

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**Vliv flubendazolu na proliferaci prsních buněk a aktivitu
acenaftenoldehydrogenas**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Mgr. Klára Štěřbová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne 10. 8. 2011

.....

Mgr. Klára Štěrbová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D., Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D., Doc. RNDr. Petru Klemmerovi, CSc., Mgr. Veronice Hanušové a Aleně Pakostové za jejich ochotu, cenné rady a významnou pomoc při získávání informací a dat pro tuto rigorózní práci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta: Mgr. Klára Štěřbová

Titul, jméno, příjmení školitele: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Vliv flubendazolu na proliferaci prsních buněk a aktivitu acenaftenoldehydrogenas

V této práci je sledován vliv flubendazolu (FLU) na proliferaci buněk prsních nádorových linií MCF-7 a MDA-MB-231 a prsní nenádorové linie MCF-10A. FLU je benzimidazolové anthelmintikum široce využívané k terapii cestodóz a nematodóz. Mechanismus účinku FLU proti hlísticím a tasemnicím spočívá v narušení jejich cytoplazmatického systému mikrotubulů. V roce 2010 bylo zjištěno, že FLU narušuje také mikrotubuly nádorových buněk a významně inhibuje proliferaci leukemických a myelomových buněk. Hlavním cílem předložené práce bylo zjistit, zda FLU také inhibuje proliferaci prsních nádorových buněk. Dalším cílem práce bylo zjistit, zda FLU zasahuje do syntézy estradiolu, protože tento aktivní estrogen hraje významnou roli v rozvoji nádoru prsu. Proliferace prsních nádorových i nenádorových buněk byla testována dvěma testy životnosti (MTT a NRU) a kontinuálním sledováním impedance pomocí xCelligence. Inhibiční účinek FLU na enzymy přeměňující estron na estradiol byl zjišťován nepřímo pomocí stanovení tzv. acenaftenoldehydrogenas (AND). Výsledky ukázaly, že antiproliferační efekt FLU na různé prsní buněčné linie je rozdílný. Inhibice proliferace v buněčné linii MCF-7 nedosáhla 50%, kdežto u buněk linií MDA-MB-231 a MCF-10A klesla životnost buněk přibližně o 60% (MCF-10A) a 70% (MDA-MB-231) při použité koncentraci 10 μ M. Byl prokázán významný inhibiční vliv FLU na aktivitu AND ve všech testovaných prsních buňkách (MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A, EST).

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Title, Name, Surname of candidate: Mgr. Klára Štěrbová

Title, Name, Surname of tutor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of a thesis: Flubendazole influence on breast cells proliferation and activity of acenaphthenol dehydrogenases

This thesis investigates the effect of flubendazole (FLU) on the proliferation of breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and nonmalignant breast line MCF-10A. The anthelmintic drug FLU is widely used for treatment cestodoses and nematodoses. The mechanism of FLU's effect against nematodes and cestodes is disruption of the cytoplasmic system of microtubules. In 2010 it was found out that FLU disrupts the microtubules of tumor cells and significantly inhibits the proliferation of leukemia and myeloma cells. The main aim of this paper was to determine whether FLU also inhibits proliferation of breast cancer cells. Another objective was to determine whether FLU interferes with the synthesis of estradiol, because this active estrogen plays an important role in the development of breast cancer. The proliferation of breast cancer cells and nonmalignant cells was usually tested by two viability tests (MTT and NRU) and by continuous monitoring impedance using xCelligence. The inhibitory effect of FLU on enzymes which convert estrone to estradiol was investigated indirectly by determining acenaphthenoldehydrogenases (AND). The results showed that the antiproliferative effect of FLU on various breast cell lines is different. Inhibition of proliferation in MCF-7 cell line didn't reach 50%, whereas in cell lines MDA-MB-231 and MCF-10A cells viability decreased by about 60% (MCF-10A) and 70% (MDA-MB-231) used at concentration of 10 μ M. A significant inhibitory effect FLU on the activity AND was proved in all tested breast cells MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A, EST).

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	KARCINOM PRSU	9
2.1.1	ROLE ESTROGENŮ V ROZVOJI KARCINOMU PRSU.....	9
2.2	TERAPIE KARCINOMU PRSU.....	10
2.2.1	HORMONÁLNÍ TERAPIE KARCINOMU PRSU.....	10
2.2.2	CÍLENÁ LÉČBA KARCINOMU PRSU.....	11
2.2.3	CHEMOTERAPIE KARCINOMU PRSU.....	12
2.3	TUBULIN	13
2.4	BENZIMIDAZOLOVÁ ANTHELMINTIKA.....	14
2.4.1	BENZIMIDAZOLY JAKO POTENCIÁLNÍ PROTINÁDOROVÉ LÁTKY	15
2.4.2	FLUBENDAZOL	16
2.5	REDUKTASY KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN	18
2.5.1	ALDOKETOREDUKTASY V PRSNÍ TKÁNI.....	19
2.6	BUNĚČNÉ KULTURY	22
3	CÍL PRÁCE.....	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	26
4.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE	26
4.2.1	POMŮCKY	26
4.2.2	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	27
4.2.3	METODIKA PRÁCE	28
4.2.4	TEST CYTOTOXICITY – NEUTRAL RED UPTAKE TEST	28
4.2.5	TEST CYTOTOXICITY – MTT.....	29

4.2.6	STANOVENÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE METODOU RTCA	31
4.2.7	STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN	32
4.2.8	STANOVENÍ AKTIVITY AND.....	33
5	VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	36
5.1	STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN.....	36
5.2	ANTIPROLIFERATIVNÍ ÚČINEK FLU.....	38
5.2.1	NEUTRAL RED UPTAKE TEST	41
5.2.2	MTT TEST	46
5.2.3	RTCA (XCELLIGENCE) TEST	53
5.3	VLIV FLU NA AKTIVITU AND.....	57
6	DISKUZE	61
7	ZÁVĚR.....	64
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	65
9	POUŽITÉ ZDROJE.....	66

1 ÚVOD

Společně s prodlužujícím se věkem života a stárnutím populace dochází k nárůstu onkologických onemocnění. Mezi rokem 1975 a 2000 došlo přibližně ke zdvojnásobení celosvětové incidence všech karcinomů. Karcinom prsu je nejčastější malignitou u ženy a v posledních deseti letech se jeho incidence zvýšila o 33 % (Strnad a Daneš, 2001).

Pokrok v léčbě rakoviny je brzděn rozvojem rezistentních nádorů. Ačkoli nové směry léčby, např. inhibitory tyrosinkinasových receptorů, přinesli nižší toxicitu při prokázaném chemoterapeutickém účinku, v popředí systémové léčby stále zůstává využití antimetabolitů a látek zasahujících na úrovni DNA (Lio et al, 2007). U hormon-dependentních nádorů lze využít také hormonální léčbu. Zajímavým cílem v boji proti rakovině je zásah do systému mikrotubulů. Hojně využívanými látkami s tímto mechanismem účinku jsou vinka alkaloidy a taxany (Pojarová et al, 2007). Protože narušení mikrotubulů patří do mechanismu působení i některých anthelmintik, je v posledních letech intenzivně studováno možné cytostatické působení těchto léčiv schválených a využívaných k léčbě helmintóz.

Již u některých jiných léčiv, schválených pro zcela jiné indikace, byla dodatečně rozpoznána aktivita proti maligním buňkám. Například pacienti s cukrovkou léčení metforminem měli snížené riziko rozvoje rakoviny slinivky ve srovnání s diabetiky, kteří toto léčivo neužívali. Dalším příkladem je objevená antimyelomová aktivita thalidomidu. V této práci je sledována potenciální cytostatická aktivita flubendazolu, který patří mezi benzimidazoly s anthelmintickou aktivitou (Spagnuolo et al, 2010) a jeho možný zásah do syntézy estrogenů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 KARCINOM PRSU

Karcinom prsu je nejčastější neoplázií u žen v rozvinutých zemích. Nejvyšší incidence je mezi americkými běloškami. Nejnižší incidence je v zemích jihovýchodní Asie a v Japonsku (Strnad a Daneš, 2001). Ročně se v ČR zjišťuje kolem 6500 nových případů a mortalita dosahuje téměř 1700 žen (ÚZIS ČR, 2011). Příčina karcinomu prsu není známa, v podstatě se však jedná o genetické onemocnění vzniklé mutací různých tumor-supresorových genů a protoonkogenů. V současné době není možná primární prevence, jsou ovšem dostupné možnosti prevence sekundární – časná diagnóza nádorů prsu, tzn. samovyšetřování, dispenzarizace rizikových skupin žen, mamografie a mamografický screening (Strnad a Daneš, 2001).

2.1.1 ROLE ESTROGENŮ V ROZVOJI KARCINOMU PRSU

Estradiol je nejučinnější steroidní mitogen v prsní tkáni. Účinek estradiolu v buňce je mediován prostřednictvím estrogenového receptoru (ER), který účinkuje jako ligand-dependentní transkripční faktor. Estrogeny i antiestrogeny svou vazbou s ER řídí úroveň přepisu genů, které se podílejí na aktivaci progresu G-1 fáze buňky. Estrogeny aktivují gen estrogenového receptoru, geny produkující receptor epidermálního růstového faktoru a onkogeny c-myc, c-ras, c-fos. Stimulují další růstové faktory: epidermální (EGF), transformující (TGF), destičkový (PDGF), insulínu podobný (IGF-1) a expresi onkogenu her2/neu. Estrogeny též stimulují aktivitu katepsinu D. Katepsin D je aktivován nejen estrogeny, ale i růstovými faktory a zvyšuje riziko šíření a metastazování nádoru (Strnad, Daneš, 2001).

První publikací, která referovala o hormonální závislosti karcinomu prsu, byla práce Beatsona v roce 1896, který zjistil, že některé ženy v premenopauze po odstranění ovarií reagovaly remisí nádoru prsu (Strnad a Daneš, 2001). Jednou z cest podílejících se na tvorbě aktivních estrogenů v nádorové prsní tkáni je interkonverze neaktivního estronu na aktivní 17 β -estradiol enzymy z podrodiny aldo-ketoreduktas 1C (AKR1C). V prsní tkáni je přítomna isoforma AKR1C3 a zdá se, že její inhibice by mohla být novým terapeutickým cílem v léčbě hormon-dependentních forem karcinomu prsu (Bauman et al, 2004).

2.2 TERAPIE KARCINOMU PRSU

Existují tři přístupy léčby, které se navzájem kombinují – chirurgický, radiační a systémový. Systémová terapie zahrnuje léčbu hormonální, cílenou a chemickou (Abrahámová et al, 2009).

2.2.1 HORMONÁLNÍ TERAPIE KARCINOMU PRSU

Estrogen působí jako endokrinní růstový faktor přibližně u dvou třetin karcinomů prsu a téměř u 75 % postmenopauzálních žen. V minulosti byla u premenopauzálních žen prováděna chirurgická nebo radiační léčba k vyřazení ovariální funkce, zatímco u postmenopauzálních žen byla prováděna hypofyzektomie nebo adrenalectomie; tyto postupy však byly spojeny se značnou morbiditou. V padesátých až sedmdesátých letech 20. století se navíc používal diethylstilbestrol, většinou jako antigen podávaný ve vysokých dávkách v léčbě postmenopauzálních žen (Strnad a Daneš, 2001).

U hormon-dependentních nádorů prsu je možná hormonální léčba. Závislost na hormonech je dána přítomností hormonálních receptorů uvnitř nádorové buňky. Pokud hormon pronikne do buňky a spojí se s receptorem, může tento komplex nastartovat změny vedoucí k růstu a dělení nádorových buněk. Při hormonální léčbě bráníme tvorbě hormonů, které podporují růst nádoru (antagonisté gonadoliberinu – goserelin, leuprorelin; inhibitory aromatasy – anastrozol, exemestan, letrozol; gestageny - medroxyprogesteron acetát, megestrol acetát) nebo bráníme účinkům existujících hormonů na nádorovou buňku (antiestrogeny – fulvestrant, tamoxifen, toremifen) (ČLS JEP, 2009). Odpověď na hormonální léčbu je odhadována podle výsledků studie Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group takto (Strnad, Daneš, 2001):

75 % u nádorů ER+/PR+ (estrogen-pozitivní/ progesteron-pozitivní)

27 % u nádorů ER+/PR-(estrogen-pozitivní/ progesteron-negativní)

46 % u nádorů ER-/PR+

11 % u nádorů ER-/PR-

Hormonální léčba má méně nežádoucích účinků než chemoterapie a je proto lépe snášena. Nádory s pozitivitou hormonálních receptorů mají lepší prognózu i méně časté postižení regionálních lymfatických uzlin (ČLS JEP, 2009).

2.2.2 CÍLENÁ LÉČBA KARCINOMU PRSU

Cílená léčba blokuje nitrobuněčné pochody aberantně aktivované u nádorových buněk. Na rozdíl od necílené (konvenční) chemoterapie, která inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu buněk nespécifickým zásahem do replikace, transkripce, translace a průběhu mitózy, působí cílená terapeutika poměrně specificky na konkrétní signální proteiny či signální dráhy (Klener, 2011). Rozpoznání receptoru 2 pro lidský epidermální růstový faktor (HER2) jako cílové molekuly u karcinomu prsu vedlo k rozvoji cílené léčby namířené proti HER2. Jako první látka byl v roce 1998 schválen trastuzumab. Tato humanizovaná monoklonální protilátka je namířena proti extracelulární doméně receptoru ERBB/HER2/NEU. Po vazbě na cílový receptor blokuje tvorbu aktivovaných signalizačních kaskád, čímž je bržděna proliferace, invazivita, apoptóza a je potlačena tvorba angiogenních faktorů. Dalším, teprve nedávno dostupným lékem (v roce 2007), je lapatinib, což je malá molekula působící jako inhibitor tyrosinkinasy (Surabhi a Perez, 2007). Bylo prokázáno, že u HER-2 pozitivního karcinomu prsu dochází ke zvýšené expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který je důležitým mediátorem novotvorby cév (angiogeneze), která má pro růst a metastazování nádoru zásadní význam. Dosud bylo popsáno více než 20 faktorů, které se podílejí na stimulaci nebo inhibici angiogeneze. VEGF je zodpovědný za stimulaci migrace, proliferaci a přežívání endoteliálních buněk. Mezi potenciální mechanismy anti-VEGF léčby patří snížení počtu cév zásobujících nádor, což způsobí odumření alespoň části nádorových buněk a snížení počtu cirkulujících endoteliálních a progenitorových buněk v nádoru, což může redukovat metastatický rozsev. Tyto poznatky posilují důvody pro kombinování cílených léků proti HER-2 s monoklonální protilátkou proti VEGF bevacizumabem. Kombinace bevacizumabu a taxanů v léčbě metastatických onemocnění vede k signifikantnímu prodloužení přežití bez známek onemocnění. V současné době probíhají klinická hodnocení, která mají za cíl definovat vhodnost adjuvantní anti-VEGF léčby (Sinclair, 2009).

2.2.3 CHEMOTERAPIE KARCINOMU PRSU

Chemoterapie se u karcinomu prsu podává buď u lokalizovaných forem jako adjuvantní, popř. neoadjuvantní léčba (s kurativním záměrem), nebo u generalizovaných forem onemocnění jako paliativní léčba (Klener, 1996).

V současné době existuje nejméně 40 cytostatik s prokázanou účinností v léčbě karcinomu prsu. Procento úspěšnosti jednotlivých cytostatik použitých samostatně se pohybuje mezi 20 - 65% a jejich účinnost je značně zvýšena při jejich kombinování (Abrahámová et al., 2009). Početná skupina cytostatik působí na základě strukturální podobnosti s přirozenými metabolity, např. analoga kyseliny listové (metotrexát) nebo analoga pyrimidinů (5-fluorouracil). Jedním z nejčastějších mechanismů účinku cytostatik je alkylace a v léčbě rakoviny prsu se uplatňuje především cyklofosamid a platinové deriváty. Interkalačním mechanismem působí antracyklinová antibiotika a deriváty antracenu (doxorubicin, epirubicin, mitoxantron) (Abrahámová et al., 2000). Mezi cytostatika zastávající buněčný cyklus zásahem do systému mikrotubulů patří vinka alkaloidy a taxany. Vinka alkaloidy (vinkristin, vinblastin, vinorelbin) se pevně váží na obě podjednotky mikrotubulů (α - a β - tubulin) během S-fáze buněčného cyklu a vyvolávají jejich depolymerizaci a rozpuštění mitotického vřeténka vedoucí k zástavě mitózy. Vinka alkaloidy ovlivňují i mikrotubuly, které umožňují chemotaxi, migraci, intracelulární transport a pohyb organel (Adam et al, 2011). Urychlení tvorby mikrotubulů má podobné funkční důsledky, jako když se mikrotubuly nevytvářejí. Takto působí taxany (paclitaxel, docetaxel) (Abrahámová et al., 2000). Taxany se váží na odlišném vazebném místě mikrotubulů než vinka alkaloidy a inhibují depolymerizaci mikrotubulů, která normálně v buňce nastává na konci buněčného dělení. Buňky s nerozloženými tubuly se přestávají dělit a růst (Adam et al, 2011).

2.3 TUBULIN

Tubulin je protein o molekulové hmotnosti cca 100 kDa, skládá se ze dvou podobných globulárních podjednotek α - a β - tubulinu. Polypeptidové řetězce α - a β -tubulinu jsou v heterodimeru vázány nekovalentními silami s disociační konstantou $K_d = 8 \times 10^{-7}$ (Nečas et al, 1991). α - a β - tubulin vykazuje 40% shodu v aminokyselinové sekvenci a jejich exprese je tkáňově specifická (Nogales et al, 1998). U savců rozeznáváme 6 isotypů α -tubulinu označených $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3/7$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 8$ a 8 isotypů β -tubulinu pojmenovaných jako βI , βII , βIII , βIVa , βIVb , βV , βVI , a βVII . α - i β -tubulin podléhají posttranslačním změnám zahrnující tyrosinaci (popř. detyrosinaci) a acetylaci α -tubulinu, fosforylaci βIII -tubulinu a polyglycylyaci α - i β -tubulinu (Banerjee, 2002). Struktura tubulinového monomeru obsahuje tři funkční domény: N-konec uspořádaný do Rossmanova záhybu, který je typickým vazebným místem pro nukleotidy, prostřední doménu obsahující vazebné místo pro Taxol a C-konec představující pravděpodobný prostor pro vazbu proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAP) a motorových proteinů (Nogales et al, 1998). Tubulin je základní podjednotkou mikrotubulů a patří mezi vysoce konzervativní proteiny. Mikrotubuly tvoří mitotické vřeténko, udržují tvar buňky, organizují umístění organel, zajišťují intracelulární dopravu, podílejí se na extracelulární sekreci, přenosu nervových vzruchů, axonálním toku a pohyblivosti buněk (Hait et al, 2007). Tyto funkce představují mikrotubuly jako vysoce efektivní cíl v léčbě rakoviny, o čemž svědčí různorodost mikrotubulinových inhibitorů (Grogan et al, 2008). Antimitotické látky interagující s tubulinem se dělí na látky rozvolňující strukturu mikrotubulů (v onkologické praxi se využívají např. podofylotoxin, vinblastin, vincristin), inhibitory polymerizace tubulinu (maytansin, rhizoxin) a látky stabilizující mikrotubuly (významná cytostatika paclitaxel, docetaxel) (Holý, 2004). Mezi mikrotubulární toxiny patří také některé syntetické deriváty benzimidazolu, které reverzibilně inhibují polymerizaci tubulinu (Nečas et al, 1991).

