

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

In vitro* antiproliferační aktivita *Ranunculaceae

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Karolína Veltruská

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "*In vitro* antiproliferační aktivita *Ranunculaceae*" 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 15.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a cenné rady, které mi při psaní této práce poskytl. Děkuji také své rodině a blízkým za podporu a pomoc po celou dobu mého studia.

In vitro antiproliferační aktivita *Ranunculaceae*

Souhrn

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastěji diagnostikovaná onemocnění a zároveň se řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí. V roce 2018 bylo diagnostikováno 18,1 milionu nových případů nádorových onemocnění a 9,6 milionu pacientů jejich následkem zemřelo. Nové predikce navíc ukazují, že toto číslo bude nadále stoupat. Pozornost se proto zaměřuje na získávání nových protinádorových léčiv využitelných při léčbě. V současné době jsou využívána zejména rostlinná cytostatika. Je zde však neustálá snaha hledat nové rostliny a látky s protinádorovou aktivitou. Mezi takové rostliny by mohly patřit i rostliny z čeledi *Ranunculaceae*, které jsou hojně využívány v tradiční čínské medicíně. Rostliny této čeledi obsahují celou řadu biologicky aktivních látek a mohou mít potenciální využití v protinádorové léčbě.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat *in vitro* antiproliferační aktivitu 19 metanolových extraktů z různých částí rostlin *Ranunculaceae* na buněčných liniích kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT-29), pro srovnání byla využita zdravá střevní buněčná linie (FHs 74Int). Ke stanovení cytotoxicity byla použita metoda využívající tetrazoliové soli MTT. MTT je v mitochondriích živých buněk metabolizována na nerozpustné krystaly formazánu, ty jsou následně rozpuštěny pomocí dimetylsulfoxidu. Získané výsledky byly vyjádřeny jako hodnota IC_{50} v $\mu\text{g/ml}$. Dále byl stanoven selektivní index, který značí, zda testovaná látka působí selektivně pouze na nádorové buňky nebo bylo pozorováno rovněž negativní působení na zdravé buňky.

Z testovaných vzorků bylo nejnižších hodnot dosaženo u extraktů z listů *Hepatica transilvanica* $IC_{50} = 46,88 \pm 5,94 \mu\text{g/ml}$ (Caco-2) a kořene *Hepatica nobilis* $IC_{50} = 46,9 \pm 4,43 \mu\text{g/ml}$ (Caco-2). U těchto vzorků bylo rovněž pozorováno selektivní působení (listy *H. transilvanica* SI = 0,303; kořen *H. nobilis* SI = 0,140). Z těchto výsledků vyplývá, že dané extrakty působí cytotoxicky vůči nádorovým buňkám, ne však proti normálním buňkám, kde cytotoxická aktivita pozorována nebyla.

Extrakty listů *H. transilvanica* a kořene *H. nobilis* vykazovaly mezi testovanými vzorky nejvyšší cytotoxickou aktivitu, bylo by proto vhodné je dále podrobněji testovat a přesně identifikovat jednotlivé biologicky aktivní látky.

Klíčová slova: *Ranunculaceae*; nádorová onemocnění; cytotoxicita; proliferace; *in vitro*

In vitro* antiproliferative activity of *Ranunculaceae

Summary

Cancer is one of the most often diagnosed illnesses and at the same time one of the most common cause of death. In 2018, 18.1 million of new cases of cancer were diagnosed and 9.6 million of patients died of it. Moreover, new predictions show that the number will keep increasing. Attention is therefore focused on obtaining new anticancer medicines that can be used in treatment. Treatment potential could be found in plant-derived cytostatics from which some are already commonly used. Plants of the *Ranunculaceae* family that are extensively used in traditional Chinese medicine contain a number of biologically active substances and therefore may have potential in anticancer treatment.

The aim of the diploma thesis is to test *in vitro* antiproliferative activity of extracts from different parts of *Ranunculaceae* plants on cell lines of colorectal cancer (Caco-2 and HT-29). A healthy intestinal cell line (FHS 74Int) was used for comparison. 19 methanol extracts from individual parts of the plants were tested. For determination of cytotoxicity, the most common method – MTT was used to determine toxicity in 2D cell models. This method uses tetrazolium salts that are metabolized in mitochondria of living cells into insoluble crystals of formazan and subsequently dissolved using DMSO. The results obtained were expressed as IC₅₀ value in µg/ml. Furthermore, the selectivity index was determined that indicates whether the tested drug is selective and acts only against cancer cells or it has negative effects on healthy cells.

19 samples were tested and with some of them, rather significant cytotoxic effects occurred. The best results were achieved with leaves of *Hepatica transilvanica* IC₅₀ = 46,88 ± 5,94 µg/ml (Caco-2) and root of *Hepatica nobilis* IC₅₀ = 46,9 ± 4,43 µg/ml (Caco-2). In these samples, selective activity was observed (leaves of *H. transilvanica* SI = 0,303; root of *H. nobilis* SI = 0,140). These results show that the extracts are cytotoxic against cancer cells but not against normal cells where no cytotoxic activity was observed.

Extracts from leaves of *H. transilvanica* and root of *H. nobilis* showed the highest cytotoxic activity from the tested samples and these are suitable for further testing in *in vivo* conditions to identify their biologically active components.

Keywords: *Ranunculaceae*; neoplastic disease; cytotoxicity; proliferation; *in vitro*.

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Nádorová onemocnění	9
3.1.1 Charakteristické rysy nádorových onemocnění	9
3.1.2 Příčiny vzniku nádorových onemocnění	13
3.1.3 Kouření	14
3.1.4 Alkohol	14
3.1.5 Výživa a pohybová aktivita	15
3.1.6 Obezita	15
3.2 Nádorová onemocnění ve světě a v České republice	18
3.3 Kolorektální karcinom	20
3.3.1 Příčiny vzniku	20
3.3.2 Rizikové faktory pro rozvoj KK	20
3.3.3 Kolorektální karcinom v České republice	21
3.4 Léčba nádorových onemocnění	22
3.4.1 Fytochemikálie využívané pro své cytotoxické účinky	22
3.5 Čeleď <i>Ranunculaceae</i>	24
3.5.1 Saponiny	25
3.5.2 Isoprenoidy	27
3.5.3 Alkaloidy	28
3.5.4 Kardioaktivní steroidy	29
3.5.5 Polysacharidy	29
3.5.6 Mastné kyseliny	29
4 Metodika	31
4.1 Materiál	31
4.2 Kultivace buněčných linií	31
4.3 MTT cytotoxický test	31
4.4 Statistické vyhodnocení	32
5 Výsledky	33
6 Diskuze	35
7 Závěr	39
8 Literatura	40

1 Úvod

Nádorová onemocnění zaujímají celosvětově přední příčky mezi příčinami úmrtí a jejich počet se neustále zvyšuje. Tento druh onemocnění je zapříčiněn mnoha faktory, které mohou být vnitřní (genetické mutace, nedostatečná funkce imunitního systému, hormonální vlivy), ale i vnější (ozáření, kouření, znečištění ovzduší, životní styl). Přestože některé faktory jsou vrozené a neovlivnitelné, mnoho faktorů souvisejících s životním stylem lze poměrně snadno ovlivnit a tím pádem snížit riziko rozvoje tohoto druhu onemocnění.

Velmi častou příčinou vzniku nádorového onemocnění mohou být stravovací návyky, které úzce souvisí s celkovým zdravím jedince. Zejména nadměrný kalorický příjem, spolu s nedostatečnou pohybovou aktivitou, vede ke vzniku obezity, která negativně ovlivňuje celou řadu biologických pochodů, vedoucích k rozvoji řady onemocnění. Mezi taková onemocnění patří i nádorová onemocnění trávicího traktu, a to zejména kolorektální karcinom. Tento typ nádorového onemocnění celosvětově zaujímá přední příčky mezi příčinami úmrtí v důsledku nádorového onemocnění. Z této nelichotivé statistiky nevybočuje ani Česká republika, která je dlouhodobě na předních místech výskytu kolorektálního karcinomu v populaci.

Léčba kolorektálního karcinomu je obtížná, jelikož často dochází k pozdnímu stanovení diagnózy daného typu onemocnění. Nejčastější typ léčby bývá chirurgická operace nádoru, radioterapie a chemoterapie. Při chemoterapii jsou využívány chemické látky cíleně schopné zabránit množení nádorových buněk. V současné době je snaha nalézt nové druhy rostlin, které by obsahovaly účinné látky a jejich směsi, jež by umožňovaly léčbu přesnější a cílenější na nádorové buňky a jejich ložiska, zároveň by však nepoškozovaly okolní zdravé tkáně a jejich buňky. Mezi takové rostliny mohou patřit zkoumané rostliny čeledi *Ranunculaceae*, které jsou využívány v tradiční čínské medicíně a již v nich byla nalezena celá řada bioaktivních látek, které mohou mít protinádorový účinek.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

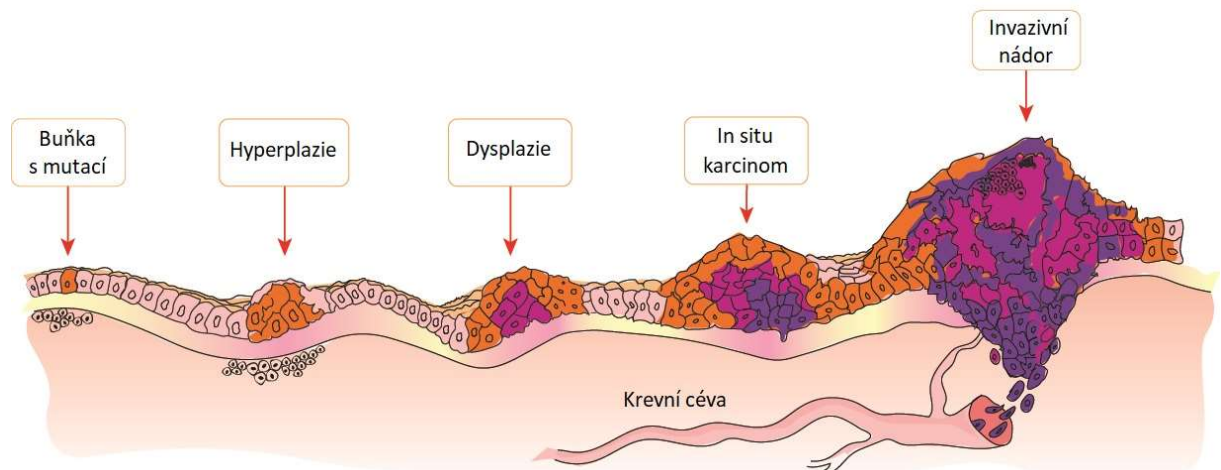
Hypotéza: Některé druhy rostlin čeledi pryskyřníkovitých mohou vykazovat výraznou antiproliferační aktivitu na buněčné linie kolorektálního karcinomu.

Cílem práce v teoretické části je vytvořit literární přehled o nádorových onemocněních a možnostech léčby a prevence. Dále současným poznáním *Ranunculaceae*, kdy se práce zaměří na botanické vlastnosti dané čeledi, obsah biologicky aktivních látek a jejich možného účinku na prevenci nádorových onemocnění. V praktické části budou testovány metanolové extrakty pryskyřníkovitých rostlin na buněčných liniích kolorektálního karcinomu a normálních střevních buňkách, se stanovením hodnoty IC_{50} . V závěru by měly být vybrány vzorky, které by bylo vhodné dále testovat na podrobnější aktivitu.

3 Literární rešerše

3.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění zahrnují více než 100 onemocnění, která se vyvíjí v čase a je pro ně typické nekontrolované buněčné dělení. Ačkoliv se nádorové onemocnění může vyskytovat prakticky v jakékoliv tkáni v těle a každý typ nádoru má své specifické rysy, základní procesy jsou obdobné (NIH 2007). V normálním případě jsou dělení, diferenciace a buněčná smrt kontrolovány. Pokud dojde ke ztrátě této kontroly, dochází k rozvoji nádorových onemocnění (Marmot et al. 2007). Tumor vytvořený z těchto abnormálních buněk dále může setrvat v původní tkáni (*in situ* karcinom) nebo může začít napadat okolní tkáň (invazivní nádor). Invazivní nádor (obr. 1) je považován za maligní, jeho buňky mohou pronikat do krve nebo lymfy a vytvářet nové nádory v celém těle. Pokud růst nádoru naruší životně důležité tkáně a orgány, ohrožuje pak život jedince (NIH 2007).



Obrázek 1: Fáze rozvoje nádoru. Maligní nádor se vyvíjí v čase: **A.** Nádor se začne vyvíjet po tom, co buňka projde mutací, která pozmění její dělení. **B.** Změněná buňka a její potomci rostou a dělí se příliš často, což je jev nazývaný se hyperplazie. V určitém momentu dojde u jedné z buněk k další mutaci, což dále zvyšuje její tendenci se dělit. **C.** Potomci této buňky se nadměrně dělí a také abnormálně vypadají, což se nazývá dysplazie. Postupem času dochází k další mutaci. **D.** Potomci této buňky mají opět pozměněný vzhled a růst. Pokud nádor, který se z těchto buněk vytvořil, zůstává v původní tkáni, nazývá se karcinom *in situ*. **E.** Pokud dochází k dalším mutacím, které umožňují, aby nádor napadal sousední tkáň a pronikal do krve a lymfy, jedná se o nádor maligní. Tento typ nádoru může tvořit nové nádory (metastázy) v jiných místech v těle. Převzato a upraveno dle (NIH 2007), zdroj obrázku: <https://strandls.com/what-is-cancer/stages-of-cancer-image/>.

3.1.1 Charakteristické rysy nádorových onemocnění

Všechny nádorové buňky mají původ v normálních buňkách hostitele. Buňka musí projít řadou změn, aby se stala tumorigenní a následně maligní. U nádorových buněk je popsána řada typických znaků, které umožňují proces tumorigeneze a růst buněk (Chmielowski & Territo 2017).

Prvním znakem je proliferativní signalizace. U normálních buněk je buněčný cyklus přísně regulován, aby bylo možné kontrolovat proliferaci a udržování homeostázy tkáně. Maligní buňky mají schopnost nekontrolovaně proliferovat (Witsch et al. 2010). K udržení vlastní proliferace užívají tumory řadu mechanismů, mezi které patří vlastní produkce

růstových faktorů nebo mohou stimulovat okolní normální tkáň k produkci růstových faktorů (Cheng et al. 2008). Také se mohou stát nezávislémi na růstových faktorech tím, že obsahují somatické mutace, čímž dochází k aktivaci některých významných signálních drah (Hanahan & Weinberg 2011). Příkladem je mutace BRAF, která aktivuje signální dráhu MAPK, jejíž zvýšená aktivita je spojena s buněčnou proliferací a redukcí apoptózy (Davies & Samuels 2010).

Nádorové buňky mají mimo jiné také schopnost vyhýbat se růstovým supresorům. Normální buňky používají řadu mechanismů, aby mohly regulovat proliferaci. Většinou jsou tyto mechanismy zprostředkované produkty tumor supresorových genů (Hanahan & Weinberg 2011). Do tohoto procesu je zapojeno více genů, jejichž produkty spolupůsobí v řadě procesů, proto ztráta jednoho tumor supresoru ještě nestačí k vyvolání onkogeneze. Příkladem je retinoblastomový protein (RB protein), který je zodpovědný za kontrolu buněčného cyklu a přechod z klidového stavu do stavu buněčného dělení. Buňkám postrádajícím RB protein chybí tento kontrolní mechanismus (Dick & Rubin 2013). Abnormality tohoto supresorového genu vedou k rozvoji poměrně neobvyklých a vzácných dědičných chorob, mezi které patří Wilmsův tumor, familiární polypóza, familiární melanom a familiární nádorová onemocnění prsu a vaječníků (Brose et al. 2003).

Dalším proteinem, kontrolujícím buněčný cyklus, je protein p53 se schopností potlačovat tvorbu tumorů. Běžně se v buňkách nachází ve velmi malých množstvích, ovšem jeho obsah narůstá jako odpověď na stres, například poškození DNA, onkogenní aktivitu a další typy stresu (Green & Kroemer 2009). V běžné situaci je p53 neaktivní a je navázán na přenašeč MDM2. Reakcí na stres dochází k fosforylaci přenašeče a k uvolnění a aktivaci p53 (Shieh et al. 1997). Podle typu buňky a tkáňe, ale i typu a míře stresových signálů, p53 selektivně reguluje zastavení buněčného cyklu prostřednictvím působení na gen p21, který působí jako inhibitor cyklin-dependentních kináz, čímž dojde k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Abbas & Dutta 2009), dále také dokáže zprostředkovat opravu DNA, apoptózu nebo senescenci pro udržení genomové integrity a zabránění vzniku nádoru (Liu et al. 2015a).

Protein p53 však patří mezi geny, u kterých dochází poměrně často k mutacím, čímž dochází k narušení jeho funkce. Tato mutace často vede k rozvoji tumorů, což dokazuje fakt, že je přítomna asi u 50 % lidských tumorů. Ztráta funkce se může také vyskytnout jako následek poruch signálních drah nebo může dojít k potlačení funkce jinými mechanismy, například inaktivací a degradací lidským papilomavirovým E6 proteinem (HPV-E6) v případě nádorových onemocnění děložního čípku (Liu et al. 2015a). V případě poškození pak dochází ke ztrátě standardních funkcí a mutantní p53 získává onkogenní funkce (Muller & Vousden 2013). U tohoto mutovaného proteinu pak dochází k výskytu nových funkcí, jako je podpora buněčné proliferace, angiogeneze, migrace, invaze, tvorby metastáz a chemorezistence (Liu et al. 2015a). Záradečné mutace p53 způsobují u lidí syndrom Li-Fraumeni, což je dědičný syndrom zvyšující predispozice k nádorovým onemocněním. U lidí se pak vyskytne nádorové onemocnění u 50 % jedinců do věku 30 let a u 90 % jedinců do věku 60 let (Strong 2003).

Transformující růstový faktor (TGF) má také funkci supresoru nádorového růstu, ovšem u pokročilých maligních buněk může dojít ke změně funkce, které vedou k vyšší agresivitě nádorů prostřednictvím epiteliálně mesenchymálního přechodu (EMT) (Hanahan & Weinberg 2011). EMT je biologický proces, kdy polarizovaná epiteliální buňka dostává mezenchymální

fenotyp spolu se zvýšenou schopností invazivity, pohybu a resistenci k apoptóze (Kalluri & Weinberg 2009).

Pro nádorové buňky je dále typická schopnost vyhýbat se buněčné smrti. Za normálních podmínek jsou poškozené buňky odstraňovány za pomoci apoptózy, autofagie nebo nekrózy. Nádorové buňky však mají schopnost se těmto procesům vyhnout nebo je využívat ve svůj prospěch (Chmielowski & Territo 2017).

Apoptóza je vyvažována působením antiapoptických molekul skupiny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) a proapoptických molekul Bax a Bak. Nádorové buňky mohou snižovat hladinu proapoptických a zvyšovat hladiny antiapoptických molekul (Adams & Cory 2007). Apoptóza eliminuje buňky s abnormální DNA, způsobenou nenapravitelným poškozením nebo nepřesnou nebo neúplnou transkripcí. Apoptóza je hlavní proces udržující počet chromozomů v buňkách určitých druhů a zajišťuje vstup do mitózy pouze buňkám, které se plně a správně replikovaly (Fouad & Aanei 2017). V procesu apoptózy mají zásadní význam kaspázy. Jedná se o skupinu proteáz, které musí být nejprve aktivovány. Expozice cytotoxickým látkám má za následek narušení mitochondriální membrány, čímž dojde k uvolnění cytochromu c. Cytochrom c putuje do cytosolu, kde dochází aktivaci adaptorního proteinu Apaf-1, který následně způsobí přeměnu prokaspázy-9 na kaspázu-9. Kaspáza-9 je tak aktivována a spouští proces vedoucí buňku k procesu apoptózy (Koff et al. 2015).

Autofagie je přirozený proces, který umožňuje rozpad buněk po expozici stresorům, mezi které patří například deficit nutrientů (Mizushima 2007). Tento způsob degradace intracelulárních konstituentů také funguje jako alternativní zdroj energie v období stresu a udržuje homeostázu buňky (Mathew et al. 2007). V případě nádorových onemocnění má však autofagie dvojí roli a v mnoha případech podporuje tumorigenezi. Vzhledem k tomu, že autofagie je mechanismus umožňující přežití v období nedostatku živin a hypoxie, využívají jej tumory v těchto případech, které jsou pro nádorové prostředí typické (White 2015).

