

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VLIV TRABEKTEDINU NA BUŇKY ODVOZENÉ  
Z KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU**

Diplomová práce

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

Školitel specialista: RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Jaroslav Bobek

## Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat především své školitelce RNDr. Veronice Hanušové a doc. Ivě Boušové za její odborné vedení, rady, ochotu a hlavně trpělivost v průběhu vypracovávání této diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat ostatním pracovníkům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za vstřícnost a pomoc s prací v laboratoři.

Prohlášení:

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

Hradec Králové 2018

Jaroslav Bobek

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických věd**

**Kandidát:** Jaroslav Bobek

**Školitel:** Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

**Školitel specialista:** RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vliv trabektedinu na buňky odvezené z kolorektálního karcinomu

Trabektedin je alkaloid, který se přirozeně vyskytuje v mořských pláštěncích *Ecteinascidia turbinata*. Jeho mechanismus účinku spočívá v tvorbě komplexů s DNA, transkripčními faktory a jadernými proteiny. To způsobí blokádu transkripce a poruchu funkce reparačních mechanismů DNA v buňce. Toho můžeme následně využít v léčbě některých typů nádorových onemocnění, konkrétně v této práci jsme zkoumali jeho vliv na buňky kolorektálního karcinomu. Tuto látku jsme testovali na nádorových buněčných liniích SW 480 (odvozena od primárního ložiska adenokarcinomu) a SW 620 (metastatická linie z lymfatických uzlin od stejného pacienta). Primární buněčné kultury označené 36B a 39B byly získány odběrem od pacientů ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a jejich následnou kultivací. Primární kultury 36B a 39B byly odvozeny z primárního ložiska nádoru tlustého střeva. U všech linií byla testována cytotoxicita trabektedinu a následně vypočítány hodnoty inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub>. U buněk 36B a 39B byly tyto hodnoty použity při zkoušce ovlivnění migrace. U obou primárních kultur došlo vlivem trabektedinu ke snížení schopnosti migrace. Pomocí RT-PCR a imunoblotingu jsme zjistili významné snížení exprese sledovaných adhezivních a invazivních molekul (EpCAM, ICAM-1, E-kadherin, N-kadherin, FAK, fosfo-FAK) u linie 36B při koncentraci trabektedinu 5 µg/ml. Tato linie byla podle našich zjištění nejcitlivější k použitým koncentracím trabektedinu. Výsledky dosažené u buněčných linií SW 480 a SW 620 a primární kultury 39B nebyly tak jednoznačné. U některých molekul došlo ke snížení hladin, některé nevykazovaly signifikantní změny a u některých se hladiny studovaných molekul zvýšily. Jako slibné se ukázalo působení trabektedinu na proteiny FAK a fosfo-FAK, jejichž hladiny se u většiny buněčných linií a primárních kultur snížily.

## **ABSTRACT**

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Jaroslav Bobek

**Supervisor:** Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

**Supervisor specialist:** RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.

**Title od diploma thesis:** The effect of trabectedin on the cells derivated from colorectal carcinoma

Trabectedin is alkaloid, which occurs naturally in sea tunicate *Ecteinascidia turbinata*. Its mechanism of action consist of creation complexes with DNA, transcription factors and nuclears proteins. This cause blocade of transcription and defect of repair mechanism of DNA in cell. We can use it in therapy of some types of cancer, in this particular work we was researching influence on colorectal carcinoma. We tested this substance on two cancerous cell lines SW 480 – derivated from primary deposit of adenokarcinoma and SW 620 – metastatic line from lymph nodes from same patient. Prime cell cultures marked as 36B and 39B were secured from patients in University Hospital in Hradec Králové and their following cultivation. Both samples 36B and 39B were derived from the primary colon tumor deposit. On all cell lines was performed cytotoxicity assay and then was individually calculated  $IC_{50}$ . These values were used in migration assay for cells 36B and 39B. After treatment with trabectedin both samples showed a decrease in migration capacity. With RT-PCR and immunobloting we discovered significant decrease in expresion of observed adhesive and invasive molecules (EpCAM, ICAM-1, E-cadherin, N-cadherin, FAK, p-FAK) on line 36B at a trabectedin concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$ . By our measurement was this line most sensitive to selected levels of trabectedin. Achieved result on other lines were not clear. Some observed molecules have here decreased levels, some have not shown significant changes and some have increased levels. Trabectedin has been shown to be promising for FAK and phospho-FAK proteins whose levels have decreased in most cell lines and primary cultures.

