

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Vliv albendazolu na proliferaci buněk *in vitro*

Diplomová práce

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

Školitel specialista: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Bc. Knoppová Kateřina

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

Datum

Podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Věře Králové, Ph.D. za odborné vedení v průběhu této práce, cenné rady a připomínky. Děkuji také Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. a Mgr. Veronice Hanušové a dále děkuji všem pracovníkům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za ochotu a pomoc.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Kateřina Knoppová

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

Školitel specialista: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv albendazolu na proliferaci buněk *in vitro*

Albendazol (ABZ) patří mezi benzimidazolová anthelmintika a je široce využíván k léčbě parazitárních onemocnění člověka i zvířat. Mechanismus účinku spočívá v inhibici polymerace mikrotubulů, ke které dojde po navázání ABZ na β -podjednotku tubulinu parazitů. V důsledku toho následně dochází k narušení životních funkcí parazita a k jeho smrti. Po objasnění tohoto mechanismu byl ABZ testován jako látka s možným protinádorovým účinkem. Bylo prokázáno, že je schopen inhibovat proliferaci některých nádorových buněčných linií. V této práci jsme se zabývali účinkem ABZ na proliferaci buněk *in vitro*. Pro potřeby našeho experimentu byly použity buněčné linie odvozené od kolorektálního karcinomu – SW 480 a SW 620 společně s buněčnou linií NCM 460, odvozenou z buněk normální střevní sliznice. Buňky byly ovlivněny koncentracemi ABZ v rozmezí 0,01 – 10 μM a následně inkubovány 24, 48 a 72 hod. Pro stanovení viability buněk jsme použili metody WST-1 a test neutrální červeně (NRU). V případě obou metod ABZ inhiboval proliferaci testovaných buněk v závislosti na koncentraci a době působení. V časovém intervalu 72 hod po ovlivnění jsme vypočítali hodnoty IC_{50} pro všechny testované linie. Jako nejcitlivější k působení ABZ se jevila linie SW 480. Při porovnání obou použitých metod (WST-1 a NRU) se metoda WST-1 jevila jako více citlivá. Dále jsme pomocí průtokové cytometrie měřili distribuci fází buněčného cyklu v časovém intervalu 24 hod po ovlivnění ABZ koncentracemi v rozmezí 0,2 - 1 μM . Měření jsme prováděli na buněčné linii SW 480. Se zvyšující se koncentrací ABZ způsoboval akumulaci buněk v G2/M fázi buněčného cyklu v porovnání s kontrolním vzorkem. Z našich experimentů tedy vyplývá, že ABZ v koncentracích nižších než 1 μM způsobuje zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a inhibuje proliferaci buněk kolorektálního karcinomu *in vitro*.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Knoppová

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

Supervisor specialist: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Influence of albendazole on cell proliferation *in vitro*

Albendazole (ABZ) is a benzimidazole anthelmintic widely used for the treatment of parasitic diseases in man and animals. The mechanism of action is based on inhibition of microtubule polymerization by binding of ABZ to the β -subunit of tubulin in parasites. As a result, it subsequently leads to the disruption of vital functions of the parasite and to its death. After elucidation of this mechanism, ABZ was tested as a potential anticancer agent. It has been shown that it is able to inhibit proliferation of some cancer cell lines. In this study, we examined the effect of ABZ on cell proliferation *in vitro*. For the purpose of our experiment we used cell lines derived from colorectal carcinoma – SW 480 and SW 620 together with a cell line NCM 460 isolated from normal colonic mucosa. The cells were treated with ABZ in the concentration range of 0.01 - 10 μ M for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined using WST-1 assay and Neutral Red Uptake Test (NRU). ABZ inhibited cell proliferation in a concentration-dependent and time-dependent manner, which was shown using both methods. We calculated the IC_{50} values for all tested cell lines at the time interval of 72 hours of treatment with ABZ. The cell line SW 480 appeared as the most sensitive to ABZ. Comparing both methods used (WST-1 and NRU), the WST-1 assay was more sensitive. Using flow cytometry, we also measured cell cycle distribution of SW 480 cells treated with ABZ in concentration range 0.2 - 1 μ M for 24 hours. Increasing concentrations of ABZ caused accumulation of cells in G2/M phase of the cell cycle in comparison with the control. In conclusion, ABZ in concentrations lower than 1 μ M causes cell cycle arrest in G2/M phase and inhibits proliferation of colorectal cancer cells *in vitro*.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	10
2.1	Nádorová onemocnění	11
2.1.1	Vznik nádorové buňky.....	11
2.1.2	Rizikové faktory	12
2.2	Kolorektální karcinom	13
2.2.1	Mechanismus vzniku	14
2.2.2	Epidemiologie.....	15
2.2.3	Symptomy.....	17
2.2.4	Prevence.....	17
2.2.5	Stanovení diagnózy.....	18
2.2.6	Terapie	19
2.3	Albendazol.....	20
2.3.1	Farmakodynamika	21
2.3.2	Farmakokinetika	21
2.3.3	Toxicita	23
2.3.4	Nežádoucí účinky	24
2.3.5	Protinádorové účinky.....	24
3	Cíl práce.....	26
4	Materiál a metody	28
4.1	Přístroje.....	29
4.2	Spotřební materiál.....	29
4.3	Chemikálie.....	30
4.4	Biologický materiál.....	31
4.5	Pasážování buněk.....	32

4.6	Počítání buněk na analyzátoru Cellometer Auto T4.....	32
4.7	Nasazování buněk do 96ti-jamkových destiček.....	33
4.8	Příprava pracovních roztoků albendazolu pro WST-1 a test neutrální červeně ...	33
4.9	Ovlivňování buněk.....	34
4.10	Stanovení metabolické aktivity buněk	36
4.10.1	Metodika testu WST–1	36
4.11	Stanovení integrity plazmatické membrány buněk.....	37
4.11.1	Metodika testu neutrální červeně	37
4.12	Nasazování buněk do kultivačních lahví	38
4.13	Příprava pracovních roztoků albendazolu pro průtokovou cytometrii	38
4.14	Ovlivňování a fixace buněk pro průtokovou cytometrii	39
4.15	Průtoková cytometrie	41
4.16	Měření distribuce fází buněčného cyklu	42
4.17	Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení	42
5	Výsledky	43
5.1	Vliv albendazolu na metabolickou aktivitu buněk	44
5.2	Vliv albendazolu na integritu plazmatické membrány buněk	46
5.3	Porovnání hodnot IC_{50}	48
5.4	Hodnocení buněčného cyklu průtokovou cytometrií.....	49
6	Diskuze	52
7	Závěr	57
8	Seznam zkratk	59
9	Seznam použité literatury	62

1 Úvod

Kolorektální karcinom neboli rakovina tlustého střeva a konečníku, je již více než dvě generace nemalým problémem české populace. Od roku 1960 výskyt tohoto onemocnění stále stoupá a od 90. let minulého století zaujímá Česká republika přední postavení ve světových statistikách. Ročně přibude v českém státě kolem 8000 nových pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem (diagnóza C18-C20) a více než 4000 osob na toto onemocnění zemře. Tento typ nádoru je možné označit za jeden z nejlépe prevencí ovlivnitelných a zároveň léčitelných, je však nutné ho zachytit v časném stádiu (Zavoral et al. 2013).

Přesnou příčinu vzniku kolorektálního karcinomu u většiny pacientů neznáme, ale existují rizikové faktory, které možnost vzniku onemocnění zvyšují. Je to například věk, mužské pohlaví, složení potravy, kouření či dědičné vlivy.

Vývoj tohoto typu nádoru trvá až 15 let, je tu tedy možnost včasného záchytu a zahájení léčby, avšak příznaky v časném stádiu bývají často podceňovány a dochází tedy k dalšímu rozvoji onemocnění, se kterým se naděje na úplné vyléčení snižuje (Kiss a Tomášek 2010).

Přestože se možnosti léčby zlepšují, u pacientů se záchytem kolorektálního karcinomu v pozdním stádiu je prognóza stále špatná. Situace není příznivá ani u jiných typů nádorů a tak se výzkum zabývá neustále hledáním nových látek, které by mohly pozitivně ovlivnit terapii nádorových onemocnění.

Pomocí metod WST-1 a testu neutrální červeně jsme v této práci zkoumali vliv benzimidazolového anthelmintika albendazolu na proliferaci buněk kolorektálního karcinomu a buněk normální střevní sliznice *in vitro* a dále jeho vliv na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie.

2 Teoretická část

2.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění představují stále závažný problém moderní medicíny. Počet těchto onemocnění i přes veškeré snahy o prevenci stále vzrůstá. Důležité je však brát v úvahu prodlužující se délku lidského života, jelikož incidence nádorových onemocnění stoupá s věkem člověka. Dále je třeba zmínit zhoršující se životní prostředí, nezdravý životní styl či stres, ke kterému zajisté přispívají vyšší nároky společnosti na uplatnění se v pracovním procesu.

V dnešní době jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí v naší populaci, přičemž na prvním místě jsou choroby kardiovaskulární. V České republice onemocní různým typem rakoviny ročně přibližně 73 000 lidí a více než 27 000 jich na toto onemocnění zemře. Velká úmrtnost souvisí především se skutečností, že řada případů je diagnostikována až v pokročilém stádiu onemocnění (web 1, Altaner 2008).

2.1.1 Vznik nádorové buňky

Za normálních okolností je růst buněk a tkání přísně regulovaný a hlídáný proces, který je podřízený konkrétním potřebám organismu. V případě, že se buňka z různých důvodů vymkne regulaci a pokračuje v buněčném dělení, je možné, že se z ní vyvine zárodek zhoubného nádoru. Na lidský organismus působí po celý život fyzikální, chemické a biologické faktory, které mohou vést k mutacím v buňkách (Altaner 2008). Mezi fyzikální faktory vyvolávající nádorovou transformaci patří UV záření, rtg záření či gama záření. Benzen, asbest, polycyklické aromatické uhlovodíky, nitrosaminy a mnoho dalších látek řadíme mezi chemické karcinogeny (Dršata et al. 2009).

K mutacím v organismu dochází díky řadě náhodných a příznivých okolností pro buňku, která tak získává prakticky neomezenou možnost proliferovat. Mutace způsobující tyto změny se týkají především dvou kategorií genů. První skupinu tvoří proliferací geny, druhá je označována jako geny antiproliferační. Pokud dojde k mutaci v genu pro proliferaci, nastává zvýšená exprese proteinů, která vede k nadměrnému buněčnému dělení. Tyto geny se nazývají onkogeny, přičemž nemutovaný gen je označován jako protoonkogen. Geny antiproliferační jsou označovány jako tumor – supresorové geny. Obě skupiny genů kódují různé typy proteinů. Pokud například dojde

k mutaci genu pro proteiny regulující přežití buněk a jejich zánik, buňka může získat schopnost přežít i bez potřebných proliferčních signálů (Alberts et al. 1998).

Vznik nádorové buňky však není jednoduchý děj, ale jedná se o vícestupňový proces, na kterém se podílí kumulace změn způsobených predispozicemi, aktivací onkogenů a inaktivací supresorových genů (Dršata et al. 2009).

Charakteristické rysy nádorových buněk jsou:

- hyperplázie – nekontrolovaná proliferace buněk, rezistence vůči apoptóze
- anaplázie – ztráta buněčné funkce
- invazivita – prorůstání nádorů do zdravých tkání, schopnost tvořit nové cévy a kapiláry
- metastázování – schopnost oddělení se od původního nádoru a vytváření sekundárních nádorů (metastázy) v jiných částech těla (Hynie 2003).

Dalším typickým znakem nádorové buňky je telomerázová aktivita. Telomery obsahují opakující se nukleotidové sekvence, které umožňují replikaci konců chromosomů (Dršata et al. 2009). U normálních buněk dochází postupně ke zkracování telomery a tím i ke smrti těchto buněk. U nádorově zvrhlých buněk je neustále udržována konstantní délka opakujících se nukleotidových sekvencí na konci chromosomů, které tvoří telomery (Altaner 2008).

2.1.2 Rizikové faktory

Rizikové faktory pro vznik nádoru lze obecně rozdělit na ty, které můžeme vhodným způsobem ovlivnit, a na faktory neovlivnitelné, kterým se nelze úplně vyhnout.

Do druhé skupiny patří zejména:

- genetická predispozice
- virové a bakteriální infekce
- ionizační záření
- znečištěné životní prostředí.

Mezi faktory, které lze ovlivnit, se řadí například:

- kouření
- složení stravy

- vysoký příjem alkoholu
- nízká fyzická aktivita
- obezita
- některé léky - např. cytostatika, která mohou způsobit sekundární malignity (Šmejkalová 2012).

Především strava a kouření představují jedny z nejdůležitějších rizikových faktorů. Až ke třetině úmrtí na nádorová onemocnění dochází v důsledku kouření, které lze rozdělit na aktivní a pasivní. Je tedy zřejmé, že odstraněním tohoto faktoru by došlo k výraznému snížení výskytu nádorových onemocnění, především pak rakoviny plic. U osob, které začaly kouřit v mladém věku, se riziko úmrtí na nádory způsobené kouřením značně zvyšuje. Stejně je tomu i u dětí, které byly v dětství pravidelně pasivně vystavovány karcinogennímu účinku cigaretového kouře.

Dalším velice významným faktorem je strava, ve které se nacházejí látky působící preventivně proti vzniku nádoru, ale také nejrůznější chemické látky (karcinogeny), které ke vzniku zhoubného bujení přispívají. Je tedy na místě věnovat potravě, kterou konzumujeme, zvýšenou pozornost. V ohrožení je zvláště trávicí systém, kterým je potrava zpracována, a s tím související především vznik nádorů střev. Jak již bylo uvedeno, strava může mít protekční účinek (příznivě působí např. dostatek vlákniny, čerstvé ovoce a zelenina, vitamíny A, C, E), na druhé straně může významným způsobem přispívat ke vzniku nádoru např. nadměrná konzumace alkoholu, červeného masa a živočišných tuků (Altaner 2008).

2.2 Kolorektální karcinom

Mluvíme – li o kolorektálním karcinomu (CRC), jedná se o zhoubný nádor tlustého střeva a konečníku. Ve více než 90 % jde histologicky o adenokarcinomy, které lze popsat jako nádory, vznikající ze žlaznatých buněk střevní sliznice. Pouze vzácně se objevují lymfom, karcinoid či sarkom. U těchto typů nádorů je pak nasazena odlišná léčba.

U většiny pacientů nejsme schopni určit přesnou příčinu, známe však rizikové faktory pro vznik kolorektálního karcinomu. Jedním z nich je vyšší věk, podobně jako u většiny nádorových onemocnění. Rakovinou tlustého střeva a konečníku trpí především pacienti nad 50 let.

Velkou roli hrají také dědičné vlivy a to obzvláště vyskytuje-li se CRC u příbuzných prvního stupně, tj. u pokrevních rodičů a sourozenců.

