

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Stanovení toxicity pomocí 3D sféroidů

Bakalářská práce

**Eliška Rubešová
Výživa a potraviny**

**Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.
Ing. Štěpánka Kozáková**

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Stanovení toxicity pomocí 3D sféroidů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. a také Ing. Štěpánce Kozákové za vaše rady, shovívavost, nervy z ocele a skvělý přístup, díky Vám jsem mohla tuto práci dopsat. Dále bych chtěla poděkovat své blízké rodině a příteli za podporu a pochopení nejen v období psaní.

Stanovení toxicity pomocí 3D sféroidů

Souhrn

Celosvětově se nádorová onemocnění řadí na druhé místo v příčině úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocnění. Každoročně, jen v České republice, každé páté úmrtí je na nádorové onemocnění, což je za rok 2020 přes 28 000 lidí. Jelikož je vznik nádorových onemocnění z 80 % ovlivněn exogenními faktory jako je kouření, požívání alkoholu, špatná strava, stres, expozice chemickým látkám či ionizujícímu záření a pouze z 20 % genetickými a mutačními procesy, z tohoto důvodu je snaha hledat účinné látky, které budou vykazovat potenciál v účinnosti na nádorové buněčné linie. Většina testů je uskutečněna pomocí klasických 2D *in vitro* testů využívající reakci živých buněčných mitochondrií s tetrazilovými solemi a vytvoření formazánu. Nicméně takové výsledky nemusejí být zcela přesné, jelikož v 2D modelech nedochází k interakci mezi buňkami jako je tomu u živé tkáně. Z tohoto důvodu jsou využívány 3D metody, mezi které patří i sféroidy – kulovité buněčné útvary, které se podobají více živé tkáni.

Cílem naší práce bylo otestovat šest alkaloidů: 9-O-demetylgalantin, haemantamin, hippeastrin, masonin, norplavin a odulin získaných z čeledi *Amaryllidaceae* na buňky kolorektálního karcinomu buněčné linie HT29. Z této buněčné linie byly vytvořeny sféroidy a třetí den od založení byly pořízeny snímky a následně každý druhý den po dobu 10 dní se focení opakovalo. Současně s focením docházelo k výměně média s testovaným vzorkem o koncentracích 5; 2,5; 1,25; 0,625 μM . Následně byly pořízené snímky vyhodnoceny pomocí programu ImagiJ a data vyhodnocena v programu Grahpad Prism 9.

Z dosažených výsledků je patrné, že u námi testovaných alkaloidů nevykazovaly významnou schopost inhibovat růst sféroidů v nižších koncentracích. Pro významnou schopnost by muselo dojít k zastavení nebo zpomalení růstu již při koncentraci 0,625 μM . Růst sféroidů ošetřených alkaloidy byl obdobný jako u kontroly, která nebyla ničím ošetřena.

Klíčová slova: *Amaryllidaceae*, buněčné linie; toxicita; HT29; alkaloidy

Determination of toxicity using 3D spheroids

Summary

Worldwide, cancer ranks second only behind to cardiovascular disease as the leading cause of death. Every year, in the Czech Republic alone, one in five deaths is due to cancer, which is over 28,000 people in 2020. Since the development of cancer is 80% influenced by exogenous factors such as smoking, alcohol consumption, poor diet, stress, exposure to chemicals or ionizing radiation and only 20% by genetic and mutational processes, for this reason, there is a search for effective agents that will show potential in acting on cancer cell lines. Most of the tests are performed using classical 2D *in vitro* assays utilizing the reaction of live cell mitochondria with tetrazil salts to form formazan. However, such results may not be completely accurate as there is no interaction between cells in 2D models as there is in living tissue. For this reason, 3D methods are used, which include spheroids - spherical cell formations that more closely resemble living tissue.

The aim of our work was to test six alkaloids: 9-O-demethylgalanthine, haemanthamine, hippeastrine, masonine, norpluvine, and oduline derived from the *Amaryllidaceae* family on colorectal cancer cells of the HT29 cell line. Spheroids were formed from this cell line and images were taken on the third day after establishment, followed by repeat imaging every other day for 10 days. Simultaneously with the photography, the medium was exchanged with the test sample at concentrations of 5; 2.5; 1.25; 0.625 μM . Subsequently, the acquired images were evaluated using the ImagiJ program and the data were analyzed using the Grahpad Prism 9 program.

From the results obtained, it is evident that the alkaloids we tested did not show significant ability to inhibit spheroid growth at lower concentrations. For a significant ability to be detected, growth would have to be stopped or retarded already at a concentration of 0.625 μM . Growth of spheroids treated with alkaloids was similar to the control, which was not treated with anything.

Keywords: *Amaryllidaceae*; cell lines; toxicity; HT29; alkaloids

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Vědecká hypotéza a cíl práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Nádorová onemocnění	9
3.2	Karcinogeneze	9
3.3	Nádorové markery	11
3.3.1	Kolorektální karcinom	12
3.3.2	Faktory ovlivňující nádorová onemocnění	13
3.3.3	Léčba nádorových onemocnění	17
3.4	Alkaloidy	18
3.4.1	Biologická aktivita alkaloidů <i>Amaryllidaceae</i>	18
3.4.2	Využití alkaloidů	20
3.4.3	Izolace alkaloidů	21
3.5	Sféroidy jako <i>in vitro</i> modely	21
4	Metodika	24
4.1	Materiál	24
4.2	Kultivace buněčných linií	24
4.3	Příprava sféroidů	24
4.4	Statistické vyhodnocení	25
5	Výsledky	26
5.1	Účinek alkaloidů z čeledi <i>Amaryllidaceae</i> na sféroidy	26
6	Diskuze	32
7	Závěr	33
8	Literatura.....	34

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocnění (Siegel et al. 2020). V České republice v roce 2020 zemřelo na nádorová onemocnění 28 000 lidí, z toho přes 3 400 lidí představuje úmrtí na kolorektální karcinom (ÚZIS ČR 2020). Příčina vzniku nádorového onemocnění je až z 80 % ovlivněna exogenními faktory jako jsou expozice chemických látek, virů, prostředí, ve kterém se pohybujeme, špatným stravováním, požíváním alkoholu, kouřením a dalších (Lewandowska et al. 2019; Thanikachalam & Khan 2019).

Při léčbě nádorového onemocnění se většinou využívá kombinace chemoterapie, radioterapie, biologické léčby a chirurgické léčby (Biller & Schrag 2021). Avšak z důvodu nežádoucích vedlejších účinků těchto terapií je stále úsilí vyhledávat nové účinné protinádorové látky, které by mohly dosáhnout stejného protinádorového účinku. Zdrojem těchto potencionálních aktivních látek je čeleď *Amaryllidaceae*, která řadou farmakologicky aktivních látek vykazuje protinádorovou, protizánětlivou, antibakteriální, antifungální, antimalarickou, antivirovou, antidepresivní, antinociceptivní a cholinesterázově inhibiční aktivitu (Kukula-Koch & Widelski 2017; Berkov et al. 2020).

K testování se dříve používali k pozorování růstu a diferenciaci buněk mimo tělo dvojrozměrné (2D) modely buněčných linií, tvořící adherentní monovrstvu. S postupem času po odhalení nedostatků se díky svému uspořádání začali využívat trojrozměrné (3D) modely – organoidy či sféroidy, které umějí dobře imitovat 3D strukturu zhoubné tkáně a též mikroprostředí nádoru. Tímto způsobem je možno zvýšit míru úspěšnosti nových léčiv proti NO (Sant & Johnston 2017).

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Hypotéza: V současné době slouží 3D buněčné modely k přesnějšímu stanovení účinků látek podobných in vivo podmínkám. S úpravou kultivačních podmínek pro založení 3D sféroidů je možné využívat rozdílné buněčné linie pro studium aktivity přírodních látek.

Cílem práce je využít nádorové a zdravé buňky střevního epitelu pro vytvoření 3D sféroidů. A to i u buněčných linií, u kterých publikace doposud uvádějí, že netvoří 3D sféroidy.

Pomocí nádorových a zdravých buněčných linií střevního epitelu budou vytvořeny 3D sféroidy za standardních podmínek. Takto získané sféroidy budou následně analyzovány 10 dní s focením každý druhý den. V závěru budou snímky vyhodnoceny a bude zjištěna schopnost látek prostupovat přes vícero buněčných vrstev.

3 Literární řešerše

3.1 Nádorová onemocnění

První zmínky o nádorových onemocněních (NO) se datují již v období 1500 let př. n. l. z doby Starověkého Egypta, kde jako první zaznamenali NO prsu bez možnosti jeho léčby (di Lonardo et al. 2015). Nádor prsu patří v současnosti mezi nejčastěji diagnostikované NO především u žen ve Spojených státech amerických (Ward et al. 2015; Azamjah et al. 2019) a celosvětově se NO řadí mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocněních (Siegel et al. 2020).

V roce 2020 byla diagnóza a léčba NO ztížena pandemií koronavirového onemocnění 2019 (SARS-CoV-2). Z celkového počtu 1,8 milionů jedinců bylo identifikováno 23 tisíc pacientů s NO, kteří měli až o 60 % vyšší pravděpodobnost pozitivního testu na SARS-CoV-2. Tato pravděpodobnost zvýšeného rizika hrozí také u starších pacientů, pacientů s nadváhou či obezitou a mužského pohlaví (Lee et al. 2021). Například studie od Mehta et al. (2020) probíhající od března do dubna roku 2020 zaznamenala až 28% úmrtnost pacientů s NO, kteří podlehlí onemocnění SARS-CoV-2 a bez NO to bylo o polovinu méně. Velice obdobný výsledek se objevil v čínském Wu-chanu od Meng et al. (2020), kde téměř 30 % pacientů z 2665 zemřelo v důsledku SARS-CoV-2 a 10 % pacientů bez SARS-CoV-2 s NO. V České republice dle dat Českého statistického úřadu za rok 2020 zemřelo 129 289 lidí, přičemž 8 % z nich zemřelo na onemocnění SARS-CoV-2. To dělá z SARS-CoV-2 drohou nejčastější příčinu úmrtí v ČR (ČSÚ 2021).

V České republice postihuje NO každého třetího člověka a každý pátý na NO umírá (Krejčí et al. 2018). Za rok 2020 na NO zemřelo celkem 28 000 lidí, z toho 12,1 % představuje úmrtí na kolorektální karcinom (KK; Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2020). Významnou roli ve výskytu NO a úmrtnosti hraje pohlaví, kde u mužů je výskyt o 20 % vyšší než u žen a úmrtnost dokonce až o 40 % (Bray et al. 2018). Příčina vzniku NO, je ovlivněna endogenními faktory, kam se řadí například genetické predispozice a také exogenními faktory, jako je vliv životního prostředí, ionizující záření, strava (Thanikachalam & Khan 2019), přítomnost odpadních látek, expozice chemických látek, viry, požívání alkoholu a kouření (Lewandowska et al. 2019). Až z 80 % mohou za vznik nádoru exogenní faktory. Zbývajících 20 % je přičítáno genetickým a mutačním predispozicím (Hofmanová 2013). Tyto faktory přispívají k transformaci normálních buněk, které se vyvíjí a stanou se z nich buňky nádorové, celý tento proces změn se označuje jako karcinogeneze (Moindjie et al. 2021).

3.2 Karcinogeneze

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, karcinogeneze (též ontogeneze, tumorigeneze, kancerogeneze) je vícestupňový proces, který zahrnuje buněčnou transformaci normálních buněk a buněčnou proliferaci (Klaunig & Wang, 2018; Moindjie et al. 2021). Během karcinogeneze se postupně hromadí poruchy základních regulačních mechanismů somatických buněk (proliferace, diferenciace a apoptóza) (Hofmanová 2013), které způsobují genetickou modifikaci genomové DNA (vznik mutované buňky) s následným selektivním růstem. Celý tento proces (Obrázek 1) se obecně dělí na tři stádia, a to iniciace, promoce a progese (DiGiovanni 1992; Klaunig & Wang 2018).

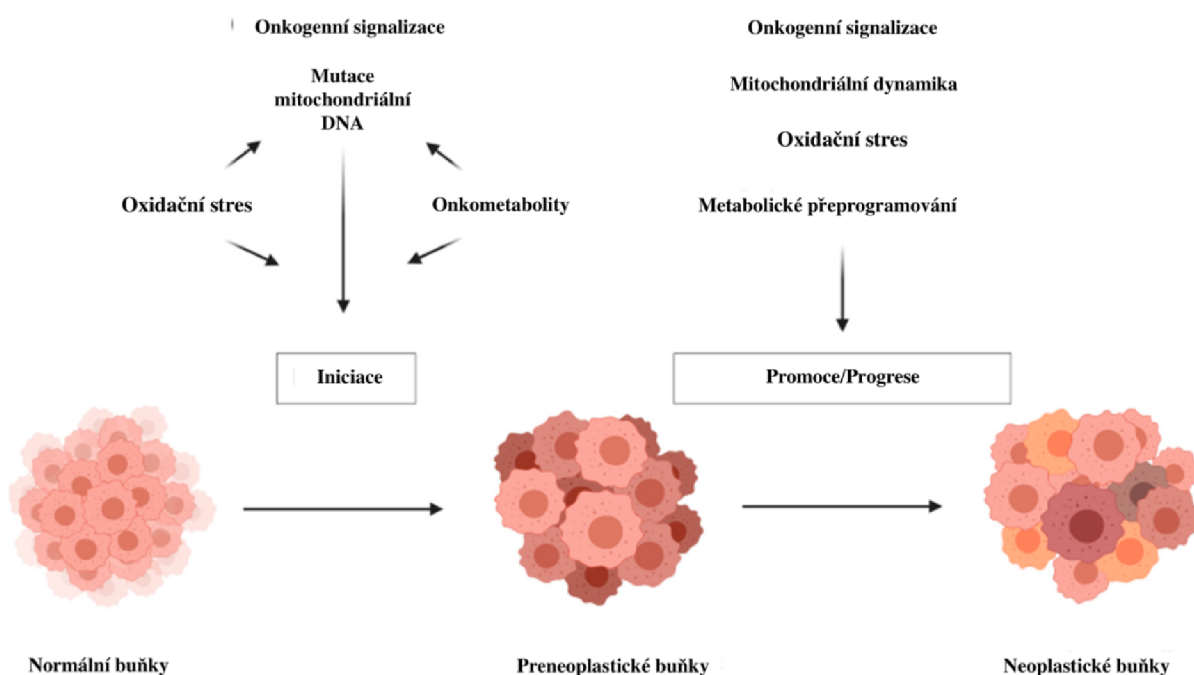
Iniciační fáze může začínat mutací v jediné buňce pohou změnou jednoho nukleotidu, delece či duplikace sekvence DNA. Změna v genetické sekvenci pak může vést k produkci mutantního proteinu, kde ve vzácných případech stačí pouze jedna mutace, aby vznikla nádorová buňka. Ovšem čím je člověk starší, dochází ke kumulaci těchto mutací více a více, což vysvětluje, proč případy NO stoupají se zvyšujícím věkem (Deman & van Larebeke 2001).

