

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**PŮSOBENÍ ALFA-HUMULENU A KARYOFYLENOXIDU  
NA OVARIÁLNÍ NÁDOROVÉ BUŇKY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Kateřina Žáková

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

Datum

Podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. a doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za jejich rady a čas, který mi věnovali při řešení dané problematiky. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Martinu Ambrožovi za odborné vedení, pomoc a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Žáková

Školitel: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název diplomové práce: Působení alfa-humulenu a karyofylenoxidu na ovariální nádorové buňky.

Seskviterpeny  $\alpha$ -humulen a  $\beta$ -karyofylenoxid jsou látky s antiproliferační aktivitou vůči mnoha nádorovým buněčným liniím. V této práci byl antiproliferační účinek  $\alpha$ -humulenu a  $\beta$ -karyofylenoxidu testován metodou NRU jak samostatně, tak v kombinaci s doxorubicinem. Na doxorubicin citlivá buněčná linie A2780 byla vůči působení doxorubicinu i seskviterpenů citlivější než linie SKOV3, přirozeně doxorubicin-rezistentní. Pro stanovení vzájemných interakcí seskviterpenů s doxorubicinem byl použit softwarový program CalcuSyn pracující na základě metody Chou-Talay. Byly stanoveny kombinační indexy seskviterpenů s doxorubicinem. Oba seskviterpeny působily na doxorubicin v linii A2780 antagonisticky a v linii SKOV3 synergisticky. Mechanismus antiproliferativního účinku všech tří testovaných látek je ovlivnění produkce ROS. Pro stanovení prooxidačních účinků látek byla použita metoda DCF. Výsledky ukázaly dobré prooxidační vlastnosti doxorubicinu, který zvyšoval produkci ROS v obou testovaných buněčných liniích. Seskviterpeny vykazovaly pouze slabé prooxidační účinky na linii A2780. Dále byla testována schopnost  $\alpha$ -humulenu a  $\beta$ -karyofylenoxidu zvyšovat intracelulární koncentraci doxorubicinu metodou UHPLC. Obě látky prokázaly schopnost zvyšovat intracelulární koncentraci doxorubicinu v obou testovaných liniích, účinnější byl  $\beta$ -karyofylenoxid. Při stanovení intracelulární distribuce doxorubicinu v buňkách pomocí konfokální mikroskopie byly výsledky neprůkazné.

## **ABSTRACT**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Žáková

Supervisor: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of alpha-humulene and caryophyllene oxide in ovarian cancer cells.

Sesquiterpenes  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene oxide are substances with antiproliferative activity against number of tumor cell lines. In this study, the antiproliferative effect of  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene oxide was tested alone and in combination with doxorubicin, using neutral red uptake assay. Doxorubicin-sensitive cell line A2780 was more sensitive to the action of doxorubicin and sesquiterpenes than SKOV3 cell line, which is naturally doxorubicin-resistant. To determine the interactions between sesquiterpenes and doxorubicin, software program CalcuSyn which is based on Chou-Talay method was used. The combination indexes of sesquiterpenes with doxorubicin were determined. Both sesquiterpenes had antagonistic effect on doxorubicin in A2780 cell line and synergistic effect on SKOV3 cell line. The mechanism of the antiproliferative effect of all three tested substances is explained by the production of ROS. For the determination of pro-oxidant effects of the tested substances the DCF assay was used. Our results showed good pro-oxidant properties of doxorubicin increasing ROS production in both tested cell lines. Sesquiterpenes showed only slight pro-oxidant effect on A2780 cell line. Furthermore, we tested the ability of  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene oxide to increase intracellular concentrations of doxorubicin using UHPLC method. Both substances showed the ability to increase intracellular concentration of doxorubicin in both tested cell lines,  $\beta$ -caryophyllene oxide being more efficient. When determining the intracellular distribution of doxorubicin in cells by confocal microscopy, the results were inconclusive.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Ovariální karcinom.....	9
2.1.1	Epidemiologie a etiologie.....	9
2.1.2	Symptomy.....	10
2.1.3	Diagnostika.....	11
2.1.4	Prognóza a terapie.....	14
2.2	Doxorubicin.....	18
2.2.1	Indikace DOX.....	19
2.2.2	Mechanismus účinku.....	19
2.2.3	Nežádoucí účinky a toxicita.....	21
2.3	Myrica rubra.....	22
2.4	Terpeny.....	23
2.4.1	Seskviterpeny.....	25
3	CÍL PRÁCE.....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
4.1	Biologický materiál a chemikálie.....	31
4.2	Přístroje.....	31
4.3	Metody.....	32
4.3.1	Buněčné linie a jejich kultivace.....	32
4.3.2	Stanovení cytotoxicity – Neutral Red Uptake test.....	36
4.3.3	Detekce reaktivních forem kyslíku (ROS).....	38
4.3.4	Stanovení akumulace DOX v buňkách.....	39
4.3.5	Nitrobuněčná distribuce DOX.....	40
4.3.6	Zpracování naměřených dat.....	40
5	VÝSLEDKY.....	42
5.1	Vliv doxorubicinu na viabilitu a proliferaci.....	42
5.1.1	24 hodinová expozice.....	42
5.1.2	48 hodinová expozice.....	43
5.1.3	72 hodinová expozice.....	44
5.2	Vliv seskviterpenů na viabilitu a proliferaci.....	44
5.2.1	24 hodinová expozice.....	45
5.2.2	48 hodinová expozice.....	46
5.2.3	72 hodinová expozice.....	47

5.3	Kombinační indexy .....	48
5.3.1	24 hodinová expozice .....	49
5.3.2	48 hodinová expozice .....	50
5.3.3	72 hodinová expozice .....	51
5.4	Kvantifikace oxidativního stresu.....	51
5.4.1	Buněčná linie A2780 .....	52
5.4.2	Buněčná linie SKOV3 .....	54
5.5	Intracelulární koncentrace doxorubicinu.....	56
5.6	Stanovení distribuce DOX v buňkách.....	58
6	DISKUZE .....	60
7	ZÁVĚR.....	63
8	LITERATURA .....	67

# 1 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou v České republice po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou smrti. V roce 2013 bylo v České republice nově diagnostikováno 81 541 pacientů se zhoubným novotvarem a 26 944 osob v souvislosti se zhoubným novotvarem zemřelo. Nejzhoubnějším gynekologickým nádorovým onemocněním je nádor vaječníků. Toto onemocnění je v České republice každoročně diagnostikováno u tisíce pacientek (Zdroj dat: Národní onkologický registr, ÚZIS ČR). Hlavní formou léčby zůstává (společně s chirurgickou léčbou a radioterapií) chemoterapie. Mnoho chemoterapeutik ovšem způsobuje závažné nežádoucí účinky, což vede k hledání nových bezpečnějších a účinnějších léčiv.

Přírodní látky přispěly již v minulosti k vývoji několika léčiv používaných v terapii rakoviny. První látky rostlinného původu zavedené do klinické praxe léčby nádorového onemocnění byly alkaloidy vinblastin a vinkristin izolované z *Catharanthus roseus* (syn. *Vinca rosea*). Další důležité sloučeniny rostlinného původu, používané v terapii rakoviny, zahrnují např. paklitaxel, alkaloid izolovaný z tisu *Taxus brevifolia*, semisyntetický derivát epipodofylotoxinu etoposid, izolován z *Podophyllum peltatum* či deriváty kaptotecinu topotekan a irinotekan. V současné době se studie opět zaměřují na hledání potenciálních nových léčiv v léčivých rostlinách a rostlinných produktech. Nedávné studie ukazují, že tvorba ROS může být jedním z mechanismů antiproliferativního účinku těchto látek (Martin-Cordero et al., 2012). Možnost použití látek s prooxidačním účinkem jako chemoterapeutických agens v léčbě rakoviny vede k jejich intenzivnímu zkoumání. Mezi tyto látky se řadí např. terpeny nacházející se v silicích mnoha rostlin.

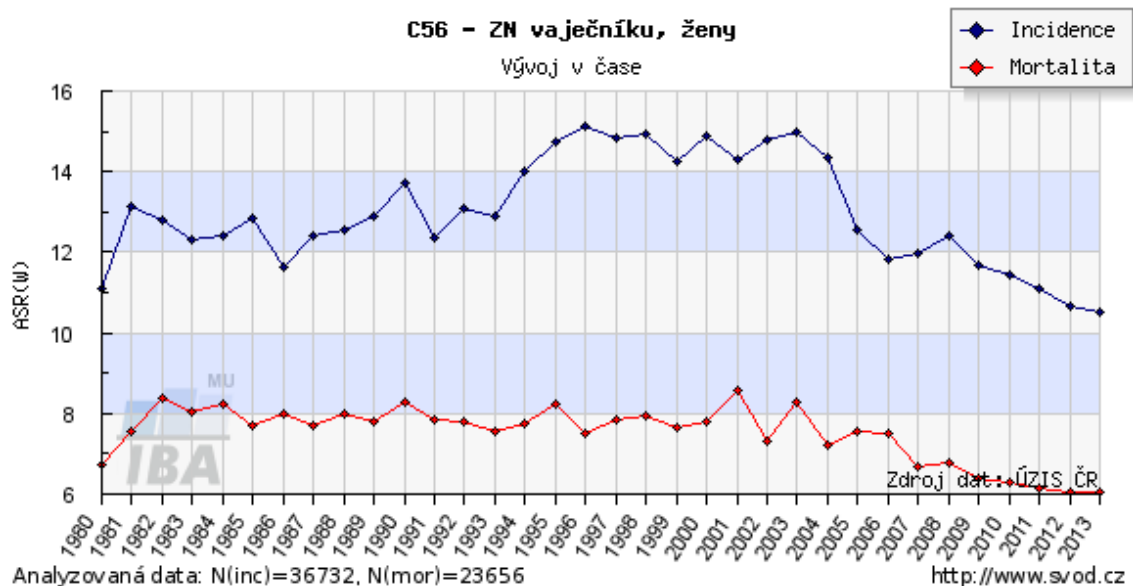


## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Ovariální karcinom

#### 2.1.1 Epidemiologie a etiologie

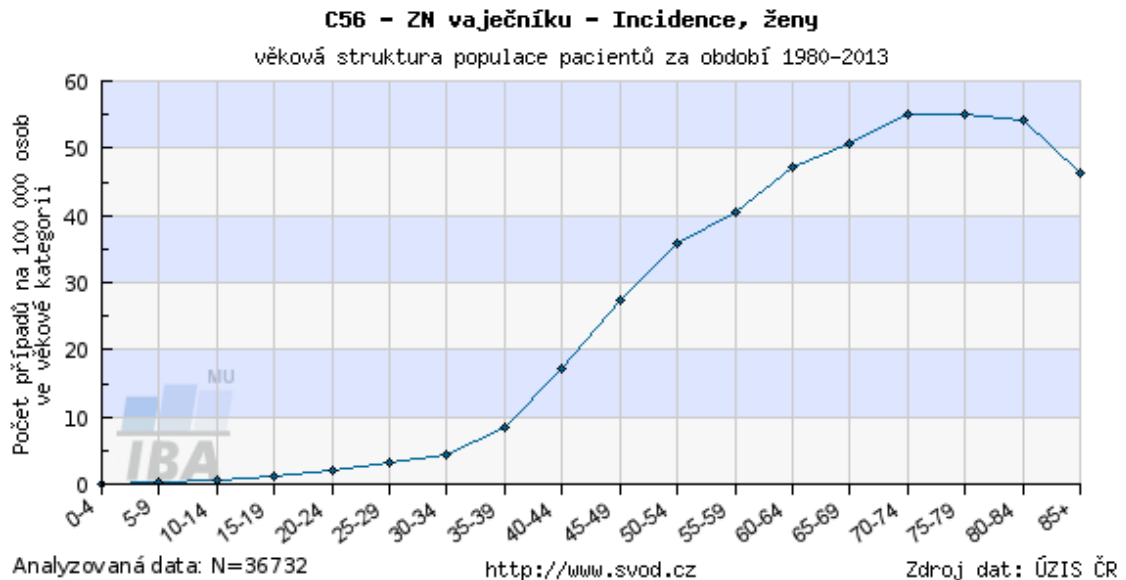
Ovariální karcinom představuje velmi heterogenní skupinu nádorů. Oproti ostatním gynekologickým nádorům je specifický ve své vysoké malignitě a tendenci k recidivám (Zavesky et al., 2011). Jde o pátý nejzhoubnější typ nádoru u žen, po karcinomu endometria je to druhé nejběžnější gynekologické nádorové onemocnění. Každý rok je na světě diagnostikováno více než 200 000 nových případů, což odpovídá přibližně 3,6% ženské populace s rakovinovým onemocněním (Ferlay et al., 2014). V roce 2013 bylo v České republice hlášeno 1045 nových případů, což odpovídá 10,52 případů na 100 000 žen. Tentýž rok zemřelo na následek ovariálního karcinomu 718 žen, mortalita je tedy 6,06 na 100 000 žen (Zdrojem dat je Národní onkologický registr spravovaný ÚZIS ČR).



Obr. 1 Incidence a mortalita zhoubných nádorů vaječníků v ČR v letech 1980 – 2013

Nejčastěji onemocnění postihuje ženy mezi 50 a 79 lety, více než 70% případů se vyskytne po 50. roce života. Až 90% žen s karcinomem ovaria nemá žádnou rodinnou historii nemoci, onemocnění u nich tedy není způsobeno genetickými faktory. Mezi další skupinu – takzvané reprodukční rizikové faktory se řadí zejména důvody zvýšení počtu

ovulací v životě ženy, může jít například o vyšší věk, brzká menarche, pozdní menopauza či nuliparita. Důvodem může být opakované poškození a hojení zárodečného epitelu povrchu ovarií, naopak protektivní vliv mají procesy potlačující ovulaci, jako je těhotenství, kojení či pravidelné užívání hormonální antikoncepce (Ebell et al., 2016).



Obr. 2 Věková struktura pacientek se zhoubným nádorem vaječníku v letech 1980-2013

Pouze 10% případů ovariálního karcinomu můžeme řadit do kategorie hereditárního onemocnění – podmíněného genetickými faktory. Z 90% jde o mutace na genech BRCA1 a BRCA2. Mutace genů BRCA1 a BRCA2 byly prokázány ve spojení s rozvojem rakoviny prsu, vaječníků a vejcovodů. Mutace neznamená jistotu propuknutí nemoci, dochází pouze ke zvýšení celoživotního rizika, u BRCA1 na 15-30%, u BRCA2 10-15% (Zavesky et al., 2011).

### 2.1.2 Symptomy

Symptomy ovariálního karcinomu jsou nespecifické. Pacientky s brzkým stádiem onemocnění ojediněle pociťují příznaky jako je bolest v oblasti pánve v důsledku torze (přetočení) vaječníku (Hennessy et al., 2009). Ve většině případů jsou brzká stadia bezpříznaková, proto se diagnóza v 70% případů stanoví až ve III. nebo IV. klinickém stadiu (dle FIGO, tab. 1). Nejprve se vyskytují neurčité příznaky, například diskomfort v dutině břišní, pálení žáhy či nadýmání.

Pokročilejší stadia se poté projevuje charakterističtějšími příznaky, jako je např. zvětšování objemu břicha, ascitem, iregularity v menstruačním cyklu, častými bolestmi

břicha, pocity tlaku v břišní dutině, dýchacími obtížemi, otokem dolních končetin jako důsledek žilní trombózy, dále příznaky obstrukce močových cest nebo tlak na močový měchýř, které se projevují častým močením malého objemu moči (Adam et al., 2004).

Tab. 1 Souhrn klasifikací TNM a FIGO

TNM	FIGO	
<b>T0</b>	0	Bez známek primárního nádoru
<b>T1</b>	<b>Stadium I</b>	<b>Tumor omezen na ovarium (jedno či obě)</b>
<b>T1a</b>	IA	Postižení jednoho ovaria, pouzdro intaktní
<b>T1b</b>	IB	Postižení obou ovarii, pouzdro intaktní
<b>T1c</b>	IC	Ruptura pouzdra, nádor na povrchu ovaria, maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu
<b>T2</b>	<b>Stadium II</b>	<b>Šíření nádoru v pánvi</b>
<b>T2a</b>	IIA	Postižení dělohy či vejcovodu
<b>T2b</b>	IIB	Postižení jiných tkání pánevních
<b>T2c</b>	IIC	Šíření v pánvi, maligní buňky v ascitu nebo peritoneálním výplachu
<b>T3</b>	<b>Stadium III</b>	<b>Nádor postihuje jedno či obě ovaria, mikroskopicky potvrzeny peritoneální metastázy mimo pánev nebo metastázy v regionálních mízních uzlinách</b>
<b>T3a</b>	IIIA	Mikroskopické peritoneální metastázy mimo pánev
<b>T3b</b>	IIB	Makroskopické peritoneální metastázy mimo pánev do 2 cm
<b>T3c</b>	IIIC	Makroskopické peritoneální metastázy mimo pánev nad 2 cm
<b>N1</b>	IIIC	Metastázy v regionálních mízních uzlinách
<b>M1</b>	<b>Stadium IV</b>	<b>Vzdálené metastázy (mimo peritoneální oblast)</b>

Stadia dle FIGO založena na chirurgickém stagingu, stadia TNM založena na klinické či patologické klasifikaci.

### 2.1.3 Diagnostika

#### 2.1.3.1 Fyzikální vyšetření

Prvním vyšetřením bývá zpravidla vyšetření pánve. Lékař kontroluje dělohu, vagínu, vaječníky a konečník a zaznamenává všechny neobvyklé změny (Ozols, 2003). Prvotním nálezem při vyšetření pánve bývá tuhá, nebolestivá nebo mírně bolestivá

rezistence. U pokročilého ovariálního karcinomu může lékař při ascitu udělat punkci nahromaděné tekutiny, ta je poté mikroskopicky kontrolována. Při podezření lze pro diagnózu využít zobrazovací metody, jako je transabdominální či vaginální ultrazvuk, výpočetní tomografie a magnetická rezonance (Adam et al., 2004).

### **2.1.3.2 Zobrazovací metody**

Základní zobrazovací metodou je ultrasonografie. Jde o jednu z nejlepších metod, jak pozorovat vaječníky. Může být prováděna transabdominálně (přes stěnu břišní) či transvaginálně (přes pochvu). Transvaginální ultrazvuk (TVU) je preferovanou metodou pro prvotní screening z důvodu jeho dostupnosti, vysokého rozlišení, a absence ionizujícího záření (Iyer & Lee, 2010). TVU zůstává jako první volba při screeningu adnex, transabdominální metoda se užívá pouze v případě, že adnexa jsou zobrazena špatně, či pokud žena odmítne vaginální skenování (Fishman et al., 2005). TVU má prokázanou užitečnost při detekci rakoviny vaječníků u asymptomatických žen, je totiž schopna detekovat i malé ovariální cysty. Není ale možno rozlišit patologické masy způsobené benigními onemocněními vaječníků od maligních mas způsobených rakovinným bujením (Kufe et al., 2003).

Přestože TVU zůstává metodou volby pro prvotní screening, má omezenou kapacitu pro charakterizaci tkáně. Magnetická rezonance má v rukou zkušeného radiodiagnostika specializovaného na gynekologické nádory také vysokou specifitu (83-93%) ve stanovení benigních a maligních ovariálních nádorů. Oproti TVU má vysokou tkáňovou specifitu – je schopna odlišit maligní masy od benigních, jako např. endometrióza, ovariální fibroma či dermoidní cysta. MRI má ovšem několik kontraindikací, například kardiostimulátor, kochleární či feromagnetické kovové implantáty. V praxi se magnetická rezonance využívá hlavně ve sporných případech jako je například odlišení tuku od krve v diferenciální diagnostice dermoidní a endometroidní cysty (Fischerová et al., 2012; Ozols, 2003).

CT není vzhledem k nízkému tkáňovému odlišení vhodnou metodou pro diferenciální diagnostiku pánevních nádorů. Většinou se využívá ke zhodnocení rozsahu pokročilého nádorového onemocnění, je schopna vyobrazit zbývající část dutiny břišní (močovody, střeva, močový měchýř) a dutinu hrudní. Proto je preferovanou

technikou v předoperační diagnostice k definování stádia onemocnění a k zhodnocení možnosti optimální chirurgické cytoredukce (Iyer & Lee, 2010; Ozols, 2003).

Pozitronová emisní tomografie kombinovaná s CT (PET/CT) není doporučovaná metoda pro primární diagnostiku zejména díky velkému množství falešně-positivních výsledků. Používá se zejména pro zpřesnění určení stádia nádoru (stagingu) – přidání PET k CT zvyšuje jeho přesnost, proto je vhodné k předoperační diagnostice u cytoredukčních operací (Iyer & Lee, 2010). Vzhledem k dostupnosti a ceně vyšetření se však k tomuto účelu používá pouze ojediněle. Je to nejpřesnější metoda k potvrzení recidivujícího nádoru, k detekci lézí a k zhodnocení léčby pro případné doléčení (Fischerová et al., 2012).

