

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



***In cellulo* antiproliferační aktivita léčivých rostlin  
z peruánské Amazonie**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Lucie Červenková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, PhD.**

**© 2018 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "*In cellulo* antiproliferační aktivita léčivých rostlin z peruánské Amazonie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4. 2018

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za ochotu, věnovaný čas, trpělivé konzultace a odborné vedení při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janu Tauchenovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků léčivých rostlin.

# ***In cellulo* antiproliferační aktivita léčivých rostlin z peruánské Amazonie**

## **Souhrn**

Nádorová onemocnění jsou celosvětově nejčastěji diagnostikovaným onemocněním. V roce 2012 to bylo 14,1 milionů nových případů a v roce 2015 na ně zemřelo 8,8 milionu lidí, přičemž se předpokládá, že tato čísla budou i nadále stoupat. Z tohoto důvodu je cílem vědců a lékařů porozumění veškerým principům nádorových onemocnění a především vývoj specifických protinádorových léků, jejichž slibným zdrojem mohou být léčivé rostliny obsahující bioaktivní látky, především potom ty, které byly a jsou využívány původními obyvateli a domorodými komunitami v tradičním lidovém léčitelství.

Cílem této diplomové práce bylo, na buněčných liniích kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT-29), hepatokarcinomu (Hep-G2) a normálních plicních fibroblastech (MRC-5), stanovit *in cellulo* antiproliferační aktivitu léčivých rostlin z peruánské Amazonie. Bylo testováno 9 rostlin a jejich nadzemní části, u jedné rostliny byla testována i cibule, ze kterých byly připraveny metanolové extrakty. K testu byla použita metoda MTT využívající tetrazol bromid, který tvoří fialové krystaly v mitochondriích živých buněk. Výsledky byly následně vyhodnoceny proti neošetřené kontrole.

Výrazná cytotoxicita nebyla stanovena u žádného z testovaných rostlinných druhů. U tří vzorků byla zjištěna mírná cytotoxicita ( $IC_{50} = 2 - 89 \mu\text{g/ml}$ ) a to u *Alternanthera flavescens* s  $IC_{50} = 79,40 \pm 6,60 \mu\text{g/ml}$  (Hep-G2), dále u *Dysphania ambrosioides* s  $IC_{50} = 69,90 \pm 9,00 \mu\text{g/ml}$  (HT-29) a *Petiveria alliacea* (Mucura macho) s  $IC_{50} = 81,10 \pm 2,80 \mu\text{g/ml}$  (HT-29). Ostatní zkoumané extrakty neprokázaly cytotoxicitu ( $IC_{50} > 90 \mu\text{g/ml}$ ) na testovaných buněčných liniích.

Námi testované vzorky nemají výrazné cytotoxické účinky na nádorové buněčné linie Caco-2, HT-29 a Hep-G2. Neprokázaly ani vysokou selektivitu mezi normálními a nádorovými buněčnými liniemi.

**Klíčová slova:** cytotoxicita; buněčné linie; MTT; léčivé rostliny; peruánská Amazonie

# ***In cellulo* antiproliferative activity of medicinal plants from the Peruvian Amazon**

## **Summary**

Cancer is the most commonly diagnosed disease worldwide with 14.1 millions of new cases in 2012, and 8.8 millions of deaths in 2015. These numbers are expected to increase even further. For this reason, the goal of scientists and doctors is to understand all principles of cancer, and especially to develop specific anti-cancer drugs. The promising source of which may be medicinal plants containing bioactive substances, mainly those used by indigenous people in traditional folk medicine.

The aim of this work was to determine *in cellulo* antiproliferative activity of medicinal plants from the Peruvian Amazon against human colorectal carcinoma (Caco-2 and HT-29), hepatocarcinoma (Hep-G2) and normal pulmonary fibroblasts (MRC-5) cell lines. Methanolic extracts from 9 plants and their aerial parts and 1 bulb were tested. The MTT method, utilizing tetrazole bromide forming violet crystals in live cell mitochondria, was used for the assay. The results were subsequently evaluated against untreated control. Significant cytotoxicity was not observed in any of the tested plant species. Three samples showed moderate cytotoxicity ( $IC_{50} = 2 - 89 \mu\text{g/ml}$ ), namely *Alternanthera flavescens* with  $IC_{50} = 79.40 \pm 6.60 \mu\text{g/ml}$  (Hep-G2), *Dysphania ambrosioides* with  $IC_{50} = 69.90 \pm 9.00 \mu\text{g/ml}$  (HT-29) and *Petiveria alliacea* (Mucura macho) with  $IC_{50} = 81.10 \pm 2.80 \mu\text{g/ml}$  (HT-29). The other extracts examined did not show cytotoxicity ( $IC_{50} > 90 \mu\text{g/ml}$ ) against the tested cell lines.

Our samples do not have significant cytotoxic effects on Caco-2, HT-29 and Hep-G2 cancer cell lines. They have not even shown high selectivity between normal and cancer cell lines.

**Keywords:** cytotoxicity, cell lines, MTT, medicinal plants, Peruvian Amazon

## Obsah:

<b>1.</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíl práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3.</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
3.1.	Nádorová onemocnění .....	3
3.2.	Faktory ovlivňující vznik nádorových onemocnění .....	5
3.2.1	Endogenní faktory vzniku nádorových onemocnění .....	5
3.2.1.1	Dědičné mutace DNA.....	5
3.2.1.2	Oxidační stres .....	5
3.2.1.3	Záněty a infekce .....	7
3.2.2	Exogenní faktory vzniku nádorových onemocnění .....	8
3.3.	Vybrané typy nádorových onemocnění .....	8
3.3.1	Karcinom plic .....	8
3.3.2	Kolorektální karcinom .....	9
3.3.1	Karcinom jater .....	10
3.4.	Nádorová onemocnění v ČR a ve světě .....	12
3.5.	Moderní přístupy v léčbě nádorových onemocnění.....	13
3.5.1	Chemoterapie .....	13
3.6.	Tradiční medicína .....	16
3.6.1	Etnomedicína v peruánské Amazonii .....	16
3.6.1.1	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A. Gentry .....	19
3.6.1.2	<i>Petiveria alliacea</i> L. ....	20
3.6.1.3	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants.....	21
3.6.1.4	<i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze.....	22
3.6.1.5	<i>Alternanthera flavescens</i> Kunth .....	23
3.6.1.6	<i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) R.M.King & H.Rob.....	24
3.6.1.7	<i>Phyllanthus niruri</i> L. ....	25

3.6.1.8	<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb. ....	26
<b>4.</b>	<b>Materiál a metodika.....</b>	<b>28</b>
4.1.	Materiál .....	28
4.2.	Metodika .....	28
4.2.1	Příprava extraktů.....	28
4.2.2	Kultivace buněčných linií .....	29
4.2.3	Test cytotoxicity .....	29
4.3.	Statistické vyhodnocení .....	30
<b>5.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>40</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>41</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>57</b>

# 1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou celosvětovým problémem veřejného zdraví a patří mezi nejčastěji diagnostikovaná onemocnění. V roce 2012 to bylo 14,1 milionu nových případů. Více než 40 % ze všech diagnostikovaných případů po celém světě představují nádorová onemocnění plic, prsu, tlustého střeva a žaludku. Tato onemocnění jsou také celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2012 na ně zemřelo 8,2 milionu lidí a v roce 2015 to bylo dokonce 8,8 milionu. Tyto alarmující statistiky nutí vědce k neustálému výzkumu původu a léčby nádorových onemocnění. Cílem je přesné porozumění veškerým principům nádorových onemocnění a vývoj specifických protinádorových léků.

Významným prvkem léčby je chemoterapie, tedy léčba nádoru pomocí cytotoxických látek, které ovlivňují buněčný cyklus nádorových buněk a působí na ně antiproliferačně. Vývoj léků z potencionálně léčivých rostlin hraje v léčbě důležitou roli a představuje také podstatnou část nových léčiv. Testovány jsou surové výtažky z léčivých rostlin za účelem objevení a izolace sloučenin, které vykazují biologickou aktivitu.

Mezi takové patří i léčivé rostliny z peruánské Amazonie. Peru je, díky Amazonskému pralesu, charakterizováno jako země s jednou z nejvyšších biodiverzit na světě. Domorodé kmeny zde mají dlouhou historii využívání rostlin pro léčbu nemocí a tyto praktické znalosti byly přenášeny různými způsoby z generace na generaci. Výzkum dalších rostlinných druhů, využívaných v tradičním lidovém léčitelství v oblasti léčby nádorových onemocnění, by mohl poskytnout zajímavé informace a vést k vývoji nových léčiv.



## 2. Vědecká hypotéza a cíl práce

Hypotézou je, že některé doposud netestované druhy léčivých rostlin z Amazonie mohou mít výrazný cytotoxický efekt vůči nádorovým buněčným liniím.

Cílem práce je otestování doposud netestovaných léčivých rostlin z peruánské Amazonie na jejich cytotoxické účinky vůči panelu lidských buněčných linií. Následně z nich vybrat potencionálně účinné druhy u kterých bude provedena separace na jednotlivé látky. Ty budou následně testovány na svou cytotoxickou aktivitu.

### 3. Literární rešerše

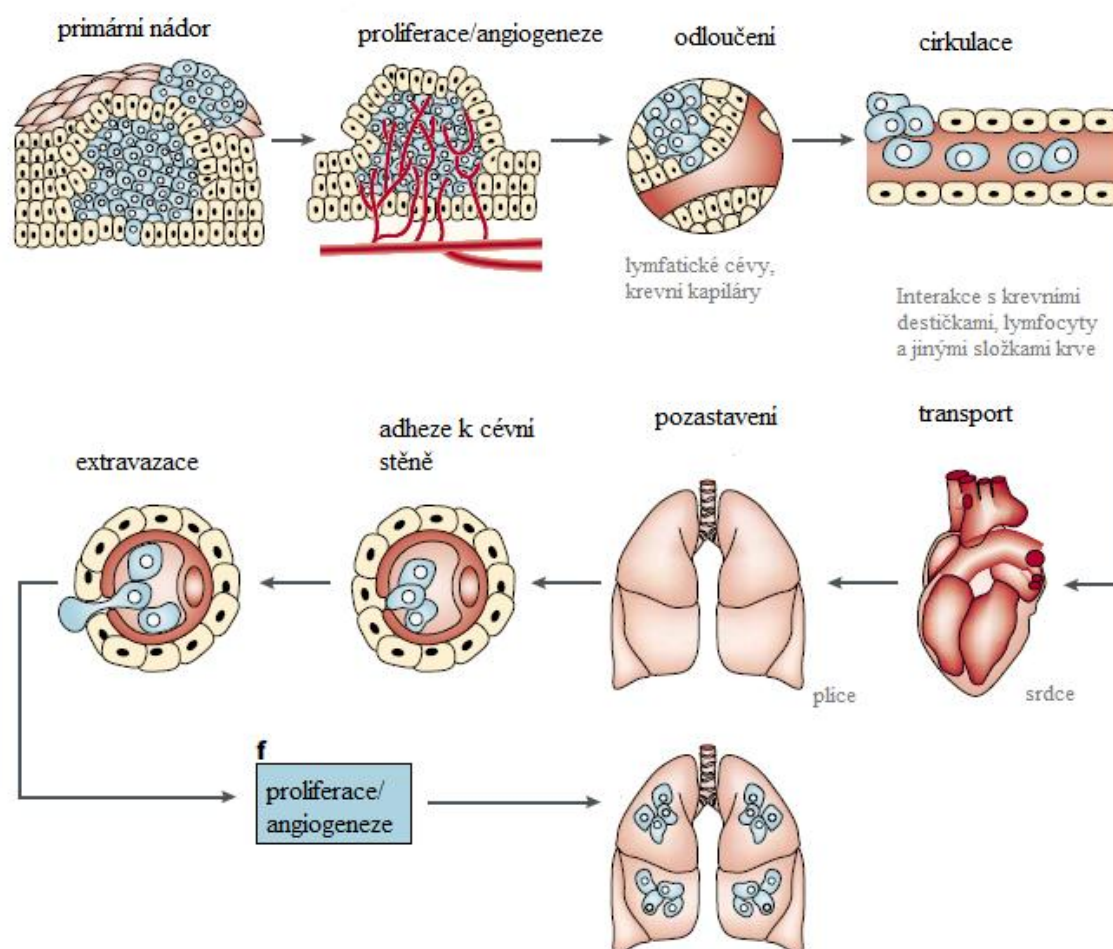
#### 3.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou skupinou více než 100 onemocnění charakterizovaných nekontrolovaným růstem buněk v důsledku změn jejich genetické informace. Vývoj nádorového onemocnění vyžaduje řadu buněčných změn. Jedná se o vícestupňový proces způsobený nahromaděnými chybami v genech, které řídí buněčné procesy (Hanahan a Weinberg, 2000). Neopravené nebo nesprávně opravené úseky DNA mají vážné potenciální následky na buňku, což vede ke genomové nestabilitě a deregulaci buněčných funkcí (Altieri et al., 2008). Za běžných podmínek jsou dělení, diferenciace i smrt buněk pečlivě regulovány. Všechny typy nádorů začínají jedinou buňkou, která ztratila kontrolu nad svými normálními růstovými a replikačními procesy (Marmot et al., 2007). Buňka si vyvinula řadu mechanismů pro opravu DNA a v lidském genomu bylo nalezeno více než 130 genů, které se do tohoto procesu zapojují. Znalosti o základních mechanismech pro opravu DNA ukázaly nečekané složitosti s překrývající se specifícností v rámci jedné cesty, stejně jako rozsáhlé funkční interakce mezi proteiny zapojenými do opravných cest (Altieri et al., 2008).

Nádorová onemocnění lze také vnímat jako skupinu onemocnění, která postihují různé tkáně a tedy i různé typy buněk. Právě podle původní tkáně mohou být nádorová onemocnění klasifikována na karcinomy (z epiteliálních buněk - kožního povrchu či sliznic a žláz), sarkomy (z pojivové tkáně - vaziva, chrupavek, kostí či svalů) a lymfomy (z bílých krvinek - lymfocytů). Každý typ nádorového onemocnění má různé charakteristiky, ale jejich společným znakem je právě neregulovaný růst i apoptóza buněk, který vede ke vzniku nádoru (Marmot et al., 2007).

Nádorové buňky také často napadají své okolí pomocí metastáz, kdy se z primárního místa šíří do jiných částí těla. Pokud je růst nádoru ohraničený a nádor se nemůže šířit do jiných částí těla (metastazovat), jedná se o takzvaný nezhoubný (benigní) nádor. Zhoubné (maligní) nádory svým růstem mohou ničit okolní tkáně a krevními či mízními cestami se šířit (metastazovat) do dalších, i vzdálených částí těla. Tam vytvářejí nové nádory, které poškozují další tkáně (Fidler, 2003). Postup šíření metastázy je znázorněn na Obr. 1. Většina nádorových onemocnění se vyvíjí do fáze

klinické identifikace roky či dokonce desetiletí po počátečním poškození DNA (Hanahan a Weinberg, 2000).



**Obr. 1:** Hlavní kroky formace metastázy. Upraveno dle Fidler (2003).

Existuje řada poruch nebo syndromů, včetně několika predispozic k rakovině či rychlému stárnutí, které jsou spojeny se zděděnou vadou v jedné z cest pro opravu DNA. Toto je však pouze menší část případů vzniku nádorových onemocnění (Altieri et al., 2008). Většina zahrnuje změny nebo poškození genetického materiálu nahromaděné v průběhu času (Anand et al., 2008). Přestože je DNA poměrně stabilní, existují faktory, které mohou mít vliv na její strukturu a integritu a způsobovat tak její poškození (Altieri et al., 2008). Toto poškození může být výsledkem endogenních procesů, jako jsou dědičné mutace DNA, vnitřní chemická nestabilita určitých DNA bází nebo napadení volnými radikály. Poškození DNA může také vyplýnout z interakcí s exogenními činidly, jako

fyzikální karcinogeny (např.: ultrafialové záření a ionizující záření), nebo chemické karcinogeny (např.: 3,4-benzpyren a N-nitrosamin) (Bertram, 2000).

### 3.2. Faktory ovlivňující vznik nádorových onemocnění

Pouze 5-10 % všech případů nádorových onemocnění lze připsat genetickým poruchám, zatímco zbývajících 90-95 % má své kořeny v životním prostředí a životním stylu. Příčiny poškození genetického materiálu buněk mají za následek jak exogenní (environmentální), tak endogenní (vnitřní) faktory (Anand et al., 2008).