Látky stabilizující mikrotubuly jako jsou taxany (paclitaxel, docetaxel) se staly široce uznávanými účinnými chemoterapeutiky v léčbě metastatického karcinomu prsu a časných stádiích tohoto onemocnění z hlediska celkového přežití i bezpříznakového období. Nicméně u pacientů léčených taxany studie poukazují na relativně krátké období do progresu onemocnění, tudíž je nezbytné hledat další možnosti terapie a nových léčiv (Grogan et al, 2008).

2.4 BENZIMIDAZOLOVÁ ANTHELMINTIKA

Benzimidazolová anthelmintika jsou široce využívaná léčiva ve veterinární a humánní medicíně, vykazují vysokou účinnost proti řadě parazitů, jako jsou hlístice, motolice a tasemnice (Robinson et al, 2004). Benzimidazoly (BZM) tvoří rozsáhlou skupinu chemických sloučenin odvozených od thiabendazolu (TBZ), prvního širokospektrého anthelmintika. Od této látky byl později odvozen např. mebendazol (MBZ) (1973), jeho fluorovaný derivát FLU (1976) a mnoho dalších strukturně podobných léčiv nebo proléčiv s nižší toxicitou pro savce a širším spektrem účinku proti helmintům (Köhler, 2001; WHO/OIE, 2003). Účinnost TBZ proti hlísticím poprvé popsal ve své práci Brown et al, 1961 (Kates et al, 1971). Studování mechanismu účinku poukázalo na ultrastrukturální změny jak ve střevních buňkách nematod, tak v tegumentálních buňkách cestod (Köhler, 2001). BZM působí na úrovni inhibice mikrotubulinového systému, váží se přímo na β -tubulin hlístic a znemožňují tak procesy závislé na funkci mikrotubulů (Robinson et al, 2004). Vazbou na β -tubulin dochází k úbytku mikrotubulů a redistribuci sekrečních vezikul v cytoplazmě. Porušení transportu sekrečních granulí vede k jejich hromadění a možnosti uvolnění trávicích enzymů v nich obsažených do cytoplazmy střevní buňky (Jasmer et al, 2000). Společným rysem chemické struktury BZM, důležitým pro jejich biologickou aktivitu, je zřejmě aminokarboalkoxylová skupina (Nečas et al, 1991). Různě substituované benzimidazolové jádro je farmaceuticky výhodnou strukturou, terapeutické využití nachází jako antihistaminika, antiulcerotika, analgetika, látky s antiproliferativními, antioxidačními, antibakteriálními a potenciálně protinádorovými vlastnostmi. Biologický význam těchto heteroaromatických skupin spočívá také v jejich podobnosti s mnoha biologickými strukturami, např. s guaninovými zbytky. Albendazol (ABZ), zavedený do praxe v roce 1975, je nyní intenzivně studován pro potenciální cytostatickou aktivitu (Pourgholami et al, 2010a). V poslední době se zjistilo, že i jiné benzimidazolové deriváty selektivně inhibují růst endoteliálních buněk a potlačují angiogenezi jak *in vitro*, tak *in vivo* (Thimmegowda et al, 2008)

2.4.1 BENZIMIDAZOLY JAKO POTENCIÁLNÍ PROTINÁDOROVÉ LÁTKY

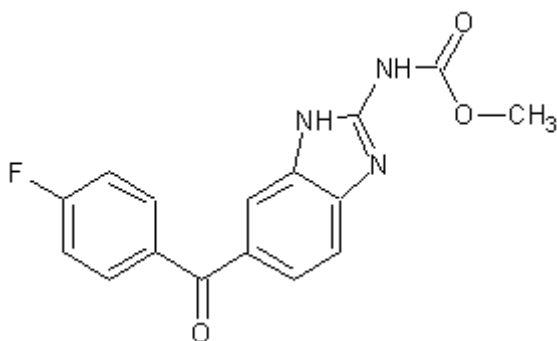
BZM tvoří chemickou skupinu využívanou jako hlavní strukturní prvek mnoha léčiv, např. látek s antifungální, anthelmintickou a antiulcerózní aktivitou. U několika látek z benzimidazolové rodiny anthelmintik byla prokázána indukce buněčné smrti v řadě solidních nádorů. Benomyl a jeho metabolit karbendazim patří mezi sloučeniny s benzimidazolovým jádrem, využívající se jako fungicidní látky (Laryea et al, 2010). Karbendazim (FB642, chemicky methyl-2-benzimidazolkarbamát) indukuje apoptózu nádorových buněk. V testech *in vitro* byla prokázána potenciální protinádorová aktivita proti myším buňkám melanomu B16 a lidským buňkám HT-29. Mechanismus protinádorového účinku není zcela objasněn, předpokládá se interakce se systémem mikrotubulů a tím zásah na úrovni buněčného cyklu a intracelulárního transportu (Hao et al, 2002).

Schopnosti BZM poškozovat strukturu mikrotubulů, vedly k rozvoji zájmu o tyto sloučeniny na úrovni hledání látek s protinádorovou aktivitou (Pourgholami et al, 2005). MBZ a ABZ se klinicky využívají jako bezpečná anthelmintika s širokým spektrem účinku. Tato anthelmintika jsou schválená pro léčbu intestinálních parazitických infekcí ve veterinární i humánní medicíně. Bylo poukázáno na antikancerózní účinky těchto látek potlačením mitotické aktivity nádorových buněk a nižší toxicitu proti nenádorovým buňkám, zahrnující lidské fibroblasty a endoteliální buňky umbilikální žíly. ABZ, fenbendazol a nokodazol významně inhibují proliferaci buněk mnohočetného myelomu. Na mechanismu cytotoxického a antimitotického účinku se pravděpodobně podílí depolymerizace tubulinu a signalizace prostřednictvím proteinu Bcl-2 (Feng et al, 2010). Ukázalo se, že ABZ (chemicky methyl-5-propylthio-1*H*-benzimidazol-2-yl karbamát) má antiproliferativní účinky proti mnoha buněčným nádorovým liniím, např. hepatocelulární, kolorektální, ovariální a pankreatické (Pourgholami et al, 2005). V buněčných kulturách, v závislosti na použité koncentraci, ABZ poškozuje buněčný cyklus nahromaděním buněk v G0-G1 fázi (při použití nižší koncentrace ABZ) nebo v G2-M fázi (při použití vyšší koncentrace ABZ). Další studie prokázaly, že ABZ potlačuje vznik maligního ascitu, inhibuje VEGF a je potenciálním inhibitorem hypoxického inducibilního faktoru 1 α (HIF-1 α) (Pourgholami et al, 2010a, b). Dalším benzimidazolovým anthelmintikem, u kterého se zkoumala potenciální protinádorová aktivita, byl MBZ (chemicky methyl-5-benzyl-2-benzimidazolkarbamát). Bylo zjištěno,

že MBZ indukuje apoptózu buněk jaterní nádorové linie zastavením buněčného cyklu ve fázi G₂M. Léčba MBZ také vede k uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií, což je signál pro zahájení apoptotické smrti buňky. Po perorálním podání holým myším (*nu/nu* myš) MBZ inhiboval růst lidských nádorů u tumorizovaných myší a výrazně inhiboval růst a snížil počet nádorů v experimentálním modelu jaterních metastáz. Také při hodnocení angiogeneze bylo nalezeno snížení hustoty cévní sítě. Tyto výsledky vedou k předpokladu, že by se MBZ mohl uplatnit v léčbě rakoviny a ostatních onemocněních spojených se závislostí na novotvorbě cév (Mukhopadhyay et al, 2002).

2.4.2 FLUBENDAZOL

Chemicky se jedná o methyl N-[6-(4-fluorobenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbamát.



Obr. 1 Strukturní vzorec FLU

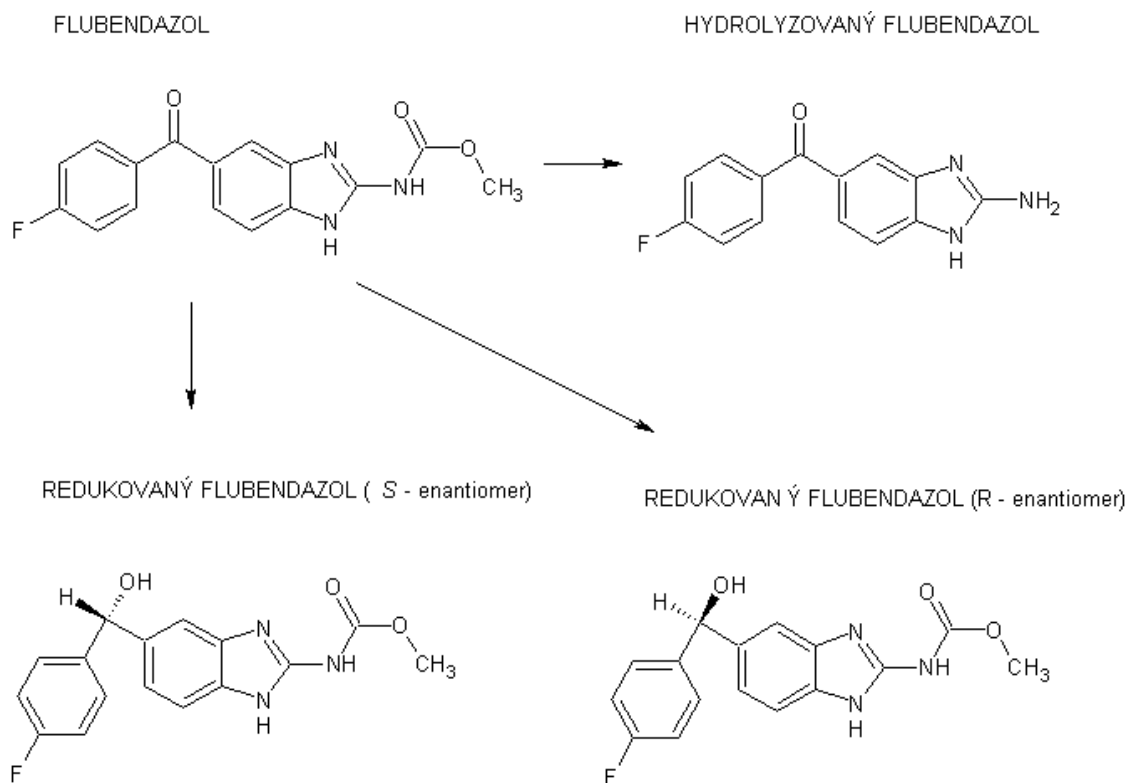
Sumární vzorec FLU: C₁₆H₁₂FN₃O₃

Molekulová hmotnost FLU: 313,29 [g/mol]

FLU je bílý nebo téměř bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, v ethanolu 96% a v dichlormethanu (ČL 2009). FLU je benzimidazolové anthelmintikum široce využívané proti gastrointestinálním hlísticím a tasemnicím schválené pro použití u terapie psů, koček, prasat, drůbeže a lovného ptactva. Pro velmi nízkou rozpustnost ve vodě nelze FLU podávat parenterálně, jsou dostupné pouze orální léčivé formy (pasta, premix, tablety) (Lampo et al, 1996). I. fáze biotransformace FLU zahrnuje hydrolyzu

karbamátové skupiny (hydrolyzovaný FLU) a redukcí karbonylové skupiny (redukováný FLU), viz Obr. 2. FLU je prochirální látka, vznikají tedy racemické směsi při nestereoselektivní redukcí karbonylu (Nobilis et al., 2007). Existují interindividuální rozdíly ve farmakokinetice FLU, mezi něž patří kromě jiných také vliv pohlaví. Na pohlavních rozdílech v biologické dostupnosti, distribuci, metabolismu a eliminaci xenobiotik se podílí odlišná tělesná stavba, distribuční objem, plazmatické bílkoviny nebo enzymy zasahující do biotransformace xenobiotik. Významné pohlavní rozdíly byly sledovány u ovcí. Farmakokinetické parametry (plocha pod koncentrační křivkou, eliminační poločas a residenční poločas) FLU a jeho hlavního metabolitu - redukováného FLU byly u ovcí významně vyšší ve srovnání s berany. V úvodní studii, kdy bylo totožným nedospělým zvířatům podáván FLU, nebyly pozorovány signifikantní pohlavní rozdíly, lze tedy předpokládat, že dospívání může ovlivnit farmakokinetiku FLU (Křížová-Forstová et al, 2011).

V roce 2010 byla zjištěna u FLU významná antileukemická a antimyelomová aktivita (Spagnuolo et al, 2010).



Obr. 2 Chemická struktura FLU a metabolitů vzniklých při redukcí ketonu a hydrolyze karbamátu (Nobilis et al, 2007)

FLU indukuje buněčnou smrt *in vitro* v leukemických a myelomových buněčných liniích. FLU také výrazně zpomaluje nádorový růst v myších tumorizovaných leukemickými (OCI-AML2) a myelomovými (OPM2) buňkami a nevykazuje známky systémové toxicity. FLU použitý současně s vinblastinem (VBL) působí synergicky na redukci životnosti buněk OCI-AML2 a tato kombinace je tak účinnější v inhibici růstu nádoru, než každá látka zvlášť. FLU díky inhibici polymerizace mikrotubulů působí odlišným mechanismem účinku než vinka alkaloidy a stává se tak potenciálně účinným proti VBL-resistentním buňkám (Spagnuolo et al, 2010).

2.5 REDUKTASY KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN

Karbonylová skupina je součástí mnoha endogenních sloučenin a xenobiotik. Často je složkou molekuly, která určuje její biologickou funkci, např. 3-ketoskupina steroidních hormonů je nezbytná pro vazbu na jejich specifické receptory (Oppermann, 2007). Redukce karbonylových sloučenin na jejich odpovídající hydroxyderiváty hraje důležitou roli v 1. fázi metabolismu mnoha endogenních a exogenních sloučenin. Z farmakologického pohledu, redukcí karbonylu může dojít k významné inaktivaci některých léčiv s touto skupinou, na druhé straně, tvorba alkoholů může účinky některých látek prodloužit a v některých případech i léčivo aktivovat (Maser, 2010). Enzymy redukující karbonyl patří do proteinových nadrodin: dehydrogenasy/ reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/ reduktasy s krátkým řetězcem (SDR), zahrnující karbonyl reduktasy (CBR) a chinon oxidoreduktasy (NQO1, NQO2) (Gavelová, 2008).

Steroidní hormony obsahující keto-/hydroxy- funkční skupinu na pozici C3, C11, C17 a C20 jsou substráty pro hydroxysteroiddehydrogenasy (HSD), které patří do dvou enzymových nadrodin SDR a AKR. Např. lidské enzymy z podrodiny AKR1C se podílejí na zvýšení koncentrace pohlavních hormonů v cílových nádorových tkáních a jejich inhibice představuje potenciální cíl v léčbě rakoviny prostaty, prsu a endometria (Bauman et al, 2004).

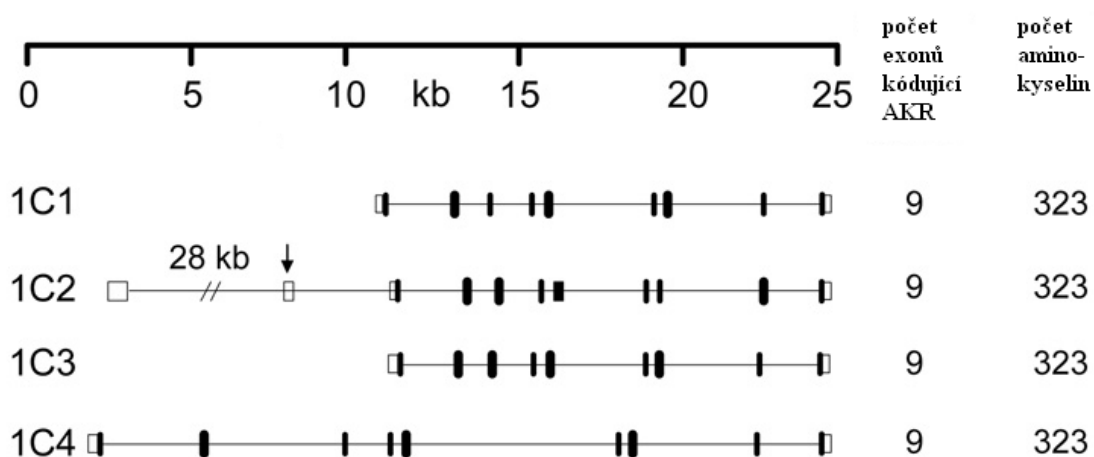
2.5.1 ALDOKETOREDUKTASY V PRSNÍ TKÁNI

AKR tvoří velkou nadrodinu NAD(P)H-dependentních, převážně monomerních oxidoreduktas se širokou substrátovou specifitou zahrnující steroidy, eikosanoidy, polyoly a xenobiotika (Oppermann, 2007). AKR jsou strukturně příbuzné proteiny se společným prvkem označovaným jako $(\alpha/\beta)_8$ soudek, který představuje pevnou, ale velmi flexibilní kostru potřebnou pro vazbu k odlišným strukturám karbonylových sloučenin. Aktivní místo AKR je lokalizováno na C-konci soudku, má vysokou afinitu k pyridinovým nukleotidům a při jejich použití jako kofaktorů většina AKR katalyzuje jednoduché oxidačně - redukční reakce (Barski et al., 2008). AKR nadrodina je rozdělena do 15 rodin, některé se dále dělí do podrodin. Názvosloví AKR je založeno na porovnání aminokyselinové sekvence. Základ názvu tvoří symbol „AKR“, kterému je přiřazena arabská číslice označující rodinu, písmeno indikující podrodinu a arabskou číslici pro jednotlivý enzym. K vymezení rodiny dochází na úrovni 40% shody. Členové rodiny by měly vykazovat <40% shody se členy dalších rodin (Barski et al., 2008; Penn Med, 2011). Podrodina je definována >60% shodou v aminokyselinové sekvenci, např. rodina AKR1 zahrnuje podrodiny savčích aldehydoreduktas, savčích aldoreduktas, HSD a Δ^4 -3-ketosteroid-5 β -reduktas. Číslování známých členů podrodin bylo náhodné (např. AKR1A1, AKR1A2 a AKR1A3 jsou příslušné aldehydoreduktasy pocházející z lidské, prasečí a krysí tkáně), nově objevené enzymy se číslují chronologicky. Při více než 97% shodě v sekvenci aminokyselin se předpokládá, že se jedná o alely téhož genu, pokud enzymy nemají rozdílnou aktivitu nebo odlišný 3'-untranslated region (UTR) či jejich geny mají různou strukturu (Penn Med, 2011). Mezi lidské AKR, které mohou regulovat lokální koncentraci steroidních hormonů, patří AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4 a AKR1D1. V prsní tkáni je přítomna isoforma AKR1C3 a zdá se, že její inhibice by mohla být novým terapeutickým cílem v léčbě hormon-dependentních forem karcinomu prsu (Bauman et al., 2004).

AKR1C3

AKR1C3, spolu s ostatními lidskými enzymy tvořící podrodinu AKR1C (AKR1C1 - AKR1C4), patří mezi NAD(P)H-dependentní monomerní dehydrogenasy o 323 aminokyselinových zbytcích. Představují vysokou shodu v aminokyselinové sekvenci (>83 %), ale jejich biochemické vlastnosti jsou odlišné. Tyto enzymy mají 3 α -, 17 β - a/nebo 20 α -HSD aktivitu a podílejí se na pre-receptorové regulaci steroidních receptorů, jaderných receptorů a receptorů spřažených s iontovými kanály (Matsunaga et al., 2006). Od ostatních členů nadrodiny AKR se odlišují vysokou dihydrodiol-dehydrogenasovou aktivitou, díky které oxidují aromatické uhlovodíky na odpovídající katecholy.

