

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Analýza růstově inhibičních mechanismů flubendazolu u
buněk maligního melanomu**

Kristýna Čáňová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Lékařská biologie

Hradec Králové

2018

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Lékařská biologie na Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: PharmDr. Kristýna Čáňová
Ústav lékařské biologie a genetiky

Školitel: prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.
Ústav lékařské biologie a genetiky

Oponenti: doc. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Biologický ústav
Kamenice 753/5, 625 00 Brno

prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.
Ústav patologie 3. LF a FNKV
Šrobárova 50, 100 34 Praha 10

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařské biologie dne 18. června 2018 v budově Výukového a výzkumného centra UK v Hradci Králové (Kampus) v posluchárně A105 (K) od 10:00 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantů:

SVV 2016

SVV 2017

PRVOUK P37/01

PROGRESS Q40 01

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací

v doktorském studijním programu Lékařská biologie

Garant studijního programu

OBSAH

1.	SOUHRN.....	5
2.	SUMMARY.....	6
3.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY.....	7
3.1.	Maligní melanom	7
3.1.1.	Definice.....	7
3.1.2.	Epidemiologie	7
3.2.	Melanocyty.....	7
3.2.1.	Evoluce melanocytů.....	7
3.2.2.	Melanogeneze	8
3.2.3.	Biologie melanocytů	8
3.3.	Genomické změny u melanomu.....	8
3.4.	Chemorezistence	9
3.5.	Benzimidazolové deriváty.....	9
3.5.1.	Mechanismus účinku benzimidazol-karbamátů.....	9
3.5.2.	Protinádorové vlastnosti benzimidazol-karbamátů.....	10
3.5.3.	Flubendazol.....	10
3.5.4.	Protinádorové účinky flubendazolu	10
3.6.	Mitotická katastrofa.....	10
4.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	12
5.	MATERIÁL A METODIKA	13
5.1.	Buněčné linie a jejich kultivace	13
5.2.	Izolace melanocytů ze vzorků od pacientů	13
5.3.	Stanovení cytotoxicity pomocí testů WST-1 a xCELLigence	13
5.4.	Proliferace buněk HEM-LP.....	13
5.5.	Časosběrná videomikroskopie.....	14
5.6.	Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie a EdU značení.....	14

5.7.	Aktivita kaspáz 2 a 3/7	14
5.8.	Imunofluorescenční detekce.....	14
5.9.	Detekce proteinů pomocí Western blottu.....	14
5.10.	Statistika	14
6.	VÝSLEDKY.....	15
6.1.	Antiproliferativní účinky FLU na buněčné linie maligního melanomu.....	15
6.2.	Antiproliferativní účinky FLU na normální lidské melanocyty (HEM-LP)	15
6.3.	Vliv FLU na distribuci buněčného cyklu	16
6.4.	Vliv FLU na inhibici buněčného cyklu	17
6.5.	Morfologické změny v buňkách ovlivněných FLU	18
6.6.	Efekt FLU na cytoskelet.....	20
6.7.	Charakteristika flubendazolem-navozené buněčné smrti.....	21
6.8.	Efekt FLU na p53 zprostředkované proapoptické signály	23
6.9.	Efekt FLU na vzorky primárních melanomů	24
7.	DISKUZE	26
8.	ZÁVĚRY	30
9.	POUŽITÁ LITERATURA	31
10.	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	34

1. SOUHRN

Analýza růstově inhibičních mechanismů flubendazolu u buněk maligního melanomu

Maligní kožní melanom je ve svém pokročilém stádiu vysoce agresivním nádorovým onemocněním, často chemorezistentním na většinu současných terapeutických strategií. V současné době se výzkumy zaměřují na identifikaci nových cílů v maligních melanocytech či se snaží využít tzv. nových indikací již schválených léčiv, a to prostřednictvím přístupů nazývaných „drug repurposing“. Tato práce se zabývá ověřováním růstově inhibičních vlastností jednoho takového léčiva – flubendazolu (FLU) – široce využívaného anthelmintika patřícího do rodiny benzimidazolových derivátů. Toto léčivo specificky interaguje s β -tubulinem, což následně vede k poškození struktury a funkce mikrotubulů v ovlivněných buňkách. Několik členů benzimidazolové rodiny (včetně FLU) již prokázalo růstově-inhibiční potenciál u nádorových buněk odvozených z nádorů prsu, tlustého střeva, krve a nervového systému. Protinádorové vlastnosti FLU u maligního melanomu však ještě do této doby nebyly ověřovány.

Cytotoxicita FLU byla testována u tří linií lidského maligního melanomu představující odlišné molekulární subtypy (A-375, BOWES a RPMI-7951) během 72 hodin pomocí WST-1 a x-CELLigence testů. Na základě jednotlivých hodnot IC_{50} získaných z jednotlivých buněčných linií byla pro další testování vybrána koncentrace FLU 1 μ M. Tato koncentrace byla relativně tolerována u normálních lidských kožních melanocytů (HEM), nicméně u melanomových buněk významně poškodila organizaci a funkci mikrotubulů, indukovala zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a vyvolala sérii změn v buněčné morfolologii. Přítomnost dalších specifických změn (tzn. vznik obrovských mnohojaderných buněk, zvýšená exprese p21 a aktivace kaspázy-2) naznačila mitotickou katastrofu, po které následovala na kaspáze-3/7 závislá apoptotická buněčná smrt. Další analýzy prokázaly, že oba procesy nespojuje aktivovaná signální dráha TP53-BAX, a jejich podrobnější mechanismy budou tedy předmětem budoucích studií.

Protinádorová aktivita FLU byla také ověřována u melanomových buněk odvozených z explantátových kultur získaných ze vzorků melanomu od pacientů léčených ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. V pilotní studii prováděné na buňkách vzorku od vybraného pacienta FLU vyvolal inhibici růstu a cytotoxicitu, nicméně buňky na něj vykazovaly nižší citlivost (dle získané hodnoty IC_{50}). Dále testovaná koncentrace FLU 1 μ M vykazovala cytostatický účinek a vyvolávala velmi ojedinělé morfologické změny u exponovaných buněk, významně odlišné od dříve pozorované mitotické katastrofy a apoptózy u buněk melanomových linií.

2. SUMMARY

Analysis of growth-inhibitory mechanisms of flubendazole in malignant melanoma cells

Malignant skin melanoma is at its advanced stage highly aggressive and chemoresistant to almost all currently available therapies. Moderns efforts are thus aimed to identify new targets in melanoma cells or to take advantage of novel indications of already approved drugs – a process called drug repurposing. This work was focused on evaluation of cell growth inhibitory properties of one such drug – flubendazole (FLU) – a widely used anthelmintic compound belonging to benzimidazole family. This drug specifically interacts with β -tubulin, which results in disruption of microtubule structure and function in the exposed cells. Several members of the benzimidazole family (including FLU) have already shown the growth inhibitory potential in tumor cells derived from breast, colon, blood and nervous system malignancies. Still, the specific activity of FLU in malignant melanoma has not been tested to the date.

Cytotoxicity of FLU was tested in three malignant melanoma cell lines representing diverse melanoma molecular types (A-375, BOWES and RPMI-7951) during up to 72 hours using WST-1 and x-CELLigence assays. Based on achieved IC_{50} from individual cell lines, the 1 μ M FLU concentration was selected for further testing. While relatively tolerated in normal human skin melanocytes, FLU at this concentration disrupted microtubular cytoskeleton, induced G2/M cell cycle arrest and changed morphology of exposed melanoma cells. The presence of other specific changes (i.e. cell enlargement and multinucleation, overexpression of p21 and activation of caspase-2) indicated mitotic catastrophe which was followed by apoptotic cell death. Further analyses revealed that both processes were not linked by activated TP53-BAX axis and their further elucidation should be addressed in future.

FLU activity was also evaluated in melanoma cells derived from melanoma explant cultures obtained from human subjects undergoing melanoma excision in Faculty teaching hospital in Hradec Králové. In a pilot study using cells from one patient FLU showed cytotoxicity and growth inhibitory properties, however, with lesser potency as judged from higher IC_{50} value. 1 μ M FLU concentration then had cytostatic effect in exposed cells and induced a series of very unusual morphological alterations entirely dissimilar of mitotic catastrophe and classical apoptosis.

3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

3.1. Maligní melanom

3.1.1. Definice

Melanom je zhoubný nádor, který vzniká z pigmentových buněk (melanocytů) a primárně se vyskytuje v kůži. Vzácně se také vyskytuje v jiných tkáních (jako je sítnice oka nebo sliznice úst a genitálu) a to díky neuroektodermálnímu původu melanocytů. Melanomy jsou běžně vysoce pigmentované, ale mohou být také amelanotické. Melanom je charakteristický agresivním růstem a schopností rychle metastazovat (1).

3.1.2. Epidemiologie

Výskyt maligního melanomu v bělošské populaci celosvětově dramaticky narůstá, zejména v oblastech s nadměrným slunečním zářením. Do hlavní rizikové skupiny výskytu melanomu se řadí lidé se světlou pletí, blondatými nebo zrzavými vlasy a modrými očima.

Nejvyšší míra výskytu melanomu byla hlášena v Austrálii (2, 3), přičemž v České republice vzrostl výskyt melanomu kůže skoro pětkrát za posledních 30 let (4).

Genetická predispozice hraje dominantní roli v riziku vzniku melanomu. Kromě pigmentace kůže to jsou i další dědičné faktory, jako je pozitivní rodinná anamnéza, hustota a typ stávajících névů nebo náchylnost k spálení sluncem, nikoliv opálení (5). Nejčastěji zmiňované mutace v případě maligního melanomu jsou mutace genů *CDKN2A* a *CDK4*, které kódují tumor-supresorové proteiny p16 a p19. Ty byly dokumentovány v některých rodinách s dědičným melanomem a přinášejí 60 až 90 % celoživotního rizika výskytu melanomu (6, 7).

Je všeobecně známo, že celkové riziko pro vznik melanomu je určeno vzájemnou součinností mezi genetickými a environmentálními faktory, zejména pak vystavením se slunečnímu záření (3). Účinky slunečního záření na výskyt melanomu však nejsou zcela zřejmé. Předpokládá se, že na vznik melanomu se podílí zejména mutagenní UV-B záření (to které je zodpovědné za opalování a spálení kůže), ale i prozánětlivé UV-A záření, které proniká hlouběji a tak aktivuje melanocyty. Navíc UV záření má na kůži imunopresivní účinky a tím, přinejmenším teoreticky, zasahuje do imunologických mechanismů a přispívá k rozvoji rakoviny kůže (5).

3.2. Melanocyty

Melanocyty jsou pigmentové buňky vyskytující se většinou, ale ne pouze, v epidermis kůže, dále také ve vlasech nebo očích. Jejich hlavní funkcí je produkce černohnědého pigmentu melaninu, který je zodpovědný za barvu kůže a vlasů (8).

3.2.1. Evoluce melanocytů

Melanocyty se diferencují z melanoblastů v neurální zárodečné liště a migrují do *stratum basale epidermis*, kde se vyskytují mezi keratinocyty. Alternativní cesty vedou melanocyty do vlasových folikulů nebo uveálního traktu oka a sítnice (9).

Melanocyty jsou oválné dendritické buňky, menší než keratinocyty. Nacházejí se ve spodní vrstvě epidermis, kde dohromady s 30-40 přidruženými keratinocyty tvoří epidermální-melaninovou jednotku. Ve spodní vrstvě epidermis se melanocyty vůči keratinocytům vyskytují v poměru 1:10 a tento poměr zůstává zachován po celý život.

Expresí speciálních adhezních molekul, jako jsou E- a P- kadheriny, demonstruje existenci mezibuněčných spojů v epidermální-melaninové jednotce. Tyto kontakty mezi dendritickými melanocyty a keratinocyty jsou nezbytné pro transport melaninu do keratinocytů, což zaručuje zbarvení kůže a fotoprotekci (10).

3.2.2. Melanogeneze

Syntéza melaninu je biochemický proces zvaný melanogeneze. Probíhá v melanocytech, ve váčcích zvaných melanosomy, které vznikají odštěpováním z Golgiho aparátu (10). V lidské kůži jsou dva typy pigmentu: eumelanin, odpovídající za tmavou barvu vlasů i kůže a feomelanin vyskytující se u světlých a rezavých vlasů. K tomu, aby syntéza mohla probíhat, je potřeba dostatek klíčové aminokyseliny tyrosin a enzymu tyrosinasy. V kůži se obvykle nachází směs obou typů pigmentu, přičemž lidé s tmavší pletí mají více eumelaninu (11, 12).

3.2.3. Biologie melanocytů

Počet, organizace a biologická aktivita melanocytů je v epidermis kontrolována a regulována genetickými, epigenetickými a environmentálními mechanismy, které nejsou úplně zřejmě objasněny. Melanocyty jsou vysoce diferenciované buňky charakterizované dlouhou životností, zvýšenou rezistencí na environmentální stres a nízkou proliferační aktivitou. Tento stav je udržován díky komplexní souhře různých růstových faktorů, parakrinních faktorů a/nebo expresí molekul buněčného povrchu, které zprostředkovávají interakce mezi melanocyty, keratinocyty, fibroblasty nebo jinými orgány (např. hypofýzou) (10). Melanocyty navíc podléhají vlivům environmentálního prostředí, zejména UV záření. UV záření následně aktivuje keratinocyty, které vysílají řadu signálů pro zvýšení proliferace melanocytů, které jsou odpovědné za tvorbu névů. Melanocyty vyskytující se v névech se významně neliší od normálních melanocytů, mohou však začít s expresí růstových faktorů a často nesou některé genetické změny typické pro rozvoj melanomu (13). Névové buňky přestávají proliferovat v určitém stadiu, aby vytvořily populaci pigmentových buněk, která tvoří pihu (14). Tato zástava proliferace je zdánlivě pod kontrolou inhibitory buněčného cyklu p16^{INK4A}, přičemž defekty v expresi *CDNK2A* korelují se zvýšeným počtem pih a vyšším rizikem transformace melanocytů (15). Avšak vznik zhoubného melanomu z jednotlivých névů je vysoce individuální proces s postupnou akumulací genetických a epigenetických změn a silným vlivem mikroprostředí (13).