#### 3.2.1 Endogenní faktory vzniku nádorových onemocnění

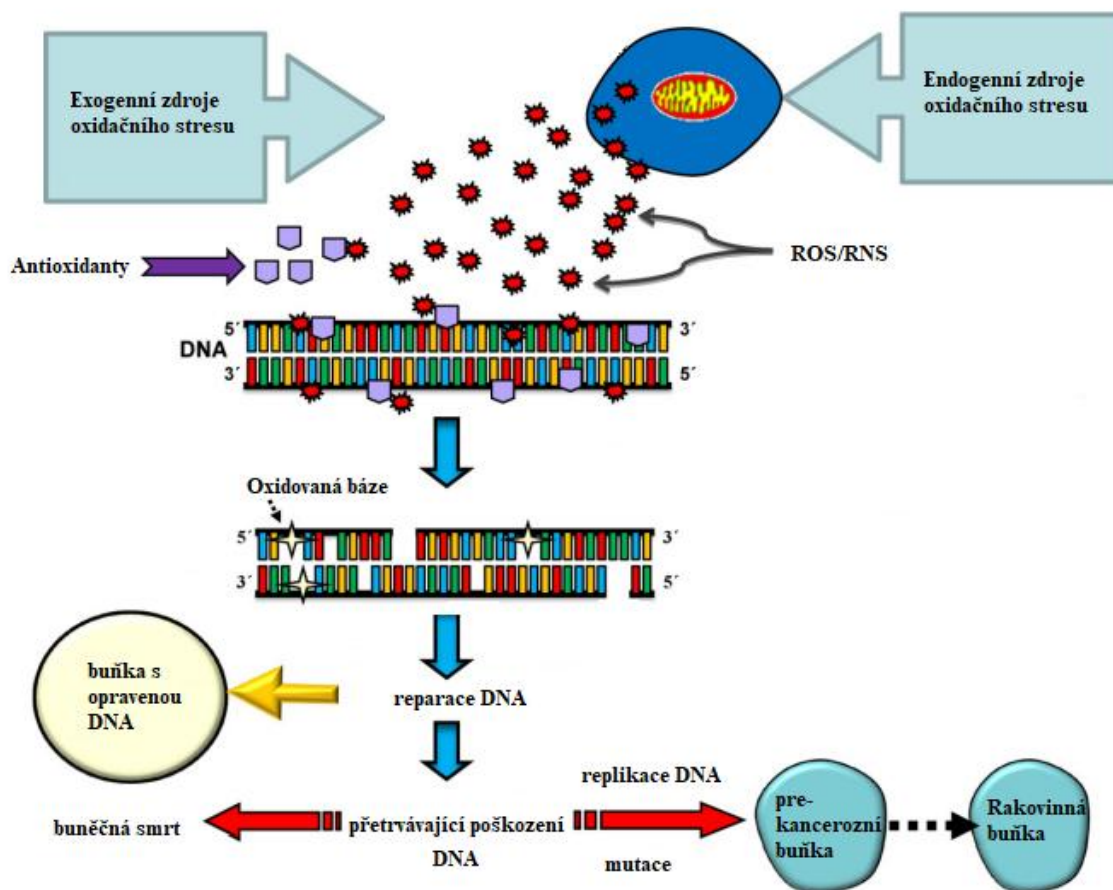
##### 3.2.1.1 Dědičné mutace DNA

Dědičné geny způsobují pouze menšinu nádorových onemocnění. Zděděné změny jsou nazývány mutacemi zárodečné linie a jsou předávány z mateřské DNA vajíčka nebo spermie. Jedinci s dědičnými mutacemi zárodečných linií nádorovým onemocněním onemocnět nemusí, ale ve srovnání s ostatní populací mají zvýšené riziko jeho rozvoje (Anand et al., 2008). Mutace genů, které potlačují vznik nádoru, často zvyšují možnost vzniku rakoviny v mladém věku. Patří mezi ně například LiFraumeni či Von Hippel-Lindau syndrom, což jsou geneticky podmíněná onemocnění charakterizovaná obecně zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění. Nejčastějšími nádorovými onemocněními způsobenými vrozenými mutacemi genů jsou rakovina prsu a tlustého střeva. Další běžná nádorová onemocnění, včetně onemocnění vaječníků, prostaty, slinivky břišní, či dělohy, také mohou souviset se zděděnými mutacemi, ale pouze v malém podílu případů (Stewart a Kleihues, 2003).

##### 3.2.1.2 Oxidační stres

Ke vzniku nádorových onemocnění přispívá i oxidační stres vyvolaný volnými radikály. Jedná se o vysoce reaktivní částice, které mají jeden nebo více nepárových elektronů. Mezi ně patří volné kyslíkové radikály (Reactive Oxygen Species; ROS), jako je superoxidový anion, hydroxylový radikál, peroxid vodíku a volné dusíkové radikály (Reactive Nitrogen Species; RNS) jako je oxid dusnatý či dusičitý (Altieri et al., 2008). Tyto volné radikály mají schopnost poškozovat důležité biomolekuly jako proteiny, lipidy či nukleové kyseliny. Mohou tedy mít za následek chemické modifikace nukleotidů DNA, což je poškození, které může vést až k mutaci (Halliwell et al., 1992).

Jedním ze způsobů vzniku ROS/RNS je jejich tvorba na buněčné úrovni, jako přirozený vedlejší produkt oxidativního metabolismu buněk. Mezi hlavní producenty patří mitochondrie, které produkují ROS jako vedlejší produkt respirace (1-5 % spotřebovaného O<sub>2</sub>) (Georgakilas et al., 2010). Volné radikály jsou produkovány nejen normálním metabolismem, ale také environmentálním stresem, jako je kouření, fyzikální karcinogeny a chemické karcinogeny, které jsou obsažené například v potravinách (Altieri et al., 2008).



**Obr. 2:** Působení oxidačního stresu na DNA. Upraveno dle Kryston et al. (2011)

Tělo má několik mechanismů, které mohou zneškodnit nebo blokovat účinky ROS/RNS, aby nedošlo k oxidačnímu poškození DNA. Během oprav se poškozené, oxidované, báze vylučují močí (Georgakilas et al., 2010). Látky, které mohou zneškodnit ROS/RNS se nazývají antioxidanty. Například vitaminy C a E mohou volným radikálům předat elektrony a blokovat tak jejich škodlivou aktivitu. Dietární složky, jako jsou isothiokyanáty či polyfenoly, mohou rovněž aktivovat signální dráhy, které vedou k aktivaci prvku antioxidantní odpovědi a ke zvýšení regulace exprese detoxikačních

enzymů. Aby nedocházelo k negativním projevům volných radikálů, je třeba udržování jejich rovnováhy s antioxidanty (Marmot et al., 2007)

### 3.2.1.3 Záněty a infekce

Mezi další endogenní faktory vzniku nádorových onemocnění patří záněty a infekce. Zánět je fyziologická reakce na infekci, cizí tělo, trauma nebo chemické či jiné podráždění a v akutní fázi může být užitečný. Chronický zánět však může způsobit až poškození DNA. Infekční agens, včetně virů, bakterií a parazitů tak mohou podporovat vývoj nádorových onemocnění (Marmot et al., 2007). Chronická zánětlivá tkáň je infiltrována různými druhy buněk, které produkují širokou škálu bioaktivních látek. Mezi ně patří například cytokiny, růstové faktory, ROS/RNS nebo produkty cyklooxygenáz a lipoxygenáz. Chronické zánětlivé prostředí může zvyšovat proliferaci a diferenciaci buněk, inhibovat apoptózu (programovaná buněčná smrt) a indukovat angiogenezi (tvorba nových krevních kapilár). Lidé trpící chronickým zánětlivým stavem tedy zároveň predisponují k rozvoji nádorových onemocnění (Coussens a Werb, 2002). Nedostatečná výživa nebo dietní nerovnováha může vést k imunodeficiencím a zvýšené náchylnosti na infekce (Marmot et al., 2007).

Některá konkrétní infekční onemocnění se považují za známou příčinu vzniku konkrétních rakovin. Lidský papillomavirus může být příčinou rakoviny děložního čípku, vir Epstein-Barrové rakoviny nosohltanu, infekce hepatitidou B a C rakoviny jater a infekce krevničkou močovou (*Schistosoma haematobium*) rakoviny močového měchýře. DNA a RNA viry také mohou způsobit nádorové onemocnění. DNA viry kódují virové proteiny, které blokují nádorové supresorové geny, zatímco RNA viry nebo retroviry kódují onkogeny (Stewart a Kleihues, 2003). Ve většině případů infekce těmito infekčními agens sama o sobě nevede ke vzniku nádoru, ale je přispívajícím nebo nutným faktorem v rozvoji rakovinového procesu. Odhaduje se, že 1 ze 4 nádorových onemocnění v rozvojových zemích je způsobeno infekcí. V roce 2002 to představovalo přibližně 1,9 milionů pacientů nebo téměř 1 z 5 všech nádorových onemocnění na celém světě (Mackay, 2006).

### 3.2.2 Exogenní faktory vzniku nádorových onemocnění

Jak bylo zmíněno, většina případů nádorových onemocnění má původ z vlivů životního prostředí a životního stylu. Například souvislost mezi stravou a vznikem nádorových onemocnění byla prokázána na základě rozdílů v míře specifických typů rakoviny v různých zemích a pozorovanými změnami výskytu rakoviny při migraci. Bylo zjištěno, že Asijci mají 25× nižší výskyt rakoviny prostaty a 10× nižší výskyt rakoviny prsu, než obyvatelé západních zemí. Poté, co Asijci migrují na západ, se míra těchto nádorů podstatně zvyšuje (Anand et al., 2008; Maskarinec a Noh, 2004; Ziegler et al., 1993).

Výrazným faktorem životního stylu je také kouření tabáku. Cigaretový kouř je silným karcinogenem a zdrojem oxidačního stresu. Ve srovnání s nekuřáky mají aktivní kuřáci nižší cirkulační koncentrace antioxidantů včetně  $\beta$ -karotenu, kryptoxanthinu či kyseliny askorbové (Alberg, 2002). Tabák způsobuje odhadem 20 % všech úmrtí na nádorová onemocnění. Celosvětově je přibližně 80 % případů rakoviny plic u mužů a 50 % u žen způsobeno kouřením tabáku (Stewart a Kleihues, 2003). Cigaretový kouř obsahuje alespoň 80 známých mutagenních karcinogenů, včetně arsenu, kadmia, amoniaku, formaldehydu či benzopyrenu. Každý z nich má samostatný mechanismus způsobující nádorové onemocnění (Nishikawa et al., 2004). Význam faktorů životního stylu ve vývoji rakoviny byl také prokázán ve studiích monozygotních dvojčat (Lichtenstein et al., 2000).

### 3.3. Vybrané typy nádorových onemocnění

Celosvětově jsou nádorová onemocnění nejčastěji diagnostikovaným onemocněním s 8,2 miliony úmrtími v roce 2012. Více než polovina všech úmrtí na nádorová onemocnění je způsobena karcinomem plic, žaludku, jater, tlustého střeva a prsu (Ferlay et al., 2012).

#### 3.3.1 Karcinom plic

Karcinom plic je jedním z nejčastějších typů nádorových onemocnění na celém světě. Běžně je diagnostikován v zemích s vysokými příjmy, přesto jeho výskyt začíná narůstat i v zemích jako například Čína. V roce 2002 bylo zaznamenáno přibližně 1,4 milionu případů, což představuje více než 12 % všech případů nádorových onemocnění,

(Mackay, 2006). Za hlavní příčinu rozvoje karcinomu plic je považováno kouření a vystavení tabákovému kouři. Karcinogeny v tabákovém kouři nebo dalších inhalovaných částicích, jako je uhelný dehet či azbest, mohou interagovat přímo s DNA plicních buněk. Vzhledem k tomu, že inhalačním karcinogenům je vystavena celá plicní tkáň, v různých místech může dojít k různým změnám, což vede ke vzniku odlišných typů karcinomů (Kufe et al., 2003). I globální a regionální trendy výskytu tohoto onemocnění odrážejí prevalenci kouření, s časovým zpožděním asi 35 let. Karcinom plic byl až do konce 19. století poměrně vzácný, s pouhými 140 případy nalezenými ve světové literatuře před rokem 1898 a pouze 374 případy do roku 1912 (Proctor, 2001).

Ve vývoji karcinomu plic může také hrát roli zánět, přičemž rakovinné změny se vyskytují jako odpověď na chronickou expozici dráždivým látkám a opakovaným poraněním. Plicní karcinomy mohou mít souvislost s chronickými onemocněními plic jako sklerodermie, revmatoidní onemocnění, sarkoidóza nebo tuberkulóza (Kufe et al., 2003). Počáteční stádia tohoto nádorového onemocnění obvykle nevyvolávají žádné příznaky, proto je běžné, že v době diagnózy je karcinom již v pokročilém stádiu. 10% míra přežití není příznivá a je obvykle vyšší u žen než mužů (Iwase et al., 1999).

### 3.3.2 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (tlustého střeva nebo konečníku) je třetí nejběžnější typ nádorového onemocnění na světě s více než 1 milionem nových případů zaznamenaných v roce 2002. Úmrtnost je přibližně polovina incidence a jedná se o čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí na nádorové onemocnění. Existují značné zeměpisné rozdíly v celosvětovém rozdělení výskytu kolorektálního karcinomu. Incidence kolorektálních karcinomů se zvyšuje s industrializací a urbanizací. Bývá častější v zemích s vysokými příjmy a zůstává poměrně neobvyklá v Africe a Asii. Častěji se také vyskytuje u mužů než u žen. (Mackay, 2006). Míra přežití dosahuje v průměru 50 % z toho 55 % v zemích s vysokými příjmy a 39 % v zemích střední a nízké úrovně (Jemal et al., 2011).

V Evropě je kolorektální karcinom druhým nejčastějším typem rakoviny. Poslední údaje ukazují alarmující epidemiologické trendy ve střední a východní Evropě (Maďarsko, Slovensko a Česká republika) (Ferlay et al., 2012). V celosvětovém pořadí států má Česká republika šestou nejvyšší incidenci tohoto onemocnění (NOR, 2015). Vysoká míra výskytu kolorektálního karcinomu v těchto zemích je způsobena kombinací běžných exogenních



faktorů s nezdravým životním stylem a s blízkou původní genetickou výbavou místních obyvatel, která vede k podobnosti v dědičných predispozicích (Zastera et al., 2010).

Karcinogeny požití jako součást potravin či nápojů, pokud nejsou metabolizovány nebo absorbovány v tenkém střevě, mohou přímo reagovat s buňkami tlustého střeva a konečníku. Kolorektální karcinom se může také vyvinout na pozadí zánětlivého onemocnění střev jako například ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba (Itzkowitz a Yio, 2004). Rozvoj kolorektálního karcinomu je často doprovázen příznaky již v počáteční fázi, což znamená, že k léčbě dochází včas a míra přežití je poměrně vysoká. Kromě toho v některých zemích, včetně České republiky, probíhají pravidelná screeningová vyšetření. Cílem těchto screeningových programů je právě včasná detekce. Tři randomizované studie prokázaly snížení úmrtnosti o 15-33 % u pacientů, kteří podstupují rutinní screening (Hardcastle et al., 1996; Kronborg et al., 1996; Mandel et al., 1993).

Národní screeningový program v České republice byl zahájen v červnu 2000, přičemž pro testování jsou využívána periodická vyšetření stolice pro okultní krvácení. Jedno testování během dvou let je nabízeno asymptomatickým osobám starším 50 let prostřednictvím sítě praktických lékařů. V případě pozitivního testu je provedena následná kolonoskopie, aby bylo možno vznikající nádor lokalizovat. Od roku 2006 se shromažďují a vyhodnocují individualizované údaje o těchto vyšetřeních, aby byly splněny doporučení EU pro kontrolu kvality screeningových programů (Zavoral et al., 2009).