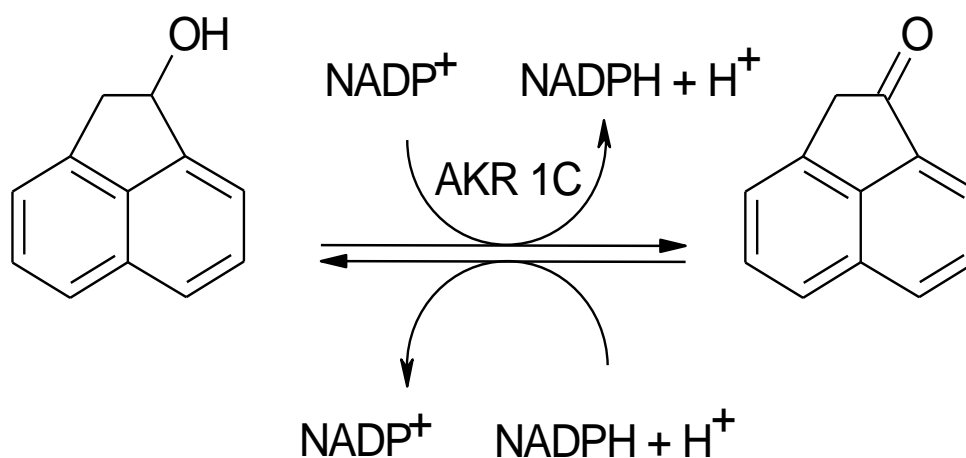
Struktura genů pro lidské AKR1C1 – 4, vycházející z databází NCBI a Ensembl, se skládá z 9 kódujících exonů a tvoří zřetelný cluster na chromosomu 10p14 – 15. Gen pro 1C1 má téměř identickou strukturu a délku s 1C3 - viz Obr. 3. Všechny AKR, kromě *AKR1d1*, mají tzv. 3'-untranslated regions (3'-UTR) méně než 300 nt. 3'-UTR jsou běžně považovány za důležité faktory, které ovlivňují stabilitu m-RNA a regulaci mi-RNA. V genu pro AKR1C3 byla zjištěna řada fenotypově významných polymorfismů. Například polymorfismus rs376376 (5'-71 A/G blízko vazebného místa SP1/SP3) AKR1C3 souvisí se syndromem polycystických vaječníků. Některé polymorfismy AKR1C3 mají souvislost s výskytem karcinomu prsu a jsou považovány za jednu z možných příčin různého rizika vzniku rakoviny prsu u žen různých národností (Moeller a Adamski, 2008).



Obr. 3 Struktura genu pro AKR1C (převzato z Barski et al., 2008)

AKR1C3 byla poprvé pojmenována jako 3 α -HSD typ 2, dále také jako 17 β -HSD typ 5, DDX a jako PGF-synthasa. AKR1C3 vykazuje širokou tkáňovou distribuci (Matsunaga et al., 2006). Pomocí kvantitativní RT-PCR bylo prokázáno, že AKR1C3 je vysoce exprimována v prsní žláze a v prostatě ve srovnání s jinými tkáněmi (Penning et al., 2000). Lidská AKR1C3 vykazuje převážně 17 β -HSD aktivitu ($k_{cat}/K_M = 42 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$), 3 α -HSD aktivitu, která je podstatně nižší ($k_{cat}/K_M = 6 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$) a 11-ketoreduktasovou aktivitu ($k_{cat}/K_M = 1 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$) (Bauman et al., 2004). AKR1C3, díky 17 β -HSD aktivitě, redukuje slabé androgeny (androstendion) na aktivní androgeny (testosteron) a slabé estrogény (estron) na aktivní estrogény (17 β -estradiol) s využitím NADPH jako koenzymu. AKR1C3 také katalyzuje redukcí 3-keto-, 20-ketosteroidů prostřednictvím 3 α -HSD aktivitě a redukcí prostaglandinu D₂ (PGD₂) díky 11-ketoreduktasové aktivitě. Inhibice tohoto enzymu se zdá být zajímavým cílem v léčbě hormon-dependentních forem rakoviny prostaty, prsu a endometria (Gobec et al., 2005). Jako velmi nadějně inhibitory se jeví látky ze skupiny nesteroidních antiflogistik, fytoestrogeny (coumestrol, quercetin, a biochanin), mykoestrogeny (zearalenon) a další látky typu benzodiazepinů, benzofuranů a derivátů fenolftaleinu (Škarydová et al., 2009).

Pro studium aktivity AKR1C3 lze použít modelový substrát acenaftenol (AcNOH), který je relativně specifický pro enzymy z nadrodiny AKR1C (Brožič et al., 2009). AKR1C3 využívá při jeho přeměně oxidovanou formu NADP⁺, která se reakcí redukuje na NADPH a tato forma poskytuje fluorescenci. AcNOH působením dehydrogenasy je za přítomnosti kofaktoru NADP⁺ metabolizován na 1-acenaftenon, viz Obr. 4 (Zavřelová, 2008).



Obr. 4 Enzymatická přeměna acenaftenolu na acenaftenon (Zavřelová, 2008)

2.6 BUNĚČNÉ KULTURY

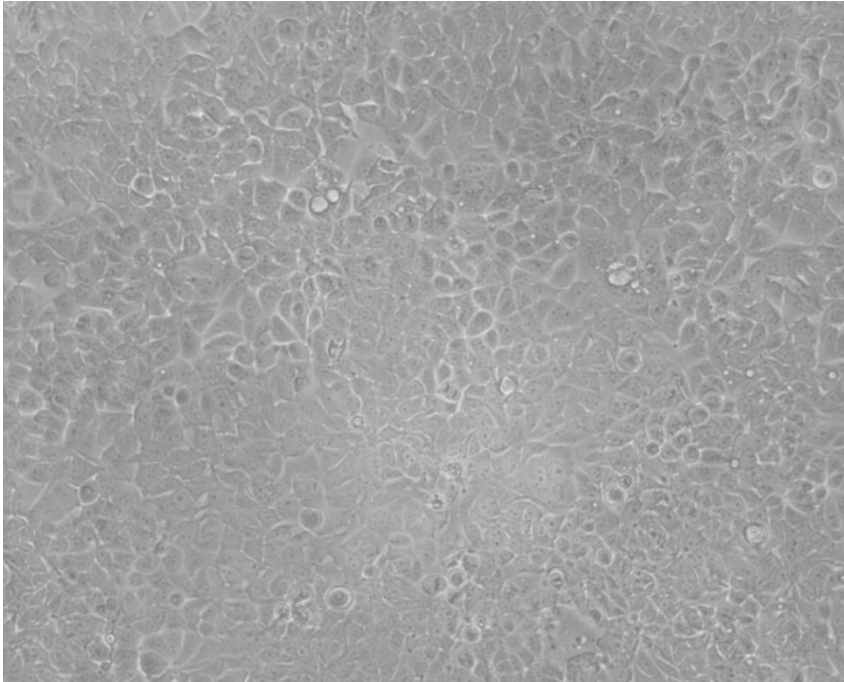
Buněčné kultury dnes patří mezi zásadní techniky používané v základním a aplikovaném výzkumu i ve výrobě. Využití buněčných kultur v experimentální práci má ve srovnání s použitím jiných biologických modelů, např. s laboratorním zvířetem nebo s izolovaným orgánem či tkání, zásadní výhody. Především, pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu, řadu buněčných linií lze snadno kultivovat a v krátké době je možné získat poměrně velké množství materiálu. Na druhou stranu je potřeba počítat s různými omezeními, např. pěstování buněk probíhá za nefyziologických podmínek a buňky jsou také prosty *in vivo* komunikace (Vejražka, 2008).

Buněčná kultura odebraná jedinci je označována jako primární kultura. Tato primární kultura se stává buněčnou linií tehdy, kdy jsou buňky namnoženy, rozředěny a přeneseny do dalších kultivačních lahví. Jejich oddělení se provádí např. pomocí proteas (trypsin) nebo chelatačními činidly (EDTA), tento postup je známý jako pasážování (Masters, 2000). Tímto krokem se získá tzv. sekundární kultura, čili subkultura. Primokultury získané z nádorové tkáně se svými vlastnostmi liší od normálních buněk - zpravidla se lépe množí a většinou nepodléhají stárnutí. Naopak kultury normálních buněk mají omezenou životnost, po několika pasážích buňky změňjí svoje vlastnosti a přestávají se dělit (Vejražka, 2008).

V této práci byly využity buněčné linie:

MCF-7

MCF-7 je buněčná linie lidského karcinomu prsu. Buňky MCF-7 mají estrogenový receptor. Linie byla vyvinuta v r. 1973 (Strnad a Daneš, 2001).



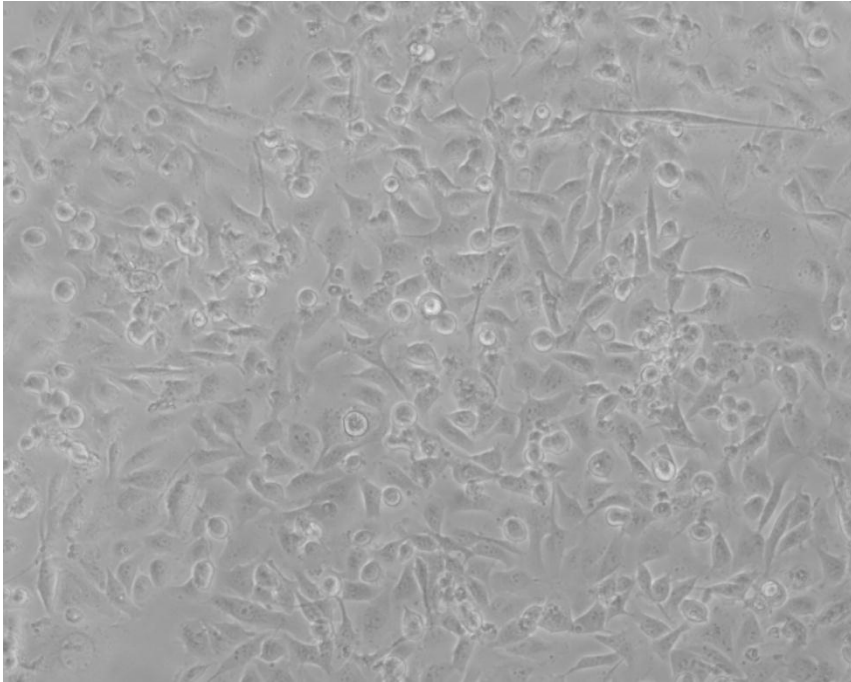
Obr. 5 Buňky nádorové linie MCF-7

MCF-10A

MCF-10A je imortalizovaná buněčná linie pocházející z lidské fibrocystické prsní tkáně. Buněčná linie MCF-10A odpovídá normální prsní tkáni na základě těchto ukazatelů: absence tumorigenicity u nahých myší, trojrozměrný růst v kolagenu, růst v přítomnosti hormonů a růstových faktorů, absence růstu závislého na adherenci, formace v konfluentní kultury (Soule et al., 1990).

MDA-MB-231

MDA-MB-231 je buněčná linie lidského karcinomu prsu, která nemá estrogenový receptor.



Obr. 6 Buňky nádorové linie MDA-MB-231

EST

Buňky EST jsou získány z prsního Ehrlichova solidního tumoru myši.

3 CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo:

1. vyhodnocení a porovnání antiproliferačního účinku flubendazolu (FLU) v buněčných liniích MCF-7, MDA-MB-231 a MCF-10A
2. stanovení vlivu flubendazolu (FLU) na aktivitu acenaftenoldehydrogenasy (AND) v cytosolu z homogenátu buněk MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231 a EST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

buněčná linie MCF-7

buněčná linie MCF-10A

buněčná linie MDA-MB-231

homogenát z myšího prsního nádoru EST

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMSO – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

doxorubicin – Pharmacia (Upjon, Itálie)

flubendazol

kyselina chlorovodíková

isopropanol (Sigma)

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) (Sigma)

NADP

NADPH

neutrální červeň roztok 3,3 g/l (Sigma)

set pro stanovení bílkovin s BCA (bicinchoninová kyselina)

tris-HCl pufr, 0,1 M, pH 8,0

další běžné chemikálie v laboratorní čistotě

4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE

4.2.1 POMŮCKY

Buničina, Erlenmayerovy a odměrné baňky, kádinky, ledítka, mikrotitrační destičky, mikrozkuhavky, míchadlo, multikanálové pipety, navažovací kopistka, nádoby na led, nesmyvatelný fix, nůžky, pipetovací špičky, pipety, rukavice, sterilní pipetovací špičky, sterilní pipety, stojánky na eppendorfky, stopky, váženka.

4.2.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

analytické váhy – Scaltec SBC 22

CO₂ inkubátor – HeraCell

čtečka absorbance – Microplate reader Infinite M200 (Tecan, Rakousko)

inkubátor – Eppendorf Thermomixer Comfort

koncentrátor - Eppendorf Concentrator 5301

laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C.

mikroskop – Nikon Eclipse TS 100

mrazicí box (-80°C) – HeraFreeze 40

spektrofluorimetr - Perkin Elmer LS 50 B

třepačka – IKA MS2 Minishaker

ultrazvuková lázeň - Bandelin Sonorex

vodní lázeň – Memmert

xCELLigence RTCA, Roche

4.2.3 METODIKA PRÁCE

Pro experimenty v této práci byl využit cytosol z buněčných linií MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A připravený Mgr. Veronikou Hanušovou na katedře biochemických věd FAF UK. Cytosol z homogenátu myšího prsního nádoru (EST) byl získán na katedře biochemických věd FAF UK.

4.2.4 TEST CYTOTOXICITY – NEUTRAL RED UPTAKE TEST

Cytotoxicita FLU byla testována pomocí Neutral Red Uptake Testu (NRU). Tato metoda patří mezi nejpoužívanější testy cytotoxicity, především díky nízké ceně a vysoké citlivosti. Hodnocení NRU testu poskytuje kvantitativní vyjádření počtu životaschopných buněk v buněčné kultuře. Tento test je založen na schopnosti zdravých buněk hromadit ve svých lysozomech supravitální barvivo neutrální červeň. Toto slabé kationické barvivo prochází do buňky pasivní difúzí, kde se váže na lysozomální matrix. Lysozomy udržují pH nižší než okolní cytoplazma a neutrální červeň zde získává náboj, a proto neprostupuje zpět do cytoplazmy. Udržování protonového gradientu na membráně lysozomu je energeticky náročné. Buněčná smrt nebo ztráta gradientu pH při poškození buňky způsobí zvýšení propustnosti membrány a uvolnění zadržené neutrální červeně. Důsledkem toho je množství zadrženého barviva přímo úměrné počtu živých buněk a lze tedy spektrofotometricky změřit absorbanci solubilizovaného barviva (Repetto et al, 2008).

Postup:

Pro testování cytotoxicity FLU byly buňky MCF-7 a MDA-MB-231 linie nasazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček po 100 μ l na jamku, do vnějších jamek byla pipetováno stejné množství vody. Buňky byly následně 24 hodin inkubovány v termostatu. Hustota buněk byla cca 5 tis. b./ 100 μ l média. K mediu v jamce bylo napipetováno 100 μ l expozičního media. Finální koncentrace testovaných látek jsou uvedeny v tabulce – viz Tab. 1. V případě látek rozpouštěných v DMSO (FLU) byla výsledná koncentrace DMSO 0,1%.

Tab. 1 Finální koncentrace testovaných látek

0,08 μM FLU
0,10 μM FLU
0,20 μM FLU
0,40 μM FLU
2,00 μM FLU
4,00 μM FLU
10,00 μM FLU
2 μM DOX

Buňky MCF-7 a MDA-MB-231 byly po 24hod inkubaci s expozičním médiem mikroskopicky prohlédnuty.

Po 24 hodinové expozici v termostatu bylo odsáto 100 μl media a přidáno 100 μl roztoku neutrální červeně v mediu do výsledné koncentrace 40 $\mu\text{g/ml}$. Následovala 3 hodinová inkubace v termostatu. Po odsátí media bylo přidáno 100 μl fixačního roztoku (1 g/100 ml CaCl_2 v 0,5% formaldehydu). Za 15 minut byl fixační roztok odsán a do jamek bylo napipetováno 200 μl lyzačního roztoku (1% CH_3COOH v 50% etanolu). Po 15 minutách stání při pokojové teplotě byly desky 15 minut třepány na deskové třepače. Následně byla odečtena absorbance při 540 nm.

Pro vyhodnocení se od naměřených absorbancí odečítá hodnota blanku (jamka s médiem bez buněk) a tyto získané hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta kontroly v závislosti na koncentraci použitého expozičního média. Byl sestrojen graf závislosti životnosti buněk [%] na koncentraci FLU, popř. DOX.

4.2.5 TEST CYTOTOXICITY – MTT

MTT-test je často využívaná metoda pro hodnocení životaschopnosti buněk v toxikologických studiích *in vitro*. Principem metody je přeměna ve vodě rozpustné tetrazoliové soli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromidu (MTT) pomocí mitochondriálních dehydrogenas na nerozpustný fialový produkt formazan. Protože buněčná membrána je pro formazan nepropustná, je akumulován uvnitř živých buněk a lze jej kvantifikovat pomocí spektrofotometrického hodnocení (Fotakis, Timbrell, 2005).

Postup:

Pro testování cytotoxicity FLU byly buňky MCF-7 a MDA-MB-231 linie nasazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček po 100 μ l na jamku, do vnějších jamek byla pipetováno stejné množství vody. Buňky byly následně inkubovány 24 a 48 hodin v termostatu. Hustota buněk byla cca 5 tis. b./ 100 μ l média. K mediu v jamce bylo napipetováno 100 μ l expozičního média. Finální koncentrace testovaných látek jsou uvedeny v tabulce – viz Tab. 2. V případě látek rozpouštěných v DMSO (FLU) byla výsledná koncentrace DMSO 0,1%.

Použité roztoky:

Roztok MTT: 2,5 mg MTT/1 ml fosfátového pufru 0,1M, pH 7,4 (k rozpouštění byl použit ultrazvuk), předeřtát na 37°C

0,08M HCl v isopropanolu: 2ml 4M HCl přidat k 98 ml isopropanolu

Tab. 2 Finální koncentrace testovaných látek

0,04 μ M FLU
0,10 μ M FLU
0,20 μ M FLU
0,50 μ M FLU
1,00 μ M FLU
2,00 μ M FLU
4,00 μ M FLU
10,00 μ M FLU

Po 24hod (48hod) inkubaci bylo k buňkám napipetováno 30 μ l MTT/jamka, s výjimkou slepých vzorků, a inkubovaly se 1 hodinu v termostatu při 37°C. Po skončení inkubace bylo slito médium a byl přidán HCl-isopropanol (50 μ l/jamka - včetně slepých vzorků). Po 15 minutách třepání při 25°C se rozpustil vzniklý fialový formazan. Absorbance se proměřuje při dvou vlnových délkách (570 a 690 nm), které se od sebe vzájemně odečtou. Hodnota absorbance slepého vzorku (jamka s médiem bez buněk) je odečtena od naměřené absorbance. Hodnoty absorbance jsou vyjádřeny jako procenta kontroly v závislosti na koncentraci expozičního média. Byl sestaven graf závislosti životnosti buněk [%] na koncentraci FLU.

4.2.6 STANOVENÍ BUNĚČNÉ PROLIFERACE METODOU RTCA

Proliferace buněk byla stanovena pomocí přístroje RTCA xCELLigence (Real Time Cell Analyzer). Tato metoda umožňuje kontinuálně sledovat chování buněk v reálném čase, aniž by se buňky značily, či barvily. Podstatou tohoto systému je sledování buněk v tzv. „*E-plates*“, tedy 16-jamkových destičkách, kde každá jamka má na svém dně zlaté mikroelektrody. Princip experimentu je založen na monitorování buněk přisedlých na dně jamek a měření jejich impedance. Míra impedance je pak vyjádřena v bezrozměrných jednotkách tzv. buněčného indexu (cell index, CI) (Vondráčková et al, 2010).