3.3. Genomické změny u melanomu

Míra mutací u melanomu je podle publikace „The cancer genome atlas data“ nejvyšší ze všech analyzovaných malignit (16). Podrobné vyčíslení genetických a epigenetických změn zjištěných v různých formách melanomu je mimo rozsah tohoto úvodu, nicméně nejčastěji nalezené genetické změny jsou shrnuty v obrázku 1.

Gen	Typ genu	Frekvence/typ výskytu u melanomu (%)
<i>BRAF</i>	Protoonkogen	Mutace (50-70 %)
<i>NRAS</i>	Protoonkogen	Mutace (10-30 %)
<i>AKT3</i>	Protoonkogen	Overexprese
<i>NF1</i>	Antionkogen	Mutace (12-18 %)*
<i>KIT</i>	Protoonkogen	Mutace (3 %), amplifikace**
<i>GNAQ</i>	G protein	Mutace (1-2 %)**
<i>GNA11</i>	G protein	Mutace (1-2 %)**
<i>CDKN2A</i>	Antionkogen	Delece, mutace nebo silencing (30-70 %)
<i>PTEN</i>	Antionkogen	Delece nebo mutace (5-20 %)
<i>APAF1</i>	Antionkogen	Silencing (40 %)
<i>Cyklin D1</i>	Protoonkogen	Amplifikace (6-44 %)
<i>MITF</i>	Transkripční factor	Amplifikace (10-16 %)

Obrázek 1 - Vybrané genetické změny u maligního melanomu (upraveno podle: Gray-Schopfer et al., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. Únor 2007. Vol. 445, no. 7130, s. 853. * Kiuru et al., 2017. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Únor 2017. Vol. 97, no. 2, s. 146–157. ** Lyle et al., 2013. Diagnosis and treatment of KIT-mutant metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. Zář 2013. Vol. 31, no. 26, s. 3176–3181)

3.4. Chemorezistence

Chemorezistence je hlavní příčinou selhání chemoterapeutické léčby u většiny lidských nádorů. Tradičně je chemorezistence klasifikována jako vrozená nebo získaná a to na základě počáteční odpovědi organismu na terapii. Mezi nejčastější mechanismy rezistence patří například např. zvýšená exprese efluxních proteinů, zvýšená tolerance stresových stavů a potlačení signalizace buněčné smrti. Melanom je agresivní a mnohočetně chemorezistentní typ malignity, přičemž jsou přítomné mnohé z výše uvedených mechanismů rezistence vůči léčivům.

3.5. Benzimidazolové deriváty

Benzimidazoly jsou kondenzované heterocyklické struktury, které tvoří nedílnou součást vitamínu B12. Bylo prokázáno, že substituce jádra benzimidazolu modifikuje chemické a farmakologické vlastnosti molekuly a je rozhodujícím krokem v procesu objevování léků. První benzimidazol, který byl vyvinut a určen pro humánní použití, byl thiabendazol, následovaný řadou veterinárních antihelmintik (parabendazol, fenbendazol, oxfendazol a cambendazol). První benzimidazolkarbamát používaný u lidí byl mebendazol a následně flubendazol. V současné době jsou některé deriváty benzimidazolu klinicky schváleny včetně albendazolu, mebendazolu, thiabendazolu jako anthelmintika; omeprazol, lansoprazol, pantoprazol jako inhibitory protonové pumpy; astemizol jako antihistaminikum; envirodin jako antivirotikum; candesartan cilexetil a telmisartan jako antihypertenziva (17).

3.5.1. Mechanismus účinku benzimidazol-karbamátů

Benzimidazolkarbamáty se specificky váží a interagují s podjednotkou mikrotubulu β -tubulinem (18), i navzdory tomu, že afinita k savčímu tubulinu je slabší než afinita k tubulinu helmintů (19). Vzhledem k tomu, že struktura mikrotubulů je velmi důležitá pro mnoho životně důležitých funkcí parazita, jako jsou proliferace, mitóza, intracelulární

transport organel, udržování tvaru buňky nebo změna mikrotubulárního uspořádání, jejich zablokování vede ke konečné destrukci parazita (18, 20, 21). Kromě toho také mohou benzimidazolkarbamáty inhibovat energetický metabolismus parazitních buněk. Dále způsobují narušení transportu a metabolismus glukózy, což vede k vyčerpání energie a glykogenu a ke ztrátě buněčné motility. Dokonce i tento proces nakonec přispívá ke smrti parazita (22, 23).

3.5.2. Protinádorové vlastnosti benzimidazol-karbamátů

Ukázalo se, že benzimidazolkarbamáty interagují nejen s mikrotubuly u helmintů, ale i se savčím tubulinem *in vitro*. To vyvolalo otázku, zda tato skupina sloučenin může také inhibovat polymeraci tubulinu v lidských buňkách, a pokud ano, zda by takový účinek mohl vyvolat jejich antiproliferativní a / nebo protinádorové účinky. V řadě publikovaných studií se ukázalo, že albendazol a mebendazol jsou cytotoxické a indukují buněčnou smrt v širokém spektru nádorových buněk (24).

3.5.3. Flubendazol

Flubendazol (FLU) je syntetické anthelmintikum objevený v 70. letech firmou Janssen. Běžně je používán ve veterinární medicíně jako širokospektré anthelmintikum, ale je také v Evropě registrován k humánnímu použití na léčbu střevních nematod (24).

3.5.4. Protinádorové účinky flubendazolu

Protinádorové účinky FLU byly poprvé zaznamenány u buněčných linií leukémie a myelomu, kde FLU způsoboval potlačení proliferace, zástavu buněčného cyklu a mitotickou katastrofu. Podobné účinky byly také pozorovány u buněčných linií nádoru prsu MDA-MB-231, BT-549, MCF-7 a SK-BR-3, kde kromě inhibičních účinků FLU byla pozorována i inhibice buněčné migrace, která byla doprovázena sníženou expresí mezenchymálních markerů (β -katenin, N-kadherin, Vimentin) a indukovaná exprese epiteliálního markeru (Keratin 18). FLU byl navíc popsán jako silný induktor reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které jsou schopné prostřednictvím cíleného autofagického proteinu 4B (ATG4B) aktivovat autofagii (24, 25). U buněk kolorektálního karcinomu SW480 a SW620, FLU inhiboval jejich růst, způsobil zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M a také potencoval účinek paklitaxelu (26, 27). Nakonec v rozsáhlém zkoumání 321 buněčných linií, včetně různých nádorových buněčných linií, byl identifikován neuroblastom jako další maligní buněčná linie vysoce citlivá na FLU. Následné experimenty ukázaly, že FLU vykazuje širokou aktivitu vůči primárním neuroblastomovým buňkám získaným od pěti pacientů a panelu 140 buněčných linií neuroblastomu se získanou rezistencí vůči hlavním sloučeninám vázajících se na mikrotubuly. Specifická aktivita FLU směřovala k signalizaci p53, a to zejména proteinu PUMA, který byl prokázán jako klíčový mediátor indukovaných účinků (24).

3.6. Mitotická katastrofa

Ve vědecké literatuře se termín mitotická katastrofa používá k popisu několika souvisejících, ale ne zcela totožných jevů. Konkrétně jsou v současné době prezentovány dva protichůdné názory, zda mitotická katastrofa je způsob smrti buněk nebo zda představuje řadu kroků vedoucích k buněčné smrti (apoptóze nebo nekróze) (28). Mitotická katastrofa je

charakterizována několika zřetelnými morfologickými rysy, jako je tvorba velkých mnohojaderných buněk s dekonzovaným chromatinem, zmnožení centrosomů a výskyt aberantních mitotických vřetének. Některé studie navíc zdůrazňují, že buňky podstupující mitotickou katastrofu mají přítomné vybrané fenotypové znaky charakteristické pro apoptózu (29).

Alternativní pohled na mitotickou katastrofu ji představuje jako sekvenční proces, který vrcholí buněčnou smrtí vyplývající z abnormální mitózy. V tomto případě může být samotný proces spuštěn předčasným nebo abnormálním vstupem buněk do mitózy v důsledku přítomnosti fyzických nebo chemických stresorů. Tyto stresory zahrnují činidla poškozující DNA, jako je doxorubicin nebo cisplatina, mitotické jedy zahrnující jak hyperpolymerizaci mikrotubulů (např. Taxany), tak i depolymerizační činidla (Vinca alkaloidy) nebo inhibitory mitotických proteinů (monatrol nebo hesperidin). Aktivita těchto činidel vedou k defektům v DNA (chromozómech), které pak mají vliv na vazbu na mitotické vřeténko, případně k nepravidelné tvorbě vřeténka spojenou s defekty v kontrolních bodech nebo ke vzniku multipolárních mitóz (30).

Většina maligních buněk (včetně melanomu) vykazuje různé úrovně genetické nestability (31, 32). Proto bylo navrženo, že stimulace další nestability může představovat terapeutickou strategii. V souladu s tím se zdá, že maligní buňky jsou náchylnější k buněčné smrti po mitotickém poškození ve srovnání s netransformovanými buňkami (33), což způsobuje, že mitotická katastrofa představuje potenciálně důležitou protinádorovou strategii, kterou by mohla dosáhnout různými mechanismy, které se zaměřují na buněčný cyklus.

4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

V této práci jsme si stanovili následující cíle:

1. Stanovení biologického účinku FLU u normální linie lidských melanocytů
2. Ověření cytotoxicity FLU v lidských maligních melanomových buněčných liniích s odlišným molekulárním profilem A-375, BOWES a RPMI-7951
3. Charakterizace mechanismů, při kterých FLU indukuje cytotoxické účinky ve výše uvedených buněčných liniích, zejména s ohledem na mitotickou katastrofu a srovnání těchto účinků s účinky známých z jiných modelů
4. Získání melanomových buněk ze vzorků od pacientů a následná charakterizace buněk a ověření cytotoxicity FLU

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1. Buněčné linie a jejich kultivace

Buněčné linie A-375 a BOWES jsou adherentní linie odvozené od lidského maligního melanomu přičemž linie A-375 obsahuje ve svých buňkách mutaci genů *BRAF* a *CDKN2A*. Buněčná linie RPMI-7951 je odvozená od maligního melanomu metastazujícího do lymfatických uzlin s mutacemi v genech *BRAF*, *p53*, *CDKN2A* a *PTEN*. HEM-LP je linie zdravých lidských epidermálních melanocytů izolovaných z neonatální předkožky z lehce pigmentované tkáně.

A-375 a BOWES byly kultivovány v médiu DMEM s přidáním 10% fetálního bovinního séra (FBS) a 1% penicilinem/streptomycinem v 5% CO₂ při 37 °C. RPMI-7951 byly kultivovány v E-MEM s přidáním 10% FBS a 1% penicilinem/streptomycinem v 5% CO₂ při 37 °C. HEM byly kultivovány v medium 254CF s přidáním kalcium a melanocytovým růstovým suplementem v 5% CO₂ při 37 °C. Izolované melanomové buňky od pacientů byly pěstovány v kultivačním médiu (RPMI-1640 medium, 1% penicilin/streptomycin, 15% FBS, humulin N 100 IU/ml, transferrin 2 mg/ml) v 5% CO₂ při 37 °C. HEM-LP byly pasážovány 1x týdně pomocí 0,05 % trypsinu/ EDTA a trypsin neutralizeru, médium bylo měněno každé 2-3 dny. Ostatní buňky byly pasážovány po dosažení 80 % konfluency 2x týdně pomocí 0,05 % trypsinu/ EDTA. Kultury byly pravidelně testovány na přítomnost mykoplasmat.

5.2. Izolace melanocytů ze vzorků od pacientů

Lidské kožní melanocyty byly odvozeny z explantátových kultur získaných ze vzorků melanomu od pacientů léčených ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Vzorky tkáně byly následně přeneseny v transportním médiu (RPMI-1640 medium, 15% FBS, humulin N 100 IU/ml, transferrin, heparin) na katedru Lékařské biologie a genetiky, kde byly dále zpracovány. Tkáň byla i s transportním médiem přenesena na Petriho misku, kde byla pomocí nůžek a skalpelu nastržována na co nejmenší kousky. Kousky tkáně byly následně pomocí Pasteurovy pipety přeneseny do kultivační lahve s kultivačním médiem.

5.3. Stanovení cytotoxicity pomocí testů WST-1 a xCELLigence

Cytotoxicita FLU byla testována u tří linií lidského maligního melanomu A-375, BOWES a RPMI-7971 pomocí WST-1 a xCELLigence testů. Test WST-1 byl prováděn v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin v koncentračním rozmezí 0,05-10 μM. Měření bylo provedeno ihned a následně 2 hodiny po přidání činidla pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 při vlnové délce 450/650 nm. Systém xCELLigence měří elektrickou impedanci a poskytuje kvantitativní informace o biologickém stavu buněk. Rostoucí impedance (odpovídající proliferaci buněk) byla měřena každých 30 minut po dobu 24 hodin, kdy byly buňky ovlivněny FLU v koncentraci 1 μM a impedance byla následně měřena každou hodinu po dobu dalších 72 hodin. Postup je podrobně popsán v publikaci Čáňová et al. 2018.