Dalším procesem buněčné smrti je nekróza. Při tomto procesu jsou uvolňovány prozánětlivé cytokiny. Imunitní buňky se přesunují do místa nekrózy, aby eliminovaly zbytky buněk. Nádorové buňky mohou tento proces využívat pro vlastní stimulaci angiogeneze a cytokiny využívat pro svůj vlastní růst (Grivennikov et al. 2010).

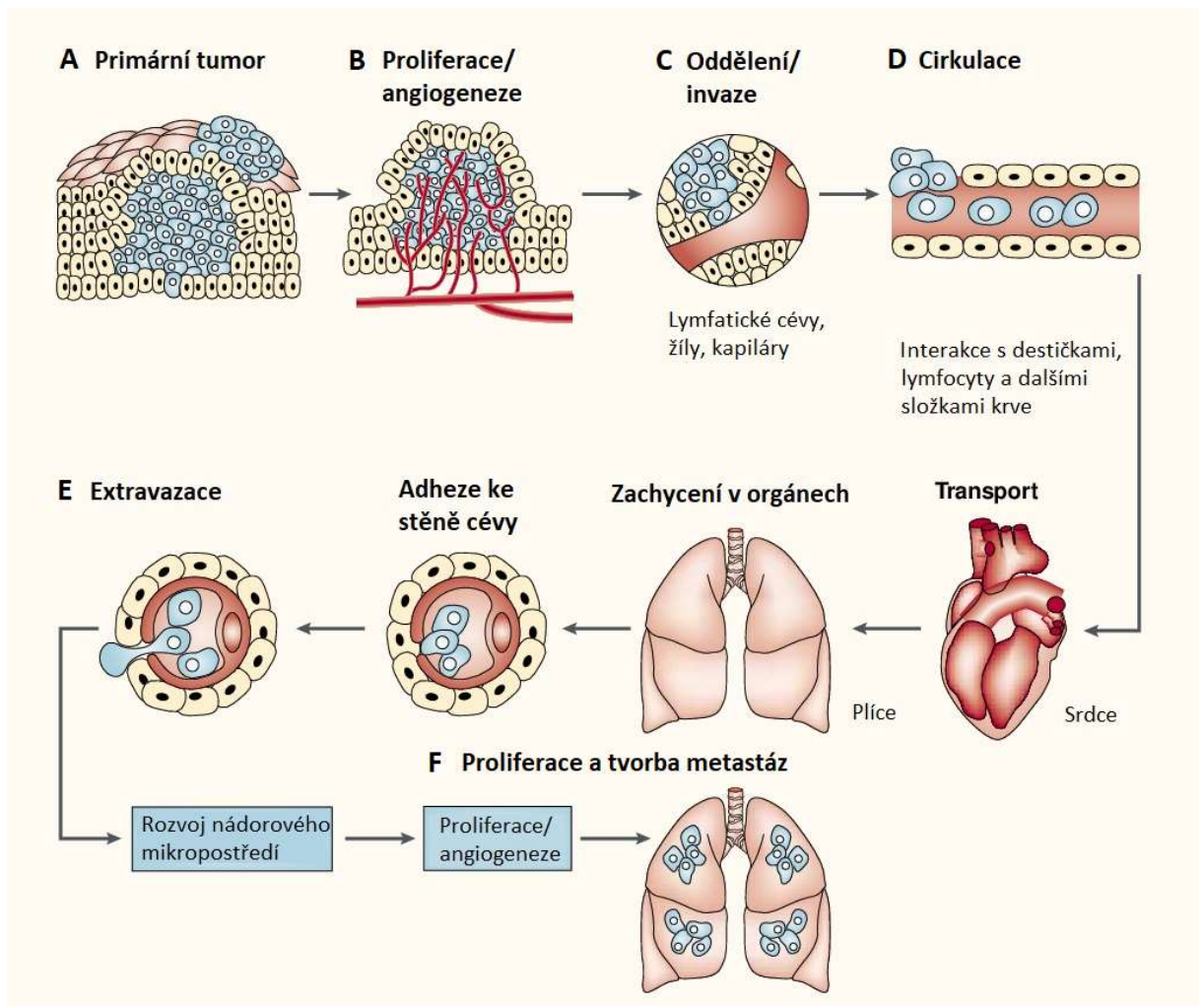
Normální buňky mohou podstoupit pouze omezený počet dělení, po nichž nastupuje senescence (buňky se dále nedělí, ale neodumírají). Jedná se o další obranný mechanismus proti buněčnému stresu (Campisi 2013). Senescence je řízena přítomností telomer na koncích chromozomů. Za fyziologických podmínek se telomery s každým dělením zkracují, po vyčerpání replikačního potenciálu nastupuje senescence. Pokud by došlo k dalšímu dělení, vedlo by to k chromozomálním zlomům a následně genomové nestabilitě (Martínez & Blasco 2011). Enzym telomeráza, jejíž regulace je zvýšena u 85-90 % lidských nádorů, je schopna obnovovat telomerické konce, čímž udržuje dostatečnou délku pro další replikaci (Shay 2016).

K růstu buněk může docházet pouze tehdy, jsou-li zásobeny potřebnými živinami a jsou-li odváděny odpadní metabolity. Tento proces vyžaduje přítomnost krevních cév. Proces novotvorby krevní kapilár se nazývá angiogeneze. Jedná se o proces růstu, dělení, migrace a shromažďování endoteliálních buněk z již existujících cév (Carmeliet 2000). Angiogeneze se využívá během embryogeneze k expanzi a remodelaci primitivních vaskulárních sítí a i později během postnatálního života je součástí hojení ran, reprodukčního cyklu žen a chronického zánětu (Ribatti et al. 2015). V těchto procesech je však angiogeneze omezena, na rozdíl

od nádorů, kde je proces nepřetržitě aktivován. Regulace je zajišťována proangiogenními a antiangiogenními faktory. Pokud dojde k významné převaze proangiogenních faktorů, což se stává v případech maligních stavů, tkáně začínají vykazovat známky angiogeneze (Carmeliet & Jain 2000). Nejdůležitějším spouštěčem angiogeneze je hypoxie. Endoteliální buňky vykazují řadu mechanismů závislých na kyslíku, mezi které patří procesy propojené se skupinou hypoxií indukovaného transkripčního faktoru (HIF). HIF regulují expresi velkého množství genů zapojených nejen do angiogeneze, ale do procesů přežití buněk, metabolismu i zánětu. Reakcí na hypoxii, HIF iniciují adaptivní transkripční odpověď, mnoho produktů tohoto procesu jsou faktory zapojené do spuštění angiogeneze (Yang et al. 2013). Výskyt hypoxie je typický v případě nádorů, není proto překvapivé, že vyšší hladiny HIF jsou přítomny v mnoha typech nádorových onemocnění (Hashimoto & Shibasaki 2015). Hlavním proteinem zodpovědným za neoangiogenezi je vaskulární endotelový růstový faktor (VEGFA). Jeho činnost je vyvažována aktivitou trombospondinu-1 (Hanahan & Weinberg 2011). Zajímavé je, že cévy tumorů jsou často deformované, rozvětvené, netěsné a objevuje se krvácení (Baluk et al. 2005). Různé druhy nádorových onemocnění mají rozdílný stupeň vaskularizace, například renální karcinom je vysoce angiogenní a vaskularizovaný (Zee et al. 2010), oproti tomu vysoce agresivní karcinom pankreatu je hypovaskularizovaný a mohou být dokonce aktivně antiangiogenní (Olive et al. 2009).

Maligní buňky jsou dále charakterizovány schopností invaze okolní tkáně a následně vytvářením vzdálených metastáz. Metastatické onemocnění je zodpovědné za 90 % úmrtí spojených s nádorovým onemocněním (Steeg 2006). Proces vzniku vzdálených metastáz je víceúrovňový proces, který se nazývá metastatická kaskáda (obr. 2). Nejdříve dochází k místní invazi, následně k migraci do lymfatických a krevních cév, čímž dochází k šíření buněk cévami. Nádorové buňky pak pronikají do parenchymu vzdálených buněk (extravazace), kde vytváří mikrometastázy, z nichž vzniká makroskopický nádor (kolonizace) (Fidler 2003).

V nádorových buňkách také dochází ke změnám metabolismu. Chronická a často nekontrolovaná buněčná proliferace, která představuje podstatu neoplastického onemocnění, zahrnuje nejen deregulovanou kontrolu buněčné proliferace, ale také odpovídající úpravy energetického metabolismu, aby se podpořil růst a dělení buněk. Za aerobních podmínek normální buňky zpracovávají glukózu, nejdříve glykolýzou v cytosolu na pyruvát a poté v mitochondriích na oxid uhličitý. Za anaerobních podmínek převažuje glykolýza a relativně malé množství pyruvátu přechází do mitochondrií (Hanahan & Weinberg 2011). U nádorových buněk dochází ke změně energetického metabolismu. Jako první tento proces pozoroval Otto Warburg. Dochází k přechodu z aerobní na anaerobní glykolýzu a to i v přítomnosti kyslíku, tento proces se nazývá Warburgův efekt (Warburg 1930). Anaerobní glykolýza je méně účinný způsob produkce ATP, při němž dochází až k 18× nižší produkci ATP v porovnání aerobní glykolýzou. Nádorové buňky tento fakt kompenzují zvýšeným využitím glukózy k dosažení stejného množství ATP, čehož je často dosaženo zvýšením glukozových transportérů, jako je GLUT1 (DeBerardinis et al. 2008; Hsu & Sabatini 2008; Jones & Thompson 2009). Výhodou tohoto typu metabolismu pro nádorové buňky je tvorba meziproduktů, které jsou nádorovými buňkami využívány pro výrobu nukleosidů a aminokyselin, které jsou nutné pro následný růst nádoru (Vander Heiden et al. 2009).



Obrázek 2: Hlavní kroky při vzniku metastáz. **A.** Buněčná transformace a růst tumoru. Růst neoplastických buněk musí být progresivní, živiny pro růst nádoru jsou dodávány prostou difuzí. **B.** Pokud přesáhne průměr tumoru 1-2 mm, musí dojít k vaskularizaci. **C.** Lokální invaze hostitelské tkáně probíhá několika mechanismy. Tenké stěny lymfatických kapilár jsou velmi málo odolné vůči vstupu nádorových buněk a jsou nejčastější cestou pro vniknutí nádorových buněk do krevního oběhu. **D.** Cirkulace. Většina nádorových buněk je rychle zničena. Nádorové buňky, které přežily cestu, se usazují na kapilárním endotelu. **E.** Extravazace probíhá pravděpodobně pomocí podobných mechanismů jako invaze. **F.** Proliferace v parenchymu orgánu je posledním krokem metastatického procesu. Mikrometastázy musí k dalšímu růstu vytvořit cévní síť a vyhnout se zničení hostitelskými buňkami. Buňky pak mohou opět napadat krevní cévy, vstoupit do oběhu a produkovat další metastázy. Převzato a upraveno dle Fidler (2003).

3.1.2 Příčiny vzniku nádorových onemocnění

Pro nádorová onemocnění je typické poškození genů vedoucí k mutacím DNA. Většina případů nádorových onemocnění je však následkem poškození vznikajících během života, hromadění mutací vede k rozvoji nádoru. K mutacím dochází účinkem mnoha faktorů, mezi které patří fyzikální, chemické i biologické kancerogeny, ale i hormonální faktory. Za malou část nádorů jsou zodpovědné genetické predispozice, ovšem pouze v 5-10 % případů. Zbýlých 90-95 % je zapříčiněno vlivem životního stylu a prostředí (Anand et al. 2008). Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí, v roce 2018 zemřelo 9,6 milionu lidí následkem výskytu nádorového onemocnění. Přibližně za jednu třetinu úmrtí je zodpovědný některý z 5 hlavních faktorů životního stylu, tedy vysoký

body mass index (BMI), nízký příjem ovoce a zeleniny, nedostatek fyzické aktivity, užívání tabáku a užívání alkoholu (WHO 2018).

3.1.3 Kouření

S kouřením lidé začínají často v relativně mladém věku a obvykle mají problém s kouřením přestat, mohou tak kouřit celá desetiletí, což je vystavuje dlouhodobému působení tabákového kouře (Lushniak et al. 2014). Kouř z tabákových výrobků obsahuje širokou škálu chemických látek, včetně 60 známých karcinogenů. Mezi silné karcinogeny, nalezené v cigaretovém kouři, patří polycyklické aromatické uhlovodíky, nitrosaminy, aromatické aminy, ty se v jedné cigaretě vyskytují v menším množství (1-200 ng). Slabé karcinogeny, například acetaldehyd, katechol a isopren, se oproti tomu vyskytují ve vyšších koncentracích (až 1 mg v jedné cigaretě). Celkově je v jedné cigaretě obsaženo asi 1-3 mg karcinogenů (Hecht 2003).

Kouření může ovlivňovat celou řadu buněčných signálních drah. Může docházet k aktivaci NF- κ B zánětlivého faktoru, který může regulovat geny zodpovědné za karcinogenezi (Anto et al. 2002). Karcinogeny obsažené v cigaretovém kouři dále způsobují poškození DNA, které vedou ke genetickým mutacím. Důkazem těchto poškození je vznik DNA aduktů, které vznikají kovalentní vazbou aktivních reaktivních karcinogenů na báze DNA. Zvýšené hladiny DNA aduktů vykazují tkáň přímo vystavené karcinogenním složkám cigaretového kouře (plíce), ale i tkáň, které nejsou přímo vystavené působení (močový měchýř) (Phillips & Venitt 2012).

Souvislost mezi kouřením a výskytem nádorových onemocnění je zkoumána po desetiletí a byla prokázána v případech nádorových onemocnění plic (Stanhope et al. 1964), hrtanu (Falk et al. 1989), ústní dutiny (Morse et al. 2007), nosní dutiny (Zheng et al. 1993), hltanu (Blot et al. 1988), jícnu (Cayuela et al. 1991), žaludku (Trédaniel et al. 1997), jater (Hsing et al. 1990), slinivky břišní (Mack et al. 1986), močového měchýře (Brennan et al. 2000), ledvin (Yuan et al. 1998), děložního hrdla (IARC et al. 2004) a kostní dřeně (Morris Brown et al. 1992).

3.1.4 Alkohol

Alkohol je podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) považován za karcinogen skupiny 1, což je skupina s dostatečně prokázaným účinkem (IARC 2020). Přestože nejvyšší riziko hrozí lidem konzumujícím vysoké dávky alkoholu, riziko nádorových onemocnění zvyšuje i lehká konzumace alkoholu, tedy do 1 alkoholického nápoje za den. Konkrétně se jedná o nádory ústní dutiny a hltanu, jícnu a prsu (Bagnardi et al. 2013).

IARC klasifikuje konzumaci alkoholických nápojů jako příčinu nádorového onemocnění prsu (Mørch et al. 2007), tlustého střeva (Ferrari et al. 2007), hrtanu (Allen et al. 2009), jater (Ohishi et al. 2008), jícnu (Ozasa 2007), ústní dutiny a hltanu (Freedman et al. 2007) a jako pravděpodobná příčina rakoviny slinivky břišní (Tramacere et al. 2010).

Ukazuje se, že etanol sám o sobě pravděpodobně není karcinogen, ale kokarcinogen. Kokarcinogen je látka, která sama o sobě není karcinogenní, ale významně zesiluje účinek určitého karcinogenu. Když je etanol metabolizován, vzniká acetaldehyd a volné radikály. Acetaldehyd je karcinogenní a mutagenní, váže se na DNA a proteiny, což vede k sekundární hyperproliferační (Pöschl & Seitz 2004; Testino 2011).

Některá nádorová onemocnění jsou spojena jak s kouřením, tak s konzumací alkoholu a při jejich společném užívání se ukazuje synergické působení, které jejich škodlivé působení ještě zvyšuje. Přestože mechanismus působení tohoto jevu není vysvětlen, zvýšené riziko se ukazuje v případě ústní dutiny, jícnu, hrtanu a hltanu (Taylor & Rehm 2006; Hashibe et al. 2009).

3.1.5 Výživa a pohybová aktivita

V prevenci nádorových onemocnění má zásadní význam „zdravý“ životní styl. Kromě výživových zvyklostí je důležitá také pravidelná pohybová aktivita, která může snižovat riziko nádorových onemocnění prsu, prostaty a dělohy (Vainio & Bianchini 2002; Patel et al. 2003, 2005). Pohybová aktivita působí protinádorově tím, že dochází ke zvyšování energetického výdeje a tím ke snižování rizika obezity, která působí jako rizikový faktor, ale také může regulovat hladiny pohlavních hormonů, inzulinu, prostaglandinů a má příznivé účinky na imunitní systém (Vainio & Bianchini 2002; McTiernan et al. 2004).

Významné je také působení zeleniny, ovoce a luštěnin, které obsahují řadu prospěšných složek, jako jsou vitamíny, minerály, vláknina, karotenoidy a další bioaktivní sloučeniny, jako jsou flavonoidy, terpeny, fenoly a další (Alissa & Ferns 2017). Vyšší konzumace ovoce a zeleniny je spojena se sníženým rizikem některých nádorových onemocnění, hlavně těch souvisejících s trávicím traktem (Turati et al. 2015). Konzumace ovoce a zeleniny také vede k nižšímu přibývání na váze a menšímu riziku obezity (He et al. 2004). Konzumace celozrnných potravin je přínosná pro lidské zdraví, a to kvůli obsahu vlákniny, vitamínů a minerálů. Konzumace celozrnných produktů se ukazuje jako pozitivní faktor při snižování rizika obezity a udržování energetické rovnováhy (Liu et al. 2003; Lutsey et al. 2007). Také se ukazuje, že konzumace celozrnných produktů vede k nižšímu riziku úmrtí na nádorová onemocnění (Chen et al. 2016).

Za rizikový faktor při rozvoji nádorových onemocnění je považována konzumace červeného masa a zpracovaných masných výrobků. Zvýšené riziko se ukazuje v případě kolorektálního karcinomu (Cross et al. 2010; Johnson et al. 2013) a prostaty (Rodriguez et al. 2006). Při tepelném zpracování masa vznikají heterocyklické aminy a polycyklické aromatické uhlovodíky, které mohou působit jako mutageny a karcinogeny (Cross & Sinha 2004). Dusičnany, používané při zpracování masa pro jeho konzervaci a ochranu proti patogenním bakteriím včetně *Clostridium botulinum*, se mohou přeměňovat na nitrosaminy, které jsou karcinogenní (Chiang & Quek 2017). Dalšími rizikovými výživovými faktory je například vysoký příjem soli, který je spojen se zvýšeným rizikem nádorů žaludku, což bylo prokázáno v Japonsku, kde je tradiční konzumace vysoce solených potravin (Tsugane et al. 2004).

3.1.6 Obezita

Jedním z faktorů, který výrazně ovlivňuje vývoj nádorových onemocnění, je obezita. Vysoký přísun energie z potravy spolu s nízkým výdejem, ke kterému přispívají i sedavá zaměstnání, vedou k hypertrofii a hyperplazii tukových buněk a následně k obezitě. Lidé jsou definováni jako obézní, pokud jejich BMI překročí 30 kg/m², za nadváhu se považuje BMI 25 až 30 kg/m². Obezita je v současné době problémem jak v rozvinutých, tak i v rozvojových zemích. Nejen, že vede ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění a diabetu II. typu, ale také

přispívá k rozvoji nádorových onemocnění. Obezita spouští několik systémových a metabolických změn, které mohou ovlivnit rozvoj nádorů (Font-Burgada et al. 2016). Je ovšem složité jednoznačně určit, jakým mechanismem obezita přispívá k rozvoji nádorových onemocnění. Se zvyšující se obezitou dochází ke zvyšování sérové koncentrace glukózy, inzulínu, inzulínu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1), ale také lipidů, leptinu, estrogenu, rezistinu, zánětlivých cytokinů, které samostatně nebo spolupůsobením mohou přispívat k rozvoji nádorových onemocnění (Perry & Shulman 2020).