*Tab. 2 Přehled pozitiv a negativ moderních zobrazovacích metod používaných v diagnostice ovariálního karcinomu*

<b>Zobrazovací metoda</b>	<b>Pozitiva</b>	<b>Negativa</b>
<b>Ultrazvuk</b>	Rutinní, běžně dostupné, levné vyšetření. Není nutná příprava pacientky ani lačnění, bez radiační zátěže. Detailní zobrazení orgánů pánve TVU nezávisle na somatotypu pacientky. Rychlost vyšetření. Možnost zobrazení ve 3D.	Závislost na erudici vyšetřujícího a kvalitě vybavení. Horší tkáňové odlišení. Omezení přesnosti u obézních pacientů.
<b>MRI</b>	Vysoký tkáňový kontrast. Možnost zobrazení orgánu ve třech rovinách. Absence ionizujícího záření.	Časté kontraindikace (kochleární implantát, kardiostimulátor, kovové implantát). Menší dostupnost, časová náročnost a ekonomická nákladnost vyšetření.
<b>CT</b>	Dostupnější a levnější než MR. Dobré prostorové rozlišení a velký rozsah zobrazení (plíce, břicho, pánev). Rychlost vyšetření.	Perorální příprava a premedikace, nutnost lačnění před vyšetřením. Malý kontrast měkkých tkání. Radiační zátěž.
<b>PET/CT</b>	Vysoká detekční schopnost v rámci celotělového scanu.	Nízká dostupnost a vysoká cena vyšetření, perorální příprava shodná s PET. Nutnost i.v. podání radiofarmaka, akumulace látky v CNS. Nutnost lačnění, radiační zátěž. Nutná fúze s CT k upřesnění lokalizace nálezu.

### **2.1.3.3 Nádorové markery**

Sérové nádorové markery se ukázaly jako užitečné při detekci existující nemoci u několika typů rakoviny. Pro diagnostiku epiteliální rakoviny vaječníků je nejvíce prostudován antigen 125 – CA125 (Ozols, 2003). Je to glykoprotein, detekovatelný v supernatantu tkáňových kultur ovariálního karcinomu, také detekovatelný v séru. U 99% zdravých žen se plasmatická koncentrace CA125 drží pod hodnotou 35 kIU/l, u 80% pacientek s ovariálním karcinomem je vyšší (Cibula et al., 2009). Abnormální hladiny CA125 lze naměřit u 50% časných stádií ovariálního karcinomu a v 80% pokročilých stádií. Až 20% karcinomů ovaria neexprimuje marker CA125 vůbec. Zvýšené hodnoty (CA125 > 35 kIU/l) lze naměřit i u zdravých žen za fyziologických podmínek jako je menstruace, či gravidita. Také bývá zvýšen u nezhoubných gynekologických stavů, např. benigní nádory ovarií, myomy nebo endometrióza. Ke zvýšení sérových hodnot markeru CA125 dochází také u negynekologických patologických stavů, např. renální, kardiální či jaterní onemocnění. Vzhledem k vysoké falešné pozitivitě není vyšetření CA125 k detekci ovariální malignity ideální, je proto indikováno pouze při podezření na maligní ovariální nádor s cílem sledování kolísání hladin markeru během onkologické léčby (Fischerová et al., 2012).

Dalšími tumorovými markery použitelnými pro diagnostiku ovariálního karcinomu jsou nespecifické markery CEA a AFP. CEA je širokospektrý marker, který může odrážet přítomnost mnoha různých nádorů. Je důležitý k predikci terapeutického účinku, progresi onemocnění a určování prognózy rakoviny tlustého střeva, prsu a plic. AFP je globulin syntetizovaný ze zárodečných buněk žloutkového váčku, je běžně používaný jako nádorový marker hepatocelulárního karcinomu. Kombinace markerů CA125, CEA a AFP vede ke zvýšení citlivosti testu, je ale spojena s vyšším výskytem falešně pozitivních výsledků (Zhang & Zhang, 2015).

### **2.1.4 Prognóza a terapie**

Přibližně třetina žen s ovariálním karcinomem je diagnostikována před tím, než se rakovina rozšíří mimo oblast pánve (stadium I a II dle International Federation of Gynecology and Obstetrics, tab. 1). U pacientek s diagnostikovaným stádiem IA a IB, s dobře diferencovaným nádorem (G<sub>1</sub> dle WHO, tab. 3) je pětileté přežití přesahující 90%.

Tyto pacientky bývají většinou léčeny bez adjuvantní chemoterapie, naopak pacientky s horšími prognostickými faktory mající větší riziko relapsu onemocnění mohou z adjuvantní chemoterapie profitovat. (Bhoola & Hoskins, 2006). Pokud dojde k šíření nádoru v pánvi na okolní tkáň a orgány, či místní mízní uzliny (stadium II a pozdější), klesá pětileté přežití pod 75%. Při šíření nádoru do vzdálených částí těla, je pětileté přežití 28%. Celkové desetileté přežití při karcinomu ovaria je 35% (Urban, 2003).

*Tab. 3 Klasifikace nádorů podle stupně diferenciacce (dle WHO)*

Označení gradingu	Stupeň diferenciacce
G <sub>x</sub>	Nelze stanovit stupeň diferenciacce (neurčený grading)
G <sub>1</sub>	Dobře diferencovaný nádor (nízký grading)
G <sub>2</sub>	Středně diferencovaný nádor (střední grading)
G <sub>3</sub>	Málo diferencovaný nádor (vysoký grading)
G <sub>4</sub>	Nediferencovaný nádor (vysoký grading)

#### **2.1.4.1 Chirurgická léčba**

Chirurgická léčba má u ovariálního karcinomu zásadní význam nejen léčebný a význam pro určení stádia nádoru, ale také umožňuje u časných stádií rozlišit pacientky s velmi nízkým rizikem recidivy onemocnění a upustit tak od adjuvantní chemoterapie. Primární cytoredukce s následnou chemoterapií je používána jako počáteční management léčby rakoviny vaječnicků. v případě stádií vyšších, než FIGO IB je standardní léčebnou metodou kombinace radikální operační léčby s adjuvantní chemoterapií na bázi platinového derivátu s taxany. Na rozdíl od adjuvantní chemoterapie, která je standardní, výsledek chirurgické léčby závisí na mnoha faktorech – charakter nádoru (stadium nemoci, histologický typ a grading nádoru), stavu pacientky, přítomnosti metastáz a také erudici onkochirurga (Klát, 2012).

Standardním postupem je provedení dolní střední laparotomie, po níž následuje odběr ascitu, či důkladná laváž dutiny břišní pro provedení cytologického vyšetření ke stanovení nádorových buněk. Operační výkon sestává zejména z odstranění vaječnicků, vejcovodů a dělohy (Adam et al., 2004). Studie prokázaly, že pacientky s předpokládaným raným stádiem nemoci mají až v 30% případů metastázy mimo vaječníky. v tomto případě dochází k tzv. upstagingu – posunutí stadia do FIGO III (Ozols, 2003).

U pokročilých stadií má význam radikální chirurgická léčba zejména proto, že velikost ponechaného rezidua koreluje s délkou přežití (Klát, 2012). Pokud nádor není radikálně operativní, odstraní se maximálně možné množství nádoru – tzv. debulking (Adam et al., 2004). Cytoredukce nezlepšuje prognózu při ponechání rezidua většího než 2 cm, prognóza se výrazně zlepšuje při ponechání rezidua menšího než 1 cm, nebo při úplné cytoredukci (Cibula et al., 2009).

#### **2.1.4.2 Chemoterapie**

90% zhoubných nádorů vaječníků je epiteliálního původu, proto jsou vnímavější vůči cytotoxickým léčivům než jiné solidní nádory. Většina patientek je z tohoto důvodu po primární cytoredukci léčena chemoterapií. Chemoterapii zhoubných nádorů vaječníků můžeme dělit do 4 základních kategorií. Chemoterapie adjuvantní má za cíl léčbu minimální reziduální nemoci po primární operaci makroskopického nádoru, kurativní pro léčbu po cytoredukční operaci, po které zůstalo reziduum nádoru  $\leq 1$  cm. Ta, která se využívá i před operací, s cílem umožnit operativní výkon, se nazývá neadjuvantní. Poslední kategorií je chemoterapie paliativní se záměrem redukovat velikost nádoru a obtíže pacientky (Cibula et al., 2009).

Evoluce chemoterapie byla za posledních 30 let signifikantní. Prvními látkami používanými pro léčbu ovariálního karcinomu (1970-1980) byly alkylující látky, jako např. melphalan, cyklofosfamid či chlorambucil. Léčebná odpověď v této době dosahovala od 20% do 60% a průměrná doba přežití byla často v rozmezí 10 – 18 měsíců. Od 80. let minulého století byly do praxe zavedeny kombinace chemoterapeutik, nejčastěji šlo o kombinace tzv. hexaCAF (hexamethylamin, cyklofosfamid, doxorubicin a 5-fluorouracil) a CAP (cyklofosfamid, doxorubicin a cisplatina)

Po zavedení derivátů platiny do léčby se zvýšily hodnoty léčebných odpovědí na 50-60% a zvýšila se průměrná doba přežití na 12 – 30 měsíců (při optimálním debulkingu). Deriváty platiny zůstávají nedílnou součástí léčby dodnes (DiSaia et al., 2012). 90. léta minulého století byla spojena se zavedením taxanů do terapie. Na základě průkazu klinické účinnosti nahradila kombinaci cisplatina + cyklofosfamid nová kombinace cisplatina + paklitaxel. Tato kombinace byla poté nahrazena karboplatinou a paklitaxelem, tyto látky vykazovaly sníženou neuro- a nefrotoxicitu se srovnatelnou aktivitou. Další z taxanů – docetaxel, byl zaveden do praxe později (Cibula et al., 2009).



Základem léčby je derivát platiny (nejčastěji karboplatina) ve dvoj- až trojkombinaci s dalšími cytostatiky (paklitaxel, docetaxel či doxorubicin). Pro raná stádia (IA, IB a IC) je bez ohledu na grading nádoru nasazována léčba kombinací paklitaxelu a karboplatiny v jedno- či vícedenních režimech. Tato léčba je opakována každé 3 týdny ve 3 – 6 cyklech. Pro pozdní stádia (II a více) se léčba provádí v 6 – 8 cyklech.

Pokud se objeví relaps onemocnění do 6ti měsíců od ukončení primární léčby, pacientky bývají hodnoceny jako platina-rezistentní. V tomto případě je doporučována léčba monoterapií (mimo deriváty platiny), či kombinace s monoklonální protilátkou bevacizumabem (Vyzula et al., 2016). Při regresi nemoci později, než za 6 měsíců je onemocnění považováno za platina-senzitivní. V tomto případě je doporučován tzv. sekundární debulking – chirurgický zákrok pro kompletní odstranění metastáz. Po něm navazuje chemoterapie, jejíž cílem je co nejdelší období bez přítomnosti nemoci, prodloužení celkového přežití s oddálením symptomů nemoci a zvýšení kvality života (Ševčík, 2012). Doporučovaná je kombinovaná chemoterapie na bázi platinového derivátu. Nejčastěji se využívá kombinace karboplatiny s paklitaxelem, gemcitabinem či doxetaxelem (Vyzula et al., 2016).

### **2.1.4.3 Biologická léčba**

Od roku 2011 je možné použít k léčbě karcinomu ovaria i cíleně-biologickou léčbu. V roce 2011 byl Evropskou lékovou agenturou schválen k primární léčbě pokročilého stadia (IIIB, IIIC a IV) ovariálního karcinomu bevacizumab, a to v kombinaci s karboplatinou a paklitaxelem. Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka, cílená proti VEGF. Vazbou na VEGF zabraňuje jeho navázání na VEGFR v endotelu cév a tím blokuje angiogenezi a zastavuje nádorový růst (Ševčík, 2012). V dalších letech byl schválen pro léčbu rekurentního onemocnění citlivého na platinu – v kombinaci s karboplatinou a gemcitabinem, a také pro léčbu rekurentního onemocnění rezistentního k platině – v kombinaci s paklitaxelem, topotekanem či pegylovaným liposomálním doxorubicinem (Vyzula et al., 2016).

#### **2.1.4.4 Radioterapie**

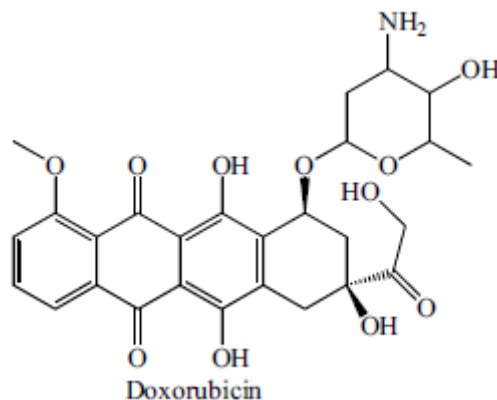
Radioterapie je v léčbě ovariálního karcinomu využívána spíše výjimečně. Celobřišní ozáření je známo od 40. let 20. století, efekt celobřišního a pánevního ozáření (WAPRT) je závislý na histologickém typu, gradingu a rozsahu onemocnění (Dolečková et al., 2015). V 70. letech 20. století, po publikaci randomizované studie z University of Texas MD Anderson Cancer Center, se postupně od používání radioterapie ustupovalo. Tato randomizovaná studie porovnávala léčbu chemoterapie a WAPRT. Bylo jištěno, že při stejné účinnosti má WAPRT vyšší toxicitu a náklady. Důvodů pro upouštění od radioterapie bylo několik, zejména špatný efekt při ozáření pouze malé pánve, špatné zkušenosti s WAPRT u pacientek s makroskopickým nádorovým postižením a také naděje vkládané do stále účinnější chemoterapie (Petera et al., 2003).

Nyní se WAPRT doporučuje jako konsolidační léčba u pacientek s karcinomem ovaria s vysokou pravděpodobností recidivy. Radioterapie má také potenciál ve využití jako samostatná adjuvantní léčba časných stádií, jako konsolidační léčba po chemoterapii u lokálně pokročilých stádií, jako záchranná léčba u chemorezistentních nádorů a také jako paliativní léčba (Dolečková et al., 2015; Petera et al., 2003).

## **2.2 Doxorubicin**

Doxorubicin (DOX) se řadí do skupiny anthracyklinů – velmi účinných chemoterapeutik, nejpoužívanějších proti rakovině. Vývoj anthracyklinů začal v 50. letech objevem kancerostatických látek v červeném pigmentu bakteriálního kmene *Streptomyces peucetius*, touto látkou byl daunorubicin. Pro nalezení látky se širším spektrem nádorů byl o 10 let později vyprodukován DOX, který má oproti daunorubicinu také nižší akutní toxicitu.

DOX obsahuje necukernou a cukernou část (Obr. 3). Necukerná sestává z tetracyklického základu s vedlejšími chinonovými skupinami, methoxy substituentem a krátkým postranním řetězcem nesoucím karbonyl, který je zakončen alkoholickou skupinou. Cukernou část tvoří daunosamin, aminocukr, který je glykosidickou vazbou připojen na jeden z cyklů (Carvalho et al., 2009).



Obr. 3 Chemická struktura doxorubicinu (Carvalho et al., 2009).

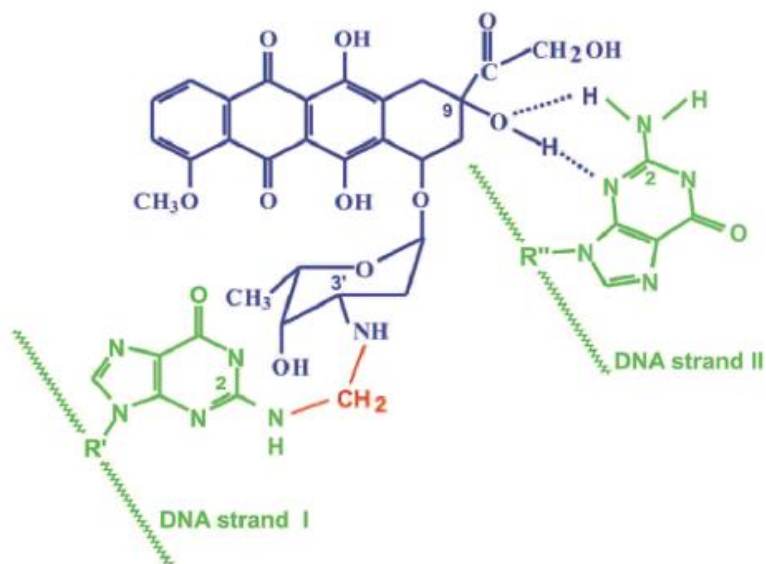
### 2.2.1 Indikace DOX

DOX má z anthracyklinů největší spektrum aktivity. Používá se pro léčbu solidních nádorů i hematologických malignit, zahrnující rakovinu prsu, prostaty, dělohy, vaječník či jícnu. Dále se používá k léčbě osteosarkomů, sarkomů měkkých tkání a Kaposiho sarkomu, myeloblastické a lymfoblastické leukémie a dalších onemocnění.

### 2.2.2 Mechanismus účinku

Mnoho studií připisuje protinádorovou aktivitu DOX jeho schopnosti interkalovat DNA. Interkalace je nekovalentní vazba cytostatika na DNA, dochází při ní k vmezeření planární necukerné části DOX mezi sousední páry DNA bazí (Obr. 4). Výsledkem je inhibice replikace i transkripce, tedy i syntézy RNA závislé na DNA. U většiny interkalačních látek se současně uplatňuje i jejich inhibiční účinek na topoisomerasu II. (Klener & Klener jr., 2010).

Topoisomerasa je zásadní enzym pro replikaci. Váže se na dvoušroubovici DNA, přerušuje řetězce, uvolňuje torzi a poté řetězce opět spojuje. Při působení anthracyklinů dochází ke stabilizaci normálně reverzibilního komplexu topoisomerasa II-DNA, nedochází tak k opětovnému spojení přerušovaných řetězců. Vznikají proto zlomy v obou řetězcích DNA, fatální pro buňku (Hortobagyi, 1997; Klener & Klener jr., 2010).



Obr. 4 Struktura DOX-DNA aduktu (Cutts et al., 2005).

Modře je znázorněna molekula DOX, červeně methylenový můstek a zeleně DNA.

Druhým základním mechanismem účinku DOX je tvorba kyslíkových radikálů. DOX může být podroben jedno-elektronové redukci množstvím nitro-buněčných oxidoreduktas, jako je NADH dehydrogenasa v mitochondrii, NADPH cytochrom P450 reduktasa v sarkoplasmatickém retikulu, NOS či xantinoxidasa v cytosolu (Keizer et al., 1990). Tento proces zahrnuje jedoelektronový transfer z redukovaných nukleotidů, které převádějí anthracenové molekuly na semichinonový radikál. Následně dochází k neenzymatické reoxidaci tohoto radikálu kyslíkem, který může tvořit superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), či peroxid vodíku, interagující s makromolekulami (Carvalho et al., 2009).

Anthracykliny ochotně vážou železo a tvoří 1:1, 2:1 či 3:1 komplexy anthracyklin-Fe. Doxorubicin může vázat železo přímo, za vzniku komplexu  $DOX-Fe^{III+}$  (Xu et al., 2005).  $DOX-Fe^{III+}$  komplex katalyzuje vznik hydroxylového radikálu z  $H_2O_2$ , terciální komplex s DNA ( $DNA-DOX-Fe^{III+}$ ) je o mnoho více efektivní. Tvorba  $OH^{\bullet}$  komplexem  $DOX-Fe^{III+}$  v přítomnosti DNA koreluje s jeho schopností štěpit DNA.

Hydroxylové radikály jsou poté zapojeny do poškození DNA způsobené DOX-Fe<sup>III+</sup> komplexem (Muindi et al., 1984).

DOX je schopen proniknout také do mitochondrií, kde dochází NADH dehydrogenasou ke vzniku ROS, které mohou reagovat s mitochondriálními biomolekulami jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. DOX interaguje i s mitochondriální DNA, tvoří adukty, které narušují přirozené funkce mitochondrie, zejména expresi proteinů a oxidaci lipidů (Xu et al., 2005).

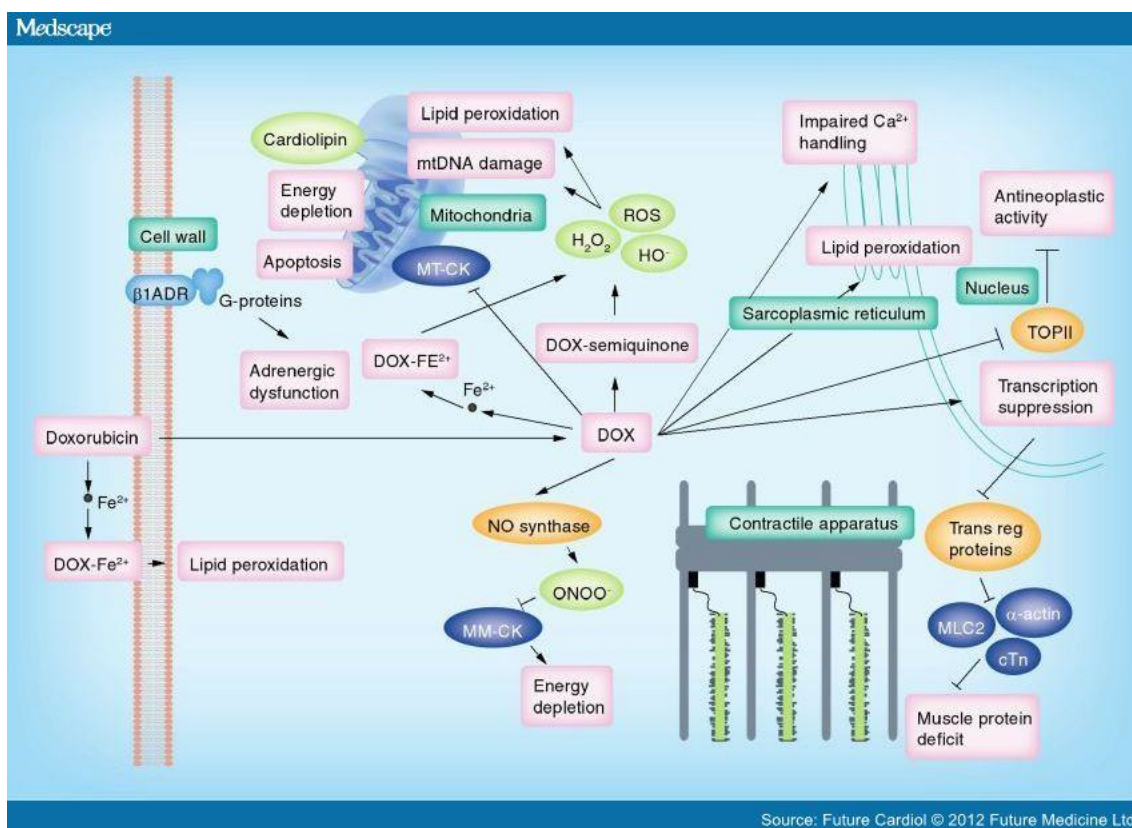
### 2.2.3 Nežádoucí účinky a toxicita

Navzdory širokému spektru DOX je jeho použití limitováno na dávce závislými nežádoucími účinky, mezi něž se řadí například: nevolnost a zvracení, stomatitida, neurologické poruchy – halucinace, závratě a točení hlavy, kumulativní kardiotoxicita, alopecie a aplazie kostní dřeně (Fong et al., 2012). Depresivní účinky na kostní dřeň mohou vést ke zvýšenému výskytu mikrobiálních infekcí, zpomalenému hojení a krvácení z dásní. Hlavním na dávce závislým nežádoucím účinkem je myelosuprese doprovázená leukopenií, neutropenií, trombocytopenií a anemií (Carvalho et al., 2009).

