoceno programem CalcuSyn



Obr. 22 Závislost kombinačního indexu na ovlivněné frakci buněk po 48hodinové inkubaci, hodnoceno programem CalcuSyn



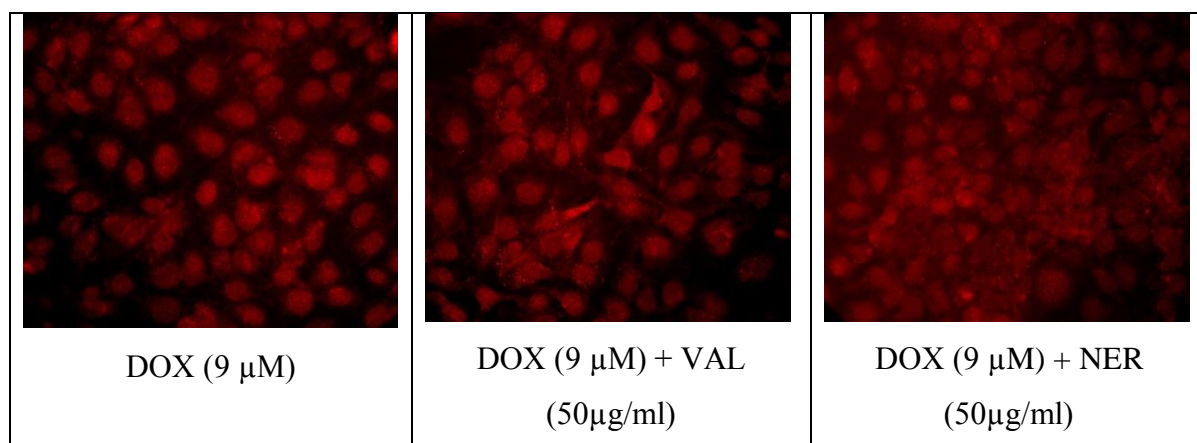
Obr. 23 Závislost kombinačního indexu na ovlivněné frakci buněk po 72hodinové inkubaci, hodnoceno programem CalcuSyn

Vztah mezi terpeny a doxorubicinem byl hodnocen v hodnotě $F_a = 0,9$ (vysoká frakce ovlivněných buněk), což je z terapeutického hlediska nejvýhodnější. U okrajových bodů může v simulaci dojít ke zkreslení, proto byl vztah mezi terpeny a doxorubicinem hodnocen v této hodnotě (Chou TC, 2006).

U linie SK-OV-3 byl po 24 hodinách expozice vztah mezi doxorubicinem a valencenem ($CI = 0,73$) i mezi doxorubicinem a trans-nerolidolem ($CI = 0,26$) synergický. Na linii A2780 po 24 hodinách působil valencen antagonisticky ($CI > 1$) a trans-nerolidol synergicky ($CI = 0,73$). Po 48hodinové expozici linie SK-OV-3 se valencen a trans-nerolidol chovaly antagonisticky. Na linii A2780 působil valencen ($CI = 0,56$) i trans-nerolidol ($CI = 0,27$) synergicky. Po 72 hodinách byl u linie SK-OV-3 vyhodnocen účinek valencenu jako antagonistický a účinek trans-nerolidolu jako synergický ($CI = 0,71$). Na linii A2780 působil jak valencen ($CI = 0,88$), tak trans-nerolidol ($CI = 0,31$) synergicky.

5.6 Fluorescenční mikroskopie

Buňky linie A2780 na Petriho miskách vhodných pro konfokální mikroskopii nerostly, proto nebylo možné je po inkubaci s testovanými látkami vyfotit. Buňky SK-OV-3 byly inkubovány se samotným doxorubicinem a poté s kombinací doxorubicinu a valencenu nebo trans-nerolidolu (Obr. 24).



Obr. 24 Fluorescenční mikroskopické fotografie buněčné linie SK-OV-3 po expozici doxorubicinem a kombinací s terpeny, foceno při zvětšení 40x na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E

Na výsledných snímcích nebyly pozorovány významné rozdíly v distribuci doxorubicinu do konkrétních buněčných kompartmentů při kombinaci s valencenem nebo trans-nerolidolem.