Prvním stádiem většiny kolorektálních karcinomů jsou polypy. Jedná se o výrůstky ze střešní stěny, ze kterých může za delší časový úsek vzniknout nádor. Je proto nutné polypy odstranit a odeslat na histologické vyšetření. Tímto způsobem je tedy možné snížit riziko vzniku karcinomu. Důležitým faktem však je, že se polypy mohou tvořit opakovaně a je proto někdy nutné je odstranit vícekrát.

Dalšími faktory, které jsou považovány za rizikové z hlediska vzniku CRC, jsou chronická zánětlivá onemocnění střev (ulcerózní kolitida a Crohnova choroba) a v neposlední řadě nevhodná strava (Kiss a Tomášek 2010).

2.2.1 Mechanismus vzniku

Pro začátek vzniku CRC je typická DNA mutace nebo epigenetická změna jednoho nebo více genů, které postihují epiteliální buňky střevních krypt. Dochází ke ztrátě funkcí regulujících buněčný cyklus, k poruchám přirozených opravných a kontrolních systémů DNA replikace a v důsledku toho vzniká nekontrolovatelné dělení buněk. Podle původu iniciační mutace rozlišujeme vrozené a sporadické formy CRC.

Vrozené formy kolorektálního karcinomu

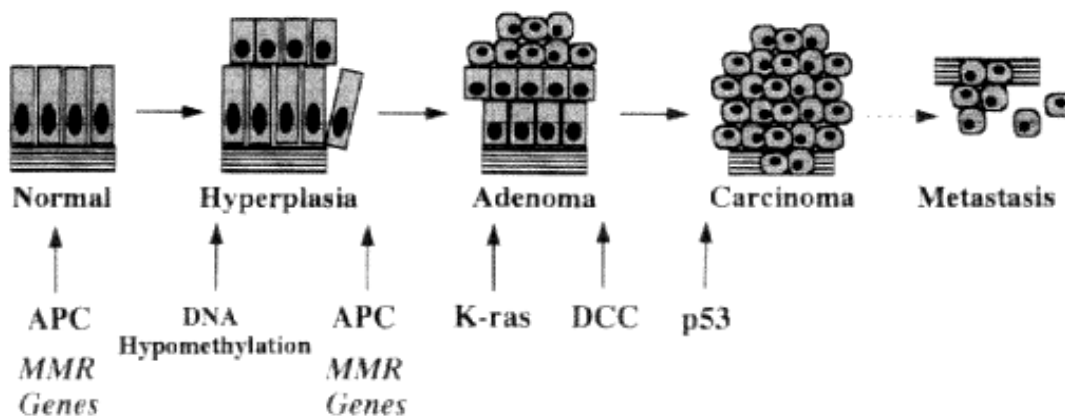
Přibližně 15 % CRC je způsobeno vrozenou predispozicí, která se přenáší ve formě dědičné genové poruchy. Mezi nejznámější typy patří familiární adenomatózní polypóza (FAP) a hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC).

Pro FAP je typický nález stovek až tisíců polypů v tlustém střevě a rektu. Jedná se o autosomálně dominantní syndrom. U těchto pacientů je nejčastější mutace v genu APC (Adenomatous Polyposis Coli), (Minárik a Mináriková 2005).

HNPCC je onemocnění označované též jako Lynchův syndrom. V porovnání s FAP se zde nenachází velké množství střevních polypů. Opět se jedná o autosomálně dědičné postižení, které je zapříčiněno nejčastěji mutací některého genu ze skupiny tzv. "mismatch-repair genů" (MMR). Tyto geny zajišťují systém oprav náhodně vzniklých chyb při DNA replikaci (Minárik a Mináriková 2005).

Sporadické formy kolorektálního karcinomu

Jedná se o více než 85 % případů CRC. Tyto nádory primárně vznikají na základě působení vnějších faktorů. V roce 1990 Fearon a Vogelstein prezentovali důkazy o několikastupňovém procesu vzniku sporadického kolorektálního karcinomu. Vogelsteinův model prezentuje formaci sporadického CRC z adenomových polypů v důsledku nahromadění somatických mutací několika onkogenů a tumor supresorových genů. Na počátku této dráhy dochází k mutaci genu APC a postupně k hyperplazii buněk střevní sliznice a ke vzniku polypů. Další mutace nastávají nejčastěji v protoonkogenu K-ras (Kirsten rat sarcoma), jejichž důsledkem je zablokování proteinu v jeho aktivní formě. Výsledkem je tvorba benigního adenomu, který se inaktivací nádorového supresorového genu DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) mění na pozdní adenom. Posledním z genů mutujících dle Vogelsteinova modelu je tumor supresorový gen p53. Ztrátou funkce genu p53 dochází až k vývoji maligního karcinomu (Fearon a Vogelstein 1990).



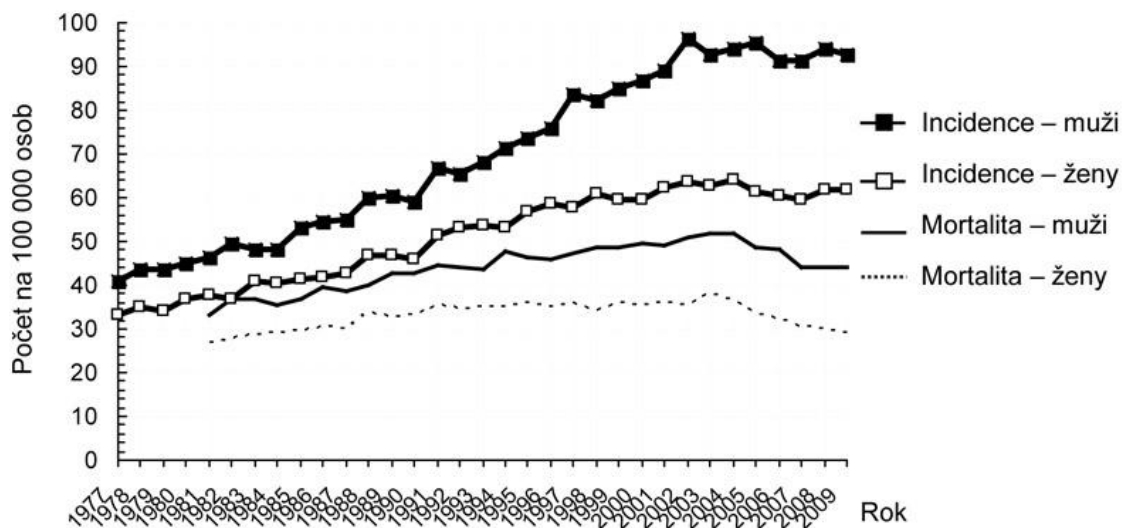
Obr. 1 Vývoj CRC (Howe a Guillem 1997)

2.2.2 Epidemiologie

Kolorektální karcinom patří v České republice mezi nejčastější malignity u mužské i ženské populace. Incidence značně narůstá s věkem a i v mezinárodních statistikách je ČR v incidenci CRC na předních pozicích. Konkrétně v Evropě obsazuje 2. místo u mužů a u žen je na 5. místě (Dušek et al. 2012).

Prevalence CRC je v ČR u mužů druhá nejvyšší, po zhoubném nádoru prostaty, a u žen je třetí nejvyšší. Vyšší je již jen u karcinomu prsu a dělohy (Dušek et al. 2012).

V mortalitě na nádorová onemocnění je u obou pohlaví tento typ nádoru na druhém místě. U žen je řazen po karcinomu prsu a u mužů je před ním již jen karcinom plic. U ženské populace se však po 75. roce života posouvá na místo první. Mortalita závisí především na stádiu onemocnění v době stanovení diagnózy. V České republice přežívá průměrně 41 % pacientů se zhoubným kolorektálním karcinomem 5 let, velký vliv na to má však již zmiňované stádium nemoci, ve kterém se pacient v době záchytu nachází (Lipská et al. 2009).



Obr. 2 Incidence a mortalita CRC v ČR (Dušek et al. 2012)

Stádia kolorektálního karcinomu

- Stádium 0 Nádor se nachází pouze na sliznici střeva.
- Stádium I Dochází k prorůstání nádoru do hlubších vrstev stěny střeva.
- Stádium II Nádor prorůstá celou střevní stěnou, případně až do sousedních orgánů. Nešíří se do okolních uzlin a nejsou vzdálené metastázy.
- Stádium III Nádor se rozšiřuje i do okolních uzlin, nejsou vzdálené metastázy.
- Stádium IV Dochází ke vzniku metastáz. Nejčastěji se nacházejí v játrech nebo v plicích (Kiss a Tomášek 2010).

2.2.3 Symptomy

Je poměrně obtížné zachytit CRC v počátečním stádiu, jelikož se vyznačuje zpravidla asymptomatickým průběhem. Symptomatologie je z velké části závislá na pozici nádoru. Nádory, které jsou lokalizovány proximálně od lineární flexury, způsobují sideropenickou anemii z chronických ztrát krve a s tím tedy souvisejí příznaky jako slabost, zvýšená únava, abdominální diskomfort a bolesti břicha.

Nádory v části colon descendens a sigmoidea způsobují průjmy, které se často střídají s obstipacemi. Dále se objevuje stolice s příměsí krve a časté kolikovitě bolesti břicha.

Pro nádory rekta jsou typické tenezmy, jedná se o nutkavý pocit na stolicí, ale s defekací minimálního množství stolice či hlenu s krví. Dalším příznakem je hematochezie, což je pasáž čerstvé krve konečníkem, která svědčí pro gastrointestinální krvácení.

V případě pokročilého metastatického postižení se jednotlivé symptomy liší podle převládající lokalizace. Může to být např. dušnost, porucha jaterní funkce a další.

K celkovým příznakům se řadí nevolnost, nechutenství, hubnutí, únava nebo bledost. Může se objevit také narůstající objem břicha (Buchler 2009).

2.2.4 Prevence

Kolorektální karcinom je za předpokladu včasné diagnózy vyléčitelné onemocnění, je však důležité nádor včas odstranit, aby se zabránilo jeho rozšíření do ostatních orgánů lidského těla. Nejzásadnější však je, že se mu dá správnou prevencí předcházet (web 2).

Rozlišujeme tzv. primární prevenci a prevenci sekundární. Pod pojmem primární prevence se rozumí takové chování člověka, které vede k předcházení vzniku onemocnění. Patří sem především zdravý životní styl a dostatečná pohybová aktivita. V rámci prevence CRC je důležité dodržovat zásady správné výživy. To znamená snížení obsahu nasycených tuků, omezení uzenin a tzv. červeného masa, omezení konzumace alkoholu a nekuřáctví. Důležitý je dostatečný přísun ovoce a zeleniny a zvýšený příjem vlákniny.

Sekundární prevence je zaměřena především na včasný záchyt zhoubného nádoru ve stádiu, kdy je plně vyléčitelný. Jedná se zejména o kolorektální screening. Patří sem test okultního krvácení do stolice (TOKS) a primární screeningová kolonoskopie. Lidem nad 50 let je doporučeno udělat si jedenkrát za rok TOKS, který je zcela nenáročný na provedení a lidé po 55 letech mohou v těchto pravidelných testech pokračovat, nebo se mohou nechat vyšetřit primární screeningovou kolonoskopií, která se provádí jednou za deset let (web 3).

2.2.5 Stanovení diagnózy

Základem správné diagnostiky je, jako v případě všech chorob, pečlivá anamnéza. Vyšetření u lékaře dále pokračuje klinickým vyšetřením, které zahrnuje vyšetření konečníku pohmatem, tzv. per rectum. Provádí se odběr krve, která se posílá na základní laboratorní vyšetření a určení hladiny karcinoembryonálního antigenu (CEA), který je však především využíván ke sledování průběhu terapie. Dalším krokem v diagnostice může být vyšetření stolice na přítomnost krve.

Základním vyšetřením umožňujícím diagnózu CRC je v současné době kolonoskopie. Kolonoskopie poskytuje podrobné vyšetření celého tlustého střeva a konečníku, dovoluje odběr materiálu k histologickému vyšetření a odstranění polypů střeva.

Druhým důležitým nástrojem diagnostiky jsou rentgenologická vyšetření. Patří sem především irrigografie, kdy se pacientovi aplikuje kontrastní látka přes konečník do tlustého střeva a následně se snímkuje rentgenem.

Z dalších postupů je možné jmenovat ultrazvuk břicha a někdy také výpočetní tomografii (CT) břicha, protože CRC ze sliznice postupně prorůstá střevní stěnou do okolních struktur a infiltuje lymfatické a krevní cévy a CT je schopné určit právě hloubku nádorové invaze do střevní stěny (Abrahámová et al. 2010, Urban 2008).

2.2.6 Terapie

Léčebný postup u pacientů s diagnostikovaným CRC je vždy závislý na lokalizaci nádoru, jeho velikosti a šíření do okolí. Důležitý je též celkový stav pacienta a jiné přidružené choroby. Mezi základní léčebné metody patří:

- chirurgický výkon
- chemoterapie
- radioterapie.

Chirurgický výkon se u většiny případů provádí jako první, ale v případě záchytu velmi časného stádia je tu také možnost provést endoskopické odstranění maligně transformovaného polypu. Nádory konečníku lze odstranit za použití operačního rektoskopu. Nejčastěji však dochází k resekci části střeva nebo konečníku, která je postižena nádorem. U části pacientů je následně možné sešítí zbylých částí střev nebo konečníku.

V případech, kde tento postup nelze uplatnit, je nutné provést kolostomii. Jedná se o vyústění střeva na povrch přední břišní stěnou. Pacient pak má při sobě upevněn sáček, do kterého odchází stolice a který se po naplnění vyměňuje.

Terapie cytostatiky u pacientů s CRC často doplňuje chirurgické odstranění nádoru nebo především v případě karcinomu konečníku také radioterapii. Cytostatika jsou látky s protinádorovým účinkem, které se aplikují ve formě infuzí, nitrožilních injekcí či ve formě tablet určených pro perorální podání (Abrahámová et al. 2010).

Je třeba zmínit, že rozlišujeme adjuvantní a neoadjuvantní terapii a to na základě časového použití. Neoadjuvantní léčba předchází operační výkon a je používána především pro karcinom rekta v pokročilých stádiích oproti terapii adjuvantní, která následuje po operačním výkonu, kdy byl nádor primárně odstraněn (Zavoral et al. 2012).

Pro adjuvantní terapii je využíván 5-fluorouracil (5-FU) v kombinaci s leukovorinem, přičemž by tato terapie měla být aplikována maximálně po dobu 6 měsíců, delší podávání způsobuje nárůst toxicity této léčby. V chemoterapii CRC je dále využíván kapecitabin, který je prekurzorem 5-FU a jeho největší předností je možnost perorálního podávání pacientům. Oxaliplatin a irinotecan se řadí mezi další cytostatika, která jsou využívána k léčbě CRC.