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav poznání .....	11
2.1	Kolorektální karcinom.....	11
2.1.1	Rizikové faktory vzniku CRC.....	11
2.1.2	Rozdělení CRC.....	11
2.1.3	Incidence a mortalita v ČR.....	12
2.1.4	Věková struktura nemocných.....	13
2.1.5	Prevalence a klinicky diagnostikovaná stadia.....	13
2.1.6	Epidemiologická data ve světě.....	14
2.2	Kancerogeneze a metastázování.....	15
2.2.1	Fáze kancerogeneze.....	15
2.2.2	Mutogeneze .....	16
2.2.3	Protoonkogeny .....	17
2.2.4	Tumor-supresorové geny.....	18
2.2.5	Epigenetické změny .....	19
2.2.6	Metastázování.....	20
2.2.7	Účast mucinu na karcinogenezi.....	22
2.3	Metastázy v lymfatických uzlinách a prognóza onemocnění.....	22
2.4	Příznaky, diagnostika a léčba CRC .....	23
2.4.1	Příznaky CRC.....	23
2.4.2	Diagnostika CRC.....	24
2.4.3	Léčba CRC .....	25
2.5	Buněčné kultury.....	29
2.5.1	Typy buněčných kultur.....	29
2.5.2	Fáze růstu buněčné populace.....	30
2.5.3	Získávání primárních kultur .....	31

2.6	Yondelis (trabektedin)	32
2.6.1	Farmakokinetika	32
2.6.2	Použití	32
2.6.3	Nežádoucí účinky	32
2.6.4	Fertilita, těhotenství a kojení	33
2.6.5	Ostatní	33
3	Cíle práce	34
4	Metodika	35
4.1	Chemikálie	35
4.2	Přístroje a pomůcky	36
4.2.1	Přístroje	36
4.2.2	Pomůcky	36
4.3	Buněčné linie	37
4.3.1	SW 480	37
4.3.2	SW 620	37
4.3.3	Linie 36B a 39B	37
4.4	Test cytotoxicity	37
4.5	X-celligence – stanovení migrace buněk	37
4.6	Stanovení exprese mRNA pomocí Real-Time PCR	38
4.7	Stanovení koncentrace bílkoviny metodou BCA	40
4.8	Stanovení proteinové exprese pomocí elektroforézy a imunoblotingu	41
4.9	Statistická analýza dat	48
5	Výsledky	49
5.1	Vliv trabektedinu na životaschopnost buněk CRC	49
5.1.1	Buněčné linie SW 480 a SW 620	49
5.1.2	Buněčné linie 36B a 39B	50
5.2	Ovlivnění schopnosti migrace buněk	52

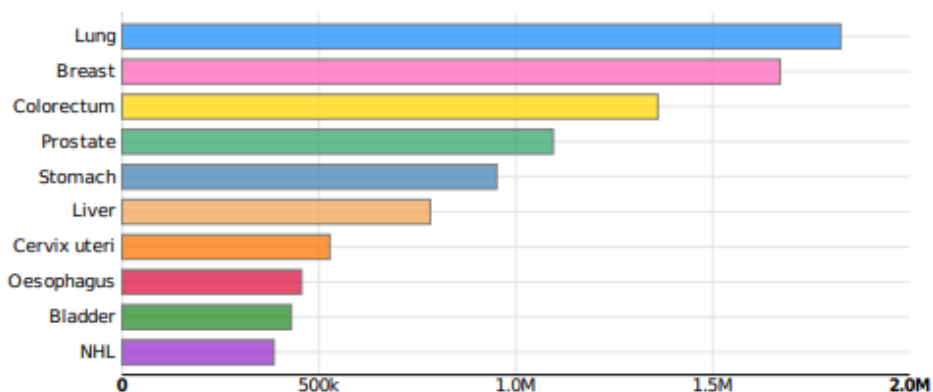
5.3	Vliv trabektedinu expresi molekul účastnících se migrace a adheze na úrovni mRNA .....	54
5.3.1	EpCAM a ICAM-1 .....	54
5.3.2	E-kadherin a N-kadherin .....	56
5.4	Vliv trabektedinu na expresi molekul účastnících se migrace a adheze buněk na úrovni proteinu pomocí imunoblotingu .....	59
5.4.1	Vliv na buněčné linie SW 480, SW 620.....	59
5.4.2	Vliv na buněčné linie 36B, 39B .....	60
5.4.3	Denzitometrické vyhodnocení blotů .....	60
6	Diskuze .....	62
7	Závěr .....	66
8	Seznam zkratk .....	66
9	Seznam tabulek .....	69
10	Seznam obrázků .....	70
11	Seznam literatury.....	73



## 1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2015 v jejich důsledku zemřelo ve světě 8,8 milionu lidí. Nejčastějšími typy nádorových onemocnění u mužů jsou rakovina plic, prostaty, tlustého střeva a konečníku, žaludku a jater. U žen je situace podobná, u nich jsou nejčastějšími typy rakovina prsu, plic tlustého střeva a konečníku a dělohy (82). Odhadovaný počet případů u deseti nejčastějších nádorových onemocnění ve světě za rok 2012 je uveden v Obr. 1 (83).