Nejlépe popsáný je mechanismus kardiotoxicity DOX. Existuje několik vysvětlení, proč je srdce obzvláště citlivé na působení DOX. Anthracykliny obecně způsobují poškození a ztrátu myofibril, selektivní inhibicí exprese genů pro troponin,  $\alpha$ -aktin, lehký myozinový řetězec typu 2 a M isoformu kreatinkinasy, toto poškození může vést ke vzniku kardiomyopatie (Poprach et al., 2008).

DOX tvoří komplexy s kardiolipinem, hlavním komponentem vnitřní mitochondriální membrány čímž brání vazbě mitochondriální kreatinkinasy na mitochondriální membránu. Kardiomyocyty mají vyšší hustotu mitochondrií na jednotku objemu ve srovnání s většinou tkání. Srdce také obsahuje specifickou isoformu NADH dehydrogenasy, která je schopna iniciovat redukci DOX za vzniku ROS (Obr. 5) (Carvalho et al., 2009). Zároveň je srdeční tkáň chudá na antioxidační enzymy (superoxid dismutasa, glutathion reduktasa), proto se zde projeví toxický účinek DOX ve zvýšené míře. ROS poté způsobují peroxidaci lipidů, zvyšují propustnost buněčné membrány pro vápenaté ionty, narušují funkci ATP-pumpy a tím ovlivňují kontraktilitu svalových elementů. DOX může také aktivovat některé typy kalciových kanálů

v sarkoplazmatickém retikulu a narušovat tak intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  (Poprach et al., 2008)



Obr. 5 Mechanismus kardiotoxicity doxorubicinu (Harake et al., 2012).

$\beta 1\text{ADR}$  –  $\beta 1$  adrenergní receptor,  $c\text{Tn}$  – srdeční troponin,  $\text{MLC}2$  – lehký myozinový řetězec typu 2,  $\text{MM-CK}$  – svalová kreatinkinasa,  $\text{MT-CK}$  – mitochondriální kreatinkinasa,  $\text{ROS}$  – oxidativní formy kyslíku,  $\text{TOPII}$  – topoisomerasa II

## 2.3 Myrica rubra

Voskovník červený (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) je subtropický ovocný strom pocházející z Číny, kde je kultivován po více než 2000 let. Je to ekonomicky nejdůležitější rostlina čeledi Myricaceae, její plody jsou velmi populární pro jejich chuť a barvu (Sun et al., 2013). Listy a kůra *M. rubra* se v lidovém léčitelství používají pro své bohaté léčebné účinky, zejména pro léčbu spálenin, nemocí kůže, jako antidotum, či jako antidiarhoikum. Je bohatým zdrojem fytochemických látek, zejména flavonoidů, ale také taninů či terpenů, které vykazují biologickou aktivitu (Kim et al., 2013). Dosud se studie zaměřovaly zejména na flavonoidy, které se v listech a kůře nacházejí ve vysokých

koncentracích a mohou mít antibakteriální, antioxidační, protizánětlivé, protinádorové a další zdraví podporující vlastnosti (Langhansova et al., 2014).

Esenciální oleje (EO) jsou směsi nízkomolekulárních sloučenin extrahovaných z rostlin. Hlavními složkami bývají terpenoidy a fenylpropanoidy, které dávají EO charakteristické aroma. Jsou jim připisovány mnohé farmaceutické a biologické vlastnosti, např. antibakteriální, antifungální, antivirální, antiprotozoární, antidiabetické protinádorové či protizánětlivé. Silice se mohou nacházet ve všech částech rostliny, nejčastěji jsou ukládány v siličných kanálcích, sličných buňkách či trichomech. Nejvíce zastoupenými látkami silic jsou monoterpeny, seskviterpeny a jejich oxidační deriváty.

EO jsou tvořeny různými aktivními molekulami, které ovlivňují mnohé cíle v buňce. Jejich primárním cílem je cytoplasmatická membrána. Její narušení a permeabilizace vede ke ztrátě důležitých buněčných funkcí, např. iontové homeostázy či dýchacího řetězce, narušením elektronového transportního řetězce. EO mohou mít cytostatické účinky na eukaryotické buňky – permeabilizace vnější a vnitřní mitochondriální membrány vede ke smrti buňky nekrotickou a apoptotickou (Raut & Karuppaiyil, 2014).

Silice se z rostlin mohou extrahovat mnoha procesy, lisováním, extrakcí rozpouštědlem, lisováním za studena a dalšími metodami. Nejčastější způsob extrakce je destilace, často s použitím vodní páry. Touto metodou byla extrahována také silice z čerstvých listů *M. rubra*, jejíž složení bylo analyzováno dvoudimenzionální plynovou chromatografií (GC × GC – TOFMS). Bylo zjištěno, že hlavními složkami silice *M. rubra* jsou seskviterpeny, největší zastoupení mají β-karyofylen – 43,2%, α-humulén – 21,6%, valencen – 6,0%, β-karyofylen oxid – 2,6%, *trans*-nerolidol – 1,9% a aromadendren – 0,6% (Langhansova et al., 2014).

## 2.4 Terpeny

Terpeny se v přírodě vyskytují hojně. Jedná se o rozmanitou skupinu uhlovodíků, která může být produkována širokou škálou rostlin, některými houbami a bezobratlými. Jejich koncentrace je obecně vysoká v rostlinných reprodukčních orgánech a listech během a bezprostředně po květu, jsou také významnou složkou rostlinných pryskyřic. V rostlinách se uplatňují jako feromony, atraktanty a repelenty, jsou zodpovědné

za typickou vůni mnoha rostlin. Ve vyšších koncentracích mohou být toxické, proto fungují také jako fytoalexiny v přímé obraně, či jako signály v nepřímé ochranné odpovědi proti býložravcům a patogenům (Bartikova et al., 2014; Paduch et al., 2007)

Terpeny tvoří strukturálně a funkčně různé skupiny, které jsou tvořeny kombinací několika pětiuhlíkových jednotek, zvaných izopren (2-methylbuta-1,3-dien), se sumárním vzorcem  $C_5H_8$  (Bakkali et al., 2008). Terpeny mohou existovat jako uhlovodíky, nebo mohou obsahovat kyslíkové skupiny, např. hydroxylovou, ketonickou nebo aldehydickou. Sloučeniny vzniklé chemickou modifikací terpenů se označují jako terpenoidy. Terpeny jsou označovány podle velikosti, tedy podle počtu izoprenových jednotek (Paduch et al., 2007).

*Tab. 4 Označování terpenů (Paduch et al., 2007)*

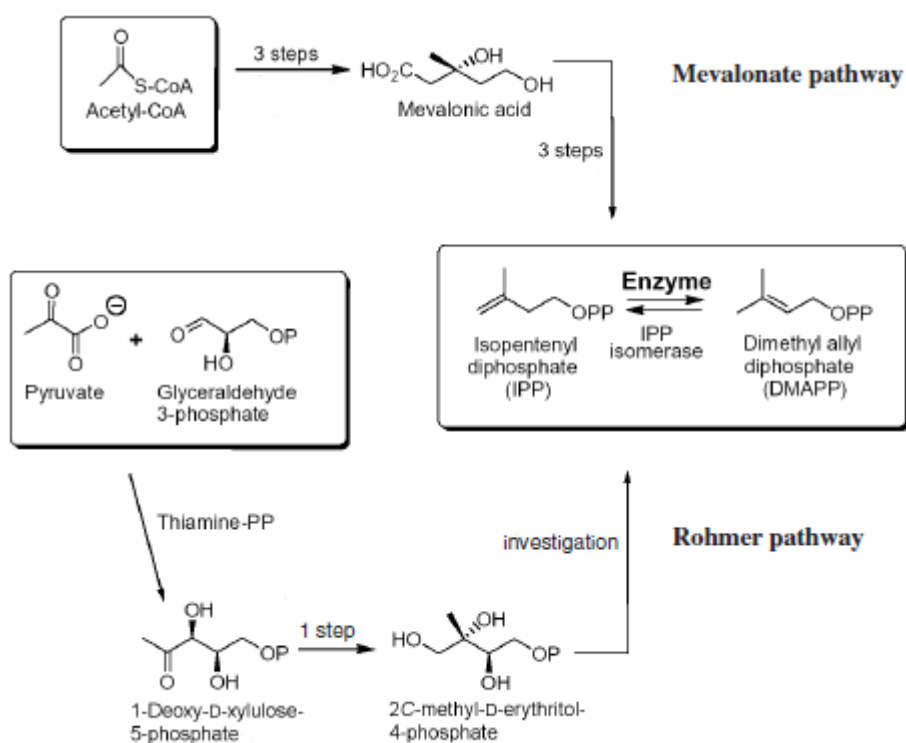
Označení terpenu	Počet izoprenových jednotek	Počet uhlíků
Hemiterpeny	1	5
Monoterpeny	2	10
Seskviterpeny	3	15
Diterpeny	4	20
Triterpeny	6	30
Tetraterpeny	8	40

Základem terpenů jsou izoprenoidní jednotky – isopentenyl difosfát (IPP) a jeho izomer dimethylallyl difosfát (DMAPP), které mohou vznikat dvěma biochemickými drahami. První je klasická mevalonátová dráha, lokalizovaná v cytosolu. V této dráze jsou 3 molekuly acetyl-CoA kondenzovány za vzniku 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA s následnou redukcí na mevalonát, který je poté přeměněn na IPP (Obr. 6).

Druhá, tzv. mevalonát-nezávislá nebo-li Rohmerova dráha, byla objevena u některých bakterií a v plastidech nižších i vyšších rostlin. Kondenzací glycerinaldehyd-3-fosfátu a pyruvátu zde vzniká 1-deoxy-D-glukosa 5-fosfát, která je poté následnými reakcemi přeměněna na IPP (Davis & Croteau, 2000; Paduch et al., 2007). Všechny terpenoidy jsou odvozeny od prekursoru IPP, který je IPP isomerasou přeměněn na DMAPP. Pro vznik terpenů je DMAPP kondenzován s IPP pomocí prenyltransferas za vzniku desetiuhlíkatého geranyldifosfátu (GPP), farnesyl difosfátu (FPP) s 15 uhlíky či dvacetihlíkatého geranyl-geranyl difosfátu (GGPP). Z těchto acyklických



meziproduktů jsou poté syntasami tvořeny monoterpeny – z GPP, seskviterpeny – z FPP či diterpeny – z GGPP (Davis & Croteau, 2000).



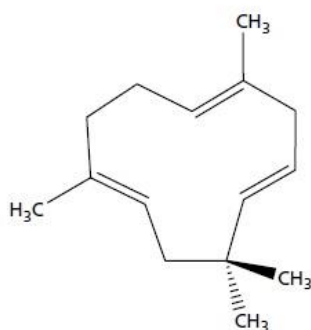
Obr. 6 Mevalonátová a Rohmerova dráha v biosyntéze terpenů (Paduch et al., 2007)

### 2.4.1 Seskviterpeny

Seskviterpeny obsahují 3 izoprenové jednotky, mohou být acyklické (farnesol), nebo to mohou být mono-, bi-, tri-, či tetracyklické systémy (Bartikova et al., 2014). Jejich zástupci mohou mít antimikrobní a antifungální aktivitu (farnesol, nerolidol), protizánětlivé účinky (costunolid, parthenolid), antiparazitickou aktivitu (artemisinin a jeho deriváty), mohou sloužit jako enhancery kožní penetrace (nerolidol) a mohou mít také další biologické aktivity (Paduch et al., 2007).

### 2.4.1.1 $\alpha$ -humulen

$\alpha$ -humulen (HUM), chemicky (1E,4E,8E)-2,6,6,9-tetramethylcykloundeka-1,4,8-trien (Obr. 7), někdy také označován jako  $\alpha$ -karyofylen, je přírodně se vyskytující monocyklický seskviterpen. Obsahuje tři dvojné vazby a šest allylových poloh, které mohou být teoreticky oxidovány. HUM může být také autooxidován při interakci s ROS. Při autooxidaci dochází ke spontánní radikálové reakci s tripletovým kyslíkem ( $^3\text{O}_2$ ), hlavními autooxidačními produkty jsou epoxidy a diepoxidy humulenu (Steenackers et al., 2015; Zigon et al., 2015).



Obr. 7 Strukturní vzorec humulenu (Legault & Pichette, 2007)

Jeho jméno je odvozeno od chmele otáčivého – *Humulus lupulus*, v jehož silici je HUM hlavní komponentou. V závislosti na odrůdě chmele má HUM v silici hmotnostní podíl 5 – 45% (Steenackers et al., 2015). Kromě EO *Humulus lupulus* a *Myrica rubra* je v menším množství obsažen také v EO dalších rostlin, např. *Abies balsamea* (Legault & Pichette, 2007), *Piper gaudichaudianum* (Sperotto et al., 2013), *Cordia verbenacea* (Chaves et al., 2008) nebo v *Salvia officinalis* (el Hadri et al., 2010).

Perorální podávání HUM izolovaného z *Cordia verbenacea* prokázalo jeho inhibiční účinky na experimentální zánětlivé modely myši a potkanů. Byl účinný při snižování zánětlivé odpovědi při otoku myši tlapy navozeném PAF, bradykininem, ovoalbuminem a histaminovou injekcí. Také působil proti akutní i pozdní fázi karagenanem navozeném otoku myši a krysí tlapy. Perorální systémová léčba způsobila inhibici syntézy zánětlivých faktorů IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  a také uvolnění PGE $_2$  v reakci na karagenanovou injekci, HUM také významně inhiboval expresi dvou důležitých proteinů zánětu – COX-2, a NOS (Chaves et al., 2008). Preventivně či terapeuticky podávaný HUM snižuje eosinofilní migraci do bronchoalveolární tekutiny a plicní tkáň při alergickém zánětu dýchacích cest. Inhibicí aktivace transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B

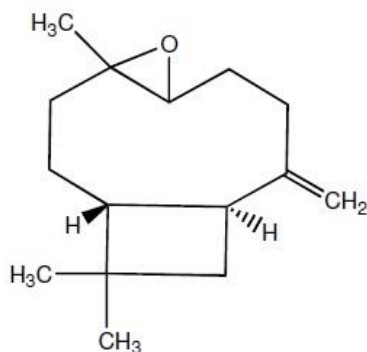
a AP-1 snižuje produkci hleny a uvolňování prozánětlivých cytokinů, čímž představuje atraktivní molekulu s významem pro léčbu astmatu a související zánětlivé a alergické reakce (Rogerio et al., 2009).

HUM vykazuje antiproliferační účinek na mnoho buněčných linií. Je o mnoho méně toxický vůči normálním fibroblastům, než vůči nádorovým buňkám (Legault et al., 2003). Má antiproliferační efekt např. proti buňkám alveolárního adenokarcinomu – A-549, cervikálního karcinomu – HeLa, adenokarcinomu kolonu – HT-29, kolorektálního adenokarcinomu – Caco2 a DLD-1 (Vinhole et al., 2014), adenokarcinomu ledvin – ACHN, karcinomu prostaty – LNCaP a PC-3, amelanotického melanomu – C32, rakoviny prsu – MCF-7 (Sperotto et al., 2013) a dalším liniím. Jeho cytotoxická aktivita je vysvětlována deplecí glutathionu a produkcí ROS. HUM může indukovat aktivitu glutathion-S-transferasy (GST), což naznačuje, že GST a glutathion (GSH) se mohou podílet na jeho metabolizaci. Bylo prokázáno, že indukce genové exprese GST může být regulována intracelulární hladinou GSH a že ztráta GSH se podílí na cytotoxicitě několika sloučenin. HUM vyvolává na dávce a čase závislou depleci intracelulárního GSH, což může přispívat k jeho toxicitě. GSH také hraje velkou roli při buněčné obraně proti oxidativnímu stresu, GSH je substrátem GSH peroxidasy a GSH reductasy, které se podílejí na přeměně peroxidu vodíku, který je produkován dýchacím řetězcem, na vodu. Snižená koncentrace GSH tak může vést k hromadění ROS, které mohou způsobit poškození proteinů, lipidů a DNA a vést k buněčné smrti (Bartikova et al., 2014; Legault et al., 2003).

#### **2.4.1.2 $\beta$ -karyofylenoxid**

Systematický název  $\beta$ -karyofylenoxidu (CAO) je (1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimethyl-9-methylen-5-oxatricyklo[8.2.0.0<sup>4,6</sup>]dodekan (Obr. 8). Je to bicyklický seskviterpen přírodně se nacházející v EO mnoha rostlin využívaných v tradiční medicíně a jako koření. Využívá se také jako ochucovadlo a konzervant v kosmetickém a potravinářském průmyslu. Kromě silice *Myrica rubra* je také obsažen v EO *Athanasia brownii* (Rasoanaivo et al., 2013), *Psidium guajava*, *Origanum vulgare*, *Eugenia caryophyllata*, *Piper nigrum* (Kim et al., 2014a), *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum* a *Humulus lupulus* (Di Sotto et al., 2013). Je oxidačním produktem

( $\beta$ )-karyofylenu. Je také jedním z nejzastoupenějších oxidovaných seskviterpenů v EO (Rasoanaivo et al., 2013).



Obr. 8 Strukturální vzorec  $\beta$ -karyofylenoxidu (Jun et al., 2011; Rasoanaivo et al., 2013)

CAO efektivně působí proti dermatofytům *Trichophyton mentagrophytes* a *T. rubrum*, což jsou nejčastější původci onychomýkóz (Yang et al., 1999). Bylo zjištěno, že CAO má stejně jako HUM významné protizánětlivé účinky v karagenanem navozeném otoku tlapy, a u vatovým tamponem indukovaného granulomu. Byla prokázána antipyretická a anti-artritická aktivita CAO u krys. Stejně jako HUM indukuje aktivaci detoxikačního enzymu GST. Působí jako antikarcinogenní látka, má prokazatelnou *in vitro* antiagregační aktivitu (Park et al., 2011).

Vykazuje cytotoxický efekt proti několika nádorovým liniím, např. proti buňkám cervikálního karcinomu – HeLa, hepatocelulárního karcinomu – HepG2, karcinomu žaludku – AGS, SNU-1 a SNU-16 (Jun et al., 2011), mnohočetného myelomu – U266, MM1.S (melphalan senzitivní) a karcinomu prostaty – DU145 (Kim et al., 2014a). Jeho účinek může být zprostředkován supresí aktivačních STAT3 drah v nádorových buňkách, PI3K/AKT/mTOR/S6K1 signálních drah a aktivací MAPK signální dráhy zprostředkované ROS (Kim et al., 2014b). MAPK regulují mnoho buněčných funkcí, včetně proliferace, diferenciace a apoptózy. Aktivace STAT3 je často spojována s proliferací, invazí, metastází a angiogenezí nádorových buněk. CAO potlačuje expresi několika STAT3 regulovaných genů, čímž ovlivňuje proteiny spojené s proliferací (cyklin D1 a cyklin E), invazí (MMP-9 a COX-2) a antiapoptózou (Bcl-xl, survivin, IAP-1 a IAP-2), které mohou být zodpovědné za jeho antiproliferační a antiinvazivní účinky na nádorové buňky (Kim et al., 2014a).

CAO potencuje TNF $\alpha$  indukovanou apoptózu a potlačuje TNF $\alpha$  indukovanou invazi nádorových buněk, které vyžadují aktivaci nukleárního faktoru NF- $\kappa$ B. Bylo

zjištěno, že  $TNF\alpha$  stimuluje expresi genových produktů podílejících se na anti-apoptóze (IAP1, IAP2, Bcl-2, Bcl-XL a survivinu), proliferaci (COX-2, cyklin D1, a c-myc), invazi (MMP 9 a ICAM-1), a angiogenezi (VEGF), a že CAO potlačuje jejich expresi. CAO také může potencovat apoptotické účinky paklitaxelu a DOX (Kim et al., 2014b).

