

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**



Iva Malátová

Využití cucurbitacinu D pro léčbu nádorových onemocnění

Use of cucurbitacin D for cancer treatment

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Milada Šírová, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Miladě Šírové za cenné rady a vstřícnost. Dále patří dík mé rodině a příteli za podporu při psaní této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7. 5. 2018

Podpis:

ABSTRAKT

Cucurbitaciny jsou vysoce oxidované triterpenoidy, které se běžně nachází v rostlinách, a to především u čeledi *Cucurbitaceae*, tykvovité. Cucurbitacinů je sedmnáct druhů a každý z nich má ještě své deriváty. Cucurbitaciny s nejvýznamnější protinádorovou aktivitou jsou B, D, E a I. Z nich se v rostlinách nejčastěji vyskytují cucurbitacin B a D. Tato práce se pak zaměřuje zejména na cucurbitacin D.

Cucurbitacin D často v nádorových buňkách indukuje apoptózu, zastavuje buněčný cyklus a tím zabraňuje proliferaci buněk. Indikátory těchto procesů jsou snížená množství proteinů Bcl-xL, Bcl-2, p21, p27 a cyklinů A a B. Hlavním účinkem cucurbitacinu D na nádorové buňky je inhibice STAT3 signální dráhy. Ať už tuto dráhu ovlivňuje na úrovni fosforylace, dimerizace, nebo translokace STAT3 do jádra, výsledkem je zablokování transkripce genů, kterou STAT3 spouští. To jsou především geny ovlivňující růst nádorů, angiogenezi, invazi nádorových buněk a únik před imunitou. Cucurbitacin D má vliv i na děje buňky, jako je transkripční faktor NF- κ B nebo funkce enzymového komplexu proteazomu a inflamazomu. Současné znalosti cucurbitacinu D a mechanismů jeho účinku ale nejsou zatím dostatečné pro jeho využití jako protinádorového léčiva, i když jsou výsledky testování velice nadějně.

Klíčová slova: Cucurbitaciny, cucurbitacin D, nádorová onemocnění, STAT3, proteazom, inflamazom, imunitní systém, imunomodulace

ABSTRACT

Cucurbitacins are highly oxidized triterpenoids commonly found in plants, especially in the family *Cucurbitaceae*. There are seventeen types of cucurbitacins and each of them has its derivatives. Cucurbitacins with the most prominent antitumor activity are B, D, E and I. Of these, cucurbitacin B and D are the most common in plants. This work focuses mainly on cucurbitacin D.

Cucurbitacin D often induces apoptosis in tumor cells, cell cycle arrest and thereby stops cell proliferation. Indicators of these processes are reduced levels of Bcl-xL, Bcl-2, p21, p27 and cyclins A and B proteins. The main effect of cucurbitacin D on tumor cells is the inhibition of the STAT3 signaling pathway. Whether this pathway is affected at the level of phosphorylation, dimerization, or STAT3 translocation into the nucleus, the result is blocking transcription of genes, which are activated thanks to STAT3 pathway. These are primarily genes that affect tumor growth, angiogenesis, cell invasion, and immune escape. Cucurbitacin D also affects other cell components and processes, such as the NF- κ B transcription factor, the enzyme complex of proteasome and inflammasome.

However, current knowledge of cucurbitacin D and its mechanism of action is not yet sufficient for its use as an antitumor drug, although the results of its testing are very promising.

Key words: Cucurbitacins, Cucurbitacin D, cancer, STAT3, proteasome, inflammasome, immune system, immunomodulation

Obsah

1	Úvod	1
2	Cucurbitaciny	1
2.1	Historie.....	3
2.2	Tradiční medicína	4
2.3	Druhy cucurbitacinů	5
3	Cucurbitacin D.....	7
3.1	Indukce apoptózy.....	8
3.1.1	Apoptóza.....	8
3.1.2	Indukce apoptózy cucurbitacinem D	9
3.2	Autofagie	9
3.3	Zastavení buněčného cyklu.....	11
3.4	STAT3 a NF-κB.....	11
3.4.1	STAT3	11
3.4.2	NF-κB	12
3.4.3	Vliv cucurbitacinu D na STAT3 a NF-κB.....	13
3.5	Proteazom	16
3.6	Inflamazom	17
3.7	Hepatoprotektivní potenciál cucurbitacinu D	19
3.8	Metabolismus.....	20
4	Závěr.....	21
5	Seznam použitých zkratek	22
6	Přehled použité literatury.....	24

1 Úvod

Počet dětských i dospělých pacientů, kterým byla diagnostikována rakovina, se setrvale zvyšuje. Většina lidí má ve svém okolí někoho, kdo tímto onemocněním prošel, nebo s ním stále bojuje. Proto také roste zájem veřejnosti i vědců o nová léčiva proti rakovině a zvyšuje se množství výzkumných týmů po celém světě, které pracují na vývoji, vyhledávání a testování nových látek.

Současně se zájmem o výzkum protirakovinných léčiv se znovu obrací pozornost vědců k látkám přirozeného původu, zejména těm, které jsou součástí rostlin. Na mnohé z nich se během staletí zapomnělo, ale pro využití v klinické praxi mají tyto přírodní látky oproti syntetickým mnoho výhod. Většinou jsou mnohem méně toxické pro organismus, tělo je dokáže lépe zpracovat a také bývá jejich účinek ověřen mnoha lety jejich používání jako léčivých rostlin.

Skupinou přírodních látek, které se v posledních několika desetiletích znovu testují v laboratořích, jsou cucurbitaciny. Vyskytují se v řadě druhů a existuje množství jejich derivátů. Ukazuje se, že pro léčbu rakoviny je nejzajímavější cucurbitacin D a možná ještě tři další, cucurbitacin B, E a I. Po prvních výzkumech, kdy se potvrdil protirakovinný účinek cucurbitacinu D, je ovšem potřeba další pro pochopení mechanismů, které vedou k redukci růstu nebo vyléčení různých typů nádorů. Zatím dostupné studie porovnávají vlastnosti cucurbitacinu D s již používanými léčivy a testují většinou jeho vliv na buněčné linie odvozené od nádorů *in vitro*, i na *in vivo* systém.

Tato práce se soustředí na zatím popsané účinky cucurbitacinu D a jejich možné mechanismy a snaží se poukázat na místa, kde by bylo vhodné poznatky ještě více rozšířit, aby se v budoucnu mohl cucurbitacin D využít jako účinné léčivo rakovinných onemocnění.

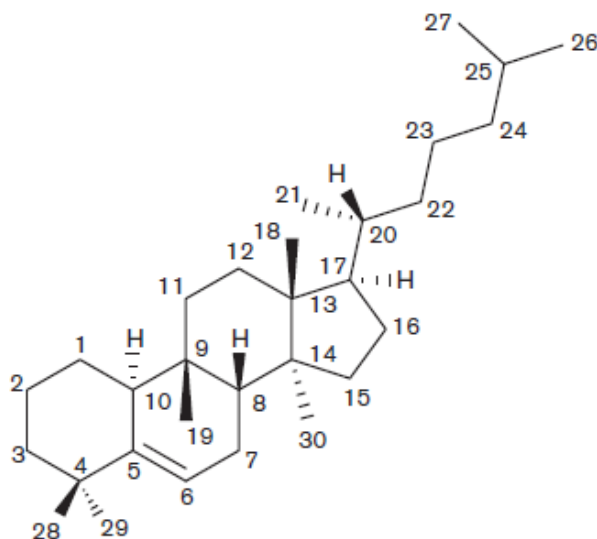
2 Cucurbitaciny

Cucurbitaciny jsou přírodní látky, které získaly svůj název podle čeledi rostlin, u kterých byly poprvé popsány.² Nejčastěji se vyskytují právě v čeledi *Cucurbitaceae* (tykvovité), ale i u mnoha dalších rostlin³. Příklady rostlin s obsahem cucurbitacinů mohou být: drchnička

rolní (*Anagallis arvensis*), tykvice stříkavá (*Ecballium elaterium*), meloun cukrový (*Cucumis melo*) nebo *Melonispedicellus*.⁴ V rostlinné říši jsou cucurbitaciny velice rozšířené, rostlinám mohou sloužit jako ochrana před fytofágními bezobratlými.¹ Nejčastěji bychom v rostlinách našli cucurbitacin B a D, těsně za nimi cucurbitacin E, dále pak G, H a I.⁵

Mnoho rostlin, které obsahují některý z cucurbitacinů, se používá už stovky let v lidovém léčitelství. Jejich účinky využívají lidé po celém světě, od Latinské Ameriky³ přes Tunisko⁶ až po východní Asii.⁷ V lidové medicíně jsou těmto rostlinám připisovány různé účinky, a proto se s jejich pomocí léčí různé nemoci od žloutenky, cirhózy jater, přes využití projímavých, protizánětlivých a antimikrobiálních účinků⁵, až po léčbu příznaků diabetu.⁷

Strukturně jsou cucurbitaciny vysoce oxidované triterpenoidy, obsahují tetracyklické jádro cucurbitanu, konkrétně 19-(10->9 β)-abeo-10- α -lanost-5-en, také známý jako 9 β -methyl-19-norlanosta-5-en (viz obrázek 1). Existují různé druhy cucurbitacinů, které se více či méně liší od společného jádra. Celkem je zatím známo nejméně sedmnáct hlavních druhů cucurbitacinu, od cucurbitacinu A až po cucurbitacin T, se stovkami různých derivátů.²



The basic skeleton of cucurbitacins – cucurbitane-type tetracyclic triterpenoids.

