

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Účinek flubendazolu na Glioblastoma
multiforme *in vitro* a *in vivo*.**

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Monika Šteigerová

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

Hradec Králové

Monika Šteigerová

Poděkování:

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. Dále bych velice ráda poděkovala mé konzultantce RNDr. Veronice Skarkové, Ph.D. a PharmDr. Barboře Vítovcové za odborné vedení, za pomoc a spolupráci v laboratoři a rady při zpracování této práce. Velice děkuji celému týmu Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za možnost se zúčastnit spolupráce na projektu zkoumajícím glioblastom.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Monika Šteigerová

Školitel: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D., RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.

Název diplomové práce: Účinek flubendazolu na glioblastoma multiforme *in vitro* a *in vivo*.

Glioblastoma multiforme (GBM) představuje nejčastější maligní gliom centrální nervové soustavy. Průměrná doba přežití se i přes systematickou komplexní terapii pohybuje okolo 14 měsíců. Anthelmintikum flubendazol (FLU), potencionální protinádorové léčivo, je nyní pro své antiproliferační účinky zkoumáno na několika typech nádorových buněk (1). Cílem našeho projektu bylo vyhodnotit vliv FLU na buněčné linie GBM U118MG (stabilizovaná buněčná linie) a GBM69 (primolinie) *in vitro*, na růst nádorů *in vivo*, a jeho efekt na úrovni mRNA a proteinů vybraných markerů epitelu-mesenchymální tranzice (EMT) a markerů rezistence. Jako pozitivní kontrola bylo použito cytostatikum první volby, temozolomid (TMZ). Obě testované buněčné linie byly v porovnání s TMZ citlivější na FLU. FLU u těchto linií také oproti TMZ způsobil výraznější morfologické změny. FLU signifikantně ovlivňoval hladiny mRNA a proteinů E-kadherinu, N-kadherinu, vimentinu a stejně tak i MGMT a MRP-1. Subkutánní ektopická implantace buněk U118MG do imunodeficitního athymického myšního modelu Nude-Foxn1^{nu} potvrdila námi zjištěná *in vitro* data. FLU (10 mg/kg) signifikantně potlačil růst nádoru v myším modelu, což se zároveň projevilo i na proliferačním markeru ki67. Hodnoty mesenchymálního markeru N-kadherinu byly v odebraných nádorech taktéž signifikantně sníženy. Závěrem tedy lze konstatovat, že FLU signifikantně ovlivňuje viabilitu GBM buněk *in vitro* a taktéž má vliv na růst nádorů *in vivo* v myších modelech. Efekt FLU byl ve většině případů výraznější než vliv TMZ.

Klíčová slova: *Glioblastoma multiforme*, flubendazol, *in vitro* a *in vivo* efekt, markery epitelu-mesenchymální tranzice, markery rezistence.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Monika Šteigerová

Supervisor: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D., RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of flubendazole on glioblastoma multiforme *in vitro* and *in vivo*.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common malignant glioma of the central nervous system. Despite systematic complex treatment, the median survival of this malignancy is 14 months. Anthelmintic and potential anticancer drug flubendazole (FLU) is recently studied for its antiproliferative effect in various tumor cells (1). The aim of our project was to investigate the effect of FLU on GBM cell lines U118MG (stabilized cell line) and GBM69 (primary cell line) *in vitro*, tumor growth *in vivo*, and its effect on mRNA and protein levels of selected markers of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance. First-line chemotherapeutic temozolomide (TMZ) was used as a positive control. Both tested cell lines were more sensitive to FLU treatment in comparison with TMZ. Indeed, FLU caused more apparent morphological changes than TMZ in these cells. FLU significantly influenced mRNA and protein levels of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, as well as resistance markers MGMT or MRP-1. In addition, subcutaneous ectopic implantation of U118MG cell line into the immunodeficiency athymic mouse xenograft models Nude-Foxn1^{nu} confirmed our *in vitro* data. FLU (10 mg/kg) significantly suppressed tumor growth in mice, which was also manifested in proliferation marker ki67. The level of mesenchymal marker N-cadherin in excised tumors was significantly decreased as well. In conclusion, FLU significantly affected GBM cell viability *in vitro*, as well as tumor growth in athymic immunodeficient mice. Moreover, FLU effect was mostly more prominent than the effect of TMZ.

Keywords: *Glioblastoma multiforme*, flubendazole, *in vitro* a *in vivo* effect, markers of epithelial-mesenchymal transition, markers of drug resistance

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Glioblastoma multiforme.....	10
2.1.1 Úvod	10
2.1.2 Epidemiologie.....	10
2.1.3 Kancerogeneze.....	10
2.1.4 Etiopatogeneze glioblastomu.....	11
2.1.5 Epitelo-mesenchymální tranzice a EMT markery	14
2.1.6 Markery rezistence.....	15
2.1.7 Morfologie	16
2.1.8 Klinický obraz	17
2.1.9 Diagnostika	17
2.2 Léčba glioblastomu.....	19
2.2.1 Neurochirurgická léčba.....	20
2.2.2 Radioterapie.....	20
2.2.3 Chemoterapie.....	21
2.3 Farmakoterapie glioblastomu	21
2.3.1 Temozolomid.....	21
2.3.2 Biologická léčba glioblastomu	23
2.4 Modely testování nových léčiv	23
2.4.1 Buněčné nádorové linie	25
2.4.2 Xenograft.....	26
2.5 Využití léčiv s protinádorovým účinkem původně používaných pro jiné indikace 27	
2.5.1 Flubendazol	28

3. CÍLE PRÁCE.....	30
4. METODIKA	31
4.1 Materiál	31
4.1.1 Chemikálie	31
4.1.2 Přístrojové vybavení.....	32
4.1.3 Pomůcky.....	33
4.2 Buněčné linie.....	33
4.3 <i>In vitro</i> testování vzorků	36
4.3.1 Testování proliferace a viability buněk metodou WST-1	36
4.3.2 Mikroskopie fázového kontrastu.....	37
4.3.3 Izolace RNA z <i>in vitro</i> kultivovaných buněk.....	37
4.3.4 Stanovení koncentrace mRNA pomocí metody RT-qPCR.....	38
4.3.5 Stanovení proteinů metodou Western blotting.....	40
4.4 <i>In vivo</i> testování	45
4.4.1 Implantace buněk	45
4.4.2 Podávání cytostatik sondováním.....	47
4.4.3 Ukončení pokusu.....	47
4.4.4 Zpracování vzorku z odebraného tumoru – izolace RNA.....	47
4.4.5 Imunohistochemická analýza	49
4.5 Statistická analýza.....	49
5. VÝSLEDKY	50
5.1 Vliv FLU a TMZ na proliferaci a viabilitu buněk.....	50
5.2 Stanovení IC ₅₀ u U118MG a GBM69	51
5.3 Morfologické změny po ovlivnění FLU a TMZ	51
5.4 Stanovení množství mRNA a zjištění vlivu FLU na expresi EMT markerů ...	53

5.5	Ovlivnění množství proteinů zapojených do procesu EMT a procesu rezistence	57
5.6	Implantace buněk kolorektálního karcinomu HCT8 a kokultivovaných buněk HCT8 s EA.hy926	60
5.7	Implantace buněčné kultury U118MG	61
5.8	Implantace buněčné kultury U118MG a GBM69 a vliv FLU a TMZ na růst těchto tumorů.....	63
5.8.1	RT-qPCR analýza EMT markerů na úrovni mRNA u U118MG tumorů odebraných z myší	64
5.8.2	Western blot analýza markerů EMT na úrovni proteinů u U118MG tumorů odebraných z myší.....	65
6.	DISKUSE.....	66
7.	ZÁVĚR	71
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	73
9.	SEZNAM TABULEK.....	75
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
11.	CITOVANÁ LITERATURA.....	78

1. ÚVOD

Glioblastoma multiforme (GBM) představuje nejčastější a nejagresivnější maligní gliom centrální nervové soustavy s průměrnou dobou přežití léčeného pacienta okolo 14 až 15 měsíců. Incidence se pohybuje mezi 3 až 4 pacienty na 100 000 obyvatel za rok. Etiopatogeneze GBM je zatím nejasná. Kvůli velmi špatné prognóze, která se nedaří zlepšit ani systematickou komplexní terapií zahrnující neurochirurgickou resekci, radioterapii, chemoterapii, se neustále hledají nové možnosti léčby (2-6).

Výzkum a vývoj nové chemické entity pro léčbu nádorového onemocnění je velice nákladný. V dnešní době proto roste trend využití již dříve objevených a registrovaných léčiv v nových indikacích (6). Mezi taková léčiva patří právě flubendazol (FLU), benzimidazolové veterinární anthelmintikum s antiproliferačními účinky. Efekt FLU je již zkoumán jak na solidních tumorech (kolorektální karcinom, rakovina prsu a prostaty, gliomy, melanom), tak hematologických nádorových onemocněních (1,6-10). FLU vazbou na β -tubulin zpomaluje růst a proliferaci buněk a inhibuje procesy závislé na funkci mikrotubul (7). FLU také dále inhibuje děj epitel-mesenchymální tranzice (EMT) (1), a tím taktéž zpomaluje proliferaci a migraci nádorových buněk. FLU je zároveň léčivem o nízké toxicitě s případnými mírnými nežádoucími účinky (1).

V našem projektu jsme se zaměřili na stanovení a porovnání *in vitro* a *in vivo* účinku FLU na nádorové linie GBM U118MG (stabilizovaná buněčná linie) a GBM69 (primolinie). Jako pozitivní kontrola byl u všech provedených testů použit temozolomid (TMZ), cytostatikum první volby.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Glioblastoma multiforme*

2.1.1 Úvod

Termín *Glioblastoma multiforme* zaštiťuje skupinu geneticky a fenotypově heterogenních mozkových nádorů s průměrnou dobou přežití okolo 14 až 15 měsíců. Jedná se o nejčastější a nejagresivnější nádor centrální nervové soustavy, který dle histologické klasifikace malignity Světové zdravotnické organizace padá do IV. třídy. Až u 90 % případů glioblastomů se jedná o primární nádory – tedy nádory vyvinuté *de novo* z astrocytů či oligodendrocytů během pár měsíců, typicky se vyskytují u starších lidí. Zbývajících 10 % případů postihuje mladší pacienty, vyvíjí se z nádorů nižšího stupně malignity – z gliomů II. třídy či z anaplastického astrocytomu III. třídy – během několika let a mají lepší prognózu (2-4).

2.1.2 Epidemiologie

Incidence glioblastomu se pohybuje mezi 3 až 4 pacienty na 100 000 obyvatel za rok. Procentuálně zastupuje 12–15 % všech intrakraniálních nádorů. Průměrný věk diagnostikovaných pacientů je 64 let a častěji jsou postiženi muži než ženy v poměru 1,26:1. Přestože je léčba velmi radikální, tak většina pacientů umírá do tří až pěti let (2, 4, 11).

2.1.3 Kancerogeneze

Vznik nádoru je komplexní a dlouhodobý děj a řadu jeho příčin se ještě nepodařilo odhalit. Kancerogeneze je mnohostupňový proces, který zahrnuje tři základní fáze: iniciace, promoce a progres. Během tohoto procesu vzniká nová abnormální tkáň, která v organismu neplní žádnou fyziologickou funkci, roste neregulovaným způsobem a vymyká se kontrolním mechanismům buněčného cyklu. Maligní transformace buňky vzniká na podkladě akumulace mutací specifických genů kontroly buněčného cyklu, které naruší rovnováhu mezi stimulačními a inhibičními signály. Mutace postihuje nejčastěji geny dvou hlavních tříd: onkogenů a genů kódujících nádorové supresory (12-14).

Onkogeny jsou aktivovány mutací z tzv. *protoonkogenů* (= fyziologické geny zodpovědné za růst a diferenciaci buněk). Mutace onkogenů jsou dominantní, takže stačí,

aby došlo k alteraci pouze v jedné z alel, např. translokací protoonkogenu z jednoho chromosomu na druhý, bodovou mutací genu či narušením DNA retroviru. Retrovirová RNA se pomocí reverzní transkriptázy přepíše na DNA, která se zabuduje do hostitelského genomu (tzv. vložená mutagenese). Druhou možností vzniku alterace je transdukcí, tzv. zachycení genu hostitelské buňky virovým genomem – tento nově pozměněný virový genom se přesune do další buňky – např. lidský papilomavirus, který souvisí s karcinomem děložního čípku (13, 14).

Onkogeny produkují onkoproteiny – aktivací onkogenu dochází k pozměnění aktivity onkoproteinu (zvýšení či snížení) nebo k jeho nadbytečné či snížené produkci. Dle (14) se onkogeny dělí do pěti kategorií podle funkce kódovaného onkoproteinu:

1. onkogeny pro růstové faktory,
2. onkogeny pro receptory růstových faktorů,
3. onkogeny pro nerekceptorové proteinkinasy,
4. onkogeny pro transkripční faktory,
5. onkogeny pro faktory buněčné signalizace (transdukční, regulační faktory).

Termín **nádorový supresor** neboli antionkogen označuje gen, jehož kódující protein inhibuje vznik a rozvoj nádorového bujení – regulují buněčný cyklus, opravné mechanismy DNA a vstup buňky do fáze apoptózy. K inaktivaci těchto nádorových supresorů dojde recesivní mutací obou alel daného genu a tato alterace může vést k indukci rozvoje kancerogeneze (např. retinoblastomový protein RB1, protein p53) (13, 14).

K iniciaci nádorové transformace nepřispívá jen hromadění mutací ve struktuře DNA ale také nežádoucí aktivace klíčového enzymu *telomerasy*. Fyziologicky je tento enzym v somatických buňkách inaktivován (až na zárodečné a kmenové buňky) a během každého buněčného cyklu dochází ke zkrácení telomer. V momentu, kdy dojde ke zkrácení těchto repetitivních sekvencí konců chromosomů na hraniční délku, buňka ztrácí schopnost se znovu replikovat (15). U 90 % tumorů dochází k vysoké expresi telomerasy, a ty jsou tak schopné trvale proliferovat (14).

2.1.4 Etiopatogeneze glioblastomu

Etiologie glioblastomu je zatím nejasná. 99 % případů se vyvíjí spontánně a jejich genetický podklad je jiný, než u zbývajících 1 % případů familiární formy onemocnění

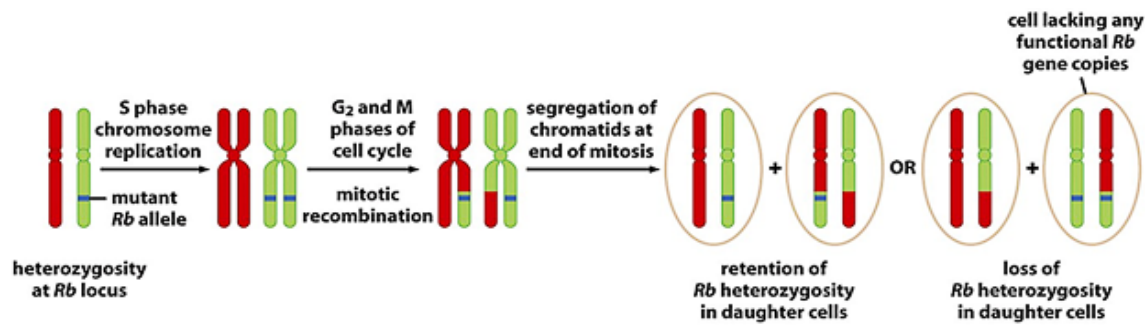
(2). Výskyt nádoru byl taktéž zaznamenán u pacientů se vzácnými genetickými onemocněními – Turcotův syndrom, neurofibromatóza typu I, Li Fraumeni syndrom (16).

Mezi rizikové faktory se řadí radioaktivní záření (radioterapie hlavy a krku) způsobující bodové mutace, mužské pohlaví, věk nad 50 let, chromosomální abnormality na 10. a 17. chromosomu, výše zmíněné vzácné genetické syndromy, excesivní pití alkoholu (16). Dále vysoký index tělesné hmotnosti, infekce lidským cytomegalovirem a chemická agens – pesticidy, rozpouštědla, polycyklické aromatické uhlovodíky (2).

Nález postihuje nejčastěji oblast hemisfér, mozkový kmen nebo cerebellum. Obě varianty – jak primární, tak sekundární glioblastom – vznikají na podkladě nahromadění různých genetických mutací. Všechny tyto alterace ovlivní budoucí proliferaci a buněčný cyklus a buňka se dostává do patologického stavu. U **primárního původu** lze nalézt: v 70 % ztrátu heterozygotnosti na raménku chromosomu 10q, amplifikaci receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) u 36 % nálezů, homozygotní delecii p16^{INK4A} na 9q chromosomu u 31 %, mutaci genu PTEN u 25 %. **Sekundární glioblastom** se často zvrhne z primárního gliomu na podkladě mutace genu nádorového supresoru p53 tzv. *TP53 mutace* a velmi často je přítomna i methylace promotoru genu MGMT (*o-6-methylguanin-DNA-methyltransferasy*). Zásadním prognostickým molekulárním markerem u sekundárních GBM je mutace IDH1 (*isocitrátdehydrogenasy 1*) – jeho pozitivita zvyšuje celkovou dobu přežití (3, 4).

Ztráta heterozygotnosti na raménku 10q

Jev, při kterém je jedna alela genu nádorového supresoru již mutována (buď je zděděna od rodiče či vznikla *de novo* bodovou mutací) a druhá alela genu je stále funkční. Funkce nádorového supresoru je v tento moment ještě stále zachována, k inaktivaci dochází při mutaci i druhé alely – dojde ke změně na recesivní homozygot (Obrázek 1). U značné části primárních i sekundárních glioblastomů dochází k inaktivaci nádorových supresorů PTEN (tzv. *Phosphatase and tensin homolog*) ztrátou heterozygotnosti. Buňka, která nese jednu mutovanou alelu nádorového supresoru, při segregaci chromosomů na konci mitózy ztrácí funkční alelu (3, 4, 17).



Obrázek 1 Ztráta heterozygotnosti (18)

Amplifikace receptoru epidermálního růstového faktoru

EGFR, receptor epidermálního růstového faktoru, jeden z tyrosinkinasových receptorů, je transmembránový receptor pro extracelulární ligandy – růstové faktory. Při interakci s nimi přenáší dovnitř buňky fosforylační signál vybranému intracelulárnímu cíli a podílí se tak na signalizačních kaskádách komunikace vnitřního a vnějšího prostředí buněk. Mutace genu EGFR vede k amplifikaci EGFR, která vyústí ve zvýšenou signalizaci a tím i proliferaci (3, 4, 17).

Methylace o-6-methylguanin-DNA-methyltransferasy

DNA buněk nepodléhá jen mutacím, míru exprese různých genů taktéž ovlivňují epigenetické změny závislé na okolním prostředí. Nejčastější takovou změnou je methylace cytosinu v DNA na methylcytosin. Transkripce genů s přílišnou methylací v promotorové oblasti (v oblastech bohatých na cytosin-guanin nukleotidy) je utlumena. Různé fenotypy subtypů glioblastomu s odlišnou mírou methylace mají rozdílnou prognózu (3). Enzym MGMT chrání buňky před karcinogeny odstraňováním různých nestandardních alkylových zbytků – u pacientů s vysokou mírou exprese MGMT je tento mechanismus bohužel zodpovědný za rezistenci na chemoterapii TMZ. V případě, že je promotor genu pro MGMT methylován, jeho exprese je utlumena a odpověď na léčbu je vysoká (19).

Mutace onkogenu isocitrátdehydrogenasy 1

IDH1 je enzym, který se vyskytuje v pěti různých isoformách, a katalyzuje základní reakce energetického metabolismu – např. během Krebsova cyklu, metabolismu glutathionu atd. Mutace vyústí v produkci onkometabolitu *R(-)-2-hydroxyglutarátu* a spuštění dalších signalizačních kaskád podporujících angiogenezi a vaskulární

hyperpermeabilitu. Tato alterace se vyskytuje hlavně u sekundárních glioblastomů a je spojena s lepší prognózou (3, 4, 17).

2.1.5 Epitelo-mesenchymální tranzice a EMT markery

EMT tranzice je reversibilní biologický proces, který v lidském organismu probíhá jak při fyziologických pochodech (embryogeneze, regenerace tkání a hojení ran), tak i během těch patologických (kancerogeneze). Termín označuje proces, při němž dochází ke změně z epiteliálního fenotypu buňky na mesenchymální typ. Pro epiteliální buňky, nebo-li epitely, jeden ze základních typů tkání, je typické, že jsou polarizované (tzn. mají apikální a bazální pól), jsou spolu navzájem ve velmi těsném kontaktu pomocí mezibuněčných spojů a leží na bazální membráně. Jejich těsné spoje zabraňují nadměrnému dělení buněk a pohybu. Naproti tomu mesenchymální buňky nejsou polarizované, typický je vřetenovitý tvar, mají odolnější mechanickou stavbu, jsou pohyblivé a mohou diferencovat (obvykle na buňky pojivové tkáně, hladké a srdeční svaloviny, křetvorné tkáně, buňky cévního systému). Během EMT tranzice dochází nejen ke změně tvaru a funkcí buněk, ale mění se i exprese typických markerů, proteinů a genů. Aktivace EMT procesu vede k akceleraci kancerogeneze, k rekurencím nádorů, k horší prognóze, k rezistenci vůči chemoterapii i radioterapii, k zakládání sekundárních ložisek (20, 21).

Výzkum EMT procesů je zaměřen na transmembránový protein *E-kadherin*, který je součástí těsných spojů (*tight junctions*). Gen pro tento protein spadá do třídy tumor supresorových genů a jeho exprese ukazuje na epiteliální typ buněk. Při aktivaci EMT dochází k výraznému poklesu až ztrátě exprese E-kadherinu a zvyšuje se exprese transkripčních faktorů (*Snail*, *Slug*, *ZEB1*), proteinů (*vimentin*, *N-kadherin*), růstových faktorů (*transformující růstový faktor β*), mění se aktivita různých signálních cest (*β -katenin*) atd. Exprese všech těchto EMT markerů tlumí až plně inhibuje expresi E-kadherinu vyúsťující ve ztrátu buněčných spojů a změnu fenotypu na mesenchymální. Dále je exprese těchto molekul spojena s výskytem nádorových kmenových buněk (20).

Spouštěč EMT procesu je nyní předmětem výzkumu. Mechanismus je založen nejspíše na epigenetických změnách. Předpokládá se, že důležitou roli má hypoxické prostředí nádoru, zánětlivé procesy v nádorovém parenchymu, migrace myeloidních buněk ze sousední tkáně do nádoru a také mikroRNA - krátké sekvence nukleotidů, které posttranskripčně řídí genovou expresi (20).

V této diplomové práci byly v rámci RT-qPCR a Western blot analýz ve vzorcích měřeny hladiny E-kadherinu, N-kadherinu a vimentinu. Kadheriny jsou skupina adhezivních molekul, které se podílejí na stavbě mezibuněčných spojů. Jedná se o transmembránové proteiny, jejichž aktivita je Ca^{2+} -dependentní. E-kadherin je typický pro epitelální buňky, N-cadherin pro buňky mesenchymální (22). Vimentin, jeden z významných proteinů cytoskeletu, se řadí mezi intermediární filamenta III. třídy. Typicky jej lze nalézt v buňkách mesenchymálního typu, u nádorových buněk jeho vysoká exprese koreluje se schopností migrace, invazivity a progresí onemocnění (23).

2.1.6 Markery rezistence

2.1.6.1 MGMT

Mezi nejdůležitější nádorové markery, jejichž exprese ovlivňuje míru odpovědi na léčbu alkylačními cytostatiky, se řadí *o-6-methylguanin-DNA methyltransferasa*. Mechanismus je popsán v textu výše.

2.1.6.2 MRP-1, MRP-2

Multidrug Resistance Protein 1 (MRP-1) spadá do rozsáhlé rodiny transmembránových ABC transportérů. Je složen z domény vázající ATP (od toho zkratka ABC – „*ATP-binding cassette*“) a z jednotky procházející membránou. Hlavní funkcí těchto transportérů je aktivní transport exogenních látek (léčiv a dalších xenobiotik) z buňky ven (efflux), transport nutrientů a endogenních látek dovnitř (influx). ABC transportéry lze fyziologicky nalézt na apikálním (žlučovém) pólu hepatocytů (přenášejí své substráty z jater do žluče), u enterocytů a v peritubulárních kapilárách zajišťujících renální exkreci látek proti koncentračnímu gradientu. Tyto transportéry chrání organismus před působením xenobiotik, bohužel jsou exprimovány i v buňkách glioblastomu (24, 25).