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

- 1) Porovnat antiproliferační účinek vybraných seskviterpenů ( $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -karyofylenoxid), doxorubicinu a jejich kombinací na buněčných liniích
  - a. citlivých na DOX (A2780)
  - b. rezistentních na DOX (SKOV3)
- 2) Stanovit kombinační indexy  $\alpha$ -humulenu a  $\beta$ -karyofylenoxidu s doxorubicinem
- 3) Zjistit vliv  $\alpha$ -humulenu,  $\beta$ -karyofylenoxidu a doxorubicinu na produkci intracelulárních ROS
- 4) Stanovení intracelulární koncentrace doxorubicinu a jeho distribuce v buňce

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Biologický materiál a chemikálie

Buněčné linie A2780 a SKOV-3 – věnovány Ústavem lékařské biologie a genetiky,  
Lékařská fakulta UK HK

RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, ČR)

McCoy's 5A Medium (Sigma-Aldrich, ČR)

Doxorubicin (Sigma-Aldrich, ČR)

$\alpha$ -humulene (Sigma-Aldrich, ČR)

(-)-caryophyllene oxide (Sigma-Aldrich, ČR)

FBS – fetální bovinní sérum (Lonza, ČR)

Penicilin/Streptomycin (Lonza, ČR)

L-Glutamin (Sigma-Aldrich, ČR)

PBS – fosfátový pufr se solemi v tabletách (Sigma-Aldrich, ČR)

Trypsin-EDTA (Lonza, ČR)

DMSO – dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, ČR)

Neutral Red Solution 0,33% (Sigma-Aldrich, ČR)

Běžné chemikálie čistoty p. a.

### 4.2 Přístroje

analytické váhy – Scaltec SBC 22 (Scaltec Instruments GmbH, Německo)

centrifuga – Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Německo)

CO<sub>2</sub> inkubátor – Heraeus Heracell 150 (Thermo Scientific, Spojené státy americké)

laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C. (Bio Air Instrument s.r.l, Itálie)

invertovaný mikroskop – Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Japonsko)

mrazicí box – HeraFreeze

zamrazovací kontejner – Nalgene (Sigma-Aldrich, Spojené státy americké)

spektrometrický a spektrofluorimetrický analyzátor – Tecan Infinite M 200 (Tecan Trading AG, Švýcarsko)

třepačka – IKA MS2 Minishaker (IKA, Německo)

invertovaný epifluorescenční mikroskop – Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Japonsko)  
s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5.5 (Andor Technology, Spojené Království)  
a NIS Elements AR 4.20 software (Laboratory Imaging, Česká Republika)

kapalinový chromatograf – Agilent 1290 Series vybaven kolonou Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 × 50 mm, 1,8 μm) s 1290 Infinity inline filtrem (Agilent Technologies, Spojené státy americké)

## **4.3 Metody**

### **4.3.1 Buněčné linie a jejich kultivace**

#### **4.3.1.1 *Buněčné linie***

V experimentální části byly použity buněčné linie A2780 a SKOV3, odvozené od epiteliálních nádorů vaječníků. Buňky byly věnovány Ústavem lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta UK HK.

Buněčná linie A2780 pochází z nádorové tkáně neléčené pacientky s epiteliálním karcinomem ovaria. Tyto buňky rostou v monovstvě, nebo jako suspenzní kultura. Buňky byly pasážovány pravidelně dvakrát týdně metodou trypsinizace. Kultivace probíhala při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky jsou přirozeně citlivé na cisplatinu a doxorubicin. Jsou parentální linií pro doxorubicin-rezistentní variantu – A2780 ADR a cisplatinarezistentní variantu – A2780 cis (ECACC, 2016).

Buněčná linie SKOV3 pochází z nádorové tkáně neléčené 64 leté pacientky s adenokarcinomem vaječníků. Buňky rostou přisedle v monovstvě. Buňky byly kultivovány a pasážovány stejně jako buněčná linie A2780. Buněčná linie je rezistentní vůči tumor nekrotizujícímu faktoru a několika cytotoxickým látkám, mezi něž patří difterický toxin, cisplatinu či doxorubicin (ATCC, 2016).



### 4.3.1.2 Příprava kultivačních médií

#### Linie A2780

Základem pro kultivační médium bylo RPMI-1640. Jedná se o modifikované McCoy's 5A Medium Modified obohaceno o vyšší hladiny inositolu. Při kultivaci bylo použito médium modifikováno 20 mM HEPES a L-glutaminem (0.3g/l), bez hydrogenuhličitanu sodného.

K médiu bylo přidáno FBS, předem inaktivované při 57°C po dobu 30 minut, dále 5 ml L-glutaminu 2mM. Jako antiinfekční agens byl použit úzkospektrý penicilin a širokospektrý aminoglykosidový streptomycin, tato kombinace účinně působí proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Použitá množství jednotlivých složek jsou uvedena v tabulce.

*Tab. 5 Přehled složení kultivačního média pro linii A2780*

RPMI-1640	450 ml
FBS inaktivované	50 ml (10%)
L-Glutamin 2mM	5 ml (1%)
Penicilin/Streptomycin	2,5 ml (0,5%)

#### Linie SKOV-3

Jako základ kultivačního média bylo použito McCoy's 5A Medium modified, ke kterému bylo přidáno FBS, předem inaktivované, a kombinace antibiotik penicilin/streptomycin. Použitá množství jednotlivých složek jsou uvedena v tabulce.

*Tab. 6 Přehled složení kultivačního média pro linii SKOV-3*

McCoy's 5A Medium	450 ml
FBS inaktivované	50 ml (10%)
Penicilin/Streptomycin	2,5 ml (0,5%)

#### **4.3.1.3 Zamrazování buněčných linií**

K dlouhodobému uchovávání buněk se používá jejich mrazení – kryokonzervace. Nejlepší způsob pro kryokonzervaci buněk je uchovávání v tekutém dusíku v kompletním médiu s přidavkem kryoprotektivního agens – např. DMSO. Kryoprotektivní agens snižuje teplotu tuhnutí média a umožňuje pomalejší zmrazení, čímž se snižuje riziko vzniku krystalů ledu a tím i poškození buněk (Vejražka, 2008).

Suspenze buněk získaná pasáží se naředila tak, aby byl v médiu počet buněk odpovídající asi 80 – 90% konfluenci na ploše 25 cm<sup>2</sup>. Suspenze byla napipetována do zamrazovacích zkumavek o objemu 1,5 ml po 1,2 ml. Do zkumavky bylo následně přidáno 150 µl sterilního FBS a 150 µl sterilního DMSO. Poté byla zkumavka rychle uzavřena a buněčná suspenze promíchána. Zkumavky byly ihned umístěny do zamrazovacího kontejneru (Nalgene, Sigma-Aldrich), který byl naplněn isopropanolem. Kontejner byl poté co nejrychleji umístěn do mrazicího boxu (-80°C), kde probíhalo gradientové zamrazení. Po nejméně dvou hodinách byly zamražené buněčné suspenze přeneseny do tekutého dusíku pro dlouhodobé uchovávání.

#### **4.3.1.4 Rozmrazování buněčných linií**

Před kultivací je nutné buňky rozmrazit a přenést je do kultivačního média. Proces rozmrazování je pro buňky velmi stresující, rychlost práce a použití vhodné metody zajistí přežití velké části zmrazených buněk.

Do 15 ml zkumavky bylo napipetováno 12 ml nezahřátého kultivačního média. Po vyjmutí zamrazovací zkumavky z tekutého dusíku byla zkumavka ponořena na 1 – 2 minuty do vodní lázně o teplotě 37 °C pro rychlé rozmrazení buněk. Po desinfekci víčka zkumavky byla postupně sterilně přidávána část média. Rozpuštěná část suspenze v médiu byla odsáta a přidána do zkumavky ke zbylému médiu, tento proces byl opakován do úplného rozpuštění suspenze. Po rozmrazení byla suspenze homogenizována a zkontrolována pod mikroskopem. Suspenze byla centrifugována 5 minut při 70 g a laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl odsát supernatant a peleta byla resuspendována v 15 ml nezahřátého média. Tato suspenze byla přenesena do kultivační lahve 75 cm<sup>2</sup> a 24 hodin inkubována při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Po 24 hodinách bylo vyměněno kultivační médium.

#### **4.3.1.5 Pasážování adherentních buněk**

Většina buněčných kultur je adherentní – rostou přichycené na vhodném kultivačním povrchu. Adherentní buňky jsou při pasážování uvolněny od kultivačního povrchu i od sebe navzájem. Součástí mnoha adhezních faktorů jsou dvojmocné ionty, zejména vápenaté a hořečnaté. Při pasážování dochází k jejich odstranění opláchnutím médiem, a také použitím chelatátorů – např. EDTA, což umožní větší účinnost proteas, jako je trypsin. Tyto proteasy se používají pro rozrušení vzájemných mezibuněčných interakcí, které jsou zprostředkovány bílkovinnými adhezními molekulami (Vejška, 2008).

Po vyjmutí z termostatu bylo z kultivační lahve slito médium. Poté byly buňky dvakrát opláchnuty 7 ml sterilního fosfátového pufru (PBS). Po slítí PBS byly do kultivační lahve po kapkách napipetovány 2 ml roztoku 0,25 % trypsinu s EDTA, který byl jemným kývavým pohybem rozprostřen po povrchu celé lahve. Po 30 sekundách inkubace bylo odsáto 1,5 ml Trypsinu-EDTA a lahev byla uzavřena a opět umístěna do termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), stav buněk byl pravidelně kontrolován mikroskopem. Ve chvíli, kdy měla většina buněk kulový tvar, byly buňky prudkým pohybem sklepnuty do spodní části lahve. Účinkování trypsinu bylo zastaveno napipetováním 4 ml kultivačního média předehřátého na 37°C, buňky byly spláchnuty ze stěn lahve a buněčná suspenze byla homogenizována pipetou.

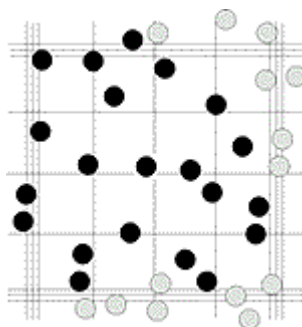
Takto připravená buněčná suspenze byla dle potřeby využita pro experimenty, či dále naředěna a přenesena do nové kultivační lahve k zajištění růstu buněk. Pro kultivaci byla přenesena potřebná část suspenze do sterilní lahve a doplněna předehřátým kultivačním médiem na celkový objem 13 ml. Lahev poté byla umístěna v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### **4.3.1.6 Určování koncentrace buněčné suspenze**

Koncentrace buněčné suspenze může být určována dvěma základními přístupy. První, ruční počítání, využívá spojení speciálních kalibrovaných počítacích komůrek (Cyrusova, Bürkerova, Thomova, Neubauerova a další) pod světelným mikroskopem. Druhá, poloautomatická metoda, využívá počítání pomocí průtokové cytometrie.

Nejjednodušší metodou počítání buněk je počítání pomocí komůrky. Pro laboratorní potřeby se většinou používá Bürkerova komůrka, ta je složena ze dvou měřících políček, která jsou rozdělena mřížkou na 9 velkých čtverců (každý o ploše 1 mm<sup>2</sup>). Tyto čtverce jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců. Hloubka komůrky je 0,1 mm, celkový objem jednoho měřícího políčka je tak 0,9 mm<sup>3</sup> (9 μl).

Pipetou bylo do každého měřícího políčka napipetováno 9 μl buněčné suspenze. Naplněná počítací komůrka byla umístěna pod mikroskop tak, aby počítací mřížka byla v ohnisku mikroskopu. Je třeba počítat buňky úhlopříčně v alespoň pěti čtvercích napříč komůrkou. Počítají se i všechny buňky dotýkající se (vně i zevnitř) levé a horní strany. Buňky dotýkající se pravé a dolní strany (zevnitř i zvenčí) se do počítání nezahrnují (Obr. 9).



Obr. 9 Pravidlo pro počítání buněk v Bürkerově komůrce. (Laboratory Resource, 2014)

Černě označené buňky jsou buňky, které se do počítání zahrnují, světlé buňky jsou pak ty, které se nepočítají.

Po spočítání buněk v jednotlivých čtvercích je třeba vypočítat koncentraci buněk v suspenzi. Pro tento výpočet slouží vzorec:

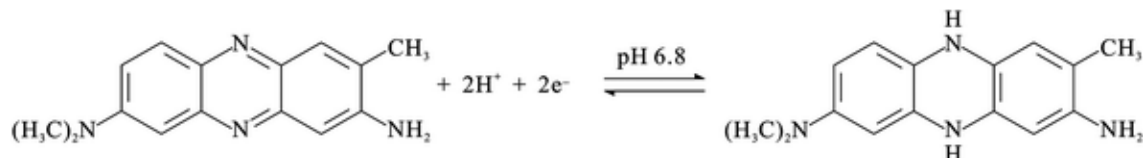
$$c = \frac{x}{y \times 16}$$

Kde c je výsledná koncentrace buněk vyjádřena jako 10<sup>4</sup> buněk / 1 ml, x je počet buněk zjištěných výpočtem z Bürkerovy komůrky a y je počet počítaných čtverců (v obou měřících políčkách).

#### 4.3.2 Stanovení cytotoxicity – Neutral Red Uptake test

Neutral red uptake test je obecně prováděn na adherentních buňkách. Neutrální červeně je slabé kationické barvivo, které snadno proniká buněčnou membránou neionickou pasivní difuzí a akumuluje se intracelulárně v lysozomech, kde váže

anionické a/nebo fosfátové skupiny lysosomální matrix pomocí elektrostatických hydrofobních vazeb. Při fyziologickém pH, má barvivo náboj blízký nule, což mu umožňuje průnik membránami buňky. Uvnitř lysosomů je přítomen protonový gradient zajišťující pH nižší, než pH cytoplasmu. Barvivo tak přijímá náboj (Obr. 10) a je zadrženo uvnitř lysosomu. (Repetto et al., 2008)



Obr. 10 Redoxní rovnice neutrální červeně. (Lin et al., 2012)

Test NRU byl proveden podle standardního protokolu (Borenfreund & Puerner, 1984). Do 96ti-jamkových destiček bylo sterilně nasazeno 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze v koncentraci potřebné pro dosažení konfluence (50 000 buněk na ml, růst 24 hodin). Poté byly buňky ovlivněny 100  $\mu\text{l}$  čerstvě připravené testované látky v rostoucích koncentracích v kompletním médiu a inkubovány 24, 48 a 72 hodin. Pro jamky bez buněk (blank) bylo použito kompletní médium. Kontrolní jamky (neovlivněné buňky) byly plněny 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze a 100  $\mu\text{l}$  kompletního média.

Po inkubaci byly jamky promyty 200  $\mu\text{l}$  předehřátého PBS, do každé jamky (včetně blanku a kontrolních jamek) bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku neutrální červeně v kompletním médiu (pro buňky A2780 – 40  $\mu\text{l/ml}$ , SKOV3 – 60  $\mu\text{l/ml}$ ). Poté byly destičky umístěny do termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), kde byly 3 hodiny inkubovány.

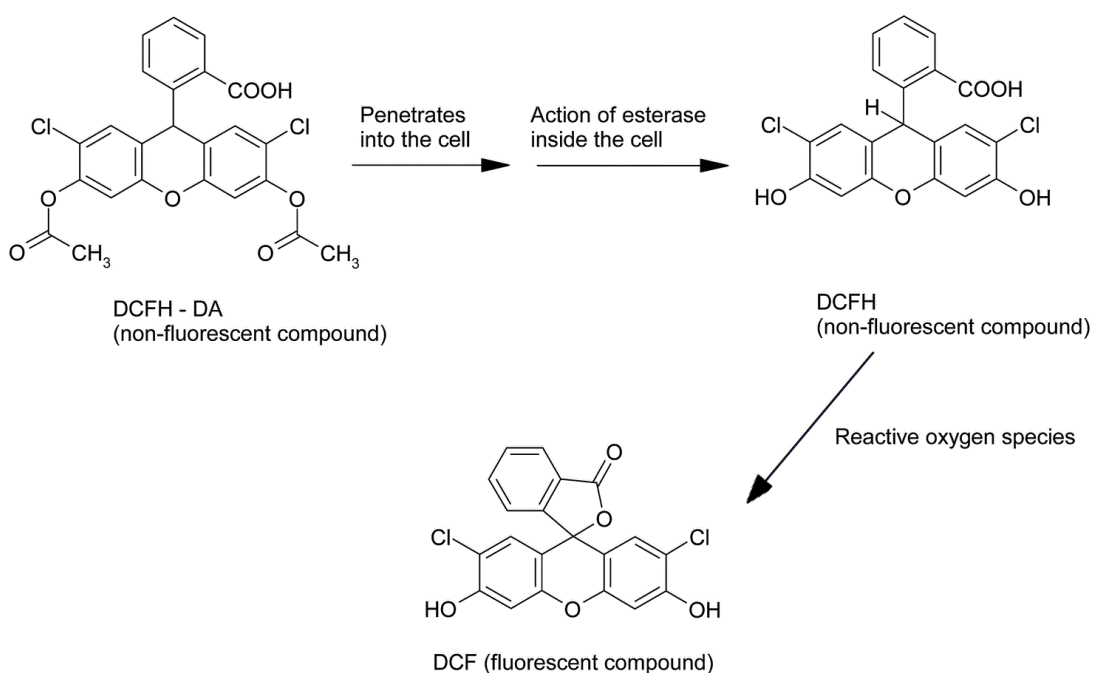
Po třech hodinách bylo z destiček odsáto veškeré médium a buňky byly opatrně promyty 300  $\mu\text{l}$  PBS. Poté bylo k buňkám napipetováno 100  $\mu\text{l}$  fixačního roztoku (10 g/l CaCl<sub>2</sub> v 0,5% formaldehydu). Destičky byly ponechány 15 minut stát při pokojové teplotě. Poté byl fixační roztok nahrazen 200  $\mu\text{l}$  lyzačního roztoku (1% CH<sub>3</sub>COOH v 50% ethanolu) a destička se nechala třepat 30 minut na třepačce pro extrakci barviva z buněk.

Absorbance byla měřena při 540 nm na čtečce mikrotitračních destiček (Tecan Infinite M 200). Pro vyhodnocení optické hustoty byl vypočten rozdíl mezi absorbancí jamek se sledovanými látkami či kontrolou a absorbance pozadí destiček.

### 4.3.3 Detekce reaktivních forem kyslíku (ROS)

Existují různé metody posouzení oxidačního poškození buněk, například měření lipoperoxidačních produktů a markerů poškození DNA, které ale nehodnotí ROS přímo. Pro toto hodnocení se využívá test s dichlorofluoresceinem.

Detekce kyslíkových radikálů je založena na skutečnosti, že nefluorescentní deriváty fluoresceinu (např. 2',7'- dichlorofluorescein diacetát – DCFH-DA) emitují fluorescenci po oxidaci reaktivními formami kyslíku. Emitovaná fluorescence je přímo úměrná koncentraci kyslíkových radikálů. Po přidání k buňkám prochází neionická, nepolární molekula DCFH-DA do buňky a je enzymaticky hydrolyzována intracelulárními esterasami na nefluorescentní dichlorofluorescein (DCFH). V přítomnosti reaktivních forem kyslíku je DCFH oxidováno na dichlorofluorescein, – DCF, vysoce fluorescenční sloučeninu, která může být detekována fluorescenční spektroskopií při 495 – 529 nm (Obr. 11) (Wang & Joseph, 1999).



Obr. 11 Tvorba fluorescenční sloučeniny DCF díky ROS (Aula et al., 2015)

Do 96ti-jamkových destiček bylo sterilně nasazeno 100  $\mu$ l buněčné suspenze v koncentraci potřebné pro dosažení konfluence 90% (50 000 buněk na ml, růst 24 hodin). Poté bylo odsáto veškeré médium a k buňkám bylo přidáno 100  $\mu$ l testované látky (ve vzestupných koncentracích, každá koncentrace minimálně v triplikátu) ředěné v PBS. Jako kontrola posloužila buněčná suspenze, ke které bylo přidáno pouze PBS.

Do těchto jamek nebylo po inkubaci napipetováno H<sub>2</sub>DCF-DA, aby byla odhalena případná autofluorescence buněk. Destičky byly umístěny do termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), kde byly 12 hodin inkubovány. 30 minut před koncem inkubace bylo do každé jamky přidáno 100 µl H<sub>2</sub>DCF-DA zředěného PBS na koncentraci 5 µM. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát je nutno chránit před světlem, ředění PBS i pipetování do jamek tak bylo provedeno po tmě. Destičky byly zabaleny do alobalu a inkubovány 30 minut. Fluorescence byla měřena na spektrometrickém analyzátoru Tecan Infinite M 200 v 5ti minutových intervalech (37°C, excitační filtr – 490 nm, emisní filtr – 530 nm). Výsledky byly zpracovány jako závislost fluorescence na čase.

#### **4.3.4 Stanovení akumulace DOX v buňkách**

##### ***4.3.4.1 Příprava vzorku pro UHPLC analýzu***

Do 12ti-jamkových destiček bylo sterilně nasazeno 600 µl buněčné suspenze v koncentraci potřebné pro dosažení konfluence 70-80% (1000 buněk na ml, růst 48 hodin). Po dosažení požadované konfluence bylo přidáno 600 µl roztoku testované látky (ve vzestupných koncentracích, každá koncentrace v singletu) ředěné v kompletním médiu. K buňkám určeným jako kontrola bylo přidáno DMSO ve stejné koncentraci jako u testovaných látek.

Po 3 hodinách inkubace bylo opatrně odsáto veškeré médium a po opláchnutí 500 µl PBS bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton, pH 7,4). Destičky se nechaly 15 minut lyzovat při pokojové teplotě. Lyzát byl smíchán s 300 µl ledového metanolu a zhomogenizován. Vysrážené proteiny byly odstraněny centrifugací (10 000 g, 10 min, 4°C). Supernatant byl přefiltrován přes membránový filtr o velikosti pórů 0,22 µm. Filtrát byl uchováván (-80°C) pro pozdější analýzu pomocí UHPLC.