**Estimated number of incident cases, both sexes, worldwide (top 10 cancer sites) in 2012**



Obr 1: Celosvětový výskyt nejčastějších typů rakoviny v roce 2012 (83)

Nádorové buňky jsou charakterizovány nekontrolovatelným dělením. K tomu dochází v důsledku mutací v genetické informaci, změnám v růstových a inhibičních signálech a omezení v kontrolních mechanismech buňky. Pokud jsou buňky dobře ohraničené a připomínají tkáň, ze které pocházejí, mluvíme o benigním nádoru. Maligní forma je charakterizovaná ztrátou diferenciací, prorůstáním do okolí a rozšiřováním do vzdálených tkání pomocí krevního či lymfatického řečiště (2).

Trabektedin je jednou z novějších molekul v terapii nádorových onemocnění. Jedná se o alkaloid, který byl izolován z mořských pláštěnců, a díky svému působení na nádorové buňky na více úrovních se jeví jako nadějný kandidát v terapii nádorových onemocnění. V současné době je v Evropské unii schválen ke dvěma indikacím a to k léčbě sarkomů měkkých tkání a karcinomu vaječníku a vejcovodů (43,44).

Tato diplomová práce byla vypracována na Ústavu lékařské biologie a genetiky, Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. V této práci jsme se zabývali vlivem trabektedinu na nádorové buněčné linie SW 480 a SW 620, které jsou odvozené od kolorektálního karcinomu, a na primární buněčné kultury 36B a 39B odebrané z ložisek

nádoru tlustého střeva pacientů ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Vzhledem k vysoké incidenci karcinomu tlustého střeva a konečníku u nás i ve světě se studium vlivu novějšího cytostatika trabektedinu na buňky tohoto karcinomu přímo nabízí. V této práci jsme hodnotili účinek trabektedinu na životaschopnost výše zmíněných nádorových buněk, na schopnost primárních buněčných kultur migrovat, a na expresi adhezních a invazních molekul na úrovni mRNA a proteinu.

## 2 Současný stav poznání

### 2.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC) je zhoubné nádorové onemocnění. CRC vzniká, jako většina ostatních karcinomů, kombinací genetických faktorů společně s vlivy vnějšího prostředí. Některé typy nádorů také ovlivňují dědičné mutace specifických genů. Nádorové buňky vycházejí z původně jedné mateřské, u které se většinou akumulují genetické změny (mutace jednotlivých genů) a změny epigenetické (ovlivňují expresi genů). Mezi genetické faktory patří změny hlavně (ne ale pouze) v těchto třech skupinách genů: tumor-supresorové geny, protoonkogeny a geny systému reparace chybného párování nukleotidů („*DNA mismatch repair system*“). Ze změn epigenetických můžeme zmínit změny metylace DNA, acetylace histonů, inhibice mezibuněčné komunikace a ovlivnění mechanismů přenosu signálů regulujících proliferaci, diferenciaci, buněčný cyklus a apoptózu buněk (1,2).

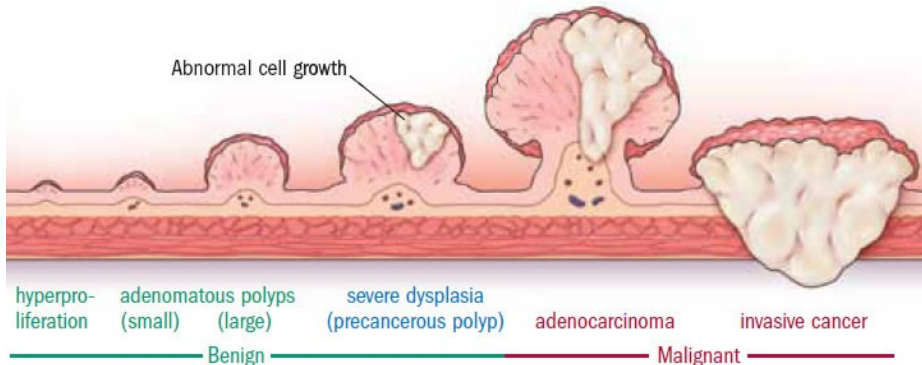
#### 2.1.1 Rizikové faktory vzniku CRC

Rizikové faktory vedoucí ke zvýšené šanci onemocněním CRC, které mohou být jak ovlivnitelné tak nikoli, jsou i vlivy vnějšího prostředí. Z hlediska pohlaví jsou více ohroženi muži. Zvýšené riziko v souvislosti se zdravotním stavem zaznamenáváme u lidí s Crohnovou chorobou, ulcerózní kolitidou, diabetem mellitem 2. typu, u pacientů majících střevní polypy anebo jiný typ rakoviny. Lidé starší 50 let a s CRC v rodinné anamnéze jsou také náchylnější k tomuto onemocnění. Ohledně životního stylu jsou ohroženi více lidé s nadváhou, konzumující zvýšené množství potravy upravené pečením a grilováním, potraviny s menším podílem vlákniny, vyšším podílem živočišných nasycených mastných kyselin, lidé konzumující velké množství alkoholu, dále kuřáci, lidé s nízkou pohybovou aktivitou a lidé s nízkým příjmem vápníku, selenu, vitamínů A,C,E a kyseliny listové (3,4).