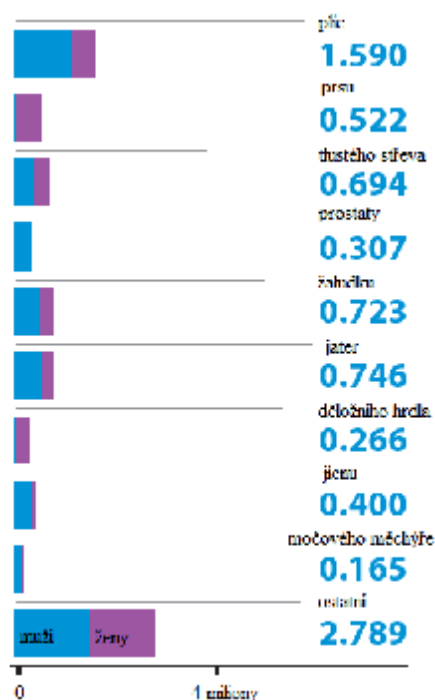
### 3.3.1 Karcinom jater

Nádorové onemocnění jater je šestým nejčastějším typem nádorových onemocnění na světě. V roce 2002 bylo zaznamenáno přibližně 625 000 případů, což představuje přibližně 6 % všech případů rakoviny. Asi polovina těchto případů se vyskytuje v Číně. Je téměř vždy fatální a je třetí nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění, což představuje přibližně 9 % všech úmrtí. V játrech se vyskytují různé typy nádorů. Každý má potenciálně různé příčiny a přirozenou historii. Kolem 75-90 % rakovin jater se vyskytuje jako hepatocelulární karcinom, který začíná poškozením jaterních buněk (hepatocytů) (Mackay, 2006).

Hepatocelulární karcinom se vyvíjí až u 80 % pacientů s cirhózou jater. Tento preneoplastický stav je nejsilnějším predispozičním faktorem (Llovet, 2005). Vir hepatitidy B je hlavním rizikovým faktorem v Asii a Africe. Přenašeči tohoto viru mají

100× vyšší relativní riziko pro rozvoj s roční incidencí 2-6 % u pacientů s cirhózou jater. V západních zemích a v Japonsku je hlavním rizikovým faktorem, společně s dalšími příčinami cirhózy, infekce virem hepatitidy C (Bosch et al., 2004). Přibližně u 20-30 %, z odhadovaných 170 milionů jedinců, nakažených virem hepatitidy C po celém světě, se vyvine cirhóza jater. Po vzniku cirhózy je roční incidence karcinomu jater 3-5 % (Sangiovanni et al., 2004).

Expozice aflatoxinů v potravinách je také významným rizikovým faktorem pro vývoj hepatocelulárního karcinomu. (Wild a Gong, 2009). Aflatoxiny jsou primárně produkovány plísněmi *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, které kontaminují řadu potravinářských komodit včetně kukuřice, olejnatých semen, koření, podzemnice olejné a ořechů, především v tropických a subtropických oblastech světa. Příjem aflatoxinu B<sub>1</sub> zvyšuje riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu. Aflatoxiny mohou hrát klíčovou roli u 4,6-28,2 % všech globálních případů hepatocelulárního karcinomu (Liu a Wu, 2010). Aflatoxiny se mohou dostat do potravního řetězce i skrze živočišné produkty. Například pokud zvířata určena k produkci mléka konzumují krmiva kontaminovaná aflatoxiny, do mléka může být vylučován metabolit aflatoxin M<sub>1</sub> (Strosnider et al., 2006).



**Obr. 3:** Celosvětová úmrtnost na jednotlivé typy nádorových onemocnění. Upraveno dle Ferlay et al. (2012).

### 3.4. Nádorová onemocnění v ČR a ve světě

V roce 2015 bylo do Národního onkologického registru ČR (NOR) nově nahlášeno celkem 94 462 případů zhoubných novotvarů z toho téměř 49 tis. případů u mužů a 46 tis. případů u žen. Incidence nádorových onemocnění v České republice v dlouhodobém pohledu roste. Rostoucí počet hlášených případů můžeme částečně dávat do souvislosti se stárnutím populace ČR. Věk je hlavním rizikovým faktorem zhoubného bujení, mimo jiné díky kumulativnímu vlivu rizikových faktorů. Dalšími možnými vlivy na rostoucí absolutní incidenci jsou vyšší výskyt fyzikálních a chemických karcinogenů, ale také zlepšená diagnostika a celková kvalita lékařské péče. Kolorektální karcinom je jednou z nečastějších onkologických diagnóz v ČR. V celosvětovém pořadí států má Česká republika šestou nejvyšší incidenci tohoto onemocnění (NOR, 2015).



**Obr. 4:** Věkově standardizovaná mapa výskytu nádorových onemocnění (s výjimkou rakoviny kůže), pro obě pohlaví; rok 2012 (Ferlay et al., 2012)

Celosvětově jsou nádorová onemocnění nejčastěji diagnostikovaným onemocněním. Odhaduje se, že v roce 2012 to bylo 14,1 milionů nových případů. Nádorová onemocnění plic, prsu, tlustého střeva a žaludku představovaly více než 40 % ze všech diagnostikovaných případů po celém světě. U mužů byla nejběžněji diagnostikována rakovina plic (16,7 % všech nových případů v roce 2005). U žen to byla nejčastěji rakovina prsu (25,2 % všech nových případů v roce 2005). Nádorová

onemocnění jsou také nejčastější příčinou úmrtí ve světě, v roce 2012 na ně zemřelo 8,2 milionu lidí (Ferlay et al., 2012).

Tyto alarmující statistiky nutí vědce k neustálému výzkumu původu a léčby nádorových onemocnění. K rapidnímu výzkumu docházelo především v předchozích 25 letech, kdy byly odhaleny principy vzniku a nesmírná komplexita nádorových onemocnění. Lze předpokládat, že výzkum bude nadále pokračovat. Cílem je přesné porozumění veškerým principům nádorových onemocnění a vývoj specifických protinádorových léků (Hanahan a Weinberg, 2000).

### 3.5. Moderní přístupy v léčbě nádorových onemocnění

V současné době je cílem léčebné terapie nádorových onemocnění odstranění nádoru (kurativní terapie) nebo alespoň prodloužení přežití u pacientů s pokročilým stadiem onemocnění (paliativní terapie), při zachování co nejvyšší kvality života v dlouhodobém i krátkodobém horizontu (Siegel et al., 2012).

Nekurativní léčebný postup přichází na řadu v případech, kdy není možné dosáhnout úplného vyléčení, a to z důvodu stupně pokročilosti nemoci, její přirozené rezistence na léčbu či celkový stav pacienta. Možnosti paliativní léčby jsou poměrně pestré, patří sem převážně symptomatická terapie. Jedná se zejména o terapii bolesti a případně různé chirurgické a endoskopické zákroky, které mají obvykle zajistit průchodnost dutých orgánů, které jsou jinak nádorem utlačené (Adam et al., 2011). Kurativní léčba má za cíl úplné uzdravení jedince, tedy dokonalé odstranění nemoci, bez ohledu na okolní zdravou tkáň. Provádí se v případech, kdy charakter a rozsah nádoru, i celkový stav nemocného, dávají předpoklad pro úplné odstranění nádoru z organismu. V současné době jsou k dispozici 3 základní formy kurativní terapie, a to chirurgické odstranění nádoru, ozařování (radioterapie) a chemoterapie. U některých nádorů je také možno využít hormonální terapii či biologickou léčbu (Klener a Klener jr, 2010).

#### 3.5.1 Chemoterapie

Významným prvkem kurativní léčby je chemoterapie, tedy léčba nádoru pomocí chemických látek, které ovlivňují buněčný cyklus. Principem jejich účinku je inhibice množení především nádorových buněk - v takovém případě hovoříme o antiproliferačním

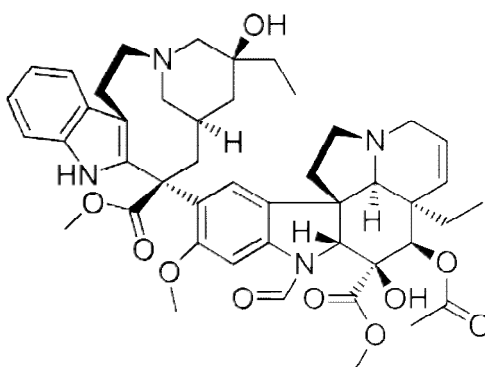
účinku látky, extrémní formou antiproliferačního účinku je cytotoxicita, kdy daná látka působí na buňku toxicky a způsobuje její usmrcení (Aguilar, 2001).

Cytotoxické látky využívané v léčbě nádorových onemocnění se nejčastěji rozdělují podle svého mechanismu účinku na několik základních skupin. Mezi ně patří alkylancia (kovalentně se váží na DNA a inhibují tak její funkci a dělení buněk), antimetabolity (inhibují tvorbu bází DNA, nebo jsou za tyto báze zaměňovány a působí tak jako falešný substrát s výslednou nefunkční DNA), inhibitory mitózy (vazbou na tubulin způsobují rozrušení buněčných mikrotubulů, jež mají rozhodující význam pro správný průběh mitózy), inhibitory topoizomerázy (blokují enzymy účastnící se rozdělení DNA při mitóze), interkalacia (vsunují se mezi báze a blokují tak nové syntézy DNA či RNA), inhibitory tyrosinkináz (inhibují nebo modifikují nitrobuněčný přenos signálů, čímž ovlivňují genovou transkripci) (Slíva a Votava, 2010).

Velká část moderního farmaceutického průmyslu byla vyvinuta na základě léčivých rostlin obsahujících látky s cytotoxickým účinkem. Většina těchto rostlin byla využívána původními obyvateli a domorodými komunitami (Aguilar, 2001). Mezi hlavní rostlinné protinádorové přípravky, které jsou v současnosti v klinickém užívání patří podofylotoxiny, kamptothecin, *Vinca* alkaloidy či taxany. Podofylotoxiny jsou lignany inhibující polymeraci tubulinu, které jsou získávány z pryskyřice *Podophyllum peltatum* (*Berberidaceae*) (Damayanthi a Lown, 1998), často jsou využívány semisyntetické deriváty podofylotoxinů etoposid a teniposid (silné ireverzibilní inhibitory DNA topoizomerázy II) (Gertsch et al. 2007). Dalším protinádorovým přípravkem je chinolinový alkaloid kamptothecin, nacházející se v *Camptotoca acuminata* (*Nyssaceae*). Jeho protinádorová aktivita (inhibice DNA topoizomerázy) byla objevena Wallem et al. (1966). Kamptothecin byl chemicky modifikován ke snížení svých toxických účinků a dva z jeho derivátů topotekan a irinorekan byly komercializovány (Garcia-Carbonero a Supko, 2002). Mezi další významné rostlinné protinádorové přípravky patří *Vinca* alkaloidy (vincristin, vinblastin, vindesin, vinorelbin), které jsou izolovány z *Catharantus rosea* (*Apocynaceae*), česky Barvínkovec růžový. *Vinca* alkaloidy mají podobné struktury, ale vykazují rozdíly jak ve spektru biologické aktivity, tak ve své toxicitě (Leveque a Jehl, 2007). Vinblastin blokuje tvorbu mikrotubulů a zabraňuje tak rakovinným buňkám podstupovat mitózu (Hait et al., 2007). Mezi důležité protinádorové přípravky v neposlední řadě patří také taxany. Jedná se o diterpeny nacházející se v keřích a stromech rodu *Taxus*. Přirozený obsah taxanů v těchto rostlinách však není příliš vysoký, a proto jsou využívány převážně jejich

semisyntetická analoga. Paclitaxel (známý pod obchodní značkou Taxol) a docetaxel (známý pod obchodní značkou Taxotere) (Kingston a Newman, 2007). Mechanismus jejich působení je inhibice mitózy. Paclitaxel byl v roce 1992 schválen americkým Úřadem pro léčivé přípravky k léčbě metastatického karcinomu vaječníků. Ukázaly se také slibné výsledky v klinických studiích karcinomu plic, prsu, hlavy a krku (Gordaliza, 2007). Docetaxel je semisyntetickým analogem paclitaxelu. Používá se v léčbě pokročilého metastatického karcinomu prsu a nemalobuněčného karcinomu plic (Dubois, 2006; Fang a Liang, 2005).

Polovina všech protinádorových léků schválených na mezinárodní úrovni od roku 1940 do roku 2006 byla buď přírodním produktem nebo jeho derivátem. Taxany a kamptohecinny samy o sobě představovaly přibližně jednu třetinu globálního trhu s protinádorovými léčivy v roce 2002 s tržní hodnotou vyšší než 2,75 miliardy amerického dolaru (Newman a Cragg, 2007).



**Obr. 5:** Vincristin

Kong a Liu (2006) uvádějí, že více než 50 % všech léků, které jsou v současné době v klinickém užívání, pochází z přirozených přírodních produktů a asi polovina z 25 nejprodávanějších světových léčiv je odvozena od přírodních produktů. Mnoho států se zaměřuje na botanický výzkum a testování kvůli významu fytochemikálií pro lidský život a jejich obrovskému potenciálu na trhu. Podle Effertha et al. (2007) Čína vyvíjí přibližně 139 inovativních léků, z nichž 9 vychází z tradiční čínské medicíny. V USA proběhl v letech 1991–2004 projekt financovaný Národním institutem pro rakovinu „Přírodní inhibitory karcinogeneze“, který nashromáždil více než 5000 rostlinných vzorků a získal z nich více než 250 účinných látek pro prevenci rakoviny. Podobné výzkumy probíhají i v dalších zemích jako například Indie, Pákistán či Brazílie (Kinghorn et al., 2004).

### 3.6. Tradiční medicína

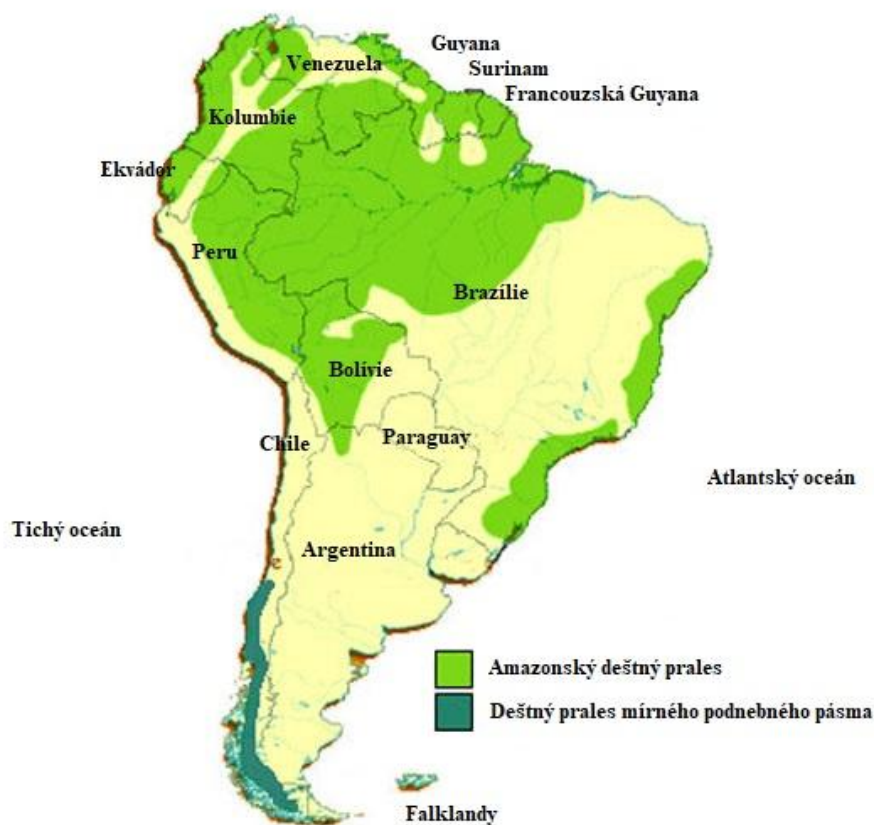
Dalším možným přístupem k léčbě je tradiční medicína (TM). Jedná se o způsob ochrany zdraví, který existoval již před relativně nedávným příchodem moderní medicíny. TM často slouží jako jedna ze součástí komplexního systému léčby, který může zahrnovat použití rostlinných, živočišných a minerálních přípravků, duchovní terapie, regulace stravování, cvičení či různé techniky jako akupunktura nebo masáž, k udržení zdraví, ale také k prevenci a léčbě onemocnění. TM je důležitou součástí zdravotní péče v mnoha rozvojových zemích, ale také v zemích rozvinutých a má rychle rostoucí ekonomický význam. Přesto, že použití léčivých rostlin v terapii je známo již po celá staletí ve všech částech světa, poptávka po bylinných lécích roste dramaticky především v posledních letech (Kartal, 2007). Odhaduje se, že v tradiční medicíně je využíváno přes 25 000 rostlinných druhů (Aguilar, 2001). Například v texaském Andersonově centru pro léčbu rakoviny z 453 pacientů 99,3 % slyšelo o TM. Z nich 83,3 % využilo alespoň jeden přístup TM. Největší využití měly duchovní praktiky (80,5 %), užívání vitaminů a bylin (62,6 %) a pohybové a fyzikální terapie (59,2 %) (Richardson et al., 2000).