5.4. Proliferace buněk HEM-LP

Vzhledem k pomalé proliferaci buněk HEM-LP a závislosti na hustotě nasazení, která by mohla produkovat potenciálně nekonzistentní data z WST-1, jsme se rozhodli vyhodnotit účinky FLU na tyto buňky pomocí přímé mikroskopie se softwarově podporovaným počítáním buněk. Počet živých buněk byl počítán na mikroskopu Nikon Eclipse E 400

(Nikon, Praha, Česká republika) s fázovým kontrastem v intervalu 24-96 hodin. Fotky byly získané pomocí softwaru LUCIA DI Image Analysis System LIM (Laboratory Imaging s.r.o, Praha, Česká republika) a analyzovány. Pro účely analýzy bylo vyhodnoceno minimálně 2000 buněk při zvětšení 100x a 400x.

5.5. Časoběrná videomikroskopie

Kontrolní a ovlivněné buňky byly umístěny na stolek invertovaného mikroskopu v prostoru s teplotou 37 °C. Po dobu 72 hodin bylo snímáno vybrané reprezentativní zorné pole.

5.6. Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie a EdU značení

Stanovení jednotlivých fází buněčného cyklu bylo detekováno u buněk ovlivněných 1 μ M FLU v čase 12 a 24 hodin. Buněčná suspenze byla měřena na průtokovém cytometru Beckman Coulter metodou barvení DNA proprium jodidem. Procento buněk v S fázi bylo měřeno pomocí EdU za použití kitu Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kit. Kit byl použit dle pokynů výrobce a následně došlo k vyhodnocení pomocí MetaXpress[®] Image Acquisition and Analysis Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Postup je podrobně popsán v publikaci Čáňová et al. 2018.

5.7. Aktivita kaspáz 2 a 3/7

K detekci aktivity kaspáz 2 a 3/7 byl použit Caspase-Glo Assay kit (Promega, USA). Kit byl použit dle pokynů výrobce. Postup je podrobně popsán v publikaci Čáňová et al. 2018.

5.8. Imunofluorescenční detekce

Morfologické změny v kontrolních a FLU ovlivněných buňkách byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 400 (Nikon, Prague, Česká republika) pomocí značení specifickými fluorescenčními protilátkami. Postup je podrobně popsán v publikaci Čáňová et al. 2018.

5.9. Detekce proteinů pomocí Western blottu

Detekce vybraných proteinů byla prováděna pomocí gelové elektroforézy a následně byly proteiny přeneseny z gelu na PVDF membránu, kde byly rozpoznány specifickými protilátkami. Kvantifikace imunoreaktivních bandů na exponovaných filmech byl provedena pomocí chemiluminiscence za pomoci softwaru QuantityOne imaging software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Postup je podrobně popsán v publikaci Čáňová et al. 2018.

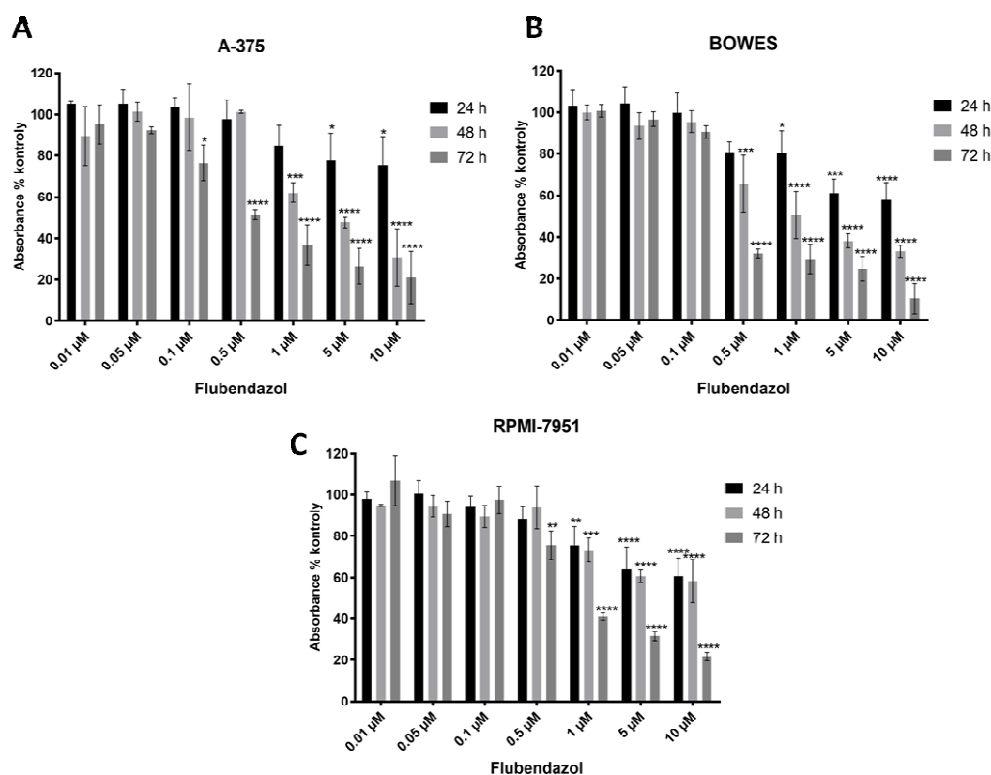
5.10. Statistika

Pro statistické vyhodnocení dat byl použit program GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, USA). Statistická analýza byla provedena pomocí one-way a two-way ANOVA s následným hodnocením podle Bonferroniho (mnohočetný porovnávací test). Výsledky byly porovnávány s kontrolou, přičemž rozdíly byly považovány za signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$.

6. VÝSLEDKY

6.1. Antiproliferativní účinky FLU na buněčné linie maligního melanomu

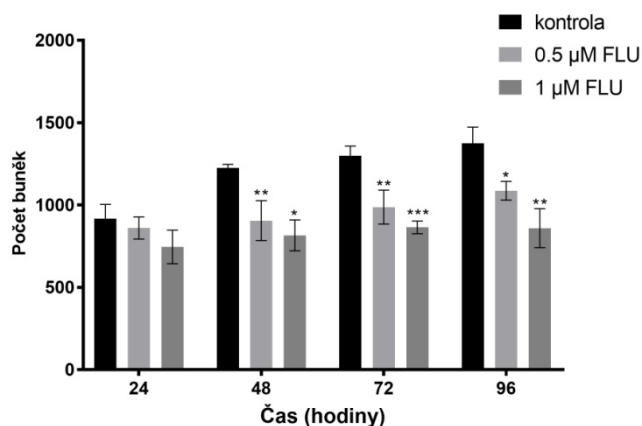
Efekt FLU na viabilitu a proliferaci buněk lidského maligního melanomu A-375, BOWES a RPMI-7951 byl testován v koncentračním rozmezí 0,01 - 10 μM . Test WST-1 ve všech třech liniích ukázal, že FLU působí cytotoxicky v závislosti na koncentraci a čase působení (Obr. 2A, 2B, 2C). Stejně výsledky potvrdil i systém xCELLigence, který navíc určil hodnotu IC_{50} pro každou buněčnou linii: A375 - $\text{IC}_{50} = 0,96 \mu\text{M}$, BOWES - $\text{IC}_{50} = 0,90 \mu\text{M}$ a RPMI-7951 - $\text{IC}_{50} = 0,25 \mu\text{M}$. Na základě těchto výsledků byla pro další experimenty zvolena koncentrace FLU 1 μM .



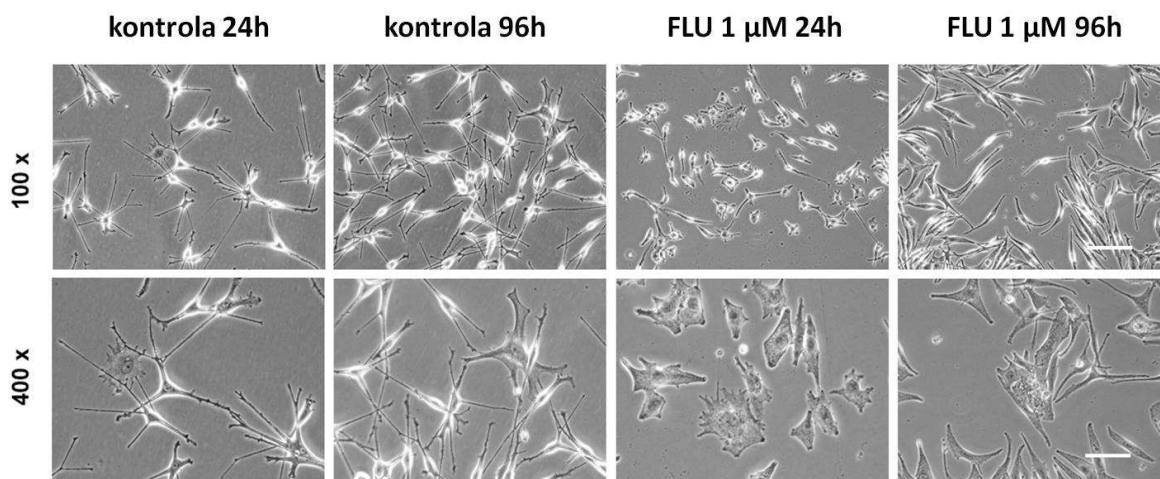
Obrázek 2 - Proliferace buněk A-375 (A), BOWES (B) a RPMI-7951 (C) po ovlivnění flubendazolem (FLU) v koncentračním rozmezí 0,01 - 10 μM pomocí testu WST-1. Data představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

6.2. Antiproliferativní účinky FLU na normální lidské melanocyty (HEM-LP)

FLU v koncentraci 0,5 μM a 1 μM způsobil nižší proliferaci buněk HEM-LP (Obr. 3). Navíc přidání 1 μM FLU vyvolalo okamžitou změnu morfologie i chování buněk. Zejména během prvních 12-24 hodin byly buňky zploštělé a naplněné četnými váčky připomínající vakuoly, přičemž některé z nich prošly rychlou degradací. Během pozdějšího času (72-96 hodin) se buňky postupně vracely k původnímu vzhledu i chování. FLU v koncentraci 1 μM tedy má na normální lidské melanocyty HEM-LP cytotoxické a cytostatické účinky, ale zdá se, že se časem snižují a většina exponovaných buněk je dokáže tolerovat (Obr. 4).



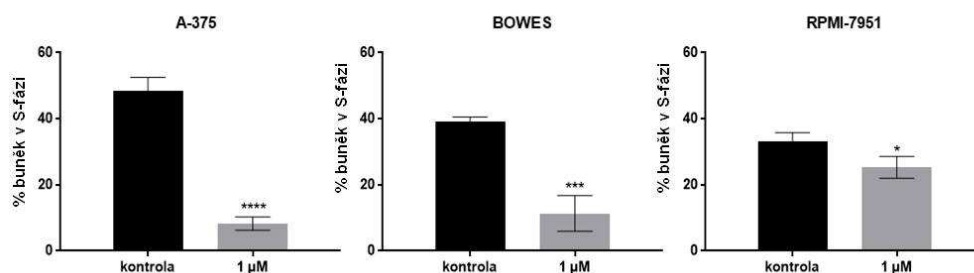
Obrázek 3 - Proliferace buněk HEM-LP po ovlivnění flubendazolem (FLU) v koncentracích 0,5 a 1 μM během 96 hodin stanovená pomocí počítání buněk. Data představují průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001



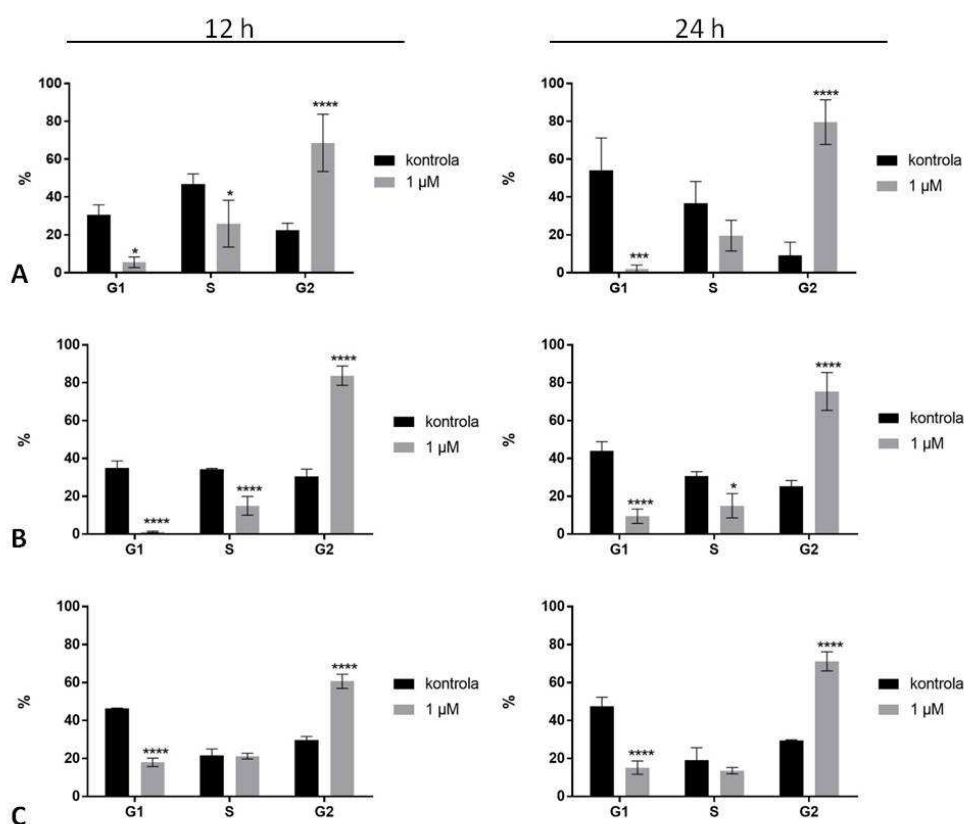
Obrázek 4 - Vzhled lidských normálních melanocytů HEM-LP během 96 hodin působení flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 μM. Fázový kontrast 100x a 400x. Měřítka 30 μm.