6. DISKUZE

Rostliny jsou perspektivním zdrojem nových léčivých látek, především díky své obrovské strukturní rozmanitosti. V posledních letech bylo přes 50% nových protinádorových látek rostlinného původu (Huang et al., 2012). Jednu z největších a nejrozmanitějších skupin přírodních látek tvoří terpeny. Podskupinou terpenů tvořenou 15uhlíkatým skeletem jsou seskviterpeny, které jsou hojně zastoupeny v silicích rostlin a jsou využívány v lidovém léčitelství, v průmyslu nebo v tradiční čínské medicíně. V posledních letech se experimentální studium zaměřuje na biologické účinky seskviterpenů. Byla popsána již celá řada účinků samostatných terpenů anebo silic z rostlin, které zahrnují např. protizánětlivé, antibakteriální a protinádorové působení. Možné využití seskviterpenů by mohlo spočívat v kombinaci s již stávajícími cytostatiky, u kterých by mohly zvyšovat účinnost, snižovat chemorezistenci nádorů nebo snižovat nežádoucí účinky cytostatik. Některé konkrétní kombinace již byly experimentálně studovány, např. seskviterpen β -karyofylen zvyšoval citlivost nádorových buněk k paklitaxelu, zerumbon potencoval cytotoxický účinek doxorubicinu a cisplatinu (shrnuto v Bártíková et al., 2014).

Trans-nerolidol a valencen jsou seskviterpeny, které byly studovány v této práci. Byla zkoumána jejich antiproliferační aktivita, vliv na produkci ROS a také jejich možné ovlivnění cytostatika doxorubicinu a vztah k němu. Jako experimentální model byly využívány nádorové buněčné linie lidského ovariálního karcinomu A2780, SK-OV-3. Buněčná linie SK-OV-3 vykazuje zvýšenou rezistenci k doxorubicinu, takže předmětem našeho zájmu bylo i to, jak dokáží seskviterpeny případně ovlivnit tuto rezistenci.

Trans-nerolidol a valencen jsou součástí celé řady silic rostlin, například v silici rostliny *Myrica rubra*, kterou studovala Langhasová et al. (2014). Tato silice vykazovala významné antiproliferační působení na nádorové buněčné linie HCT8, SW620, SW480, HT29 a CaCo-2. Tato silice byla podrobena rozboru a ten ukázal, že trans-nerolidol je zde zastoupen ve 2 % a valencen v 6 %. Z toho důvodu lze jen těžko výsledné protinádorové působení na základě této studie přičítat právě těmto dvěma terpenům. Silice rostliny *Citrus sinensis* obsahovala podle práce Liu et al. (2012) v 82% zastoupení valencen a působila významně cytotoxicky na buňky HeLa, s IC_{50} pod 20 μ g/ml. Prokázalo se také mírné antioxidační působení valencenu. Sperotto et al. (2013) studoval silici rostliny *Piper gaudichaudianum*, která obsahovala jako hlavní složku

trans-nerolidol. Silice vykazovala výrazný cytotoxický účinek na kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a autoři této studie přisuzují cytotoxický účinek zvýšené tvorbě ROS a následným zlomům v DNA kvasinek.

Na rozdíl od předchozích prací, které se zabývaly studiem kompletních silic z rostlin, práce Ambrože et al. (2015) se zaměřila na samostatné seskviterpeny ze silice rostliny *Myrica rubra*, včetně valencenu a trans-nerolidolu. Oba terpeny prokázaly antiproliferační účinek na buněčnou linii CaCo-2, navíc potencovaly účinek cytostatika doxorubicinu. Valencen i trans-nerolidol zvyšovaly akumulaci doxorubicinu do nádorových buněk. Valencen také vykazoval prooxidační působení, naopak trans-nerolidol působil antioxidačně v buněčné linii CaCo-2. V potkaních hepatocytech působily oba terpeny jako mírné antioxidanty.

Výsledky této práce se částečně shodují a částečně rozcházejí s dosud publikovanými pracemi. Můžeme ale vidět, že i publikované práce dochází k rozdílným výsledkům, např. co se týče prooxidačního/antioxidačního působení terpenů. Valencen v práci Liu et al. (2012) působil na nádorové buňky antioxidačně, naproti tomu v práci Ambrože et al. (2015) působil prooxidačně na nádorových buňkách a jako mírný antioxidant na buňkách nenádorových. Vždy je tedy nutné vzít v úvahu, na jakém buněčném modelu se experiment prováděl a také jakými metodami. V této práci testování probíhalo na buněčných liniích ovariálního karcinomu SK-OV-3 a A2780, na kterých valencen a trans-nerolidol doposud testovány nebyly.