Vývoj karcinogeneze podporují rovněž volné radikály, kterými jsou atomy, molekuly nebo ionty, které mají ve svém elektronovém obalu alespoň jeden nepárový elektron. Mezi nejznámější volné radikály patří reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species ROS) a dusíku (reactive nitrogen species RNS) (Mandal 2017). ROS a RNS vznikají jako vedlejší produkty aerobního metabolismu. Jedná se o skupinu vysoce reaktivních chemických iontů a molekul (Schieber & Chandel 2014), jako je superoxid, hydroxyl, peroxy a neradikálové reaktivní formy v podobě - kyselina chlorná, singletového kyslíku či peroxidu vodíku (Lin et al. 2018). V důsledku nadprodukce ROS a RNS dochází v buňkách k oxidačnímu stresu, který je zodpovědný za celou řadu zánětlivých a degenerativních onemocnění, čímž může postupem času dojít až ke vzniku NO. Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidační kapacitou buňky, jež ji chrání před zmíněnými ROS a RNS. Při zahájení karcinogeneze mitochondriální ROS napomáhají transformaci normálních buňek na preneoplastické především prostřednictvím onkogenních mutací mitochondriální a jaderné DNA, která pak mění dýchání buněk, podporuje akumulaci onkometabolitů a aktivuje signální dráhy (Moindjie et al. 2021). Během mutace mitochondriální či jaderné DNA dochází k celé řadě mitochondriálních dysfunkcí, které většinou probíhají ve fázi progresu. Nicméně pozdější stádium progresu je spojeno s mitochondriálním metabolickým přeprogramováním stimulovanými několika faktory (Nadege 2009). Zprvu se jedná o mitochondriální dynamiku ve spojitosti korelace věku a zrychlenou produkci volných radikálů (Leufkens et al. 2012). Dále se předpokládá, že vlivem akumulace oxidačního poškození makromolekul hraje klíčovou roli v procesu stárnutí. Proto je významná oxidační rovnováha, která je udržována endogenními enzymatickými mechanismy, ale i endogenními faktory. V neposlední řadě mitochondriální metabolické přeprogramování je stimulováno onkogeny. Ty společně s protoonkogeny tvoří významnou úlohu při tvorbě nádoru. Představují sice drobnou, ale přesto velmi podstatnou část celé genetické výbavy (Stewart & Wild 2014; Mandal 2017).

V normální buňce existují protoonkogeny, které mohou fungovat jako růstové faktory, přenašeči buněčných signálů a jaderné transkripční faktory. Protoonkogeny řídí normální buněčnou diferenciaci a proliferaci. Změnou těchto genů se mohou projevit v nádorových buňkách jako onkogeny. Doposud bylo rozpoznáno 50 – 60 onkogenů. Vzniklé onkogeny pak řídí množení buněk a přebírají klíčovou roli v patogenezi nádorů (Kontomanolis et al. 2020). Mezi zástupce onkogenů patří například MYC a RAS (Bashyam et al. 2019).

Mutace ovlivňující strukturu, zahrnují bodové mutace protoonkogenů RAS a chromozomální translokace, které produkují hybridní geny. Ke zvýšené expresi dochází v lidských nádorech prostřednictvím amplifikace genů nebo translokace chromozomů. Jestliže protoonkogeny začnou mutovat, stávají se karcinogenními onkogeny, které povedou k nadměrné proliferaci (Brown 2021). Změněné formy jiných tříd genů se pak mohou také účastnit na vzniku malignity tím, že umožní proliferující buňce být invazivní a dostat se do jiných částí těla (Hofmanová 2013).

Velkou pomoc při detekování NO jsou tzv. nádorové markery, díky kterým může být zachycen relaps onemocnění, stanovena diagnóza a v neposlední řadě souží při monitorování v průběhu terapie (Nagpal et al. 2016).



Obrázek 1: Mutace mitochondriálních genů (Moindjie et al. 2021).

3.3 Nádorové markery

Nádorové markery se definují jako substance stanovitelné přímo v nádorové tkáni nebo v tělních tekutinách (moč, krev, sliny), od kterých se odvíjí nebo projevuje nádorové bujení. Dále markery mohou být produkovány přímo buňkami nádoru nebo jinými tkáněmi v reakci na přítomnost nádorových buněk (Nagpal et al. 2016).

Nádorové markery se dělí podle místa produkce, specifčnosti, chemické struktury a biologického charakteru. Téměř jakýkoli typ molekuly může fungovat jako nádorový marker, kde většinou se jedná o proteiny nebo glykoproteiny (Tie et al. 2015). Například látky s nízkou molekulovou hmotností, jako je vanilmandlová kyselina, enzymy (laktátdehydrogenáza, neuron specifická enoláza, prostatický specifický antigen), imunoglobuliny, hormony (hCG, gastrin, prolaktin, kalcitonin) a nukleové kyseliny (RNA a DNA) jsou v současné době brány jako možné markery (Lau & Lai 2008).

A i přes široké spektrum NO dosud neexistuje univerzální nádorový marker, který je dostatečně specifikovaný a zajistí 100% identifikaci NO. Mimo jiné i nízká koncentrace nádorového markeru neznamená nepřítomnost maligního nádoru a naopak z pozitivních výsledků nemusí nutně vyplývat zhoubný nádor (Lech et al. 2016). Proto je snahou nalézt specifické a detekovatelné markery v co nejčasnějším stádiu maligní transformace, které by korelovaly s růstem nádoru, stádiem, prognózou a účinností terapie (Klener & Klener 2013).

Detekovatelné prahy nádorový markerů umožňují v příznivých případech odhalit nádor už o velikosti 10^6 maligních buněk, zatímco klinická diagnóza bývá určena u nádoru, který obsahuje 10^9 maligních buněk (Valík et al. 2014).

Například u KK se karcinoembryonální antigeny CEA a Ca 19-9 používají jako markery indikující úspěšnost léčby a optimálně je doporučena jejich kombinace (Zavoral 2019). Karcinoembryonální antigen CEA je glykoprotein a jeho normální hodnoty by se měly pohybovat v rozmezí 0 – 3 µg/l, hraniční hodnoty jsou stanoveny v rozmezí 3 – 5 µg/l a patologická hodnota je definována nad 5 µg/l u maligního onemocnění tlustého střeva a konečníku. Falešné pozitivní výsledky se mohou vyskytnout u kuřáků, Crohnovy choroby či jaterní cirhózy (Karlíková et al. 2020). Jejich pokles ukazuje na úspěšnost protinádorové léčby, a naopak jejich vzestup může být prvním znamením relapsu (návratu nemoci). Ovšem zvýšené hodnoty nádorových markerů mohou doprovázet i řada jiných onemocnění, například zánět slinivky břišní (Holubec 2004). Na druhou stranu ani normální hodnota nevyklučuje NO, v některých případech totiž nádor nemusí tyto markery produkovat. Je důležité si uvědomit, že jejich přínos nespočívá ani tak v diagnostice onemocnění, ale spíše ve sledování účinků terapie a prognózy (Valík et al. 2014).

Nicméně v posledních letech se poměrně využívají také screeningové metody s použitím střevního mikrobiomu podle studie Wirbel et al. (2019). Některé střevní bakterie totiž přeměňují žlučové kyseliny, které jsou součástí našich trávicích šťáv, na metabolity, které mohou být karcinogenní. To dělá z výzkumu pro diagnostiku založenou na mikrobiomu prozatím nejslibnější způsob, jak provádět neinvazivní screening pro odhalení KK (Saus et al. 2019; Thomas et al. 2019).

3.3.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom je maligní NO (Fleming et al. 2012; Saus et al. 2019; Zavoral et al. 2013), které neustále roste. Každý rok se diagnostikuje kolem 1,4 milionů nových případů a pravděpodobně bude toto číslo stoupat dál. Každý rok také umírá přes více jak 500 tisíc lidí (Alsheredah & Akhtar 2018; Arnold et al. 2017; Siegel et al. 2020). S takto velkým výskytem a úmrtností je v současné době snaha o včasné zachycení, zejména u obyvatel ve věku nad 50 let pomocí screeningu, jak bylo zmíněno v předchozí kapitole. Existují dva systémy klasifikace KK. První byl vyvinut v 50. letech 20. století Pierrem Denoixem (Goiffon et al. 2021), který KK kategorizuje podle anglické zkratky TNM neboli T jako „tumor“, N jako „lymph node“ a M představuje „metastasis“. Toto označení pomáhá lékařům rozhodnout v jakém stádiu se pacient nachází, jak daleko se nádor rozšířil a případně jakou léčbu daný pacient potřebuje. Písmeno T popisuje velikost nádoru (T0 – T4). T0, někdy také Tis, značí karcinom *in situ* – nádor v nejranějším stádiu a pouze ve sliznici. T1 představuje, že nádor je pouze ve vnitřní vrstvě střeva (Li 2014). T2 znamená, že nádor prorostl do svalové vrstvy střevní stěny. T3 popisuje, že nádor prorostl do vnější výstelky střevní stěny, ale neprorostl skrz ni (Goiffon et al. 2021). T4 se rozděluje do dvou stupňů: T4a, kdy nádor prorostl vnější stélkou střevní stěny a rozšířil se do vrstev tkání (pobřišnice) pokrývající orgány v břiše. Při T4b nádor prorostl stěnou střeva do blízkých orgánů (Lea et al. 2014). Písmeno N popisuje postižení regionálních lymfatických uzlin a značí se od N0 až N2. N0 popisuje, že lymfatické uzliny neobsahují žádné nádorové buňky. N1 má tři stupně (N1a, N1b a N1c), přičemž ve všech stupních se nacházejí nádorové buňky. N2 se dělí na dva stupně (N2a a N2b), kde jsou specifikovány počty lymfatických uzlin a nádorových buněk (Jin & Frankel 2018).

Písmeno **M** označuje metastáze (M0 – M1) rozšiřující se do dalších částí těla. M0 značí, že se nádor nerozšiřuje do částí těla jako jsou plíce nebo játra. Naopak M1, které se rozděluje na tři stupně (M1a, M1b a M1c) představuje, že nádor metastázuje do dalších částí těla (Lea et al. 2014).

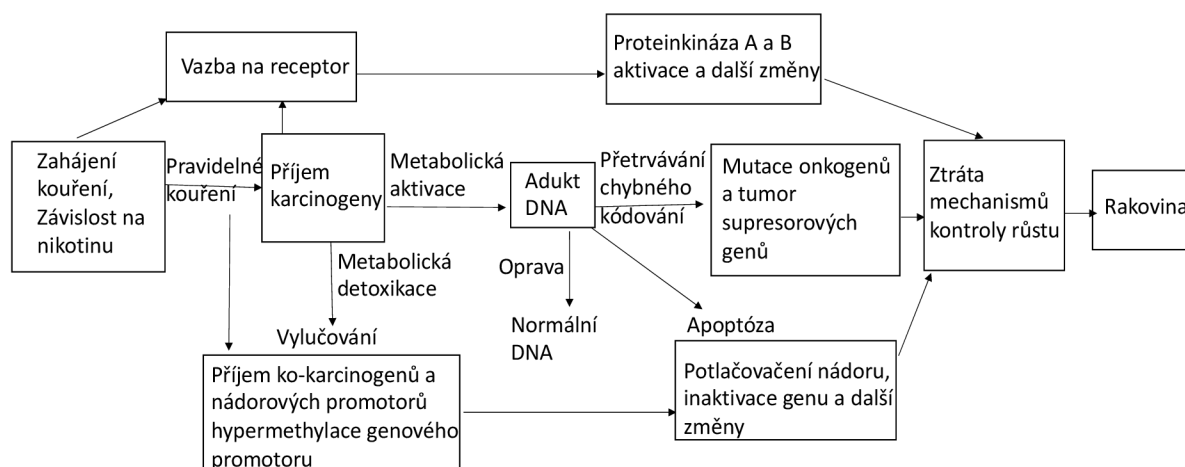
Druhý systém klasifikace se hodnotí dle Dukesovy stupnice písmeny A-D. Pokud se nádor nachází na vnitřní výstelce střeva nebo mírně roste do svalové vrstvy vyznačuje se písmenem A. Písmeno B znamená, že nádor již prorostl svalovou vrstvou střeva. Rozšíření nádoru alespoň do jedné lymfatické uzliny představuje písmeno C a D, že se nádor rozšířil do dalších částí těla a jedná se o pokročilé stádium (Akkoca et al. 2014).

Zvýšená rizika rozvoje KK hrozí u pacientů s dědičnými poruchami (Plawski et al. 2013; Stojcev et al. 2013; Brenner et al. 2014), jak již bylo zmíněno v kapitole nádorová onemocnění, z 80 % má na NO vliv faktory životního prostředí, strava, požívání alkoholu či kouření (Arnold et al. 2017).

3.3.2 Faktory ovlivňující nádorová onemocnění

V následujících kapitolách budou popsány různé faktory, které pozitivně či negativně ovlivňují NO, přičemž bude kladen důraz na vliv u KK.

Ze studie (Gram et al. 2020) vyplývá, že **kouření** cigaret je spojeno se zvýšeným rizikem nádorů. Tato souvislost byla pozorována jak u mužů, tak u žen. Zvyšující se riziko souvisí především s délkou kouření, věkem a množstvím vykouřených cigaret (Gram et al. 2020; Tsoi et al. 2009). Obrázek 2 detailně popisuje příčinu vzniku NO v důsledku kouření.



Obrázek 2: Schéma příčin vzniku NO v důsledku tabákového kouře. Upraveno podle (Stewart & Wild 2014).

Byla zaznamenána silnější asociace s relativním rizikem přibližně 2 % u jedinců, kteří uvedli délku kouření 45 a více let (Gram et al. 2020). Studie (Lakkis et al. 2021), která pozorovala statisticky významnou souvislost mezi kouřením cigaret a výskytem nádoru tlustého střeva, potvrdila, že dávka či množství obvykle vykouřených cigaret za den je jeden z nejdůležitějších ukazatelů rizika (Botteri et al. 2020). Riziko nádoru klesá po úspěšném ukončení kouření, ale u dlouhodobějších kuřáků tato rizika zcela neklesnou na stejnou úroveň jako u těch, kteří nikdy nekouřili (Slattery et al. 2000; Carter et al. 2015; Siegel et al. 2020).

Dalším rizikovým faktorem pro vznik nebo rozvoj NO je konzumace **alkoholu**. Toto riziko bylo známo již na počátku 20. století, kdy bylo zjištěno, že přibližně 8 z 10 pacientů s nádorem jícnu nebo oblasti žaludku byli konzumenti alkoholu. Toto pozorování bylo

předlohou ve studii McNabb et al. (2020) u níž bylo zjištěno, že je větší pravděpodobnost konzumace alkoholu u osob zapojené do výroby a distribuce alkoholických nápojů a měli vyšší riziko nádoru hlavy a krku ve srovnání s lidmi, kteří se z náboženských důvodů zdrželi pití, a že tito abstinenti měli výrazně nižší riziko těchto forem NO ve srovnání s celkovou populací. Alkoholické nápoje byly prohlášeny za „karcinogenní pro člověka“ s označení 64-17-5 (skupina 1) programem Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer IARC), nejprve v roce 1988, poté znovu v roce 2007 a v roce 2010 (IARC 2015).

Požitý alkohol se nejvíce vstřebává v trávicí soustavě, konkrétně v játrech. Etanol je nejpodstatnější složkou v alkoholických nápojích a je metabolizován mikrobiální alkoholdehydrogenázou na acetaldehyd, který způsobuje poškození sliznice a regenerační buněčnou proliferaci (Seesaha et al. 2020). Acetaldehyd, jakožto první meziprodukt v metabolismu etanolu přispívá k rozvoji karcinogeneze a je označen jako rizikový faktor pro vznik KK (Winkels et al. 2013). Jeho přímá vazba na molekulu DNA působí negativně a může nastat vznik genových či chromozomových mutací (Brooks & Zakhari 2014). V metaanalýze od Keum & Giovannucci (2019) shrnujících 14 kohortových studií ze Severní Ameriky, Evropy a Asie, bylo dokázáno, že dokonce i lehké pití (≤ 1 alkoholický nápoj denně) významně zvyšuje riziko KK ve srovnání s žádným nebo příležitostným pitím alkoholu.