V rozvojových zemích je tradiční medicína často jedinou dostupnou léčbou. V Africe ji využívá jako primární systém zdravotní péče až 80 % populace. Regionální úřad WHO (World Health Organization; Světová zdravotnická organizace) pro latinskou Ameriku uvádí, že 71 % obyvatel Chile a 40 % populace Kolumbie používá tradiční medicínu. V mnoha asijských zemích je široce používána tradiční medicína, přesto, že je často běžně dostupný i moderní (západní) způsob léčby (World Health, 2002). Systémy tradiční medicíny, které jsou široce používány v národní zdravotní péči po celém světě, zahrnují například tradiční čínskou medicínu, tradiční japonskou medicínu Kampo, tradiční arabskou medicínu Unani, indickou ayurvédskou medicínu či tradiční západní bylinnou medicínu. Mezi další typy tradiční medicíny patří etnomedicína domorodých kmenů, léčitelství nebo šamanismus (Ichikawa et al., 2007).

#### 3.6.1 Etnomedicína v peruánské Amazonii

Peru je, díky Amazonskému pralesu, který se rozkládá na 60 % plochy státu, charakterizováno jako země s jednou z nejvyšších biodiverzit na světě. Domorodé kmeny zde mají dlouhou historii využívání rostlin pro léčbu nemocí a tyto praktické znalosti byly přenášeny různými způsoby z generace na generaci (Gonzales a Valerio, 2006). Existuje

zde řada tradičních medicínských praktik od šamanismu přes kosmologické rituály po mnohé bylinné prostředky (Bussmann a Sharon, 2006). Domorodé kmeny v Peru se nacházejí na různých úrovních vývoje. Některé z nich se poprvé setkaly s evropskou (převážně španělskou) kulturou na počátku 16. století. V tomto období zde byla dominantní incká a mayská kultura. Tyto pre-hispánské kultury měly významný stupeň lékařských znalostí. Moderní země v celé Jižní Americe vliv těchto kultur odrážejí. Dobyť kontinentu Evropany a koloniální období, které následovalo, vedlo k přijímání nové kultury a k vymizení mnoha domorodých lékařských konceptů. Nicméně některé oblasti, zejména odlehlé části amazonského deštného pralesa s menším kontaktem s novou kulturou, si tyto hluboce zakořeněné formy léčitelství zachovaly (Zolla, 1980).



**Obr. 6:** Tropický deštný prales na území jižní Ameriky (Peru)

Zprávy o použití rostlin domorodými kmeny jako specifické protinádorové přípravky, jsou zřídka kdy dostupné, zejména proto, že nádorová onemocnění zahrnující složitý soubor příznaků a v podmínkách kmenového léčitelství je není vždy snadné



diagnostikovat. Na základě toho lze vzít v úvahu etnofarmakologické způsoby užití jednotlivých rostlin při léčbě zánětlivých, infekčních, parazitických a virových onemocnění či kožních problémů (Cordell et al., 1991; Popoca et al., 1998). Shahidi (2012) uvádí, že pravidelná konzumace potravin rostlinného původu je spojena se sníženým rizikem výskytu nádorových onemocnění. Předpokládá se, že příznivý účinek potravin rostlinného původu může být připisován především množství fenolických sloučenin a jejich schopnosti podporovat antioxidační účinek (Brewer, 2011). V současné době je antioxidační aktivita primárně zkoumána v běžně konzumovaných potravinách jako je ovoce a zelenina. Další studie však naznačují, že i ostatní kategorie rostlin, jako jsou léčivé byliny, mají výrazné antioxidační účinky a jejich extrakty mohou mít také významný antiproliferační a cytotoxický účinek na nádorové buňky (Jaberian et al., 2013).

K léčbě nádorových onemocnění jsou využívány i rostliny z peruánské Amazonie. Mezi nejznámější patří Vilcacora (*Uncaria tomentosa*), Maca (*Lepidium meyenii*) a “Dračí krev“ (*Croton lechleri*) (Gonzales a Valerio, 2006). Každá z nich byla vědecky zkoumána pro širokou škálu terapeutických, včetně specifických protinádorových účinků (Alonso-Castro et al., 2012; Bai et al., 2015; Riva et al., 2001). Bussmann a Sharon (2006) uvádějí, že výzkum dalších rostlinných druhů, využívaných v tradičním lidovém léčení v oblasti léčby nádorových onemocnění, by mohl poskytnout zajímavé informace a vést k vývoji nových léčiv. Mezi tyto rostlinné druhy by mohly patřit i *Mansoa alliacea* (Lam.) A. Gentry, *Petiveria alliacea* L., *Alternanthera brasiliensis* (L.) Kuntze, *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M.King & H.Rob., *Alternanthera flavescens* Kunth, *Phyllanthus niruri* L, či *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

### 3.6.1.1 *Mansoa alliacea* (Lam.) A. Gentry

*Mansoa alliacea*, také nazývaná česneková réva, je druh tropické dřevnaté liány s fialovými květy z čeledi Trubačovitě (*Bignoniaceae*). Téměř všechny části rostliny jsou hojně využívány a respektovány řadou původních kmenů Amazonie (Taylor, 2012). Indiáni považují rostlinu za "magickou" nebo "duchovní" se schopností odvrátit zlé duchy a přivolat štěstí. Listy svázané ve svazcích se pro tyto účinky často nacházejí v místních chýších a domcích (Patel et al., 2013). *M. alliacea* je peruánskými amazonskými kmeny také používán jako lék. Indiáni Shipibo-Conibo připravují obklady na otoky a záněty pokožky a odvary při revmatismu, artritidě, nachlazení, či onemocnění dělohy. Kořen je připravován v alkoholové tinktuře jako celkové regenerační tonikum. Kmen Ese'eja připravuje čaj z listů při nachlazení, zatímco kmen Amuesha používá tento čaj k podpoře plodnosti. Wayapiové připravují z listů lázeň k léčbě horečnatých stavů (Taylor, 2012).

Jako hlavní složky *M. alliacea* byly identifikovány sloučeniny síry dialyldisulfid, allin či allicin (Zoghbi et al., 2009), dále b-sitosterol, fukosterol, stigmasterol, iridoidy, isothiokyanáty, naftochinony, alkaloidy, saponin či flavony jako apigenin, luteolin a methylscutellarein (Rao a Rao, 1980; Sáez a Soto, 2010)

Towne et al. (2015) testovali biologickou aktivitu extraktů z listů *M. alliacea*. Vodní extrakty mají mírný cytotoxický účinek na nádorové buňky T3-HA (terciální metastatický nádor jater). Etanolový extrakt z *M.alliacea* prokázal cytotoxickou aktivitu ( $IC_{50} = 5,6 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) proti buňkám V-79 (Itokawa et al., 1992). Dále mají extrakty z této rostliny antioxidační aktivitu (Tasambay Salazar et al., 2017) a působí protizánětlivě (Zoghbi et al., 2009).

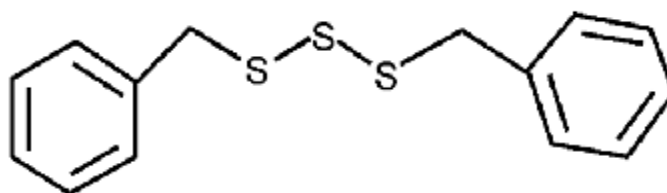


**Obr. 7:** *Mansoa alliacea* (Lam.) A. Gentry

### 3.6.1.2 *Petiveria alliacea* L.

*Petiveria alliacea* je vytrvalá bylina z čeledi Líčidlovité (*Phytolaccaceae*), dosahující výšky až 1 m. Vytváří tmavě zelené kožovité listy a nenápadné bílé květy (Lopes-Martins et al., 2002). Rostlina, a zejména kořeny, má silný česnekový zápach. Kořeny a listy jsou v lidové medicíně používány pro sedativní, diuretické a antihelmintické účinky. Indiáni kmene Ese'Eja v peruánské Amazonii připravují nálev z listů při nachlazení. Jiné domorodé skupiny drtí z listů pastu a používají ji externě při revmatických obtížích či bolesti hlavy. Tato pasta z listů se používá také jako insekticid. Mimo to je *P.alliacea* využívána i při magických obřadních koupelích bylinných léčitelů zvaných curanderos (Taylor, 2012).

Významnou látkou obsaženou v *P. alliacea* je lipofilní sloučenina dibenzyltrisulfát (DTS), který je schopen regulovat buněčné procesy jako je genová exprese, transkripce a u kterého byla zjištěna imunomodulační aktivita (Williams et al., 1997).



**Obr. 8:** Dibenzyltrisulfát

Jednou z jeho nejsilněji prozkoumaných terapeutických cest je proces regulující apoptózu (Deschesnes et al., 2001). Antiproliferační/cytotoxická aktivita DTS byla poprvé objasněna za použití lidských buněk neuroblastomu SH-SY5 (Rösner et al., 2001). Hlavním účinkem DTS v protinádorové aktivitě se jeví indukce apoptotické buněčné smrti. Kromě toho se zdá, že DTS má i určitý stupeň selektivity k patologickým buňkám, neboť po dobu 7 dní nepůsobil toxicky na humánní fibroblasty (HOFA), což je normální buněčná linie (Williams et al., 2004b). Cytotoxický účinek DTS na lidskou neuroblastomovou buněčnou linii SH-SY5 byl při *in vitro* pokusech zvýšen až 70% vytvořením komplexu s bovinním sérovým albuminem (Williams et al., 2002). Na rozdíl od složitě povahy některých z nejslibnějších protinádorových léčiv, je DTS jednoduchá molekula. Bylo vytvořeno několik derivátů DTS, které měly trisulfidový můstek (ten byl stanoven jako kritické místo pro biologickou aktivitu) (Rösner et al., 2001). Některé z těchto uměle

vytvořených molekul měly dokonce vyšší cytotoxickou aktivitu než DTS (An et al., 2006; Xu et al., 2009).



**Obr. 9:** *Petiveria alliacea* L.

### 3.6.1.3 *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

*Dysphania ambrosioides*, česky Merlík vonný, je jednoletá bylina z čeledi Laskavcovité (*Amaranthaceae*). Dosahuje výšky asi jednoho metru a má drobné zelené květy. Listy mají na spodní straně vonné žlázy. Extrakty této rostliny byly tradičně využívány v lidovém léčitelství již od dob mayské civilizace. *D. ambrosioides* byla a je využívána jako koření, jelikož podporuje chuť k jídlu, uklidňuje nervy a uvolňuje křeče trávicího traktu. Významné využití má také jako antihelmintikum proti střevním parazitům (Kliks, 1985).

Chemickým složením *D. ambrosioides* se zabýval Barros et al. (2013), dle této studie *D. ambrosioides* obsahuje organické kyseliny, fenolické kyseliny, fenoly, flavonoidy a tokoferoly. Vodní infuze vzorku vykazovala vyšší antioxidační aktivitu, zatímco metanolický extrakt vykazoval protinádorové účinky proti buněčným liniím karcinomu tlustého střeva, děložního čípku a hepatocelulárního karcinomu. Degenhardt et al. (2016) a Monzote et al. (2011) analyzovali jako hlavní složky silice *D. ambrosioides* ascaridol (30,5 - 49,7 %) a *p*-cymen (20,2 - 42,3 %), které byly nalezeny v různých koncentracích. To naznačuje závislost oblasti sběru a podmínek extrakce na izolaci těchto sloučenin.



**Obr. 11:** *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

#### 3.6.1.4 *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze

*Alternanthera brasiliana* je vytrvalá bylina z čeledi Laskavcovité (*Amaranthaceae*), pocházející z tropických a subtropických oblastí Jižní Ameriky a Austrálie. Má fialové listy a drobné bílé květy vyrůstající v klastrech (Kumar et al., 2011). Téměř všechny části rostliny jsou používány v tradičním léčebném systému pro různá onemocnění, jako jsou záněty a drobné infekční procesy. Rostlina napomáhá hojení ran, dále má analgetický účinek, působí jako imunomodulátor a podporuje proliferaci lymfocytů. Používají se také při poruchách trávení. Kromě odvarů a extraktů jsou listy používány i jako zelenina například do polévek (Duarte a Debur, 2004).

Fytochemické testy ukazují přítomnost saponinů, flavonoidů, tříslovin a fenolů (Samudrala et al., 2015). Hlavními složkami *A. brasiliana* jsou flavonové glykosidy (3-O-robinobiosidové deriváty kaempferolu a kvercetinu), betacianin a steroidy, jako je  $\beta$ -sitosterol (Kumar et al., 2011; Samudrala et al., 2015). Kumar et al. (2011) uvádějí, že byly popsány různé bioaktivní účinky *A. brasiliana*. Mezi ně patří například protizánětlivost, schopnost inhibice proliferace lymfocytů, antioxidantní, antimikrobiální a antivirové účinky či hojení ran a analgetické schopnosti.

Při vyhodnocení protinádorové aktivity *A. brasiliana* proti Ehrlichovu karcinomu (transplantabilní tumor z hrudního karcinomu myši) u švýcarských albino myší byly zjištěny hodnoty  $IC_{50} = 33,54 \text{ mg/ml} - 33,69 \text{ mg/ml}$  (Samudrala et al., 2015).



**Obr. 10:** *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze

### 3.6.1.5 *Alternanthera flavescens* Kunth

*Alternanthera flavescens* je vytrvalá bylina z čeledi Laskavcovité (*Amaranthaceae*), dosahující výšky až 150 centimetrů. Listy jsou tenké, ostré, špičaté, s krátkými řapíky. Květy jsou velmi drobné, bílé barvy, vyrůstají na dlouhých stoncích. *A. flavescens* pochází z Kolumbie a Ekvádoru, rozšířena je však v celé střední a jižní Americe a na Floridě (McCarty et al., 2008). V tradiční medicíně domorodých kmenů jsou listy přikládány na rány, čaj z listů je využíván při infekcích urinárního traktu, kořen je žvýkán při léčení bolestí žaludku a proti střevním parazitům, pasta z kořene je také podávána jako poporodní lék (Quattrocchi, 2012). Fytochemické složení *A. flavescens* není velmi dobře otestováno.

Několik druhů čeledi *Amaranthaceae* se široce používá v tradiční medicíně (např.: *A. brasiliana*, *A. sessilis*, *A. pungens*, *A. dentate*). Některé druhy jsou konzumovány také jako divoká zelenina (Ramachandran, 2007). Mroczek (2015) uvádí, že chemický profil rostlin čeledi *Amaranthaceae* je složitý s celou řadou fytochemických složek. Rostliny obsahují flavonoidy, saponiny, glykosidy a další sekundární metabolity. Z etnobotanických poznatků je zřejmé, že zástupci rodu *Alternanthera* mají významný farmakologický potenciál a slibné biologické aktivity, zejména v oblasti antioxidačních (Escudero et al., 2011; Kraujalis et al., 2013), imunomodifikačních, protinádorových či antibakteriálních účinků (Sun, 2006).

Etanolové extrakty pěti rostlin *Amaranthaceae* shromážděných na jihu Brazílie ukázaly vysoké úrovně fenolických sloučenin. Při jejich testování byla prokázána vysoká antioxidační aktivita spolu s nadějnou cytotoxickou aktivitu proti některým rakovinným buněčným liniím. Mohou tedy být považovány za slibné zdroje antioxidačních

a antiproliferačních sloučenin, jako jsou fenolové kyseliny a flavonoidy (Correa et al., 2016). Významný by mohl být i obsah triterpenových saponinů (oleananový, ursanový a lupanový typ), které byly v hojném množství identifikovány u 30 druhů patřících do čeledi *Amaranthaceae* (Mroczek, 2015). Bioaktivita saponinových směsí nebo jednotlivých saponinů *in vitro* a *in vivo* zahrnuje cytotoxické, imunomodulační, hepatoprotektivní, antidiabetické, hypolipidemické, antiosteoporózní, antivirové, antifungální i antihelmintické účinky. Rostliny čeledi *Amaranthaceae* lze považovat za užitečné a vysoce dostupné zdroje biologicky aktivních triterpenových saponinů (Mroczek, 2015; Podolak et al., 2010; Sparg et al., 2004).