6.3. Vliv FLU na distribuci buněčného cyklu

Buněčný cyklus byl analyzován 12 a 24 hodin po ovlivnění FLU v koncentraci 1 μM. U všech tří zkoumaných linií maligního melanomu A-375, BOWES a RPMI-7951 došlo k poklesu buněk ve fázi G1 (A-375 ~ 2 %, BOWES ~ 9 %, RPMI-7951 ~ 15 %) a rapidnímu nárůstu buněk v G2/M fázi (A-375 ~ 79 %, BOWES ~ 75 %, RPMI-7951 ~ 71 %; Obr. 6). Navíc další nezávislé měření používající značení DNA pomocí EdU ukázalo, že dochází i k významnému poklesu S fáze (A-375 ~ 8 %, BOWES ~ 11 %, RPMI-7951 ~ 45 %; Obr. 5)



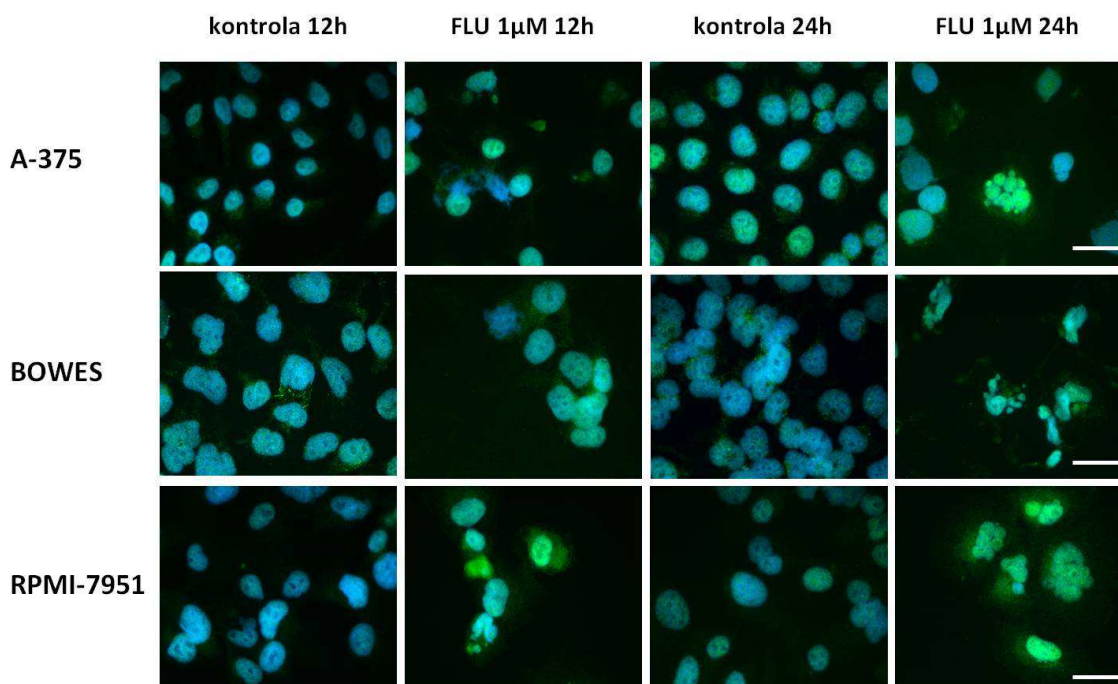
Obrázek 5 - Procento buněk A-375, BOWES a RPMI-7951 vyskytujících se v S fázi buněčného cyklu po 24 hodinách od ovlivnění flubendazolem (FLU) v koncentraci 1 μM. Data představují průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů. * P < 0,05; *** P < 0,001; **** P < 0,0001



Obrázek 6 - Změny v buněčném cyklu u melanomových buněk A-375 (A), BOWES (B) a RPMI-7951 (C) po 12 a 24 hodinách od ovlivnění flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 μM. Data představují průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů. * P < 0,05; *** P < 0,001; **** P < 0,0001

6.4. Vliv FLU na inhibici buněčného cyklu

Inhibici buněčného cyklu po působení FLU jsme ověřili pomocí exprese proteinu p21, který hraje roli v zástavě buněčného cyklu jak v G1, tak v G2/M fázi. Imunoflourescenční detekce proteinu p21 v kontrolních buňkách odhalila jeho slabou přítomnost a expresi zejména v jádrech melanomových buněk. Oproti tomu 1 μM FLU indukoval zvýšenou expresi p21, který se nacházel v jádře i cytoplazmě buněk a to po 12 i 24 hodinách (Obr. 7).

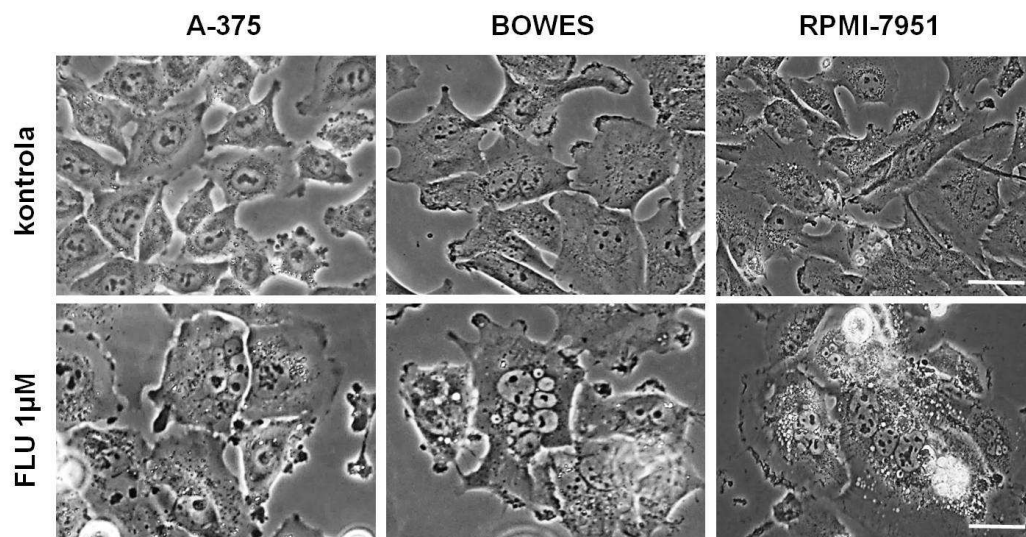


Obrázek 7 - Expres proteinu p21 u linií A-375, BOWES a RPMI-7951 po ovlivnění flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 μ M v časech 12 a 24 hodin. Stanoveno pomocí fluorescenční mikroskopie, zelená - p21, modrá - jádro. Zvětšení 400x, měřítko 10 μ m.

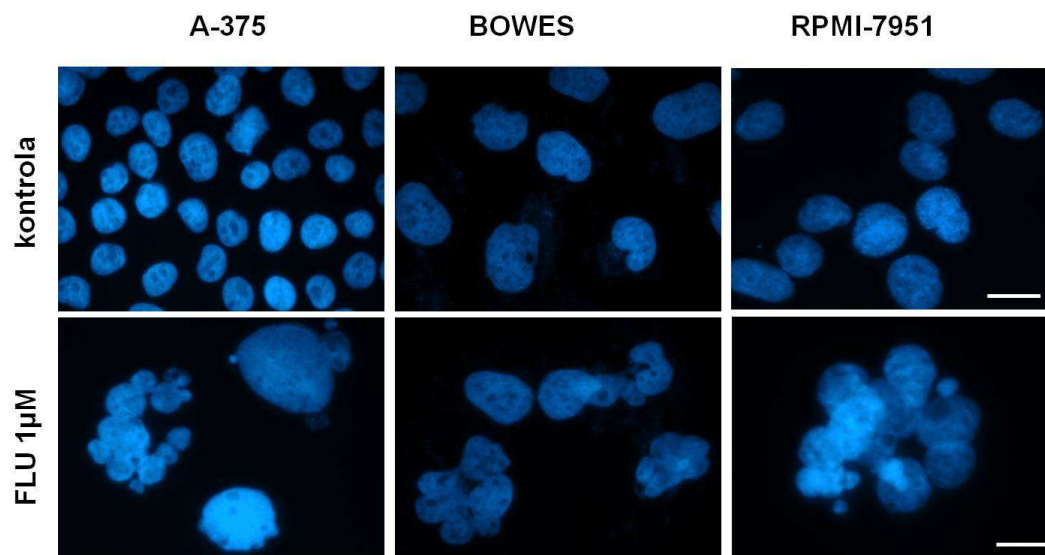
6.5. Morfologické změny v buňkách ovlivněných FLU

Časoběrná video-mikroskopie nám ukazuje, že buňky se během prvních 12-24 hodin po ovlivnění 1 μ M FLU dále dělí a rostou, i když méně intenzivně než u kontrol. Přibližně po 12 hodinách působení FLU byly postupně pozorovány větší buňky s více jádry a to zejména v linii RPMI-7951. Tyto mnohоядерné buňky neměly jednotné rozměry a jejich jádra se lišila ve velikosti, tvaru a počtu (Obr. 8). Výskyt mnohоядерných buněk byl také potvrzen fluorescenčním zbarvením pomocí DNA-specifického barviva - DAPI (Obr. 9). Navíc při pozdějším 24 hodinovém intervalu působení FLU došlo k dalšímu rozšíření mnohоядерnosti a některé buňky byly obrovské.

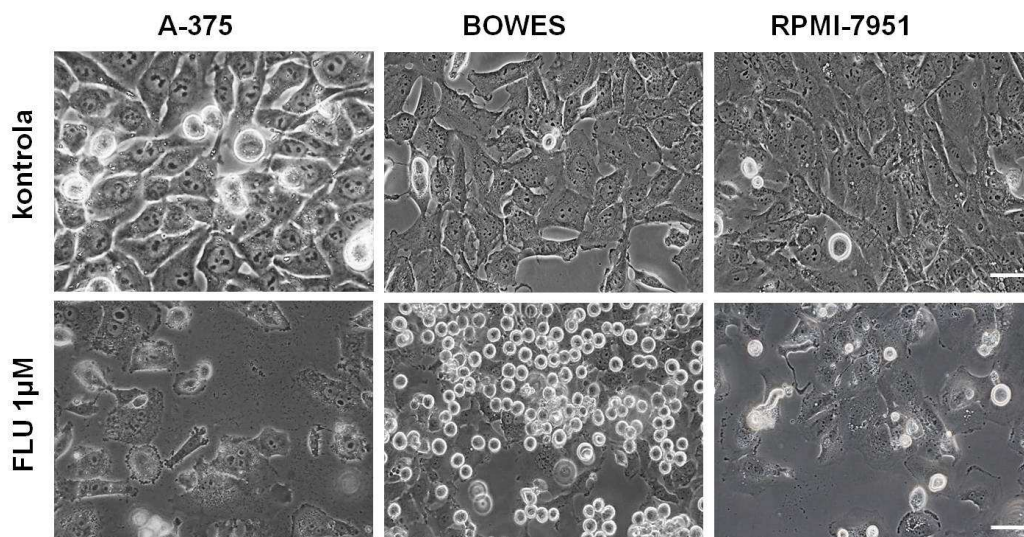
Kromě mnohоядерných buněk se v liniích A-375 a RPMI-7951, avšak velmi málo v linii BOWES, vyvinula perinukleární vakuolizace. Tyto buňky s vakuolami přetrvávaly dalších 12-24 hodin a poté ztratily svou adhezenci, byly zaoblené a jejich membrána vykazovala řadu rychle vyčnívajících výstupků. To následně vedlo ke konečné fragmentaci buněčných těl na malé elementy. Některé buňky však nevykazovaly změny plazmatické membrány a podstoupily rychlou buněčnou demisi bez výrazných morfologických znaků (Obr. 10). Dynamika popsaných změn v ovlivněných buňkách se lišila nejen mezi jednotlivými buněčnými liniemi, ale také mezi jednotlivými buňkami. Takže v buněčných liniích A-375 a RPMI-7951 se zaoblení buněk a fragmentace vyskytovala asynchronně, zatímco v buněčné linii BOWES se zdálo, že buňky provádějí jednotlivé kroky více synchronně.



Obrázek 8 - Kontrolní buňky a obří mnohojaderné buňky 12 hodin po ovlivnění flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 µM. Fázový kontrast 600x. Měřítka 25 µm.