Postup:

Do každé jamky E-destičky bylo napipetováno 90 μ l kultivačního média a byla změřena základní hodnota impedance (pozadí) ve všech jamkách. Poté bylo do jamek přidáno 100 μ l buněčné suspenze linií MCF-7 a MDA-MB-231. Po 24 hodinové inkubaci bylo do jamek přidáno 10 μ l expozičního média. Buňky byly dále kultivovány po dobu 48 hod a hodnota impedance (buněčného indexu) byla měřena každou hodinu.

Použité roztoky:

Zásobní roztoky: FLU (313,29 g/mol) 10mM, 2mM, 1mM, 0,2mM, 0,1mM, 0,4mM

Expoziční média: FLU 10 μ M (2 μ l 10mM FLU + 98 μ l média)

FLU 2 μ M (2 μ l 2mM FLU + 98 μ l média)

FLU 1 μ M (2 μ l 1mM FLU + 98 μ l média)

FLU 0,2 μ M (2 μ l 0,2mM FLU + 98 μ l média)

FLU 0,1 μ M (2 μ l 0,1mM FLU + 98 μ l média)

FLU 0,4 μ M (2 μ l 0,4mM FLU + 98 μ l média)

K (4 μ l DMSO + 196 μ l média)

4.2.7 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN

Aktivita enzymů je vždy vztahována k určitému množství proteinů (nejčastěji 1mg) a vyjádřena jako specifická aktivita, proto je nutné určit koncentraci bílkovin v připraveném vzorku cytosolu. Byla použita metoda BCA stanovení bílkoviny.

Principem této metody je reakce proteinů s měďnatými ionty (Cu^{2+}) v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^{2+} ionty, které vytvářejí v prostředí o pH kolem 10 stabilní modrofialový komplex s BCA (bicinchoninovou kyselinou). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny. Absorbance komplexu se proměřuje při vlnové délce 562 nm.

Koncentrace proteinů ve sledovaném vzorku byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky, která vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci bílkoviny. Tato závislost je lineární a byla zjištěna proměřením absorbancí 6 připravených standardních roztoků o známé koncentraci bílkoviny. Jako standardní bílkovina byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Standardní roztoky byly připraveny z výchozího 1% roztoku BSA a destilované vody – viz Tab. 3.

Tab. 3 Složení roztoků pro kalibrační křivku

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

Postup:

Každý vzorek cytosolu byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:3 a 1:5. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nanášeno 10 μl vzorku bílkovin (naředěný cytosol popř. standardní roztoky pro kalibrační křivku). U slepého vzorku bylo místo bílkovin nanášeno 10 μl destilované vody. Každá varianta byla nanášena v triplicátu, v případě kalibrační křivky v tetraplikátu. Dále byl do jamek nanášen pracovní roztok C, který byl připraven v čas potřeby smícháním komerčně dodávaných roztoků A a B v poměru 50:1.

Roztok A: NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH

Roztok B: 4% roztok CuSO₄ · 6H₂O

Po promíchání složek v jamkách byla destička 30 minut inkubována při 37°C. Hodnoty absorbance byly změřeny při 562 nm na čtečce Infinite M200. Jako nulová absorbance byla na přístroji nastavena hodnota absorbance destilované vody. Výsledná hodnota absorbance byla průměrem ze 3 (4) naměřených hodnot, od nichž byla odečtena průměrná absorbance slepého vzorku. Při výpočtu výsledné koncentrace proteinů ve vzorcích cytosolu byla použita získaná rovnice kalibrační přímky a zohledněno předchozí zředění vzorku.

4.2.8 STANOVENÍ AKTIVITY AND

Principem metody je přeměna AcNOH na acenaftenon pomocí AND za přítomnosti kofaktoru NADP⁺, ze kterého reakcí vzniká NADPH, který je detekován pomocí spektrofluorimetru (Perkin Elmer LS 50 B). Z přírůstku fluorescence se vyjádří enzymová aktivita a vypočítá se specifická enzymová aktivita. K vyjádření specifické aktivity bylo třeba stanovit koncentraci bílkovin.

Nastavení přístroje:

Tab. 4 Nastavení spektrofluorimetru (Perkin Elmer LS 50 B)

Vlnové délky měření	$\lambda_{\text{excitační}} = 340 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisní}} = 480 \text{ nm}$
excitační šterbina	10 nm
emisní šterbina	10 nm
teplota	37°C
délka inkubace	3 min
míchání	low

Zásobní roztoky:

substrát: AcNOH (Mr = 170,2 g/mol), 10 mM
kofaktory: NADP⁺ (Mr = 787,4 g/mol), 100 mM
NADPH (Mr = 833,4 g/mol), 0,4 mM, 1,0 mM
testovaná látka: FLU (Mr = 313,28 g/mol)
pufr: TRIS-HCl, pH 8,0, 0,1 M, 37°C

Zásobní roztoky NADP⁺, NADPH byly připraveny v čas potřeby a spolu s cytosolem byly během měření uchovávány v ledové lázni a chráněny před světlem.

Složení reakční směsi pro stanovení aktivity enzymů v cytosolu:

870 µl TRIS-HCl pufru (0,1 M, pH 8,0)
10 µl roztoku AcNOH
10 µl roztoku NADP⁺
100 µl cytosolu
10 µl roztoku FLU
10 µl roztoku NADPH o koncentraci 0,4 mM

Postup:

Reakce probíhala v kyvetě Hellma-semimikro a celkový objem reakční směsi byl 1 ml. Před každým měřením byl obsah kyvety odsán a kyveta byla 3× propláchnuta destilovanou vodou. Do kyvety byl nejprve napipetován pufr, AcNOH (výsledná koncentrace v reakční směsi: 0,1 mM), NADP⁺ (výsledná koncentrace v reakční směsi: 1 mM) a spuštěn záznam na spektrofluorimetru. Při měření vlivu FLU na enzymovou aktivitu byl přidán do reakční směsi v množství 10 µl (koncentrace v reakční směsi 10 µM, 2 µM, 0,2 µM) a temperován společně s pufrům, AcNOH a NADP⁺. Po 20 s temperování byl přidán cytosol a tím spuštěna vlastní enzymová reakce. Po 120 s byl přidán standardní přídavek 10 µl NADPH. Byla odečtena směrnice k, číslo A (intenzita začátku přídávku NADPH) a číslo B (intenzita konce přídávku NADPH). Intenzita přídávku se zjišťovala pomocí posuvného kurzoru hned po změření vzorku. Z množství NADPH vytvořeného za 1 minutu byla vypočítána enzymová aktivita. U každého vzorku bylo stanovení aktivity AND provedeno ve třech paralelních měřeních, určen průměr a směrodatná odchylka.

Koncentrace enzymové aktivity byla vypočtena dle vzorce:

$$a = \frac{k}{B - A} \times n \times D \times 60$$

- a* koncentrace enzymové aktivity [nmol/min/ml cytosolu]
k směrnice
A intenzita začátku přidavku NADPH
B intenzita konce přidavku NADPH
n látkové množství standardního přidavku v 1 ml [nmol]
D zředění
60 přepočet na minuty

Výpočet koncentrace enzymové aktivity v cytosolu buněk MCF-7:

$$a[\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}] = \frac{k}{8,28} \times 1[\text{nmol}] \times 10 \times 60$$

Výpočet koncentrace enzymové aktivity v cytosolu buněk MCF-10A:

$$a[\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}] = \frac{k}{8,28} \times 0,15[\text{nmol}] \times 10 \times 60$$

Výpočet koncentrace enzymové aktivity v cytosolu buněk MDA-MB-231:

$$a[\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}] = \frac{k}{8,28} \times 0,75[\text{nmol}] \times 10 \times 60$$

Výpočet koncentrace enzymové aktivity v cytosolu buněk EST:

$$a[\text{nmol}/\text{min}/\text{ml}] = \frac{k}{8,28} \times 20[\text{nmol}] \times 10 \times 60$$

Specifická enzymová aktivita byla vypočtena dle vzorce:

$$\text{spec. a.} = \frac{a}{c \cdot b_i}$$

- spec. a.* specifická enzymová aktivita [nmol/min/mg]
a koncentrace enzymové aktivity [nmol/min/ml]
c *b_i* koncentrace bílkoviny [mg/ml]

5 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

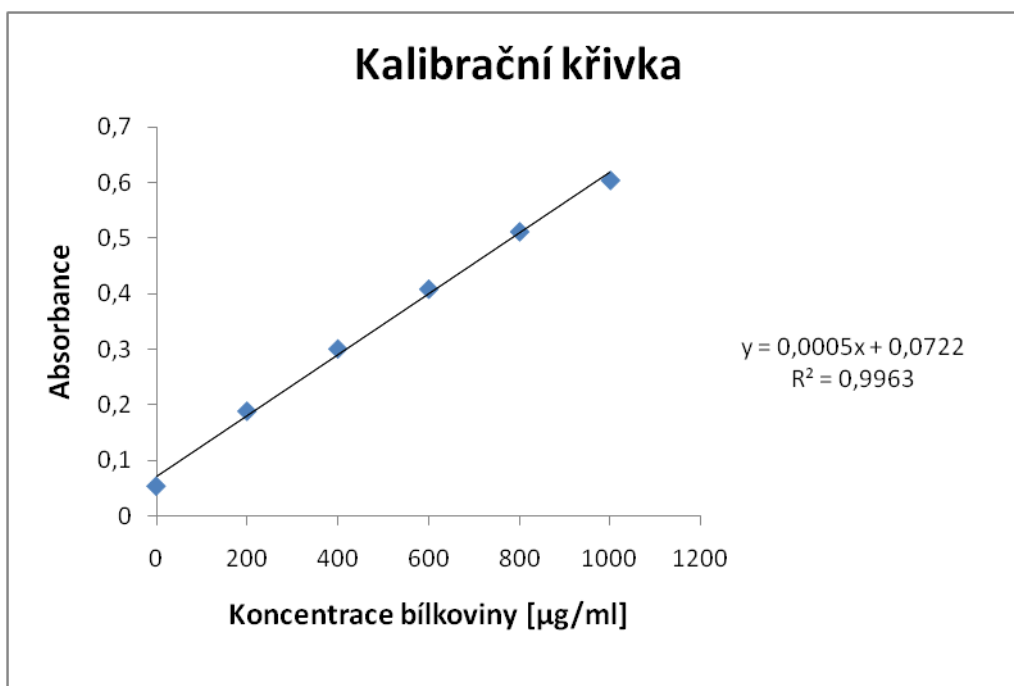
5.1 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN

Při zjišťování koncentrace bílkovin v cytosolu získaném z buněk MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231 a EST bylo postupováno podle výše uvedeného návodu (viz kapitola 4.2.7).

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci bílkoviny. Hodnoty absorbance použité pro sestrojení křivky jsou průměrem z 6 naměřených hodnot. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě: A (absorbance) \pm S. D. (směrodatná odchylka), viz Tab. 5, Obr. 7.

Tab. 5 Průměrné hodnoty absorbance (A) kalibračních roztoků

označení	koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	$A \pm \text{S. D.}$
1	0	$0,055 \pm 0,004$
2	200	$0,189 \pm 0,005$
3	400	$0,301 \pm 0,008$
4	600	$0,409 \pm 0,009$
5	800	$0,512 \pm 0,008$
6	1000	$0,604 \pm 0,009$



Obr. 7 Závislost absorbance na koncentraci bílkovin

Rovnice kalibrační přímky je $y = 0,0005x + 0,0722$ s hladinou spolehlivosti $R^2 = 0,9963$. Z průměrných hodnot absorbance jednotlivých vzorků a z parametrů rovnice přímky byly vypočítány koncentrace bílkovin v připravených vzorcích cytosolu - viz Tab. 6.

Koncentrace bílkovin byla využita při výpočtu specifické enzymové aktivity.

Tab. 6 Koncentrace proteinů ve vzorcích cytosolu

Vzorek	koncentrace bílkoviny (mg/ml) \pm S. D.
MCF-7	1,37 \pm 0,00
MCF-10A	0,28 \pm 0,02
MDA-MB-231	1,17 \pm 0,06
EST	11,45 \pm 1,31

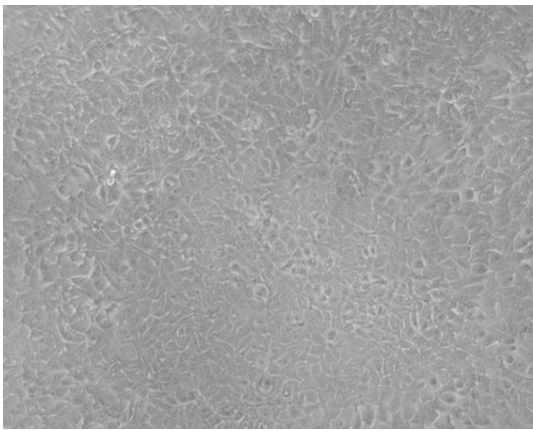
5.2 ANTIPROLIFERATIVNÍ ÚČINEK FLU

K hodnocení antiproliferativního účinku FLU byly použity metody pro stanovení životnosti buněk: NRU, MTT a RTCA testy. Vliv FLU na proliferaci buněk byl testován na prsních nádorových liniích MCF-7 a MDA-MB-231 a prsní nenádorové linii MCF-10A. Životnost buněk byla sledována po přidání FLU v koncentracích 0-10 μ M, kontrolní vzorky byly inkubovány s DMSO.

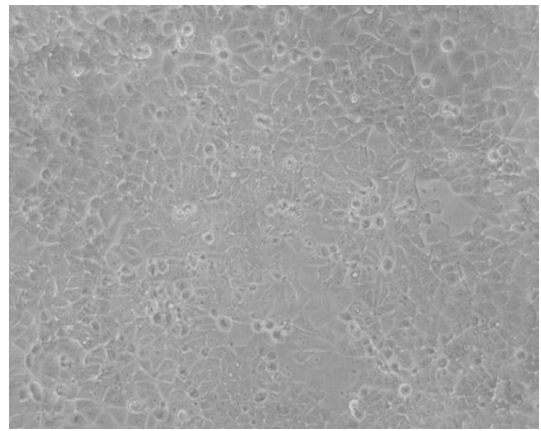
Nádorové buňky MCF-7 a MDA-MB-231 byly po 48hod inkubaci s expozičním médiem mikroskopicky prohlédnuty a rozdíl mezi kontrolními buňkami a buňkami s testovanými látkami jsou dokumentovány na Obr. 8-15.

MCF-7

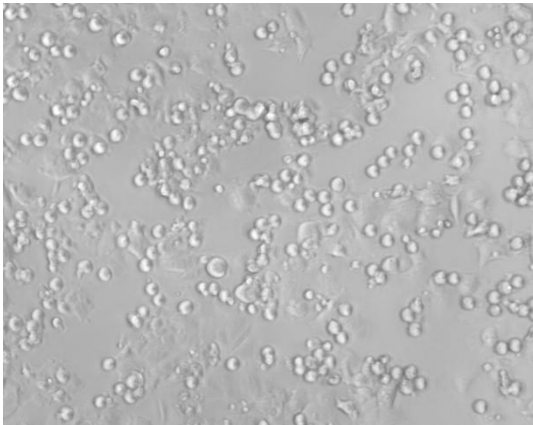
Mikroskopicky znázorněné buňky MCF-7 po 48hod expozici FLU. Živé buňky (kontrolní, bez FLU) mají hvězdicovitý tvar, jsou přisedlé na dně jamek mikrotitrační destičky. V přítomnosti FLU (koncentrace 0,1 μ M, 2 μ M a 10 μ M) lze pozorovat změny tvaru buněk, mrtvé buňky mají kulovitý tvar a odlepují se ode dna destiček.



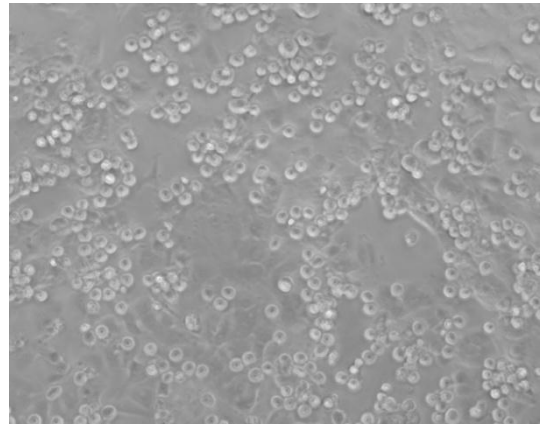
Obr. 8 MCF-7 0 μ M FLU



Obr. 10 MCF-7 0,1 μ M FLU



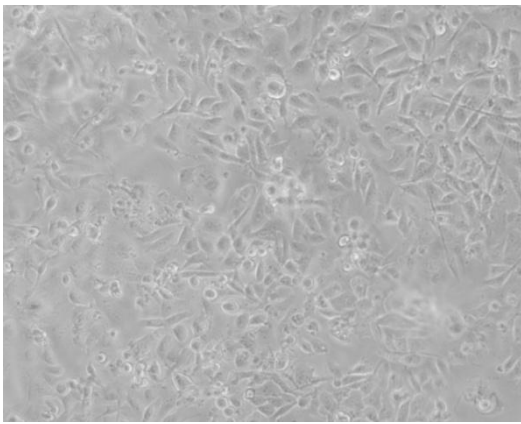
Obr. 9 MCF-7 2 μ M FLU



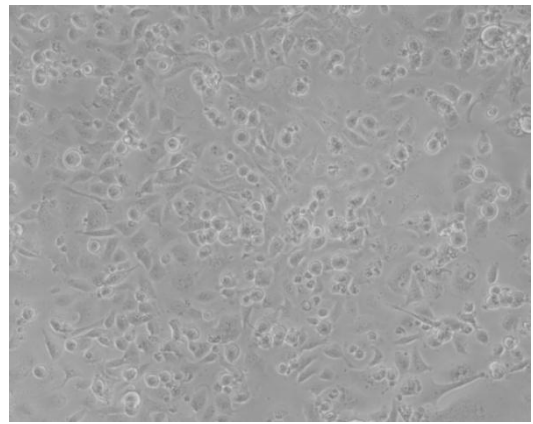
Obr. 11 MCF-7 10 μ M FLU

MDA-MB-231

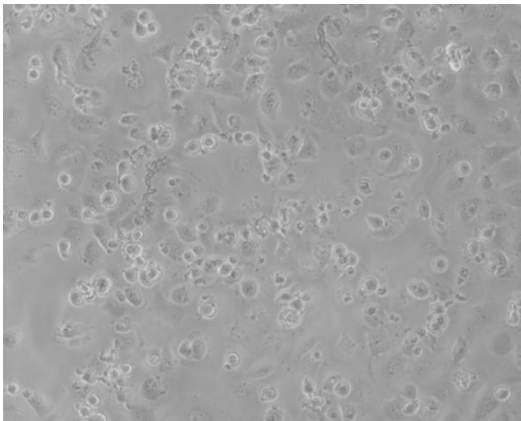
Mikroskopicky znázorněné buňky MDA-MB-231 po 48hod expozici FLU. Živé buňky (kontrolní, bez FLU) mají podlouhlý tvar, jsou přisedlé na dně jamek mikrotitrační destičky. V přítomnosti FLU (koncentrace 0,1 μ M, 2 μ M a 10 μ M) lze pozorovat změny tvaru buněk, mrtvé buňky mají kulovitý tvar a odlepují se ode dna destiček.