Tuková tkáň u obézních lidí vykazuje změny v produkci hormonů, adipokinů, cytokinů a také ovlivňuje imunitní reakce. V tukové tkáni se nachází mnoho typů imunitních buněk, převažují zde makrofágy (Weisberg et al. 2003). Běžně v tukové tkáni převažují makrofágy M2, které mají protizánětlivou funkci. U obézních jedinců však převládají M1 prozánětlivé makrofágy (McNelis & Olefsky 2014). U těchto prozánětlivých tukových makrofágů následně dochází k produkci cytokinů podporujících rozvoj řady tumorů (TNF, IL-6, IL-1b). Zvýšené hodnoty IL-6 a TNF jsou běžně nalézány u obézních pacientů (Weisberg et al. 2003). TNF následně může zvyšovat poškození DNA prostřednictvím vyššího mutačního zatížení, také indukuje epiteliálně mesenchymální přechod, což vede k malignitě a metastatickému chování buněk (Yan et al. 2006; Kim et al. 2009). IL-6 je schopný aktivovat signální dráhy STAT3, které řídí expresi genů podporujících buněčnou proliferaci, angiogenezi, invazivitu a schopnost tvořit metastázy (Taniguchi & Karin 2014). Všechny tyto cytokiny, jejichž exprese je zvýšena během obezity, mají dobře prokázané účinky podporující rozvoj tumorů (Grivennikov et al. 2010). V břišním tuku jsou dále umístěny důležité protizánětlivé regulační T-lymfocyty. Při obezitě se však tyto lymfocyty ztrácí, což ještě prohlubuje prozánětlivý stav organismu při obezitě (Feuerer et al. 2009).

Tuková tkáň také působí jako endokrinní orgán, jež produkuje polypeptidové hormony adipokiny, v souvislosti s rozvojem nádorových onemocnění jsou nejvíce diskutované leptin a adiponektin (Kershaw & Flier 2004). Leptin pozitivně koreluje se stavem tukových zásob a nutričním stavem jedince a také je důležitý v regulaci energetického příjmu a chuti k jídlu. Leptin je intenzivně zkoumán jako možný mediátor v případě obezitou indukovaných nádorových onemocnění. Možným mechanismem účinku je aktivace některých signálních drah spojených s rozvojem nádorů, například STAT3 a PI3K (Jaffe & Schwartz 2008; Gao et al. 2009; Chen 2011). Oproti tomu adiponektin může vykazovat protinádorové účinky snížením hladiny inzulínu, IGF-1 a ovlivněním signální dráhy mTOR a také může vykazovat protizánětlivé účinky inhibicí NF- κ B (Dalamaga et al. 2012).

Pro obézní pacienty je také typický metabolický syndrom, který zahrnuje inzulínovou rezistenci a diabetes II. typu, aterosklerózu a vysoký krevní tlak. Inzulínová rezistence je stav, kdy při normální hladině inzulínu dochází k nižší biologické odpovědi organismu. Tělo ve snaze kompenzovat tento stav následně vytváří další inzulín, což vede k hyperinzulinémii (Font-Burgada et al. 2016). Inzulín a IGF jsou zkoumány v souvislosti s rozvojem nádorových onemocnění. Ukazuje se vyšší úmrtnost na nádorová onemocnění u osob s obezitou a diabetem II. typu, což by mohlo být následkem hyperinzulinémie, zvýšených hladin IGF-1 případně kombinace těchto faktorů (Gallagher & LeRoith 2011). U diabetiků II. typu, kteří užívali léky ke stimulaci sekrece inzulínu, se ukázal vyšší výskyt nádorových onemocnění, v porovnání s pacienty užívajícími metformin, což je lék užívaný ke snížení hladiny inzulínu (Dowling et al. 2012). Kalorická restrikce, která vede ke snížení hladin cirkulujícího inzulínu a IGF-1,

má potenciál v protinádorovém působení (Hursting et al. 2009). Role inzulínu a IGF-1 by mohla být vysvětlena jejich působením na kaskádu Akt/PI3K/mTOR. Tato dráha patří mezi nejčastěji mutované signální dráhy v případě lidských nádorových onemocnění (Kalaany & Sabatini 2009; Liu et al. 2009; Chen 2011). Tato dráha je aktivována jak inzulínem, tak IGF-1, které jsou v séru obézních jedinců ve vysokých hladinách (Woods et al. 1998; Moore et al. 2008a). I v tomto případě kalorická restrikce snižuje aktivaci této dráhy aktivací AMPK (AMP aktivovaná protein kináza), která působí jako antagonistka Akt/PI3k dráhy (Jiang et al. 2008; Moore et al. 2008a). Narušení kaskády Akt/PI3K/mTOR se opravdu ukazuje jako účinný prostředek k narušení karcinogeneze a incidence nádorů na zvířecích i lidských modelech (Moore et al. 2008b; Olivo-Marston et al. 2009; Fierz et al. 2010). V neposlední řadě se při obezitou indukované inzulínové rezistenci objevuje hyperinzulinémie a hyperglykémie, které také mohou přispívat k rozvoji tumorů. Vysoké koncentrace glukózy, inzulínu a volných mastných kyselin významně přispívají k růstu a buněčné proliferaci (Font-Burgada et al. 2016). Hyperglykémie současně může vést k aktivaci genu HIF-1 α (hypoxií-indukovaný faktor 1), který zvyšuje možnosti přežití nádorových buněk za hypoxických podmínek (Catrina et al. 2004). Hyperinzulinémie také může podporovat růst tumorů, protože inzulín může přispívat k buněčnému růstu a mít antiapoptotické účinky (Font-Burgada et al. 2016).

S vyšším výskytem nádorových onemocnění u obézních pacientů by také mohly souviset změny ve střevní mikrobiotě. Lidské tělo obsahuje více než 100 bilionů mikrobů, z nichž většina obývá střeva (Ursell et al. 2012). Tato populace se nazývá mikrobiom a zahrnuje širokou škálu mikroorganismů, včetně virů, hub a bakterií, kdy nejhojněji zastoupenou skupinou jsou anaerobní bakterie (Stearns et al. 2011; Scarpellini et al. 2015). Tyto mikrobiální kolonie jsou získávány již při narození a jsou nutné k udržení homeostázy v těle (Matamoros et al. 2013). Interakce mezi hostitelem a mikrobiomem ovlivňuje velký počtem genetických a environmentálních faktorů, jako je věk, zeměpisná poloha, příjem alkoholu a drog, strava (Yatsunencko et al. 2012; Engen et al. 2015). Nejvíce zastoupenými kmeny jsou *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, tvořící přes 90 % endogenních bakterií vyskytujících se u zdravých dospělých lidí. Další běžně se vyskytující bakterie lidského mikrobiomu jsou *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Streptococci* nebo *Enterobacteriaceae* (Davenport et al. 2014; Sankar et al. 2015).

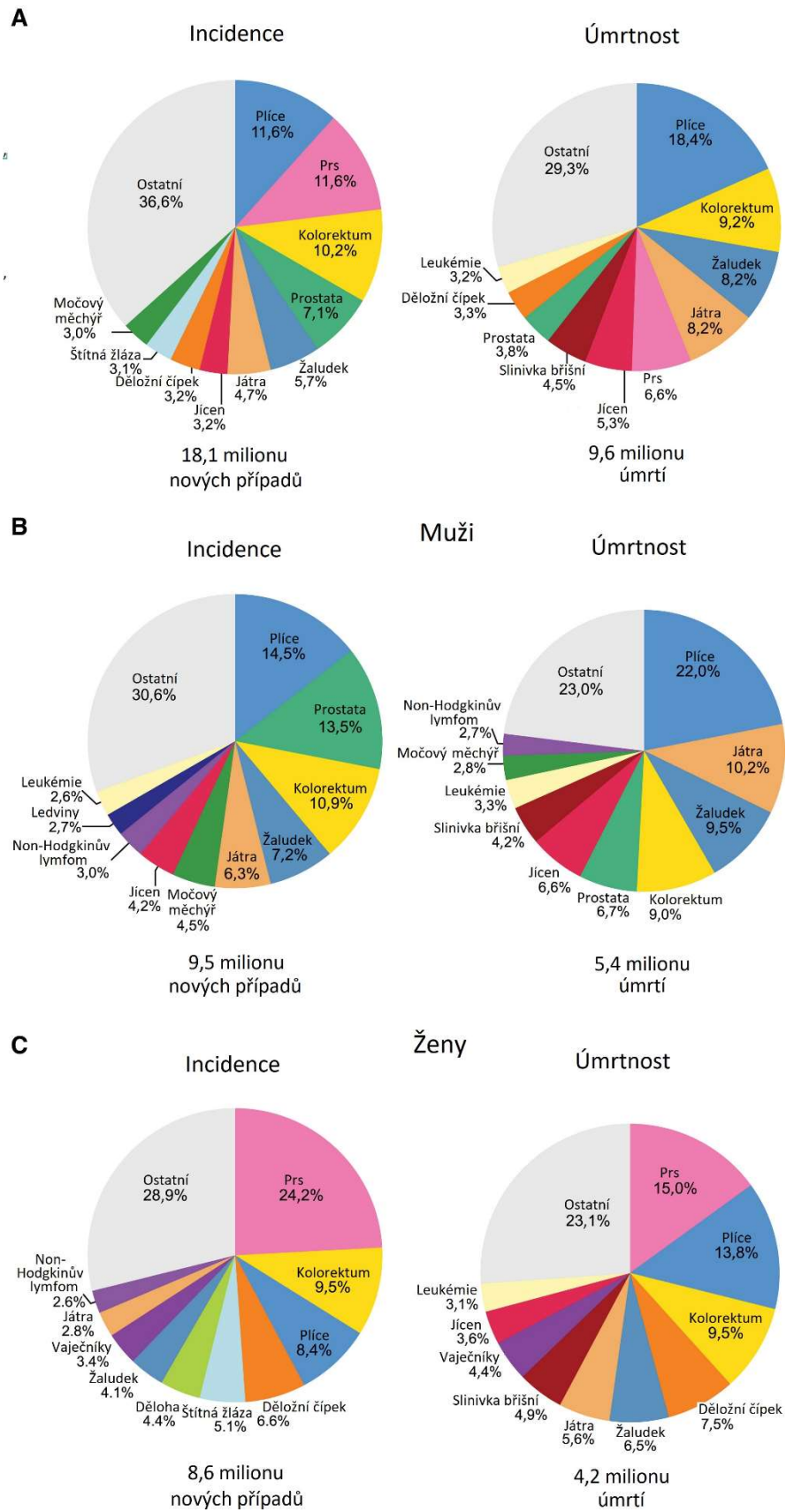
Stav, kdy dojde k narušení vztahu mezi hostitelem a mikrobiotou, se nazývá dysbióza (Zhang et al. 2015). Tento stav je považován za jednu z nejpravděpodobnějších příčin zánětlivých onemocnění střev (Schippa & Conte 2014; Nagao-Kitamoto et al. 2016) a také přispívá k rozvoji nádorů tlustého střeva (Wang et al. 2012; Sheflin et al. 2014). Složení střevní mikrobioty je silně ovlivněno stravovacími návyky. Strava s vysokým obsahem tuku a cukru, což jsou faktory typické pro západní stravu, jsou spojeny u zvířecích modelů se zvýšeným zastoupením *Firmicutes*, zatímco u *Bacteroidetes* dochází ke snižování (Turnbaugh et al. 2008). V důsledku obezity také může docházet k zvýšenému výskytu některých bakteriálních druhů, jejichž metabolity mohou mít karcinogenní účinky (Louis et al. 2014). Typickým příkladem je protein CagA, produkovaný *Helicobacter pylori* (Hatakeyama 2017). Ten je prokázán karcinogen a řadí se mezi karcinogeny třídy 1 (IARC 2020). Také patogenní *Escherichia coli* produkuje toxiny, které mají schopnost generovat dvouřetězcové zlomy v epiteliálních buňkách hostitele, podporují vznik genomových mutací a nakonec přispívají k tvorbě nádoru (Lara-Tejero & Galán 2000). Navíc některé střevní bakterie mohou modulovat určité buněčné

proliferační dráhy, například již zmíněný protein CagA z *Helicobacter pylori*, ale dále také toxiny *Fusobacterium nucleatum* nebo *Bacteroides fragilis*. Tyto toxiny jsou schopné interagovat s epitelovým E-kadherinem, čímž dochází k narušení mezibuněčných spojů a aktivaci některých signálních molekul, což přispívá k buněčné proliferaci a potenciální nádorové transformaci hostitelských buněk (Murata-Kamiya et al. 2007; Wu et al. 2007; Rubinstein et al. 2013).

3.2 Nádorová onemocnění ve světě a v České republice

Výskyt nádorových onemocnění a související úmrtnost celosvětově rapidně roste. Mezi hlavní důvody patří stárnutí a růst populace. Předpokládá se, že v roce 2018 bylo diagnostikováno 18,1 milionu nových případů nádorových onemocnění a 9,6 milionu pacientů zemřelo. Nejčastěji diagnostikovaným typem jsou nádorová onemocnění plic (11,6 %), dále rakovina prsu u žen (11,6 %), rakovina prostaty u mužů (7,1 %) a kolorektální karcinom (6,1 %). Nádorovým onemocněním, které nejčastěji způsobuje úmrtí, je rakovina plic (18,4 %), následuje kolorektální karcinom (9,2 %) a nádorová onemocnění žaludku (8,2 %) a jater (8,2 %) (obr. 3) (Bray et al. 2018).

V České republice bylo v roce 2016 nově nahlášeno 96 500 případů zhoubných novotvarů, zemřelo 27 261 pacientů. Incidence zhoubných nádorových onemocnění dlouhodobě roste. U některých typů nádorových onemocnění dochází ke stagnaci nebo mírnému poklesu (nádorová onemocnění plic u mužů, kolorektální karcinom), ovšem tento pokles je vyvážen nárůstem výskytu zhoubných novotvarů prsu u žen a kůže u obou pohlaví. Úmrtnost na zhoubné nádory přesto stagnuje, i tak je stále druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice po kardiovaskulárních onemocněních. Zvyšující se počet hlášených zhoubných nádorů souvisí zejména se stárnutím populace, kdy vyšší věk představuje hlavní rizikový faktor pro rozvoj nádorových onemocnění. Projevuje se zde také zlepšená diagnostika zhoubných nádorů a celková kvalita lékařské péče, která vede ke zvyšování věku dožití. Zvýšený počet hlášených novotvarů může být také následkem celoplošných onkologických screeningů. Nejčastěji diagnostikovaným onemocněním jsou novotvary kůže (kromě melanomu, tedy bazaliomy a spinocelulární karcinomy), ovšem díky relativně příznivé povaze onemocnění je úmrtnost na tento typ nádoru nízká. Na druhém místě se nachází zhoubné nádory kolorekta, u mužů zhoubné nádory prostaty, u žen zhoubné nádory prsu, dále zhoubné nádory plic, průdušek a průdušnice (ÚZIS 2016).



Obrázek 3: Koláčové grafy zobrazující výskyt a úmrtí na 10 nejčastějších nádorových nemocnění ve světě v roce 2018 pro obě pohlaví (A), muže (B) a ženy (C). Převzato a upraveno dle Bray et al. (2018).s

3.3 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (KK) patří mezi celosvětově nejvíce rozšířené druhy nádorových onemocnění. V roce 2018 se předpokládá výskyt 1,8 milionu nových případů a 881 000 případů úmrtí, což znamená, že se z hlediska incidence řadí na druhé místo a z hlediska mortality na třetí místo (Bray et al. 2018).

3.3.1 Příčiny vzniku

Jako u jiných typů nádorových onemocnění i zde dochází k mutacím specifických genů, které mohou vést k rozvoji KK. Tyto mutace se mohou objevit u onkogenů, tumor supresorových genů a u genů souvisejících s opravami poškozené DNA (Fearon & Vogelstein 1990). Podle původu mutace pak rozlišujeme nádory sporadické, hereditární a familiární (Mármol et al. 2017).

Bodové mutace, vznikající během života, nejsou ovlivněné dědičnými faktory a postihují pouze jednotlivé buňky. Tento typ nádoru se nazývá sporadický a představuje kolem 70 % všech KK. Následně dochází ke specifické sérii mutací, která je přeložena do specifické morfologické sekvence, začínající formací adenomu a přecházející v nádorový stav. První mutace se vyskytuje na tumor supresorovém genu APC, což vede k tvorbě nezhoubných adenomů (polypů). Asi 15 % těchto polypů se během následujících 10 let vyvine do stádia nádoru. Následují pak mutace genů KRAS, TP53 a DCC (Fearon & Vogelstein 1990).

Hereditární formy karcinomu tvoří asi 5 % případů, jedinci s touto formou mají větší predispozice pro rozvoj nádorových onemocnění. Hereditární formy KK můžeme dále rozdělit na polypózní a nepolypózní formy. Polypózní forma zahrnuje familiární adenomatózu tlustého střeva (FAP), pro kterou je typická formace mnohočetných potenciálně maligních polypů v tlustém střevě (Lynch & De la Chapelle 2003). Oproti tomu hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCK) je spojen mutacemi genů zodpovědných za opravy mutací DNA. HNPCK vede ke vzniku Lynchova syndromu, který je způsoben mutacemi jedné z alel kódující proteiny sloužící pro opravy DNA, jako je MSH2, MLH1, MLH6, PMS1 a PMS2. Lynchův syndrom se vyskytuje asi u 2-3 % všech případů KK (Lynch & De la Chapelle 2003; Umar et al. 2004).

Familiární typ tohoto karcinomu představuje asi 25 % případů tohoto typu nádorového onemocnění a je také způsobem dědičnými mutacemi, ovšem neřadí se mezi žádnou ze známých variant hereditárního karcinomu (Stoffel & Kastrinos 2014).

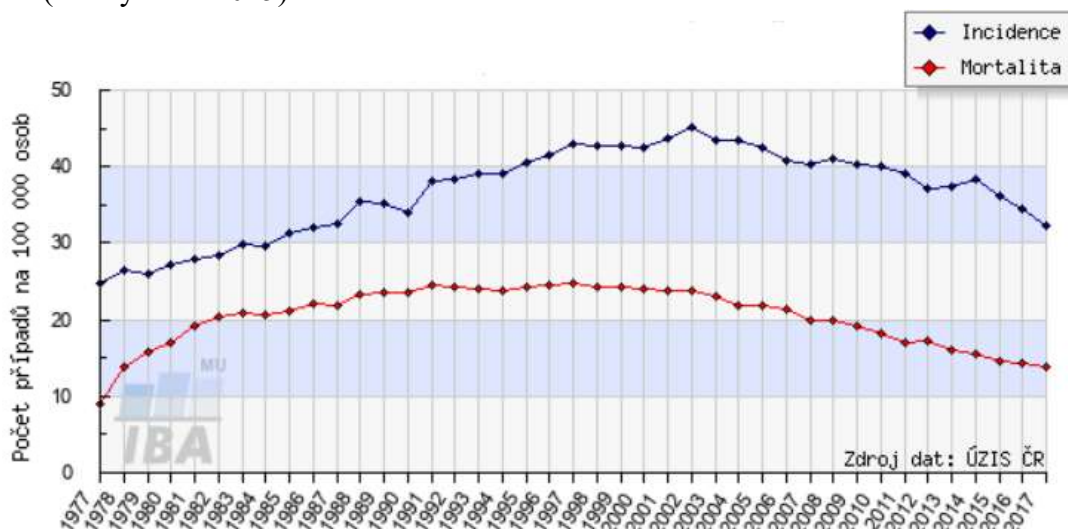
3.3.2 Rizikové faktory pro rozvoj KK

Jako hlavní rizikový faktor pro vznik tohoto typu karcinomu se uvádí věk. Tento typ nádoru se nejčastěji vyskytuje po 50. roku života, do tohoto věku je jeho výskyt poměrně vzácný (kromě dědičných typů této nemoci) (Levin et al. 2008). Mezi neovlivnitelné faktory dále patří zánětlivá střevní onemocnění, konkrétně ulcerózní kolitida (Eaden et al. 2001) a Crohnova choroba (Canavan et al. 2006). Chronický zánět, vyskytující se při zánětlivých onemocnění střev, způsobuje růst abnormálních buněk, tedy dysplasii. Ačkoliv tyto buňky nejsou maligní, je zde vyšší šance, že se změní v anaplastické buňky a následně v nádor (Mármol et al. 2017). Mezi ovlivnitelné faktory ovlivňující výskyt KK patří již výše zmíněné

faktory životního stylu, je však nutno zdůraznit, že nezdravé stravovací návyky mohou zvyšovat riziko této nemoci až o 70 % (Willett 2005).

