

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Seskviterpeny v protinádorové terapii.

Disertační práce

Mgr. Martin Ambrož

Vedoucí disertační práce:

Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce, prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D., za odborné vedení v průběhu doktorského studia a za její trpělivost, lidský přístup a optimismus.

Děkuji celému kolektivu katedry biochemických věd, zejména naší paní laborantce, Aleně Pakostové a RNDr. Veronice Hanušové, Ph.D., za jejich ochotu kdykoli pomoci, poradit a za příjemné pracovní prostředí.

Díky patří i rodině a přátelům za podporu v průběhu studia.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (Centre of Excellence P303/12/G163 a Univerzitě Karlově (GAUK 296 314, SVV 260 416)

Prohlášení

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

Mgr. Martin Ambrož

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Martin Ambrož

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

Název disertační práce: Seskviterpeny v protinádorové terapii.

Nedílnou součástí léčby onkologických onemocnění je chemoterapie. V současnosti se ukazuje jako výhodnější kombinovaná terapie, složená z více druhů protinádorových látek. Kombinovaná terapie omezuje pravděpodobnost rozvoje rezistence, zároveň umožňuje podávat nižší jednotlivé dávky a tím předcházet rozvoji nežádoucích účinků spojených s působením proti jiným tkáním. Nově zkoumanými složkami kombinované terapie jsou i přírodní látky, konkrétně seskviterpeny.

Cílem disertační práce bylo studovat účinky silice voskovníku červeného (*Myrica rubra*, MEO) a vybraných seskviterpenů v kombinované protinádorové terapii. Zaměřili jsme se nejen na potenciální schopnost seskviterpenů zvýšit účinnost klasických cytostatik (doxorubicin, oxaliplatin, 5-fluorouracil), ale i na problematiku možných interakcí seskviterpenů s léčivými, které by mohly být způsobené modulačními účinky seskviterpenů na enzymy metabolizující léčiva a další xenobiotika. K experimentům jsme využili řadu buněčných nádorových i nenádorových linií, primární kultury izolovaných hepatocytů i *in vivo* modely zdravých i tumorizovaných myší

Zjistili jsme výrazný antiproliferační účinek MEO proti nádorovým buňkám střevní linie HCT-8, HT-29, SW480, SW620 a Caco-2. MEO byla schopna zvýšit účinek doxorubicinu (DOX) v nádorových buňkách. Zvýšení účinku bylo spojené se zvýšením intracelulární koncentrace DOX a zvýšením produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). V kultuře hepatocytů nedošlo vlivem MEO ke snížení viability ani ke změnám intracelulární koncentrace DOX či produkce ROS. Seskviterpeny β -karyofylen (CAR), β -karyofylenoxid (CAO), α -humulen (HUM), *trans*-nerolidol (NER) a valencen (VAL), tvořící hlavní složky MEO, byly dále testovány na nádorových liniích samostatně a v kombinaci s vybranými cytostatiky DOX, 5-fluorouracilem (FU) a oxaliplatinou (OxPt). Všechny seskviterpeny (kromě CAR) byly schopné zvyšovat účinek DOX v linii Caco-2. V kultuře hepatocytů se neprojevil cytotoxický účinek. Účinek FU a OxPt byl

schopen zvyšovat hlavně CAO. V další studii jsme využili ovariální linie s různou citlivostí k DOX a dvě lymfoblastové linie, citlivou a od ní odvozenou DOX rezistentní linii se zvýšenou expresí lékového přenašeče ABCB1. Seskviterpeny byly schopny zvyšovat účinek DOX ve všech liniích, s výjimkou linie rezistentní k DOX, ačkoli došlo k výraznému nárůstu intracelulární koncentrace DOX a k inhibici transportéru ABCB1. Při pokusech *in vivo* na tumorizovaných myších nedošlo vlivem seskviterpenů ke změnám koncentrace DOX v tumoru, ani se nezměnila velikost tumoru.

V *in vitro* studiích potenciálních inhibičních účinků seskviterpenů na enzymy metabolizující xenobiotika jsme zjistili výraznou schopnost seskviterpenů inhibovat cytochromy P450 (CYP). Aktivitu enzymů redukujících karbonylové sloučeniny a konjugačních enzymů seskviterpeny neinhibovaly. *In vivo*, v myších játrech a tenkém střevu, naopak došlo vlivem CAO a NER ke zvýšení aktivity a exprese CYP2B, 3A a 2C. V játrech dále došlo ke zvýšení aktivity aldo-ketoreduktázy 1C, karbonylreduktázy a sulfotransferázy. V tenkém střevu byla snižena aktivita NAD(P)H-chinon oxidoreduktázy 1.

Výsledky dizertační práce ukazují možný pozitivní přínos seskviterpenů v terapii nádorových onemocnění. Avšak při jejich použití v terapii je třeba mít na zřeteli jejich schopnost modulovat aktivitu enzymů metabolizujících xenobiotika, což naznačuje možnost interakcí s léčivými látkami.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Martin Ambrož
Supervisor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Title of Doctoral Thesis: Sesquiterpenes in cancer therapy.

Chemotherapy is an important part of treatment of cancer. Currently, the use of several anticancer drugs in combination seem to be more advantageous. This combination therapy prevents drug resistance development and make it possible to lower the doses of single drugs, which prevents the side effects in non-cancerous tissues. Large pool of potential drugs for combination therapy can be found among natural compounds, for example among sesquiterpenes.

Our project was designed to evaluate the effect of *Myrica rubra* essential oil (MEO) and selected sesquiterpenes in combination cancer therapy. We focused on the potential ability of MEO and sesquiterpenes to increase the antiproliferative efficacy of classical cytostatics (doxorubicin, oxaliplatin, 5-fluorouracil). In addition, we also studied the possible interaction of sesquiterpenes with other drugs in combination therapy, which could be caused by sesquiterpene-mediated modulation of drug-metabolizing enzymes. For these purposes, a panel of various cell lines (both cancerous and non-cancerous) and primary culture of hepatocytes were used in *in vitro* experiments. Normal and tumor bearing mice were chosen as *in vivo* models.

MEO has significant antiproliferative effect in intestine cancer cell lines HTC-8, HT-29, SW480, SW620 and Caco-2. MEO was able to potentiate efficacy of DOX in cancer cells. Increase of efficacy correlated with enhanced intracellular DOX concentration and increased production of ROS. MEO has no effect on viability, intracellular DOX concentration and ROS production in primary culture of hepatocytes. Sesquiterpenes β -caryophyllene (CAR), β -caryophyllene oxide (CAO), α -humulene (HUM), *trans*-nerolidol (NER) and valencene (VAL) are main components of MEO. Their antiproliferative effects were tested in cancer cell lines, when they were used alone and in combination with selected cytostatics DOX, 5-fluorouracil, oxaliplatin. All

sesquiterpenes (except CAR) were able to increase DOX efficacy in Caco-2 cell line. Viability of hepatocytes was not affected by sesquiterpenes. Antiproliferative activity of OxPt and FU was increased, dominantly by CAO. In the next study, ovarian cancer cell lines with different sensitivity and two lymphoblast cancer cell lines, one sensitive and the other DOX completely resistant (with overexpression of ABCB1 transporter) were used. Sesquiterpenes were able to increase efficacy of DOX in all cell lines with exception of DOX resistant cell line. Nevertheless, sesquiterpenes were able to increase intracellular DOX concentration and to inhibit ABCB1 transporter in DOX-resistant cell line. *In vivo*, the use of sesquiterpenes in combination with DOX led to neither increase of DOX concentration in tumors nor size of tumors in tumor bearing mice.

In vitro study of potential inhibitory effect of sesquiterpenes on drug-metabolizing enzymes showed significant ability of sesquiterpenes to inhibit cytochrome P450 (CYP). Activities of carbonyl reducing enzymes and conjugating enzymes were not inhibited by sesquiterpenes. On the other hand, CAO and NER *in vivo* increased activities and expression of CYP2B, 3A and 2C in mouse liver and small intestine. In liver, elevated activity of aldo-ketoreductase 1C, carbonyl reductase and sulphhotransferase were also found. Contrary, sesquiterpenes decreased NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity in small intestine.

Results from this doctoral thesis show possible beneficial effects of sesquiterpenes in cancer treatment. However, it is necessary to take into mind their ability to modulate activity of drug-metabolizing enzymes and possibility of sesquiterpene-drug interactions.

Obsah

1	Úvod	10
2	Teoretická část	11
2.1.	Nádorová onemocnění	11
2.1.1.	Terapie nádorových onemocnění	11
2.1.1.1.	Klasická cytostatika	12
2.1.1.2.	Antimetabolity	12
2.1.1.3.	Alkylační a interkalační látky	13
2.1.1.4.	Antimitotika	13
2.1.2.	Cytostatika studovaná v disertační práci	13
2.1.2.1.	Doxorubicin	13
2.1.2.2.	5-fluorouracil	14
2.1.2.3.	Oxaliplatin	15
2.1.3.1.	Kombinovaná terapie s využitím FU	16
2.1.3.2.	Kombinovaná terapie OxPt	16
2.1.3.3.	Kombinovaná terapie DOX	17
2.1.4.	Hodnocení účinku kombinací látek	17
2.1.5.	Látky rostlinného původu a jejich potenciální využití v kombinované terapii	18
2.2.	Terpeny	19
2.2.1.	Seskviterpeny	21
3	Cíle práce	24
4.	Komentáře k publikacím	25
4.1.	Antioxidační, pro-oxidační a jiné biologické účinky seskviterpenů	25
4.2.	Antiproliferační účinky a toxicita silice z listů voskovníku červeného ve střevních nádorových liniích a izolovaných hepatocytech	26
4.3.	Schopnost silice z listů voskovníku červeného zvyšovat účinnost doxorubicinu ve střevní nádorové linii	27
4.4.	Účinky vybraných seskviterpenů v kombinaci s doxorubicinem, 5-fluorouracilem a oxaliplatinou ve střevních nádorových liniích a možné mechanismy jejich působení.	28
4.5.	Účinek vybraných seskviterpenů v kombinaci s doxorubicinem na ovariální a lymfatické nádorové buňky s různou mírou citlivosti/ rezistence vůči doxorubicinu	30
4.6.	Účinky vybraných seskviterpenů v kombinaci s doxorubicinem v prsních nádorových buňkách a v myších s implantovaným prsním tumorem	31

4.7. Modulační účinky vybraných seskviterpenů <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> na enzymy metabolizující xenobiotika	32
5 Závěry	34
6 Seznam použité literatury	36
7 Přílohy	39
7.1. Seznam zkratk	39
7.2. Podíl předkladatele na publikacích zahrnutých v disertační práci	40
7.3. Seznam publikací vztahujících se k tématu disertační práce	43
Publikace I.	45
Publikace II.	63
Publikace III.	71
Publikace IV.	80
Publikace V.	97
Publikace VI.	108
Publikace VII.	125
Publikace VIII.	135
Publikace IX.	147
Publikace X.	165
7.4. Seznam všech publikací	193
7.5. Seznam prezentací na vědeckých setkáních	195

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou celosvětový problém spojený s prodlužováním lidského věku a rozvojem medicíny v ostatních oblastech, zejména v terapii infekčních onemocnění. V České republice jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinu smrti hned za nemocemi srdce a oběhové soustavy. Nejvíce se u obou pohlaví vyskytuje kolorektální karcinom, následovaný u žen nádory prsu a u mužů nádory prostaty. Vzrůstajícím problémem je nárůst výskytu melanomu u obou pohlaví [55].