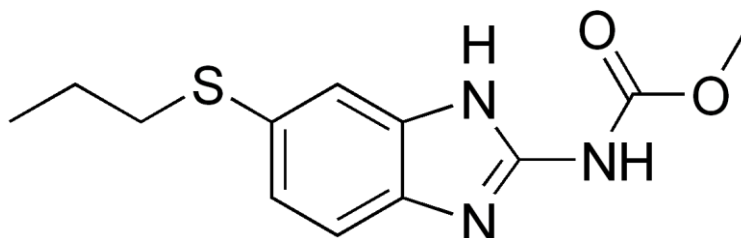
Radioterapie se nejčastěji používá neoadjuvantně u nádorů konečníku. Cílem této léčby je zmenšení objemu nádoru. Často také dochází ke kombinaci léčby pomocí záření a chemoterapie, mluvíme tedy o radiochemoterapii. Možné je použít 5-FU či oxaliplatinu, která má radiosenzibilizační vlastnosti.

Mezi současné možnosti léčby CRC patří také biologická léčba využívající protilátky, které jsou namířené proti určitým strukturám buňky. Jedná se nejčastěji o buněčné receptory či fosforylační enzymy. Příkladem lze uvést např. bevacizumab, který je namířen proti receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor). VEGF je stimulatorem tvorby endoteliálních buněk a tím se tedy zajišťuje angiogeneze, která se po navázání bevacizumabu na receptor VEGF zablokuje. Tohoto procesu je tedy využíváno v nádorové tkáni, kde je angiogeneze velice intenzivní (Richter 2008).

2.3 Albendazol

Albendazol (ABZ), chemickým názvem methyl-[5-(propylthio)-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbamát (viz Obr. 3), patří do skupiny benzimidazolů. Původně byla tato látka vyvinuta pro veterinární léčebné účely, v současné době je však běžně předepisována jako účinné anthelmintikum k léčbě člověka i zvířat (Pourgholami et al. 2010a). ABZ je oblíbený díky jeho širokému využití, účinnosti a nízké toxicitě (Ramírez et al. 2007).

Používá se k léčbě onemocnění vyvolaných některými prvoky či tkáňovými a střevními červy, jako jsou např. teniosy, enterobiosy a trichuriasy. Působí efektivně proti všem vývojovým stádiím helmintů (web 4).

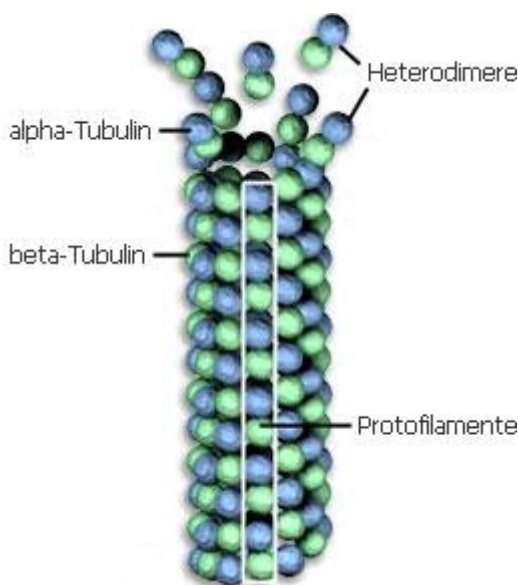


Obr. 3 Struktura ABZ (web 5)

2.3.1 Farmakodynamika

ABZ je karbamát benzimidazolu, který disponuje anthelmintickým a antiprotozoálním účinkem proti střevním a tkáňovým parazitům. Má širokou využitelnost ve veterinární i humánní medicíně, působí ovicidně, larvicidně a vermucidně. Je účinný na nematoda, cestoda, trematoda a protozoa (web 4).

Společně se všemi benzimidazoly vykazuje vysokou afinitu k tubulinu parazitů. Specifickou vazbou na β -tubulin dojde k inhibici polymerace mikrotubulů. Mikrotubulární struktury (viz Obr. 4) zajišťují životně důležité funkce parazita, jako jsou pohyb, transport a migrace chromosomů při mitóze. Po jejich zablokování tedy dochází k pomalé destrukci jedince (Bodeček a Koudela 2009). Za nízkou toxicitu u savců je zodpovědná mnohem vyšší afinita ABZ k tubulinu parazitů, než k tubulinu savců (Ramírez et al. 2007).



Obr. 4 Základní struktura mikrotubulu (web 6)

2.3.2 Farmakokinetika

Absorpce různých sloučenin, včetně léčiv, závisí na rozpustnosti ve vodě. ABZ vykazuje menší rozpustnost než ostatní benzimidazoly, prakticky je ve vodě nerozpustný. Rozpouští se v dimethylsulfoxidu, silných kyselinách a bazích. Po perorálním podání je jeho absorpce u myši 20 – 30% a u skotu až 50%. U člověka dosahuje 1 – 5%, v porovnání se zvířaty je tedy značně snížena. Při podání společně

s tučným jídlom se absorpce zvýší až na pětinasobek. Toto platí u lidí i zvířat (Dayan 2003).

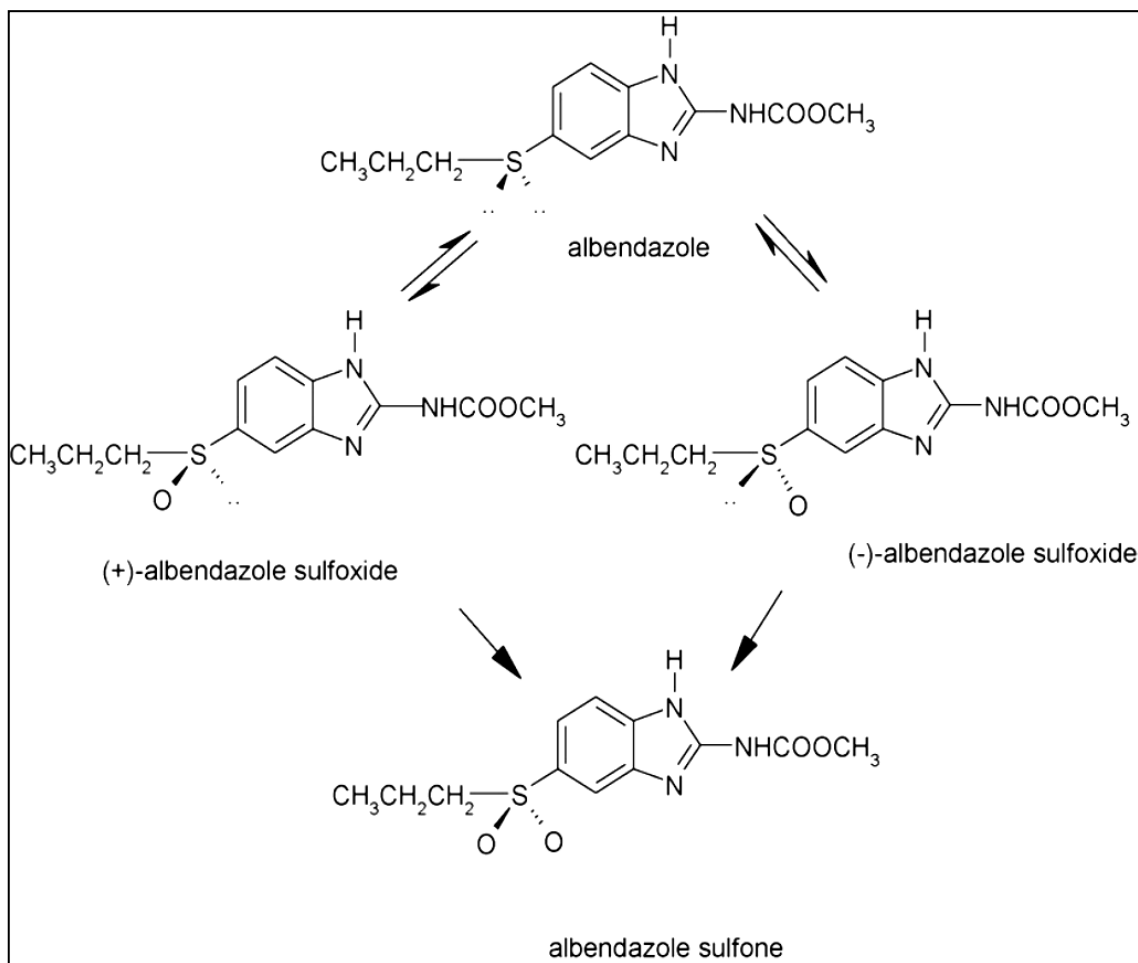
ABZ je rychle metabolizován v játrech na primární metabolit albendazolsulfoxid (ABZSO), který je považován za aktivní metabolit, zodpovědný za terapeutický účinek ABZ. Prvního kroku biotransformace se účastní hlavně cytochrom P4503A (CYP3A) a flavinové monooxygenasy (FMO) (Velík et al. 2005).

Cytochromy P450 (CYP) jsou klíčovými enzymy v metabolismu xenobiotik, kam spadají samozřejmě veškerá léčiva, a mají též zásadní význam v metabolismu některých eobiotik. V lidském organismu jsou játra orgánem nejhojnějšího výskytu CYP, ale v menší míře se nacházejí prakticky ve všech tkáních a specializovaných buňkách. FMO jsou enzymy, které oxidují velkou část organických sloučenin s nukleofilním heteroatomem. Největší výskyt je v játrech, ale je možné je nalézt i v dalších tkáních (Skálová et al. 2011).

Produktem první fáze biotransformace ABZ je látka s chirálním centrem a vznikají tak dva enantiomery: (-)-ABZSO, který je závislý především na CYP3A a (+)-ABZSO, produkovaný systémem FMO (Dayan 2003). V průběhu druhého kroku biotransformace vzniká za účasti CYP1A albendazolsulfon (ABZSO₂) (viz Obr. 5), který nevykazuje žádnou farmakologickou aktivitu (Velík et al. 2005).

Díky rychlé transformaci je samotný ABZ prakticky nedetekovatelný v plazmě, je možné detekovat pouze jeho metabolity. Až 70 % ABZSO se váže na plazmatické proteiny a v této podobě je ABZSO široce distribuován po celém těle. Společně s dalšími metabolity se vylučuje převážně žlučí, pouze malá část je vyloučena močí (Dayan 2003).

Dále je třeba zmínit indukční aktivitu ABZ. Působí jako induktor biotransformačních enzymů, především podrodiny CYP1A (Velík et al. 2005). Indukce může mít zásadní farmakologické a toxikologické důsledky, neboť jejím výsledkem může být několikanásobné zvýšení plasmatických hladin účinné látky či naopak jejich snížení. V případě ABZ jako anthelmintika může snížením koncentrace účinné látky pod terapeutickou mez dojít ke vzniku rezistence na parazita (Skálová et al. 2011).



Obr. 5 Metabolismus ABZ (Skálová et al. 2007)

2.3.3 Toxicita

ABZ představuje širokospektré anthelmintikum, které vyniká vysokou účinností a bezpečností. Ovšem po podání léčiva v graviditě byly prokázány teratogenní a embryotoxické účinky u hospodářských i laboratorních zvířat (Teruel et al. 2011). Docházelo ke snížení tělesné hmotnosti u myši, potkanů, králíků a ovcí. Dále byly hlášeny cévní a skeletální malformace u plodu, které nastaly po léčbě gravidního potkana netobiminem, což je proléčivo albendazolu (Carlsson et al. 2011). Jelikož byl jasně prokázán embryotoxický a teratogenní účinek ABZ ve studiích na zvířatech, nelze toto riziko vyloučit i u člověka a je tedy kontraindikován v období gravidity.

Díky rychlé metabolizaci ABZ v játrech se předpokládalo, že za prenatální toxicitu je zodpovědný hlavní metabolit ABZSO. Byly však provedeny studie v prostředí *in vivo* i *in vitro*, které měly za cíl objasnit, zda je za teratogenitu zodpovědný ABZ či jeho metabolit. Bylo zjištěno, že hlavní podíl na tomto účinku

in vivo nese ABZSO, ačkoli je 5 – 100x méně účinný než ABZ v prostředí *in vitro* (Eckardt et al. 2012). Pokusy s buněčnými kulturami kolorektálního karcinomu s linií HT-29 toto potvrzují. ABZ byl přibližně 20x cytotoxičtější než ABZSO. Hodnota IC₅₀ pro ABZ byla vypočítána na 0,12 μM a pro ABZSO na 2,35 μM (Pourgholami et al. 2005).

Po dlouhodobém podávání vysokých dávek (více než 30 – 40 mg/kg/den) ABZ myším a psům docházelo k anemii, lehké leukopenii, hypercholesterolemii a dalším nespecifickým změnám. Při podávání dávek větších než 40 – 60 mg/kg/den bylo pozorováno relativní zvětšení jater a při dávkách 400 mg/kg/den docházelo k hypoplazii varlat. Při výzkumech, které byly zaměřeny na kancerogenitu u myši a potkanů, kdy jim byly podávány denní dávky mnohonásobně vyšší, než je doporučená dávka u člověka, nebyla prokázána kancerogenní aktivita. Na základě nepublikovaných výsledků ze studie genotoxicity *in vivo* při mikronukleárním testu na myši kostní dřeni je ABZ považován za látku genotoxickou. Ačkoli nebyly provedeny studie, které by prozkoumaly toto riziko pro člověka, předpokládá se, že při dodržování terapeutického dávkování je nepravděpodobné (Dayan 2003).

2.3.4 Nežádoucí účinky

V souvislosti s léčbou parazitárních onemocnění u člověka se mohou vyskytovat vedlejší účinky, jako jsou např.: průjem, zvracení, nevolnost, nespavost, únava, žloutenka, vyrážka apod. Léčba albendazolem může také způsobit dočasné zvýšení jaterních enzymů (Pourgholami et al. 2010b).

2.3.5 Protinádorové účinky

Poté, co byl objasněn mechanismus působení benzimidazolů včetně ABZ, který spočívá v inhibici polymerace tubulinu, se výzkum zaměřil na jeho možnou protinádorovou aktivitu (Morris et al. 2001). Mikrotubuly jsou používány jako cíl protinádorové terapie. Jedná se o klíčové složky cytoskeletu všech eukaryotních buněk. Mají zásadní význam pro řadu buněčných procesů, především buněčné dělení a mitózu (Field et al. 2013).

Doposud bylo publikováno několik studií, které popisují protinádorové vlastnosti ABZ a dalších benzimidazolů. Např. ABZ, společně s mebendazolem (MBZ), flubendazolem (FLU) a carbendazimem (CBZ), které také patří do skupiny

benzimidazolů, je schopen indukce apoptózy v nádorových buňkách (Pourgholami et al. 2010b). Dále byla prokázána schopnost těchto látek inhibovat proliferaci širokého spektra nádorových buněk zahrnujících např. buňky hepatocelulárního karcinomu (Pourgholami et al. 2001), karcinomu plic (Mukhopadhyay et al. 2002), adrenokortikálního karcinomu (Martarelli et al. 2008), karcinomu děložního čípku (Pourgholami et al. 2006) nebo kolorektálního karcinomu, u kterého byla prozatím testována pouze buněčná linie HT-29 (Pourgholami et al. 2005).