Konzumaci alkoholu nehrozí pouze možnost výskytu KK, ale i dalších NO, a to dutiny ústní, hltanu, jícnu, jater a prsu. Dle studie Rungay et al. (2021) bylo v roce 2020 celosvětově zaznamenáno 741 300 nových případů NO, které lze přičíst nadměrné konzumaci alkoholu a také celosvětově vyplývá, že 4 % úmrtí na NO lze připsat alkoholu (Stewart & Wild 2014).

Naopak při konzumaci jednoho až dvou šálků **kávy** denně dochází ke snížení rozvoje NO. Ve velké populační studii od Poole et al. (2017) se uvádí, že i kategorie nejvyšší spotřeby kávy (více jak 2,5 šálků kávy denně) představuje 54% snížení pravděpodobnosti vzniku NO. Konzumaci kávy tedy lze označit jako ochranný faktor nejen pro vznik KK a jako prediktor snížené recidivy a úmrtí na NO (Arab 2010; Schmit et al. 2016).

Složky kávy mají pozitivní účinek na zdravé a oxidační prostředí tlustého střeva, dobré složení mikrobiomu, sekreci žlučových kyselin a citlivosti na inzulín. Na základě experimentu od Farah & dePaula Lima (2019) *in vitro* buněčných liniích jaterního karcinomu (HepG2), které byly inkubovány s různými koncentracemi extraktu ze zelených kávových zrn (1, 10 a 50 $\mu\text{g/ml}$) a standardy chlorogenová kyselina a metylxanthin kofein (1, 10, 20 a 40 $\mu\text{g/ml}$) pro testování přímého antioxidačního účinku se z výsledků zjistilo, že polyfenoly, které se nacházejí jako specifické složky v kávě mají antioxidační a antiproliferační účinky a vyvolávají zástavu buněčného cyklu. Dle dalšího výzkumu od Sadeghi Ekbatan et al. (2018) zaměřeného na nádorovou buněčnou linii Caco-2 bylo potvrzeno, že silný antioxidant vyskytující se v kávě, chlorogenová kyselina a její metabolity, mají inhibují buněčnou proliferaci protinádorový účinek při koncentraci 50 - 1000 μM .

Další pozitivní vlastnosti má pražená káva na základě melanoidů, které se v ní vyskytují. Působí jako dietní vláknina a zvyšují tak peristaltiku trávicího traktu. Diterpeny cafestol a kahweol jsou hojně zastoupené ve vařených a nefiltrovaných kávách a vykazují antikarcinogenní aktivitu, a tím posilují obranný systém proti oxidačnímu poškození (Bradbury et al. 2020).

Nicméně nejzákladnější složkou kávy je kofein, který má díky antioxidační aktivitě schopnost omezit růstový potenciál nádorových buněk tlustého střeva. Složení kávy a poměr daných sloučenin v ní pozitivně ovlivňuje organismus, ale liší se v závislosti na typu kávových zrn, stupni pražení, technice přípravy a velikosti porce. Například cafestol a kahweol jsou odstraněny filtrací, a proto filtrovaná a instantní káva je téměř neobsahuje (Schmit et al. 2016).

Dalším významným činitelem ovlivňující NO je z hlediska stravy **tuk**, kterému je věnována poměrně velká pozornost díky silné mezinárodní korelaci s výskytem běžných NO ve vyspělých zemích (Lee et al. 2015). Modelová studie Seesaha et al. (2020) na zvířatech jednoznačně prokázala, že n-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) mohou uplatnit své příznivé účinky díky antioxidačním, protizánětlivým, antiproliferativním, antiangionogenním a proapoptickým vlastnostem. A také u nich bylo prokázáno pozitivní ovlivnění ve složení a aktivitě střevního mikrobiomu (Fu et al. 2021).

Strava bohatá na n-3 PUFA inhibuje karcinogenezi tlustého střeva (Volpato & Hull 2018). Z výsledků od (Bojková et al. 2020) vyplývá, že zvýšením příjmu n-3 PUFA, zejména eikosapentaenové a dokosahexaenové kyseliny a zároveň snížením příjmu n-6 PUFA, nasycených tuků, má potenciál být hlavním směrem prevence KK. N-3 PUFA jako alfa-linolenová kyselina (ALA), eikosapentaenová kyselina (EPA) a dokosahexaenová kyselina (DHA) jsou označeny jako možní zachránci z hlediska prevence KK (Arshad et al. 2015). Jejich zdrojem jsou především chia semínka, lněná semínka, ryby jako sardinky a tresčí játra a jejich konzumace by měla být velmi častá.

Dále bylo zjištěno, že hlavní zástupce n-6 PUFA (linolová kyselina) nacházející se v rostlinných olejích, jako je sójový nebo kukuřičný olej, způsobuje negativní navýšení COX-2 (Prostaglandin-endoperoxid syntáza 2), což zvyšuje zánětlivou reakci ve střevech. Ideální poměr n-3 a n-6 PUFA by se měl pohybovat v rozmezí 1:2 až 1:4 který je z hlediska stravy v západních vyspělých zemích často nevyvážený a dosahuje až poměru 1:20 (Seesaha et al. 2020). Nejenom PUFA, ale i mononasyčené mastné kyseliny (MUFA) mají preventivní funkce před vznikem KK. Konkrétně konzumace olivového oleje má pozitivní vliv na růst nádoru a mnohodalších, včetně nádoru prostaty a prsu. Především díky olejové kyselině, která se zde nachází. Nicméně olivový olej se označuje jako funkční a komplexní potravinu, která obsahuje několik i řadu bioaktivních sloučenin, jako jsou tokoferoly, skvaleny, alkoholy a polyfenoly, které se nacházejí v čaji, kakau, již zmiňované kávě, ořechách, ovoci a zelenině (Reddy 2002).

Mezi již zmíněné polyfenoly patří například oleuropein, hydroxytyrosol a tyrosol, který představují přibližně 80 % obsahu fenolů v olivovém oleji (Farinetti et al. 2017). Potvrzuje to i metaanalýza od Sofí et al. (2010), která zjistila, že vysoký příjem olivového oleje by mohl vést ke snížení rozvoje NO trávicího traktu až o 30 %. Další výsledek této studie přináší, že úmrtnost na NO jsou nižší ve středomořských zemích, protože konzumace olivového oleje je zde součástí každodenního stravování.

Ovšem v rámci každodenního stravování bývá i konzumace živočišného tuku, který se poměrně hojně nachází v **červeném a zpracovaném mase** spojován spíše se stinnou stranou stravování. Konzumací červeného masa nebyla jednoznačně prokázána spojitost mezi rizikem vzniku KK a zvýšeným příjmem, jako je tomu například u mléčného tuku. Přesto by se konzumace červeného masa měla omezit či přejít alespoň na konzumaci drůbežního masa či králičího (Islam et al. 2019; Saliba et al. 2019). Existuje několik možných mechanismů

a některých mutagenních nebo karcinogenních sloučenin u zvířat k vysvětlení vztahu mezi konzumací červeného masa a vznikem KK.

Mezi možné mechanické faktory patří N-nitrososloučeniny (NOC), heterocyklické aminy (HCA), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), hemové železo v červeném mase, žlučové kyseliny a nehumánní sialová kyselina (Aykan 2015).

Další problém mohou být potravinářská aditiva, jako je dusitan draselný (E249), dusitan sodný (E250), dusičnan sodný (E251) a dusičnan draselný (E252), jež jsou všechny schválené v mnoha zemích, ale jejich použití je obecně omezeno na maximální povolené množství 200 ppm nebo méně. Častější konzumace masných výrobků s přísadkou dusitanů může vést k poškození DNA, zvyšování oxidačního stresu a díky interakci s aminy a amidy v žaludku a ve střevech produkovanými bakteriální dekarboxylací aminokyselin, mohou být N-nitrosovány v přítomnosti nitrosacího činidla, a tak tvořit NOC (Zhu et al. 2014; Zheng et al. 2019). Existují dvě hlavní podskupiny NOC; N-nitrosaminy a N-nitrosamidy. Ty se prokázali jako karcinogenní u laboratorních zvířat a pravděpodobně budou karcinogenní pro člověka podle IARC (2015). Ve studii od McCullough et al. (2013) se účastnilo 2315 dobrovolníků, kteří přežili léčbu KK. Uvádí se, že účastníci studie, kteří před diagnostikou KK konzumovali větší množství červeného a zpracovaného masa, měli o 29 % vyšší riziko úmrtnosti ve srovnání s těmi, kteří konzumovali nejmenší množství červeného a zpracovaného masa. Naopak je tomu u tuku v mléce nebo mléčných výrobcích. Zde je tuk obecně považován za pozitivně ovlivňující makronutrient, jelikož jeho vyšší příjem je spojen se sníženým výskytem KK. Jako faktor s ochranným účinkem v mléce je označován vápník (Ca; Winkels et al. 2013), jelikož Ca v mléku, ale i v mléčných výrobcích může neutralizovat škodlivé žlučové kyseliny a ionizovat mastné kyseliny ve střevech. Vzhledem k tomu, že Ca je důležitou složkou v buněčných dracích zapojených do buněčné proliferace a diferenciaci buněk, může modifikace příjmu Ca ovlivnit tyto dráhy a v konečném důsledku přispívá ke snížení rizika KK (Barrubés et al. 2019).

Jednou z možností, jak tedy snížit riziko vzniku nádoru je omezit konzumaci červeného masa a zvýšit příjem mléčných výrobků. Současně by měl být kladen důraz na vyváženou stravu s předností konzumací zeleniny a ovoce. Preferovat celozrnné výrobky, omezit příjem jednoduchých cukrů jako jsou mono a disacharidy. Důležitou roli hraje i tepelná úprava, kdy je doporučováno dušení, vaření (Song et al. 2015) a vyhýbat se smažení a roštování. Dále by se člověk měl zaměřit více na pohybovou aktivitu, protože přiměřená hmotnost také přispívá ke snížení rizika vzniku KK společně s preventivními vyšetřeními (Holubec 2004). Výše uvedené pozitivní faktory (Tabulka 1) nemohou léčit KK, ale jejich omezení či zařazení představuje prevenci proti vzniku NO (Song et al. 2015; Seesaha et al. 2020). IARC (2014) zrevidovala Evropský kodex proti rakovině a uvedla 12 doporučení pro zdravější životní styl, která by měla podpořit prevenci NO. Těmito zásadami, kterými by se relativně snadno mohla řídit celá populace, aby se tím snížilo riziko vzniku zhoubného nádoru, přičemž dle odborníků by bylo možné takto zabránit až polovině ze všech úmrtí na NO v Evropě. Některé z těchto 12 zásad zní: nekouřit, udržet si zdravou tělesnou hmotnost, jíst zdravě, pít méně nebo žádný alkohol, nevystavovat se příliš slunečnímu záření, zajistit dětem očkování proti hepatitidě B a proti lidským papilomavirům, účastnit se screeningových programů.

Tabulka 1: Přehled rizikových a preventivních faktorů KK (Brenner et al. 2014).

Sociodemografické faktory	Riziko
Vyšší věk	↑↑↑
Mužské pohlaví	↑↑
Lékařské faktory	
Zánětlivá onemocnění střev	↑↑
Cukrovka	↑
Infekce <i>Helicobacter pylori</i>	(↑)
Endoskopie tlustého střeva	↓↓
Aspirin	↓
Faktory životního stylu	
Kouření	↑
Nadměrná konzumace alkoholu	↑
Obezita	↑
Fyzická aktivita	↓
Stravovací návyky	
Vysoká spotřeba červeného a zpracovaného masa	↑
Ovoce a zelenina	(↓)
Vláknina a celozrnné výrobky	(↓)
Ryby	(↓)
Mléčné výrobky	(↓)

↑↑↑ = velmi zvýšené riziko, ↑↑ = středně zvýšené riziko, ↑ = mírně zvýšené riziko,
 ↓↓ = velmi snížené riziko, ↓ = mírně snížené riziko. V závorkách jsou uvedeny
 pravděpodobné, ale ne plně stanovené vztahy.

3.3.3 Léčba nádorových onemocnění

Při léčbě NO záleží na lokalizaci nádoru a rozsahu postižení, proto se léčba provádí pomocí chemoterapie, radioterapie, biologickou léčbou, chirurgickou léčbou či jejich kombinací (Biller & Schrag 2021). V současnosti jsou pro časná stádium preferované miniinvazivní metody, laparoskopické a roboticky asistované operace, které jsou bezpečné a onkologicky dostatečně radikální (Tsimberidou et al. 2020).

U radioterapie se využívá ionizující záření, při kterém je snaha zasáhnout nádor v co největší míře a okolní zdravou tkáň, co nejméně. Léčba probíhá jednorázově nebo v cyklech. Podle soudobých poznatků má být radioterapie prvním léčebným krokem při karcinomu rekta. Radioterapie je indikována u karcinomů, jejichž proximální hranice je podle kolonoskopického vyšetření maximálně ve vzdálenosti 25 cm od anu (Jech & Hoch 2004). Samotný chirurgický výkon by měl být proveden v odstupu 4–6 týdnů po ukončení radioterapie, kdy je efekt radioterapie na nádorovou tkáň maximální. Cílem dlouhodobého předoperačního ozáření je dosažení regrese nádoru „down-staging“, od kterého je očekáváno zvýšení operability, snížení počtu lokálních recidiv a dokonce prodloužení přežití. Provádí se zpravidla současně s chemoterapií, která zlepšuje účinek neoadjuvantní radioterapie resp. radiochemoterapie (Zavoral et al. 2016).

Při léčbě chemoterapií se podávají cytostatika, což jsou látky toxické pro nádorové buňky, ale i zdravé, patří mezi ně např. paclitaxel nebo u KK 5-fluorouracil a raltitrexed (Kim 2015). Převážná většina cytostatik se podává nitrožilně prostřednictvím infúzí, možné je podávat také formou tablet např. cytostatikum kapecitabin (Lu et al. 2012). Jako další cytostatikum mají velký potenciál rostlinné alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae*, které

poškozující cytoskelet (konkrétně mikrotubuly) a tím inhibují mitózu a metafázi (Doskočil et al. 2015), přičemž pro buňky zdravé vykazují alkaloidy relativně nízkou toxicitu.

3.4 Alkaloidy

Alkaloidy jsou sekundárními metabolity, jež na rozdíl od primárních metabolitů vykazují farmakologické účinky, konkrétně antivirové, antimykotické, antibakteriální a analgetické, antiproliferační, antiparazitické protizánětlivé (Cahlíková et al. 2021). V současné době je jich známo přes 6000 (Kukula-Koch & Widelski 2017). Rostliny produkují sekundární metabolity jako obranné sloučeniny, které je chrání před abiotickými vlivy (např. UV zářením a vysycháním) a před nepříznivými vlivy biotických faktorů (herbivorií a fytopatogenním mikrobiálním infekcím) (Berkov et al. 2020).