##### ***4.3.4.2 UHPLC analýza***

Pro analýzu byl použit přístroj UHPLC Agilent 1290 Series vybaven kolonou Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 × 50 mm, 1,8 µm) s 1290 Infinity inline filtrem. Nástřík na kolonu byl 10 µl vzorku. Mobilní fáze byla tvořena z 0,1% vodného roztoku kyseliny

mravenčí a acetonitrilu v poměru 76 : 24. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,0 ml/min. Analýza probíhala při teplotě 30°C. K detekci byl použit fluorescenční detektor ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ ). Výstupem UHPLC analýzy bylo množství DOX v ng.

#### 4.3.5 Nitrobuněčná distribuce DOX

DOX má výrazné fluorescenční vlastnosti, jeho distribuce v buňkách tak může být detekována *in vivo* pomocí konfokální mikroskopie.

Do petriho misek vhodných pro konfokální mikroskopii byly napipetovány 2 ml buněčné suspenze (80 000 buněk na ml, růst 72 hodin). Po dosažení konfluency 70-80% byly buňky ovlivněny 2 ml roztoku testovaných látek v kompletním médiu. Po 30 minutách inkubace byly buňky foceny pomocí Cy3 filtrového setu na epifluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti-E s chlazenou sCMOS kamerou Andor Zyla 5, použité zvětšení bylo 20 ×. Distribuce DOX v buňkách byla sledována vždy ve vybrané části petriho misky, vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwaru NIS Elements AR 4.20.

#### 4.3.6 Zpracování naměřených dat

Při stanovování viability buněk pomocí NRU testu byly provedeny 3 nezávislé měření, při každém měření bylo získáno 5 hodnot pro každou měřenou koncentraci. Výsledky byly vyjádřeny jako průměrné hodnoty těchto měření se směrodatnými odchylkami. Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA), metodou TwoWay ANOVA s *post hoc* Tukey testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly hodnot od hladiny významnosti  $p \leq 0,05\%$ .

Pro stanovení hodnot  $IC_{50}$  a kombinačních indexů byl použit program CalcuSyn 1.1 (Biosoft, Velká Británie). CalcuSyn využívá metodu kombinačního indexu dle Chou-Talay. Ta umožňuje určit kombinační účinek dvou a více látek výpočtem kombinačního indexu (CI). Hodnoty  $CI < 0,90$  odpovídají synergismu, rozmezí hodnot  $0,90 - 1,10$  odpovídají aditivnímu efektu a hodnoty  $> 1,10$  odpovídají antagonismu (Chou, 2007).



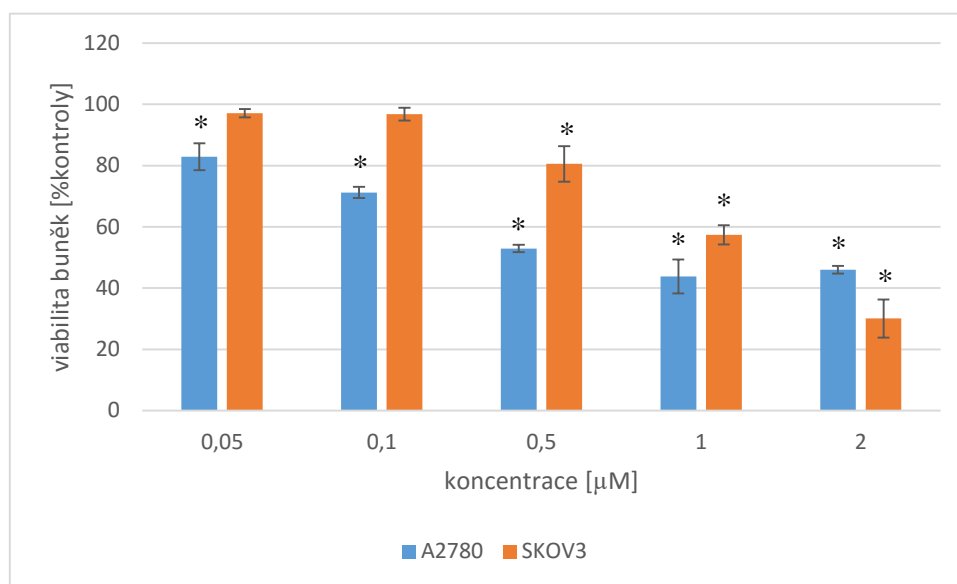
Pro stanovení intracelulární koncentrace DOX byla provedena 2 nezávislá měření. Výsledky byly vyjádřeny jako průměrné hodnoty těchto měření se směrodatnými odchylkami. Statistická analýza dat byla provedena programem GraphPad Prism 6, pomocí t-testu. Za statisticky významné byly považovány rozdíly hodnot od hladiny významnosti  $p \leq 0,05\%$ .

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Vliv doxorubicinu na viabilitu a proliferaci

Cytotoxicita DOX byla testována na ovariálních buněčných liniích. Linie A2780 je na DOX citlivá, linie SKOV3 je na DOX přirozeně rezistentní. Koncentrace roztoků DOX, použitých pro ovlivnění buněk, byla od 0,05  $\mu\text{g/ml}$  do 2  $\mu\text{g/ml}$ . Po 24, 48 a 72 hodinové inkubaci buněk s DOX byla viabilita buněk stanovena NRU testem. Získané hodnoty jsou uvedeny v grafu jako závislost viability buněk [% kontroly] na koncentraci doxorubicinu [ $\mu\text{M}$ ].

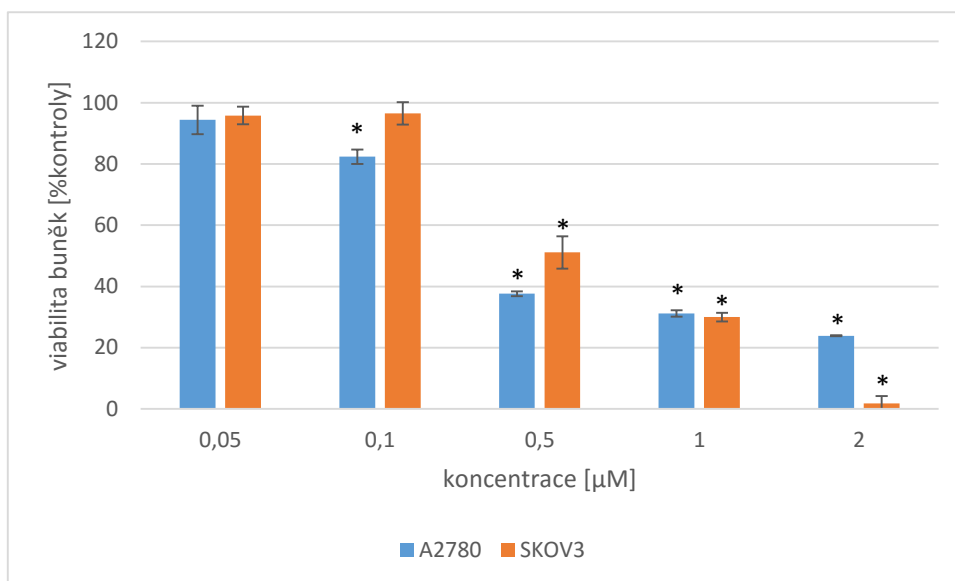
#### 5.1.1 24 hodinová expozice



Obr. 12 Porovnání antiproliferačního účinku DOX na buněčné linie A2780 a SKOV3 po 24 hodinové expozici, vyhodnoceno NRU testem. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (TwoWay ANOVA, Tukey's post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

Po 24 hodinové expozici buněk DOX došlo pouze k pomalému snižování viability buněk. U buněk linie A2780 se i při použití nejvyšší koncentrace DOX (2  $\mu\text{M}$ ) držela viabilita nad 40%.

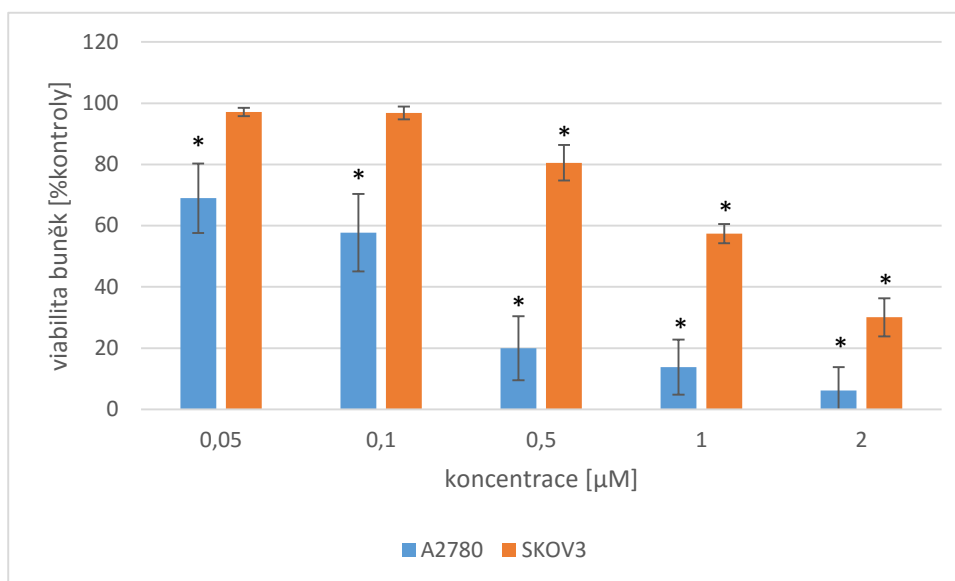
### 5.1.2 48 hodinová expozice



Obr. 13 Porovnání antiproliferačního účinku DOX na buněčné linie A2780 a SKOV3 po 48 hodinové expozici, vyhodnoceno NRU testem. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (TwoWay ANOVA, Tukey's post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

Po 48 hodinové expozici byl výrazný pokles viability u linie A2780 pozorován od koncentrace 0,1  $\mu\text{M}$  a u linie SKOV3 pozorován až při koncentracích 0,5  $\mu\text{M}$  a vyšších.

### 5.1.3 72 hodinová expozice



Obr. 14 Porovnání antiproliferačního účinku DOX na buněčné linie A2780 a SKOV3 po 72 hodinové expozici, vyhodnoceno NRU testem. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (TwoWay ANOVA, Tukey's post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

Po 72 hodinové expozici byl pozorován velký rozdíl mezi buněčnými liniemi. U linie A2780 došlo k největšímu poklesu viability v rozmezí koncentrací 0,5 – 0,5  $\mu\text{M}$ . U linie SKOV3 došlo ke snižování viability při koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  a vyšší.

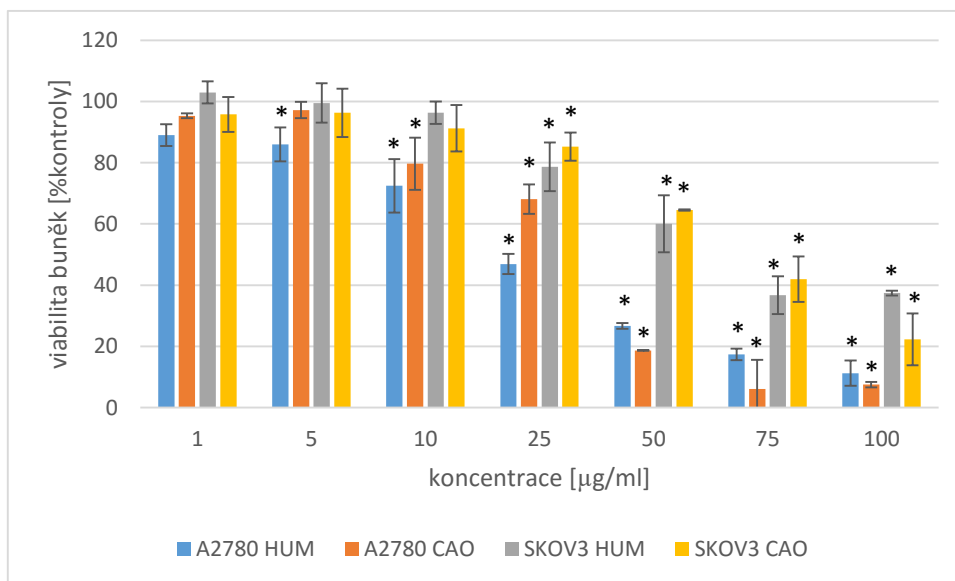
Tab. 7 Hodnoty  $IC_{50}$  doxorubicinu. Vyhodnoceno programem CalcuSyn.

Doba expozice	24 hodin		48 hodin		72 hodin	
Buněčná linie	A2780	SKOV3	A2780	SKOV3	A2780	SKOV3
$IC_{50}$ DOX	0,85	1,41	0,44	0,47	0,13	1,41

## 5.2 Vliv seskviterpenů na viabilitu a proliferaci

Antiproliferační účinek HUM a CAO byl testován na ovariálních buněčných liniích A2780 a SKOV3. Koncentrace roztoků seskviterpenů, použitých pro ovlivnění buněk, byla od 1  $\mu\text{g/ml}$  do 100  $\mu\text{g/ml}$ . Po 24, 48 a 72 hodinové inkubaci buněk se seskviterpeny byla viabilita buněk stanovena pomocí NRU testu. Získané hodnoty jsou uvedeny v grafu jako závislost viability buněk [% kontrolly] na koncentraci látek [ $\mu\text{g/ml}$ ].

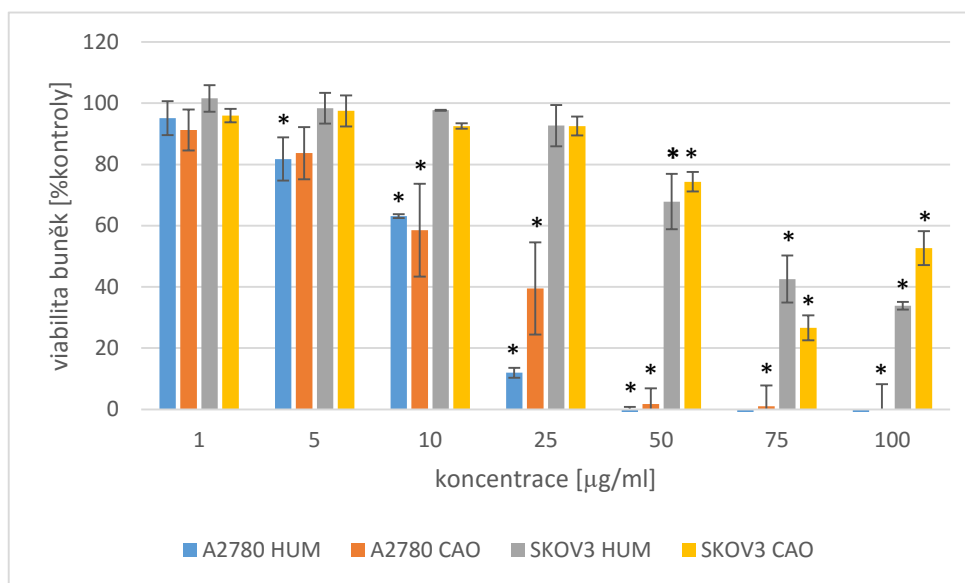
### 5.2.1 24 hodinová expozice



Obr. 15 Porovnání antiproliferačního účinku HUM a CAO na buněčné linii A2780 a SKOV3 po 24 hodinové expozici, vyhodnoceno NRU testem. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (TwoWay ANOVA, Tukey's post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

U buněčné linie A2780 se po 24 hodinové expozici HUM začal pokles proliferace projevovat již při nižších koncentracích, při koncentraci 50 µg/ml a vyšší již nebyl pozorován výrazný rozdíl ve viabilitě buněk. Po ovlivnění CAO byl nejvýraznější pokles proliferace při koncentracích 10 – 50 µg/ml. U rezistentní linie SKOV3 se po ovlivnění nižšími koncentracemi (1 – 10 µg/ml) obou terpenů proliferace buněk zásadně nezměnila, výrazný pokles byl pozorován až při koncentracích 25 µg/ml a vyšší.

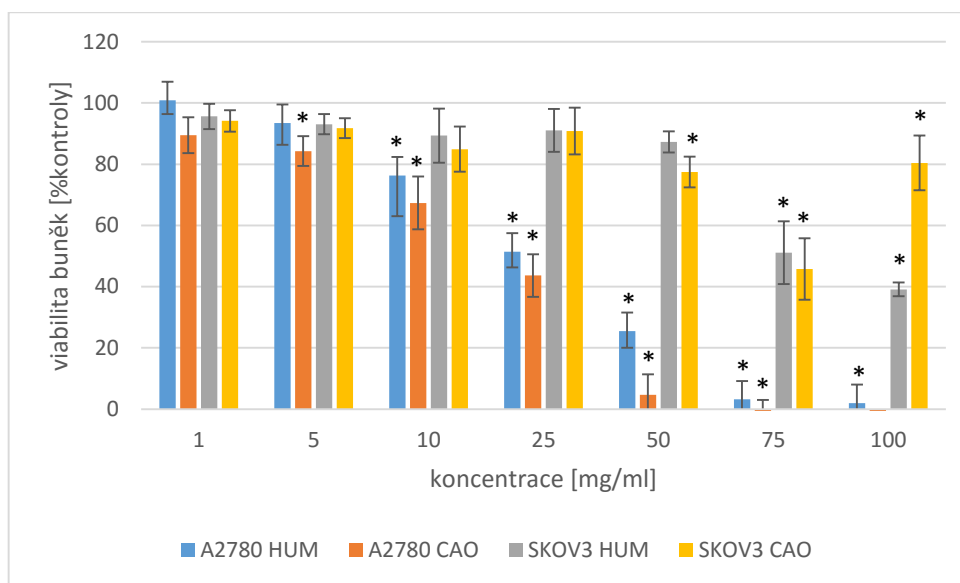
### 5.2.2 48 hodinová expozice



Obr. 16 Porovnání antiproliferačního účinku HUM a CAO na buněčné linii A2780 a SKOV3 po 48 hodinové expozici, vyhodnoceno NRU testem. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (TwoWay ANOVA, Tukey's post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

U buněčné linie A2780 byl po 48 hodinové expozici HUM pozorován největší pokles viability při koncentracích 10 – 25 µg/ml. Ve vyšších koncentracích již byla viabilita buněk nulová. Po ovlivnění CAO došlo k největšímu poklesu viability při koncentracích 10 – 50 µg/ml, ve vyšších koncentracích již byla viabilita nulová. U linie SKOV3 se pokles proliferace začal projevovat až při koncentracích obou terpenů vyšších než 50 µg/ml. U CAO byla viabilita buněk vyšší při koncentraci 100 µg/ml než při 50 µg/ml.

### 5.2.3 72 hodinová expozice



Obr. 17 Porovnání antiproliferačního účinku HUM a CAO na buněčné linii A2780 a SKOV3 po 72 hodinové expozici, vyhodnoceno NRU testem. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (TwoWay ANOVA, Tukey's post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

U buněčné linie A2780 byl největší pokles v proliferaci po 72 hodinové expozici seskviterpeny při koncentracích 10 – 50  $\mu\text{g/ml}$ . Ve vyšších koncentracích byla viabilita buněk velmi nízká. U linie SKOV3 se pokles proliferace začal projevovat až při koncentracích 50 – 100  $\mu\text{g/ml}$  u obou seskvitepenů. U CAO byla viabilita buněk vyšší při koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$  než při 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Tab. 8 Hodnoty  $IC_{50}$  HUM a CAO. Vyhodnoceno programem CalcuSyn.

Doba expozice	24 hodin		48 hodin		72 hodin	
Buněčná linie	A2780	SKOV3	A2780	SKOV3	A2780	SKOV3
<b><math>IC_{50}</math> HUM</b>	17,64	61,37	9,93	75,33	19,54	153,87
<b><math>IC_{50}</math> CAO</b>	21,12	59,56	8,09	126,77	11,23	236,56

### 5.3 Kombinační indexy

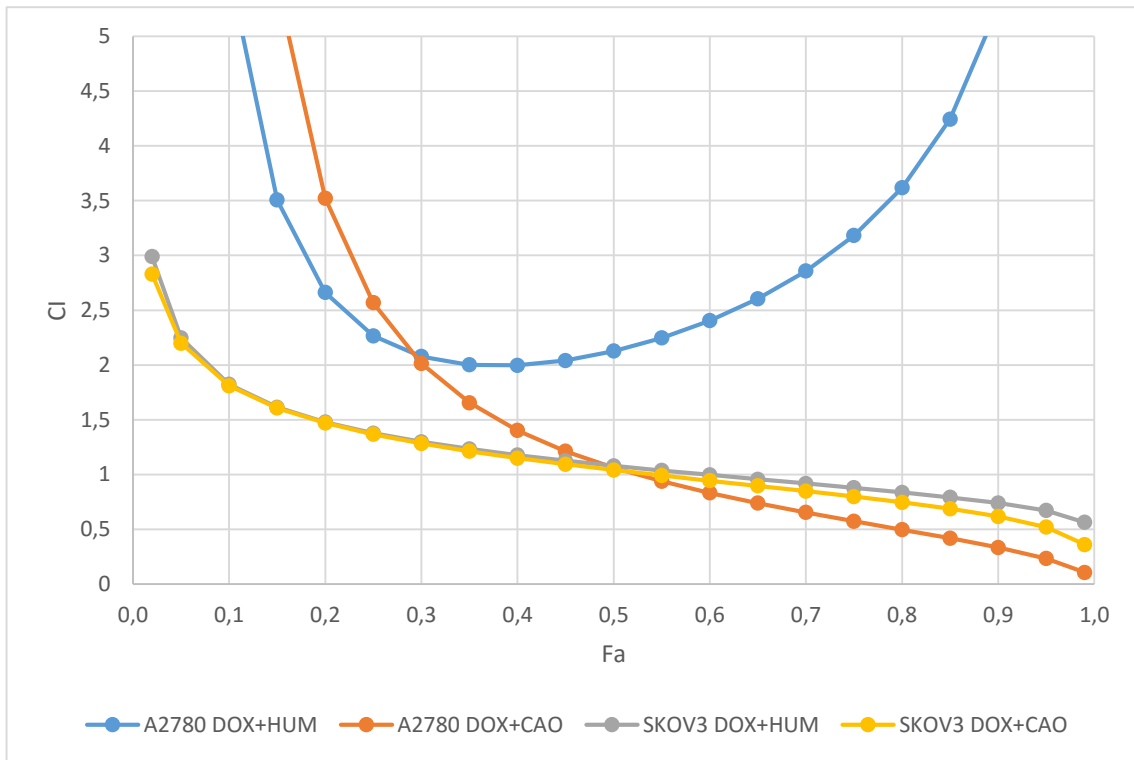
Pro stanovení kombinačních indexů byly použity hodnoty cytotoxicity HUM, CAO, DOX a jejich kombinací, vyhodnocené pomocí NRU testu. Pro testy cytotoxicity kombinací daného seskviterpenu a DOX byla použita metoda postupného ředění při zachování poměru koncentrací, které byly přibližně odvozeny od hodnot IC<sub>50</sub> (tab. 9).