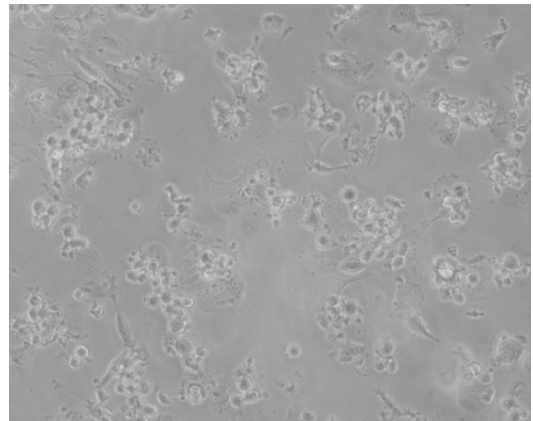
Obr. 12 MDA-MB-231 0 μ M FLU



Obr. 14 MDA-MB-231 0,1 μ M FLU



Obr. 13 MDA-MB-231 2 μ M FLU



Obr. 15 MDA-MB-231 10 μ M FLU

5.2.1 NEUTRAL RED UPTAKE TEST

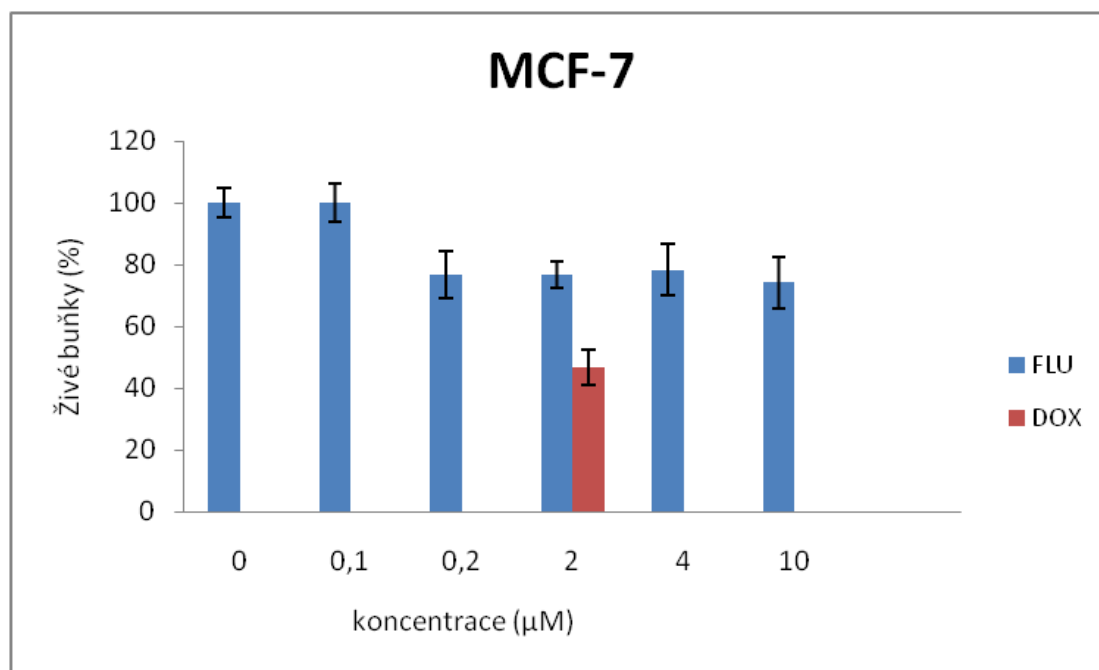
Cytotoxicita flubendazolu byla hodnocena pomocí metody NRU. Byl testován cytosol izolovaný z buněk MCF-7 a MDA-MB-231. FLU byl použit v koncentracích 0,1 μ M, 0,2 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 10 μ M a DOX v koncentraci 2 μ M. Životnost buněk byla vyhodnocena po 24hod inkubace s FLU. Hodnoty IC₅₀, tedy hodnoty koncentrace, při kterých došlo k úmrtí 50% buněk, byly odhadnuty. Naměřené hodnoty byly zaznamenávány v grafech závislosti životnosti buněk [%] na koncentraci FLU [μ M]. DOX byl použit jako referenční inhibitor růstu buněk. Byly provedeny dva pokusy, v prvním případě byly buňky MCF-7 a MDA-MB-231 kultivovány pouze v DMEM médiu, v druhém případě byl součástí kultivačního média přídavek FBS.

Výsledky testu NRU jsou shrnuty v Tab. 7 - Tab. 10 spolu s odpovídajícími grafy, viz Obr. 16 - Obr. 19.

MCF-7 bez FBS

Tab. 7 Vliv FLU a DOX na životnost buněk MCF-7

koncentrace flubendazolu [μM]	koncentrace doxorubicinu [μM]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0,00	-	$0,26 \pm 0,01$	100 ± 5
0,10	-	$0,26 \pm 0,02$	100 ± 6
0,20	-	$0,20 \pm 0,02$	77 ± 8
2,00	-	$0,20 \pm 0,01$	77 ± 4
4,00	-	$0,20 \pm 0,02$	78 ± 8
10,00	-	$0,19 \pm 0,02$	74 ± 8
-	2,00	$0,12 \pm 0,01$	47 ± 6



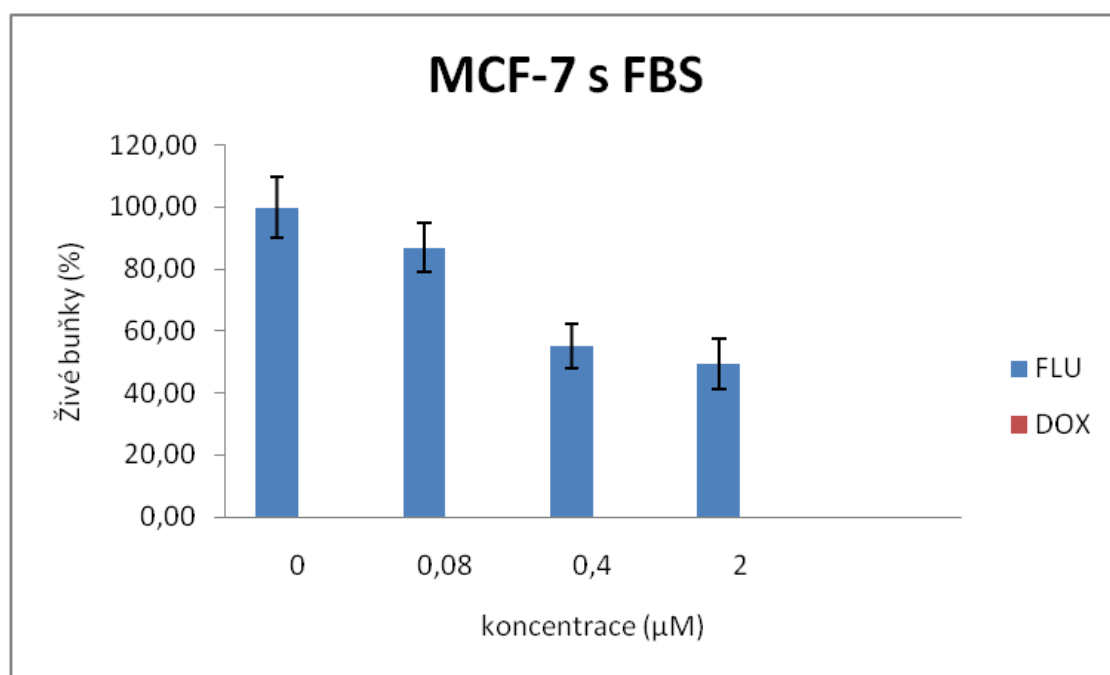
Obr. 16 Vliv FLU a DOX na životnost MCF-7 buněk

Při použitých koncentracích FLU nedošlo k poklesu životnosti buněk MCF-7 na 50 %. K výraznějšímu poklesu životnosti buněk došlo při použití koncentrace FLU $0,2\mu\text{M}$, při zvýšení koncentrace FLU již k dalšímu poklesu životnosti nedocházelo.

MCF-7 s FBS

Tab. 8 Vliv FLU a DOX na životnost buněk MCF-7 (s FBS)

koncentrace flubendazolu [μM]	koncentrace doxorubicinu [μM]	absorbance ± s. d.	životnost buněk %
0,00	-	0,24 ± 0,02	100 ± 10
0,08	-	0,21 ± 0,02	87 ± 8
0,40	-	0,13 ± 0,02	55 ± 7
2,00	-	0,12 ± 0,02	49 ± 8
-	2,00	0,00 ± 0,00	0 ± 0



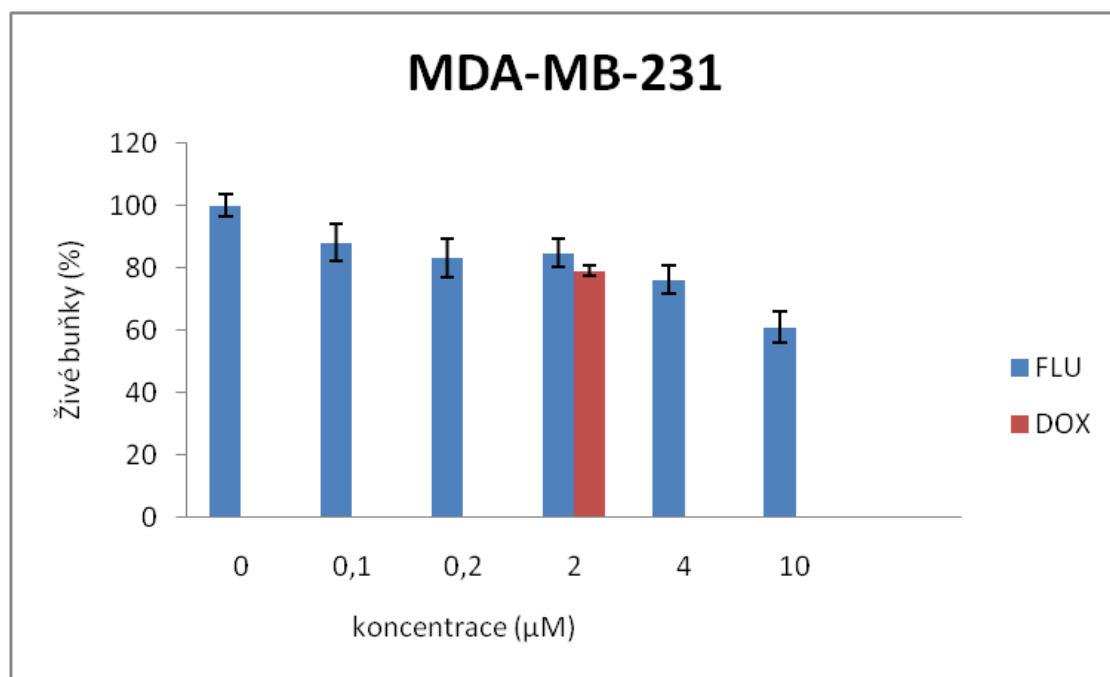
Obr. 17 Vliv FLU a DOX na životnost MCF-7 buněk

Přibližná hodnota IC_{50} FLU je 1,5 μM. Použití DOX v koncentraci 2 μM způsobilo 100% inhibici růstu.

MDA-MB-231 bez FBS

Tab. 9 Vliv FLU a DOX na životnost buněk MDA-MB-231

koncentrace flubendazolu [μM]	koncentrace doxorubicinu [μM]	absorbance ± s. d.	životnost buněk %
0,00	-	0,22 ± 0,01	100 ± 4
0,10	-	0,19 ± 0,01	88 ± 6
0,20	-	0,18 ± 0,01	83 ± 6
2,00	-	0,18 ± 0,01	85 ± 4
4,00	-	0,16 ± 0,01	76 ± 5
10,00	-	0,13 ± 0,01	61 ± 5
-	2,00	0,17 ± 0,00	79 ± 2



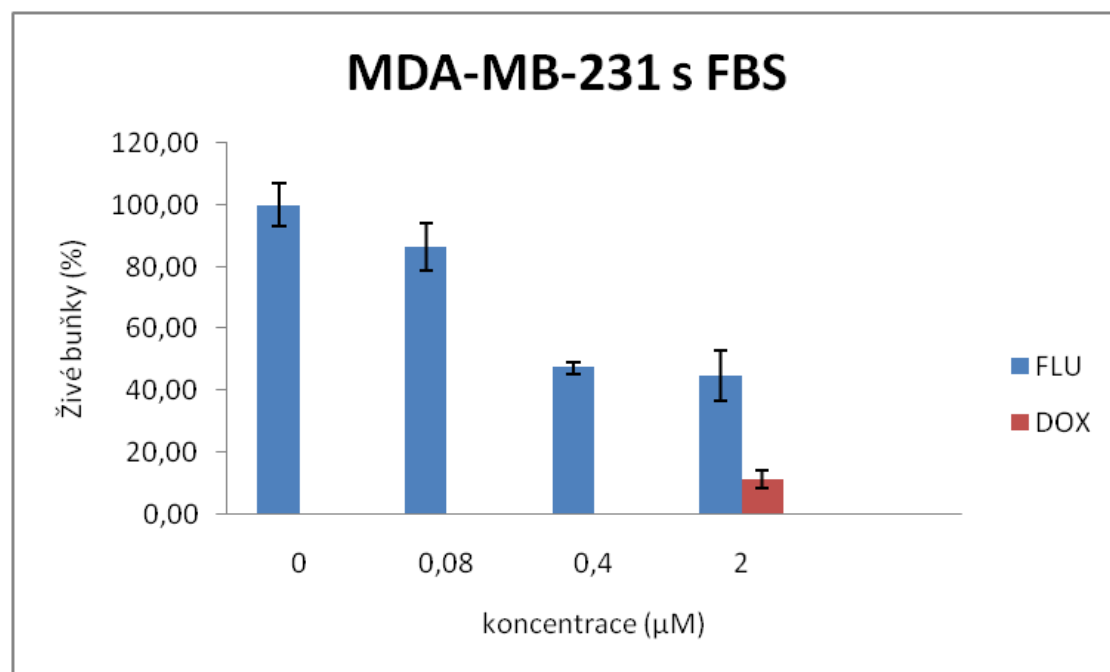
Obr. 18 Vliv FLU a DOX na životnost MDA-MB-231 buněk

Při použitých koncentracích FLU nedošlo k poklesu životnosti buněk MCF-7 na 50 %.

MDA-MB-231 s FBS

Tab. 10 Vliv FLU a DOX na životnost buněk MDA-MB-231 (s FBS)

koncentrace flubendazolu [μM]	koncentrace doxorubicinu [μM]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0,00	-	$0,18 \pm 0,01$	100 ± 7
0,08	-	$0,16 \pm 0,01$	86 ± 8
0,40	-	$0,09 \pm 0,00$	47 ± 2
2,00	-	$0,08 \pm 0,02$	45 ± 8
-	2,00	$0,02 \pm 0,01$	11 ± 3



Obr. 19 Vliv FLU a DOX na životnost MDA-MB-231 buněk

Přibližná hodnota IC_{50} FLU je $0,4 \mu\text{M}$. Použitá koncentrace DOX ($2 \mu\text{M}$) vedla ke snížení růstu buněk na 11%.

5.2.2 MTT TEST

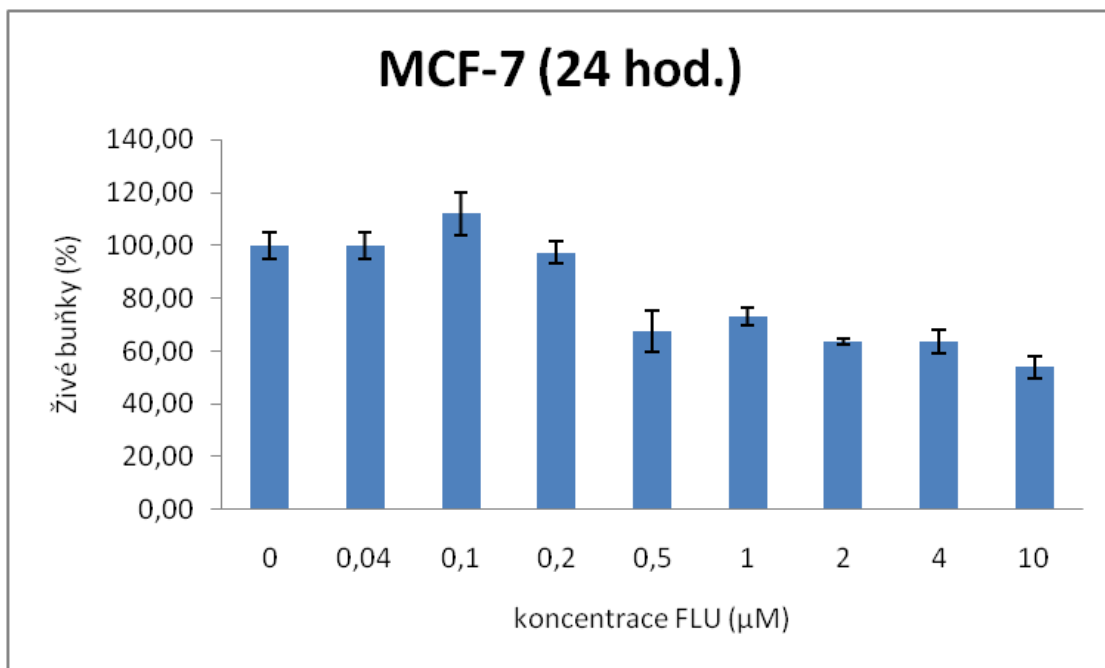
Cytotoxicita flubendazolu byla hodnocena pomocí metody MTT. Pomocí tohoto testu byl hodnocen cytosol izolovaný z buněk MCF-7, MCF-10A a MDA-MB-231. FLU byl použit v rozmezí koncentrací 0,04 μ M - 10 μ M. Životnost buněk byla hodnocena po 24hod a 48hod inkubace s FLU. Hodnoty IC₅₀, tedy hodnoty koncentrace, při kterých došlo k úmrtí 50% buněk, byly odhadnuty. Naměřené hodnoty byly zaznamenávány v grafech závislosti životnosti buněk [%] na koncentraci FLU [μ M].

Výsledky testu MTT jsou shrnuty v Tab. 11 - Tab. 16 spolu s odpovídajícími grafy, viz Obr. 20 - Obr. 25.

MCF-7 (vliv 24hod inkubace s FLU)

Tab. 11 Vliv 24hod. expozice flubendazolu na životnost MCF-7 buněk

koncentrace flubendazolu [μ M]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0	0,22 \pm 0,01	100 \pm 5
0,04	0,22 \pm 0,01	100 \pm 5
0,10	0,24 \pm 0,02	112 \pm 8
0,20	0,21 \pm 0,01	97 \pm 4
0,50	0,15 \pm 0,02	68 \pm 8
1,00	0,16 \pm 0,01	73 \pm 3
2,00	0,14 \pm 0,00	64 \pm 1
4,00	0,14 \pm 0,01	63 \pm 5
10,00	0,12 \pm 0,01	54 \pm 4



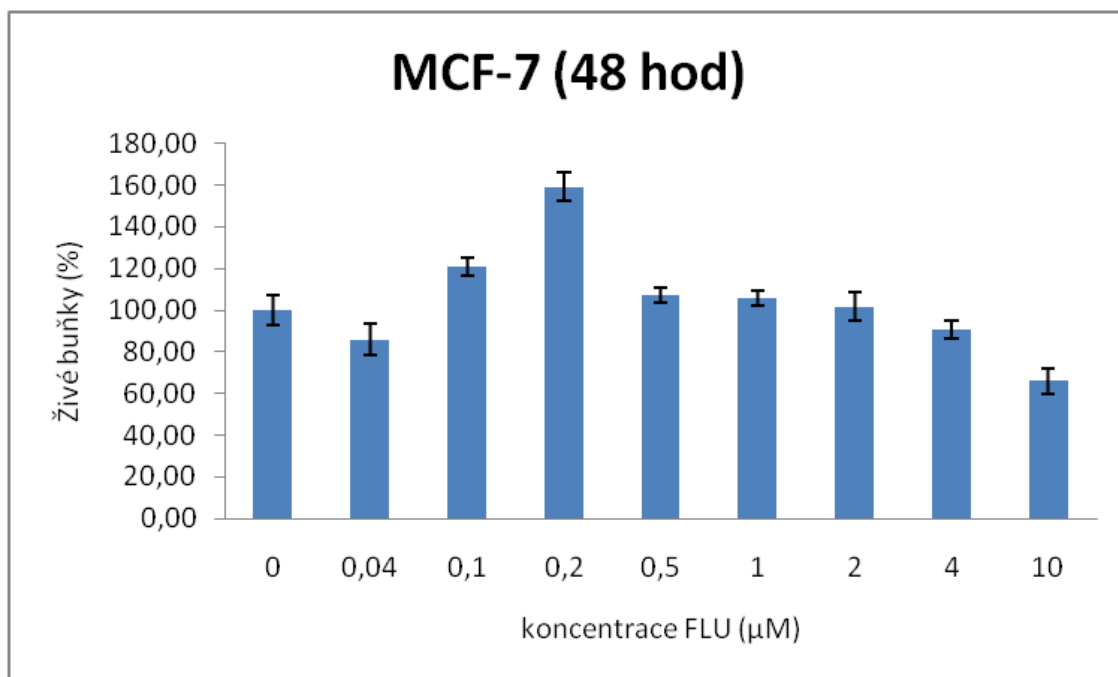
Obr. 20 Vliv 24hod. expozice FLU na životnost MCF-7 buněk

Při použití nižších koncentrací (0,04-0,1 μM) došlo k mírnému zvýšení proliferace buněk MCF-7. K výraznějšímu poklesu růstu došlo při vystavení buněk koncentraci 0,5 μM , další zvyšování koncentrace FLU proliferaci již příliš neovlivnilo.