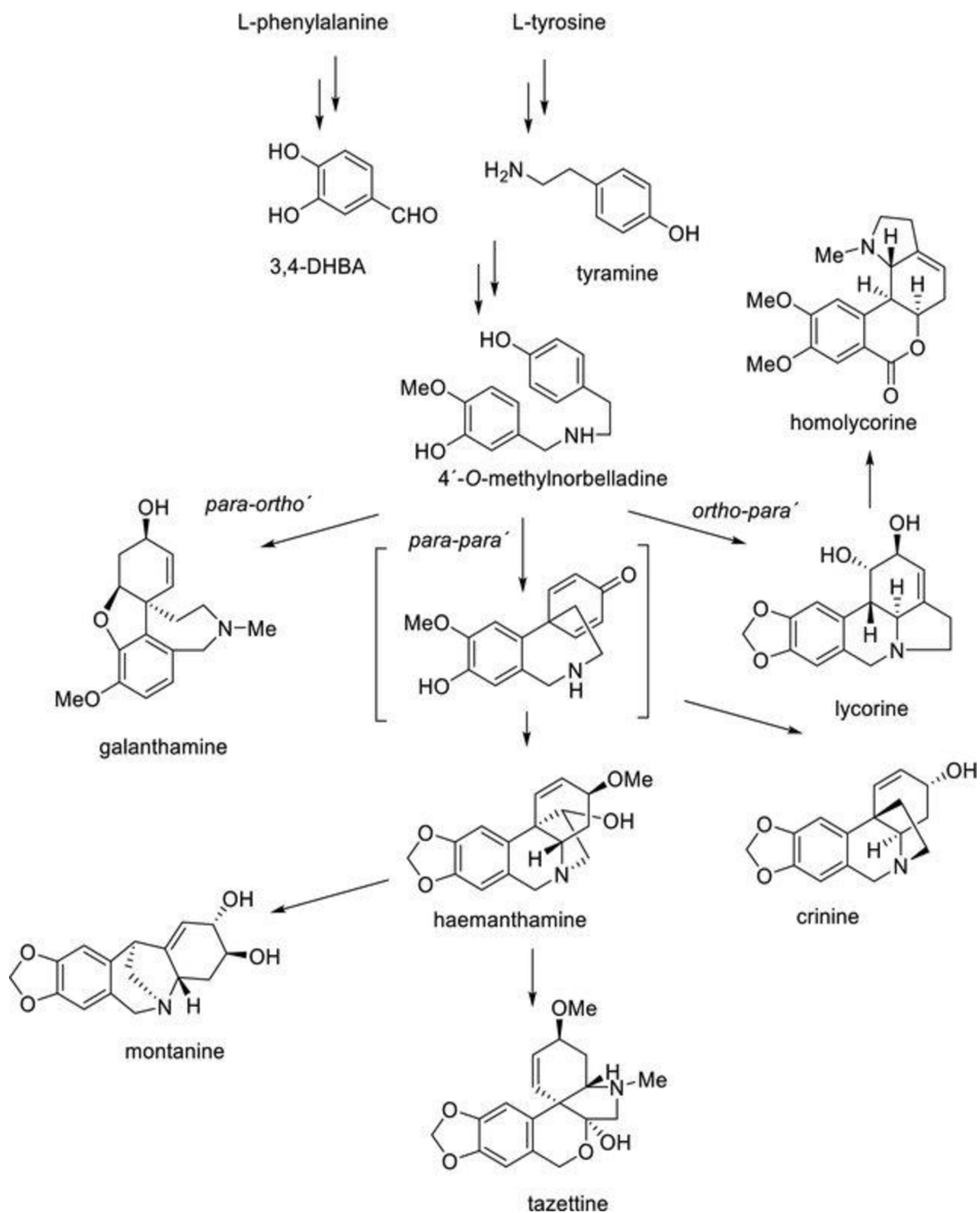
„Převážná většina alkaloidů náleží k rostlinným alkaloidům, vzácně se však vyskytují i alkaloidy živočichů (hlavně obojživelníků) a hub. Není přesně známo, jaký mají význam v tělech organismů, ovšem je zřejmé, že mají obrannou funkci a dále např. různé rostliny se v podobě alkaloidů zbavují dusíkatých zplodin“ (Dalecká et al. 2013).

Do dnešní doby bylo izolováno a popsáno na 600 strukturně odlišných alkaloidů vyskytujících se jednotlivě, nebo ve skupinách napříč celou čeledí *Amaryllidaceae* (Berkov et al. 2020). Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, v závislosti na druhu rostliny se avšak ve zvýšeném množství se nachází v listech (*Hyoscyamus niger*), plodech nebo semenech (*Strychnos nux-vomica*), kořenech (*Rauwolfia serpentina*) či kůře (*Cinchona*) (Oksman-Caldentey et al. 1987; Jaremicz et al. 2014; Murauer & Ganzera 2018;).

3.4.1 Biologická aktivita alkaloidů *Amaryllidaceae*

Alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae* se typicky tvoří (Obrázek 3) biogeneticky intramolekulárním oxidativním spojením norbelladinů odvozených od aminokyselin L-fenylalaninu (L-phe) a L-tyrosinu (L-tyr). Klíčový metabolit, 4-O-methylnorbelladin vzniká po kondenzaci 3,4-dihydroxybenzaldehydu (3,4-DHBA) a tyraminu, redukcí výsledných Schiffových bází či Mannichových reakcí dle dané třídy alkaloidů (Berkov et al. 2020). Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká sedm základních skeletů, které jsou pojmenovány dle svého hlavního reprezentanta. Jmenovitě se jedná o lykorinový, galantaminový, tazettinový, pankratistatinový, homolykorinový, haemantaminový a krinanový typ (Havelek et al. 2014).

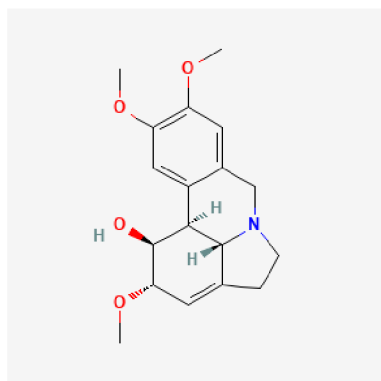
Dosud bylo zjištěno, že alkaloidy izolované z různých rostlin čeledi *Amaryllidaceae* vykazují rozsáhlou biologickou aktivitu, jež závisí na struktuře daného alkaloidu. Je dobře známo, že mnoho alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* vykazují selektivní inhibiční aktivitu na acetylcholinesterázu (AChE) a jako reprezentativní vzorek byl použit alkaloid galantamin uveden na evropské a americké trhy ve formě hydrobromidové soli pro léčbu Alzheimerovy choroby. Kromě toho alkaloidy lykorinového typu byly nedávno objeveny jako nové inhibitory AChE, v některých případech s vyšší úrovní aktivity ve srovnání s komerčním galantaminem (Lu et al. 2012).



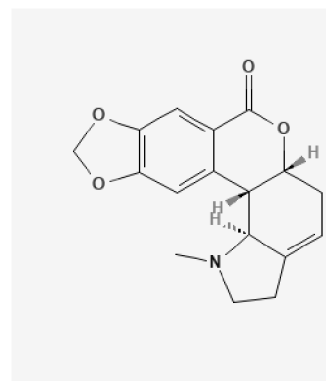
Obrázek 3: Biosyntetická dráha hlavních strukturálních typů alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* (Cahlíková et al. 2021)

V práci bude analyzován účinek konkrétně těchto šesti vybraných alkaloidů (Obrázek 4): 9-O-demetylgalantin (lykorinový typ), haemantamin (haemantaminový typ), hippeastrin (homolykorinový typ), masonin (homolykorinový typ), norpluvin (lykorinový typ) a odulin (homolykorinový typ).

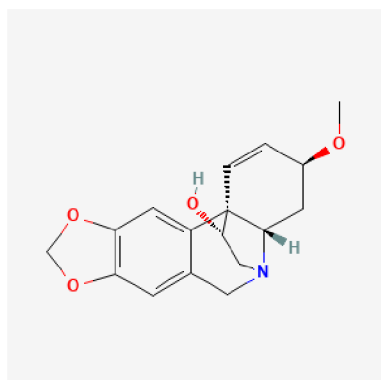
9-O-
demetylgalanthin



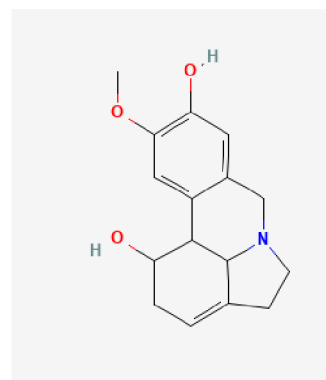
Masonin



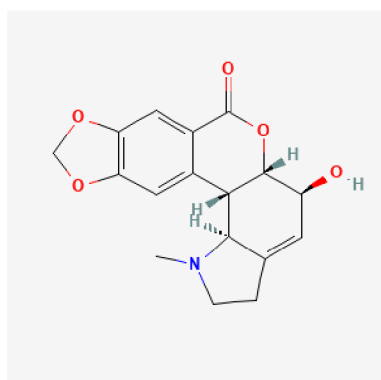
Haemantamin



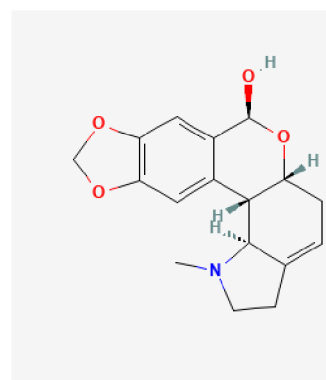
Norpluvín



Hippeastrin



Odulin



Obrázek 4: Struktura šesti zkoumaných alkaloidů.

3.4.2 Využití alkaloidů

Nejnámější, prvně izolovaný alkaloid byl v roce 1877 lykorin, spadající do lykorinového strukturního typu, který z pohledu toxicity patří k těm neúčinnějším. Dokáže inhibovat syntézu L-askorbové kyseliny tím, že potlačí enzym galaktodehydrogenázu. Lykorin vykazuje antivirotický proti viru plánných neštovic, ale současně i proti SARS-CoV-19. Především je ale lykorin známý svou protinádorovou aktivitou (Gao et al. 2021). Homolykorinový typ alkaloidů (konkrétně hippeastrin, masonin a odulin) má antimykotický účinek, inhibuje růst některých nádorových buněk lidského jaterního karcinomu HepG2 a leukemických buněk MOLT-4. Přesto vykazuje také cytotoxický efekt i k nenádorovým buňkám. Haemantaminový typ alkaloidů (konkrétně haemantamin) dokáže selektivně iniciovat apoptózu u nádorových buněk (potkaního hepatocelulárního karcinomu 5123tc) a zároveň nebýt toxický vůči zdravým buňkám. Nicméně kompletní mechanismus byl prozkoumán zatím minimálně.

U haemanthaminu byla prokázána silná inhibiční růstová a cytotoxická aktivita proti široké škále nádorových buněčných linií různých histotypů, včetně cervikálního karcinomu (HeLa), nemalobuněčného karcinomu plic (A549), KK (Caco2 a HT29) aj. (Cahlíková et al. 2021). Dle pokusu od Havelek et al. (2017), z 22 testovaných alkaloidů vykázal nejvyšší aktivitu haemantamin, přičemž dávka 20 mg/kg haemantaminu u myši vedla k poklesu proliferace pod 25 % u 12 ze 17 testovaných buněčných linií a pod 50 % u 17 linií (např. HT-29, kolorektální adenokarcinom SW-480 a COLO-201). U druhého neúčinnějšího alkaloidu lykorinu byla zaznamenána snížená proliferace pod 25 % u 10 ze 17 linií. Na základě výsledků byly dále provedeny studie s cílem stanovit koncentraci alkaloidů, která vyvolala 50% inhibici buněčné proliferace (hodnota IC_{50}). V tomto ohledu vykazoval vůči všem buňkám nejsilnější cytotoxicitu lykorin, jehož rozmezí IC_{50} činilo 0,7 – 1,4 μM . Haemantamin vykazoval hodnoty IC_{50} v rozmezí 0,3 – 9,8 μM .

3.4.3 Izolace alkaloidů

Před analyzováním účinnosti alkaloidů je zapotřebí je extrahovat neboli izolovat z biomasy. Extrakce a izolace alkaloidů může být provedena různými způsoby v závislosti na povaze příslušných alkaloidů a materiálu, ve kterém se nacházejí. Jelikož se alkaloidy obvykle vyskytují v rostlinách jako soli organických a anorganických kyselin spolu s často složitými směsmi ve vodě rozpustných sloučenin, jako jsou proteiny, minerální soli, taniny, lipidy a pryskyřice, je často velkým problémem odstranit všechny tyto nealkaloidní sloučeniny během izolace a čištění alkaloidů (Baerheim Svendsen & Verpoorte 1983; Vaněčková et al. 2016). U rostlinného materiálu se primární extrakce obvykle provádí organickými rozpouštědly nemísitelnými s vodou po uvolnění alkaloidových bází z jejich solí zpracováním s minerální bází, protože delší kontakt se silnými bázemi může vést ke změnám mnoha alkaloidů, jako je například hydrolýza (Dymek & Mroczek 2021). Extrakce a čištění alkaloidních bází pomocí silikagelu nebo oxidu hlinitého může být v mnoha případech výhodná, protože se odstraní tuk a pryskyřice. Alkaloidy budou vázány jako soli, zatímco neutrální lipidy mohou být vymyty, následně mohou být alkaloidní báze eluovány organickým rozpouštědlem. Aby se dosáhlo co nejlepšího čištění alkaloidů od nealkaloidních sloučenin nacházejících se v extraktu získaném s polárními rozpouštědly. Postup čištění se často provádí vysrážením alkaloidů pomocí pikrové kyseliny, Reineckeho soli nebo Mayerova činidla (Sibanyoni et al. 2020).

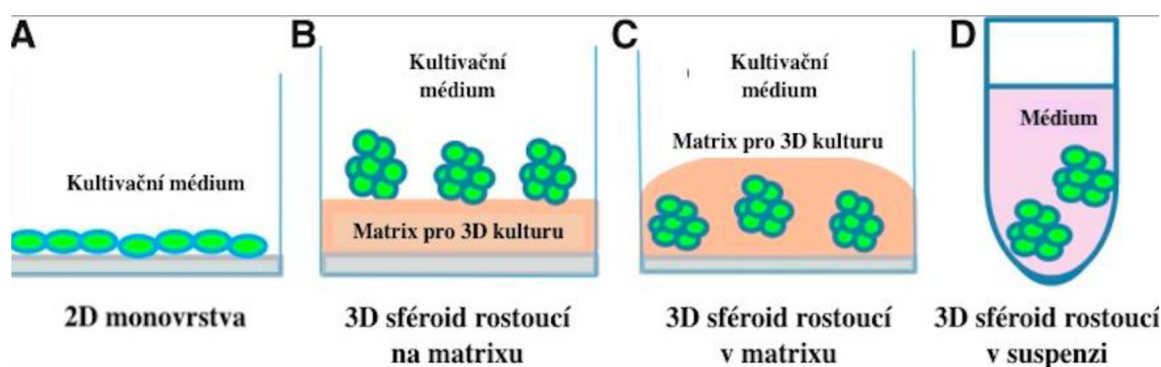
3.5 Sféroidy jako *in vitro* modely

Kultivace buněk slouží jako nástroj v buněčné biologii již několik desetiletí. Monovrstvy adherentních buněk pěstovaných na plochých, dvourozměrných (2D) substrátech jako je plast nebo sklo hrály klíčovou roli při prohlubování našeho chápání vývojové biologie, morfogeneze tkání, mechanismů onemocnění a objevení léků ve velkém měřítku. V roce 1907 Ross Granville Harrison úspěšně kultivovali jako první žabí neuroblasty v lymfatickém médiu, což dokazuje, že nervová vlákna se vyvíjejí bez řetězce a že tkáně mohou růst mimo tělo. Od té doby byla metoda zdokonalována a používána k pozorování růstu a diferenciaci buněk mimo tělo (Kapałczyńska et al. 2016). S postupem času se objevilo množství nedostatků spojených s 2D buněčnou kulturou, zejména s jejich neschopností napodobit podmínky *in vivo* (Sanyal 2014). V současné době lze experimenty provádět s primárními buňkami izolovanými přímo z materiálu dárců nebo s použitím zavedených kultur uložených v buněčných bankách.

Charakteristické znaky primárních buněčných linií jsou: potíže s izolací a krátká životnost (Yamada & Cukierman 2007).