3.3.3 Kolorektální karcinom v České republice

Středoevropské země (Maďarsko, Slovensko, Česká republika) tradičně patří mezi oblasti s nejvyšším výskytem a úmrtností související kolorektálním karcinomem. V těchto zemích je výskyt 2× až 3× vyšší než v zemích s nejnižším výskytem tohoto typu rakoviny (Bosna a Hercegovina). V České republice dochází k mírnému snižování výskytu a úmrtnosti v souvislosti s kolorektálním karcinomem (obr. 4). V roce 2012 se Česká republika dostala z 3. místa v obou ukazatelích na 9. místo v mortalitě a 5. místo v incidenci rakoviny tlustého střeva (Ferlay et al. 2015).



Obrázek 4: Vývoj incidence a mortality zhoubných novotvarů (ZN) tlustého střeva a konečníku v čase. V posledních letech se incidence v České republice snížila, klesá také mortalita. Zdroj: svod.cz.

V České republice se toto onemocnění nejčastěji vyskytne u pacientů mezi 63 a 77 lety, ovšem téměř čtvrtina jedinců v době diagnózy ještě nedosáhla 60 let. Riziko výskytu stoupá s dovršením 50 let života, proto se screening tohoto onemocnění v České republice zaměřuje na bezpříznakové jedince od tohoto věku (Zavoral et al. 2009). Screeningové metody mohou mít zásadní vliv na mortalitu způsobenou kolorektálním karcinomem. Změny normální sliznice přes adenomy až v karcinom trvají v průměru 8-10 let, což umožňuje během této doby screeningem odhalit premaligní léze, odstranit je a tím zabránit vzniku nádoru, případně nemoc zachytit v raném stádiu (Conteduca et al. 2013). K dosažení úspěšnosti screeningových metod je nutné co nejvyšší pokrytí populace, proto je organizován celoplošný program sloužící k včasné identifikaci a následně pozvání jedince k vyšetření. Screening KK byl v České republice zaveden již v roce 2000, kdy byl nabízen bezpříznakovým jedincům guajakový test na okultní krvácení, v případě pozitivního nálezu následovaný kolonoskopií. Od roku 2009 se zavedlo používání imunochemických testů a kolonoskopického screeningu. Lidem od 50 do 54 let života je jednorůčně nabízen test na okultní krvácení, v případě pozitivního nálezu následuje kolonoskopie. Od 55 let života je možná volba testu na okultní krvácení ve dvouletých intervalech nebo kolonoskopie. Screeningu se od roku 2009 účastní kromě praktických lékařů a gastroenterologů také gynekologové. Od roku 2014 bylo zavedeno adresné zvaní občanů

k účasti na screeningu kolorektálního karcinomu, tedy populační screening. Zdravotní pojišťovny korespondenčně vyzývají své pojištěnce k účasti na screeningu kolorektálního karcinomu, v případě žen také k účasti na screeningu nádorů děložního hrdla a nádoru prsu. Pokud se zvaný člověk nedostaví k vyšetření, je zván opakovaně. Zavedení tohoto opatření vedlo ke zvýšení pokrytí cílové populace a přineslo výsledky, v roce 2014 bylo zjištěno o 42 % více adenomů a o 20 % více karcinomů v porovnání s přechozím rokem (Zavoral et al. 2009).

3.4 Léčba nádorových onemocnění

Metody léčby nádorových onemocnění závisí na typu, stádiu a lokaci daného tumoru. Patří sem chirurgická operace tumoru, radioterapie a chemoterapie. Chemoterapie zahrnuje cytotoxické a cytostatické léky, které ovlivňují buněčný cyklus. Cytostatická léčiva dělíme podle mechanismu jejich účinku na několik základních skupin: alkylační látky (poškozují strukturu a funkci nukleových kyselin, tím inhibují replikaci, transkripci a translaci), inhibitory topoizomerázy (brání replikaci DNA), látky ovlivňující dynamiku růstu mikrotubulů (váží se na tubulin, narušují buněčné mikrotubuly, čímž přerušují mitózu) a antimetabolity (zastavují syntézu nukleových kyselin) (Greenwell & Rahman 2015; Singh et al. 2016). Tyto látky působí na rychle se dělící buňky, což může být problémem u buněk, které se rychle dělí i za normálních podmínek, například buňky kostní dřevě, buňky v trávicím traktu nebo buňky vlasových folikulů. Tyto buňky jsou následně při chemoterapeutické léčbě zasaženy a dochází k výskytu nežádoucích účinků. Mezi nežádoucí účinky patří snížená produkce krvinek, záněty zažívacího traktu, ztrátu vlasů, kardiotoxicita, neurotoxicita a potlačení imunity. Navíc rychlá eliminace a distribuce léčiva do necílových orgánů vyžaduje velkou dávku léčiva, což vede k zesílení vedlejších účinků. Dalším omezením je rezistence nádorových buněk k dostupným lékům, protože nádorové buňky podléhají mutacím, které vedou k rezistenci. Tyto faktory přispívají ke snahám hledat látky, které nebudou mít tolik vedlejších účinků a budou vykazovat cytotoxicitu pouze proti cílovým buňkám. Fytochemikálie a jejich deriváty mají potenciál k tomu být méně toxickou alternativou k chemoterapeutické léčbě (Singh et al. 2016).

3.4.1 Fytochemikálie využívané pro své cytotoxické účinky

Fytochemikálie a jejich metabolity jsou přítomné v kořenech, listech, květech, kmenech i v kůře rostlin a vykazují mnoho funkcí v lidském těle. Za ty jsou zodpovědné alkaloidy, flavonoidy, fenolické látky, taniny, glykosidy, gummy, pryskyřice a oleje (Singh, Jarial & Kanwar, 2013). Účinky řady rostlin a jejich extraktů jsou využívány od nepaměti a mají své hojné zastoupení i v tradiční medicíně (Hosseinzadeh et al. 2015). Avšak i v moderní medicíně mají rostlinné produkty velký význam, více než ¼ léčiv používaných během posledních 20 let jsou získávané přímo z rostlin, dalších 25 % jsou chemicky upravené přírodní látky. Odhaduje se, že rostlinná říše zahrnuje okolo 250 000 druhů, ale pouze u 10 % bylo zkoumáno jejich potencionální využití ve farmacii (Amin et al. 2009).

Vinka alkaloidy

Vinka alkaloidy jsou skupinou fytochemikálií izolovaných z listů rostliny *Catharanthus roseus* (barvínekovec růžový) v 50. letech 20. století (Noble et al. 1958). Extrakty této rostliny byly zkoumány pro své účinky při léčbě diabetu, které se však nepotvrdily, ovšem byl objeven jejich účinek proti lymfatické leukémii u krys (Noble 1990). V léčebné terapii se využívají hlavně vinorelbin, vindesin, vincristin a vinblastin. Využívány jsou pro léčbu celé řady nádorových onemocnění, například prsu, jater, varlat, plic nebo leukémie (Moudi et al. 2013). Mechanismem jejich působení je jejich interakce s tubulinem, čímž dochází k narušení funkce mikrotubulu a tím pozastavení metafáze (Himes 1991).

Taxany

První objevenou látkou z této skupiny byl paklitaxel. Izolován byl z kůry *Taxus brevifolia* Nutt (tis západoamerický). Mechanismem účinku je vazba na mikrotubuly, což vede k zastavení ve fázi mitózy. Tyto účinky byly objeveny už v 70. letech 20. století, v roce 1992 byl paklitaxel schválen Úřadem pro potraviny a léčiva k léčbě karcinomu vaječnicků. V současné době patří samostatně nebo v kombinaci k nejpoužívanějším chemoterapeutickým prostředkům k léčbě širokého spektra nádorových onemocnění (Xie & Zhou 2017). Produkce paklitaxelu byla zjištěna také u *Corylus avellana* (líška obecná) (Ottaggio et al. 2008). Zajímavé je, že paklitaxel mohou také produkovat endofytické bakterie nalezené u rodu *Taxus*, čehož by mohlo být využíváno jako alternativní cesty pro získávání této látky (Mirjalili et al. 2012).

Semisyntetickým analogem paklitaxelu je docetaxel, který je také schválen pro využití při řadě nádorových onemocnění, konkrétně rakoviny prsu, plic a prostaty (Xie & Zhou 2017). Docetaxel byl syntetizován z přírodního prekurzoru (10-deacetylbaaccatin III), který se přirozeně vyskytuje v jehlicích *Taxus baccata* (tis červený) (Ojima et al. 1994).

Deriváty kamptothecinu

Tato skupina látek také patří mezi chemoterapeutické látky v klinické praxi, která vykazuje silné protinádorové účinky. Mechanismem účinku je inhibice topoizomerázy I. Nalezeny byly v rostlině *Camptotheca acuminata* (kamptoteka ostrolistá). Mezi deriváty patřící do této skupiny řadíme také opotecan, využívaný při léčbě karcinomu vaječnicku a plic, irinotecan se využívá při léčbě kolorektálního karcinomu (Rahier et al. 2005).

Kolchicin

Kolchicin byl poprvé izolován z cibulí a semen *Colchicum autumnale* (ocún jesenní). Tato látka se trvale váže na tubulin, stabilizuje tvorbu mikrotubulů, zastavuje buněčný cyklus v různých fázích a vyvolává apoptózu (Negi et al. 2015). Bohužel účinek kolchicinu není příliš specifický a působí i na rychle se dělící normální buňky. Z toho důvodu byly vyvinuty semisyntetické deriváty, které jsou méně toxické a využívají se k léčbě například kolorektálního karcinomu, melanomu, chronické granulocytární leukémie, nádorů prsu (Iqbal et al. 2017). Samotný kolchicin není schválený pro léčbu nádorových onemocnění kvůli své toxicitě (Stack et al. 2015).

3.5 Čeleď *Ranunculaceae*

Čeleď pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*) zahrnuje asi 60 rodů a 2200 druhů. Jedná se převážně o byliny, ale méně často také polokeře nebo dřevité liány, které jsou rozšířeny po celém světě, hlavně v mírných pásmech severní polokoule. Velká část, konkrétně 42 rodů a 720 druhů, je rozšířeno v Číně, převážně v jihozápadních horských oblastech (Wu 2003). Rostliny této čeledi obsahují široké spektrum chemických složek. Nejméně 30 rodů a asi 220 druhů má dlouhou tradici použití v tradiční čínské medicíně. Vzhledem k velkému množství zástupců této čeledi je zde i velmi složité a rozmanité chemické složení. Typické pro tuto čeleď je obsah benzylchinolinových a protoberberinových alkaloidů. Dále jsou zde běžně nalézány triterpenoidní saponiny, laktony (typickým příkladem je ranunculin), dále kyogenní glykosidy. Ve většině rodů byly nalezeny také flavonoidy. Další chemické sloučeniny se vyskytují v jednotlivých rostlinách, některé jsou však distribuovány mezi více druhy v rámci této čeledi (Hao et al. 2015). Distribuce fytochemických látek v rámci této čeledi není náhodná, ale souvisí s fylogenezí (Hao et al. 2014). Rody *Ranunculus*, *Clematis*, *Pulsatilla*, *Anemone* a *Nigella* jsou typické vysokým obsahem pentacyklických triterpenoidních saponinů, *Actaea* a *Cimicifuga* jsou bohatým zdrojem tetracyklických triterpenoidních saponinů, diterpenoidů, triterpenoidů a monoterpenů, ty lze také nalézt v *Thalictrum* a *Anemone*. Isochinolinové alkaloidy jsou hojně zastoupeny v *Caltha*, *Nigella*, *Delphinieae*, *Adonideae*, *Thalictroideae* a *Coptidoideae*, diterpenoidní alkaloidy jsou hojně v *Delphinium*, *Consolida* a *Aconitum*, nalezeny jsou také v *Nigella* a *Thalictrum* (Rana et al. 2015; Hao et al. 2017; Karimi et al. 2018).

Hao et al. (2015) se zabývali využitím rostliny čeledi *Ranunculaceae* v tradiční čínské medicíně. Nejčastěji byly tyto rostliny využívány pro své „ochlazující účinky“, které jsou v tradiční čínské medicíně jedním ze základních pilířů (rozdělení energií na teplé/studené) (Nestler 2002), dále pro detoxikaci, léčbu vředů, jako antimikrobiální a protizánětlivé látky, což může být následkem přítomnosti určitých komponentů, jako jsou laktony anemonin a protoanemonin, dále triterpenoidních saponinů nebo benzylchinolinových a protoberberinových alkaloidů. Rostliny obsahující saponiny (*Ranunculeae*, *Anemoneae*, *Cimicifugeae*, *Nigelleae*, *Thalictroideae*) jsou často využívány pro snižování otoků, k úlevě od bolesti a léčbě vředů. Rostliny rodu *Delphinieae*, které jsou bohaté na diterpenoidní alkaloidy, jsou využívány jako analgetika a také pro své účinky proti artritidě (Reina et al. 2007; Nesterova et al. 2009). Malá množství diterpenoidních alkaloidů obsahují i *Thalictrum*, *Nigella* a *Clematis* (Hao et al. 2013a; Chen et al. 2014), jež jsou využívány pro své antimikrobiální a protizánětlivé účinky (Hao et al. 2015). *Thalictroideae* a *Coptidoideae* jsou bohaté na benzochinolinové alkaloidy, což jim zapůjčuje antibakteriální, antivirové a protinádorové účinky. V tradiční medicíně se využívají pro „chlazení krve“, v západní medicíně by mohly mít účinek při léčbě hypertenze a dalších kardiovaskulárních onemocnění (Peng et al. 2006; Hao et al. 2013b, 2015).

Mezi námi zkoumané rody patří *Ranunculeae*, tyto rostliny se tradičně využívají proti parazitům, otokům a pro detoxikaci, proti malárii, artritidě, astmatu a žloutence. Rod *Aconitum* se využívá k léčbě artritidy, neuropatické bolesti, mrtvice, ochrnutí, bolesti žaludku, gastroenteritidě, menstruačních poruch a vředů. *Caltha* se využívá proti artritidě. Kořen a stonek *Hepatica* se využívá pro léčbu traumatických zranění, lézí, bolesti kloubů a svalstva.

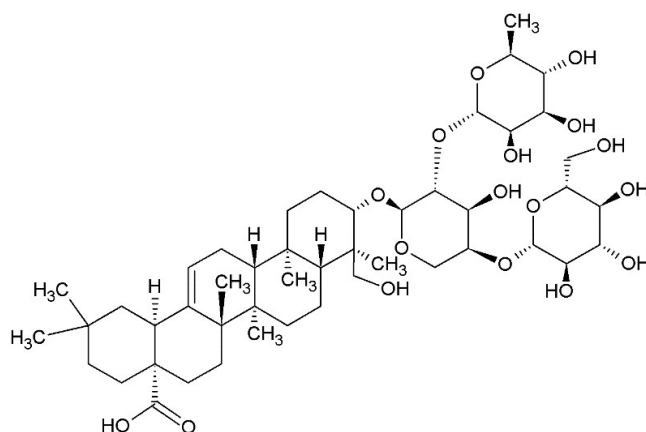
Trollius má antibakteriální účinky a používá se v léčbě angíny, zánětech středního ucha, červených očí spolu s jejich otoky a bolestí (Hao et al. 2015).

3.5.1 Saponiny

Saponiny jsou rozmanitou skupinou přírodních látek, které jsou tvořeny hydrofilní sacharidovou složkou a lipofilním aglykonem. Saponiny se dále dělí na steroidní nebo triterpenové saponiny, podle typu aglykonu (Lacaille-Dubois 2005).

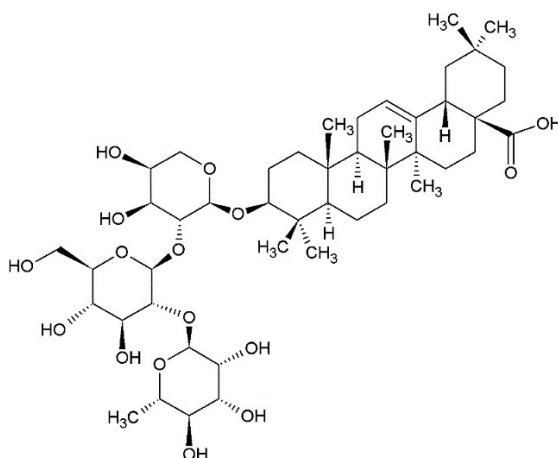
Saponiny jsou hojně zastoupené v rodech *Clematis*, *Pulsatilla*, *Anemone* a *Cimicifugae* (Hao et al. 2013a, 2015). Některé tyto saponiny vykazují schopnost zastavovat buněčný cyklus v S fázi a vyvolávat apoptózu (Liu et al. 2015b). Saponiny nalezené v rodu *Clematis* vykazují cytotoxickou aktivitu proti lidskému glioblastomu, IC_{50} se pohybuje v rozmezí 6,95 až 38,51 μM (Zhao et al. 2014b), nádorovým onemocněním jater (IC_{50} = 2,26 až 19,16 μM) (Zhao et al. 2014a), cervikálnímu karcinomu jater (IC_{50} = 1,88 až 7,26 μM) (Zhao et al. 2016), žaludku (IC_{50} = 1,40 až 19,50 μM) (Tian et al. 2013), tlustého střeva (IC_{50} = 2,10 až 3,30 μM) (He et al. 2011) a prostaty (IC_{50} = 0,71 až 1,5 μM) (Gong et al. 2013) a to v inhibičních koncentracích pohybujících se přibližně od 0,71 do 26 μM .

Saponin D (obr. 5), nalezený v *Pulsatilla koreana*, silně potlačuje růst buněk hepatocelulárního karcinomu v závislosti na podané dávce a indukuje apoptózu tím, že zvyšuje podíl buněk v G1 fázi, k čemuž dochází prostřednictvím zvýšené exprese genu Bax (gen odpovědný za řízení apoptózy) a zvýšenému štěpení kaspázy 3, což vede k její aktivaci (také se účastní procesu apoptózy) (Hong et al. 2012). Saponin D také potlačuje proliferaci buněk nádoru tlustého střeva a pankreatických buněk a indukuje apoptózu modulací zodpovědných signálních drah (Son et al. 2013a, 2013b). Ethanolový extrakt *Pulsatilla koreana* vykazoval inhibici růstu a vyvolání apoptózy nádorových buněk štítné žlázy *in vivo* i *in vitro*, spolu s potlačením angiogeneze. Také v tomto případě byl potvrzen význam kaspáz, tedy enzymů, které vyvolávají apoptózu. Kaspázy jsou zodpovědné za proteolytické štěpení řady klíčových proteinů, mezi které patří poly (ADP-ribóza) polymerázy (PARP), tedy proteiny, které opravují DNA a udržují integritu genomové DNA. Účinkem extraktu *Pulsatilla koreana* došlo ke zvýšení exprese kaspázy-3 a PARP, čímž došlo k zvýšení apoptózy. Také došlo ke zvýšení proapoptických regulátorů Bax a ke snížení antiapoptických regulátorů Bcl-2. V neposlední řadě také došlo ke snížení exprese hypoxií indukovaného faktoru 1 (HIF-1 α) a vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), což jsou důležité angiogenetické faktory při progresi nádorů. V případě *in vivo* pokusu se prokázala v pokusech na myších inhibice růstu tumoru, snížení jeho váhy, zatímco nedošlo ke snížení tělesné váhy myši, což naznačuje nízkou toxicitu extraktu (Park et al. 2013).



Obrázek 5.: Struktura Saponinu D.

Raddeanin A (obr. 6), pentacyklický triterpenový saponin z *Anemone raddeana*, také inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu v případě nádorových onemocnění jako je karcinom žaludku a kolorektální karcinom (Xue et al. 2013; Guan et al. 2015). Raddeanin A zvyšuje expresi genu Bax a snižuje Bcl-2 a Bcl-xL (antiapoptické proteiny), zároveň aktivuje kapsázy-3, 8, 9 a inhibitory PARP. Navíc může také přispívat ke snížení invazivity a tvorby metastáz. Degradace extracelulárního matrixu hraje zásadní roli v procesu tvorby metastáz nádorů. Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou endopeptidázy, které mohou degradovat extracelulární matrix, čímž napomáhají invazi a tvorbě metastáz nádorových buněk (Xue et al. 2013). Důležitými členy této skupiny jsou MMP-2, MMP-9 a MMP-14, u kterých často dochází k nadměrné expresi v případě nádorů prsu a kolorektálního karcinomu (Zucker & Vacirca 2004; Quaranta et al. 2007). Po podání raddeaninu A se ukázalo snížení invazivity a migrace nádorových buněk, v závislosti na dávce. Také došlo ke zvýšené expresi RECK, což je důležitý nádorový supresor, který může potlačovat angiogenezi a tvorbu metastáz. RECK snižující expresi MMP skupiny může být klíčovým faktorem, kterým raddeanin A snižuje invazivitu a tvorbu metastáz nádorů (Xue et al. 2013).