Obrázek 1: Základní struktura cucurbitacinů (převzato z: Chen, X.P., 2012¹)

Cucurbitaciny mají významné farmakologické vlastnosti, prověřené lidovým léčitelstvím po staletí po celém světě. Jsou známy pro svou hořkost a toxicitu². Hlavními účinky cucurbitacinů je jejich protizánětlivá, protinádorová a hepatoprotektivní aktivita.¹ Cucurbitaciny B, D, E a I a jejich deriváty jsou studovány pro vysokou protinádorovou aktivitu. Vedle nich jsou ještě cucurbitaciny F, O, P a Q se svými deriváty, jejichž protinádorová aktivita je oproti první skupině nižší.² V poslední době byly objeveny synergické protinádorové účinky při použití cucurbitacinů současně s jinými léčivými, jako je docetaxel, methotrexát⁸ nebo doxorubicin⁹.

2.1 Historie

První publikace zmiňující cucurbitaciny a jejich protinádorovou aktivitu jsou z 60. let 20. století.^{2; 10} Poté pozornost vědců na dvě desetiletí utichla, to mohlo být způsobené například tím, že cucurbitacin má nízký terapeutický index.² Terapeutický index je kvantitativní vyjádření vztahu mezi účinností a bezpečností léčiva. Pro bezpečnou léčbu je preferován vysoký terapeutický index, zatímco nízký terapeutický index se akceptuje jen v případech, kdy je léčeno život ohrožující onemocnění a nejsou jiné možnosti léčby.¹¹

Dalším důvodem může být i fakt, že se v průběhu let objevily případy otravy lidí cucurbitacinem.¹² Dřívější výzkumy také využívaly rostlinné extrakty přímo, bez purifikace aktivní látky či látek, a nepoužívaly standardizované metody pro získávání produktů ani pro samotné pokusy.¹³

Na konci 80. let minulého století se díky kultivaci lidských nádorových buněčných linií NCI60 znovu objevil zájem vědců věnovat se výzkumu léčiv rostlinného původu, mezi které cucurbitacin patří.^{14; 15} Linie NCI60 byly kultivované ve Spojených státech amerických v NCI (National Cancer Institute) jako nástroj pro výzkum léčiv, který měl nahradit zvířecí transplantabilní nádorové modely. Rychle se začal využívat jako bohatý zdroj informací o mechanismech inhibice růstu a zabíjení nádorových buněk.¹⁴ Využitím těchto buněčných linií dostali vědci standardizovaný nástroj pro další výzkum a díky tomu se v 90. letech začaly znovu objevovat také studie zabývající se cucurbitaciny.¹³

2.2 Tradiční medicína

Dávno před tím, než lidé pojmenovali, popsali a začali studovat cucurbitacin, rostliny s jeho obsahem byly hojně využívány v lidovém léčení po celém světě.

Citrullus lanatus var. *citroides* z čeledi *Cucurbitaceae*, rostlina příbuzná lubenici obecné, na které dozrávají vodní melouny, obsahuje cucurbitacin L 2-O- β -glukosid.¹⁶

Citrullus colocynthis z čeledi *Cucurbitaceae* se vyskytuje v různých pouštních oblastech po celém světě.¹⁷ Je to malá plazivá rostlina, která má hladké žluté kulovité plody. Tyto plody jsou stejně jako všechny části rostliny velmi hořké, proto jsou známé také pod názvem hořké jablko.¹⁸ V tradiční medicíně je rostlina využívána v různých zemích Afriky a Asie, kde sloužila hlavně k léčbě zánětlivých onemocnění, artritidy, diabetu nebo bolestí žaludku.^{6; 19} Dále bychom ji mohli najít jako součást léčení Řeků, Římanů a Arabů.¹⁸ V Indii s její pomocí domorodí obyvatelé léčili bakteriální infekce, tuberkulózu a další respirační onemocnění.¹⁸ Kromě dalších látek obsahuje *C. colocynthis* cucurbitaciny A, B, E, I, J, K, L a jejich glykosidy.²⁰

Ecballium elaterium z čeledi *Cucurbitaceae* je trvalka vyskytující se především ve Středomořské pánvi.¹² Bylinná medicína tuto rostlinu doporučuje použít k léčbě nemocí jako je chronická sinusitida, jaterní cirhózy, zánětlivá onemocnění, revmatismus a infekce^{21; 22}. Látka, která způsobuje protizánětlivé účinky *E. elaterium*, je cucurbitacin B²¹, díky němu jsou všechny části rostliny, především plody, toxické.¹²

Wilbrandia ebracteata z čeledi *Cucurbitaceae* je jihoamerická rostlina, v Brazílii známá jako „Taiuiá“. Její kořeny se používají k léčbě revmatických onemocnění. Nejvíce je v nich zastoupen dihydrocucurbitacin B.²³

Bolbostemma paniculatum z čeledi *Cucurbitaceae* roste především v Číně, a to v provinciích Shaanxi, Shanxi, Henan a Shandong. Je jednou z léčivých rostlin, které můžeme najít v dodatku ke sborníku *Materia Medica*. Je zde popsána jako lék na léčbu nádorů, bradavic a je doporučena k detoxikaci. V cibulích *B. paniculatum* bylo popsáno několik druhů cucurbitacinu.²⁴

2.3 Druhy cucurbitacinů

Mezi hlavní druhy cucurbitacinů, které jsou známé pro svou vysokou protinádorovou aktivitu, patří kromě cucurbitacin D, kterému se věnuje tato práce, i cucurbitacin B, E a I. Některé z jejich mechanismů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 – Některé účinky cucurbitacinů B, E a I na nádorové buňky

Cucurbitacin B	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibice JAK/STAT dráhy - Indukce apoptózy ovlivněním JAK2/STAT3 a MAPK 	Zheng, Q. et al., 2014 ²⁵
	<ul style="list-style-type: none"> - Indukce apoptózy pomocí ROS-závislého mechanismu, který není závislý na STAT3 	Yasuda, S. et al., 2010 ²⁶
	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibice TNF-indukované exprese antiapoptotických proteinů závislých na NF-κB a transkripční aktivity RelA/p65 - Inhibice fosforylace ATP citrát lyázy, která je významná pro metabolismus nádoru - Štěpení PARP, akumulace sub-G1/G0 populace buněk a aktivace kaspázy-3 a -7 	Chiu, M.H.; Gao, J., 2003 ²⁷
	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibice HER2 a integrinové signalizace 	Gupta, P.; Srivastava, S.K., 2014 ²⁸
	<ul style="list-style-type: none"> - Zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi - Indukce apoptózy snížením exprese signálních molekul spojených s Wnt, jako jsou B-katenin, cyklin D1, galektin-3, c-Myc 	Dakeng, S. et al., 2012 ²⁹

	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibice aktivace faktoru HIF-1α, který je indukován hypoxií 	Ma, J. et al., 2014 ³⁰
Cucurbitacin E	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibice proliferace buněk díky zvýšené expresi tumor supresoru meninu a tím supresi Wnt/B- katenin signalizace 	Feng, H. et al. 2014 ³¹
	<ul style="list-style-type: none"> - Indukce apoptózy díky zvýšené expresi zkráceného BID a Fas/CD95 - Ztráta membránového potenciálu mitochondrií $\Delta\psi$ (m) vedoucí k uvolnění aktivačního faktoru apoptotické proteázy 1, cytochromu c a apoptózu indukujícího faktoru - Aktivace kaspázy-3, -8 a -9 - Zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi ovlivněním STAT3/p53/p21 signalizace 	Huang, W.W. et al., 2012 ³²
	<ul style="list-style-type: none"> - Zastavení translokace NF-κB do jádra, snížení exprese TNFα a IL-1β 	Qiao, J. et al., 2013 ³³
	<ul style="list-style-type: none"> - Blokace migrace, invaze nádorových buněk a snížení tvorby metastáz 	Zhang, T. et al, 2012 ³⁴
Cucurbitacin I	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibice JAK/STAT3 	Van Kester, M.S. et al., 2008 ³⁵
	<ul style="list-style-type: none"> - Indukce apoptózy pomocí indukce štěpení PARP a kaspáz-3, -7, -8, -9 	Kim, H.J.; Park, J.H.; Kim, J.K., 2014 ³⁶
	<ul style="list-style-type: none"> - Suprese STAT3 dráhy pomocí 	Chang, C.J. et al., 2012 ³⁷

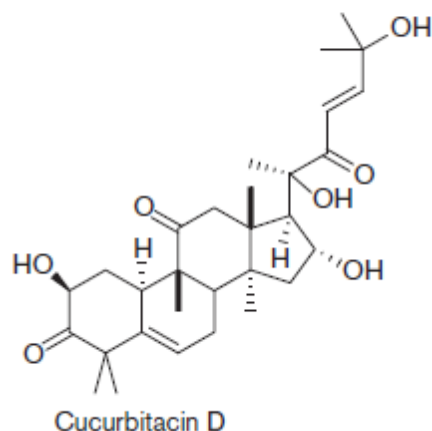
	exprese Bcl-2 a survivinu	
	- Inhibice tyrosin kinázy, regulace degradace proteinů proteazomem, včetně JAK3 a nukleophosmin-ALK	Shi, X.Z. et al., 2006 ³⁸

(zkratky uvedené v tabulce jsou vysvětleny v seznamu zkratk)

3 Cucurbitacin D

Některé druhy cucurbitacinů se nyní studují v souvislosti s jejich protinádorovou aktivitou, při níž se ovšem mohou uplatňovat různé mechanismy. Nejdůležitějšími cíli v buňkách jsou aktin, signální dráha STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), cyklooxygenáza aj.¹ Další kapitoly v této práci se zaměřují zejména na jeden z cucurbitacinů, a to cucurbitacin D (synonymum: elatericin), (viz obrázek 2). Jsou zde shrnuty zatím známé projevy jeho účinku na nádorové buňky. Bohužel, v pracích, které byly zatím k tomuto tématu publikovány, jsou většinou popsány jen efekty, které cucurbitacin D způsobuje. Většinu konkrétních mechanismů, jakými cucurbitacin D působí na buňky a molekuly v nich, bude teprve potřeba ověřit dalšími výzkumy. Publikací, které se věnují cucurbitacinu D, zatím není mnoho.