ABZ byl také představen jako látka potlačující vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor), který hraje významnou roli v kancerogenezi. VEGF se podílí na přežívání endoteliálních buněk, proliferaci, migraci a zvýšené vaskulární permeabilitě (Pourgholami et al. 2010a).

V závislosti na použité koncentraci ovlivňuje ABZ buněčný cyklus. Nízké koncentrace způsobují akumulaci buněk v G0/G1 fázi cyklu a naproti tomu vyšší koncentrace jsou zodpovědné za vyšší počet buněk v G2/M fázi buněčného cyklu (Pourgholami et al. 2010b).

V současné době je ABZ jako potenciální látka pro léčbu rakoviny ve stádiu výzkumu (Pourgholami et al. 2010b). Byla však již provedena pilotní studie, kdy byl orálně podáván sedmi pacientům převážně s CRC a jaterními metastázami nebo s hepatocelulárním karcinomem. 10 mg/kg ABZ za den bylo rozděleno do dvou dávek po dobu 28 dní. U dvou ze sedmi pacientů byl zaznamenán pokles tumorových markerů, u třech pacientů nedocházelo ke změně a u posledních dvou pacientů, po počáteční stabilizaci, začalo docházet k jejich zvyšování (Morris et al. 2001).

3 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo:

1. Stanovit cytotoxické účinky ABZ na buňky kolorektálního karcinomu linií SW 480 a SW 620 a linie odvozené od buněk normální střevní sliznice NCM 460 za použití testu metabolické aktivity WST-1 a testu neutrální červeně.
2. Za pomoci průtokové cytometrie prozkoumat účinky ABZ na distribuci fází buněčného cyklu u vybrané buněčné linie, která vykáže v předchozích testech největší citlivost k působení ABZ.

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje

- Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience
- Centrifuga Allegra TM X-12 R Centrifuge, Beckman Coulter
- Invertovaný mikroskop CK2, Olympus
- Laminární box MSC - ADVANTAGE 1.2, Thermo Scientific
- Laminární box Telstar Bio-II-A/G
- Lednice BRANDT Apollo
- Průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC Flow Cytometer, Beckman Coulter
- Pipetboy Swiftpet, Thermo Scientific
- Spektrofotometr Tecan infinite M200pro, Tecan
- Termostat CO₂ Incubateur IG 150, JOUAN
- Termostat Sanyo CO₂ incubator MCO-18 AIC (UV), Sanyo
- Desková třepačka MTS 2/4 digital, IKA
- Vodní lázeň Memmert
- Vortex MS2 Minishaker, IKA

4.2 Spotřební materiál

- Automatické pipety Finnpiptette, Thermo Scientific, objemy – 0,2-2 µl, 0,5-10 µl, 5-50 µl, 2-200 µl, 30-300 µl, 200-1000 µl, 0,5-5 ml, 2-10 ml
- Centrifugační zkumavky (50 ml), Sarstedt
- Jednorázové špičky Finntip Filter, Thermo Scientific
- 96ti-jamkové mikrotitrační destičky s víčkem, NuncTM, Thermo Scientific
- Kultivační lahve, střední (20 ml) NuncTM, Thermo Scientific
- Plastová korýtka (10 ml)
- Lahve pro média (250 ml), Pyrex
- Odměrné sklo – odměrné válce, kádinky, skleněné pipety (10 ml)
- Stojánky na zkumavky
- Počítací komůrky Cellometer Counting Chambers, Nexcelom Bioscience
- Mikrozukmavky Eppendorf

4.3 Chemikálie

- PBS bez Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů, PANTM Biotech
- Trypsin 0,05% + EDTA, GIBCO
- Penicilin /Streptomycin, GIBCO
- Albendazol, Sigma-Aldrich
- Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium (D-MEM), Sigma-Aldrich
- 5-(2,4-disulfonatófenyl)-3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2*H*-tetrazolium (WST-1), Boehringer Mannheim-Roche
- Neutrální červeň (NR), Sigma-Aldrich
- Fetální bovinní sérum (FBS), PAA Laboratories
- Dimetylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich
- Propidium jodid, Sigma-Aldrich
- Ribonukleáza A, Sigma-Aldrich
- Triton-X, Sigma-Aldrich
- Etanol (70%), RNDr. Jan Kulich s.r.o.
- Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.4 Biologický materiál

Buněčná linie SW 620

Zdroj: The European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Katalogové číslo: 87051203

Původ: lidský kolorektální adenokarcinom, metastáza v lymfatických uzlinách

Morfologie: epiteliální

Kultivace: médium D – MEM (Sigma Aldrich) + 10% FBS, 37 °C, 5% CO₂

Pasážování: 2 x týdně – Po a Čt za použití trypsinu 0,05% + EDTA

Buněčná linie SW 480

Zdroj: The European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Katalogové číslo: 87092801

Původ: lidský kolorektální adenokarcinom

Morfologie: epiteliální

Kultivace: médium D – MEM (Sigma Aldrich) + 10% FBS, 37 °C, 5% CO₂

Pasážování: 2 x týdně – Po a Čt za použití trypsinu 0,05% + EDTA

Buněčná linie NCM 460

Zdroj: Incell corporation, LLC

Původ: lidská sliznice tlustého střeva

Morfologie: epiteliální

Kultivace: médium D – MEM (Sigma Aldrich) + 10% FBS, 37 °C, 5% CO₂

Pasážování: 2 x týdně – Po a Čt za použití trypsinu 0,05% + EDTA

4.5 Pasážování buněk

Většina buněčných kultur roste adherentně, potřebuje tedy ke své proliferaci kontakt s podkladem a postupně dochází k pokrytí celého dna kultivační lahve (100% konfluence). Dále již není možná proliferace a je nutné buňky před dosažením 100% konfluence zpasážovat. Jedná se o přenesení pouze části buněčné populace z kultivační lahve, kde jsou již buňky narostlé, do nové kultivační nádoby, kde opět začnou růst (Čedíková et al. 2012).

Postup pro pasážování buněk:

- Roztok trypsinu a kultivační médium ohřát ve vodní lázni na 37°C.
- Připravit sterilní nádobu na vylití starého média a popsat kultivační lahve – datum, název linie, číslo pasáže, podpis laboranta.
- Narostlé buňky v kultivační lahvi vyjmout z inkubátoru a prohlédnout pod mikroskopem.
- Vylít staré médium do sterilní nádoby.
- Přidat trypsin (2 ml) a omývat kývavým pohybem buňky, slít do sterilní nádoby, opakovat 3x, při posledním omývání nechat malé množství trypsinu v lahvi.
- Na 4 - 6 min vložit do inkubátoru.
- Kultivační lahev vyjmout zpět z inkubátoru a uvolněné buňky opláchnout a resuspendovat v 10 ml média.
- 2 ml této buněčné suspenze přenést do nové, již popsané kultivační lahve.
- Doplnit médiem na objem 10 ml.
- Uložit do inkubátoru.

4.6 Počítání buněk na analyzátoru Cellometer Auto T4

Před nasazením buněk do 96ti-jamkových destiček je třeba stanovit koncentraci buněk v suspenzi získané při pasážování. Počítání buněk pro potřeby našeho experimentu bylo prováděno na přístroji Cellometer Auto T4 firmy Nexcelom Bioscience.

Postup pro měření koncentrace buněk:

- Zapnout počítač.
- Pečlivě promíchat připravenou buněčnou suspenzi.
- Do počítací komůrky (dodávané speciálně pro přístroj Cellometer Auto T4) napipetovat 20 μ l buněčné suspenze.
- Vložit do analyzátoru.
- Zaostrit.
- Zvolit typ buněk.
- Provést měření.

4.7 Nasazování buněk do 96ti-jamkových destiček

Postup pro nasazování buněk:

- Na základě změřené koncentrace buněk pomocí přístroje Cellometer Auto T4 připravit buněčnou suspenzi o koncentraci 30 000 buněk/ml.
- Připravit a popsat 96ti-jamkové destičky pro každou testovanou linii.
- Do každé jamky pipetovat 200 μ l buněčné suspenze, tj. 6000 buněk na jamku.
- Destičky s nasazenými buňkami vložit do termostatu a nechat inkubovat 24 hod v podmínkách 5% CO₂ a 37°C.

4.8 Příprava pracovních roztoků albendazolu pro WST-1 a test neutrální červeně

Pro obě metody je třeba připravit pracovní roztoky ABZ v DMSO o koncentraci 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM a 10 mM.

Postup:

- Médium vložit do vodní lázně ohřát na 37°C. DMSO a zásobní roztok ABZ (10 mM) nechat povolit při pokojové teplotě.
- Připravit a popsat mikrozskumavky pro jednotlivé koncentrace.
- Postupně ředit zásobní roztok ABZ (10 mM) do DMSO dle Tab. 1.
- Připravené roztoky skladovat při teplotě 4°C bez přístupu světla.

Tab. 1 Příprava pracovních roztoků ABZ pro WST-1 a test neutrální červeně

Množství ABZ o koncentraci uvedené v závorce	Množství přidaného DMSO	Výsledná koncentrace pracovního roztoku ABZ
100 µl (10 mM)	100 µl DMSO	5 mM
40 µl (5 mM)	160 µl DMSO	1 mM
100 µl (1 mM)	100 µl DMSO	0,5 mM
40 µl (0,5 mM)	160 µl DMSO	0,1 mM
100 µl (0,1 mM)	100 µl DMSO	0,05 mM
40 µl (0,05 mM)	160 µl DMSO	0,01 mM

4.9 Ovlivňování buněk

Pondělí:

- Nasadit buňky – linie SW 620, SW 480, NCM 460 do 96ti-jamkových destiček, 200 µl buněčné suspenze o koncentraci 30 000 buněk/ml.
Do sloupce 1 (blank) buňky nenasazovat.
- Inkubovat 24 hod v inkubátoru v podmínkách 37°C, 5 % CO₂.

Úterý:

- Médium vložit do vodní lázně ohřát na 37°C. DMSO a pracovní roztoky ABZ nechat povolit při pokojové teplotě.
- Připravit a popsat korýtko pro ředění pracovních roztoků.
- Na 3 destičky (24 hod, 48 hod, 72 hod) připravit 5 ml ovlivňovacího média, pracovní roztok ABZ ředit 1000x (viz Tab. 2), tj. 5 µl pracovního roztoku v DMSO + 4995 µl média.
- Stejným způsobem připravit roztok DMSO, tj. 5 µl DMSO + 4995 µl média.
- Destičky s buňkami vyjmout postupně z inkubátoru a odsát staré médium.
- Podle Tab. 3 pipetovat 200 µl ovlivňovacího média do jamky.
- Do sloupce 3 pipetovat roztok 0,1% DMSO v médiu.
- Vložit do inkubátoru.

Tab. 2 Výsledná koncentrace testované látky v jamce

Pracovní roztok v DMSO	Výsledná koncentrace ABZ v jamce
10 mM	10 μ M
5 mM	5 μ M
1 mM	1 μ M
0,5 mM	0,5 μ M
0,1 mM	0,1 μ M
0,05 mM	0,05 μ M
0,01 mM	0,01 μ M

Konečná koncentrace DMSO je ve všech jamkách 0,1%.

Středa, čtvrtek, pátek:

- Odsát médium s ABZ a zpracovat podle příslušné metody.

Tab. 3 Rozložení koncentrací ABZ na 96ti-jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- Bl..... blank
- K..... kontrola, přidáván roztok 0,1% DMSO v médiu.

4.10 Stanovení metabolické aktivity buněk

4.10.1 Metodika testu WST-1

Metoda WST-1 představuje účinný a spolehlivý nástroj pro měření buněčné proliferace a viability (Yin et al. 2013). Jedná se o kolorimetrickou metodu, při níž se měří přežívání buněk v prostředí účinné látky na základě zachování jejich metabolické aktivity. Intenzita metabolické aktivity je hodnocena stupněm schopnosti živých buněk redukovat tetrazoliovou sůl [4-(3(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5tetrazolio)-1,3-benzen disulfonát] na barevný produkt formazan, který je ve vodě rozpustný (web 7). Celý proces je katalyzován sukcinátdehydrogenasou, která se nachází v živých buňkách a daná reakce probíhá pouze na mitochondriální membráně těchto buněk (Michalová et al. 2008). Standardní doba inkubace pro WST-1 je 2 hod (Yin et al. 2013). Měření absorbance vzniklého barevného produktu se provádí v rozmezí vlnových délek 420 – 480 nm, maximum absorbance je 440 nm (web 7). Naměřená hodnota absorbance pak odpovídá intenzitě metabolismu a viabilitě buněk (Michalová et al. 2008).

Postup měření:

- Připravit pracovní roztok WST-1. Na jednu destičku je třeba připravit množství 10 ml. Smíchat WST-1 s médiem v poměru 1:20, tj. 0,5 ml WST-1 + 9,5 ml média.
- Destičky s buňkami vyjmout z inkubátoru a odstranit původní médium s ABZ.
- Pipetovat 100 μ l připraveného roztoku WST-1 do šesti prostředních jamek sloupců 1 a 3 – 10.
- Zapnout počítač a spektrofotometr (Tecan infinite M200pro) a změřit absorbanci v čase 0 hod (450 nm, referenční vlnová délka 650 nm).
- Destičky vložit na 2 hod do inkubátoru (37°C, 5% CO₂).
- Po dvouhodinové inkubaci změřit absorbanci v čase 2 hod (450 nm, referenční vlnová délka 650 nm).

4.11 Stanovení integrity plazmatické membrány buněk

4.11.1 Metodika testu neutrální červeně

Test neutrální červeně (Neutral Red Uptake test - NRU) patří mezi nejvíce používané testy pro stanovení cytotoxicity (Repetto et al. 2008). Jedná se o kvantitativní kolorimetrickou metodu, která je založena na schopnosti živých buněk vychytávat a akumulovat neutrální červeně (NR) v lyzozomech (Chiba et al. 1998). U poškozených či mrtvých buněk se tato schopnost rapidně snižuje. NR je barvivo nesoucí kladný náboj, které snadno prochází přes buněčnou membránu (web 8).

Buňky jsou po obarvení inkubovány v termostatu po dobu tří hodin a následně jsou promývány, přičemž poškozené buňky nedokážou uchovat barvivo ve svých lyzozomech a jsou odbarveny (Repetto et al. 2008). Množství akumulované NR je měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm a je přímo úměrné počtu živých buněk (web 8).