MRP-1 transportuje lipofilní substráty, jak antineoplastika (vinkristin, doxorubicin), tak hraje roli v účinnosti i různých antibiotik, anodyn, antivirotik a statinů. *MRP-1* je příčinnou rezistence nádorů na řadu chemoterapeutik a jeho zvýšená exprese byla pozorována u hematologických i solidních nádorů – zvýšené hodnoty tohoto markeru jsou spojeny s horší prognózou a odpovědí na chemoterapii (25). *Multidrug Resistance Protein 2* (*MRP-2*) transportuje hlavně lipofilní konjugáty glutathionu, konjugáty s kyselinou glukuronovou (bilirubin), s kyselinou sírovou (tedy produkty II. fáze

biotransformace). MRP-2 tak taktéž zasahuje do metabolismu mnoha léčiv (irinotekan, etoposid, vinblastin, vinkristin, methotrexát, statiny atd.) (26).

2.1.6.3 MDR-1

MDR-1 (multi drug resistance 1), transmembránový protein známý jako P-glykoprotein, je taktéž členem skupiny ABC transportérů. Jedná se o další energeticky-dependentní transportér přenášející své substráty z buněk ven. Míra exprese MDR-1 genu může stejně jako u MPR-1 a MPR-2 ovlivnit účinek léčiva a negativně tak snížit klinickou odpověď na léčbu. Dle DrugAgency, a.s. je v ČR registrováno přes 300 léčiv, které jsou substráty P-glykoproteinu, 130 látek, které inhibují jeho činnost a 25 molekul, které naopak P-glykoprotein indukují (26).

2.1.7 Morfologie

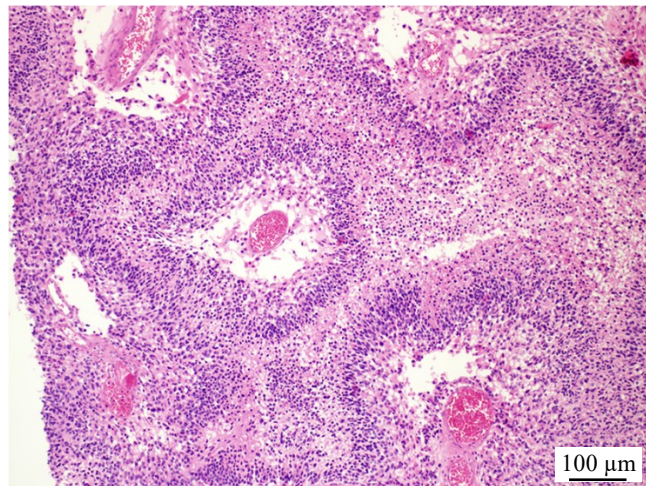
Glioblastoma multiforme se morfologicky skládá z několika menších subpopulací buněk charakteristických polymorfismem, anaplasii a anisokaryosou – tzn. že každá buňka má jiný tvar a jinou velikost jádra. Buňky tumoru prorůstají okolní zdravou tkáň a nádorová masa není jasně odlišitelná od svého okolí. Metastazování není typické, ale jsou zaznamenány případy infiltrace buněk do sleziny, pleury, plic, lymfatických orgánů, jater, kostní tkáně, a to jak cévami, tak cerebrospinální tekutinou (2). Histologicky od sebe téměř nelze odlišit primární a sekundární glioblastom, rozdíly jsou patrné až při genetické a epigenetické analýze (4).

Buňky mají polygonální tvar, obsahují acidofilní cytoplazmu, jádro je podlouhlé nebo oválné. Nádor je složen z několika subpopulací, přičemž je dnes rozšířena teorie tzv. nádorových kmenových buněk. Dle (27) řídí růst a přežití nádorové masy malá subpopulace CD133⁺ mající charakter neurálních kmenových buněk, které se od ostatních liší zachovalou schopností sebeobnovy, neomezené proliferace, diferenciace, velké pohyblivosti, schopnosti produkovat markery a celkově podporovat růst nádoru. Ze studií vyplývá, že právě tyto CD133⁺ buňky jsou vysoce rezistentní vůči radio a chemoterapii a právě z tohoto důvodu je léčba GBM neúspěšná.

Pro GBM je typická bohatá vaskularizace. Nově vzniklé cévy jsou morfologicky velmi podobné renálním glomerulům, jejich endoteliální buňky se od těch standardních ale liší

– jsou různě velké, různých tvarů a různě se překrývají. Nedokonalý povrch endotelu a nádorové mikroprostředí vede ke vzniku mikrotrombů, poškození cév a extravazaci (28).

Makroskopicky je tumor složen ze dvou částí – periferních nádorových buněk tvořících tzv. pseudopalisády a vnitřní částí – nekrotickým středem díky nedostatečnému cévnímu zásobení (28). Histologický řez glioblastomem je ukázán v Obrázku 2.



Obrázek 2 Histologický řez Glioblastoma multiforme s typickým pseudopalisádováním a nekrotickými ložisky (barvení hematoxylin a eosin) (29).

2.1.8 Klinický obraz

Projevy onemocnění se odvíjí od lokalizace tumoru a míry postupného narůstání intrakraniálního tlaku. Mezi nejčastější symptomy patří bolest hlavy (bývá větší během rána po probuzení), ataxie, nauzea, závratě, změny vidění (diplopie, rozmazané vidění), synkopa, parciální i generalizované epileptické záchvaty. Díky těmto nespecifickým symptomům může být prvotní diagnóza bohužel chybná (2, 16).

2.1.9 Diagnostika

Diagnostika intrakraniálních nádorů je založena na přímém zobrazení nádoru pomocí magnetické rezonance (MR), výpočetní tomografie (CT) a provedení histopatologického rozboru.

Nález postihuje nejčastěji oblast hemisfér, mozkový kmen nebo cerebellum. Dle doporučených postupů (5) se začíná MR s gadoliniem. Gadolinium je směsí kontrastních látek zvyšující kontrast a rozlišení struktur na snímku. U pacientů, kteří z důvodu např. kovových implantátů, kardiostimulátorů atd. nemohou být vyšetřeni pomocí MR, se volí

CT hlavy a krku. Snímky mozkových struktur pomocí CT ale nemusí být tak přesné (30). Pomocí zobrazovací metody se nádor lokalizuje a určí se jeho velikost, struktura a vztah k okolním tkáním. Dále se někdy využívá pozitronová emisní tomografie (PET) buď samostatně nebo v kombinaci s CT – tzv. PET-CT scan. PET s (¹⁸F)-fludeoxyglukosou se využívá hlavně pro zjištění metabolických změn tkání a diferenciální diagnostice nádoru – pro možné rozlišení zánětlivého ložiska (abscesu) či depozitu patologického materiálu (amyloidom, kalcifikace) od nádorové tkáně (31).

Pro další postup je při diagnostice zásadní odběr vzorku nálezu – biopsie.

2.1.9.1 Histopatologická diagnostika

Histologické, molekulárně genetické a cytogenetické vyšetření je základem pro správné a přesné stanovení diagnózy a vzájemné odlišení intrakraniálních nádorů od sebe. Detailní analýza nádoru umožní rozdělení pacientů dle subtypů glioblastomu, prognózy a poskytnutí individuálnější léčby.

U každého nálezu se dle klasifikace Světové zdravotnické organizace určuje tzv. typing, grading a staging. Glioblastom je původem neuroepitelový astrocytární nádor („typing“) histologického čtvrtého stupně diferenciace („grading“) – buňky jsou málo diferencované. Termín „staging“ označuje určení klinického stádia tumoru u daného pacienta (5, 14).

Z molekulárně genetického a cytogenetického vyšetření má největší význam určení mutací genu IDH1 a IDH2, methylace promotoru genu MGMT a kodelece 1p/19q ramének chromosomů (32). Klinicky důležité molekulární markery u high-grade gliomů a jejich prognostický a prediktivní význam jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled důležitých markerů u agresivních high-grade gliomů

	Prognostický význam	Prediktivní význam
IDH1/2	Tumory s touto mutací jsou prognosticky příznivější.	Při wild-type IDH je metylace promotoru MGMT u pacientů s anaplastickým astrocytomelem prediktorem pro léčbu TMZ.
1p/19q kodelece (u diagnostiky GBM se zatím nepoužívá, svědčí pro oligodendrogliální nádor (5))	Tumory s kodelecí jsou prognosticky příznivější.	Přítomnost této kodelece je prediktorem pro léčbu cytostatikem PCV.
Methylace promotoru MGMT	Methylace promotoru MGMT je příznivým prognostickým faktorem u anaplastických gliomů a glioblastomů léčených radioterapií a/nebo chemoterapií.	Methylace promotoru MGMT predikuje benefit z terapie alkylačními činidly u glioblastomu.

IDH – isocitrátdehydrogenasa; MGMT – O-6-metylguanin-DNA-metyltransferasa; PCV – prokarbazin, lomustin, vinkristin; TMZ – temozolomid; GBM – glioblastom (5, 32)

Jako primární protilátky pro imunohistochemickou analýzu (IHC) byly v této diplomové práci vybrány protilátky proti ki67, N-kadherinu a IDH1. Ki67 je nukleární protein, který je v buňce ve vysokých koncentracích během G1, S, G2 a M fáze – podle jeho koncentrace a místa navázání lze určit stádium buněčného cyklu a výši proliferace (není detekován při G0 fázi). V high-grade gliomech jej nalezneme ve vysokých koncentracích. Fyziologické humánní buňky tento marker neexprimují (33). N-kadherin představuje epiteliální EMT marker. IDH1 je enzym, jehož vysoká exprese je spojena s lepší prognózou pacientů.

2.2 Léčba glioblastomu

Léčebný postup závisí na charakteru tumoru, na jeho lokalizaci v mozku a vztahu k okolním tkáním, velikosti, věku a celkovém zdravotním stavu pacienta¹ (5). Přestože léčba je velmi radikální – co nejdokonalejší chirurgické odstranění léze, radioterapie, chemoterapie – prognóza pacientů je špatná.

¹ Celkový zdravotní stav je hodnocen dle škály Karnofského skóre (*Karnofsky performance status*, KPS) či dle testu Mini-Mental State Examination (MMSE).

2.2.1 Neurochirurgická léčba

Neurochirurgická léčba stojí na počátku celé komplexní onkologické léčby pacienta. Principem je co nejpřesnější odstranění maximálního možného množství tkáně tumoru bez poškození důležitých funkčních částí mozku. Jak již ale z vlastností glioblastomu vyplývá – velmi invazivně prorůstá do okolních tkání; nádorová tkáň je špatně odlišitelná od okolní atd. – nelze tento postup vždy dodržet. U odebrané tkáně se stanovují histopatologické vlastnosti nádoru a provádí se molekulárně biologické vyšetření. I přesto, že resekce není kurativního charakteru, chirurgický zákrok má velmi pozitivní vliv na prognózu pacienta – prodlužuje celkovou dobu přežití (tzv. *Overall survival*, OS), čas do progresu onemocnění (tzv. *Progression-free survival*, PFS) a odstraňuje nebo alespoň zmírňuje symptomy onemocnění. Pokud se nádor nachází v tzv. *elokventních zónách* – lokalizován v příliš hlubokých částech mozkové tkáně nebo funkčně důležitých lokusech, je indikována alespoň stereobiopsie. (Pomocí zobrazovací techniky se třemi souřadnicemi udá přesný cílový trojrozměrný nitrolební prostor. Hlava pacienta se zajistí stereotaktickým rámem a bioptickou jehlou se za lokální anestezie odebere část nálezu (34). V případě, že je chirurgický zákrok kontraindikován, přistupuje se rovnou k radioterapii.

Poslední studie ukazují (5), že minimální prospěšný objem resekce pro pacienta je 78 % nádorové masy, optimální objem resekce je 98 % a více. Pacient do 72 hodin po operaci podstupuje MR vyšetření, pomocí kterého se hodnotí procentuální odstranění masy. 20 až 40 % pacientům s rekurentním glioblastomem je indikována reoperace.

2.2.2 Radioterapie

Radioterapie je dalším velmi důležitým krokem v komplexní onkologické léčbě pacienta a u inoperabilních pacientů je léčbou první volby. Dnes je standardně používáno cílené ozáření tumoru, pro které se oblast určí pomocí MR. Ozařování je aplikováno během třiceti až třiceti tří procedur v šesti týdnech. Celková dávka záření během těchto aplikací činí do 60 Gy. Pacienti s horším zdravotním stavem (KPS < 60) či pacienti nad 70 let, kteří by standardní léčbu mohli hůře tolerovat, podstupují zkrácené radioterapeutické režimy bez konkomitantní chemoterapie. Pacientům s KPS > 60 mladších sedmdesáti let je indikována standardní léčba – konkomitantní chemoradioterapie a poté adjuvantní chemoterapie temozolomidem (32).

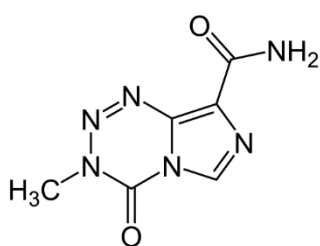
Mezi používané radioterapeutické techniky spadá konvenční 3D konformní radioterapie a radioterapie s modulovanou intenzitou svazku (tzv. IMRT a VMAT) (32).

2.2.3 Chemoterapie

Základní léčivou látkou chemoterapie glioblastomu představuje alkylační cytostatikum temozolomid. Existuje několik různých léčebných režimů, standardním dávkovacím režimem je tzv. Stuppův režim (35).

2.3 Farmakoterapie glioblastomu

2.3.1 Temozolomid



Obrázek 3 Vzorec TMZ

Temozolomid (Obrázek 3), TMZ, je orálně podávané proléčivo spadající do skupiny alkylačních cytostatik, které je užíváno jako léčivo první volby. Dle několika metaanalýz klinických studií prodlužuje společně s radioterapií průměrně přežití pacienta – šance na čtyřleté přežití u kombinované léčby je procentuálně vyšší (12,9 %) oproti pacientům léčeným pouze radioterapií (3,8 %) (36).

TMZ je malá lipofilní molekula, jejíž základ představuje struktura imidazotetrazinu. Jedná se o proléčivo, které je stabilní v kyselém (pH < 5) prostředí, což umožňuje orální podání a absorpci v gastrointestinálním traktu. V neutrálním a zásaditém prostředí je molekula labilní a dochází k neenzymatickému spontánnímu rozkladu na meziprodukt *5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazol-4-karboxamid* (MTIC). MTIC dále reaguje s molekulou vody – hydrolyzuje se za vzniku *5-amino-imidazol-4-karboxamidu* a velmi reaktivního methyldiazoniového kationtu. Tento kationt napadá nukleofilní centra DNA a dochází k methylaci N⁷-guaninu (asi ze 70 %), N³-adeninu (asi z 9 %) a O⁶-guaninu (asi z 6 %). Za cytotoxické účinky TMZ je zodpovědná hlavně methylace O⁶-guaninu. Výsledná methylace DNA vede k chybám při replikaci templátu, inhibici reparačních mechanismů DNA a apoptóze buňky (19).

Míra účinku TMZ závisí na několika faktorech. Methylový zbytek na O⁶-methylguaninu může být odstraněn enzymem MGMT. Jedná se o malý protein (22 kDa) vyskytující se jak v jádře, tak v cytoplazmě buněk. MGMT chrání buňky před karcinogeny

odstraňováním různých nestandardních alkylových zbytků – bohužel, u pacientů s vysokou mírou exprese MGMT je tento mechanismus zodpovědný za rezistenci na chemoterapii. V případě, že je promotor genu pro MGMT methylován, jeho exprese je utlumena a odpověď na léčbu je vysoká. Methylace MGMT enzymem *5'-methylcytosin-methyltransferasou* je běžný epigenetický jev vznikající během tumorigeneze. Hypermethylace MGMT byla detekována u 45 až 70 % high-grade gliomů a korelace mezi ní a odpovědí na léčbu alkylujícími cytostatiky je velmi dobrým prediktivním markerem (19).

2.3.1.1 Farmakokinetika TMZ

Biologická dostupnost TMZ je po perorálním podání 100 % a molekula díky své lipofilitě ($\log P -2,8$) a velikosti (194 Da) velmi dobře přestupuje přes hematoencefalickou bariéru. Nádorová tkáň vykazuje v porovnání s okolním prostředím zásaditější pH a spontánní rozklad molekuly zde probíhá ještě lépe (19). Plazmatická clearance, distribuční objem ($V_d = 0,4 \text{ l/kg}$) a biologický poločas ($T_{1/2} = 1,8 \text{ hod}$) jsou na velikosti dávky nezávislé. Na plazmatické proteiny se váže z 10 až 20 %, exkrece probíhá hlavně močí a klinický stav eliminačních orgánů dle dostupných dat neovlivňuje míru clearance (37).

2.3.1.2 Chemoterapeutické režimy

1. linie léčby: TMZ je standardně podáván po neurochirurgické resekci nádoru. Chemoterapie u pacientů s dobrým celkovým zdravotním stavem ($KPS \geq 60$) a ve věku do 70 let probíhá konkomitantně s radioterapií během 28denního intervalu. TMZ je podáván v šesti cyklech (v dávce 75 mg/m^2). Tento režim, tzv. Stuppův režim, vychází z výsledků klinické studie z roku 2005 a do dnešních dnů zůstává standardem. Po ukončení tohoto 28denního intervalu lze podle vývoje přistoupit k adjuvantnímu režimu chemoterapie, při kterém je znovu podáván TMZ (v dávkách $150\text{--}200 \text{ mg/m}^2$). Pacienti starší 70 let nebo pacienti s horším zdravotním stavem po chirurgické resekci podstupují pouze radioterapii. U těchto pacientů se volí spíše šetrnější režimy s nižší dávkou ve více frakcích (než standardních celkových 60 Gy) (5, 35).

2. linie: V případě recidivy či progresu a vyčerpání všech možností chirurgické léčby – resekce recidivy – a radioterapie se přistupuje k druhé linii chemoterapie. Strategie léčby je pak určena multidisciplinárním týmem, závisí na zdravotním stavu pacienta (KPS), a zlatým standardem by dnes měla být analýza molekulárních markerů (pokud tedy nebyla

provedena již před 1. linií). V případě, že se nepřistoupí k adjuvantnímu režimu, lze zvolit paliativní režimy léčby. V 2. linii chemoterapie se indikuje prokarbazin, lomustin, vinkristin (5, 35).

Při rekurenci onemocnění či progresi reziduálního nádoru se přistupuje k paliativním chemoterapeutickým režimům, při kterých se využívá mimo zmíněných cytostatik ještě ifosfamid, karboplatiny, etoposidu, fotemustinu, karmustinu a lomustinu (5, 35).

2.3.2 Biologická léčba glioblastomu

V roce 2009 byla k léčbě rekurentního glioblastomu registrována monoklonální protilátka bevacizumab. V tuto humánní monoklonální protilátku proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF) byly vkládány velké naděje a byla registrována na podkladě dat z druhé fáze klinického testování. Výsledky následné třetí fáze téže klinické studie (EORTC 26101 z roku 2016 (38)) avšak neukázaly, že by pacienti léčení kombinací bevacizumab + lomustin přežívaly déle než pacienti léčení pouze lomustinem (hodnoceno jako *overall survival* nebo-li celková doba přežití). Z dosavadních výsledků studií vyplývá, že bevacizumab indikovaný již v první linii léčby zvyšuje tzv. *progression-free survival* nebo-li čas do progresse onemocnění a z kvalitňuje tak nově diagnostikovaným pacientům život, ale celkovou dobu přežití neprodlužuje. Velikou nevýhodou je jeho finanční náročnost a i proto dnes stále zůstává léčivem první volby TMZ (39).

2.4 Modely testování nových léčiv

Vývoj nového léčiva se dělí na několik základních fází. Začíná *in silico* základním výzkumem (za pomoci počítačových softwarů), poté pokračuje preklinickým výzkumem (*in vitro* a *in vivo* fází) a končí klinickým výzkumem (děleným na čtyři fáze včetně té postmarketingové, ve které je po registraci již léčivý přípravek uvolněn na trh). Samotný vývoj od vlastního objevu molekuly – nové chemické entity – po registraci nového léčivého přípravku trvá průměrně 15 let a stojí okolo 2,6 miliard USD.

Na začátku vývoje nového léčiva stojí pochopení příčin onemocnění, analýza těchto mechanismů etiopatogeneze na molekulární a buněčné úrovni, a nalezení cílové molekuly (např. protein, nukleová kyselina), se kterou má nové léčivo interagovat. Po popsání cíle

(tzn. validaci cílové struktury) a způsobu, jak má nově vyvíjená molekula s tímto cílem interagovat, se hledají potenciální kandidáti (40).

První fází vývoje je tzv. ***in silico* výzkum** – tzn. hledání pomocí výpočetních technologií (*Computer-aided drug Discovery, CADD*). Dnešní screeningové metody umožňují rychlé analyzování tisíců látek z velkých souborů (databází či knihoven), tzv. „*high throughput screening*“. Tyto knihovny obsahují *in silico* modelované nové molekuly, jejichž tvorbou se zabývá obor kombinatoriální chemie. Dále v nich najdeme izolované molekuly z přírodních zdrojů či chemicky syntetizované molekuly. Taktéž se studují již objevené molekuly a jejich možné využití v jiných indikacích či se tyto molekuly různě modifikují, inovují atd. Po nalezení možných využitelných molekul se dále *in silico* studují a analyzují jejich vlastnosti – toxicita, stabilita, absorpce, rozpustnost, lipofilita, afinita a selektivita k dané cílové struktuře, chiralita, jejich metabolismus, Lipinského pět vlastností (molekulární hmotnost, počet rotovatelných vazeb, počet donorů a akceptorů H-vazeb, hodnota rozdělovacího koeficientu $\log P$). Vybrané molekuly se různě strukturně obměňují s cílem získat kandidáty s co nejlepšími fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi – nesmí být toxické, příliš se kumulovat v organismu, ovlivňovat základní životní funkce atd. (40, 41).

Po fázi *in silico* vývoje přichází na řadu **preklinický výzkum**, během kterého se zjišťují farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti daných molekul. Pro pochopení složitosti patologie nádorových buněk a preklinické testování potenciálních léčivých látek se během preklinického výzkumu využívá více různých typů modelů s cílem vhlédnout do problematiky z různých úhlů. Testování probíhá jak na *in vitro*, tak i na *in vivo* modelech. Existence rozličných typů nádorových linií s různou histopatologií, genetickými a epigenetickými variantami a klinickými výstupy – prognózami, studium a vývoj nových léčebných metod ztěžuje (42). I přes investované miliony dolarů na validaci a optimalizaci modelů užívaných v preklinickém testování, většina nově objevených antineoplastik neprojde třetí fází klinického testování. I kvůli těmto nezdarům je na výzkum a zdokonalování modelů vkládán velmi velký důraz (43).

Studium probíhá na primárních tumorech, primárních nádorových liniích (tzv. primolinie), stabilizovaných nádorových liniích, xenograftech – tzv. PDX-modely (myší modely).

2.4.1 Buněčné nádorové linie

Buněčné nádorové linie jsou základním modelem pro studium patologických dějů v buňkách tumoru – od základní charakteristiky buněk po signalizační dráhy v buňce, geny podílející se na rozvoji nádoru, komunikaci mezi buňkami, mikroprostředí nádoru, nádorové markery atd. Studium a popis jednotlivých buněčných linií je taktéž esenciální pro vývoj nových protinádorových léčivých látek, a zároveň porozumění mechanismu rozvoje rezistence u již používaných chemoterapeutik (42).

Mezi výhody buněčných linií patří lehká manipulovatelnost, snadná kultivace v krátkém čase, a to, že lze jednoduše definovat typ buněk, který je homogenní. Dále – vysoká podobnost s původní nádorem – jedná se pouze o čistou populaci buněk tumoru bez podpůrných buněk stromy nádoru a zánětlivých buněk. Výsledky pokusu tak nejsou ovlivněny interakcí s dalšími buňkami orgánů a tkání (to však lze brát i jako nevýhodu.) Dále mezi pozitiva spadá snadná reprodukovatelnost výsledků, dostupnost velkého množství rozdílných linií, neomezená schopnost auto-replikace imortalizovaných buněčných linií. A mimo jiné také možnost provádění experimentálních pokusů, které mohou zničit danou linii, a které z etického hlediska na zvířecích či lidských subjektech nelze provádět (42, 44).