Některé z dosud popsaných efektů cucurbitacinu D na nádorové buňky jsou: indukce apoptózy, zastavení buněčného cyklu, ovlivnění signálních drah STAT3 a NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), vliv na funkci proteazomu a inflamazomu.



Obrázek 2: Struktura cucurbitacinu D (převzato z: Chen X.P., 2012¹)

3.1 Indukce apoptózy

Častým efektem cucurbitacinu D na nádorové buňky je indukce programované buněčné smrti, apoptózy.

3.1.1 Apoptóza

Apoptotické buňky mají jiný charakter³⁹, než jaký můžeme vidět u buněk nekrotických. Nekróza je buněčná smrt provázená buněčným edémem, vakuolizací, karyolýzou a vznikem zánětlivých změn v okolí. Je charakterizována porušením plazmatické membrány a uvolněním obsahu cytosolu do mezibuněčného prostoru.⁴⁰ Naproti tomu apoptotické buňky se při apoptóze smršťují, podobně jako jejich organely, dochází ke snižování koncentrace iontů, fragmentaci DNA (deoxyribonucleic acid) a formování dynamických výčnělků plazmatické membrány. Při apoptóze se vytvoří na povrchu buňky „puchýře“ („blebbing“), kterými se poté obalí obsah cytoplasmy do menších apoptotických tělísek.³⁹

Apoptotické buňky a tělíška vysílají tzv. find me/eat me signály, jako jsou nukleotidy a fosfatidylserin. To umožní detekci a následné pohlcení apoptotických buněk nebo tělísek profesionálními fagocyty ještě před tím, než by došlo k prasknutí plazmatické membrány.⁴¹ Tímto způsobem se rychle uklidí mrtvé buňky z těla bez aktivace zánětlivých změn v okolí umírajících buněk a bez jejich poškození.⁴² Mezi apoptózou a nekrózou je však neostrá hranice. Za některých okolností, např. je-li apoptóza indukována zcela určitými stimuly, mezi které patří některá cytostatika (např. mitoxantron, doxorubicin), dochází k apoptóze, která je imunogenní, tj. jsou produkovány molekuly, které představují signál nebezpečí a je indukována maturace dendritických buněk.^{43; 44; 45}

Apoptóza je programovaný, fyziologický proces, který je přísně regulován a využívá enzymatické regulační kaskády buňky. Uplatňují se zde tzv. kaspázy, které se nacházejí v buňce v neaktivním stavu a jsou aktivovány proapoptotickým signálem. Jednou ze základních charakteristik nádorových buněk je snížená citlivost vůči těmto signálům. Při selhání regulačních mechanismů apoptózy se může rozvinout maligní proces díky zvýšení exprese některých genů, jako jsou Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) a Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large). Změny v regulaci apoptózy se mohou vyskytovat i při nenádorových procesech v organismu, např. při overexpresi Bcl-2 se prodlužuje přežití neutrofilů během infekcí, a to vede ke zvýšené intenzitě zánětu.⁴⁶

Pro měření množství apoptotických buněk se často využívá průtoková cytometrie a značení pomocí PI (propidium jodid). PI se váže stechiometricky na DNA a poté se měří jeho fluorescence. Apoptotické buňky s naštěpenou DNA mají na průtokovém cytometru široký hypodiploidní peak, nazývaný sub G1. Tím se odliší normální buňky, které jsou diploidní.⁴⁷

3.1.2 Indukce apoptózy cucurbitacinem D

U mnoha nádorových linií, které byly testovány *in vitro* s různými koncentracemi cucurbitacinu D, bylo detekováno zvýšené množství apoptotických buněk. U lidských nádorových linií, které jsou odvozeny od karcinomu endometria a ovarií, byl detekován dramatický nárůst frakce buněk v sub G1 fázi, což odkazuje na apoptózu, společně se snížením množství buněk v S fázi buněčného cyklu. S rostoucí dávkou cucurbitacinu D se zvyšoval podíl apoptotických buněk. V těchto buňkách bylo detekováno několik indikátorů apoptózy, jako je například ztráta mitochondriálního membránového potenciálu⁴⁸, ke které dochází před jadernou kondenzací a aktivací kaspáz a je také spojena s uvolněním cytochromu c ve většině apoptotických buněk.^{49; 50} Dalším indikátorem je snížení množství proteinů Bcl-2 a Bcl-xL, které v normálně rostoucích buňkách inhibují apoptotickou odpověď buňky na různé podněty.⁵¹ V nádorových buňkách endometriálního karcinomu, rakoviny vaječníků i rakoviny prsu byly navíc detekovány fragmenty štěpených prokaspáz-3, -8 a -9 a štěpeného proteinu PARP (Poly ATP-ribose polymerase), které společně spouští dráhu vedoucí k apoptóze.^{7; 48; 52; 53}

Cucurbitacin D indukuje apoptózu také u buněk T-buněčné leukémie. Po 48 hodinách bylo 60 % buněk identifikovaných jako apoptotické pomocí Anexinu V. I tady se zvýšilo množství sub G1 buněk a došlo ke snížení exprese proteinů Bcl-xL a Bcl 2. Také bylo pozorováno, že cucurbitacin D nespouští apoptózu normálních buněk PBL (peripheral blood lymphocytes), ale mechanismus, proč na rozdíl od nádorových buněk apoptóza nenastává u zdravých buněk, není znám.^{52; 54}

3.2 Autofagie

Autofagie je mechanismus, který je evolučně konzervovaný a je nezbytný pro udržení homeostázy. Během autofagie dochází k degradaci nefunkčních nebo nepotřebných buněčných komponent.⁵⁵ Autofagie je také přímo spojena s apoptózou, ale nejde o vztah jednoduchý a dobře prozkoumaný. Pravděpodobnost, že v buňce nastane apoptóza, může autofagie jak zvýšit, tak snížit. Dva hlavní proteiny, které autofagii a apoptózu spojují, jsou

p62 a Beclin-I.⁵⁶ V závislosti na okolnostech může autofagie podporovat i potlačovat tumorigenezi. Podpora nádorů je zde hlavně díky potlačení indukce tumorsupresoru p53 a udržování metabolické funkce mitochondrií. Proto by bylo výhodné inhibovat autofagii ke zlepšení nádorové terapie.⁵⁷

Vztah autofagie k indukcí buněčné smrti při působení cucurbitacinu D byl studován u linií lidských leukemických buněk (MT-1, MT-4, HuT78 a Jurkat) s použitím dvou inhibitorů, Z36 a 3-MA (3-methyladenin). Z36 inhibuje Bcl-xL a navozuje autofagii. 3-MA je přímý inhibitor autofagie. Oba inhibitory, Z36 i 3-MA, byly s leukemickými buňkami nejdříve testovány samostatně. Oba dva snížily proliferaci všech testovaných linií buněk.

Dále bylo testováno společné působení Z36 a cucurbitacinu D. Samotný cucurbitacin D omezil proliferaci nádorových buněk, kterou Z36 ještě dále inhiboval u linií HuT78, Jurkat a MT-1. U linie MT-4 byl ale efekt opačný, proliferace buněk se zvýšila. Stejně tak vliv na množství štěpeného proteinu PARP se lišil u jednotlivých linií. Po indukcí štěpení PARP cucurbitacinem D se jeho efekt potencoval za přítomnosti Z36 u linie Jurkat, ale ne u MT-1. Je zřejmé, že Z36 ovlivňuje apoptózu indukovanou cucurbitacinem D u každé linie jiným mechanismem.

Stejně tak byly testovány leukemické buňky s inhibitorem 3-MA. Při testování proliferace se efekt cucurbitacinu D zvýšil u linií Jurkat a HuT78, nezměnil se u MT-1 a naopak se snížil u MT-4.

Dále bylo testováno společné působení cucurbitacinu D, Z36 a 3-MA na Z36 senzitivních liniích Jurkat a MT-1. U obou linií se díky 3-MA ještě více snížila proliferace.