Postup měření:

- Připravit pracovní roztok NR. Na jednu destičku je třeba připravit množství 10 ml. Smíchat NR s médiem v poměru 1:40, tj. 250 μ l NR + 9,75 ml média.
- Destičky s buňkami vyjmout z inkubátoru a z jamek odsát 100 μ l původního média s ABZ.
- Pipetovat 100 μ l připraveného pracovního roztoku NR do šesti prostředních jamek sloupců 1 a 3 – 10. Výsledná koncentrace NR v jamce je 40 μ g/ml.
- Destičky vložit na 3 hod do inkubátoru (37°C, 5% CO₂).
- Po tříhodinové inkubaci provést fixaci a lýzu buněk: odsát médium s NR a přidat 100 μ l fixačního roztoku (1 g/100 ml CaCl₂ v 0,5% roztoku formaldehydu), 15 min fixovat při pokojové teplotě, 2x opláchnout 100 μ l PBS bez iontů, přidat 200 μ l lyzačního roztoku (1% CH₃COOH v 50% etanolu), 15 min inkubovat při pokojové teplotě, 15 min třepat na deskové třepačce.
- Zapnout počítač a spektrofotometr (Tecan infinite M200pro) a změřit absorbanci při vlnové délce 540 nm.

4.12 Nasazování buněk do kultivačních lahví

Postup pro nasazování buněk:

- Na základě změřené koncentrace buněk pomocí přístroje Cellometer Auto T4 připravit buněčnou suspenzi o koncentraci 150 000 buněk/ml.
- Připravit a popsat kultivační lahve pro jednotlivé koncentrace a kontrolu.
- Do každé kultivační lahve (75 cm²) přenést 20 ml média s buňkami o koncentraci 150 000 buněk/ml, tj. 3 000 000 buněk na lahev.
- Kultivační lahve s nasazenými buňkami vložit do termostatu a nechat inkubovat 24 hod v podmínkách 5% CO₂ a 37°C.

4.13 Příprava pracovních roztoků albendazolu pro průtokovou cytometrii

Pro měření buněčného cyklu (BC) metodou průtokové cytometrie je třeba připravit pracovní roztoky ABZ v DMSO o koncentraci 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM a 1 mM.

Postup:

- Médium vložit do vodní lázně ohřát na 37°C. DMSO a zásobní roztok ABZ (10 mM) nechat povolit při pokojové teplotě.
- Připravit a popsat mikrozkuhavky pro jednotlivé koncentrace.
- Postupně ředit zásobní roztok ABZ do DMSO dle Tab 4.
- Připravené roztoky skladovat při teplotě 4°C bez přístupu světla.

Tab. 4 Příprava pracovních roztoků ABZ pro průtokovou cytometrii

Množství ABZ o koncentraci uvedené v závorce	Množství přidaného DMSO	Výsledná koncentrace pracovního roztoku ABZ
10 μ l (10 mM)	90 μ l DMSO	1 mM
5 μ l (10 mM)	95 μ l DMSO	0,5 mM
4 μ l (10 mM)	96 μ l DMSO	0,4 mM
3 μ l (10 mM)	97 μ l DMSO	0,3 mM
2 μ l (10 mM)	98 μ l DMSO	0,2 mM

4.14 Ovlivňování a fixace buněk pro průtokovou cytometrii

Pondělí:

- Nasadit buňky – linie SW 480 do kultivačních lahví, 20 ml buněčné suspenze o koncentraci 150 000 buněk/ml.
- Inkubovat 24 hod v termostatu v podmínkách 37°C, 5 % CO₂.

Úterý:

- Médium vložit do vodní lázně ohřát na 37°C. DMSO a pracovní roztoky ABZ nechat povolit při pokojové teplotě.
- Připravit a popsat zkumavky pro ředění pracovních roztoků.
- Pro každou lahev (1 lahev = 1 koncentrace) připravit 20 ml ovlivňovacího média, pracovní roztok ABZ ředit 1000x (viz Tab. 5), tj. 20 μ l pracovního roztoku v DMSO + 19 980 μ l média.
- Stejným způsobem připravit roztok DMSO, tj. 20 μ l DMSO + 19 980 μ l média.
- Kultivační lahve s buňkami postupně vyjmout z inkubátoru.
- Vylít staré médium a ovlivnit připraveným médiem s určitou koncentrací ABZ.
- Do poslední lahve pipetovat roztok 0,1% DMSO v médiu - kontrola.
- Vložit do inkubátoru na 24 hod (37°C, 5% CO₂).

Tab. 5 Výsledná koncentrace testované látky v kultivační lahvi

Pracovní roztok v DMSO	Výsledná koncentrace ABZ v kultivační lahvi
1 mM	1 μ M
0,5 mM	0,5 μ M
0,4 mM	0,4 μ M
0,3 mM	0,3 μ M
0,2 mM	0,2 μ M

Středa:

- Médium a trypsin vložit do vodní lázně ohřát na 37°C.
- Připravit a popsat centrifugační zkumavky.
- Vylít staré médium z kultivační lahve.
- Přidat trypsin (2 ml) a omývat kývavým pohybem buňky, slít do sterilní nádoby, opakovat 3x, při posledním omývání nechat malé množství trypsinu v lahvi.
- Na 4 – 6 min vložit do inkubátoru.
- Trypsinem uvolněné buňky resuspendovat v 10 ml média.
- Buněčnou suspenzi přenést do centrifugační zkumavky.
- Centrifugovat při 1000 RPM, 4°C, 10 min.
- Slít supernatant, sediment dobře rozklepat.
- Doplnit 10 ml PBS.
- Centrifugovat při 1000 RPM, 4 °C, 10 min.
- Slít supernatant, sediment dobře rozklepat.
- Po kapkách přidat 2 ml 70 % etanolu za stálého třepání.
- Skladovat při teplotě 4°C bez přístupu světla.

4.15 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FC) je moderní analytická metoda umožňující simultánní analýzu více parametrů na velkém množství buněk. Při cytometrické analýze se provádí měření každé jednotlivé buňky zvlášť. Tato skutečnost je velice významným faktorem, jelikož nejde pouze o průměrné hodnoty měřené suspenze.

Analýza fyzikálně-chemických vlastností buněk, včetně simultánního měření více parametrů, je umožněna jejich průchodem laserovým paprskem, u kterého po dopadu na částici dochází k lomu a rozptylu světla. Podle směru a úhlu lomu je tento rozptyl označován jako přímý rozptyl – forward scatter (FSC). Boční rozptyl neboli tzv. side scatter (SSC) je ovlivněn charakterem a vnitřní strukturou buňky, zatímco FSC je úměrný její velikosti (Pecka 2010).

Po ozáření laserovým paprskem může buňka také emitovat fluorescenční záření. Látky, které jsou schopné fluorescence, se nazývají fluorochromy a jsou většinou konjugovány s monoklonálními protilátkami. Ty mají schopnost vázat se na specifické struktury na povrchu částic. Některé fluorochromy vynikají také možností vazby na buňku přímo nebo se mohou do buňky inkorporovat (Roubalová 2012).

Průtoková cytometrie se uplatňuje v celé řadě analýz ve všech odvětvích klinické praxe. Největší uplatnění nachází v klinické imunologii, hematonekologii, molekulární biologii a také v oblasti nádorové biologie. Jednou z nejčastěji využívaných je analýza buněčného cyklu (Roubalová 2012).

Při analýze buněčného cyklu průtokovou cytometrií je měřen obsah DNA jednotlivých buněk ve vzorku. DNA je nejprve označena fluorescenční sondou, kterou je nejběžněji propidium jodid (PI). Jedná se o fluorescenční interkalační činidlo, které se zabudovává do struktury DNA. Po vazbě dochází k posunu a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra (Branská et al. 2011).

4.16 Měření distribuce fází buněčného cyklu

Postup měření:

- Fixované buňky v centrifugačních zkumavkách centrifugovat při 2000 RPM, 4 °C, 10 min.
- Slít supernatant, sediment dobře rozklepat.
- Přidat 10 ml PBS.
- Centrifugovat při 1000 RPM, 4 °C, 10 min.
- Slít supernatant, sediment dobře rozklepat.
- Přidat 0,5 ml PBS + 0,5 ml fosfát–citrátového pufru (0,2 M Na₂HPO₄, 0,1 M citrát, pH 7,8).
- Inkubovat 5 min.
- Přidat 10 ml PBS.
- Centrifugovat při 1000 RPM, 4 °C, 10 min.
- Slít supernatant, sediment dobře rozklepat.
- Přidat 0,5 ml Vindelova roztoku (2 g/l TRIS, 0,01 g/l RNAsa, 0,6 g/l NaCl, 0,05 g/l PI).
- Inkubovat 50 – 60 min v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).
- Měřit na průtokovém cytometru (Cell Lab QuantaTM SC Flow Cytometer, Beckman Coulter).

4.17 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení

Výsledky metod WST-1 a NRU byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel, ve kterém byly vytvořeny i grafy. Měření bylo prováděno vždy šestkrát pro každou koncentraci ve třech nezávislých pokusech. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány v programu GraphPad Prism 6.0. V programu MultiCycle AV for Windows bylo vyhodnoceno měření buněčného cyklu, který byl také měřen ve třech nezávislých pokusech. Statistické hodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Prism 6.0 pomocí analýzy one way analysis of variance (ANOVA) za použití testu Bonferroni, statistická významnost $p < 0,05$.

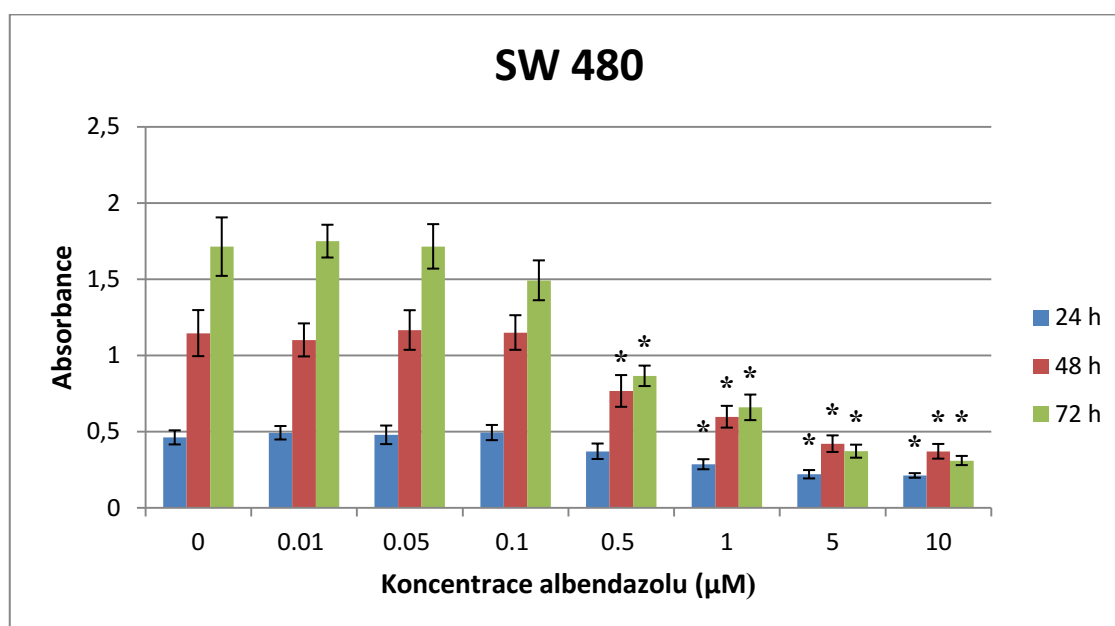
5 Výsledky

5.1 Vliv albendazolu na metabolickou aktivitu buněk

Účinek ABZ na metabolickou aktivitu buněčných linií SW 480, SW 620 a NCM 460 byl stanoven pomocí testu WST-1. ABZ byl testován v koncentračním rozmezí 0,01 – 10 μM a v časových intervalech 24, 48 a 72 hod.

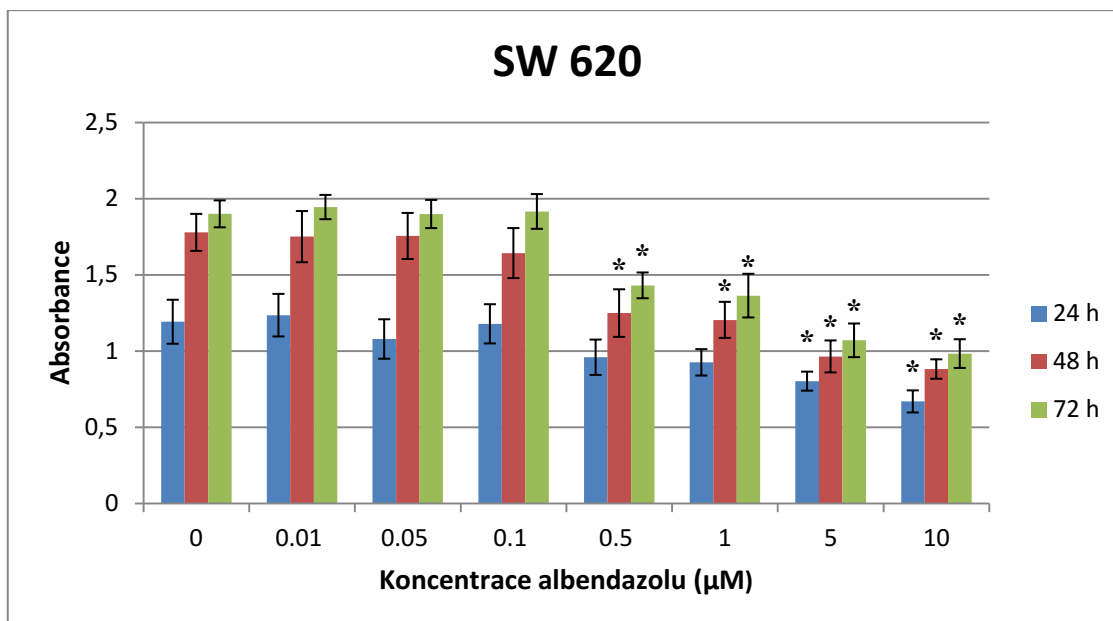
U všech buněčných linií ABZ snižoval metabolickou aktivitu v závislosti na koncentraci a době působení (viz Obr. 6 – 8).

Statisticky významný rozdíl hodnot absorbance ve srovnání s hodnotami absorbance kontrolních vzorků byl zaznamenán u všech buněčných linií od koncentrace 0,5 μM ABZ. V případě buněčné linie SW 620 docházelo i při nejvyšší testované koncentraci ABZ (10 μM) k nárůstu hodnot absorbance mezi časovými intervaly 24 – 72 hod, na rozdíl od dalších dvou testovaných linií.