MCF-7 (vliv 48hod inkubace s FLU)

Tab. 12 Vliv 48hod. expozice flubendazolu na životnost MCF-7 buněk

koncentrace flubendazolu [μM]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0	0,20 \pm 0,01	100 \pm 7
0,04	0,17 \pm 0,01	86 \pm 7
0,10	0,24 \pm 0,01	121 \pm 4
0,20	0,32 \pm 0,01	159 \pm 7
0,50	0,22 \pm 0,01	107 \pm 4
1,00	0,21 \pm 0,01	106 \pm 4
2,00	0,20 \pm 0,01	102 \pm 7
4,00	0,18 \pm 0,01	90 \pm 4
10,00	0,13 \pm 0,01	66 \pm 6



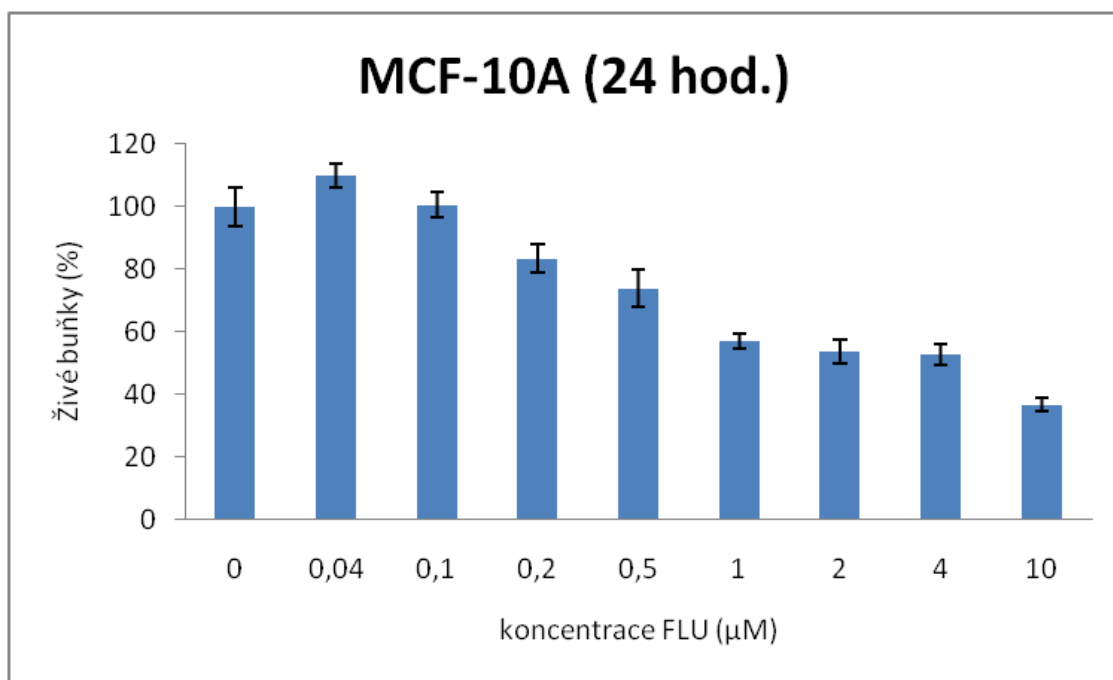
Obr. 21 Vliv 48hod. expozice FLU na životnost MCF-7 buněk

Po 48hod inkubaci buněk MCF 7 s FLU, došlo k výraznějšímu zvýšení růstu při koncentraci 0,2 μM . Výraznější pokles proliferace lze pozorovat až při použití nejvyšší testované koncentraci FLU (10 μM).

MCF-10A (vliv 24hod inkubace s FLU)

Tab. 13 Vliv 24hod. expozice flubendazolu na životnost MCF-10A buněk

koncentrace flubendazolu [μM]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0	$0,19 \pm 0,01$	100 ± 6
0,04	$0,20 \pm 0,01$	110 ± 4
0,10	$0,19 \pm 0,01$	101 ± 4
0,20	$0,15 \pm 0,01$	84 ± 4
0,50	$0,14 \pm 0,01$	74 ± 6
1,00	$0,11 \pm 0,00$	57 ± 2
2,00	$0,10 \pm 0,01$	54 ± 4
4,00	$0,10 \pm 0,01$	53 ± 3
10,00	$0,07 \pm 0,00$	37 ± 2



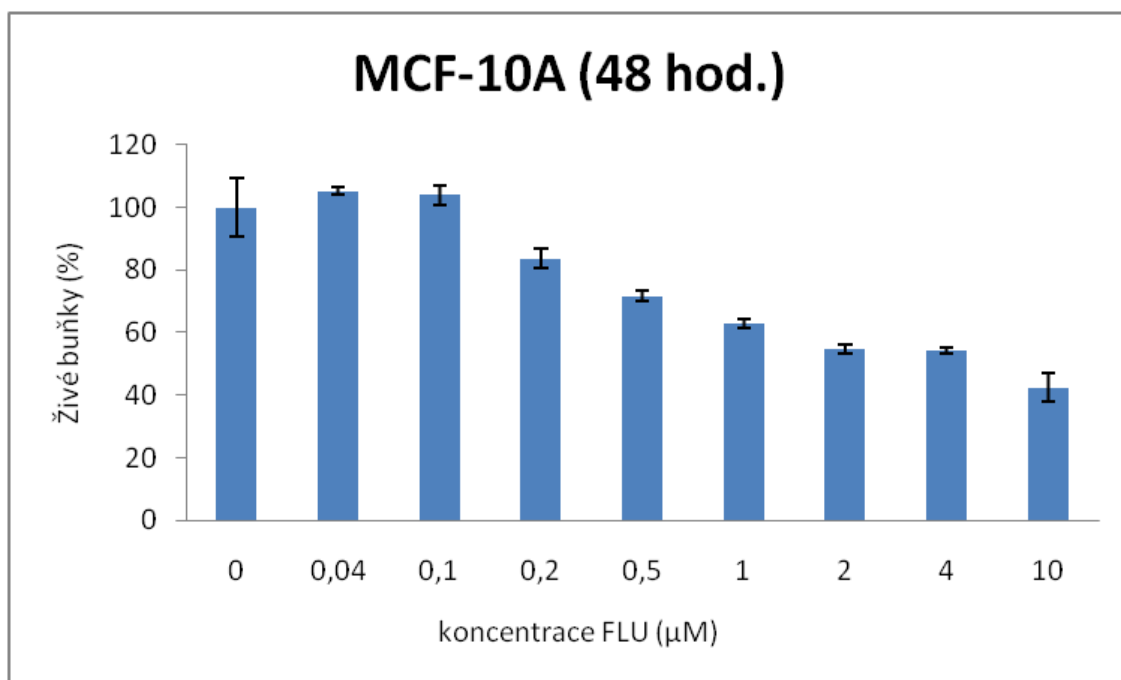
Obr. 22 Vliv 24hod. expozice FLU na životnost MCF-10A buněk

Nejnižší koncentrace FLU (0,04 μM a 0,1 μM) způsobila mírné zvýšení růstu buněk MCF-10A. Použití koncentrace 0,2 μM již vedlo ke snížení proliferace, která se vzrůstající koncentrací FLU klesala přibližně lineárně. Hodnota IC_{50} se nachází v rozmezí koncentrací 4 - 10 μM .

MCF-10A (vliv 48hod inkubace s FLU)

Tab. 14 Vliv 48hod. expozice flubendazolu na životnost MCF-10A buněk

koncentrace flubendazolu [μM]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0	$0,24 \pm 0,02$	100 ± 9
0,04	$0,25 \pm 0,00$	105 ± 1
0,10	$0,24 \pm 0,01$	104 ± 3
0,20	$0,20 \pm 0,02$	84 ± 3
0,50	$0,17 \pm 0,01$	72 ± 2
1,00	$0,15 \pm 0,00$	63 ± 1
2,00	$0,13 \pm 0,00$	55 ± 1
4,00	$0,13 \pm 0,01$	54 ± 1
10,00	$0,10 \pm 0,01$	42 ± 5



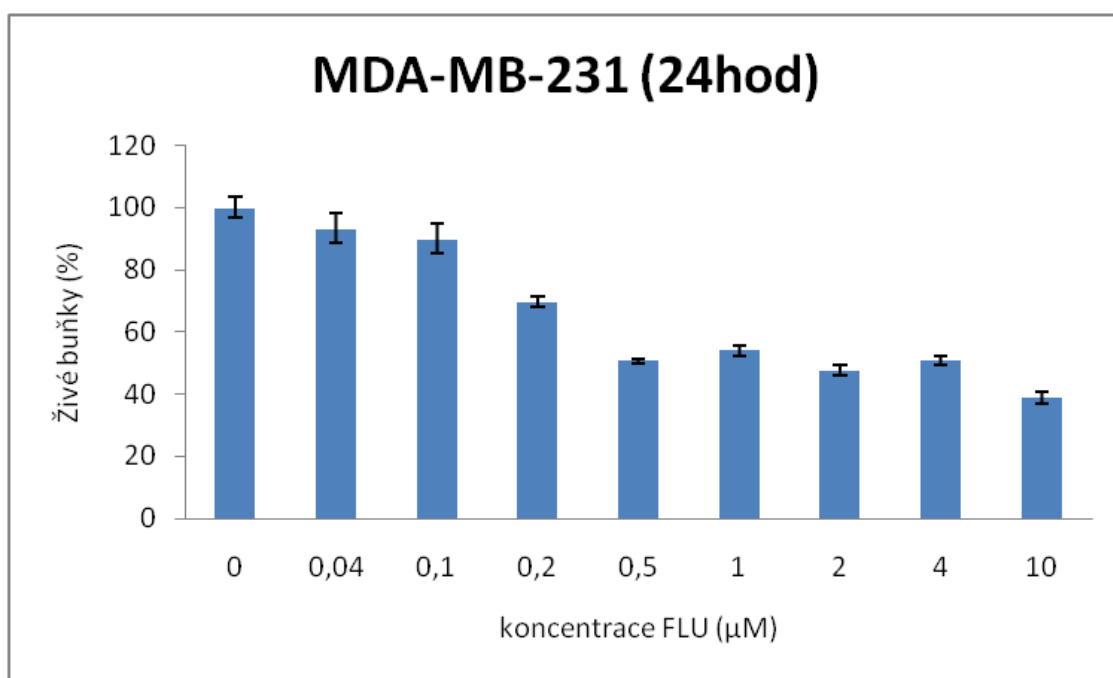
Obr. 23 Vliv 48hod. expozice FLU na životnost MCF-10A buněk

Nejnižší koncentrace FLU ($0,04 \mu\text{M}$ a $0,1 \mu\text{M}$) způsobila mírné zvýšení růstu buněk MCF-10A. Použití koncentrace $0,2 \mu\text{M}$ již vedlo ke snížení proliferace, která se vzrůstající koncentrací FLU klesala přibližně lineárně. Koncentrace potřebná k 50% inhibici proliferace se nachází v rozmezí koncentrací $4 - 10 \mu\text{M}$.

MDA-MB-231 (vliv 24hod inkubace s FLU)

Tab. 15 Vliv 24hod. expozice flubendazolu na životnost MDA-MB-231 buněk

koncentrace flubendazolu [μM]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0	$0,43 \pm 0,01$	100 ± 3
0,04	$0,40 \pm 0,02$	93 ± 5
0,10	$0,38 \pm 0,02$	90 ± 5
0,20	$0,30 \pm 0,01$	70 ± 2
0,50	$0,22 \pm 0,00$	51 ± 1
1,00	$0,23 \pm 0,01$	54 ± 2
2,00	$0,20 \pm 0,01$	48 ± 2
4,00	$0,22 \pm 0,01$	51 ± 2
10,00	$0,17 \pm 0,01$	39 ± 2



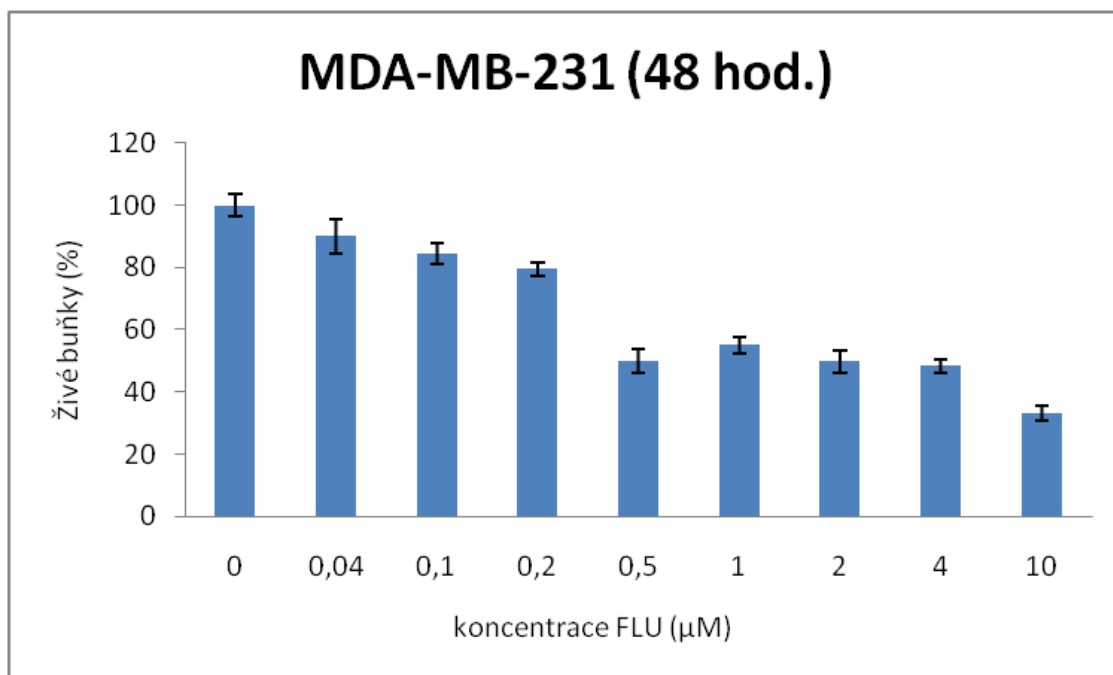
Obr. 24 Vliv 24hod. expozice FLU na životnost MDA-MB-231 buněk

U buněk MDA-MB-231 vedla již nejnižší použitá koncentrace FLU ($0,04 \mu\text{M}$) k inhibici růstu. K výraznějšímu poklesu vedlo použití koncentrací $0,2 \mu\text{M}$ a $0,5 \mu\text{M}$.

MDA-MB-231 (vliv 48hod inkubace s FLU)

Tab. 16 Vliv 48hod. expozice FLU na životnost MDA-MB-231 buněk

koncentrace flubendazolu [μM]	absorbance \pm s. d.	životnost buněk %
0	$0,55 \pm 0,02$	100 ± 3
0,04	$0,49 \pm 0,03$	90 ± 5
0,10	$0,46 \pm 0,02$	84 ± 3
0,20	$0,43 \pm 0,01$	80 ± 2
0,50	$0,27 \pm 0,02$	50 ± 4
1,00	$0,30 \pm 0,01$	55 ± 3
2,00	$0,27 \pm 0,02$	50 ± 4
4,00	$0,26 \pm 0,01$	48 ± 2
10,00	$0,18 \pm 0,01$	33 ± 2



Obr. 25 Vliv 48hod. expozice FLU na životnost MDA-MB-231 buněk

U buněk MDA-MB-231 vedla již nejnižší použitá koncentrace FLU ($0,04 \mu\text{M}$) k inhibici růstu. Výraznější pokles způsobila koncentrace $0,5 \mu\text{M}$. Nejvyšší použitá koncentrace FLU ($10 \mu\text{M}$) snížila proliferaci buněk téměř o 70%.

5.2.3 RTCA (XCELLIGENCE) TEST

Proliferace buněk byla stanovena pomocí přístroje xCELLigence. Princip metody je založený na měření impedance, jejíž změna je vyjádřena jako buněčný index (CI). Buňky byly nasazeny v 16-ti jamkových destičkách, pokrytých zlatými elektrodami. Čím silněji buňky adherují, nebo čím více buněk je přisedlých na dně jamky, tím vyšší impedanci, tedy CI přístroj naměří (Vondráčková et al, 2010). Změna CI byla sledována u buněk MCF-7 a MDA-MB-231 po dobu 48 hod po přidání flubendazolu v koncentracích 0-10 μ M.