**Obr. 12:** *Alternanthera flavescens* Kunth

#### 3.6.1.6 *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M.King & H.Rob.

*Ayapana triplinervis* je vzpřímená vytrvalá bylina s drobnými narůžovělými květy a štíhlými aromatickými listy z čeledi Hvězdnicovité (*Asteraceae*) (Gurib-Fakim a Brendler, 2004). Domorodý peruánský kmen Shipibo-Conibo používá její listy interně při kolikách a bolestech žaludku. Z listů je také připravována pasta k externímu užití na rány a krvácení. V peruánské bylinné medicíně se předpokládá, že rostlina podporuje pocení a snižuje horečku, je adstringentní a podporuje hojení ran, stimuluje žaludeční činnost a má protinádorové účinky (Taylor, 2012). Etanolvý extrakt z nadzemních částí rostliny má antibakteriální a antifungální vlastnosti (Matos Lopes et al., 2015).

Nejcharakterističtějšími sekundárními metabolity *A. triplinervis* jsou kumariny. Mezi nejvíce zastoupené patří celkem sedm kumarinů - ayapanin (neboli herniarin),

ayapin, daphnetin, daphnetindimethylether, daphnetin-7-methylether, hydrangetin a umbelliferon (Chaturvedi a Mulchandani, 1989; Natarajan a Natarajan, 1979). Kumariny jsou považovány za součást celkové obranné odpovědi rostlin na abiotické a biotické stresy a bylo prokázáno, že různé substituované kumariny vykazují antimikrobiální nebo protizánětlivou aktivitu a působí jako inhibitory čtených enzymových systémů (Murray et al., 1982). *A. triplinervis* je potenciálním zdrojem cytotoxických, trombolytických, antioxidačních, protizánětlivých a antimikrobiálních látek (Asha et al., 2017).



**Obr. 13:** *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M.King & H.Rob.

#### 3.6.1.7 *Phyllanthus niruri* L.

*Phyllanthus niruri* je malá, vzpřímená, jednoletá rostlina z čeledi Smuteňovité (*Phyllanthaceae*). Roste v deštných pralesech Amazonie a dalších tropických oblastech po celém světě, včetně jižní Indie a Číny. *P. niruri* je v Amazonii poměrně rozšířená bylina rostoucí a šířící se volně (podobně jako plevel) (Taylor, 2012). Španělský název rostliny, „chanca piedra“, znamená „lámající kámen“. Byla pojmenována pro své efektivní použití při odstraňování žlučových a ledvinových kamenů po generace amazonských domorodých národů. Kromě ledvinových a žlučových kamenů je rostlina v Amazonii používána pro řadu dalších příznaků včetně bakteriálních infekcí, koliky, diabetu, hepatitidy, malárie, úplavice, horečky, chřipky, nádorů či dyspepsie (Taylor, 2012). *P. niruri* získala pozornost koncem 80. let díky své aktivitě proti hepatitidě B (Venkateswaran et al., 1987). Antihepatotoxická aktivita *P. niruri* je přisuzována dvěma lignanům, phyllanthinu a hypophyllanthinu (Syamasundar et al., 1985). Mezi další složky,



kterým je přisuzována biologická aktivita patří taniny, kumariny, terpeny, flavonoidy, alkaloidy, saponiny a fenypropanoidy, které byly nalezeny v listech a kořenech této rostliny. V rostlině se vyskytují také lipidy, steroly a flavonoly (Dhar et al., 1968). Další výzkumy prokázaly, že extrakty alkaloidů *P. niruri* vykazují antivirovou aktivitu proti viru lidské imunodeficience (HIV) tím, že inhibují reverzní transkriptázu HIV-1 (Naik a Juvekar, 2003; Ogata et al., 1992)



**Obr. 14:** *Phyllanthus niruri* L.

#### 3.6.1.8 *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

*Eleutherine bulbosa* je cibulovitá rostlina z čeledi Kosatcovité (*Iridaceae*), která produkuje velké množství trávovitých listů. Květy této rostliny jsou bílé a cibule červené. Je také značně rozšířena jako okrasná rostlina, často se pěstuje v zahradách udržovaných indiánskými kmeny, pro léčebné účely se však běžně získává i z volné přírody. *E. bulbosa* je důležitým prvkem amerického indikačního lékopisu a je jedním z mála jihoamerických *Iridaceae* se známými léčivými účinky (Missouri Botanical, 1991). Bulva je tradičně smíchávána se solí či alkoholem a užívána roztíráním na kůži jako lék na epileptické záchvaty. Pasta z rozmělněných bulv se také používá k podpoře hojení ran a pro léčbu ischemické choroby srdeční. Dále je bulva využívána k léčbě krvavého průjmu či hemoragie. Kořen se používá také při léčbě ženské neplodnosti (DeFilipps et al., 2004; Vickers a Plowman, 1984). Nejčastěji jsou prováděny chemické analýzy cibulek, kde byla zjištěna zvýšená koncentrace sekundárních metabolitů (Xijing et al., 2009). Nejvíce zastoupenými látkami v extraktu z cibulek jsou naftochinony jako eleuterin, isoeleuterin

a elekanacin (Hara et al., 1997; Weniger et al. 1982), dále antrachinony jako eleutrachinon A a B (Komura et al., 1983) a ostatní látky jako alkaloidy, kumariny či flavonoidy (Couto et al., 2016; Silva Delgado et al., 1997).

Extrakty eleuterinu a isoeleuterinu z cibulek prokázaly dilatační účinek na cévy. Také zvyšují tok krevního řečiště, včetně koronární arterie, což může mít potenciálně užitečný význam při léčbě srdečních onemocnění (Lorenzi a Matos, 2008; Zhengxiong et al., 1984). Naftochinony isoeleuterol a isoeleuterin vykazují inhibiční aktivitu proti replikaci viru HIV a eleuterin vykazuje inhibiční aktivitu vůči topoizomeráze II (Hara et al., 1997). Surový výtazek inhibuje proteázové a lipázové enzymy a může být použit v potravinářském průmyslu jako aditivum s cílem bojovat proti růstu *Staphylococcus aureus* (Ifesan a Voravuthikunchai, 2009).



**Obr. 15:** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb

## 4. Materiál a metodika

### 4.1. Materiál

Pro testování extraktů léčivých rostlin z perunské Amazonie byly použity lidské buněčné linie střevního karcinomu Caco-2 a HT-29, hepatokarcinomu Hep-G2 a k zjištění selektivní cytotoxicity byly použity zdravé lidské plicní fibroblasty MRC-5, které byly zakoupeny z European Collection of Cell Culture (ECACC). Ke kultivaci buněčných linií Caco-2 a HT-29 bylo použito Dulbecco Modified Egles Medium (DMEM), pro buňky hepatokarcinomu Hep-G2 a zdravé lidské plicní fibroblasty MRC-5 se jednalo o Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM). Výše zmíněný materiál byl zakoupen u společnosti Sigma-Aldrich (CZ). Dále byl použit dimethylsulfoxid (DMSO) zakoupený u společnosti Lach-Ner (CZ). Kultivační láhve, serologické pipety a 96jamkové destičky byly pořízeny od společnosti Termo Fisher (UK) a spektrofotometr Tecan Infinite M200 od společnosti Tecan (CH). Jako standard byl použit komerčně dostupný *Vinca* alkaloid vinorelbin od společnosti Sigma-Aldrich (CZ). Dále byl použit analytický mlýnek od společnosti IKA Werke (DE), metanol (MeOH), laboratorní třepačka a vakuová rotační odparka Rotavapor R-200 od společnosti Buchi Flawil (CH)

Sušené vzorky rostlin (*Mansoa alliacea* (Lam.) A. Gentry, *Petiveria alliacea* L., *Alternanthera brasiliensis* (L.) Kuntze, *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M.King & H.Rob., *Alternanthera flavescens* Kunth, *Phyllanthus niruri* L, a *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) byly získány od Ing. Jan Tauchena, Ph.D. a Fakulty tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze.

### 4.2. Metodika

#### 4.2.1 Příprava extraktů

Dva gramy sušeného rostlinného materiálu každého rostlinného druhu byly jemně rozemlety na analytickém mlýnku a extrahovány v 80% MeOH v laboratorní třepačce po dobu 72 hodin při pokojové teplotě. Extrakty byly následně zfiltrvány za použití vakuové rotační odparky při 40 °C. Vysušené zbytky byly znovu rozpuštěny ve 100% MeOH. Výsledné zásobní roztoky měly koncentraci 51,2 mg/ml a byly skladovány při -80 °C.

#### 4.2.2 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie kolorektálního karcinomu v podobě buněčných linií Caco-2 a HT-29 byly pěstovány v DMEM mediu s 10 % FBS (fetální bovinní sérum), 1 % roztoku penicilinu a streptomycinu, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného a 1 % neesenciálních aminokyselin. Buněčná linie lidského hepatokarcinomu Hep-G2 a buněčná linie zdravých plicních fibroblastů MRC-5 byly kultivovány v EMEM mediu s 10 % FBS, 1 % roztoku penicilinu (10 000 MJ) a streptomycinu (100 mg), 1 % neesenciálních aminokyselin, glutamin (2 mM (MRC-5) respektive 4 mM (Hep-G2)). Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm<sup>2</sup>) s 15 ml příslušného media, které byly vloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5 % CO<sub>2</sub> a s teplotou 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny. Po 7denní kultivaci byly buňky propláchnuty pomocí PBS (phosphate buffer saline, fosfátový pufr), aby bylo odstraněno staré medium. Následně bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu 3 minut. Po 3 minutách byl trypsin neutralizován pomocí 1 ml media. Následně byla buněčná monovrstva seškrábána pomocí buněčné škrabky a přepipetována do 15 ml zkumavky typu Falcon. Takto byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 200× g. Následně bylo staré medium odstraněno a buňky byly naředěny v novém mediu. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml média s buňkami, které bylo následně přidáno k 15 ml nového média v kultivační láhvi a proběhla další kultivace. Zbytek buněk byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky a naředěn na koncentraci  $2,5 \times 10^3$  buněk/ml suspenze.

#### 4.2.3 Test cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxicity byla využita metoda MTT dle Mosmanna (1983) s modifikacemi. Připravená buněčná suspenze o koncentraci  $2,5 \times 10^3$  buněk/ml byla pipetována do 96jamkové destičky v množství 200 µl. Po 24 hodinách bylo odstraněno staré medium a přidáno 100 µl nového media spolu s testovanými vzorky MeOH extraktů rostlin v daných koncentracích (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 µg/ml). Takto byly testované vzorky s buňkami inkubovány po dobu 72 hodin. Po této době bylo médium se vzorky odstraněno a nahrazeno 100 µl čistého média s 1 µg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Po 2 hodinách v CO<sub>2</sub> inkubátoru bylo medium s MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena

při vlnové délce 550 nm. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno pomocí porovnání s kontrolou, která obsahovala buňky bez přidání testovaných látek.

#### 4.3. Statistické vyhodnocení

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

## 5. Výsledky

V této práci byla pomocí metody MTT stanovena *in cellulo* antiproliferační aktivita metanolových extraktů léčivých rostlin z perunské Amazonie způsobující 50% inhibici (IC<sub>50</sub>) buněčných liniím karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT-29 a hepatokarcinomu Hep-G2. Ke zjištění selektivní cytotoxicity byly použity zdravé lidské plicní fibroblasty MRC-5. Jako pozitivní kontrola byl použit semisyntetický *Vinca* alkaloid vinorelbin.

Výsledky měření jsou znázorněny v Tab. 2. Z dosažených výsledků je patrné, že nejvyšší cytotoxicitu vůči námi testovaným nádorovým buněčným liniím vykazoval extrakt *D. ambrosioides* na buněčné linii HT-29 (IC<sub>50</sub>= 69,90 ± 9,00 µg/ml), hodnoty IC<sub>50</sub> stejných extraktů vůči zdravým plicním fibroblastům MRC-5 byly nižší (IC<sub>50</sub>= 63,30 ± 1,86 µg/ml), měly tedy vyšší cytotoxicitu. Podobné výsledky byly stanoveny i pro *A. flavescens*. U těchto extraktů byla cytotoxicita k buněčné linii Hep-G2 vyšší (IC<sub>50</sub>= 79,40 ± 6,60 µg/ml), než ke zdravým plicním fibroblastům MRC-5 (IC<sub>50</sub>= 86,53 ± 5,50 µg/ml). Cytotoxicita extraktů *D. ambrosioides* a *A. flavescens* na ostatní buněčné linie lze považovat za nevýznamné s hodnotami IC<sub>50</sub>= až 300,10 ± 9,10 µg/ml pro *A. flavescens* a buněčnou linii Caco-2.

Extrakt *P. alliacea* (*Mucura macho*) patří mezi vzorky s nejvyšší cytotoxicitou na buněčné linie kolorektálního karcinomu HT-29 (IC<sub>50</sub>= 81,10 ± 2,80 µg/ml) a zároveň s nejlepší selektivitou vůči této linii. Hodnoty IC<sub>50</sub> pro ostatní buněčné linie karcinomů se pohybovaly od IC<sub>50</sub>= 251,74 ± 1,99 µg/ml pro linii Caco-2 a IC<sub>50</sub>= 419,06 ± 12,13 µg/ml pro linii Hep-G2. Extrakt *P. alliacea* (*Mucura macho*) vůči zdravým plicním fibroblastům MRC-5 (IC<sub>50</sub>= 226,60 ± 14,20 µg/ml) nevykazovaly cytotoxicitu. Z tohoto důvodu je možno předpokládat selektivitu vůči jedné ze tří testovaných nádorových buněčných linií. Extrakt *P. alliacea* (*Mucura hembra*) nevykazovaly významnou cytotoxicitu vůči žádné buněčné linii.

U extraktů *P. niruri* byla prokázána nejvyšší cytotoxicita (IC<sub>50</sub>= 96,92 ± 6,17 µg/ml) právě vůči zdravým plicním fibroblastům MRC-5. Cytotoxicita vůči buněčným liniím karcinomů se pohybovala od IC<sub>50</sub>= 103,46 ± 5,90 µg/ml pro linii Caco-2 do IC<sub>50</sub>= 322,00 ± 5,10 µg/ml pro linii HT-29. Bylo prokázáno, že nadzemní části *E. bulbosa* mají v porovnání s cibulemi stejné rostliny zanedbatelné cytotoxické účinky. IC<sub>50</sub> extraktů nadzemních částí vůči všem testovaným buněčným liniím kromě HT-29 přesáhly 512 µg/ml. U extraktů ostatních rostlinných druhů jako *M. alliacea*, *A. brasiliiana* a *A. triplinervis* nebyla shledána významná cytotoxicita vůči testovaným buněčným liniím.

**Tab. 1:** Hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných vzorků pro jednotlivé buněčné linie.

Vzorek	Část rostliny <sup>a</sup>	Antiproliferační aktivita <sup>b</sup> (IC <sub>50</sub> <sup>c</sup> v µg/mL)/buněčná linie			
		Caco-2 <sup>d</sup>	HT-29 <sup>e</sup>	Hep-G2 <sup>f</sup>	MRC-5 <sup>g</sup>
<i>A. brasiliiana</i>	A	252,9 ± 5,7	160,3 ± 8,5	281,1 ± 11,5	264,4 ± 1,9
<i>A. flavescens</i>	A	300,1 ± 9,1	203,4 ± 7,3	<b>79,4 ± 6,6</b>	<b>86,5 ± 5,5</b>
<i>A. triplinervis</i>	A	470,7 ± 1,3	174,9 ± 10,4	251,1 ± 3,2	259,5 ± 9,3
<i>D. ambrosioides</i>	A	129,2 ± 6,9	<b>69,9 ± 9,0</b>	130,6 ± 8,2	<b>63,3 ± 1,9</b>
<i>E. bulbosa</i>	A	> 512,0	289,4 ± 11,7	> 512,0	> 512,0
<i>E. bulbosa</i>	B	128,7 ± 6,8	200,0 ± 5,9	140,7 ± 11,2	209,2 ± 10,5
<i>M. alliacea</i>	A	456,7 ± 16,4	321,5 ± 3,9	276,9 ± 4,7	240,9 ± 7,0
<i>P. alliacea</i> (Mucura hembra)	A	277,0 ± 9,0	136,0 ± 7,4	> 512,0	149,7 ± 8,0
<i>P. alliacea</i> (Mucura macho)	A	251,7 ± 2,0	<b>81,1 ± 2,8</b>	419,1 ± 12,1	226,6 ± 14,2
<i>P. niruri</i>	A	103,5 ± 5,9	322,0 ± 5,1	132,4 ± 8,6	96,9 ± 6,2
Standard					
Vinorelbin		0,05 ± 0,0	N	0,12 ± 0,0	0,02 ± 0,0

<sup>a</sup>(A) nadzemní část, (B) cibule; <sup>b</sup> Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka; <sup>c</sup> polovina maximální inhibiční koncentrace; <sup>d,e</sup> linie buněk kolorektálního karcinomu; <sup>f</sup> linie buněk hepatocelulárního karcinomu; <sup>g</sup> linie normálních plicních fibroblastů; N–nezměřeno.