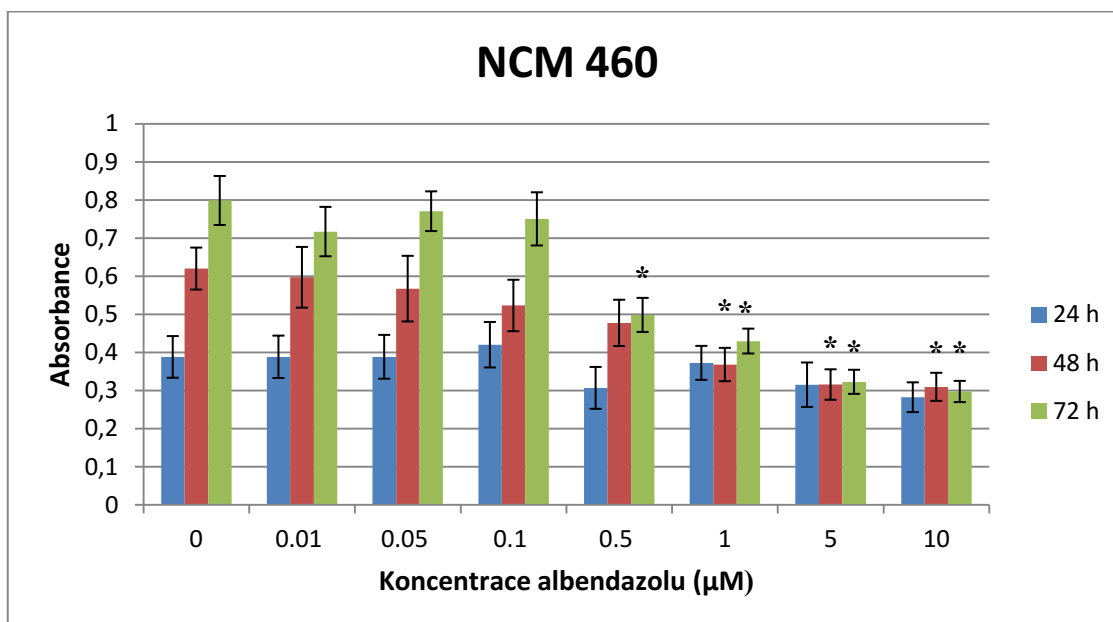
Obr. 6 Porovnání vlivu různých koncentrací ABZ na hodnotu absorbance po 24-, 48- a 72- hodinové inkubaci u buněčné linie SW 480 – metoda WST-1

* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$



Obr. 7 Porovnání vlivu různých koncentrací ABZ na hodnotu absorbance po 24-, 48- a 72- hodinové inkubaci u buněčné linie SW 620 – metoda WST-1

* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$



Obr. 8 Porovnání vlivu různých koncentrací ABZ na hodnotu absorbance po 24-, 48- a 72- hodinové inkubaci u buněčné linie NCM 460 – metoda WST-1

* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$

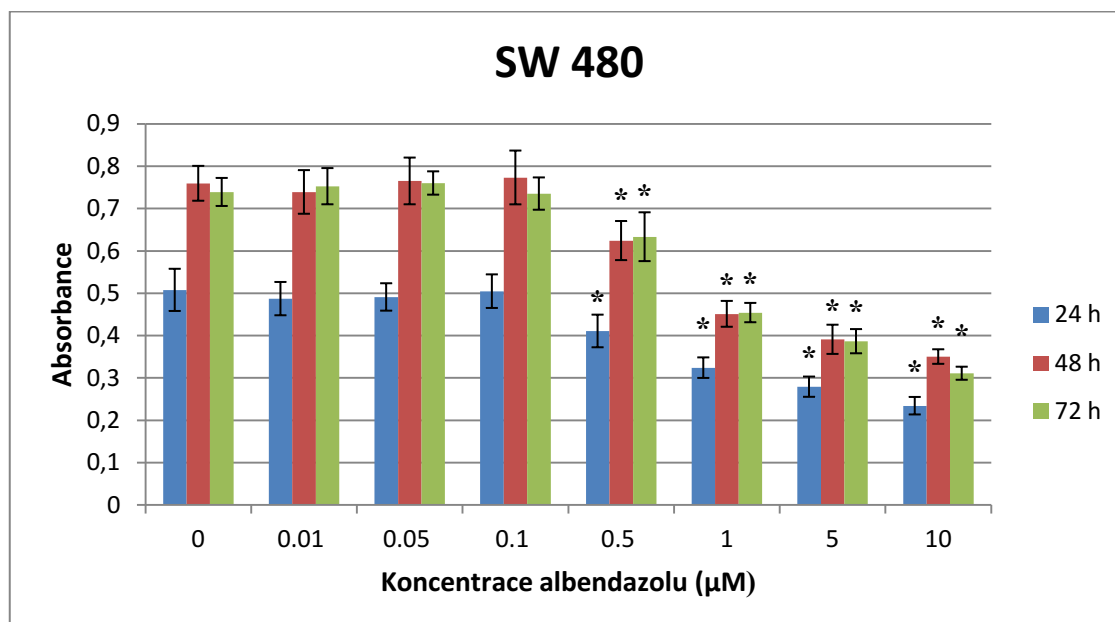
5.2 Vliv albendazolu na integritu plazmatické membrány buněk

Účinek ABZ na integritu plazmatické membrány buněk byl stanoven u buněčných linií SW 480, SW 620 a NCM 460 pomocí testu NRU. ABZ byl testován v koncentračním rozmezí 0,01 – 10 μM a v časových intervalech 24, 48 a 72 hod.

U všech buněčných linií ABZ snižoval schopnost buněk vychytávat a akumulovat NR v závislosti na koncentraci a době působení (viz Obr. 9 – 11).

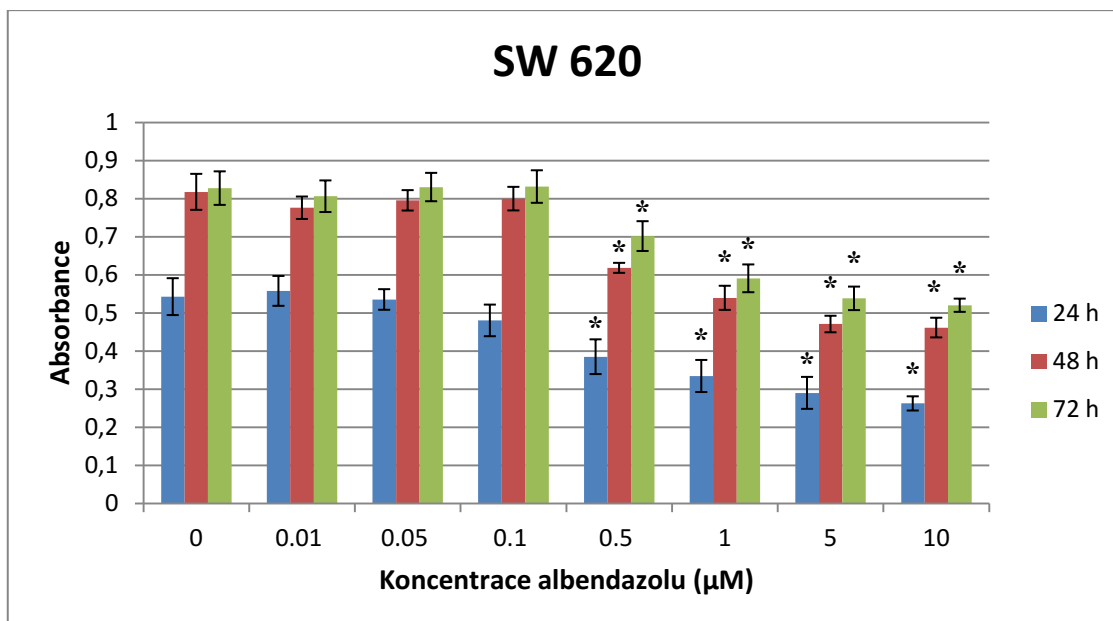
Statisticky významný rozdíl hodnot absorbance ve srovnání s hodnotami absorbance kontrolních vzorků byl zaznamenán u buněčných linií SW 480 a SW 620 od koncentrace 0,5 μM ABZ. U buněčné linie NCM 460 byl zaznamenán již při koncentraci 0,1 μM ABZ v časovém intervalu 24 hod.

V případě buněčné linie SW 620 a NCM 460 docházelo i při nejvyšší testované koncentraci ABZ (10 μM) k nárůstu hodnot absorbance mezi časovými intervaly 24 – 72 hod, na rozdíl od buněčné linie SW 480, u které došlo mezi intervaly 48 – 72 hod k mírnému poklesu.



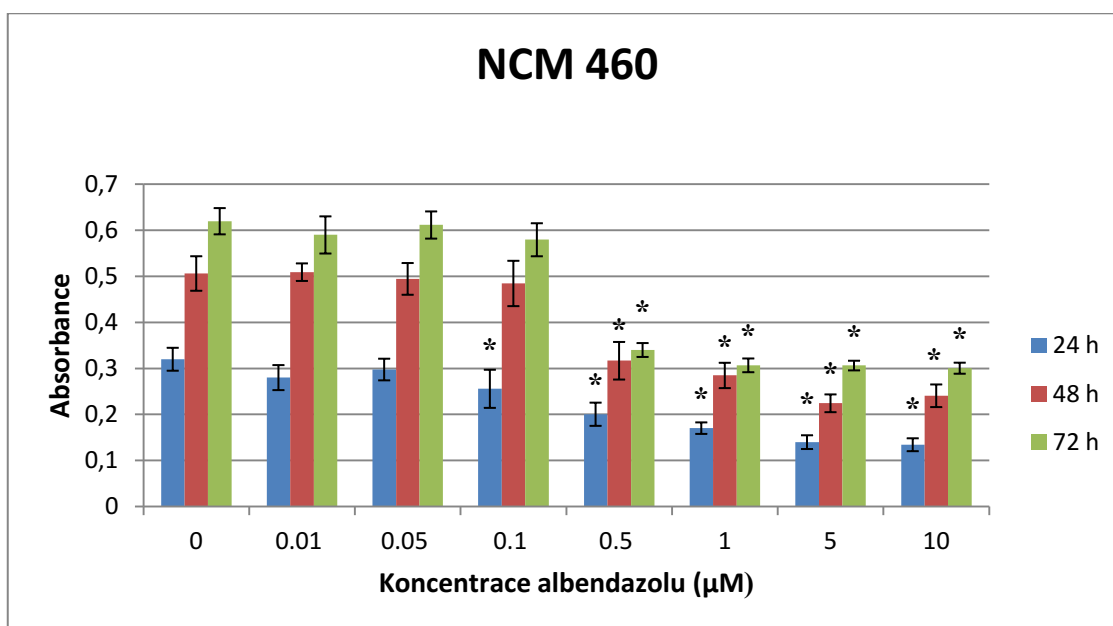
Obr. 9 Porovnání vlivu různých koncentrací ABZ na hodnotu absorbance po 24-, 48- a 72- hodinové inkubaci u buněčné linie SW 480 – metoda NRU

* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$



Obr. 10 Porovnání vlivu různých koncentrací ABZ na hodnotu absorbance po 24-, 48- a 72- hodinové inkubaci u buněčné linie SW 620 – metoda NRU

* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$



Obr. 11 Porovnání vlivu různých koncentrací ABZ na hodnotu absorbance po 24-, 48- a 72- hodinové inkubaci u buněčné linie NCM 460 – metoda NRU

* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$

5.3 Porovnání hodnot IC₅₀

Pomocí programu GraphPad Prism 6.0 byly u jednotlivých buněčných linií, z dat získaných metodami WST-1 a NRU, vypočítány hodnoty IC₅₀ v čase 72 hod po ovlivnění ABZ. Pro jejich výpočet byly použity průměrné hodnoty ze tří nezávislých pokusů. Tab. 6 shrnuje vypočítané hodnoty IC₅₀ (koncentrace ± SD) pro metody WST-1 a NRU pro všechny testované buněčné linie. V případě buněk SW 620 měřených metodou NRU nedošlo k poklesu životnosti pod 50 %, IC₅₀ tedy nebyla hodnocena.

Tab. 6 Hodnoty IC₅₀ získané jednotlivými metodami pro všechny testované linie v intervalu 72 hod po ovlivnění ABZ

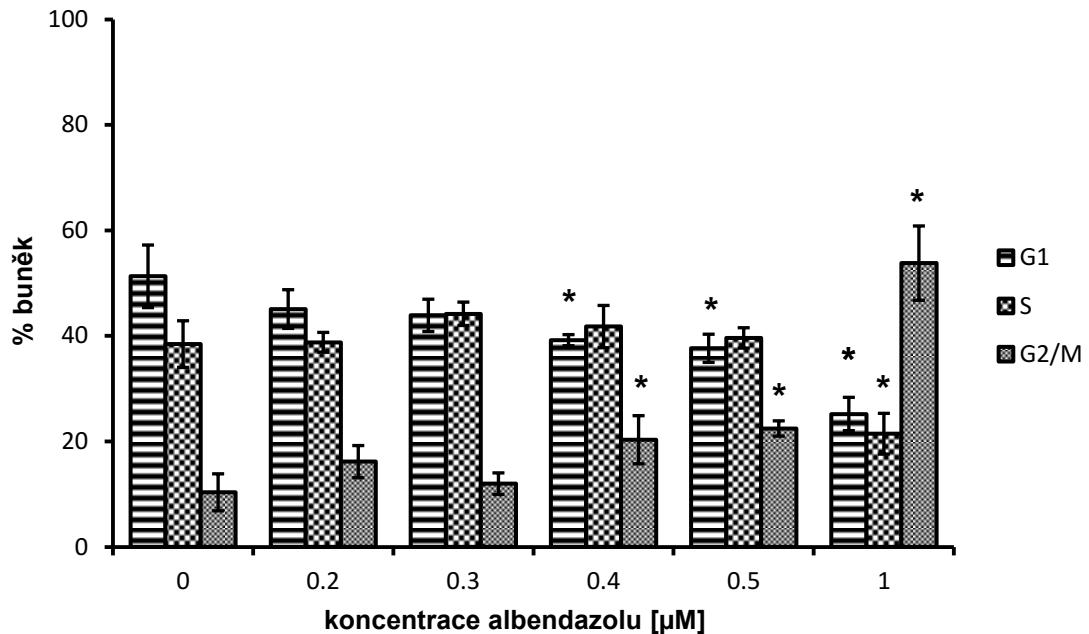
	WST-1	NRU
SW 620	8,70 μM ± 0,12	Nehodnoceno
SW 480	0,78 μM ± 0,08	5,05 μM ± 0,08
NCM 460	2,33 μM ± 0,10	3,46 μM ± 0,15

Pro buněčnou linii SW 480 byla hodnota IC₅₀ zaznamenaná metodou WST-1 více než 6x nižší než v případě metody NRU. Pro buněčnou linii NCM 460 byla rovněž stanovena nižší hodnota IC₅₀ u metody WST-1, avšak nejedná se zde o takový rozdíl, jaký byl zjištěn u buněčné linie SW 480. V případě buněk SW 620 bylo možné hodnotit IC₅₀ pouze pro metodu WST-1. Z uvedených hodnot tedy vyplývá, že metoda WST-1 v našem experimentu celkově vykazovala větší citlivost než metoda NRU.