Ke vzniku nádorové buňky dochází v důsledku postupné přeměny normální buňky kvůli akumulaci genetických a epigenetických mutací. Důsledkem může být utlumení exprese tumor supresivních genů nebo naopak zvýšená aktivita faktorů umožňujících přežití buňky. Může také dojít k obnovení exprese genů, které nejsou za normálních podmínek exprimovány. Proces přeměny normální buňky na nádorovou je označován jako kancerogeneze. V průběhu kancerogeneze jsou rekrutovány další nenádorové buňky, které usnadňují přežití, růst a šíření nádoru. V rozvoji kancerogeneze je rovněž připisován vliv imunitnímu systému a chronického zánětu [1].

Při terapii nádorů narážíme na problém cíleného působení na nádorové buňky, které jsou tělu vlastní a vykazují pouze omezené specifické metabolické vlastnosti. Používaná skupina cytostatik využívá cytotoxického působení látek, které ovlivňují hlavně rychle se dělící buňky. To je spojeno s nežádoucími účinky např. vypadávání vlasů, poruchy funkce trávicího ústrojí, nevolnost, zvracení, oslabení imunitního systému, útlum kostní dřeně a poruchy spermatogeneze. Nebezpečné je podávání v těhotenství pro teratogenní účinky [2].

V popředí vědeckého zájmu je proto hledání možností, jak zvýšit účinnost a selektivitu protinádorových léčiv a současně snížit jejich nežádoucí účinky. Jednou z možností by mohlo být jejich kombinované použití s některými přírodními látkami, například seskviterpeny. Studie, zahrnuté do předložené disertační práce, si kladly za cíl alespoň částečně prozkoumat protinádorové působení přírodních látek ze skupiny seskviterpenů a jejich možné ovlivnění účinku klasických cytostatik jak v nádorových, tak i nenádorových buňkách. Zároveň jsme studovali účinky seskviterpenů na biotransformační enzymy s cílem posoudit riziko možných interakcí seskviterpenů s léčivy v kombinované terapii.

2 Teoretická část

2.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou charakteristické nekontrolovaným dělení buněk a určitou schopností šířit se do okolních tkání. Nádorové buňky z buňky nenádorové vznikají na základě hromadění genetických a epigenetických mutací. Proces je označován jako kancerogeneze. U solidních nádorů bylo prokázáno průměrně šest až osm tzv. kritických mutací. Mezi kritické mutace patří aktivace onkogenů, inaktivace tumor supresorových genů, zvýšení exprese anti-apoptických faktorů a mutace genů ovlivňujících buněčný cyklus. Hromadění mutací je dlouhodobý proces trvající několik let. Významný podíl na kancerogenezi je připisován imunitnímu systému a chronickému zánětu. Vlivu imunitního systému je věnována pozornost až od devadesátých let 20. století. Byla prokázána tzv. duální role imunitního systému, kdy imunitní systém eliminuje nově transformované a eradikuje zbytkové nádorové populace, na druhé straně ale u řady nádorů podporuje přežití, růst a šíření. S imunitním systémem pravděpodobně souvisí i vliv chronického zánětu, kdy aktivované makrofágy produkují angiogenní a lymfangiogenní molekuly, které mohou parakrinně působit na nádorové buňky, čímž zvyšují jejich přežití, proliferaci a migrační schopnosti. Předpokládá se, že až 15 % nádorových onemocnění vzniká na podkladě chronického zánětu [1,3].

2.1.1. Terapie nádorových onemocnění

Terapie nádorových onemocnění je složena ze tří základních postupů, které jsou v závislosti na typu nádoru vzájemně kombinovány. Tyto postupy zahrnují: chirurgické odstranění, ozařování a farmakoterapii. Farmakoterapie se dále dělí na terapii klasickými cytostatiky, imunoterapii, cílenou a hormonální léčbu. Klasická cytostatika využívají vyšší citlivosti nádorových buněk k proapoptotickým stimulům. Účinkují proti různým typům nádorů a mají různé mechanismy účinku. Většinou tyto mechanismy zahrnují inhibici replikace DNA, transkripce, translace nebo dělení buněk. Výsledkem bývá v konečném důsledku apoptóza vyvolaná aktivací dráhy p53. V některých případech mohou buňky zanikat i dalšími druhy buněčné smrti, jako mitotickou katastrofou, autofagií případně nekrózou. Nevýhodou klasických cytostatik je častý výskyt závažných nežádoucích účinků [1,4,5].

Imunoterapie stimuluje vlastní imunitní systém k eliminaci nádorových buněk. Výhodou je selektivní působení a likvidace nádorových buněk nezávislá na buněčném cyklu. Velmi významné se jeví využití imunoterapie k odstranění nádorových buněk zbylých po předchozí klasické cytostatické léčbě, zvláště pak u nádorů s častým relapsem. Hormonální léčba nachází uplatnění u nádorů exprimujících receptory. Například u žen s nádory prsu a dělohy jsou používány antiestrogeny, mužům s nádory prostaty jsou podávány antiandrogeny [1,6].

Nejnovějším typem farmakoterapie je tzv. cílená léčba. Látky řazené do této skupiny inhibují konkrétní signální dráhy, interferují s onkogenními signály, přímo indukují apoptózu nebo indukují diferenciaci. Kromě nádorových buněk mohou cílit i na okolní buňky a ovlivňovat angiogenezi, metastázování nebo imunitní odpověď. Díky vyšší selektivitě mívá cílená léčba nižší toxicitu. Přesto i cílená léčba má řadu nežádoucích účinků. Cílové molekuly nebo dráhy charakteristické pro určitý typ nádoru často plní také fyziologickou funkci, která se po ovlivnění projeví jako nežádoucí účinek. Problémem u cílené terapie může být i odlišná reakce nádoru u různých pacientů na léčbu v důsledku patologické aktivace dané dráhy na rozdílné úrovni [1,7-9].

2.1.1.1. Klasická cytostatika

Klasická cytostatika lze rozdělit podle mechanismu účinku do čtyř skupin: antimetabolity, alkylační a interkalační látky a antimitotika [4,10].

2.1.1.2. Antimetabolity

Antimetabolity jsou fázově specifická cytostatika, působící v S-fázi buněčného cyklu. Jsou odvozeny od endogenních látek důležitých pro syntézu DNA a RNA. K jejich aktivaci většinou slouží fosforylace různými kinázami. Díky změnám struktury dochází po jejich zapojení do biochemických pochodů k inhibici důležitých metabolických reakcí nebo produkci nefunkčních produktů. Antimetabolity jsou podávány většinou jako neúčinné látky, tzv. proléčiva. Patří sem analoga kyseliny listové, jejichž nejznámějším zástupcem je metotrexát, která blokuje enzym dihydrofolátreduktázu, čímž zastaví *de novo* syntézu purinů. Do této skupiny se dále řadí analoga purinových a pyrimidinových bazí. Tyto látky jsou po své aktivaci na příslušný nukleosidtrifosfát integrovány pomocí DNA-polymeráz do struktury DNA, kde zastavují replikaci a vedou ke zlomům DNA s následnou aktivací apoptózy [4,10-12].

2.1.1.3. Alkylační a interkalační látky

Jak alkylační, tak i interkalační látky se váží na strukturu DNA, avšak rozdílným způsobem. Alkylační látky mají dvě reaktivní místa a tvoří dvě kovalentní vazby s nukleovými bázemi, nejčastěji s guaninem. Interkalační látky tvoří nekovalentní vazbu s DNA. Molekula cytostatika se vmezeří do šroubovice DNA, kde inhibuje replikaci a transkripci. Interkalační látky také většinou působí jako inhibitory topoizomerázy II, což vede ke vzniku zlomů v řetězci DNA [4,10,13].

2.1.1.4. Antimitotika

Antimitotika jsou skupinou látek, které jsou schopny stabilizovat vzniklé mikrotubuly nebo naopak inhibovat polymerizace jednotek tubulinu. Mezi stabilizátory mikrotubulů patří taxany, zástupci inhibitorů polymerizace tubulinu jsou vinca alkaloidy a kolchicin. Výsledkem účinku antimitotik je zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodu G2-M a následná apoptóza. Poškozením cytoskeletu dochází ke změnám v dalších buněčných funkcích jako v buněčné mobilitě, invazivitě, metastazování a angiogenezi [4,10].

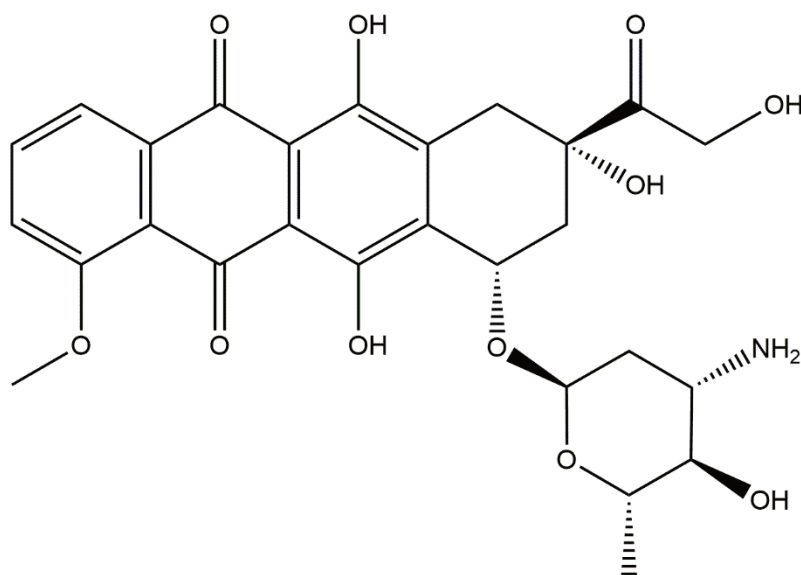
2.1.2. Cytostatika studovaná v disertační práci

2.1.2.1. Doxorubicin

Doxorubicin (DOX) je antracyklinové antibiotikum izolované ze *Streptomyces peucetius*. DOX v buňkách inhibuje replikaci a transkripci DNA. Hlavními mechanismy účinku je schopnost interkalace do struktury DNA a inhibice topoizomerázy II. Dalším účinkem DOX i dalších antracyklinů je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) buď přímo nebo v komplexu s železitými ionty. Výše zmíněné mechanismy jsou však také příčinou závažných nežádoucích účinků, zvláště pak kardiotoxicity antracyklinů [1,4,14].

V terapii je DOX podáván ve formě pomalé injekce či infuze, neboť po perorálním podání má malou biologickou dostupnost. V klinické praxi je DOX již řadu let používán samostatně nebo v kombinaci s dalšími cytostatiky k terapii karcinomu prsu, tlustého střeva, osteosarkomu, sarkomu měkkých tkání, malobuněčného bronchogenního karcinomu a v hematologii jako složka kombinované terapie ne Hodgkinových lymfomů, Hodgkinovy choroby, mnohočetného myelomu, akutní lymfoblastové a myeloidní leukémie. Mezi nežádoucí účinky patří výše zmíněná kardiotoxicita, myelosuprese,

trombocytopenie, nauzea, průjem a alopecie. Projevy kardiotoxicity se mohou projevit v průběhu léčby, ale i mnoho let po ukončení terapie. Rizikovými faktory pro rozvoj kardiotoxicity jsou věk, onemocnění srdce, ženské pohlaví, radioterapie v oblasti mediastina a srdce. Vzhledem k závislosti kardiotoxicity na kumulativní dávce je celková dávka limitována na 450-550 mg/m². Při podání vyšších dávek je riziko srdečního selhání až 50 % s mortalitou 37-60 % [4,10].