Obrázek 6.: Struktura Raddeaninu A.

α -Hederin, pentacyklický triterpenový saponin, nacházející se v *Nigella sativa* a *Clematis*, také silně inhibuje růst a způsobuje apoptózu buněk nádorů prsu. Mechanismem působení je depolarizace mitochondriálního membránového potenciálu, čímž dojde k uvolnění

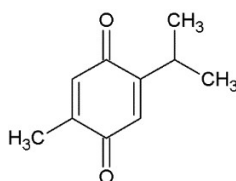
Apaf-1 a cytochromu z intermembránového prostoru do cytosolu a tím k aktivaci kaspázy-3 a kaspázy-9, což vede k vyvolání apoptózy (Cheng et al. 2014).

3.5.2 Isoprenoidy

Betulinová kyselina, izolovaná z *Pulsatilla nigricans*, podporuje zástavu buněčného cyklu v S-fázi a indukuje apoptózu buněk chronické myeloidní leukémie. Také narušuje mitochondriální membránový potenciál, snižuje hladiny Bcl-2, survivinu a zvyšuje hladinu Bax, cytochromu C a podporuje štěpení kaspázy-3 a 9 (Liu et al. 2015b).

Monoterpen thymochinon (obr. 7) je hojně zastoupený v *Nigella sativa* a vykazuje své léčivé potažmo protinádorové účinky mnoha mechanismy (Mahmoudvand et al. 2015). Thymochinon může vychytávat volné radikály a superoxidové radikály (Mansour et al. 2002). Dále také může zvyšovat aktivitu některých antioxidantních enzymů, jako je superoxid dismutáza a glutathion peroxidáza, čímž zvyšuje ochranu buněk proti poškození (Ismail et al. 2010). Thymochinon také působí proti prozánětlivému faktoru NF-kB, který má zásadní roli při rozvoji nádorových onemocnění a to tím, že zabraňuje buněčné smrti s maligním potenciálem, a také stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů (Greten et al. 2004). Thymochinon dokáže inhibovat aktivaci NF-kB a také potlačit translokaci tohoto transkripčního faktoru do jádra, čímž dojde k zabránění regulace přepisu určitých genů (Chehl et al. 2009). U thymochinonu také byla prokázána antiproliferační aktivita u mnoha druhů nádorových onemocnění, například v netoxických koncentracích snižuje proliferaci u neoplastických keratinocytů myši o 50 % (Gali-Muhtasib et al. 2004b). Inhibuje růst mnoha jiných nádorových onemocnění, včetně gliomu (Gurung et al. 2010), nádorů prsu (Woo et al. 2011), leukémie (El-Mahdy et al. 2005), kolorektálního karcinomu, pankreatu (Rooney & Ryan 2005), prostaty (Kaseb et al. 2007). Mechanismus antiproliferačního působení thymochinonu je podobný jako v případě saponinů, tedy dochází k aktivaci kaspáz, dochází k uvolňování cytochromu c do cytoplazmy a také k regulaci poměru Bax a Bcl-2 (El-Mahdy et al. 2005). Thymochinon také zastavuje buněčný cyklus nádorových buněk. Příkladem je zastavení buněčného cyklu nádorových buněk děložního hrdla u myši ve fázi G0/G1, pravděpodobně zvýšením exprese proteinu p16, který má funkci nádorového supresoru a snížením exprese cyklinu D1, jehož nadprodukce je spojena s rozvojem nádorů (Gali-Muhtasib et al. 2004b). V případě buněk nádorů prsu, které byly rezistentní k léčivu doxorubicin, došlo k zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M, spolu se zvýšením proteinů p21 a p53, které působí jako tumorové supresory (Arafa et al. 2011). Thymochinon také dokáže indukovat apoptózu, v případě buněk lidského kolorektálního karcinomu byla prokázána jeho aktivita prostřednictvím zvyšování proteinu p53 a p21, společně se snižováním Bcl-2 (Gali-Muhtasib et al. 2004a). V případě buněk myeloblastické leukémie také došlo k apoptóze, ovšem mechanismem účinku byla aktivace kaspáz-3, 8 a 9 a úprava poměru Bax a Bcl-2. Význam kaspáz v tomto procesu potvrzuje fakt, že podání inhibitorů kaspázy dokáže zvrátit thymochinonem indukovanou apoptózu (El-Mahdy et al. 2005). Dalším mechanismem indukce apoptózy v nádorových buňkách tlustého střeva je inaktivací STAT3 signální dráhy, která je aktivována u mnoha typů nádorových onemocnění (Kundu et al. 2014). Buněčná smrt může být také indukována procesem zvaným autofagie. Autofagie je katabolický proces, který udržuje buněčnou homeostázu jako odpověď na různé stresové faktory. Nádorové buňky, které byly

ošetřené pomocí thymochinonu, vykazovaly vyšší množství autofágických vakuol a specifických autofágických markerů (LC3-II proteiny) (Chu et al. 2014). V neposlední řadě dokáže thymochinon zabraňovat tvorbě metastáz a angiogenezi. Kromě toho, že došlo v případě myšího modelu k potlačení růstu buněk tumoru prostaty, pravděpodobně pomocí inhibice angiogeneze, což se projevilo snížením počtu krevních cév v nádoru, došlo také ke snížení migrace a invazivity (Yi et al. 2008). To potvrzuje také studie nádorových buněk pankreatu, kde došlo působením thymochinonu ke snížení exprese MUC4. MUC4 což je glykoprotein, u něhož dochází v případě nádorů pankreatu ke zvýšené expresi a přispívá k diferenciaci, proliferaci, metastázi a chemorezistenci nádorových buněk pankreatu. Následkem podávání thymochinonu bylo zvýšení apoptózy a snížení migrace těchto nádorových buněk (Torres et al. 2010). Snížení invazivity a tvorby metastáz bylo pozorováno také v případě nádorových buněk prsu (Woo et al. 2011) a plic (Jafri et al. 2010).

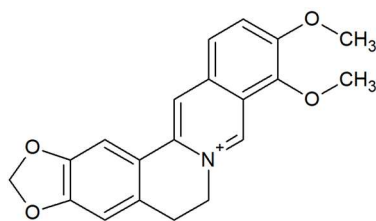


Obrázek 7.: Struktura thymochinonu.

3.5.3 Alkaloidy

Thalictrum, *Coptis* a *Hydrastis* jsou zdrojem isochinolových alkaloidů (Hao et al. 2015). Typickým zástupcem je berberin (obr. 8), jeho antiproliferační aktivita byla zdokumentována u mnoha typů nádorových onemocnění, včetně neuroblastomu (Choi et al. 2008), karcinomu jazyka (Ho et al. 2009), kolorektálního karcinomu (Hsu et al. 2007), nádorů plic (James et al. 2011), prsu (Patil et al. 2010), leukémie (Yu et al. 2007).

Berberinem vyvolané změny mitochondriální membrány stimulují uvolnění cytochromu c, kaspáz a PARP proteinů, podporují formaci reaktivních druhů kyslíku (ROS), které jsou cytotoxické pro nádorové buňky, čímž dochází k vyvolání apoptózy (Meeran et al. 2008). Berberin také může snižovat mitochondriální membránový potenciál, snižovat hladiny Bcl-2 a Bcl-xL, spolu se zvýšením Bax a kaspázy-3 (Katiyar et al. 2009). Berberinem indukovaná regulace buněčného cyklu v nízkých dávkách způsobuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, při vyšších dávkách v G2 fázi u melanomu myších i lidských buněk (Serafim et al. 2008). Berberin se také může hromadit na mitochondriální membráně, kde mění vazbu mezi adenin nukleotidovým translokátorem a bongkrekovou kyselinou, čímž vyvolává depolarizaci a fragmentaci, což přispívá k inhibici respirace a dysfunkci mitochondrií, což může přispívat k jeho protinádorovému působení (Pereira et al. 2008). Kromě toho může také berberin podporovat autofagii (Peng et al. 2008; Wang et al. 2010) a inhibovat tvorbu metastáz (Tang et al. 2009).



Obrázek 8: Struktura berberinu.

3.5.4 Kardioaktivní steroidy

Hellebrigenin, izolovaný z *Helleborus*, významně snižuje životaschopnost lidského hepatocelulárního karcinomu. Hellebrigenin vyvolal poškození DNA tím, že došlo k dvouřetězcovému zlomu a následně k zastavení cyklu v G2/M fázi. Hellebrigenin také indukuje mitochondriální apoptózu, charakterizovanou translokací Bax do mitochondrií, narušením mitochondriálního membránového potenciálu, uvolňováním cytochromu c do cytosolu a následnou aktivací kaspáz (Deng et al. 2014).

3.5.5 Polysacharidy

Imunitní funkce jsou zásadní pro boj s nádorovými buňkami. Polysacharidy z *Ranunculus ternatus* mohou zvyšovat aktivitu NK buněk a indukovat apoptózu v buňkách rakoviny prsu (Sun et al. 2013). Polysacharidová frakce připravená z *Anemone raddeana* podporuje proliferaci splenocytů, NK buněk a zvyšuje aktivitu cytotoxických T-lymfocytů, interleukinů-2 (IL-2) a faktorů nádorové nekrózy (TNF- α) u myši trpících hepatocelulárním karcinomem. Tato frakce nevykazovala žádné negativní účinky na váhu, játra a ledviny myši (Liu et al. 2012). Polysacharid ACP-a1, extrahovaný z *Aconitum coreanum*, významně inhiboval růst nádoru jater transplantovaného do myši a významně prodlužoval dobu jejich dožití (Li et al. 2013). Polysacharidy z *Pulsatilla chinensis* u myši s gliomem mohou zvyšovat aktivitu superoxid dismutázy a katalázy (Zhou et al. 2012). Vodorozpustné polysacharidy z *Aconitum kusnezoffii* vykazují antioxidační a imunologické účinky (Gao et al. 2010, 2011). Neškrobové polysacharidové frakce, hlavně pektiny a α -D-glukany, extrahované z kořenu *A. lateralis* a *A. kusnezoffii* v testech u myši vykazovaly až 70% snížení růstu tumorů, ale také pozoruhodné imunostimulační účinky, včetně ovlivnění nespecifické imunity, buněčné imunity a humorální imunity, ale také obnovu imunitních funkcí potlačených protinádorovými léky (Gao et al. 2010).

3.5.6 Mastné kyseliny

Rostliny rodu *Ranunculaceae* také obsahují širokou řadu fytochemikálií s protizánětlivými účinky. *Ranunculus pedatus* a *R. constantinopolitanus* vykazují protizánětlivé účinky a podporují hojení ran (Akkol et al. 2012). Frakce mastných kyselin *R. constantinopolitanus* také ukázaly protizánětlivé účinky tím, že snižují hladiny interleukinu-6 (IL-6) a cyklooxygenázy (COX-2) (Fostok et al. 2009).

Extrakt z *Helleborus purpurascens* vykazuje aktivitu proti enzymům COX-1, COX-2 a 5-LOX. Je všeobecně uznáváno, že cyklooxygenázové a lipoxygenázové dráhy patří mezi hlavní enzymatické dráhy spojené se zánětlivými procesy v savčích buňkách. Za tuto funkci je

zodpovědný pravděpodobně komplex mastných kyselin, hlavně kyselina α -linolenová (Malik et al. 2017).

Vzhledem k pozitivním vlastnostem, obsahu látek s protinádorovým působením a velkému množství zástupců této čeledi, u kterých by mohlo potenciálně dojít k objevu vhodných léčivých složek, jsme se rozhodli k otestování některých zástupců. Naším cílem je zjistit pomocí *in vitro* testu na buněčných liniích kolorektálního karcinomu potenciální účinky a možnosti využití extraktů z jednotlivých částí rostlin. Je-li nám dobře známo, neexistují (nebo jen velmi malé množství) studií, které by se této problematice plně věnovaly.

4 Metodika

4.1 Materiál

Pro testování extraktů čeledi rostlin *Ranunculaceae* byly použity buněčné linie střevního karcinomu HT-29, Caco-2 a normální lidská buněčná linie FHS 74Int. Tyto buněčné linie byly zakoupeny z European Collection of Cell Culture (ECACC), respektive z American Type Culture Collection (ATCC). Využito bylo kultivační medium Hybri-Care Medium ATCC 46, zakoupené od ATCC (USA), dále Modified Egles Medium (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, roztok penicilínu (10 000) a streptomycinu (100 mg), trypsin, fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline - PBS), epidermální růstový faktor (EGF), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), vše pořízeno od Sigma-Aldrich (CZ). Dimetylsulfoxid byl zakoupen u společnosti Lach-Ner (CZ), mikrotitrační destičky, serologické pipety a kultivační láhve byly pořízeny od ThermoFisher (UK). Spektrofotometr Tecan Infinite M200 pochází od společnosti Tecan (CH).

4.2 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 byly pěstovány v DMEM médiu s přidávkem 10% FBS, 1% roztoku penicilinu a streptomycinu, 1% pyruvát sodným, 1% hydrogenuhličitanem sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami. Buněčná linie lidského tenkého střeva FHS 74Int byla kultivována v Hybri-Care Mediu (ATCC 46-Y) s 30 ng/ml EGF, 10% FBS, 1% roztoku penicilinu a streptomycinu, 1% hydrogenuhličitanem sodným. Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích s 15 ml příslušného média, ty byly vloženy do inkubátoru při 5 % CO₂ a 37 °C. Výměna média probíhala každé dva dny. Buňky byly kultivovány přibližně po dobu 7 dní do 80-90 % konfluency. Při sklizni byla kultivační láhev propláchnuta 1× pomocí PBS, aby došlo k odstranění inhibitoru trypsinu. Následně bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu 3 minut, poté bylo přidáno 5 ml kompletního média obsahující inhibitory trypsinu. Obsah láhve byl v případě nekompletního uvolnění buněk od povrchu láhve uvolněn pomocí buněčné škrabky a následně byl obsah přepipetován do centrifugační zkumavky. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1063 × RCF. Poté bylo staré médium slito tak, aby nedošlo k poškození buněčné pelety, k ní bylo následně přidáno 5 ml čerstvého média a peleta v něm byla mechanicky rozpuštěna. Z této buněčné suspenze bylo přeneseno 0,5 ml do nové kultivační láhve s 15 ml kompletního média.

Ve zbylé suspenzi byl zjištěn přesný obsah buněk a naředěn na požadovanou koncentraci pro Caco-2 a HT-29 $2,5 \times 10^3$ buněk/ml a pro FHS 74Int na 2×10^4 buněk/ml.

4.3 MTT cytotoxický test

Ke stanovení cytotoxicity bylo využito tetrazoliové soli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyln tetrazol bromid (MTT) s modifikacemi dle Doskočil et al. (2015). Buněčné suspenze buněk Caco-2, HT-29 a FHs-74 byly pipetovány do 96-jamkové destičky v připravených koncentracích. Po 24 hodinách došlo k odstranění starého média a nahrazení čerstvým, které

obsahovalo testované vzorky v koncentraci 16-512 $\mu\text{g/ml}$, následně byly vzorky inkubovány po dobu 72 hodin. Po uplynutí této doby bylo medium odstraněno a nahrazeno DMEM médiem obsahujícím MTT (1 $\mu\text{g/ml}$) a vzorky byly inkubovány další 2 hodiny při 37 °C. Následně byl supernatant odsát a formazanový produkt byl rozpuštěn ve 100 ml DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm s použitím Tecan Infinite M200 spektrometru. Následně byla stanovena inhibiční koncentrace (IC_{50}) jednotlivých vzorků.

4.4 Statistické vyhodnocení

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Selektivní index se vypočítá jako poměr inhibiční koncentrace (IC_{50}) Caco-2 a HT-29 ku IC_{50} normálních buněk linie FHS 74Int. Selektivní index nižší než 1 značí pozitivní selektivitu, výsledek vyšší než 1 značí negativní selektivitu.

5 Výsledky

Tato práce byla zaměřena na testování cytotoxicity metanolových extraktů z jednotlivých částí rostlin čeledi *Ranunculaceae* a jejich vlivu na inhibici růstu lidských buněčných linií kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29. Pro srovnání byla použita zdravá střevní buněčná linie FHs 74Int.

Z námi dosažených výsledků (tab. 1) je patrné, že nejvyšší cytotoxicitu proti námi testovaným nádorovým buněčným liniím vykazují extrakt z listů *Hepatica transilvanica* ($IC_{50} = 46,88 \pm 5,94 \mu\text{g/ml}$) a extrakt z kořenů *Hepatica nobilis* ($IC_{50} = 46,9 \pm 5,94 \mu\text{g/ml}$) na buněčné linii Caco-2. Extrakt z listů *Hepatica transilvanica* zároveň vykazoval i mírnou cytotoxicitu vůči buněčné linii HT-29 ($IC_{50} = 86,47 \pm 4,46 \mu\text{g/ml}$). Poměrně významnou cytotoxicitu vůči Caco-2 i HT-29 vykazuje rovněž i extrakt z kořene *Hepatica transilvanica* ($IC_{50} = 65,77 \pm 2,63 \mu\text{g/ml}$; $IC_{50} = 70,24 \pm 9,37 \mu\text{g/ml}$). Ani jeden z těchto extraktů nevykazuje cytotoxicitu na zdravou střevní buněčnou linii FHs 74Int, z čehož vyplývá poměrně vysoká selektivita těchto extraktů. Nejvyšší selektivitu vykazuje extrakt kořene *Hepatica nobilis* ($SI = 0,140$) v případě hodnocení cytotoxicity vůči Caco-2. Významnou selektivitu vůči Caco-2 a zároveň HT-29 vykazuje extrakt kořene *Hepatica transilvanica* ($SI = 0,253$; $SI = 0,271$).

Cytotoxicitu vůči oběma buněčným liniím kolorektálního karcinomu vykazuje také *Ranunculus nemorosus* ($IC_{50} = 83,34 \pm 4,62 \mu\text{g/ml}$; $IC_{50} = 67,39 \pm 1,81 \mu\text{g/ml}$). Rovněž je zde jen zanedbatelné cytotoxické působení proti zdravé střevní buněčné linii. Cytotoxicitu pouze vůči buněčné linii kolorektálního karcinomu HT-29 vykazuje extrakt z listů rostliny *Aconitum moldavicum* ($IC_{50} = 77,54 \pm 10,54 \mu\text{g/ml}$). Vůči Caco-2 nevykazuje cytotoxicitu. Také je zde poměrně vysoké selektivní působení tohoto extraktu ($SI = 0,266$).

Velmi mírná cytotoxicita pouze vůči Caco-2 byla pozorována u extraktů nadzemních částí a květu této rostlin *Caltcha palustris* ($IC_{50} = 85,84 \pm 7,35 \mu\text{g/ml}$) a *Ranunculus sardous* ($IC_{50} = 94,15 \pm 4,41 \mu\text{g/ml}$), v případě této buněčné linie také vykazují oba extrakty poměrně vysokou selektivitu ($SI = 0,309$; $SI = 0,266$). Proti linii kolorektálního karcinomu HT-29 ani zdravé buněčné linii tyto extrakty nevykazují cytotoxicitu.

Ostatní metanolové extrakty nevykazují cytotoxicitu vůči námi vybraným buněčným liniím.

Tab. 1: Hodnoty IC₅₀ testovaných vzorků pro jednotlivé buněčné linie.