Nejprve byla testována antiproliferační aktivita samotného doxorubicinu s cílem porovnat jeho působení na obě buněčné linie. SK-OV-3 linie je k doxorubicinu částečně rezistentní a z toho důvodu jsme očekávali její vyšší odolnost vůči tomuto cytostatiku. Tato domněnka se také potvrdila, protože linie A2780 byla k doxorubicinu výrazně citlivější a již v nízkých koncentracích doxorubicinu (0,05 a 0,1 μM) docházelo ke znatelnému antiproliferačnímu působení. Naproti tomu linie SK-OV-3 v těchto koncentracích nevykazovala téměř žádný pokles počtu živých buněk. Určitá odolnost linie SK-OV-3 se ukázala i v testech cytotoxicity obou terpenů, kdy linie A2780 byla opět citlivější a vykazovala výrazný pokles proliferace buněk při nižších koncentracích terpenů než linie SK-OV-3. Na obě linie měl vyšší antiproliferační účinek valencen.

Tvorba ROS je jedním z mechanismů účinků doxorubicinu, jak je popsáno i v teoretické části této práce. Z toho důvodu jsme očekávali jeho zvýšenou tvorbu při expozici buněk tímto cytostatikem. Vliv na tvorbu ROS buňkami po expozici valencenem nebo trans-nerolidolem se v literatuře různí a závisí na typu buněčné linie. U linie

SK-OV-3 působil doxorubicin prooxidačně a to v závislosti na koncentraci, tedy podle předpokladů. Oba terpeny působily na této linii antioxidačně. U linie A2780 působil pouze valencen v nejvyšší koncentraci prooxidačně, doxorubicin a trans-nerolidol nevykazovaly žádný vliv na tvorbu ROS. Tento test by bylo vhodné, alespoň u buněčné linie A2780 zopakovat nebo pozměnit podmínky (např. délka expozice látkou), protože minimálně doxorubicin by měl v testu prokázat určité prooxidační působení.

Ke kvantifikaci vzájemného vztahu látek se použil výpočet kombinačních indexů dle Chou TC (2006). Kombinační indexy v nejdélším čase 72 hodin jsou nejměrodatnější z terapeutického hlediska, protože i protinádorová léčba trvá delší dobu. Trans-nerolidol působil na obou buněčných liniích, ve vyšších $F_a(0,9)$, synergicky s doxorubicinem, to znamená, že může potencovat jeho účinek. Valencen působil s doxorubicinem synergicky na buněčné linii A2780, na linii SK-OV-3 působil antagonicky.

Zvýšení akumulace doxorubicinu do nádorových buněk je jedním z možných přístupů zvýšení jeho účinnosti anebo snížení chemorezistence. Trans-nerolidol v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ způsobil zvýšení akumulace doxorubicinu do buněk u obou buněčných linií. Při měření vlivu valencenu se objevily vysoké směrodatné odchylky a z toho důvodu není možné jeho vliv jednoznačně stanovit. Fluorescenční mikroskopie byla použita za účelem sledování vlivu terpenů na distribuci doxorubicinu uvnitř buňky. Petriho misky, na které se buňky kvůli následnému focení musí nasadit, se ukázaly jako nevhodné pro buněčnou linii A2780, které na nich vůbec nenarostly. Tento problém by se dal vyřešit např. modifikací povrchu misek potažením vrstvou kolagenu. U buněk SK-OV-3 nebyl pozorován rozdíl v distribuci doxorubicinu v buňkách po expozici valencenu nebo trans-nerolidolu.

7. ZÁVĚR

- Byl prokázán antiproliferační účinek doxorubicinu na obě testované buněčné nádorové linie, tedy na SK-OV-3 i A2780. Antiproliferační aktivita byla koncentračně závislá. Citlivější k doxorubicinu byla linie A2780, kde docházelo k významnému poklesu proliferace buněk při nižších koncentracích doxorubicinu než u linie SK-OV-3.
- Byl prokázán antiproliferační účinek valencenu i trans-nerolidolu na obě testované buněčné linie. Citlivější k oběma terpenům byla linie A2780. Větší antiproliferační aktivitu k oběma buněčným liniím prokázal valencen. Trans-nerolidol ovlivnil linii SK-OV-3 jen v menší míře, po 72hodinové expozici nejvyšší koncentrací nezpůsobil pokles počtu živých buněk pod 70 %.
- Zvýšená produkce ROS byla pozorována po ovlivnění buněčné linie SK-OV-3 doxorubicinem a byla koncentračně závislá. Terpeny na tuto buněčnou linii působily spíše antioxidačně. U linie A2780 doxorubicin a valencen neovlivňoval tvorbu ROS, trans-nerolidol v nejvyšší koncentraci tvorbu ROS zvyšoval.
- Výpočet kombinačního indexu prokázal jak synergické tak antagonické vztahy terpenů k doxorubicinu, které se lišily podle doby expozice testovanými látkami. Z terapeutického pohledu nejspolehlivější délka expozice 72 hodin prokázala u linie SK-OV-3 vztah mezi valencenem a doxorubicinem antagonický a mezi trans-nerolidem a doxorubicinem synergický. Na linii A2780 působil valencen i trans-nerolidol ve vztahu k doxorubicinu synergicky.
- Trans-nerolidol v nejvyšší koncentraci způsobil zvýšenou akumulaci doxorubicinu do buněk obou buněčných linií. Valencen vliv na akumulaci doxorubicinu do buněk neměl, ale vzhledem k velkým směrodatným odchýlkám měření, není možné jeho potenciální účinek vyloučit.
- Fluorescenční mikroskopií nebyl prokázán vliv terpenů na distribuci doxorubicinu do buněčných kompartmentů u linie SK-OV-3