V průběhu let se začal používat model tvořící třítorozměrnou (3D) strukturu, ve kterém mají buněčné linie přirozený tvar, uspořádání cytoskeletu, vlastnosti interakcí s extracelulárním matrixem jsou lepší a intenzivnější. Tyto modely jsou nazývány sféroidy či organoidy. Díky svému uspořádání umějí dobře imitovat 3D strukturu zhoubné tkáně a též mikroprostředí nádoru. Jedním způsobem jak zvýšit míru úspěšnosti nových léčiv proti NO je implementace 3D modelů nádorů *in vitro*, které přesněji kopírují lidský nádor (Sant & Johnston 2017). Sféroidy jsou definovány jako jednoduché shluky buněk rozsáhlé škály typů, například z nádorové tkáně, embryoidních těl, hepatocytů, nervové tkáně nebo mléčných žláz (Costa et al. 2016). Sféroidy se utvářejí spontánním přichycením buněk k sobě navzájem a nepotřebují, na rozdíl od organoidů, žádné lešení (Białkowska et al. 2020; Rozich et al. 2020).

V případě 2D kultur dochází k uchycení buněk na jedné straně buňky (ta, která je v kontaktu s 2D povrchem), zatímco u 3D kultur dochází k uchycení buněk kolem celého povrchu buňky. Obecně k přichycení a šíření buněk na 2D substrátech bez omezení dochází během několika minut (Kapałczyńska et al. 2016). V porovnání, uchycení a šíření buněk ve 3D kulturách předchází proteolytická degradace jejich fyzického prostředí, ke které může dojít během hodin a v některých případech i v průběhu několika dnů. Buněné 3D modely, lze vzhledem ke způsobu přípravy rozdělit na (Obrázek 5): suspenzní kultury na nepřilnavých plotnách; kultivace v koncentrovaném médiu či v gelovitých látkách a kultury založené na lešení (Edmondson et al. 2014).



Obrázek 5: Schéma tradiční 2D jednovrstvé buněčné kultury (A) a 3D systémů buněčné kultury (B-D) (Edmondson et al. 2014).

U techniky založené na lešení se buňky pěstují v přítomnosti podpory a lze použít dva typy podpory. Nosič na bázi hydrogelu, kde je polymerní síť značně nabobtnalá vodou a buňky mohou být zapuštěny v těchto hydrogelech nebo potaženy na povrchu (Rodrigues et al. 2018). Druhou možností je podpora na bázi polymerního tvrdého materiálu (většinou polystyren), kde jsou buňky kultivovány v přítomnosti vláken či houbových struktur (Edmondson et al. 2014; Kapałczyńska et al. 2016). Technika bez lešení umožňuje buňkám, aby se samy shromáždily a vytvořily tak neadherentní buněčné agregáty – sféroidy.

Tabulka 2: Srovnání metod 2D a 3D kultivace buněk (Kapałczyńska et al. 2016).

Typ buněčných kultur	2D	3D
Tvar	<ul style="list-style-type: none"> • Ploché a roztažené 	<ul style="list-style-type: none"> • Přirozený tvar (elipsoidní)
Citlivost na léky	<ul style="list-style-type: none"> • Buňky jsou citlivé a léky vykazují vysokou účinnost 	<ul style="list-style-type: none"> • Buňky často vykazují rezistenci a léky vykazují nízkou účinnost
Doba formování kultury	<ul style="list-style-type: none"> • Během několika minut až hodin 	<ul style="list-style-type: none"> • V řádu několika hodin až dnů
Kvalita kultury	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoká reprodukovatelnost, dlouhodobá kultura, snadná interpretace, jednoduchost kultury 	<ul style="list-style-type: none"> • Horší reprodukovatelnost, obtížná interpretace, kultury obtížněji realizovatelné
Imitace <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Nenapodobuje přirozenou strukturu tkáně nebo nádoru 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In vivo</i> tkáně a orgány jsou ve 3D formě přirozené
Interakce buněk	<ul style="list-style-type: none"> • Bez interakcí 	<ul style="list-style-type: none"> • Interakce prostředí buňka-buňka a buňka-extracelulární prostředí
Cena	<ul style="list-style-type: none"> • Levné, komerčně dostupné 	<ul style="list-style-type: none"> • Dražší, komerčně méně dostupné
Molekulární mechanismy	<ul style="list-style-type: none"> • Změny v genové expresi, sestřihu mRNA, topologii a biochemii buněk, špatná diference 	<ul style="list-style-type: none"> • Expresí genů, spojování, topologie a biochemie buněk jako <i>in vivo</i>, dobrá diference
Přístup k esenciálním sloučeninám	<ul style="list-style-type: none"> • Neomezený přístup ke kyslíku, živinám, metabolitům a signálním molekulám (na rozdíl od <i>in vivo</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilní přístup ke kyslíku, živinám, metabolitům a signálním molekulám (stejně jako <i>in vivo</i>)

Tyto jedinečné vlastnosti zdůrazňují potenciál 3D buněčných agregátů pro použití jako *in vitro* modely pro screening nových protirakovinných léčiv, a to jak v malém, tak ve velkém měřítku (Chatzinikolaidou 2016). Díky využívání 2D a 3D buněčných modelů se snížil počet testování na pokusných zvířatech a je možné určit směr dalšího testování či pozastavení dalšího testování léčiva (Rodrigues et al. 2018).

Multicelulární 3D sféroidy odvozené z nádorů, které budou využity v práci, se připravují fragmentací a jemnou mechanickou disociací nádorové tkáně.

4 Metodika

Alkaloidy použité k testování, byly dodány farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové a jejich příprava byla již popsána dříve (Doskočil et al. 2015).

4.1 Materiál

Pro testování extraktů čeledi rostlin *Amaryllidaceae* byly použity buněčné linie střevního karcinomu HT29. Tyto buněčné linie byly zakoupeny z American Type Culture Collection (ATCC). Kultivační média a Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, roztok penicilínu (10 000 MJ) a streptomycinu (100 mg), zakoupeno od Biowest (Biowest, USA), 3-(Dimethylthialzo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), trypsin, fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline -PBS), zakoupeno od Sigam - Aldrich (Sigma - Aldrich, CZ). Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lachner, Neratovice CZ), Nunclon Sphera 96 jamková destička, 96 jamková mikrotitrační destička, serologické pipetety a kultivační láhve Nunc (ThermoFischer, UK).

4.2 Kultivace buněčných linií

Modely buněčných linií KK HT29 byly kultivovány v DMEM médiu s přidavkem 10% FBS, 1% roztoku penicilínu a streptomycinu, 1% pyruvátu sodného, 1% hydrogenuhličitanu sodného a 1% neesenciálních aminokyselin. Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích s 15 ml čerstvého média v CO₂ inkubátoru při 5 % CO₂ a 37 °C, přičemž médium bylo měněno každé dva dny. Celá kultivace buněk probíhala přibližně po dobu 7 dní do 80-90% konfluency. Při sklizni byly kultivační láhve propláchnuty 1 × pomocí PBS, aby došlo k odstranění inhibitorů trypsinu z média. Poté bylo na dobu 3 minut přidáno 5 ml trypsinu a po uplynutí výše uvedené doby bylo přidáno ještě 5 ml kompletního média obsahující inhibitory trypsinu. Aby došlo ke kompletnímu uvolnění buněk z povrchu láhve byla vrstva buněk seškrábnuta buněčnou škrabkou. Následně byl obsah přepipetován do centrifugačních zkumavek, které byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1063 × RCF. Po centrifugaci byl ze zkumavek slit supernatant (staré médium) bez poškození buněčné pelety, ke které bylo přidáno 5 ml čerstvého média a peleta v něm byla mechanicky rozpuštěna do rozvolnění jednotlivých buněk. Následně ze zkumavek bylo do ependroforek odebráno 100 µl buněčné suspenze a k tomu přidáno 100 µl tripanové modře. Poté byla koncentrace buněk analyzována na EVE™ automatické čtečce buněk (NanoEntek). Z původní buněčné suspenze byl odebrán 1 ml buněčné suspenze o koncentraci 1×10^5 a přidán do nové kultivační láhve s 15 ml čerstvého média. Takto připravené kultivační láhve se opět nechaly kultivovat. Zbylá suspenze se využila pro přípravu sféroidů a stanovení cytotoxicity.

4.3 Příprava sféroidů

Sféroidy byly založeny dle postupu od Gupta (2020) s jistými modifikacemi. Zbylá suspenze z kultivace buněčných linií byla naředěna na koncentraci 1×10^4 buněk/ml média, následně byla suspenze pipetována do destiček Nunclon Sphera 96-well se speciální úpravou pro sféroidy o objemu 100 µl s výslednou koncentrací 1000 buněk na jamku. Takto připravená destička byla centrifugována při 400 × g po dobu 5 minut s pomalým gradientem spomalování

rotoru. Po ukončení centrifugace byla destička opatrně přemístěna do CO₂ inkubátoru a inkubována po dobu 72 hodin. Po 72 hodin inkubace byla pořízena první série snímků sféroidů pomocí mikroskopu ZEISS Primovert (Carl Zeiss, objective, 10 × /0.3, kamera Color Axion) Získané snímky byly zpracovány v programu ZEN Blue software (Carl Zeiss) a označeny jako čas 0. Po nafocení bylo k vzorku přidáno 100 µl média s testovaným vzorkem, aby finální koncentrace byla 5, 2,5, 1,25 a 0,625 µM následně byla destička inkubována 48 hodin. Po uplynutí 48 hodin byla pořízena další série fotek. Z destičky bylo odebráno 100 µl starého média a přidáno opět 100 µl nového média se vzorkem. Stejný postup byl opakován dalších 10 dní. Jako kontrola byl vybrán vinorelbin v koncentraci 0,07, 0,039, 0,019 a 0,009 µM. Získané fotografie byly poté analyzovány pomocí programu Fiji ImagenJ a vypočtení velikosti sféroidu bylo určeno na základě výpočtu dle Puhr et al. (2018):

$$V = \pi r^3$$

Vzorek pro poloměr geometrického průměru.

$$= (a \times b)^{1/2}$$

a,b jsou ortogonální průměry sféroidů

4.4 Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí programu Graphpad Prism 9. Pro vyhodnocení byl použit dvoufaktorový test významnosti – ANOVA ($p \leq 0,05$). Získaná data byla vyjádřena jako průměr směrodatnou odchylkou a následně post-hoc porovnání analyzováno pomocí Tukeyho testu.

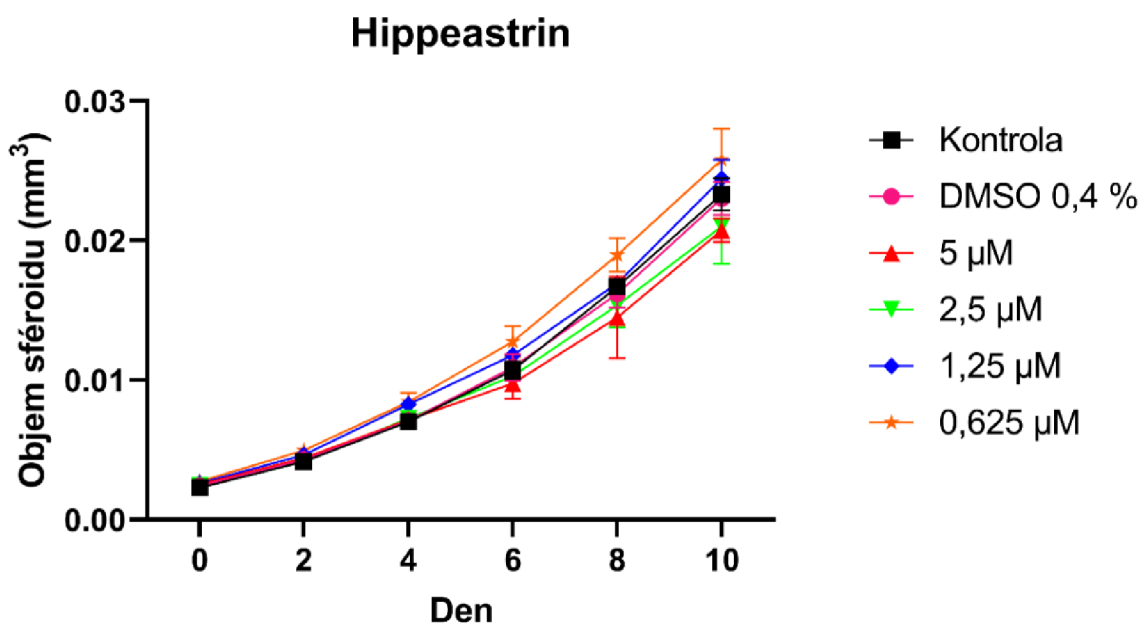
5 Výsledky

V této bakalářské práci byla testována cytotoxická aktivita *in vitro* 6 připravených alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae*, konkrétně: 9-O-demethylgalanthin, haemanthamin, haemanthamin, hippeastrin, odulin, norpluvin a masonin v koncentracích 5; 2,5; 1,25 a 0,625 μM na buněčných liniích lidského KK HT29.

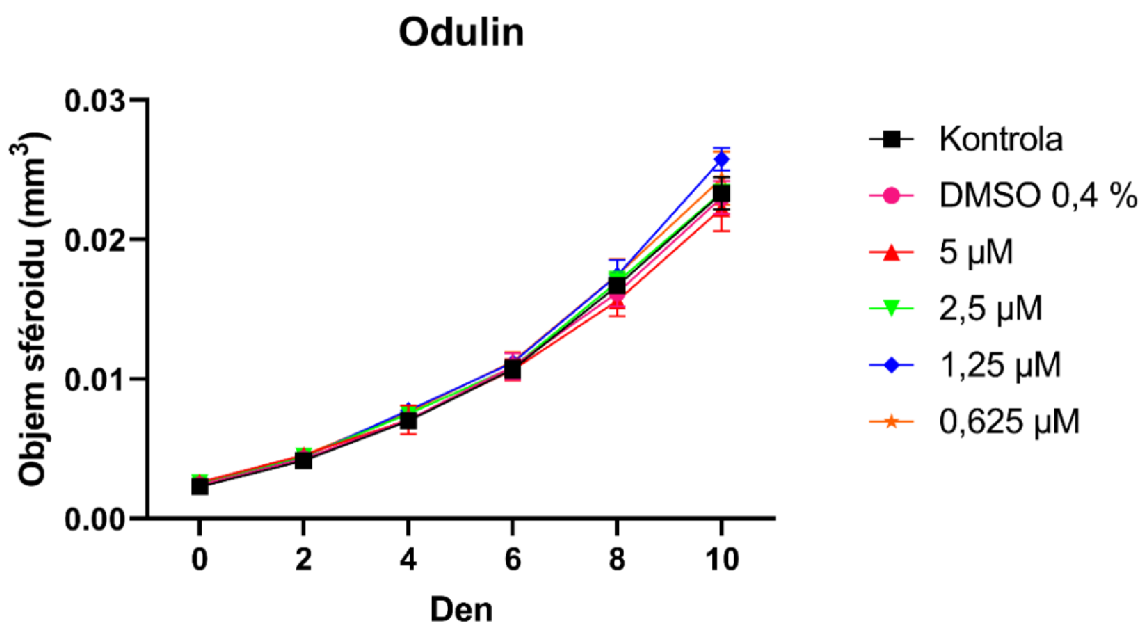
5.1 Účinek alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* na sféroidy

Buněčná linie HT29 byla schopna udržet kompaktní tvar sféroиду po celou dobu testování alkaloidy při všech koncentracích (Obrázek 7a, 7b). Jediný alkaloid, který vykazoval mírnou inhibici na růst sféroidů byl hippeastrin u kterého bylo od 6. dne pozorován pomalejší růst při koncentraci 5 μM , než u kontroly (Obrázek 6a), avšak tyto hodnoty nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. 10. den byla zaznamenána velikost sféroidů při použití tohoto alkaloidu v průměru na hodnotě 0,022931 mm^3 , což je o 4 % menší oproti kontrole se statisticky významným rozdílem $p=0,0001$. Naproti nižší koncentrace 1,25 a 0,625 μM , kde u hippeastrinu nebyla rychlost sféroidu zpomalena, naopak při koncentraci 0,625 μM je z obrázku 6a patrné, že růst byl pozitivně podpořen oproti kontrole a velikost byla o 2 % vyšší než kontrola. Norpluvin při koncentraci 1,25 μM 10. den dokonce zvětšil velikost sféroidu na 0,0248495 mm^3 oproti kontrole, což odpovídá 12% zvětšení. 10. den bylo zvětšení velikosti sféroidu díky norpluvinu 13 % v porovnání s kontrolou u koncentrace 1,25 μM a o 12 % oproti kontrole při koncentraci 0,625 μM . Taktéž odulin vykázal při koncentracích 0,625 a 1,25 μM podporu růstu sféroidu nad hodnoty kontroly. U odulinu bylo toto zvětšení oproti kontrole o 3 % při koncentraci 1,25 μM .