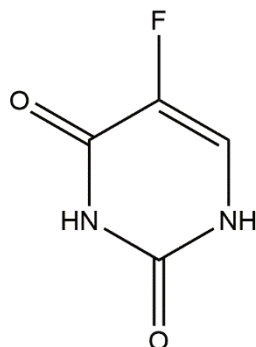
Obr.1. doxorubicin

2.1.2.2. 5-fluorouracil

5-fluorouracil (FU) je pyrimidinovým analogem. Po jeho přeměně na nukleotid se může dále měnit na 5-fluorouridin a integrovat se do DNA, kde poškozuje její funkci nebo na 5-fluorodeoxyuridin, který působí jako inhibitor tymidylátsyntázy, se kterou tvoří stabilní komplex. Fluorouridintrifosfát je také inkorporován do RNA. *In vitro*, v nádorových liniích rakoviny tlustého střeva a prsu bylo zjištěno, že FU také znemožňuje přeměnu pre-rRNA na rRNA. Rovněž bylo ukázáno, že vlivem FU dochází i k narušení postranskripčních modifikací tRNA. Polyadenylace mRNA byla inhibována už relativně nízkou koncentrací FU.

V klinické praxi je FU využíván k léčbě kolorektálního karcinomu, nádorů žaludku, pankreatu, karcinomu prsu, hlavy a krku. Do buněk se dostává aktivním transportem stejným přenašečem jako uracil. Odbouráván je v játrech dihydropyrimidindehydrogenázou na fluoro-β-alanin. Mezi nežádoucí účinky FU patří

časté perorální a enterální mukozitidy. Dalšími jsou megaloblastová anemie a mozečková ataxie způsobená neurotoxickým metabolitem fluorocitrátem. [4,10,15]

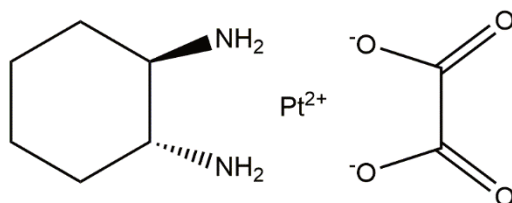


Obr.2. 5-fluorouracil

2.1.2.3. Oxaliplatina

Oxaliplatina (OxPt) je cytostatikum třetí generace platinových derivátů. Působí podobným mechanismem jako alkylující látky, ovšem místo vazby alkylové skupiny se váže komplexní platnatý kationt. Dalším účinkem je aktivace stresových kináz (JNK a p38 kináza), které vedou ke zvýšené expresi tzv. „death receptorů“ FAS a TRAILR2/DR5 na povrchu buňky. Současně vyvolaná transkripce a translace solubilních ligandů těchto receptorů (převážně FAS ligandu) vede k aktivaci vnější apoptotické dráhy s následnou apoptózou.

V klinické praxi je OxPt indikována u nádorů varlat, vaječníků, maligního melanomu, bronchogenního karcinomu, nehodgkinských lymfomů a kolorektálního karcinomu. Z nežádoucích účinků je častá nevolnost a zvracení, mírná myelosuprese a ototoxicita. Ve vyšších kumulativních dávkách se může projevit neurotoxicita. OxPt ve srovnání s cisplatinou vykazuje pouze malou nefrotoxicitu. Zajímavá je rozdílná pacienty tolerovaná dávka v závislosti na čase podání. Podstatně vyšší dávky jsou pacienty tolerovány kolem 16 h [4,10,16].



Obr.3. Oxaliplatina

2.1.3. Kombinovaná terapie v léčbě nádorových onemocnění

Kombinovaná terapie je současné nebo následné podání dvou a více cytostatik. Výhodou je delší doba remise i delší doba přežití pacientů spojená s menším výskytem nežádoucích účinků oproti monoterapii. Teoreticky podání dvou účinných látek vede k ovlivnění více buněčných populací, působení na více buněčných cílů v rámci populace, možné úpravě farmakokinetiky a snížení toxicity. V jedné populaci může být prospěšné i ovlivnění jednoho enzymu, či dráhy více léčiv. Důsledkem je možné snížení jednotlivých dávek spojené s omezením nežádoucích účinků. Jako tzv. sekvenční inhibice je nazýváno ovlivnění více následných kroků jedné biochemické dráhy, které v konečném důsledku může vést k téměř úplné inhibici dané dráhy.

Vhodná kombinace látek s různými mechanismy účinku působí i jako prevence rozvoje lékové rezistence. Rozvoj rezistence může souviset se sníženým transportem cytostatika do buňky, zvýšeným transportem z buňky, sníženou bioaktivací prekurzoru, změnou v cílovém místě působení, zvýšenou reparací poškozených struktur nebo inhibicí apoptózy. V klinické praxi jsou používány kombinace cytostatik, dle tzv. terapeutických režimů, které zahrnují doporučené kombinace cytostatik, optimální časy jejich podání a počet celkových opakování s klidovým obdobím, ve kterých mohou nádorové buňky přejít do fáze dělení [2,4,10,17].

2.1.3.1. Kombinovaná terapie s využitím FU

Při terapii nádorů žaludku, tlustého střeva, slinivky, jater a žlučových cest je používána kombinace FU a leukovorinu, analogu kyseliny tetrahydrofolové, který je přeměňován na kyselinu tetrahydrofolovou. Nadbytek vzniklé kyseliny tetrahydrofolové vytváří s FU a tymidylátsyntázou komplex, který blokuje další syntézu tymidinu [15,18,19].

2.1.3.2. Kombinovaná terapie OxPt

Kombinace OxPt a FU, případně jiným pyrimidinovým derivátem (např. kapecitabin) jsou, s možným doplněním o leukovorin, kombinace pro terapii rakoviny jícnu, žaludku a varlat. OxPt působí v této kombinaci zřejmě inhibicí dihydropyrimidindehydrogenázy, čímž brání odbourání FU. Inhibice dihydropyrimidindehydrogenázy je odvozována ze snížené tvorby dihydrofluorouracilu. Schopnost samotné OxPt částečně inhibovat tymidylátsyntázu podporuje účinek FU. Vliv

kombinace na buněčný cyklus byl téměř shodný s FU, dochází ke zvýšení G₁-S fáze populace, oproti zvýšené G₂ u samotné OxPt [16,18,20].

2.1.3.3. Kombinovaná terapie DOX

DOX je často využíván v kombinaci s cyklofosfamidem, FU a taxolovými deriváty v terapii karcinomu prsu. S paklitaxelem a platinovými deriváty se DOX podává pacientům s nádory ovaria a děložního hrdla, v kombinaci s cyklofosfamidem, vinkristinem a cis-platinou bývá častou volbou u pacientů s nádory plic. V terapii Hodgkinova lymfomu je využívána kombinace DOX, cyklofosfamidu, etoposidu, prokarbazinu, vinkristinu, bleomycinu a prednisonu označována jako BEACOPP režim. Cílem léčebného režimu kombinace více látek s různým mechanismem účinku je eliminovat nádorové buňky před rozvojem rezistence a snižovat četnost relapsu [18,21].

2.1.4. Hodnocení účinku kombinací látek

S používáním kombinované terapie v léčbě nádorových i jiných závažných onemocnění vyvstává otázka objektivního hodnocení jejich společného účinku. Synergismus označuje účinek vyšší (matematicky $1+1>2$), antagonismus pak účinek nižší ($1+1<2$), než suma účinků jednotlivých složek, tzv. aditivní účinek ($1+1=2$). Kombinaci látek lze popsat kombinačním indexem (CI), který udává, zda je účinek synergický $CI<1$, aditivní účinek $CI=1$ a antagonický $CI>1$. Problémem ovšem je definovat aditivní účinek. Jako relativně dobrý model se osvědčil přístup na základě vztahů dávky a odpovídajícího účinku vycházejícího z Loeweho aditivity (1926), dále rozšířený teorií Chou a Talalay. K dispozici je počítačový program CalcuSyn schopný CI vypočítat na základě vztahů mezi účinkem a koncentrací jednotlivých látek a účinkem jejich kombinace. Nevýhodou přístupu je nutnost přesně určené závislosti mezi dávkou a účinkem, což je při práci s biologickým materiálem relativně náročné [22-24].

2.1.5. Látky rostlinného původu a jejich potenciální využití v kombinované terapii

V terapii nádorových onemocnění se dlouhodobě využívají i látky rostlinného původu. Zavedenými účinnými látkami s ověřeným protinádorovým účinkem je například paclitaxel (PTX), alkaloid z tisu používaný v monoterapii i v kombinované terapii nebo skupina vinca alkaloidů, vinkristin, vinblastin, vinorelbin, izolovaných z barvínku. Vinca alkaloidy jsou převážně používány jako součást kombinované terapie. Potenciálním přínosem pro zvýšení účinnosti klasických cytostatik by mohly být látky schopné inhibovat aktivitu efluxních transportérů, podílejících se na rozvoji rezistence nádorových buněk [4,10].