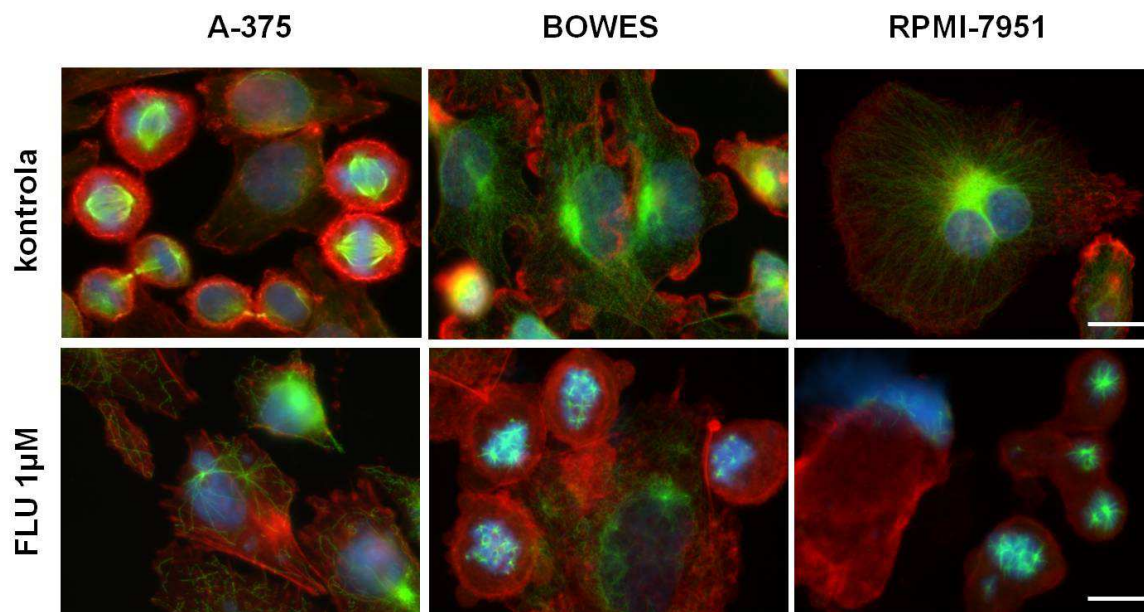
Obrázek 9 - Kontrolní a mnohojaderné buňky 12 hodin po ovlivnění flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 µM. Fluorescenční mikroskopie 600x, modrá - jádro. Měřítka 20 µm.



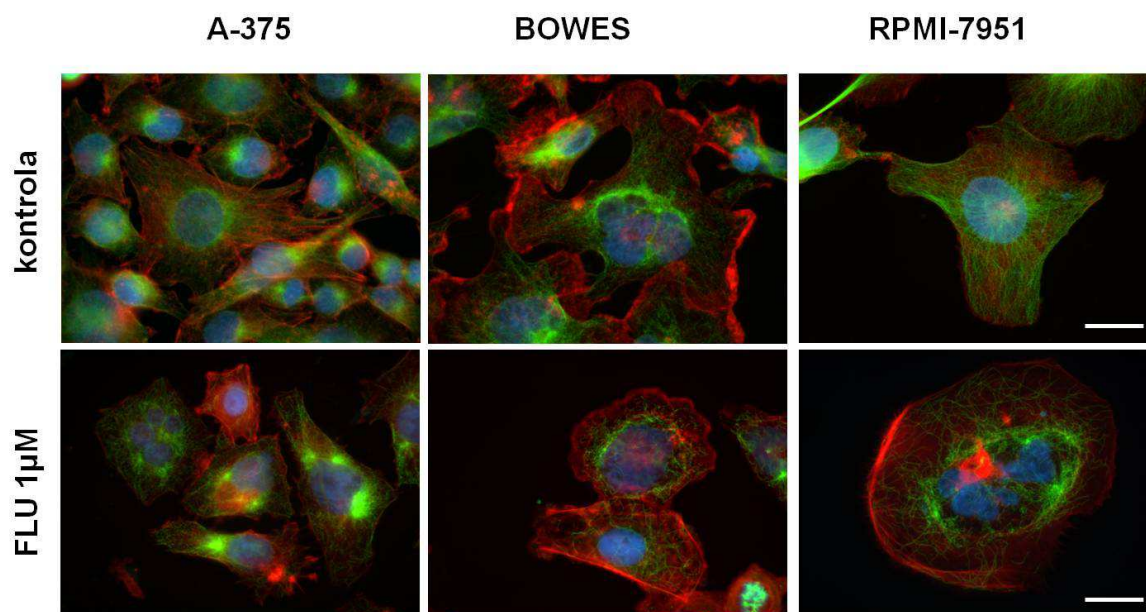
Obrázek 10 - Morfologické změny u buněčných linií melanomu 48 hodin po ovlivnění flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 μ M. Fázový kontrast 400x. Měřítka 10 μ m.

6.6. Efekt FLU na cytoskelet

Dalším cílem bylo zjistit, jaké změny vyvolává působení FLU na strukturu a uspořádání mikrotubulů. Mikrotubuly v interfázi kontrolních buněk jsou typicky uspořádány z jediného centrozomu v blízkosti jádra. Během mitózy se pak mikrotubuly přeskupují a tvoří mitotické vřeténko. Ve srovnání s kontrolními kulturami se u FLU ovlivněných buněk změnil počet a distribuce centrozomů, což vedlo k přítomnosti aberantních mitotických vřetének a následných multipolárních mitóz (Obr. 11). Rovněž mikrotubulární síť v interfázních buňkách se také rozpadla; mikrotubuly byly poškozeny a došlo ke ztrátě jejich typického uspořádání. Kromě změněné mikrotubulární topografie byly zaznamenány také některé změny v aktinových vláknech, ačkoliv ne tak závažné jako v případě mikrotubulů (Obr. 12).



Obrázek 11 - Normální mitotické vřeténko vs. aberantní multipolární vřeténko 24 hodin po ovlivnění flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 μ M. Fluorescenční mikroskopie 600x, modrá - jádro, zelená - α -tubulin, červená - β -aktin. Měřítka 10 μ m.

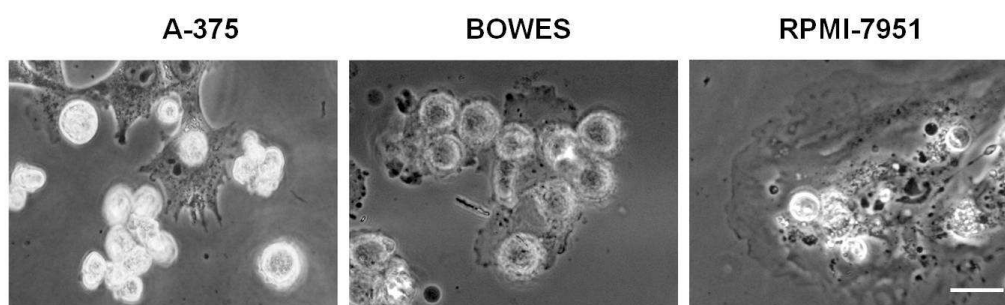


Obrázek 12 - Efekt flubendazolu (FLU) v koncentraci 1 μM na interfázni cytoskelet po 24 hodin od ovlivnění. Fluorescenční mikroskopie 600x, modrá - jádro, zelená - α -tubulin, červená - β -aktin. Měřítka 10 μm .

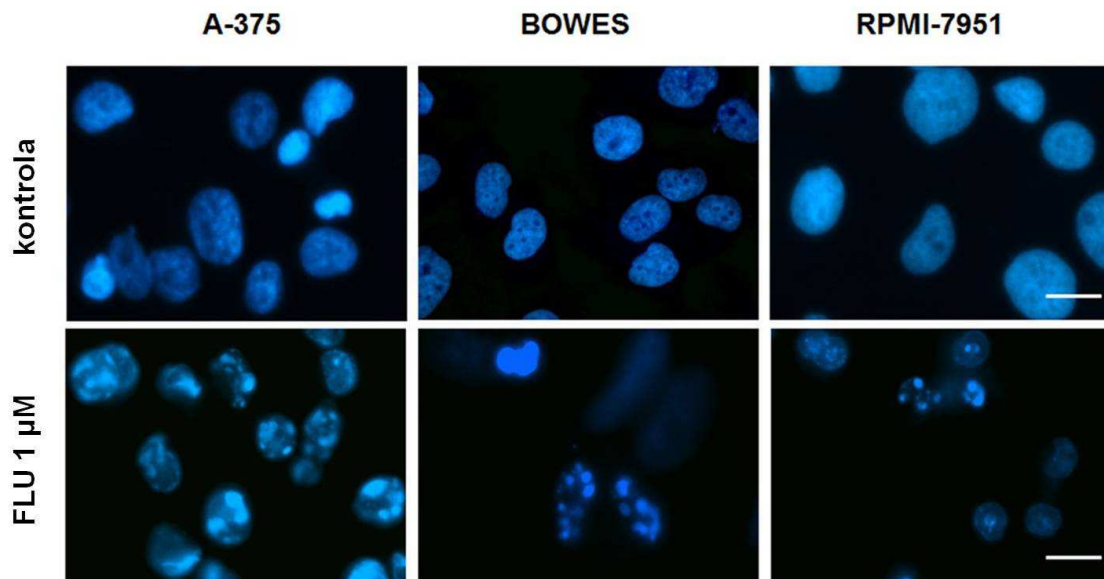
6.7. Charakteristika flubendazolem-navozené buněčné smrti

Jak již bylo zmíněno výše, FLU v koncentraci 1 μM způsobuje u použitých melanomových buněk sérii morfologických změn jako je ztráta adherence, tvorba membránových výčnělků, zaokrouhlení a fragmentace (Obr. 13). Přesto, ne všechny ovlivněné buňky vykazují všechny tyto kroky, které se navíc objevily v souvislosti s mnohojaderností buněk. Navzdory individuálním rozdílům v těchto morfologických změnách a jejich načasování, se 48 hodin po ovlivnění počet takto postižených buněk stále zvyšoval ve všech testovaných buněčných liniích a jejich poměr zůstal podobný s výjimkou buněk RPMI-7951 (Obr. 15). Spolu se změnami celkové morfologie a chování melanomových buněk byly přítomny i další typické markery apoptotické buněčné smrti. Patří mezi ně zejména typická kondenzace a fragmentace nukleárního chromatinu (Obr. 14).

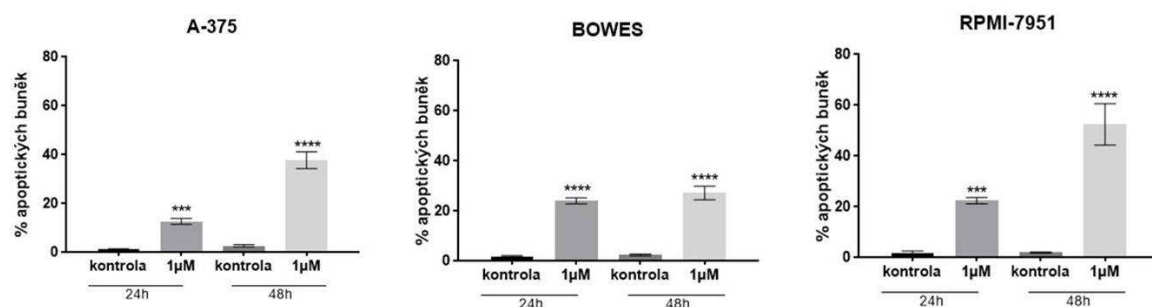
FLU-indukovaná apoptóza byla dále potvrzena měřením aktivity vybraných kaspáz 2 a 3/7, o nichž je známo, že jsou typicky spojeny s apoptózou. Časové intervaly 12, 24 a 48 hodin byly zvoleny pro měření pomocí standardního luminiscenčního testu. 1 μM FLU aktivoval kaspázy ve všech třech buněčných liniích, avšak s jiným časovým průběhem a účinností (Obr. 16).



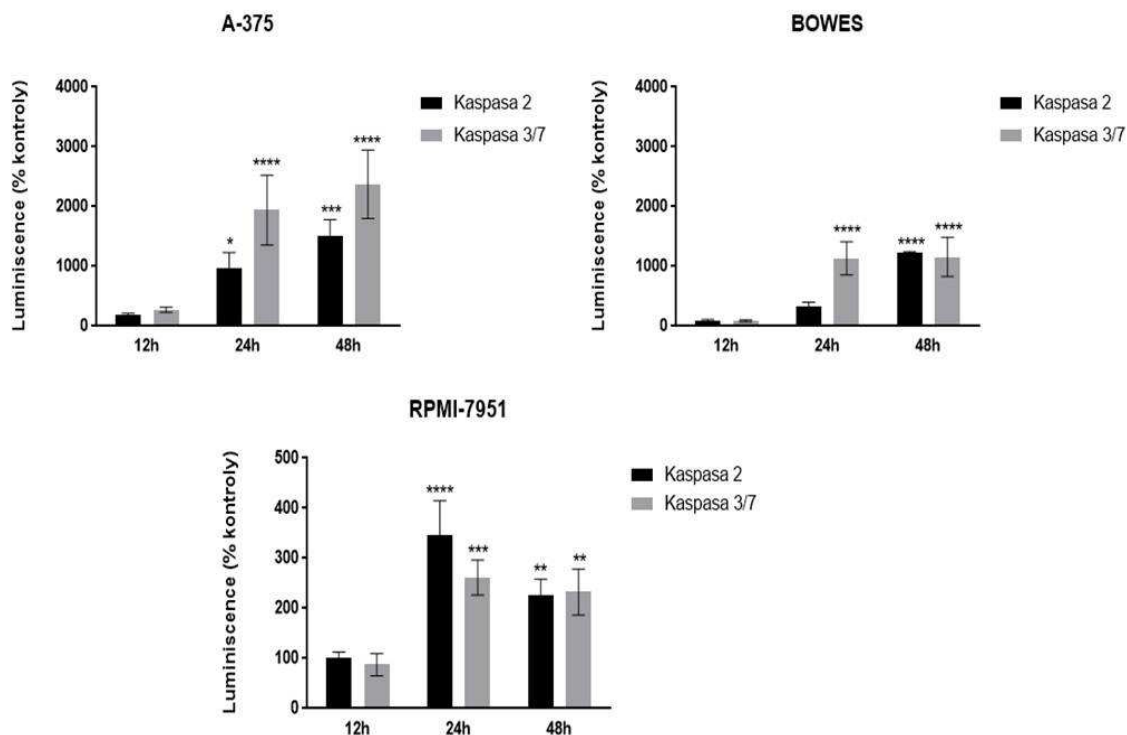
Obrázek 13 - Morfologie apoptických buněk A-375, BOWES a RPMI-7951 36 hodin po ovlivnění flubendazolem (FLU) v koncentraci 1 μM . Fázový kontrast 400x. Měřítka 10 μm .