8. Seznam zkratek

ARE – antioxidant response element
bax – Bcl2-associated X protein
bak 1 – Bcl2 antagonist/killer 1
bcl-2 – antiapoptotický gen („B-cell lymphoma 2“)
BHT – butylhydroxytoluen
BRCA1, BRCA 2 – tumorsupresorové geny („breast cancer“)
CA 125 – onkogenní marker („cancer antigen 125“)
CAT - katalasa
Cdk4 – cyklin dependentní kinasa 4
CI – kombinační index
COX-2 – cyklooxygenasa 2
DCF – 2',7'-dichlorofluorescein
DMSO – dimethylsulfoxid
DOX – doxorubicin
EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
ELAM-1 - endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1
Fa – ovlivněná frakce buněk
FBS – fetální bovinní sérum
FPP - farnesyl pyrofosfát
GPx – glutathion-peroxidasa
H₂DCFDA – 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
HE 4 – onkogenní marker („lidský epididymální protein-4“)
HMBG1 – high mobility group box 1 protein
HO-1 – hem-oxygenasa 1
HPLC – vysokoúčinná kapalinná chromatografie
ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1
IL-1, IL-6, IL-8 – interleukin 1, 6, 8
iNOS – indukovatelná NO-syntasa
Keap1 - Kelch-like erythroid cell-derived protein
MIC – minimální inhibiční koncentrace
MMP-9 – matrixová metalopeptidasa 9

NADPH - nikotinamidadeninukleotidfosfát
NER – trans-nerolidol
NF- κ B – nukleární faktor kappa aktivující B-buňky
NR – neutrální červeň
Nrf2 – nuclear factor erythroid 2–related factor 2
NRU – Neutral Red Uptake
NSAID – nesteroidní antiflogistika
ORAI1 – calcium release-activated calcium modulator 1
PARP – poly(ADP-ribose)polymerasa
PBS – fosfátový pufovaný fyziologický roztok
Ras – onkogen (podle prvního objevu „Rat sarcoma“)
Rb protein – retinoblastomový protein
ROMA I, ROMA II – risk of ovarian malignancy algorithm
ROS – reaktivní formy kyslíku
SOD – superoxid-dismutasa
TFI – treatment free interval
TNF- α – tumor nekrotizující faktor alfa
TRPV1 – transient receptor potential cation channel subfamily V member 1
VAL – valencen
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor

9. Seznam literatury

ADAM, Z, M KREJČÍ a J VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-715-8.

AMBROŽ, M, I BOUŠOVÁ, A SKARKA, V HANUŠOVÁ, V KRÁLOVÁ, B SZOTÁKOVÁ a L SKÁLOVÁ. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules*. 2015, **20**(8), 15343-15358.

AMBROŽ, M, V HANUŠOVÁ, A SKARKA, I BOUŠOVÁ, V KRÁLOVÁ, L LANGHASOVÁ a L SKÁLOVÁ. Essential Oil from *Myrica rubra* Leaves Potentiated Antiproliferative and Prooxidative Effect of Doxorubicin and its Accumulation in Intestinal Cancer Cells. *Planta Medica*. 2016, **82**(1-02), 89 - 96.

AMORIM, MH, RM GIL DA COSTA, C LOPES a MM BASTOS. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology*. 2013, **43**(7), 559 - 579.