Vzorek	Část rostliny	Caco-2	HT-29	FHs 74Int	Selektivní index (SI)	
		IC ₅₀ (μg/ml)*			Caco-2/FHs 74Int	HT-29/FHs 74Int
<i>A. moldavicum</i>	1	160,66 ± 7,50	77,54 ± 10,45	291,25 ± 7,21	0,552	0,266
<i>A. vulparia</i>	1, 2	249,87 ± 0,80	184,54 ± 2,05	>512	0,488	0,556
<i>R. platanifolius</i>	1, 4	242,45 ± 6,81	253,15 ± 0,42	>512	0,474	0,494
<i>H. transilvanica</i>	1	46,88 ± 5,94	86,47 ± 4,46	154,84 ± 17,16	0,303	0,558
<i>H. transilvanica</i>	3	65,77 ± 2,63	70,24 ± 9,37	259,64 ± 19,10	0,253	0,271
<i>A. variegatum</i>	1, 4	144,29 ± 7,54	330,66 ± 17,89	>512	0,282	0,646
<i>R. acer</i>	5	>512	205,25 ± 15,44	450,29 ± 12,08	1,137	0,456
<i>R. polyanthemos</i>	5	318,23 ± 5,81	230,66 ± 9,27	>512	0,622	0,451
<i>R. carpaticus</i>	5	277,60 ± 9,58	387,68 ± 0,51	318,93 ± 19,86	0,870	1,216
<i>R. nemorosus</i>	5	83,34 ± 4,62	67,39 ± 1,81	152,97 ± 4,63	0,545	0,441
<i>R. repens</i>	5	227,61 ± 5,98	295,19 ± 18,04	>512	0,445	0,577
<i>R. bulbosus</i>	5	152,27 ± 6,29	221,92 ± 5,60	285,14 ± 6,36	0,534	0,778
<i>A. napellus</i>	2, 5	292,94 ± 16,61	228,2 ± 15,71	274,89 ± 26,20	1,066	0,830
<i>A. napellus</i>	3	245,22 ± 10,35	>512	>512	0,479	1,000
<i>C. palustris</i>	2, 5	85,84 ± 7,35	148,84 ± 0,51	277,36 ± 16,95	0,309	0,537
<i>H. nobilis</i>	1	124,10 ± 1,13	335,85 ± 19,35	463,61 ± 12,00	0,268	0,724
<i>H. nobilis</i>	3	46,90 ± 4,43	133,02 ± 11,14	335,30 ± 10,65	0,140	0,397
<i>R. sardous</i>	2, 5	94,15 ± 4,41	347,94 ± 7,34	353,45 ± 21,91	0,266	0,984
<i>T. europeus</i>	2, 5	213,92 ± 32,67	>512	>512	0,418	1,000

1 - listy, 2 - květy, 3 - kořeny, 4 stonek, 5 - nadzemní část; *vyjádřeno jako průměr IC₅₀ ± směrodatná odchylka. Za cytotoxické jsou považovány hodnoty IC₅₀ (inhibiční koncentrace, která způsobí 50% inhibici růstu) nižší než 100 μg/ml. Selektivní index se vypočítá jako poměr IC₅₀ Caco-2 a HT-29 ku IC₅₀ normálních buněk linie FHs 74Int. Selektivita je považována za pozitivní při výsledku <1.

6 Diskuze

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější onemocnění a také se řadí na první příčky v příčinách úmrtí. V současné době je léčba nádorových onemocnění založena hlavně na chirurgickém odstranění a radiační léčbě nádoru, obvykle následovanou systémovou chemoterapií. Mezi hlavní nevýhody chemoterapie však patří rezistence některých nádorových buněk na léky spojená s možností návratu nádoru a také vážné vedlejší účinky, které limitují použití protinádorových léků a zhoršují kvalitu pacientova života. Pochopení molekulárních mechanismů, které jsou základem progresu nádoru, vedlo k vývoji velkého množství protinádorových léčiv, ovšem mnoho těchto chemicky syntetizovaných léčiv může vést ke vzniku nežádoucích účinků, například k poškození imunitního systému (Rayan et al. 2017).

Přes slibný vývoj cílených terapií je tedy objevování nových cytotoxických látek stále důležité pro léčbu lidských nádorových onemocnění. Některá maligní onemocnění stále nereagují na léčbu, hlavně pokud jsou v metastatické fázi. Zde by mohl mít význam výzkum rostlin využívaných v tradiční medicíně. Některé protinádorové léky, jako je vinblastin, paklitaxel nebo kamptothecin, byly také objeveny v rostlinách, proto se zde předpokládá potenciál pro objevení nových účinných cytotoxických látek (Chodoeva et al. 2014). Léčivé rostliny obsahují celou řadu sekundárních metabolitů, které jsou součástí jejich chemické obrany a přežití v jejich přirozeném prostředí (Koleva et al. 2018). Rozmanitost rostlinných druhů nabízí širokou škálu potenciálně protinádorových látek a pouze malé množství rostlin bylo v tomto ohledu detailně zkoumáno. Mnoho extraktů z rostlin je využíváno v tradiční medicíně a jejich aktivní látky ještě nebyly izolovány a identifikovány (Chodoeva et al. 2005). V současné době více než 60 % léčiv využívaných při léčbě pochází z přírodních produktů získaných z rostlin, mořských živočichů nebo mikroorganismů (Seelinger et al. 2012).

Výsledky mnoha studií (Burits & Bucar 2000; Rooney & Ryan 2005; El-Najjar et al. 2010; Norsharina et al. 2011; Son et al. 2013a; Xu et al. 2017) ukazují poměrně vysoký potenciál protinádorového působení čeledi *Ranunculaceae*. Tato diplomová práce se ovšem zabývala rody, u kterých, je-li nám dobře známo, doposud neexistuje mnoho prací. Pravděpodobně nejlépe prozkoumaným rodem z námi testovaných rostlin je rod *Aconitum*. Z bioaktivních komponentů, které dominují u tohoto rodu a mají potenciál v léčbě, jsou diterpenoidní alkaloidy (Hao et al. 2013b). Námi testovaný druh *A. moldavicum* vykazoval cytotoxickou aktivitu proti buněčné linii HT-29 ($IC_{50} = 77,54 \pm 10,45 \mu\text{g/ml}$). Qu et al. (2019) se také zabývali cytotoxickým působením rodu *Aconitum*, ovšem konkrétního diterpenoidního alkaloidu lappaconitin sulfát, extrahovaného z kořene *A. sinomontanum*, a zkoumali jeho roli v indukci apoptózy na buněčné linii HT-29. Došli k závěru, že lappaconitin sulfát vykazoval antiproliferační aktivitu a indukoval apoptózu v závislosti na dávce tím, že docházelo ke zvýšení exprese proteinu p53, Bax, dále ke štěpení PARP a kaspázy-3, 7 a 9 a k inhibici exprese Bcl-2. Také došlo k ovlivnění exprese cyklinu D1 a p21 a došlo k zastavení buněčného cyklu v G0/G1 fázi. Protinádorové a protizánětlivé působení rostlin *Aconitum* potvrzují také Liang et al. (2016), kteří se zabývali chemickými konstituenty *Aconitum carmichaelii*, konkrétně diterpenoidními alkaloidy. Nově objevený alkaloid vykazoval silnou inhibiční aktivitu nejen k buněčné linii HT-29 ($IC_{50} = 0,948 \mu\text{M}$), ale i v případně buněčné linie nádoru žaludku SGC-7901 a jater HepG2. Tento alkaloid vykazoval schopnost inhibice aktivity COX-2, tedy protizánětlivé účinky. Gao et al. (2012) pozorovali cytotoxickou aktivitu

diterpenoidních alkaloidů z *Aconitum carmichaeli* také vůči buněčným liniím nádoru tlustého střeva HCT8, nádoru prsu MCF7 a nádoru jater Hep-G2. Nejvyšší cytotoxickou aktivitu vykazovaly konkrétně deoxyaconitin, oxonitin a aconitin. Ukázalo se, že přítomnost dvou esterových skupin u diterpenoidních alkaloidů vede k vyššímu cytotoxickému potenciálu v porovnání s alkaloidy bez esterových skupin. Zhang et al. (2014) se zabývali konkrétním diterpenoidním alkaloidem taipenin A, který byl získán z kořene rostliny *A. taipeicum*, a jeho vlivem na buněčné linie hepatocelulárního karcinomu (HepG2). Taipenin A vykazoval schopnost inhibice růstu nádorových buněk, hlavně při vyšších dávkách zastavoval buněčný cyklus v G0/G1 fázi, přispíval k indukci apoptózy a také docházelo k omezení invazivnosti nádorových buněk. Autoři studie považují za mechanismus účinku zvyšování koncentrace Bax a kaspázy-3, současně se snižováním Bcl-2 a cyklinu D1. K odlišným výsledkům dospěli Jiang et al. (2019), kteří se zabývali diterpenoidními alkaloidy izolovanými z rostliny *A. brevicaratum*. Ačkoliv žádný ze zkoumaných alkaloidů nevykazoval významné antiproliferační účinky, ukázalo se, že sloučenina scaconitin vykazovala schopnost indukovat protektivní autofagii buněčné linie nádoru tlustého střeva. Tato látka indukovala autofagii za pomoci aktivace p53 a dalších příslušných signalizačních drah. Diterpenoidní alkaloidy izolované z *A. handelianum* také vykazují antioxidační aktivitu, pravděpodobně díky jejich silným vazebným účinkům ke kovovým iontům (Yin et al. 2016).

Mírná antioxidační aktivita byla nalezena také u rostlin *Hepatica nobilis* a *Caltha palustris* (Nikolova et al. 2011). Určitou antioxidační a cytotoxickou aktivitu rostliny *Caltha palustris* pozorovali také Mubashir et al. (2014). Cytotoxické působení *C. palustris* bylo pozorováno i v naší práci ($IC_{50} = 85,84 \pm 7,35 \mu\text{g/ml}$). Bohužel rod *Hepatica* zatím není příliš probádáný, tím pádem není prozkoumána cytotoxicita toho druhu, ovšem v této práci vykazují zástupci nadějně působení v případě buněčných linií Caco-2 i HT-29 ($IC_{50} = 46,88 \pm 5,94 \mu\text{g/ml}$; $86,47 \pm 4,46 \mu\text{g/ml}$) v případě listů a ($IC_{50} = 65,77 \pm 2,63 \mu\text{g/ml}$; $70,24 \pm 9,37 \mu\text{g/ml}$) v případě kořene *H. transilvanica*. U *H. nobilis* se ukázalo cytotoxické působení pouze u buněčné linie Caco-2, ovšem patří k nejsilnějším mezi námi zkoumanými druhy ($IC_{50} = 46,9 \pm 4,43 \mu\text{g/ml}$).

Pro rod *Ranunculus* je typická přítomnost toxických laktonů, mezi kterými převládá protoanemonin, anemonin a ranunculín (Hao et al. 2015). Protoanemonin je považován za antimutagen, tedy za faktor zabraňující vzniku mutací (Minakata et al. 1983). Anemonin vykazuje možné protizánětlivé účinky (Lee et al. 2008). V této diplomové práci vykazovaly určitou cytotoxicitu druhy *R. nemorosus* ($IC_{50} = 83,34 \pm 4,62 \mu\text{g/ml}$; $67,39 \pm 1,81 \mu\text{g/ml}$) a *R. sardous* ($IC_{50} = 94,15 \pm 4,41 \mu\text{g/ml}$). V literatuře lépe popsáným zástupcem rodu *Ranunculus* je *R. ternatus*. Flavonoidy této rostliny vykazovaly mírné cytotoxické účinky vůči buněčným liniím karcinomu děložního čípku (HeLa), karcinomu prsu (MCF-7), pankreatu (PANC-1) a hepatocelulárního karcinomu (HepG-2). Konkrétně kayaflavon vykazoval silnou cytotoxickou aktivitu vůči HeLa a HepG-2 buněčným liniím, s hodnotou IC_{50} 3,26 a 8,67 $\mu\text{g/ml}$ (Shen et al. 2014). Polysacharidy nalezené v této rostlině vykazují protinádorovou aktivitu v případě buněčných linií nádoru prsu MCF-7. Mechanismem tohoto účinku je pravděpodobně schopnost indukovat apoptózu a zvýšit aktivitu NK buněk (Sun et al. 2013). Účinkem saponinů a polysacharidů z kořene *R. ternatus* na buněčnou linii nádoru žaludku (BGC823) se zabývali Niu et al. (2013). Ukázalo se, že jak saponiny, tak polysacharidy, vykazují inhibiční efekt na růst těchto nádorových buněk, vyšší účinek

vykazovaly saponiny než polysacharidy. Pozitivních výsledků bylo dosaženo také v případě potlačení formování kolonií nádorových buněk, kde v případě polysacharidů došlo v závislosti na koncentraci k inhibici tvorby kolonií o 32,62 %, 55,62 % a 100 %, u saponinů v koncentračním rozmezí nedošlo vůbec k tvorbě kolonií, tedy byl opět prokázán vyšší účinek. U myších modelů bylo také prokázáno zlepšení imunity a zvýšení počtu NK buněk.

Čeď *Ranunculaceae* má dlouhou historii využití v tradiční čínské medicíně, rostliny této čeďi jsou využívány pro celou řadu onemocnění a rozmanité chemické složení nabízí mnoho nadějných látek pro léčbu nádorových onemocnění (Hao et al. 2015). V rámci této čeďi je hojně využívanou a také poměrně dobře prozkoumanou rostlinou *Nigella Sativa*, mezi jejíž biologicky aktivní konstituenty patří thymochinon a α -hederin. Rooney & Ryan (2005) se zabývali vlivem těchto sloučenin na lidské nádorové buněčné linie. S využitím metody MTT došli k závěru, že obě tyto látky vykazují antiproliferační účinky na testované buněčné linie, včetně buněčné linie HT-29, která sice nebyla nejvíce citlivá z testovaných buněčných linií, ale došlo k významné inhibici: α -Hederin ($IC_{50} = 21,6 \pm 1,4 \mu M$ po 24 h, $16,7 \pm 2,2 \mu M$ po 48 h a $12,9 \pm 3,5 \mu M$ po 72 h), thymochinon ($IC_{50} = 51,6 \pm 3,0 \mu M$; $53,3 \pm 1,7 \mu M$; $51 \pm 0,7 \mu M$), v tomto případě IC_{50} značí množství látky nutné k inhibici buněčného růstu o 50 % v porovnání s kontrolními buňkami v rámci metody MTT. Obě tyto látky také vyvolávají apoptózu a nekrózu. To je v souladu s výsledky studie od El-Najjar et al. (2010), kteří také pozorovali antiproliferační aktivitu v případě několika lidských nádorových buněčných linií, včetně HT-29 a Caco-2. I v této studii došlo k inhibici růstu těchto linií v závislosti na dávce a času (Caco-2: $IC_{50} = 15 \mu M$ po 24 h, $IC_{50} = 12,5 \mu M$ po 48 h; HT-29: $IC_{50} = 110 \mu M$ po 48 h). Také se zde ukázalo, že buněčná linie Caco-2 byla nejvíce citlivá k působení thymochinonu, zatímco HT-29 byla nejméně citlivá. U zdravých buněčných linií FHS74Int nebyl pozorován ani růst, ani toxicita, což je pozitivní ukazatel selektivity působení. Indukce apoptózy byla v této studii prokázána u buněčné linie DLD-1 v případě užívání $40 \mu M$ thymochinonu, ovšem ne v případě relativně rezistentních buněčných linií HT-29, kde u $40 \mu M$ thymochinonu nedošlo ke změnám v žádném z ukazatelů o vyvolání apoptózy. Autoři studie si vysvětlují rezistenci buněčné linie HT-29 tím, že tyto buňky jsou známé vysokou expresí DT-diaforáz, což jsou enzymy, které katalyzují redukci dvouelektronových chinonů (oxidovaná forma) na hydrochinony (redukovaná forma). Po ošetření inhibitory DT-diaforáz došlo k redukci IC_{50} z $96 \mu M$ na $63 \mu M$, což ukazuje, že vysoké hladiny těchto enzymů jsou opravdu částečně odpovědné za tuto rezistenci. Navíc bylo zjištěno, že thymochinon má vliv na indukci buněčné smrti jeho prooxidační aktivitou. Pokud byly buněčné linie DLD-1 a Caco-2 před pokusem ošetřeny silným antioxidantem, došlo k přerušení inhibičního působení thymochinonu a životaschopnost buněk se vrátila na 100 %. K podobným výsledkům došli i Norsharina et al. (2011), kteří se zabývali působením thymochinonu na buněčné linie HT-29 a také buněčné linie leukémie CEMSS a HL-60. Thymochinon ukázal cytotoxicitu vůči HT-29 ($IC_{50} = 8 \mu g/ml$) i leukemickým buněčným liniím. I v této studii se ukázalo, že HT-29 vykazoval nižší citlivost vůči působení thymochinonu než ostatní buněčné linie. V případě ovlivnění buněčného cyklu došlo u leukemických linií k 98% snížení, v porovnání s HT-29, kde došlo pouze k mírnému zvýšení apoptických buněk na 12 %. Podle autorů potřebují buňky HT-29 delší dobu působení thymochinonu a zároveň je možné, že se zde uplatňuje pouze cytostatický, ne cytotoxický efekt. Burits & Bucar (2000) také u esenciálního oleje z *Nigella sativa*, respektive jeho hlavních komponentů, popsali schopnost vychytávat volné radikály, a tudíž antioxidantní schopnost.

Xu et al. (2017) testovali na buněčné linii HT-29 vliv *Pulsatilla chinensis*, konkrétně Pulsatilla saponin A (PsA) a jeho spolupůsobení s běžně používaným léčivem fluorouracil (5-FU). 5-FU má bohužel poměrně vysokou toxicitu, výrazné vedlejší účinky a dokonce se objevují rezistence na toto léčivo. Ukázalo se, že PsA dokázal inhibovat proliferaci nádorových buněk, v případě podání PsA spolu s 5-FU se projevilo synergické působení těchto dvou látek. Získané výsledky následně byly přeneseny do *in vivo* podmínek, kde bylo myším modelům s aplikovanými HT-29 buňkami podáváno samostatně PsA, 5-FU a společná směs. PsA i 5-FU úspěšně inhibovaly růst nádoru, což ukazoval jeho menší objem. Opět se zde ukázalo, že nejlepšími výsledky bylo dosaženo při společném podávání PsA a 5-FU. V nádorových buňkách došlo ke zvýšení apoptózy o 9,5 % u PsA, o 17 % u 5-FU a v jejich směsi dokonce o 49 %, v porovnání s kontrolní skupinou, kde došlo pouze k 2% změně. U buněk ošetřených PsA navíc došlo ke zvýšení exprese proteinu p53 a štěpení kaspázy-9, zatímco exprese proteinu Bcl-2 byla snížena. Rostlinami *Pulsatilla* se zabývali také Son et al. (2013a), konkrétně *Pulsatilla koreana* a působením pulsatilla saponinu D (PsD) na buňky lidského karcinomu střeva (HT-29 a LoVo). Ty byly ošetřené různými koncentracemi PsD po dobu 48 h, přičemž z výsledků vyplývá, že PsD inhiboval buněčný růst v závislosti na dávce. Získané výsledky ukazují, že PsD bylo v rámci této studie účinnější než 5-FU. Hodnoty IC_{50} u PsD byly 1,9 a 1,8 μ M u HT-29 a LoVo, zatímco u 5-FU byly hodnoty >20 μ M u obou buněčných linií. Testována byla také schopnost indukce apoptózy, přičemž se ukázalo, že u HT-29 ošetřené za pomoci 1 μ M PsD již došlo ke štěpení kaspáz a PARP, a také došlo k rapidní změně poměru Bcl/Bax, což je důkazem apoptózy v nádorových buňkách. Navíc se u PsD ukázal antiangiogenní efekt snížením exprese HIF-1 α a VEGF. V *in vivo* testech na myších s implantovanými lidskými nádorovými buňkami došlo k významnému potlačení objemu a hmotnosti nádoru při dávkách 10 mg/kg PsD nebo stejné dávky 5-FU, ovšem inhibice růstu byla významnější opět v případě saponinu. V těchto koncentracích však došlo také k malé změně hmotnosti myší, což by mohlo naznačovat toxicitu látky v testovaných koncentracích.

7 Závěr

Čeleď *Ranunculaceae* je známa pro své rozmanité složení, z kterého vyplývají také široké biologické účinky. Mezi ty patří i aktivita antiproliferační, která byla prokázána u některých rostlin této čeledi. V této diplomové práci byl pozorován vliv extraktů vybraných pryskyřníkovitých rostlin na buněčné linie kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT-29) a na normální střevní buňky (FHS 74Int). U těchto extraktů byla sledována *in vitro* antiproliferační aktivita. Bylo využito metody MTT, u níž se užívá tetrazoliové soli, jež vytváří fialové krystaly v mitochondriích živých buněk.

Podle našich výsledků byl u některých vzorků pozorován selektivní účinek vůči nádorovým buněčným liniím kolorektálního karcinomu. Z testovaných druhů byla nejvyšší cytotoxicita pozorována u *Hepatica transilvanica* a *Hepatica nobilis*, u kterých bylo dosaženo nejlepších výsledků spolu s pozitivním selektivním účinkem. Tyto extrakty by bylo vhodné podstoupit dalším testům, například v podmínkách *in vivo*. Dále by také mohla být přínosná identifikace jejich účinných biologicky aktivních složek.