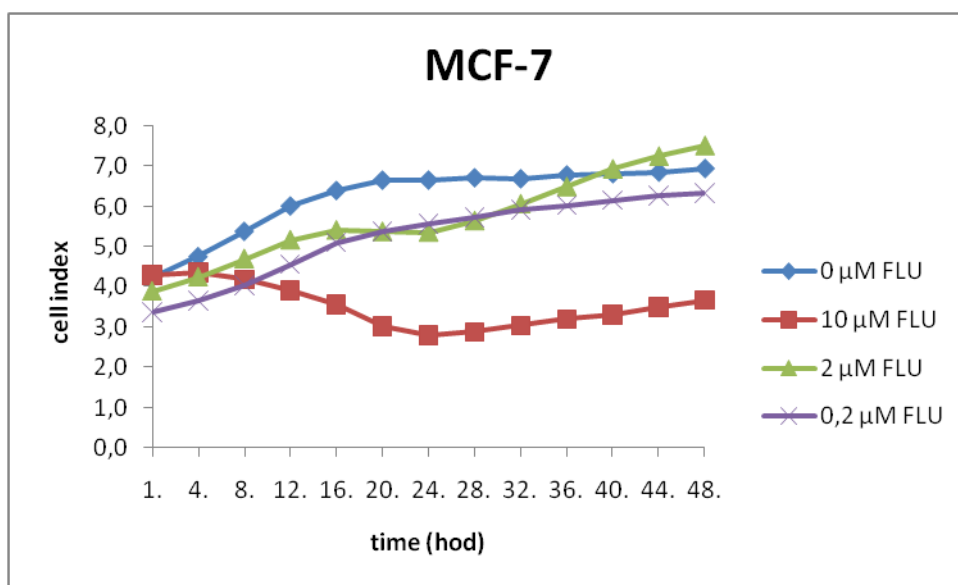
MCF-7

Tab. 17 Vliv FLU na životnost buněk MCF-7 (impedance)

Čas	impedance			
	0 μ M FLU	0,2 μ M FLU	2 μ M FLU	10 μ M FLU
1.	4,22	4,29	3,89	3,38
4.	4,75	4,36	4,25	3,68
8.	5,38	4,19	4,70	4,05
12.	6,01	3,92	5,17	4,58
16.	6,39	3,57	5,41	5,11
20.	6,65	3,03	5,38	5,39
24.	6,65	2,80	5,36	5,58
28.	6,71	2,88	5,65	5,73
32.	6,69	3,05	6,07	5,92
36.	6,78	3,20	6,49	6,03
40.	6,81	3,32	6,93	6,16
44.	6,85	3,50	7,25	6,27
48.	6,94	3,68	7,52	6,34

Tab. 18 Vliv FLU na životnost buněk MCF-7 (%)

Čas	%			
	0 μM FLU	0,2 μM FLU	2 μM FLU	10 μM FLU
1.	100,00	80,09	92,20	101,55
4.	100,00	89,39	89,39	91,79
8.	100,00	87,35	87,35	77,85
12.	100,00	86,01	86,01	65,17
16.	100,00	84,65	84,65	55,83
20.	100,00	80,83	80,83	45,53
24.	100,00	80,60	80,60	42,11
28.	100,00	84,11	84,11	42,93
32.	100,00	90,73	90,73	45,59
36.	100,00	95,77	95,77	47,22
40.	100,00	101,75	101,75	48,76
44.	100,00	105,87	105,87	51,08
48.	100,00	108,29	108,29	52,96

**Obr. 26** Vliv FLU na životnost buněk MCF-7

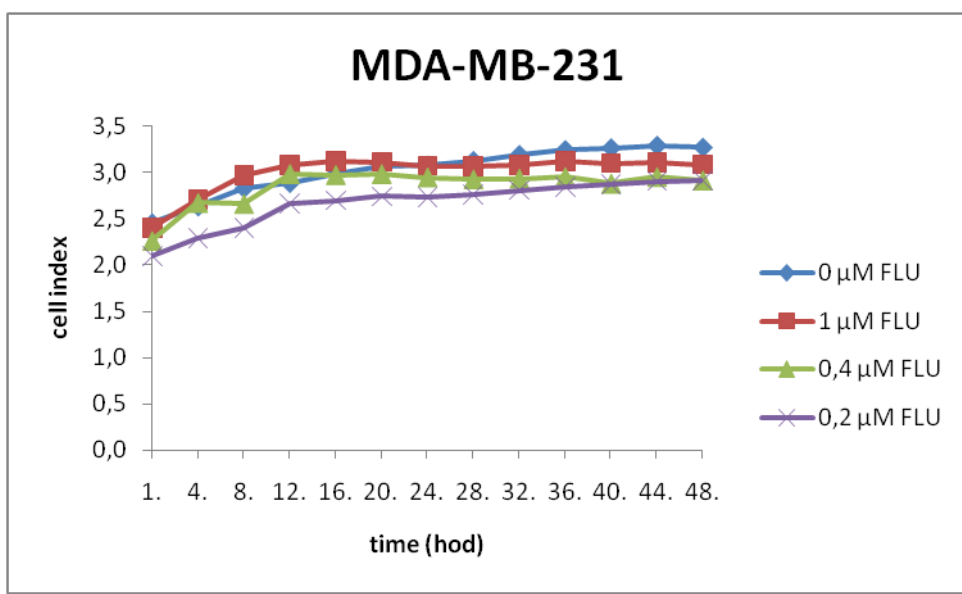
Po přidání FLU v koncentraci 0,2 μM k buňkám MCF-7 nedošlo k žádným signifikantním změnám oproti kontrole, kde můžeme pozorovat po mírném počátečním vzrůstu proliferace stagnaci růstu buněk. Použití FLU v koncentraci 2 μM a 10 μM způsobilo pokles proliferace buněk, následovaný jejím vzrůstem, při použití vyšší koncentrace můžeme pozorovat výraznější snížení počtu buněk.

MDA-MB-231**Tab. 19** Vliv FLU na životnost buněk MDA-MB-231 (impedance)

Čas	impedance			
	0 μM FLU	0,2 μM FLU	0,4 μM FLU	1,0 μM FLU
1.	2,45	2,09	2,27	2,40
4.	2,63	2,29	2,67	2,70
8.	2,83	2,40	2,66	2,97
12.	2,89	2,66	2,98	3,08
16.	2,99	2,70	2,97	3,12
20.	3,07	2,74	2,98	3,11
24.	3,08	2,73	2,95	3,07
28.	3,13	2,76	2,93	3,07
32.	3,20	2,81	2,93	3,08
36.	3,25	2,85	2,95	3,12
40.	3,27	2,87	2,88	3,10
44.	3,29	2,91	2,95	3,11
48.	3,27	2,91	2,92	3,09

Tab. 20 Vliv FLU na životnost buněk MDA-MB-231 (%)

Čas	%			
	0 μM FLU	0,2 μM FLU	0,4 μM FLU	1,0 μM FLU
1.	100,00	85,28	92,41	97,95
4.	100,00	87,10	101,61	102,74
8.	100,00	84,88	94,16	104,91
12.	100,00	92,28	103,41	106,72
16.	100,00	90,28	99,46	104,46
20.	100,00	89,37	97,31	101,51
24.	100,00	88,64	95,71	99,79
28.	100,00	88,13	93,55	98,02
32.	100,00	87,83	91,83	96,51
36.	100,00	87,62	90,87	95,98
40.	100,00	87,85	88,17	94,87
44.	100,00	88,22	89,63	94,36
48.	100,00	89,03	89,07	94,32



Obr. 27 Vliv FLU na životnost buněk MDA-MB-231

Po přidání FLU v koncentracích 0,2μM, 0,4μM a 1μM k buňkám MDA-MB-231 v průběhu jejich růstu za stálého monitorování došlo ke stagnaci buněčné proliferace, stejně jako v případě kontroly, tedy bez přidání FLU.

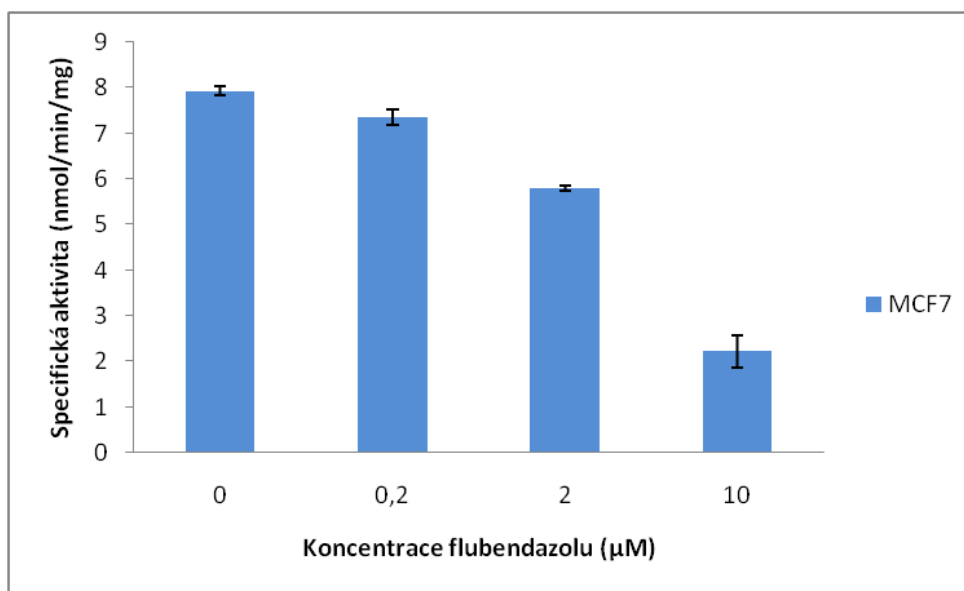
5.3 VLIV FLU NA AKTIVITU AND

Vliv FLU na aktivitu AND byl hodnocen spektrofluorimetry. Byl sledován inhibiční účinek FLU v cytosolu buněk izolovaných z MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231 a EST v koncentracích 0,2 μ M, 2 μ M a 10 μ M. V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky měření enzymové aktivity a specifické aktivity při oxidaci AcNOH. Rozdíly v aktivitě AND byly statisticky zhodnoceny nepárovým Studentovým t-testem. Byla prokazována hypotéza (se spolehlivostí 0,95), že aktivita AND v cytosolu z jednotlivých buněčných linií po přidání FLU je významně nižší než v cytosolu s nulovou koncentrací FLU.

MCF-7

Tab. 21 Specifická aktivita AND ve vzorcích cytosolu buněk MCF-7

koncentrace flubendazolu [μ M]	koncentrace aktivity [nmol/min/ml] \pm S. D.	specifická aktivita \pm s.d. (nmol/min/mg)
0	10,87 \pm 0,13	7,94 \pm 0,09
0,2	10,08 \pm 0,23	7,36 \pm 0,17
2,0	7,94 \pm 0,09	5,80 \pm 0,07
10,0	3,05 \pm 0,49	2,23 \pm 0,36



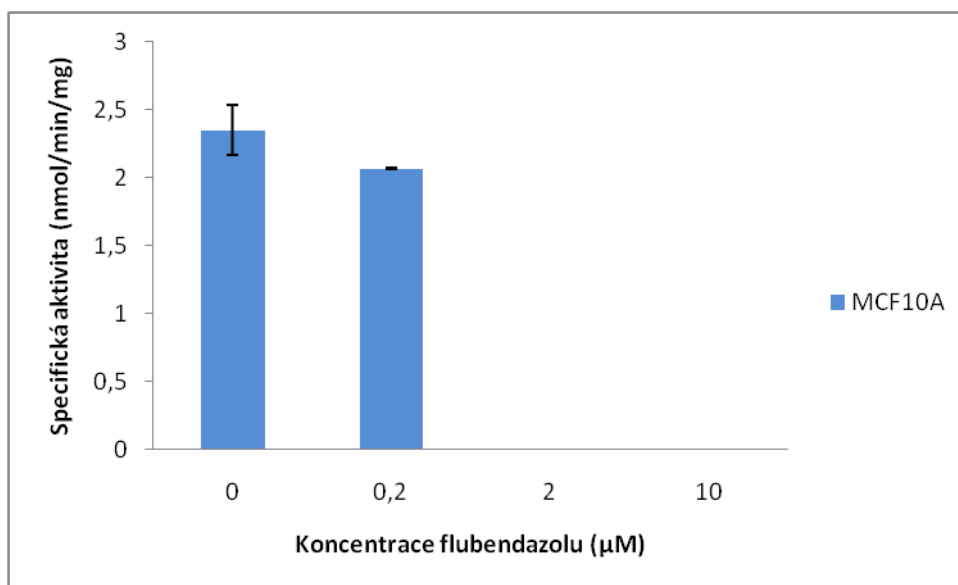
Obr. 28 Vliv FLU na specifickou aktivitu buněk MCF-7

Při testování vlivu FLU na aktivitu AND došlo při nejnižší použité koncentraci (0,2 μ M) k mírnému, ale statisticky významnému poklesu aktivity. FLU v koncentraci 10 μ M snížil aktivitu AND o více jak 70%.

MCF-10A

Tab. 22 Specifická aktivita AND ve vzorcích cytosolu buněk MCF-10A

koncentrace FLU [μM]	koncentrace aktivity [nmol/min/ml] \pm S. D.	specifická aktivita \pm s.d. (nmol/min/mg)
0	0,65 \pm 0,05	2,35 \pm 0,19
0,2	0,59 \pm 0,03	2,07 \pm 0,00
2,0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
10,0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00



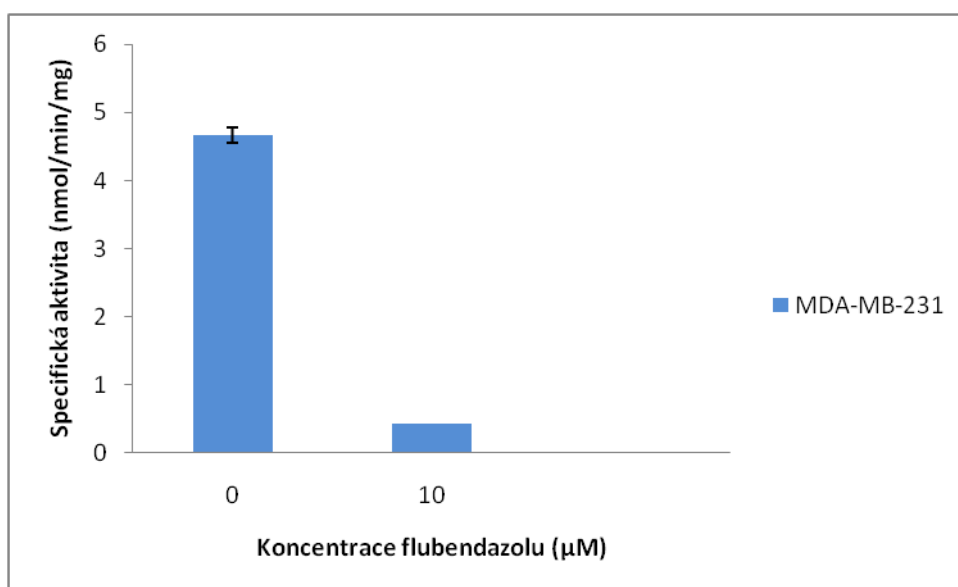
Obr. 29 Vliv FLU na specifickou aktivitu buněk MCF-10A

Aktivita AND byla v cytosolu buněk MCF10A výrazně nižší než v cytosolu buněk MCF7. Při testování vlivu FLU na aktivitu AND došlo při nejnižší použité koncentraci (0,2 μM) k mírnému, ale statisticky významnému poklesu aktivity. FLU v koncentraci 2 μM a 10 μM zcela inhiboval aktivitu AND.

MDA-MB-231

Tab. 23 Specifická aktivita AND ve vzorcích cytosolu buněk MDA-MB-231

koncentrace FLU [μM]	koncentrace aktivity [nmol/min/ml] \pm S. D.	specifická aktivita \pm s.d. (nmol/min/mg)
0	5,47 \pm 0,14	4,67 \pm 0,12
10,0	0,50 \pm 0,00	0,42 \pm 0,00



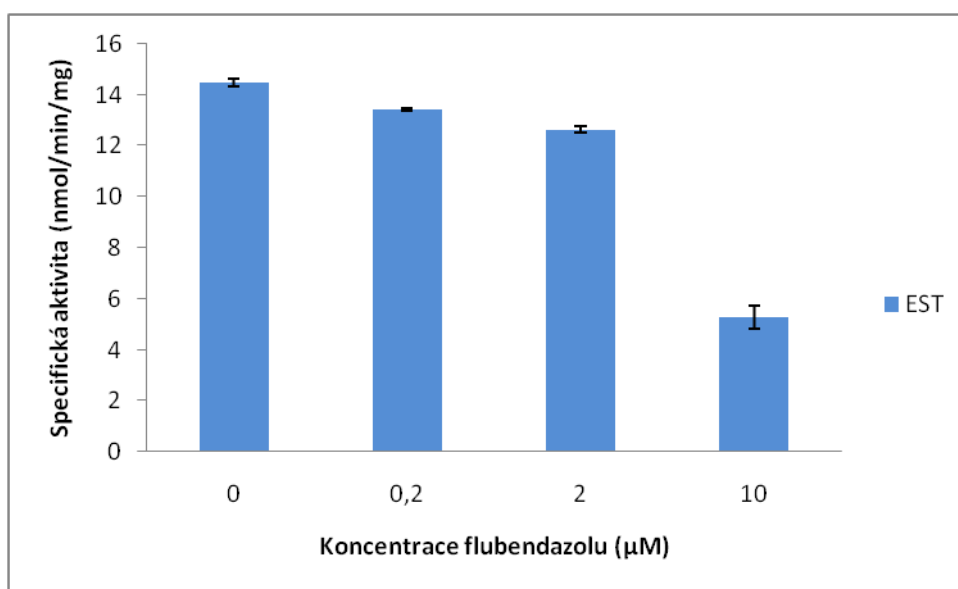
Obr. 30 Vliv FLU na specifickou aktivitu buněk MDA-MB-231

V cytosolu buněk MDA-MB-231 byl testován inhibiční účinek FLU pouze v koncentraci 10 μM . FLU v této koncentraci významně snížil aktivitu AND.

EST

Tab. 24 Specifická aktivita acenaftenoldehydrogenasy ve vzorcích cytosolu buněk EST

koncentrace FLU [μM]	koncentrace aktivity [nmol/min/ml] \pm S. D.	specifická aktivita \pm s.d. (nmol/min/mg)
0	166 \pm 2	14 \pm 0
0,2	154 \pm 0	13 \pm 0
2,0	145 \pm 2	13 \pm 0
10,0	60 \pm 5	5 \pm 0



Obr. 31 Vliv FLU na specifickou aktivitu buněk EST

Cytosol EST vykazoval vysokou specifickou aktivitu AND. Při testování vlivu FLU na aktivitu AND došlo již při nejnižší použité koncentraci (0,2 μM) k mírnému, ale statisticky významnému poklesu aktivity. FLU 10 μM výrazně inhiboval AND.

6 DISKUZE

Benzimidazolová anthelmintika jsou široce využívaná léčiva ve veterinární a humánní medicíně, vykazují vysokou účinnost proti řadě parazitů, jako jsou hlístice, motolice a tasemnice (Robinson et al, 2004). Schopnosti BZM poškozovat strukturu mikrotubulů, vedly k rozvoji zájmu o tyto sloučeniny na úrovni hledání látek s protinádorovou aktivitou (Pourgholami et al, 2005). V roce 2010 byla zjištěna u FLU významná antileukemická a antimyelomová aktivita. FLU pozměňuje strukturu mikrotubulů a inhibuje polymerizaci tubulinu interakcí s vazebným místem podobným kolchicinu a působí odlišným mechanismem od vinka alkaloidů. (Spagnuolo et al, 2010). Tzv. „kolchicinová“ doména je lokalizována v prostoru mezi α - a β - tubulinem. *In vitro* bylo prokázáno, že 2-methoxyestradiol, metabolit estradiolu, který je schopen vazby s touto kolchicinovou doménou působí inhibičně na růst nádorových buněk. Důležitým faktorem, určujícím odpověď na antimitotická léčiva, je kromě zastoupení jednotlivých isoform tubulinu také množství polymerizovaného tubulinu v buňce spolu s rozdílnou expresí proteinů asociovaných s mikrotubuly, které regulují mikrotubulární dynamiku při interakci tubulinu s mikrotubuly (McGrogan, 2007). Léčiva zasahující do systému mikrotubulů, jako jsou právě vinka alkaloidy nebo taxany, jsou součástí základní chemoterapie využívané při léčbě rakoviny prsu.