Ostatní testované alkaloidy nevykázaly téměř žádnou aktivitu vůči růstu sféroidů nebo velikost lehce zvětšovaly oproti kontrole. Bylo prokázáno, že je nepatrný statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi u všech testovaných alkaloidů do 6. dne, kdy se hodnoty jednotlivých koncentrací jen lehce vzdalovaly od kontroly (Obrázek 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 6f).

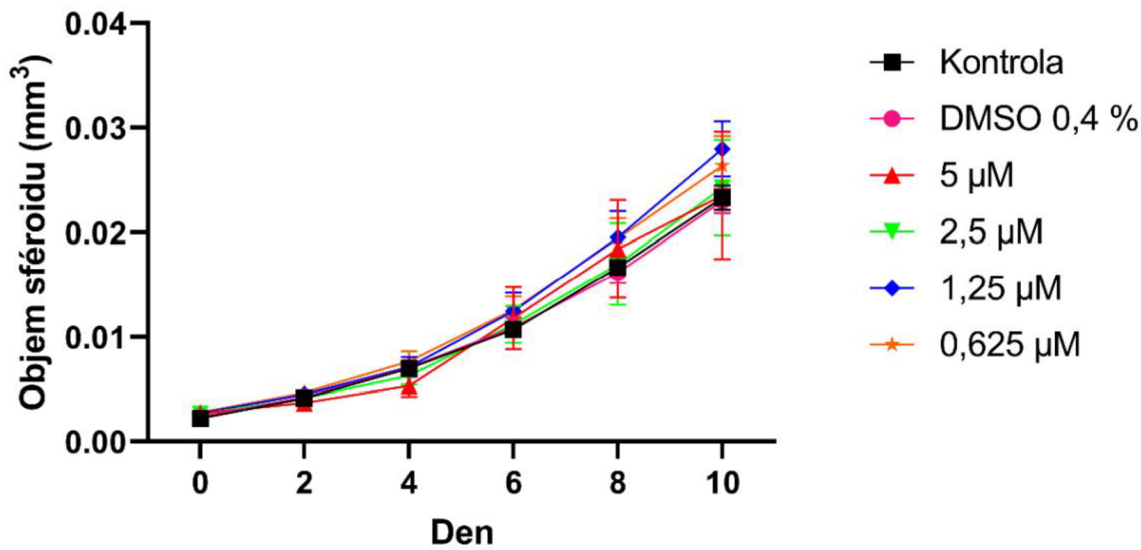


Obrázek 6a: Grafické znázornění růstu 3D sféroidů tvořených buněčnou linií HT29 v závislosti na dávce a času. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Testovaný alkaloid hippeastrin byl sledován postupně 0, 2, 4, 6, 8 a 10 den před opětovným přidáním testované látky.



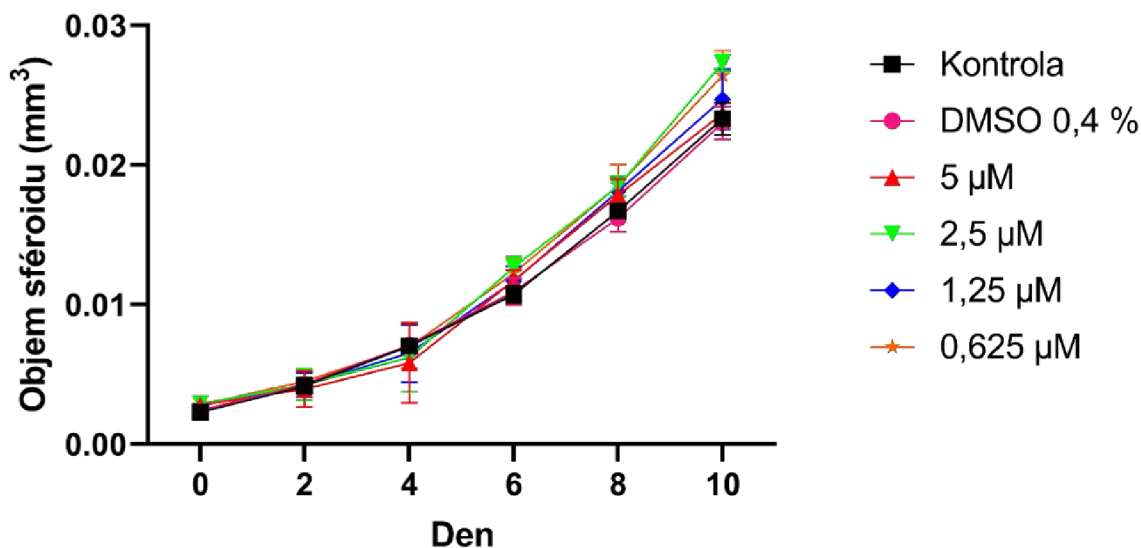
Obrázek 6b: Grafické znázornění růstu 3D sféroidů tvořených buněčnou linií HT29 v závislosti na dávce a času. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Testovaný alkaloid odulinu byl sledován postupně 0, 2, 4, 6, 8 a 10 den před opětovným přidáním testované látky.

Norpluvín

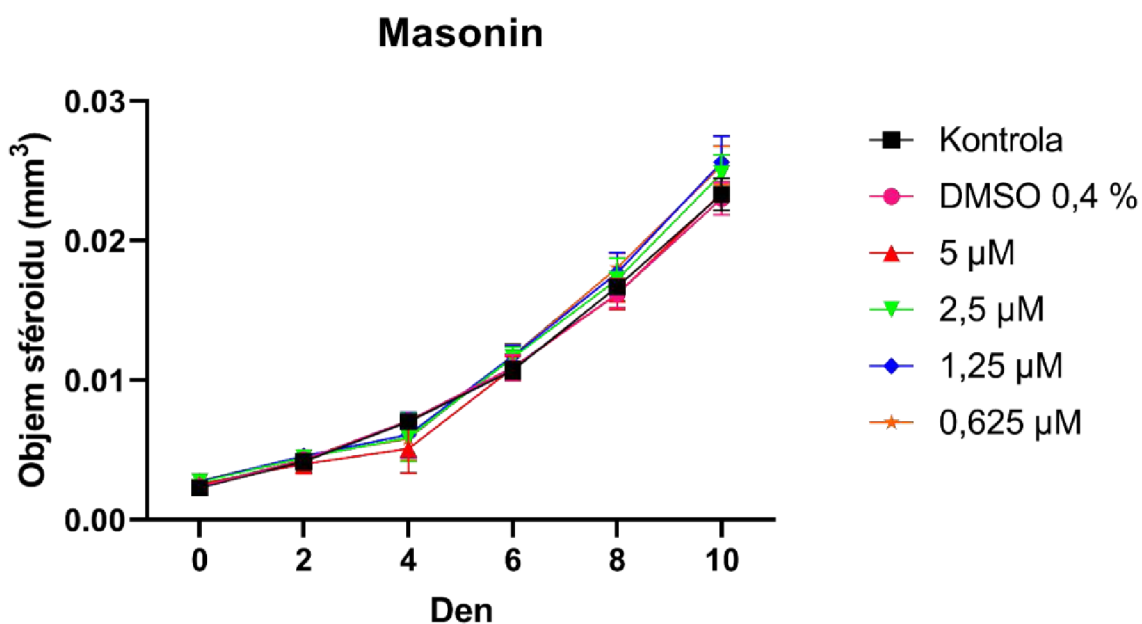


Obrázek 6c: Grafické znázornění růstu 3D sféroidů tvořených buněčnou linií HT29 v závislosti na dávce a času. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Testovaný alkaloid norpluvín by sledován postupně 0, 2, 4, 6, 8 a 10 den před opětovným přidáním testované látky.

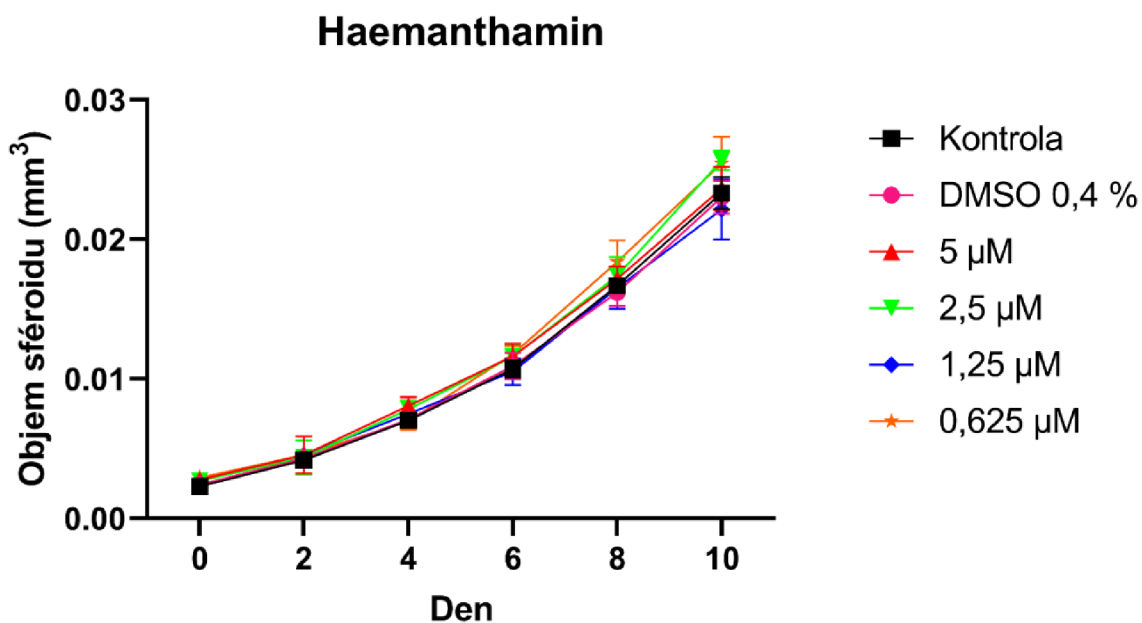
9-O-demethylgalanthin



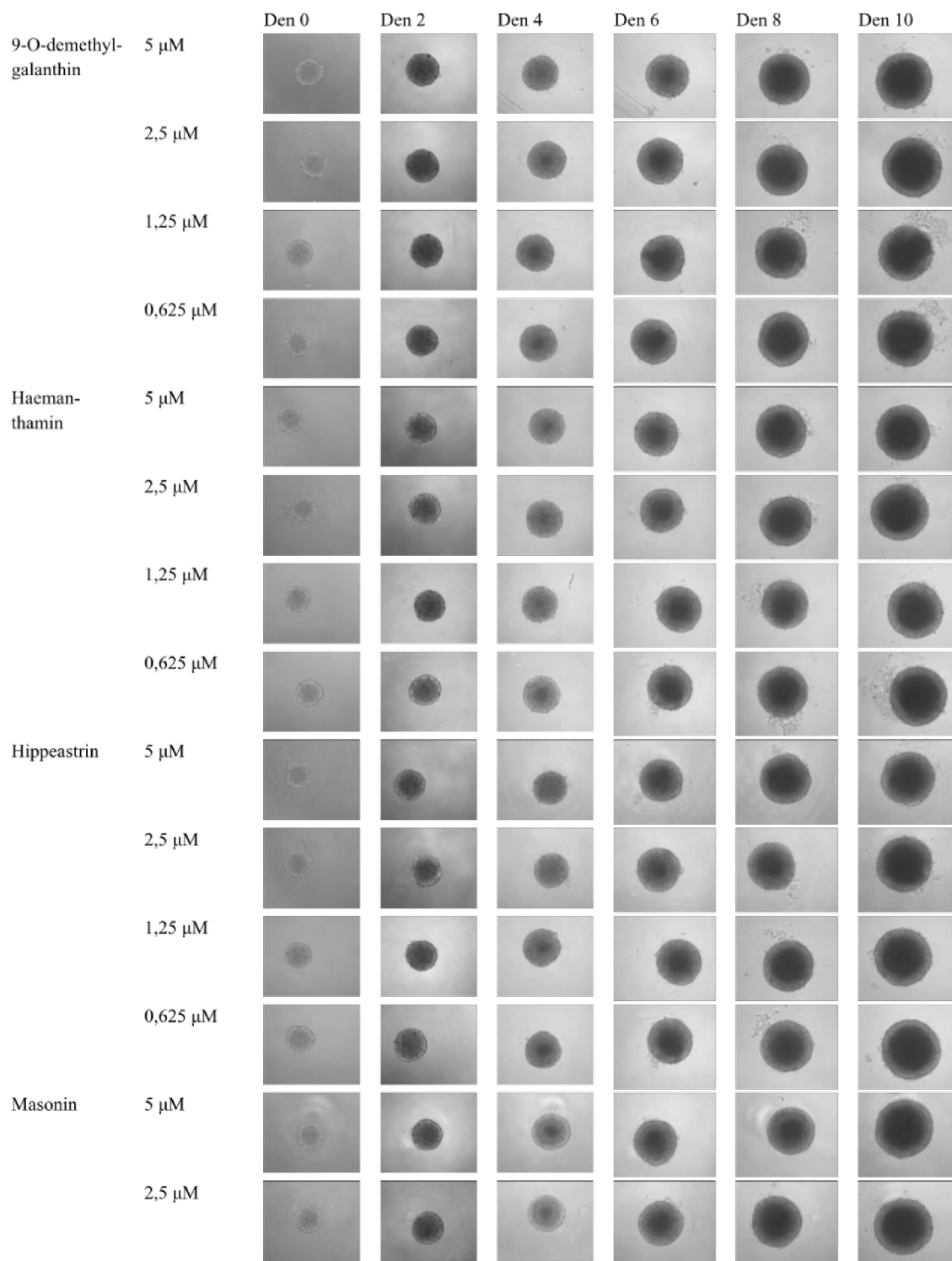
Obrázek 6d: Grafické znázornění růstu 3D sféroidů tvořených buněčnou linií HT29 v závislosti na dávce a času. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Testovaný alkaloid 9-O-demethylgalanthin by sledován postupně 0, 2, 4, 6, 8 a 10 den před opětovným přidáním testované látky.