Obrázek 14 - Kondenzace chromatinu u buněk A-375, BOWES a RPMI-7951 24 hodin po ovlivnění flubendazolem (FLU) v koncentraci 1 μM . Fluorescenční mikroskopie, zvětšení 600x. Měřítko 10 μm .



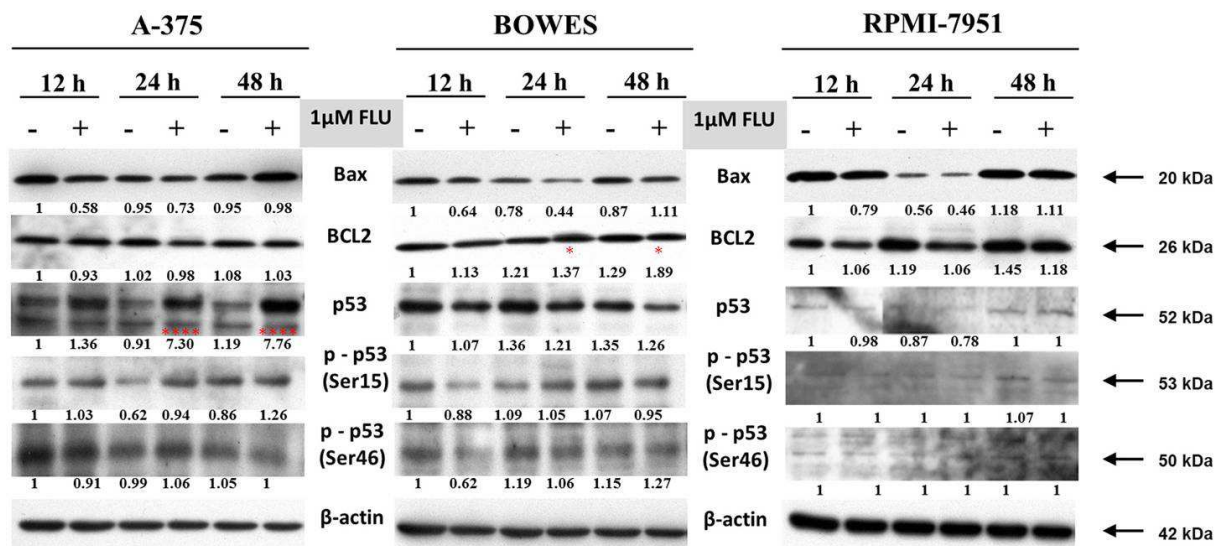
Obrázek 15 - Procento apoptických buněk 24 a 48 hodin po ovlivnění flubendazolem (FLU) v koncentraci 1 μM . Data, uvedená v procentech, představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001



Obrázek 16 - Aktivita kaspáz 2 a 3/7 v buněčných liniích A-375, BOWES a RPMI-7951 ovlivněných flubendazolem (FLU) v koncentraci 1 μM během 48 hodin. Data, uvedená v procentech kontrolly (=100 %) představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. ** P < 0,05, * P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001

6.8. Efekt FLU na p53 zprostředkované proapoptické signály

Imunoblotovací analýzy exprese *p53*, stejně jako vybrané posttranslační modifikace TP53 (konkrétně Ser-15 a Ser-46) v melanomových buňkách vystavených 1 μM FLU během 48 hodin odhalily významné rozdíly mezi testovanými buněčnými liniemi melanomu. Na jedné straně došlo k pozdnímu (48 hodin) výraznému zvýšení exprese proteinu TP53 po ovlivnění 1 μM FLU v buňkách A-375. Naopak v buňkách BOWES byly ve všech intervalech působení FLU pozorovány stabilní hladiny proteinu *p53*. Navíc v buňkách RPMI-7951 jsme nebyli schopni detekovat jakoukoliv expresi proteinu TP53 jak u kontrol, tak ovlivněných buněk, což zřejmě potvrzuje již oznámený stav absence *p53* (34). TP53 fosforylace u Ser-15 a Ser-46, které jsou považovány za pomocné posttranslační modifikace po poškození DNA a aktivaci apoptózy, nebyly signifikantně zvýšeny v žádné z testovaných melanomových linií. Podobné byly i výsledky výskytu proteinů BAX a BCL-2, kde ve všech ovlivněných melanomových buňkách byly pouze okrajové a nevýznamné změny, což naznačuje, že klasická osa TP53-BAX-BCL-2 nebyla signifikantně zapojena do FLU-indukované buněčné smrti (Obr. 17).

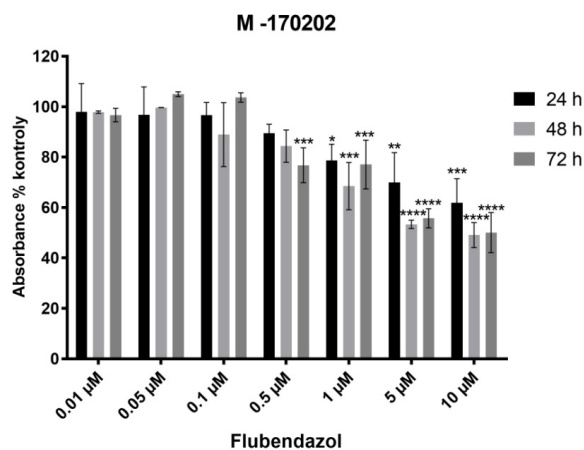


Obrázek 17 - Expres proapoptických proteinů v melanomových buňkách A-375, BOWES a RPMI-7951 po ovlivnění flubendazole (FLU) v koncentraci 1 μM zjištěno pomocí imunoblotovací analýzy po 48 hodin od ovlivnění. Data představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$

6.9. Efekt FLU na vzorky primárních melanomů

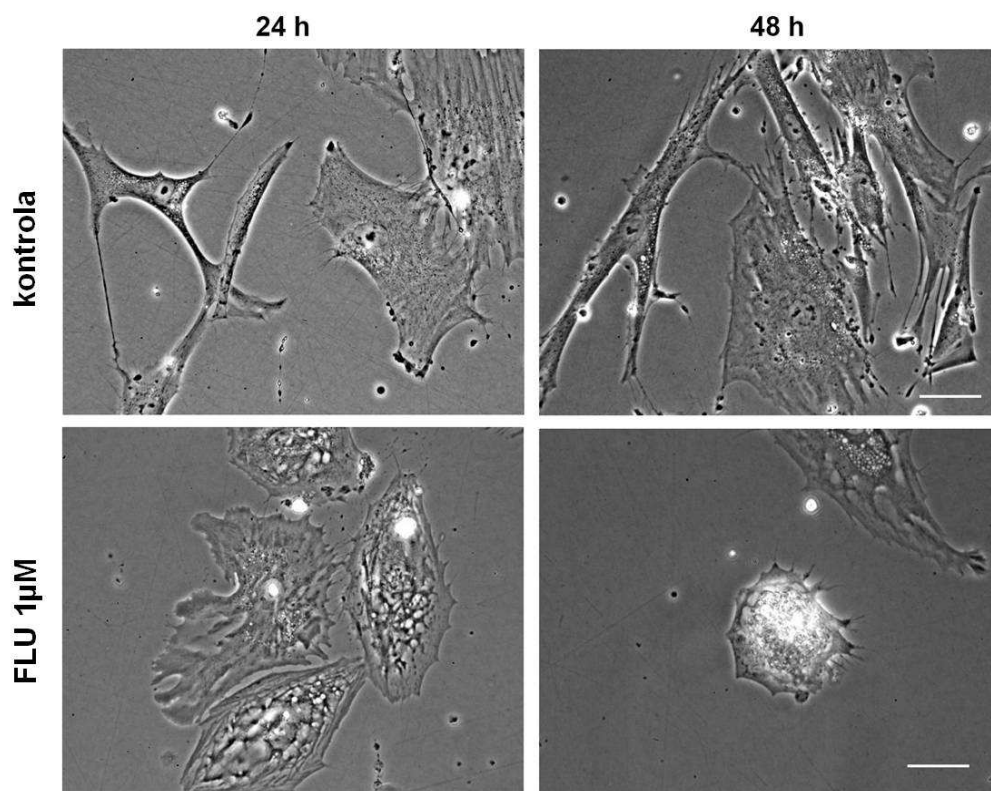
Během let 2013-2017 jsme získali 5 vzorků kožního melanomu z oddělení Plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Z těchto vzorků se nám podařilo izolovat explantátové kultury, které byly v jednotlivých vzorcích poměrně heterogenní a obsahovaly různé podíly většinou fibroblastů, melanocytů a dalších buněk s rozdílnou velikostí a chováním. Na základě růstových a kultivačních charakteristik byl vybrán jeden vzorek (M-170202) pro pilotní testování.

Cytotoxicita FLU v koncentračním rozmezí 0,01 μM - 10 μM byla ověřena na získaných melanomových buňkách z primárního explantátu izolovaného od pacienta, pomocí testu WST-1. Výsledky tohoto experimentu ukázaly podobný inhibiční účinek FLU ve srovnání s našimi použitými melanomovými buněčnými liniemi A-375, BOWES a RPMI-7951, přičemž koncentrace FLU 1 μM byla účinná již po 24 hodinách působení (Obr. 18). Naopak, hodnota FLU IC_{50} (stanovená pomocí GraphPad Prism Software) po 72 hodinách byla 1,42 μM ; tj. výrazně vyšší než hodnota získaná ze stabilizovaných linií melanomu.



Obrázek 18 - Proliferace M-170202 během působení FLU v koncentracích 0,01 μM - 10 μM měřená pomocí testu WST-1. Data, uvedená v procentech, představují průměr \pm SD ze tří nezávislých experimentů. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

Cytometrické studie melanomových buněk získaných z explantátu melanomu ukázaly, že buňky rostly poněkud pomaleji ve srovnání s melanomovými buněčnými liniemi a typicky se lišily jejich velikostí a vzhledem. Při expozici 1 μM FLU; tj. pod dávkou IC_{50} , reagovaly tím, že změnily svou vnitřní organizaci. Navíc se objevily větší vakuoly nebo vakuolovité struktury a postupně docházelo ke změnám v adhezenci. Naopak, na rozdíl od takto ovlivněných melanomových buněčných linií se nevyskytly obrovské, mnohojaderné buňky. Během delší doby od ovlivnění (24-48 hodin) se buňky začaly smršťovat, někdy pomalu někdy rychle a rozšiřovat své cytoplazmatické membrány (Obr. 19). Následně pozorovaná demise buněk byla obecně mnohem méně homogenní než v ovlivněných melanomových buněčných liniích a obsahovala alespoň tři odlišné vzory - 1) individuální smrštění buněk doprovázené zvlněním plazmatické membrány, 2) kolektivní rychlé smrštění bez jakékoliv zřetelné aktivity buněčné membrány a 3) vnitřní fragmentace, následovaná destrukcí buněk.



Obrázek 19 - Morfologické změny u vzorku explantátu melanomu ovlivněného 1 μM FLU po 48 hodin. Fázový kontrast 600 x. Měřítka 5 μm .

7. DISKUZE

Maligní melanom představuje poměrně vzácnou, ale velmi nebezpečnou formu kožní malignity, která je ve své pokročilé fázi charakterizována agresivním růstem s vysokou tendencí k metastatickému šíření a chemorezistencí. Proto není v současné době k dispozici žádná účinná cytostatická léčba pokročilého maligního melanomu a nové cílené terapie vykazují pouze omezenou klinickou účinnost (35). Díky tomu pokračují studie biologie melanomu, které jsou zaměřeny na identifikaci nových předpokládaných cílů u maligních melanocytů, které by mohly být použity pro vývoj léčby. Alternativně, prostřednictvím přezkoumání již zavedených terapeutických konceptů se vědci snaží najít nové aplikace pro budoucí léčbu této malignity (36).

Jedním ze záměrů cílené terapie v maligních buňkách je cytoskelet, konkrétně mikrotubuly. Mikrotubuly hrají podstatnou roli v různých procesech, jako je mitóza, intracelulární transport a signalizace nebo udržování tvaru a polarita buněk (37). Zejména mitotické vřetenko, které tvoří mikrotubuly při dělení buněk, se stalo základním cílem pro chemoterapeutický přístup k širokému spektru malignit. Účinnost léků, zaměřených na mikrotubuly, byla potvrzena úspěšným použitím vinka alkaloidů nebo taxanů u široké škály nádorů. Jejich klinický úspěch vyvolal celosvětové hledání sloučenin s podobným mechanismem účinku, ale zlepšenými vlastnostmi, zejména kvůli převládající existenci toxických vedlejších účinků a vyvinuté chemorezistenci (38, 39).

Koncem minulého století byly publikovány první experimenty demonstrující cytotoxicitu vybraných benzimidazolkarbamátů (tj. albendazolu a mebendazolu) u několika linií nádorových buněk. Přestože byly původně schváleny pro léčbu parazitických červů jak u lidí, tak u zvířat, selektivní zaměření na mikrotubuly rychle podnítilo vědecké zkoumání jejich potenciálního antiproliferativního účinku (24).