Rychlé a přesné zhodnocení počtu životaschopných buněk a buněčné proliferace je nezbytným krokem v toxikologických testech pro určení cytostatické aktivity potenciálních protinádorových látek. Hlavním cílem předložené práce bylo zjistit, zda FLU inhibuje proliferaci prsních nádorových buněk. Byl sledován vliv FLU na růst buněk prsních nádorových linií MCF-7 a MDA-MB-231 a prsní nenádorové linie MCF-10A. Pro stanovení antiproliferačního vlivu FLU byly použity testy životnosti NRU, MTT a kontinuální sledování buněčné proliferace pomocí systému xCelligence. Výsledky poukázaly na rozdílný antiproliferační efekt FLU v různých prsních buněčných liniích. U buněk MCF-7 v testech NRU a MTT byl účinek FLU slabší a inhibice růstu nedosáhla 50% ani při nejvyšší testované koncentraci FLU (10 μ M). Proliferace buněk MCF-10A a MDA-MB-231 působením 10 μ M FLU klesla výrazněji. U buněk MCF-10A bylo IC₅₀ dosaženo koncentrací FLU 4-10 μ M, u buněk MDA-MB-231 byla IC₅₀ přibližně 0,5 μ M FLU. Tato hodnota je srovnatelná s hodnotami zjištěnými v myelomových buněčných liniích, avšak je výrazně vyšší než

IC₅₀ FLU v leukemických buňkách (Spagnuolo et al. 2010). Inhibice proliferace buněk linie MCF-10A je nežádoucí, na tomto jevu by se mohly podílet malé rozdíly v zastoupení jednotlivých isotypů β -tubulinu v prsní nádorové a nenádorové tkáni. Rozdílný antiproliferativní vliv FLU na prsní nádorové a leukemické buňky by mohl být způsoben odlišným zastoupením jednotlivých isotypů β -tubulinu v daných tkáních, v prsní tkáni je přítomen hlavně β -tubulin třídy II, hematospecifické β -tubuliny patří do třídy VI (Dozier, 2003). Při použití vyšší koncentrace FLU nedocházelo již k významnějšímu poklesu životnosti buněk, což je zřejmě způsobeno tím, že snížení buněčné proliferace navozené zásahem do mikrotubulů dochází pouze u buněk, které se nacházejí ve fázi růstu. V experimentu hodnoceném systémem xCelligence nebyla prokázána významná inhibice růstu FLU v buněčných liniích MCF-7 a MDA-MB-231. Pouze u buněk MCF-7, nejvyšší koncentrace FLU (10 μ M) vedla ke snížení proliferace. Výhodou systému xCelligence je jeho neinvazivní charakter sledování chování buněk a možnost kontinuálního sledování životnosti v čase. Vzhledem k tomu, že přístroj xCelligence měří elektrický odpor buněk na dně jamek, může dojít k tomu, že mrtvé buňky zůstanou přisedlé a budou imitovat buňky živé.

V další části práce byl testován účinek FLU na enzymy podílející se na syntéze estradiolu. U hormon-dependentních forem karcinomu prsu lze využít hormonální léčbu, která u části nemocných po čase selhává. Z tohoto důvodu je snaha hledat další účinné kombinace látek. Proliferace prsních nádorových buněk je závislá na přítomnosti aktivních estrogenů. Na základě tohoto poznatku jsou intenzivně studovány metabolické pochody vedoucí k ovlivnění hladiny steroidních hormonů v prsní tkáni.

Důležitou roli při vzniku a progresi karcinomu prsu hraje biosyntéza estrogenů *in situ*. Jednu z cest lokální konverze představuje přeměna neaktivního estronu na aktivní 17 β -estradiol pomocí AKR1C3. Tento enzym je lokalizován v cytosolu a patří do nadrodiny AKR, NAD(P)H-dependentních převážně monomerních oxidoreduktas se širokou substrátovou specifitou (Strnad a Daneš, 2001; Bauman et al, 2004). Protože molekula FLU obsahuje karbonylovou skupinu a I. fáze biotransformace zahrnuje kromě hydrolýzy karbamátové skupiny také redukci karbonylové skupiny, mohlo by toto léčivo být substrátem enzymů z nadrodiny AKR, popřípadě tyto enzymy ovlivňovat. Běžně používaným substrátem při studiu AKR1C je AcNOH, který lze tedy použít při testování enzymu AKR1C3, podílejícího se na přeměně estrogenů v prsní tkáni (Brožič et al, 2009). Vzhledem k tomu, že buněčný cytosol představuje multienzymový systém, bylo nutné předpokládat, že na přeměně AcNOH se mohou

podílet i další enzymy. Proto bylo pro všechny enzymy podílejících se na přeměně AcNOH zvoleno označení acenaftenoldehydrogenasy (AND). V naší práci jsme zjišťovali vliv FLU na aktivitu AND v cytosolu z homogenátu buněk MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231 a EST. Aktivita AND byla stanovována metodou kontinuálního měření přírůstku fluorescence NADPH při redukci NADP^+ během enzymatické přeměny AcNOH. Spektrofluorimetrie byla zvolena na základě vyšší citlivosti oproti běžně využívané spektrofotometrii. Nejvyšší specifická aktivita AND byla naměřena v buňkách EST, naopak nejnižší aktivita v buňkách MCF-10A. K mírné, ale statisticky významné inhibici AND docházelo v buňkách MCF-7, MCF-10A a EST již při použití nejnižší koncentrace FLU ($0,2 \mu\text{M}$). FLU v koncentraci $2 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$ v buněčné linii MCF-10A zcela inhiboval aktivitu AND. U buněk MDA-MB-231 byla testována pouze koncentrace FLU $10 \mu\text{M}$ a došlo k významnému snížení aktivity AND. FLU tedy lze považovat za inhibitor AND. Ovšem to, zda FLU opravdu inhibuje syntézu estradiolu, bude třeba ověřit přímým stanovením estradiolu v buňkách např. pomocí HPLC nebo LC-MS.

FLU se velmi slabě vstřebává ze zažívacího ústrojí a z plazmy je rychle eliminován. Perorálně podaný FLU by mohl být účinný především v gastrointestinálním traktu, proto se nyní zkouší antiproliferační vliv FLU na střevních nádorových buňkách.

7 ZÁVĚR

Výsledky rigorózní práce lze shrnout do následujících bodů:

- FLU vykazoval v testech životnosti na prsních buněčných liniích rozdílný antiproliferativní účinek. U buněk MCF-7 nedosáhla inhibice růstu 50% ani při nejvyšší testované koncentraci FLU (10 μ M). U buněk MCF-10A bylo IC₅₀ dosaženo koncentrací FLU 4-10 μ M, u buněk MDA-MB-231 byla IC₅₀ přibližně 0,5 μ M FLU.
- Při kontinuálním sledování buněčné proliferace pomocí systému xCelligence se antiproliferativní účinek FLU se vůči buňkám MDA-MB-231 neprojevil, vůči buňkám MCF-7 pouze při použití nejvyšší koncentrace FLU (10 μ M).
- Při sledování vlivu FLU na aktivitu AND v cytosolu z homogenátu buněk MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231 a EST byl pozorován statisticky významný inhibiční účinek FLU na aktivitu AND ve všech testovaných buněčných liniích.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABZ	albendazol
AcNOH	acenaftenol
AKR	aldoketoreduktasa
AND	acenaftenoldehydrogenasa
BZM	benzimidazol
CBR	karbonylreduktasy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
ER	estrogenový receptor
FLU	flubendazol
HER	receptor pro lidský epidermální růstový faktor
HIF	hypoxický inducibilní faktor
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasy
IFG-1	insulinu podobný růstový faktor
MBZ	mebendazol
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NADPH	redukováná forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu
NRU	Neutral Red Uptake Test
PDGF	destičkový růstový faktor
PG	prostaglandin
PR	progesteronový receptor
RTCA	Real Time Cell Analyzer
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
TGF	transformující růstový faktor
VBL	vinblastin
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

9 POUŽITÉ ZDROJE

ABRAHÁMOVÁ, J.; POVÝŠIL, C.; HORÁK, J. *Atlas nádorů prsu*. 1. vydání. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-771-0

ABRAHÁMOVÁ, J. a kol. *Co byste měli vědět o rakovině prsu*. 1. vydání. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3063-9

ADAM, Z.; KREJČÍ, M.; VORLÍČEK, J. *Obecná onkologie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-715-8

BANERJE, A. *Increased levels of tyrosinated α -, β III-, and β IV-tubulinisotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002, 293, s. 598-601

BARSKI, O. A.; TIPPARAJU, S. M.; BHATNAGAR, A. *The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification*. *Drug Metabolism Reviews*. 2008, 40, s. 553-624

BAUMAN, D. R.; STECKELBROECK, S.; PENNING, T. M. *The Roles of Aldo-Keto Reductases in Steroid Hormon Action*. *Drug News Perspect*. 2004, 17, 9, s. 563-577

DOZIER, J. H.; HISER, L.; DAVIS, J. A.; THOMAS, N. S.; TUCCI, M. A.; BENGHUZZI, H. A.; FRANKFURTER, A.; CORREIA, J.; LOBERT, S. *Beta class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues*. *Breast Cancer Research*. 2003, 5, 5, s. R157-169

BROŽIČ, P.; CESAR, J.; KOVAČ, A.; DAVIES, M.; JOHNSON, A. P.; FISHWICK, C. W. G.; RIŽNER, T. L.; GOBEC, S. *Derivatives of pyrimidine, phthalimide and anthranilic acid as inhibitors of human hydroxysteroid dehydrogenase AKR1C1*. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, 178, 1-3, s. 158-164

FENG, R.; RIOS, A. J.; ONISHI, T.; LOKSHIN, A.; GORELIK, E.; LENTZSCH, S. *Cell-based and cytokine-directed chemical screen to identify potential anti-multiple myeloma agents*. 2010, 34,7, s. 917-924

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*. Toxicology Letters. 2005, 160, s. 171-177

GAVELOVÁ, M.; HLADÍKOVÁ, J.; VILDOVÁ, L.; NOVOTNÁ, R.; VONDRÁČEK, J.; KRČMÁŘ, P.; MACHALA, M.; SKÁLOVÁ, L. *Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells*. Chemico-Biological Interactions. 2008, 176, 1, s. 9-18

GOBEC, S.; BROŽIČ, P.; RIŽNER, T. L. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3 : New lead compounds for the development of anticancer agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2005, 15, 23, s. 5170-5175

HAIT, W. N.; RUBIN, E.; ALLI, E.; GOODIN, S. *Tubulin Targeting Agents*. Cancer Therapeutics. 2007, 2, 1, s. 1-18

HAO, D.; RIZZO, D. J.; STRINGER, S.; MOORE, V. R.; MARTY, J.; DEXTER, D. L.; MANGOLD, G. L.; CAMDEN, J. B.; VON HOFF, D. D.; WEITMEN, S. D. *Preclinical antitumor activity and pharmacokinetics of methyl-2-benzimidazolecarbamate (FB642)*. Investigational New Drugs. 2002, 20, s. 261-270

HOLÝ, A. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2004. ISBN 80-244-0855-4

JASMER, D. P.; YAO, CH.; REHMAN, A.; JOHNSON, S. *Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode Haemonchus contortus*. Molecular and Biochemical Parasitology. 2000, 105, s. 81-90

KATES, K. C.; COLGLAZIER, M. L.; ENZIC, F. D.; LINDAHL, I. L.; SAMUELSON, G. *Comparative activity of thiabendazole, levamisole and parbendazole against natural infections of helminths in sheep*. The Journal of Parasitology. 1971, 57, 2, s. 356-362

KATZUNG, B. G et al. *Základní a klinická farmakologie*. Praha: H&H, 1994. ISBN 80-85787-35-0

KLENER, P. *Základy klinické onkologie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-7262-716-5

KLENER, P. *Protinádorová chemoterapie*. 1. vydání. Praha: Grada, 1996. ISBN 80-85824-36-1

KÖHLER, P. *The biochemical basis of anthelmintic action and resistance*. International Journal for Parasitology. 2001, 31, s. 336-345

KŘÍŽOVÁ-FORSTOVÁ, V.; LAMKA, J.; CVILINK, V.; HANUŠOVÁ, V.; SKÁLOVÁ, L. *Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: The consequences and potential risks*. Research in Veterinary Science. *In Press*, 2011

LAMPO, A.; VANPARYS, P.; VAN CAUTEREN, H. *Report on the Safety Documentation of Flubendazole*. Janssen Research Foundation, Beerse. 1996, s. 1–29.

LARYEA, D.; GULLBOA, J.; ISAAKSON, A.; LARSSON, R.; NYGREN, P. *Characterization of the cytotoxic properties of the benzimidazole fungicides, benomyl and carbendazim, in human tumor cell lines and primary cultures of patient tumor cells*. Anticancer Drugs. 2010, 21, 1, s. 33-42

LIO, S. C.; JOHNSON, J.; CHATTERJEE, A.; LUDWIG, J. W.; MILLIS, D.; BANIE, H.; SIRCAR, J. C.; SINHA, A.; RICHARDS, M. L. *Disruption of Golgi processing by 2-phenyl benzimidazole analogs blocks cell proliferation and slows tumor growth*. Cancer Chemother Pharmacol. 2008, 61, s. 1045-1058

MARTIN, R. J. *Modes of Action of Anthelmintic Drugs*. The Veterinary Journal, 1997, 154, s. 11 – 34

MASER, E. *Carbonyl reductases/ steroid dehydrogenases: Biology, classification and implication in drug metabolism and detoxification*. Toxicology Letters. 2010, 196, Supplement 1, s. S9-S10

MASTERS, J. R. W. *Human cancer cell lines: fact and fantasy*. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2000, 1, s. 233-236

MATSUNAGA, T.; SHINTANI, S.; HARA, A. *Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds*. Drug Metab. Pharmacokinet. 2006, 21, s. 1-18

McGROGAN, B.; GILMARTIN, B.; CARNEY, D. N.; Mc CANN, A. *Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer*. Biochimica et Biophysica Acta. 2008, 1785, 2, s. 96-132

MOELLER, G.; ADAMSKI, J. *Integrated view on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases*. Molecular and Cellular Endocrinology. 27 October 2008, 301, s. 7-19

MUKHOPADHYAY, T.; SASAKI, J.; RAMESH, R.; ROTH, J. *Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo*. Clinical Cancer Research. 2002, 8, s. 2963-2969

NEČAS, O.; BÁRTEK, J.; HAŠEK, J.; STREIBLOVÁ, E.; VIKLICKÝ, V. *Cytoskelet*. 1. vydání. Praha: Academia, 1991. ISBN 80-200-0116-6

NOBILIS, M.; JIRA, T.; LÍSA, M.; HOLČAPEK, M.; SZOTÁKOVÁ, B.; LAMKA, J.; SKÁLOVÁ, L. *Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices using UV photodiode-array and mass spectrometric detection*. A Journal of Chromatography. 2007, 1149, 1, s. 112-120

NOGALES, E.; WOLF, S. G.; DOWNING, K. D. *Structure of the tubulin dimer by electron crystallography*. Nature. 1998, 391, s. 199-203

OPPERMANN, U. *Carbonyl Reductases: The Complex Relationships of Mammalian Carbonyl- and Quinone- Reducing Enzymes and Their Role in Physiology*. The Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2007, 47, s. 293-322

PENNING, T. M.; BURCZYNSKI, M. E.; JEZ, J. M.; HUNG, Ch.; LIN, H.; MA, H.; MOORE, M.; PALACKAL, N.; RATNAM, K. *Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1 – AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily : functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones*. Biochemical Journal. 2000, 351, s. 67-77

POJAROVÁ, M.; KAUFMANN, D.; GASTPAR, R.; NISHINO, T.; RESZKA, P.; BEDNARSKI, P. J.; ANGERER, E. *[(2-Phenylindol-3-yl)methylene]propanedinitriles inhibit the growth of breast cancer cells by cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, 15, 23, s. 7368-7379

POURGHOLAMI, M. H.; AKHTER, J.; WANG, L.; LU, Y.; MORRIS, D. L. *Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2005, 55, s. 425-432

POURGHOLAMI, M. H.; SZWAJECER, M.; CHIN, M.; LIAUW, W.; SEEF, J.; GALETTIS, P.; MORRIS, L. D.; LINKS, M. *Phase I clinical trial to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advanced cancer*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2010a, 65, s. 597-605

POURGHOLAMI, M. H.; CAI, Z. Y.; BADAR, S.; WANGOO, K.; PORUCHYNSKY, S. M. *Potent inhibitor of tumoral hypoxia-inducible factor 1 α by albendazole*. *BMC Cancer*. 2010b, 10, 143, s. 1471-2407

REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. *Nature Protocols*. 2008, 3, s. 1125-1131

ROBINSON, M. W.; Mc FERRAN, N.; TRUDGETT, A.; HOEY, L.; FAIRWEATHER, I. *A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement*. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2004, 23, s. 275-284

SINCLAIR, S.; ZIMMER, A. S.; SWAIN, S. M. *HER-2 Targeting Agents and Antiangiogenic Therapy: Evolution of Adjuvant Therapy in Breast Cancer*. ASCO, Educational book [online]. 2009, s. 1-10, [cit. 2011-6-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.asco.org/ASCOv2/Home/Education%20&%20Training/Educational%20Book/PDF%20Files/2009/09EdBk.Breast.01.pdf>>

SOULE, H. D.; MALONEY, T. M.; WOLMAN, S. R.; PETERSON, W. D.; BRENZ, R.; MCGRATH, CH. M.; RUSSO, J.; PAULEY, R. J.; JONES, R. F.; BROOKS, S. C. *Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10*. *Cancer Research*. 1990, 50, 18, s. 6075

SPAGNUOLO, P.; HU, J.; HURREN, R.; WANG, X.; GRONDA, M.; SUKHAI, M. A.; DI MEO, A.; BOSS, J.; ASHALI, I.; BEHESHTI ZAVAREH, R.; FINE, N.; SIMPSON, C. D.; SHARMEEN, S.; ROTTAPPEL, R.; SCHIMMER, A. D. *The antihelminthic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma*. Blood. 2010, 115, 23, s. 4824-4832.

STRNAD, P.; DANEŠ, J. *Nemoci prsu pro gynekology*. 1. vydání. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-7169-714-1

SURAHBI, A.; PEREZ, E. A. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive Breast Cancer: Treatment of Metastatic Disease-From Bench to Bedside*. ASCO, Educational book [online]. 2007, s. 90-94, [cit. 2011-6-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.asco.org/ASCOv2/Home/Education%20&%20Training/Educational%20Book/PDF%20Files/2007/07breast19.pdf>>

ŠKARYDOVÁ, L.; ŽIVNÁ, L.; XIONG, G.; MASER, E.; WSÓL, V. AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, 178, 1-3, s. 138-144

THIMMEGOWDA, N. R.; SWAMY, S. N.; KUMAR, A. C. S.; KUMAR, Y. C. S.; CHANDRAPPA, S.; YIP, G. W.; RANGAPPA, K. S. *Synthesis, characterization and evaluation of benzimidazole derivative and its precursors as inhibitors of MDA-MB-231 human breast cancer cell proliferation*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008, 18, 1, s. 432-435

VEJRAŽKA, M. Buněčné kultury. In *Molekulární medicína a biotechnologie: Soubor přednášek*. 1. vydání. Praha: Galén, 2008., s. 81-100. ISBN 978-80-7262-535-2

VONDRÁČKOVÁ, L.; HORVATH, V.; ŽŮREK, D. *O zlatých elektrodách*. Labor Aktuell [online]. 2010, 01, [cit. 2011-05-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.rochediagnostics.cz/download/la/0110/Elektrody.pdf>>

ZAVŘELOVÁ, I. *Spektrofluorimetrické stanovení AKR*. Hradec Králové, 2008. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře biochemických věd

Další internetové zdroje:

WHO/OIE. World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties) and World Health Organization 2003, [cit. 2011-07-06]. Dostupný z WWW: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562390.pdf>>

ÚZIS ČR. Ústav zdravotnických informací a statistiky 2011, [cit. 2011-07-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.uzis.cz/cz/dps/data/frame.html?T0=6220+&T1=ROK+r2007+r2008+&T2=REG+CZE+>>

ČLS JEP. Česká onkologická společnost 2009, [cit. 2011-07-21]. Dostupný z WWW: <http://www.linkos.cz/pacienti/lecba/f_hormon.php>

PENN MED. The Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, 2011, cit. [2011-07-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.med.upenn.edu/akr/nomenclature.shtml>>