Buněčné linie mají ale taktéž mnoho negativ:

1. Během pasážování buněčné kultury dochází ke genetickým změnám – chromosomální aberace, mutace onkogenů, delece alel (genetický drift), amplifikace genů. Po n buněčných cyklech při dlouhodobém pasážování tak může dojít ke změně fenotypových vlastností a k dalším genetickým změnám.
2. Buněčné linie ztrácí heterogenitu nádoru a jsou homogenní.
3. Buněčné linie nedokáží vhodně imitovat reálné komplexní prostředí nádoru, tzv. *tumor microenvironment* – chybí buňky stromy, zánětlivé buňky a další buňky imunitního systému. Buňky jsou pěstovány v kultivačním médiu, které svým složením neodpovídá vnitřnímu fyziologickému prostředí v tkáních. Atmosféra v kultivačních lahvích taktéž neodpovídá reálnému prostředí (42-44).

Tyto body mohou být odstraněny použitím primárních linií, které si ještě zachovávají heterogenitu původního primárního nádoru, nebo co nejnižším možným počtem pasáží

zmrazováním buněk, či využitím pestrosti kombinace více stabilizovaných nádorových linií (42).

Z výčtu výhod a nevýhod tedy vychází, že při práci s kultivovanými buňkami v umělém prostředí je nutné počítat s tím, že výsledky experimentů na tomto *in vitro* modelu nemusí být stoprocentně reprodukovatelné na *in vivo* modely.

2.4.1.1 Buněčné kultury a linie glioblastomu

Termínem primární kultura se označuje první kultura izolovaných buněk. Zdrojem buněk je laboratorní zvíře či člověk; v případě tohoto projektu pacient s glioblastomem a materiál je odebrán při chirurgické resekci či biopsii. Po namnožení buněk v kultivačním médiu se buňky přenesou do nové kultivační láhve – tzv. *pasážování* či *subkultivace* – a vznikne tak subkultura – při namnožení dostatečného množství buněk subkultury jej označujeme termínem *buněčná linie* (44). Nejcitovanějšími liniemi GBM ve vědeckých publikacích jsou U87, U251, T98G, které byly v letech 1966 až 1969 odebrány z mozkového parenchymu od různých pacientů na Universitě v Uppsale. Pro U87MG je charakteristická heteroploidie (polovina buněk má pouze 44 chromosomů) (45). Pro U251 je typický standardní počet 46 chromosomů a liší se od U87MG v expresi stovek proteinů. T98G je hyperpentaploidní (průměrný počet chromosomů se pohybuje od 128 do 132) (45, 46). V experimentální části jsme pracovali se stabilizovanou linií GBM U118mg a s primolinií GBM69. Jako kontrolu růstu nádorových buněk po subkutánní implantaci jsme použili ověřenou linii z adenokarcinomu HCT8, samotnou a kokultivovanou s endoteliálními buňkami linie EA.hy926.

2.4.2 Xenograft

Výrazem *xenograft* se označuje *in vivo* model – imunodeficitní myš – do které jsou implantovány buď buňky linie odvozené z tumoru (tzv. *Cell line-derived xenograft model*) či buňky/tkáň samotného nádoru (tzv. *PDX-xenograft model*, *patient-derived xenograft model*). Na rozdíl od nádorových liniích pěstovaných v kultivačních médiích (*in vitro* výzkum), kdy je pro buňky vytvořené umělé prostředí, tyto myší modely umožňují simulovat přirozené prostředí pro rozvoj a další růst nádorových buněk. Lze tak pozorovat např. chování buněk v nedostatečně okysličených tkáních, transkripci aktivovanou hypoxickými podmínkami, mechanismy rezistence vůči různým složkám imunitního systému, angiogenezi, autokrinní, parakrinní a endokrinní vlivy (47).

Implantace probíhá subkutánním podáním buněčné suspenze, ortotopickou transplantací či žilním nebo peritoneálním podáním injekce.

Cell line-derived xenograft model: Nevýhoda těchto modelů obnáší stejné nevýhody již zmíněné u buněčných linií – a to, že s narůstajícím počtem pasáží buněčná linie ztrácí svoji heterogenitu díky hromadění genetických změn – alterací, které fenotypově a genotypově postupně mění charakter genomu. Dále, různé buněčné linie se od sebe leckdy velmi liší svými vlastnostmi a neodpovídají tak třeba zrovna posuzovanému typu nádoru u daného pacienta. Díky těmto negativům nemají tyto modely tak přesnou vypovídající hodnotu, co se týče predikce odpovědi na nádorovou léčbu a nejsou vhodné pro posuzování individuální odpovědi na klinickou terapii (47).

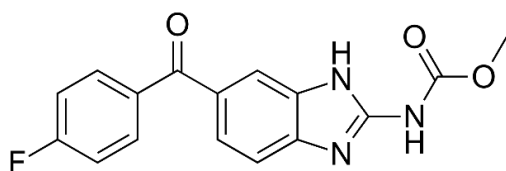
Tzv. *PDX-xenograft models* si zachovávají heterogenitu tumoru a dnes se tak považují za ideální nástroj pro výzkum patobiochemie buněk, farmakokinetiku a farmakodynamiku potenciálních léčivých látek či individuální odpověď na léčbu antineoplastiky u daného pacienta (47).

Během experimentální části byly využity imunodeficitní heterozygotní myši bez brzlíku Nude-Foxn1^{nu} deficitní na cytotoxické T-lymfocyty CD8⁺ a ostatní T-lymfocyty. Fenotypicky bezsrsté, genotypicky s autosomálně recesivní mutací *nu* alely na 11. chromosomu. Myším byla subkutánně podávaná suspenze buněk několika buněčných linií – tzv. *Ectopic tumor xenograft model*.

2.5 Využití léčiv s protinádorovým účinkem původně používaných pro jiné indikace

Vývoj a výzkum nových chemických entit pro léčbu nádorových onemocnění je velice nákladný a zdlouhavý a do I. fáze klinického testování postoupí pouze 5 % molekul. V dnešní době proto roste trend využití již dříve objevených a registrovaných léčiv v nových indikacích. Tento proces (tzv. *drug repurposing*) je levnější, rychlejší a bezpečnější díky již dostupným datům o farmakokinetice, farmakodynamice a proběhlým klinickým zkouškám u dané substance. Na podkladě technologického pokroku a bližšího pochopení etiopatogeneze mnoha onemocnění a mechanismu účinku léčiv se zjistilo, že mnoho molekul z řad antihypertenziv, antidiabetik, antipsychotik, antidepresiv a anthelmintik má ještě navíc protinádorové účinky. Jedná se např. o α_1 -lytika (terazosin, doxazosin), propranolol; metformin a pioglitazon; amitriptylin; chlorpromazin (6).

2.5.1 Flubendazol



Obrázek 4 Vzorec flubendazolu.

Flubendazol (Obrázek 4), širokospektré anthelmintikum využívané ve veterinární medicíně, je látka spadající do skupiny benzimidazolů. Nositelem anthelmintického účinku molekuly je amidinová skupina.

FLU se v ČR indikuje u psů, koček, prasat a kura domácího při nákaze oblémy červy (antinematodní účinek) a tasemnicemi (anticestodní účinek) (48). Nyní je tato látka zkoumána za účelem využití v terapii myelomů, leukémie, rakoviny prsu, kolorektálního karcinomu, a právě glioblastomu multiforme.

Mechanismus účinku tkví v tvorbě specifické vazby s podjednotkou β -tubulinu. Polypeptid β -tubulin tvoří společně s α -tubulinem protein tubulin, který je základní stavební jednotkou mikrotubulů buňky. Mikrotubuly, nejtlustší typ mikrofilament, tvoří cytoskelet eukaryoty udržující její tvar, dodávají jí mechanickou pevnost, udávají vnitřní prostorové rozložení organel, probíhá díky nim vnitřní transport látek a vesikul, tvoří během M-fáze dělicí vřeténko a umožňují tak rovnoměrné rozložení chromosomů mezi budoucí dceřiné buňky atd. Správná funkce mikrotubulů je tedy dle výčtu naprosto zásadní pro celý buněčný cyklus buňky – tedy pro její existenci (15).

Benzimidazoly, včetně FLU, vazbou na podjednotku β -tubulinu naruší funkci mikrotubulů helminta a vedou ke smrti parazita. Alterace mikrotubulů naruší i transport a metabolismus glukózy vedoucí k nedostatečné tvorbě ATP a glykogenu a depleci energetického metabolismu parazita. Výhodou benzimidazolových anthelmintik je jejich vysoká toxicita pro helminty, ale nízká pro savce, protože afinita k savčímu β -tubulinu je daleko nižší než k β -tubulinu helmintů (49).

Podstatou rakovinného bujení je buňkou neřízené rychlé a všem kontrolním procesům se vymykající dělení patologických buněk tumoru. FLU je nyní díky svému účinku na mikrotubuly zkoumán jako nadějný cytostatikum (49). FLU dále ale neovlivňuje pouze mikrotubuly, dle studií (1) a (49) zasahuje i do procesu epitel-mesenchymální tranzice (EMT) – inhibuje expresi mesenchymálních markerů N-kadherinu a vimentinu a zvyšuje expresi epitelálního markeru E-kadherinu. FLU tímto mechanismem inhibuje proliferaci a migraci buněk.

2.5.1.1 Farmakokinetika flubendazolu

FLU, *methylester-[5-(4-fluorobenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]-karbamové kyseliny*, je lipofilní molekula, která se obvykle podává perorálně, avšak absorpce po p. o. podání je velmi malá. Biodostupnost lze zvýšit podáním ihned po jídle. Nízká biodostupnost je hlavním limitem případného budoucího využití v protinádorové terapii a její zlepšení je nyní předmětem výzkumu (49).

FLU je v lidském organismu metabolizován v cytosolu hepatocytů, kde podléhá redukci katalyzované enzymem *karbonylreduktasa 1* s koenzymem NADPH. Reakce je přísně stereospecifická (50) a jiný metabolit, než produkt této redukce nebyl v hepatocytech detekován. Molekula FLU nepodléhá hydrolyzačním ani konjugačním reakcím, což značí malý potenciál pro farmakokinetické interakce s ostatními léčivými látkami (až na možné interakce s interkalačními antibiotiky doxorubicinem a daunorubicinem, které taktéž podléhají redukci *karbonylreduktasou*) (51).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem mé práce bylo stanovit a porovnat *in vitro* a *in vivo* účinek FLU na nádorové linie GBM U118MG (stabilizovaná buněčná linie) a GBM69 (primolinie). TMZ byl použit jako kontrola u všech provedených testů.

Dílčími cíli projektu bylo:

- porovnat antiproliferační vliv FLU a TMZ ve vybraných buněčných liniích GBM, stanovit hodnoty IC_{50} a vyhodnotit morfologické změny.
- stanovit účinek vybraných koncentrací FLU a TMZ na zvolené markery epitelomesenchymální tranzice (EMT) a markery rezistence jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů u vybraných buněčných linií GBM.
- implantovat subkutánně suspenzi buněčných linií U118MG a GBM69 do imunodeficitních athymických myší Nude-Foxn1^{nu} a porovnat jejich růst po aplikaci FLU a TMZ
- porovnat vliv FLU a TMZ na hladiny vybraných markerů EMT a markerů rezistence u odebraných myších tumorů U118MG na úrovni mRNA a proteinů.

4. METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- 4xSDS vzorkový pufr složený z: 1M Tris/HCl pH 6,8, 85% glycerol, SDS, DTT (dithiotreitol), bromfenolová modř, redestilovaná voda.
- Akrylamid (AA) a bis-akrylamid (bisAA) (Sigma Aldrich)
- Bovinní (hovězí) sérový albumin (Sigma Aldrich)
- DEPC (diethylpyrokarbonát) voda bez nukleas (InVitrogen)
- Direct Zol RNA PreWash Buffer (ZymoResearch)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – bazální médium pro kultivaci (Gibco)
- DNA Digestion Buffer (ZymoResearch)
- DNAsa I (ZymoResearch)
- dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma Aldrich)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (ZymoResearch)
- Fetální bovinní sérum (Gibco)
- Formaldehyd 4% (Fagron)
- Glycin (Sigma Aldrich)
- HCl (Penta)
- Isobutanol (Sigma Aldrich)
- Isofluran roztok (Laboratorio Fatro Ibérica)
- Kit pro měření proliferace a viability buněk metodou WST-1 (Gibco)
- Kit pro polymerázovou řetězcovou reakci: SYBR Green fluorescenční substrát, Forward primer a Reverse primer pro cílovou mRNA (10 mM), DEPC voda bez nukleas (Roche)
- Kit pro přípravu cDNA obsahující: Random hexamer primer, 5x reakční pufr, 10 mM mix dNTP; RiboLock inhibitor RNAás (20U/μl); M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/μl) (Gibco)
- Kit pro stanovení proteinů metodou BCA: roztok A (obsahuje BCA, *kyselinu bicinchoninovou* v 0,1 M NaOH). Roztok B (4% CuSO₄·6H₂O) (Sigma Aldrich)

- Lyzační pufr: Tris/HCl o pH 7,4, NaCl, 85% glycerol, Triton X-100, EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), EGTA (ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová), β -glycerolfosfát, fluorid sodný, pyrofosfát sodný, diethiotreitol, vanadičnan sodný, voda. Směs inhibitorů proteas – Protease Inhibitor Cocktail Powder (Sigma Aldrich).
- PBS (Phosphate Buffered Saline) – fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (Gibco)
- Persíran amonný (APS) (Sigma Aldrich)
- RNA Wash Buffer (ZymoResearch)
- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) médium pro kultivaci savčích buněk (Gibco)
- TBST pufr (Tris-Buffered Saline s Tween 20) (Sigma Aldrich)
- TEMED (N,N,NN-Tetramethylethylenediamin) (Sigma Aldrich)
- Temozolomidu a flubendazolu (Merck Life Science)
- Transfer Buffer blotovací pufr (Sigma Aldrich)
- TRIS (*tris*(hydroxymethyl)aminomethan) (Penta)
- TRIzolTM - roztok pro izolaci RNA (Gibco)

4.1.2 Přístrojové vybavení

- Buněčný CO₂ inkubátor (Binder)
- Cellometer Auto na počítání buněk (Nexcelom)
- Gel Logic zobrazovací zařízení pro výsledné bloty (Kodak)
- Laboratorní centrifuga – menší i větší s možností regulace teploty (Eppendorf)
- Laminární box s vertikálním prouděním (Verkon)
- Lightcycler96 pro Real-Time PCR (Roche)
- Mikroskop Olympus IX-70
- NanoDrop 2000 spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- Plastové sterilní boxy na drobné hlodavce (ve viváriu na LF HK)
- Spektrofotometr (Tecan)
- Třepaný inkubátor (tzv. třepačka) (Eppendorf)
- Vyhřívavý termoblok pro PCR (Eppendorf)
- Zdroj stejnosměrného napětí pro elektroforézu (120 V)

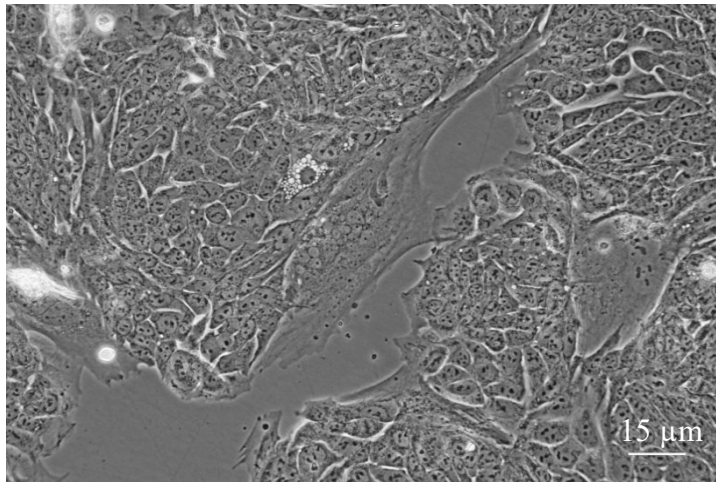
4.1.3 Pomůcky

- 96jamkové destičky (Gibco)
- EDTA zkumavky
- Injekční stříkačky a jehly pro aplikaci buněčné suspenze
- Laboratorní pomůcky pro základní laboratorní úkony
- Mikrozukavky (Eppendorf)
- Pipety různých velikostí (Eppendorf)
- Plastové nádoby s víčkem (Eppendorf)
- Pomůcky pro přípravu gelů na elektroforézu – nalévací stojánek, skla, skla se spacerem, spony, hřeben pro tvorbu jamek (Rotiphorese)
- PVDF membrána (Sigma Aldrich)
- Skalpel
- Stojánek pro elektroforézu, vana pro elektroforézu (Rotiphorese)
- Špičky různých velikostí (Eppendorf)
- Tlustý filtrační papír, blotovací houbičky

4.2 *Buněčné linie*

4.2.1.1 *HCT8*

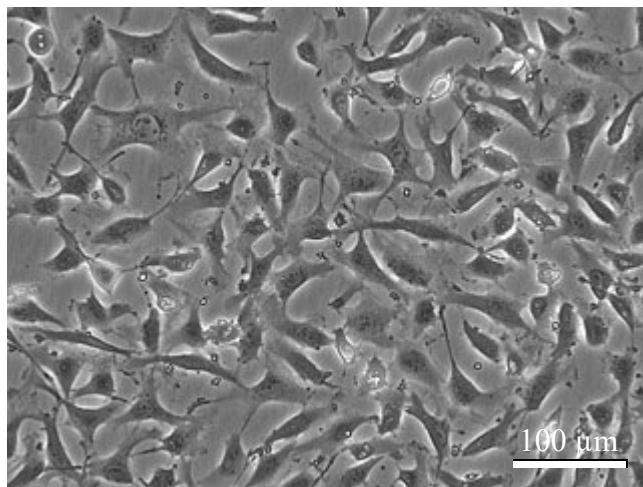
HCT8 (Obrázek 5) je adherentní buněčná linie izolovaná z adenokarcinomu tlustého střeva od 67leté ženy. Linie je tumorigenní – po subkutánní aplikaci buněčné suspenze do athymické myši vyroste tumor do 21 dní. Linie je pozitivní na karcinoembryonální antigen, alkalickou fosfatasu a keratin. HCT8 jsou uchovávány v kultivačních plastových sterilních láhvích při teplotě 37°C. Jako kultivační médium bylo zvoleno DMEM médium pro kultivaci s přísadkou L-glutaminu (4 mM roztok), glukosy (4500 mg/l), pyruvátu sodného (1 mM) a hydrogenuhličitanu sodného (1500 mg/l) v 10% bovinním fetálním séru (52).



Obrázek 5 Buňky linie HCT8 (zvětšení 40×)

4.2.1.2 EA.hy926

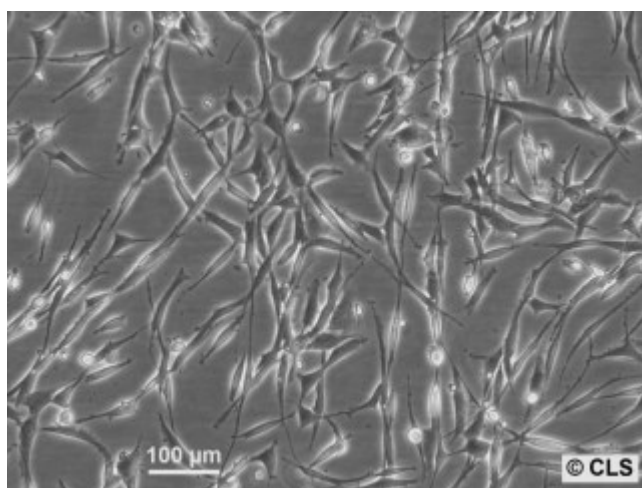
Stabilizovanou linii EA.hy926 představují endoteliální buňky (Obrázek 6). Byla vytvořena fúzí primárních humánních buněk pupečnickové venózní krve s thioguanin-rezistentními buněčnými klony linie A459. Charakteristickým znakem je přítomnost Weibel-Paladeho granul (53) v cytoplasmě, jež obsahují von Willebrandův srážecí faktor (VIII) a P-selektin – působky ovlivňující angiogenezi, hemostázu, rozvoj zánětlivých procesů. Linie je kultivována v kultivačním médiu DMEM s přidavkem L-glutaminu (4 mM roztok), glukosy (4500 mg/l), pyruvátu sodného (1 mM) a hydrogenuhličitanu sodného (1500 mg/l) v 10% bovinním fetálním séru při teplotě 37°C (54).



Obrázek 6 EA.hy926 (54)

4.2.1.3 U118MG

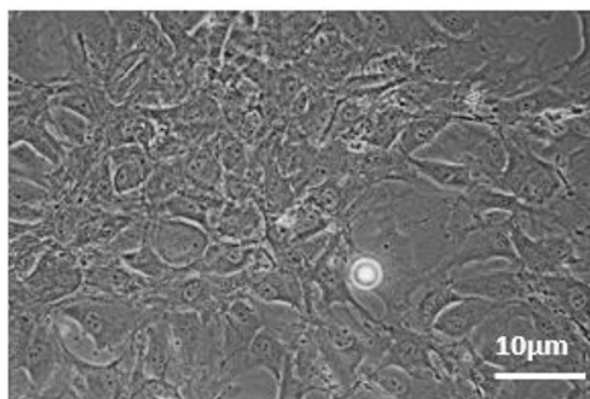
Stabilizovaná buněčná linie U118MG (Obrázek 7) odvozená z maligního glioblastomu multiforme izolovaná J. Pontenem a jeho kolektivem během let 1966 až 1969. Pochází od padesátiletého muže kavkazské rasy. Z morfologického hlediska jsou přítomné jak buňky glioblastomu, tak astrocyty. Buňky jsou pentaploidní, počet chromosomů se pohybuje od 110 do 115 a jsou přítomny rozličné strukturní chromosomální aberace. Linie je tumorigenní, po subkutánní injekci do athymické myši se začne tumor vyvíjet během jednadvaceti dní. (45) Základním médiem pro kultivaci je DMEM médium s přidavkem roztoku 4,5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu a 10% fetálního bovinního séra. Teplota kultivace je 37°C (45).



Obrázek 7 Linie U118MG (55)

4.2.1.4 GBM69

Primolinie GBM69 (Obrázek 8) je odvozena ze vzorku získaného od pacienta, muže, ročník narození 1970, operovaného ve Fakultní nemocnici Hradec Králové v roce 2021. U tohoto pacienta byla zjištěna nemutovaná forma IDH1. Buňky byly kultivovány při 37°C v plastových sterilních kultivačních láhvích v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Stav primolinie byl zkontrolován 2 dny po izolaci, každé tři dny bylo měněno médium do doby vytvoření ucelené adherentní vrstvy na povrchu láhve. K oddělení buněk od povrchu byl použit roztok trypsinu s EDTA vytemperovaný na 37°C (s dobou působení 5 až 10 min). Poté byly buňky opláchnuty RPMI kultivačním médiem s přidavkem 15% PBS a přeneseny do nové kultivační láhve. Experimenty byly provedeny na druhé, třetí až čtvrté pasáži buněk.



Obrázek 8 Buněčná linie GBM69. Zvětšení 400×.

4.2.1.5 Kultivace buněčných kultur

Odebraný vzorek tkáně obsahuje velké množství heterogenních buněk, takže je nejprve třeba vhodným postupem izolovat chtěné buňky. Tkáň se buď mechanicky či za pomoci enzymů rozruší. Poté se buňky izolují různými způsoby, např. odlišné typy buněk různě adherují na kultivační povrch; využitím selekčního media se zamezí růstu kontaminujícím nechtěným buňkám. Po izolaci vybraného typu buněk se za pomoci protilátek ještě detailněji určuje jejich přesný typ. Aby takto izolované buňky přežily, je nutno zvolit co nejvhodnější podmínky pro kultivaci – nejdůležitější je výběr složení vhodného kultivačního média, atmosféry, teploty (nejčastěji 37°C), povrchu kultivační nádoby. Převážná část buněčných linií roste na povrchu kultivační láhve – jsou tzv. *adherentní*. Některé se k povrchu nepřichycují a jedná se tak o tzv. *suspenní kultury* (44).