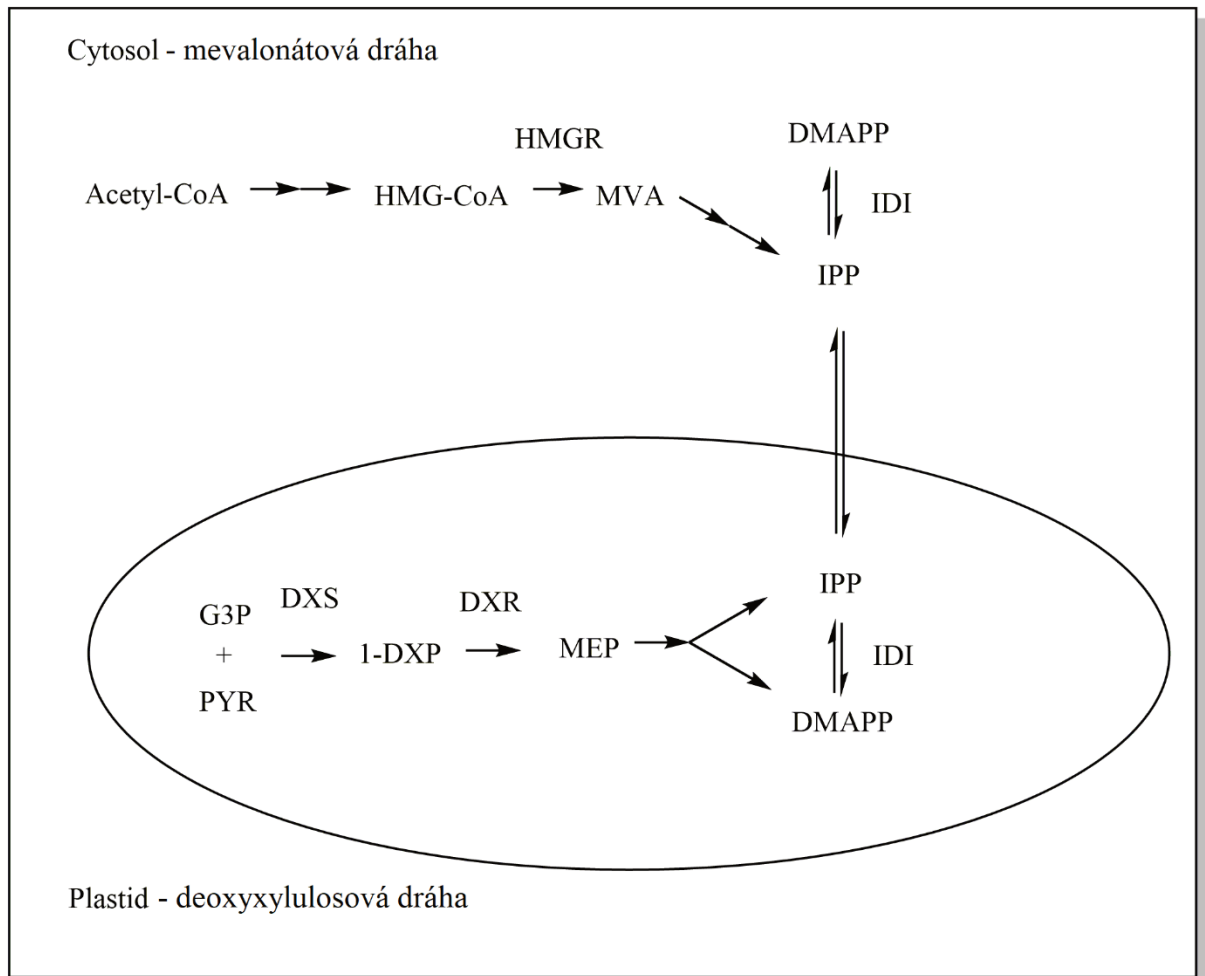
Schopnost inhibovat lékový přenašeč ABCB1 má např. dihydro- β -agarofuran, zástupce seskviterpenů. Experimenty s tímto značeným seskviterpenem naznačují nejen inhibici ABCB1 na membráně, ale i nově syntetizovaného v endoplasmatickém retikulu a v sekrečním aparátu [25]. Jiným seskviterpenem, který zvyšoval v nádorových buňkách účinek a koncentraci PTX, byl β -karyofylen. Ke zvýšení intracelulární koncentrace PTX došlo jiným mechanismem než inhibicí ABCB1, pravděpodobně zvýšeným transportem PTX do buňky [26].

Terpenoidy a jejich deriváty prokázaly schopnost zvyšovat účinnost klasických cytostatik v mnoha studiích. V *in vivo* studii geraniol v kombinaci s FU způsobil zmenšení myších tumorů o 53 %, přičemž FU samotný byl bez účinku a samotný geraniol způsobil zmenšení pouze o 26 % [27]. Kombinace geraniolu s docetaxelem způsobovala 3x větší redukci myších tumorů oproti samotnému geraniolu [28]. Zajímavá je kombinace geraniolu a simvastatinu, která byla schopná inhibovat proliferaci jaterních nádorových buněk, přestože jednotlivé látky jsou samostatně bez účinku [29]. Monoterpen limonen v kombinaci s docetaxelem byl schopen zvyšovat produkci ROS spojenou s deplecí redukováného glutathionu a aktivací kaspáz s následnou apoptózou nádorových buněk [30]. Synergický účinek byl popsán mezi seskviterpenem parthenolidem a dvěma cytostatiky, PTX a cisplatinou, na třech žaludečních nádorových liniích i na modelu myši s implantovanými tumory [31]. Synergicky s DOX působily i dva seskviterpenlaktony, izolované z *Moquiniastrum polymorphum*, na prsní nádorovou linii MCF-7 [32].

2.2. Terpeny

Terpeny jsou látky přírodního původu složené z pěti izoprenových jednotek. V závislosti na počtu izoprenových stavebních jednotek rozlišujeme hemiterpeny (C_5), monoterpeny (C_{10}), seskviterpeny (C_{15}), diterpeny (C_{20}), sestraterpeny (C_{25}), triterpeny (C_{30}), tetraterpeny (C_{40}) a polyterpeny ($C_{\geq 45}$). Z terpenů vznikají dalšími modifikacemi struktury terpenoidy, které zpravidla obsahují atom kyslíku ve formě různých funkčních skupin. Rovněž u nich často dochází k dalším změnám struktury, typické je připojení metylové skupiny.

Biosyntéza prekurzorů terpenů, izopentenyldifosfátu (IPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP), probíhá jednou ze dvou biochemických drah. První z možností je syntéza probíhající v cytosolu z acetyl-CoA přes hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) a kyselinu mevalonovou (MVA). Zelené rostliny, řasy a některé bakterie jsou schopné v plastidech z glyceraldehyd-3-fosfátu (G3P) a pyruvátu (PYR) vytvořit 1-deoxyxyluloza-5-fosfát (1-DXP) a následně 2C-metylerythriol-4-fosfát (MEP). Přeměna IPP a DMAPP je možná pomocí izopentenyldifosfátizomerázy (IDI). Syntetizovaný IPP je buňka v případě potřeby schopna přemístit z plastidů do cytosolu a naopak viz. Obr.4 [33,34].



Obr. 4. Schéma biosyntézy terpenů mevalonátovou a deoxyxylulosovou drahou.

3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A- reduktáza (HMGR),
 izopentenyldifosfátisomeráza (IDI), 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátsyntáza (DXS), 1-
 deoxy-D-xylulóza-5-fosfátisomeráza (DXR), izopentenyldifosfát (IPP),
 dimethylallyldifosfát (DMAPP), hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA), kyselina
 mevalonová (MVA), glyceraldehyd-3-fosfát (G3P), pyruvát (PYR) 1-deoxyxyluloza-5-
 fosfát (1-DXP), 2C-metylerythriol-4-fosfát (MEP)

2.2.1. Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou velmi rozmanitou skupinou sekundárních metabolitů. Jsou složeny ze tří izoprenových jednotek. Syntéza seskviterpenů probíhá většinou v cytosolu mevalonátovou dráhou. Rostliny mohou za určitých podmínek využít i prekuzory syntetizované 1-DXP dráhou v plastidech a po jejich transportu do cytosolu je využit k syntéze seskviterpenů [35].

Z pohledu struktury lze seskviterpeny rozdělit na dvě podskupiny. První podskupinu tvoří vlastní seskviterpeny, které se dále dělí podle počtu uhlíkatých kruhů na acyklické, monocyklické, bicyklické a tricyklické. Druhou podskupinou jsou seskviterpenlaktony, které ve své struktuře obsahují laktonový kruh. Ty jsou opět rozděleny dále podle počtu a velikosti jednotlivých uhlíkatých cyklů v molekule.

Seskviterpeny jsou velmi důležitými látkami. Vyskytují se v rostlinách, bakteriích, houbách a mořských bezobratlých. V rostlinách tvoří významnou složku silic, které se druhově liší jak kvalitativním, tak i kvantitativním zastoupením jednotlivých seskviterpenů. Podílejí se na signalizaci jako feromony, ovlivňují dospívání hmyzu jako juvenilní hormony, fungují jako fytoalexiny v rostlinách při obraně proti mikroorganismům a jsou součástí nepřímé odpovědi rostlin na napadení býložravcem [36].

Seskviterpeny se rovněž vyznačují širokým spektrem účinků na lidský organismus. Mají protinádorové, protizánětlivé, antiparazitní, antifungální a antivirové účinky. Mohou rovněž urychlovat hojení ran a modifikovat přenos látek kožní bariérou. Některé seskviterpeny vykazují významné antioxidační schopnosti. Např. acyklické seskviterpeny *trans*, *trans*-farnesol a *cis*-nerolidol byly schopny vychytávat hydroxylový radikál v závislosti na koncentraci s vyšší efektivitou než vitamín C [37]. Vyšší antioxidační aktivitu než vitamín C měly i β -karyofylen a β -eudesmol [38,39]. U parthenolidu byla pozorována schopnost chelátovat ionty železa a mědi.

V poslední době je nejintenzivněji zkoumána protinádorová aktivita seskviterpenů. Často popisovaným mechanismem protinádorového působení seskviterpenů je ovlivnění signální dráhy nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B). NF- κ B je skupinou transkripčních faktorů podílejících se na regulaci imunity, zánětlivé odpovědi, buněčné smrti a mnohých dalších. To je činí zajímavým terapeutickým cílem s využitím při léčbě zánětlivých, autoimunitních a nádorových onemocnění. Nejčastěji je inaktivní NF- κ B v cytosolu v komplexu s inhibičním proteinem. Po aktivaci

membránového receptoru signálem je spuštěna kaskáda, která v konečném důsledku aktivuje IκB-kinázu (IKK), která fosforyluje inhibiční protein, který se následně odštěpí a uvolní NF-κB. Aktivní NF-κB je translokován do jádra, kde se váže na specifické sekvence DNA a spouští transkripci. S aktivitou NF-κB je spojen vliv seskviterpenů na buněčný cyklus a apoptózu. Velmi častý modulační účinek na NF-κB má skupina seskviterpenlaktónů. V literatuře byl popsán inhibiční vliv kostunolidu a parthenolidu na aktivitu NF-κB a následný protizánětlivý účinek [40].

Seskviterpen zerumbon byl schopen indukovat zástavu buněčného cyklu ve fázi G₂/M v leukemické buněčné linii NB-4 s následnou apoptózou indukovanou mitochondriální cestou i přes Fas receptor [41]. Zástava buněčného cyklu ve fázi G₂/M se projevila i po expozici kostunolidem a jeho derivátem dehydrokostunolidem [42]. Snížení hladiny cyklinu D1 se projevilo po podání β-karyofylen oxidu, zerumbonu a farnesolu [43,44]. Mimo ovlivnění buněčného cyklu mohou seskviterpeny vyvolat i řízenou buněčnou smrt, apoptózu. Např. α-bisabolol v primárních kulturách chronické myeloidní leukémie od 26 pacientů byl schopen aktivovat vnitřní cestu apoptózy s preferencí pro maligní buňky [45]. Zerumbon izolovaný ze *Zingiber zerumbet* byl schopný indukovat apoptózu v pankreatické nádorové linii PANC-1 spojenou se zvýšenou expresí proteinu p53. Stejný účinek měl i v dalších pankreatických liniích SW1990 a AsPC-1 [46].

Antiproliferační aktivita některých seskviterpenů je připisována jejich pro-oxidačnímu působení v nádorových buňkách. Účinek seskviterpenů na redoxní systém se podstatně liší dle látky, koncentrace a typu buňky či organismu. Některé seskviterpeny vykazují v normálních buňkách antioxidační účinky, avšak v nádorových buňkách účinek pro-oxidační. Pro-oxidační působení seskviterpenů může probíhat buď přímou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS), nebo nepřímo, ovlivněním jiných drah. U artemisininu je za část účinku přisuzována přímé produkci ROS, případně uvolnění Fe²⁺ iontů [47]. Seskviterpenlaktony mají mnohdy pro-oxidační účinek spojený s deplecí redukováného glutathionu a produkcí ROS. Tomentosin v liniích HeLa a SiHa, kostunolid v linii ECA-109 vyvolaly snížení mitochondriálního potenciálu, zvýšení produkce ROS, snížení množství BCL-2 a aktivaci kaspázy 3 [48,49]. Zerumbon byl schopen ovlivnit mimo proliferace i funkci mitochondrií a zvýšit produkci ROS v kultuře CHL-1 [50].