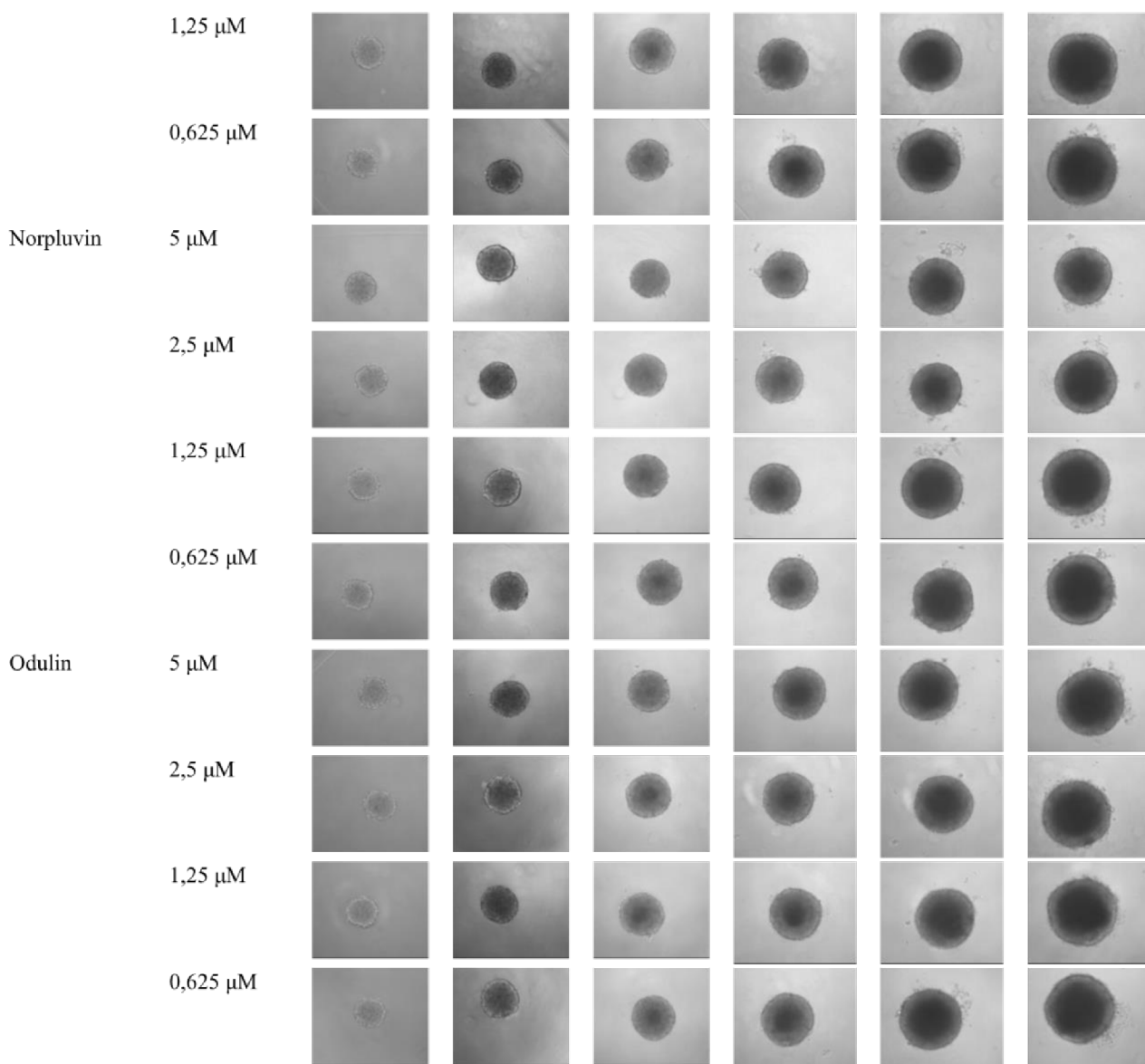
Obrázek 6e: Grafické znázornění růstu 3D sféroidů tvořených buněčnou linií HT29 v závislosti na dávce a času. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Testovaný alkaloid masonin by sledován postupně 0, 2, 4, 6, 8 a 10 den před opětovným přidáním testované látky.



Obrázek 6f: Grafické znázornění růstu 3D sféroidů tvořených buněčnou linií HT29 v závislosti na dávce a času. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Testovaný alkaloid haemantamin by sledován postupně 0, 2, 4, 6, 8 a 10 den před opětovným přidáním testované látky.



Obrázek 7a: Znázornění růstu sféroidů v čase a v závislosti na koncentraci testované látky. Sféroidy tvořené buněčnou linií HT29 při použití 10× /0.3 objektivu.



Obrázek 7b: Znázornění růstu sféroidů v čase a v závislosti na koncentraci testované látky. Sféroidy tvořené buněčnou linií HT29 při použití 10× /0.3 objektivu.

6 Diskuze

Celosvětově se nádorová onemocnění řadí na druhé místo v příčině úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocnění (Siegel et al. 2020). Například v České republice zemřelo v roce 2020 na nádorová onemocnění 28 000 lidí z toho přes 3 000 lidí zemřelo na kolorektální karcinom (ÚZIS 2020). Nádorová onemocnění vznikají takzvanou karcinogenezi, což je sled změn normálních buněk, které se vyvíjí a vznikají z nich buňky nádorové. Tyto pochody v těle ovlivňují z 80 % exogenní faktory – vliv životního prostředí, strava jedince, expozice virům a chemickým látkám, požívání alkoholu a kouření; zbývajících 20 % je přičítáno genetickým a mutačním predispozicím (Hofmanová 2013; Lewandowska et al. 2019; Thanikachalam & Khan 2019). Problémem u nádorových onemocnění je pozdní diagnostika, proto mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International agency for research on cancer 2014) vydala 12 doporučení pro zdravější životní styl (viz kapitola 3.3.2 Faktory ovlivňující nádorová onemocnění).

U nádorových onemocnění se k léčbě nejčastěji využívá cíleného radiačního záření, chemoterapie nebo chirurgických zákroků či kombinací výše uvedených metod (Biller & Schrag 2021). Nejčastěji používanou léčbu je chemoterapie při níž jsou užívána léčiva zvaná cytostatika, nicméně různá omezení často snižují jejich účinnost, a proto výzkumníci zkoumají bezpečnější a účinnější formy chemoterapeutických léčiv jako jsou například rostlinné alkaloidy z čeledi *Amaryllidaceae*. U alkaloidů bylo prokázána inhibice mitózy a metafáze, cytostatické, cytotoxické a selektivní účinky na nádorové buňky a naopak na zdravé buňky mají jen minimální vedlejší účinky (Khan et al. 2022). Dále mají alkaloidy z pozitivních účinků prokázány antioxidační, antinociceptivní, antiproliferační, antipyretické, antiastmatické, protizánětlivé a antibakteriální účinky. Mezi alkaloidy, u kterých byly tyto účinky prokázány patří běžně používaný vinblastin, vinkristin či vinorelbin, který byl v naší práci použit jako standart.

V rámci našeho pokusu nevykazovali testované alkaloidy významnou schopnost inhibovat růst sféroidů v nižších koncentracích. Obdobných výsledků dosahál i Doskočil et al. (2015), který testoval schodné látky pomocí klasické 2D metody využívají tetrazilové soli. A nebyla u nich zaznamenána výrazná toxicita pod $1 \mu\text{M}$. Nebylo tomu tak ale u haemantaminu, který ve studii Doskočil et al. (2015), měl hodnotu IC_{50} ($0,59 \pm 0,01 \mu\text{M}$), neproti tomu Luo et al. (2012), uvádí hodnotu IC_{50} u haemantaminu v průměru $2,66 \mu\text{M}$. Z tohoto důvodu jsme předpokládali, že haemantamin bude mít schopnost inhibovat růst sféroidů na stejné buněčné linie. V rámci testu však došlo naopak k buněčné proliferaci a zvětšení objemu sféroidů při koncentracích $1,25$ a $0,625 \mu\text{M}$. Při koncentraci $5 \mu\text{M}$ byl růst obdobný jako u kontroly, která nebyla ničím ošetřena.

Obdobně tomu bylo i u dalších látek, které taktéž nevykazovaly schopnost inhibovat růst sféroidů. A není u nich zazanemaná aktivita ani pomocí klasických metod (Luo et al. 2012; Doskočil et al. 2015).

7 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na testování schopnosti inhibovat růst 3D buněčných sféroidů pomocí alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* na buněčných liniích kolorektálního karcinomu. Ze získaných výsledků je patrné, že testované látky nevykazují výraznou schopnost inhibovat buněčný růst. Dle dostupných snímků je otázka, zda tyto látky mohou podporovat nebo naopak inhibovat buněčnou nekrózu ve středu sféroidů. K získání takových poznatků bohužel laboratoř na ČZU nedisponuje nutnými prostředky, jako je moderní inverzní fluorescenční mikroskop, který by mohl poskytovat údaje na světové úrovni.

8 Literatura

- Akkoca A N, Yanik S, Ozdemir Z T, Cihan F G, Sayar S, Cincin T G, Cam A, Ozer C. 2014. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* **7**: 2828–35.
- Alsheredah N, Akhtar S. 2018. Diet, obesity and colorectal carcinoma risk: results from a national cancer registry-based middle-eastern study. *BMC Cancer* **18** (1227). DOI: 10.1186/s12885-018-5132-9
- Arab L. 2010. Epidemiologic Evidence on Coffee and Cancer. *Nutrition and Cancer* **62**: 271–283.
- Arnold M, Sierra M S, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**: 683–691.
- Arshad A, Isherwood J, Dennison A. 2015. Could omega-3 fatty acids improve quality of life in cancer patients? *Future Oncology* **11**: 3225–3228.
- Aykan, N F. 2015. Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncology Reviews* **9**: 38–44.
- Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F, 2019. Global Trend of Breast Cancer Mortality Rate: A 25-Year Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **20**: 2015–2020.
- Baerheim Svendsen A, Verpoorte R. 1983. Chapter 4 Isolation of Alkaloids. pp. 51–58. DOI: 10.1016/S0301-4770(08)60904-5
- Barrubés L, Babio N, Becerra-Tomás N, Rosique-Esteban N, Salas-Salvadó J. 2019. Association Between Dairy Product Consumption and Colorectal Cancer Risk in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *American society for nutrition* 190–211.
- Bashyam M D, Animireddy S, Bala P, Naz A, George S A. 2019. The Yin and Yang of cancer genes. *Gene* (e704). DOI: 10.1016/j.gene.2019.04.025
- Berkov S, Osorio E, Viladomat F, Bastida J. 2020a. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. pp. 113–185. DOI: 10.1016/bs.alkal.2019.10.002
- Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. 2020. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences* (e6225) DOI: 10.3390/ijms21176225
- Biller L H, Schrag D. 2021. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA* (e669) DOI: 10.1001/jama.2021.0106
- Bojková B, Winklewski P J, Wszedybyl-Winklewska M 2020. Dietary Fat and Cancer—Which Is Good, Which Is Bad, and the Body of Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* (e4114) DOI: 10.3390/ijms21114114
- Botteri E, Borroni E, Sloan E K, Bagnardi V, Bosetti C, Peveri G, Santucci C, Specchia C, van den Brandt P, Gallus S, Lugo A. 2020. Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* **115**: 1940–1949.
- Bradbury K E, Murphy N, Key T J. 2020. Diet and colorectal cancer in UK Biobank: A prospective study. *International Journal of Epidemiology* **49**: 246–258.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**: 394–424.
- Brenner H, Kloor M, Pox C P. 2014. Colorectal cancer. *The Lancet* **383**:1490–1502.
- Brooks P J, Zakhari S. 2014. Acetaldehyde and the genome: Beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **55**: 77–91.
- Brown G. 2021. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* (e9667). DOI: 10.3390/ijms22189667

- Cahlíková L, Kawano I, Řezáčová M, Blunden G, Hulcová D, Havelek R. 2021. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochemistry Reviews* **20**: 303–323.
- Carter B D, Abnet C C, Feskanich D, Freedman N D, Hartge P, Lewis C E, Ockene J K, Prentice R L, Speizer F E, Thun M J, Jacobs E J. 2015. Smoking and Mortality — Beyond Established Causes. *New England Journal of Medicine* **372**: 631–640.
- ČSÚ. 2021. Covid-19 byl vloni druhou nejčastější příčinou smrti. Praha 10. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/covid-19-byl-vloni-druhou-nejcastejsi-pricinou-smrti> (accessed December 2021).
- Chatzinikolaidou M, 2016. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discovery Today* **21**:1553–1560.
- Costa E C, Moreira A F, de Melo-Diogo D, Gaspar V M, Carvalho M P, Correia I J. 2016. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
- Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. 2013. ALKALOIDY ROSTLIN Čeledi AMARYLLIDACEAE JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ. *Chem. Listy* **107**: 701–708.
- di Lonardo A, Nasi S, Pulciani S. 2015. Cancer: We should not forget the past. *J Cancer* **6**: 29–39.
- DiGiovanni J. 1992. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology & Therapeutics* (e54). DOI: 10.1016/0163-7258(92)90051-Z
- Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelek R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková, L. 2015. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* **13**: 394–398.
- Dymek A, Mroczek T. 2021. Methods of isolation and bioactivity of alkaloids obtained from selected species belonging to the Amaryllidaceae and Lycopodiaceae families. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* **34**: 81–86.
- Edmondson R, Broglie J J, Adcock A F, Yang L. 2014. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies* **12**: 207–218.
- Farah A, dePaula Lima J. 2019. Consumption of Chlorogenic Acids through Coffee and Health Implications. *Beverages* **5**: 11.
- Farinetti A, Zurlo V, Manenti A, Coppi F, Mattioli A V. 2017. Mediterranean diet and colorectal cancer: A systematic review. *Nutrition* (e43–44) DOI: 10.1016/j.nut.2017.06.008
- Fleming M, Ravula S, Tatishchev S F, Wang H L. 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* **3**: 153–73.
- Fu Y, Wang Y, Gao H, Li D, Jiang R, Ge L, Tong C, Xu K. 2021. Associations among Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, the Gut Microbiota, and Intestinal Immunity. *Mediators of Inflammation* 2021 (e 8879227)
- Gao L, Feng Y, Ge C, Xu X, Wang S, Li X, Zhang K, Wang C, Dai F, Xie S. 2021. Identification of molecular anti-metastasis mechanisms of lycorine in colorectal cancer by RNA-seq analysis. *Phytomedicine* (e 153530) DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153530
- Goiffon R J, O’Shea A, Harisinghani M G. 2021. Advances in radiological staging of colorectal cancer. *Clinical Radiology* **76**: 879–888.
- Gram I T, Park S Y, Wilkens L R, Haiman C A, le Marchand L, Wilkens R, Le L. 2020. Smoking and Risk of Colorectal Cancer may differ by Anatomical Subsite and Sex. **189**: 543-553.
- Gupta P K. 2020. Problem Solving Questions in Toxicology: Problem Solving Questions in Toxicology: Springer International Publishing.