*Tab. 9 Souhrn koncentrací kombinací použitých pro stanovení kombinačních indexů*

<b>A2780</b>	terpen [ $\mu\text{g/ml}$ ]	5	10	25	50	75
	doxorubicin [ $\mu\text{M}$ ]	0,03	0,06	0,15	0,3	0,5
<b>SKOV3</b>	terpen [ $\mu\text{g/ml}$ ]	5	10	25	50	75
	doxorubicin [ $\mu\text{M}$ ]	0,1	0,2	0,5	1	2



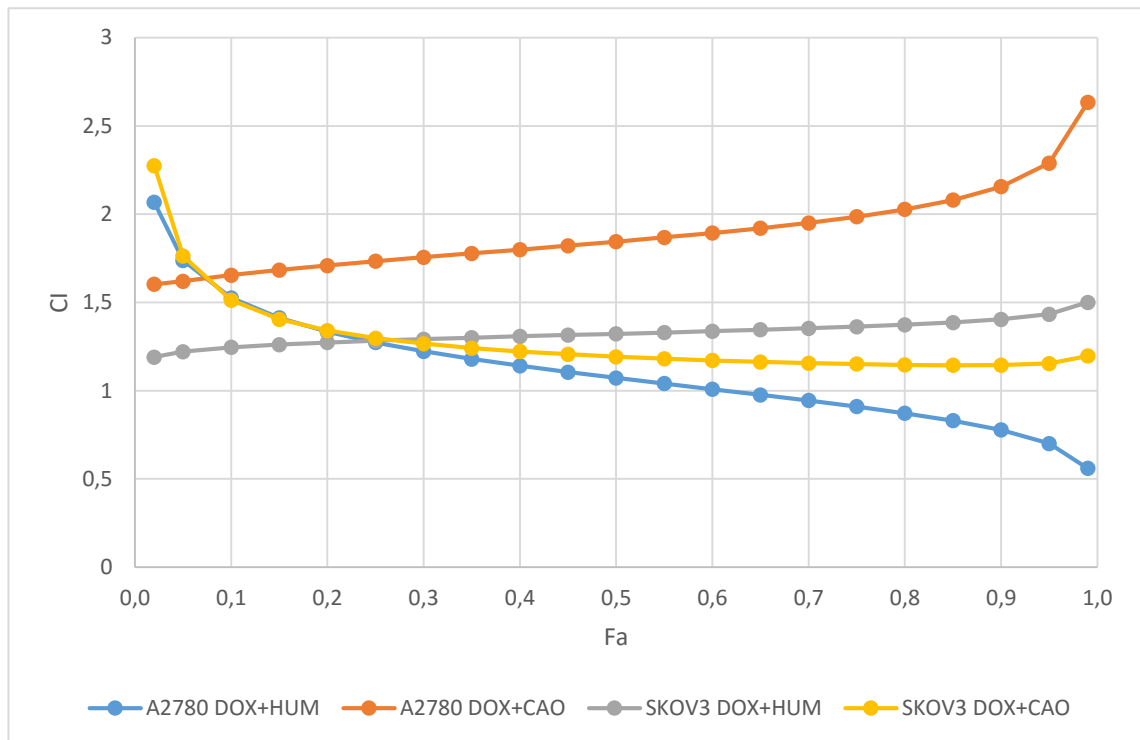
### 5.3.1 24 hodinová expozice



Obr. 18 Fa-CI křivka kombinace HUM a CAO s DOX v A2780 a SKOV3 buňkách po 24 hodinové expozici. CI (kombinační index), Fa (fraction affected): Fa = 0 odpovídá stoprocentní viabilitě buněk, Fa = 1 odpovídá nulové viabilitě

Po 24 hodinové expozici měl HUM s DOX v linii A2780 účinek antagonistický a v linii SKOV3 slabě synergistický účinek. CAO měl s DOX v linii A2780 i SKOV3 účinek synergistický (vztaženo k Fa = 0,8 kdy je ovlivněno 80% buněk).

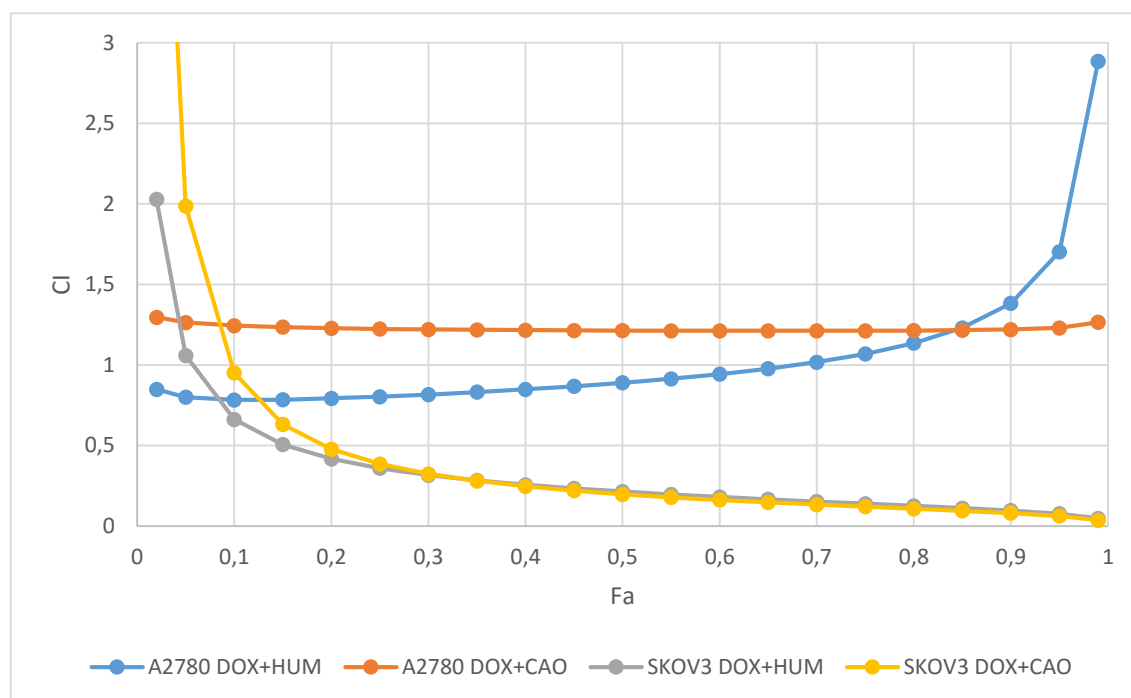
### 5.3.2 48 hodinová expozice



Obr. 19 Fa-CI křivka kombinace HUM a CAO s DOX v A2780 a SKOV3 buňkách po 48 hodinové expozici. CI (kombinační index), Fa (fraction affected): Fa = 0 odpovídá stoprocentní viabilitě buněk, Fa = 1 odpovídá nulové viabilitě

Po 48 hodinové expozici měl HUM s DOX v linii A2780 účinek slabě synergistický a v linii SKOV3 antagonistický účinek. CAO měl s DOX v linii A2780 účinek antagonistický a v linii SKOV3 účinek aditivní až lehce antagonistický (vztaženo k Fa = 0,8 kdy je ovlivněno 80% buněk).

### 5.3.3 72 hodinová expozice



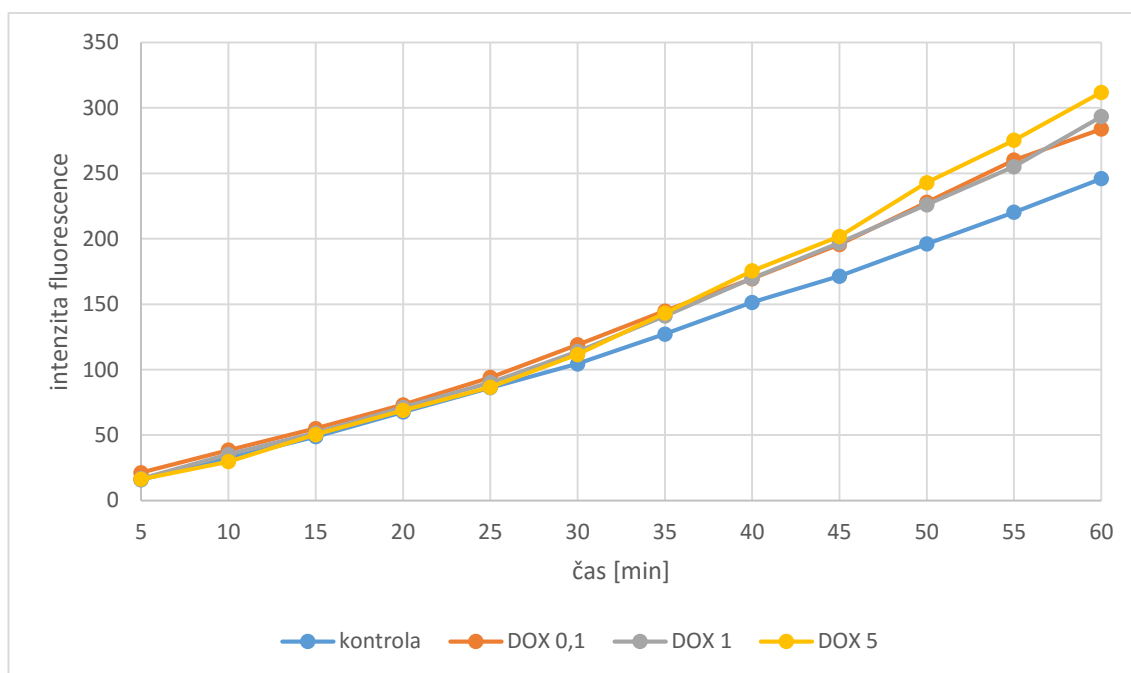
Obr. 20  $Fa$ - $CI$  křivka kombinace HUM a CAO s DOX v A2780 a SKOV3 buňkách po 72 hodinové expozici.  $CI$  (kombinační index),  $Fa$  (fraction affected):  $Fa = 0$  odpovídá stoprocentní viabilitě buněk,  $Fa = 1$  odpovídá nulové viabilitě

Po 72 hodinové expozici měli HUM i CAO s DOX v linii A2780 účinek slabě antagonistický a v linii SKOV3 silně synergistický účinek (vztaženo k  $Fa = 0,8$  kdy je ovlivněno 80% buněk).

## 5.4 Kvantifikace oxidativního stresu

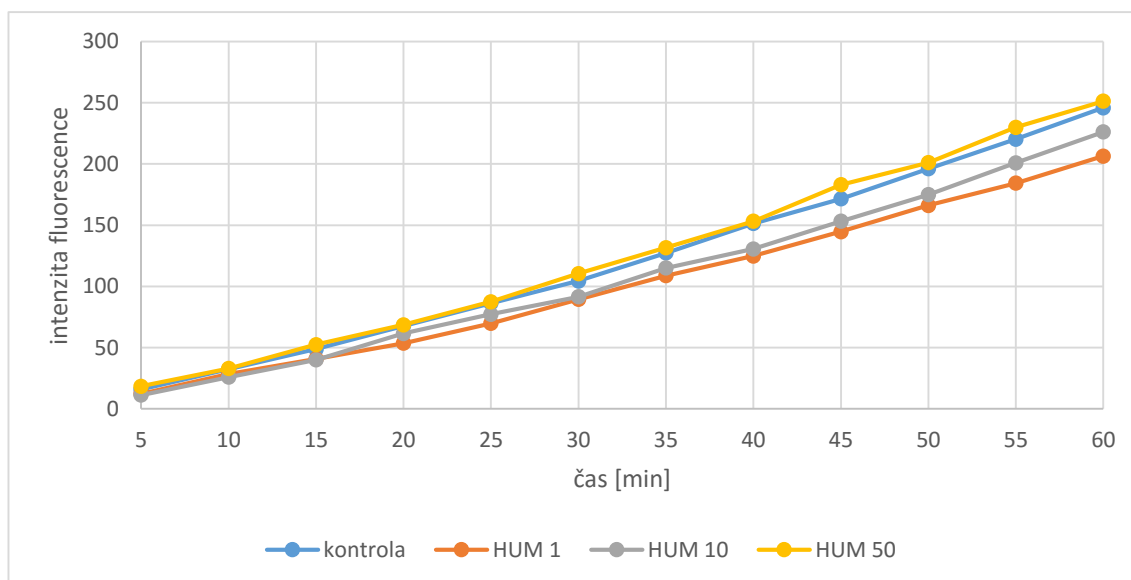
Kvantifikace produkce volných radikálů byla provedena metodou DCF. Pro test byly použity 3 koncentrace seskviterpenů (1, 10 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) a 3 koncentrace DOX (0,1, 1 a 5  $\mu\text{M}$ ) a byly porovnány proti kontrole. Jako kontrola byl použit roztok buněk s PBS. Fluorescence byla měřena 60 minut v 5ti minutových intervalech. Po celou dobu měření byl zaznamenáván nárůst fluorescence odpovídající zvýšení produkce ROS.

### 5.4.1 Buněčná linie A2780



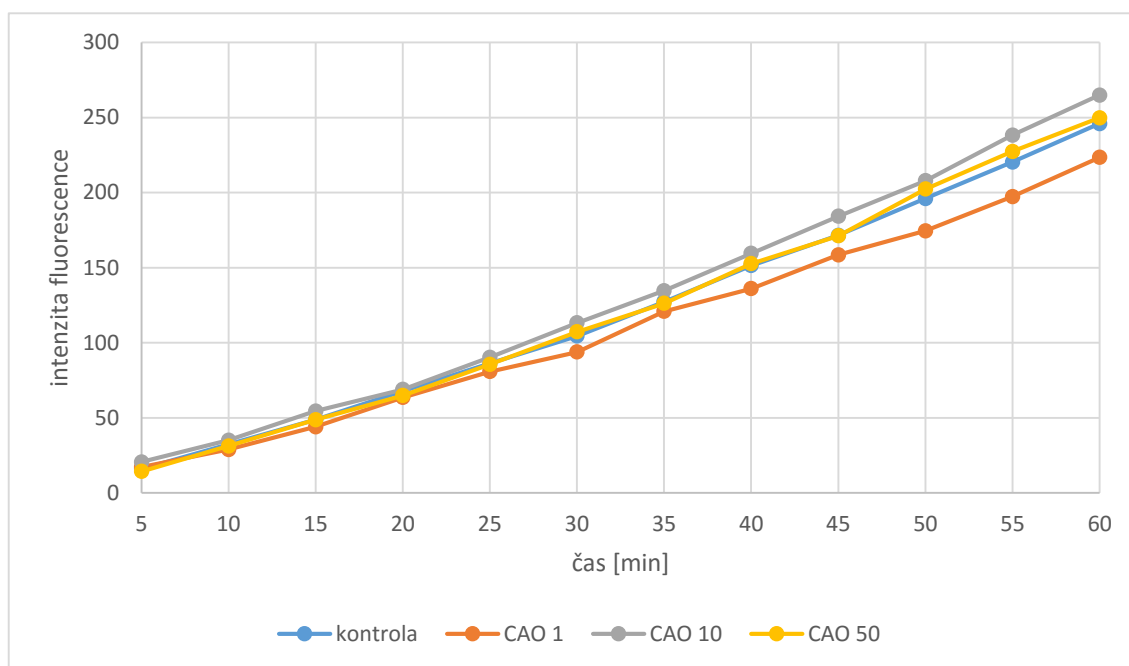
Obr. 21 Graf produkce volných radikálů buněčnou linií A2780 po ovlivnění DOX, stanoveno metodou DCF.

U buněčné linie A2780 DOX zvyšoval produkci ROS ve všech použitých koncentracích, nejúčinnější byla nejvyšší koncentrace – 5  $\mu\text{M}$ .



Obr. 22 Graf produkce volných radikálů buněčnou linií A2780 po ovlivnění HUM, stanoveno metodou DCF.

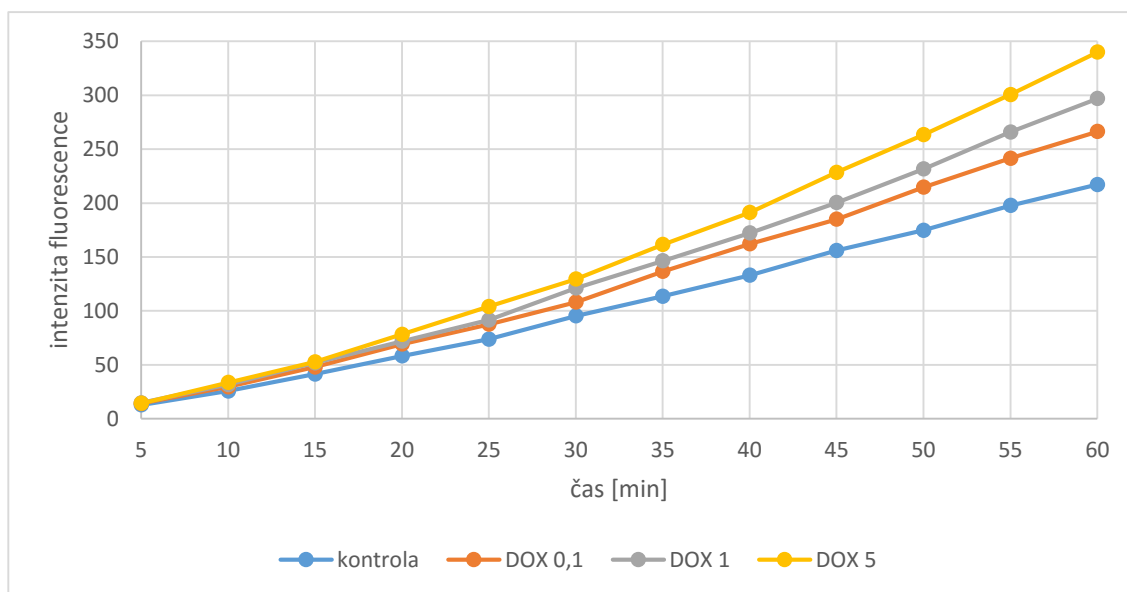
U buněčné linie A2780 působil HUM slabě prooxidačně pouze v nejvyšší koncentraci (50  $\mu\text{g/ml}$ ), v nižších koncentracích působil antioxidačně.



Obr. 23 Graf produkce volných radikálů buněčnou linií A2780 po ovlivnění CAO, stanoveno metodou DCF.

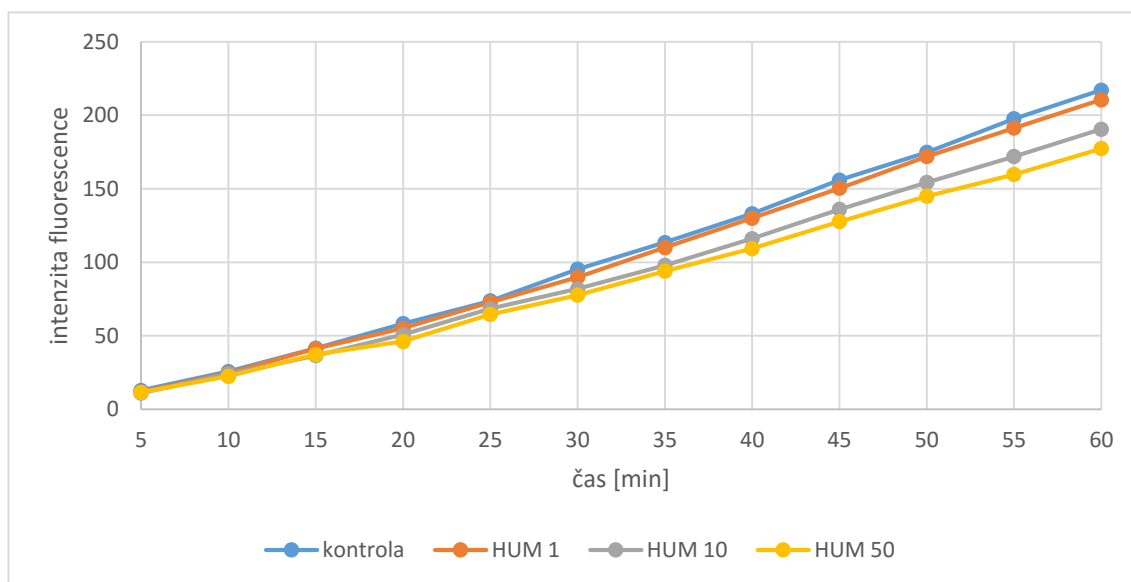
U linie A2780 měl CAO prooxidační účinek v koncentrací 10  $\mu\text{g/ml}$ . Koncentrace 1  $\mu\text{g/ml}$  působila antioxidačně.