Přestože se výzkum protinádorových léčiv neustále vyvíjí a nabízí nové možnosti léčby, nádorové onemocnění zůstává častým a velmi obávaným onemocněním. Ačkoliv je příčina často geneticky podmíněná nebo neovlivnitelná, až třetině případů by bylo možné při dodržování zásad „zdravého“ životního stylu zabránit. Proto by každý člověk měl převzít zodpovědnost nad svým jednáním a snažit se vzniku (nejen) nádorových onemocnění předejít.

8 Literatura

- Abbas T, Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer* **9**:400–414. Nature Publishing Group.
- Adams JM, Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*.
- Akkol EK, Süntar I, Erdoğan TF, Keleş H, Gonenc TM, Kıvçak B. 2012. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: A comparative study. *Journal of ethnopharmacology* **139**:478–484. Elsevier.
- Alissa EM, Ferns GA. 2017. Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:1950–1962. Taylor & Francis.
- Allen NE, Beral V, Casabonne D, Kan SW, Reeves GK, Brown A, Green J. 2009. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *Journal of the National Cancer Institute*.
- Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R. 2009. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International journal of biomedical science: IJBS* **5**:1. Master Publishing Group.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research* **25**:2097–2116. Springer US.
- Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB. 2002. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor- κ B through phosphorylation and degradation of I κ B α : correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* **23**:1511–1518. Oxford University Press.
- Arafa E-SA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, El-Mahdy MA, Wani AA. 2011. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **706**:28–35. Elsevier.
- Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, Scotti L, Jenab M, Turati F, Pasquali E. 2013. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Annals of oncology* **24**:301–308. Oxford University Press.
- Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. 2005. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development* **15**:102–111. Elsevier.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research* **48**:3282–3287. AACR.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **68**:394–424. Wiley Online Library.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U. 2000. Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. *International journal of cancer* **86**:289–294. Wiley Online Library.
- Brose MS, Smyrk TC, Weber B, Lynch HT. 2003. Genetic basis of cancer syndromes. *Holland-Frei cancer medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker.
- Burits M, Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research* **14**:323–328. Wiley Online Library.
- Campisi J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology* **75**:685–705. Annual Reviews.
- Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. 2006. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer

- risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **23**:1097–1104. Wiley Online Library.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* **6**:389–395. Nature Publishing Group.
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature* **407**:249–257. Nature Publishing Group.
- Catrina S-B, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L. 2004. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 α protein stability and function. *Diabetes* **53**:3226–3232. Am Diabetes Assoc.
- Cayuela A, Vioque J, Bolumar F. 1991. Oesophageal cancer mortality: relationship with alcohol intake and cigarette smoking in Spain. *Journal of Epidemiology & Community Health* **45**:273–276. BMJ Publishing Group Ltd.
- Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA. 2009. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB* **11**:373–381. Elsevier.
- Chen G-C, Tong X, Xu J-Y, Han S-F, Wan Z-X, Qin J-B, Qin L-Q. 2016. Whole-grain intake and total, cardiovascular, and cancer mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *The American journal of clinical nutrition* **104**:164–172. Oxford University Press.
- Chen J. 2011. Multiple signal pathways in obesity-associated cancer. *Obesity reviews*. **12**:1063-1070
- Chen Q-B, Xin X-L, Yang Y, Lee S-S, Aisa HA. 2014. Highly conjugated norditerpenoid and pyrroloquinoline alkaloids with potent PTP1B inhibitory activity from *Nigella glandulifera*. *Journal of natural products* **77**:807–812. ACS Publications.
- Cheng L, Xia T-S, Wang Y-F, Zhou W, Liang X-Q, Xue J-Q, Shi L, Wang Y, Ding Q, Wang M. 2014. The anticancer effect and mechanism of α -hederin on breast cancer cells. *International journal of oncology* **45**:757–763. Spandidos Publications.
- Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. 2008. Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*.
- Chiang VS-C, Quek S-Y. 2017. The relationship of red meat with cancer: Effects of thermal processing and related physiological mechanisms. *Critical reviews in food science and nutrition* **57**:1153–1173. Taylor & Francis.
- Chmielowski B, Territo M. 2017. *Manual of Clinical Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Chodoeva A, Bosc J-J, Guillon J, Decendit A, Petraud M, Absalon C, Vitry C, Jarry C, Robert J. 2005. 8-O-Azeloyle-14-benzoylaconine: A new alkaloid from the roots of *Aconitum karacolicum* Rapcs and its antiproliferative activities. *Bioorganic & medicinal chemistry* **13**:6493–6501. Elsevier.
- Chodoeva A, Bosc J-J, Lartigue L, Guillon J, Auzanneau C, Costet P, Zurdinov A, Jarry C, Robert J. 2014. Antitumor activity of semisynthetic derivatives of *Aconitum* alkaloids. *Investigational new drugs* **32**:60–67. Springer.
- Choi MS, Yuk DY, Oh JH, Jung HY, Han SB, Moon DC, Hong JT. 2008. Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis. *Anticancer research* **28**:3777–3784. International Institute of Anticancer Research.
- Chu S-C, Hsieh Y-S, Yu C-C, Lai Y-Y, Chen P-N. 2014. Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation-dependent apoptosis and LC3-II activation-dependent autophagy. *PloS one* **9**:e101579. Public Library of Science.
- Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. 2013. Precancerous colorectal lesions (Review). *International Journal of Oncology* **43**:973–984.

- Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Sinha R. 2010. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer research* **70**:2406–2414. AACR.
- Cross AJ, Sinha R. 2004. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and molecular mutagenesis* **44**:44–55. Wiley Online Library.
- Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. 2012. The role of adiponectin in cancer: A review of current evidence. *Endocrine Reviews*.
- Davenport ER, Mizrahi-Man O, Michelini K, Barreiro LB, Ober C, Gilad Y. 2014. Seasonal variation in human gut microbiome composition. *PLoS one* **9**:e90731. Public Library of Science.
- Davies MA, Samuels Y. 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism* **7**:11–20. Elsevier.
- Deng L-J, Hu L-P, Peng Q-L, Yang X-L, Bai L-L, Yiu A, Li Y, Tian H-Y, Ye W-C, Zhang D-M. 2014. Hellebrigenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through inhibition of Akt. *Chemico-biological interactions* **219**:184–194. Elsevier.
- Dick FA, Rubin SM. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function.
- Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelek R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková L. 2015. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* **13**:394–398. Elsevier.
- Dowling R, Niraula S, Stambolic V, Goodwin P. 2012. Metformin in cancer: Translational challenges. *Journal of molecular endocrinology* **48**:R31-43.
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **48**:526–535. BMJ Publishing Group.
- El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H. 2010. Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis* **15**:183–195. Springer.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang Q, Wani G, Wani AA. 2005. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International journal of cancer* **117**:409–417. Wiley Online Library.
- Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. 2015. The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol research: current reviews* **37**:223. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.
- Falk RT, Pickle LW, Brown LM, Mason TJ, Buffler PA, Fraumeni JF. 1989. Effect of Smoking and Alcohol Consumption on Laryngeal Cancer Risk in Coastal Texas. *Cancer Research*.
- Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell* **61**:759–767. Cell Press.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* **136**:E359–E386. Wiley Online Library.
- Ferrari P et al. 2007. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*.
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine* **15**:930. Nature Publishing

- Group.
- Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews cancer* **3**:453–458. Nature Publishing Group.
- Fierz Y, Novosyadlyy R, Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. 2010. Mammalian target of rapamycin inhibition abrogates insulin-mediated mammary tumor progression in type 2 diabetes. *Endocrine-related cancer* **17**:941–951.
- Font-Burgada J, Sun B, Karin M. 2016. Obesity and cancer: the oil that feeds the flame. *Cell metabolism* **23**:48–62. Elsevier.
- Fostok SF, Ezzeddine RA, Homaidan FR, Al-Saghir JA, Salloum RG, Saliba NA, Talhouk RS. 2009. Interleukin-6 and Cyclooxygenase-2 downregulation by fatty-acid fractions of *Ranunculus constantinopolitanus*. *BMC complementary and alternative medicine* **9**:44. BioMed Central.
- Fouad YA, Aanei C. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research* **7**:1016. e-Century Publishing Corporation.
- Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. 2007. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *American Journal of Epidemiology*.
- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. 2004a. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology* **25**:857–866. Spandidos Publications.
- Gali-Muhtasib HU, Kheir WGA, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. 2004b. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs* **15**:389–399. LWW.
- Gallagher EJ, LeRoith D. 2011. Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology* **152**:2546–2551..
- Gao F, Li Y-Y, Wang D, Huang X, Liu Q. 2012. Diterpenoid alkaloids from the Chinese traditional herbal "Fuzi" and their cytotoxic activity. *Molecules* **17**:5187–5194. Molecular Diversity Preservation International.
- Gao J, Tian J, Lv Y, Shi F, Kong F, Shi H, Zhao L. 2009. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/ STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. *Cancer Science*.
- Gao T, Bi H, Ma S, Lu J. 2010. The antitumor and immunostimulating activities of water soluble polysaccharides from *Radix Aconiti*, *Radix Aconiti Lateralis* and *Radix Aconiti Kusnezoffii*. *Natural product communications* **5**:1934578X1000500322. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA.
- Gao T, Ma S, Song J, Bi H, Tao Y. 2011. Antioxidant and immunological activities of water-soluble polysaccharides from *Aconitum kusnezoffii* Reichb. *International journal of biological macromolecules* **49**:580–586. Elsevier.
- Gong Y, Hua H, Xu Y, Liu J, Yu Z, Ma J, Zhang H, Jing Y. 2013. Triterpene saponins from *Clematis mandshurica* and their antiproliferative activity. *Planta medica* **79**:987–994. Georg Thieme Verlag KG.
- Green DR, Kroemer G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**:1127. Nature Publishing Group.
- Greenwell M, Rahman P. 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research* **6**:4103. Europe PMC Funders.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li Z-W, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. 2004. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**:285–296. Elsevier.

- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**:883–899. Elsevier.
- Guan Y-Y, Liu H-J, Luan X, Xu J-R, Lu Q, Liu Y-R, Gao Y-G, Zhao M, Chen H-Z, Fang C. 2015. Raddeanin A, a triterpenoid saponin isolated from *Anemone raddeana*, suppresses the angiogenesis and growth of human colorectal tumor by inhibiting VEGFR2 signaling. *Phytomedicine* **22**:103–110. Elsevier.
- Gurung RL, Lim SN, Khaw AK, Soon JFF, Shenoy K, Ali SM, Jayapal M, Sethu S, Baskar R, Hande MP. 2010. Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *PloS one* **5**. Public Library of Science.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation.
- Hao D-C, He C-N, Shen J, Xiao P-G. 2017. Anticancer chemodiversity of Ranunculaceae medicinal plants: molecular mechanisms and functions. *Current genomics* **18**:39–59. Bentham Science Publishers.
- Hao D-C, Xiao P-G, Ma H-Y, Peng Y, He C-N. 2015. Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chinese journal of natural medicines* **13**:507–520. Elsevier.
- Hao D, Gu X, Xiao P, Peng Y. 2013a. Chemical and biological research of *Clematis* medicinal resources. *Chinese Science Bulletin* **58**:1120–1129. Springer.
- Hao DC, Gu XJ, Xiao PG, Xu L, Peng Y. 2013b. Recent advances in the chemical and biological studies of *Aconitum* pharmaceutical resources. *J. Chin. Pharm. Sci* **22**:209–221.
- Hao DC, Xiao PG, Liu M, Peng Y, He CN. 2014. Pharmaphylogeny vs. pharmacophylogenomics: molecular phylogeny, evolution and drug discovery. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica* **49**:1387–1394.
- Hashibe M et al. 2009. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer Epidemiology consortium. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.
- Hashimoto T, Shibasaki F. 2015. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Frontiers in pediatrics* **3**:33. Frontiers.
- Hatakeyama M. 2017. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **93**:196–219. The Japan Academy.
- He K, Hu FB, Colditz GA, Manson JE, Willett WC, Liu S. 2004. Changes in intake of fruits and vegetables in relation to risk of obesity and weight gain among middle-aged women. *International journal of obesity* **28**:1569–1574. Nature Publishing Group.
- He Y-X, Li L, Zhang K, Liu Z-R. 2011. Cytotoxic triterpene saponins from *Clematis mandshurica*. *Journal of Asian natural products research* **13**:1104–1109. Taylor & Francis.
- Hecht SS. 2003. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer* **3**:733–744. Nature Publishing Group.
- Himes RH. 1991. Interactions of the catharanthus (*Vinca*) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacology & therapeutics* **51**:257–267. Elsevier.
- Ho Y-T, Lu C-C, Yang J-S, Chiang J-H, Li T-C, Ip S-W, Hsia T-C, Liao C-L, Lin J-G, Wood WG. 2009. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8,-9 and-3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer research* **29**:4063–4070. International Institute of Anticancer Research.
- Hong S, Jung KH, Lee H, Choi M, Son MK, Zheng H, Hong S. 2012. SB 365 inhibits angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI 3 K/A kt/mTOR signaling pathway. *Cancer science* **103**:1929–1937. Wiley Online Library.
- Hosseinzadeh S, Jafarikukhdan A, Hosseini A, Armand R. 2015. The application of medicinal

- plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine* **6**:635. Scientific Research Publishing.
- Hsing AW, McLaughlin JK, Hrubec Z, Blot WJ, Fraumeni JF. 1990. Cigarette smoking and liver cancer among US veterans. *Cancer Causes & Control* **1**:217–221. Springer.
- Hsu PP, Sabatini DM. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**:703–707. Elsevier.
- Hsu W-H, Hsieh Y-S, Kuo H-C, Teng C-Y, Huang H-I, Wang C-J, Yang S-F, Liou Y-S, Kuo W-H. 2007. Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL. *Archives of toxicology* **81**:719–728. Springer.
- Hursting SD, Smith SM, Lashinger LM, Harvey AE, Perkins SN. 2009. Calories and carcinogenesis: Lessons learned from 30 years of calorie restriction research.
- IARC. 2020. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–125. Available from <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> (accessed February 2020).
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and World Health Organization and International Agency for Research on Cancer. 2004. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC.
- Iqbal J, Abbasi BA, Mahmood T, Kanwal S, Ali B, Shah SA, Khalil AT. 2017. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **7**:1129–1150. Elsevier B.V.
- Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW. 2010. *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radical Biology and Medicine* **48**:664–672. Elsevier.
- Jaffe T, Schwartz B. 2008. Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *International Journal of Cancer*.
- Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H. 2010. Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **29**:87. Springer.
- James MA, Fu H, Liu Y, Chen D, You M. 2011. Dietary administration of berberine or *Phellodendron amurense* extract inhibits cell cycle progression and lung tumorigenesis. *Molecular carcinogenesis* **50**:1–7. Wiley Online Library.
- Jiang H, Huang S, Gao F, Zhen Y, Li C, Zhou X. 2019. Diterpenoid alkaloids from *Aconitum brevicaratum* as autophagy inducers. *Natural product research* **33**:1741–1746. Taylor & Francis.
- Jiang W, Zhu Z, Thompson HJ. 2008. Dietary energy restriction modulates the activity of AMP-activated protein kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin in mammary carcinomas, mammary gland, and liver. *Cancer Research*.
- Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. 2013. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control* **24**:1207–1222. Springer.
- Jones RG, Thompson CB. 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development* **23**:537–548. Cold Spring Harbor Lab.
- Kalaany NY, Sabatini DM. 2009. Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. *Nature*.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition.
- Karimi E, Ghorbani Nohooji M, Habibi M, Ebrahimi M, Mehrafarin A, Khalighi-Sigaroodi F. 2018. Antioxidant potential assessment of phenolic and flavonoid rich fractions of *Clematis orientalis* and *Clematis ispanhanica* (Ranunculaceae). *Natural product research* **32**:1991–1995. Taylor & Francis.
- Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy

- GP-V. 2007. Androgen receptor–and E2F-1–targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research* **67**:7782–7788. AACR.
- Katiyar SK, Meeran SM, Katiyar N, Akhtar S. 2009. P53 cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo. *Molecular Carcinogenesis*.
- Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *Page Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
- Kim S, Takahashi H, Lin W-W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo J-L, Karin M. 2009. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *nature* **457**:102. Nature Publishing Group.
- Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. 2015. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences* **16**:2942–2955. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Koleva V, Dragoeva A, Stoyanova Z, Yordanova Z, Ali S, Uzunov NM, Melendez-Alafort L, Rosato A, Enchev DD. 2018. In vitro cytotoxicity of allelopathic plants *Adonis vernalis* L. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *Nepeta nuda* subsp. *nuda*. *Acta Scientifica Naturalis* **5**:64–69. De Gruyter Open.
- Kundu J, Choi BY, Jeong C-H, Kundu JK, Chun K-S. 2014. Thymoquinone induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through inactivation of STAT3 by blocking JAK2- and Src-mediated phosphorylation of EGF receptor tyrosine kinase. *Oncology reports* **32**:821–828. Spandidos Publications.
- Lacaille-Dubois M-A. 2005. Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. Pages 209–246 *Studies in natural products chemistry*. Elsevier.
- Lara-Tejero M, Galán JE. 2000. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* **290**:354–357. American Association for the Advancement of Science.
- Lee TH, Huang NK, Lai TC, Yang ATY, Wang GJ. 2008. Anemonin, from *Clematis crassifolia*, potent and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor. *Journal of ethnopharmacology* **116**:518–527. Elsevier.
- Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR. 2008. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA: a cancer journal for clinicians* **58**:130–160. Wiley Online Library.
- Li H, Sun M, Xu J, Li H, Zang M, Cui Y. 2013. Immunological response in H22 transplanted mice undergoing *Aconitum coreanum* polysaccharide treatment. *International journal of biological macromolecules* **55**:295–300. Elsevier.
- Liang Y, Wu J-L, Li X, Guo M-Q, Leung EL-H, Zhou H, Liu L, Li N. 2016. Anti-cancer and anti-inflammatory new vakognavine-type alkaloid from the roots of *Aconitum carmichaelii*. *Tetrahedron Letters* **57**:5881–5884. Elsevier.
- Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. 2015a. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer letters* **356**:197–203. Elsevier.
- Liu M, Zhao X, Xiao L, Liu G, Liu H, Wang X, Feng X, Lin X. 2015b. Cytotoxicity of the compounds isolated from *Pulsatilla chinensis* saponins and apoptosis induced by 23-hydroxybetulinic acid. *Pharmaceutical biology* **53**:1–9. Taylor & Francis.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer.
- Liu S, Willett WC, Manson JE, Hu FB, Rosner B, Colditz G. 2003. Relation between changes

- in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *The American journal of clinical nutrition* **78**:920–927. Oxford University Press.
- Liu Y, Li Y, Yang W, Zhang L, Cao G. 2012. Anti-hepatoma activity in mice of a polysaccharide from the rhizome of *Anemone raddeana*. *International journal of biological macromolecules* **50**:632–636. Elsevier.
- Louis P, Hold GL, Flint HJ. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews microbiology* **12**:661–672. Nature Publishing Group.
- Lushniak BD, Samet JM, Pechacek TF, Norman LA, Taylor PA. 2014. The Health consequences of smoking—50 years of progress: A report of the Surgeon General.
- Lutsey PL, Jacobs DR, Kori S, Mayer-Davis E, Shea S, Steffen LM, Szklo M, Tracy R. 2007. Whole grain intake and its cross-sectional association with obesity, insulin resistance, inflammation, diabetes and subclinical CVD: The MESA Study. *British Journal of Nutrition* **98**:397–405. Cambridge University Press.
- Lynch HT, De la Chapelle A. 2003. Hereditary colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* **348**:919–932. Mass Medical Soc.
- Mack TM, Yu MC, Hanisch R, Henderson BE. 1986. Pancreas cancer and smoking, beverage consumption, and past medical history. *Journal of the National Cancer Institute* **76**:49–60. Oxford University Press.
- Mahmoudvand H, Tavakoli R, Sharififar F, Minaie K, Ezatpour B, Jahanbakhsh S, Sharifi I. 2015. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical biology* **53**:1052–1057. Taylor & Francis.
- Malik J, Tauchen J, Landa P, Kutil Z, Marsik P, Kloucek P, Havlik J, Kokoska L. 2017. In vitro antiinflammatory and antioxidant potential of root extracts from Ranunculaceae species. *South African Journal of Botany* **109**:128–137. Elsevier.
- Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM. 2002. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell biochemistry and function* **20**:143–151. Wiley Online Library.
- Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. 2017. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences* **18**:197. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- 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. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research.
- Martínez P, Blasco MA. 2011. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews Cancer* **11**:161–176. Nature Publishing Group.
- Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere M-F. 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in microbiology* **21**:167–173. Elsevier.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. 2007. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer* **7**:961–967. Nature Publishing Group.
- McNelis JC, Olefsky JM. 2014. Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* **41**:36–48. Elsevier.
- McTiernan A, Tworoger SS, Ulrich CM, Yasui Y, Irwin ML, Rajan KB, Sorensen B, Rudolph RE, Bowen D, Stanczyk FZ. 2004. Effect of exercise on serum estrogens in postmenopausal women: a 12-month randomized clinical trial. *Cancer research* **64**:2923–2928. AACR.