- Havelek R, Královec K, Cahlíková L. 2014. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* **9**: 701–708.
- Havelek R, Muthna D, Tomsík P, Kralovec K, Seifrtová M, Cahlíková L, Hostalková A, Safratová M, Perwein M, Cermáková E, Rezacová M. 2017. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions* **275**: 121–132.
- Hofmanová J. 2013. Genotoxicita a karcinogeneze. Masarykova univerzita, Brno.
- Holubec L. 2004. Kolorektální karcinom : současné možnosti diagnostiky a léčby. Praha Grada, Praha .
- IARC. 2015. IARC: Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. International agency for research on cancer. European code against cancer Available from https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/pr240_E.pdf (accessed November 2021).
- Islam Z, Akter S, Kashino I, Mizoue T, Sawada N, Mori N, Yamagiwa Y, Tsugane S, Naito M, Tamakoshi A, Wada K, Nagata C, Sugawara Y, Tsuji I, Matsuo K, Ito H, Lin Y, Kitamura Y, Sadakane A, Tanaka K, Shimazu T, Inoue M, Iwasaki M, Muto M, Saito E, Yamaji T, Charvat H, Otani T, Sasazuki S, Nishino Y, Tsubono Y, Nomura S, Suzuki H, Oze I, Wakai K, Nakayama T, Ozasa K, Utada M. 2019. Meat subtypes and colorectal cancer risk: A pooled analysis of 6 cohort studies in Japan. *Cancer Science* **110**: 3603–3614.
- Jaremicz Z, Luczkiewicz M, Kokotkiewicz A, Krolicka A, Sowinski P. 2014. Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. *Biotechnology Letters* **36**: 843–853.
- Jin M, Frankel W L. 2018. Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* **27**: 401–412.
- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2016. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*.
- Karlíková M, Topolčan O, Svobodová Š. 2020. Nádorové markery. Postudium.
- Keum N, Giovannucci E. 2019. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **16**: 713–732.
- Khan H, Alam W, Alsharif K F, Aschner M, Pervez S, Saso L. 2022. Alkaloids and Colon Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications for Cell Cycle Arrest. *Molecules* **27**: 920.
- Kim J H. 2015. Chemotherapy for colorectal cancer in the elderly. *World Journal of Gastroenterology* **21**: 5158.
- Klaunig J E, Wang Z. 2018. Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology* **7**: 116–121.
- Klener P jr, Klener P. 2013. Principy systémové protinádorové léčby. Grada publishing, a.s., Praha.
- Kontomanolis E N, Koutras A, Syllasios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. 2020. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research* **40**: 6009–6015.
- Krejčí D, Pehalová L, Talábová A, Pokorová K, Katinová I, Mužík J, Dušek L. 2018. Novotvary 2018 – Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice. ÚZIS, Praha
- Kukula-Koch W A, Widelski J. 2017. Alkaloids, in: *Pharmacognosy*. Elsevier. **3**: 163–198.

- Lakkis N A, El-Kibbi O, Osman M H. 2021. Colorectal Cancer in Lebanon: Incidence, Temporal Trends, and Comparison to Regional and Western Countries. *Cancer Control* (e 28) DOI: 10.1177/1073274821996869
- Lau W Y, Lai E C H. 2008. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **7**: 237–57.
- Lea D, Håland S, Hagland H R, Søreide K. 2014. Accuracy of TNM staging in colorectal cancer: a review of current culprits, the modern role of morphology and stepping-stones for improvements in the molecular era. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **49**: 1153–1163.
- Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodebski I W. 2016. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World Journal of Gastroenterology* **22**: 1745–1755.
- Lee J, Jeon J Y, Meyerhardt J A. 2015. Diet and Lifestyle in Survivors of Colorectal Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **29**: 1–27.
- Lee K A, Ma W, Sikavi D R, Drew D A, Nguyen L H, Bowyer R C E, Cardoso M J, Fall T, Freidin M B, Gomez M, Graham M, Guo C G, Joshi A D, Kwon S, Lo C H, Lochlainn M N, Menni C, Murray B, Mehta R, Song M, Sudre C H, Bataille V, Varsavsky T, Visconti A, Franks P W, Wolf J, Steves C J, Ourselin S, Spector T D, Chan A T. 2021. Cancer and Risk of COVID-19 Through a General Community Survey. *The Oncologist* (e182–e185) DOI: 10.1634/theoncologist.2020-0572
- Leufkens A M, van Duijnhoven F J B, Woudt S H S, Siersema P D, Jenab M, Jansen E H J M, Pischon T, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Boutron-Ruault M C, Clavel-Chapelon F, Morois S, Palli D, Pala V, Tumino R, Vineis P, Panico S, Kaaks R, Lukanova A, Boeing H, Aleksandrova K, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Dilis V, Peeters P H, Skeie G, Gonzalez C A, Arguelles M, Sanchez M J, Dorronsoro M, Huerta J M, Ardanaz E, Hallmans G, Palmqvist R, Khaw K T, Wareham N, Allen N E, Crowe F L, Fedirko V, Norat T, Riboli E, Bueno-de-Mesquita H B. 2012. Biomarkers of Oxidative Stress and Risk of Developing Colorectal Cancer: A Cohort-nested Case-Control Study in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition. *American Journal of Epidemiology* **175**: 653–663.
- Lewandowska A M, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. 2019. Environmental risk factors for cancer-review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **26**: 1–7.
- Li J. 2014. TNM staging of colorectal cancer should be reconsidered by T stage weighting. *World Journal of Gastroenterology* **20**: 5104.
- Lin S, Li Y, Zamyatnin A A, Werner J, Bazhin A. 2018. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology* **233**: 5119–5132.
- Lu J J, Bao J L, Chen X P, Huang M, Wang Y T. 2012. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**: 1–12.
- Luo Z, Wang F, Zhang J, Li X, Zhang M, Hao X, Xue Y, Li Y, Horgen F D, Yao G, Zhang Y. 2012. Cytotoxic Alkaloids from the Whole Plants of *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products* **75**: 2113–2120.
- Mandal P. 2017. Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **390**: 557–565.
- McCullough M L, Gapstur S M, Shah R, Jacobs E J, Campbell P T. 2013. Association between red and processed meat intake and mortality among colorectal cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology* **31**: 2773–2782.
- McNabb S, Harrison T A, Albanes D, Berndt S I, Brenner H, Caan B J, Campbell P T, Cao Y, Chang-Claude J, Chan A, Chen Z, English D R, Giles G G, Giovannucci E L, Goodman

- P J, Hayes R B, Hoffmeister M, Jacobs E J, Joshi A D, Larsson S C, le Marchand L, Li L, Lin Y, Männistö S, Milne R L, Nan H, Newton C C, Ogino S, Parfrey P S, Petersen P S, Potter J D, Schoen R E, Slattery M L, Su Y, Tangen C M, Tucker T C, Weinstein S J, White E, Wolk A, Woods M O, Phipps A I, Peters U. 2020. Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer. *International Journal of Cancer* **146**: 861–873.
- Mehta V, Goel S, Kabarriti R, Cole D, Goldfinger M, Acuna-Villaorduna A, Pradhan K, Thota R, Reissman S, Sparano J A, Gartrell B A, Smith R, Ohri N, Garg M, Racine A D, Kalnicki S, Perez-Soler R, Halmos B, Verma A. 2020. Case Fatality Rate of Cancer Patients with COVID-19 in a New York Hospital System. *Cancer Discovery* **10** 935–941.
- Meng Y, Lu W, Guo E, Liu J, Yang B, Wu Ping Lin S, Peng T, Fu Y, Li F, Wang Z, Li Y, Xiao R, Liu C, Huang Y, Lu F, Wu X, You L, Ma D, Sun C, Wu Peng Chen G. 2020. Cancer history is an independent risk factor for mortality in hospitalized COVID-19 patients: a propensity score-matched analysis. *Journal of Hematology & Oncology* **13**: 75.
- Moindjie H, Rodrigues-Ferreira S, Nahmias C. 2021. Mitochondrial metabolism in carcinogenesis and cancer therapy. *Cancers (Basel)* (e 13)
DOI: 10.3390/cancers13133311
- Murauer A, Ganzera M. 2018. Quantitative determination of major alkaloids in Cinchona bark by Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1554**: 117–122.
- Nadege B. 2009. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience Volume*, (e 4015) DOI: 10.2741/3509
- Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi M. 2016. Tumor markers: A diagnostic tool. *National Journal of Maxillofacial Surgery* **7**: 17-20.
- Oksman-Caldentey K M, Vuorela H, Strauß A, Hiltunen R. 1987. Variation in the Tropane Alkaloid Content of *Hyoscyamus muticus* Plants and Cell Culture Clones. *Planta Medica* **53**: 349–354.
- Plawski A, Banasiewicz T, Borun P, Kubaszewski L, Krokowicz P, Skrzypczak-Zielinska M, Lubinski J. 2013. Familial adenomatous polyposis of the colon. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* **11**: 15.
- Poole R, Kennedy O J, Roderick P, Fallowfield J A, Hayes P C, Parkes J. 2017. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ* (e 359) DOI: 10.1136/bmj.j5024
- Puhr M, Hofer J, Eigentler A, Ploner C, Handle F, Schaefer G, Kroon J, Leo A, Heidegger I, Eder I, Culig Z, van der Pluijm G, Klocker H. 2018. The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. *Clinical Cancer Research* **24**: 927–938
- Reddy B S. 2002. Types and Amount of Dietary Fat and Colon Cancer Risk: Prevention by Omega-3 Fatty Acid-Rich Diets, *Environmental Health and Preventive Medicine*.
- Rodrigues T, Kundu B, Silva-Correia J, Kundu S C, Oliveira J M, Reis R L, Correlo V M. 2018. Emerging tumor spheroids technologies for 3D in vitro cancer modeling. *Pharmacology and Therapeutics*.
- Rozich N S, Blair A B, Burkhart R A. 2020. Organoids in: Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers. Elsevier.
- Rumgay H, Shield K, Charvat H, Ferrari P, Sornpaisarn B, Obot I, Islami F, Lemmens V E P P, Rehm J, Soerjomataram I. 2021. Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study. *The Lancet Oncology* **22**: 1071–1080.
- Sadeghi Ekbatan S, Li X Q, Ghorbani M, Azadi B, Kubow S. 2018. Chlorogenic Acid and Its Microbial Metabolites Exert Anti-Proliferative Effects, S-Phase Cell-Cycle Arrest and

- Apoptosis in Human Colon Cancer Caco-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 723.
- Saliba W, Rennert H S, Gronich N, Gruber S B, Rennert G. 2019. Red meat and processed meat intake and risk of colorectal cancer: a population-based case-control study. *Eur J Cancer Prev* **28**: 287–293.
- Sant S, Johnston P A. 2017. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies* **23**: 27–36.
- Sanyal S. 2014. Introduction Culture and Assay Systems Used for 3D Cell Culture.
- Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis J R, Brunet-Vega A, Gabaldón T. 2019. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Molecular Aspects of Medicine* **69**: 93–106.
- Schieber M, Chandel N S. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* **24**:453–462.
- Schmit S L, Rennert H S, Rennert G, Gruber S B. 2016. Coffee consumption and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **25**: 634–639.
- Seesaha P K, Chen X, Wu X, Xu H, Li C, Jheengut Y, Zhao F, Liu L, Zhang D. 2020. The interplay between dietary factors, gut microbiome and colorectal cancer: a new era of colorectal cancer prevention. *Future Oncology* **16**: 293–306
- Sibanyoni M N, Chaudhary S K, Chen W, Adhami H R, Combrinck S, Maharaj V, Schuster D, Viljoen A. 2020. Isolation, in vitro evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae. *Fitoterapia* **146**: 104650.
- Siegel R L, Jakubowski C D, Fedewa S A, Davis A, Azad N S. 2020. Colorectal Cancer in the Young: Epidemiology, Prevention, Management. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* (e75–e88) DOI: 10.1200/EDBK_279901
- Siegel R L, Miller K D, Jemal A. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **70**: 7–30.
- Šimová J, Habermann V. 2001. Alkaloidy: malé laboratorní praktikum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, Praha.
- Slattery M L, Curtin K, Anderson K, Ma K N, Ballard L, Edwards S, Schaffer D, Potter J, Leppert M, Samowitz W S. 2000. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *J Natl Cancer Inst* **92**: 1831–1836.
- Sofi F, Abbate R, Gensini G F, Casini A. 2010. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* **92**: 1189–1196.
- Song M, Garrett W S, Chan A T. 2015. Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology* (e16) DOI: 10.1053/j.gastro.2014.12.035
- Stewart B W, Wild C P. 2014. World cancer report 2014.
- Stojcev Z, Borun P, Hermann J, Krokowicz P, Cichy W, Kubaszewski L, Banasiewicz T, Plawski A. 2013. Hamartomatous polyposis syndromes. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* **11**: 4.
- Thanikachalam K, Khan G. 2019. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* **11**: 164.
- Thomas A M, Manghi P, Asnicar F, Pasolli E, Armanini F, Zolfo M, Beghini F, Manara S, Karcher N, Pozzi C, Gandini S, Serrano D, Tarallo S, Francavilla A, Gallo G, Trompetto M, Ferrero G, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Shibata T, Yachida S, Yamada T, Wirbel J, Schrotz-King P, Ulrich C M, Brenner H, Arumugam M, Bork P, Zeller G, Cordero F, Dias-Neto E, Setubal J C, Tett A, Pardini B, Rescigno M, Waldron L, Naccarati A, Segata N. 2019. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nature Medicine* **25**: 667–678.

- Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong L H, Roebert J, Christie M, Tacey M. 2015. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology* 1715–1722.
- Tsimberidou A M, Fountzilas E, Nikanjam M, Kurzrock R. 2020. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treatment Reviews* **86**: 102019.
- Tsoi K K F, Pau C Y Y, Wu W K K, Chan F K L, Griffiths S, Sung J J Y. 2009. Cigarette Smoking and the Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (e5) DOI: 10.1016/j.cgh.2009.02.016
- Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. 2020. Zemřelí 1–169.
- Valík D, Nekulová M, Zdražilová Dubská L, Malbohan I, Springer D, Zima T, Topolčan O, Fuchsová R, Svobodová Š. 2014. Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus* **43**: 22–39.
- Vaněčková N, Hošťálková A, Šafratová M, Kuneš J, Hulcová D, Hrabínová M, Doskočil I, Štěpánková Š, Opletal L, Nováková L, Jun D, Chlebek J, Cahlíková L. 2016. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances* **6**: 80114–80120.
- Volpato M, Hull M A. 2018. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **37**: 545–555.
- Ward E M, DeSantis C E, Lin C C, Kramer J L, Jemal A, Kohler B, Brawley O W, Gansler T. 2015. Cancer statistics: Breast cancer in situ. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **65**: 481–495.
- Winkels R M, van Duijnhoven F J, Heine-Bröring R C, Kampman E. 2013. Diet and colorectal cancer risk and survival. *Colorectal Cancer* **2**: 43–50.
- Wirbel J, Pyl P T, Kartal E, Zych K, Kashani A, Milanese A, Fleck J S, Voigt A Y, Palleja A, Ponnudurai R, Sunagawa S, Coelho L P, Schrotz-King P, Vogtmann E, Habermann N, Niméus E, Thomas A M, Manghi P, Gandini S, Serrano D, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Shibata T, Yachida S, Yamada T, Waldron L, Naccarati A, Segata N, Sinha R, Ulrich C M, Brenner H, Arumugam M, Bork P, Zeller G. 2019. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nature Medicine* **25**: 679–689.
- Yamada K M, Cukierman E. 2007. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell* **130**: 601–610
- Zavoral M. 2019. Časný kolorektální karcinom (klinická stádia I. a II.) diagnostika a léčba.
- Zavoral M, Grega T, Suchánek Š. 2016. Komplikace léčby kolorektálního karcinomu. *Onkologie* **10**: 41–47.
- Zavoral M, Vojtěchová G, Suchánek Š. 2013. Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 172–175.
- Jech Z, Hoch J. 2004. CHIRURGICKÁ LÉČBA KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU. *Interní medicína pro praxi* **2**: 81–84.
- Zheng J, Stuff J, Tang H, Hassan M M, Daniel C R, Li D. 2019. Dietary N-nitroso compounds and risk of pancreatic cancer: results from a large case–control study. *Carcinogenesis* **40**: 254–262.
- Zhu Y, Wang P P, Zhao Jing Green R, Sun Z, Roebathan B, Squires J, Buehler S, Dicks E, Zhao Jinhui Cotterchio M, Campbell P T, Jain M, Parfrey P S, McLaughlin J R. 2014. Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case–control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. *British Journal of Nutrition* **111**: 1109–1117.