4.3 In vitro testování vzorků

4.3.1 Testování proliferace a viability buněk metodou WST-1

WST-1 test, neboli *Water Soluble Tetrazoline Salt*, je založen na redukci a enzymatickém štěpení tetrazolinového kruhu soli² na formazan. Reakce je katalyzována mitochondriálními dehydrogenasami živých buněk. Počet viabilních buněk je přímo úměrný množství růžového barviva formazanu, které je měřeno pomocí absorbance. Vzorky buněk byly pipetovány na 96ti jamkovou mikrotitrační destičku (do každé jamky 5 tisíc buněk/ 100 µl). Následně byly ovlivněny po dobu 48 hodin různými koncentracemi

² 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát

FLU a TMZ. Po uběhnuté době byly buňky opláchnuty PBS, do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l roztoku WST-1 (ředěno 1:20) a buňky byly dvě hodiny kultivovány. V posledním kroku byla na spektrofotometru změřena absorbance A (při λ 450 nm s referenční λ 650 nm).

4.3.2 Mikroskopie fázového kontrastu

Technika fázového kontrastu se využívá pro pozorování objektů, které kvůli jejich malé absorpci světla nelze pozorovat klasickým světelným mikroskopem (jádro, vakuoly). Tyto objekty se nazývají tzv. *fázové objekty* – od okolních objektů se liší jen velmi malou změnou indexu lomu světla. Paprsek procházející těmito objekty se láme jen nepatrně, světelnou vlnu posunuje pouze o fázi (nemění celou amplitudu elektromagnetického vlnění tak jako objekt viditelný) (56). Mikroskopie byla prováděna v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po ovlivnění TMZ 500 μ M a FLU 0,5 μ M mikroskopem Olympus IX-70 nastaveným na fázový kontrast. Buněčné linie U118MG, GBM69 byly pozorovány v kultivačních láhvích.

4.3.3 Izolace RNA z *in vitro* kultivovaných buněk

Princip: RNA se naváže na speciální povrch matrix kolonky, je promyta několika pufry a nakonec eluována vodou z kolonky pryč.

Buňky byly kultivovány v médiu ve sterilních kultivačních plochých kulatých miskách. V prvním kroku bylo médium odsáto odsávačkou, k buňkám byly přility 3 ml ledového PBS a obsah každé misky byl kývavými pohyby opláchnut od média. PBS bylo odsáto a k buňkám bylo připipetováno 200 μ l *TRIZOLu*, ve kterém byly buňky po dobu 2 minut lyzovány. Po slítí *TRIZOLu* byly buňky z misek staženy pomocí speciální stěrky a transportovány do 1,5ml zkumavek Eppendorf bez nukleas.

Ke vzorku buněk bylo přidáno stejné množství ethanolu, jaký byl objem vzorku. Překlápěním se vše promíchalo a celý obsah vzorku směsi ethanolu a lyzovaných buněk byl přepipetován do kolonek Zymo-Spin IIC Column, které byly vloženy do větších zkumavek, tzv. Collection Tube. Vzorky se poté nechaly zcentrifugovat po dobu 30 sekund, při 13 000 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byly kolonky dány do nových prázdných zkumavek (Collection Tube).

Do kolonek bylo přidáno 400 µl komerčního pufru *RNA Wash Buffer* a vzorky se nechaly opět zcentrifugovat (30 sekund, při 13 000 rpm a 4°C). Ze spodní části zkumavky Collection Tube byla vylita profiltrovaná tekutina.

Poté byla do 1,5ml zkumavky Eppendorf bez nukleas připravena směs DNAs a pufru *DNA Digestion Buffer*. Pro jeden vzorek bylo pipetováno 5 µl DNasy a 75 µl pufru *DNA Digestion Buffer*. Směs byla promíchána, přidána do každé kolonky a vzorky byly ponechány 15 minut při pokojové teplotě.

Ke vzorkům v kolonkách bylo přidáno 400 µl pufru *Direct Zol RNA PreWash* a kolonky se nechaly po dobu 30 sekund centrifugovat (13 000 rpm a 4 °C). Tekutina, která prošla při centrifugaci do spodní části větších zkumavek Collection Tube, byla vylita. Tato fáze byla provedena dvakrát.

Následně bylo ke vzorkům připipetováno 700 µl pufru *RNA Wash Buffer* a vzorky byly centrifugovány po dobu 2 minut (13 000 rpm, 4 °C). Kolonky byly následně přemístěny do předem připravených 1,5ml sterilních zkumavek Eppendorf bez nukleas.

Nakonec byla z kolonky izolovaná RNA vymyta DEPC vodou bez nukleas – podle množství lyzovaných buněk 30-50 µl na jednu kolonku, centrifugace 30 sekund (13 000 rpm, 4 °C).

Koncentrace izolované mRNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop 2000.

4.3.4 Stanovení koncentrace mRNA pomocí metody RT-qPCR

Metoda RT-qPCR kombinuje techniky RT (*reverzní transkripce*) s qPCR (*kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase*). Umožňuje tak měřením hladiny mRNA rychlou detekci změn genové exprese. Změny v expresi specifických genů jsou základním ukazatelem patofyziologických a diferenciacních změn v buňce. V prvním kroku je RNA templát za pomoci enzymu *reverzní transkriptasy* přepsán na jednovláknovou cDNA (*tzv. complementary DNA*). V druhém kroku je nově vzniklá cDNA amplifikována (zmnožena) v reálném čase a její množství je detekováno pomocí fluorescenční sondy (57).

Termín *polymerázová řetězcová reakce* označuje laboratorní techniku, kterou lze rychle zmnožit – tzv. amplifikovat – vybranou sekvenci DNA. Tato sekvence je dána použitými primery, které přisednou na specifické místo na jednovláknové DNA a enzym *Taq-*

DNA-polymerasa od nich pak ve směru od 5' k 3' konci syntetizuje dle komplementarity bázi nový řetězec – vzniká tak dvouvláknová DNA. Princip PCR tkví v cyklickém opakování tří základních fází: denaturace, annealing (nasedání primerů na templát) a syntéza DNA. Reakce PCR probíhá v 96 jamkové destičce v zařízení zvaném termocykler, které umí během několika sekund měnit teplotu o desítky stupňů Celsia. Reakce začíná úvodní denaturací, poté následuje *X* cyklů tří fází (v našem případě 45). Vše je ukončeno závěrečnou extenzí, která má zajistit, aby byly všechny produkty skutečně dosyntetizovány (58).

Denaturace: vysoká teplota 95 °C po dobu 10 sekund zajistí rozrušení všech vodíkových můstků mezi jednotlivými bázemi DNA a rozdělení jedné dvouřetězcové DNA na dvě jednořetězcové.

Annealing nebo-li nasednutí primerů: teplota se sníží na 55 °C (dle délky primeru a CG nukleosidů), což umožní specifické nasednutí primerů. Na tyto dvouvláknové úseky pak může přisednout *Taq-polymerasa*.

Syntéza DNA: termostabilní enzym *Taq-polymerasa* je aktivní při teplotě 72 °C, kdy nasedne na primery a připojuje dle komplementarity bázi volné nukleotidy k vlákně DNA (58).

Množství amplifikované cDNA je nakonec měřeno pomocí navázaného nespecifického interkalačního barviva *SYBR Green*.

4.3.4.1 Příprava cDNA

V prvním kroku byla na Nanodropu 2000 změřena koncentrace RNA s následným ředěním DEPC vodu na výslednou koncentraci 1 µg RNA v objemu 10 µl. V druhém kroku byla vytvořena směs A – do sterilní zkumavky bez nukleas bylo pipetováno 10 µl ředěného vzorku RNA a 1 µl *Random hexamer primeru* – celkový objem byl 11 µl. Poté byla směs A zhomogenizována pipetou, stočena v centrifuze a inkubována při teplotě 70 °C po dobu 5 min. Po vyndání vzorků z inkubátoru byla směs schlazena.

Během inkubace byla připravena směs B – pro jeden vzorek bylo pipetováno: 4 µl *5x reakčního pufru*, 2 µl směsi nukleotidů *10 mM dNTP mixu* (deoxyribonukleosidtrifosfátů), 1 µl *RiboLock RNase inhibitoru* (20U/µl), 2 µl *M-Mul V Reverse Transcriptasy* (20 U/µl). Směs B byla pořádně promíchána.

K 11 μl směsi A bylo pipetováno 9 μl směsi B (vznikla tak směs A+B), vše bylo řádně promícháno a poté inkubováno 5 min při pokojové teplotě, následně v inkubátoru 60 min při 37 °C. Nakonec byla reakce zakončena zahřátím na 70 °C po dobu 5 min.

4.3.4.2 PCR amplifikace jednovláknové cDNA

Vzorky směsi A+B byly ředěny dvěma způsoby:

První způsob se týkal specifických cílových genů: ředěno v poměru 1:5 pro cílovou mRNA amplifikaci – ke každému vzorku směsi A+B bylo připipetováno 80 μl DEPC vody a vzorky byly řádně zhomogenizovány pipetou.

Pro amplifikaci referenčních housekeepingových genů, která slouží jako kontrola mRNA amplifikace, byly vzorky naředěny v poměru 1:40. Do nových 0,5 ml sterilních zkumavek Eppendorf bez nukleas bylo odměřeno 45 μl DEPC vody (vody bez nukleas) a 5 μl ředěného vzorku směsi A+B. Vše bylo řádně promícháno pipetou.

Poté byla připravena směs C. Pro jeden vzorek bylo pipetováno: 25 μl *SYBR Green* fluorescenčního substrátu, 1 μl 10 mM *Forward primeru* pro cílovou mRNA, 1 μl 10 mM *Reverse primeru* pro cílovou mRNA a 13 μl DEPC vody bez nukleas.

Měření hladiny mRNA probíhalo v duplikátech pro každý vzorek. Do sterilních mikrozkušavek na 96ti jamkové destičce bylo odměřeno 20 μl směsi C a 5 μl vzorku (směsi A+B) a vše řádně promícháno. Jako negativní kontrola byla místo vzorku užitá DEPC voda bez nukleas. Nakonec byla destička vložena do Lightcycler96 Real Time PCR cykleru.

4.3.5 Stanovení proteinů metodou Western blotting

Technika zvaná Western blot umožňuje detekovat přítomnost i množství určitého specifického proteinu v biologickém materiálu. Skládá se ze tří po sobě jdoucích fází: elektroforetické separace proteinů na základě jejich hmotnosti (kDa), přenosu separovaných proteinů na membránu a detekce proteinů (59).

V experimentální části byla využita polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek (SDS-PAGE). Ionizační detergent dodecylsírán sodný (SDS) v kombinaci se zvýšenou teplotou denaturuje proteiny ve vzorku, obalí každou makromolekulu proteinu a udá tak všem proteinům záporný náboj, který je přímo úměrný

molekulové hmotnosti proteinu. Nabité proteiny pak při elektroforéze putují od záporně nabitě katody ke kladně nabitě anodě, přičemž malé proteiny putují rychleji a dochází tak k separaci na základě jejich molekulové hmotnosti (59, 60).

Separované proteiny jsou poté pomocí působení elektrického proudu z gelu přeneseny na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Na gel se umístí membrána, vrstva filtračního papíru, blotovací houbička a všechny vrstvy se sepnou mezi dvě elektrody. Proteiny putují napříč vrstvami směrem ke kladnému náboji a zachytí se na membráně. Poloha proteinů na membráně odpovídá jejich přesné poloze na gelu.

Dalším krokem je zablokování zbylých volných vazebných míst na membráně, aby se předešlo nespecifickému vázání protilátek vedoucímu ke zkreslení výsledků. K blokaci se používá 5% roztok mléka v TBST pufru.

Separované proteiny na membráně jsou nakonec detekovány chemiluminiscenčně pomocí primární a sekundární protilátky. Na protein se nejdříve specificky váže primární protilátka a na tu v dalším kroku sekundární protilátka nesoucí enzym katalyzující chemiluminiscenční reakci. Enzym křenová peroxidasa katalyzuje přeměnu dodaného chemiluminiscenčního substrátu na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením světelného signálu. Velikost signálu je přímo úměrná množství navázaného enzymu, a to je přímo úměrné množství specifického proteinu (59, 60).

4.3.5.1 Příprava buněčného lyzátu

Buňky byly kultivovány v médiu ve sterilních kultivačních plochých kulatých miskách. V prvním kroku bylo médium odsáto odsávačkou, k buňkám byly připipetovány 3 ml ledového PBS a obsah každé misky byl kývavými pohyby opláchnut od média. Poté bylo PBS opatrně odsáto. V dalším kroku bylo přidáno 100 až 150 μ l ledového lyzačního pufru s inhibitory proteas. Pufr se nechal působit cca 2 minuty. Buňky byly poté z jednotlivých misek setřeny speciální stěrkou a pipetou transportovány do 1,5ml zkumavek Eppendorf – zkumavky byly pro zajištění stability obsahu uchovávány na ledu v polystyrenovém boxu. Obsah zkumavek se pomocí injekční stříkačky zhomogenizoval a vzorky se nechaly stát 20 minut na ledu. Homogenát byl následně centrifugován při 13 000 rpm, 4°C po dobu 10 min. Po centrifugaci byl automatickou pipetou odebrán supernatant. U těchto vzorků se následně stanovila koncentrace bílkovin a byly použity pro detekci proteinů metodou Western blot.

4.3.5.2 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Principem bicinchoninové metody je redukce měďnatého iontu na měďný přítomným proteinem v alkalickém prostředí. Na redukci se podílí peptidová vazba, cystein, cystin, tryptofan a tyrosin. Měďný ion následně tvoří s kyselinou bicinchoninovou modrofialový chelátový komplex. Reakce se vyhodnocuje spektrofotometricky, absorbance je přímo úměrná koncentraci bílkovin ve vzorku.

V prvním kroku byly z 1% roztoku BSA (bovinní sérový albumin) připraveny dle tabulky 2 roztoky pro měření kalibrační křivky (v duplikátech).

Tabulka 2 Ředění roztoku 1% BSA pro přípravu kalibrační křivky.

	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Objem 1% roztoku BSA (μl)	Objem destilované vody (μl)
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

Roztoky vzorků byly taktéž připraveny v duplikátech. Základ vzorků tvořil buněčný lyzát připravený v bodě 4.3.4.1 v poměru 1:4 s destilovanou vodou, tedy 10 μl buněčného lyzátu a 40 μl destilované vody.

Poté byl smícháním roztoků A a B v poměru 50:1 vytvořen roztok C. Roztok A obsahoval NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH a roztok B se skládal z 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Obsah proteinů byl měřen v 96ti jamkové destičce. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 10 μl vzorku a 200 μl pracovního roztoku C. Vzorky byly řádně promíchány a destička byla poté 30 minut za stálého třepání (300 rpm) inkubována při teplotě 37 °C.

Absorbance A byla měřena při 562 nm a jako slepý vzorek sloužila destilovaná voda. Při vyhodnocování byl od hodnot absorbance vzorků odečten průměr absorbance slepého vzorku. V posledním kroku byla sestavena kalibrační křivka a pomocí ní byly vyhodnoceny dané vzorky.

4.3.5.3 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Vzorky bílkovin byly ředěny tak, aby se jejich výsledná koncentrace rovnala 1 µg/µl proteinů. K ředění byly využity 4xSDS vzorkový pufr a lyzační pufr s roztokem inhibitorů proteas.

K provedení elektroforézy byly podle tabulky 3 připraveny separační polyakrylamidové gely v koncentraci 7,5% k separaci proteinů o velké molekulové hmotnosti (36–94 kDa) a 10% k separaci proteinů o menší molekulové hmotnosti (16–68 kDa). Dle tabulky 4 byl připraven zaostřovací gel.

Tabulka 3 Složení separačních gelů (spodní gel) o tloušťce 1,5 mm.

	Objem materiálu pro 2 gely o koncentraci 7,5%.	Objem pro 2 gely o koncentraci 10%.
Redestilované voda	9,8 ml	8,1 ml
Roztok 1,5M pufru Tris-HCl o pH 8,8	5 ml	5 ml
Roztok AA s bisAA	5 ml	6,7 ml
10% roztok SDS	0,2 ml	0,2 ml

	Látky pro iniciaci polymerace	
Roztok APS	200 µl	200 µl
TEMED	16 µl	16 µl

Tabulka 4 Složení zaostřovacího 4% gelu (horní gel) o tloušťce 1,5 mm.

	Objem materiálu pro 2 gely.
Redestilovaná voda	6,1 ml
Roztok 1,5M pufru Tris-HCl o pH 8,8	2,5 ml
Roztok AA s bisAA	1,3 ml
10% roztok SDS	0,1 ml

	Látky pro iniciaci polymerace
Roztok APS	200 µl
TEMED	16 µl

V nalévacím stojánku byla sestavena skla pro přípravu gelu. Byl namíchán roztok pro přípravu spodního (separačního) gelu a ten byl pipetou nalit mezi skla do výšky asi 4,5 cm od spodního okraje. Roztok byl opatrně převrstven 200 μ l isobutanolu nasyceného vodou a ponechán 30 až 60 minut polymerovat. V dalším kroku byl isobutanol opatrně slit a byl namíchán roztok pro horní zaostřovací gel. Tento roztok byl následně pipetou nalit mezi skla až po horní okraj. Poté byl ihned do gelu zasunut hřeben pro vytvoření jamek a gel byl dále nechán 30 minut polymerovat.

Nařaděné vzorky se nechaly po dobu 5 minut povařit v termobloku (95 °C). Mezi tím byly opatrně vyjmuty gely z nalévacího stojánku, opláchnuty a byl z nich odstraněn hřeben. Poté byl s gely sestaven stojánek pro elektroforézu, který se vložil do vaničky. Dovnitř i zvenku stojánku byl nalit elektroodvodový pufr v takovém množství, aby byla celá aparatura pořádně ponořena. Do každé jamky gelu bylo pipetováno 30 μ l vzorku a do poslední jamky bylo nanášeno 5 μ l molekulárního standardu. Celá vanička se stojánkem byla umístěna do polystyrenové bedny a obsypána ledem. Elektrody byly připojeny ke zdroji (konstantní napětí 120 V). Zdroj byl vypnut v momentě, kdy čelo doběhlo na spodní okraj gelu.

4.3.5.4 *Imunobloting*

PVDF membrána byla aktivována ponořením do methanolu na 5 minut.

Po skončení elektroforézy byl z gelu odstraněn horní zaostřovací gel a od separačního spodního gelu byla odstraněna dolní část s modrým barvivem. Separační gel byl vložen do blotovacího pufru do uzavíratelné krabičky. Do stejného blotovacího pufru byla následně vložena i PVDF membrána. Do další krabičky s blotovacím pufrem byl namočen tlustý filtrační papír (2 ks pro jeden gel) a blotovací houbičky. Materiál se nechal ponořený 20 minut.

V dalším kroku byl postupně sestaven blotovací sendvič – 1 blotovací houbička, 1 silný filtrační papír, polyakrylamidový gel, PVDF membrána, 1 silný filtrační papír a 1 blotovací houbička. Při sestavování byly průběžně odstraňovány vzduchové bubliny, aby nebránily v přenosu proteinů. Blotovací sendvič byl vložen do blotovacího nástavce a vše bylo vloženo do vany, na jejíž dno bylo umístěno ledítko. Dále byla vana vložena do ledové lázně s cílem předejít přehřátí. Vana byla uzavřena, víko se připojilo ke zdroji

(napětí 200 V a proud 0,25 A). Po ukončení přenosu proteinů byla membrána opatrně vyjmuta pinzetou ven.

4.3.5.5 Chemiluminiscenční detekce proteinů

PVDF membrána byla dána do plastové uzavíratelné krabičky. Byla k ní přilita destilovaná voda na oplach a následně vylita. Poté bylo na membránu nalito přibližně 15 ml 5% roztoku mléka v TBST pufre s cílem blokovat zbývající volná místa na membráně. Krabička byla umístěna na kývačku na asi 2 hodiny a poté byl roztok mléka slit a membrána se opláchla destilovanou vodou. V další fázi následovalo zředění primární protilátky TBST pufrem s 2% BSA (dle instrukcí výrobce) a s tímto roztokem se nechala membrána přes noc inkubovat. Ráno se roztok primární protilátky slil a membrána se celkem šestkrát za sebou opláchla TBST pufrem, přičemž jeden oplach trval vždy přibližně 5 minut. V poslední fázi byla naředěna dle instrukcí výrobce sekundární protilátka TBST pufrem s 2% BSA a membrána se poté nechala s tímto roztokem na jednu až dvě hodiny inkubovat. Poté se roztok slil a membrána byla znovu šestkrát opláchnuta TBST pufrem (1 oplach = 5 minut).

Chemiluminiscenční detekce probíhala se substrátem *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*. Z krabičky s PVDF membránou byl slit TBST pufr a na povrch membrány byl pipetován takový objem detekčního reagentu, aby byla zcela pokryta – poté ponecháno 5 minut inkubovat. Membrána byla umístěna do přístroje Gel Logic, kde byla snímána intenzita luminiscence.

4.4 In vivo testování

Pro *in vivo* testování byly vybrány athymické imunodeficitní myši – samice Nude-Foxn1^{nu}, staré 6 týdnů, u kterých byly již dříve úspěšně implantovány buňky kolorektálního karcinomu. U všech pokusů byla proto jako pozitivní kontrola růstu použita adherentní kolorektální linie HCT8.

4.4.1 Implantace buněk

Nejdříve byla připravena buněčná suspenze na implantaci. Buňky byly pasážovány do kultivačního média, spočítány a naředěny na objemy, aby se jejich výsledná koncentrace rovnala pokynům rozpisu. Ve viváriu byly buňky stočeny při 1000×g po dobu 5 minut

při pokojové teplotě, po odsátí kultivačního média byly buňky naředěny sterilním PBS. S použitím celkového anestetika isofluranu bylo myším subkutánně injikováno 250 μ l buněčné suspenze získané z kultury lidských nádorových buněk. Pokud nebylo dáno jinak, každé myši byla suspenze injikována dvakrát – tj. do levého i pravého zadního boku. Nádory se nechaly růst maximálně po dobu 4 týdnů. Růst nádorů byl sledován 2 \times týdně, vždy v pondělí a čtvrtek, kdy byly zvířata přenesena do čistého kontejneru, byla jim vyměněna dieta a voda. Případný růst nádoru byl zjištěn pohmatem a jeho nárůst, stejně tak změna hmotnosti jednotlivých myší byly pravidelně zaznamenány. V případě, že došlo k výraznému zhoršení zdravotního stavu, byla myš neodkladně usmrcena. V případě, že nedošlo k hmatatelnému nárůstu nádorů, nebo ke zhoršení stavu zvířat, byla prodloužena doba růstu nádoru až do doby 4 týdnů.

4.4.1.1 Implantace buněk kolorektálního karcinomu HCT8 a kokultivovaných buněk HCT8 s EA.hy926

První experiment byl zaměřen na porovnání růstu samotné nádorové linie HCT8, které byly v dalších experimentech používány jako kontrola růstu GBM nádorů, a linie kokultivované s endoteliálními buňkami EA.hy926.

Dvěma myším byla implantována s.c. z levé strany boku suspenze 3 miliony buněk HCT8/250 μ l a z pravé strany boku 3 miliony kokultivovaných buněk HCT8 a EA.hy926/250 μ l.

4.4.1.2 Implantace buněčné kultury U118MG

V dalším experimentu jsme se již zaměřili na samotné buňky GBM. Nejprve byly myši rozděleny do 3 skupin po 4 myších. Buňky U118MG byly subkutánně injikovány do pravého a levého boku každé myši ve třech různých koncentracích: 1 milion; 2,5 milionu a 5 milionů buněk. Po 14 dnech růstu nádorů se z každé skupiny odebrala jedna myš a té byl každodenně po dobu 14 dnů podáván sondou FLU v dávce 25 mg/kg. 24 hodin po podání poslední dávky byly myši usmrceny. Cílem pokusu bylo zjištění ideální koncentrace buněčné suspenze pro růst nádorů a zjištění účinku navržené dávky FLU.

4.4.1.3 Implantace buněčné linie U118MG a primokultury GBM69

Pro pokus bylo použito šestnáct myší, které byly rozděleny do dvou skupin. *Skupina A:* dvanácti myším bylo v jednom vpichu do levé a v druhém vpichu do pravé strany podáno

250 μ l buněčné suspenze (koncentrace 3 mil. buněk/250 μ l) stabilizované buněčné linie U118MG. Použitá koncentrace vycházela z výsledků růstu nádorů z předchozího experimentu. *Skupina B*: na základě zjištění exprese markeru kmenovosti CD133⁺ u primolinie GBM69 bylo čtyřem myším po jednom vpichu (250 μ l) injikováno 1,5 milionu buněk primokultury GBM69.

4.4.2 Podávání cytostatik sondováním

Po dobu čtrnácti dnů byly vybraným myším (dle rozpisu) podávány orální nerezovou sondou cytostatika: temozolomid o koncentraci 0,9 mg/kg, flubendazol o koncentraci 10 mg/ml, nebo 25 mg/ml. Léciva byla ředěna roztokem methylcelulózy. Myš byla opatrně uchopena, přidržela se jí hlava a rychlým hmatem jí byla zavedena do žaludku sonda. Množství podávaného cytostatika (100 μ l) bylo přesně odměřeno pomocí injekční stříkačky, na kterou byla sonda nasazena. Myším z kontrolní skupiny byla podána methylcelulóza.

4.4.3 Ukončení pokusu

Na konci pokusu byly myši usmrceny předávkováním inhalačním anestetikem isofluranem (5% koncentrace po dobu \geq 5 minut). Po usmrcení byly odebrány cílové tkáně – každý tumor byl rozdělen na tři části: pro histopatologickou analýzu (posouzení růstu nádoru, případně metastáz) byla první část tkáně odebrána do 4% formaldehydu a uchovávána při pokojové teplotě. Druhá část tumoru sloužila pro analýzu RNA, třetí část tumoru pro WB analýzu – druhá a třetí část byly vloženy do prázdných zkumavek a zamraženy na -80°C . U všech myší byla zároveň odebrána plná krev do K₃EDTA zkumavek, která byla centrifugací zpracována na plazmu a byla taktéž uchována v -80°C . Dále byly odebrány srdce, játra a plíce pro kontrolu morfologie těchto orgánů a pro zjištění případných metastáz v těchto orgánech. Jednotlivé myši s nádorem byly zároveň vyfoceny.

4.4.4 Zpracování vzorku z odebraného tumoru – izolace RNA

Zpracování vzorku lze pro přehlednost rozdělit dle (61) do několika fází:

1. homogenizace nádorové tkáně – její rozrušení,
2. separace RNA do vodné fáze roztoku,
3. zachycení RNA na matrix speciální kolony

4. promývání matrix kolonky – čištění zachycené RNA
5. eluce RNA z matrix kolonky.

Princip: vzorky jsou homogenizovány s komerčním RiboEx – jednofázovým roztokem obsahujícím fenol a guanidinovou sůl, který lyzuje buňky, vyvazuje z lyzátu proteiny a inaktivuje nukleasy. Po homogenizaci tkáně, přidání chloroformu a centrifugaci se vzorek separuje na vodnou a organickou fázi. RNA a DNA jsou díky svým polárním strukturám rozpuštěny ve vodné fázi, proteiny se díky jednotlivým aminokyselinám o různé polaritě hromadí na rozhraní vodné a organické fáze. K vodné fázi s RNA je přidán RBI pufr – RNA vázající pufr – a směs se naváže na matrix kolonky. Po promytí vzorku SW1 a RNW pufrem, je RNA z kolonky vyeluována RNase-free vodou (61).

Rotor z homogenizátoru TissueLyser byl předem vychlazen v mrazáku na -80°C . Centrifuga byla nastavena na $12,000\times g$, 15 min, vychlazená na 4°C (centrifuga Eppendorf). Vzorky tumoru byly přeneseny do 2ml zkumavek (Eppendorf, PCR clean), bylo přidáno cca 200 μl RiboEx a do každé zkumavky byla dána jedna homogenizační kulička.

Zkumavky byly vloženy do rotoru, rotor do homogenizátoru a byl spuštěn následující program: Oscilační frekvence 1/s – 25; čas 1 min. Po skončení byl každý vzorek zkontrolován, jestli už je dostatečně zpracovaný (zda nezůstávají v roztoku kusy tkáně). Pokud ještě kusy tkáně zbývaly, program byl spuštěn ještě jednou. Po homogenizaci byly vzorky 5 min inkubovány při pokojové teplotě, a nakonec z nich byla vyndána homogenizační kulička.

Ke vzorkům se přidalo 200 μl chloroformu a směs se nechala inkubovat 2 minuty při pokojové teplotě. Následně se vzorky centrifugovaly při $12,000\times g$ 15 min (4°C). Vzorek se separoval na vodnou a organickou fázi. Vodná fáze každého vzorku byla přenesena do nových zkumavek (1,5ml Eppendorf, safe lock, PCR clean).

V dalších krocích byly použity pufrы a zkumavky/kolonky z balení *Kit Hybrid-R*. K vodné fázi se přidal stejný objem RBI pufru a obsah se promíchal překlápěním zkumavek. Tato směs byla přenesena na horní část zkumavky (minispin column) a poté centrifugována při $12,000\times g$, 30 s.

Ze spodní části kolonky byla vylita profiltrovaná tekutina a na horní část kolonky bylo napipetováno 500 μl SW1 pufru a vzorky byly centrifugovány při $12,000\times g$, 30 s. Ze

spodní části kolonky byla znovu vylita profiltrovaná tekutina a na horní část kolonky bylo napipetováno 500 μ l RNW pufru, vše znovu centrifugováno při 12,000 \times g, 30 s.

Nakonec byly vzorky centrifugovány ještě jednou při 12,000 \times g 1 minutu. Poté bylo na horní část kolonky nanášeno 50–100 μ l DEPC vody (podle velikosti vzorku), necháno stát po dobu 1 minuty, a nakonec centrifugováno při 12,000 \times g, 1 min.

4.4.5 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemická analýza (IHC) umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraných molekul *in situ*. Odebrané části nádorů byly fixovány ve 4% formaldehydu a byly zpracovány v parafinové tkáňové bločky, které byly následně nařezány na 2 až 3 μ m tenké plátky. Jako primární protilátky použité pro následnou analýzu byly vybrány protilátky proti ki67, N-kadherinu a IDH1. Navazování protilátek na specifické antigeny probíhalo v přístroji *Ventana Benchmark Ultra machine* za využití detekční sady daných protilátek. V posledním kroku byly plátky barveny kontrastní látkou hematoxylinem. Sklíčka byla analyzována světelnou mikroskopií.

4.5 Statistická analýza

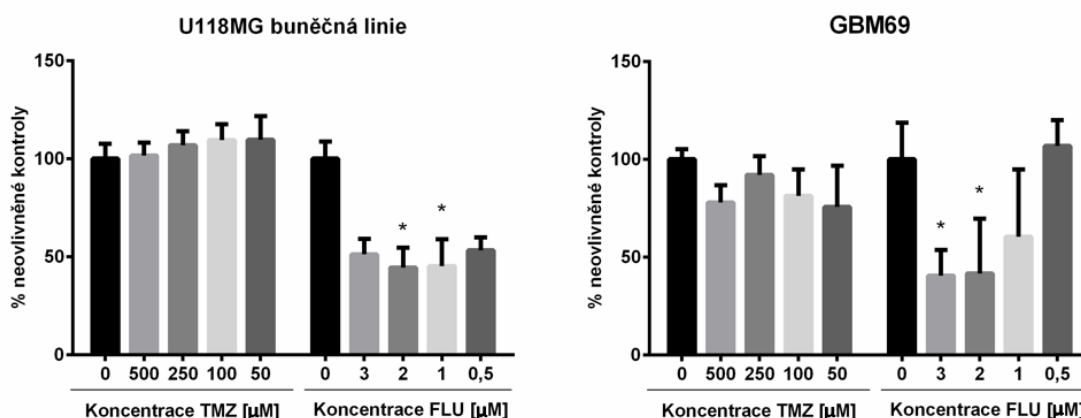
Naměřená data jsou uváděna jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka (SD) z minimálně dvou nezávislých experimentů. Data byla analyzována v programu GraphPad Prism, ve kterém byla statisticky vyhodnocena pomocí tzv. dvoucestné analýzy rozptylu (Two-way ANOVA) a Bonferroniho korekce. Statistická významnost (u dat vyjádřena jako *) odpovídá hladině spolehlivosti $p < 0,05$.

Hodnota IC₅₀ u WST-1 analýzy odpovídá koncentraci léčivé látky, která snížila viabilitu buněk o 50 %. Hodnoty IC₅₀ byly vyhodnoceny pomocí statistické metody nelineární regrese.

5. VÝSLEDKY

5.1 Vliv FLU a TMZ na proliferaci a viabilitu buněk

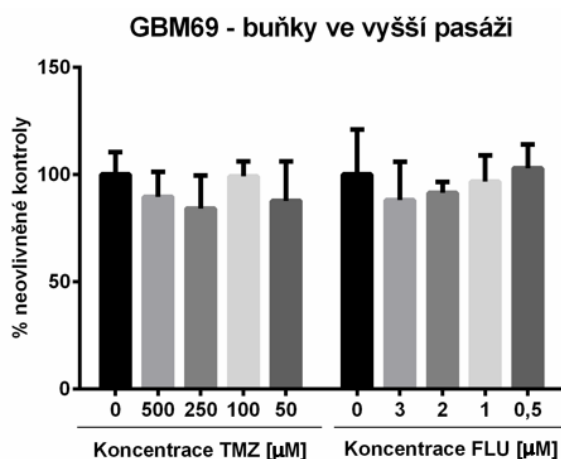
Vliv flubendazolu a temozolomidu na proliferaci buněk byl hodnocen pomocí WST-1 analýzy. Temozolomid byl použit jako pozitivní kontrola pro hodnocení inhibice proliferace (jedná se o léčivo 1. volby) pro porovnání účinku FLU na buňky glioblastomu. Obě léčivé látky byly zkoušeny v několika různých koncentracích (Obrázek 9) na stabilizované buněčné linii U118MG a primokultuře GBM69 odvozené ze vzorku od pacienta operovaného ve Fakultní nemocnici Hradec Králové v roce 2021. FLU na rozdíl od TMZ inhiboval proliferaci a viabilitu buněk jak u stabilizované buněčné linie, tak i u primokultury a jeho antiproliferativní účinek byl podstatně výraznější.



Obrázek 9 Stanovení počtu živých nádorových buněk U118MG a GBM69 po ovlivnění TMZ a FLU v různých koncentracích. * $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola

Nevyšší účinnost u linie U118MG byla zaznamenána u koncentrace 2 μM FLU, což se projevilo snížením počtu živých buněk na 48,27 % oproti kontrole. Druhou nejvyšší účinnost u stabilizované linie měla koncentrace 1 μM FLU. Oproti tomu u primokultury GBM69 byla naměřena nejvyšší citlivost na koncentraci 3 μM FLU (pokles počtu viabilních buněk na 40,58 %) a 2 μM FLU (pokles na 41,72 %).

U primolinie GBM69 bylo navíc zjištěno, že u buněk se zvyšující se pasáží (Obrázek 10) se mění jejich citlivost na obě léčiva – citlivost primolinie na FLU se snižovala, citlivost na TMZ zůstávala skoro stejná.



Obrázek 10 Viabilita buněk ve vyšší pasáži (primolinie GBM69) a její změny po ovlivnění různými koncentracemi TMZ a FLU.

5.2 Stanovení IC_{50} u U118MG a GBM69

Po provedení měření vlivu různých koncentrací FLU a TMZ na proliferaci a viabilitu buněk glioblastomu byla vypočtena střední inhibiční koncentrace (tzv. IC_{50}). Získané výsledky jsou prezentovány v Tabulce 5.

Tabulka 5 Hodnota IC_{50} u buněk U118MG a GBM69

	IC_{50}	
	TMZ [μ M]	FLU [μ M]
U118MG	1468,0	2,1
GBM69	3056,0	1,3

Jak již bylo ukázáno v Obrázek 9, citlivost k FLU byla statisticky vyšší než k TMZ u obou testovaných buněčných linií, výraznější byla účinnost u primokultury GBM69.

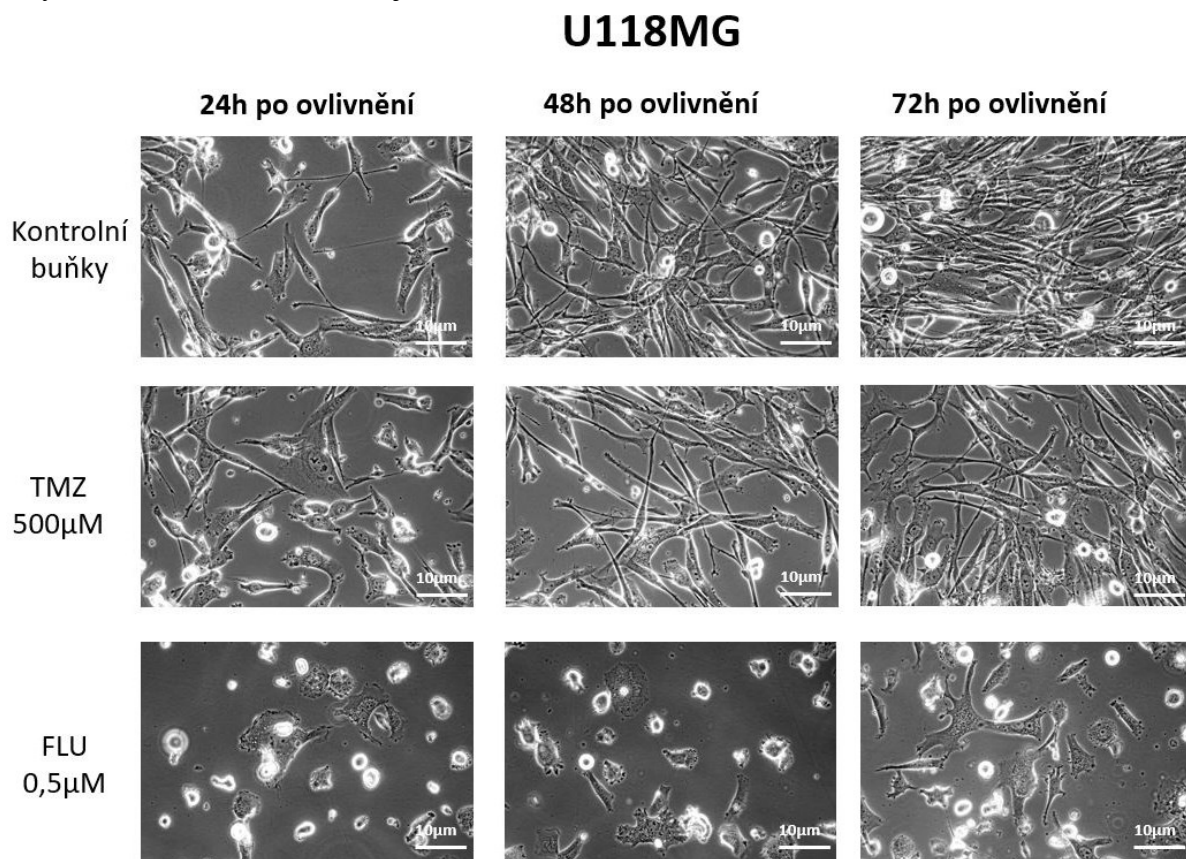
U buněk GBM69 ve vyšší pasáži se citlivost k FLU snižovala (Obrázek 10) a hodnotu IC_{50} u nich nebylo možné stanovit.

5.3 Morfologické změny po ovlivnění FLU a TMZ

U stabilizované buněčné linie U118MG byly zaznamenány největší změny v morfologii buněk po ovlivnění FLU. Živé buňky U118MG jsou protáhlé, tenké a adherované k povrchu. FLU vazbou na β -tubulin zpomaluje buněčný růst a proliferaci buněk, způsobuje řadu morfologických změn; buňka následně vstupuje do apoptózy a umírá (7).

V intervalech 24 a 48 hodin po aplikaci 0,5 μM FLU docházelo k apoptóze buněk (Obrázek 11). Buňky po smrti ztrácejí schopnost adheze, dochází ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra a buňky samotné – buňky vypadaly vizuálně menší a nabyly kulatého tvaru. Po 72 hodinách část buněk, která přežila účinek FLU, pokračovala v růstu, avšak s rozdílnou morfologií oproti kontrole.

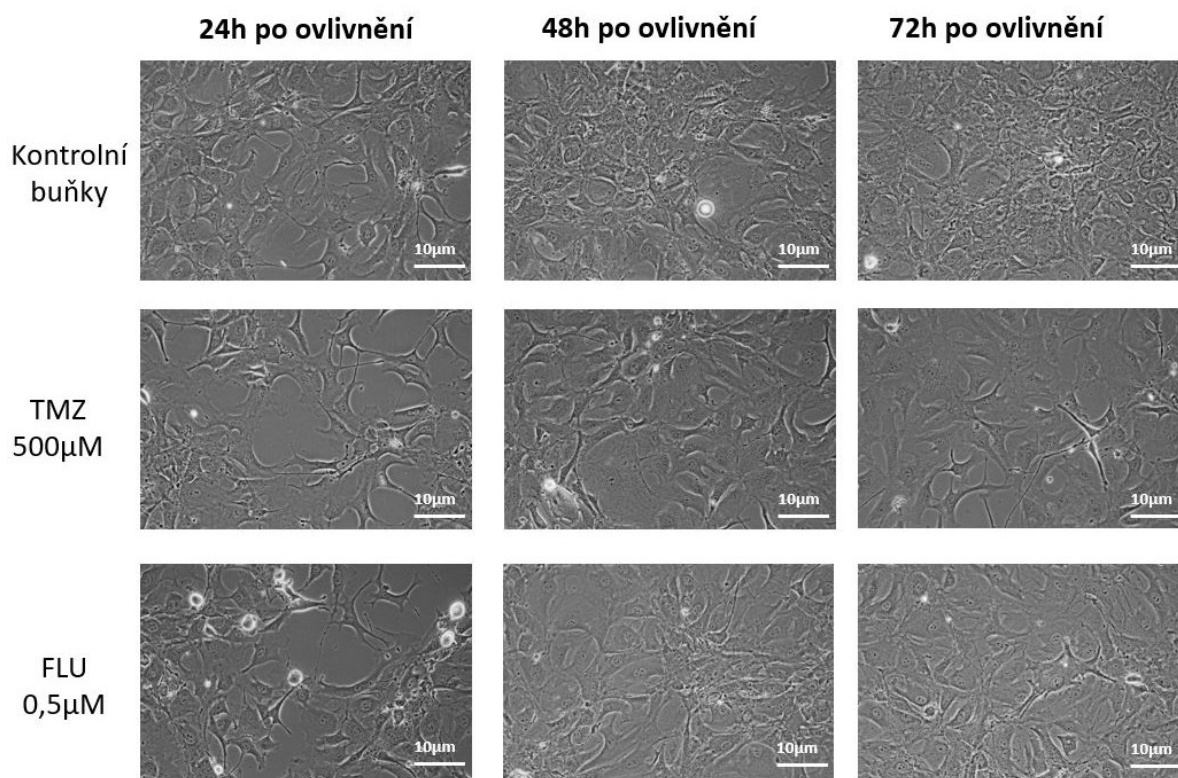
Po působení 500 μM TMZ byly pozorovány jen mírné morfologické změny. Část buněk byla usmrcena a změnila svůj tvar.



Obrázek 11 Fázový kontrast U118MG po ovlivnění TMZ a FLU v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po ovlivnění léčivy. Zvětšení: 400 \times .

U primolinie GBM69 (Obrázek 12) byly největší morfologické změny zaznamenány po 24 hodinách od ovlivnění FLU i TMZ. U vzorku s 0,5 μM FLU lze taktéž pozorovat usmrcené buňky, které ztratily schopnost adheze a nabyly vizuálně menšího a zakulaceného tvaru. Na fotografii 48 a 72 hodin po ovlivnění FLU pokračovaly přeživší buňky v růstu s morfologickými odlišnostmi oproti kontrole. Po působení 500 μM roztoku TMZ byly pozorovány jen mírné morfologické změny.

GBM69



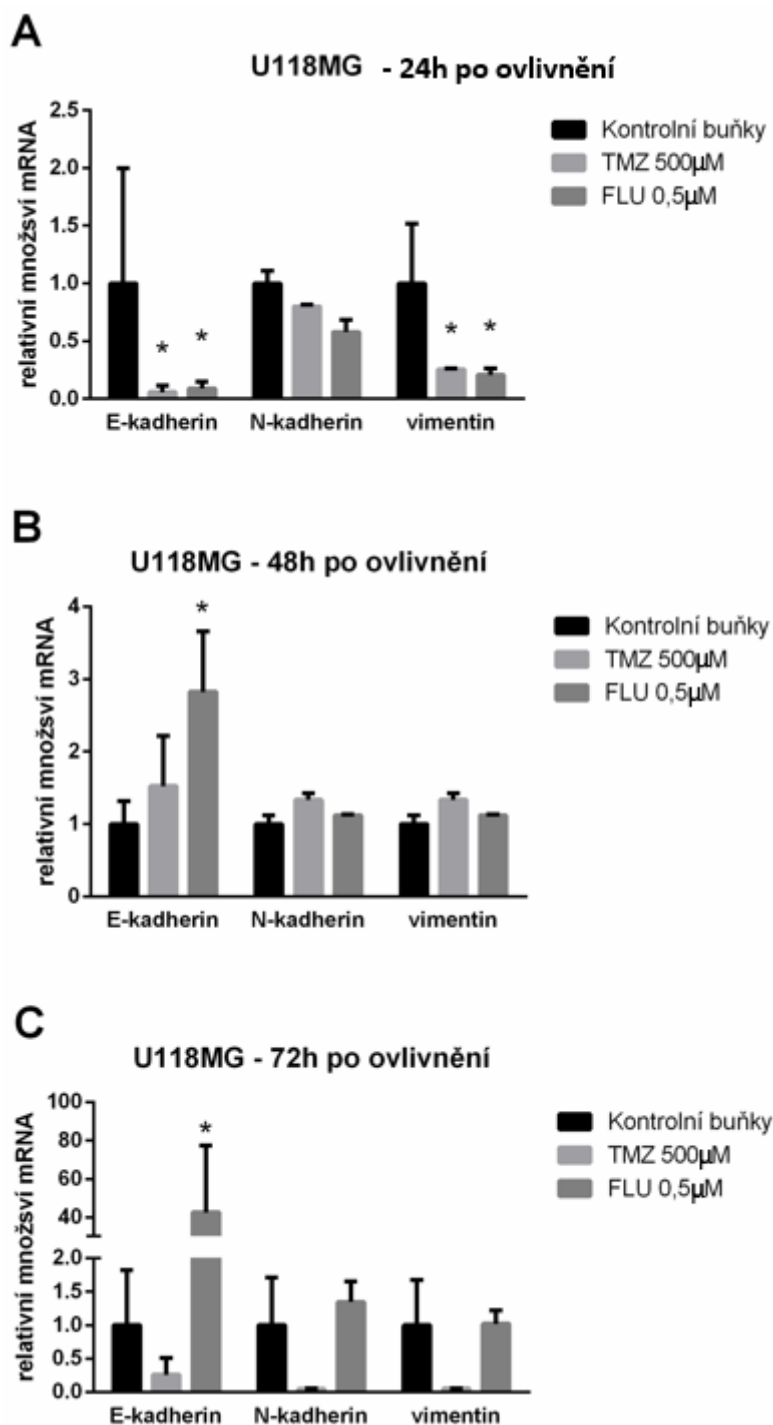
Obrázek 12 Fázový kontrast primolnie GBM69 po ovlivnění TMZ a FLU v časových intervalech 24, 48 a 72 hod po ovlivnění. Zvětšení: 400×.

5.4 Stanovení množství mRNA a zjištění vlivu FLU na expresi EMT markerů

Pomocí metody RT-qPCR byly pozorovány změny množství mRNA vybraných EMT markerů (E-kadherin, N-kadherin, vimentin), které doprovázejí proces kancerogeneze. Hladiny mRNA byly stanoveny jak u kontrolních vzorků buněk (bez ovlivnění léčivy), tak u vzorků ovlivněných TMZ a FLU.

Buňky U118MG byly ovlivněny TMZ 500 μ M a FLU 0,5 μ M po dobu 24, 48 a 72 hodin. Zvolené koncentrace a časové intervaly vycházely z předchozí analýzy stanovení citlivosti linie na daná léčiva a morfologických změn sledovaných pomocí fázového kontrastu. Po 24hodinovém působení TMZ i FLU lze pozorovat výrazné snížení hladin E-kadherinu a vimentinu, které je statisticky významné. V dalších časových intervalech byl zaznamenán nárůst množství mRNA E-kadherinu po ovlivnění FLU, zatímco u TMZ dochází nejprve ke zvýšení exprese tohoto markeru, následně po 72 hodinách ovlivnění dochází k jejímu snížení. Po 48 hodinách ovlivnění TMZ taktéž došlo u buněk U118MG k zvýšené produkci mRNA N-kadherinu a vimentinu, zatímco po 72 hodinách ovlivnění

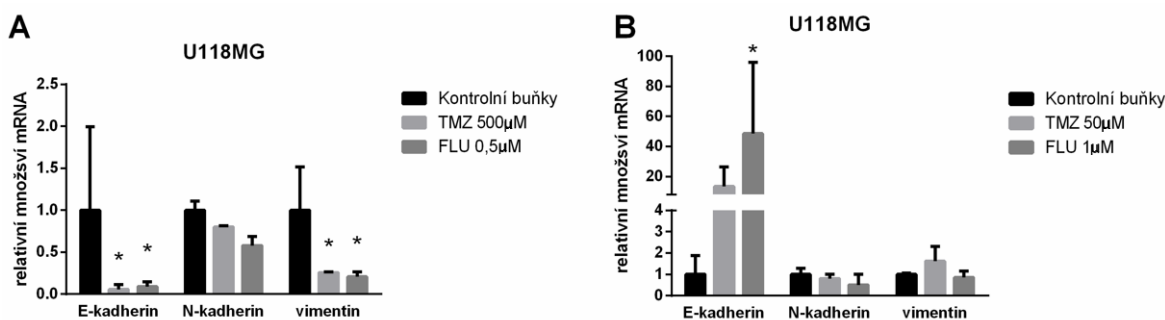
byly u vzorků s TMZ zjištěny minimální hladiny všech markerů, tyto změny však nebyly statisticky významné. Hladina N-kadherinu a vimentinu po delším ovlivnění FLU (48h a 72h) zůstává konstantní a nedochází k signifikantním změnám oproti kontrolním buňkám (Obrázek 13).



Obrázek 13 Stanovení relativního množství jednotlivých markerů na úrovni mRNA metodou RT-qPCR u buněk stabilizované buněčné linie U118MG ovlivněných TMZ a FLU v časových intervalech 24, 48 a 72 hod po ovlivnění. * $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola

V rámci porovnání vlivu vyšších a nižších koncentrací vybraných léčiv byly dále buňky U118MG ovlivněny také TMZ o nižší koncentraci (50 μ M) a FLU o vyšší koncentraci (1 μ M) po dobu 24 hodin. Vybrané koncentrace byly zvoleny na základě testu viability a proliferace buněk. Množství molekuly E-kadherinu bylo po podání nižší dávky FLU sníženo, avšak po podání vyšší koncentrace FLU došlo k jeho statisticky významnému navýšení. Vyšší koncentrace FLU dále nesignifikantně snížila hladinu N-kadherinu, u vimentinu po jejím použití nebyly pozorovány žádné výrazné změny oproti kontrolním buňkám. V porovnání s tím nižší koncentrace FLU způsobila statisticky významné snížení mRNA vimentinu.

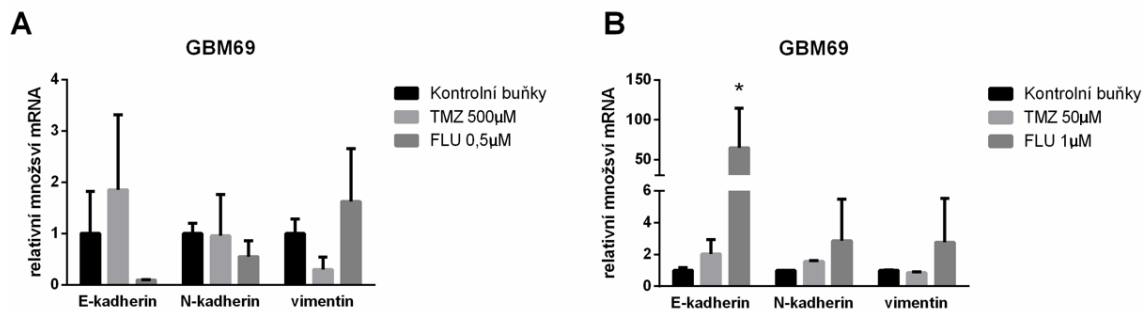
Co se týče TMZ, po aplikaci 500 μ M roztoku se signifikantně snížila transkripce mRNA E-kadherinu i vimentinu, při použití slabšího 50 μ M roztoku nedošlo k statisticky významným změnám (Obrázek 14).



Obrázek 14 Porovnání exprese EMT markerů u linie U118MG po ovlivnění různými koncentracemi TMZ a FLU po dobu 24 hod. * $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola

U buněk primokultury GBM69 byl taktéž zkoumán vliv roztoků TMZ o koncentracích 50 μ M, 500 μ M a FLU o koncentracích 0,5 μ M a 1 μ M po dobu 24 hodin. Z důvodu malého množství materiálu jsme analýzu provedli pouze v jednom časovém intervalu. I u GBM69 lze pozorovat statisticky významně zvýšenou hladinu E-kadherinu po ovlivnění vyšší koncentrací FLU a oběma koncentracemi TMZ.

Po ovlivnění vyšší koncentrací FLU bylo dále zaznamenáno mírné zvýšení množství mRNA N-kadherinu a vimentinu, zatímco po ovlivnění nižší koncentrací FLU byl pozorován útlum v produkci E-kadherinu a N-kadherinu, ačkoli tyto změny exprese nebyly statisticky významné (obrázek 15).

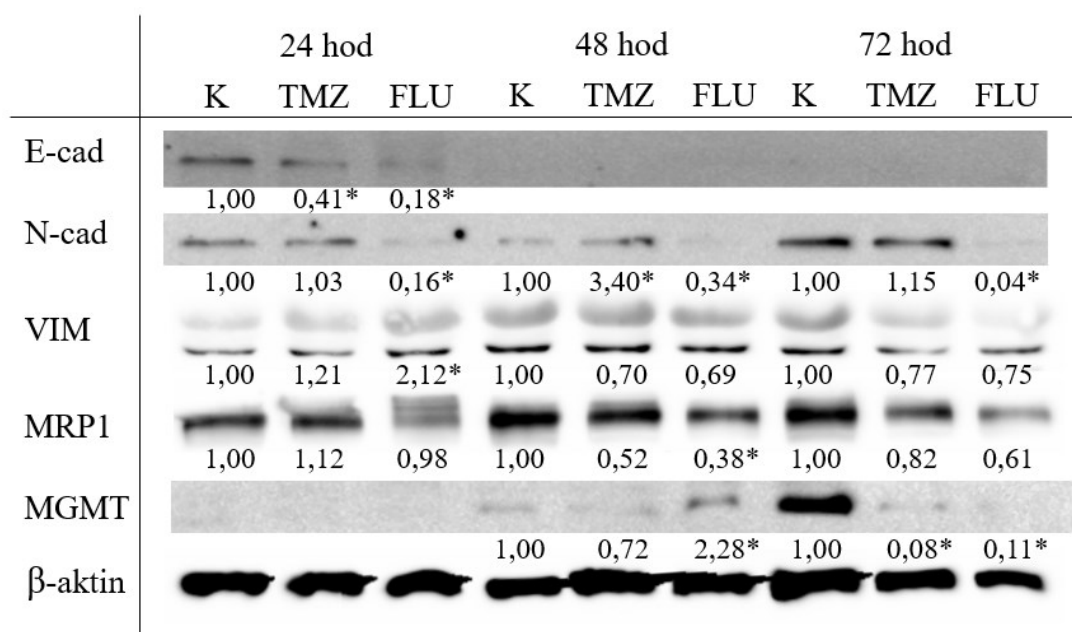


Obrázek 15 Porovnání exprese EMT markerů u primokultury GBM69 po ovlivnění různými koncentracemi TMZ a FLU po dobu 24 hod. * $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola

5.5 Ovlivnění množství proteinů zapojených do procesu EMT a procesu rezistence

Co se týče markerů EMT, u vzorků ovlivněných FLU po 24 hodin byla zaznamenána snížená exprese E-kadherinu a N-kadherinu, exprese vimentinu se naopak oproti kontrole dvakrát zvýšila. Po ovlivnění TMZ došlo po 24 hod k výraznému snížení hladiny E_kadherinu. Po 48 a 72 hod nebyly hladiny E-kadherinu detekovány v kontrolních ani ovlivněných vzorcích. 48 a 72 hodin po působení FLU lze pozorovat výrazné snížení hladiny N-kadherinu (Obrázek 16).

Pokud jde o markery rezistence, k významnému snížení hladin MRP-1 došlo pouze 48 hod po ovlivnění FLU, naopak hladina MGMT byla ve stejném časovém intervalu po ovlivnění FLU dvakrát vyšší oproti neovlivněné kontrole. Významný pokles hladin MGMT byl zaznamenán po 72 hod od ovlivnění FLU i TMZ (Obrázek 16).

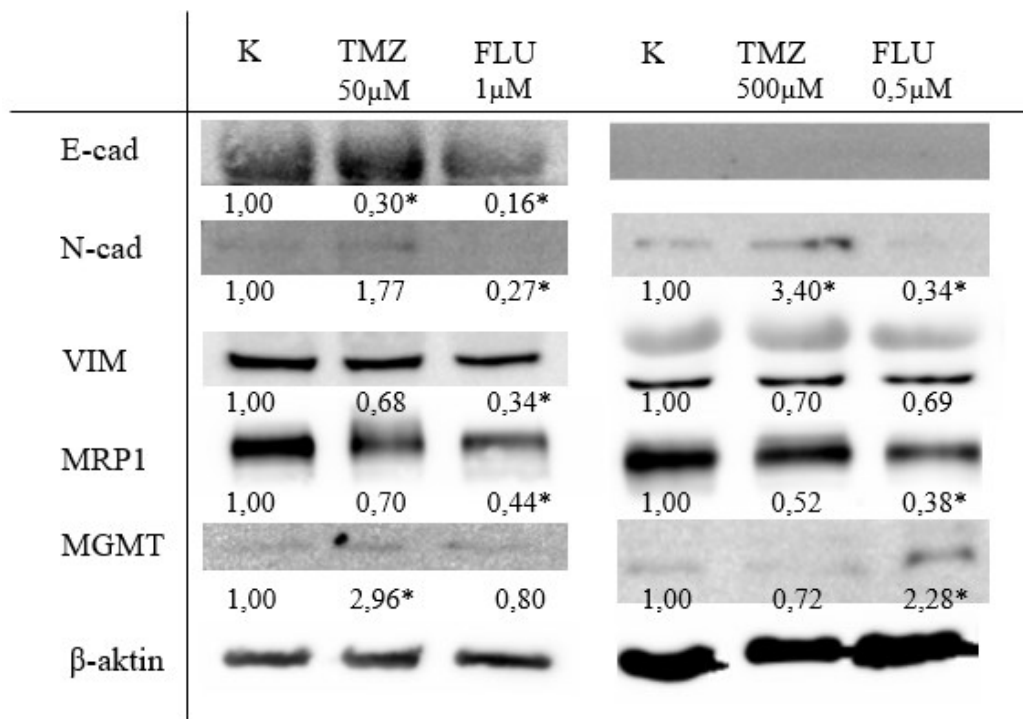


Obrázek 16 Porovnání množství proteinů zapojených do procesu EMT (E-kadherin, N-kadherin, vimentin) a markerů rezistence (MRP1, MGMT) v časových intervalech 24, 48 a 72 hod u buněčné linie U118MG po ovlivnění TMZ 500 μ M a FLU 0,5 μ M. β -aktin byl použit jako housekeepingový protein. Čísla pod bandy představují relativní proteinovou expresi vztahovanou ke kontrole. (* $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola)

Hladiny proteinů zapojených do procesu EMT a proteinů souvisejících s rezistencí jsme dále vyhodnocovali i po ovlivnění 50 μ M TMZ a 1 μ M FLU. Cílem bylo zjištění a porovnání účinků nižší a vyšší koncentrace léčiv (Obrázek 17). U vzorků ovlivněných vyšší koncentrací FLU (1 μ M) si lze taktéž všimnout statisticky významného snížení množství všech EMT markerů, hladina proteinu E-kadherinu byla u této koncentrace

trochu vyšší. 1 μM FLU také stejně jako 0,5 μM FLU snížil expresi markeru rezistence MRP-1.

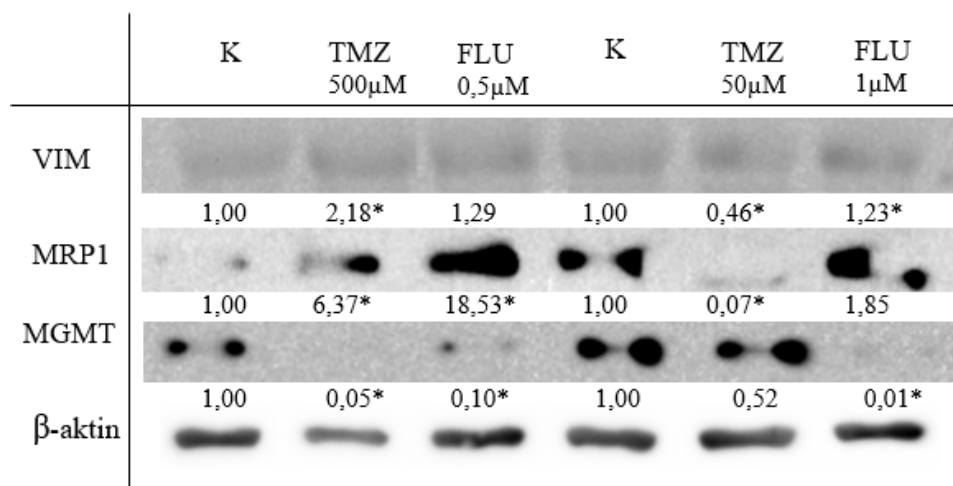
TMZ o koncentraci 50 μM snížil hladinu E-kadherinu o něco méně než 500 μM koncentrace, a naopak u něj byla detekována statisticky významně zvýšená hladina MGMT markeru rezistence.



Obrázek 17 Porovnání hladin proteinů zapojených do procesu EMT (E-kadherin, N-kadherin, vimentin) a markerů rezistence (MRP-1 a MGMT) při působení různých koncentrací TMZ (50 a 500 μM) a FLU (0,5 a 1 μM) u buněčné linie U118MG 48 hodin po ovlivnění. β -aktin byl použit jako housekeepingový protein. Čísla pod bandy představují relativní proteinovou expresi vztahenou ke kontrole. (* $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola.)

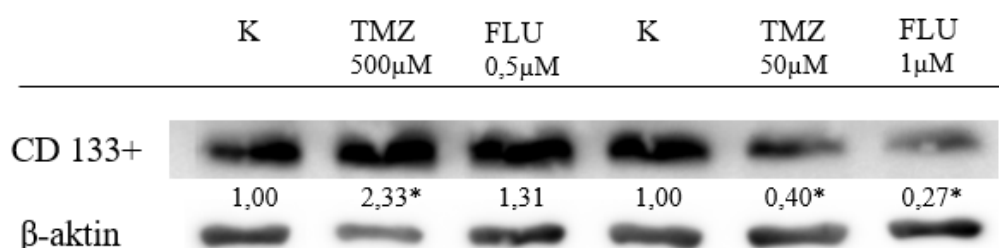
U primolinie GBM69 jsme měli omezené množství materiálu, a proto jsme pro testování hladin EMT markerů a markerů rezistence zvolili pouze jeden časový interval (48 hod) při porovnání dvou různých koncentrací TMZ a FLU. Co se týče markerů EMT, podařilo se nám detekovat pouze vimentin, množství E- a N-kadherinu na úrovni proteinu nebylo námi použitou metodou zjištěno. Hladinu vimentinu snížil pouze TMZ v nižší koncentraci (50 μM), a naopak obě vyšší koncentrace TMZ a FLU (TMZ 500 μM a FLU 1 μM) hladiny vimentinu zvýšily. U markeru rezistence MRP-1 bylo detekováno statisticky významné zvýšení po ovlivnění TMZ 500 μM a FLU 0,5 μM , naopak po ovlivnění nižší koncentrací TMZ (50 μM) lze pozorovat minimální hladinu tohoto

markeru. Množství proteinu MGMT bylo po aplikaci roztoků TMZ 500 μ M, FLU 0,5 μ M a 1 μ M oproti kontrole minimální (Obrázek 18).



Obrázek 18 Porovnání exprese proteinů EMT markeru vimentinu a markerů rezistence (MRP-1, MGMT) při působení dvou různých koncentrací TMZ (50 a 500 μ M) a FLU 0,5 a 1 μ M u primolinie GBM69 48 hodin po ovlivnění. Čísla pod bandy představují relativní proteinovou expresi vztahovanou ke kontrole. (* $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola, zkratky markerů viz. text)

Marker CD133⁺ je charakteristický pro nádorové kmenové buňky a pozitivita tohoto markeru znamená, že je linie tumorigenní a pravděpodobně tedy i vhodná pro implantaci do imunodeficitního zvířecího modelu. U primokultury GBM69 byla zjištěna vysoká hladina CD133⁺, přičemž po ovlivnění vyšší koncentrací FLU (1 μ M) došlo k nejvýznamnějšímu snížení množství tohoto glykoproteinu. Útlum v produkci daného markeru lze pozorovat i po působení nižší 50 μ M koncentrace TMZ. Naopak při ovlivnění vyšší 500 μ M koncentrací TMZ došlo ke zvýšení hladin této molekuly.



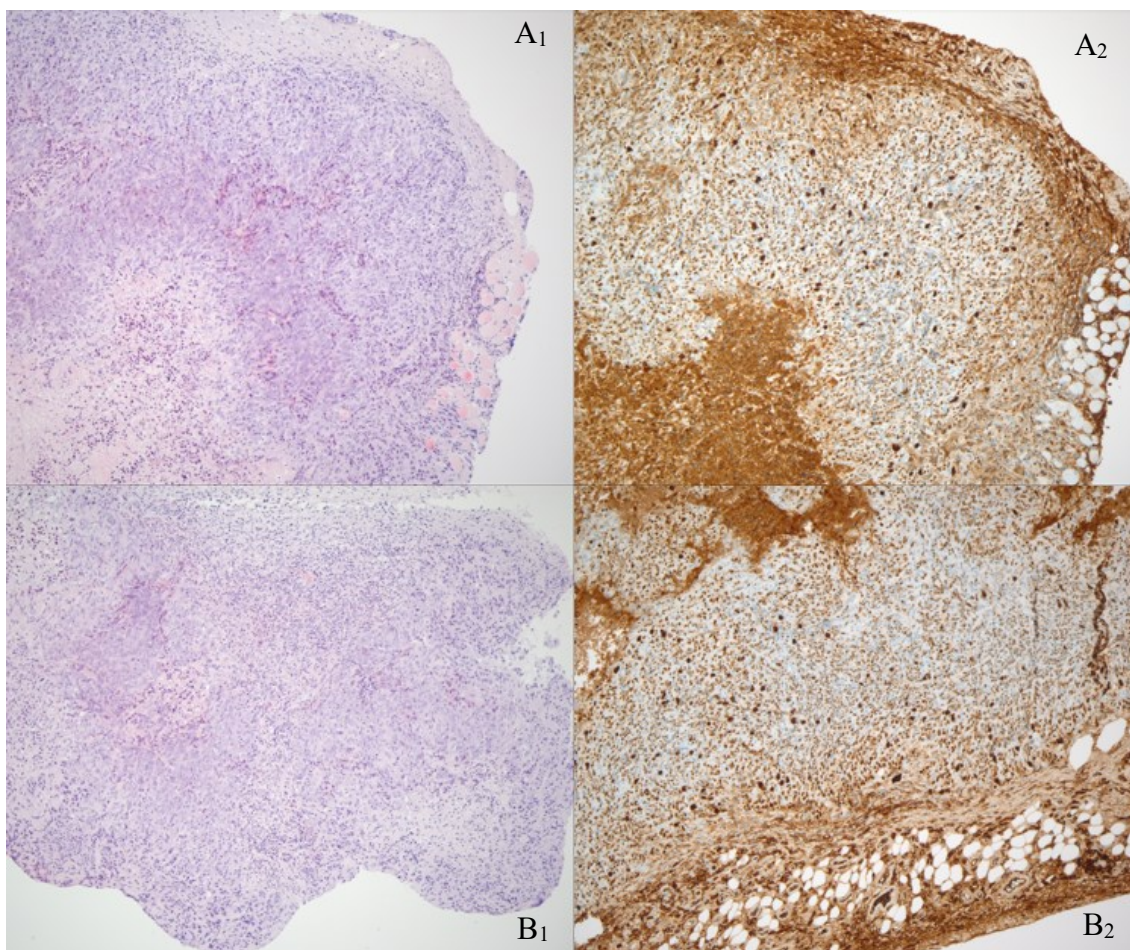
Obrázek 19 Stanovení exprese markeru CD133⁺ u primokultury GMB69 48 hodin po ovlivnění TMZ (50 a 500 μ M) a FLU (0,5 a 1 μ M). β -aktin byl použit jako housekeepingový protein. Čísla pod bandy představují relativní proteinovou expresi vztahovanou ke kontrole. * $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola.

5.6 Implantace buněk kolorektálního karcinomu HCT8 a kokultivovaných buněk HCT8 s EA.hy926

Prvotní *in vivo* experiment byl zaměřen na seznámení se s prací s vybraným typem myši a ověření tumorigenicity buněčné linie kolorektálního karcinomu HCT8. Do levé strany myši byly implantovány samotné buňky HCT8 a do pravé buňky HCT8 kokultivované s endoteliálními buňkami EA.hy926 v poměru 1:1. Z původních dvou myši se implantace zdařila jen u jedné. Levý nádor ze samotných buněk HCT8 byl o polovinu menší než pravý hlavní nádor. V místě vpichu kokultivovaných buněk navíc vyrostly vedle hlavního nádoru ještě dva menší (Obrázek 20). Pravý nález rostl rychleji než levý, i když IHC analýza ukázala, že hodnota proliferačního markeru ki67 byla zhruba stejná v obou typech nádorů (Obrázek 21).



Obrázek 20 Myš s výslednými tumory. Na pravé straně detailní fotografie tří tumorů kokultivovaných buněk HCT8 s EA.hy926. Žlutě jsou zakroužkovány všechny tři vyrostlé tumory.



Obrázek 21 Snímky imunohistochemické analýzy. Řez A zobrazuje tumor z HCT8 – A₁ řez barvený hematoxylinem a eosinem, A₂ barvení pomocí protilátky proti ki67. Fotografie B představuje řez tumorem z kokultivovaných buněk HCT8 s EA.hy926 – B₁ řez barvený hematoxylinem a eosinem, B₂ barvení pomocí protilátky proti ki67. Zvětšení: 100×.

5.7 Implantace buněčné kultury U118MG

Po úspěšné implantaci kontrolní buněčné suspenze HCT8 jsme pokračovali s experimenty na stabilizované buněčné linii U118MG. V rámci experimentu byla dvanácti myším implantována stabilizovaná buněčná linie U118MG ve třech různých koncentracích, abychom zjistili nejvhodnější množství implantovaných buněk pro další experimenty. Také byla testována účinnost jedné vybrané koncentrace FLU.

Se zvyšujícím se počtem implantovaných buněk se ve skupinách zvyšovala hmotnost tumorů (Tab. 6).

Tabulka 6 Průměry výsledných velikostí nádorů po implantaci buněčné linie U118MG do imunodeficitních athymických myši *Foxn1^{nu}* ve třech různých koncentracích (1; 2,5 a 5 milionů buněk/vpich).

	skupina A (1 mil. bk/vpich) velikost nádoru (g)	skupina B (2,5 mil. bk/vpich) velikost nádoru (g)	skupina C (5 mil. bk/vpich) velikost nádoru (g)
průměr hmotnosti nádorů (g) ± SD	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,07 ± 0,06

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. Skupina A: n=5 (3 myši celkově: 1 myš pouze s jedním nádorem, zbylé dvě každá se dvěma nádory), skupina B: n=6 (3 myši, každá s dvěma nádory), skupina C: n=6 (3 myši, každá s dvěma nádory).

U tumorů myši ze skupiny A a B jsme po aplikaci FLU zjistili pouze malé rozdíly v hmotnosti (Tab. 7, Obrázek 22). Myš ze skupiny C, které byl podán FLU nepřežila, nejednalo se ale o úhyn z důvodu aplikace FLU.

Tabulka 7 Průměry výsledných velikostí nádorů po implantaci buněčné linie U118MG do imunodeficitních athymických myši *Foxn1^{nu}* ve třech různých koncentracích (1; 2,5 a 5 milionů buněk/vpich) po každodenní aplikaci FLU (25 mg/kg) po dobu 14-ti dní.

myš (aplikace 25 mg/kg FLU po dobu 14 dnů)	skupina A (1 mil. bk/vpich) velikost nádoru (g)	skupina B (2,5 mil. bk/vpich) velikost nádoru (g)	skupina C (5 mil. bk/vpich) velikost nádoru (g)
průměr hmotnosti nádorů (g) ± SD	0,03 ± 0,00	0,08 ± 0,01	myš nepřežila

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. Skupina A: n=2 (1 myš se dvěma nádory), skupina B: n=2 (1 myš se dvěma nádory), skupina C: n=0 (myš nepřežila).



Obrázek 22 Myš ze skupiny B 14 dní po implantaci buněčné linie U118MG do levého i pravého boku. Žlutě jsou označeny vyrostlé tumory.

5.8 Implantace buněčné kultury U118MG a GBM69 a vliv FLU a TMZ na růst těchto tumorů

Po úvodním experimentu, kdy jsme zjistili nejvhodnější množství implantovaných nádorových buněk a také vliv FLU na růst těchto nádorů, jsme pokračovali v dalších experimentech s větším množstvím myši. Zároveň jsme pro ovlivnění růstu použili dvě různé koncentrace FLU a také jednu koncentraci TMZ. Výsledné velikosti nádorů po implantaci stabilizované buněčné linie U118MG jsou zaznamenány v tabulce č. 8. Implantace primokultury GBM69 nebyla úspěšná, ani jedné myši nádor nevyrostl.

Tabulka 8 Průměry výsledných velikostí nádorů po implantaci stabilizované buněčné linie U118MG do imunodeficitních athymických myši Foxn1^{mu} v koncentraci 3 mil. buněk/250 μ l.

	kontrola	FLU 10 mg/kg	FLU 25 mg/kg	TMZ 0,9 mg/kg
průměrná hmotnost nádorů (g)	0,10 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,03

Skupina „kontrola“ představuje 3 myši bez léčby. Dále byl třem myším podáván každodenně po dobu 14 dní FLU v koncentraci 10 mg/kg, třem myším FLU v koncentraci 25 mg/kg a třem myším TMZ v koncentraci 0,9 mg/kg. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Skupina „kontrola“ n=4 (1 myš bez nádorů a dále 2 myši, každá se dvěma nádory). Skupina FLU 10 mg/kg: n=4 (jedné myši nádory nevyrostly, dále 2 myši, každá se dvěma nádory). Skupina FLU 25 mg/kg: n=4 (jedné myši nádory nevyrostly, dále 2 myši, každá se dvěma nádory). Skupina TMZ 0,9 mg/kg: n=6 (3 myši, každá se dvěma nádory)

Průměrná hmotnost tumoru u kontrolních myši bez léčby byla 0,1 g. U všech myši, kterým byla podávána testovaná léčiva FLU a TMZ, byly velikosti nádorů výrazně menší.

Průměrná hmotnost tumoru u myši, kterým se podával FLU v dávce 10 mg/kg byla 0,04 g. Tato hmotnost byla v porovnání s ostatními skupinami nejnižší. V druhé skupině, u které byla dávka FLU vyšší – 25 mg/kg – byla konečná průměrná hmotnost nádoru 0,05 g. Stejná výsledná průměrná hmotnost byla naměřena i u skupiny, které byl podáván TMZ v dávce 0,9 mg/kg.

Imunohistochemická analýza U118MG nádorů ukázala, že u myších modelů léčených FLU či TMZ byla oproti kontrolním myším bez léčby nižší procentuální pozitivita vybraných markerů – jak proliferačního markeru ki67, tak mesenchymálního markeru N-kadherinu. Největší vliv na oba markery měl FLU podávaný v dávce 10 mg/kg, který v tumoru navíc plně potlačil syntézu proteinu N-kadherinu. Léčba myších modelů TMZ

měla na množství obou markerů menší vliv v porovnání s FLU (Tabulka 9). Všechny myší vzorky byly negativní na mutaci IDH1 R132H.

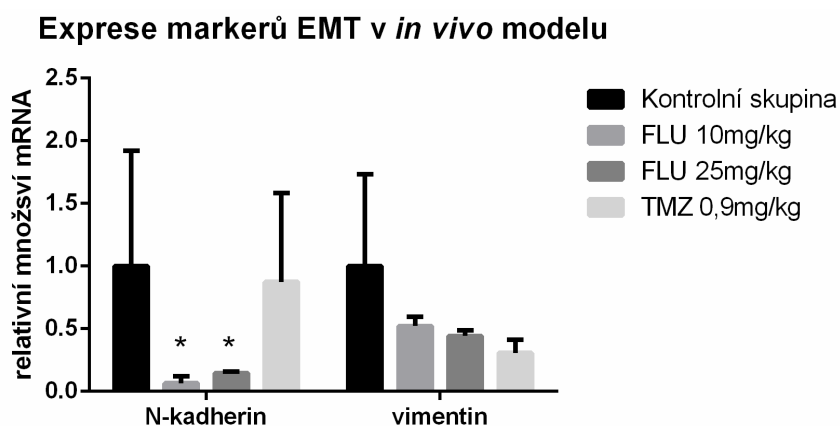
Tabulka 9 Imunohistochemická analýza u U118MG tumorů odebraných z myší.

	ki67	N-kadherin
kontrola	25 %	10 %
FLU 10 mg/kg	10 %	negativní
FLU 25 mg/kg	15 %	2 %
TMZ 0,9 mg/kg	15 %	10 %

Stanovení proliferačního markeru ki67 a EMT markeru N-kadherinu. Výsledky uvedeny jako pozitivita vzorku v procentech. Skupina „kontrola“ představuje myší model bez léčby, v dalších skupinách tumory z myších modelů, kterým byla 14 dní podávána každodenně léčiva v dávce: FLU 10 mg/kg, FLU 25 mg/kg a TMZ 0,9 mg/kg.

5.8.1 RT-qPCR analýza EMT markerů na úrovni mRNA u U118MG tumorů odebraných z myší

Z odebraných nádorů po ukončení experimentu se nám podařilo stanovit pouze EMT markery N-kadherin a vimentin. Z výsledků PCR je patrné, že hladina mRNA N-kadherinu se podáváním obou koncentrací FLU snížila, zatímco u modelu ovlivněného TMZ zůstala oproti kontrole téměř stejná. U hladiny vimentinu nebyly nalezeny žádné statisticky významné změny (Obrázek 23).

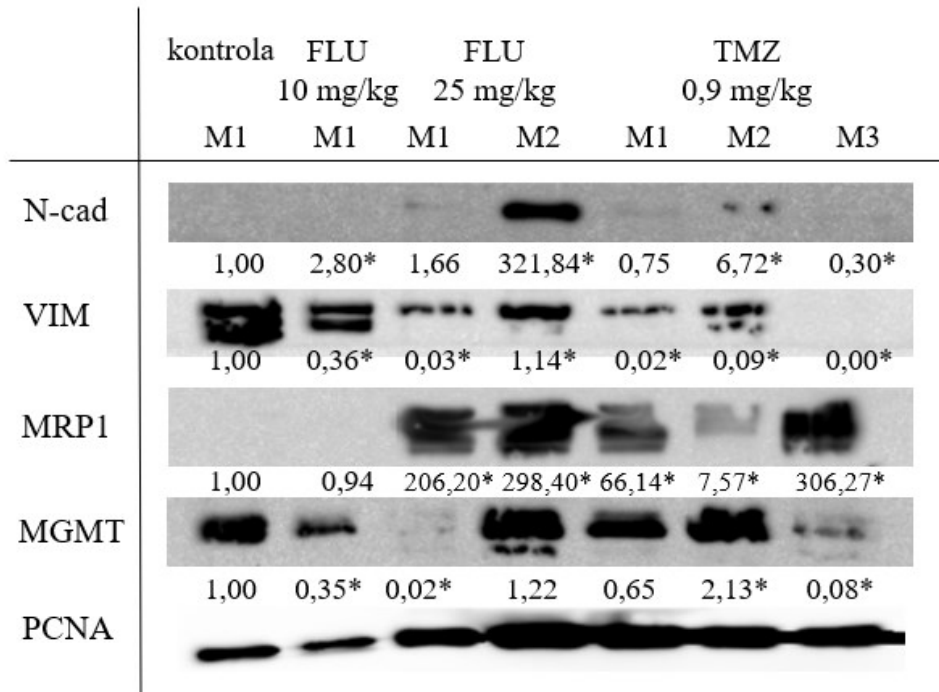


Obrázek 23 Stanovení relativního množství markerů zapojených do procesu EMT (N-kadherin, vimentin) na úrovni mRNA metodou RT-qPCR u odebraných tumorů po implantaci stabilizované buněčné linie U118MG do athymické myši *Foxn1^{mu}*. Hladina mRNA byla stanovena jak u nádorů kontrolních myší bez léčby, tak u tumorů myší, kterým byla každodenně po dobu 14 dní podávána léčiva FLU (dávky 10 a 25 mg/kg) a TMZ v dávce 0,9 mg/kg. * $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola

5.8.2 Western blot analýza markerů EMT na úrovni proteinů u U118MG tumorů odebraných z myší

Stejně jako u RT-qPCR stanovení se z EMT markerů podařilo v odebraných nádorech stanovit na úrovni proteinů pouze N-kadherin a vimentin. U N-kadherinu byla zaznamenána výrazně zvýšená hladina u jedné z myší, které byl podáván FLU v dávce 25 mg/kg. Po podávání 0,9 mg/kg TMZ se taktéž u jedné myši objevily vyšší hladiny. Co se týče vimentinu, lze pozorovat jeho signifikantní snížení u všech myší, kterým byl podán FLU nebo TMZ, avšak u jedné s dávkou FLU 25 mg/kg zůstala jeho hladina stejná jako u myši kontrolní.

U markeru rezistence MRP-1 docházelo u léčených myší (FLU 25 mg/kg a TMZ 0,9 mg/kg) k významnému nárůstu jeho hladin, pouze u jedné z myší s dávkami TMZ byla exprese oproti kontrole zvýšena jen mírně. Hladina molekuly MGMT byla statisticky významně snížena u jedné myši po podání FLU 10 mg/kg a jedné myši po podání FLU 25 mg/kg. Po aplikaci TMZ došlo k signifikantnímu zvýšení hladin MGMT u dvou myší, u třetí myši došlo naopak ke snížení.



Obrázek 24 Porovnání množství proteinů zapojených do procesu EMT (N-kadherin, vimentin) a markerů rezistence (MRP1, MGMT) u *in vivo* modelu (u odebraných tumorů po implantaci stabilizované buněčné linie U118MG do athymické myši *Foxn1tm*). Jedna myš sloužila jako kontrola, dalším byla 14 dní podávána každodenně léčiva v dávce: jedné myši FLU 10 mg/kg, dvěma myším FLU 25 mg/kg, třem myším TMZ 0,9 mg/kg. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) byl použit jako housekeepingový protein. * $p < 0,05$ versus neovlivněná kontrola

6. DISKUSE

Glioblastoma multiforme (GBM) představuje nejčastější a nej malignější nitrolební nádor. Průměrná doba přežití u diagnostikovaných pacientů je i přes velmi radikální léčbu (neurochirurgická resekce, radioterapie, chemoterapie) okolo čtrnácti měsíců (2-4). Léčivem první volby stále zůstává alkylační cytostatikum TMZ (35).

TMZ je prolečivem, jehož metabolit reaguje s nukleofilními centry DNA. Za cytotoxické účinky TMZ je zodpovědná hlavně metylace O⁶-guaninu. Výsledná metylace DNA vede k chybám při replikaci templátu, inhibici reparačních mechanismů DNA a apoptóze buňky. Terapeutickou odpověď TMZ ovlivňuje metylace promotoru genu MGMT a také nežádoucí účinky zatěžující pacienta (19, 37).

Benzimidazolové antihelmintikum FLU se díky svým antiproliferačním účinkům stalo středem pozornosti mnoha studií zkoumajících jeho vliv na různé typy nádorových onemocnění – kolorektální karcinom, rakovina prsu a prostaty, melanomy, nemalobuněčný plicní karcinom (6-9, 49). FLU vazbou na β -tubulin zpomaluje růst a proliferaci buněk, inhibuje procesy závislé na funkci mikrotubul, vyvolává morfologické změny; buňka poté vstupuje do apoptózy a umírá (7). Dle dat ze studií jsou na působení FLU citlivější nádorové buňky oproti zdravým buňkám (1). FLU je léčivem o nízké toxicitě s případnými mírnými nežádoucími účinky. Díky těmto vlastnostem se FLU zdá jako nadějně léčivo a během posledních pár let se začínají objevovat studie zkoumající vliv nejen FLU ale i ostatních benzimidazolových anthelmintik na GBM a další intrakraniální nádory (1). V našem projektu jsme se zaměřili na *in vitro* a *in vivo* vliv FLU na stabilizovanou buněčnou linii U118MG a primokulturu GBM69.

Obě linie, jak stabilizovaná buněčná linie U118MG, tak primokultura GBM69, byly, co se týče testu viability citlivější na FLU než TMZ. Buňky primokultury reagovaly již na nižší koncentrace FLU ($IC_{50}^{GBM69} = 1,329 \mu M$) oproti stabilizované buněčné linii ($IC_{50}^{U118MG} = 2,093 \mu M$). Z našeho měření i z ostatních studií vyplývá, že některé linie GBM jsou na FLU citlivější (10) a některé méně (1). Nutno ale zmínit, že u buněk GBM69 se ve vyšší pasáži citlivost na FLU snížila.

V případě ovlivnění TMZ byla naopak výrazně citlivější linie U118MG ($IC_{50}^{U118MG} = 1468,0 \mu M$) než primokultura ($IC_{50}^{GBM69} = 3056,0 \mu M$).

Co se týče vyhodnocení morfologických změn, i zde se FLU v porovnání s TMZ projevil jako účinnější. Tyto změny byly patrné hlavně u linie U118MG, u které byly pozorovány

po celou dobu inkubace (v časových intervalech 24, 48, 72 hod). U GBM69 byly morfoloické změny patrné hlavně po prvních 24 hodinách. FLU spustil u mnoha buněk proces apoptózy, přeživší buňky pokračovaly v růstu ale již s rozdílnou morfoloíí.

Na patofyziologii GBM se podílí molekuly E-kadherin, N-kadherin a vimentin, které hrají významnou roli v jevu zvaném epitelo-mesenchymální tranzice (EMT). Dle studií (1) by měl FLU inhibovat děj EMT, přičemž výsledky našeho projektu tento vliv potvrdily. Transmembránový protein E-kadherin je součástí těsných spojů. Gen pro tento protein spadá do třídy tumor-supresorových genů a jeho exprese ukazuje na epiteliální typ buněk. FLU a TMZ tedy zvýšením hladin E-kadherinu zpomalují proces proliferace a migrace buněk (1, 20). V kontrastu s tím N-kadherin a vimentin spadají do skupiny mesenchymálních markerů. Jejich přítomnost ve vyšším množství poukazuje na probíhající děj EMT a na mesenchymální fenotyp buněk. Tyto buňky se na rozdíl od epiteliálních buněk mohou rychle dělit, mají vřetenovitý tvar, odolnější mechanickou stavbu, migrují (riziko založení sekundárního ložiska) a mohou diferenciovat (20-23). Prvotní útlum na úrovni relativního množství mRNA N-kadherinu a vimentinu po ovlivnění buněk TMZ a FLU naznačuje zpomalení patologických procesů v nádorových buňkách, avšak jejich navýšení spolu s delším časem inkubace poukazuje na regeneraci buněk. Při pozorování fázovým mikroskopem jsme zaznamenali, že přeživší buňky pokračovaly v růstu s rozdílnou morfoloíí oproti kontrole (nejpatrnější byly změny u U118MG po ovlivnění 0,5 μ M FLU).

Na úrovni relativního množství mRNA jsme tedy u linie U118MG po ovlivnění FLU (v koncentraci 0,5 μ M i 1 μ M) zaznamenali signifikantní zvýšení E-kadherinu, které buď rostlo s délkou inkubace (u 1 μ M) či bylo zvýšeno již po prvních 24 hodinách (v případě vzorku s 0,5 μ M FLU). Co se týče mesenchymálních markerů N-kadherinu a vimentinu u linie U118MG, FLU (obě koncentrace) po prvních 24 hodinách snížil jejich množství, ale s narůstající dobou inkubace se hladina těchto markerů postupně zase zvyšovala (a to i nad úroveň hladiny mRNA u kontrolních buněk bez léčby).

V případě TMZ byl u linie U118MG po ovlivnění vyšší koncentrací (500 μ M) nejdříve zjištěn signifikantní pokles mRNA E-kadherinu, N-kadherinu, vimentinu, po 48 hodinách došlo k jejich nárůstu a po 72 hodinách zase k poklesu. Po ovlivnění koncentrací 50 μ M se množství E-kadherinu zvýšilo již po 24 hodinách.

U buněk primokultury GBM69 byl také pozorován jev zvýšeného množství E-kadherinu a to po aplikaci 1 μM FLU a také po obou koncentracích TMZ. Pokud jde o N-kadherin a vimentin, u vzorků GBM69 jsme nezaznamenaly statisticky významné změny.

Vliv na markery EMT jsme pozorovali také na úrovni exprese proteinů. U linie U118MG došlo u obou koncentrací FLU k signifikantnímu snížení E-kadherinu a N-kadherinu. Množství proteinu vimentinu bylo po prvotním nárůstu (vzorek s FLU 0,5 μM v intervalu 24 hodin) rovněž sníženo. Co se týče TMZ, obě koncentrace taktéž snížily množství E-kadherinu. Hladiny N-kadherinu a vimentinu příliš neovlivnil, v některých případech je oproti kontrole zvýšil.

Výsledný terapeutický efekt TMZ i FLU ovlivňují markery rezistence MRP-1 a MGMT. Výrazné snížení proteinu MRP-1 u buněk U118MG vyvolal pouze FLU (obě koncentrace). MGMT snížila signifikantně obě léčiva až 72 hodin po ovlivnění, avšak tento vliv na množství markeru nemusí být pro účinnost léčiv, hlavně TMZ, tak zásadní – spíše záleží na množství methylace promotoru genu kódující MGMT (19), což nebylo předmětem našeho projektu.

U primolinie GBM69 se podařilo stanovit z EMT markerů jen vimentin, jehož hladinu snížil pouze 50 μM TMZ. U markerů rezistence jsme zaznamenaly několikanásobný signifikantní nárůst MRP-1 po 0,5 μM FLU a 500 μM TMZ, naopak množství markeru snížil 50 μM TMZ. Co se týče MGMT, u primolinie bylo pozorováno signifikantní snížení markeru po ovlivnění FLU i TMZ. Největší vliv na expresi proteinů u primolinie měl tedy 50 μM TMZ.

Expres markerů EMT a markerů rezistence se u ustálené linie U118MG a primokultury GBM69 liší. Taktéž jsme tyto rozdíly zaznamenali při porovnání *in vitro* kultivovaných linií a *in vivo* implantovaných buněk: proto se námi používanými metodami nepodařilo u GBM69 na úrovni proteinů stanovit E-kadherin a N-kadherin a dále u odebraných tumorů E-kadherin (jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů).

U primolinie GBM69 jsme zaznamenali vysokou hladinu markeru CD133⁺, který je charakteristický pro nádorové kmenové buňky. Pozitivita tohoto markeru značí, že je linie tumorigenní a pravděpodobně tak i vhodná pro implantaci do imunodeficitního zvířecího modelu. Populace nádorových kmenových buněk přítomná v nádorové tkáni je nejspíše odpovědná za iniciaci růstu nádoru, jeho progresi, agresivitu GBM (27). Navzdory přítomnosti toho markeru se implantace GBM69 nezdařila. Nabízí se několik důvodů:

- nedostatečná koncentrace implantované buněčné suspenze
- nedostatečně dlouhá doba experimentu
- tumor se přirozeně vyvíjí v oblasti hemisfér, mozkového kmene nebo cerebella. Prostředí centrální nervové tkáně se od podmínek v subkutánní oblasti athymické imunodeficientní myši značně liší, jak biochemickými pochody, tak okysličením tkáně, vaskularizací atd (47).
- z důvodu počtu pasáží – u implantovaných linií se zvyšuje jejich agresivita s počtem pasáží, avšak dle (62) buněčné linie starší 3 týdny ztrácejí schopnost tumorigeneze v myším modelu, a navíc s narůstajícím počtem dělení přibývá alterací DNA, mění se genotyp buněk a primokultura oproti původnímu nádoru nemusí být tak invazivního charakteru (42-44, 47). Buňky linie GBM69 byly v šesté pasáži.

Implantace ustálené buněčné linie U118MG se naproti tomu zdařila. U myší, kterým byla podávána léčba (0,9 mg/kg TMZ, 10 mg/kg FLU nebo 25 mg/kg FLU), měly výsledné nádory výrazně menší velikost oproti myším bez léčby. Největší vliv na velikost nádorů měl FLU 10 mg/kg. FLU, stejně jako v dalších studiích (1, 10), během našeho projektu inhiboval růst nádorů bez nežádoucích či vedlejších účinků. Z RT-qPCR analýzy jsme získali statisticky významné výsledky pouze u N-kadherinu: obě koncentrace FLU jej signifikantně snížily (nejvíce FLU 10 mg/kg), zatímco u modelu s TMZ zůstala hladina toho markeru téměř stejná jako u kontrolních nádorů myší bez léčby. Western blot analýza odebraných nádorů odhalila, že na hladinu proteinu N-kadherinu měla obě léčiva různý vliv: obě koncentrace FLU způsobily jeho nárůst, TMZ nárůst i pokles. Množství vimentinu bylo ve všech případech až na jeden signifikantně sníženo. U markerů rezistence jsme zaznamenali statisticky velmi významné zvýšení množství MRP-1 po podávání FLU 25 mg/kg a TMZ. Zvýšená exprese toho effluxního transmembránového proteinu byla nejspíše vyvolána vyššími koncentracemi FLU a TMZ, protože u myší bez léčby či s nižší koncentrací FLU (10 mg/kg) tento marker nebyl detekován. Co se týče MGMT, jeho hladiny byly jak snižené, tak zvýšené.

Data z imunohistochemické analýzy (IHC) potvrdila a doplnila výsledky z RT-qPCR a Western blot analýz – tedy že na U118MG tumory v xenograftovém myším modelu měl největší vliv FLU v dávce 10 mg/kg, který způsobil signifikantní snížení množství proliferačního markeru ki67 a negativitu na N-kadherin. Druhý největší vliv měl FLU v dávce 25 mg/kg, TMZ oproti tomu ovlivnil množství proteinů ki67 i N-kadherinu

nejméně. Naše data, tedy že FLU signifikantně *in vivo* ovlivňuje množství ki67 a zpomaluje tak proliferaci buněk, se shodují a s výsledky studie (10), ve které taktéž potvrdily tento vztah. Vhodno ještě zmínit, že IHC analýza u všech odebraných U118MG tumorů prokázala negativitu na mutaci IDH1 R132H (tato mutace je spojena s lepší prognózou pacientů) (4, 17).

Největší efekt jak na velikost nádoru, tak na hladinu EMT markerů, markerů rezistence a proliferačního markeru ki67 měl tedy FLU 10 mg/kg.

Na základě zjištěných a zde diskutovaných výsledků lze konstatovat, že FLU má výrazný vliv na buňky GBM jak *in vitro*, tak *in vivo*. V porovnání s TMZ, byl jeho antiproliferační efekt ve většině případů vyšší. Výsledný účinek obou léčiv však závisí na mnoha proměnných: od vybrané buněčné linie, po její stáří (množství pasáží) či přítomné mutace u daných linií.

7. ZÁVĚR

Výsledky z námi provedených experimentů lze shrnout v několika bodech:

- Obě linie, ustálená buněčná linie U118GM a primokultura GBM69, byly v testu viability a proliferace citlivější na FLU. FLU také oproti TMZ způsobil výraznější morfologické změny. Přeživší buňky po ovlivnění pokračovaly v růstu, avšak s rozdílnou morfologií oproti kontrole.
- FLU způsobil oproti TMZ u obou linií signifikantnější nárůst mRNA epiteliálního markeru E-kadherinu. FLU stejně jako TMZ moduluje na úrovni mRNA hladiny mesenchymálních markerů N-kadherinu a vimentinu. FLU v mnoha případech snížil jejich expresi více než TMZ (mnoho výsledků ale nebylo vyhodnoceno jako statisticky významné). S narůstající dobou inkubace se hladina těchto markerů postupně zase zvýšila. Je tedy evidentní, že FLU zasahuje do děje EMT.
- FLU stejně jako TMZ ovlivňoval na úrovni proteinů množství E-kadherinu, N-kadherinu a vimentinu. U buněk U118MG potlačil FLU ve většině případů expresi proteinů účinněji než TMZ. U primokultury GBM69 měl však větší vliv na hladinu vimentinu 50 μ M TMZ.
- FLU a TMZ moduluje hladiny markerů rezistence: v některých případech hladiny snížily, v některých zvýšily. Efekt léčiv na MRP-1 a MGMT byl u každé linie trochu jiný. U U118MG vyvolal signifikantní snížení MRP-1 pouze FLU (obě koncentrace), u GBM69 marker snížil 50 μ M TMZ. Na hladinu MGMT měla ve většině případů inhibiční vliv obě léčiva.
- Subkutánní implantace primokultury GBM69 do imunodeficitní athymické myši Foxn1^{nu} se i přes námi prokázaný potenciál tumorigenicity (pozitivita na CD133⁺) nezdařila.
- Implantace ustálené buněčné linie U118MG byla úspěšná: u myši, kterým byla 14 dní podávána léčba (0,9 mg/kg TMZ, 10 mg/kg FLU nebo 25 mg/kg FLU), byly výsledné nádory výrazně menší oproti myším bez léčby. Největší vliv na velikost nádorů měl FLU 10 mg/kg.
- Analýza odebraných nádorů prokázala: obě podávané koncentrace FLU signifikantně snížily hladiny mRNA N-kadherinu, TMZ nijak hladinu neovlivnil. FLU i TMZ též modulovaly expresi N-kadherinu a vimentinu na úrovni proteinů.

IHC analýza U118MG tumorů potvrdila a doplnila výsledky RT-qPCR a WB analýzy, tedy že největší vliv na proliferaci nádorových buněk měl FLU 10 mg/kg, který způsobil signifikantní procentuální snížení množství proliferačního markeru ki67 a negativitu na N-kadherin. O trochu menší, ale stále signifikantní efekt měl FLU v dávce 25 mg/kg. TMZ měl na množství proteinů ki67 a N-kadherinu nejmenší vliv.

- U odebraných tumorů, co se týče markerů rezistence na úrovni proteinů, bylo zaznamenáno: velmi významné zvýšení hladiny MRP-1 po podávání FLU 25 mg/kg a TMZ 0,9 mg/kg. V případě MGMT byly hladiny jak snižené, tak zvýšené.
- Největší efekt jak na velikost nádorů, tak na hladinu EMT markerů, markerů rezistence a proliferačního markeru ki67 v nádorovém parenchymu měl FLU 10 mg/kg.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

AA – akrylamid

APS – persíran amonný

ATP – adenosintrifosfát

bisAA – bis-akrylamid

BSA – bovinní sérový albumin

cDNA – komplementární DNA

CT – výpočetní tomografie

DEPC – diethylpyrokarbonát

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru

EMT – epitelo-mesenchymální tranzice

FBS – fetální bovinní sérum

FLU – flubendazolu

GBM – *glioblastoma multiforme*, glioblastom

IC₅₀ – střední inhibiční koncentrace

IDH-1 – isocitrátdehydrogenasa 1

IHC – imunohistochemická analýza

KPS – Karnofského skóre (*Karnofsky performance status*)

log P – rozdělovací koeficient oktanol/voda

MDR-1 – *multi drug resistance 1* (p-glykoprotein)

MGMT – o-6-methylguanin-DNA-methyltransferasa

MMSE – *Mini-Mental State Examination*

MR – magnetická rezonance

mRNA – mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina

MRP-1, MRP-2 – *Multidrug Resistance Protein 1 a 2*

MTIC – 5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazol-4-karboxamid

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát

OS – celková doba přežití (*overall survival*)

PBS – fyziologický roztok pufovaný fosfáty (*Phosphate Buffered Saline*)

PDX-model, PDX-xenograft model – *patient-derived xenograft model*

PET – pozitronová emisní tomografie

PFS – čas do progrese onemocnění (*progression-free survival*)
PTEN – *phosphatase and tensin homolog* – nádorový supresor
PVDF – polyvinylidendifluorid
RB1 – retinoblastomový protein 1
RNA – ribonukleová kyselina
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*
RT-qPCR – reverzní transkripce-kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SD – směrodatná odchylka
SDS – dodecylsírán sodný
TMZ – temozolomid
TRIS - *tris*(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
WB – Western blot analýza
WHO – Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*)
WST-1 – Water Soluble Tetrazolium Salt 1

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Klinicky důležité molekulární markery u high-grade gliomů a jejich význam	19
Tabulka 2 Ředění roztoku 1% BSA pro přípravu kalibrační křivky.	42
Tabulka 3 Složení separačních gelů (spodní gel) o tloušťce 1,5 mm.	43
Tabulka 4 Složení zaostřovacího 4% gelu (horní gel) o tloušťce 1,5 mm.....	43
Tabulka 5 Hodnota IC ₅₀ u buněk U118MG a GBM69.....	51
Tabulka 6 Průměry výsledných velikostí nádorů po implantaci buněčné linie U118MG do imunodeficitních athymických myší Foxn1-nu ve třech různých koncentracích (1; 2,5 a 5 milionů buněk/vpich).	61
Tabulka 7 Průměry výsledných velikostí nádorů po implantaci buněčné linie U118MG do imunodeficitních athymických myší Foxn1-nu ve třech různých koncentracích (1; 2,5 a 5 milionů buněk/vpich) po každodenní aplikaci FLU (25 mg/kg) po dobu 14-ti dní.....	62
Tabulka 8 Průměry výsledných velikostí nádorů po implantaci stabilizované buněčné linie U118MG do imunodeficitních athymických myší Foxn1-nu v koncentraci 3 mil. buněk/250 μl.	63
Tabulka 9 Imunohistochemická analýza u U118MG tumorů odebraných z myší.	64

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Ztráta heterozygotnosti (18).....	13
Obrázek 2 Histologický řez Glioblastoma multiforme s typickým pseudopalisádováním a nekrotickými ložisky (barvení hematoxylin a eosin) (29).....	17
Obrázek 3 Vzorec TMZ.....	21
Obrázek 4 Vzorec flubendazolu.	28
Obrázek 5 Buňky linie HCT8 (zvětšení 40×).....	34
Obrázek 6 EA.hy926 (53).....	34
Obrázek 7 Linie U118MG (54).....	35
Obrázek 8 Buněčná linie GBM69. Zvětšení 400×.....	36
Obrázek 9 Stanovení počtu živých nádorových buněk U118MG a GBM69 po ovlivnění TMZ a FLU v různých koncentracích. * p <0,05 versus neovlivněná kontrola	50
Obrázek 10 Viabilita buněk ve vyšší pasáži (primolinie GBM69) a její změny po ovlivnění různými koncentracemi TMZ a FLU.	51

Obrázek 11 Fázový kontrast U118MG po ovlivnění TMZ a FLU v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po ovlivnění léčivy. Zvětšení: 400×.	52
Obrázek 12 Fázový kontrast primolinie GBM69 po ovlivnění TMZ a FLU v časových intervalech 24, 48 a 72 hod po ovlivnění. Zvětšení: 400×.	53
Obrázek 13 Stanovení relativního množství jednotlivých markerů na úrovni mRNA metodou RT-qPCR u buněk stabilizované buněčné linie U118MG ovlivněných TMZ a FLU v časových intervalech 24, 48 a 72h po ovlivnění. *p<0,05 versus neovlivněná kontrola.....	54
Obrázek 14 Porovnání exprese EMT markerů u linie U118MG po ovlivnění různými koncentracemi TMZ a FLU po dobu 24 hod. *p<0,05 versus neovlivněná kontrola.	55
Obrázek 15 Porovnání exprese EMT markerů u primokultury GBM69 po ovlivnění různými koncentracemi TMZ a FLU po dobu 24 hod. *p<0,05 versus neovlivněná kontrola.....	56
Obrázek 16 Porovnání množství proteinů zapojených do procesu EMT (E-kadherin, N-kadherin, vimentin) a markerů rezistence (MRP1, MGMT) v časových intervalech 24, 48 a 72 hod u buněčné linie U118MG po ovlivnění TMZ 500 μM a FLU 0,5 μM. β-actin byl použit jako housekeepingový protein. (*p<0,05 versus neovlivněná kontrola)	57
Obrázek 17 Porovnání hladin proteinů zapojených do procesu EMT (E-kadherin, N-kadherin, vimentin) a markerů rezistence (MRP-1 a MGMT) při působení různých koncentrací TMZ (50 a 500 μM) a FLU (0,5 a 1 μM) u buněčné linie U118MG 48 hodin po ovlivnění. β-actin byl použit jako housekeepingový protein. (*p<0,05 versus neovlivněná kontrola,).....	58
Obrázek 18 Porovnání exprese proteinů EMT markeru vimentinu a markerů rezistence (MRP-1, MGMT) při působení dvou různých koncentrací TMZ (50 a 500 μM) a FLU 0,5 a 1 μM) u primolinie GBM69 48 hodin po ovlivnění. (*p<0,05 versus neovlivněná kontrola, zkratky markerů viz. text)	59
Obrázek 19 Stanovení exprese markeru CD133 ⁺ u primokultury GMB69 48 hodin po ovlivnění TMZ (50 a 500 μM) a FLU (0,5 a 1 μM). β-actin byl použit jako housekeepingový protein * p<0,05 versus neovlivněná kontrola.....	59
Obrázek 20 Myš s výslednými tumory. Na pravé straně detailní fotografie tří tumorů kokultivovaných buněk HCT8 s EA.hy926. Žlutě jsou zakroužkovány všechny tři vyrostlé tumory.....	60

- Obrázek 21 Snímky imunohistochemické analýzy. Řez A zobrazuje tumor z HCT8 – A₁ řez barvený hematoxylin-eosinem, A₂ barvení pomocí protilátky proti ki67. Fotografie B představuje řez tumorem z kokultivovaných buněk HCT8 s EA.hy926 – B₁ řez barvený hematoxylin-eosinem, B₂ barvení pomocí protilátky proti ki67. Zvětšení: 100×. 61
- Obrázek 22 Myš ze skupiny B 14 dní po implantaci buněčné linie U118MG do levého i pravého boku. Žlutě jsou označeny vyrostlé tumory. 62
- Obrázek 23 Stanovení relativního množství markerů zapojených do procesu EMT (N-kadherin, vimentin) na úrovni mRNA metodou RT-qPCR u odebraných tumorů po implantaci stabilizované buněčné linie U118MG do athymické myši Foxn1-nu. Hladina mRNA byla stanovena jak u nádorů kontrolních myší bez léčby, tak u tumorů myší, kterým byla každodenně po dobu 14 dní podávána léčiva FLU (dávky 10 a 25 mg/kg) a TMZ v dávce 0,9 mg/kg. * p<0,05 versus neovlivněná kontrola 64
- Obrázek 24 Porovnání množství proteinů zapojených do procesu EMT (N-kadherin, vimentin) a markerů rezistence (MRP1, MGMT) u in vivo modelu (u odebraných tumorů po implantaci stabilizované buněčné linie U118MG do athymické myši Foxn1-nu). Jedna myš sloužila jako kontrola, dalším byla 14 dní podávána každodenně léčiva v dávce: jedné myši FLU 10 mg/kg, dvěma myším FLU 25 mg/kg, třem myším TMZ 0,9 mg/kg. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) byl použit jako Housekeepingový protein. * p<0,05 versus neovlivněná kontrola 65

11. CITOVANÁ LITERATURA

1. **Son D. S., Lee E. S., Adunyah A. E.** The Antitumor Potentials of Benzimidazole Anthelmintics as Repurposing Drugs. *Immune Network*. 2020, 20(4):e29.
2. **Urbanska K., Sokolowska J., Szmidt M., Sysa P.** Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary Oncology*. 2014, 18(5):307-12.
3. **Ramos A. D., Maggie R. S., Ramakrishna R.** Molecular Pathogenesis and Emerging Treatment for Glioblastoma. *World Neurosurgery*. 2018, 116:495-504.
4. **Delgado-Martín B., Medína M. A.** Advances in the Knowledge of the Molecular Biology of Glioblastoma and Its Impact in Patient Diagnosis, Stratification, and Treatment. *Advance Science*. 2020, 7(9):1902971.
5. **Pracovní skupina pro doporučené postupy NOS ČOS JEP.** Doporučené postupy Neuroonkologické sekce České onkologické společnosti ČLS JEP. Praha, *Ambit Media*, a. s. , 2014. ISBN: 978-80-905474-4-5.
6. **Skarková Hanušová V., Skálová L., Králová V., Matoušková P.** Potential Anti-cancer Drugs Commonly Used for Other Indications. *Current Cancer Drug Targets*. 2015, 15(1):35-52.
7. **Čáňová K., Rozkydalová L., Vokurková D., Rudolf E.** Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2018, 46:313-322.
8. **Králová V., Hanušová V., Rudolf E., Čáňová K., Skálová L.** Flubendazole induces mitotic catastrophe and senescence in colon cancer cells in vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2016, 68(2):208-18.
9. **Zhou Xm., Zou Lb., Chen Wb., Yang Tw., Lou Jq., Wu Ka., Shu Fp., Tan X.** Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, elicits valid antitumor effects by targeting P53 and promoting ferroptosis in castration-resistant prostate cancer. *Pharmacological Research*. 2021, 164:105305.
10. **Xumin Z., Jumei L., Jinming Z., Yong W., Hua L.** Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis. *Cell Death Discovery*. 2018, 4(1):18.

11. **Smetanová, L., Ryška P., Malá P., Kohout A.** Glioblastom grade IV – dlouhodobé přežití. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2020, 116(3): 332-334.
12. **Strítěský J.** Patologie. Olomouc, *Epava*. 2001. Str. 125-162. ISBN 978-80-86297-06-4.
13. **Mačák J., Mačáková J., Dvořáčková J.** Patologie. Praha, *Grada Publishing a. s.*, 2012. ISBN: 978-80-247-3530-6.
14. **Kiss I., Vyzula R., Němeček R., Sláma O., Doubek M.** Klinická onkologie pro mediky – solidní nádory, nádory dětského věku a hematologické malignity. Brno, *Masarykova univerzita*, 2021. ISBN 978-80-210-9908-1.
15. **Alberts B., Johnson A., Bray D., Lewis J.** Základy buněčné biologie. Praha, *Espero Publishing*, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
16. **Moffitt Cancer Center.** Glioblastoma Risk Factors, *Moffitt Cancer Center* [Online]. 2018 [citace: 31. srpen 2021]. Dostupné na: <https://moffitt.org/cancers/glioblastoma/diagnosis/risk-factors/>.
17. **Sasmitan A. O., Wong Y. P., Ling A. P.** Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2018, 14(1):40-51.
18. **Weinberg R. A.** Biology of Cancer, *WW Norton & Co*, 2013. ISBN: 0815345283.
19. **Zhang J., Stevens M. F. G., Bradshaw T. D.** Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*, 2012, 5(1):102-14.
20. **Iwadate Y.** Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology Letters*. 2016, 11(3): 1615–1620.
21. **Matějka V. M., Fínek J., Králíčková M.** Epitelo-mesenchymální tranzice v nádorové tkáni a její role při metastatickém šíření karcinomů. *Klinická onkologie*. 2017, 30(1):20-27.
22. **Loh Ch. Y., Chai Y. Ch., Tang T. F., Wong W. F.** The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019, 8(10):1118.

23. **Battaglia R. A., Delic S., Herrmann H., Snider N. T.** Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research*, 2018, 7:F1000 Faculty Rev-1796.
24. **Švihovec J., Bultas J., Anzenbacher P. a spol.** Farmakologie. Praha, *Grada Publishing a. s.*, 2021. ISBN 978-80-247-5558-8.
25. **Susan P. C.** Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289(45):30880-8.
26. **Kolektiv DrugAgency, a. s.** *P-glykoprotein*. DrugAgency, a. s. 2020.
27. **Sedo A., Mentein R.** Glioma Cell Biology - Cancer Stem Cells and Glioblastoma. Vídeň, *Springer-Verlag Wien*, 2014. ISBN 978-3-7091-1430-8.
28. **Brat, D. J. a A. Castellano-Sanchez, S. B. Hunter, M. Pecot, C. Cohen. E. H. Hammond, S. N. Devi, B. Kaur.** Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Research Journal*. 2004, 64(3):920-7.
29. **Lim S. M., Choi J., Chang J. H., Sohn J., Jacobson K.** Lack of ROS1 Gene Rearrangement in Glioblastoma Multiforme. *PLoS one*. 2015, 10(9):e0137678.
30. **Perkins A., Liu G.** Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment. *American Academy of Family Physicians*, 2016, 93(3):211-7.
31. **Fadrus P., Lakomý R., Hubnerová P., Slabý O., Keřkovský M., Svoboda T., Bybíhal V., Kryštofová S., Sova M., Smrčka M.** Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie. *Interní medicína pro praxi*. 2010, 12(7-8):376-381.
32. **Pospíšil P., Kazda T., Šlampa P., Jančálek R.** Aktuální onkologická léčba high-grade gliomů. *Neurologie pro praxi*. 2016, 17(5):287-292.
33. **Staněk L., Lísová S., Tvrdík D., Velenská Z., Povýšil C.** Nové možnosti a metody v prediktivní diagnostice u karcinomu prsu - abstrakt ze symposia Onkologie v gynekologii a mammologii (17. ročník). *linkos.cz*. [Online] 6. leden 2012. [Citace: 17. listopad 2021.] Dostupné na: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologicky-konferencnich-abstrakt/nove-moznosti-a-metody-v-prediktivni-diagnostice-u-karcinomu-prsu/>.

34. **Liščák R.** Stereotaktická neurochirurgie. Nemocnice Na Homolce. www.homolka.cz [Online]. 2017 [citace: 14. září 2021.] Dostupné na: <https://www.homolka.cz/nase-oddeleni/11635-neuroprogram/11635-odd-stereotakticke-a-radiacni-neurochirurgie-gama-nuz-osrn/11770-nase-sluzby/11771-klasicka-stereotakticka-neurochirurgie-invazivni-vykon/>.
35. **Kiss I.** Modrá kniha České onkologické společnosti, 23. Zhoubný novotvar mozku. Brno. *Masarykův onkologický ústav*, 2021. ISBN: 978-80-86793-51-1.
36. **Zycháčková K., Pospíšilová M., Kohoutek M., Filip M., Jakšičová A., Zycháček M.** Přínos versus toxicita temozolomidu u pacientů. *Onkologie*. 2013, 7(1):52-54.
37. **Šlampa P., Hynková L.** Lékové profily - Temozolomid. *Remedia*, 2007, 2007(2).
38. **EORTC Brain Tumor Group.** Clinical trial database - EORTC 26101. eortc.org. [Online] European Organisation for Research and Treatment of Cancer. [Citace: 13. listopad 2021.] https://www.eortc.org/research_field/clinical-detail/26101/.
39. **Gramatzki D., Roth P., Rushing E. J., Weller J., Andratschke N., Hofer S., Korol D., Regli L.** Bevacizumab may improve quality of life, but not overall survival in glioblastoma: an epidemiological study. *Annals of Oncology*. 2018, 29(6):1431-1436.
40. **Green D.** Computational chemistry in drug discovery. *European Bioinformatics Institute - EMBL-EBI* [Online]. 2016 [citace: 13. listopad 2021]. Dostupné na: <https://www.youtube.com/watch?v=9DESulCWbRQ>.
41. **Shaker B., Ahmad S., Lee J., Jung Ch., Dokyun N.** In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*. 2021, 137:104851.
42. **Ferreira D., Adegá F., Chaves R.** The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylome Analysis and Anticancer Drugs Testing. *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*. 2013(1):139-166.
43. **Wilding J. L., Bodmer W. F.** Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Research*. 2014, 74(9):2377-84.
44. **Vejražka M.** Buněčné kultury, textová verze přednášky. [Online] <https://bioprojekty.lf1.cuni.cz/>. [Citace: 7. listopad 2021.] Dostupné na:

<https://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>.

45. **ATCC.** U-118 MG. American Type Culture Collection [Online] *ATCC.org*, říjen 2021. [Citace: 29. říjen 2021.] Dostupné na: <https://www.atcc.org/products/htb-15>.

46. **Hezhen L., Bingxi L., Wei X., Hai W., Wenfeng F., Yawei L., Songtao Q.** Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines. *Turkish Neurosurgery*. 2017, 27(6):894-903.

47. **Cong X., Xuelu L., Pixu L., Man L., Fuwen L.** Patient-derived xenograft mouse models: A high fidelity tool for individualized medicine. *Oncology Letters*. 2019, 17(1): 3-10.

48. **USKVBL.** Aktuálně registrované HVLP s flubendazolem. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. [Online] www.uskvbl.cz 2021. [Citace: 10. říjen 2021.] Dostupné na: <https://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp>.

49. **Čáňová K., Rozkydalová L., Rudolf E.** Anthelmintic Flubendazole and Its Potencial Use In Anticancer Therapy. *Acta Medica*. 2017, 60(1):5-11.

50. **Kubíček V., Skálová L., Skarka A., Králová V., Holubová J., Štěpánková J., Šubrt Z., Szotáková B.** Carbonyl Reduction of Flubendazole in the Human Liver: Strict Stereospecificity, Sex Difference, Low Risk of Drug Interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, 10:600.

51. **Stuchlíková L. R., Králová V., Lněničková K., Zárybnická T., Matoušková P., Hanušová V., Šubrt Z., Skálová L., Ambrož M.** The metabolism of flubendazole in human liver and cancer cell lines. *Drug Testing and Analysis*. 2018, 10(7):1139-1146.

52. **ATCC.org.** Characteristics of HCT-8 (HRT-18). American Type Culture Collection [Online] *ATCC.org*, říjen 2021. [Citace: 29. říjen 2021.] Dostupné na: <https://www.atcc.org/products/ccl-244>

53. **Naß J., Terglane J., Gerke V.** Weibel Palade Bodies: Unique Secretory Organelles of Endothelial Cells that Control Blood Vessel Homeostasis. *Frontiers in Cell and Develomenet Biology*. 2021, 9:813995.

54. **atcc.org**. Characteristics of EA.hy926. American Type Culture Collection [Online] *ATCC.org*, říjen 2021. [Citace: 29. říjen 2021.] Dostupné na: <https://www.atcc.org/products/crl-2922>.
55. **CLS Cell Lines Service GmbH**. Images of U-118 MG human Brain glioblastoma cell line. [Online] *www.clsgmbh.de* [Citace: 29. listopad 2021]. Dostupné na: <https://www.clsgmbh.de/pdf/u-118-mg-pict.pdf>.
56. **Kolektiv MUNI**. Fázový kontrast. Přírodovědecká fakulta MUNI, Ústav experimentální biologie, 2020. [Online] *www.sci.muni.cz* [Citace: 29. listopad 2021] Dostupné na: https://www.sci.muni.cz/kfar/html/fazovy_kontrast.pdf.
57. **Adams G**. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*. 2020, 42(3):48–53.
58. **Tým LabGuide.cz**. Polymerázová řetězová reakce (PCR). *LabGuide: Průvodce laboratoři*. [Online] *www.labguide.cz* [Citace: 10. listopad 2021.] Dostupné na: <https://labguide.cz/metody/pcr/>.
59. **Mahmood T., Yang P. C**. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 2012, 4(9):429–434.
60. **Tým LabGuide.cz**. Western blot. *LabGuide: Průvodce laboratoři*. [Online] *www.labguide.cz* [Citace: 11. listopad 2021.] Dostupné na: <https://labguide.cz/metody/western-blot/>.
61. **GeneAll Biotechnology**. GeneAll® Hybrid-R™: For total RNA isolation from tissues and cultured cells, RNA Purification handbook. Seoul. *GeneAll Biotechnology*, 2010(1).
62. **Carlson B. L., Pokorny J. L., Schroeder M. A., Sarkaria J. N**. Establishment, Maintenance and in vitro and in vivo Applications of Primary Human Glioblastoma Multiforme (GBM) Xenograft Models for Translational Biology Studies and Drug Discovery. *Current Protocols in Pharmacology*. 2011, 52(14):1–14.
63. **Zhang H., Cui B., Zhou Y., Xinxing W., Wantao W., Zeyu W., Ziyu D**. B2M overexpression correlates with malignancy and immune signatures in human gliomas. *Scientific Reports*, 2021, 11(1):5045.

64. **Hagenbuch B.**, MRP2, Multiple Drug Resistance Protein 2. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007, 2007:1-5.