### 5.4.2 Buněčná linie SKOV3



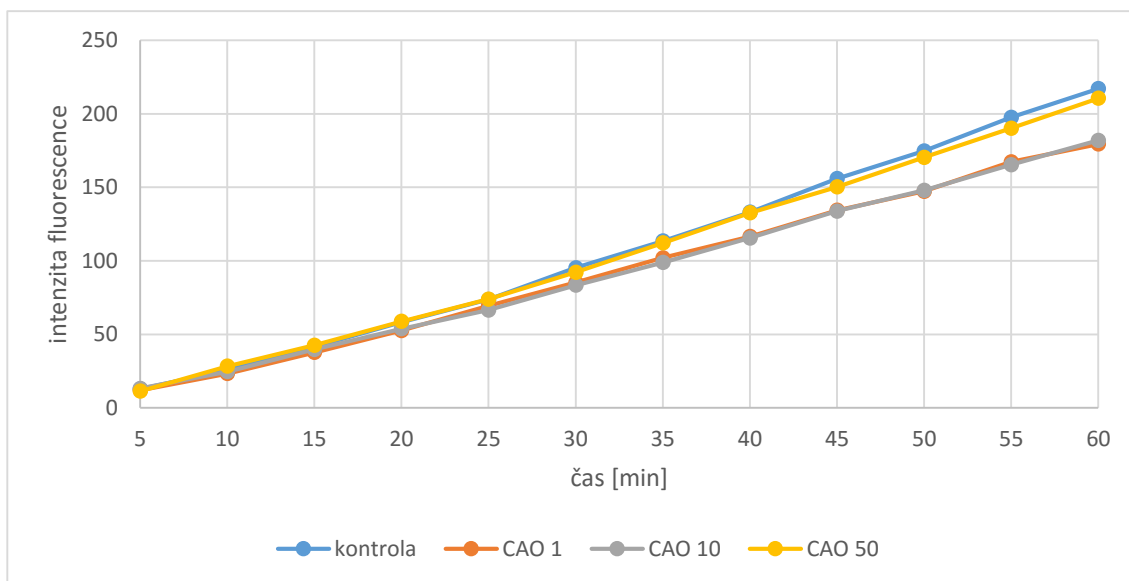
Obr. 24 Graf produkce volných radikálů buněčnou linií SKOV3 po ovlivnění DOX, stanoveno metodou DCF.

V buněčné linii SKOV3 zvyšoval DOX produkci ROS ve všech koncentracích, nejúčinnější byl v nejvyšší koncentraci – 5  $\mu\text{M}$ .



Obr. 25 Graf produkce volných radikálů buněčnou linií SKOV3 po ovlivnění HUM, stanoveno metodou DCF.

U buněčné linie SKOV3 měl HUM antioxidační účinky ve vyšších koncentracích (10 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ), produkce ROS buněk ovlivněných koncentrací 1  $\mu\text{g/ml}$  se téměř nelišila od kontroly.



Obr. 26 Graf produkce volných radikálů buněčnou linií SKOV3 po ovlivnění CAO, stanoveno metodou DCF.

U buněčné linie SKOV3 měl CAO v nižších koncentracích antioxidační účinek, produkce ROS buněk ovlivněných koncentrací 50  $\mu\text{g/ml}$  se téměř nelišila od kontroly.

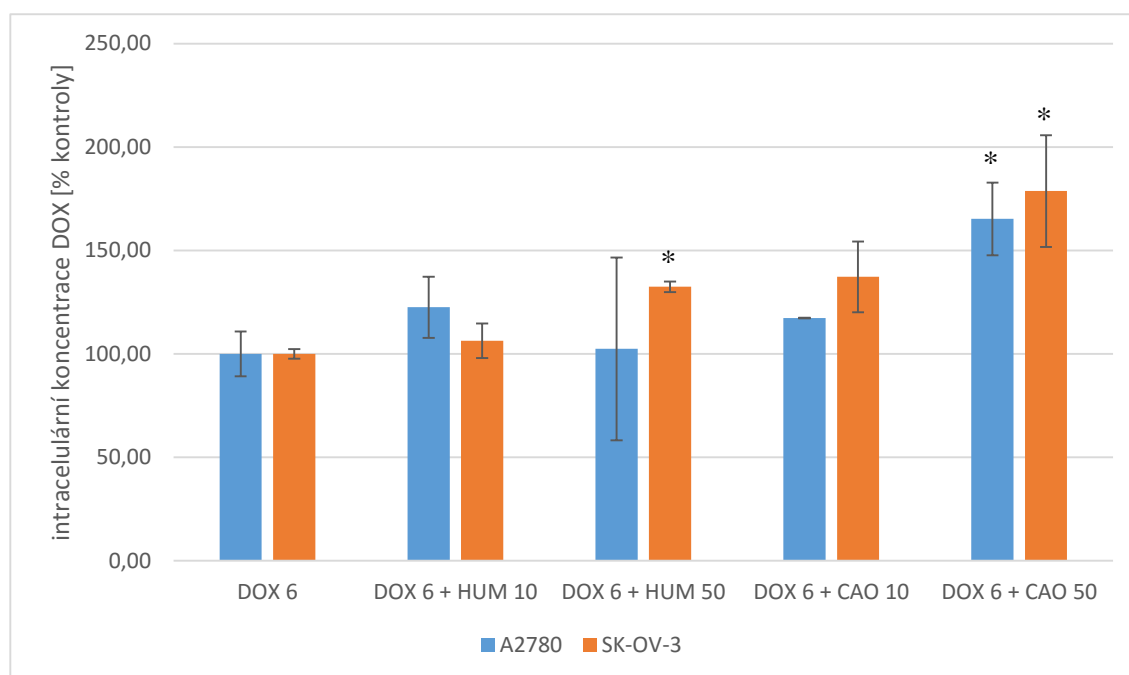
## 5.5 Intracelulární koncentrace doxorubicinu

V testu byla zjišťována intracelulární koncentrace DOX pomocí metody UHPLC. Byla porovnávána intracelulární koncentrace DOX při ovlivnění seskviterpeny s dosaženou intracelulární koncentrací při použití samotného DOX. Pro ovlivnění buněk byly použity následující koncentrace DOX a seskviterpenů:

Tab. 10 Přehled koncentrací látek používaných při ovlivnění buněk

<b>doxorubicin [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	6	6	6	6	9	9	9	9
<b><math>\beta</math>-karyofylenoxid [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	10	50	-	-	10	50	-	-
<b><math>\alpha</math>-humulen [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	-	-	10	50	-	-	10	50

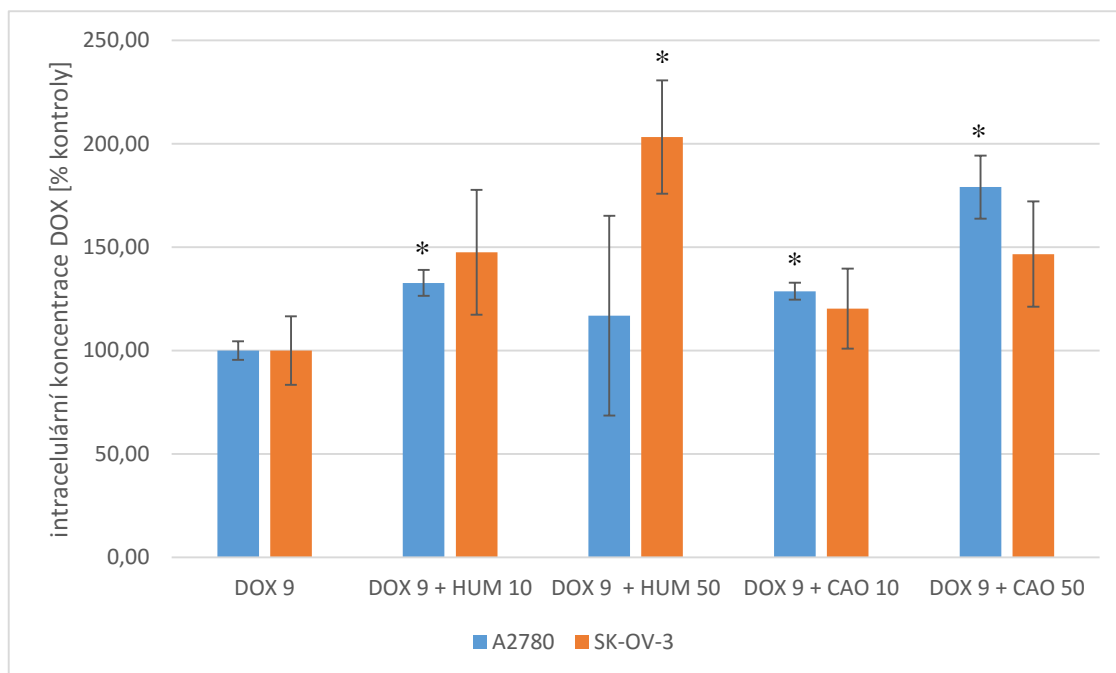
Naměřené hodnoty byly zaznamenány v grafu jako závislost intracelulární koncentrace DOX na použitých koncentracích seskviterpenů. Výsledky jsou vyjádřeny jako procenta intracelulární koncentrace DOX v buňkách ovlivněných samostatným DOX v odpovídající koncentraci (jako 100%).



Obr. 27 Porovnání efektu různých koncentrací HUM a CAO na intracelulární koncentraci DOX při použití 6  $\mu\text{M}$  DOX. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (Multiple t test;  $p < 0,05$ ).

U buněčné linie A2780 statisticky významně zvyšoval intracelulární koncentraci DOX CAO v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ . U buněčné linie SKOV3 zvyšovaly intracelulární koncentraci DOX HUM i CAO v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ .



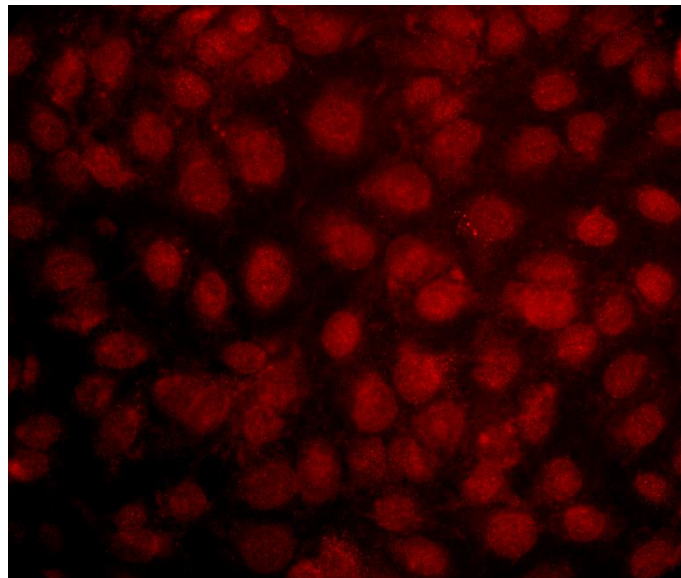


Obr. 28 Srovnání vlivu různých koncentrací HUM a CAO na intracelulární koncentraci DOX při použití 9  $\mu$ M DOX. Statisticky významná změna proti kontrole je v grafu označena symbolem \* (Multiple t test;  $p < 0,05$ ).

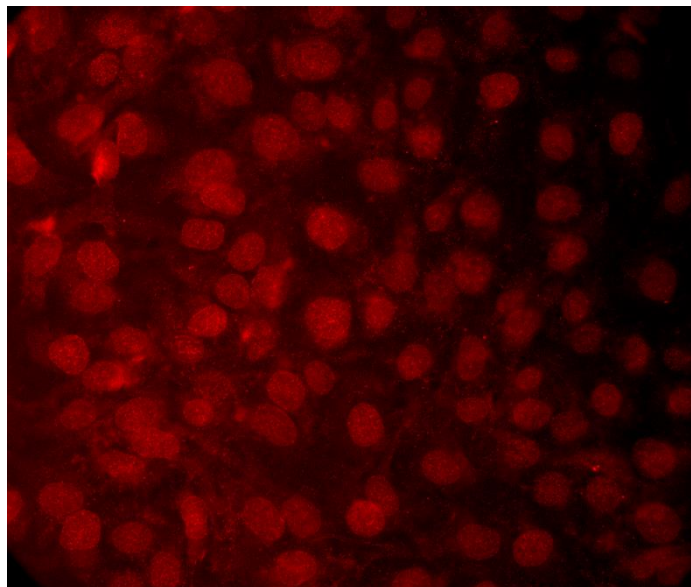
U buněčné linie A2780 zvyšoval intracelulární koncentraci DOX HUM v koncentraci 10  $\mu$ g/ml a CAO v obou použitých koncentracích. U linie SKOV3 zvyšoval intracelulární koncentraci DOX HUM v koncentraci 50  $\mu$ g/ml.

## 5.6 Stanovení distribuce DOX v buňkách

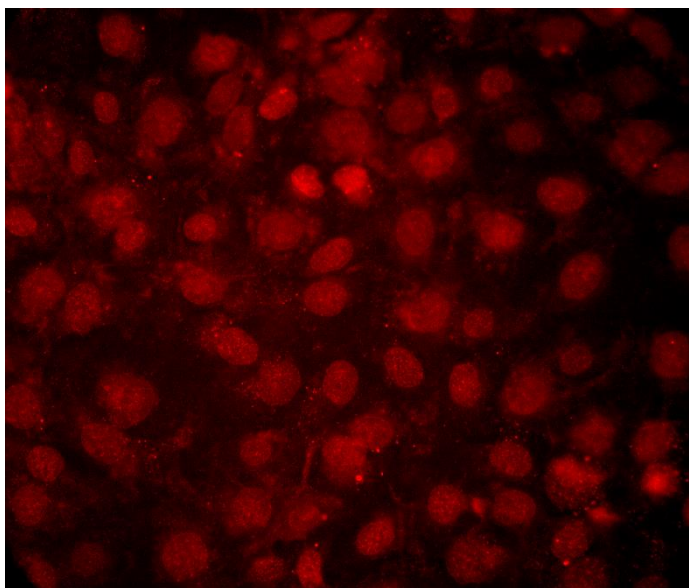
Distribuce DOX v buňkách může být díky jeho fluorescenčním vlastnostem detekována *in vivo* konfokální mikroskopií. Byla porovnána fluorescence buněk ovlivněných samotným DOX v koncentraci 9  $\mu\text{M}$  a fluorescence kombinací DOX s HUM a CAO v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  na SKOV3 buňkách.



*Obr. 30 Intracelulární distribuce DOX po ovlivnění samotným DOX*



*Obr. 29 Intracelulární distribuce DOXu po ovlivnění DOX a HUM.*



*Obr. 31 Intracelulární distribuce DOX po ovlivnění DOX a CAO.*

Buněčná linie A2780 nebyla focena, jelikož nebyla dosažena dostatečná konfluence buněk na petriho miskách vhodných pro konfokální mikroskopii. Buňky nebyly schopny na dno misky v dostatečné míře adherovat. Řešením by mohlo být potažení dna petriho misek kolagenem, který by vytvořil vhodné prostředí pro adherenci buněk a jejich proliferaci.

Z fotografií nejsou patrné významné rozdíly v distribuci DOX po ovlivnění HUM a CAO v porovnání se samotným DOX.

## 6 DISKUZE

Rakovina vaječníku je nejzhoubnější gynekologické nádorové onemocnění. Celkové přežití pacientek s časným stadiem ovariálního karcinomu je 70-90%. Vzhledem k nespecifickým symptomům a obtížné diagnostice časných stádií bývají až dvě třetiny pacientek diagnostikovány v pozdějších stádiích, kdy pětileté přežití klesá pod 75% (Bhoola & Hoskins, 2006; Urban, 2003). Vzhledem k tomu, že 90% zhoubných nádorů vaječníku je epiteliálního původu, tudíž vnímavější k cytostatikům, je většina pacientek po primárním chirurgickém zákroku léčena chemoterapií. Základem chemoterapeutické léčby karcinomu vaječníku jsou deriváty platiny v kombinaci s dalšími cytostatiky, např. paklitaxelem, docitaxelem či doxorubicinem (Cibula et al., 2009; Vyzula et al., 2016). Doxorubicin (DOX) je nejpoužívanější cytostatikum ze skupiny anthracyklinů s největším spektrem aktivity. Účinně působí při léčbě mnoha solidních nádorů i hematologických malignit. Jeho použití je ovšem limitováno mnohými na dávce závislými nežádoucími účinky, nejčastěji kumulativní kardiotoxicitou (Carvalho et al., 2009; Fong et al., 2012).

Navzdory rostoucímu zájmu o molekulární modelování a kombinatorní chemii při syntéze nových aktivních molekul jsou přírodní látky a léčivé rostliny stále významným zdrojem potenciálních léčiv. Jednou z těchto rostlin je i *Myrica rubra*, ovocný strom rostoucí v Číně, Japonsku a Korei, který je již po 2000 let využíván v lidovém léčitelství pro své antioxidační, antibakteriální, antiproliferační či protizánětlivé účinky (Kim et al., 2013; Langhansova et al., 2014). Antiproliferační efekt silice *M. rubra* byl poprvé testován ve studii Langhansové et al. (2014). V této studii bylo také analyzováno složení silice *M. rubra*. Hlavními složkami této silice jsou seskviterpeny  $\beta$ -karyofylen,  $\alpha$ -humulen (HUM), valencen,  $\beta$ -karyofylenoxid (CAO) a *trans*-nerolidol. Látky HUM a CAO, zkoumané i v této diplomové práci vykazovaly antiproliferační účinky v několika buněčných liniích. V naší práci byla testována jejich cytotoxicita jak samostatně, tak v kombinaci s DOX. Vzhledem k časté na dávce závislé kardiotoxicitě DOX by synergistický efekt seskviterpenů na DOX mohl vést ke snížení dávky DOX a tím i rizika kardiotoxicity.

Jedním z cílů této diplomové práce bylo porovnání antiproliferačního účinku DOX a dvou seskviterpenů (HUM a CAO) ve dvou liniích buněk ovariálního karcinomu. K experimentům byla zvolena buněčná linie na DOX citlivá – A2780 a na DOX přirozeně

rezistentní – SKOV3. U linie SKOV3 testy projevily větší odolnost vůči DOX. Přesto vyšší koncentrace DOX (2  $\mu$ M) po 72 hodinové expozici prokazovala dobré antiproliferační vlastnosti – viabilita buněk dosahovala pouze 30%. Antiproliferační účinek HUM byl prokázán na řadě buněčných linií, např. A-549, HT-29, Caco2, DLD-1, ACHN, LNCaP, PC-3, C32 a MCF-7 (Sperotto et al., 2013; Vinholes et al., 2014). Studie Legaulta et al. (2003) prokázala menší toxicitu HUM vůči normálním fibroblastům, než vůči nádorovým buňkám. V naší práci vykazoval HUM na buněčnou linii A2780 signifikantní antiproliferační účinek (po 72 hodinové expozici, která je z hlediska terapie nejdůležitější) při koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Na buněčnou linii SKOV3 měl HUM signifikantní antiproliferační účinek od koncentrace 75  $\mu$ g/ml. Mnohé studie se v názoru na cytotoxický účinek CAO liší. Kaneda et al. (1992) a Legault et al. (2003) ve svých studiích antiproliferační účinek CAO na testovaných liniích nepotvrdili. V naší práci měl CAO po 72 hodinové expozici na buněčnou linii A2780 významný antiproliferační účinek při koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Na buněčnou linii SKOV3 měl CAO signifikantní antiproliferační účinek od koncentrace 50  $\mu$ g/ml. Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějšími studii potvrzujícími antiproliferační aktivitu CAO (Jun et al., 2011; Kubo et al., 1996; Park et al., 2011).

Zjišťovali jsme také kombinační indexy HUM a CAO s DOX. Studie Ambrože et al. (2016) na buňkách Caco2 potvrdila, že při použití kombinace DOX s esenciálním olejem *M. rubra*, jehož jsou HUM a CAO součástí, byl ve vyšších koncentracích synergistický účinek. Naše výsledky ukázaly, že HUM i CAO měli při vyšší  $F_a$  ( $F_a = 0,8$ ) v linii A2780 s DOX účinek slabě antagonistický a v linii SKOV3 silně synergistický účinek. Tento výsledek ukazuje, že by seskviterpeny mohly potencovat účinek DOX na linii SKOV3, kde je méně účinný. Rozdíl ve výsledku této práce a studie Ambrože et al. (2016) může být způsobena např. rozdílem v testovaných buněčných liniích, či potenciací působení HUM a CAO dalšími složkami esenciálního oleje *M. rubra*.