Jak je patrné z výše uvedených studií, seskviterpeny jsou velmi zajímavé látky, které by mohly být v budoucnu využity i v protinádorové terapii. Díky svému širokému spektru účinků mohou být zdrojem potenciálně účinných látek pro terapii dalších

závažných nemocí. V lidovém léčitelství jsou seskviterpeny, hlavně ve formě rostlinných silic, užívány od pradávna. Vzhledem k rostoucí oblibě přírodních preparátů i vzhledem k potenciálnímu využití seskviterpenů jako farmak, je však třeba mít na zřeteli i otázku možných interakcí seskviterpenů se současně nebo následně podanými léčivy [51].

Seskviterpeny, vzhledem ke své vysoké lipofilitě, mají pravděpodobně schopnost modifikovat funkci enzymů účastnících se I. a II. fáze biotransformace. Vědeckých publikací věnujících se této problematice jsou bohužel velice omezené množství. Popsán byl hepatotoxický účinek zederonu a germakronu, spojený se změnami exprese cytochromů P450 (CYP). V lidských hepatocytech dokázaly oba vyvolat zvýšenou expresi a zároveň mírnou inhibici CYP2B6 a 3A4 [52]. Inhibici CYP3A4 a 1A2 germakron epoxidem, derivátem germakronu, popsali i Bamba a kol. [53]. U seskviterpen laktonu artemisininu, účinného na původce malárie, byla popsána inhibice CYP1A2, 2B6, 2C19 a 3A4. Vysoké riziko závažné interakce je předpokládáno pro substráty CYP1A2 a 2C19 [54]. Popsané inhibiční účinky na CYP, jehož izoformy hrají důležitou úlohu v metabolismu léčiv, ukazují možné riziko rozvoje toxických účinků zároveň podávaných léčiv.

3 Cíle práce

Cílem disertační práce bylo studovat účinky vybraných seskviterpenů v protinádorové terapii. Zaměřili jsme se nejen na potenciální schopnost seskviterpenů zvýšit účinnost klasických cytostatik, ale i na problematiku možných interakcí seskviterpenů s léčivy.

Dílními cíli bylo:

1. Shromáždit dostupné informace o biologických účincích seskviterpenů
2. Studovat antiproliferační účinky silice z voskovníku červeného (MEO) na střevní nádorové linie a izolované hepatocyty
3. Studovat schopnost MEO zvyšovat účinnost DOX ve střevní nádorové linii
4. Sledovat účinky vybraných seskviterpenů v kombinaci s DOX, FU a OxPt ve střevních nádorových liniích a hledat možné mechanismy jejich působení.
5. Testovat vybrané seskviterpeny v kombinaci s DOX na ovariální a lymfatické nádorové buňky s různou mírou citlivosti/ rezistence vůči DOX
6. Studovat účinky vybraných seskviterpenů s DOX v prsních nádorových buňkách a na myších s implantovaným Ehrlichovým tumorem
7. Testovat modulační účinky vybraných seskviterpenů na biotransformační enzymy *in vitro* i *in vivo*

4. Komentáře k publikacím

4.1. Antioxidační, pro-oxidační a jiné biologické účinky seskviterpenů

Bártiková, H.; Hanušová, V.; Skálová, L.; Ambrož, M.; Boušová, I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current topics in medicinal chemistry* **2014**, *14*, 2478-2494

Cílem přehledového článku bylo shromáždit dostupné informace o biologických účincích seskviterpenů. Seskviterpeny, 15-ti uhlíkaté sloučeniny složené ze tří izoprenových jednotek, jsou sekundární metabolity rostlin. Produkovány jsou také houbami a bezobratlými. Jsou obsaženy v lidské potravě, potravních doplncích a jako součást tradiční medicíny. Rozmanitost biologických účinků je činí zajímavými molekulami pro medicínské využití. V literatuře popsané účinky seskviterpenů zahrnují protizánětlivé, antiparazitní a protinádorové působení. Na druhé straně byla popsána i řada jejich toxických účinků. Je tedy velmi důležité poznat mechanismy jejich působení na různé tkáně a odhalit bližší vztahy mezi strukturou a účinkem.

Biologická dostupnost seskviterpenů po p.o. podání bývá kolem 30 %. Vzhledem k lipofilitě jsou seskviterpeny schopny prostupovat hematoencelelickou bariérou. Biotransformace probíhá v I. fázi hlavně jako hydroxylace a epoxidace, v II. fázi jako glukuronidace. Mnoho studií se zabývalo působením seskviterpenů na redoxní systém buněk. Výsledky se lišily v závislosti na struktuře, koncentraci a použitém modelu. Byl popsán antioxidační účinek některých seskviterpenů způsobený vychytáváním ROS, chelatací iontů kovů nebo zvýšením exprese antioxidačních systémů. Pro-oxidační účinek seskviterpenů se zdá být závislý na původním redoxním stavu buňky. K produkci ROS dochází přímo nebo vysycením antioxidační kapacity. Pro-oxidační účinek seskviterpenů, selektivní pro nádorové buňky, je pravděpodobně jedním z mechanismů jejich protinádorového působení. Dalšími mechanismy protinádorového působení seskviterpenů je aktivace apoptózy, inhibice proliferace a invazivity nebo zásah do průběhu buněčného cyklu.

4.2. Antiproliferační účinky a toxicita silice z listů voskovníku červeného ve střevních nádorových liniích a izolovaných hepatocytech

Langhansová, L.; Hanušová, V.; Rezek, J.; Štohanslová, B.; Ambrož, M.; Králová, V.; Vaněk, T.; Lou, J.D.; Yun, Z.L.; Yang, J., *et al.* Essential oil from myrica rubra leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Ind Crop Prod* **2014**, *59*, 20-26

Voskovník červený (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc) je subtropický asijský ovocný strom s tradičním použitím v lidovém léčitelství. Ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AVČR byly listy z tohoto stromu extrahovány destilací s vodní parou. Antiproliferační účinek získané silice (MEO) byl testován na nádorových buněčných liniích HCT8, SW620, SW480, HT29 a Caco2. Cytostatikum paklitaxel bylo použito jako pozitivní kontrola. MEO výrazně inhiboval buněčnou proliferaci ve všech buněčných liniích. Účinnost MEO se lišila v jednotlivých buněčných liniích, přičemž linie Caco2 byla nejcitlivější. V těchto buňkách byla naměřena hodnota IC₅₀ 1,5 ug / ml s využitím systému xCelligence pro sledování proliferace buněk v reálném čase. Dále bylo zjištěno, že v nádorových buňkách MEO vyvolává apoptózu a způsobuje významné zvýšení aktivity iniciátorových i efektorových kaspáz. Na rozdíl od rakovinných buněk neměla MEO vliv na životaschopnost izolovaných hepatocytů (jako model normálních nenádorových buněk). GC × GC-TOFMS analýzou chemického složení MEO byly zjištěny jako dominantní sloučeniny seskviterpeny CAR, HUM, VAL, epi- α -selinen, γ -muurolen, CAO a NER.

4.3. Schopnost silice z listů voskovníku červeného zvyšovat účinnost doxorubicinu ve střevní nádorové linii

Ambrož, M.; Hanušová, V.; Skarka, A.; Boušová, I.; Králová, V.; Langhasová, L.; Skálová, L. Essential oil from myrica rubra leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. *Planta medica* **2016**, 82, 89-96

V dané studii jsme se zaměřili na účinek MEO na antiproliferační a pro-oxidační aktivitu DOX. Jako modely jsme použili střevní nádorovou linii Caco-2, lidské fibroblasty z periontodontálního ligamenta a primární kulturu potkaních hepatocytů. MEO měla silný pro-oxidační účinek na nádorovou linii Caco-2 a pouze mírný na nenádorové kultury. V kombinaci s DOX byla MEO schopná zvýšit účinek DOX a produkci ROS v nádorové linii. V nenádorových buňkách MEO neměla vliv na toxicitu DOX a nezvyšovala produkci ROS. Významné bylo zjištění, že MEO je schopná zvyšovat intracelulární koncentraci DOX i jeho množství v buněčném jádru nádorových buněk, ale nezvyšuje množství DOX v hepatocytech.

4.4 Účinky vybraných seskviterpenů v kombinaci s doxorubicinem, 5-fluorouracilem a oxaliplatinou ve střevních nádorových liniích a možné mechanismy jejich působení.

Ambrož, M.; Boušová, I.; Skarka, A.; Hanušová, V.; Králová, V.; Matoušková, P.; Szotáková, B.; Skálová, L. The influence of sesquiterpenes from *myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules* **2015**, *20*, 15343-15358

Ambrož, M., Šmatová, M., Šadibolová, M., Pospíšilová, E., Hadravská, P., Kašparová, M., Hanušová, V., Králová, V., Skálová, L. Sesquiterpenes from *Myrica rubra* essential oil enhanced the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells (odesláno do *Int J Mol Sci*)

Seskviterpeny CAR, CAO, HUM, NER a VAL tvoří významný podíl silice izolované z MEO. Cílem první studie bylo stanovení účinku jednotlivých vybraných seskviterpenů na viabilitu buněk linie Caco-2 a jejich účinek při současném podání DOX. Jako model zdravé tkáně byla použita primární kultura potkaních hepatocytů. Seskviterpeny HUM, CAO, NER a VAL měly schopnost ovlivňovat viabilitu buněk linie Caco-2, přičemž vůči potkaním hepatocytům neměly žádný účinek. CAO, NER a VAL synergicky zvyšovaly účinek DOX v linii Caco-2. Součástí účinku seskviterpenů byla i schopnost zvyšovat intracelulární koncentraci DOX v buňkách linie Caco-2. Intracelulární koncentrace DOX v kultuře hepatocytů byla při současném podání seskviterpenů beze změny. CAO a VAL byly schopné v kombinaci s DOX zvyšovat produkci ROS. CAO byl schopný mírně snížit toxicitu DOX v kultuře hepatocytů.

Druhá studie byla navržena tak, aby zjistila, zda jsou vybrané seskviterpeny z MEO schopné zlepšit antiproliferační účinek FU a OxPt, dalších dvou klasických cytostatik používaných při léčbě rakoviny tlustého střeva. Rovněž byly v rámci této studie testován vliv seskviterpenů na mitochondriální membránový potenciál jako další možný mechanismus působení seskviterpenů. Výsledky ukázaly významnou schopnost HUM a zejména CAO zvýšit antiproliferační účinky FU a OxPt v nádorové buněčné linii

Caco-2 a SW-620. Naproti tomu byly VAL a NER neúčinné. Účinek CAO může být částečně založen na jeho schopnosti narušit membránový potenciál mitochondrií, což vede k produkci ROS, narušení syntézy ATP a k aktivaci iniciačních kaspáz. Jeho účinek je však pravděpodobně komplexnější a jsou zapojeny i další mechanismy. Z testovaných seskviterpenů má CAO nevyšší potenciál pro kombinovanou léčbu rakoviny tlustého střeva a zaslouží si další studium.