BÁRTÍKOVÁ, H, V HANUŠOVÁ, L SKÁLOVÁ, M AMBROŽ a I BOUŠOVÁ. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014, **14**(22), 2478 - 2494.

BORK, PM, ML SCHMITZ, M KUHN, C ESCHER a M HEINRICH. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Letters*. 1997, **402**, 85 - 90.

BRACA, A, T SICILIANO, M D'ARRIGO a MP GERMANÒ. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*. 2008, **79**(2), 123 - 125.

FERREIRA, FM, CM PALMEIRA, MM OLIVEIRA, D SANTOS, AM SIMÕES, SM ROCHA a MA COIMBRA. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicology in Vitro*. 2012, **26**(2), 189 - 196.

FÍNEK, J. Významný pokrok v léčbě ovariálního karcinomu po 20 letech. *Praktická gynekologie*. 2012, **16**, 54 - 58.

FROHWITTER, J, SA HEIDER, P PETERS-WENDISCH, J BEEKWILDER a VF WENDISCH. Production of the sesquiterpene (+)-valencene by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2014, **191**, 205 - 213.

HALÁMKOVÁ, J, K PETRÁKOVÁ, J TOMÁŠEK a I KISS. Specifika ovariálního karcinomu u pacientek s mutací BRCA: léčba karcinomu ovaria inhibitory PARP. *Praktická gynekologie*. 2014, **18**(1), 54 - 59.

HALL, IH, KH LEE, CO STARNES, Y SUMIDA, RY WU, TG WADDELL, JW COCHRAN a KG GERHART. Anti-Inflammatory Activity of Sesquiterpene Lactones and Related Compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1979, **68**(5), 537 - 542.

HALL, IH, CO STARNES, KH LEE a TG WADDELL. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1980, **69**(5), 537 - 543.

HANUŠOVÁ, V, I BOUŠOVÁ a L SKÁLOVÁ. Possibilities to increase the effectiveness of doxorubicin in cancer cells killing. *Drug Metabolism Reviews*. 2011, **43**(4), 540 - 557.

HUANG, M, JJ LU, MQ HUANG, JL BAO, XP CHEN a YT WANG. Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2012, **21**(12), 1801 - 1818.

CHOU, TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*. 2006, **58**(3), 621 - 681.

IRMGARD, Merfort. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. *Current Drug Targets*. 2011, **12**(11), 1560 - 1573.

JANČÁRKOVÁ, N, M KRKAJCOVÁ, M JANASHIA, P FREITAG, J DUŠKOVÁ a D CIBULA. Význam chromozomálních změn ve vztahu k prognostickým faktorům u zhoubných nádorů vaječníku a děložního hrdla. *Česká gynekologie*. 2008, **73**(2), 79 - 86.

JIN, JH, DU LEE, YS KIM a HP KIM. Anti-allergic Activity of Sesquiterpenes from the Rhizomes of *Cyperus rotundus*. *Archives of Pharmacal Reseach*. 2011, **34**(2), 223 - 228.

KIM, HJ, N HAWKE a AS BALDWIN. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death and Differentiation*. 2006, **13**(5), 738 - 747.

KIM, SL, KT TRANG, SH KIM, IH KIM, SO LEE, ST LEE, DG KIM a SW KIM. Parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of colorectal cancer cells by inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis. *International Journal of Oncology*. 2012, **41**(4), 1547 - 1553.

KLENER, P. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.

KLOPELL, FC, M, LEMOS, JP SOUSA, E COMUNELLO, EL MAISTRO a JK BASTOS. Nerolidol, an Antiulcer Constituent from the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2007, **62**, 537 - 542.

LANGHASOVA, L, V HANUSOVA, J REZEK, B STOHANSLOVA, M AMBROZ, V KRALOVA, T VANEK a L SKALOVA. Essential oil from *Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Industrial Crops and Products*. 2014, **59**, 20 - 26.

LAPCZYNSKI, A, SP BHATIA, CS LETIZIA a AM API. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**, 247 - 250.

LEDERMANN, JA, FA RAJA, C FOTOPOULOU, A GONZALEZ-MARTIN, N COLOMBO a C SESSA. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*.

2013, **24**, 24 - 32.

LEE, CH, YT JEON, SH KIM a YS SONG. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *BioFactors*. 2007, **29**(1).

LEE, WL, JY HUANG a LF SHYUR. Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013.

LI, X, L WU, W LIU, Y JIN, Q CHEN, L WANG, X FAN a Y CHENG. A Network Pharmacology Study of Chinese Medicine QiShenYiQi to Reveal Its Underlying Multi-Compound, Multi-Target, Multi-Pathway Mode of Action. *PLoS ONE*. 2014, **9**(5).