Program pro výzkum a školení v oblasti tropických nemocí (WHO – Tropical Diseases) uvádí rozdělení látek dle míry cytotoxicity. Je-li IC<sub>50</sub> > 90 µg/ml, je sloučenina klasifikována jako necytotoxická, je-li IC<sub>50</sub> v rozmezí 2 - 89 µg/ml, je sloučenina klasifikována jako mírně cytotoxická a je-li IC<sub>50</sub> < 2 µg/ml, je sloučenina klasifikována jako cytotoxická. Dle tohoto rozdělení je možné říci, že žádná z testovaných rostlin neprokázal výraznou cytotoxickou aktivitu vůči zkoumaným buněčným liniím. Výsledné hodnoty pro extrakty *P. alliacea* (Mucura macho) s IC<sub>50</sub> = 81,10 ± 2,80 µg/ml vůči buněčné linii kolorektálního karcinomu HT-29, *A. flavescens* s IC<sub>50</sub> = 79,40 ± 6,60 µg/ml proti buněčné linii hepatocelulárního karcinomu Hep-G2 a *D. ambrosioides* s IC<sub>50</sub> = 69,90 ± 9,00

$\mu\text{g/ml}$  na buněčné linii kolorektálního karcinomu HT-29 lze zařadit pouze do kategorie mírně cytotoxické.

Dalším cílem práce bylo vybrat druhy, které mají významnou cytotoxicitu a provést separaci na jednotlivé látky, které měly být následně testovány na svou cytotoxicitu. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že výraznou cytotoxickou aktivitu na buněčné linii kolorektálního karcinomu a hepatokarcinomu žádný z extraktů neměl.



## 6. Diskuze

Nádorová onemocnění jsou komplexní onemocnění, která jsou celosvětovým problémem veřejného zdraví. Mnoho protinádorových léků, které jsou v současné době klinicky používány, bylo izolováno z léčivých rostlinných druhů nebo bylo na látkách v nich obsažených založeno. Proto se v posledních několika desetiletích zkoumají surové výtažky z léčivých rostlin za účelem objevení a izolace nových sloučenin, které vykazují biologickou aktivitu.

Cytotoxická aktivitu extraktu *D. ambrosioides*, který byl naším testováním vyhodnocen jako nejúčinnější na nádorové buněčné linie HT-29 ( $IC_{50} = 69,90 \pm 9,00$   $\mu\text{g/ml}$ ), byla testována také Degehardtem et al. (2016). V tomto testování byla mimo jiné zkoumána cytotoxická aktivita silice a etanolového extraktu listů *D. ambrosioides* na nádorové buněčné linie myeloidní leukémie (K562), akutní B lymfocytární leukémie (NALM6 a B15) a Burkittova lymfomu (RAJI) pomocí metody MTT. Zejména silice ukázaly výraznou cytotoxicitu na buňky Burkittova lymfomu (RAJI) ( $IC_{50} = 1.0 \pm 0,2$   $\mu\text{g/ml}$ ) ve srovnání s pozitivní kontrolou doxorubicinem ( $IC_{50} = 13,2$   $\mu\text{g/ml}$ ). Také etanolový extrakt *D. ambrosioides* vykazoval vyšší cytotoxicitu na buňkách myeloidní leukémie (K562) ( $IC_{50} = 47$   $\mu\text{g/ml}$ ) ve srovnání s doxorubicinem ( $IC_{50} = 62,5$   $\mu\text{g/ml}$ ). Nascimento et al. (2006) zkoumali *in vivo* účinky etanolového extraktu *D. ambrosioides* na albino myších s Ehrlichovým tumorem. Počet nádorových buněk byl významně nižší u myší ošetřených etanolovým extraktem *D. ambrosioides*. Léčba *D. ambrosioides* také snížila hmotnost myší nesoucích nádor a výrazně prodloužila jejich život v porovnání s myši neošetřenými. Inhibice Ehrlichova tumoru byla pozorována jak při podávání extraktu *D. ambrosioides* před, tak i po implantaci nádorových buněk. Nejnovější výsledky testování cytotoxicity přinášejí Knauth et al. (2018), kteří poprvé otestovali cytotoxicitu metanolového extraktu z plodů *D. ambrosioides*. Dle jejich výsledků je jasně patrný kontrast mezi jednotlivými částmi rostliny. Cytotoxicita byla, stejně jako v našem pokusu, testována na lidské buněčné linii kolorektálního karcinomu Caco-2. A vyhodnocena jako koncentrace způsobující usmrcení 50 % buněk ( $CC_{50}$ ). Zatímco metanolový extrakt listů byl z testovaných vzorků nejméně cytotoxický s  $CC_{50} = 563 \pm 66$   $\mu\text{g/ml}$ , extrakt z plodů vykázal nejvyšší toxicitu s  $CC_{50} = 45 \pm 7$   $\mu\text{g/ml}$ .

Degenhardt et al. (2016) a Monzote (2011) analyzovali jako hlavní složky silice *D. ambrosioides* ascaridol a *p*-cymen. Cytotoxická aktivita silice *D. ambrosioides*

pravděpodobně souvisí s obsahem ascaridolu, jelikož *p*-cymen, je uznáván jako silná protizánětlivá látka (Chen et al., 2014) a má nízkou cytotoxickou aktivitu (Koba et al., 2009). Ascaridol (také známý jako ascarisin, 1,4-epidioxy-*p*-menth-2-en) je bicyklický monoterpen, který obsahuje neobvyklou peroxidovou funkční skupinu. Ascaridol má sedativní a antifungální účinky (Pare et al., 1993). Bylo zjištěno, že ascaridol je silným inhibítozem *in vitro* vývoje *Plasmodium falciparum* (Pollack et al., 1990), *Trypanosoma cruzi* (Kiuchi et al., 2002) a *Leishmania amazonensis* (Monzote et al., 2006). Použití *D. ambrosioides* je v Latinské Americe pro své léčebné účinky rozšířené. Nicméně domorodí lidé tuto rostlinu popisují také jako toxickou (Pereira et al., 2010). V literatuře lze nalézt případy intoxikace u lidí a potkanů v důsledku použití velkého množství silic *D. ambrosioides*, přičemž toxické účinky se objevují zejména na ledvinách, játrech a střevě (Chevallier, 1996; De Pascual et al., 1980). Soares et al. (2017) testovali cytotoxické účinky ascaridolu na lidské fibroblasty plic (buňky GM07492-A) a však cytotoxicita nebyla prokázána ( $IC_{50} = 207,1 \pm 4,4 \mu\text{g/ml}$ ).

Složení *D. ambrosioides* bylo předmětem několika studií a výsledky ukazují nejednotnost týkající se jak obsažených látek, tak jejich procentuálního zastoupení. Například faktory, které obecně určují složení a výtěžek silic, jsou četné a v některých případech je obtížné je od sebe navzájem izolovat (Anwar et al., 2009). V případě *D. ambrosioides* má pravděpodobně největší vliv zeměpisný původ rostliny a jak se ukázalo ve studii Knautha et al. (2018) také část rostliny, která je použita pro získání vzorků. Jak bylo již zmíněno výše, Degenhardt et al. (2016) a Monzote (2011) analyzovali jako hlavní složky silice *D. ambrosioides* ascaridol a *p*-cymen a Jardim et al. (2008) uvádějí 80% obsah ascaridolu v silici rostlinných vzorků shromážděných v jihovýchodní Brazílii. Naopak však bylo zaznamenáno jen malé procento (0,1 %) ascaridolu v rostlinách z Nigerie, kde byl hlavní složkou  $\alpha$ -terpinen (56,0 %) (Onocha et al., 1999). Monzote et al. (2011) ve své studii prokázali, že ošetření rostlinného materiálu, které předcházelo testování cytotoxicity výrazně ovlivnilo cytotoxickou aktivitu silice. Naopak nijak neovlivnilo její antiparazitické účinky proti prvokům rodu *Leishmania* (způsobující kožní onemocnění Leishmaniozu). Výše uvedené faktory mohly ovlivnit i naše měření.

Druhou nejvyšší cytotoxicitu jsme naměřili u metanolového extraktu *A. flavescens* na buněčné linii Hep-G2 ( $IC_{50} = 79,40 \pm 6,60 \mu\text{g/ml}$ ). O samotné rostlině *A. flavescens* není v literatuře mnoho informací. Lze však předpokládat že složení *A. flavescens* je obdobné ostatním rostlinám z čeledi *Amaranthaceae*. Mroczek (2015) uvádí, že rostliny čeledi

*Amaranthaceae* obsahují celou řadou fytochemických složek jako například flavonoidy, glykosidy a především saponiny. Saponiny byly izolovány z mnoha rostlin čeledi *Amaranthaceae* a u některých druhů se ukázaly jako hlavní účinné složky. Mohou být zodpovědné za farmakologickou aktivitu rostlin, jejichž saponinový profil nebyl dosud zcela objasněna. Zástupci rodu *Alternanthera* mají významný farmakologický potenciál a slibné biologické aktivity, zejména v oblasti antioxidačních (Escudero et al., 2011; Kraujalis et al., 2013), imunomodifikačních, protinádorových a antibakteriálních účinků (Sun, 2006). Několik druhů z rodu *Alternanthera* např.: *A. brasiliiana*, *A. sessilis*, *A. pungens*, *A. dentate*) se široce používá v tradiční medicíně (Ramachandran, 2007). V našem měření jsme testovali dvě rostliny tohoto rodu. Kromě *A. flavescens* i *A. brasiliiana*, u které jsme ovšem nezjistili cytotoxickou aktivitu na žádné z testovaných buněčných linií.

George et al. (2010) ve své studii léčivých rostlin prokázal pomocí metody MTT mírný cytotoxický účinek extraktu z *A. sessilis* na buněčné linie pankreatického karcinomu Panc-1 s  $IC_{50} = 13,08 - 34,9 \mu\text{g/ml}$ . Etanolový extrakt z *A. philoxeroides* o koncentraci 200 mg/ml ukázal významný cytotoxický účinek na nádorové buněčné linie HeLa (97,24% úmrtnost buněk) a buněčné linii L929 (84,75% úmrtnost buněk) (Fang et al., 2007). Akhtar et al. (2017) prokázali mutagenní účinky metanolových a n-hexanových extraktů z *A. bettzickiana* na kmeny *Salmonella* TA-100 a TA-102, naopak tyto extrakty nevykazovaly v testu MTT žádné cytotoxické účinky na buněčnou linii BHK-21 s  $IC_{50} = 456 - 493 \mu\text{g/ml}$ . Dále v této studii metanolový extrakt ukázal přítomnost saponinů, taninů, terpenoidů, flavonoidů a glykosidů. Nicméně extrakt n-hexanu odhalil pouze přítomnost taninů a terpenoidů. Han et al. (2017) hodnotil cytotoxicitu 27 oleanových saponinů z *Albizia julibrissin* (*Fabaceae*) proti čtyřem lidským nádorovým buněčným liniím BGC-823, A549, HCT-116 a HepG2. Julibrosid J<sub>44</sub> byl nejaktivnější sloučeninou se všemi hodnotami  $IC_{50}$  menšími než 5  $\mu\text{M}$ . Vztah struktury a cytotoxické aktivity těchto saponinů jasně ukázal, že vnější monoterpenoidní část a její substituenty jsou rozhodující a existence 16-OH aglykonu na cytotoxicitu nemá téměř žádný vliv. Aktivitu naopak zvyšuje N-acetyl-glukosaminová skupina na C-3. Vztah mezi strukturou saponinů a jejich cytotoxickou aktivitou prokázali i Jabrane et al. (2011), kteří testovali saponiny z *Atriplex glauca* (*Amaranthaceae*) na buněčných liniích lidského karcinomu tlustého střeva HT-29 a HCT116. Z testovaných sloučenin byl saikogenin F vyhodnocen jako nejaktivnější, vykazující  $IC_{50} = 7,08 \mu\text{M}$  na buňkách HT-29 a  $IC_{50} = 9,47 \mu\text{M}$  na linii HCT 116. Glucosid

C vykazoval mírnou cytotoxicitu s hodnotami  $IC_{50} = 24,34 \mu\text{M}$  a  $27,23 \mu\text{M}$  na buňkách HT-29 a HCT116. Obě účinné sloučeniny mají společnou aglykonovou strukturu v poloze C-3, která může určovat jejich cytotoxickou aktivitu. Provedení chemické analýzy *A. flavescens* na obsah jednotlivých sekundárních metabolitů, použití jiné extrakční metody či otestování extraktu vůči dalším buněčným liniím by mohlo pomoci podrobněji prozkoumat její cytotoxické účinky.

Extrakty *P. alliacea* (*Mucura macho*) patřily, v porovnání s námi zkoumanými vzorky, mezi ty s nejvyšší cytotoxicitou vůči buněčné linii kolorektálního karcinomu HT-29 ( $IC_{50} = 81,10 \pm 2,80 \mu\text{g/ml}$ ) a zároveň s nejlepší selektivitou vůči této linii. Naopak extrakt *P. alliacea* (*Mucura hembra*) nevykázal cytotoxicitu na žádné námi testované buněčné linii. V literatuře tyto dvě varianty rostliny rozlišovány nejsou. Hernández et al. (2017) jako složky *P. alliacea* identifikovali benzaldehyd, leridol, petiveral, myricetin, petiveral-4-ethyl, pinitol, dibenzyldisulfid a dibenzyltrisulfid. V této studii byla dále testována cytotoxicita etanolového extraktu *P. alliacea* na lidské a myší buněčné linie 4T1, TS/A, 3T3, MCF12F a HS578T pomocí metody MTT. Hodnoty  $IC_{50}$  činily  $30 \mu\text{g/ml}$  u buněk HS578T a 4T1,  $77 \mu\text{g/ml}$  u buněčné linie TS/A a  $88 \mu\text{g/ml}$  u buněčné linie HCT116 a značily tedy mírnou toxicitu tohoto extraktu. Z testování také vyplynulo, že extrakt *P. alliacea* způsobuje pokles mitochondriální respirace, expresi ATP-syntázy a intracelulární koncentrace ATP na buněčných liniích rakoviny prsu.

Nejvíce testovanou složkou extraktu *P. alliacea* je dibenzyltrisulfid (DTS). Cytotoxická aktivita DTS byla poprvé objasněna za použití lidských buněk neuroblastomu SH-SY5 (Rösner et al., 2001). Hlavním účinkem DTS v protinádorové aktivitě je pravěpodobně indukce apoptotické buněčné smrti (Williams et al., 2004b). Cytotoxicita DTS byla testována na několika lidských rakovinných buněčných liniích jako například malobuněčný karcinom plic H460 ( $IC_{50} = 5,1 \mu\text{M}$ ), adenokarcinom HeLa ( $IC_{50} = 2,5 \mu\text{M}$ ) či ovariální karcinom A2780 a OVCAR4 ( $IC_{50} = 0,40 \mu\text{M}$  a  $1,4 \mu\text{M}$ ) (An et al., 2006). Cytotoxický účinek DTS na lidskou SH-SY5 neuroblastomovou buněčnou linii byl zvýšen komplexací DTS s bovinním sérovým albuminem 70x *in vitro* (Williams et al., 2002; Williams et al., 2004a).

Mezi extrakty, u kterých jsme v našem testování nezjistili cytotoxickou aktivitu na žádné z testovaných buněčných linií patřily, kromě výše zmiňované *A. brasiliana*, také *M. alliacea* či *A. triplinervis*.

Zoghbi et al. (2009) jako hlavní složky *M. alliacea* identifikovali sloučeniny síry dialyldisulfid, allin či allicin. V sušině květů *M. alliacea* nasbíraných v Indii bylo stanoveno množství 1,76 % allinu. Pro srovnání obsah této látky v česneku kuchyňském (*Allium sativum*) je 2,34 % (Rao a Rao, 1982). Davila et al. (1997) uvádějí, že *M. alliacea* obsahuje několik organických sírných složek, které se také vyskytují v česneku, tyto sloučeniny korelují s nižším výskytem rakoviny v klinických studiích (Dorant et al., 1993; Thomson a Ali, 2003; Wang et al., 2010). Ariga a Seki (2006) uvádějí, že dialyldisulfid má protinádorové účinky. Kwon et al. (2002) objevili, že dialyldisulfid vyvolává apoptózu lidské leukemické buněčné linie HL pomocí aktivace kaspázy-3 (enzym účastnící se apoptózy buněk). Dialyltrisulfid pak indukuje apoptózu v buňkách lidské rakoviny prostaty PC-3 a DU145 (Xiao a Singh, 2005). Towne et al. (2015) prokázali selektivní inhibici růstu myších rakovinných buněk T3-HA pomocí extraktu z listů *M. alliacea*. Itokawa et al. (1992) uvádějí, že etanolový extrakt z *M. alliacea* prokázal cytotoxickou aktivitu proti buňkám V-79 s  $IC_{50} = 5,6 \text{ mg/ml}$ , tato biologická aktivita je v tomto případě ovšem připisována naftochynonům. Dále mají extrakty této rostliny antioxidační aktivitu (Tasambay Salazar et al., 2017) a působí protizánětlivě (Zoghbi et al. 2009). I přes pozitivní výsledky jiných studií se nám nepodařilo prokázat cytotoxicitu metanolového extraktu *M. alliacea* vůči námi testovaným buněčným liniím lidského kolorektálního karcinomu a hepatokarcinomu.