Nakonec byla linie MT-4 transfekována Beclin-I siRNA (small interfering RNA). Tím se utlumil Beclin-I, který vlivem proteinu Tax dysreguluje autofagii. Poté bylo pozorováno zvýšení citlivosti buněk na působení cucurbitacinu D.⁵⁸

Bylo ověřeno, že autofagie přerušuje procesy, které jsou indukované pomocí cucurbitacinu D a vedou k apoptóze. Proto by mohla být regulace procesu autofagie užitečná při vývoji efektivnějších chemoterapeutik pro léčbu leukémie.⁵⁸ Zároveň je ale evidentní, že účast autofagie je závislá na charakteristice buněk a může být odlišná mezi různými liniemi. Heterogenita klonů nádorových buněk je tak důležitým faktorem, který spoluurčuje odpověď buněk na léčiva nebo jejich kombinace.

3.3 Zastavení buněčného cyklu

Jedním z dalších efektů, které byly pozorovány po přidání cucurbitacinu D k nádorovým buňkám, je zastavení buněčného cyklu.

Po kultivaci lidských nádorových linií odvozených od karcinomu endometria a rakoviny vaječníků s cucurbitacinem D se dramaticky zvýšilo množství buněk v sub G1 a G2/M fázi, společně se snížením populace v S fázi. Zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi může být způsobeno zvýšením exprese p21 a p27 a snížením hladiny cyklinů A a B.⁴⁸ Proteiny p21 a p27 jsou inhibitory CDK (Cyklin-dependentní kinázy), které hrají důležitou roli v blokaci buněčného cyklu. Tím, že se naváží na CDK komplex, sníží kinázovou aktivitu tohoto komplexu a zastaví buněčný cyklus.^{48; 59} Exprese proteinu p21 je indukována tumorsupresorem p53. Ten hraje důležitou roli při zábraně vzniku nádorů, téměř polovina lidských nádorových onemocnění má tento protein nefunkční. p53 může mimo jiné zastavit buněčný cyklus, např. právě přes p21, a umožnit tak opravu poškození buňky, především poškozené DNA. p53 také indukuje apoptózu nezávisle na p21, pokud je DNA poškozena příliš.^{59; 60}

Zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi bylo pozorováno v nádorových buňkách rakoviny prsu, které vykazují známky mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance, MDR)⁵², a u buněk schwannomu a meningeomu, kde bylo detekováno snížení množství cyklinu B, fosfo-AKT a fosfo-PRAS40 (proline-rich Akt-substrate).⁶¹

3.4 STAT3 a NF-κB

Jedním z nejčastěji pozorovaných a nejdůležitějších účinků cucurbitacinu D na nádorové buňky je jeho vliv na signální dráhy s účastí STAT3 a NF-κB, a to několika různými mechanismy.

3.4.1 STAT3

STAT3, z anglického Signal transducer and activator of transcription 3, se účastní karcinogeneze prostřednictvím imunoprese. Po aktivaci nadřazeným signálem dojde k jeho fosforylaci, dimerizaci, translokaci do jádra a vazbě na DNA. To vede k transkripci různých genů, které mají vliv na růst nádorů, angiogenezi, invazi buněk a únik před imunitou.⁶²

Za fyziologických podmínek je aktivace STAT3 striktně řízená, na její regulaci se podílejí zejména PIAS (protein inhibitor of activated STAT), SOCS (supressors of cytokine signaling), PTP (protein tyrosine phosphatases), nebo proteazomu závislého na ubiquitinaci. Geny, jejichž exprese je regulována pomocí STAT3, často kódují cytokiny, růstové faktory nebo angiogenní faktory, jako například IL-6 (interleukin-6), IL-10 (interleukin-10), VEGF (vascular endothelial growth factor). Ty poté znovu aktivují STAT3 a tím se vytvoří smyčka, která může v nádorových buňkách způsobit trvalou aktivaci STAT3. Tím dojde k trvalé podpoře produkce právě IL-6, IL-10 a VEGF v nádorovém mikroprostředí a tím se zablokuje imunitní odpověď proti nádoru⁶³. Zároveň STAT3 aktivuje transkripci klíčových onkogenů, které jsou zapojeny do suprese imunitních odpovědí proti nádoru. Kromě toho STAT3 moduluje nádorové mikroprostředí, jako jsou stromální a imunitní buňky, k podpoře růstu nádoru.

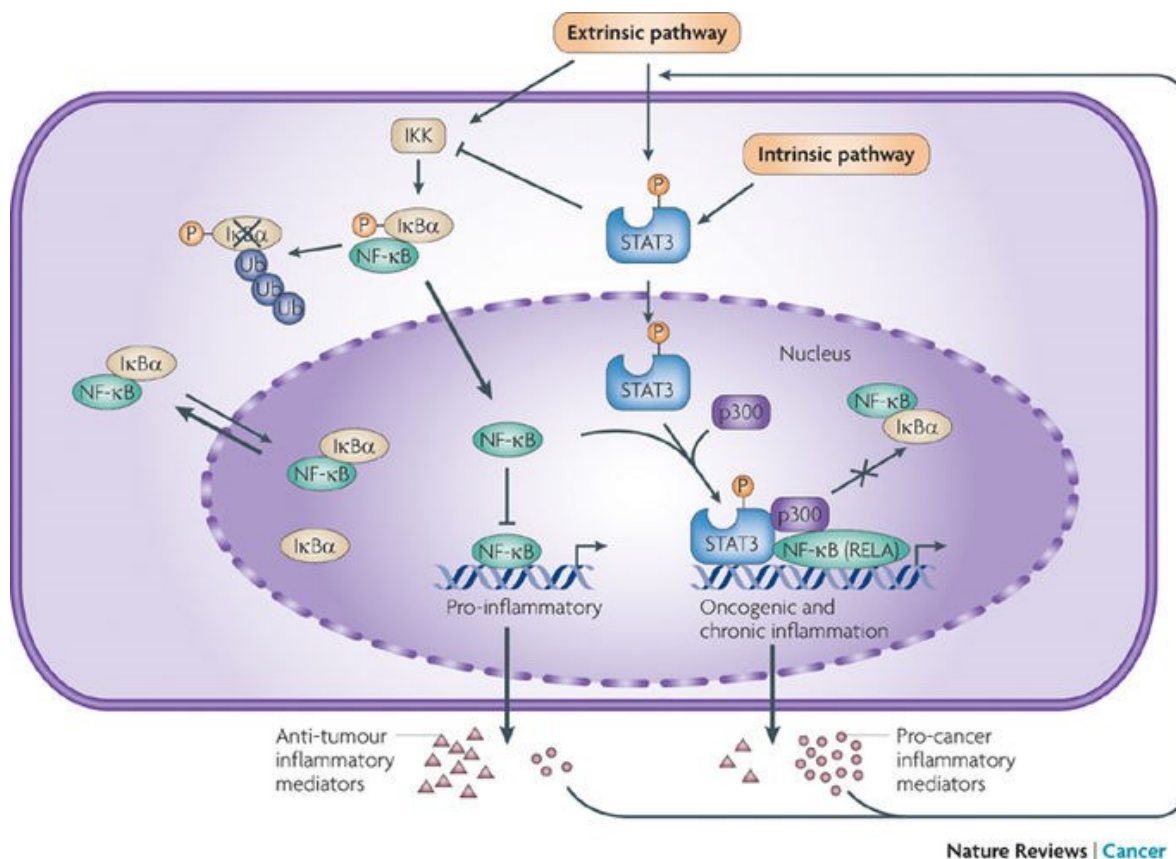
Funkční motivy skupiny proteinů STAT zahrnují N-koncovou doménu pro dimerizaci, „coiled coil“ doménu pro integraci s dalšími proteiny, DNA-vazebnou doménu, SH2 (SRC homology 2) doménu a C-terminální transaktivační doménu.⁶³

Aktivovaný STAT3 byl detekován u mnoha lidských nádorů⁶⁴, proto je cílení na STAT3 signalizaci důležitým krokem k potlačení proliferace nádorových buněk a k indukci apoptózy. STAT3 dráha zahrnuje jak podporu nádorů, tak i imunosupresi. Díky tomu je STAT3 významným molekulárním cílem pro imunoterapii. Zároveň tak může jít o léčbu cílenou na nádorové buňky, pokud mají významně zvýšenou hladinu STAT3 exprese. Zdravé buňky nemají STAT3 aktivovaný nepřetržitě, tak jako nádorové buňky, proto by je inhibitory STAT3 neovlivňují v takové míře.⁶³

3.4.2 NF-κB

NF-κB je označení dimerních transkripčních faktorů, které patří do skupiny Rel a jejich aktivita je regulována přesuny mezi cytoplazmou a jádrem buňky.⁶⁵ Při odpovědi na prozánětlivé cytokiny a vedlejší produkty mikrobů a virů se výrazně zvyšuje DNA-vazebná aktivita NF-κB. Vazebná místa pro NF-κB jsou v oblastech promotorů genů, které kódují cytokiny, chemokiny, adhezivní molekuly a enzymy, a tím NF-κB uplatňuje svůj vliv na imunitní systém, zánětlivou odpověď, růst a smrt buněk.^{66; 67}

Dimery NF- κ B zůstávají v cytoplazmě díky své interakci s inhibitory I κ B (inhibitor κ B). K degradaci I κ B dojde poté, co jsou fosforylovány I κ B kinázovým komplexem, IKK (inhibitor of nuclear factor κ -B kinase).⁶⁸ IKK se skládá ze dvou katalytických podjednotek, IKK α a IKK β , které přímo fosforylují I κ B a dále zjedné regulační podjednotky IKK γ , také označované jako NEMO (NF-kappa-B essential modulator).⁶⁸ (STAT3 a NF- κ B signalizační dráha viz obrázek 3)