LINCOVÁ, D a H FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-726-2168-8.

LI-WEBER, M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Letters*. 2013, **332**(2), 304 - 312.

LIU, K, Q CHEN, Y LIU, X ZHOU a X WANG. Isolation and biological activities of decanal, linalool, valencene, and octanal from sweet orange oil. *Journal of Food Science*. 2012, **77**(11), 1156 - 1161.

LÜLLMANN, H, K MOHR a M WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.

MAJIRSKÝ, KUBECOVÁ a TIKOVSKÝ. Postavení cílené léčby v managementu ovariálního karcinomu. *Česká gynekologie*. 2013, **78**(4), 347 - 350.

MINOTTI, G, P MENNA, E SALVATORELLI, G CAIRO a L GIANNI.

Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 2004,**56**(2), 185 - 229.

MOON, DO, YH CHOI, SK MOON, WJ KIM a GY KIM. Gossypol decreases tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via suppression of NF- κ B activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2011, **49**(4), 999 - 1005.

NAM, JH, DY NAM a DU LEE. Valencene from the Rhizomes of *Cyperus rotundus* Inhibits Skin Photoaging-Related Ion Channels and UV-Induced Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells. *Journal of Natural Products*. 2016.

PAHL, HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999, **18**(49), 6853 - 6866.

PÉRES, VF, DJ MOURA, AR SPEROTTO, FC DAMASCENO, EB CARAMÃO, CA ZINI a J SAFFI. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, **47**(6), 2389 - 2395.

POLLARD, TD a WC EARNSHAW. *Cell biology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, c2008. ISBN 978-1-4160-2255-8.

POVÝŠIL C a I ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-494-2.

SHEIBANI, E, SE DUNCAN, DD KUHN, AM DIETRICH a SF O'KEEFE. SDE and SPME Analysis of Flavor Compounds in Jin Xuan Oolong Tea. *Journal of Food Science*. 2016, **81**(2), 348 - 358.

SCHOLTMEIJER, K, K CANKAR, J BEEKWILDER, HA WÖSTEN, LG LUGONES a D BOSCH. Production of (+)-valencene in the mushroom-forming fungus *S. commune*. *Applied Genetics And Molecular Biotechnology*. 2014, **98**(11), 5059 - 5068.

SCHUMACKER, PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*. 2006, **10**(3), 175 - 176.

SPEROTTO, AR, DJ MOURA, VF PÉRES, FC DAMASCENO, EB CARAMÃO, JA HENRIQUES a J SAFFI. Cytotoxic mechanism of Piper gaudichaudianum Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, **57**, 57 - 68.

SUN, Y, DK ST CLAIR, Y XU, PA CROOKS a WH ST CLAIR. A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells. *Cancer Research*. 2010, **70**(7), 2880 - 2890.

TSOYI, K, HJ JANG, YS LEE, 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, **137**(3), 1311 - 1317.

VINHOLES, J, A RUDNITSKAYA, P GONÇALVES, F MARTEL, MA COIMBRA a SM ROCHA. Hepatoprotection of sesquiterpenoids: a quantitative structure-activity relationship (QSAR) approach. *Food Chemistry*. 2014, **146**, 78 - 84.

WONG, HR a IZ MENENDEZ. Sesquiterpene Lactones Inhibit Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999, **262**(2), 375 - 380.

Internetové zdroje:

web 1: SVOD Analýza. *Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR - analýzy* [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor>

web 2: Online Analysis. *IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER* [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>

web 3: Modrá kniha: Zhoubný novotvar ovarií a tuby (C56-57). *Linkos: Stránky České onkologické společnosti JEP*[online]. [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/informace-pro-praxi/modra-kniha/>

web 4: (+)-Valencene analytical standard | Sigma-Aldrich. *Czech Republic / Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-03-24]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/06808?lang=en@ion=CZ>

web 5: Trans-Nerolidol analytical standard | Sigma-Aldrich. *Czech Republic / Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/18143?lang=en@ion=CZ>

web 6: SK-OV-3 Cell Line human | Sigma-Aldrich. *Czech Republic / Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/91091004?lang=en@ion=CZ>

web 7: SK-OV-3: Human Ovarian Cancer Cell Line | Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-ovarian-cell-line-sk-ov-3>

web 8: Sigma 93112519, A2780 Cell Line human ovarian carcinoma. *Czech Republic / Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/93112519?lang=en@ion=CZ>