- Meeran SM, Katiyar S, Katiyar SK. 2008. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicology and applied pharmacology* **229**:33–43. Elsevier.
- Minakata H, Komura H, Nakanishi K, Kada T. 1983. Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants. *Mutation Research/Genetic Toxicology*.
- Mirjalili MH, Farzaneh M, Bonfill M, Rezadoost H, Ghassempour A. 2012. Isolation and characterization of *Stemphylium sedicola* SBU-16 as a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus baccata* grown in Iran. *FEMS microbiology letters* **328**:122–129. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK.
- Mizushima N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes & development* **21**:2861–2873. Cold Spring Harbor Lab.
- Moore T, Beltran L, Carbajal S, Strom S, Traag J, Hursting SD, DiGiovanni J. 2008a. Dietary energy balance modulates signaling through the Akt/mammalian target of rapamycin pathways in multiple epithelial tissues. *Cancer Prevention Research* **1**:65–76.
- Moore T, Carbajal S, Beltran L, Perkins SN, Yakar S, LeRoith D, Hursting SD, Digiovanni J. 2008b. Reduced susceptibility to two-stage skin carcinogenesis in mice with low circulating insulin-like growth factor I levels. *Cancer Research* **68**:3680–3688.
- Mørch LS, Johansen D, Thygesen LC, Tjønneland A, Løkkegaard E, Stahlberg C, Grønbæk M. 2007. Alcohol drinking, consumption patterns and breast cancer among Danish nurses: A cohort study. *European Journal of Public Health*.
- Morris Brown L, Gibson R, Blair A, Burmeister LF, Schuman LM, Cantor KP, Fraumeni Jr JF. 1992. Smoking and risk of leukemia. *American journal of epidemiology* **135**:763–768. Oxford University Press.
- Morse DE, Psoter WJ, Cleveland D, Cohen D, Mohit-Tabatabai M, Kosis DL, Eisenberg E. 2007. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer Causes & Control* **18**:919–929. Springer.
- Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. 2013. Vinca alkaloids. *International journal of preventive medicine* **4**:1231. Wolters Kluwer--Medknow Publications.
- Mubashir S, Dar MY, Lone BA, Zargar MI, Shah WA. 2014. Anthelmintic, antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of *Caltha palustris* var. *alba* Kashmir, India. *Chinese journal of natural medicines* **12**:567–572. Elsevier.
- Muller PAJ, Vousden KH. 2013. p53 mutations in cancer. *Nature cell biology* **15**:2. Nature Publishing Group.
- Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM, Azuma T. 2007. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **26**:4617–4626. Nature Publishing Group.
- Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. 2016. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intestinal research* **14**:127. Korean Association for the Study of Intestinal Diseases.
- Negi AS, Gautam Y, Alam S, Chanda D, Luqman S, Sarkar J, Khan F, Konwar R. 2015. Natural antitubulin agents: Importance of 3, 4, 5-trimethoxyphenyl fragment. *Bioorganic & medicinal chemistry* **23**:373–389. Elsevier.
- Nesterova Y V, Povetieva TN, Nagornyak YG, Suslov NI, Vetoshkina T V, Andreeva TI. 2009. Correction of adjuvant arthritis with delphinium extracts and alkaloids. *Bulletin of experimental biology and medicine* **147**:711. Springer Science & Business Media.
- Nestler G. 2002. Traditional chinese medicine. *Medical Clinics* **86**:63–73. Elsevier.
- NIH. 2007. NIH curriculum supplement series. The Institutes.
- Nikolova M, Evstatieva L, Nguyen TD. 2011. Screening of plant extracts for antioxidant properties. *Botanica Serbica* **35**:43–48.

- Niu L, Zhou Y, Sun B, Hu J, Kong L, Duan S. 2013. Inhibitory effect of saponins and polysaccharides from *Radix ranunculi ternati* on human gastric cancer BGC823 cells. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*.
- Noble RL. 1990. The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and cell biology* **68**:1344–1351. NRC Research Press.
- Noble RL, Beer CT, Cutts JH. 1958. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **76**:882–894. Wiley Online Library.
- Norsharina I, Maznah I, Aied A, Ghanya A-N. 2011. Thymoquinone rich fraction from *Nigella sativa* and thymoquinone are cytotoxic towards colon and leukemic carcinoma cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**:3359–3366.
- Ohishi W, Fujiwara S, Cologne JB, Suzuki G, Akahoshi M, Nishi N, Takahashi I, Chayama K. 2008. Risk factors for hepatocellular carcinoma in a Japanese population: A nested case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.
- Ojima I, Duclos O, Zucco M, Bissery M-C, Combeau C, Vrignaud P, Riou JF, Lavelle F. 1994. Synthesis and structure-activity relationships of new antitumor taxoids. Effects of cyclohexyl substitution at the C-3' and/or C-2 of taxotere (docetaxel). *Journal of medicinal chemistry* **37**:2602–2608. ACS Publications.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D. 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**:1457–1461. American Association for the Advancement of Science.
- Olivo-Marston SE, Hursting SD, Lavigne J, Perkins SN, Maarouf RS, Yakar S, Harris CC. 2009. Genetic reduction of circulating insulin-like growth factor-1 inhibits azoxymethane-induced colon tumorigenesis in mice. *Molecular carcinogenesis* **48**:1071–1076.
- Ottaggio L, Bestoso F, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Mazzei M, Sancandi M, Miele M. 2008. Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*. *Journal of natural products* **71**:58–60. ACS Publications.
- Ozasa K. 2007. Alcohol use and mortality in the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer (JACC). *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*.
- Park BH, Jung KH, Son MK, Seo JH, Lee H-S, Lee J-H, Hong S-S. 2013. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* extract in anaplastic thyroid cancer via apoptosis and anti-angiogenesis. *Molecular medicine reports* **7**:26–30. Spandidos Publications.
- Patel A V, Calle EE, Bernstein L, Wu AH, Thun MJ. 2003. Recreational physical activity and risk of postmenopausal breast cancer in a large cohort of US women. *Cancer Causes & Control* **14**:519–529. Springer.
- Patel A V, Rodriguez C, Bernstein L, Chao A, Thun MJ, Calle EE. 2005. Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large US Cohort. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **14**:459–466. AACR.
- Patil JB, Kim J, Jayaprakasha GK. 2010. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. *European Journal of Pharmacology*.
- Peng P ling, Kuo WH, Tseng HC, Chou FP. 2008. Synergistic Tumor-Killing Effect of Radiation and Berberine Combined Treatment in Lung Cancer: The Contribution of Autophagic Cell Death. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*.
- Peng Y, Chen SB, Chen SL, Xiao PG. 2006. Preliminary pharmaphylogenetic study on *Ranunculaceae*. *China journal of Chinese materia medica* **31**:1124–1128.
- Pereira C V, Machado NG, Oliveira PJ. 2008. Mechanisms of Berberine (Natural Yellow 18)–Induced Mitochondrial Dysfunction: Interaction with the Adenine Nucleotide Translocator. *Toxicological Sciences* **105**:408–417.
- Perry RJ, Shulman GI. 2020. Mechanistic Links between Obesity, Insulin, and Cancer. *Trends in cancer* **6**:75–78. Elsevier.

- Phillips DH, Venitt S. 2012. DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. *International journal of cancer* **131**:2733–2753. Wiley Online Library.
- Pöschl G, Seitz HK. 2004. Alcohol and cancer. *Alcohol and alcoholism* **39**:155–165. Oxford University Press.
- Qu D, Zhang X, Sang C, Zhou Y, Ma J, Hui L. 2019. Lappaconitine sulfate induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells and down-regulates PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Medicinal Chemistry Research* **28**:907–916. Springer.
- Quaranta M, Daniele A, Coviello M, Venneri MT, Abbate I, Caringella ME, Di Tardo S, Divella R, Trerotoli P, Di Gennaro M. 2007. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. *Anticancer research* **27**:3593–3600. International Institute of Anticancer Research.
- Rahier NJ, Thomas CJ, Hecht SM. 2005. Camptothecin and its analogs. Pages 15–31 *Anticancer agents from natural products*. CRC Press.
- Rana S, Rawat K, Mahendru M, Padwad Y, Pakade YB, Lal B, Bhushan S. 2015. Screening of bioconstituents and in vitro cytotoxicity of *Clematis gouriana* leaves. *Natural product research* **29**:2242–2246. Taylor & Francis.
- Rayan A, Raiyn J, Falah M. 2017. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PloS one* **12**. Public Library of Science.
- Reina M, Mancha R, Gonzalez-Coloma A, Bailén M, Rodriguez ML, Martinez-Diaz RA. 2007. Diterpenoid alkaloids from *Delphinium gracile*. *Natural product research* **21**:1048–1055. Taylor & Francis.
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E. 2015. The development of the vascular system: a historical overview. Pages 1–14 *Vascular Morphogenesis*. Springer.
- Rodriguez C, McCullough ML, Mondul AM, Jacobs EJ, Chao A, Patel A V, Thun MJ, Calle EE. 2006. Meat consumption among Black and White men and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **15**:211–216. AACR.
- Rooney S, Ryan MF. 2005. Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer research* **25**:2199–2204. International Institute of Anticancer Research.
- Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. 2013. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe* **14**:195–206. Elsevier.
- Sankar SA, Lagier J-C, Pontarotti P, Raoult D, Fournier P-E. 2015. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Systematic and applied microbiology* **38**:276–286. Elsevier.
- Scarpellini E, Ianiro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A. 2015. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease* **47**:1007–1012. Elsevier.
- Schippa S, Conte MP. 2014. Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *Nutrients* **6**:5786–5805. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Seelinger M, Popescu R, Giessrigl B, Jarukamjorn K, Unger C, Wallnöfer B, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T, Diaz R, Jäger W. 2012. Methanol extract of the ethnopharmaceutical remedy *Smilax spinosa* exhibits anti-neoplastic activity. *International journal of oncology* **41**:1164–1172. Spandidos Publications.
- Serafim TL, Oliveira PJ, Sardao VA, Perkins E, Parke D, Holy J. 2008. Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **61**:1007–1018. Springer.
- Shay JW. 2016. Role of telomeres and telomerase in aging and cancer.
- Sheflin AM, Whitney AK, Weir TL. 2014. Cancer-promoting effects of microbial dysbiosis. *Current oncology reports* **16**:406. Springer.
- Shen H, Sun J, Zhao P, Tang M, Liu Y, Xia P. 2014. Cytotoxic Metabolites from the Roots of

- Ranunculus ternatus. *Chemistry of natural compounds* **50**:621–623. Springer.
- Shieh S-Y, Ikeda M, Taya Y, Prives C. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**:325–334. Elsevier.
- Singh S, Jarial R, Kanwar SS. 2013. Therapeutic effect of herbal medicines on obesity: herbal pancreatic lipase inhibitors. *Wudpecker J Med Plants* **2**:53–65.
- Singh S, Sharma B, Kanwar SS, Kumar A. 2016. Lead phytochemicals for anticancer drug development. *Frontiers in plant science* **7**:1667. Frontiers.
- Son MK, Jung KH, Hong S-W, Lee H-S, Zheng H-M, Choi M-J, Seo JH, Suh J-K, Hong S-S. 2013a. SB365, Pulsatilla saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signalling pathway. *Food chemistry* **136**:26–33. Elsevier.
- Son MK, Jung KH, Lee H-S, Lee H, Kim SJ, Yan HH, Ryu Y-L, Hong S-S. 2013b. SB365, Pulsatilla saponin D suppresses proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *Oncology reports* **30**:801–808. Spandidos Publications.
- Stack J, Ryan J, McCarthy G. 2015. Colchicine: new insights to an old drug. *American journal of therapeutics* **22**:e151–e157. LWW.
- Stanhope B-J, Burdette WJ, Cochran WG, Farber E, Fieser LF, Furth J, Hickam JB, LeMaistre C, Schuman LM, Seevers MH. 1964. Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service. Education and Welfare, Public Health Service
- Stearns JC, Lynch MDJ, Senadheera DB, Tenenbaum HC, Goldberg MB, Cvitkovitch DG, Croitoru K, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD. 2011. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Scientific reports* **1**:170. Nature Publishing Group.
- Steeg PS. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine* **12**:895–904. Nature Publishing Group.
- Stoffel EM, Kastrinos F. 2014. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **12**:1059–1068. Elsevier.
- Strong LC. 2003. General keynote: hereditary cancer: lessons from Li–Fraumeni syndrome. *Gynecologic oncology* **88**:S4–S7. Elsevier.
- Sun D, Xie H, Xia Y. 2013. A study on the inhibitory effect of polysaccharides from Radix ranunculus ternate on human breast cancer MCF-7 cell lines. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* **10**:439–443. African Ethnomedicines Network (Nigeria).
- Tang F et al. 2009. Berberine inhibits metastasis of nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells by targeting rho kinase-mediated ezrin phosphorylation at threonine 567. *Journal of Biological Chemistry*.
- Taniguchi K, Karin M. 2014. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. Pages 54–74 *Seminars in immunology*. Elsevier.
- Taylor B, Rehm J. 2006. When risk factors combine: the interaction between alcohol and smoking for aerodigestive cancer, coronary heart disease, and traffic and fire injury. *Addictive behaviors* **31**:1522–1535. Elsevier.
- Testino G. 2011. The burden of cancer attributable to alcohol consumption. *Maedica* **6**:313. Amaltea Medical, Editura Magister.
- Tian X, Feng J, Tang H, Zhao M, Li Y, Hai W, Zhang X. 2013. New cytotoxic triterpenoid saponins from the whole plant of Clematis lasiantha Maxim. *Fitoterapia* **90**:233–239. Elsevier.
- Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, Batra SK. 2010. Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. *Molecular cancer therapeutics* **9**:1419–1431. AACR.
- Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, Corrao G, Bravi F, Boffetta

- P, La Vecchia C. 2010. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of the dose-risk relation. *International Journal of Cancer*.
- Trédaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. 1997. Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *International journal of cancer* **72**:565–573. Wiley Online Library.
- Tsugane S, Sasazuki S, Kobayashi M, Sasaki S. 2004. Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *British Journal of Cancer* **90**:128–134. Nature Publishing Group.
- Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. 2015. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *British journal of nutrition* **113**:S102–S110. Cambridge University Press.
- Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe* **3**:213–223. Elsevier.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chappelle A de la, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R. 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute* **96**:261–268. Oxford University Press.
- Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition reviews* **70**:S38–S44. Oxford University Press Oxford, UK.
- ÚZIS. 2016. Cancer Incidence in the Czech Republic. Available from <https://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2016>.
- Vainio H, Bianchini F. 2002. Weight control and physical activity. *Iarc*.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science* **324**:1029–1033. American Association for the Advancement of Science.
- Wang N, Feng Y, Zhu M, Tsang CM, Man K, Tong Y, Tsao SW. 2010. Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: The cellular mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, Jia W, Cai S, Zhao L. 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME journal* **6**:320. Nature Publishing Group.
- Warburg OH. 1930. *The metabolism of tumours: investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem*. Constable & Company Limited.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* **112**:1796–1808. Am Soc Clin Investig.
- White E. 2015. The role for autophagy in cancer. *Journal of Clinical Investigation* **125**:42–46.
- WHO. 2018. Cancer. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed March 11, 2020).
- Willett WC. 2005. Diet and cancer: an evolving picture. *Jama* **293**:233–234. American Medical Association.
- Witsch E, Sela M, Yarden Y. 2010. Roles for Growth Factors in Cancer Progression.
- Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KHB. 2011. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical pharmacology* **82**:464–475. Elsevier.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis.
- Wu C. 2003. *The families and genera of angiosperms in China: a comprehensive analysis*. Science Press.

- Wu S, Rhee K-J, Zhang M, Franco A, Sears CL. 2007. *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and γ -secretase-dependent E-cadherin cleavage. *Journal of cell science* **120**:1944–1952. The Company of Biologists Ltd.
- Xie S, Zhou J. 2017. Harnessing plant biodiversity for the discovery of novel anticancer drugs targeting microtubules. *Frontiers in plant science* **8**:720. Frontiers.
- Xu L, Cheng G, Lu Y, Wang S. 2017. An active molecule from *Pulsatilla chinensis*, Pulsatilla saponin A, induces apoptosis and inhibits tumor growth of human colon cancer cells without or with 5-FU. *Oncology letters* **13**:3799–3802. Spandidos Publications.
- Xue G, Zou X, Zhou J-Y, Sun W, Wu J, Xu J-L, Wang R-P. 2013. Raddeanin A induces human gastric cancer cells apoptosis and inhibits their invasion in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **439**:196–202. Elsevier.
- Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y, Li F, Dewhirst MW, Li C-Y. 2006. Tumor necrosis factor- α is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Research* **66**:11565–11570. AACR.
- Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. 2013. HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of cellular biochemistry* **114**:967–974. Wiley Online Library.
- Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature* **486**:222. Nature Publishing Group.
- Yi T, Cho S-G, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M. 2008. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular cancer therapeutics* **7**:1789–1796. AACR.
- Yin T-P, Cai L, Xing Y, Yu J, Li X-J, Mei R-F, Ding Z-T. 2016. Alkaloids with antioxidant activities from *Aconitum handelianum*. *Journal of Asian natural products research* **18**:603–610. Taylor & Francis.
- Yu FS, Yang JS, Lin HJ, Yu CS, Tan TW, Lin YT, Lin CC, Lu HF, Chung JG. 2007. Berberine inhibits WEHI-3 leukemia cells in vivo. *In Vivo*.
- Yuan J-M, Castelaو JE, Gago-Dominguez M, Yu MC, Ross RK. 1998. Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **7**:429–433. AACR.
- Zavoral M, Suchánek Š, Májek O, Dušek L, Frič P. 2009. Populační screening kolorektálního karcinomu v České republice. *Rozhl Chir* **88**:292–294.
- Zee Y-K, O'connor JPB, Parker GJM, Jackson A, Clamp AR, Taylor M Ben, Clarke NW, Jayson GC. 2010. Imaging angiogenesis of genitourinary tumors. *Nature Reviews Urology* **7**:69. Nature Publishing Group.
- Zhang H, Guo Z, Han L, You X, Xu Y. 2014. The antitumor effect and mechanism of taipeinine A, a new C19-diterpenoid alkaloid from *Aconitum taipeicum*, on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *J. BUON* **19**:705–712.
- Zhang Y-J, Li S, Gan R-Y, Zhou T, Xu D-P, Li H-B. 2015. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of molecular sciences* **16**:7493–7519. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Zhao M, Da-Wa Z-M, Guo D-L, Fang D-M, Chen X-Z, Xu H-X, Gu Y-C, Xia B, Chen L, Ding L-S. 2016. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Clematis tangutica*. *Phytochemistry* **130**:228–237. Elsevier.
- Zhao M, Ma N, Qiu F, Hai W-L, Tang H-F, Zhang Y, Wen A-D. 2014a. Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argenticulida* and their cytotoxic activity. *Planta medica* **80**:942–948. Georg Thieme Verlag KG.
- Zhao M, Ma N, Qiu F, Tian X, Zhang Y, Tang H, Liu X. 2014b. Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argenticulida*. *Fitoterapia* **97**:234–240. Elsevier.

- Zheng W, McLaughlin JK, Chow W-H, Chien HTC, Blot WJ. 1993. Risk factors for cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses among white men in the United States. *American journal of epidemiology* **138**:965–972. Oxford University Press.
- Zhou F, Lv O, Zheng Y, Wang J, Hu P, Wang Z, Yang L. 2012. Inhibitory effect of *Pulsatilla chinensis* polysaccharides on glioma. *International journal of biological macromolecules* **50**:1322–1326. Elsevier.
- Zucker S, Vacirca J. 2004. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **23**:101–117. Springer.