Obrázek 3: STAT3 a NF- κ B signalizační dráha (převzato z: Yu H. et.al. 2009⁶⁹)

3.4.3 Vliv cucurbitacinu D na STAT3 a NF- κ B

Cucurbitacin D způsobuje inhibici fosforylace STAT3, konkrétně na Tyr705 a Ser727. To bylo prokázáno na buňkách rakoviny děložního hrdla, ve kterých cucurbitacin D ovlivnil transkripci genů, jejichž přepis se spouští aktivací signální dráhy STAT3. Těmito geny jsou například c-Myc a MMP9 (Matrix metalloproteinase 9). Jejich produkty podporují proliferaci a invazi nádorových buněk. Díky tomu, že cucurbitacin D inhiboval fosforylaci STAT3, se aktivita jím ovlivňovaných genů blokovala a zastavila se proliferace. To bylo ověřeno i v *in vivo* podmínkách, kdy došlo po podání cucurbitacinu D intratumorálně

k redukci růstu i hmotnosti nádoru. V tomto případě se jednalo o ortotopický xenograft lidského nádoru děložního hrdla (linie CaSki) u athymických myší.⁷⁰

Cucurbitacin D také snížil množství p-STAT3 (phospho-STAT3) v doxorubicin-rezistentní buněčné linii MCF7/ADR. V této buněčné linii byla pozorována over-exprese p-STAT3 oproti základní linii MCF7, která nevykazuje mnohočetnou lékovou rezistenci. Tím, že došlo ke snížení množství p-STAT3, se inhibovala translokace STAT3 do jádra a narušil se přepis cílových genů. U této rezistentní buněčné linie bylo zároveň pozorováno zvýšené množství I κ B a NF- κ B v cytosolu a s tím i snížená hladina p-NF- κ B (phospho-NF- κ B) v jádře. Výsledkem těchto změn byla apoptotická smrt buněk. Zatím ale není známo, v jaké části signální dráhy cucurbitacin D působí.⁵²

Potlačení konstitutivní aktivace STAT3 nastalo i u buněk rakoviny prsu, které byly vystaveny cucurbitacinu D. Tento efekt byl pozorován už po 6 hodinách od počátku kultivace buněk s cucurbitacinem D.⁷

Cucurbitacin D inhibuje proliferaci i dalších typů nádorových buněk, kterými jsou např. buňky T buněčné leukémie, konkrétně linie MT-1, MT-2, MT-4, Hut102, Hut78 a Jurkat. V tomto případě se začala projevovat aktivita cucurbitacinu D po 12 hodinách od začátku kultivace buněk s cucurbitacinem D. Účinek u nádorových buněk byl porovnán s buňkami lidských periferních krevních lymfocytů (PBL) od zdravých dárců. Životnost těchto zdravých buněk nebyla cucurbitacinem D nijak ovlivněna, ale důvod tohoto rozdílu mezi účinkem na zdravé a leukemické buňky zatím není známý.⁵⁴

U zmíněných linií T-buněčné leukémie (MT-1, MT-2, MT-4, Hut102, Hut78 a Jurkat) byl dále zkoumán mechanismus apoptózy. U nádorových buněk byla po kultivaci s cucurbitacinem D detekována snížená exprese Bcl-xL a Bcl-2. Naproti tomu u zdravých PBL buněk nebyla exprese těchto genů ovlivněna. Bcl-xL je protein, který patří mezi Bcl-2 proteiny a spolu s anti-apoptotickými proteiny zajišťuje ochranu nádorových buněk před apoptózou.⁵⁴ Transkripci Bcl-xL reguluje NF- κ B, který byl v buňkách T-buněčné leukémie pozorován nepřetržitě aktivovaný.⁷¹ Pro lepší pochopení vztahu mezi aktivitou NF- κ B a expresí Bcl-xL byly linie MT-4 a Hut102 kotransfekovány p65, který je součástí NF- κ B, a Bcl-xL nebo NF- κ B reporterovými konstrukty. Overexprese p65 zvýšila aktivitu NF- κ B a Bcl-xL reporterů a tato aktivita nebyla zastavena po kultivaci s cucurbitacinem D. To

znamená, že cucurbitacin D inhibuje expresi Bcl-2 proteinů přes supresi NF- κ B signální dráhy v cytoplasmě, ne v jádře.⁵⁴

Už po šestihodinové kultivaci buněk s cucurbitacinem D se snížilo množství NF- κ B v jádře a zároveň se NF- κ B začal kumulovat v cytoplasmě. Tam se zvedla i hladina I κ B α (inhibitor κ B), tím nemohlo dojít k translokaci NF- κ B do jádra, protože I κ B α tvoří komplex s NF- κ B v cytoplasmě a tím inhibuje jeho translokaci do jádra. Zároveň se zvýšila fosforylace nadřazené kinázy pro NF- κ B, IKK α /b, a bylo detekováno zvýšené množství ubiquitovaného I κ B α . Zatím ale není jasné, zda cucurbitacin D může přispívat ke kumulaci NF- κ B v cytoplasmě také tím, že by podněcoval translokaci aktivovaného NF- κ B z jádra do cytoplasmy.⁵⁴

3.4.3.1 Aktivace STAT3

Na následujícím příkladu je vidět, že výsledky studia účinků cucurbitacinu D nejsou vždy jednoznačné a je potřeba mnoho další práce k jejich pochopení a objasnění přesných mechanismů. V předcházející kapitole jsou popsány mechanismy a s nimi související efekty cucurbitacinu D, které jsou spojené s inhibicí signální dráhy STAT3 na různých úrovních. Byla publikována ale i práce⁷², která popisuje přesně opačný efekt, a to aktivaci STAT3.

Déledobé podávání cucurbitacinu D snížilo u db/db myši (model pro hyperglykémii a diabetes 2. typu) hladinu glukózy v krvi. V tomto případě byl cucurbitacin D podáván po dobu tří týdnů a glukóza byla v krvi měřena poté, co byly myši ponechány přes noc bez přístupu k potravě. V játrech těchto myši způsobilo podávání cucurbitacinu D inhibici exprese enzymů PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) a G6Pázy (glucose 6-phosphatase), které jsou klíčové pro glukoneogenezi v játrech. Glukoneogeneze je důsledně řízena transkripčními faktory a v tomto případě byla inhibice PEPCK a G6Pázy cucurbitacinem D způsobena zvýšeným množstvím aktivovaného STAT3 v játrech.

Pro ověření dat byla v játrech db/db myši exprese STAT3 inhibována. K tomu byla použita adenovirová shRNA (short hairpin RNA) komplementární k oblasti, která kóduje STAT3. Tím se exprese jaterního STAT3 úplně potlačila a zároveň se eliminoval i vliv cucurbitacinu D na snížení hladiny glukózy v krvi i na expresi enzymů PEPCK a G6Pázu. Tím se potvrdilo, že glukoneogeneze ovlivněná cucurbitacinem D je závislá na aktivitě STAT3.

Dále byl testován i vliv cucurbitacinu D na akutní diabetes 1. typu. Pro tento účel byl použit inbrední kmen myši C57BL/6, kterým byly pomocí streptozotocinu odstraněny β buňky pankreatu produkující inzulin. Poté, co byly tyto myši léčeny cucurbitacinem D (opět po dobu tří týdnů), došlo i u nich ke snížení hladiny glukózy v krvi, která byla měřena po fázi hladovění. Také zde byla naměřena nižší hladina mRNA (messenger RNA) a proteinů PEPCCK a G6Pázy a vyšší množství fosforylovaného STAT3.

Zmíněné výsledky ukazují, že by cucurbitacin D mohl snižovat množství glukózy v krvi a být tak užitečný při vývoji léků pro léčbu diabetu, i když zatím není jasné, jakým způsobem cucurbitacin D STAT3 signalizační dráhu aktivuje.⁷² Zároveň to také vede k otázce, jak je možné, že cucurbitacin D prokazatelně inhibuje STAT3 dráhu u některých buněk, ale u jiného zkoumaného modelu ji aktivuje. Možným vysvětlením by mohla být specifická aktivita cucurbitacinu D na konkrétní buňky nebo tkáň, nebo také dávkování, které bylo v tomto případě dlouhodobé, po dobu tří týdnů.