Nejcharakterističtějšími sekundárními metabolity *A. triplinervis* jsou kumariny. Mezi nejvíce zastoupené patří celkem sedm kumarinů - herniarin, ayapin, daphnetin, daphnetindimethylether, daphnetin-7-methylether, hydrangetin a umbelliferon (Chaturvedi a Mulchandani, 1989; Natarajan a Natarajan, 1979). Ochranné účinky kumarinů proti cytotoxicitě vyvolané hydroperoxidem kyseliny linolové byly zkoumány v kultivovaných lidských endoteliálních buňkách pupečnickové žíly. Kumariny, jako je umbelliferon (7-hydroxykumarin), obsahující pouze jednu hydroxylovou skupinu neprokázaly žádný ochranný účinek (Kaneko et al., 2003). Valiahdi et al. (2013) hodnotili cytotoxickou aktivitu několika kumarinů pomocí buněčných linií karcinomu vaječníků (CH1), karcinomu plic (A549) a melanomu (SK-MEL-28) pomocí MTT testu. Herniarin neboli ayapanin prokázal pouze mírnou cytotoxicitu ( $IC_{50} = 62,5 \text{ } \mu\text{M}$ ) na buněčné linii CH1, na ostatní linie cytotoxicita nebyla prokázána. Yang et al. (1999) studovali vliv kumarinu a jeho derivátů, včetně daphnetinu, na aktivitu proteinkináz, které hrají klíčovou roli v řízení proliferace, diferenciaci a metabolismu buněk. Daphnetin byl, jako jediná

z testovaných látek, prokázán jako inhibitor proteinkinázy. Ovšem nebyla prokázána jeho účinnost na lidskou linii hepatokarcinomu Hep-G2. Strukturní srovnání daphnetinu s kumarinem a jinými kumarinovými deriváty naznačuje, že hydroxylace na C-8 může být stěžejní pro jeho účinnost. Dle výše uvedených studií se zdá, že daphnetin by mohl být slibnou sloučeninou pro testování cytotoxicity na dalších buněčných liniích.

## 7. Závěr

Cílem práce bylo otestovat 9 léčivých rostlin z peruánské Amazonie, které doposud vůči panelu lidských buněčných linií karcinomu tlustého střeva (Caco-2 a HT-29), hepatokarcinomu (Hep-G2) a zdravým lidským plicním fibroblastům (MRC-5) nebyly testovány, na jejich *in cellulo* antiproliferační aktivitu. Byla použita metoda MTT, která využívá soli tetrazol bromidu, který tvoří fialové krystaly v mitochondriích živých buněk.

Žádný ze vzorků výraznou cytotoxicitu vůči testovaným buněčným liniím neprokázal. U tří vzorků byla zjištěna pouze mírná cytotoxicita. Přesto v některých dalších studiích, které testovaly extrakty stejných rostlin na jiných buněčných liniích, cytotoxicita prokázána byla. Nejednotnost výsledků mohla být způsobena konkrétními vlastnostmi našich vzorků, které mohly být ovlivněny například zeměpisným původem, genetickou variací, fází růstu a zralostí či způsobem sklizně rostliny, úpravou vzorků či použitými buněčnými liniemi, na kterých byla cytotoxicita testována.

## 8. Seznam použité literatury

Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J, 2011. *Obecná onkologie*. Galén. Praha. 394 s. ISBN: 978-80-7262-715-8.

Aguilar, G. 2001. Access to genetic resources and protection of traditional knowledge in the territories of indigenous peoples. *Environmental Science & Policy*. 4(4). 241-256.

Akhtar, M.F., Sharif, A., Saleem, M., Saleem, A., Akhtar, B., Raza, M., Ijaz, H., Shabbir, M., Ali, S., Nasim, M.B. 2017. Genotoxic and cytotoxic potential of *Alternanthera Bettzickiana*, an important ethno-medicinal plant. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 63(8). 109-114.

Alberg, A.J. 2002. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*. 180(2). 121-137.

Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., López-Toledo, G., Chávez, M., de Jesús Ortiz-Tello, A., García-Carrancá, A. 2012. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg.(*Euphorbiaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*. 140(2). 438-442.

Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M., Chichiarelli, S. 2008. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*. 10(5). 891- 938.

An, H., Zhu, J., Wang, X., Xu, X. 2006. Synthesis and anti-tumor evaluation of new trisulfide derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 16(18). 4826-4829.

Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*. 25(9). 2097-2116.

Anwar, F., Hussain, A.I., Sherazi, S.T.H., Bhangar, M.I. 2009. Changes in composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruit at different stages of maturity. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*. 15(2). 187-202.



- Ariga, T., Seki, T. 2006. Antithrombotic and anticancer effects of garlic derived sulfur compounds: A review. *Biofactors*. 26(2). 93-103.
- Asha, I.Z., Khan, M.I.H., Mukharjee, S.K., Rony, S.R. 2017. Total Phenolic Content, Cytotoxic, Antioxidant, Thrombolytic, Membrane Stabilizing And Antimicrobial Activities of *Eupatorium Ayapana* Vent. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*. 6(8). 2319-6718.
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.-S., Bai, L., Pan, M.H. 2015. Flavonolignans and other constituents from *Lepidium meyenii* with activities in anti-inflammation and human cancer cell lines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 63(9). 2458-2463.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. 2013. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*. 5(4). 1732-1740.
- Bertram, J.S. 2000. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*. 21(6). 167-223.
- Bosch, F.X., Ribes, J., Díaz, M., Cléries, R. 2004. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 127(5). S5-S16.
- Brewer, M.S. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 10(4). 221- 247.
- Bussmann, R.W., Sharon, D. 2006. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2(1). 47.
- Chaturvedi, R., Mulchandani, N.B. 1989. Coumarins from *Eupatorium Ayapana*. *Indian Chemical soc*. 92. 286-387.
- Chen, L., Zhao, L., Zhang, C., Lan, Z. 2014. Protective effect of *p*-cymene on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Inflammation*. 37(2). 358-364.

Chevallier, A. 1996. The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley. London. 336 p. ISBN: 9780751303148.

Cordell, G.A., Beecher, C.W.W., Pezzuto, J.M. 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *Journal of ethnopharmacology*. 32(1-3). 117- 133.

Correa, W.R., Hern, A.J., Marinho, J.V.N., Pascoal, A.C.R.F., de Carvalho, J.E., Marchioretto, M.S., Salvador, M.J. 2016. Antioxidant and Cytotoxic Activities and chemical Profile of Five *Amaranthaceae* Plants Collected in the South of Brazil. *Natural Products Chemistry & Research*. 4(5).

Coussens, L.M., Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. 420(6917). 860-867.

Couto, C.L.L., Moraes, D.F.C., Maria do Socorro, S.C., do Amaral, F.M.M., Guerra, R.N. 2016. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.: A review study. *Journal of Medicinal Plants Research*. 10(21). 286-297.

Damayanthi, Y., Lown, J.W. 1998. Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Current medicinal chemistry*. 5. 205-252.

De Pascual, T.J., Torres, B.C., Perez, M.A. 1980. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. *Rivista Italiana Essenze, Profiumi. Piante Officinali Aromi Cosmetica Aerosol*. 62. 123-125.

DeFilipps, R.A., Maina, S.L., Crepin, J. 2004. Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). [online]. Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution Washington, DC. [cit. 2018-02-02]. Dostupné z <<https://botany.si.edu/BDG/medicinal/Introduction.pdf>>.

Degenhardt, R.T., Farias, I.V., Grassi, L.T., Franchi Jr, G.C., Nowill, A.E., Bittencourt, C.M.d.S., Wagner, T.M., Souza, M.M.d., Cruz, A.B., Malheiros, A. 2016. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26(1). 56-61.

Deschesnes, R.G., Huot, J., Valerie, K., Landry, J. 2001. Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation. *Molecular biology of the cell*. 12(6). 1569-1582.

- Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N., Ray, C. 1968. Screening of Indian plants for biological activity: I. Indian journal of experimental biology. 6(4). 232-247.
- Dorant, E., van den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A., Hermus, R.J.J., Sturmans, F. 1993. Garlic and its significance for the prevention of cancer in humans: a critical view. British journal of cancer. 67(3). 424.
- Duarte, M.d.R., Debur, M.d.C. 2004. Characters of the leaf and stem morpho-anatomy of *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze, *Amaranthaceae*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 40(1). 85-92.
- Dubois, J. 2006. Recent progress in the development of docetaxel and paclitaxel analogues. Expert Opinion on Therapeutic Patents. 16(11). 1481-1496.
- Efferth, T., Li, P.C.H., Konkimalla, V.S.B., Kaina, B. 2007. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. Trends in molecular medicine. 13(8). 353-361.
- Escudero, N.L., Albarracin, G.J., Lucero Lopez, R.V., Giménez, M.S. 2011. Antioxidant activity and phenolic content of flour and protein concentrate of *Amaranthus cruentus* seeds. Journal of Food Biochemistry. 35(4). 1327-1341.
- Fang, J.-B., Jia, W., Gao, W.-Y., Yao, Z., Teng, J., Zhao, A.-H., Duan, H.-Q. 2007. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. Journal of Asian natural products research. 9(6). 511-515.
- Fang, W.S., and Liang, X.T. 2005. Recent progress in structure activity relationship and mechanistic studies of taxol analogues. Mini reviews in medicinal chemistry. 5(1). 1-12.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [online]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. [cit. 2017-12-15]. Dostupné z <<http://globocan.iarc.fr>>
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. Nature Reviews Cancer. 3(6). 453.

- Garcia-Carbonero, R., Supko, J.G. 2002. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clinical Cancer Research*. 8(3). 641-661.
- Georgakilas, A.G., Mosley, W.G., Georgakila, S., Ziech, D., Panayiotidis, M.I. 2010. Viral-induced human carcinogenesis: an oxidative stress perspective. *Molecular BioSystems*. 6(7). 1162-1172.
- George, S., Bhalerao, S.V., Lidstone, E.A., Ahmad, I.S., Abbasi, A., Cunningham, B.T., Watkin, K.L. 2010. Cytotoxicity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts on pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative medicine*. 10(1). 52.
- Gertsch, J., Meier, S., Tschopp, N., Altmann, K.-H. 2007. New tubulin inhibitors from plants—a critical assessment. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 61(6). 368-372.
- Gonzales, G.F., and Valerio, L.G. 2006. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 6(5). 429-444.
- Gordaliza, M. 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*. 9(12). 767-776.
- Gurib-Fakim, A., Brendler, T. 2004. Medicinal and aromatic plants of Indian Ocean Islands: Madagascar, Comoros, Seychelles and Mascarenes. Medpharm GmbH Scientific Publishers. Stuttgart. 575p. ISBN: 3887630947.
- Hait, W.N., Rubin, E., Alli, E., Goodin, S. 2007. Tubulin targeting agents. Update on cancer therapeutics. 2(1). 1-18.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 119(6). 598- 620.
- Han, Q., Qian, Y., Wang, X., Zhang, Q., Cui, J., Tu, P., Liang, H. 2017. Cytotoxic oleanane triterpenoid saponins from *Albizia julibrissin*. *Fitoterapia*. 121. 183-193.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer cell. 100(1). 57-70.

- Hara, H., Maruyama, N., Yamashita, S., Hayashi, Y., Lee, K.-H., Bastow, K.F., Marumoto, R., Imakura, Y. 1997. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine americana*. Chemical and pharmaceutical bulletin. 45(10). 1714-1716.
- Hardcastle, J.D., Chamberlain, J.O., Robinson, M.H.E., Moss, S.M., Amar, S.S., Balfour, T.W., James, P.D., Mangham, C.M. 1996. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. The Lancet. 348(9040). 1472-1477.
- Hernández, J.F., Urueña, C.P., Sandoval, T.A., Cifuentes, M.C., Formentini, L., Cuezva, J.M., Fiorentino, S. 2017. A cytotoxic *Petiveria alliacea* dry extract induces ATP depletion and decreases  $\beta$ -F1-ATPase expression in breast cancer cells and promotes survival in tumor-bearing mice. Revista Brasileira de Farmacognosia. 27(3). 306-314.
- Ichikawa, H., Nakamura, Y., Kashiwada, Y., Aggarwal, B.B. 2007. Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. Current pharmaceutical design. 13(33). 3400-3416.
- Ifesan, B.O.T., Voravuthikunchai, S.P. 2009. Effect of *Eleutherine americana* merr. Extract on enzymatic activity and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in broth and cooked pork. Foodborne pathogens and disease. 6(6). 699-704.
- Ito, H., Matsumoto, K., Morita, H., Takeya, K. 1992. Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. Phytochemistry. 31(3). 1061-1062.
- Itzkowitz, S.H., Yio, X. 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 287(1). G7-G17.
- Iwase, Y., Takemura, Y., Ju-ichi, M., Kawaii, S., Yano, M., Okuda, Y., Mukainaka, T., Tsuruta, A., Okuda, M., Takayasu, J. 1999. Inhibitory effect of Epstein-Barr virus activation by Citrus fruits, a cancer chemopreventor. Cancer letters. 139(2). 227-236.
- Jaberian, H., Piri, K., Nazari, J. 2013. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. Food chemistry. 136(1). 237-244.

- Jabrane, A., Ben Jannet, H., Miyamoto, T., Tanaka, C., Mirjolet, J.F., Duchamp, O., Harzallah Skhiri, F., and Lacaille Dubois, M.A. 2011. Glucosides A–C, three saikosaponins from *Atriplex glauca* L. var. *ifiniensis* (Caball) Maire. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 49(2). 83-89.
- Jardim, C.M., Jham, G.N., Dhingra, O.D., and Freire, M.M. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of chemical ecology*. 34(9). 1213-1218.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 61(2). 69-90.
- Kaneko, T., Baba, N., Matsuo, M. 2003. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chemico-biological interactions*. 142(3). 239-254.
- Kartal, M. 2007. Intellectual property protection in the natural product drug discovery, traditional herbal medicine and herbal medicinal products. *Phytotherapy research*. 21(2). 113-119.
- Kinghorn, A.D., Su, B.N., Dae, S.J., Leng, C.C., Lee, D., Gu, J.Q., Carcache-Blanco, E.J., Pawlus, A.D., Sang, K.L., Eun, J.P. 2004. Natural inhibitors of carcinogenesis. *Planta medica*. 70(8). 691-705.
- Kingston, D.G., Newman, D.J. 2007. Taxoids: cancer-fighting compounds from nature. *Current opinion in drug discovery & development*. 10(2). 130-144.
- Kiuchi, F., Itano, Y., Uchiyama, N., Honda, G., Tsubouchi, A., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T. 2002. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Natural Products*. 65(4). 509-512.
- Klener, P., Klener jr, P. 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada Publishing a.s. Praha. 232 s. ISBN: 978-80-247-2808-7.
- Kliks, M.M. 1985. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. *Social Science & Medicine*. 21(8). 879-886.