První zpráva o protinádorové aktivitě FLU se týkala jejích účinků na buňky leukémie a myelomů, kdy nízké koncentrace FLU indukovaly mitotickou katastrofu a buněčnou smrt v maligních buňkách. Navíc v buňkách rezistentních vůči vinblastinu, v důsledku nadměrné exprese P-glykoproteinu, byla zachována citlivost na FLU (40). V následných studiích provedených na několika buněčných liniích karcinomu prsu (MDA-MB-231, BT-549, SK-BR-3 a MCF-7) a liniích kolorektálního karcinomu a neuroblastomu, FLU vykazoval širokou protinádorovou aktivitu prostřednictvím různých mechanismů (41, 42).

Na základě těchto, již dříve publikovaných zkušeností s FLU, jsme v naší současné práci chtěli vyšetřit potenciální aktivitu FLU v *in vitro* modelu melanomu lidské pokožky nejprve pomocí několika zavedených melanomových buněčných linií s odlišnými molekulovými subtypy. Použité testy cytotoxicity ukázaly, že FLU předvídatelně inhibuje buněčný růst a proliferaci u všech použitých melanomových buněčných linií, avšak v závislosti na čase a koncentraci. Kromě toho, existence rozdílné citlivosti exponovaných buněk (jak je naznačeno dosaženými hodnotami IC_{50}) nejspíše dokazovala vlastní heterogenitu odezvy mezi jednotlivými buněčnými liniemi, která již byla prokázána s jinými benzimidazolovými deriváty a melanomovými buněčnými liniemi (43). Na základě těchto počátečních experimentů jsme si vybrali 1 μ M koncentraci FLU pro další testování v melanomových buňkách a pro ověřování jeho účinku na normálních melanocytech lidské pokožky.

Naše výsledky naznačují, že FLU má v těchto normálních melanocytech cytostatický účinek, což usuzujeme díky rychlým morfologickým změnám (tj. zploštění a expanze buněk), zpomalenému růstu a alespoň zpočátku zvýšenému zániku buněk. Na druhé straně se tyto nepříznivé změny snížily v pozdějším období (48 hodin a dále) a některé exponované melanocyty obnovily svou dynamiku a proliferaci. Zdá se tedy, že použitá koncentrace 1 μM FLU je v tomto modelu normálních kožních buněk dostatečně tolerována. Přesto je však třeba si uvědomit, že tato "tolerance" může být způsobena spíše zvláštním stavem melanocytů. Melanocyty jsou zodpovědné za syntézu melaninu v kůži a jako takové jsou vysoce odolné proti environmentálním stresům a apoptóze. Jejich tolerance k FLU proto musí být potvrzena a porovnána s jinými kožními buňkami (fibroblasty nebo keratinocyty), aby se ověřilo, zda by normální kůže nebyla touto sloučeninou vážněji postižena.

Abychom dále identifikovali mechanismy cytotoxicity FLU na testovaných buněčných liniích melanomu, provedli jsme analýzu buněčného cyklu, která odhalila, že u FLU ovlivněných buněčných populací se významně zvýšil počet buněk ve fázi G2/M což odpovídalo poklesu buněk ve fázi G1 a S buněčného cyklu. Tato zástava buněk ve fázi G2/M se zdá být charakteristickým účinkem pro mnoho benzimidazolkarbamátu v nádorových buňkách, protože to bylo pozorováno také u nádorových buněk jater a tlustého střeva ovlivněných albendazolem a v nádorových buňkách tlustého střeva ovlivněných FLU (26, 44).

Kromě zástavy buněčného cyklu došlo také u melanomových buněk ovlivněných FLU k řadě morfologických změn, které zahrnovaly: 1) časnou intracelulární vakuolizaci, zvětšení buněk, hrubnutí cytoplazmy a mnohojadernost a 2) ztrátu adherence, zaokrouhlení buněk, smrštění objemu buněk a blebování membrány. Ze všech popsanych změn byla intracelulární vakuolizace zaznamenána sporadicky u některých exponovaných buněk pouze buněčné linie BOWES. Naopak, vznik obrovských mnohojaderných buněk bylo ve všech použitých buněčných modelech téměř univerzální a jednoznačně spojeno s primárním cílem FLU, tedy mikrotubuly. FLU modifikuje strukturu mikrotubulů a inhibuje polymerizaci tubulinu tím, že se váže na β -tubulin v podobném místě jako kolchicin, ale v odlišném místě než molekuly z řady vinca alkaloidů (40). V použitých melanomových liniích tedy FLU měnil mikrotubulární uspořádání dělicích se buněk za vzniku zvýšeného výskytu aberantních multipolárních vřetýnek a abnormálních mitóz. Navíc v interfázních buňkách FLU způsoboval viditelné změny v mikrotubulární topografii. Přítomnost těchto změn naznačila aktivaci procesu zvaného mitotická katastrofa.

Mitotická katastrofa je termín, který často označuje mechanismus zpožděné buněčné smrti spojené s mitózou. Na druhé straně, několik výzkumů má alternativní pohled, který tvrdí, že mitotická katastrofa je proces způsobený aberantní mitózou vedoucí ke smrti buněk - apoptóze nebo nekróze (28,45). Vzhledem k tomu, že mitotická katastrofa může být indukována nejen mitotickými inhibitory, ale také činidly poškozující DNA, inhibována mitotickými proteiny nebo replikačním stresem, vykazuje řadu morfologických a biochemických charakteristik. V našich použitých melanomových buňkách ovlivněných FLU, bylo přítomno hned několik těchto vlastností, jako je přetrvávající blok G2/M fáze, nadměrná exprese inhibitoru buněčného cyklu p21, mnohojadernost buněk a zvýšená aktivita kaspázy 2, což jasně demonstruje aktivaci tohoto procesu. Je ale zajímavé, že mitotická katastrofa byla doprovázena chromatinovou kondenzací, mitochondriálním uvolňováním proapoptického cytochromu c a faktorem indukujícím apoptózu (AIF), aktivací kaspázy a degradací DNA

(45), tj. vlastnostmi typickými pro apoptózu, což naznačuje těsnou vazbu mezi oběma procesy. Námi získané výsledky potvrzují tuto úzkou vazbu, protože melanomové buňky ovlivněné FLU nakonec ukázaly typické apoptotické morfologie s membránovým blebováním a kondenzací jaderného chromatinu. Za tímto účelem jsme také ověřili apoptózu detekcí zvýšené aktivity kaspázy 3/7.

Zástava mitózy a mitotická katastrofa jsou silně spojeny s apoptózou, ale přesné molekulární mechanismy této asociace zůstávají nejasné. Navzdory již publikovaným výsledkům, kdy FLU indukoval apoptózu závislou na p53 v buňkách neuroblastomu (42), naše data získaná z ovlivněných melanomových buněk argumentují odlišně. FLU indukoval zvýšenou expresi TP53 pouze v buněčné linii A-375. Navíc současná fosforylace TP53 se týkala Ser-15 (tj. modifikace zvyšující akumulaci TP53), ale ne Ser-48 (tj. modifikace regulující schopnost tohoto proteinu indukovat apoptózu), což naznačuje nepřímou účast tohoto proteinu na indukované apoptóze (46). Zvýšená aktivita kaspázy 2 v exponovaných buňkách navíc naznačuje apoptózu nezávislou na p53, vzhledem k tomu že se tato iniciační kaspasa vyskytovala jak při mitotické buněčné smrti, tak i u mitotické katastrofy, prostřednictvím MOMP-závislého a p53-nezávislého procesu (47).

Aktivita rodiny proteinů BCL-2 je klíčovým faktorem určující následky mitotické katastrofy (48-52). Protein BCL-2 je široce exprimován v lidském melanomu a byl spojen s chemoresistancí melanomu prostřednictvím jeho antiapoptotické funkce (53). Bylo již prokázáno, že mebendazol, derivát benzimidazolu podobný s flubendazolem, inhibuje buněčnou proliferaci melanomu prostřednictvím BCL-2 zprostředkované buněčné odpovědi na mikrotubulární poškození (43). Kromě toho inhibice růstu melanomu zprostředkovaná mebendazolem *in vivo* je doprovázena fosforylací BCL-2 a snížením hladin X-spojeného inhibitoru apoptózy (XIAP) prostřednictvím mitochondriálních proteinů SMAC/DIABLO (46, 54). Na rozdíl od těchto zjištění, v našich experimentech ani BCL-2 ani BAX proteiny nevykazovaly zvýšenou expresi, což poukazuje na jejich zanedbatelnou úlohu v apoptotickém procesu.

Schopnost FLU inhibovat růst a proliferaci buněk melanomu zahrnující vznik mitotické katastrofy a apoptózy byla testována také na melanomových buňkách odvozených z explantátových kultur získaných ze vzorků melanomu od pacientů. Jak bylo popsáno ve výsledkové části, všech pět vzorků maligního melanomu mělo odlišný histopatologický stupeň a obsahovalo několik buněčných typů v různých počátečních poměrech a biologických vlastnostech. Jejich podrobná charakterizace a třídění však nebylo primárním cílem současné práce a výsledné primární kultury obsahovaly směs buněčných fenotypů, které podle našeho názoru přesněji odrážejí skutečné složení nádoru. Na základě růstových a kultivačních charakteristik všech vzorků byl nakonec vybrán jeden pro pilotní testování. Tyto buňky byly nejprve udržovány ve standardních laboratorních podmínkách a následně byly ovlivněny koncentrační řadou FLU. Podobně jako u stabilizovaných melanomových buněčných linií FLU indukoval inhibici růstu a proliferace melanomových buněk v závislosti na čase a koncentraci, jeho účinnost však byla nižší, jak je také patrné z vyšší hodnoty IC₅₀. Navíc morfologické studie ovlivněných melanomových buněk odhalily zcela odlišný efekt FLU; tj. buňky prakticky nevytvářely obrovské mnohojaderné struktury, místo toho se měnila jejich struktura cytoplazmy následována vnitřní implozí. Přítomnost klasické, morfologicky odlišné apoptózy byla velmi nízká a buňky se často rychle zmenšovaly a připomínaly nekrotické

buňky. Tyto pozorování jsou na jedné straně překvapující, neboť podle našich znalostí nebyly nikdy popsány v léčbě benzimidazoly. Na druhou stranu bylo předloženo, že indukovaná mitotická katastrofa by mohla působit jako prevence apoptózy nebo nekrózy (28), což by mohl být tento případ. Vzhledem k tomu, že jsme neměli žádné další údaje, nemůžeme tuto možnost potvrdit, ačkoli se zdá, že ji podporuje několik morfologických ukazatelů. Každopádně je potřeba provést další zkoumání tohoto jevu.

8. ZÁVĚRY

Tento výzkum byl zaměřen na zkoumání biologických aktivit a zejména antiproliferativních účinků derivátu benzamidazolkarbamátu - flubendazolu (FLU) - v *in vitro* modelech melanomu lidské kůže. Vzhledem k původním cílům jsme dospěli k následujícím závěrům:

- 1) V lidských maligních melanomových buněčných liniích s odlišným molekulárním profilem (A-375, BOWES a RPMI-7951), FLU během působení 72 hodin vykazuje cytotoxicitu závislou na čase a koncentraci. Cytotoxicita FLU se navíc mění mezi jednotlivými ovlivněnými buněčnými liniemi a vyplývá z konkrétně stanovených hodnot IC_{50} (A375 - $IC_{50} = 0,96 \mu\text{M}$, BOWES - $IC_{50} = 0,90 \mu\text{M}$ a RPMI-7951- $IC_{50} = 0,25 \mu\text{M}$).
- 2) Koncentrace $1 \mu\text{M}$ FLU zvolená pro další testování, má spíše cytostatický než cytotoxický účinek u normálních melanocytů lidské kůže. V těchto buňkách indukuje FLU morfologické změny, zpomaluje proliferaci a způsobuje omezenou aktivaci buněčné smrti. Pozorované účinky jsou však časově omezené a na konci testovaného intervalu ubývají. Dospělo se tedy k závěru, že působení FLU je alespoň v melanocytech tolerováno.
- 3) FLU v koncentraci $1 \mu\text{M}$ indukuje v exponovaných melanomových buněčných liniích zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M, zvyšuje expresi inhibitoru buněčného cyklu p21 a vytváří řadu morfologických změn včetně tvorby obrovských mnohojaderných a vakuolových buněk. FLU interaguje s mikrotubuly jak dělicích, tak interfázních buněk a je odpovědný za zahájení procesu mitotické katastrofy. FLU-simulovaná mitotická katastrofa vede k apoptóze v exponovaných melanomových buňkách, která je charakterizována zvýšenou aktivitou kaspázy 2 a 3/7 a typickými morfologiemi jader a membrán. TP53, ani BAX nebo BCL-2 proteiny nejsou přímo a univerzálně zapojeny do apoptózy způsobené FLU, a proto jsou zapotřebí další výzkumy týkající se tohoto mechanismu.
- 4) Pět explantátových kultur ze vzorků melanomu od pacientů s odlišným histopatologickým stupněm umožnily jejich testování citlivosti FLU. Vzhledem k jejich heterogenitě a různým biologickým vlastnostem byly pro pilotní testování použity pouze buňky odvozené z jednoho vzorku. Jejich citlivost na FLU se ukázala být nižší než u stabilizovaných buněčných linií melanomu ($IC_{50} = 1,42 \mu\text{M}$). Při ovlivnění $1 \mu\text{M}$ FLU (dávka nižší než IC_{50}) se u melanomových buněk zpomaluje jejich růst a dochází k řadě morfologických změn odlišných od těch, pozorovaných u stabilizovaných linií melanomu. Jejich morfologie smrti je také odlišná.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) GARBE, Claus, PERIS, Ketty, HAUSCHILD, Axel, SAIAG, Philippe, MIDDLETON, Mark, BASTHOLT, Lars, GROB, Jean-Jacques, MALVEHY, Josep, NEWTON-BISHOP, Julia, STRATIGOS, Alexander J., PEHAMBERGER, Hubert and EGGERMONT, Alexander M., 2016. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2016. *European Journal of Cancer*. Srpen 2016. Vol. 63, s. 201–217.
- 2) LEITER, U. and GARBE, C., 2008. Epidemiology of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer—The Role of Sunlight. In: [online]. Springer, New York, NY. s. 89–103. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 9780387775739.
- 3) GARBE, Claus and LEITER, Ulrike, 2009. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*. Leden 2009. Vol. 27, no. 1, s. 3–9.
- 4) LAKOMÝ RADEK, 2013. Současné možnosti léčby pokročilého a metastatického maligního melanomu. *ONKOLOGIE*. 2013. Vol. 7, no. 2, s. 65–68.
- 5) HOUGHTON, Alan N. and POLSKY, David, 2002. Focus on melanoma. *Cancer Cell*. Říjen 2002. Vol. 2, no. 4, s. 275–278.
- 6) TSAO, Hensin, ATKINS, Michael B. and SOBER, Arthur J., 2004. Management of Cutaneous Melanoma. *New England Journal of Medicine*. Zář 2004. Vol. 351, no. 10, s. 998–1012.
- 7) GILCHREST, Barbara A., ELLER, Mark S., GELLER, Alan C. and YAAR, Mina, 1999. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *New England Journal of Medicine*. Duben 1999. Vol. 340, no. 17, s. 1341–1348.
- 8) GRAY-SCHOPFER, Vanessa, WELLBROCK, Claudia and MARAIS, Richard, 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. Únor 2007. Vol. 445, no. 7130, s. 851–857.
- 9) GEOFFREY A. CHARTERS, 2007. Human metastatic melanoma in vitro. *Melanocyte biology*. 2007. The University of Auckland, New Zeland. [online]. Dostupné z: <https://www.scribd.com/document/124442315/Melanocyte-Biology>
- 10) CICHOREK, Mirosława, WACHULSKA, Małgorzata, STASIEWICZ, Aneta and TYMIŃSKA, Agata, 2013. Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii*. Únor 2013. Vol. 30, no. 1, s. 30–41.
- 11) KAREL, Pizinger, 2003. *Kožní pigmentové projevy*. Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-6383-5.
- 12) WASMEIER, Christina, HUME, Alistair N., BOLASCO, Giulia and SEABRA, Miguel C., 2008. Melanosomes at a glance. *J Cell Sci*. Prosinec 2008. Vol. 121, no. 24, s. 3995–3999.
- 13) DAMSKY, W. E. and BOSENBERG, M., 2017. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*. Říjen 2017. Vol. 36, no. 42, s. 5771–5792.
- 14) BENNETT, Dorothy C., 2003. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene*. Květen 2003. Vol. 22, no. 20, s. 3063–3069.
- 15) HAYWARD, N., 2000. New developments in melanoma genetics. *Current Oncology Reports*. Červenec 2000. Vol. 2, no. 4, s. 300–306.
- 16) LAWRENCE, Michael S., STOJANOV, Petar, et al., 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. Červenec 2013. Vol. 499, no. 7457, s. 214–218.
- 17) YADAV, Geeta and GANGULY, Swastika, 2015. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Červen 2015. Vol. 97, s. 419–443.
- 18) LACEY, E., 1990. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today (Personal Ed.)*. Duben 1990. Vol. 6, no. 4, s. 112–115.
- 19) IRELAND, C. M., GULL, K., GUTTERIDGE, W. E. and POGSON, C. I., 1979. The interaction of benzimidazole carbamates with mammalian microtubule protein. *Biochemical Pharmacology*. Zář 1979. Vol. 28, no. 17, s. 2680–2682.
- 20) COOPER, Geoffrey M., 2000. Microtubules. [online]. 2000. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9932/>
- 21) JORDAN, Mary Ann and WILSON, Leslie, 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. Duben 2004. Vol. 4, no. 4, s. 253–265.
- 22) JASRA, N., SANYAL, S. N. and KHERA, S., 1990. Effect of thiabendazole and fenbendazole on glucose uptake and carbohydrate metabolism in *Trichuris globulosa*. *Veterinary Parasitology*. Březen 1990. Vol. 35, no. 3, s. 201–209.

- 23) CUMINO, Andrea C., ELISSONDO, María Celina and DENEGRÍ, Guillermo M., 2009. Flubendazole interferes with a wide spectrum of cell homeostatic mechanisms in *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitology International*. Zář 2009. Vol. 58, no. 3, s. 270–277.
- 24) ČÁŇOVÁ, Kristýna, ROZKYDALOVÁ, Lucie and RUDOLF, Emil, 2017. Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2017. Vol. 60, no. 1, s. 5–11.
- 25) ZHANG, Lan, GUO, Mingrui, et al., 2015. Systems biology-based discovery of a potential Atg4B agonist (Flubendazole) that induces autophagy in breast cancer. *Molecular BioSystems*. Ř 2015. Vol. 11, no. 11, s. 2860–2866.
- 26) KRÁLOVÁ, Věra, HANUŠOVÁ, Veronika, RUDOLF, Emil, ČÁŇOVÁ, Kristýna and SKÁLOVÁ, Lenka, 2016. Flubendazole induces mitotic catastrophe and senescence in colon cancer cells in vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Únor 2016. Vol. 68, no. 2, s. 208–218.
- 27) KRÁLOVÁ, Věra, HANUŠOVÁ, Veronika, STAŇKOVÁ, Petra, KNOPPOVÁ, Kateřina, ČÁŇOVÁ, Kristýna and SKÁLOVÁ, Lenka, 2013. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*. Ř 2013. Vol. 24, no. 9, s. 911–919.
- 28) VAKIFAHMETOGLU, H., OLSSON, M. and ZHIVOTOVSKY, B., 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation*. Červenec 2008. Vol. 15, no. 7, s. 1153–1162.
- 29) CASTEDO, Maria, PERFETTINI, Jean-Luc, ROUMIER, Thomas, VALENT, Alexander and RASLOVA, Hana, 2004. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*. Květen 2004. Vol. 23, no. 25, s. 4362–4370
- 30) RONINSON, Igor B., BROUDE, Eugenia V. and CHANG, Bey-Dih, 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates*. Ř 2001. Vol. 4, no. 5, s. 303–313.
- 31) GORDON, David J., RESIO, Benjamin and PELLMAN, David, 2012. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature Reviews Genetics*. Březen 2012. Vol. 13, no. 3, s. 189–203.
- 32) ESCANDON, J., KING, L., BLOBSTEIN, R., ELLER, M. S. and AURICH-COSTA, J., 2016. Aneuploidy and Tetraploidy as Distinct Patterns During Melanomagenesis. *Surgical technology international*. Ř 2016. Vol. XXIX, s. 53–59.
- 33) JANSSEN, Aniek, KOPS, Geert J. P. L. and MEDEMA, René H., 2009. Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Listopad 2009. Vol. 106, no. 45, s. 19108–19113.
- 34) WARENIUS, H. M., JONES, M., GORMAN, T. and MCLEISH, R., 2000. Combined RAF1 protein expression and p53 mutational status provides a strong predictor of cellular radiosensitivity. *British Journal of Cancer*. Ř 2000. Vol. 83, no. 8, s. 1084–1095.
- 35) MOZŪRAITIENĖ, Julija, BIELSKIENĖ, Kristina, ATKOČIUS, Vydmantas and LABEIKYTĖ, Danutė, 2015. Molecular alterations in signal pathways of melanoma and new personalized treatment strategies: Targeting of Notch. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 2015. Vol. 51, no. 3, s. 133–145.
- 36) SHIM, Joong Sup and LIU, Jun O., 2014. Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. *International Journal of Biological Sciences*. 2014. Vol. 10, no. 7, s. 654–663.
- 37) VALIRON, O., CAUDRON, N. and JOB, D., 2001. Microtubule dynamics. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. Prosinec 2001. Vol. 58, no. 14, s. 2069–2084.
- 38) FOJO, Antonio Tito and ADELBERG, David E., 2010. Microtubule Targeting Agents. In: *Drug Management of Prostate Cancer* [online]. Springer, New York, NY. s. 179–194. ISBN 978-1-60327-831-7.
- 39) ZHOU, Jun and GIANNAKAKOU, Paraskevi, 2005. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents*. Leden 2005. Vol. 5, no. 1, s. 65–71.
- 40) SPAGNUOLO, Paul A., HU, Jiayi, HURREN, Rose, WANG, Xiaoming and GRONDA, Marcela, 2010. The anthelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood*. Červen 2010. Vol. 115, no. 23, s. 4824–4833.
- 41) HOU, Zhi-Jie, LUO, Xi, ZHANG, Wei, et al., 2015. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*. Únor 2015. Vol. 6, no. 8, s. 6326–6340.

- 42) MICHAELIS, Martin, AGHA, Bishr and ROTHWEILER, Florian, 2015. Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. *Scientific Reports*. Únor 2015. Vol. 5.
- 43) DOUDICAN, Nicole, RODRIGUEZ, Adrianna, OSMAN, Iman and ORLOW, Seth J., 2008. Mebendazole Induces Apoptosis via Bcl-2 Inactivation in Chemoresistant Melanoma Cells. *Molecular Cancer Research*. Srpen 2008. Vol. 6, no. 8, s. 1308–1315.
- 44) POURGHOLAMI, M. H, WOON, L and ALMAJD, R, 2001. In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. *Cancer Letters*. Duben 2001. Vol. 165, no. 1, s. 43–49.
- 45) CASTEDO, Maria, PERFETTINI, Jean-Luc, ROUMIER, Thomas, ANDREAU, Karine, MEDEMA, Rene and KROEMER, Guido, 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. Duben 2004. Vol. 23, no. 16, s. 2825–2837.
- 46) ČÁNOVÁ, K., ROZKYDALOVÁ, L., VOKURKOVÁ, D. and RUDOLF, E., 2018. Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. Únor 2018. Vol. 46, s. 313–322.
- 47) DAWAR, S., LIM, Y., PUCCINI, J., WHITE, M., THOMAS, P., BOUCHIER-HAYES, L., GREEN, D. R., DORSTYN, L. and KUMAR, S., 2017. Caspase-2-mediated cell death is required for deleting aneuploid cells. *Oncogene*. Květen 2017. Vol. 36, no. 19, s. 2704–2714.
- 48) TERRANO, David T., UPRETI, Meenakshi and CHAMBERS, Timothy C., 2010. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. Únor 2010. Vol. 30, no. 3, s. 640–656.
- 49) HARLEY, Margaret E., ALLAN, Lindsey A., SANDERSON, Helen S. and CLARKE, Paul R., 2010. Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *The EMBO journal*. Červenec 2010. Vol. 29, no. 14, s. 2407–2420.
- 50) SHI, Jue, ZHOU, Yuan, HUANG, Hsiao-Chun and MITCHISON, Timothy J., 2011. Navitoclax (ABT-263) accelerates apoptosis during drug-induced mitotic arrest by antagonizing Bcl-xL. *Cancer Research*. Červenec 2011. Vol. 71, no. 13, s. 4518–4526.
- 51) TUNQUIST, Brian J., WOESSNER, Richard D. and WALKER, Duncan H., 2010. Mcl-1 stability determines mitotic cell fate of human multiple myeloma tumor cells treated with the kinesin spindle protein inhibitorARRY-520. *Molecular Cancer Therapeutics*. Červenec 2010. Vol. 9, no. 7, s. 2046–2056.
- 52) SAKURIKAR, Nandini, EICHHORN, Joshua M., ALFORD, Sarah E. and CHAMBERS, Timothy C., 2014. Identification of a mitotic death signature in cancer cell lines. *Cancer Letters*. Únor 2014. Vol. 343, no. 2, s. 232–238.
- 53) MC GEE, Margaret M., 2015. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators of Inflammation*. 2015. Vol. 2015, s. 146282.
- 54) DOUDICAN, Nicole A., BYRON, Sara A., POLLOCK, Pamela M. and ORLOW, Seth J., 2013. XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. *Anti-Cancer Drugs*. February 2013. Vol. 24, no. 2, p. 181–188.

10. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Původní vědecké práce v časopisech s IF

1. ČÁŇOVÁ, K., ROZKYDALOVÁ, L., VOKURKOVÁ, D. and RUDOLF, E., 2018. Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. Únor 2018. Vol. 46, s. 313–322. (IF 2,866)
2. KRÁLOVÁ, Věra, HANUŠOVÁ, Veronika, RUDOLF, Emil, ČÁŇOVÁ, Kristýna and SKÁLOVÁ, Lenka, 2016. Flubendazole induces mitotic catastrophe and senescence in colon cancer cells in vitro. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Únor 2016. Vol. 68, no. 2, s. 208–218. (IF 2,405)
3. ŘEZÁČOVÁ, K., ČÁŇOVÁ, K., BEZROUK, A. and RUDOLF, E., 2016. Selenite induces DNA damage and specific mitochondrial degeneration in human bladder cancer cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*. Duben 2016. Vol. 32, s. 105–114. (IF 2,866)
4. KRÁLOVÁ, Věra, HANUŠOVÁ, Veronika, STAŇKOVÁ, Petra, KNOPPOVÁ, Kateřina, ČÁŇOVÁ, Kristýna and SKÁLOVÁ, Lenka, 2013. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*. Říjen 2013. Vol. 24, no. 9, s. 911–919. (IF 2,320)

Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

5. ČÁŇOVÁ, Kristýna, ROZKYDALOVÁ, Lucie a RUDOLF, Emil, 2017. Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2017. Vol. 60, no. 1, s. 5–11.