3.5 Proteazom

Jedním z dalších účinků cucurbitacinu D je inhibice funkce proteazomu.⁵⁴

Proteazom je multikatalytický enzymový komplex, který bychom našli jak v jádře, tak i v cytoplazmě eukaryotických buněk.⁷³ Jeho velikost je 2,4 MDa a skládá se ze dvou velkých podjednotek. První z nich je 20S jádro komplexu a druhá část, 19S, je regulační. Jádro komplexu má tvar barelu, který je uspořádán do čtyř axiálně složených heptamerových kruhů.⁷⁴

Proteazom je vedle lysozomů v buňce hlavním proteolytickým systémem⁷⁵, který ovšem funguje velmi selektivně. Štěpí konkrétní proteiny nebo ty, které byly chybně poskládány. Cílové proteiny jsou předem v buňkách označeny ubiquitinem za účasti ubiquitin ligázy; takto označené cílové proteiny jsou rozpoznávány regulačními jednotkami proteazomu a podléhají rychlé degradaci⁷⁶. Proteazom je v mnoha ohledech unikátní, a to včetně způsobu, jakým proteiny degraduje. Většina proteáz uvolní při štěpení substrátu dva fragmenty nebo odštěpí jednu aminokyselinu z jednoho konce proteinu. Proteazom ale degraduje proteiny postupně a dochází ke štěpení substrátu až na oligopeptidy o délce 7 až 8 aminokyselin, které mohou být ještě dále degradovány.⁷⁷

Inhibice funkce proteazomu cucurbitacinem D byla popsána u buněčných linií MT-1, MT-2, MT-4, Hut102, Hut78 a Jurkat. Všechny tyto linie jsou odvozeny od T-buněčné leukémie. Po šesti hodinách od začátku kultivace buněk s cucurbitacinem D v nich bylo detekováno nejen větší množství ubiquitinovaného I κ B α , ale i celkové množství ubiquitovaných proteinů. Proto je zřejmé, že cucurbitacin D inhibuje aktivitu proteazomu, který by měl štěpit právě proteiny označené ubiquitinem, ale po inhibici proteazomu se takto označené proteiny hromadí v cytoplasmě.

Inhibice proteazomu cucurbitacinem D byla dále potvrzena i v *in vivo* systému. Pro tento účel byly použity SCID (Severe combined immunodeficiency) myši s MT-4 nebo Hut102 buňkami. U těchto myši byla po 24 hodinách od podání cucurbitacinu D indukována silná apoptóza nádorových buněk. V nich bylo také zjištěno zvýšené množství ubiquitovaných proteinů včetně I κ B α , což potvrzuje, že cucurbitacin D inhibuje proteazom i v *in vivo* systému.⁵⁴

3.6 Inflamazom

Kaspázy se řadí mezi cysteinové proteázy, které zahajují nebo přímo zprostředkovávají buněčné děje, které se podílejí na regulaci aktivity některých mediátorů zánětu a jsou klíčové pro proces apoptózy. Kaspázy jsou syntetizovány jako inaktivní proenzymy a jejich aktivita závisí na proteolytické aktivaci. Kaspázy mohou být buďto prozánětlivé nebo proapoptické. Mezi prozánětlivé kaspázy patří kaspáza-1, -11, -12 u myši a kaspáza-1, -4, -5 u lidí.⁷⁸ Z těchto prozánětlivých kaspáz je nejpodrobněji popsána kaspáza-1. Její katalytická aktivita je regulována signál-dependentní autoaktivací v rámci multiproteinových komplexů, které jsou nazývány inflamazomy. Inflamazomy se podílí na zpracování cytokinů, které jsou závislé na aktivitě kaspázy-1, jako je například IL-1 β (Interleukin-1 β).⁷⁹

IL-1 β je důležitý prozánětlivý cytokin, jeho inaktivní forma je exprimována díky prozánětlivým podnětům, ale maturaci této inaktivní formy řídí inflamazomy.⁸⁰ Nejpodrobněji popsaným inflamazomem je inflamazom NLRP3 (Nod-like receptor protein 3). Ten se skládá z NLRP3 kostry, ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) adaptoru a kaspázy-1.⁸¹

Aktivita inflamazomu a dostatečné množství pro-IL-1 β jsou hodně ovlivněny díky zapojení do prozánětlivých signalizačních drah, jako jsou dráhy spuštěné po navázání ligandu na TLR (Toll-like receptor). Stimulem může být v tomto případě například lipopolysacharid (LPS) nebo prozánětlivý cytokin TNF α (Tumor necrosis factor α). K aktivaci kaspázy-1, která závisí na inflamazomu, může dojít i v buňkách, které nebyly předem vystaveny LPS nebo TNF. V tomto případě by ale byla sekrece IL-1 β jen minimální. Proto se při výzkumu aktivace inflamazomu používají prozánětlivé signály, jako právě LPS nebo TNF α , které aktivují NF- κ B a spouštějí transkripci po navázání k promotoru IL-1 β .⁸²

Imunomodulační účinek cucurbitacinu D byl testován na buňkách makrofágů (lidská monocytární linie THP-1 a myší modely: peritoneální makrofágy - PEC, makrofágy odvozené z buněk kostní dřeně - BMDM a makrofágová linie - RAW264.7), které byly kultivovány s cucurbitacinem D. Už po 3 hodinách se zvýšila produkce IL-1 β . Samotný cucurbitacin ale tuto produkci neindukoval, pouze zvýšil produkci indukovanou LPS. Stejně tak i expresi IL-1 β mRNA cucurbitacin D přímo neindukoval, ale pouze zvyšoval expresi IL-1 β mRNA, která byla indukována pomocí LPS. Děje se tak ovlivněním enhanceru, ne promotoru. To bylo ověřeno pomocí luciferázového reportérového systému. Testované buňky THP-1 byly transfekovány vektorem pGL3 s genem luciferázy, ke kterému byl připojen buď jen promotor genu pro IL-1 β nebo promotor společně s enhancerem. Tyto buňky pak byly kultivovány s cucurbitacinem D společně s LPS nebo bez něj a poté byla změřena aktivita luciferázy. Cucurbitacin D indukoval aktivitu luciferázy s promotorem a enhancerem, která byla indukována LPS, ale neindukoval aktivitu luciferázy pouze s promotorem, nebo luciferázy s promotorem a enhancerem, ale bez aktivace pomocí LPS.

Produkce IL-1 β indukovaná LPS za přítomnosti cucurbitacinu D se snížila, pokud byla zároveň inhibována kináza ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2), která patří mezi MAP kinázy (mitogen-activated protein kinase) hrající důležitou roli v indukcii syntézy IL-1 β . Inhibicí ERK1/2 kinázy se v testu také snížila aktivita luciferázy s promotorem a enhancerem genu pro IL-1 β , která byla indukovaná LPS a cucurbitacinem D. Z toho vyplývá, že exprese IL-1 β indukovaná LPS a cucurbitacinem D by mohla být ovlivněna zvýšením aktivace ERK1/2 MAP kináz na transkripční úrovni. Přesný mechanismus těchto účinků zatím není znám.

Pro produkci IL-1 β je také nezbytná aktivita inflamazomu. V buňkách makrofágů bylo pozorováno, že složení NALP3 inflamazomu bylo indukováno samotným cucurbitacinem D. Zároveň bylo zjištěno, že inhibice ERK1/2 kinázy nemělo na jeho složení žádný vliv. Proto je jasné, že ERK1/2 kináza hraje roli na transkripční úrovni, ale už ne na posttranskripční úrovni.⁸³

Sekrece IL-1 β je regulována také na posttranskripční úrovni kaspázou-1. Když byla kaspáza-1 inhibována v buňkách, které pak byly kultivovány s LPS a cucurbitacinem D, množství sekretovaného IL-1 β se výrazně snížilo. Proto je možné říci, že cucurbitacin D ovlivňuje aktivační dráhu kaspázy-1, takže má vliv na produkci IL-1 β jak na transkripční, tak na posttranskripční úrovni.⁸³

3.7 Hepatoprotektivní potenciál cucurbitacinu D

Hepatoprotektivní efekt byl pozorován u krysí buněčné linie HSC-T6, která je odvozena z buněk hepatocelulárního karcinomu. Testován byl cucurbitacin D, izolovaný z rostliny *Cucurbita texana*. Efekt byl způsoben inhibicí produkce TNF- α a IL-6 přes blokádu aktivace NF- κ B dráhy. Aktivace NF- κ B hraje důležitou roli ve vývoji hepatocelulárního karcinomu a inhibice IL-6 může potlačit nádor jater. Při zkoumání této hepatoprotektivní aktivity byl testován inhibiční efekt cucurbitacinu D na produkci prozánětlivých cytokinů při stimulaci buněk pomocí LPS. Produkce TNF- α byla snížena působením cucurbitacinu D o 96,4 %, stejně tak došlo ke snížení množství IL-6, a to o 56,3 %. Inhibice TNF- α byla způsobena blokádu aktivace NF- κ B.

Cucurbitacin D působí podobně jako inhibitor PS-1145. Ten se v pokusech využívá pro inhibici IKK β a způsobuje v buňkách 1,7násobný pokles množství fosforylovaného I κ B α než je detekováno v buňkách stimulovaných LPS. Působením cucurbitacinu D se množství fosforylovaného I κ B- α snížilo 1,6krát. Bylo také ověřeno, že se cucurbitacin D váže na IKK β do vazebného místa pro ATP (adenosintrifosfát), stejně jako inhibitor PS-1145.

Během testování hepatoprotektivního potenciálu cucurbitacinu D byly pro srovnání jeho účinku použity i jiné druhy cucurbitacinů, a to dihydrocucurbitacin D (DHCD), cucurbitacin B (CuB), dihydrocucurbitacin B (DHCB) a cucurbitacin E (CuE). V porovnání s cucurbitacinem D měl DHCD o něco nižší účinnost, ale působil stejným způsobem. CuB,

DHCB a CuE působily opačně, produkci TNF- α a IL-6 nesnížily, ale naopak ji v různé míře zvýšily.⁸⁴ Cucurbitacin D a DHCD by mohly být využívány k ochraně jaterních buněk před chemicky indukovanou hepatotoxicitou díky blokaci NF-kB a tím omezení produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6. Zároveň je jisté, že velmi podobné molekuly různých druhů cucurbitacinu mohou působit na buňky různým způsobem.