- Knauth, P., Acevedo-Hernández, G.J., Cano, M.E., Gutiérrez-Lomelí, M., López, Z. 2018. In Vitro Bioactivity of Methanolic Extracts from *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl., *Chenopodium ambrosioides* L., *Cirsium mexicanum* DC., *Eryngium carlinae* F. Delaroché, and *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. Used in Traditional Medicine in Mexico. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018
- Koba, K., Catherine, G., Raynaud, C., Chaumont, J.-P., Sanda, K., Laurence, N. 2009. Chemical composition and cytotoxic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil from Togo. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 44(4). 435-440.
- Komura, H., Mizukawa, K., Minakata, H., Huang, H., Qin, G., Xu, R. 1983. New anthraquinones from *Eleutherine americana*. Chemical and pharmaceutical bulletin. 31(11). 4206-4208.
- Kraujalis, P., Venskutonis, P.R., Kraujalienė, V., Pukalskas, A. 2013. Antioxidant properties and preliminary evaluation of phytochemical composition of different anatomical parts of amaranth. Plant foods for human nutrition. 68(3). 322-328.
- Kronborg, O., Fenger, C., Olsen, J., Jørgensen, O.D., and Søndergaard, O. 1996. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. The Lancet. 348(9040). 1467-1471.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 711(1). 193-201.
- Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S. 2003. Holland-Frei cancer medicine, 6th edition. BC Decker. Hamilton. ISBN: 1-55009-213-8
- Kumar, S., Singh, P., Mishra, G., Srivastar, S., Jha, K.K., Khosa, R.L. 2011. Phytopharmacological review of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae). Asian J Plant Sci Res.1(1). 41-47.
- Kwon, K.-B., Yoo, S.-J., Ryu, D.-G., Yang, J.-Y., Rho, H.-W., Kim, J.-S., Park, J.-W., Kim, H.-R., Park, B.-H. 2002. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells<sup>1</sup>. Biochemical pharmacology. 63(1). 41-47.

- Leveque, D., Jehl, F. 2007. Molecular pharmacokinetics of *catharanthus (vinca)* alkaloids. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 47(5). 579-588.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England journal of medicine*. 343(2). 78-85.
- Liu, Y., Wu, F. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental health perspectives*. 118(6). 818.
- Llovet, J.M. 2005. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology*. 40(3). 225-235.
- Lopes-Martins, R.A.B., Pegoraro, D.H., Woisky, R., Penna, S.C., Sertié, J.A.A. 2002. The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L.(*Phytolaccaceae*). *Phytomedicine*. 9(3). 245-248.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A. 2008. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas 4. ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. Nova Odessa, 608 p. ISBN: 8586714097.
- Mackay, J. 2006. The cancer atlas. American Cancer Society. 128 p. ISBN: 978-0944235621.
- Mandel, J.S., Bond, J.H., Church, T.R., Snover, D.C., Bradley, G.M., Schuman, L.M., Ederer, F. 1993. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. *New England Journal of Medicine*. 328(19). 1365-1371.
- Marmot, M., Atinmo, T., Byers, T., Chen, J., Hirohata, T., Jackson, A., James, W., Kolonel, L., Kumanyika, S., Leitzmann, C. 2007. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. 537 p. American Institute for Cancer Research: Washington DC. ISBN: 9780972252225.
- Maskarinec, G., Noh, J.J. 2004. The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii. *Ethnicity & disease*. 14(3). 431-439.



- Matos Lopes, T.R., de Oliveira, F.R., Malheiros, F.F., de Andrade, M.A., Monteiro, M.C., and Baetas Goncalves, A.C. 2015. Antimicrobial bioassay-guided fractionation of a methanol extract of *Eupatorium triplinerve*. *Pharmaceutical biology*. 53(6). 897-903.
- McCarty, L.B., Everest, J.W., Hall, D.W. 2008. *Color atlas of turfgrass weeds: a guide to weed identification and control strategies*. John Wiley & Sons. Hoboken. 432 p. ISBN: 9780470189511.
- Ming, K.J., and Yinghong, L. 2006. New Bioactive Compounds from Herbs. The active components of herbal plants possess properties that fight disease. *Innovation; The Singapore magazine of research, technology and education*. 6(2).
- Missouri Botanical Garden. 1991. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Missouri Botanical Garden Press. 78(1). ISSN: 0026-6493.
- Monzote, L., Montalvo, A.M., Almanonni, S., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J. 2006. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*. 52(3). 130-136.
- Monzote, L., Nance, M.R., Garcia, M., Scull, R., and Setzer, W.N. 2011. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. *Natural product communications*. 6(2). 281-286.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65(1-2). 55-63.
- Mroczek, A. 2015. Phytochemistry and bioactivity of triterpene saponins from *Amaranthaceae* family. *Phytochemistry reviews*. 14(4). 577-605.
- Murray, R.D.H., Mendez, J., Brown, S.A. 1982. *The natural coumarins*. J. Wiley & Sons, New York. 667 p. ISBN: 0471280577.
- Naik, A.D., Juvekar, A.R. 2003. Effects of alkaloidal extract of *Phyllanthus niruri* on HIV replication. *Indian journal of medical sciences*. 57(9). 387-393.
- Nascimento, F.R.F., Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Azevedo, A.P.S., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M. 2006. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life sciences*. 78(22). 2650-2653.

- Natarajan, R.K., Natarajan, M. 1979. Phytochemical investigation of *Eupatorium ayapana*. Journal of Research Indian medicine, yoga and homeopathy. 14. 155-146.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of natural products. 70(3). 461-477.
- Nishikawa, A., Mori, Y., Lee, I.-S., Tanaka, T., Hirose, M. 2004. Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis. Current drug metabolism. 5(5). 363-373.
- NOR. 2015. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Národní onkologický registr (NOR). [online] [cit. 2018-12-15]. Dostupné z <<http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>>.
- Ogata, T., Higuchi, H., Mochida, S., Matsumoto, H., Kato, A., Endo, T., Kaji, A., Kaji, H. 1992. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*. AIDS research and human retroviruses. 8(11). 1937-1944.
- Onocha, P.A., Ekundayo, O., Eramo, T., Laakso, I. 1999. Essential oil constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves from Nigeria. Journal of Essential Oil Research. 11(2). 220-222.
- Pare, P.W., Zajicek, J., Ferracini, V.L., Melo, I.S. 1993. Antifungal terpenoids from *Chenopodium ambrosioides*. Biochemical systematics and ecology. 21(6-7). 649-653.
- Patel, I., Sipai, S., Rathod, D., Shrimali, G., Patel, A., Rami, E. 2013. Phytochemical studies on *Mansoa alliacea* (Lam.). International Journal of Advances in Pharmaceutical Research. 4(6).1823-1828.
- Pereira, W.S., Ribeiro, B.P., Sousa, A.I.P., Serra, I.C.P.B., Mattar, N.S., Fortes, T.S., Reis, A.S., Silva, L.A., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M. 2010. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. Journal of ethnopharmacology. 127(3). 602-605.
- Podolak, I., Galanty, A., Sobolewska, D. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. Phytochemistry Reviews. 9(3). 425-474.
- Pollack, Y., Segal, R., Golenser, J. 1990. The effect of ascaridole on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. Parasitology Research. 76(7). 570-572.

- Popoca, J., Aguilar, A.I., Alonso, D., Villarreal, M.L. 1998. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 59(3). 173-177.
- Proctor, R.N. 2001. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nature Reviews Cancer*. 1(1). 82.
- Quattrocchi, U. 2012. CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology. CRC Press. 3960 p. ISBN: 9781420080445.
- Ramachandran, V.S. 2007. Wild edible plants of the Anamalais, Coimbatore district, western Ghats, Tamil Nadu. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 6(1). 173-176.
- Rao, E.V., Rao, M.A. 1982. Apigenin-7-O-methylglucuronide from *Adenocalymma alliaceum*. *Current Science* 51(21). 1040-1040.
- Rao, M.A., Rao, E.V. 1980. Flavonoids of the flowers of *Adenocalymma [Pseudocalymma] alliaceum*. *Current Science*. 49(12). 468-469.
- Richardson, M.A., Sanders, T., Palmer, J.L., Greisinger, A., Singletary, S.E. 2000. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 18(13). 2505-2514.
- Riva, L., Coradini, D., Di, G.F., De, V.F., De, N.T., De, F.S., Pizza, C. 2001. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Research*. 21(4A). 2457-2461.
- Rösner, H., Williams, L.A.D., Jung, A., and Kraus, W. 2001. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1540(2). 166-177.
- Salazar, A.T., Scalvenzi, L., Lescano, A.S.P., Radice, M. Ethnopharmacology, biological activity and chemical characterization of *Mansoa alliacea*. A review about a promising plant from Amazonian region. *MOL2NET 2017, International Conference on Multidisciplinary Sciences*, 3rd edition, 4617.

Samudrala, P.K., Augustine, B.B., Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Barua, C., Lahkar, M. 2015. Evaluation of antitumor activity and antioxidant status of *Alternanthera brasiliensis* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Pharmacognosy research*. 7(1). 66.

Sangiovanni, A., Del Ninno, E., Fasani, P., De Fazio, C., Ronchi, G., Romeo, R., Morabito, A., De Franchis, R., Colombo, M. 2004. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology*. 126(4). 1005-1014.

Shahidi, F. 2012. Dried fruits: phytochemicals and health effects. John Wiley & Sons. 508 p. ISBN: 978-0-813-81173-4.

Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S. 2012. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 62(4). 220-241.

Silva Delgado, H., Hidalgo Herrera, J.E., Cerrutti Sifuentes, T., Garcia Ruiz, J., Mestanza Dávila, M., Rios Isern, F. 1997. Plantas medicinales de la amazonía peruana utilizadas por curanderos y chamanes con fines anticceptivos. Instituto de Medicina Tradicional, Lima.

Slíva, J., Votava, M. 2010. *Farmakologie*, 1. vyd. Triton. Praha. 238 s. ISBN: 978-80-7387-424-7.

Soares, M.H., Dias, H.J., Vieira, T.M., de Souza, M.G.M., Cruz, A.F.F., Badoco, F.R., Nicolella, H.D., Cunha, W.R., Groppo, M., Martins, C.H.G. 2017. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (*Chenopodiaceae*). *Chemistry & biodiversity*. 14(8).

Sparg, S., Light, M.E., Van Staden, J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*. 94(2-3). 219-243.

Stewart, B.W., Kleihues, P. 2003. World cancer report. [online] IARC. press Lyon. [cit. 2018-02-20]. Dostupné z <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/WorldCancerReport.pdf>>.

Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M.-N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K. 2006. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental health perspectives*. 114(12). 1898.

Sun, H.X. 2006. Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice. *Vaccine*. 24(17). 3432-3439.

Syamasundar, K.V., Singh, B., Thakur, R.S., Husain, A., Yoshinobu, K., Hiroshi, H. 1985. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs. *Journal of ethnopharmacology*. 14(1). 41-44.

Sáez, J.A.L., and Soto, J.P. 2010. Fitoquímica y valor ecológico del olor a ajo en los vegetales. *Medicina naturista*. 4(1). 15-23.

Taylor, L. 2012. Raintree tropical plant database [online]. [cit. 2018-02-20]. Dostupné z <<http://www.rain-tree.com/plants.htm>>.

Taylor, P., Colman, L., Bajoon, J. (2014). The search for plants with anticancer activity: Pitfalls at the early stages. *Journal of ethnopharmacology*, 158, 246-254.

Thomson, M., Ali, M. 2003. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Current cancer drug targets*. 3(1). 67-81.

Towne, C.M., Dudt, J.F., Ray, D.B. 2015. Effect of *Mansoa alliacea* (*Bignoniaceae*) leaf extract on embryonic and tumorigenic mouse cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*. 9(29). 799-805.

Valiahdi, S.M., Iranshahi, M., Sahebkar, A. 2013. Cytotoxic activities of phytochemicals from *Ferula* species. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 21(1). 39.

Venkateswaran, P.S., Millman, I., Blumberg, B.S. 1987. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: *in vitro* and *in vivo* studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84(1). 274-278.

Vickers, W.T., Plowman, T. 1984. Useful plants of the Siona and Secoya Indians of eastern Ecuador. *Field Museum of Natural History*. 84 p. ISSN: 00 15-0746.

Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T.a., Sim, G.A. 1966. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*, Journal of the American Chemical Society. 88(16). 3888-3890.

Wang, H.C., Yang, J.-H., Hsieh, S.-C., Sheen, L.-Y. 2010. Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage mediated G2/M arrest and apoptosis. Journal of agricultural and food chemistry. 58(11). 7096-7103.

Weniger, B., Haag-Berrurier, M., Anton, R. 1982. Plants of Haiti used as antifertility agents. Journal of Ethnopharmacology. 6(1). 67-84.

Wild, C.P., Gong, Y.Y. 2009. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. Carcinogenesis. 31(1). 71-82.

Williams, L.A.D., Rosner, H., Conrad, J., Moller, W., Beifuss, U., Chiba, K., Nkurunziza, J.P., Kraus, W. 2002. Selected secondary metabolites from *Phytolaccaceae* and their biological/pharmaceutical significance. Research Signpost. In: Recent Res Devel in Phytochem. 6. 13-68.

Williams, L.A.D., Rosner, H., Moller, W., Conrad, J., Nkurunziza, J.P., Kraus, W. 2004a. In vitro anti-proliferation/cytotoxic activity of sixty natural products on the human SH-SY5Y neuroblastoma cells with specific reference to dibenzyl trisulphide. West indian medical journal. 53. 208-219.

Williams, L.A.D., Rosner, H., Moller, W., and Kraus, W. 2004b. Antiproliferation/cytotoxic action of dibenzyl trisulphide, a secondary metabolite of *Petiveria alliacea*. Jam J Sci Tech. 15. 54-60.

Williams, L.A.D., The, T.L., Gardner, M.T., Fletcher, C.K., Naravane, A., Gibbs, N., Fleishacker, R. 1997. Immunomodulatory activities of *Petiveria alliacea* L. Phytotherapy Research. 11(3). 251-253.

World Health, O. 2002. WHO traditional medicine strategy 2002-2005. [online]. [cit. 2018-02-20]. Dostupné z <[http://www.wpro.who.int/health\\_technology/book\\_who\\_traditional\\_medicine\\_strategy\\_2\\_002\\_2005.pdf](http://www.wpro.who.int/health_technology/book_who_traditional_medicine_strategy_2_002_2005.pdf)>.

- Xiao, D., Singh, S.V. 2005. Diallyl trisulfide, a constituent of processed garlic, inactivates Akt to trigger mitochondrial translocation of BAD and caspase-mediated apoptosis in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 27(3). 533-540.
- Xijing, L., Nai-Li, W., Li Rong-Xian, L. 2009. Effect of *Eleutherine Americana* Extracts on Rats' Vascular Ring of Aorta *ex vivo*. *China Pharm*. 18. 1376-1378.
- Yang, E.B., Zhao, Y.N., Zhang, K., Mack, P. 1999. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*. 260(3). 682-685.
- Zastera, J., Roewer, L., Willuweit, S., Sekerka, P., Benesova, L., Minarik, M. 2010. Assembly of a large Y-STR haplotype database for the Czech population and investigation of its substructure. *Forensic science international: genetics*. 4(3). e75-e78.
- Zavoral, M., Suchanek, S., Zavada, F., Dusek, L., Muzik, J., Seifert, B., Fric, P. 2009. Colorectal cancer screening in Europe. *World journal of gastroenterology: WJG*. 15(47). 5907.
- Zhengxiong, C., Huizhu, H., Chengrui, W., Yuhui, L., Jianmi, D., Sankawa, U., Noguchi, H., Iitaka, Y. 1984. Hongconin, a new naphthalene derivative from the rhizome of *Eleutherine americana* (Hong-Cong). *Heterocycles*. 22(4). 691-694.
- Ziegler, R.G., Hoover, R.N., Pike, M.C., Hildesheim, A., Nomura, A.M.Y., West, D.W., Wu-Williams, A.H., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., Rosenthal, J.F. 1993. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 85(22). 1819-1827.
- Zoghbi, M.d.G.B., Oliveira, J., Guilhon, G.M.S.P. 2009. The genus *Mansoa* (*Bignoniaceae*): a source of organosulfur compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(3). 795-804.
- Zolla, C. 1980. Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. *Journal of ethnopharmacology*. 2(1). 37-41

## 9. Seznam obrázků

Obr. 1: Hlavní kroky formace metastázy

Obr. 2: Působení oxidačního stresu na DNA

Obr. 3: Celosvětová úmrtnost na jednotlivé typy nádorových onemocnění

Obr. 4: Věkově standardizovaná mapa výskytu nádorových onemocnění (s výjimkou rakoviny kůže), pro obě pohlaví; rok 2012

Obr. 5: Vincristin

Obr. 6: Tropický deštný prales na území jižní Ameriky (Peru)

Obr. 7: *Mansoa alliacea* (Lam.) A. Gentry

Obr. 8: Dibenzyltrisulfát

Obr. 9: *Petiveria alliacea* L.

Obr. 10: *Alternanthera brasiliiana* (L.) Kuntze

Obr. 11: *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

Obr. 12: *Alternanthera flavescens* Kunth

Obr. 13: *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M.King & H.Rob.

Obr. 14: *Phyllanthus niruri* L.

Obr. 15: *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb