

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**OPAKOVANÉ NÍZKODÁVKOVÉ PODÁNÍ
FLUBENDAZOLU A JEHO VLIV NA BUŇKY
GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Barbora Vítovcová, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Marie Namyslová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své vedoucí diplomové práce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. a své konzultantce PharmDr. Barboře Vítovcové, Ph.D. za trpělivé vedení mé práce a za jejich cenné rady a odborné připomínky podávané s nadměrnou ochotou a pečlivostí. Také děkuji RNDr. Kateřině Dvořákové a všem dalším zaměstnancům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za ochotu a vstřícnost. Za provedení LC/MS analýzy děkuji PharmDr. Adamu Skarkovi, Ph.D. z UHK. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu po celou dobu mého studia.

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

V Hradci Králové

Marie Namyslová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Marie Namyslová

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Opakované nízkodávkové podání flubendazolu a jeho vliv na buňky glioblastoma multiforme

Glioblastom (GBM) patří mezi nejagresivnější a nejčastější primární nádory mozku u dospělých. GBM je odolný vůči dosavadní léčbě a medián přežití u léčených pacientů s tímto onemocněním se pohybuje okolo 15 měsíců. Velice špatná prognóza této nemoci podněcuje ke studiu nových terapeutických strategií. Nadějný směr představují léčiva již registrovaná pro jiné indikace, jako je např. anthelmintikum flubendazol (FLU) s potenciální protinádorovou aktivitou. Cílem této práce bylo studovat účinek FLU po opakovaném nízkodávkovém ovlivnění buněk GBM.

Pro tuto práci byly použity dvě buněčné linie – U87MG a U87MG-IDH1mut a byl studován vliv opakovaného podání FLU na jejich viabilitu (metodou WST-1) a na morfologii buněk (mikroskopie fázového kontrastu). Dále byly po podání FLU hodnoceny změny exprese markerů buněčného cyklu, proliferace, růstu a markerů rezistence na úrovni mRNA (RT-PCR) a na úrovni proteinů (Western blotting). Následně probíhalo stanovení aktivity iniciačních a efektorových kaspáz (pomocí luminiscenčního měření) a stanovení obsahu FLU a jeho metabolitu v buňkách ovlivněných opakovaným podáváním FLU (LC/MS analýzou).

Obě testované buněčné linie vykazovaly k tomuto léčivu vysokou citlivost, FLU účinně inhiboval viabilitu a proliferaci buněk v závislosti na počtu opakování ovlivnění a také na době od ovlivnění. FLU také vyvolal změny v morfologii obou studovaných buněčných linií. Ovlivněním buněk FLU docházelo ke snížení exprese markerů proliferace a buněčného cyklu na úrovni mRNA, nicméně tyto trendy se na úrovni proteinů nepotvrdily. Působením FLU se zvyšovala aktivita iniciačních kaspáz 8 a 9, stejně tak efektorových kaspáz 3/7, a rovněž se po opakovaném ovlivnění zvyšoval v buňkách obsah FLU i jeho metabolitu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Marie Namyslová

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Repeated low-dose flubendazole treatment and its effect on glioblastoma cells

Glioblastoma (GBM) is one of the most aggressive and common primary brain tumours in the adults. GBM is resistant to current treatment and the median survival of treated patients with this disease is around 15 months. The very poor prognosis of this disease has prompted the research of new therapeutic strategies. A promising direction is represented by drugs already registered for other indications, such as the anthelmintic flubendazole (FLU) with potential antitumour activity. The aim of this work was to study the effect of FLU after repeated low-dose treatment of GBM cells.

Two cell lines, U87MG and U87MG-IDH1mut, were used for this work and the effect of repeated doses of FLU on cell viability (using the WST-1) and on cell morphology (via phase contrast microscopy) was investigated. Furthermore, changes in the expression of cell cycle markers, proliferation, growth, and resistance markers after FLU treatment were evaluated at the mRNA level (RT-PCR) and protein level (Western blotting). Subsequently, the activity of initiator and effector caspases was determined (by luminescence assay) and finally, the content of FLU and its metabolite in cells affected by repeated FLU administration was determined (LC/MS analysis).

Both tested cell lines showed high sensitivity to FLU treatment, FLU effectively inhibited cell viability and proliferation depending on the number of repetitions of FLU treatment and on the length of the treatment as well. FLU also induced changes in the morphology of both cell lines. In the cells treated with FLU, the decrease in the expression of proliferation and cell cycle markers at the mRNA level could be observed, but these trends were not confirmed at the protein level. FLU treatment increased the activity of initiator caspases 8 and 9 as well as effector caspases 3/7 and increased the content of FLU and its metabolite in cells after repeated treatment.

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Nádorová onemocnění.....	9
2.2 Glioblastom	11
2.2.1 Charakteristika a klasifikace glioblastomu.....	11
2.2.2 Epidemiologie, výskyt nemoci a rizikové faktory.....	13
2.2.3 Molekulární změny spojené s GBM.....	14
2.2.4 Klinické projevy	21
2.2.5 Diagnóza a prognóza	22
2.2.6 Současné léčebné postupy	23
2.3 Látky působící na mikrotubulární cytoskelet a „drug repurposing“.....	28
2.4 Benzimidazoly	29
2.4.1 Flubendazol	30
3. CÍLE	34
4. METODIKA A MATERIÁL	35
4.1 Materiál.....	35
4.1.1 Buněčné linie a jejich kultivace.....	35
4.1.2 Přístrojové vybavení.....	35
4.1.3 Chemikálie.....	36
4.1.4 Pomůcky	37
4.2 Stanovení viability buněk metodou WST-1	38
4.3 Mikroskopie fázového kontrastu	38
4.4 Kvantifikace proteinů metodou Western blot	39
4.4.1 Příprava vzorku pro analýzu Western blot.....	39
4.4.2 Měření koncentrace proteinů metodou BCA.....	40
4.4.3 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu	41
4.4.4 Imunoblotting	43

4.4.5 Detekce proteinů.....	43
4.5 Kvantifikace mRNA metodou RT-PCR.....	44
4.5.1 Izolace RNA pomocí kolonek.....	45
4.5.2 Příprava cDNA a qPCR identifikace	46
4.5.3 PCR amplifikace jednovláknové cDNA.....	46
4.6 Luminiscenční test buněčné apoptózy	46
4.7 Stanovení léčiv v biologickém materiálu pomocí LC/MS	47
4.8 Statistická analýza	48
5. VÝSLEDKY	49
5.1 Vliv FLU na viabilitu buněčných linií U87MG a U87MG-IDH1-mut	49
5.2 Stanovení inhibiční koncentrace IC50.....	57
5.3 Morfologické změny buněk po ovlivnění FLU	57
5.4 Stanovení vlivu FLU na expresi vybraných markerů.....	62
5.5 Stanovení proteinové exprese vybraných markerů.....	69
5.6 Stanovení aktivity kaspáz	73
5.7 Stanovení obsahu FLU a jeho metabolitu v buňkách U87MG a U87MG-IDH1-mut	76
6. DISKUZE	79
7. ZÁVĚR.....	85
8. SEZNAM ZKRATEK.....	86
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	88

1. ÚVOD

Glioblastom představuje nejagresivnější a nejčastější formu primárního nádoru mozku difúzního typu. Navzdory intenzivnímu výzkumu a pokrokům v moderní medicíně je tento gliom s vysokou buněčnou proliferací, imunorezistencí a heterogenitou začleněn mezi onemocnění nedostatečně odpovídající na nynější dostupnou léčbu. Medián přežití pacientů s glioblastomem se pohybuje okolo 15 měsíců (Czarnywojtek et al. 2023, Grochans et al. 2022).

Vzhledem k nedostatečným znalostem o rizikových faktorech glioblastomu neexistuje skutečná prevence před tímto onemocněním. Po diagnóze, která může být v některých případech z důvodu nespecifických klinických projevů onemocnění zpožděna, přichází co nejrozsáhlejší resekce nádoru následovaná radioterapií doplněnou chemoterapií. Léze však na radioterapii reagují nedostatečně a z důvodu přítomnosti hematoencefalické bariéry je omezena i léčba chemoterapeutiky. Navíc je podávání temozolomidu jako nejčastějšího adjuvans při radioterapii spojeno se vznikem rezistence (Adam et al. 2010, Jiapaer et al. 2018, Thakkar et al. 2014, Wirsching et al. 2016).

S ohledem na tyto nepříznivé skutečnosti je žádoucí najít nové terapeutické postupy vedoucí ke zlepšení prognózy pacientů postižených tímto typem nádoru. Výzkum nových léčiv je však finančně i časově náročný proces, i proto existuje snaha o použití léčiv již schválených v jiných indikacích. Mezi tato léčiva patří také rozsáhlá skupina benzimidazolů, které se ve své původní indikaci používají jako anthelmintika ve veterinární i humánní medicíně. Jedním z těchto anthelmintik je flubendazol, který vykazoval protinádorovou aktivitu již v dřívějších studiích u různých typů nádorových buněk (Čáňová et al. 2017, Chen et al. 2022a, Hanušová et al. 2015).

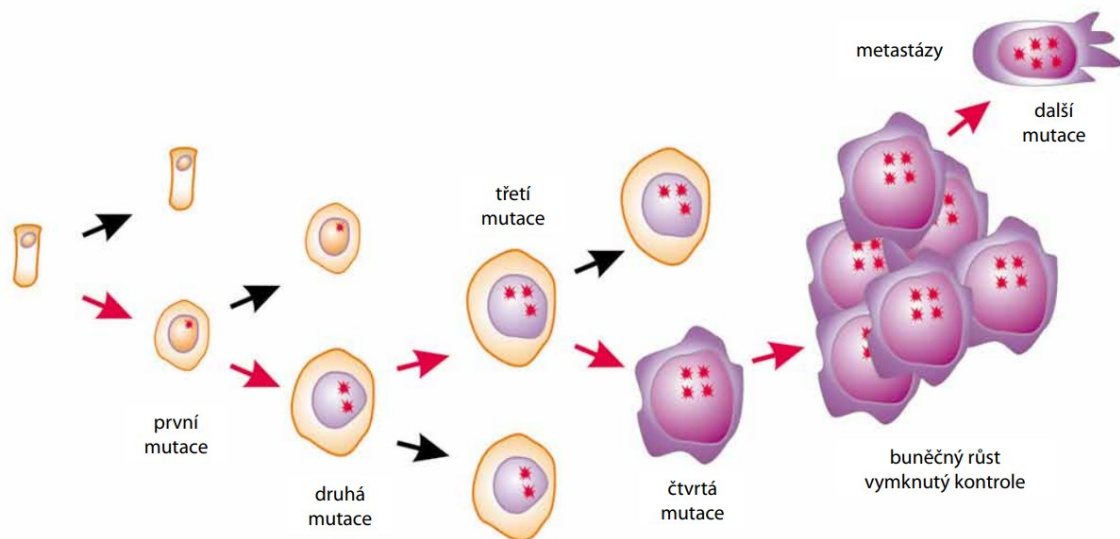
V této práci jsme se proto zabývali vlivem potenciálního chemoterapeutika flubendazolu na buňky glioblastomu, a to po jejich opakovaném ovlivnění především nízkými dávkami testovaného léčiva.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nádorová onemocnění

Rakovina je označení pro komplexní onemocnění, které patří mezi globální zdravotní problémy a jeho vývoj se nazývá karcinogeneze. Pro maligní nádory je charakteristická nekontrolovaná proliferace buněk, která je v rozporu s normální regulací buněčného růstu a diferenciaci (Peters et al 2018, Yin et al 2021, Jamasbi et al 2022).

Podle klonální teorie vzniku nádoru se novotvar vyvíjí z jediné buňky. Pro spuštění karcinogeneze je zapotřebí akumulace většího množství genetických a epigenetických mutací, které vzájemně synergicky působí v buněčném genomu. Tato komplexní kombinace změn způsobuje neschopnost buněk odpovídat na kontrolní mechanismy buněčného cyklu, a unikat tak před opravami DNA a programovanou buněčnou smrtí (apoptózou), což v konečném důsledku vede k jejich neomezené proliferaci (Cree 2011, Kontomanolis et al. 2020, Yin et al. 2021).



Obr. 1: Karcinogeneze jako proces postupného hromadění mutací (zdroj: Šmardová & Koptíková 2016)

S akumulací genetických mutací může dojít k maligní transformaci kmenových buněk, které mají schopnost dediferenciaci a nekontrolované proliferace, což umožňuje kmenovým buňkám stát se původcem neoplazií. Současně mohou sloužit jako zdroj karcinogeneze také progenitorové buňky, když procházejí maligní transformací a ztrácejí schopnost normální diferenciaci (Yin et al. 2021).

Ztráta genů, či jejich změny se často týkají protoonkogenů a tumor supresorových genů, jež za normálních okolností regulují buněčný cyklus a dělení. Mutace v protoonkogenech vedou k jejich přeměně na onkogeny, které mají schopnost indukovat proliferaci a nekontrolovatelný růst buněk a přispívají tak k nádorovému bujení (Kontomanolis et al. 2020).

V procesu aktivace protoonkogenů na onkogeny se zapojují různé mechanismy. Prvním z nich je translokace chromozomů, kdy dochází k přesunu jedné části chromozomu na chromozom jiný. Při aktivaci protoonkogenů hraje roli také bodová mutace, která vede ke změně jednoho nukleotidu v DNA. Amplifikace genu představuje další mechanismus, při němž se zvyšuje počet kopií genu v genomu. V případě amplifikace protoonkogenů dochází k produkci více proteinů, což následně posiluje signály růstu a proliferace buněk (Kontomanolis et al. 2020, Wang et al. 2018).

Tumor supresorové geny hrají klíčovou roli v regulaci buněčného růstu a potlačení vzniku rakoviny. Chrání organismus před rozvojem malignit tím, že sledují několik klíčových bodů v buněčném cyklu a monitorují integritu genomu. V případě poškození DNA nebo dalších změn v buňce mohou tyto ochranné mechanismy pozastavit buněčný cyklus a stimulovat opravy této nukleové kyseliny. Při výskytu neopravitelných lézí spouští proces programované buněčné smrti. Mutace nebo inaktivace tumor supresorových genů mohou umožnit buňkám nekontrolovaný růst a proliferaci, čímž přispívají k procesu tumorigeneze (Kontomanolis et al. 2020, Wang et al. 2018).

Začátek rakovinného bujení je rovněž spojen s epigenetickými modifikacemi. Epigenetické změny zastávají klíčovou úlohu v řízení různých biologických procesů, včetně diferenciac buněk, regulace aktivity genů a udržení genomické stability. Abnormální epigenetické změny mohou vést k modifikaci funkce genů a malignitě buněk, přičemž tak přispívají k celé řadě onemocnění, včetně rakoviny (Baylin et al. 2016, Sharma et al. 2009).

Jeden z epigenetických mechanismů je DNA metylace, což je připojení metylových skupin na cytosin v DNA. Tento proces může potlačit aktivitu některých genů, včetně tumor supresorových genů (Baylin et al. 2016, Sharma et al. 2009).

Histony, bílkoviny obalující DNA, mohou též podstupovat chemické modifikace, jako je metylace, acetylace a fosforylace. Tyto modifikace ovlivňují míru dostupnosti

DNA pro transkripci, čímž regulují aktivaci či potlačení příslušných genů (Baylin et al. 2016, Sharma et al. 2009).

Dalšími mechanizmy epigenetických modifikací je změna pozice nukleozomů v DNA a regulace genové aktivity pomocí malých nekódujících RNA molekul, jako jsou siRNA a miRNA. Tyto molekuly ovlivňují translaci a stabilitu mRNA, což má klíčový význam pro expresi genů (Baylin et al. 2016, Sharma et al. 2009).

Vlastnosti nádorových buněk zahrnují neomezenou schopnost replikace nad limity stanovené délkou telomer. Kmenové buňky sice mohou obnovovat konce své telomerické DNA, avšak u somatických buněk je tato schopnost patologickým jevem. Neoplastické buňky dále vykazují schopnost vylučovat pro-angiogenní cytokiny, které stimuluje tvorbu nových krevních cév, čímž buňkám zajistí přísun živin a kyslíku. Další významnou vlastností nádorových buněk je jejich schopnost pronikat do normálních tkání, kde narušují běžné procesy. Rovněž dochází ke změně interakce mezi imunitním systémem a nádorovými buňkami, což umožňuje těmto buňkám imunitnímu systému unikát (Cree 2011, Hanahan et al. 2000).

Pro maligní léze je též charakteristické metastázování, což je proces, během něhož se buňky oddělují od primárního nádoru migrací a proliferací, s cílem pronikat do různých vzdálených orgánů (Yin et al. 2021).

2.2 Glioblastom

2.2.1 Charakteristika a klasifikace glioblastomu

Glioblastom (GBM) představuje nejagresivnější formu gliomů, nádorů mozku vznikajících z astrocytárních buněk – podpůrných buněk nervové tkáně. Jedná se o nejčastější primární nádor mozku difúzního typu (Grochans et al. 2022).

GBM je charakterizován několika klíčovými aspekty, které přispívají k jeho agresivitě, nedostatečné odpovědi na léčbu a také k velmi špatné prognóze postižených pacientů. Toto onemocnění se vyznačuje vysokou invazivitou, rychlou proliferací a výraznou mitotickou aktivitou. Anaplastické buňky v GBM mají schopnost infiltrovat okolní zdravé tkáně, vykazují nekontrolované dělení a unikají kontrolám v buněčném cyklu a následné apoptóze. Výsledkem je rychlý růst nádoru, což ztěžuje kompletní

chirurgické odstranění (Czarnywojtek et al. 2023, Fu et al. 2023, Paolillo et al. 2018, Wang et al. 2022, Wirsching et al. 2016).

GBM prokazuje histologickou heterogenitu jak mezi jednotlivými nádory (intertumorálně), tak uvnitř nádoru (intratumorálně). V GBM lze také nalézt buňky s vlastnostmi kmenových buněk označované jako glioblastomové kmenové buňky, které přispívají k recidivám, k odolnosti nádoru vůči léčbě a k agresivitě této malignity. Heterogenita nádoru je rovněž determinována různými genetickými abnormalitami vedoucími ke klinické variabilitě mezi jednotlivými pacienty (Ayob et al. 2018, Osman et al. 2020, Wang et al. 2022, DeCordova et al. 2020).

Pro GBM jsou typická nekrotická ložiska, prostředí nádoru se navíc jeví jako imunosupresivní a adekvátně nereaguje na imunitní systém. Dalším charakteristickým znakem GBM je schopnost vlastní angiogeneze. Rychlý růst, krátký průběh nemoci a hematoencefalická bariéra pravděpodobně vysvětlují, proč se metastázy u těchto nádorů mozku vyskytují mimo centrální nervový systém (CNS) jen zřídka (Fu et al. 2023, Medikonda et al. 2021, Urbanska et al. 2014, Wang et al. 2022, Wirsching et al. 2016).

Klasifikace malignit představuje důležitý krok pro jejich správnou diagnózu, stanovení strategie terapie a určení prognózy. Podle tabulky klasifikace gliomů vytvořené Světovou zdravotnickou organizací (WHO), patří GBM do nejvyššího IV. stupně. GBM jsou fenotypicky a geneticky různorodou skupinou vznikající buď *de novo* z gliálních buněk (primární GBM), nebo jako sekundární tumory, které se vyvíjejí z primárních gliomů nižšího stupně. Přibližně 90 % diagnostikovaných GBM patří mezi GBM primárního typu, jejichž vývoj trvá zhruba 3 měsíce, zatímco sekundární GBM rostou delší dobu, obvykle 4 až 5 let. I přesto, že oba tyto typy vykazují podobné histologické a morfologické charakteristiky, jejich genetické odchylky, incidence a prognóza se významně liší (Louis et al. 2021, Paolillo et al. 2018, Thakkar et al. 2014, Urbanska et al. 2014, Wirsching et al. 2016).

GBM se dále z jiného hlediska dělí na molekulární podtyp proneurální, neurální, mezenchymální a klasický, a to na základě komplexních molekulárních aspektů včetně exprese mRNA. Tyto podtypy rovněž vykazují odlišnosti ve svých vzorcích progresu, odpovědi na terapii a výsledcích léčby (Paolillo et al. 2018, Verdugo et al. 2022).

2.2.2 Epidemiologie, výskyt nemoci a rizikové faktory

Podle dostupných zdrojů dosahuje incidence případů GBM přibližně 3 na 100 000 obyvatel každý rok, přičemž tato hodnota může na celosvětové úrovni kolísat. Tato forma nádoru představuje nejčastější primární malignitu mozku u dospělých a vyznačuje se vysokou mortalitou. Statisticky se GBM vyskytuje 1,6krát častěji u mužů než u opačného pohlaví (Grochans et al. 2022, Ostrom et al. 2014, Tamimi & Juweid 2017, Wen et al. 2020).

V 90 % případů se GBM vyvíjí z astrocytárních gliových buněk *de novo* vysokou rychlostí, což odpovídá primárnímu GBM. Zbývajících 10 % představuje sekundární typ GBM (Urbanska et al., 2014).

GBM se vyskytuje s vyšší frekvencí u bělochů, u europoidní rasy bylo hlášeno více případů než např. u Afričanů a Afroameričanů (Grochans et al. 2022, Tamimi & Juweid 2017, Thakkar et al. 2014).

Glioblastomové léze mohou vzniknout z gliální tkáně kdekoliv v CNS, ale ve většině případů v supratentoriální části mozku, kde se nachází frontální, temporální, parietální a okcipitální lalok. Ve frontálním laloku je výskyt GBM nejfrekventovanější. V jiných částech mozku, jako je mozeček a mícha, pak vzniká vzácněji (Grochans et al. 2022, Ostrom et al. 2014, Tamimi & Juweid 2017, Thakkar et al. 2014).

Věk sehrává v případě GBM klíčovou roli, neboť s postupujícím věkem stoupá výskyt tohoto nádoru. GBM se častěji vyvíjí u starších jedinců, a u jedinců ve věku 85 let a starších incidence klesá. Medián věku při diagnostice GBM činí 64 let, a nejčastější doba přežití po diagnóze se pohybuje kolem 15 měsíců (Grochans et al. 2022, Ostrom et al. 2014, Tamimi & Juweid 2017, Thakkar et al. 2014, Wen et al. 2020).

Do neovlivnitelných rizikových faktorů GBM můžeme tedy zařadit věk, mužské pohlaví, rasu, etnicitu, a podle některých studií dokonce i výšku pacienta. Dalším potenciálním rizikem pro vývoj GBM je obezita (Grochans et al. 2022, Thakkar et al. 2014).

Tuto malignitu nelze označit jako geneticky vrozenou, hereditární výskyt GBM je vzácný a u většiny pacientů s GBM nenacházíme rodinou historii těchto nádorů. Nicméně u pacientů s dědičnými nádorovými syndromy, jako jsou Turcotův syndrom,

Li-Fraumenův syndrom nebo fibromatóza, může existovat zvýšené riziko vzniku tohoto invazivního nádoru (Ostrom et al. 2014, Tamimi & Juweid 2017, Wen et al. 2020).

Byla studována celá řada environmentálních a genetických faktorů, které by mohly přispívat ke vzniku GBM. Mezi tyto faktory patří trvalý pobyt v průmyslových oblastech, socioekonomický status, předchozí expozice ionizujícímu záření, kontakt s chemikáliemi, pesticidy, těžkými kovy a rozpouštědly, ale také historie zranění hlavy. Existují i studie o vlivu tabákového kouře, mikrovlňného záření a elektromagnetického záření z mobilních telefonů (Grochans et al. 2022, Ostrom et al. 2014, Thakkar et al. 2014, Urbanska et al. 2014).

Vzhledem k tomu, že žádný z těchto potenciálních exogenních rizikových faktorů dosud nevykázal vysokou odpovědnost za vznik GBM, byla většina těchto faktorů označena jako sporadická (Thakkar et al. 2014).

Existují i potenciální protektivní faktory GBM. Mezi ně můžeme zařadit například ženské pohlaví a hormony a krátkodobé užívání nesteroidních antiflogistik. Epidemiologické studie konzistentně naznačují, že by alergické stavy včetně astmatu, ekzému, senné rýmy a potravinových alergií mohly riziko vývoje GBM snižovat (Grochans et al. 2022, Ostrom et al. 2014, Thakkar et al. 2014, Wen et al. 2020).

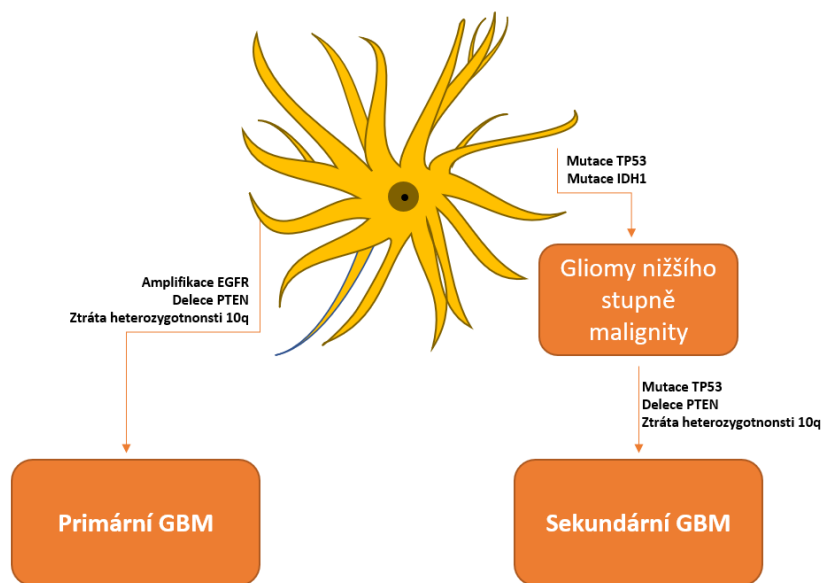
2.2.3 Molekulární změny spojené s GBM

V GBM byly již identifikovány různé změny na molekulární úrovni, které souvisejí s komplexními mechanismy vzniku tohoto nádoru. Existuje rozsáhlá škála genetických a epigenetických aspektů, u kterých dochází během vývoje GBM k dysregulaci, která je spojena s mutacemi a aberacemi genů různých molekulárních biomarkerů. Tyto genetické odchylky vedou k abnormální regulaci dvou klíčových systémů v buňce, konkrétně signálních drah a buněčného cyklu, což hraje roli ve zvýšené proliferaci, inhibici apoptózy a ve spuštění invaze a angiogeneze (Alifieris & Trafalis 2015, Taylor et al. 2019, Thakkar et al. 2014).

Buňky GBM se vyznačují nekontrolovatelnou progresí buněčného cyklu, ke které dochází na základě změn různých drah regulujících tento cyklus a apoptózu. Dráha RB proteinu (retinoblastoma proteinu), který v nefosforylované formě brání progresi buněčného cyklu, je často v GBM modifikována např. delecí, mutací, nebo metylací genů kódujících tento protein. Další dráhou, jejíž změna vede k indukci buněčného cyklu, je

dráha tumor supresorového proteinu p53. Taktéž upregulace dráhy P13K/AKT/mTOR vede k tumorigenezi, kde protein mTOR působící v této dráze indukuje syntézu cyklinů (např. cyklinu D1), a tím i buněčný růst. Dalšími změnami, jež ovlivňují buněčný cyklus a pozitivně korelují se stupněm malignity GBM, mohou být zvýšená exprese p38, upregulace dráhy NF-κB s antiapoptickým účinkem a mutace v promotoru genu telomerázové reverzní transkriptázy (TERT) (Ferry et al. 2018, Gousias et al. 2022, Paolillo et al. 2018).

Primární a sekundární GBM nemusí být do jisté míry histopatologicky rozlišitelné, ale u každého z těchto typů tumoru nalézáme odlišné genetické změny. Pro primární GBM je typičtější nadměrná exprese receptoru EGFR, mutace genu fosfatázy a homologu tenzinu (*PTEN*), ztráta heterozygotnosti dlouhého raménka chromozomu 10 (LOH 10q), promotorové mutace TERT nebo delece 16p. V souvislosti se sekundárním GBM jsou přítomny nejčastěji mutace isocitrátdehydrogenázy (*IDH1*), mutace genu *TP53* a ztráta 19q (Aldape et al. 2015, Thakkar et al. 2014, Wilson et al. 2014).



Obr. 2: Genetické změny v molekulách typických pro vznik a vývoj primárního a sekundárního GBM (zdroj: Vítovcová 2023)

2.2.3.1 Protein *STAT3*

Převodník signálu a aktivátor transkripce 3 (*STAT3*) je onkogenní transkripční faktor, který je u lidí kódován genem *STAT3*, je aktivován různými cytokinovými

receptory a figuruje v signální dráze IL6/JAK/STAT. Tato dráha je spojena s progresí a patogenezí řadou malignit, včetně GBM (Fu et al. 2023, Vítovcová et al. 2023).

Bylo prokázáno, že gen *STAT3*, lokalizovaný na chromozomu 17 lidského genomu, může zastávat v neoplastických onemocněních duální roli. V některých případech může působit i jako tumor supresorový gen, ale upregulace *STAT3* jako onkogenu se vyskytuje až u 70 % všech nádorových onemocnění (Fu et al. 2023, Lin et al. 2019, Vítovcová et al. 2023).

Pokud je *STAT3* v buňkách GBM nadměrně aktivován, může *STAT3* inhibovat aktivitu cytotoxických NK buněk, T-lymfocytů a zrání dendritických buněk, tím vytvářet imunosupresivní prostředí v GBM, a podporovat tak invazi, proliferaci a metastázování buněk. Tato zvýšená aktivace může navíc negativně ovlivňovat expresi p53 a exprese jiných genů, jako je gen pro vaskulární endotelový růstový faktor, může být naopak zvýšena. Nádorové buňky tak mohou unikat apoptotickému procesu, což přispívá k jejich přežití (Fu et al. 2023, Lin et al. 2019, Vítovcová et al. 2023).

Kdyby došlo k cílenému zablokování signální dráhy IL6/JAK/STAT, mohl by se inhibovat růst a metastázování nádorových buněk GBM. Zastavení této dráhy je tedy považováno za důležitou potenciální strategii pro léčbu neoplazií (Fu et al. 2023, Lin et al. 2019).

2.2.3.2 Protein p53

Tumor supresorový protein p53, který je označován také jako strážce genomu, má důležitou funkci při potlačování tumorigeneze. Pokud dojde k porušení buněčné DNA, je p53 schopný iniciovat a koordinovat opravu této nukleové kyseliny. V případě, že dojde ke vzniku nenapravitelných lézí DNA, zastavuje p53 buněčný cyklus a navodí se apoptóza (Carlsson et al. 2014, Sasmita et al. 2018).

V GBM se mohou nacházet mutace genu *TP53*, který kóduje protein p53. Tyto bodové mutace se vyskytují až u 90 % všech GBM sekundárního typu. Primární GBM vykazovaly tyto mutace jen ve 30 % případů, tudíž jsou změny p53 spojovány častěji s nižším věkem pacientů při diagnóze GBM (Sasmita et al. 2018, Thakkar et al. 2014).

Gen *TP53* je negativně regulován *MDM2* a sám reguluje mevalonátovou dráhu, přičemž oba tyto mechanismy podporují proces tumorigeneze. Bylo zjištěno, že výskyt

mutantního genu *TP53* silně koreluje s přechodem nádoru mozku nízkého stupně na GBM vysokého stupně (Carlsson et al. 2014, Sasmita et al. 2018).

U primárních GBM, jejichž buňky exprimují mutantní p53, se objevovaly souběžné mutace nebo delece *PTEN*, který je stejně jako protein p53 kritický pro buněčnou homeostázu. *PTEN* by navíc mohl být prognostickým faktorem u pacientů s diagnostikovaným GBM starších než 45 let, kde by hladiny *PTEN* pozitivně korelovaly s přežitím pacienta (Carlsson et al. 2014).

2.2.3.3 ZTRÁTA HETEROZYGOTNOSTI CHROMOZOMŮ

Ztrátou heterozygotnosti je ovlivněno v GBM mnoho chromozomů. Nejčastěji to bývají chromozomy 9p, 10, 17p, 19q a 22, kdy p označuje krátké raménko a q raménko dlouhé. Tato genetická ztráta se konkrétně na chromozomu 10 může týkat pouze jednotlivých ramen, nebo dochází ke ztrátě celého chromozomu (Sasmita et al. 2018, Thakkar et al. 2014).

LOH 10q, konkrétněji 10q23, je společnou charakteristikou až u 70 % pacientů postižených GBM, s častějším výskytem u primárního typu tohoto nádoru mozku. Gen *PTEN* pro výše uvedený tumor supresorový protein je lokalizován právě na 10q, jehož ztrátou je tento gen silně ovlivněn. *PTEN* inhibuje PIP3, tím zabraňuje buněčné proliferaci, tudíž jeho delece může sloužit jako prediktor nepříznivé prognózy (Sasmita et al. 2018, Thakkar et al. 2014).

2.2.3.4 ISOCITRÁTDEHYDROGENÁZA (IDH)

NAD^+ dependentní metabolický enzym IDH katalyzuje oxidační dekarboxylaci v Krebsově cyklu. Během této reakce vzniká z isocitrátu alfa-ketoglutarát a NAD^+ se redukuje na NADH. Kromě toho existují cytozolické formy IDH, které ke svému fungování využívají kofaktor NADP^+ (Cloughesy et al. 2014).

Až v 85 % případech sekundárního GBM můžeme najít bodové mutace na aktivním místě IDH, a to buď v kodonu 132 (IDH1) nebo méně často v kodonu 172 (IDH2). Tyto mutace podporují neomorfni aktivitu enzymu IDH, díky které je během dekarboxylace isocitrátu produkován onkometabolit 2-hydroxyglutarát, který pak přispívá s alfa-ketoglutarátem k aktivaci dalších enzymů podporujících metylaci DNA. To nakonec vede k hypermetylaci této nukleové kyseliny a případné tumorigenezi.

Bodové mutace IDH nejsou v primárních GBM přítomny, a proto by mohly sloužit jako biomarker pro sekundární typ GBM, který je diagnostikován u mladších pacientů a je spojován s příznivější prognózou (Aldape et al. 2015, Carlsson et al. 2014, Cloughesy et al. 2014, Sasmita et al. 2018, Thakkar et al. 2014).

Bodové mutace IDH pozitivně korelují s dalšími molekulárními abnormalitami jako je např. mutace *TP53* a *ATRX*. Inverzní korelaci pak vykazuje například s amplifikací genu *EGFR* (Aldape et al. 2015).

2.2.3.5 MUTACE A AMPLIFIKACE EGFR

Gen pro EGFR, receptor pro transmembránovou tyrosin kinázu, se nachází na chromozomu 7p12. Prostřednictvím signálních drah může EGFR modulovat různé buněčné funkce a aktivity, včetně nádorové invazivity, či rezistence vůči chemoterapii a radioterapii. Ke zvýšené aktivitě tohoto proteinu dochází zvýšením jeho exprese, mutací jeho genu, nefunkčností inhibitorů signálních drah EGFR, přítomností kontinuálně aktivovaného EGFR – EGFRvIII, nebo amplifikací EGFR (Thakkar et al. 2014).

Zvýšená exprese mutantní formy EGFRvIII (nejčastější změna spojená s EGFR), kterou nese až 70 % všech primárních typů GBM, podporuje a indukuje proliferaci buněk, tumorigenitu a odolnost vůči apoptóze. Navíc díky této formě EGFR mohou buňky GBM indukovat sousední buňky k jejich přeměně na fenotyp podobný GBM (Aldape et al. 2015, Carlsson et al. 2014, Thakkar et al. 2014).

Kontinuálně aktivovaný EGFR vykazuje potenciál sloužit jako prognostický biomarker pro GBM. Identifikace konstitutivně aktivního EGFR v nádoru signalizuje nepříznivou prognózu u pacientů s touto formou nádoru (Sasmita et al. 2018, Thakkar et al. 2014).

2.2.3.6 ENZYM MGMT

O-6-methylguanin-DNA-methyltransferáza (MGMT) je enzym, jehož úkolem je opravovat DNA. Enzym má schopnost odstraňovat methylové skupiny z O-6-methylguaninu, což je typ genomické léze vzniklé působením alkylačními látkami jako je Temozolomid (TMZ) (Aldape et al. 2015).

Pokud je v buňkách GBM hypermetylován promotor genu tohoto enzymu, dochází k transkripčnímu utlumení genu. MGMT určuje míru citlivosti na léčbu alkylačními látkami a metylace promotoru MGMT může poskytovat lepší prognózu při chemoterapii, a sloužit tak jako prediktivní a prognostický biomarker GBM (Aldape et al. 2015, Sasmita et al. 2018, Thakkar et al. 2014).

2.2.3.7 MUTACE TERT

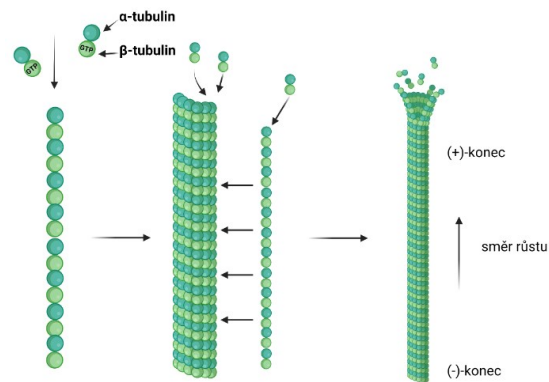
TERT představuje klíčovou podjednotku telomerázového komplexu, enzymu zodpovědného za udržování délky telomerické DNA na chromozomálních koncích. Tato délka má tendenci se zkracovat při každém buněčném dělení, a proto je role telomerázy kritická pro udržení stability chromozomů (Aldape et al. 2015, Cree 2011)

U nádorových onemocnění je často pozorována přítomnost mutací v promotoru genu TERT, v případě GBM primárního typu byly tyto mutace pozorované až u 70 % pacientů. Touto mutací TERT získávají buňky vlastnosti charakteristické pro neoplazie, včetně neomezeného buněčného dělení a imortality (Aldape et al. 2015, Thakkar et al. 2014).

2.2.3.8 MIKROTUBULÁRNÍ CYTOSKELET A JEHO DYSREGULACE

Mikrotubuly jsou dynamickou polární strukturou, která spolu s mikrofilamenty a intermediálními filamenty tvoří cytoskelet jak v buňkách zdravých, tak v buňkách nádorových. Zapojují se do mnoha důležitých základních buněčných funkcí, jako je například vznik mitotického vřeténka, které zajišťuje rovnoměrnou distribuci chromatid v anafázi a následné rozdělení genetické informace do dvou dceřiných buněk (Goodson et al. 2018, Katsetos et al. 2011, Katsetos et al. 2015).

Mikrotubulární cytoskelet mimo jiné udržuje buněčný tvar, mechanickou odolnost a polaritu, umožňuje buňkám navzájem komunikovat a přijímat extracelulární materiál. Mikrotubuly také figurují v dalších klíčových funkcích, včetně zajišťování intracelulárního transportu nebo interakce s různými buněčnými organelami (Chen et al. 2022a, Katsetos et al. 2011, Katsetos et al. 2015, Zottel et al. 2021).



Obr. 3: Struktura mikrotubulů

(zdroj: <https://e-learning.vscht.cz/mod/glossary/showentry.php?eid=50961&displayformat=dictionary>)

Tyto hojně se vyskytující proteiny, které tvoří asi 20 procent všech proteinů v mozku, jsou složeny z heterodimerů alfa a beta tubulinu, jež dále vytvářejí polární protofilamenta, připomínající tvar trubice. V savčích buňkách jsou minus konce mikrotubulů stabilně zakotveny v centrálních organizačních centrech mikrotubulů (MTOC), zatímco plus konce projevují dynamickou schopnost, která zahrnuje procesy polymerizace a depolymerizace těchto proteinů. Maligní buňky mají schopnost proliferace, angiogeneze, invaze, migrace a metastázování především díky mikrotubulárnímu cytoskeletu. (Goodson et al. 2018, Katsetos et al. 2011, Katsetos et al. 2015, Králová et al. 2013, Zottel et al. 2021)

Jeden z izotopů β -tubulinu, β III-tubulin, je fyziologicky exprimován v neuronech, zatímco v gliálních a dalších buňkách se většinou vyskytuje jen v zárodečné fázi. Ve všech typech a stupních gliomů je mikrotubulový cytoskelet dysregulován a exprese tohoto izotypu je zde v různé míře vyšší než při fyziologickém stavu. Vyšší hladina β III-tubulinu koreluje s agresivnějším chováním a nepříznivými klinickými výsledky, což zahrnuje vyšší histologický stupeň, chemorezistenci a pokročilý průběh onemocnění (Katsetos et al. 2011, Katsetos et al. 2015, Vítovcová et al. 2023)

Dalším nadměrně exprimovaným proteinem v GBM je γ -tubulin, který jako součást MTOC hraje roli při nukleaci mikrotubulů. γ -tubulin je obvykle lokalizován v centrozomech, avšak v buňkách GBM byla jeho exprese objevena i v cytosolu. V GBM je často koexprimován s β -tubulinem (Katsetos et al. 2011, Katsetos et al. 2009).

Abnormální akumulace a změny v GBM se mohou vyskytovat i u dalších proteinů cytoskeletu, např. intermediálních filament, jako jsou vimentin, gliální fibrilární kyselý protein (GFAP), synemin a nestin (Zottel et al. 2021).

Cytoskeletární proteiny se jeví jako potenciální biomarkery pro diagnostiku a terapii GBM. V současné době se v léčbě různých typů nádorů používá již celá řada látek působících na mikrotubuly (MTAs) (Katsetos et al. 2015, Zottel et al. 2021, Vitovcová et al. 2020).

2.2.4 Klinické projevy

Standardní klinická prezentace GBM neexistuje, neboť pacienti s touto diagnózou vykazují nespecifické symptomy, které se mohou lišit u každého jedince. Klinický průběh onemocnění závisí na umístění nádoru a dynamice jeho šíření. Vzhledem k rychlému průběhu GBM dochází ve většině případů k postupné progresi jeho příznaků. Jelikož bývají klinické projevy GBM nespecifické, může se toto onemocnění při diagnostice zaměnit za infekce nebo cirkulační a imunitní choroby, což může způsobit zpoždění ve stanovení správné diagnózy (McKinnon et al. 2021, Tiefenbach et al. 2023, Urbanska et al. 2014, Wirsching et al. 2016).

Poškozením tkáně a následným otokem dochází ke zvýšení intrakraniálního tlaku, který provází řada nepříjemných symptomů včetně bolesti hlavy, zvracení, závratí, neurologické deficience, ataxie s projevy ztráty koordinace. Možná je i přítomnost halucinací, jak sluchových, tak vizuálních (Tiefenbach et al. 2023, Urbanska et al. 2014, Wirsching et al. 2016).

Významným příznakem GBM je také nově vzniklý epileptický záchvat, který je pozorován u 25 % případů a v pozdním stadiu nemoci postihuje až 50 % pacientů. Epileptický záchvat jako první příznak GBM je spojován s lepší prognózou onemocnění. Ložisko v tomto případě bývá pravděpodobně menší a jeho chirurgickou resekci lze provést snadněji (Tiefenbach et al. 2023, Wirsching et al. 2016).

K neurologickým příznakům GBM dále řadíme poruchy zraku, jako je diplopie nebo rozostřené vidění. Dále mohou trpět pacienti laxními sfinktery, inkontinencí moči a stolice a erektilní dysfunkcí. Jsou pozorovány i časté synkopy a ischialgie – bolesti, ztráta citlivosti a oslabení v dolních částech zad a končetin, které připomínají potíže při vyhřezlé plotýnce (Gee et al. 2012, Urbanska et al. 2014).

Zpožděná diagnostika může nastat i v případě, kdy se GBM nachází v přední části mozku. Při této lokaci tumoru mohou pacienta postihnout poruchy nálady i změny

osobnosti, což jsou obvykle projevy psychogenní poruchy, a proto v těchto případech není snadné určit správnou diagnózu (Wirsching et al. 2016).

2.2.5 Diagnóza a prognóza

Diagnostické nástroje pro GBM bývají použity v reakci na symptomy zmíněné výše, které jsou způsobeny invazivní destrukcí mozkové tkáně a rychlým růstem nádoru. Screening nádorů mozku není běžný. Pacienti, u kterých se vyskytuje určité genetické riziko vzniku nádoru, jako je například neurofibromatóza typu 1 a Turcotův syndrom, mohou být sledováni. Během neurologického vyšetření se používají zobrazovací metody včetně magnetické rezonance (MRI), počítačové tomografie (CT) a pozitronové emisní tomografie (PET) (Weller et al. 2017, Wirsching et al. 2016, Wen et al. 2020).

Pro určení definitivní diagnózy je nutno provést histopatologické vyšetření zahrnující histologické, cytologické nebo histochemické stanovení odebraného vzorku nádoru. Jedním z diagnostických biomarkerů je protein GFAP, jež je fyziologicky exprimován v astrogliálních buňkách, avšak s rostoucí malignitou a klesající diferenciací buněk se jeho exprese v nádoru snižuje. K potvrzení diagnózy opětovného výskytu GBM může být vyžadována opakovaná operace (Czarnywojtek et al. 2023, Davis, 2016, Urbanska et al. 2014).

Standardní zobrazovací metodou pro diagnostiku nádoru mozku je kontrastem zvýrazněná MRI, jež se používá i při kontrole neoplazie po proběhnuté léčbě. Díky MRI lze rozeznat tumor jako zvýrazněnou nekrotickou hmotu, obklopenou nezvýrazněnými sekundárními intrakraniálními abnormalitami, zahrnující edém a invazi tumoru. Může být přítomno také krvácení a cystické změny. Tato neinvazivní metoda dále poskytuje anatomické podrobnosti o okolních strukturách neoplazie, což je důležité při chirurgickém plánování pro provedení co nejobsáhlejší a správné chirurgické resekce, která poskytne lepší prognózu pacienta s GBM. Další výhodou MRI je její přesnost, nepřítomnost zátěže ionizujícího záření, schopnost odlišit abnormální tkáň. Vykazuje podrobnější rozlišení cév, nervových struktur a rozdílů mezi šedou a bílou mozkovou hmotou (Adam et al. 2010, Czarnywojtek et al. 2023, Shukla et al. 2017, Urbanska et al. 2014, Wen et al. 2020)

V současnosti se již využívají pokročilé modality MRI, které poskytují komplexnější charakteristiku nádoru, mohou vyhodnotit fyziologické i metabolické

vlastnosti GBM, čímž umožňují využití personalizovaných terapeutických postupů. Jednou z novějších technik je magnetická rezonanční spektroskopie, díky níž můžeme detekovat uvnitř nádoru některé metabolity i jejich koncentrace (Shukla et al. 2017, Wen et al. 2020)

PET, další zobrazovací metoda nukleární medicíny, není součástí standardního postupu vyšetřování, ale její význam v diagnostice roste. Může rozšířit informace při diferenciální diagnostice tumoru, popsat jeho metabolické změny, vymezit rozsah pro chirurgické plánování a monitorovat terapii a prognózu nemoci (Adam et al. 2010, Wirsching et al. 2016, Wen et al. 2020).

Další dostupnou metodou je CT, která nedosahuje takového rozlišení jako MRI, ale doplňuje další informace o lokalizaci, velikosti a struktuře GBM a může také popisovat jeho vztah k okolní tkáni (Adam et al. 2010, Wirsching et al. 2016).

V onkologii a paliativní medicíně se pro vyhodnocení prognózy onemocnění používá výkonnostní stupnice – Karnofského skóre (KPS) obsahující 11 stupňů. Dále se používá prognostické schéma RPA, jež stanovuje odhad přežití pacienta s nově diagnostikovaným nádorem mozku (Urbanska et al. 2014).

Medián přežití této nemoci se pohybuje okolo 15 měsíců. Pět let po diagnóze se dožije méně než 5 % pacientů s GBM. Velice špatná prognóza tohoto onemocnění je ovlivněna faktory, jako je věk pacienta v době diagnózy a jeho výkonnostní stav před operací, histologický stupeň, genetický profil, index proliferace, lokalizace a rozsah chirurgické resekce nádoru. Tyto faktory dále ovlivňují výběr vhodného způsobu léčby (Grochans et al. 2022, Ostrom et al. 2014, Thakkar et al. 2014, Urbanska et al. 2014).

Pacienti s GBM ve vyšším věku mají kratší dobu přežití. Ve srovnání s nádory umístěnými v mozkovém kmeni a diencefalonu se GBM lokalizované v supratentorialní oblasti vyznačují příznivější prognózou, protože je zde lepší přístup pro chirurgickou resekci, která přináší zlepšení prognózy (Chen et al. 2022b, Luo et al. 2021, Ostrom et al. 2014, Thakkar et al. 2014).

2.2.6 Současné léčebné postupy

V současné době je standardem neurochirurgická léčba s adjuvantní terapií, kde se využívá radioterapie a chemoterapie. Protože GBM vykazuje vysokou odolnost vůči nynější dostupné léčbě, kdy i v případě vzácného vymizení tohoto nádoru dochází k jeho

recidivě, není tato léčba považována za úspěšnou a jejím primárním cílem je co nejvíce prodloužit dobu přežití pacienta, nikoliv však nádor plně vyléčit. Proto je nezbytné hledat inovativní a efektivní léčebné strategie, které by mohly poskytnout personalizovanou perspektivní terapii této nemoci (Alifieris & Trafalis 2015, Czarnywojtek et al. 2023, Davis 2016, Grochans et al. 2022, Chen et al. 2022b, Louis et al. 2021, Urbanska et al. 2014, Wang et al. 2022).

Mezi problémy spojené s léčbou GBM patří nemožnost dosažení dostatečné resekcí a vysoký stupeň heterogenity nádoru, což znamená, že různé typy buněk v GBM reagují různě na léčbu. Kvůli umístění GBM v mozku má léčba tohoto tumoru omezení způsobena hematoencefalickou bariérou. Velké molekuly nejsou schopny tuto bariéru překonat, což snižuje biologickou dostupnost léčiv podávaných systémově. Další překážkou jsou buňky v hypoxických oblastech, které nereagují na radioterapii (Czarnywojtek et al. 2023, Taylor et al. 2019, Urbanska et al. 2014, Vítovcová et al. 2023, Wang et al. 2022).

2.2.6.1 CHIRURGICKÁ LÉČBA

Primárním cílem základní léčby GBM je dosáhnout totální chirurgické resekcí nádorové tkáně, aniž by došlo k poškození důležitých částí mozku. Resekce je přizpůsobena individuálním charakteristikám každého případu, zohledňující umístění, velikost a tvar nádoru, polohu krevních cév a citlivé oblasti mozku. Důležitost této resekcí byla prokázána v mnoha studiích, ve kterých pacienti s rozsáhlejší chirurgickým odstraněním léze dosahovali lepších výsledků než ti s menším rozsahem. Tato zlepšení se projevovala u pacientů delším přežitím bez progresí, celkovým přežitím a redukcí neurologických symptomů, včetně záchvatů, řečových a motorických deficitů. Vzhledem k vysoké proliferativní aktivitě, invazivitě a nejasným hranicím GBM je však úplná resekce tohoto tumoru téměř vždy nemožná. Infiltrující nádorové buňky zůstávají i po resekcí v okolí léze, což později vede k recidivě nebo progresi onemocnění (Carlsson et al. 2014, Czarnywojtek et al. 2023, Davis 2016, Sasmita et al. 2018, Urbanska et al. 2014).

V chirurgickém odstraňování GBM se pro zvýšení účinnosti používá také onkologická fluorescence. Použitím barviva kyseliny 5-aminolevulové je proces resekcí efektivnější. Operační plánování je založeno na MRI a během operace se využívají další zobrazovací metody, jako je MRI, ultrazvuk nebo CT, tudíž dochází ke stálému

zlepšování chirurgických i předoperačních technik, což zvyšuje pravděpodobnost vyššího rozsahu resekce GBM (Czarnywojtek et al. 2023, Davis 2016).

2.2.6.2 RADIOTERAPIE

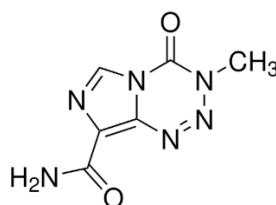
Po kraniotomii následuje období pro zahojení rány trvající přibližně 4 týdny, po kterém následuje radiační léčba, kterou doplňuje chemoterapie pro dosažení lepších výsledků (Davis 2016)

Radioterapie využívá ionizující záření jako fyzikálního činidla k napadení rakovinových buněk, přičemž celková dávka záření je obvykle 60 Gy během šesti týdnů. Také účinnost radioterapie není úplná (Urbanska et al. 2014, Davis 2016, Maier et al. 2016).

Radioterapeutické záření ovlivňuje také buňky zdravé, což může vést k nežádoucím účinkům včetně radiační nekrózy. Proto se stále pracuje na zdokonalení této metody. Technologicky vyspělejší formou radioterapie je tomoterapie (toradioterapie), která poskytuje větší ochranu zdravým tkáním (Czarnywojtek et al. 2023, Davis 2016).

2.2.6.3 CHEMOTERAPIE

Při léčbě GBM se především jako adjuvans k radiační léčbě používá TMZ, který ve srovnání s pouhým ozařováním prodlužuje medián celkového přežití pacientů, zejména u jedinců s přítomností hypermetylace MGMT. TMZ zvyšuje medián přežití pacientů s GBM více než jakékoliv jiné chemoterapeutikum. V léčbě GBM se příležitostně používají i další chemoterapeutika, jako je karboplatina, etoposid, irinotecan, karmustin a cisplatina (Alifieris & Trafalis 2015, Urbanska et al. 2014, Wirsching et al. 2016).



Obr. 4: Chemická struktura temozolomidu
(zdroj: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/t2577>)

TMZ je dusíkatý derivát dakarbazinu patřící mezi DNA alkylující cytostatika. Jedná se o lék první linie, který se podává v dávce 75 mg/m² perorálně, a to každý den po dobu 6 týdnů současně s 6týdenní radioterapií. Navzdory vysoké biodostupnosti TMZ v plazmě (téměř 100 %) dosahuje koncentrace tohoto léčiva v cerebrospinální tekutině přibližně 20 % plazmatické koncentrace. Mechanismus účinku této látky spočívá v poškození DNA prostřednictvím metylace O6 pozice na guaninu a v zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi, což nastartuje proces buněčné apoptózy. U pacientů s metylací promotoru MGMT byl zaznamenán vyšší medián přežití, který může dosahovat až 23 měsíců, a 5leté celkové přežití bylo zaznamenáno u 14 % pacientů (Alifieris & Trafalis 2015, Czarnywojtek et al. 2023, Chua et al. 2019, Ortiz et al. 2020, Sasmita et al. 2018).

Tato léčba proti nádorovým buňkám není selektivní a může způsobit toxicitu i u zdravých buněk, což může vést k nežádoucím účinkům, včetně trombocytopenie, neutropenie, virové hepatitidy nebo cytomegalovirové infekce, a může se projevit i selháním jater nebo syndromem Stevena-Johnsona. K prevenci nauzey je možné podávat antagonisty serotonergních 5-HT₃ receptorů 30-60 minut před podáním TMZ. Pro zvýšení selektivity chemoterapie na nádorové buňky se testuje využití nanonosičů a polymerních částic (Alifieris & Trafalis 2015, Czarnywojtek et al. 2023, Verdugo et al. 2022b)

Podávání TMZ je však spojeno se vznikem rezistence, jež vzniká na základě celé řady mechanismů, mezi nimiž je důležité působení enzymu MGMT, který je schopný odstraňovat alkylové skupiny z guaninu, a tím snižovat účinnost alkylační léčby. Další enzym, který hraje roli v opravě bází, je poly-(ADP-ribóza)-polymeráza-1 (PARP-1). Inhibice PARP-1 zvyšuje cytotoxicitu TMZ, a proto jsou inhibitory PARP-1 testovány pro použití v kombinaci s TMZ (Alifieris & Trafalis 2015, Davis 2016, Sasmita et al. 2018).

2.2.6.4 DALŠÍ LÉČEBNÉ STRATEGIE

S ohledem na molekulární a genetickou heterogenitu GBM jsou aktuálně vyvíjeny další léčebné strategie, které by mohly být využívány jako personalizovaná terapie přizpůsobená specifickým charakteristikám GBM u každého jedince (Aldape et al. 2015)

Angiogeneze, proces řízený VEGF a dalšími mediátory, je důležitou charakteristikou GBM. Terapeutický přístup zaměřený na angiogenezi funguje na základě vyhladovění nádoru pomocí intravenózně podávané monoklonální protilátky bevacizumab, která se váže na VEGF, snižuje jeho biologickou aktivitu a tím působí na krevní cévy. Bevacizumab snižuje vaskulární permeabilitu, čímž redukuje edém způsobený nádorem. Tato terapie také zlepšuje oxygenaci a má schopnost snižovat komplikace spojené s radiační nekrózou. Studie však zaznamenaly rozdílné výsledky týkající se účinnosti této monoklonální protilátky (Davis 2016, Urbanska et al. 2014, Verdugo et al. 2022, Wirsching et al. 2016).

Dalšími látkami, jejichž účinek se u GBM experimentálně ověřuje, jsou inhibitory tyrosinkináz, které regulují nekontrolovatelný a nadměrný růst nádoru. Patří sem např. imatinib, sunitinib a sorafenib (Czarnywojtek et al. 2023).

Prostředí GBM není odolné pouze vůči léčbě, ale buňky nádoru jsou také rezistentní vůči reakcím imunitního systému. Existují snahy spojit léčbu GBM s imuno-onkologickou terapií. Cílem imunoterapie je překonat imunorezistenci nádorových buněk vůči T-lymfocytům, obnovit či posílit reakce imunitního systému proti imunosupresivnímu prostředí GBM, a tím dosáhnout efektivní eradikace nádoru (Czarnywojtek et al. 2023, Medikonda et al. 2021, Wang et al. 2022).

Imunoterapie GBM zahrnuje dva hlavní přístupy. Prvním z nich je využití vakcín založených na peptidech, či DNA. Tyto vakcíny (podobně jako antigen prezentující buňky) mají schopnost prezentovat antigeny T-lymfocytům, přičemž zvyšují imunitní odpověď T-lymfocytů na nádor, což přispívá k aktivní specifické imunizaci. Druhý typ imunoterapie je založen na viroterapii, kde protein cytomegaloviru vyvolává silnou imunitní odpověď CD8⁺ T-buněk, a přispívá tak k protinádorové aktivitě (Czarnywojtek et al. 2023, Verdugo et al. 2022).

V nedávno publikovaných studiích se také objevila terapie elektrickým polem, při které se elektrické pole dodává přímo do místa ložiska nádoru a způsobuje poruchu dělení buněk přítomných v tomto ložisku. Slibné nové možnosti terapeutických strategií zahrnují látky, které by zacílily na molekulární buněčné signální dráhy a receptory, jako jsou EGFR, IDH2, IDH1 a PI3K/AKT, jež prochází v GBM změnami (Taylor et al. 2019, Verdugo et al. 2022).

2.3 Látky působící na mikrotubulární cytoskelet a „drug repurposing“

Mikrotubuly hrají klíčovou roli v buňkách, a to jak v normálních, tak i v těch nádorových. V důsledku toho se mikrotubuly stávají důležitým terapeutickým cílem pro léčiva používaná při terapii různých typů malignit. Mezi tyto látky patří MTAs, která interagují s cytoskeletem nádorové buňky prostřednictvím různých mechanismů (Katsetos et al. 2015, Zottel et al. 2021, Vitovcová et al. 2020).

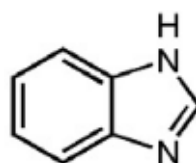
MTAs lze rozdělit na látky, které destabilizují mikrotubuly, a látky, které je stabilizují. Oba typy těchto protinádorových léčiv vedou ke smrti nádorových buněk. Mezi destabilizující antimitotika patří léčiva ze skupiny vinca alkaloidů a kolchicin, zatímco stabilizujícími látkami jsou léčiva ze skupin taxanů a epothilonů. Použitím této antimitotické léčebné strategie dochází ke zpomalení přechodu buněk z metafáze do anafáze, což brání úspěšnému dokončení mitózy, a následně se spouští programovaná buněčná smrt (Čermák et al. 2020, Katsetos et al. 2011, Katsetos 2015, Zottel et al. 2021).

Jednou z nevýhod antimitotik používaných v protinádorové terapii je možnost, že si nádorové buňky vybudují rezistenci k léčbě. V takovém případě se objevuje zvýšená exprese β III-tubulinu nebo také dochází k jeho mutaci. V léčbě nádoru mozku pomocí MTAs je také nevýhodou malá průchodnost těchto látek přes hematoencefalickou bariéru z důvodu exprese P-glykoproteinu, který funguje jako efluxní transportér látek (Vitovcová et al. 2020, Zottel et al. 2021).

Je velice žádoucí zkoumat a vyvíjet nové terapeutické postupy a léčivé látky, které by mohly vést k lepší prognóze pacientů s GBM. Vývoj léčiv je ekonomicky a časově náročný proces a mnohé studie nových látek často končí neúspěchem. "Drug repurposing" je perspektivní metoda, při které se hledají nové indikace pro již schválené a používané léčivé látky. Zkoumají se tedy takové struktury, u kterých jsou známy farmakodynamické i farmakokinetické aspekty, včetně informací o jejich toxicitě a výskytu nežádoucích účinků. Výhodou jsou tedy nejen snížené náklady na vývoj a zkrácená doba nutná ke schválení léku, ale i nižší šance na selhání jejich vývoje kvůli nežádoucím účinkům. Mezi skupinu látek, které byly dříve využívány pro jinou indikaci a v současné době jsou testovány pro své účinky na nádorové buňky, patří také benzimidazoly (Čáňová et al. 2017, Hanušová 2015, Ren et al. 2022)

2.4 Benzimidazoly

Benzimidazol je důležitý heterocyklický systém, který je základem mnoha bioaktivních sloučenin, jako jsou např. antiparazitika, analgetika, antiulceroza, antihypertenziva, antikonvulziva a potenciálně i anticanceroza. Toto široké spektrum biologické aktivity benzimidazolu je dáno možnostmi substituce jeho jádra, které obsahuje sedm pozic nesoucích rozmanité funkční skupiny, a to většinou na pozici 1, 2 a (nebo) 5/6. Sloučeniny obsahující toto různě substituované jádro tedy působí na různé cíle a mají různé farmakologické vlastnosti (Bansal & Silakari 2012).



Obr. 5: Chemická struktura benzimidazolu (zdroj: Bansal & Silakari 2012)

Benzimidazolová anthelmintika, jako je albendazol, fenbendazol, flubendazol (FLU) a mebendazol, jsou testována jako potenciální léčiva v boji proti celé řadě tumorů a některé z nich, především mebendazol, jsou také slibnými kandidáty pro léčbu GBM (Bansal & Silakari 2012, Ren et al. 2022, Zottel et al. 2021).

Podle výsledků studie publikované v roce 2022 byla prokázána protinádorová aktivita některých benzimidazolů u pacientů s GBM. Tyto látky prokázaly schopnost inhibovat migraci a invazi nádorových buněk a zastavit buněčný cyklus v G2/M fázi pomocí ovlivnění signální dráhy p53/p21/cyklin B1. Působením benzimidazolů na tumor byla zaznamenána zvýšená exprese tumor supresorového proteinu p53 a snížená exprese cyklinu B1 (Ren et al. 2022).

Bylo také prokázáno, že benzimidazoly testované na xenoimplantátu myši *in vivo* vykazují inhibiční potenciál v proliferaci maligních buněk. V tomto případě dochází k zástavě proliferace prostřednictvím indukce apoptické a pyroptické buněčné smrti. Hmotnost i objem neoplazie se navíc snižují bez pozorovatelných vedlejších účinků (Ren et al. 2022).

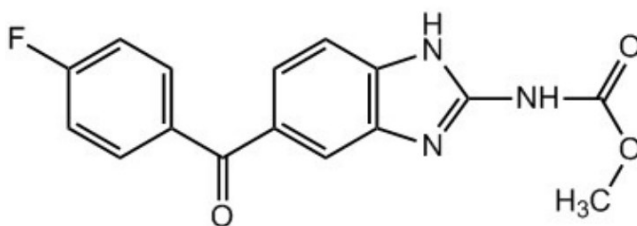
2.4.1 Flubendazol

Toto širokospektrální syntetické benzimidazolové anthelmintikum, objevené v 70. letech 20. století, se používá jak ve veterinární, tak i v humánní medicíně. V příslušných indikacích se obvykle podává po dobu tří dnů, ale jeho účinnost byla prokázána i při jednorázovém podání (Čáňová et al. 2017, Chen et al. 2022a).

Aktuální výzkumy naznačují, že FLU může sehrát klíčovou roli v úspěšné léčbě různých typů rakoviny. V současné době probíhá výzkum jeho protinádorových účinků, přičemž přesné mechanismy těchto účinků zůstávají stále neobjasněny. FLU je také zkoumán v kontextu léčby GBM, což je důležité vzhledem k nevýhodám spojeným se standardní terapií tohoto nádoru, zahrnující rezistenci vůči léčbě a selhání terapie v důsledku infiltrativního růstu a šíření GBM (Chen et al. 2022a, Vítovcová et al. 2023).

2.4.1.1. FARMAKOKINETIKA A STRUKTURA FLUBENDAZOLU

Tato chemická sloučenina má komplexní strukturu, kde benzimidazolové jádro tvoří spojení s karbamátovým řetězcem a fluorovým substituentem na benzenovém kruhu (methyl-N-[6-(4-fluorbenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát). Specifičnost FLU v rámci skupiny benzimidazolů spočívá právě v přítomnosti tohoto atomu fluoru (Chen et al. 2022a, Son et al. 2020).



Obr. 6: Chemická struktura flubendazolu (zdroj: Čáňová et al. 2017)

FLU se vstřebává v trávicím traktu, a proto se nejčastěji podává perorální cestou. Jeho lipofilní struktura způsobuje, že je toto léčivo obtížně rozpustné ve vodném prostředí gastrointestinální soustavy, což se projeví jeho nedostatečnou absorpcí do krevního oběhu. Tyto vlastnosti přispívají k celkově nízké biodostupnosti FLU. K dosažení lepšího vstřebání a biodostupnosti se obvykle doporučuje užívat lék ihned po jídle. Při indikaci, jako jsou infekce způsobené filariemi, je aplikace léčiva efektivnější ve formě podkožní či intramuskulární injekce (Čáňová et al. 2017, Chen et al. 2022a).

Lipofilní povaha FLU, která mu umožňuje proniknout hematoencefalickou bariérou a hromadit se v mozku, představuje významný potenciál pro jeho použití v léčbě GBM (Chen et al. 2022a).

Jedním z omezení při použití FLU v léčbě nádorových onemocnění je právě nízká biodostupnost této látky. Existuje předpoklad, že jeho potenciální využití musí být spojeno s modifikacemi, které zvýší jeho biodostupnost. Zlepšení rozpustnosti ve vodě by mohlo vést k větší absorpci, což by zvýšilo maximální koncentraci v plazmě, a tedy celkovou biodostupnost léčiva. Jednou z možných cest k dosažení tohoto cíle je použití cyklodextrinových komplexů (Čáňová et al. 2017).

Většina perorálně podané dávky FLU (80 %) se vyloučí stolicí a pouze velmi malé množství nezměněného léčiva (méně než 0,1 %) se nachází v moči. Poločas FLU v tkáních činí jeden až dva dny. Biotransformace absorbovaného FLU probíhá v játrech, kde dochází k jeho přeměně prostřednictvím dvou metabolických cest. Jedna z těchto cest zahrnuje redukci ketonu a během druhé reakce vznikne keton hydrolýzou karbamátu. Oba produkty těchto kroků jsou následně převedeny na stejný metylovaný metabolit (Čáňová et al. 2017, Chen et al. 2022a).

Během působení FLU *in vivo* nebyly zaznamenány žádné závažné nežádoucí účinky ani toxicita. Nedošlo k poklesu tělesné hmotnosti testovaných zvířat na jejich orgánech se neprojevíly žádné morfologické změny a v průběhu analýzy krevních testů nebyla zjištěna žádná malignita (Ren et al. 2022, Čáňová et al. 2017).

2.4.1.2 MECHANIZMY ÚČINKU A ZASTAVENÍ BUNĚČNÉHO CYKLU NÁDOROVÝCH BUNĚK

Anthelmintický účinek FLU spočívá v modifikaci struktury mikrotubulárního cytoskeletu prostřednictvím inhibice polymerizace tubulinu. Tento benzimidazolový karbamát se váže a interaguje s mikrotubulárním proteinem β -tubulinem, narušuje sestavu a dynamiku cytoskeletu parazita, a tím mu brání v plnění základních buněčných funkcí. Dochází také k porušení transportu glukózy a vyčerpání energetických zásob glykogenu. FLU není omezen pouze na tento mechanismus účinku; je též induktorem vzniku reaktivních forem kyslíku, jež jsou spojeny s aktivací oxidativního stresu, což vede k oslabení a následné degradaci buněk parazita. Toto anthelmintikum má rovněž

schopnost aktivovat autofagii buněk. Výsledkem těchto procesů je cílená destrukce parazita (Čáňová et al. 2017, Chen et al. 2022a, Vitovcová et al. 2020).

FLU byl úspěšně testován jako účinný proti solidním nádorům, jako je melanom, neuroblastom a rakovina plic, a také v případě leukemií (Chen et al. 2022).

Na nádorové buňky prsu, melanomu nebo prostaty působil FLU tak, že potlačil jejich růst inhibicí buněčného cyklu ve fázi G2/M a podpořil tvorbu monopolárního mitotického vřetenka. V buňkách prsních nádorů se současně snížila exprese genů spojených s obnovou neoplazie a redukoval se počet buněk vykazujících vlastnosti buněk kmenových. Dále docházelo k potlačení exprese mezenchymálních markerů, jako jsou β -katenin, vimentin a N-kadherin. FLU také inhiboval schopnost migrace buněk, což následně vedlo k redukcí metastázování (Chen et al. 2022a, Son et al. 2020, Vitovcová et al. 2023).

Dalším možným mechanismem účinku FLU je potlačení aktivace STAT3. V důsledku podání FLU byla pozorována snížená fosforylace STAT3. FLU byl schopný inhibovat dráhu STAT3 v nádorových buňkách prsu, melanomu i prostaty, čímž potlačil růst, angiogenezi a metastázování těchto nádorů do dalších orgánů. Toto léčivo rovněž indukovalo diferenciaci buněk, což by mohlo vést ke snížení celkového počtu buněk, a tím potenciálně omezit recidivu nádorů (Chen et al. 2022a, Vitovcová et al. 2023).

V buňkách kolorektálního a prsního karcinomu dále dokázal FLU snižovat hladinu cyklinu D1 a současně zde zvyšoval expresi cyklinu B1, aktivoval kaspázu 2 a kaspázy 3/7. Podobně jako při jeho působení na parazitické buňky, FLU způsobuje poškození buněčného mikrotubulárního cytoskeletu v buňkách nádorových. Struktura mitotického vřetenka vykazovala nepravidelnost, probíhala abnormální mitóza a vytvářely se obrovské multinukleární buňky (Chen et al. 2022a, Vitovcová et al. 2023).

Další experimentální důkazy naznačují, že by FLU mohl být perspektivní látkou právě pro léčbu GBM. Byly navrženy různé mechanismy antitumorového účinku této látky, nicméně je třeba dalšího testování, neboť přesné sekvence těchto procesů zůstávají nejasné (Zhou et al. 2018, Vitovcová et al. 2023).

Podobně jako u parazitárních buněk ovlivňuje FLU buňky GBM prostřednictvím mikrotubulového cytoskeletu. Účinek léčby FLU v GBM spočívá také ve snížení exprese a aktivace STAT3, což pravděpodobně vede k aktivaci signální dráhy p53. Tento proces je spojen se zastavením buněčného cyklu ve fázi G2/M, kde se buňky začínají hromadit,

a zároveň se snižuje jejich počet v G1 fázi. FLU také snižoval expresi PARP a zvyšoval expresi její štěpené formy. Všechny výše zmíněné mechanismy spouštějí signální cesty, které vedou k programované buněčné smrti (Ren et al. 2022, Slade 2020, Vítovcová et al. 2023).

FLU též může zvyšovat cytotoxicitu a projevovat synergický účinek s některými již existujícími protinádorovými léčivými, jako je například fluorouracil a doxorubicin (Chen et al. 2022a, Hou et al. 2015).

3. CÍLE

Cílem této práce bylo sledovat vliv opakovaného podání nízké dávky anthelmintického léčiva FLU na buněčné nádorové linie U87MG a U87MG-IDH1-mut.

Díličními cíli bylo:

- stanovení vlivu opakovaného podání FLU na viabilitu buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut a stanovení střední inhibiční koncentrace (IC50)
- posouzení vlivu opakovaného podání FLU na morfologii buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut
- stanovení vlivu opakovaného podání FLU na expresi vybraných markerů buněčného cyklu, proliferace a chemorezistence na úrovni mRNA u buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut
- zhodnocení vlivu opakovaného podání FLU na expresi vybraných markerů na úrovni proteinů u buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut
- stanovení vlivu opakovaného podání FLU na aktivitu iniciačních kaspáz 8, 9 a efektorových kaspáz 3/7 u buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut
- stanovení množství FLU a jeho metabolitu v buňkách U87MG a U87MG-IDH1-mut po opakovaném podání FLU

4. METODIKA A MATERIÁL

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčné linie a jejich kultivace

Pro tento projekt byly použity dvě buněčné linie – U87MG a U87MG-IDH1mut. Buněčná linie U87MG s epitelální morfologií byla izolována z GBM dospělého muže. Linie IDH1 mutant-U87 je odvozena od mateřské linie U87MG vnesením specifické mutace IDH1R132H za využití technologie CRISPR-Cas9 (ATCC 2022, 2024).

Buněčné linie byly pro tento výzkum zakoupeny od firmy ATCC a kultivovány v DMEM (ATCC, LGC Standard) médiu obohaceném o 10 % fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) a 1 % směs penicilinu/streptomycinu (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Pro kultivaci byly použity buněčné inkubátory (5 % CO₂ a 37 °C, Shoeller), buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s plochou 75 cm².

4.1.2 Přístrojové vybavení

- Laminární box s vertikálním prouděním (Verkon)
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf)
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf)
- CO₂ inkubátor Sanyo (Schoeller)
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200 (Tecan)
- PCR laminární box
- Třepačka
- Termoblok
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Odsávačka
- Vortex
- Cyklér LightCycler® 96 Instrument (Roche Life Science)
- Zdroj stejnosměrného napětí
- Azure c600 Gel Imaging System (Azure Biosystems)

- Mikroskop Olympus IX-70 s fázovým kontrastem (Olympus)

4.1.3 Chemikálie

- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Capricorn, EastPort)
- Fetální bovinní sérum FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- Flubendazol (Sigma-Aldrich)
- Fosfátový pufr PBS
- Penicilin/Streptomycin (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Bovinní sérový albumin BSA (Sigma Aldrich)
- Kit pro měření proliferace buněk metodou WST-1
- DEPC voda (voda bez nukleáz) (Invitrogen)
- TRISOL reagent (Qiagen)
- RNA Wash Buffer pufr (Amplicon)
- DNA Digestion Buffer pufr (Amplicon)
- DNAsa I (Amplicon)
- Direct Zol RNA PreWash pufr (Amplicon)
- Kit pro přípravu cDNA – RiboLock RNase inhibitor, 5x reakční pufr 10 mM dNTP mix, M- MuLV Reverzní Transkriptáza, Randomizovaný hexamer primer (Thermo Fisher Scientific)
- Kit pro přípravu Master mixu pro PCR amplifikaci– DEPC voda, SYBR GREEN, Forward a Reverse primer pro cílovou mRNA v koncentraci 10 mM (Roche; Generi Biotech)
- Kit pro stanovení bílkoviny – kyselina bicinchoninová BCA (Thermo Fisher Scientific)
- Blotovací pufr
- DAPI (Sigma Aldrich)
- ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen Molecular Probes)
- 4 M kyselina chlorovodíková (HCl)
- Akrylamid (AA) a bis-akrylamid (bisAA) (Sigma Aldrich)
- TEMED (N, N, NN-Tetramethylethylenediamin) (Sigma Aldrich)
- 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8

- 0,5 M TRIS-HCl pufr, pH 6,8
- 0,1 M TRIS pufr, pH 8,0
- 10x TBS (TRIS-Buffered Saline)
- 10 % SDS – dodecylsírán sodný
- Koncentrovaný elektrodový pufr
- Isobutanol nasycený vodou
- TBST pufr (TRIS-Buffered Saline s Tween 20) (Sigma Aldrich)
- 5 % roztok mléka v TBST pufru
- 10 % APS – persíran amonný
- Reakční činidlo pro kaspázy 3/7 (Promega Corporation)
- Reakční činidlo pro kaspázu 8 (Promega Corporation)
- Reakční činidlo pro kaspázu 9 (Promega Corporation)
- 4 % roztok formaldehydu
- 1x PBS

4.1.4 Pomůcky

- Pipety (Eppendorf)
- Špičky o různých velikostech (Eppendorf)
- Mikrozkušavky (Eppendorf)
- Collection tube (Amplicon)
- Zymo-Spin IIC Column (Amplicon)
- 96jamkové destičky (Thermo Scientific)
- 96jamkové destičky pro LightCycler® 96 (Roche Life Science)
- Pomůcky pro přípravu elektroforetického gelu (stojánek, spony, hřeben, skla...)
- Pomůcky pro blotting (blotovací houbičky, tlustý filtrační papír, PVDF membrána)
- Plastové nádoby s víčkem
- Injekční stříkačky a jehly
- Laboratorní pomůcky pro běžné použití

4.2 Stanovení viability buněk metodou WST-1

Metoda WST-1 se využívá pro stanovení životaschopnosti buněk. Živé buňky obsahují mitochondriální enzymy (dehydrogenázy) schopné štěpit tetrazoliový kruh solí obsažených v testovacím činidle za vzniku ve vodě rozpustného barevného produktu – formazanu. Vyhodnocení probíhá pomocí spektrofotometru měřením při specifické vlnové délce 450 nm. Naměřená absorbance vyjadřuje intenzitu zbarvení, které je přímo úměrné množství životaschopných buněk (MCE 2022, SIGMA ALDRICH 2024, Yin et al. 2013).

Buňky testovaných buněčných linií U87MG a U87MG-IDH1mut byly nanášeny na 96-jamkovou destičku (Thermo Scientific) a inkubovány v CO₂ inkubátoru po dobu 24 hodin. Následně byly buňky opakovaně (1x – 3x) ovlivněny různými koncentracemi FLU v médiu, a to v časových intervalech 2 h, 12 h, 24 h, 48 h a 72 h od předchozího ovlivnění. Po posledním ovlivnění byly mikrotitrační destičky vloženy zpět do CO₂ inkubátoru (Schoeller) a po dobu příslušného časového intervalu byly inkubovány při teplotě 37 °C a 5 % CO₂.

Po inkubaci bylo z destiček odsáto původní médium a následně bylo pipetováno do jamek 100 µl připraveného pracovního roztoku WST-1 (ředěn s médiem v poměru 1:20). Destičky byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂ další 2 hodiny.

Následně byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan) při vlnové délce 450 nm s referenční vlnovou délkou 690 nm.

Tab. 1: Koncentrace flubendazolu v médiu pro stanovení viability buněk metodou WST-1

1. konc. řada	FLU (nM)	10	25	50	100	250	500	750	1000	2000
2. konc. řada	FLU (nM)	200	300	400	500	600	700	800		

4.3 Mikroskopie fázového kontrastu

Při procházení světla materiálem s různými indexy lomu nebo tloušťkami dochází k fázovým posunům. Tyto posuny lidské oko ale samo nezaznamenává. Pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem dochází ke zlepšení viditelnosti neobarvených fázových objektů způsobujících tyto fázové posuny světla. Tato mikroskopická technika dokáže zvýraznit fázové posuny a převést je na rozdíly ve světelné intenzitě (amplitudové posuny), které jsou již lidským okem rozeznatelné (Ockenga 2022).

Buněčné linie U87MG a U87MG-IDH1mut byly pozorovány v kultivačních lahvích o ploše 25 cm². Buňky byly ovlivněny 200 nM a 500 nM FLU, a to 3x vždy po 24 h inkubace. Jejich morfologie byla pozorována v časových intervalech 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin po prvním ovlivnění mikroskopem Olympus IX-70 s fázovým kontrastem (Olympus).

4.4 Kvantifikace proteinů metodou Western blot

Během Western blotu dochází pomocí elektroforézy k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Tyto separované proteiny jsou poté přeneseny na pevný podklad – membránu. Následuje označení (detekce) proteinů pomocí specifických protilátek. Tato analytická metoda v oblasti molekulární biologie slouží k identifikaci specifických proteinů (Kurien & Scofield, 2015; Labguide, 2022b; Yang & Mahmood, 2012).

4.4.1 Příprava vzorku pro analýzu Western blot

Buňky (linie U87MG a U87MG-IDH1mut) byly kultivovány v 6jamkových kultivačních miskách v koncentraci 150 tisíc buněk na jamku. Buňky poté byly opakovaně ovlivněny (1x – 3x po 24 h) testovanou látkou (FLU) v koncentracích 200 nM a 500 nM. Po inkubaci bylo médium z jednotlivých jamek odsáto.

Dále byly do každé jamky přidány 3 ml ledového PBS. Buňky byly kývavým pohybem opláchnuty a PBS bylo následně odsáto do sucha.

K buňkám bylo posléze přidáno 100 µl ledového lyzačního pufru s inhibitory proteáz. Buňky byly 2 minuty inkubovány, poté seškrabány z kultivačních misek a přeneseny do 1,5 ml zkumavek umístěných na ledu.

Získaný buněčný lyzát ve zkumavkách byl homogenizován za pomoci injekční stříkačky (10 x nasátím a vypuštěním), byl ponechán 20 minut na ledu a následovala jeho centrifugace při 13000 rpm a 4 °C po dobu 10 min. Poté byl supernatant přenesen do nových 1,5 ml zkumavek.

Vzorky byly zmrazeny při -20 °C do dalšího použití, nebo použity ihned pro stanovení koncentrace bílkoviny a po naředění vzorků pro Western blot.

4.4.2 Měření koncentrace proteinů metodou BCA

Tato analytická metoda zahrnuje dvě chemické reakce. V prvním kroku dochází v alkalickém prostředí k redukci měďnatých iontů na ionty měďné. Tato reakce je podmíněna přítomností peptidových vazeb proteinu obsaženého ve vzorku. Následně probíhá chelatace měďných iontů molekulami bicinchoninové kyseliny, což vede k vytvoření fialového zbarvení, jež je schopno absorbovat světlo. Tato analýza se vyhodnocuje spektrofotometricky. Měřená absorbance je přímo úměrná intenzitě vzniklého zbarvení. Tímto způsobem lze kvantifikovat množství redukovaných iontů a koncentraci proteinů ve zkoumaném vzorku (Frasco 2019, G-Biosciences 2016).

V prvním kroku bylo pro každý vzorek (z buněčné linie U87MG a U87MG-IDH1mut) připraveno v duplikátech 50 μl 5x-10x zředěného vzorku a zároveň byly dle následující tabulky připraveny roztoky z 1 % bovinního sérového albuminu (BSA) (Sigma Aldrich) pro stanovení kalibrační křivky.

Tab. 2: Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky pro BCA měření koncentrace bílkovin

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

Do příslušných jamek na 96-jamkové destičce (Thermo Scientific) pak bylo pipetováno 10 μl každého kalibračního roztoku a 10 μl každého vzorku.

Měření bylo provedeno pomocí komerčně dostupného kitu pro stanovení koncentrace proteinů metodou BCA (Thermo Fisher Scientific). Byl připraven pracovní roztok C, a to smísením komerčně dostupných roztoků A (kyselina bicinchoninová, uhličitán sodný, hydrogenuhličitán sodný v 0,1 M NaOH) a B (4 % (w/v) pentahydrát síranu měďnatého) v poměru 50:1. Posléze bylo přidáno do každé jamky 200 μl pracovního roztoku C.

Destička byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut za použití Thermomixeru. Poté byla změřena absorbance při 562 nm na spektrofotometru Tecan i-control (Tecan).

Následovalo hodnocení, při kterém byl od průměrné hodnoty absorbance každého vzorku odečten průměr hodnot absorbance vzorku slepého. Koncentrace bílkoviny ve vzorku byla vypočítána pomocí sestavené rovnice kalibrační křivky.

4.4.3 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu

Při této separační metodě se využívá rozdílné pohyblivosti nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Využívá se pro analýzu makromolekul, jejichž rychlost pohybu závisí na molekulové hmotnosti a velikosti náboje iontu. Během elektroforézy proteinů se malé proteiny pohybují rychleji než proteiny s větší molekulou. Působením dodecylsírany sodného (SDS) dojde k denaturaci proteinů, díky které získají proteiny záporný náboj a schopnost migrace v elektrickém poli (směrem k anodě) (Gottwaldová, 2017; Labguide, 2022b; Yang & Mahmood, 2012).

Pro elektroforézu byly vzorky z předchozího stanovení naředěny pomocí 4xSDS vzorkového pufru a lyzačního pufru na výslednou koncentraci bílkoviny 1 µg/µl.

Pro separaci proteinů byly připraveny gely o koncentraci 10 % (viz Tabulka 2 a Tabulka 3).

Tab. 3: Složení separačního gelu

	2 gely o koncentraci 10 % a tloušťce 1,5 mm
redestilovaná voda	8,1 ml
1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8	5 ml
roztok AA + bisAA	6,7 ml
10 % SDS	0,2 ml
Iniciace polymerace	
10% roztok APS	200 µl
TEMED	16 µl

Tab. 4: Složení 4 % zaostřovacího gelu

	2 gely o tloušťce 1,5 mm
redestilovaná voda	6,1 ml
1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8	2,5 ml
roztok AA + bisAA	1,3 ml
10 % SDS	0,1 ml
Iniciace polymerace	
10% roztok APS	200 µl
TEMED	16 µl

Byl připraven nalévací stojánek, do kterého byla postavena skla spojená sponou a přichycena vrchním kolíkem.

Připravený roztok pro spodní separační gel byl nalit pomocí pipety mezi skla do výšky cca 4,5 cm od spodního okraje, poté byl převrstven isobutanolem nasyceným vodou (cca 200 µl) a následně probíhala polymerace po dobu 30-60 minut. Isobutanol byl pak opatrně slit.

V dalším kroku byl opatrně nalit na spodní gel roztok zaostřovacího gelu mezi skla pomocí pipety (po horní okraj). Do tohoto horního gelu byl zasunut hřeben až po drážky a min. 30 minut probíhala polymerace.

Gely byly posléze vyndány ze stojánku, opláchnuty pod tekoucí vodou a byl z nich opatrně vyndán hřeben.

Skla s gely byla zasunuta a připevněna sponami ve vnější části stojánku na elektroforézu, který byl vložen do vaničky. Do vnitřního a vnějšího elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr.

Nañedné vzorky proteinů byly povařeny v předehřátém termobloku po dobu 5 min při 95 °C. Do každé jamky v zaostřovacím gelu bylo naneseo 30 µl vzorku a do jedné z nich 5 µl molekulárního standardu. Stojánek pro elektroforézu byl pak přiklopen a připojen ke zdroji o konstantním napětí 120 V.

4.4.4 Imunoblotting

Pro imunoblotting byl rozpuštěním 6,06 g TRIS (Penta) a 28,8 g glycinu (Penta) v 500 ml redestilované vody, přidáním 400 ml methanolu a doplněním vodou v odměrné baňce do 2000 ml připraven blotovací pufr. Vzniklý pufr byl přelit do 1 l lahve a uchováván v chladu.

Dále byl odstraněn zaostřovací gel a u separačního gelu byla odříznuta dolní část s modrým barvivem. Separační gel byl oddělen od spodního skla a poté vložen společně s PVDF membránou aktivovanou v methanolu do blotovacího pufru v plastové krabičce s víčkem. Do blotovacího pufru byl v jiné krabičce namočen tlustý filtrační papír (2 ks pro jeden gel) a blotovací houbičky. Vše bylo takto namáčeno po dobu cca 20 minut.

Poté byl připraven blotovací sendvič, který byl postupně složen z blotovací houbičky, silného filtračního papíru, polyakrylamidového gelu, PVDF membrány, silného filtračního papíru a blotovací houbičky. Blotovací sendvič byl uzavřen a vložen do blotovacího nástavce, a ten pak vložen do vany spolu s ledítkem. Tato vana naplněná blotovacím pufrům byla umístěna do ledové lázně.

Víko vany bylo připojeno ke zdroji, ve kterém bylo spuštěno napětí na 100 V a proud 0,25 A. Proteiny byly následně přenášeny z gelu na PVDF membránu po dobu 1,5 hod. Po doběhnutí blotu byla membrána pinzetou opatrně vyjmuta a použita dále pro detekci proteinů.

4.4.5 Detekce proteinů

Po imunoblottingu byla membrána přenesena pinzetou do plastové misky s víčkem, do které byla nalita destilovaná voda, a v té byla membrána opláchnuta kývavým pohybem.

Na membránu bylo nalito cca 25 ml roztoku 5 % mléka v TBST (Sigma Aldrich) pufru a miska byla poté umístěna na kývačku po dobu 1-2 hod. Následně bylo mléko slito a membrána opláchnuta.

Membrána pak byla přes noc inkubována při 4 °C s primární protilátkou (zásobní protilátka byla ředěna dle instrukcí výrobce TBST pufrům s 2 % BSA (Sigma Aldrich) nebo 2 % mlékem).

Následovalo oplachování membrány s TBST pufrem, a to 4x po dobu 5 minut. V dalším kroku byla membrána inkubována 1-2 hod při pokojové teplotě se sekundární protilátkou. Sekundární protilátka byla ředěna podle instrukcí výrobce v poměru 1:10 000 v roztoku 1 % BSA (Sigma Aldrich) v TBST pufru. Po odstranění sekundární protilátky byla membrána 4x oplachována po dobu 5 min s TBST pufrem, který byl následně z misky vylit.

Při chemiluminiscenční detekci proteinů byl použit „Amersham ECL Prime Western Blotting Detection reagent“ (podle instrukcí výrobce). Na membránu bylo nanášeno cca 1,5 ml substrátu a následovala inkubace po dobu 5 minut.

Po inkubaci byla membrána vyndána ze substrátu a pinzetou přenesena do přístroje Azure c600 (Azure Biosystems). Relativní kvantifikace proteinů byla provedena pomocí programu AzureSpot.

4.5 Kvantifikace mRNA metodou RT-PCR

Reverzně transkripční a zároveň kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR) je laboratorní metoda, která kombinuje principy PCR s reverzní transkripcí a detekcí produktů v reálném čase. Tato metoda se používá k detekci změn v expresi specifických genů v buňce prostřednictvím kvalitativního a kvantitativního měření mRNA.

Nejprve je mRNA templát přepsán pomocí reverzní transkriptázy na jednovláknovou cDNA.

Samotná PCR reakce se skládá z několika kroků – denaturace, annealing a elongace. V prvním kroku se vzorek zahřívá na 90–95 °C po dobu 30 s, kdy dochází k denuraci. Poté probíhá annealing, kdy se primery navážou na cDNA, a tím určí sekvenci DNA k amplifikaci. Dalším krokem je elongace, během které Taq DNA polymeráza syntetizuje směrem 5'-3' od primeru nové vlákno DNA dle komplementarity bází v cDNA za vzniku dvouvláknové DNA.

Celý proces PCR se opakuje v cyklech v termocykleru. Detekce DNA se provádí pomocí fluorescence. K reakční směsi se přidá fluorescenční substrát, například SYBR Green, který se nespecificky váže na DNA a fluoreskuje. Intenzita fluorescence odpovídá

množství DNA v reakční směsi (Biogen 2024, Labguide 2022; ThermoFisher 2024, VFU 2011).

4.5.1 Izolace RNA pomocí kolonek

Buňky U87MG a U87MG-IDH1mut byly nasazeny na 6jamkové destičky (150 tisíc buněk/ jamku) a opakovaně ovlivněny 200 nM a 500 nM FLU (1x – 3x po 24 h). Po inkubaci byly buňky seškrabány do 200 μ l TRISOL reagentu. Ke vzorku lyzovaném v TRISOL reagentu bylo přidáno 200 μ l 100 % ethanolu a následným překlápěním se vzorky promíchaly.

Tato směs se přenesla do kolonek („Zymo-Spin IIC Column“) vložených do „Collection Tube“ a byla zcentrifugována při 13000 rpm a 4 °C po dobu 30 s.

Po centrifugaci byly kolonky přeneseny do nové „Collection tube“, přidalo se do každé z nich 400 μ l pufru („RNA Wash Buffer“) (Amplicon) a byla znovu provedena jejich centrifugace při 13000 rpm a 4 °C po dobu 30 s. Prošlá tekutina do „Collection tube“ z kolonky byla vylita do toxického odpadu.

V „RNAsa-free“ 1,5 ml mikrozkušavce (Eppendorf) byla připravena směs DNAsy (Amplicon) a pufru („DNA Digestion buffer“) (Amplicon), přičemž na 1 reakci bylo použito 5 μ l DNAsy a 75 μ l pufru. Tato směs pak byla přidána na kolonky a ponechána stát 15 min při pokojové teplotě.

Posléze bylo přidáno do kolonky 400 μ l „Direct Zol RNA PreWash“ (Amplicon) a následovala opět centrifugace, po které byla prošlá tekutina z kolonky vylita do toxického odpadu. Tento krok byl poté proveden znovu.

Na kolonku bylo následně napipetováno 700 μ l pufru („RNA Wash Buffer“) a poté centrifugováno při 13000 rpm a 4 °C po dobu 2 min. Dále byly kolonky přeneseny do nových 1,5 ml „RNAsa-free“ mikrozkušavek (Eppendorf).

K vymytí RNA z kolonky bylo přidáno 20 μ l vody bez nukleáz (DEPC vody) (InVitrogen) a na konec centrifugováno při 13000 rpm a 4 °C po dobu 30 s.

Poté byla měřena koncentrace RNA na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.5.2 Příprava cDNA a qPCR identifikace

Do nové sterilní zkumavky byla připravena směs A, do které byl napipetován 1 µg celkové RNA, 1 µl „Random hexamer primeru“, a nakonec byla doplněna voda do 11 µl. Směs A byla promíchána pipetou, inkubována při 70 °C po dobu 5 minut a nakonec zchlazena.

Zároveň byla připravena směs B obsahující pro 1 vzorek 4 µl 5x reakčního pufu, 2 µl 10 nM dNTP mixu, 1 µl „RiboLock RNase“ inhibitoru a 2 µl „M-MuLV Reverse Transcriptase“ (Thermo Fisher Scientific).

K 11 µl směsi A bylo přidáno 9 µl směsi B. Tato směs A + B byla poté opatrně promíchána, inkubována 5 minut při pokojové teplotě a následně 60 minut při 37 °C v inkubátoru. Reakce byla zakončena zahřátím při 70 °C na 5 min.

4.5.3 PCR amplifikace jednovláknové cDNA

Vzorky směsi A+B pro cílovou mRNA amplifikaci byly ředěny v poměru 1:5 (80 µl DEPC vody (InVitrogen) + 20 µl směsi A+B) a v poměru 1:40 pro housekeepingový gen pro kontrolu mRNA amplifikace (195 µl DEPC vody + 5 µl ředěné směsi A+B).

Poté byla do sterilních 1,5 ml mikrozkuvek (Eppendorf) připravena směs C, která obsahovala pro jeden vzorek 25 µl „SYBR Greenu“ (Roche), 1 µl „Forward primeru“ pro cílovou mRNA (10 µM), 1 µl „Reverse primeru“ pro cílovou mRNA (10 µM) a 13 µl DEPC vody.

V duplikátech pro každý vzorek bylo pipetováno 20 µl směsi C do jednotlivých jamek destičky pro LightCycler® 96 (Roche Life Science). Následně bylo do příslušných jamek přidáno 5 µl směsi A+B.

Celá destička byla promíchána v ThermoMixeru při pokojové teplotě po dobu 30 s, a dále vložena do LightCycleru® 96 (Roche Life Science), kde byla provedena analýza.

4.6 Luminiscenční test buněčné apoptózy

Luminiscenční test pro stanovení aktivity kaspáz využívá principu luminiscence, která vzniká během štěpení substrátu kaspázou. Přidáním činidla k buněčnému vzorku

dochází k lýze buněk a uvolní se aktivní kaspázy. Kaspázy následně štěpí substrát, což vede k emisi luminiscenčního signálu. Intenzita luminiscence je přímo úměrná aktivitě kaspáz v testovaném vzorku (Promega, 2023).

Luminiscenční metodou byla stanovována aktivita kaspáz 3, 7, 8, a 9. Buněčné linie U87MG a U87MG-IDH1mut byly ovlivněny (1x, 2x a 3x po 24 h) příslušnými koncentracemi (200 nM a 500 nM) FLU a kultivovány v 96-jamkové destičce (Thermo Scientific). Po 2, 4, 8 a 24 hodinách inkubace byl přidáním 50 μ l pufru obsahujícího 50 mM HEPES, 5 mM DDT a 5 mM CHAPS do každé jamky vytvořen buněčný lyzát. Lyzát byl dále vložen do mikrozkušavek (Eppendorf) a uchován při -80 °C pro další analýzu.

Při měření luminiscence byla použita 384-jamková destička určená pro spektrofotometr. Do jamek bylo pipetováno 25 μ l vzorku a k tomu následně 25 μ l reakčního činidla. Vzorky v destičce byly opatrně promíchány a poté následovala jejich inkubace při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

Po inkubaci byla naměřena luminiscence pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan). Aktivita kaspáz byla poté vztažena k celkovému množství bílkoviny, změřené za pomoci metody BCA (popsáno výše).

4.7 Stanovení léčiv v biologickém materiálu pomocí LC/MS

Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) je výkonná a citlivá analytická metoda o vysoké specifičnosti. Využívá se k identifikaci a kvantifikaci chemických sloučenin (i stopových množství chemických látek) v oblastech vědy a průmyslu, včetně farmacie, lékařství, potravinářství a ochrany životního prostředí. LC/MS kombinuje schopnost oddělit složky směsi pomocí chromatografie s citlivou a selektivní detekcí molekul pomocí hmotnostní spektrometrie. Během analýzy se směs látek rozpustí v kapalině a vstříkne do chromatografického systému, kde je oddělena na jednotlivé složky na základě jejich interakcí s pevnou fází a mobilní fází. Poté jsou separované sloučeniny vedeny do hmotnostního spektrometru, kde jsou ionizovány a analyzovány podle jejich hmotnosti a náboje (Altium 2023, Kříž 2023, MUNI 2013, Ying, 2022).

Buňky linie U87MG a U87MG-IDH1mut byly inkubovány v 6jamkové destičce v médiu. Dále byly tyto buňky ovlivněny příslušnými koncentracemi (200 nM a 500 nM)

FLU a vloženy do inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Ovlivnění bylo prováděno opakovaně, 1x – 3x vždy po 24h inkubace.

Po inkubaci byly buňky odebírány v časových intervalech 2 h, 4 h, 24 h a uchovávány při –20 °C v 500 µl vody pro injekci.

Následovalo měření koncentrace proteinů v takto připravených vzorcích pomocí metody BCA (viz výše).

Buněčná suspenze byla dále smíchána s methanolem a acetonitrilem v poměru 1:1:1 a vortexována po dobu 15 minut. Tato směs byla následně centrifugována 4 minuty při 13000 rpm. Supernatant byl pak přes 0,22 µm PTFE injekční filtr přefiltrován do skleněné lahvičky určené pro analýzu.

Pro analýzu byl použit Agilent 1290 Infinity II UHPLC systém spojený s Agilent 6470 QqQ hmotnostním spektrometrem a objem vzorku činil 1 µl. Tato analýza probíhala při gradientové eluci a průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min. Mobilní fáze byla složena z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě a 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v methanolu (v poměru 95:5 v čase 0-0,5 min; 5:95 v čase 0,5-3 min; 5:95 v čase 3-4 min, 95:5 v čase 4-5 min). Termostat autosampléru byl nastaven na 15 °C. Termostat kolony Zorbax Eclipse plus RRHD C18, 2,1 x 50 mm, 1,8 µm byl nastaven na 30 °C. Parametry MS zdroje byly nastaveny následovně: sušící plyn – 200 °C, 2 l/min; SGT („sheath gas temperature“) – 400 °C; SGF („sheath gas flow“) – 12 l/min; tlak nebulizátoru 25 psi; napětí na kapiláře 2500 V. Přejechy [M+H]⁺ iontů byly detekovány při dwell time 50 ms.

4.8 Statistická analýza

Data z měření jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ± SD z alespoň dvou nezávislých experimentů. Statistická analýza byla provedena pomocí Two-Way ANOVA testu, Bonferroniho testu a statistická významnost vyjádřená jako * odpovídá hladině spolehlivosti p < 0.05. Analýza byla provedena za použití programu GraphPad Prism 6.0.

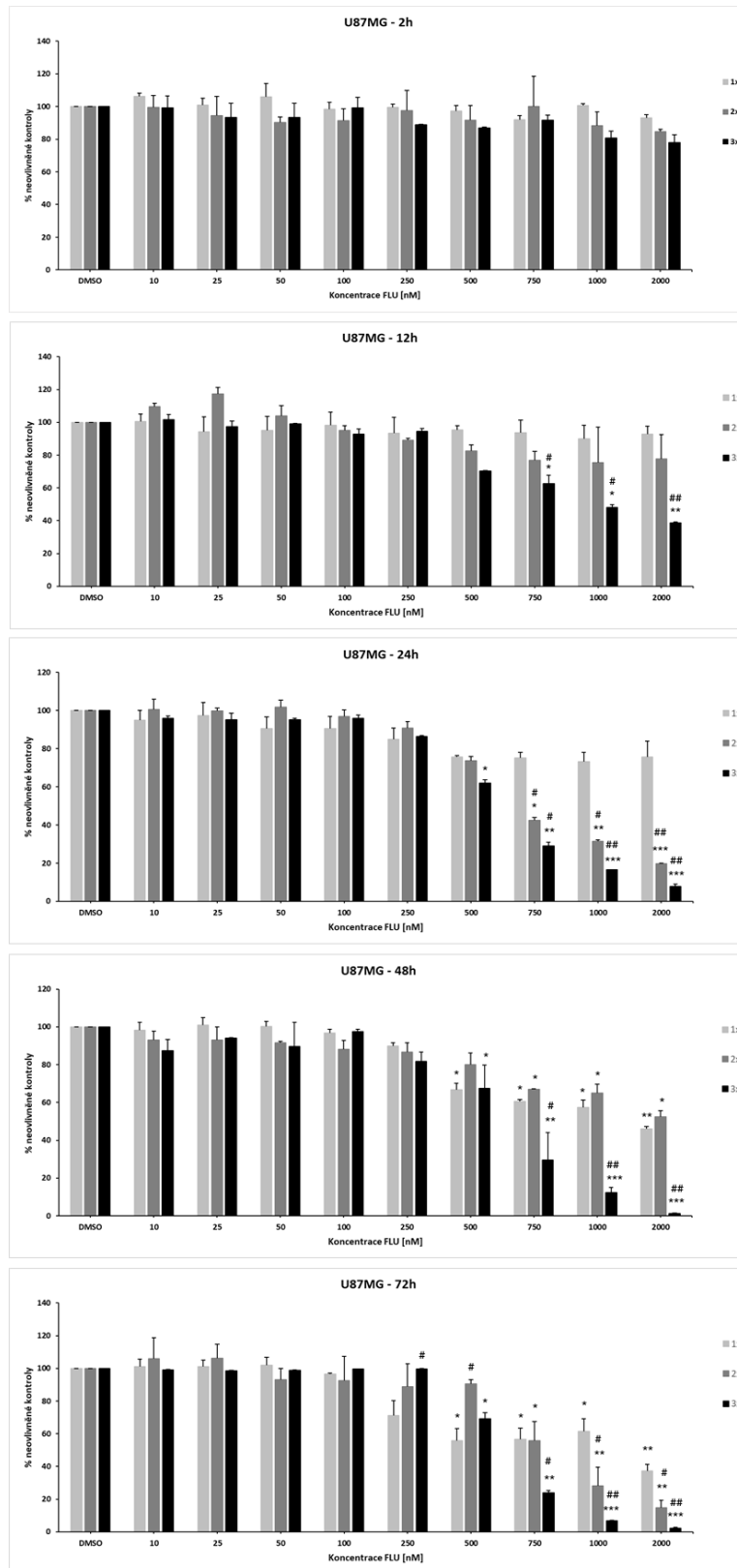
5. VÝSLEDKY

5.1 Vliv FLU na viabilitu buněčných linií U87MG

a U87MG-IDH1-mut

Působení FLU na viabilitu buněk bylo testováno na buněčných liniích U87MG a U87MG-IDH1-mut pomocí metody WST-1. Léčivo (FLU) bylo použito v koncentrační řadě 10 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM; 250 nM; 500 nM; 750 nM; 1000 nM a 2000 nM. Buňky byly ovlivněny 1x, 2x a 3x pomocí uvedených koncentrací FLU, a to v časových intervalech 2 h, 12 h, 24 h, 48 h a 72 h od předchozího ovlivnění. Po posledním ovlivnění byly buňky dále inkubovány po dobu příslušného časového intervalu a následně byla stanovena jejich viabilita.

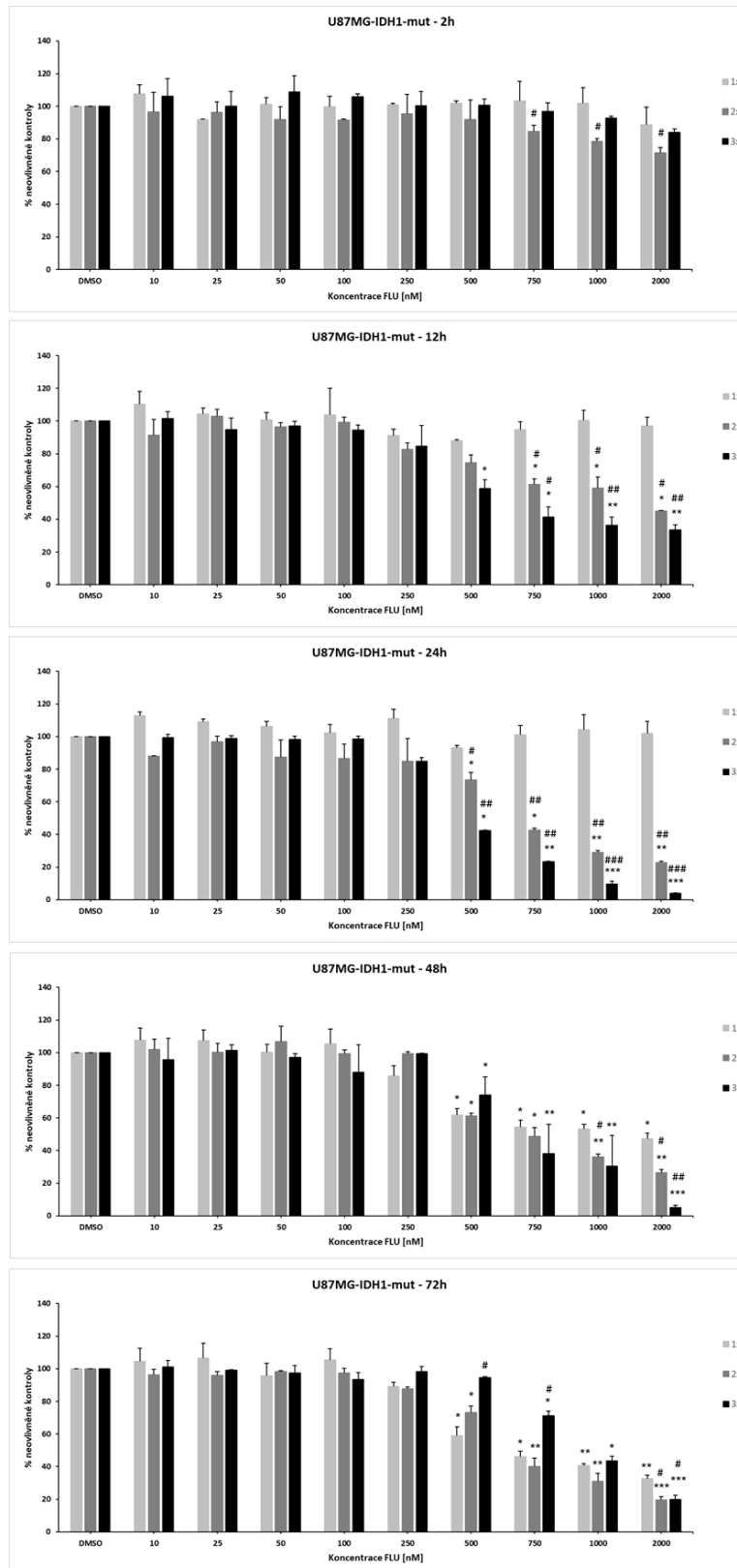
U obou buněčných linií docházelo ke snížení buněčné proliferace oproti kontrole v závislosti na zvyšující se koncentraci FLU, počtu ovlivnění a také doby ovlivnění FLU.



Obr. 7: Stanovení vlivu FLU na proliferaci buněk U87MG metodou WST-1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Neovlivněná kontrola v jednotlivých opakováních; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. 1x podání v jednotlivých koncentracích.

Statisticky významné snížení proliferace oproti kontrole bylo pozorováno u buněk U87MG ovlivněných FLU v koncentracích 750 nM, 1000 nM a 2000 nM již po 12 h od podání FLU a dále ve všech vyšších časových intervalech. Ke snížení docházelo i v koncentraci 500 nM, a to po 24 h od třetího ovlivnění, po 48 h a 72 h od prvního a třetího ovlivnění.

U těchto buněk ovlivněných 2x a 3x bylo pozorováno statisticky významné snížení viability v porovnání s buňkami ovlivněnými 1x, především se zvyšující se koncentrací FLU a časovým intervalem ovlivnění. Statisticky významné snížení proliferace je nejlépe vidět po 24 h po ovlivnění v koncentracích FLU 750 nM, 1000 nM a 2000 nM. Statisticky významné snížení viability v porovnání s buňkami ovlivněnými 1x je však možné pozorovat již při nižších koncentracích, a to po 72 h od třetího ovlivnění buněk FLU 250 nM a od druhého ovlivnění buněk 500 nM.



Obr. 8: Stanovení vlivu FLU na proliferaci buněk U87MG-IDH1-mut metodou WST-1. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 vs. Neovlivněná kontrola v jednotlivých opakováních; # p <0,05, ##p <0,01, ###p <0,001 vs. 1x podání v jednotlivých koncentracích

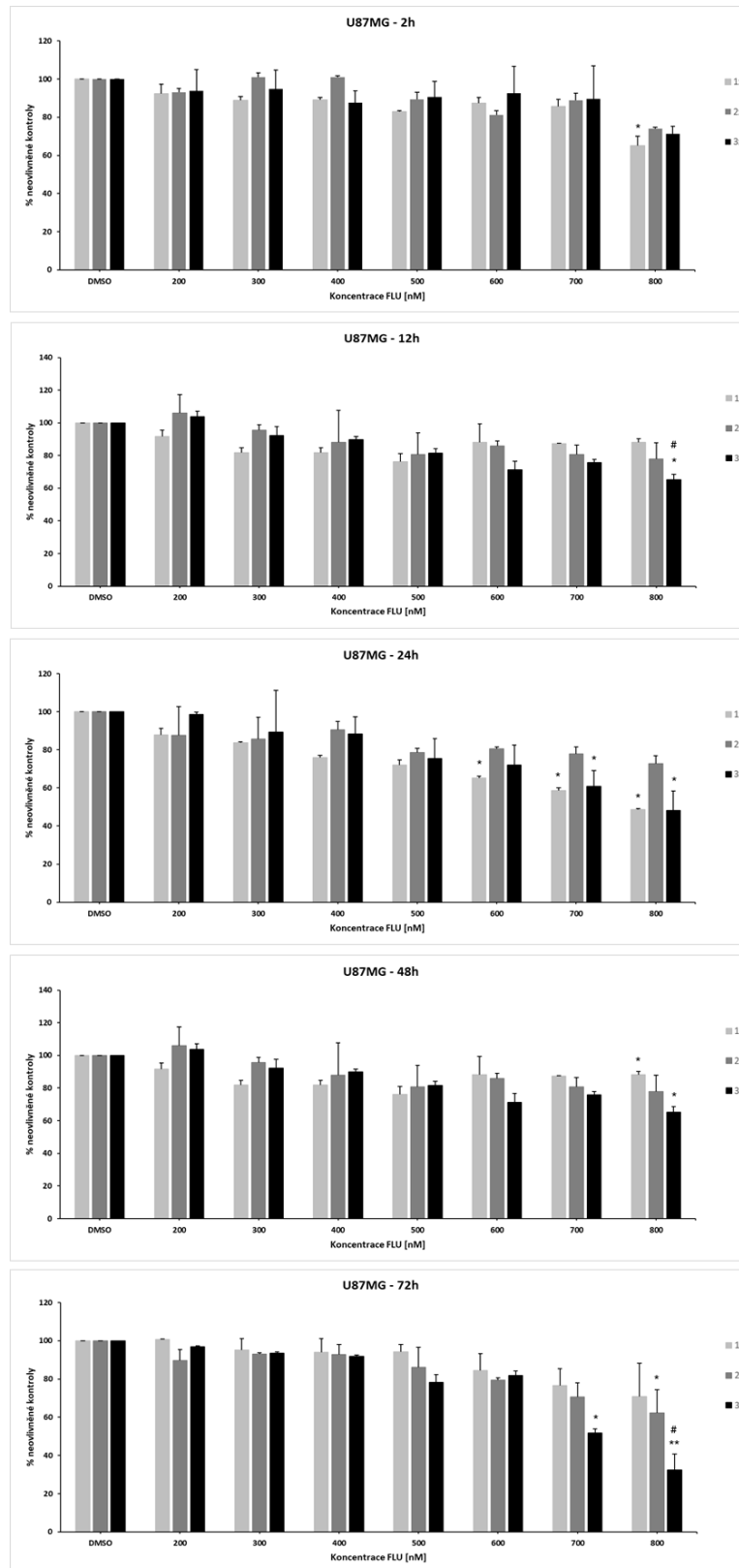
U buněčné linie U87MG-IDH-mut je trend snížení buněčné proliferace po podání FLU obdobný jako u linie U87MG, závisí na zvyšující se koncentraci FLU, počtu ovlivnění a také na délce časového intervalu ovlivnění.

U těchto buněk ovlivněných 2x a 3x je však možné pozorovat v porovnání s buňkami ovlivněnými 1x statisticky významné snížení proliferace již po 2 h od podání FLU, a to v koncentracích 750 nM, 1000 nM a 2000 nM.

Stejně jako u předchozí buněčné linie byla statistická významnost snížení proliferace oproti kontrole pozorována u buněk U87MG-IDH1-mut po 12 h od podání FLU v koncentracích 750 nM, 1000 nM a 2000 nM.

Na základě těchto výsledků jsme následně přistoupili k podrobnějšímu testování vlivu opakovaně podávaného FLU ve vybraném užším koncentračním spektru.

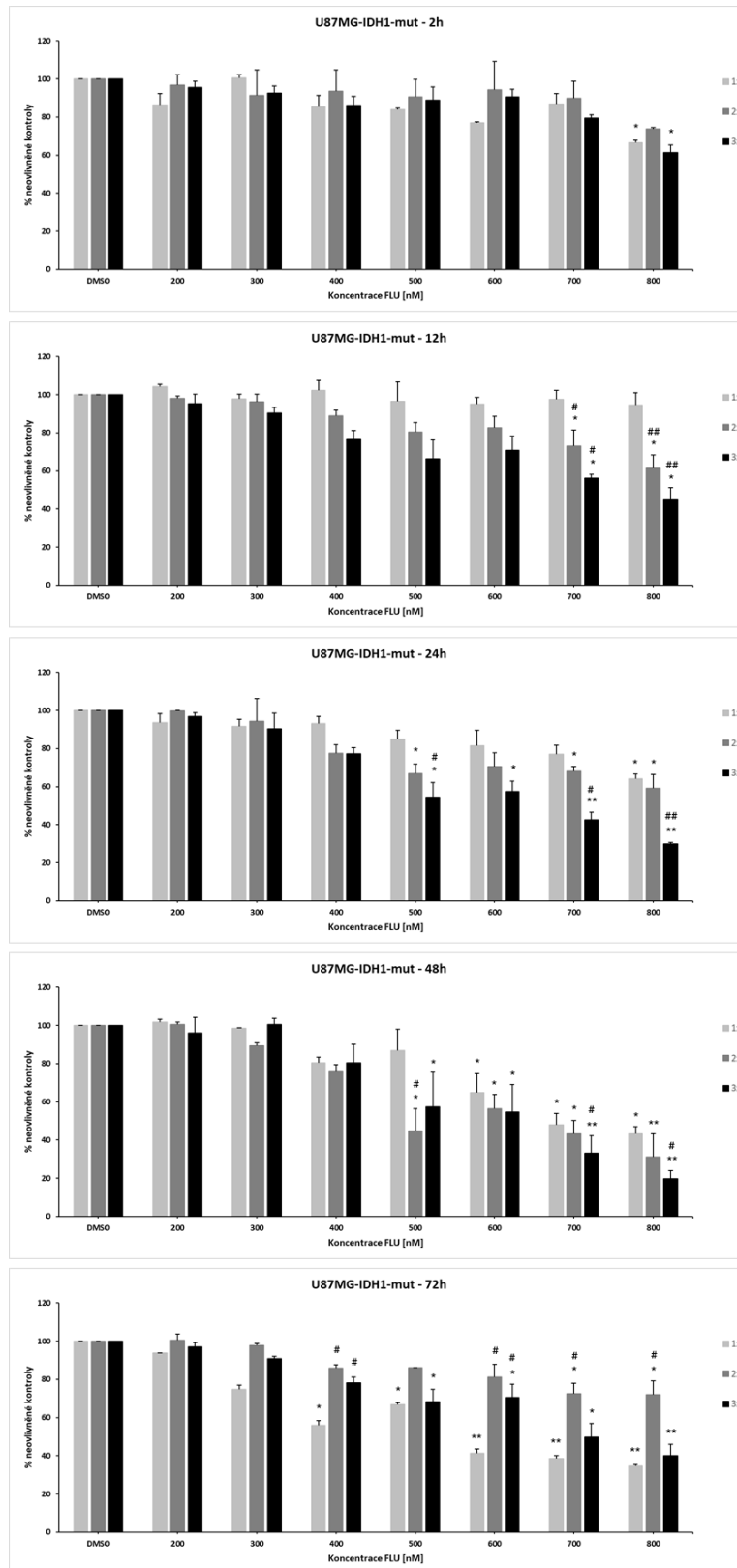
FLU byl použit ve druhé koncentrační řadě (200 nM; 300 nM; 400 nM; 500 nM; 600 nM; 700 nM; 800 nM). Stejně jako v předchozí koncentrační řadě byly buňky ovlivněny 1x, 2x a 3x pomocí uvedených koncentrací FLU, a to v časových intervalech 2 h, 12 h, 24 h, 48 h a 72 h od předchozího ovlivnění. Po posledním ovlivnění byly buňky dále inkubovány po dobu příslušného časového intervalu a následně byla opět stanovena jejich viabilita.



Obr. 9: Stanovení vlivu FLU na proliferaci buněk U87MG metodou WST-1. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 vs. Neovlivněná kontrola v jednotlivých opakováních; # p <0,05, ## p <0,01, ### p <0,001 vs. 1x podání v jednotlivých koncentracích

V porovnání s kontrolními buňkami docházelo ke statisticky významnému snížení proliferace u buněk U87MG po podání FLU v koncentracích 600 nM, 700 nM a 800 nM.

U těchto buněk ovlivněných 2x a 3x bylo pozorováno statisticky významné snížení proliferace oproti buňkám ovlivněným FLU 1x v koncentraci FLU 800 nM v časovém intervalu 24 h a 72 h.



Obr. 10: Stanovení vlivu FLU na proliferaci buněk U87MG-IDH1-mut metodou WST-1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Neovlivněná kontrola v jednotlivých opakováních; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. 1x podání v jednotlivých koncentracích.

Buněčná linie U87MG-IDH1-mut vykazovala vyšší citlivost k FLU, především v časových intervalech 12 h, 24 h a 48 h od ovlivnění. V porovnání s kontrolou bylo zaznamenáno statisticky významné snížení buněčné proliferace u buněk U87MG-IDH1-mut ve druhé koncentrační řadě v koncentracích FLU od 400 nM do 800 nM, v koncentraci 800 nM již po 2 h po ovlivnění.

Především ve vyšších časových intervalech ovlivnění (12 h, 24 h a 48 h) bylo zároveň možné pozorovat statisticky významné snížení viability buněk 3x ovlivněných 800 nM koncentrací FLU oproti buňkám, které byly danou koncentrací FLU ovlivněny pouze 1x. Toto snížení však nebylo pozorováno v intervalu ovlivnění 72 h.

5.2 Stanovení inhibiční koncentrace IC50

Na základě předchozího stanovení viability buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut po ovlivnění rozličnými koncentracemi FLU metodou WST-1 bylo provedeno stanovení poloviční maximální inhibiční koncentrace (IC50) pro jednotlivé testované buněčné linie.

Tab. 5: Hodnoty IC50 pro buněčné linie U87MG a U87MG-IDH1-mut

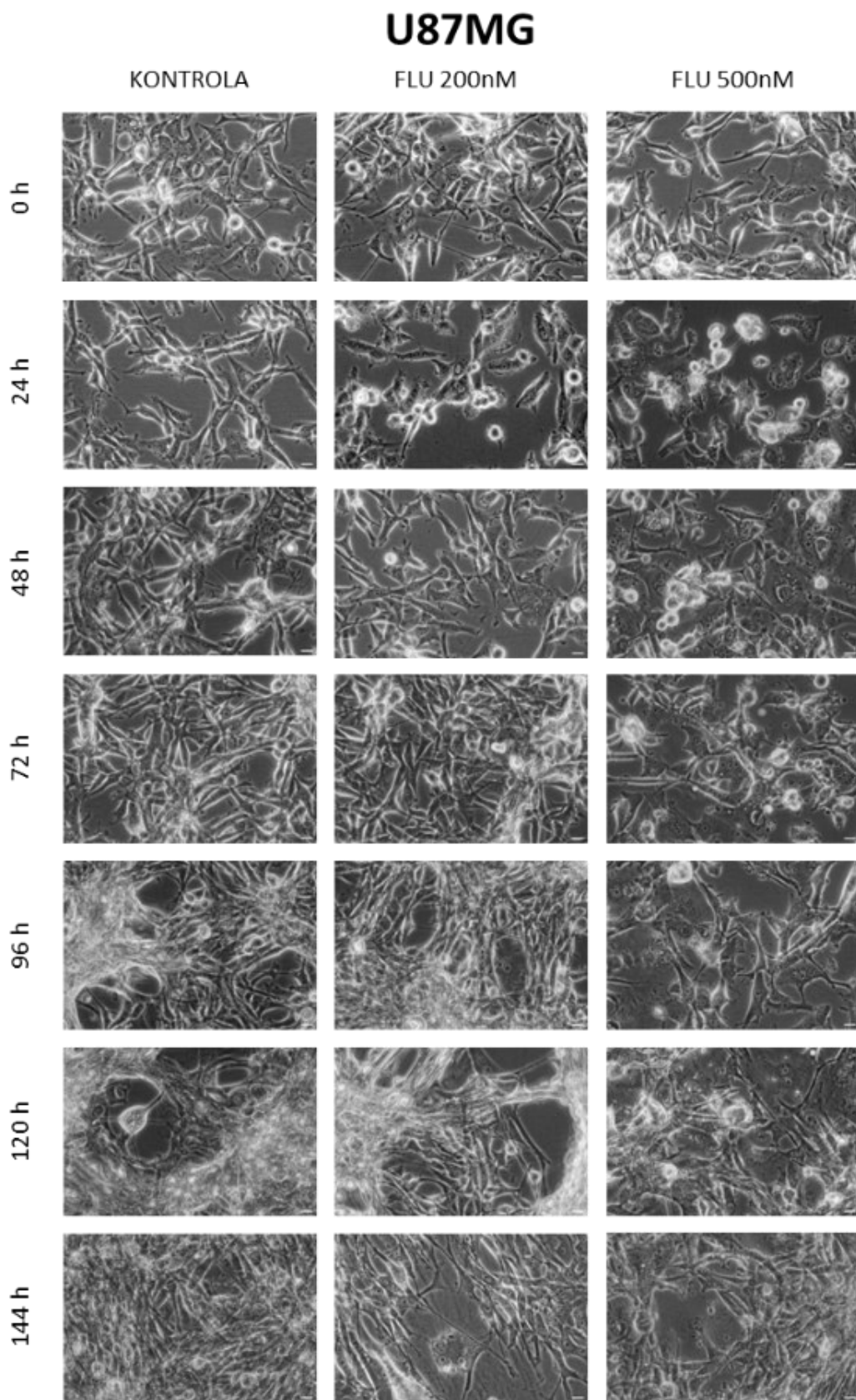
	FLU [nM]
U87MG	1377,0
U87MG-IDH1-mut	1280,0

Obě testované buněčné linie vykazovaly vysokou citlivost k ovlivnění FLU, hodnoty IC50 byly pro obě testované linie podobné. Přičemž mírně vyšší citlivost k testovanému léčivu vykazovala buněčná linie U87MG-IDH1-mut, jejíž hodnota IC50 pro FLU dosahovala 1280,0 nM koncentrace.

5.3 Morfologické změny buněk po ovlivnění FLU

V dalším kroku jsme pozorovali vliv nízkodávkového opakovaného podání FLU na morfologii GBM buněk. Buněčné linie U87MG a U87MG-IDH1-mut byly v čase 0 h, 24 h a 48 h ovlivněny pomocí FLU v koncentracích 200 nM a 500 nM. Morfologie buněk

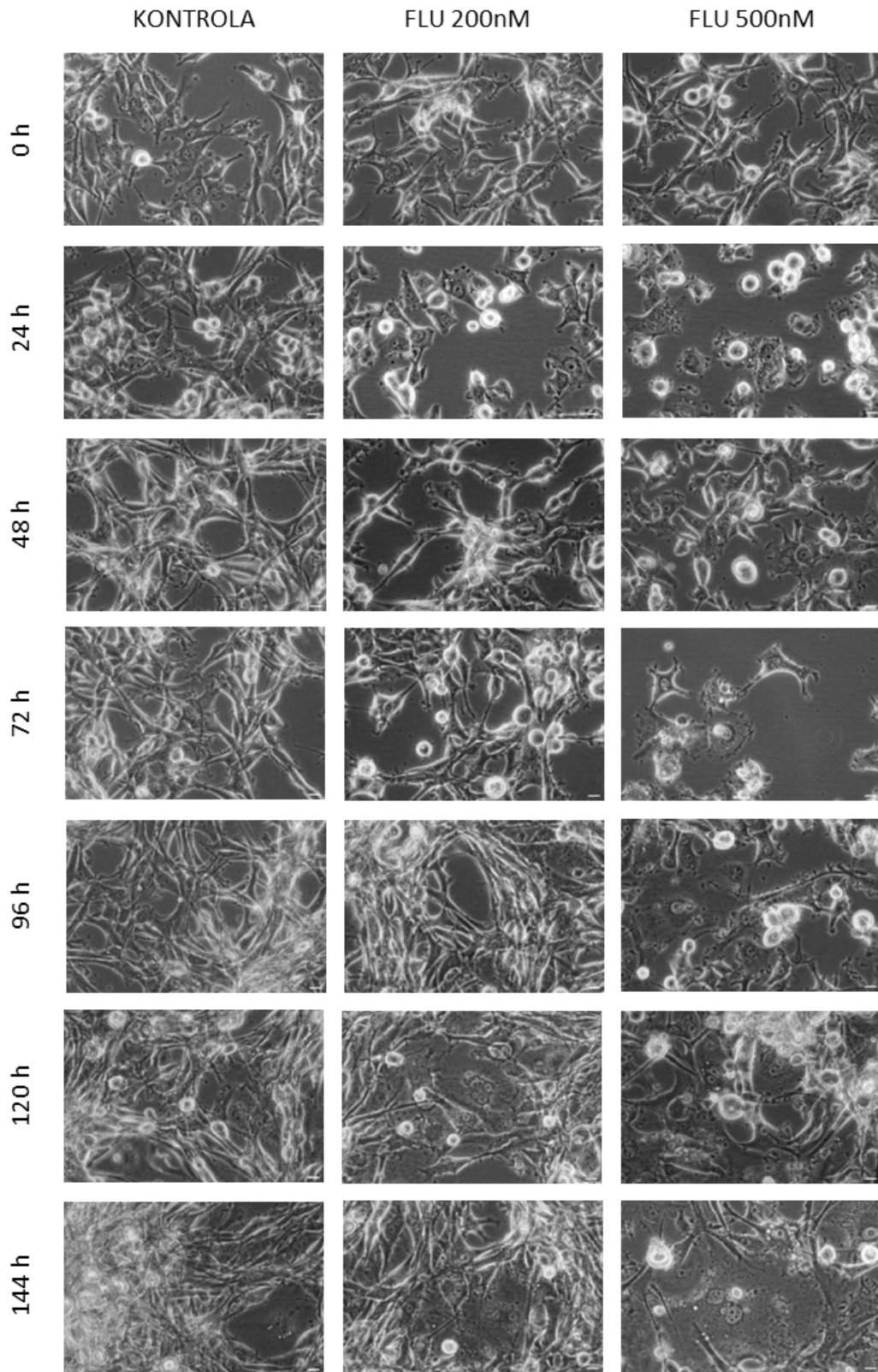
a její případné změny byly pozorovány za použití mikroskopu s fázovým kontrastem v intervalech 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h a 144 h.



Obr. 11: Morfologie buněk U87MG po ovlivnění FLU v časových intervalech 0, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin po ovlivnění léčivem, zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

Vliv FLU na buněčnou linii U87MG lze pozorovat již po prvním ovlivnění, docházelo ke vzniku zakulacených a vícejaderných buněk. Zároveň bylo možné sledovat snížení proliferace buněk. Po druhém a třetím ovlivnění tyto změny dále pokračovaly a změny v morfologii buněk byly viditelné i v následujících časových intervalech. Působením FLU na buněčnou linii v koncentraci 200 nM byly však zaznamenány menší morfologické změny v porovnání se vzorky, které byly postupně ovlivňovány FLU v koncentraci 500 nM. V dalších intervalech, kdy se ovlivnění buněk FLU dále neprovádělo, docházelo ke zdánlivému obnovení proliferace přeživších buněk, především u buněk, které byly ovlivněny 200 nM FLU.

U87MG-IDH1-mut

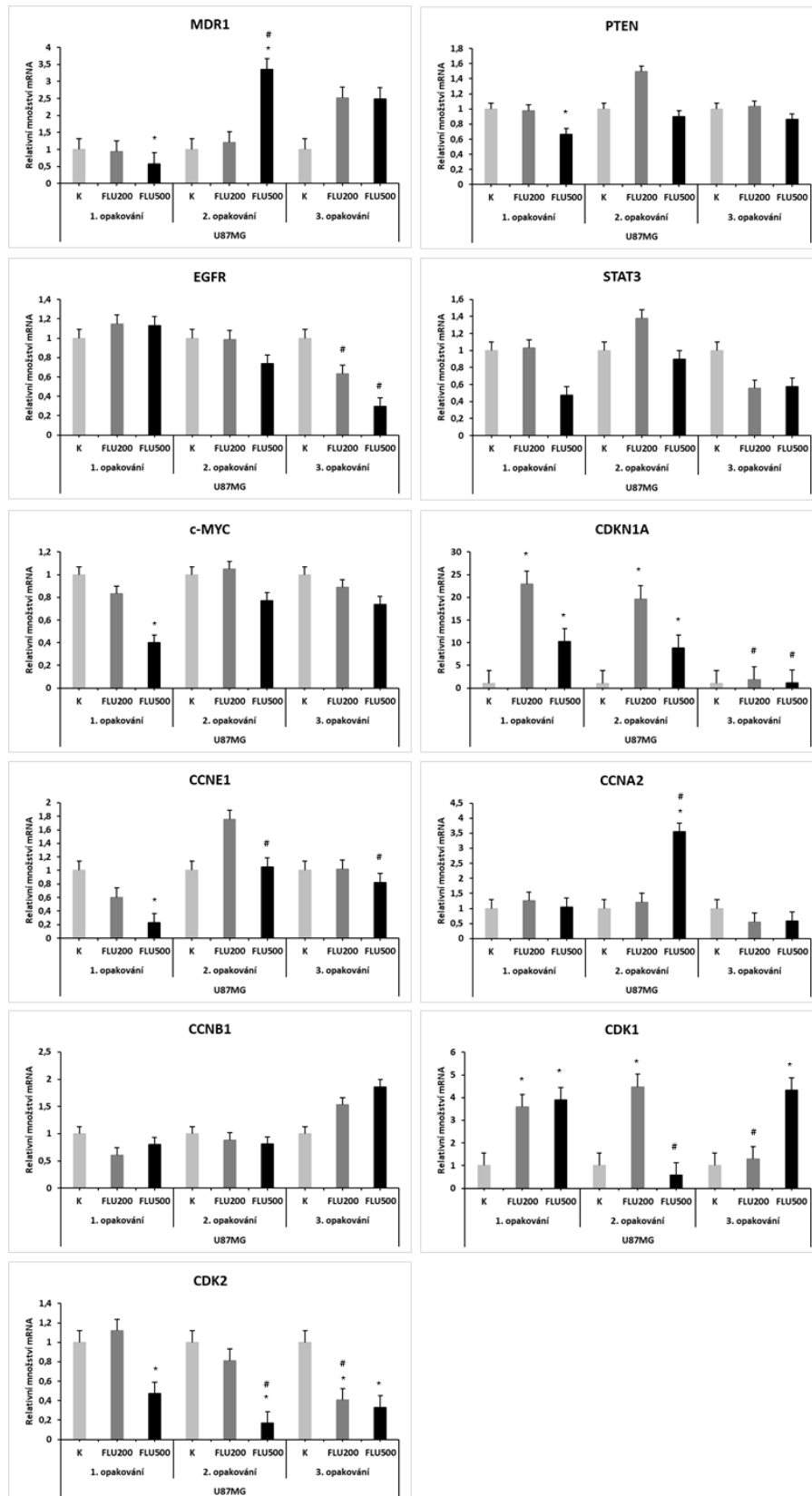


Obr. 12: Morfologie buněk U87MG-IDH1-mut po ovlivnění FLU v časových intervalech 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin po ovlivnění léčivem, zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

U buněčné linie U87MG-IDH1-mut byl vliv FLU výrazně viditelný již po prvním podání léčiva. Morfologické změny (zakulacený tvar buněk a vznik vícejaderných buněk) a snížení buněčné proliferace byly patrné po ovlivnění léčivem v obou testovaných koncentracích. Stejně jako u předchozí buněčné linie bylo po přerušení podávání FLU pozorováno zdánlivé znovuoobnovení proliferace u přeživších buněk, opět výrazněji ve vzorcích ovlivněných 200 nM FLU.

5.4 Stanovení vlivu FLU na expresi vybraných markerů

Změny hladin jednotlivých markerů na úrovni mRNA byly stanovované metodou RT-PCR. Buňky U87MG a U87MG-IDH1-mut byly ovlivněny 1x, 2x a 3x FLU v koncentraci 200 nM a 500 nM vždy po 24 h. Po posledním ovlivnění byly buňky inkubovány 24 h a posléze připraveny na RT-PCR analýzu. Následně byly stanovovány markery buněčného růstu, proliferace, přežití a chemorezistence a markery regulace buněčného cyklu.



Obr. 13: Stanovení relativního množství jednotlivých markerů na úrovni mRNA metodou RT-PCR u buněčných linií U87MG. * $p < 0,05$ vs. Neovlivněná kontrola v jednotlivých opakováních; # $p < 0,05$ vs. 1x podání v jednotlivých koncentracích.

Po prvním ovlivnění buněk U87MG oběma koncentracemi FLU docházelo ke snížení exprese MDR1, toto snížení bylo v porovnání s kontrolními buňkami statisticky významné pouze po ovlivnění 500 nM FLU. Po druhém i třetím podání obou koncentrací FLU bylo naopak zaznamenáno zvýšení exprese tohoto markeru a u buněk 2x ovlivněných koncentrací 500 nM bylo toto zvýšení statisticky významné (v porovnáním s kontrolními a 1x ovlivněnými buňkami).

Expese markeru PTEN byla snížena po prvním podání obou koncentrací FLU, kdy toto snížení po ovlivnění 500 nM bylo v porovnání s kontrolními buňkami statisticky významné. Po druhém i třetím opakování docházelo u buněk ovlivněných 200 nM FLU ke zvýšení exprese této molekuly, u buněk ovlivněných vyšší testovanou koncentrací zůstávala expese na podobných hladinách jako v kontrolních vzorcích.

Hladina molekuly EGFR byla po prvním podání obou koncentrací zvýšena. Poté byla tato hladina v případě obou koncentrací u buněk U87MG snížena v závislosti na počtu podání FLU i na koncentraci. Statisticky významné snížení hladiny EGFR bylo v porovnání s 1x ovlivněnými buňkami pozorováno po třetím ovlivnění oběma koncentracemi.

U buněk 1x ovlivněných 200 nM FLU se v porovnání s kontrolními buňkami relativní množství STAT3 signifikantně neměnilo a po ovlivnění 500 nM FLU bylo sníženo. U druhého opakování bylo možné pozorovat zvýšení relativního množství STAT3 u buněk ovlivněných 200 nM FLU a snížení u buněk ovlivněných 500 nM FLU. Po třetím podání docházelo ke snížení exprese této molekuly po ovlivnění oběma koncentracemi FLU. Žádná z těchto změn relativního množství STAT3 mRNA však nebyla statisticky signifikantní.

S výjimkou 2x ovlivněných buněk 200 nM FLU docházelo ke snížení exprese c-Myc ovlivněním oběma testovanými koncentracemi ve všech opakováních, po podání 500 nM FLU byl tento efekt výraznější. U buněk 1x ovlivněných touto koncentrací byl navíc pokles exprese molekuly c-Myc statisticky významný.

Po podání obou testovaných koncentrací FLU docházelo ve všech opakováních ke zvýšení hladiny CDKN1A, u buněk ovlivněných koncentrací 200 nM bylo toto zvýšení vzhledem k buňkám ovlivněných koncentrací 500 nM výraznější. V porovnání s kontrolními buňkami byla expese tohoto markeru statisticky významně zvýšena po prvním a druhém podání obou zkoušených koncentrací FLU a u třetího ovlivnění

oběma koncentracemi došlo ke statisticky významnému snížení v porovnání s 1x ovlivněnými buňkami.

Ke snížení množství CCNE1 docházelo u buněk 1x ovlivněných oběma zkoušenými koncentracemi FLU, statisticky významné bylo po ovlivnění 500 nM FLU. Po druhém podání obou koncentrací FLU byla však hladina tohoto markeru zvýšena, u buněk ovlivněných 500 nM FLU bylo zvýšení v porovnání s 1x ovlivněnými buňkami statisticky významné. Po třetím podání 200 nM FLU nedocházelo k výrazným změnám exprese CCNE1, u buněk ovlivněných vyšší testovanou koncentrací byla ale exprese v porovnání s 1x ovlivněnými buňkami statisticky významná.

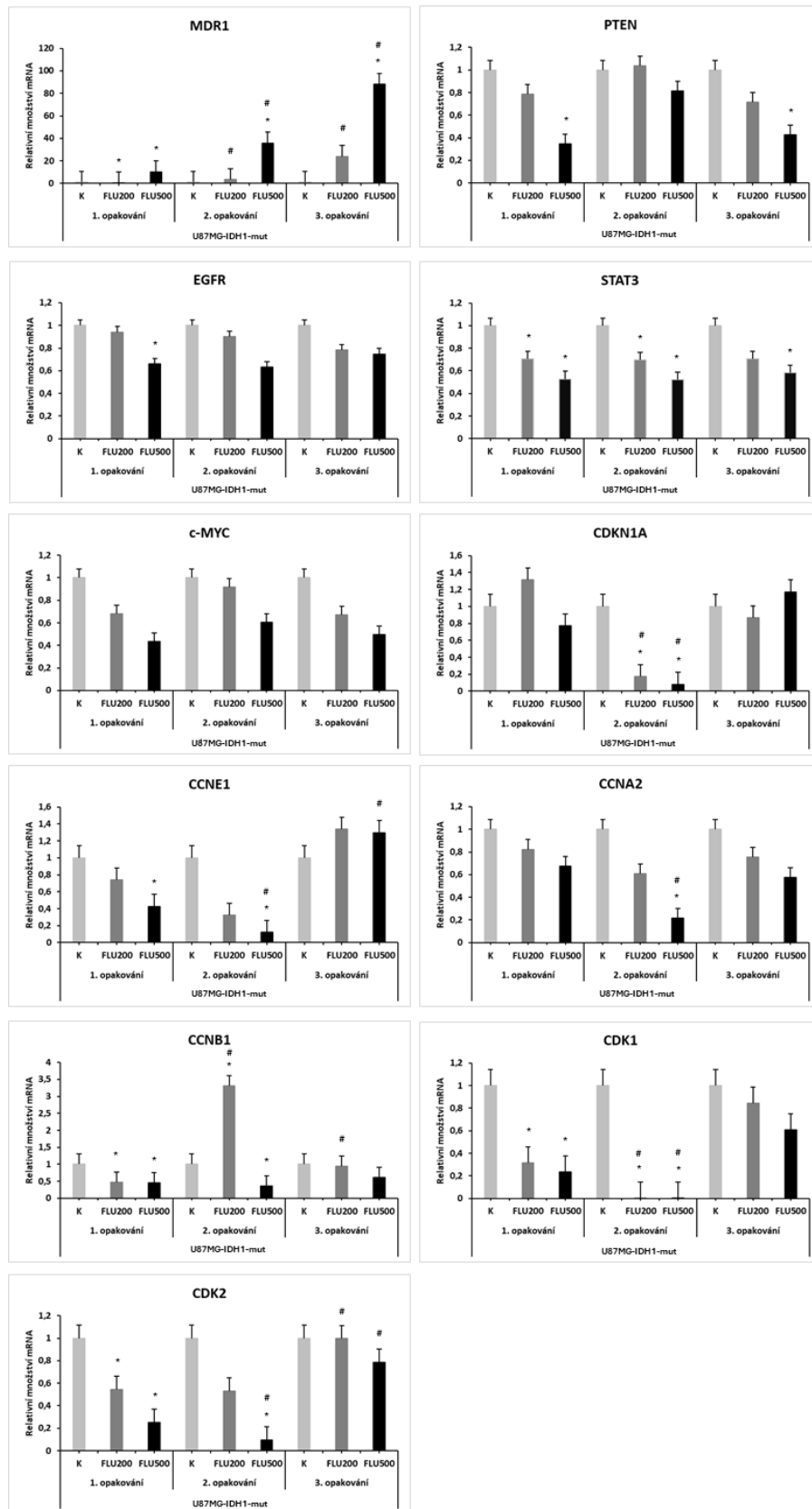
Po prvním podání obou testovaných koncentrací a po druhém podání 200 nM FLU nebyly pozorované významné odchylky exprese CCNA2. Statisticky významný nárůst relativního množství tohoto markeru byl v porovnání s kontrolními i 1x ovlivněnými buňkami zaznamenán po druhém ovlivnění buněk FLU v koncentraci 500 nM. Po třetím podání obou koncentrací FLU pak docházelo ke snížení exprese CCNA2.

Hladina molekuly CCNB1 byla u buněk U87MG snížena po prvním a druhém podání obou uvedených koncentrací FLU, a naopak zvýšena po třetím podání těchto koncentrací.

S výjimkou buněk 2x ovlivněných 500 nM FLU bylo v porovnání s kontrolními buňkami relativní množství CDK1 zvýšeno ve všech opakováních podání obou koncentrací FLU. V porovnání s kontrolními buňkami docházelo ke statisticky významnému zvýšení tohoto množství u buněk 1x ovlivněných FLU oběma koncentracemi, u 2x ovlivněných 200 nM FLU a u 3x ovlivněných 500 nM FLU. U buněk 2x ovlivněných 500 nM FLU a u 3x ovlivněných 200 nM FLU docházelo v porovnání s 1x ovlivněnými buňkami ke statisticky významnému snížení množství CDK1.

Stejně jako exprese c-Myc byla v porovnání s buňkami ovlivněnými 200 nM FLU exprese CDK2 u buněk ovlivněných koncentrací 500 nM menší. S výjimkou buněk 1x ovlivněných 200 nM FLU bylo u buněk ovlivněných oběma koncentracemi FLU pozorováno snížení exprese této molekuly, a to statisticky významně v porovnání s kontrolními buňkami u 1x, 2x i 3x ovlivněných buněk koncentrací 500 nM a u 3x ovlivněných buněk koncentrací 200 nM. V porovnání s 1x ovlivněnými buňkami se

statisticky významně tato exprese snižovala po druhém podání 500 nM FLU a po třetím podání 200 nM FLU.



Obr. 14: Stanovení relativního množství jednotlivých markerů na úrovni mRNA metodou RT-PCR u buněčných linií U87MG-IDH1-mut. * $p < 0,05$ vs. Neovlivněná kontrola v jednotlivých opakováních; # $p < 0,05$ vs. 1x podání v jednotlivých koncentracích.

U buněčné linie U87MG-IDH1-mut ovlivněné FLU docházelo ke zvýšení množství MDR1 v závislosti na počtu opakování ovlivnění a na koncentraci FLU. Statisticky významné zvýšení bylo pozorováno po prvním, druhém i třetím podání obou testovaných koncentrací FLU.

S výjimkou buněk 2x ovlivněných 200 nM FLU byla exprese markeru PTEN u buněčné linie U87MG-IDH1-mut snížena ve všech opakováních (výrazněji po podání 500 nM), statisticky významně pak po prvním a třetím podání 500 nM FLU.

Relativní množství EGFR bylo u ovlivněných buněk U87MG-IDH1-mut sníženo ve všech opakováních. Toto snížení bylo výraznější u buněk ovlivněných 500 nM FLU, statisticky významné v porovnání s kontrolními buňkami bylo jen po prvním ovlivnění.

U buněk ovlivněných 200 nM FLU i 500 nM FLU byla ve všech opakováních hladina STAT3 snížena, u buněk ovlivněných 500 nM FLU však výrazněji. Ke statisticky významnému snížení v porovnání s kontrolními buňkami docházelo u buněk 1x a 2x ovlivněných FLU v obou koncentracích a u buněk 3x ovlivněných 500 nM FLU.

Ve všech opakováních docházelo ke snížení exprese c-Myc a stejně jako u předchozí linie byl i u linie U87MG-IDH1-mut v porovnání s buňkami ovlivněnými 200 nM FLU pozorován větší pokles exprese této molekuly u buněk ovlivněných 500 nM FLU, avšak bez statistických významností.

Po prvním podání bylo u buněk ovlivněných 200 nM zaznamenáno zvýšení a u buněk ovlivněných 500 nM FLU snížení relativního množství CDKN1A. Po druhém podání FLU v obou koncentracích docházelo v porovnání s kontrolními i 1x ovlivněnými buňkami ke statisticky významnému snížení množství tohoto markeru. Ve třetím opakování se poté v porovnání s kontrolními buňkami hladiny CDKN1A v buňkách ovlivněných 200 nM snížily a v buňkách ovlivněných druhou testovanou koncentrací naopak zvýšily.

Ke snížení exprese CCNE1 docházelo po ovlivnění oběma koncentracemi po prvním i druhém podání, toto snížení bylo statisticky významné u buněk ovlivněných 1x 500 nM FLU v porovnání s kontrolními buňkami a u buněk 2x ovlivněných touto koncentrací v porovnání i s 1x ovlivněnými buňkami. Po třetím podání byla exprese tohoto markeru naopak zvýšena a v porovnání s kontrolními buňkami u buněk ovlivněných 500 nM FLU pak statisticky významně.

Oproti předchozí linii bylo u buněk U87MG-IDH1-mut zaznamenáno viditelné snížení exprese CCNA2 (výrazněji po ovlivnění 500 nM FLU) ve všech opakováních. Toto snížení bylo statisticky významné u buněk 2x ovlivněných 500 nM FLU, a to v porovnání s kontrolními i s 1x ovlivněnými buňkami.

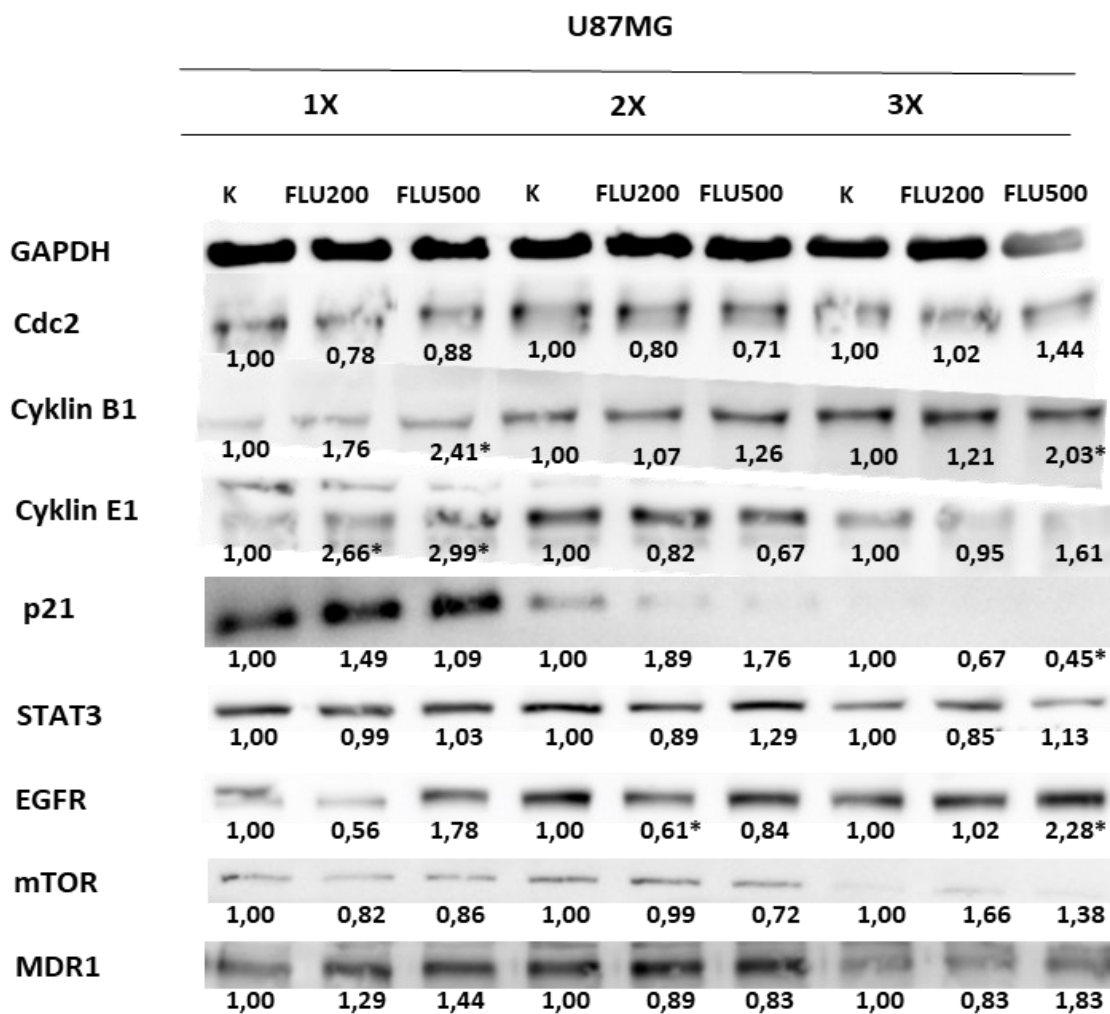
Kromě druhého podání 200 nM FLU, kdy docházelo ke statisticky významnému zvýšení hladiny CCNB1 v porovnání s kontrolními i s 1x ovlivněnými buňkami, bylo po ovlivnění FLU v obou koncentracích pozorováno snížení exprese této molekuly ve všech opakováních. Statisticky významné bylo toto snížení po ovlivnění oběma koncentracemi v prvním opakování, po druhém podání 500 nM FLU a po třetím podání 200 nM FLU.

Snížení exprese CDK1 bylo viditelné po podání obou koncentrací (výrazněji po ovlivnění 500 nM FLU) ve všech opakováních. Toto snížení bylo v porovnání s kontrolními buňkami statisticky významné u buněk po prvním podání obou testovaných koncentrací FLU a po druhém podání obou koncentrací i v porovnání s 1x ovlivněnými buňkami.

Relativní množství CDK2 bylo u buněk této buněčné linie sníženo ve všech opakováních. Tento efekt byl výraznější opět u buněk ovlivněných 500 nM FLU než u buněk ovlivněných 200 nM FLU. Statisticky významné snížení tohoto množství bylo zaznamenáno u buněk 1x ovlivněných oběma zkoušenými koncentracemi FLU a u buněk 2x ovlivněných 500 nM FLU. Ve třetím opakování však docházelo u obou koncentrací v porovnání s prvním opakováním k významnému nárůstu množství CDK2.

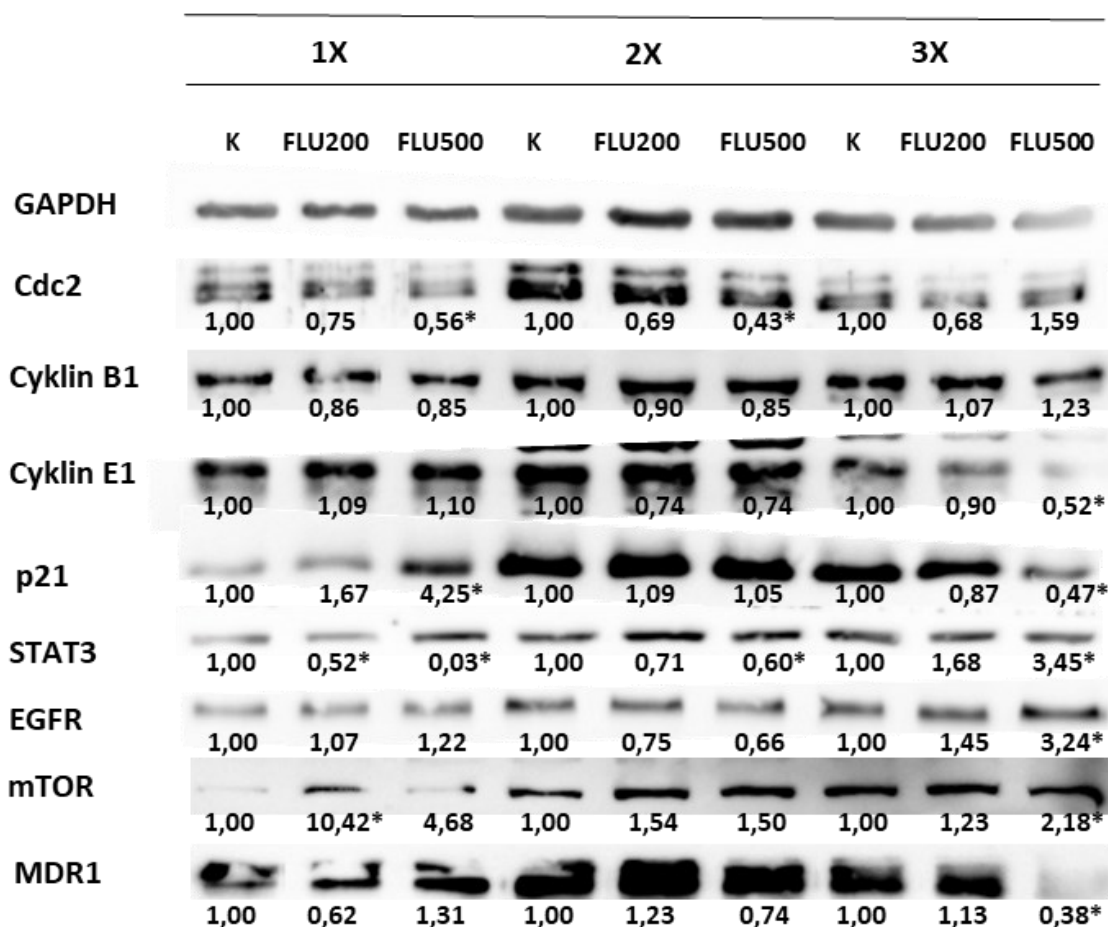
5.5 Stanovení proteinové exprese vybraných markerů

Ke stanovení exprese uvedených markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu, buněčnou proliferací a chemorezistencí na úrovni proteinů byla použita metoda Western blot. Toto stanovení bylo provedeno u buněčných linií U87MG a U87MG-IDH1-mut ovlivněných 1x, 2x a 3x FLU v koncentraci 200 nM a 500 nM. Buňky byly ovlivněny vždy po 24 h od nasazení/předchozího ovlivnění. Po posledním ovlivnění byly buňky inkubovány dalších 24 h a následně připraveny pro analýzu proteinů.



Obr. 15: Stanovení exprese vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu, buněčnou proliferací a chemorezistencí na úrovni proteinů metodou Western blot u buněk U87MG ovlivněných FLU. *p < 0,05 vs. Neovlivněná kontrola.

U87MG-IDH1-mut



Obr. 16: Stanovení exprese vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu na úrovni proteinů metodou Western blot u buněk U87MG-IDH1-mut ovlivněných FLU. *p < 0,05 vs. Neovlivněná kontrola.

Expres markeru MDR1 nebyla u buněk U87MG ovlivněných FLU výrazně změněna. U linie U87MG-IDH1-mut se exprese MDR1 po prvním a druhém podání FLU pohybovala v podobných hodnotách, jaké byly pozorovány u kontrolních vzorků. Po třetím podání však docházelo u buněk ovlivněných 500 nM FLU ke statisticky významnému snížení exprese této molekuly.

V porovnání s kontrolními buňkami nebyly u buněk U87MG ovlivněných FLU pozorovány žádné statisticky významné odchylky exprese mTOR. U buněk U87MG-IDH1-mut docházelo v porovnání s kontrolními buňkami ve všech případech ke zvýšení exprese mTOR. Tento efekt byl statisticky významný u buněk 1x ovlivněných 200 nFLU a u 3x ovlivněných 500 nM FLU.

Expres EGFR byla u buněk U87MG po prvním podání 200 nM FLU snížena a u druhé koncentrace naopak zvýšena. Po druhém podání obou testovaných koncentrací

se exprese snižovala, statisticky významná byla pouze po ovlivnění 200 nM FLU. Po třetím podání se však exprese EGFR u buněk ovlivněných 500 nM zvyšovala, a to se statistickou významností. U buněk U87MG-IDH1-mut se exprese EGFR v porovnání s kontrolními buňkami signifikantně neměnila s výjimkou třetího opakování, kdy bylo pozorováno statisticky významné zvýšení exprese této molekuly v buňkách ovlivněných 500 nM FLU.

Expresí STAT3 zůstávala u buněk U87MG v porovnání s kontrolními buňkami na stejné úrovni, po ovlivnění použitými koncentracemi FLU nebyly pozorovány žádné statisticky významné odchylky této exprese. U buněk U87MG-IDH1mut však docházelo ke statisticky významnému snížení exprese STAT3 hned po prvním podání 200 nM i 500 nM FLU. Po druhém podání obou koncentrací FLU docházelo opět ke snížení exprese testované molekuly, snížení bylo statisticky významné pouze po ovlivnění 500 nM FLU. Po třetím podání 500 nM FLU docházelo naopak ke statisticky významnému zvýšení exprese STAT3.

Po prvním a druhém podání FLU v obou koncentracích docházelo u buněk U87MG k mírnému zvýšení exprese p21, po třetím podání však byla exprese tohoto markeru snížena, v případě buněk ovlivněných 500 nM FLU bylo snížení statisticky významné. U druhé buněčné linie U87MG-IDH1-mut obě testované koncentrace FLU účinně stimulovaly expresi p21, docházelo k výraznému zvýšení exprese této molekuly již po prvním ovlivnění, u buněk ovlivněných 500 nM statisticky významně. Po třetím ovlivnění se tato exprese naopak snižovala.

Po prvním, druhém i třetím ovlivnění buněk U87MG oběma testovanými koncentracemi FLU docházelo ke zvýšení exprese molekuly cyklin B1, statisticky významné bylo zvýšení po prvním a třetím ovlivnění 500 nM FLU. Expresí této molekuly se u buněk U87MG-IDH1-mut pohybovala v podobných hodnotách, které byly pozorovány u kontrolních vzorků, žádné vychýlení hodnoty exprese nebylo statisticky významné.

U buněk U87MG 1x ovlivněných FLU v obou testovaných koncentracích docházelo ke statisticky významnému zvýšení exprese cyklinu E1. U druhé buněčné linie bylo naopak pozorováno statisticky významné snížení exprese této molekuly, a to po třetím ovlivnění FLU v koncentraci 500 nM.

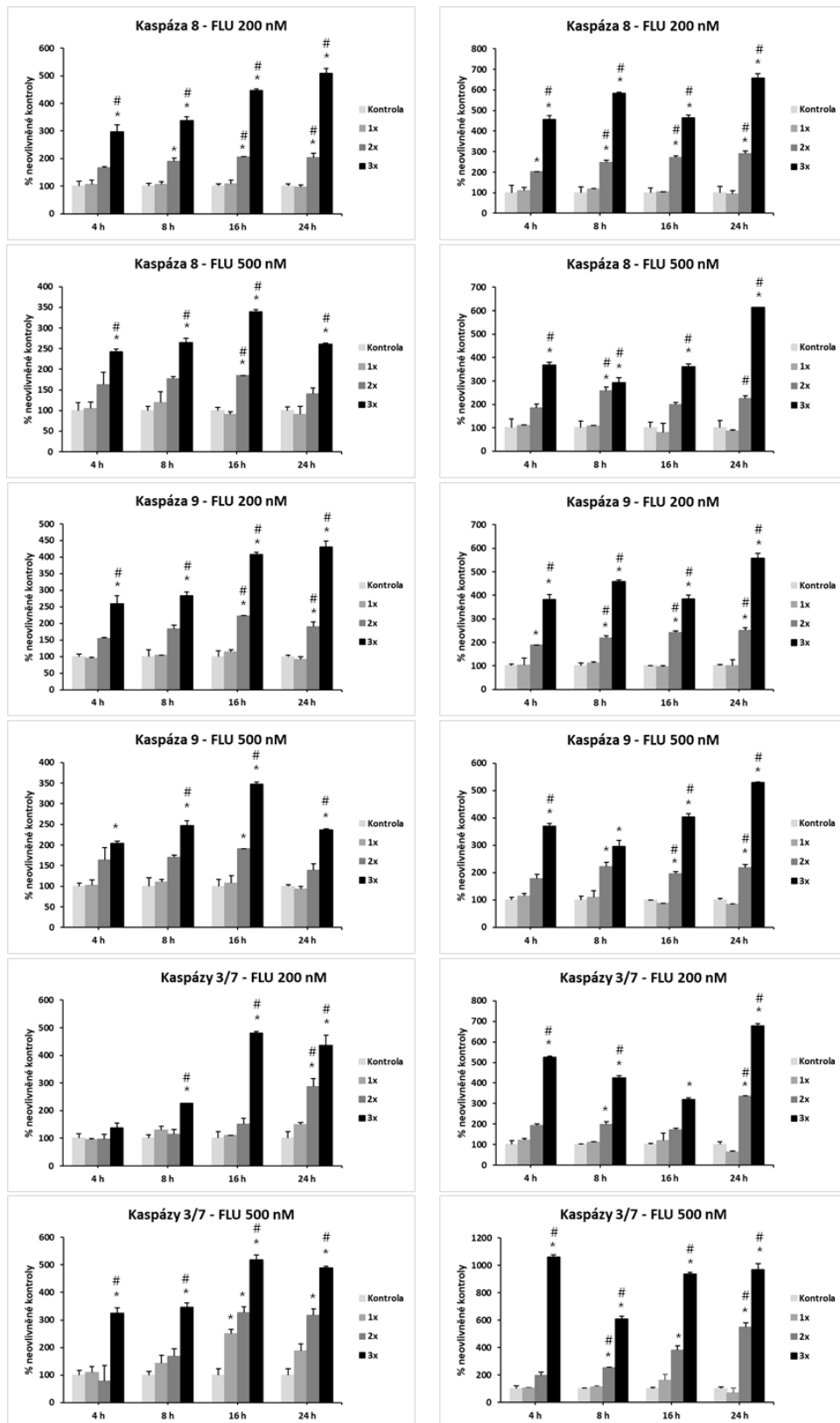
Expresa Cdc2 byla snížena u buněk U87MG i U87MG-IDH1-mut po prvním a druhém ovlivnění oběma testovanými koncentracemi FLU. Statisticky významné bylo toto snížení u buněk U87MG-IDH1-mut ovlivněných 1x a 2x 500 nM FLU.

5.6 Stanovení aktivity kaspáz

Vliv FLU na aktivitu iniciačních kaspáz 8 a 9 a efektorových kaspáz 3/7 u buněčných linií U87MG a U87MG-IDH1-mut byl stanoven luminiscenčním měřením. Buňky byly ovlivněny 1x, 2x a 3x uvedenými koncentracemi FLU (200 nM a 500 nM) vždy po 24 h, vzorky pak byly odebrány po 4 h, 8 h, 16 h a 24 h od posledního ovlivnění.

U87MG

U87MG-IDH1-mut



Obr. 17: Stanovení aktivity kaspáz 8, 9 a 3/7 u buněčné linie U87MG a U87MG-IDH1-mut ovlivněných FLU. * $p < 0,05$ vs. Neovlivněná kontrola; # $p < 0,05$ vs. 1x podání v jednotlivých koncentracích.

U buněk U87MG i U87MG-IDH1-mut ovlivněných FLU v obou testovaných koncentracích docházelo k nárůstu aktivity kaspáz v závislosti na době od ovlivnění a na počtu opakování ovlivnění. Obecně k nejvýraznějšímu nárůstu aktivity uvedených kaspáz docházelo u buněk ovlivněných 3x.

Po ovlivnění buněk U87MG i U87MG-IDH1-mut oběma testovanými koncentracemi FLU docházelo ke statisticky významnému zvýšení aktivity kaspázy 8, především u buněk 3x ovlivněných, a to v porovnání s buňkami kontrolními i s buňkami 1x ovlivněnými FLU. U buněk U87MG ovlivněných 200 nM a u buněk U87MG-IDH1-mut ovlivněných 500 nM FLU navíc docházelo k časové závislosti efektu léčiva na aktivitu kaspázy 8, k největšímu nárůstu její aktivity docházelo u buněk 3x ovlivněných FLU po 24 h od posledního ovlivnění. Tento výsledek byl statisticky významný v porovnání s kontrolními buňkami i s buňkami ovlivněnými FLU pouze jedenkrát.

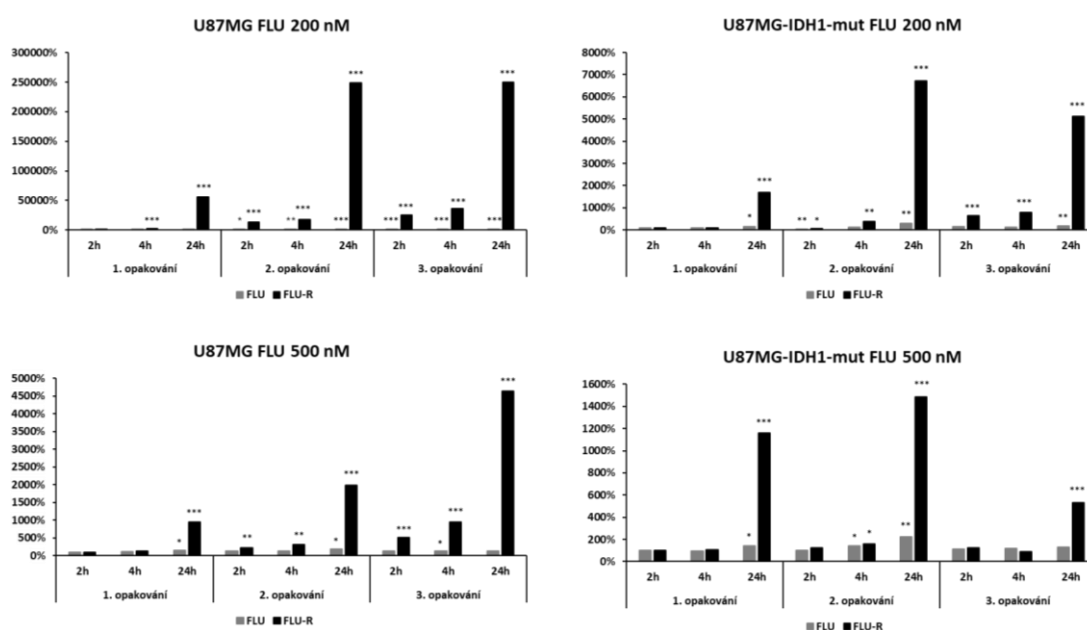
Stejně jako u předchozí kaspázy bylo v porovnání s kontrolními a 1x ovlivněnými buňkami pozorováno u buněk U87MG i U87MG-IDH1-mut statisticky významné zvýšení aktivity kaspázy 9, hlavně po třetím, ale i po druhém ovlivnění ve vyšších časových intervalech od posledního ovlivnění (16 h a 24 h). Trend zvýšení aktivity této kaspázy byl u obou buněčných linií závislý na době od podání léčiva.

U buněk U87MG byl pozorována statisticky významný nárůst aktivity kaspáz 3/7 částečně po druhém, ale především po třetím ovlivnění FLU v obou testovaných koncentracích. Zvláště ve vyšších časových intervalech od posledního ovlivnění (16 h a 24 h) bylo možné pozorovat tento nárůst v porovnání s buňkami kontrolními i s buňkami 1x ovlivněnými danými koncentracemi FLU, a to u buněk ovlivněných 2x i 3x. Staticky významný nárůst aktivity kaspáz 3/7 byl u buněk U87MG-IDH1-mut viditelný, stejně jako v předchozí buněčné linii, částečně po druhém, ale především po třetím ovlivnění FLU v obou testovaných koncentracích. Trend zvýšení aktivity těchto kaspáz v závislosti na době od ovlivnění FLU nebyl ovšem tak zřejmý jako u předchozí buněčné linie, např. u buněk ovlivněných 3x (oběma koncentracemi) FLU nebyla aktivita kaspáz po 16 h od ovlivnění zvýšena výrazněji než po 4 h.

5.7 Stanovení obsahu FLU a jeho metabolitu v buňkách U87MG a U87MG-IDH1-mut

Pro stanovení množství FLU a jeho metabolitu redukovaného FLU (FLU-R) v buněčných liniích U87MG a U87MG-IDH1-mut po jejich ovlivnění tímto léčivem byla použita LC/MS analýza. Ta byla provedena PharmDr. Adamem Skarkou, Ph.D. na Univerzitě Hradec Králové.

Pro stanovení koncentrace FLU a FLU-R uvnitř buněk byly buněčné linie ovlivněny ve třech opakováních v koncentraci FLU 200 nM a 500 nM vždy po 24 h. Koncentrace látek byla měřena v časových intervalech 2 h, 4 h a 24 h od jednotlivých ovlivnění.



Obr. 18: Stanovení množství FLU a jeho metabolitu FLU-R v buněčných liniích U87MG a U87MG-IDH1-mut pomocí LC/MS analýzy po ovlivnění FLU – porovnání ovlivněných buněk s buňkami kontrolními pro jednotlivá opakování. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. FLU 1x 2 h.

V buněčné linii U87MG obsah FLU v buňkách stoupá v závislosti na době od ovlivnění, a to po ovlivnění oběma testovanými koncentracemi FLU. Výjimkou je obsah FLU v buňkách po 24 h od posledního, třetího ovlivnění pomocí FLU 500 nM. Obsah FLU také stoupá v závislosti na počtu opakování ovlivnění, toto zvýšení množství FLU v buňkách ovšem opět nebylo pozorováno po 24 h od třetího ovlivnění FLU 500 nM.

Statisticky významné zvýšení obsahu FLU v porovnání s buňkami ovlivněnými 1x po 2 h bylo u těchto buněk ovlivněných FLU 200 nM pozorováno ve druhém a třetím opakování ve všech časových intervalech, u buněk 1x a 2x ovlivněných koncentrací 500 nM v posledním intervalu a u buněk 3x ovlivněných koncentrací 500 nM ve druhém časovém intervalu.

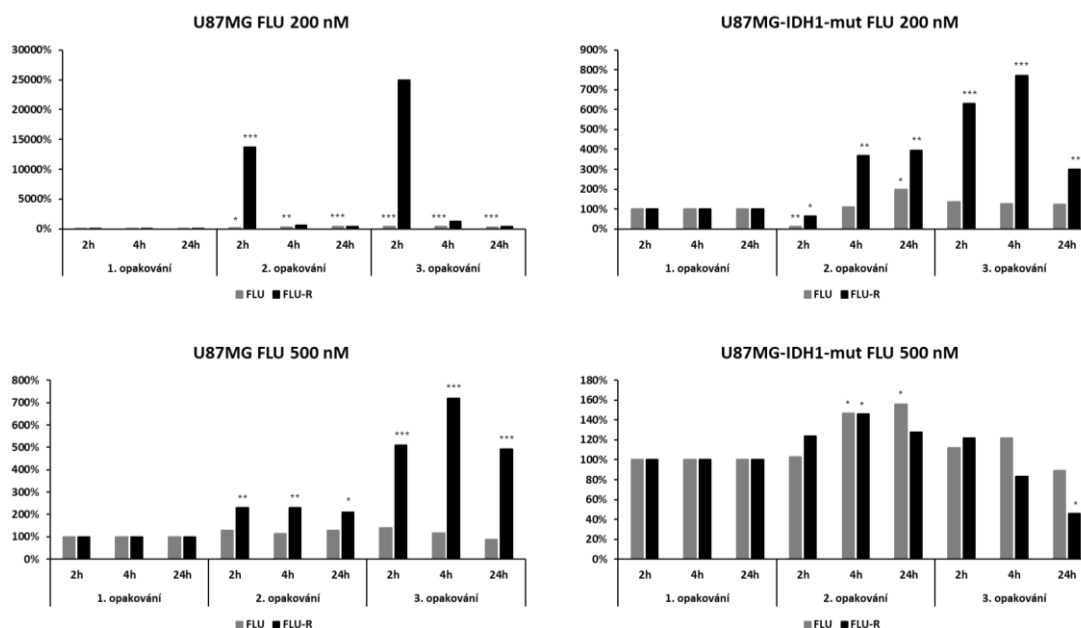
Obsah metabolitu FLU-R v těchto buňkách stoupá po podání FLU v obou testovaných koncentracích v závislosti na délce časového intervalu a na počtu opakování ovlivnění. S výjimkou 1x ovlivněných buněk v prvním opakování dochází v porovnání s buňkami 1x ovlivněnými po prvním časovém intervalu ke statisticky významnému zvýšení obsahu FLU-R ve všech časových intervalech v obou testovaných koncentracích.

V buněčné linii U87MG-IDH1-mut obsah FLU po ovlivnění léčivem v obou koncentracích také stoupal v závislosti na délce časového intervalu ovlivnění. Toto zvýšení obsahu FLU však nebylo pozorováno v buňkách, které byly ovlivněny třikrát 200 nM FLU a jedenkrát 500 nM FLU po 4 h inkubace od posledního ovlivnění léčivem. Stejně jako v předchozí buněčné linii stoupá obsah FLU v závislosti na počtu opakování ovlivnění ve většině stanovovaných časových intervalů inkubace s léčivem.

Ke statisticky významnému zvýšení obsahu FLU v těchto buňkách ovlivněných koncentrací 200 nM docházelo v porovnání s buňkami jednou ovlivněnými (po 2 h od ovlivnění) po 24 h od prvního, druhého i třetího ovlivnění a po 2 h od druhého ovlivnění. U buněk ovlivněných druhou testovanou koncentrací docházelo k tomuto zvýšení po 24 h od ovlivnění v prvním a druhém opakování a po 4 h od druhého podání léčiva.

Obsah metabolitu FLU-R v těchto buňkách opět stoupal po ovlivnění FLU 200 nM a 500 nM, a to ve většině časových intervalech ovlivnění i při opakovaném podání FLU.

Statisticky významné zvýšení obsahu metabolitu FLU-R bylo v porovnání s buňkami ovlivněnými 1x (po 2 h od ovlivnění) pozorováno v buňkách po ovlivnění FLU 200 nM, a to ve všech časových intervalech ve všech opakováních ovlivnění s výjimkou 1x ovlivněných buněk v prvním časovém intervalu.



Obr. 19: Stanovení množství FLU a jeho metabolitu FLU-R v buněčných liniích U87MG a U87MG-IDH1-mut pomocí LC/MS analýzy po ovlivnění FLU. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. FLU 1x.

V porovnání s buňkami po daném čase od prvního ovlivnění bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení obsahu FLU v buňkách U87MG 2x i 3x ovlivněných FLU 200 nM, a to ve všech časových intervalech.

Také v případě metabolitu FLU-R byl pozorován statisticky významný nárůst obsahu tohoto metabolitu v buňkách 2x i 3x ovlivněných FLU 500 nM v porovnání s buňkami ovlivněnými pouze jedenkrát, a to ve všech testovaných časových intervalech od ovlivnění.

V porovnání s buňkami po daném čase od prvního ovlivnění bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení obsahu FLU v buňkách U87MG-IDH1-mut, které byly 2x ovlivněny FLU 200 nM, a to po 2 h a 24 h od daného ovlivnění. K tomuto zvýšení dále docházelo v buňkách po 4 h a 24 h od druhého ovlivnění FLU 500 nM.

V buňkách U87MG-IDH1-mut docházelo ke statisticky významnému zvýšení obsahu metabolitu FLU-R v porovnání s buňkami po daném čase od prvního ovlivnění, a to ve všech časových intervalech u buněk U87MG-IDH1-mut 2x i 3x ovlivněných FLU 200 nM. Toto zvýšení bylo pozorováno i u buněk ovlivněných FLU 500 nM, a to po 4 h od druhého opakování ovlivnění a po 24 h od třetího ovlivnění.

6. DISKUZE

GBM je nejagresivnější forma primárních nádorů mozku. I přes intenzivní výzkum, úsilí o nové léčebné strategie a neustálé zdokonalování diagnostických metod a chirurgických postupů, zůstává prognóza pacientů s tímto onemocněním neuspokojivá. Tento fakt je dán několika faktory. Mikroprostředí GBM vykazuje vysokou heterogenitu, což představuje překážku pro jednotný terapeutický přístup. Buňky navíc vykazují imunorezistenci, vysokou schopnost rychlé proliferace a snadno pronikají do okolních tkání. Kromě toho podání běžných chemoterapeutik je značně komplikované z důvodu nepropustnosti hematoencefalické bariéry. Vývoj rezistence vůči léčbě je dalším významným faktorem přispívajícím ke špatné prognóze pacientů s GBM. Všechny tyto skutečnosti ve výsledku vedou k recidivě a progresi onemocnění a GBM tak zůstává onemocněním odolným vůči současným terapeutickým strategiím (Adam et al. 2010, Czarnywojtek et al. 2023, Jiapaer et al. 2018).

Jako nadějný směr ve výzkumu léčby GBM se jeví využití léčiv již schválených pro jiné indikace, mezi něž patří i FLU. Toto anthelmintikum se prokázalo jako účinné v boji proti buňkám různých typů nádorů. Kromě jeho antimitotického účinku, kdy léčivo inhibuje vznik mikrotubulů, bylo také zjištěno, že FLU ovlivňuje buněčný cyklus. Jeho vlivem nejčastěji dochází k zastavení buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze. Schopnost FLU ovlivňovat klíčový bod buněčného cyklu může být rozhodující pro jeho protinádorový účinek, jelikož zastavení buněčného cyklu v této fázi může vést k potlačení proliferace nádorových buněk a k následné apoptóze (Čáňová et al. 2017, Chen et al. 2022a, Hanušová et al. 2015, Vítovcová et al. 2023, Zhou et al. 2021). Cílem této práce bylo hodnocení vlivu FLU na buněčný cyklus a celkový stav buněk GBM při opakovaném podání léčiva.

Protinádorová aktivita FLU již byla pozorována na různých typech nádorových buněk, včetně leukemických, ovariálních, myelomových, melanomových, prsních, buněk karcinomu tlustého střeva a prostaty. Studie navíc ukázaly, že FLU vykazuje nízkou toxicitu a minimální nežádoucí účinky, což jej činí perspektivním kandidátem pro léčbu nádorových onemocnění (Čáňová et al. 2017, 2018, Chen et al. 2022a, Hou et al. 2015, Králová et al. 2016; Zhou et al. 2021).

Vliv FLU byl již testován také na GBM buněčných liniích. Ve studii Vítovcová et al. (2023) FLU účinně inhiboval proliferaci a viabilitu GBM buněčných linií A172, T98G a U118MG, ale také GBM primárních kultur odvozených z patientských vzorků. V naší práci jsme studovali vliv FLU rovněž na nádorové buněčné linie GBM, a to při opakovaném nízkodávkovém podávání léčiva na buňky U87MG a U87MG-IDH1-mut.

Tyto dvě stabilizované linie byly vybrány jako vhodné modely dvou typů GBM, primárního a sekundárního GBM. Ačkoli byla v doporučení WHO z roku 2021 navržena nová nomenklaturní klasifikace GBM, v současné době je v klinické praxi stále využívána klasifikace GBM na primární a sekundární typ nádoru, a to především podle přítomnosti nebo nepřítomnosti specifické mutace IDH1. Linie U87MG-IDH1-mut byla od linie U87MG odvozena vnesením právě této specifické mutace a použití obou těchto linií nám umožnilo současnou analýzu účinku FLU na buňkách imitujících primární a sekundární typ GBM nádoru (ATCC 2022, 2024, Stoyanov et al. 2022).

Nejprve byl testován vliv léčiva na viabilitu buněk. Buňky byly ovlivněny ve dvou koncentračních řadách, v různých časových intervalech a v různých stupních opakování podání (1x, 2x a 3x). Obě testované buněčné linie vykazovaly k FLU vysokou citlivost. Hodnota IC₅₀ buněčné linie U87MG pro FLU byla 1377,0 nM, mírně vyšší citlivost k testovanému léčivu vykazovala buněčná linie U87MG-IDH1-mut, jejíž hodnota IC₅₀ pro FLU dosahovala 1280,0 nM. Tyto hodnoty jsou podobné hodnotám zjištěných ve studii Vítovcová et al. (2023), kdy se IC₅₀ testovaných GBM buněčných linií pro FLU pohybovalo mezi 1,3 μM a 3,9 μM. Tyto hodnoty jsou také v souladu s naměřenými hodnotami IC₅₀ v dosud provedených studiích zabývajících se vlivem FLU na buňky rozličných typů nádorů, které se pohybovaly mezi 0,3 μM a 6,8 μM (Čáňová et al., 2018; Hou et al. 2015, Králová et al. 2016, 2013, Oh et al. 2018, Xie et al. 2021, Zhou et al. 2018).

U obou buněčných linií docházelo ke snížení buněčné proliferace oproti kontrole v závislosti na koncentraci podaného FLU, počtu ovlivnění a také době od ovlivnění FLU. Viabilita buněk U87MG se snižovala po podání 500 nM FLU na 97 % po 2 h inkubace, na 95 % po 12 h inkubace, dále na 75 % po 24 h inkubace, 66 % po 48 h inkubace a až na 55 % po 72 h inkubace. Kromě časové závislosti efektu této koncentrace na buňky U87MG bylo možné také pozorovat zvyšování efektu léčiva opakovaným podáním,

kdy docházelo ke snížení viability na 75 % po prvním podání, 73 % po druhém podání a 61 % po třetím podání 500 nM FLU vždy s 24 h inkubací mezi jednotlivými podáními. Obdobný efekt jsme také pozorovali u druhé testované buněčné linie U87MG-IDH1-mut.

Efekt FLU na nádorové buněčné linie U87MG a U87MG-IDH1-mut GBM byl dále potvrzen pomocí fázové kontrastní mikroskopie, kde byla sledována nejen jejich viabilita a proliferace, ale také morfologie buněk. Po podání FLU docházelo ke změnám kvantitativním (snižování viability buněk a jejich proliferace), ale také kvalitativním, přičemž bylo pozorováno především výrazné zakulacování buněk a vznik vícejaderných buněk. Tato pozorování jsou také konzistentní s předchozími studiemi zabývajícími se studiem efektu FLU na morfologii buněk např. Čáňová (2017), Králová (2016), Vítovcová (2023). Tento efekt byl ještě umocněn opakovaným podáním FLU (200 nM a 500 nM, 3x po 24 h), nicméně po přerušení nízkodávkového podávání FLU bylo u obou buněčných linií pozorováno zdánlivé znovuoobnovení proliferace u přeživších buněk a také obnovení jejich původní morfologie (buňky protáhlého tvaru s výběžky).

Jedním z mechanismů účinku FLU na nádorové buňky, který byl popsán v předešlých studiích, je ovlivnění signální dráhy STAT3. Molekula STAT3 je nadměrně exprimována a aktivována u mnoha nádorových onemocnění, a to také v GBM. Přispívá k vytváření imunosupresivního prostředí a výrazně ovlivňuje regulaci buněčného cyklu nádorových buněk, a tím podporuje proliferaci a invazi buněk. Navíc jeho nadměrná exprese může vést ke snížení exprese p53, jakožto tumor supresorového markeru (Fu et al. 2023, Lin et al. 2019). Předchozí studie ukázaly, že k inhibici signální dráhy STAT3 působením FLU docházelo v buňkách nádoru prsu, kolorektálního karcinomu i GBM (Chen et al. 2022a, Lin et al. 2019, Vítovcová et al., 2023).

Proliferaci buněk, tumorigenitu a odolnost vůči apoptóze podporuje a indukuje také zvýšená exprese EGFR a c-Myc. Aktivace signální dráhy STAT3 působením aktivního EGFR patří mezi nekanonické dráhy aktivace tohoto transkripčního faktoru, která již byla opakovaně u GBM buněk popsána (Aldape et al. 2015, Fritah & Niclou 2020, Miller et al. 2012). Naším dalším zájmem v této práci tedy bylo zhodnotit vliv FLU na změny exprese výše uvedených markerů buněčného růstu, proliferace a regulace buněčného cyklu.

Na úrovni mRNA bylo po opakovaném nízkodávkovém ovlivnění buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut pomocí FLU v koncentracích 200 nM a 500 nM pozorováno

snižování exprese markerů buněčné proliferace. Exprese molekul STAT3, EGFR a c-Myc byla snižována v závislosti na koncentraci, tedy výrazněji po ovlivnění 500 nM FLU než 200 nM FLU. Výraznější snížení exprese STAT3 a c-Myc bylo možné pozorovat u buněk U87MG-IDH1-mut, které také v porovnání s buňkami U87MG vykazovaly vyšší citlivost pro FLU. Opakovaným podáním však docházelo k většímu snížení exprese pouze v případě markeru EGFR v buňkách U87MG.

Tyto trendy snížení exprese výše uvedených markerů STAT3, EGFR a c-Myc působením FLU však nebyly potvrzeny na úrovni proteinů. V rámci této práce však byla testována pouze inkubační doba 24 h po posledním ovlivněním, zatímco změny v expresi těchto markerů se mohly projevovat již dříve nebo naopak později po podání testovaného léčiva. Součástí dalšího testování efektu FLU na proteiny by tak mělo být i testování jeho efektu v jiných časových intervalech.

Jak uvádí některé studie, FLU ovlivňoval přechod buněk z fáze G2 do M fáze u více typů nádorových buněk, včetně karcinomu prsu, melanomu, karcinomu prostaty a tlustého střeva (Čáňová et al. 2017, 2018, Králová et al. 2013, Zhou et al. 2021). Tento mechanismus účinku FLU byl rovněž potvrzen ve studiích zaměřených na GBM (Vítovcová et al. 2023, Zhou et al. 2018). V těchto studiích bylo u buněk GBM prokázáno snížení exprese cyklinu B1 a cyklin-dependentní kinázy 1 (cdk1), ve studii Vítovcová et al. (2023) docházelo i ke zvýšení exprese p21, což naznačuje zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi.

Také naše výsledky potvrzují tento trend působení FLU na markery buněčného cyklu GBM buněk. Působením FLU docházelo ke změně exprese cyklinů a cyklin-dependentních kináz, které regulují buněčný cyklus. Především u buněk U87MG-IDH1-mut docházelo ke snižování relativního množství mRNA cyklinu E1, cyklinu A2, cyklinu B1, cdk1 a cdk2, a to působením obou použitých koncentrací FLU (200 nM a 500 nM). Také relativní množství p21 mRNA, který inhibuje cyklin dependentní kinázy, a tím zastavuje buněčný cyklus (Cho et al. 2023), bylo po ovlivnění buněk U87MG FLU na úrovni mRNA zvyšováno ve všech opakovaných podáních, zatímco u buněk U87MG-IDH1-mut toto zvýšení pozorováno nebylo. Tento efekt na expresi p21 byl také potvrzen na úrovni proteinů, kdy docházelo ke zvýšení jeho exprese u buněk U87MG i U87MG-IDH1-mut. Vliv FLU na další markery buněčného cyklu však na úrovni proteinů potvrzen nebyl.

Vzhledem k tomu, že naše dosud zjištěné výsledky naznačovaly možné zastavení buněčného cyklu a následně vstup buněk do apoptické smrti, byl následně u buněčných linií U87MG a U87MG-IDH1-mut testován vliv opakovaného podání nízkých koncentrací FLU (200 nM a 500 nM, 1x – 3x po 24 h) na aktivitu iniciačních kaspáz 8 a 9 a efektorových kaspáz 3/7. Již v dřívějších studiích byl efekt FLU na zvýšení aktivity těchto kaspáz u buněk GBM i v dalších typech nádorových buněk prokázán (Čáňová et al. 2018, Lin et al. 2019, Oh et al. 2018, Vítovcová et al. 2023, Zhou et al. 2018).

V námi testovaných buňkách U87MG i U87MG-IDH1-mut ovlivněných FLU v obou koncentracích docházelo k nárůstu aktivity iniciačních, a především efektorových kaspáz v závislosti na koncentraci FLU, na době od posledního ovlivnění a na počtu opakování ovlivnění. Obecně k nejvýraznějšímu nárůstu aktivity uvedených kaspáz docházelo v buňkách ovlivněných 3x pomocí FLU, nejvyšší nárůst aktivity kaspáz byl pozorován především ve vyšších časových intervalech, tedy 16 h a 24 h po posledním ovlivnění. Tyto výsledky odpovídaly našemu předchozímu pozorování působení nízkodávkového podávání FLU na viabilitu buněk.

Posledním krokem této práce bylo kvantitativní stanovení obsahu FLU a jeho metabolitu, redukovaného FLU (FLU-R) po opakovaném ovlivnění buněk nízkými koncentracemi FLU (200 nM a 500 nM, 1x – 3x po 24 h). Na základě předchozích výsledků jsme tímto testováním chtěli ověřit hypotézu o zvýšení množství FLU i jeho metabolitu v buňkách v závislosti na opakování podání FLU. Tato hypotéza byla potvrzena, po ovlivnění buněčných linií U87MG a U87MG-IDH1-mut pomocí testovaného léčiva stoupal obsah FLU a především FLU-R v buňkách v závislosti na počtu opakování ovlivnění a také na době od posledního ovlivnění. Tento efekt může přispívat k protinádorovému účinku FLU.

Na základě našich experimentálních výsledků je možné konstatovat, že FLU je vysoce účinné léčivo pro působení na buňky GBM, jehož opakované podání již v nízkých koncentracích se vyznačuje značným účinkem na viabilitu, proliferaci a buněčnou morfolologii buněk GBM. V současné době se předpokládá, že protinádorový mechanismus FLU, jenž dosud nebyl zcela objasněn, je komplexní povahy a působení FLU na buněčný cyklus je jen jedním z možných mechanismů účinku tohoto léčiva. Navzdory tomu nebyla naše práce zaměřena na všechny již známé mechanismy účinku, jako například antimitotickou aktivitu FLU. Do budoucna by bylo vhodné se také zaměřit na vliv nízkých opakovaných dávek FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk GBM.

S ohledem na rozporuplné výsledky působení FLU na markery proliferace a regulace buněčného cyklu by pro další rozvoj studie bylo také vhodné sledovat efekt FLU na buněčné linie GBM při jiných inkubačních intervalech. Dalším důležitým krokem k lepšímu pochopení efektu FLU a jeho opakovaného podání na buněčný cyklus by byla také studie jeho aktivace a inaktivace pomocí fosforylace, jejíž absence je značnou limitací této práce, vzhledem k tomu, že fosforylace určitých proteinů může hrát klíčovou roli v patogenezi nádoru a sledování jejich fosforylovaných forem by mohlo poskytnout přesnější informace o signalizačních drahách v nádoru.

7. ZÁVĚR

Na základě výsledků získaných z námi provedených experimentů lze závěry práce shrnout do následujících bodů:

- FLU inhiboval viabilitu a proliferaci buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut, a to v závislosti na koncentraci FLU, počtu opakování ovlivnění a také době od ovlivnění
- Obě testované buněčné linie vykazovaly vysokou citlivost k ovlivnění FLU a hodnoty IC50 byly pro obě testované linie podobné
- Podání FLU vedlo ke změnám morfologie buněk u obou testovaných linií. Docházelo k viditelnému snížení buněčné proliferace, k zakulacení buněk a vzniku vícejaderných buněk.
- Ovlivněním buněk U87MG a U87MG-IDH1-mut pomocí FLU o koncentraci 200 nM a 500 nM docházelo ke snížení exprese EGFR, STAT3 a c-MYC na úrovni mRNA, naznačující inhibici proliferace buněk. Výraznější snížení exprese těchto markerů bylo možné pozorovat u buněk ovlivněných vyšší testovanou koncentrací.
- FLU zvyšoval expresi CDKN1A (protein p21) a snižoval exprese cyklinů CCNA2, CCNB1 a cyklin-dependentních kináz CDK1 a CDK2 na úrovni mRNA, což naznačovalo možné zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi.
- S výjimkou zvýšení exprese proteinu p21 se však tyto pozorované trendy na úrovni proteinů nepotvrdily.
- Obsah FLU a jeho metabolitu FLU-R stoupal v buňkách v závislosti na době od jejich ovlivnění a na počtu opakování podání léčiva.
- Působením FLU docházelo k aktivaci iniciačních a efektorových kaspáz u buněčných linií U87MG i U87MG-IDH1-mut, což naznačovalo vstup buněk do apoptotické buněčné smrti.

Závěrem je možné konstatovat, že FLU je vysoce účinné léčivo pro působení na buňky GBM, jehož opakované podání již v nízkých koncentracích se vyznačuje značným účinkem na viabilitu, proliferaci a buněčnou morfologii buněk GBM.

8. SEZNAM ZKRATEK

AA – akrylamid
APS – persíran amonný
bisAA – bis-akrylamid
BRAF – gen kódující protein B-Raf
BSA – bovinní sérový albumin
CDK1 – cyklin-dependentní kináza
cDNA – komplementární DNA
CNS – centrální nervový systém
CT – počítačová tomografie
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DEPC voda – voda bez nukleáz
DNA – deoxyribonukleová kyselina
EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru
FBS – fetální bovinní sérum
FLU – flubendazol
FLU-R – redukovaný flubendazol
GBM – glioblastom
GFAP – gliální fibrilární kyselý protein
HCl – kyselina chlorovodíková
IC50 – střední inhibiční koncentrace
IDH1 – isocitrátdehydrogenáza-1
LC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOH 10q – ztráta heterozygotnosti dlouhého raménka chromozomu 10
MGMT – O6-methylguanin-DNA-methyltransferáza
MRI – magnetická rezonance
mRNA – messenger RNA
MTAs – mikrotubule targeting agents
MTOC – centrální organizační centra mikrotubulů
NF1 – gen neurofibromatózy typu 1
PARP-1 – poly-(ADP-riboza)-polymeráza-1
PBS – fosfátový pufr
PDGFR – receptor pro růstový faktor PDGF

PET – pozitronová emisní tomografie
PTEN – homolog fosfatázy a tenzinu
PTX – paklitaxel
PVDF – polyvinylidendifluorid
RNA – ribonukleová kyselina
RT-PCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SD – směrodatná odchylka
SDS – dodecylsírán sodný
STAT3 – převodník signálu a aktivátor transkripce 3
TBS – tris-buffered saline
TEMED – N, N, NN-Tetramethylethylenediamin
TERT – telomerázová reverzní transkriptáza
TMZ – temozolomid
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
WHO – světová zdravotnická organizace

11. POUŽITÁ LITERATURA

- Adam Z, K. M. a V. J. (2010). Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob. In *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén.
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., & von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 829–848. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>
- Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 152, 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>
- Altium. (2023). LC/MS. Získáno 27. duben 2024, z <https://hpst.cz/hmotnostni-spektrometrie/lcms#>
- ATCC. (2022). IDH1 mutant-U-87 Isogenic Cell Line. Získáno 27. duben 2024, z <https://www.atcc.org/products/htb-14ig>
- ATCC. (2024). U-87 MG. Získáno 27. duben 2024, z <https://www.atcc.org/products/htb-14>
- Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0426-4>
- Bansal, Y., & Silakari, O. (2012). The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(21), 6208–6236. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013>
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
- Biogen. (2024). Polymerázová řetězová reakce. Získáno 27. duben 2024, z <http://www.biogen.cz/polymerazova-retezova-reakce>
- Carlsson, S. K., Brothers, S. P., & Wahlestedt, C. (2014). Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Molecular Medicine*, 6(11), 1359–1370. <https://doi.org/10.15252/emmm.201302627>

- Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K., & Mischel, P. S. (2014). Glioblastoma: From molecular pathology to targeted treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130324>
- Cree, I. A. (2011). Cancer Biology. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Roč. 731, s. 1–11). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_1
- Czarnywojtek, A., Borowska, M., Dyrka, K., Van Gool, S., Sawicka-Gutaj, N., Moskal, J., ... Ruchała, M. (2023). Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. *Pharmacology*, 108(5), 423–431. <https://doi.org/10.1159/000531319>
- Čáňová, K., Rozkydalová, L., Vokurková, D., & Rudolf, E. (2018). Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 46, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.025>
- Čáňová, Kristýna, Rozkydalová, L., & Rudolf, E. (2017). Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. *Acta medica (Hradec Kralove)*, 60(1), 5–11. <https://doi.org/10.14712/18059694.2017.44>
- Čermák, V., Dostál, V., Jelínek, M., Libusová, L., Kovář, J., Rösel, D., & Brábek, J. (2020). Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *European journal of cell biology*, 99(4), 151075. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151075>
- Davis, M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5), 1–8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>
- DeCordova, S., Shastri, A., Tsolaki, A. G., Yasmin, H., Klein, L., Singh, S. K., & Kishore, U. (2020). Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Frontiers in immunology*, 11, 1402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01402>
- Ferry, I., Kuzan-Fischer, C. M., Ernoult, E., & Rutka, J. T. (2018). Targeting Cell Cycle Proteins in Brain Cancer. In *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy: Second Edition* (s. 271–290). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812100-9.00019-X>

- Frasco, D. (2019). Determination of total protein concentration. Získáno 27. duben 2024, z <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/AN53072-determination-total-protein-concentration-bca-assay.pdf>
- Fritah, S., & Niclou, S. P. (2020). Dual blockade of STAT3 and EGFR: a key to unlock drug resistance in glioblastoma? *Neuro-Oncology*, *22*(4), 440–441. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa039>
- Fu, W., Hou, X., Dong, L., & Hou, W. (2023). Roles of STAT3 in the pathogenesis and treatment of glioblastoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1098482>
- G-Biosciences. (2016). Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay. Získáno 27. duben 2024, z https://cdn.gbiosciences.com/pdfs/protocol/786-571_protocol.pdf
- Gee, T. S., Ghani, A. R. I., Idris, B., & Awang, M. S. (2012). Case report: a rare case of pediatric conus medularis glioblastoma multiforme. *The Medical journal of Malaysia*, *67*(4), 438–441.
- Goodson, H. V., & Jonasson, E. M. (2018). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022608>
- Gottwaldová, J. (2017). Elektroforetické techniky. Získáno 27. duben 2024, z https://is.muni.cz/el/med/jaro2017/BLIT0222p/um/Elektroforeticke_techiky.pdf
- Gousias, K., Theocharous, T., & Simon, M. (2022). Mechanisms of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma. *Biomedicines*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030564>
- Grochans, S., Cybulska, A. M., Simińska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers*, *14*(10), 2412. <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. In *Cell* (Roč. 100).
- Hanušová, V., Skalova, L., Kralova, V., & Matouskova, P. (2015). Potential Anti-cancer Drugs Commonly Used for Other Indications. *Current Cancer Drug Targets*, *15*(1), 35–52. <https://doi.org/10.2174/1568009615666141229152812>

- Hou, Z.-J., Luo, X., Zhang, W., Peng, F., Cui, B., Wu, S.-J., ... Liu, Q. (2015). Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*, 6(8), 6326–6340. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3436>
- Chen, C., Ding, Y., Liu, H., Sun, M., Wang, H., & Wu, D. (2022a). Flubendazole Plays an Important Anti-Tumor Role in Different Types of Cancers. *International journal of molecular sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010519>
- Chen, L., Ma, J., Zou, Z., Liu, H., Liu, C., Gong, S., ... Liang, G. (2022b). Clinical characteristics and prognosis of patients with glioblastoma: A review of survival analysis of 1674 patients based on SEER database. *Medicine*, 101(47), e32042. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000032042>
- Cho, Y., Hwang, J. W., Park, N.-J., Moon, J., Ali, K. H., Seo, Y. H., ... Kim, Y. K. (2023). SPC-180002, a SIRT1/3 dual inhibitor, impairs mitochondrial function and redox homeostasis and represents an antitumor activity. *Free radical biology & medicine*, 208, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.07.033>
- Chua, J., Nafziger, E., & Leung, D. (2019). Evidence-Based Practice: Temozolomide Beyond Glioblastoma. *Current Oncology Reports*, 21(4). <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0783-5>
- Jamasbi, E., Hamelian, M., Hossain, M. A., & Varmira, K. (2022). The cell cycle, cancer development and therapy. *Molecular Biology Reports*, 49(11), 10875–10883. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07788-1>
- Jiapaer, S., Furuta, T., Tanaka, S., Kitabayashi, T., & Nakada, M. (2018). Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 58(10), 405–421. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>
- Katsetos, C. D., Dráber, P., & Kavallaris, M. (2011). *Targeting III-Tubulin in Glioblastoma Multiforme: From Cell Biology and Histopathology to Cancer Therapeutics*.
- Katsetos, C. D., Dráberová, E., Legido, A., & Dráber, P. (2009). Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. II. δ -tubulin. *Journal of Cellular Physiology*, 221(3), 514–520. <https://doi.org/10.1002/jcp.21884>
- Katsetos, C. D., Reginato, M. J., Baas, P. W., D'Agostino, L., Legido, A., Tuszyński, J. A., ... Dráber, P. (2015). Emerging microtubule targets in glioma therapy. *Seminars in Pediatric Neurology*, 22(1), 49–72. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2015.03.009>

- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., ... Fasoulakis, Z. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticanres.14622>
- Králová, V., Hanušová, V., Rudolf, E., Čáňová, K., & Skálová, L. (2016). Flubendazole induces mitotic catastrophe and senescence in colon cancer cells in vitro. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 68(2), 208–218. <https://doi.org/10.1111/jphp.12503>
- Králová, V., Hanušová, V., Staňková, P., Knoppová, K., Čáňová, K., & Skálová, L. (2013). Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, 24(9), 911–919. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283648c69>
- Kříž, J. (2023). Kapalinové chromatografy s hmotnostními detektory (LC-MS). Získáno 27. duben 2024, z <https://uapv.vscht.cz/veda-a-vyzkum/22026/22130>
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). *Western Blotting: An Introduction*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5
- Labguide. (2022a). Real-time PCR. Získáno 27. duben 2024, z <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
- Labguide. (2022b). Western blot. Získáno 27. duben 2024, z <https://labguide.cz/metody/western-blot/>
- Lin, S., Yang, L., Yao, Y., Xu, L., Xiang, Y., Zhao, H., ... Zhao, C. (2019). Flubendazole demonstrates valid antitumor effects by inhibiting STAT3 and activating autophagy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1303-z>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., ... Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Luo, C., Song, K., Wu, S., Hameed, N. U. F., Kudulaiti, N., Xu, H., ... Wu, J. S. (2021). The prognosis of glioblastoma: a large, multifactorial study. *British Journal of Neurosurgery*, 35(5), 555–561. <https://doi.org/10.1080/02688697.2021.1907306>

- Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., & Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1), 102. <https://doi.org/10.3390/ijms17010102>
- MCE. (2022). WST-1. Získáno 27. duben 2024, z https://www.medchemexpress.com/wst-1.html?utm_source=google&utm_medium=CPC&utm_campaign=Europe&utm_term=HY-136976&utm_content=WST-1%20assay&gclid=CjwKCAiA75itBhA6EiwAkho9e2xIe8za3yp-NpV-recYohbWmcy_YWECpGhWXNaBVS2r8hGz9PLX8BoC-9QQAvD_BwE
- McKinnon, C., Nandhabalan, M., Murray, S. A., & Plaha, P. (2021). Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ*, n1560. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1560>
- Medikonda, R., Dunn, G., Rahman, M., Fecci, P., & Lim, M. (2021). A review of glioblastoma immunotherapy. *Journal of Neuro-Oncology*, *151*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03448-1>
- Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical Cancer Research*, *18*(20), 5546–5553. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>
- MUNI. (2013). Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS). Získáno 27. duben 2024, z https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/LCMS_spec_metody.pdf
- Ockenga, W. (2022). Fázový kontrast. Získáno 27. duben 2024, z <https://www.baria.cz/rsc6186781-fazovy-kontrast>
- Oh, E., Kim, Y.-J., An, H., Sung, D., Cho, T.-M., Farrand, L., ... Kim, J. Y. (2018). Flubendazole elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition. *International journal of cancer*, *143*(8), 1978–1993. <https://doi.org/10.1002/ijc.31585>
- Ortiz, R., Perazzoli, G., Cabeza, L., Jiménez-Luna, C., Luque, R., Prados, J., & Melguizo, C. (2020). Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Current Neuropharmacology*, *19*(4), 513–537. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200626204005>

- Osman, A., Afify, S. M., Hassan, G., Fu, X., Seno, A., & Seno, M. (2020). Revisiting cancer stem cells as the origin of cancer-associated cells in the tumor microenvironment: A hypothetical view from the potential of iPSCs. *Cancers*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/cancers12040879>
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro-Oncology*, *16*(7), 896–913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
- Paolillo, M., Boselli, C., & Schinelli, S. (2018). Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Brain Sciences*, *8*(1), 15. <https://doi.org/10.3390/brainsci8010015>
- Peters, J. M., & Gonzalez, F. J. (2018). The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, *165*(2), 272–276. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy184>
- Promega. (2023). Caspase-Glo® 3/7 Assay System. Ziskáno 27. duben 2024, z https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?catNum=G8090
- Ren, L. wen, Li, W., Zheng, X. jin, Liu, J. yi, Yang, Y. hui, Li, S., ... Du, G. hua. (2022). Benzimidazoles induce concurrent apoptosis and pyroptosis of human glioblastoma cells via arresting cell cycle. *Acta Pharmacologica Sinica*, *43*(1), 194–208. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00752-y>
- Sasmita, A. O., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2018). Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, *14*(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/ajco.12756>
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2009). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Shukla, G., Alexander, G. S., Bakas, S., Nikam, R., Talekar, K., Palmer, J. D., & Shi, W. (2017). Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: A review. *Chinese Clinical Oncology*, *6*(4). <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.28>
- SIGMA ALDRICH. (2024). Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. Ziskáno 27. duben 2024, z <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/cell-culture->

and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-reagent-wst-1

- Slade, D. (2020). PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes & Development*, 34(5–6), 360–394. <https://doi.org/10.1101/gad.334516.119>
- Son, D. S., Lee, E. S., & Adunyah, S. E. (2020). The antitumor potentials of benzimidazole anthelmintics as repurposing drugs. *Immune Network*, 20(4), 1–20. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e29>
- Stoyanov, G. S., Lyutfi, E., Georgieva, R., Georgiev, R., Dzhankov, D. L., Petkova, L., ... Ghenev, P. (2022). Reclassification of Glioblastoma Multiforme According to the 2021 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: A Single Institution Report and Practical Significance. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.21822>
- Šmardová, J., & Koptíková, J. (2016). Two Approaches to Cancer Development. *Klinická onkologie*, 29(4), 259–266. <https://doi.org/10.14735/amko2016259>
- TAMIMI, A. F., & JUWEID, M. (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In *Glioblastoma* (s. 143–153). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8>
- Taylor, O. G., Brzozowski, J. S., & Skelding, K. A. (2019). Glioblastoma multiforme: An overview of emerging therapeutic targets. *Frontiers in Oncology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00963>
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>
- ThermoFisher. (2024). The Basics: RT-PCR. Získáno 27. duben 2024, z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/ambion-tech-support/rt-pcr-analysis/general-articles/rt--pcr-the-basics.html>
- Tiefenbach, J., Toljan, K., A. Khawam, E., & C. Viguera, A. (2023). PRESENTING SYMPTOMS OF RELIGIOUS DELUSIONS AND HALLUCINATIONS IN TEMPORAL LOBE GLIOBLASTOMA. *PSYCHIATRIA DANUBINA*, 35(3), 451–453. <https://doi.org/10.24869/psyd.2023.451>

- Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme – An overview. *Wspolczesna Onkologia*, Roč. 18, s. 307–312. Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
- Verdugo, E., Puerto, I., & Medina, M. Á. (2022). An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment. *Cancer Communications*, 42(11), 1083–1111. <https://doi.org/10.1002/cac2.12361>
- VFU. (2011). PCR (polymerázová řetězová reakce). Získáno 27. duben 2024, z https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
- Vítovcová, B. (2023). *Studium vlivu flubendazolu na buňky glioblastoma multiforme in vitro a in vivo*. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav lékařské biologie a genetiky, Hradec Králové.
- Vítovcová, B., Skarková, V., Havelek, R., Soukup, J., Pande, A., Caltová, K., & Rudolf, E. (2023). Flubendazole exhibits anti-glioblastoma effect by inhibiting STAT3 and promoting cell cycle arrest. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33047-9>
- Vitovcova, B., Skarkova, V., Rudolf, K., & Rudolf, E. (2020). Biology of glioblastoma multiforme—exploration of mitotic catastrophe as a potential treatment modality. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21155324>
- Wang, G., & Wang, W. (2022). Advanced Cell Therapies for Glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.904133>
- Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 51(6), 2647–2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>
- Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J. C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., ... Wick, W. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology*, 18(6), e315–e329. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30194-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30194-8)

- Wen, P. Y., Weller, M., Lee, E. Q., Alexander, B. M., Barnholtz-Sloan, J. S., Barthel, F. P., ... van den Bent, M. J. (2020). Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology*, 22(8), 1073–1113. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa106>
- Wilson, T. A., Karajannis, M. A., & Harter, D. H. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International*, 5(Supplement). <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. In *Handbook of Clinical Neurology* (Roč. 134, s. 381–397). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Xie, X., Cai, X., Tang, Y., Jiang, C., Zhou, F., Yang, L., ... Huang, X. (2021). Flubendazole Elicits Antitumor Effects by Inhibiting STAT3 and Activating Autophagy in Non-small Cell Lung Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 680600. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.680600>
- Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Yin, L.-M., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y.-D., & Yang, Y.-Q. (2013). Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *International Journal of Medical Sciences*, 10(1), 68–72. <https://doi.org/10.7150/ijms.5256>
- Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 246(16), 1791–1801. <https://doi.org/10.1177/15353702211005390>
- Ying, Z. (2022). Co je LC-MS? Získáno 27. duben 2024, z <https://antiteck.com/cs/co-je-lc-ms/>
- Zhou, X., Liu, J., Zhang, J., Wei, Y., & Li, H. (2018). Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis. *Cell Death Discovery*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-017-0017-2>
- Zhou, X., Zou, L., Chen, W., Yang, T., Luo, J., Wu, K., ... Mao, X. (2021). Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, elicits valid antitumor effects by targeting P53 and

- promoting ferroptosis in castration-resistant prostate cancer. *Pharmacological Research*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105305>
- Zottel, A., Jovčevska, I., Šamec, N., & Komel, R. (2021). Cytoskeletal proteins as glioblastoma biomarkers and targets for therapy: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103283>