Pokud porovnáme citlivost jednotlivých buněčných linií, při použití metody WST-1 vykazovala nejvyšší citlivost buněčná linie SW 480, zatímco při použití metody NRU byla jako nejcitlivější vyhodnocena buněčná linie NCM 460. Linie SW 620 dosáhla nejvyšší hodnoty IC₅₀ ze všech tří testovaných linií.

5.4 Hodnocení buněčného cyklu průtokovou cytometrií

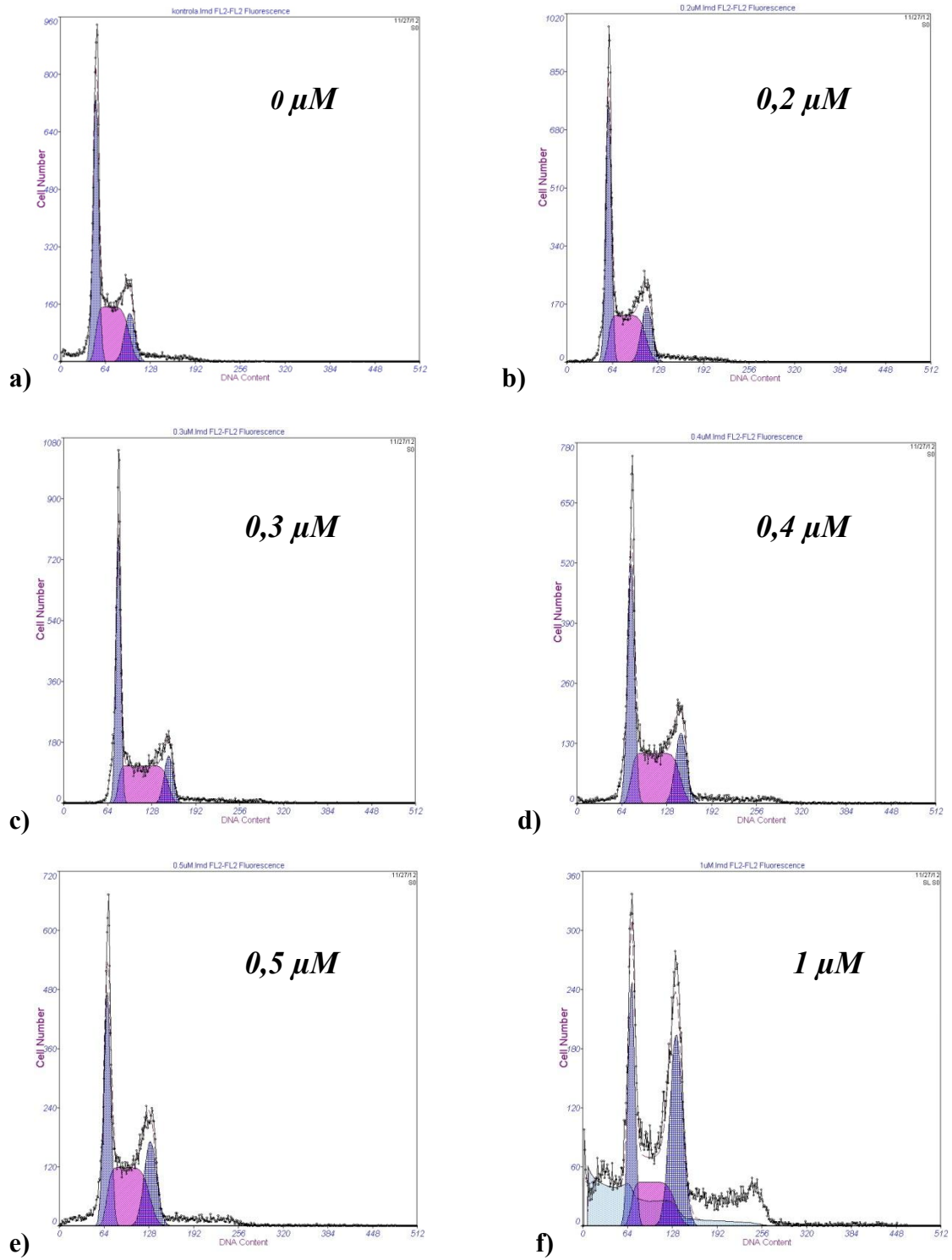
Vliv ABZ na distribuci fází buněčného cyklu byl měřen pomocí průtokové cytometrie. Buněčná linie SW 480 byla ovlivněna ABZ v koncentračním rozmezí 0,2 – 1 μM a inkubována 24 hod.



Obr. 12 Graf distribuce fází buněčného cyklu po 24- hodinové inkubaci – SW 480

* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$

V závislosti na zvyšující se koncentraci ABZ docházelo ke zvyšování počtu buněk v G2/M fázi v porovnání s kontrolním vzorkem (viz Obr. 7). Významnější změny v distribuci fází lze zaznamenat od koncentrace 0,4 μM ABZ, kdy je zaznamenán statisticky významný rozdíl proti kontrole u G1 a G2/M fáze. Při nejvyšší testované koncentraci ABZ (1 μM) je již patrný statisticky významný rozdíl proti kontrole u G1, S i G2/M fáze BC.



Obr. 13 (a – f) Distribuce fází buněčného cyklu linie SW 480 po ovlivnění ABZ

Histogramy fází buněčného cyklu linie SW 480 po ovlivnění ABZ jsou znázorněny na Obr. 13. Jedná se o výsledek jednoho ze tří opakovaných pokusů.

V závislosti na zvyšující se koncentraci ABZ docházelo ke zvyšování vrcholu frakce histogramu, která odpovídá populaci buněk v G2/M fázi buněčného cyklu.

V případě koncentrace 1 μM ABZ (viz Obr. 13-f) se v pravé části histogramu objevovala populace buněk s obsahem DNA vyšším, než odpovídá normálním buňkám v G2 fázi buněčného cyklu.

6 Diskuze

Albendazol patří svým rozsahem účinku mezi nejdůležitější zástupce benzimidazolových anthelmintik. V roce 1975 byl uveden na trh a původně byl určen pouze pro veterinární medicínu (Pourgholami et al. 2010a). Od roku 1982 je však využíván i k léčbě helmintóz člověka (Eckardt et al. 2012). Jedná se o velmi bezpečné a účinné anthelmintikum (Pourgholami et al. 2010a).

Mechanismus účinku ABZ spočívá především v inhibici polymerace mikrotubulů, která je způsobena specifickou vazbou ABZ na β -podjednotku tubulinu parazitů (Eckardt et al. 2012). Mikrotubulární struktury zajišťují životně důležité funkce parazita, po tomto procesu tedy dochází k jeho smrti (Bodeček a Koudela 2009). Tento mechanismus účinku je společný i pro další deriváty benzimidazolu jako jsou např. mebendazol, flubendazol a carbendazim. Dále bylo prokázáno, že působením těchto látek dochází k narušení energetického metabolismu parazitů a ke sníženému příjmu glukózy (Eckardt et al. 2012).

Právě schopnost ABZ inhibovat polymeraci mikrotubulů ho zařadila mezi látky s možným protinádorovým účinkem, jelikož mikrotubuly jsou v klinické medicíně používány jako cíl protinádorové terapie. Látky s inhibičním účinkem na polymeraci mikrotubulů jsou používány jako cytostatika, jedná se o tzv. mitotické jedy (Field et al. 2013). Typickým příkladem jsou alkaloidy z *Vinca rosea*, tzv. vinka alkaloidy. Lze uvést například vinkristin, který je používán jako chemoterapeutikum u hematologických malignit i solidních nádorů, či vinblastin uplatňující se v léčbě maligních lymfomů a testikulárních nádorů (Klener a Klener jr. 2010).

Stejným způsobem jsou využívány i látky způsobující inhibici depolymerace mikrotubulů. Dochází k urychlení tvorby mikrotubulů a k jejich stabilizaci, je narušen buněčný cyklus v G2/M fázi, což může mít za následek spuštění apoptózy. Inhibici depolymerace mikrotubulů vyvolávají například taxany, látky izolované z *Taxus brevifolia*. Jako jejich zástupce lze uvést paklitaxel či docetaxel, které se podílejí na terapii některých typů solidních nádorů (Klener a Klener jr. 2010).

Po objasnění mechanismu působení benzimidazolů byly tyto látky testovány *in vitro* a byla prokázána jejich schopnost ovlivňovat proliferaci různých typů nádorových buněk. ABZ inhiboval proliferaci buněk hepatocelulárního karcinomu (Pourgholami et al. 2001), karcinomu plic (Mukhopadhyay et al. 2002), adrenokortikálního karcinomu (Martarelli et al. 2008), karcinomu děložního čípku (Pourgholami et al. 2006) nebo kolorektálního karcinomu. U posledního jmenovaného však byla prozatím testována pouze buněčná

linie HT-29 (Pourgholami et al. 2005). Mezi farmakokinetické vlastnosti ABZ patří nízká rozpustnost ve vodě vedoucí k velmi nízké absorpci a zároveň k malé systémové biologické dostupnosti. Tato skutečnost je limitující pro léčbu mnohých nádorů, avšak ne pro léčbu nádorů gastrointestinálního traktu, kde je ABZ vstřebáván a kde může jeho koncentrace dosahovat značných hodnot (Pourgholami et al. 2005).

Jelikož účinek ABZ byl prozatím testován pouze na buněčné linii HT-29, rozhodli jsme se pro testování účinku tohoto anthelmintika na dalších buněčných liniích odvozených od kolorektálního karcinomu.

Pro náš experiment byly použity buněčné linie SW 480, SW 620 a NCM 460, které se navzájem liší svým nádorovým potenciálem. Buňky SW 480 byly izolovány z primárního kolorektálního adenokarcinomu a jedná se o nemetastazující linii. Dále byly testovány buňky SW 620, které jsou metastazujícím typem buněk SW 480 a byly izolovány z metastázy kolorektálního adenokarcinomu v lymfatické uzlině u stejného pacienta, od kterého pocházejí buňky SW 480 (Leibovitz et al. 1976). Jako poslední byla testována buněčná linie NCM 460, která pochází z normální sliznice tlustého střeva. Po izolaci byly tyto buňky netumorigenní a vykazovaly růstové charakteristiky normálních buněk (Moyer et al. 1996). Některé poslední studie nicméně naznačují, že některé subpopulace této buněčné linie mohly získat schopnost růst v agaru a mohou být tumorigenní (web 9).

Pro stanovení cytotoxicity ABZ jsme použili metody WST-1 a NRU. Jedná se o metody, které jsou založeny na rozdílném principu. V případě metody WST-1 je pozorována intenzita metabolické aktivity buněk, po expozici testované látky, která je hodnocena stupněm schopnosti živých buněk redukovat tetrazoliovou sůl na barevný produkt formazan, jehož absorbance je následně měřena. Naměřená hodnota absorbance pak odpovídá intenzitě metabolismu a viabilitě buněk (Michalová et al. 2008). Test neutrální červeně je založen na schopnosti živých buněk vychytávat a akumulovat barvivo – neutrální červeně v lyzozomech (Chiba et al. 1998). Buňky jsou po obarvení inkubovány v termostatu po dobu tří hodin a následně jsou promývány, přičemž poškozené buňky nedokážou uchovat barvivo ve svých lyzozomech a jsou odbarveny (Repetto et al. 2008). Množství akumulované NR je měřeno spektrofotometricky a je přímo úměrné počtu živých buněk (web 8).

Na základě provedeného měření pomocí obou metod se ABZ projevil jako látka inhibující buněčnou proliferaci u všech testovaných linií v závislosti na koncentraci a

době působení. Protože každá z použitých metod měří jinou stránku života buňky, liší se v citlivosti, s jakou detekují inhibiční účinek ABZ. Pro porovnání citlivosti použitých metod i jednotlivých testovaných linií byly vypočítány hodnoty IC_{50} v časovém intervalu 72 hod. U buněčné linie SW 620 byla IC_{50} vypočítána pouze pro metodu WST-1, protože u metody NRU nebyl zaznamenán pokles viability pod 50 %. U linie SW 480 byla na základě měření WST-1 vypočítána hodnota $IC_{50} = 0,78 \mu M$, zatímco měření NRU vedlo ke stanovení $IC_{50} = 5,05 \mu M$. Podobné výsledky jsme získali i v případě linie NCM 460, u které $IC_{50} = 2,33 \mu M$ získaná metodou WST-1 byla rovněž nižší než $IC_{50} = 3,46 \mu M$ získaná metodou NRU. V případě všech testovaných linií se tedy jeví metoda WST-1 pro detekci cytotoxických účinků ABZ jako citlivější.

Pokud porovnááme citlivost jednotlivých buněčných linií, nejméně citlivou linií k působení ABZ v našem experimentu byla linie SW 620 s $IC_{50} = 8,70 \mu M$. Nejcitlivější linií byla na základě měření WST-1 linie SW 480 s $IC_{50} = 0,78 \mu M$, na základě měření NRU to však byla linie NCM 460 s $IC_{50} = 3,46 \mu M$. Ze studie toxicity ABZ provedené na buněčné linii HT-29 odvozené také z kolorektálního karcinomu byla vypočítána $IC_{50} = 0,12 \mu M$, tedy podstatně nižší než námi naměřené hodnoty. Je však důležité brát v úvahu, že autoři této studie použili pro stanovení IC_{50} rozdílné detekční metody – barvení trypanovou modří a inkorporaci 3H - thymidinu - a celková doba expozice ABZ byla 5 dnů, přičemž médium s ABZ bylo měněno obden (Pourgholami et al. 2005).

Naše výsledky také ukázaly, že citlivost linie NCM 460, odvozené z buněk normální střevní sliznice, je srovnatelná s citlivostí nádorové linie SW 480.

Protože mechanismus účinku albendazolu je podobný působení mitotických jedů, v dalších experimentech jsme se zabývali vlivem ABZ na distribuci fází buněčného cyklu. Pro měření buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie jsme vybrali linii SW 480, která byla v našich testech cytotoxicity vyhodnocena jako nejcitlivější. Buňky byly ovlivněny ABZ v rozmezí koncentrací 0,2 - 1 μM a inkubovány 24 hod.

Se stoupající koncentrací ABZ způsobil akumulaci buněk v G2/M fázi buněčného cyklu ve srovnání s kontrolním vzorkem. Významnější posun v distribuci fází buněčného cyklu byl zaznamenán od koncentrace 0,4 μM . Zatímco u buněčné linie odvozené od hepatocelulárního karcinomu způsobil ABZ v nízké koncentraci (0,25 μM)

akumulaci buněk v G0/G1 fázi (Pourgholami et al. 2001), v případě buněk SW 480 k tomuto jevu nedošlo u žádné z testovaných koncentrací.