4.5. Účinek vybraných seskviterpenů v kombinaci s doxorubicinem na ovariální a lymfatické nádorové buňky s různou mírou citlivosti/ rezistence vůči doxorubicinu

Ambrož, M.; Matoušková, P.; Skarka, A.; Zajdlová, M.; Žáková, K.; Skálová, L. The effects of selected sesquiterpenes from myrica rubra essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules* **2017**, *22*

V předešlé studii jsme zjistili schopnost vybraných seskviterpenů HUM, CAO, NER a VAL ovlivňovat proliferaci buněk a zvyšovat účinek DOX v buněčné linii CaCo-2. Rovněž jsme zjistili, že tyto seskviterpeny zvyšují intracelulární hladiny DOX v nádorových buňkách. V této studii jsme se zabývali účinkem seskviterpenů na antiproliferační účinnost DOX v nádorových buňkách s různou mírou citlivosti, resp. rezistence vůči DOX. Rovněž jsme testovali potenciální inhibiční vliv seskviterpenů na efluxní lékový přenašeč ABCB1. Jako modelové systémy byly vybrány ovariální linie A2780 a SK-OV-3, kdy linie A2780 je citlivá k DOX, zatímco SK-OV-3 je částečně rezistentní. Dále byly použity linie lymfoblastové leukémie CCRF/CEM a od ní odvozená rezistentní linie CEM/ADR s indukovaným ABCB1 přenašečem, jenž působí eflux DOX.

Účinek samotných seskviterpenů se lišil dle buněčné linie, přičemž pouze VAL působil antiproliferačně na všechny linie. V kombinačních studiích byl silný synergismus zaznamenán mezi DOX a NER v linii A2780, DOX působil synergicky s HUM a CAO na linii SK-OV-3. Synergický účinek v lymfoblastové linii CCRF/CEM byl v kombinaci DOX s CAO a NER. V rezistentní linii CEM/ADR byl samotný DOX zcela bez účinku. Bohužel, ani kombinace DOX se seskviterpeny neměla v této linii významnější antiproliferační účinek, ačkoli seskviterpeny byly schopny zvyšovat intracelulární koncentraci DOX až 10x oproti kontrole a inhibovat eflux rhodaminu 123, substrátu přenašeče ABCB1.

Tyto výsledky ukazují schopnost seskviterpenů inhibovat lékový přenašeč ABCB1. Seskviterpeny HUM a CAO byly schopny zvýšit účinnost DOX i v částečně rezistentní linii SK-OV-3, ale nebyly účinné ve zcela rezistentní linii CEM/ADR.

4.6. Účinky vybraných seskviterpenů v kombinaci s doxorubicinem v prsních nádorových buňkách a v myších s implantovaným prsním tumorem

Hanušová, V.; Caltová, K.; Svobodová, H.; Ambrož, M.; Skarka, A.; Murinová, N.; Králová, V.; Tomšík, P.; Skálová, L. The effects of beta-caryophyllene oxide and transnerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother.* **2017**, *95*, 828-836

Schopnost CAO a NER potencovat účinek DOX byla dále testována *in vitro* na prsních nádorových liniích MDA-MB231 a MCF-7 a *in vivo* na myších s Ehrlichovým tumorem. V linii MDA-MB-231 působila kombinace DOX a CAO výraznější inhibici proliferace než DOX samotný. Pomocí softwaru CalcuSyn byl zjištěn silný synergismus CAO a DOX v této linii. NER zvyšoval akumulaci DOX v buněčných liniích a spolu s DOX byl schopen potlačit migrační schopnost buněk. Podání kombinace seskviterpenů a DOX vedlo k výrazným změnám v buněčné struktuře a v expresi adhezivních molekul.

Ve studii *in vivo* kombinace DOX s CAO, vyvolávaly změny v expresi proteinů BCL-2, které se podílí na regulaci apoptózy. Způsobily také zvýšení množství aktivní kaspázy 3. Bohužel, současné podání CAO ani NER nevedlo ke zvýšení akumulace DOX v buňkách tumoru a nemělo vliv na růst tumoru.

4.7. Modulační účinky vybraných seskviterpenů *in vitro* i *in vivo* na enzymy metabolizující xenobiotika

Špičáková, A.; Szotáková, B.; Dimunová, D.; Myslivečková, Z.; Kubíček, V.; Ambrož, M.; Lněničková, K.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome p450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules* **2017**, *22*

Nguyen, L., Myslivečková, Z., Szotáková, B., Špičáková, A., Lněničková, K., Ambrož, M., Kubíček, V., Krasulová, K., Anzenbacher, P., Skálová, L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro* (odesláno do *Chem-Biol Interact*)

Lněničková, K., Svobodová, H., Skálová, L., Ambrož, M., Novák, F., Matoušková, P. The Impact of Sesquiterpenes β -caryophyllene Oxide and trans-nerolidol on Xenobiotic-metabolizing Enzymes in Mice *in vivo* (odesláno do *Xenobiotica*)

Seskviterpeny jsou široce zastoupeny v potravě, doplňcích stravy a přírodní medicíně. Jsou lipofilní, snadno pronikají přes membrány a mohou modulovat expresi a/nebo aktivitu různých enzymů včetně enzymů metabolizujících léčiva. Při jejich současném podání s jinými léčivy tím může docházet k nežádoucím interakcím.

První studie byla zaměřená na acyklické seskviterpeny *trans*-nerolidol, *cis*-nerolidol a farnesol a jejich vliv na hlavní enzymy metabolizující xenobiotika v lidských a potkaních subcelulárních frakcích. Výsledky ukazují schopnost těchto seskviterpenů inhibovat cytochromy P450 (CYP), konkrétně CYP1A, CYP2B a CYP3A, jak ve frakci potkaních, tak lidských mikrosomů. Na aktivitu enzymů redukujících karbonylové sloučeniny a konjugačních enzymů neměly látky signifikantní vliv. S inhibicí CYP souvisí možné potenciální změny v plasmatických koncentracích léčiv a s nimi související možné nežádoucí účinky.

Druhá studie testovala potenciální inhibiční účinek strukturně podobných seskviterpenů β -karyofylenu (CAR), β -karyofylenoxidu (CAO) a α -humulenu (HUM) na aktivity hlavních enzymů metabolizujících xenobiotika. Potkaní a lidské jaterní

subcelulární frakce byly inkubovány s CAR, CAO nebo HUM společně se specifickými substráty pro oxidační, redukční a konjugační enzymy a jejich koenzymy. K vyhodnocení byla použita HPLC, spektrofotometrická a spektrofluorometrická analýza. Všechny testované seskviterpeny významně inhibovaly aktivity CYP3A v potkaních stejně jako v lidských jaterních mikrosomech, přičemž CAO byl nejsilnějším inhibitorem. V kinetické studii bylo zjištěn nekompetitivní typ inhibice. Na druhé straně žádný z testovaných seskviterpenů významně neovlivňoval aktivity enzymů redukcujících karbonyl (CBR1, AKRs, NQO1) nebo konjugačních enzymů (UGTs, GSTs, SULTs, COMT). Jelikož enzymy CYP3A metabolizují mnoho léků, jejich inhibice působením CAO, CAR a HUM může ovlivnit farmakokinetiku souběžně podávaných léčiv.

V další studii *in vivo* jsme sledovali účinek p.o. podávání dvou seskviterpenů CAO a *trans*-nerolidolu (NER) na expresi a aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika v játrech a tenkém střevě myši. Enzymatická aktivita a hladiny mRNA byly hodnoceny 6 a 24 hodin po podání seskviterpenů. CAO a NER výrazně zvýšily aktivitu CYP2B, 3A, 2C v obou tkáních. Změny hladin CYP mRNA většinou odpovídaly změnám v enzymatické aktivitě. Játra myši, kterým byly podány seskviterpeny, také vykazovala zvýšenou aktivitu aldoketoreduktasy 1C a karbonylreduktasy. Naproti tomu seskviterpeny snížily aktivitu NAD(P)H-chinon oxidoreduktasy 1 v tenkém střevě. Mezi konjugačními enzymy se podáním seskviterpenů zvýšila pouze aktivita jaterní sulfotransferázy. Naše výsledky dokládají, že seskviterpeny modulují aktivity a expresi několika významných enzymů metabolizujících xenobiotika a mohly by měnit účinky a chování podávaných léků a jiných xenobiotik.

5 Závěry

1. V odborné literatuře byly vyhledány informace o seskviterpenech a jejich biologických účincích. V přehledovém článku byly popsány účinky seskviterpenů jak pro-oxidační, tak i antioxidační, mechanismy těchto účinků i jejich potenciální využití v terapii.
2. MEO má výrazné antiproliferační účinky na střevní nádorové linie, zatímco v primární kultuře potkaních hepatocytů působí netoxicky .
3. MEO byla schopna zvyšovat účinek DOX ve střevní nádorové linii. Zvýšení účinku bylo spojené se zvýšením intracelulární koncentrace DOX a zvýšenou produkcí ROS.
4. Vybrané seskviterpeny HUM, CAO, NER a VAL byly schopné zvyšovat antiproliferační účinek DOX v linii Caco-2, v kultuře hepatocytů nezvyšovaly cytotoxický účinek DOX. Některé seskviterpeny zvyšovaly koncentraci DOX v nádorových buňkách i jeho akumulaci v jádře, snižovaly mitochondriální membránový potenciál a zvyšovaly tvorbu ROS. Antiproliferační účinek FU a OxPT v nádorových buňkách byl schopen zvyšovat hlavně CAO a částečně HUM.
5. Při testech na nádorových liniích s různou citlivostí k DOX jsme zjistili schopnost seskviterpenů zvyšovat účinek DOX nejen v liniích citlivých, ale i částečně rezistentních. V linii zcela rezistentní k DOX však seskviterpeny nedokázaly zvýšit účinek DOX, přestože byly schopné inhibovat lékový přenašeč ABCB1.
6. V prsních nádorových liniích zvyšovaly CAO a NER účinek DOX. V *in vivo* studii na myších s implantovaným Ehrlichovým tumorem neměly vliv na množství DOX v nádorových buňkách ani na velikost nádoru.
7. V *in vitro* studiích všechny testované seskviterpeny inhibovaly cytochromy P450 z podrodin CYP1A, CYP2B a CYP3A, ale neměly vliv na aktivitu enzymů redukujících karbonylové sloučeniny a konjugačních enzymů. *In vivo* CAO a NER mírně zvyšovaly aktivitu CYP2B, 3A, 2C v játrech i tenkém střevu myší.

V játrech byla zvýšená aktivita aldoketoreduktasy 1C, karbonylreduktasy a sulfotransferasy. Aktivita střevní NAD(P)H-chinon oxidoreduktasy 1 byla vlivem seskviterpenů snížena.