3.8 Metabolismus

U každé sloučeniny, u které se zkoumá vliv na lidské buňky, je nutné, aby se před případnými klinickými testy objasnil způsob, jak je látka v těle metabolizována a jakým způsobem ji tělo může vyloučit.

Biotransformace cucurbitacinů byla testována v lidských jaterních buňkách. Zde byl testován cucurbitacin D, E a I. Hydroxylové skupiny, které molekuly těchto cucurbitacinů obsahují, mohou být potenciálními místy pro sulfataci a glukuronidaci. U zmíněných cucurbitacinů byla testována biotransformace přes reakce fáze I (hydroxylace a deacetylace) a fáze II (glukuronidace a sulfatace). Sulfatace cucurbitacinů byla pozorována v cytosolu lidských jaterních buněk a její rychlost byla výrazně nižší v porovnání se sulfatací markeru (1-naftol). Stejně tak glukuronidace cucurbitacinů byla výrazně pomalejší v porovnání s markery (1-naftol, octylgalát, 4-nitrofenol, 4-aminobifenyl, β -estradiol, hyodeoxycholová kyselina, RS-ketoprofen a eugenol).

Dále byla testována rychlost hydroxylace všech tří testovaných cucurbitacinů pomocí lidských jaterních mikrosomů.⁸⁵ Mikrosomy jsou subcelulární frakce jaterních buněk, která je odvozena ze struktur endoplazmatického retikula. Mikrosomy se připravují homogenizací a následnou diferenciální centrifugací jaterních buněk. Jako *in vitro* model pro výzkum metabolismu různých léčiv jsou často používány, protože obsahují množství enzymů oxidace fáze I nebo glukuronidace⁸⁶. I tady bylo potvrzeno, že hydroxylace cucurbitacinů je pomalejší a děje se v menším rozsahu v porovnání s hydroxylací nifedipinu, který byl použit ke kontrole funkce mikrosomů jako substrát lidského jaterního cytochromu P450. Dále bylo zjištěno, že mikrosomální esterázy jsou v porovnání s odpovídajícími enzymy v cytosolu aktivnější při hydrolýze esterů triterpenů.⁸⁵

Cucurbitaciny jsou metabolizovány pomocí konjugačních reakcí – kromě sulfatace a glukuronidace také pomocí hydroxylace a hydrolýzy. Všechny tyto reakce zde probíhaly výrazně pomaleji v porovnání s příslušnými markery.⁸⁵ Zatím není jasné, jakým způsobem se cucurbitaciny z těla vyloučí, nebo zda-li se v těle ukládají.

Je jisté, že pokud by se uvažovalo o použití cucurbitacinu D v klinické praxi, je nejprve potřeba další výzkum, který by objasnil osud této sloučeniny v lidském těle.

4 Závěr

Cucurbitacin D se v posledních letech testuje pro jeho potenciální účinky proti rakovinným buňkám a výsledky ukazují, že by v budoucnu mohl být nadějným léčivem. Jeho aktivita se potvrzuje nejen *in vitro*, ale i *in vivo*. Jedním z hlavních účinků cucurbitacinu D je inhibice signalizační dráhy STAT3, na kterou může pravděpodobně působit několika mechanismy. Díky tomu, že mnoho typů rakovinných buněk má zvýšenou hladinu aktivovaného STAT3, je cucurbitacin D účinnější právě v nich a nepoškozuje tak zdravé buňky v takové míře. Dalšími důležitými účinky cucurbitacinu D jsou zastavení buněčného cyklu a indukce programované buněčné smrti, apoptózy. Cucurbitacin D dokáže také narušit důležité buněčné děje, jako je funkce proteazomu a inflamazomu. Díky vlivu na inflamazom se rozšiřuje paleta účinku i o ovlivnění imunitní odpovědi na prozánětlivé podněty. To může mít také vliv na osud nádorových buněk, protože intenzita a povaha zánětové reakce je pro vývoj nádorů zásadní.

Na druhou stranu je nutné dodat, že porozumění mechanismům účinku cucurbitacinu D v buňkách naráží zatím na mnoho otázek. Velká část mechanismů zatím nebyla popsána, stejně tak jako jeho metabolismus a rychlost a způsob vylučování z organismu. Jedním z hlavních otazníků je mechanismus, jakým cucurbitacin D u většiny buněk způsobuje inhibici STAT3 dráhy. V literatuře je navíc popsána i možnost stimulace STAT3 signální dráhy.

5 Seznam použitých zkratek

3-MA	3-methyladenin
ALK	Anaplastic lymphoma kináza
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
ATP	Adenosintrifosfát
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; B-buněčný lymfom 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large; B-buněčný lymfom extra velký
BID	BH3 interacting-domain; BH3-interagující doména
CDK	Cyklin-dependentní kináza
CuB	Cucurbitacin B
CuE	Cucurbitacin E
DHCB	dihydrocucurbitacin B
DHCD	dihydrocucurbitacin D
DNA	Deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2; extracelulární signálem regulované kinázy 1/2
Fas	First apoptosis signal receptor; první receptor signálu apoptózy
G6Páza	Glucose 6-phosphatase; glukóza 6-fosfatáza
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2; receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1; hypoxií indukovatelný faktor 1
IKK	Inhibitor of nuclear factor κ B kinase; inhibitor kinázy jaderného faktoru κ B
IL-10	Interleukin-10
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
I κ B	Inhibitor κ B

JAK	Janus kináza
LPS	Lipopolysacharid
MAP kinázy	Mitogen-activated protein kinase; mitogenem aktivovaná protein kináza
MAPK	Mitogen-activated protein kinase; mitogenem aktivovaná protein kináza
MDR	Multidrug resistance; vícečetná léková rezistence
MMP9	Matrix metalloproteinase 9; matrixová metalloproteináza 9
mRNA	Messenger RNA; mediátorová RNA
NCI	National Cancer Institute v USA
NEMO	NF- κ B essential modulator; základní modulátor NF- κ B
NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells; jaderný faktor κ -enhanceru lehkého řetězce aktivovaných B buněk
NLRP3	Nod-like receptor protein 3
PARP	Poly ADP-ribose polymerase; polymeráza poly ADP-ribózy
PBL	Peripheral blood lymphocytes; periferní krevní lymfocyty
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase; fosfoenolpyruvát karboxykináza
PI	Propidium jodid
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT; inhibitor aktivovaného STAT3
p-NF- κ B	Phosphorylated NF- κ B; fosforylovaný NF- κ B
PRAS40	Proline-rich Akt-substrate 40; Akt substrát 40 bohatý na prolin
p-STAT3	Phosphorylated-STAT3; fosforylovaný STAT3
PTP	Protein tyrosine phosphatases; tyrosinová fosfatáza
ROS	Reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
SCID	Severe combined immunodeficiency; těžké kombinované imunodeficiencie
SH2	SRC homology 2; SRC homolog 2
shRNA	Short hairpin RNA; krátká vlásenková RNA
siRNA	Small interfering RNA; malá interferující RNA

SOCS	Supressors of cytokine signaling; supresory cytokinové signalizace
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3; signální transduktor a aktivátor transkripce 3
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor; faktor nekrózy nádorů
TNF- α	Tumor necrosis factor α ; faktor nekrózy nádorů α
VEGF	Vascular endothelial growth factor; vaskulární endotelový růstový faktor
Wnt	Wingless/Int-1

6 Přehled použité literatury

- ¹ CHEN, X. P. et al. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v. 23, n. 8, p. 777-787, 2012.
- ² CHEN, J. C. et al. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 3, p. 386-399, 2005
- ³ JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from Cucurbita andreana. **Cancer Letters**, v. 189, n. 1, p. 11-16, 2003.
- ⁴ BARTALIS, J.; HALAWEISH, F. T. In vitro and QSAR studies of cucurbitacins on HepG2 and HSC-T6 liver cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 2757-2766, 2011.
- ⁵ MIRO, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 3, p. 159-168, 1995.
- ⁶ CHAWECH, R. et al. Cucurbitacins from the Leaves of Citrullus colocynthis (L.) Schrad. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18001-18015, 2015.
- ⁷ KIM, S. R. et al. Trichosanthes kirilowii Ethanol Extract and Cucurbitacin D Inhibit Cell Growth and Induce Apoptosis through Inhibition of STAT3 Activity in Breast Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- ⁸ CAI, Y. et al. Cucurbitacins: A Systematic Review of the Phytochemistry and Anticancer Activity. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 7, p. 1331-1350, 2015.
- ⁹ SADZUKA, Y. et al. Screening of biochemical modulator by tumor cell permeability of doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, n. 1-2, p. 63-69, 2008.
- ¹⁰ GEISSMAN, T. A. New substances of plant origin. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, p. 305-&, 1964.