Zástava buněčného cyklu v G2/M fázi je důsledkem inhibice polymerace mikrotubulů, které jsou nezbytné pro mitózu. Mimo to se mikrotubuly podílejí také na udržení tvaru buňky, na přenosu signálů mezi povrchovými receptory a jádrem a rovněž na buněčné motilitě a tedy i invazivitě a metastázování. Zástavou buněčného cyklu v G2/M fázi může následně dojít ke spuštění apoptózy (Klener a Klener jr. 2010).

Jak už bylo naznačeno, ABZ není jedinou látkou patřící mezi deriváty benzimidazolu, která vykazuje antiproliferativní účinky na nádorové buněčné linie. Carbendazim je schopen inhibovat proliferaci nádorových buněk odvozených z lidského karcinomu prsu, vaječníků či tlustého střeva. Způsobuje akumulaci buněk v G2/M fázi buněčného cyklu s následným spuštěním apoptózy (Yenjerla et al. 2009). U flubendazolu bylo popsáno jeho cytotoxické působení na leukemickou a myelomovou buněčnou linii. Hodnoty IC₅₀ byly téměř u všech testovaných linií menší než 1 μM FLU (Spagnuolo et al. 2010). U mebendazolu, rovněž derivátu benzimidazolu, byla prokázána v závislosti na koncentraci a době působení schopnost vyvolat apoptózu u buněk lidského karcinomu plic (Mukhopadhyay et al. 2002).

Z dosud publikovaných poznatků tedy vyplývá, že deriváty benzimidazolu by mohly najít uplatnění v terapii některých nádorových onemocnění. Naše výsledky potvrzují, že ABZ v klinicky relevantních koncentracích je schopen inhibovat proliferaci buněk kolorektálního karcinomu *in vitro*.

7 Závěr

Výsledky diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- ABZ inhibuje proliferaci buněk SW 480, SW 620 a NCM 460 v závislosti na koncentraci a době působení.
- Hodnoty IC_{50} zjištěné pro ABZ u testovaných buněčných linií se pohybují v rozsahu od $0,78 \pm 0,08 \mu\text{M}$ do $8,70 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Na základě hodnot IC_{50} , vypočítaných pro jednotlivé buněčné linie, se jako nejcitlivější k působení ABZ jeví buňky SW 480, nejméně citlivé jsou buňky SW 620. Při porovnání obou použitých metod (WST-1 a NRU) se metoda WST-1 jeví jako více citlivá.
- Se zvyšující se koncentrací způsobuje ABZ akumulaci buněk SW 480 v G2/M fázi buněčného cyklu v porovnání s kontrolním vzorkem, přičemž statisticky významný rozdíl proti kontrole byl zaznamenán od koncentrace $0,4 \mu\text{M}$.
- Citlivost linie NCM 460, odvozené z buněk normální střevní sliznice, je srovnatelná s citlivostí nádorové linie SW 480.
- Z našich experimentů tedy vyplývá, že ABZ v koncentracích nižších než $1 \mu\text{M}$ způsobuje zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a inhibuje proliferaci buněk kolorektálního karcinomu *in vitro*.

8 Seznam zkratek

ABZ	albendazol
ABZSO	albendazolsulfoxid
ABZSO ₂	albendazolsulfon
BC	buněčný cyklus
CBZ	carbendazim
CEA	karcinoembryonální antigen
CRC	kolorektální karcinom
CT	výpočetní tomografie
CYP	cytochromy P450
CYP1A	cytochrom P4501A
CYP3A	cytochrom P4503A
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECACC	The European Collection of Cell Culture
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FBS	fetální bovinní sérum
FC	průtoková cytometrie
FLU	flubendazol
FMO	flavinové monooxygenasy
FSC	přímý rozptyl
5-FU	5-fluorouracil
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
IC ₅₀	inhibiční koncentrace (50%)
MBZ	mebendazol

NR	neutrální červeň
NRU	test neutrální červene
PBS	fosfátový pufr
PI	propidium jodid
SSC	boční rozptyl
TOKS	test okultního krvácení do stolice
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

9 Seznam použité literatury

Abrahámová J. et al.: Rakovina tlustého střeva a konečníku, TRITON, Praha 2010, 1.vydání, str. 12 - 13, ISBN 80-7254-133-1

Alberts B., Bray D., Johnson A. et al.: Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing, Ústí n. Labem 1998, 2.vydání, str. 587 – 589, ISBN 80-902906-2-0

Altaner C., Buněčná a molekulární biologie rakoviny, Radix, Praha 2008, 1.vydání, str. 11 - 14, 20 - 25, 36, 42 - 43 ISBN 978-80-86031-85-9

Bodeček Š., Koudela B.: Veterinární a chovatelská opatření proti vnitřním parazitům u koní. 2009 [Online] [Citace: 19.12.2012]. Dostupné z:
http://cehis.cz/publik_syst/files11/Veterinarni%20a%20chovatelska%20opatreni%20pro%20vnitrim%20parazitum%20u%20koni.pdf

Branská B., Linhová M., Patáková P., Paulová L., Melzoch K.: Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy, Chemické listy, 105, 2011, str. 586 – 593

Buchler T.: Strategie a cíle léčby nemocných s kolorektálním karcinomem, 2009 [Online] [Citace: 21.11.2012] Dostupné z :
http://www.mojemedicina.cz/files/leciva/jinesoubory/avastin/strategie_a_cile.pdf

Carlsson G., Patring J., Ulleras E., Oskarsson A.: Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos, Reproductive Toxicology, 32, 2011, str. 129 – 137

Čedíková M., Krakorová K., Miklíková M., Hronová M., Balandová A., Pitule P., Králíčková M.: On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů, 2012, Lékařská fakulta v Plzni, str. 7 - 10

Dayan A.D.: Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics, Acta Tropica, 86, 2003, str. 141 – 159

Dršata J., Netopilová M., Marklová E., Boušová I.: Vybrané kapitoly z patobiochemie, II.Díl, Patologické stavy, Karolinum, Praha, 2009, str. 87 – 108, ISBN 978-80-246-1715-2

Dušek L., Mužík J., Malúšková D., Májek O., Pavlík T., Abrahámová J., Vyzula R., Fínek J.: Epidemiologie kolorektálního karcinomu v ČR, 2012 [Online] [Citace: 31.1.2013]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>

Eckardt K., Kaltenhäuser J., Kilb C., Seiler A., Stahlmann R.: Relative potency of albendazole and its sulfoxide metabolite in two *in vitro* tests for developmental toxicity: The rat whole embryo culture and the mouse embryonic stem cell test, *Reproductive Toxicology*, 34, 2012, str. 378 – 384

Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell*, 61 (5), Jun 1, 1990, str. 759 – 767

Field J.J., Diaz J.F., Miller J.H.: The Binding Sites of Microtubule-Stabilizing Agents, *Chemistry & Biology*, 20 (3), 2013 March 21, str. 301 - 315

Howe J.R., Guillem J.G.: The genetics of colorectal cancer, *Surgical Clinics of North America*, 77, 1997, str. 175 - 195

Hynie S., Speciální farmakologie, Protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky, Díl VII/A, Karolinum, Praha, 2003, str. 3 – 4 ISBN 80-246-0656-9

Chiba K., Kawakami K., Tohyama K.: Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells, *Toxicology in vitro*, 12 (3), 1998, str. 251 - 258

Kiss I., Tomášek J.: O nádorech tlustého střeva a konečníku, 2010, [Online] [Citace: 14.11.2012]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/nadory-travici-trubice-jicen-zaludek-tenke-strevo-tluste-strevo-konecnik-rit-c15-21/o-nadorech-tlusteho-streva-a-konecniku/>

Klener P. a Klener P. jr.: Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, Grada, Praha, 2010, 1.vydání, str. 39 - 41, ISBN 978-80-247-2808-7

Leibovitz A., Stinson J.C., McCombs W.B., III, McCoy C.E., Mazur K.C., Mabry N.D.: Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36, 1976, str. 4562 - 4569

Lipská L., Visokai V. a kol.: Recidiva kolorektálního karcinomu, Komplexní přístup z pohledu chirurga, Grada, Praha 2009, 1.vydání, str. 11 - 32 ISBN 978-80-247-3026-4

Martarelli D., Pompei P., Baldi C. et al.: Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice, *Cancer Chemother Pharmacol*, 61, 2008, str. 809 – 817

Michalová E., Poprach A., Němečková I., Nenutil R., Valík D., Žaloudík J., Vyzula R., Vojtěšek B.: Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům *ex vivo* – úskalí a limitace vlastní metody, *Klinická onkologie* 21, 3, 2008, str. 93 - 97

Minárik M., Mináriková P.: Genetika a biologie kolorektálního karcinomu, 2005, 13 (2), [Online] [Citace: 31.1.2013]. Dostupné z: <http://www.hpb.cz/index.php?pId=05-2-04>

Morris D.L., Jourdan J., Pourgholami M.H.: Pilot Study of Albendazole in Patients with Advanced Malignancy, *Oncology*, 61, 2001, str. 42 – 46

Moyer M. P., Manzano L.A., Merriman R. L., Stauffer J.S., Tanzer L.R.: NCM 460, A Normal Human Colon Mucosal Epithelial Cell Line, *In Vitro Cell Dev Biol: Animal* 32 (6), 1996, str. 315 - 317

Mukhopadhyay T., Sasaki I., Ramesh R., Roth J.A.: Mebendazole Elicits a Potent Antitumor Effect on Human Cancer Cell Lines Both in Vitro and in Vivo, *Clinical Cancer Research*, 8, 2002, str. 2963 – 2969

Pecka M. et al.: Praktická hematologie, laboratorní metody, Infiniti Art, Český Těšín, 2010, 1.vydání, str. 75, 322 - 325, ISBN 978-80-903871-9-5

Pourgholami M.H., Woon L., Almajd R., Akhter J., Bowery P., Morris D.L.: In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole, *Cancer Letters*, 165, 2001, str. 43 - 49

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 xenograft model of peritoneal carcinomatosis, *Cancer Chemother Pharmacol*, 55, 2005, str. 425 – 432

Pourgholami M.H., Yan Cai Z., Lu Y. et al.: Albendazole: a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor and malignant ascites formation in OVCAR-3 tumor-bearing nude mice, *Clinical Cancer Research*, 12, 2006, str. 1928 - 1935

Pourgholami M.H., Khachigian L.M., Fahmy R.G., Badar S., Wang L., Wai Ling Chu S., Morris D.L.: Albendazole inhibits endothelial cell migration, tube formation, vasopermeability, VEGF receptor – 2 expression and suppresses retinal neovascularization in ROP model of angiogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397, 2010a, str. 729 – 734

Pourgholami M.H., Szwajcer M., Chin M., Liauw W., Seef J., Galettis P., Morris D.L., Links M.: Phase I clinical trial to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advanced cancer, *Cancer Chemother Pharmacol*, 65, 2010b, str. 597 – 605

Ramírez T., Eastmond D.A., Herrera L.: Non-disjunction events induced by albendazole in human cells, *Mutation Research*, 626, 2007, str. 191 – 195

Repetto G., del Peso, Zurita JL.: Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat.Protoc*, 3 (7), 2008, str. 1125 – 1131

Richter I.: Současné možnosti léčby kolorektálního karcinomu, 2008 [Online] [Citace: 5.12.2012]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/soucasne-moznosti-lecby-kolorektalniho-karcinomu-350880>

Roubalová L.: Průtoková cytometrie, *bulletin FONS*, 2, 2012, str. 5 - 9

Skálová L., Křížová V., Cvilink V., Szotáková B., Štorkánová L., Velík J., Lamka J.: Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effects of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver, *Veterinary Parasitology*, 146, 2007, str. 254 – 262

Skálová L., Boušová I. et al.: *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, Karolinum, Praha, 2011, 1.vydání, str. 21 – 22, 34, ISBN 978-80-246-1917-0

Spagnuolo P.A., Hu J., Hurren R. et al.: The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma, *Blood*, 115 (23), 2010 str. 4824 – 4833

Šmejkalová J.: Primární a včasná sekundární prevence nádorových onemocnění, Hradec Králové 2012

Teruel M., D'ercole J., Catalano R.: Evaluation of potential embryo toxicity of albendazole sulphoxide in CF1 mice, *Biocell*, 35, 2011, str. 29 – 33

Urban O.: Diagnostika kolorektálního karcinomu, *Onkologie*, 2008; 2 (1), str. 9 - 11

Velík J., Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Šavlík M., Wsól V., Šnejdrová E., Skálová L.: Albendazole repeated administration induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in mouflon (*Ovis musimon*), *Research in Veterinary Science*, 78, 2005, str. 255 – 263

Yenjerla M., Cox C., Wilson L., Jordan M.A.: Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics, *The Journal of Pharm and Experimentaly therapeutics*, 328 (2), 2009, str. 390 - 398

Yin L.M., Wei Y., Wang Y., Xu Y.D., Yang Y.Q.: Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells, *Int J Med Sci*, 10, 2013, str. 68 - 72

Zavoral M., Vepřeková G., Suchánek Š., Petruželka L.: Terapie kolorektálního karcinomu, 2012 [Online] [Citace: 5.12.2012]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/terapie-kolorektalniho-karcinomu-464247>

Zavoral M., Frič P., Suchánek Š., et al.: Národní program screeningu sporadického kolorektálního karcinomu (KR-CA): vývoj, současnost, perspektiva, 2013 [Online] [Citace: 29.3.2013]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/narodni-program-screeningu-sporadickeho-kolorektalniho-karcinomu-kr-ca-vyvoj-soucasnost-perspektiva-468769>

- Web 1: Státní zdravotní ústav, Nádorová onemocnění, [Online] [Citace: 25.11.2012].
Dostupné z : <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>
- Web 2: LeeD. , Colon cancer prevention, [Online] [Citace: 21.11.2012]. Dostupné z:
http://www.medicinenet.com/colon_cancer_prevention/article.htm
- Web 3: Kolorektum.cz: Kolorektální screening, [Online] [Citace: 21.11.2012] Dostupné
z : <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-verejnost--kolorektalni-screening>
- Web 4: Albendazol. [Online] [Citace: 12.1.2013]. Dostupné z:
<http://www.farmaceutika.info/zentel>
- Web 5: Albendazol. [Online] [Citace: 25.1.2013]. Dostupné z:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Albendazol>
- Web 6: Zytoskelett. [Online] [Citace: 27.1.2013]. Dostupné z: <http://www.zytologie-online.net/zytoskelett.php>
- Web 7: Cell Proliferation Reagent WST-1, 2005, [Online] [Citace: 6.2.2013]. Dostupné
z: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644807001_en_11.pdf
- Web 8: Test cytotoxicity s neutrální červení, [Online] [Citace: 12.2.2013]. Dostupné z:
<http://www.generi-biotech.com/nr-test-cytotoxicity/>
- Web 9: Normal-Derived Colon Mucosa (NCM460), [Online] [Citace: 9.4.2013].
Dostupné z: <http://www.incell.com>