6 Seznam použité literatury

1. P. Klener, P.K.j. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha, 2013.
2. Heinz Lüllmann, K.M., Lutz Hein. *Barevný atlas farmakologie*. Grada: Praha, 2007.
3. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883-899.
4. D. Lincová, H.F. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén: Praha, 2007.
5. Perlík, F. *Základy farmakologie*. Grada: Praha, 2011.
6. Farkona, S.; Diamandis, E.P.; Blasutig, I.M. Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC medicine* **2016**, *14*, 73.
7. Tomášek, J. *Onkologie minimum pro praxi*. Axonite CZ: Praha, 2015; p 445.
8. Padma, V.V. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine* **2015**, *5*, 19.
9. Yan, L.; Rosen, N.; Arteaga, C. Targeted cancer therapies. *Chinese journal of cancer* **2011**, *30*, 1-4.
10. Klener, P. *Protinádorová chemoterapie*. Galén: Praha, 1996.
11. Parker, W.B. Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chemical reviews* **2009**, *109*, 2880-2893.
12. Tiwari, M. Antimetabolites: Established cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics* **2012**, *8*, 510-519.
13. Oronsky, B.T.; Reid, T.; Knox, S.J.; Scicinski, J.J. The scarlet letter of alkylation: A mini review of selective alkylating agents. *Translational oncology* **2012**, *5*, 226-229.
14. Thorn, C.F.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeod, H.; Klein, T.E.; Altman, R.B. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics* **2011**, *21*, 440-446.
15. Longley, D.B.; Harkin, D.P.; Johnston, P.G. 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews. Cancer* **2003**, *3*, 330-338.
16. Alcindor, T.; Beauger, N. Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. *Current oncology* **2011**, *18*, 18-25.
17. Reynolds, C.P.; Maurer, B.J. Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models. *Methods in molecular medicine* **2005**, *110*, 173-183.
18. Vyzula, R. *Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění*. Masarykův onkologický ústav: Brno, 2011.
19. Arkenau, H.T.; Bermann, A.; Rettig, K.; Strohmeyer, G.; Porschen, R.; Arbeitsgemeinschaft Gastrointestinale, O. 5-fluorouracil plus leucovorin is an effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage iii colon cancer: Long-term follow-up results of the adjcca-01 trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2003**, *14*, 395-399.
20. Fischel, J.L.; Formento, P.; Ciccolini, J.; Rostagno, P.; Etienne, M.C.; Catalin, J.; Milano, G. Impact of the oxaliplatin-5 fluorouracil-folinic acid combination on respective intracellular determinants of drug activity. *British journal of cancer* **2002**, *86*, 1162-1168.
21. Diehl, V.; Behringer, K. Could beacopp be the new standard for the treatment of advanced hodgkin's lymphoma? *Cancer investigation* **2006**, *24*, 461-465.
22. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 621-681.
23. Chou, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer research* **2010**, *70*, 440-446.

24. Tallarida, R.J. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *319*, 1-7.
25. Munoz-Martinez, F.; Reyes, C.P.; Perez-Lomas, A.L.; Jimenez, I.A.; Gamarro, A.; Castanys, S. Insights into the molecular mechanism of action of celastraceae sesquiterpenes as specific, non-transported inhibitors of human p-glycoprotein. *Bba-Biomembranes* **2006**, *1758*, 98-110.
26. Legault, J.; Pichette, A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2007**, *59*, 1643-1647.
27. Carnesecchi, S.; Bras-Goncalves, R.; Bradaia, A.; Zeisel, M.; Gosse, F.; Poupon, M.F.; Raul, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer letters* **2004**, *215*, 53-59.
28. Kim, S.H.; Bae, H.C.; Park, E.J.; Lee, C.R.; Kim, B.J.; Lee, S.; Park, H.H.; Kim, S.J.; So, I.; Kim, T.W., *et al.* Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochemical and biophysical research communications* **2011**, *407*, 129-134.
29. Polo, M.P.; Crespo, R.; de Bravo, M.G. Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line. *Cell biochemistry and function* **2011**, *29*, 452-458.
30. Rabi, T.; Bishayee, A. D -limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *Journal of carcinogenesis* **2009**, *8*, 9.
31. Sohma, I.; Fujiwara, Y.; Sugita, Y.; Yoshioka, A.; Shirakawa, M.; Moon, J.H.; Takiguchi, S.; Miyata, H.; Yamasaki, M.; Mori, M., *et al.* Parthenolide, an nf-kappab inhibitor, suppresses tumor growth and enhances response to chemotherapy in gastric cancer. *Cancer genomics & proteomics* **2011**, *8*, 39-47.
32. de Oliveira Mauro, M.; Matuo, R.; de David, N.; Strapasson, R.L.B.; Oliveira, R.J.; Stefanello, M.E.A.; Kassuya, C.A.L.; de Cepa Matos, M.F.; Faria, F.J.C.; Costa, D.S. Actions of sesquiterpene lactones isolated from moquiniastrium polymorphum subsp. Floccosum in mcf7 cell line and their potentiating action on doxorubicin. *BMC pharmacology & toxicology* **2017**, *18*, 53.
33. Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology* **2004**, *135*, 1893-1902.
34. Cheng, A.X.; Lou, Y.G.; Mao, Y.B.; Lu, S.; Wang, L.J.; Chen, X.Y. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J Integr Plant Biol* **2007**, *49*, 179-186.
35. Dudareva, N.; Andersson, S.; Orlova, I.; Gatto, N.; Reichelt, M.; Rhodes, D.; Boland, W.; Gershenzon, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 933-938.
36. Gershenzon, J.; Dudareva, N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 408-414.
37. Vinholes, J.; Goncalves, P.; Martel, F.; Coimbra, M.A.; Rocha, S.M. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro caco-2 cell models. *Food Chem* **2014**, *156*, 204-211.
38. Dahham, S.S.; Tabana, Y.M.; Iqbal, M.A.; Ahamed, M.B.; Ezzat, M.O.; Majid, A.S.; Majid, A.M. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene beta-caryophyllene from the essential oil of aquilaria crassna. *Molecules* **2015**, *20*, 11808-11829.
39. Ben Sghaier, M.; Mousslim, M.; Pagano, A.; Ammari, Y.; Luis, J.; Kovacic, H. Beta-eudesmol, a sesquiterpene from teucrium ramosissimum, inhibits superoxide production, proliferation, adhesion and migration of human tumor cell. *Environmental toxicology and pharmacology* **2016**, *46*, 227-233.

40. Nam, N.H. Naturally occurring nf-kappa b inhibitors. *Mini-Rev Med Chem* **2006**, *6*, 945-951.
41. Xian, M.; Ito, K.; Nakazato, T.; Shimizu, T.; Chen, C.K.; Yamato, K.; Murakami, A.; Ohigashi, H.; Ikeda, Y.; Kizaki, M. Zerumbone, a bioactive sesquiterpene, induces g2/m cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells via a fas- and mitochondria-mediated pathway. *Cancer science* **2007**, *98*, 118-126.
42. Lohberger, B.; Rinner, B.; Stuendl, N.; Kaltenecker, H.; Steinecker-Frohnwieser, B.; Bernhart, E.; Bonyadi Rad, E.; Weinberg, A.M.; Leithner, A.; Bauer, R., *et al.* Sesquiterpene lactones downregulate g2/m cell cycle regulator proteins and affect the invasive potential of human soft tissue sarcoma cells. *PLoS one* **2013**, *8*, e66300.
43. Park, K.R.; Nam, D.; Yun, H.M.; Lee, S.G.; Jang, H.J.; Sethi, G.; Cho, S.K.; Ahn, K.S. Beta-caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of pi3k/akt/mtor/s6k1 pathways and ros-mediated mapks activation. *Cancer letters* **2011**, *312*, 178-188.
44. Wiseman, D.A.; Werner, S.R.; Crowell, P.L. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(cip1) and p27(kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, *320*, 1163-1170.
45. Bonifacio, M.; Rigo, A.; Bonalumi, A.; Guardalben, E.; Nichele, I.; Sissa, C.; Cavalieri, E.; Bergamini, C.; Pizzolo, G.; Suzuki, H., *et al.* The sesquiterpene oil alpha-bisabolol induces apoptosis of b-chronic lymphocytic leukemia primary cells. *Blood* **2011**, *118*, 582-583.
46. Zhang, S.Y.; Liu, Q.J.; Liu, Y.J.; Qiao, H.; Liu, Y. Zerumbone, a southeast asian ginger sesquiterpene, induced apoptosis of pancreatic carcinoma cells through p53 signaling pathway. *Evid-Based Compl Alt* **2012**.
47. O'Neill, P.M.; Barton, V.E.; Ward, S.A. The molecular mechanism of action of artemisinin-the debate continues. *Molecules* **2010**, *15*, 1705-1721.
48. Merghoub, N.; El Btaouri, H.; Benbacher, L.; Gmouh, S.; Trentesaux, C.; Brassart, B.; Attaleb, M.; Madoulet, C.; Wenner, T.; Amzazi, S., *et al.* Tomentosin induces telomere shortening and caspase-dependant apoptosis in cervical cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* **2017**, *118*, 1689-1698.
49. Hua, P.; Sun, M.; Zhang, G.; Zhang, Y.; Song, G.; Liu, Z.; Li, X.; Zhang, X.; Li, B. Costunolide induces apoptosis through generation of ros and activation of p53 in human esophageal cancer eca-109 cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **2016**, *30*, 462-469.
50. Yan, H.; Ren, M.Y.; Wang, Z.X.; Feng, S.J.; Li, S.; Cheng, Y.; Hu, C.X.; Gao, S.Q.; Zhang, G.Q. Zerumbone inhibits melanoma cell proliferation and migration by altering mitochondrial functions. *Oncol Lett* **2017**, *13*, 2397-2402.
51. Herman, A.; Herman, A.P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2015**, *67*, 473-485.
52. Pimkaew, P.; Kublbeck, J.; Petsalo, A.; Jukka, J.; Suksamrarn, A.; Juvonen, R.; Auriola, S.; Piyachaturawat, P.; Honkakoski, P. Interactions of sesquiterpenes zederone and germacrone with the human cytochrome p450 system. *Toxicol in Vitro* **2013**, *27*, 2005-2012.
53. Bamba, Y.; Yun, Y.S.; Kunugi, A.; Inoue, H. Compounds isolated from curcuma aromatica salisb. Inhibit human p450 enzymes. *Journal of natural medicines* **2011**, *65*, 583-587.
54. Ericsson, T.; Sundell, J.; Torkelsson, A.; Hoffmann, K.J.; Ashton, M. Effects of artemisinin antimalarials on cytochrome p450 enzymes in vitro using recombinant enzymes and human liver microsomes: Potential implications for combination therapies. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **2014**, *44*, 615-626.