- 11 MULLER, P. Y.; MILTON, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 751-761, 2012.
- 12 RAIKHLIN-EISENKRAFT, B.; BENTUR, Y. Ecbalium elaterium (squirting cucumber) - Remedy or poison? **Journal of Toxicology-Clinical Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 305-308, 2000.
- 13 LEE, D. H.; IWANSKI, G. B.; THOENNISSSEN, N. H. Cucurbitacin: Ancient Compound Shedding New Light on Cancer Treatment. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 413-418, 2010.
- 14 SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.
- 15 CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.
- 16 ABDELWAHAB, S. I. et al. Cucurbitacin L 2-O-beta-Glucoside Demonstrates Apoptogenesis in Colon Adenocarcinoma Cells (HT-29): Involvement of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Regulation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- 17 MARZOUK, B. et al. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian Citrullus colocynthis Schrad. from Medenine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 2, p. 344-349, 2009.
- 18 MEHTA, A. et al. Antimycobacterial activity of Citrullus colocynthis (L.) Schrad. against drug sensitive and drug resistant Mycobacterium tuberculosis and MOTT clinical isolates. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 195-200, 2013.
- 19 MARZOUK, B. et al. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of Citrullus colocynthis from southern Tunisia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 15-19, 2010.
- 20 MAATOOQ, G. T. et al. C-p-hydroxybenzoylglucoflavones from Citrullus colocynthis. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 187-190, 1997.
- 21 SEZIK, E.; YESILADA, E. Clinical effects of the fruit juice of Ecbalium-elaterium in the treatment of sinusitis. **Journal of Toxicology-Clinical Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 381-382, 1995.
- 22 SEZIK, E. Researches on a Turkish medicinal plant, Ecbalium elaterium. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, n. 5, p. 698-699, 1997.
- 23 KREPSKY, P. B. et al. High performance liquid chromatography determination of cucurbitacins in the roots of Wilbrandia ebracteata Cogn. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 715-719, 2009.
- 24 TANG, Y. et al. Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from Bolbostemma paniculatum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 18-23, 2015.
- 25 ZHENG, Q. et al. Cucurbitacin B inhibits growth and induces apoptosis through the JAK2/STAT3 and MAPK pathways in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 1, p. 89-94, 2014.

- 26 YASUDA, S. et al. Cucurbitacin B induces G(2) arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 4, p. 559-565, 2010.
- 27 CHIU, M. H.; GAO, J. Three new cucurbitacins from *Hemsleya lijiangensis*. **Chinese Chemical Letters**, v. 14, n. 4, p. 389-392, 2003.
- 28 GUPTA, P.; SRIVASTAVA, S. K. Inhibition of HER2-integrin signaling by Cucurbitacin B leads to in vitro and in vivo breast tumor growth suppression. **Oncotarget**, v. 5, n. 7, p. 1812-1828, 2014.
- 29 DAKENG, S. et al. Inhibition of Wnt signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: Reduction of Wnt-associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated beta-catenin to the nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 49-60, 2012.
- 30 MA, J. et al. Cucurbitacin B inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, p. 46-54, 2014.
- 31 FENG, H. et al. Cucurbitacin-E Inhibits Multiple Cancer Cells Proliferation Through Attenuation of Wnt/beta-Catenin Signaling. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 29, n. 5, p. 210-214, 2014.
- 32 HUANG, W. W. et al. Cucurbitacin E Induces G(2)/M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 11, 2012.
- 33 QIAO, J. et al. Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF-kappa B nuclear translocation. **Inflammation Research**, v. 62, n. 5, p. 461-469, 2013.
- 34 ZHANG, T. et al. Cucurbitacin E inhibits breast tumor metastasis by suppressing cell migration and invasion. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 2, p. 445-458, 2012.
- 35 VAN KESTER, M. S. et al. Cucurbitacin I inhibits Stat3 and induces apoptosis in Sezary cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 7, p. 1691-1695, 2008.
- 36 KIM, H. J.; PARK, J. H. Y.; KIM, J. K. Cucurbitacin-I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 219, p. 1-8, 2014.
- 37 CHANG, C. J. et al. Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. **Childs Nervous System**, v. 28, n. 3, p. 363-373, 2012.
- 38 SHI, X. Z. et al. JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells. **British Journal of Haematology**, v. 135, n. 1, p. 26-32, 2006.

- 39 ATKIN-SMITH, G. K.; POON, I. K. H. Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 151-162, 2017.
- 40 WALLACH, D. et al. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. **Science**, v. 352, n. 6281, p. 4, 2016.
- 41 POON, I. K. H. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 166-180, 2014.
- 42 CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49-63, 2014.
- 43 CASARES, N. et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1691-1701, 2005.
- 44 OBEID, M. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 54-61, 2007.
- 45 APETOH, L. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1050-1059, 2007.
- 46 GAMRADT, P. et al. The Influence of Programmed Cell Death in Myeloid Cells on Host Resilience to Infection with *Legionella pneumophila* or *Streptococcus pyogenes*. **Plos Pathogens**, v. 12, n. 12, p. 28, 2016.
- 47 RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.
- 48 ISHII, T. et al. Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. **Tumor Biology**, v. 34, n. 1, p. 285-291, 2013.
- 49 RIMON, G. et al. Increased surface phosphatidylserine is an early marker of neuronal apoptosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 48, n. 6, p. 563-570, 1997.
- 50 CHEN, Y. et al. Apoptotic signaling in polyamine analogue-treated SK-MEL-28 human melanoma cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 17, p. 6437-6444, 2001.
- 51 KELLY, P. N.; STRASSER, A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 9, p. 1414-1424, 2011.
- 52 KU, J. M. et al. Cucurbitacin D induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting STAT3 and NF-kappa B signaling in doxorubicin-resistant human breast carcinoma (MCF7/ADR) cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 409, n. 1-2, p. 33-43, 2015.
- 53 TAKAHASHI, N. et al. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 508-513, 2009.

- 54 DING, N. et al. Apoptosis Induction Through Proteasome Inhibitory Activity of Cucurbitacin D in Human T-Cell Leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 12, p. 2735-2746, 2011.
- 55 PULESTON, D. J.; SIMON, A. K. Autophagy in the immune system. **Immunology**, v. 141, n. 1, p. 1-8, 2014.
- 56 GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 387-392, 2011.
- 57 WHITE, E. The role for autophagy in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 42-46, 2015.
- 58 NAKANISHI, T. et al. Autophagy is associated with cucurbitacin D-induced apoptosis in human T cell leukemia cells. **Medical Oncology**, v. 33, n. 4, 2016.
- 59 JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 295-312, 1999.
- 60 PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell cycle and apoptosis. **Neoplasia**, v. 2, n. 4, p. 291-299, 2000.
- 61 SPEAR, S. A. et al. Natural Compounds as Potential Treatments of NF2-Deficient Schwannoma and Meningioma: Cucurbitacin D and Goyazensolide. **Otology & Neurotology**, v. 34, n. 8, p. 1519-1527, 2013.
- 62 CHEN, J. et al. Inhibition of STAT3 Signaling Pathway by Nitidine Chloride Suppressed the Angiogenesis and Growth of Human Gastric Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 2, p. 277-287, 2012.
- 63 WANG, Y. et al. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system. **Cancer Letters**, v. 415, p. 117-128, 2018.
- 64 DARNELL, J. E. Validating Stat3 in cancer therapy. **Nature Medicine**, v. 11, n. 6, p. 595-596, 2005.
- 65 GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 225-260, 1998.
- 66 BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa-B in the immune-system. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 141-179, 1994.
- 67 BARNES, P. J.; LARIN, M. Mechanisms of disease - Nuclear factor-kappa b - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.
- 68 KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kappa B activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 621-+, 2000.

- 69 YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 798-809, 2009.
- 70 SIKANDER, M. et al. Cucurbitacin D exhibits potent anti-cancer activity in cervical cancer. **Scientific Reports**, v. 6, p. 13, 2016.
- 71 MORI, N. et al. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappa B and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1828-1834, 2002.
- 72 PAN, J. Y.; ZHANG, Y. Cucurbitacin-D inhibits hepatic gluconeogenesis through activation of Stat3 signaling. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 10, n. 2, p. 2582-+, 2017.
- 73 ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, p. 3-9, 2003.
- 74 DEMARTINO, G. N.; SLAUGHTER, C. A. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22123-22126, 1999.
- 75 ORLOWSKI, M.; WILK, S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n. 1, p. 1-16, 2000.
- 76 HILT, W.; WOLF, D. H. Proteasomes: Destruction as a programme. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 3, p. 96-102, 1996.
- 77 KISSELEV, A. F.; GOLDBERG, A. L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. **Chemistry & Biology**, v. 8, n. 8, p. 739-758, 2001.
- 78 MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 10-22, 2007.
- 79 MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.
- 80 FELDMEYER, L. et al. The inflammasome mediates UVB-Induced activation and secretion of interleukin-1 beta by keratinocytes. **Current Biology**, v. 17, n. 13, p. 1140-1145, 2007.
- 81 GROSS, O. et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 433-U149, 2009.
- 82 HISCOTT, J. et al. Characterization of a functional NF-kappa-B site in the human interleukin-1-beta promoter - evidence for a positive autoregulatory loop. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 10, p. 6231-6240, 1993.
- 83 SONG, Y. et al. Cucurbitacin D is a new inflammasome activator in macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1044-1050, 2013.

- 84 ARJAIBI, H. M.; AHMED, M. S.; HALAWEISH, F. T. Mechanistic investigation of hepato-protective potential for cucurbitacins. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 7, p. 1567-1573, 2017.
- 85 ABBAS, S. et al. The cucurbitacins E, D and I: Investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver. **Toxicology Letters**, v. 216, n. 2-3, p. 189-199, 2013.
- 86 ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs-A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1699-1722, 2010.