Pro ověření prooxidačních účinků DOX a seskviterpenů byl proveden test DCF kvantitativně stanovující produkci ROS. Produkce ROS je jedním ze základních mechanismů účinku DOX. Jeho prooxidační aktivita byla popsána již dříve (Carvalho et al., 2009; Keizer et al., 1990). V souladu s těmito poznatky jsou i naše naměřené výsledky, které potvrzují zvýšenou tvorbu ROS při ovlivnění DOX v obou testovaných buněčných liniích. První studií potvrzující antiproliferační účinky HUM na nádorové buňky byla

studie Legaulta et al. (2003). Cytotoxické účinky HUM jsou mimo jiné připisovány produkci ROS, HUM způsobuje depleci glutationu (GSH), který hraje důležitou roli v ochraně proti oxidačnímu stresu. Jeho nedostatek proto může vést k akumulaci ROS v buňce (Legault et al., 2003). Navzdory těmto předpokladům působil v naší práci HUM prooxidačně pouze na buněčnou linii A2780 a to jen v nejvyšší použité koncentraci (50 µg/ml), na buněčnou linii SKOV3 působil HUM antioxidačně. V předchozí studii (Park et al., 2011) byla zjištěna zvýšená produkce ROS prostatickými PC-3 buňkami po ovlivnění CAO. Na námi zkoumané buněčné linii A2780 CAO vykazoval pouze slabé prooxidační účinky při ovlivnění buněk koncentrací 10 µg/ml. Na buněčnou linii SKOV3 působil CAO antioxidačně.

Změna intracelulární koncentrace DOX po ovlivnění HUM a CAO, byla studována Ambrožem et al. (2015). Studie prokázala pozitivní vliv silice obou seskviterpenů na intracelulární koncentraci DOX v Caco2 buňkách a hepatocytech. V hepatocytech seskviterpeny intracelulární koncentraci DOX neovlivňovaly. V nádorových Caco2 buňkách byl CAO ve zvyšování intracelulární koncentrace DOX účinnější než HUM. V koncentraci 50 µg/ml byl CAO schopen zvýšit intracelulární koncentraci DOX 3,6 krát. Tato zjištění jsou v souladu s našimi výsledky, ve kterých byl CAO v koncentraci 50 µg/ml účinný ve zvyšování intracelulární koncentrace DOX 6 µM v obou zkoušených buněčných liniích a při použití koncentrace DOX 9 µM pouze v linii SKOV3. Při ovlivnění buněk HUM v koncentraci 50 µg/ml došlo ke zvýšení intracelulární koncentrace DOX pouze v linii SKOV3 při použití obou koncentrací DOX (6 µM i 9 µM), nižší koncentrace HUM (10 µg/ml) zvyšovala intracelulární koncentraci DOX v linii A2780 při použití koncentrace DOX 9 µM.

Změna intracelulární koncentrace DOX a jeho distribuce po ovlivnění silicí *M. rubra*, obsahující HUM a CAO, byla studována Ambrožem et al. (2016). Studie prokázala pozitivní vliv silice *M. rubra* na intracelulární distribuci DOX v Caco2 buňkách a fibroblastech peridontálních ligament. V Caco2 buňkách byl DOX kumulován v jádře, kdežto v nenádorových buňkách byl soustředěn v cytosolu. Po ovlivnění buněk silicí *M. rubra* došlo ke zvýšení koncentrace DOX v jádru buňky. V naší práci byla zkoumána pouze linie SKOV3, ve které nebylo dosaženo průkazných výsledků. Buněčná linie A2780 nebyla zkoumána, jelikož buňky nebyly schopny dostatečné konfluence na určených petriho miskách v důsledku neschopnosti adherence. Řešením by mohlo být potažení dna petriho misek kolagenem, který by vytvořil vhodné prostředí pro adherenci buněk a jejich proliferaci.

## 7 ZÁVĚR

Byl prokázán významný antiproliferační účinek doxorubicinu vůči oběma buněčným liniím (A2780 a SKOV3). Linie A2780 byla vůči působení DOX citlivější.

Byl prokázán antiproliferační účinek  $\alpha$ -humulenu a  $\beta$ -karyofylenoxidu vůči oběma buněčným liniím. Linie A2780 byla vůči působení obou seskviterpenů citlivější. V čase 72 hodin, který je z hlediska terapie nejdůležitější měl na linii A2780 největší efekt  $\beta$ -karyofylenoxid. U linie SKOV3 byl účinek obou seskviterpenů vyrovnaný.

Při stanovení kombinačních indexů se v jednotlivých časech vzájemné působení látek lišilo. V čase 72 hodin, který je z hlediska terapie nejdůležitější působil v linii A2780  $\alpha$ -humulen i  $\beta$ -karyofylenoxid na doxorubicin antagonisticky. V linii SKOV3 působily oba seskviterpeny na doxorubicin synergisticky.

Ke zvýšení produkce ROS došlo působením doxorubicinu v obou buněčných liniích. U linie A2780 působil slabě prooxidačně  $\alpha$ -humulen v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  a  $\beta$ -karyofylenoxid v koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . U buněčné linie SKOV3 byl efekt obou seskviterpenů antioxidační.

Zvýšení intracelulární koncentrace doxorubicinu při použití jeho nižší koncentrace (6  $\mu\text{M}$ ), způsoboval u linie A2780 pouze  $\beta$ -karyofylenoxid v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ . U linie SKOV3 zvyšovaly intracelulární koncentraci doxorubicinu  $\alpha$ -humulen i  $\beta$ -karyofylenoxid v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ . Při použití vyšší koncentrace doxorubicinu (9  $\mu\text{M}$ ) zvyšoval intracelulární koncentraci doxorubicinu u buněčné linie A2780  $\alpha$ -humulen v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  a  $\beta$ -karyofylenoxid v obou testovaných koncentracích, u linie SKOV3 měl účinek  $\alpha$ -humulen v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ .

## **SEZNAM ZKRATEK**

3D – trojrozměrný

ADR – adriamycin (doxorubicin)

AFP – alfa-fetoprotein

AKT – protein kinasa B

AP-1 – transkripční faktor AP-1 (activator protein 1)

ATCC – American Type Culture Collection

Bcl-2 – genová rodina, jejíž název je odvozen od lymfomu B-buněk

Bcl-xl – transmembránová molekula, název odvozen od extra velkého lymfomu B-buněk

BRCA – Breast Cancer

CA125 – Cancer Antigen 125

CAO –  $\beta$ -karyofylenoxid

CEA – karcinoembryonální antigen

CI – kombinační index

CNS – centrální nervová soustava

COX-2 – cyklooxygenasa 2

CT – výpočetní tomografie

cTn – srdeční troponin

DCF – 2', 7' - dichlorofluorescein

DCFH – dichlorodihydrofluorescein

DCFH-DA – 2', 7' - dichlorofluorescein diacetát

DMAPP – dimethylallyl difosfát

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EO – esenciální oleje

Fa – ovlivněná frakce buněk

FBS – fetální bovinní sérum

FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics

FPP – farnesyl difosfát



GC×GC-TOFMS – komprehenzivní dvoudimenzionální plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

GGPP – geranyl-geranyl difosfát

GPP – geranyl difosfát

GSH – glutathion

GST – glutathion-S-transferasa

H2DCF-DA – 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethylsulfonová kyselina

HUM –  $\alpha$ -humulen

IAP1, IAP2 – inhibitor apoptózy 1, inhibitor apoptózy 2

ICAM-1 – intercelulární adhezivní molekula 1

IL-1 $\beta$  – interleukin 1 beta

IPP – isopentenyl difosfát

MAPK – mitogenem aktivované kinasy

MLC2 – lehký myozinový řetězec typu 2

MM-CK – svalová kreatinkinasa

MMP9 – matrixová metalopeptidasa 9

MRI – magnetická resonance

MT-CK – mitochondriální kreatinkinasa

mTOR – savčí cíl pro rapamycin

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NF $\kappa$ -B – nukleární faktor kappa B

NOS – syntasa oxidu dusnatého

NRU – neutrální červeň

P450 – cytochrom P450

PAF – faktor aktivující destičky

PBS – fosfátový pufr se solemi

PET – pozitronová emisní tomografie

PI3K – fosfatidylinositol-3-kinasa

RNA – ribonukleová kyselina

ROS – reaktivní formy kyslíku

RPMI – Roswell Park Memorial Institute  
S6K1 – ribozomální protein-S6-kinasy  
STAT3 – signální transduktor a aktivátor transkripce 3  
TNF $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor alfa  
TNM – systém klasifikace maligních tumorů  
TOPII – topoisomerasa II  
Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan  
Triton – polyethylenglykol mono(otylfenyl)ether  
UHPLC – ultra účinná kapalinová chromatografie  
ÚZIS ČR – Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky  
VEGF – plazmatický růstový faktor cévního endotelu  
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor  
WAPRT – celobřišní a pánevní ozáření  
WHO – Světová zdravotnická organizace  
 $\beta$ 1ADR –  $\beta$ 1 adrenergní receptor

## 8 LITERATURA

Adam, Z., Vorlíček, J., & Vaniček, J. (2004). *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Praha: Grada Publishing a.s.

Ambroz, M., Bousova, I., Skarka, A., Hanusova, V., Kralova, V., Matouskova, P., Szotakova, B., & Skalova, L. (2015). The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. *Molecules* 20(8), 15343-15358.

Ambroz, M., Hanusova, V., Skarka, A., Bousova, I., Kralova, V., Langhasova, L., & Skalova, L. (2016). Essential Oil from *Myrica rubra* Leaves Potentiated Antiproliferative and Prooxidative Effect of Doxorubicin and its Accumulation in Intestinal Cancer Cells. *Planta Medica* 82(1-2), 89-96.

Aula, S., Lakkireddy, S., Jamil, K., Kapley, A., Swamy, A.V.N., & Lakkireddy, H.R. (2015). Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles. *Rsc Advances* 5(59), 47830-47859.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Waomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2), 446-475.

Bartikova, H., Hanusova, V., Skalova, L., Ambroz, M., & Bousova, I. (2014). Antioxidant, Pro-Oxidant and Other Biological Activities of Sesquiterpenes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 14(22), 2478-2494.

Bhoola, S., & Hoskins, W.J. (2006). Diagnosis and management of epithelial ovarian cancer. *Obstetrics and Gynecology* 107(6), 1399-1410.

Borenfreund, E., & Puerner, J. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* (9), 7-9.

Carvalho, C., Santos, R.X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P.J., Santos, M.S., & Moreira, P.I. (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry* 16(25), 3267-3285.

Chaves, J.S., Leal, P.C., Pianowisky, L., & Calixto, J.B. (2008). Pharmacokinetics and Tissue Distribution of the Sesquiterpene alpha-Humulene in Mice. *Planta Medica* 74(14), 1678-1683.

Chou, T.C. (2007). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug-combination studies (vol 58, pg 621, 2006). *Pharmacological Reviews* 59(1), 124-124.

Cibula, D., Petruželka, L., Bělohávek, O., & Bouda, J. (2009). *Onkogynekologie*. Praha: Grada Publishing a.s.

Cutts, S.M., Nudelman, A., Rephaeli, A., & Phillips, D.R. (2005). The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *Iubmb Life* 57(2), 73-81.

- Davis, E.M., & Croteau, R. (2000). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids* 209, 53-95.
- Di Sotto, A., Maffei, F., Hrelia, P., Castelli, F., Sarpietro, M.G., & Mazzanti, G. (2013). Genotoxicity assessment of beta-caryophyllene oxide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66(3), 264-268.
- DiSaia, P.J., Creasman, W.T., Mannel, R.S., & McMeekin, S.D. (2012). *Clinical gynecologic oncology*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Dolečková, M., Králová, D., Kutová, J., & CHourová, A. (2015). Je ještě místo pro radioterapii v léčbě nádorů vaječníků? *Onkologie* 9(3), 146-150.
- Ebell, M.H., Culp, M.B., & Radke, T.J. (2016). A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. *American Journal of Preventive Medicine* 50(3), 384-394.
- el Hadri, A., Angeles Gomez del Rio, M., Sanz, J., Gonzalez Coloma, A., Idaomar, M., Ribas Ozonas, B., Benedi Gonzalez, J., & Sanchez Reus, M.I. (2010). Cytotoxic activity of alpha-humulene and trans-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales De La Real Academia Nacional De Farmacia* 76(3), 343-356.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., & Bray, F. (2014). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* (5), 359-386.
- Fischerová, D., Zikán, M., Pinkavová, I., Sláma, J., & Freitag, P. (2012). Předoperační diagnostika ovariálních nádorů. *Onkologie* 6(2), 59-64.
- Fishman, D.A., Cohen, L., Blank, S.V., Shulman, L., Singh, D., Bozorgi, K., Tamura, R., Timor-Tritsch, I., & Schwartz, P.E. (2005). The role of ultrasound evaluation in the detection of early-stage epithelial ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 192(4), 1214-1221.
- Fong, M.Y., Jin, S., Rane, M., Singh, R.K., Gupta, R., & Kakar, S.S. (2012). Withaferin A Synergizes the Therapeutic Effect of Doxorubicin through ROS-Mediated Autophagy in Ovarian Cancer. *Plos One* 7(7).
- Harake, D., Franco, V.I., Henkel, J.M., Miller, T.L., & Lipshultz, S.E. (2012). Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: strategies for prevention and management. *Future cardiology* 8(4), 647-670.
- Hennessy, B.T., Coleman, R.L., & Markman, M. (2009). Ovarian cancer. *The Lancet*, 1371-1382.
- Hortobagyi, G.N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer - An overview. *Drugs* 54, 1-7.
- Iyer, V.R., & Lee, S.I. (2010). MRI, CT, and PET/CT for Ovarian Cancer Detection and Adnexal Lesion Characterization. *American Journal of Roentgenology* 194(2), 311-321.

- Jun, N.J., Mosaddik, A., Moon, J.Y., Jang, K.-C., Lee, D.-S., Ahn, K.S., & Cho, S.K. (2011). Cytotoxic Activity of beta-Caryophyllene Oxide Isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf. *Records of Natural Products* 5(3), 242-246.
- Kaneda, N., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R., Santisuk, T., Tuchinda, P., Udchachon, J., & Reutrakul, V. (1992). PLANT ANTICANCER AGENTS .50. CYTOTOXIC TRITERPENES FROM SANDORICUM-KOETJAPE STEMS. *Journal of Natural Products* 55(5), 654-659.
- Keizer, H.G., Pinedo, H.M., Schuurhuis, G.J., & Joenje, H. (1990). DOXORUBICIN (ADRIAMYCIN) - A CRITICAL-REVIEW OF FREE RADICAL-DEPENDENT MECHANISMS OF CYTOTOXICITY. *Pharmacology & Therapeutics* 47(2), 219-231.
- Kim, C., Cho, S.K., Kapoor, S., Kumar, A., Vali, S., Abbasi, T., Kim, S.-H., Sethi, G., & Ahn, K.S. (2014a). beta-Caryophyllene Oxide Inhibits Constitutive and Inducible STAT3 Signaling Pathway Through Induction of the SHP-1 Protein Tyrosine Phosphatase. *Molecular Carcinogenesis* 53(10), 793-806.
- Kim, C., Cho, S.K., Kim, K.-D., Nam, D., Chung, W.-S., Jang, H.-J., Lee, S.-G., Shim, B.S., Sethi, G., & Ahn, K.S. (2014b). beta-Caryophyllene oxide potentiates TNF alpha-induced apoptosis and inhibits invasion through down-modulation of NF-kappa B-regulated gene products. *Apoptosis* 19(4), 708-718.
- Kim, H.H., Kim, D.H., Kim, M.H., Oh, M.H., Kim, S.R., Park, K.J., & Lee, M.W. (2013). Flavonoid constituents in the leaves of *Myrica rubra* sieb. et zucc. with anti-inflammatory activity. *Archives of Pharmacal Research* 36(12), 1533-1540.
- Klener, P., & Klener jr., P. (2010). *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada Publishing a.s.
- Klát, J. (2012). Primární chirurgická léčba karcinomu ovaria. *Onkologie* 6(2), 71-73.
- Kubo, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T., Ishikawa, H., & Haraguchi, H. (1996). Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* 62(5), 427-430.
- Kufe, D., Holland, J., Frei, E., Pollock, R., & Weichselbaum, R. (2003). *Holland and Frei Cancer Medicine* 6. Hamilton (Ontario): BC Decker Inc.
- Langhansova, L., Hanusova, V., Rezek, J., Stohanslova, B., Ambroz, M., Kralova, V., Vanek, T., Lou, J.D., Yun, Z.L., Yang, J., & Skalova, L. (2014). Essential oil from *Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Industrial Crops and Products* 59, 20-26.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., & Madelmont, J.C. (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica* 69(5), 402-407.
- Legault, J., & Pichette, A. (2007). Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59(12), 1643-1647.

Lin, K.C., Lin, Y.C., & Chen, S.M. (2012). Electrocatalytic reaction of hydrogen peroxide and NADH based on poly (neutral red) and FAD hybrid film. *Analyst* 137(1), 186-194.

Martin-Cordero, C., Jose Leon-Gonzalez, A., Manuel Calderon-Montano, J., Burgos-Moron, E., & Lopez-Lazaro, M. (2012). Pro-Oxidant Natural Products as Anticancer Agents. *Current Drug Targets* 13(8), 1006-1028.

Muindi, J.R.F., Sinha, B.K., Gianni, L., & Myers, C.E. (1984). HYDROXYL RADICAL PRODUCTION AND DNA DAMAGE INDUCED BY ANTHRACYCLINE-IRON COMPLEX. *Febs Letters* 172(2), 226-230.

Ozols, R. (2003). *Ovarian Cancer*. Hamilton (Ontario): BC Decker Inc.

Paduch, R., Kandefler-Szerszen, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 55(5), 315-327.

Park, K.-R., Nam, D., Yun, H.-M., Lee, S.-G., Jang, H.-J., Sethi, G., Cho, S.K., & Ahn, K.S. (2011). beta-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters* 312(2), 178-188.

Petera, J., Špaček, J., & Odrážka, K. (2003). Radioterapie v léčbě epiteliálního karcinomu ovarií. *Česká gynekologie* (4), 264-269.

Poprach, A., Petráková, K., Vyskočil, J., Lakomý, R., & Němeček, R. (2008). Kardiotoxicita léků používaných v onkologii. *Klinická onkologie* 21(5), 288-293.

Rasoanaivo, P., Randriana, R.F., Maggi, F., Nicoletti, M., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Petrelli, D., Vitali, L.A., Papa, F., & Vittori, S. (2013). Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil of *Athanasia brownii* Hochr. (Asteraceae) Endemic to Madagascar. *Chemistry & Biodiversity* 10(10), 1876-1886.

Raut, J.S., & Karuppayil, S.M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250-264.

Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 3(7), 1125-1131.

Rogério, A.P., Andrade, E.L., Leite, D.F.P., Figueiredo, C.P., & Calixto, J.B. (2009). Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology* 158(4), 1074-1087.

Sperotto, A.R.M., Moura, D.J., Peres, V.F., Damasceno, F.C., Caramao, E.B., Henriques, J.A.P., & Saffi, J. (2013). Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food and Chemical Toxicology* 57, 57-68.

Steenackers, B., De Cooman, L., & De Vos, D. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry* 172, 742-756.

Sun, C., Huang, H., Xu, C., Li, X., & Chen, K. (2013). Biological Activities of Extracts from Chinese Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A Review. *Plant Foods for Human Nutrition* 68(2), 97-106.

Ševčík, L. (2012). Léčebné možnosti relabujícího karcinomu ovaria. *Remedia* 22, 86-93.

Urban, N. (2003). Specific keynote: Ovarian cancer risk assessment and the potential for early detection. *Gynecologic Oncology* 88(1), S75-S79.

Vinholes, J., Goncalves, P., Martel, F., Coimbra, M.A., & Rocha, S.M. (2014). Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. *Food Chemistry* 156, 204-211.

Vyzula, R., Arenberger, P., Babjuk, M., & Belada, D. (2016). *Modrá kniha České onkologické společnosti*. Brno: Masarykův onkologický ústav.

Wang, H., & Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology and Medicine* 27(5-6), 612-616.

Xu, X.X., Persson, H.L., & Richardson, D.R. (2005). Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Molecular Pharmacology* 68(2), 261-271.

Yang, D.P., Michel, L., Chaumont, J.P., & Millet-Clerc, J. (1999). Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia* 148(2), 79-82.

Zavesky, L., Jancarkova, N., & Kohoutova, M. (2011). Ovarian cancer: Origin and factors involved in carcinogenesis with potential use in diagnosis, treatment and prognosis of the disease. *Neoplasma* 58(6), 457-468.

Zhang, F., & Zhang, Z.L. (2015). The Diagnostic Value of Transvaginal Sonograph (TVS), Color Doppler, and Serum Tumor Marker CA125, CEA, and AFP in Ovarian Cancer. *Cell Biochemistry and Biophysics* 72(2), 353-357.

Zigon, N., Hoshino, M., Yoshioka, S., Inokuma, Y., & Fujita, M. (2015). Where is the Oxygen? Structural Analysis of -Humulene Oxidation Products by the Crystalline Sponge Method. *Angewandte Chemie-International Edition* 54(31), 9033-9037.

### **Online zdroje:**

American type cell culture collection (ATCC) – Cell line SK-OV-3 [online], Poslední revize 30.3.2016 [citováno 30.3.2016], Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-77.aspx#generalinformation>

Public Health England's European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) – General Cell Collection: A2780 [online], Poslední revize 30.3.2016 [citováno 30.3.2016], Dostupné z: [https://www.phcculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112519&collection=ecacc\\_gc](https://www.phcculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112519&collection=ecacc_gc)

Vejražka, M.: Buněčné kultury [online], Poslední revize 15. 10. 2008 [citováno 30.3.2016], dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

Laboratory Resource – SV Counting Chambers [online], Poslední revize 07. 08. 2014 [citováno 25.3.2016], Dostupné z: <https://laboratoryresource.com.au/?navaction=getitem&id=94>