55. http://www.szu.cz/uploads/documents/czpz/aktuality/Cesi_ziji_dele_ale_trapi_je_civilizacni_nemoci/Zprava_o_zdravi_obyvatele_CR.pdf staženo 1.10.2017

7 Přílohy

7.1. Seznam zkratk

ATP	adenosintrifosfát
CAO	karyofylen oxid
CAR	β -karyofylen
CYP	cytochrom P450
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DOX	doxorubixin
1-DXP	1-deoxyxylulosa-5-fosfát
DXR	1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátisomerázy
DXS	1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátsyntáza
FU	5-fluorouracil
G3P	glyceraldehyd-3-fosfát
HMGR	3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A- reduktáza
HMG-CoA	3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A
HUM	α -humulen
IDI	isopentenyldifosfátisomeráza
IPP	isopentenyldifosfát
MEO	silice z listů voskovníku červeného (<i>Myrica rubra</i> Sieb. Et Zucc)
MEP	2C-metylerythriol-4-fosfát
MVA	kyselina mevalonová
NER	<i>trans</i> -nerolidol
OxPt	oxaliplatina
p.o.	perorální podání
PTX	paklitaxel
PYR	pyruvát
RHO123	rhodamin 123
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNA	kyselina ribonukleová
VAL	valencen

7.2. Podíl předkladatele na publikacích zahrnutých v disertační práci

- I. Bártiková, H.; Hanušová, V.; Skálová, L.; Ambrož, M.; Boušova, I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Current topics in medicinal chemistry* **2014**, *14*, 2478-2494
-podíl na literární rešerši
- II. Langhansová, L.; Hanušová, V.; Rezek, J.; Štohanslová, B.; Ambrož, M.; Králová, V.; Vaněk, T.; Lou, J.D.; Yun, Z.L.; Yang, J., *et al.* Essential oil from *myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Ind Crop Prod* **2014**, *59*, 20-26
-kultivace a stanovení vibility linií Caco-2 a HCT-8
- III. Ambrož, M.; Hanušová, V.; Skarka, A.; Boušová, I.; Králová, V.; Langhasová, L.; Skálová, L. Essential oil from *myrica rubra* leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. *Planta medica* **2016**, *82*, 89-96
-kultivace a stanovení viability Caco-2 a potkaních hepatocytů
-stanovení produkce ROS
-příprava vzorků pro měření intracelulární koncentrace DOX
-statistická analýza dat
-podíl na sepsání publikace
- IV. Ambrož, M.; Boušová, I.; Skarka, A.; Hanušová, V.; Králová, V.; Matoušková, P.; Szotáková, B.; Skálová, L. The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules* **2015**, *20*, 15343-15358
-kultivace a stanovení viability Caco-2, potkaních hepatocytů
-stanovení produkce ROS po ovlivnění DOX a seskviterpeny
-příprava vzorků pro měření intracelulární koncentrace DOX
-statistická analýza dat

-podíl na sepsání publikace

- V. Ambrož , M.; Matoušková, P.; Skarka, A.; Zajdlová, M.; Žáková, K.; Skálová, L. The effects of selected sesquiterpenes from myrica rubra essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules*, **2017**, 22

-kultivace a stanovení viability CCRF/CEM, CEM/ADR5000

-western blot

-příprava vzorků pro měření intracelulární koncentrace DOX

-průtoková cytometrie - inhibice efluxu RHO 123

-statistická analýza dat

-podíl na sepsání publikace

- VI. Ambrož , M.; Šmatová, M.; Šadibolová, M.; Pospíšilová, E.; Hadravská, P.; Kašparová, M.; Hanušová, V.; Králová, V.; Skálová, L. Sesquiterpenes from Myrica rubra essential oil enhanced the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells (odesláno do *Int J Mol Sci*)

-podíl na kultivaci buněčných linií

-podíl na stanovení JC-1

-stanovení aktivity kaspáz

-statistická analýza dat

-podíl na sepsání publikace

- VII. Hanušová, V.; Caltová, K.; Svobodová, H.; Ambrož , M.; Skarka, A.; Murinová, N.; Králová, V.; Tomšík, P.; Skálová, L. The effects of beta-caryophyllene oxide and trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother.* **2017**, 95, 828-836

-podíl na práci *in vivo*, dávkování látek, odběr vzorků

-podíl na zpracování vzorků pro další analýzu

- VIII. Špičáková, A.; Szotáková, B.; Dimunová, D.; Myslivečková, Z.; Kubíček, V.; Ambrož , M.; Lněničková, K.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome P450 activities but did not

affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules* **2017**, 22

-podíl na přípravě jaterních mikrosomů a cytosolu

-podíl na měření některých enzymových aktivit

- IX. Nguyen, L.; Myslivečková, Z.; Szotáková, B.; Špičáková, A.; Lněničková, K.; Ambrož, M.; Kubíček, V.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro*

(v recenzním řízení v *Chem-Biol Interact*)

-podíl na přípravě jaterních mikrosomů a cytosolu

-podíl na měření některých enzymových aktivit

- X. Lněničková, K.; Svobodová, H.; Skálová, L.; Ambrož, M.; Novák, F.; Matoušková, P. The Impact of Sesquiterpenes β -caryophyllene Oxide and trans-nerolidol on Xenobiotic-metabolizing Enzymes in Mice *in vivo* (odesláno do *Xenobiotica*)

-podíl na práci *in vivo*, dávkování látek, odběr vzorků

-podíl na zpracování vzorků pro další analýzu

7.3. Seznam publikací vztahujících se k tématu disertační práce

- I. Bartíková, H.; Hanušová, V.; Skálová, L.; **Ambrož, M.**; Boušová, I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Curr Top Med Chem* **2014**, *14*, 2478-24944, IF 3,402
- II. Langhansová, L.; Hanušová, V.; Rezek, J.; Štohanslová, B.; **Ambrož, M.**; Králová, V.; Vaněk, T.; Lou, J.D.; Yun, Z.L.; Yang, J., *et al.* Essential oil from myrica rubra leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Ind Crop Prod* **2014**, *59*, 20-26, IF 2,837
- III. **Ambrož, M.**; Hanušová, V.; Skarka, A.; Boušová, I.; Králová, V.; Langhasová, L.; Skálová, L. Essential oil from myrica rubra leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. *Planta Medica* **2016**, *82*, 89-96, IF 2,342
- IV. **Ambrož, M.**; Boušová, I.; Skarka, A.; Hanušová, V.; Králová, V.; Matoušková, P.; Szotáková, B.; Skálová, L. The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules* **2015**, *20*, 15343-15358, IF 2,465
- V. **Ambrož, M.**; Matoušková, P.; Skarka, A.; Zajdlová, M.; Žáková, K.; Skálová, L. The effects of selected sesquiterpenes from *Myrica rubra* essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules*, **2017**, *22*, IF 2,861
- VI. **Ambrož, M.**; Šmatová, M.; Šadibolová, M.; Pospíšilová, E.; Hadravská, P.; Kašparová, M.; Hanušová, V.; Králová, V.; Skálová, L. Sesquiterpenes from *Myrica rubra* essential oil enhanced the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells (odesláno do *Int J Mol Sci*)

- VII. Hanušová, V.; Caltová, K.; Svobodová, H.; **Ambrož, M.**; Skarka, A.; Murinová, N.; Králová, V.; Tomšík, P.; Skálová, L. The effects of beta-caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother.* **2017**, *95*, 828-836, IF 2,759
- VIII. Špičáková, A.; Szotáková, B.; Dimunová, D.; Myslivečková, Z.; Kubíček, V.; **Ambrož, M.**; Lněničková, K.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome p450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules* **2017**, *22*, IF 2,861
- IX. Nguyen, L.; Myslivečková, Z.; Szotáková, B.; Špičáková, A.; Lněničková, K.; **Ambrož, M.**; Kubíček, V.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro* (odesláno do *Chem-Biol Interact*)
- X. Lněničková, K.; Svobodová, H.; Skálová, L.; **Ambrož, M.**; Novák, F.; Matoušková, P. The Impact of Sesquiterpenes β -caryophyllene Oxide and *trans*-nerolidol on Xenobiotic-metabolizing Enzymes in Mice *in vivo* (odesláno do *Xenobiotica*)

7.4. Seznam všech publikací

Bartíková, H.; Hanušová, V.; Skálová, L.; **Ambrož, M.**; Boušová, I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Curr Top Med Chem* **2014**, *14*, 2478-24944, IF 3,402

Langhansová, L.; Hanušová, V.; Rezek, J.; Štohanslová, B.; **Ambrož, M.**; Králová, V.; Vaněk, T.; Lou, J.D.; Yun, Z.L.; Yang, J., *et al.* Essential oil from myrica rubra leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. *Ind Crop Prod* **2014**, *59*, 20-26, IF 2,837

Ambrož, M.; Hanušová, V.; Skarka, A.; Boušová, I.; Králová, V.; Langhasová, L.; Skálová, L. Essential oil from myrica rubra leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. *Planta Medica* **2016**, *82*, 89-96, IF 2,342

Ambrož, M.; Boušová, I.; Skarka, A.; Hanušová, V.; Králová, V.; Matoušková, P.; Szoťáková, B.; Skálová, L. The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules* **2015**, *20*, 15343-15358, IF 2,465

Ambrož, M.; Matoušková, P.; Skarka, A.; Zajdlová, M.; Žáková, K.; Skálová, L. The effects of selected sesquiterpenes from myrica rubra essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules*, **2017**, *22*, IF 2,861

Ambrož, M.; Šmatová, M.; Šadibolová, M.; Pospíšilová, E.; Hadravská, P.; Kašparová, M.; Hanušová, V.; Králová, V.; Skálová, L. Sesquiterpenes from Myrica rubra essential oil enhanced the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells (odesláno do *Int J Mol Sci*)

Hanušová, V.; Caltová, K.; Svobodová, H.; **Ambrož, M.**; Skarka, A.; Murinová, N.; Králová, V.; Tomšík, P.; Skálová, L. The effects of beta-caryophyllene oxide and trans-

nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother.* **2017**, 95, 828-836, IF 2,759

Špičáková, A.; Szotáková, B.; Dimunová, D.; Myslivečková, Z.; Kubíček, V.; **Ambrož, M.**; Lněničková, K.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome p450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules* **2017**, 22, IF 2,861

Nguyen, L.; Myslivečková, Z.; Szotáková, B.; Špičáková, A.; Lněničková, K.; **Ambrož, M.**; Kubíček, V.; Krasulová, K.; Anzenbacher, P.; Skálová, L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro* (odesláno do *Chem-Biol Interact*)

Lněničková, K.; Svobodová, H.; Skálová, L.; **Ambrož, M.**; Novák, F.; Matoušková, P. The Impact of Sesquiterpenes β -caryophyllene Oxide and trans-nerolidol on Xenobiotic-metabolizing Enzymes in Mice *in vivo* (odesláno do *Xenobiotica*)

Zárybnický, T.; Boušová, I.; **Ambrož, M.**; Skálová, L. Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Arch Toxicol* **2017**, IF 5,901

7.5. Seznam prezentací na vědeckých setkáních

Ambrož, M.; Hanušová, V.; Skálová, L. Effect of essential oil from *Myrica rubra* and selected sesquiterpenes on anti-cancer efficacy and toxicity of doxorubicin *in vitro*, 22th Conference on Isoprenoids, Praha, **2014**

Ambrož, M.; Zajdlová, M.; Skarka, A.; Skálová, L. Effect of selected sesquiterpenes from *Myrica rubra* essential oil on accumulation and efficiency of doxorubicin in ovarian cancer cell lines., Bioactive Natural Products: translating promise into practice, Oxford, UK, **2016**

Ambrož, M.; Zajdlová, M.; Skarka, A.; Skálová, L. Vybrané seskviterpeny silice voskovníku červeného (*Myrica rubra*) a jejich vliv na akumulaci a účinek doxorubicinu v ovariálních nádorových liniích., XXV. Biochemický sjezd, Praha, **2016**

Ambrož, M.; Skálová, L. Effect of Selected Sesquiterpenes to Doxorubicin Efficacy in Sensitive and Resistant Cancer Cell Line, XXIX. Xenobiochemické symposium, Telč, **2017**