#### 2.1.2 Rozdělení CRC

Nádory dělíme z více hledisek. Makroskopicky může mít CRC podobu polypoidní, difúzní či ulcerózní. Z histologického hlediska je až 95 % karcinomů tlustého střeva a konečníku tvořeno adenokarcinomy. Mezi další možné typy karcinomů vyskytující se v této části trávicího traktu patří např. karcinoidy, lymfomy, sarkomy a gastrointestinální stromální tumory. Nádory těchto typů mohou mít odlišné příznaky a léčbu. Tyto typy však tvoří pouze malou část z celkového počtu, a tak když mluvíme o kolorektálním karcinomu, máme na mysli adenokarcinom. Tento typ nádoru vychází ze žlázoového epitelu sliznice, který vytváří sliz pro zvlhčení jejího povrchu. Vzniku tohoto nádoru velice často předchází různé stupně změn tkáně od hyperproliferace přes polypy až po prekancerózy (dysplazie tkáně, vznik

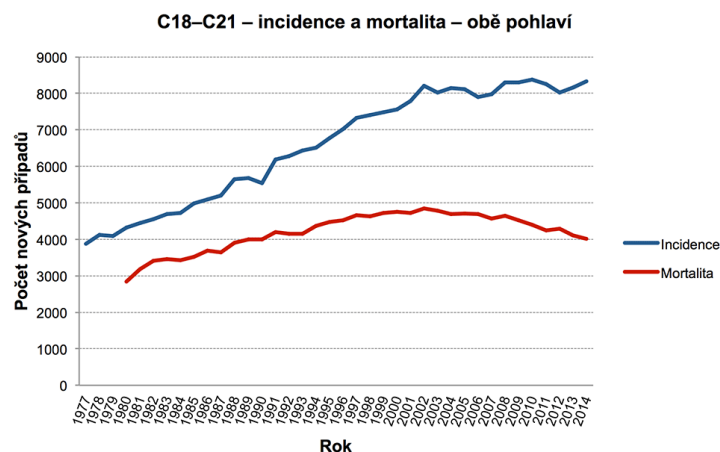
adenomů). Konečným stádiem je pak zvrát benigního adenomu do maligní formy adenokarcinomu (obr. 1). Důležitá pro stav pacienta je také znalost histologického *stagingu* (tj. umístění nádoru, jeho infiltrace do okolních tkání a tvorba metastáz) a *gradingu* (tj. stupeň diferenciacie buněk - čím menší je diferenciacie buněk, tím horší je prognóza) (5).



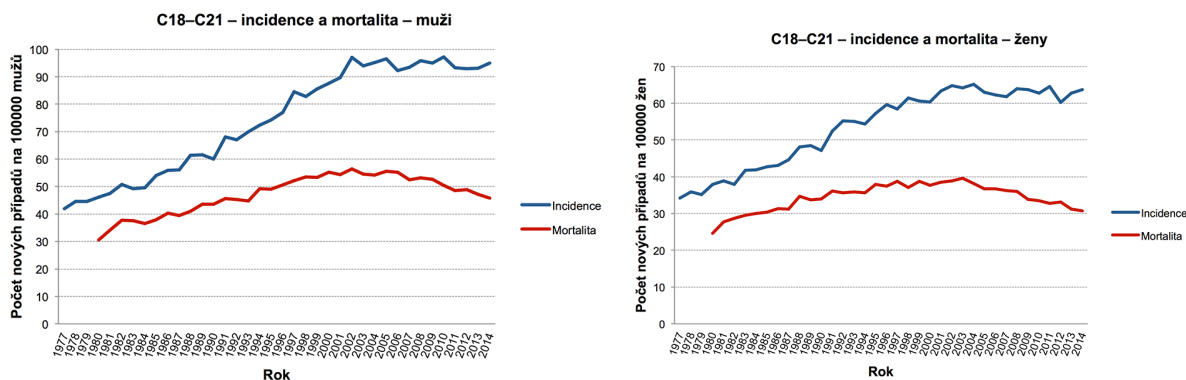
Obr. 2: Různá stádia přeměny tkáně ve střevě (6)

### 2.1.3 Incidence a mortalita v ČR

Co se týče incidence a mortality je situace v České republice velice nelichotivá. Dlouhodobě se držíme na špičce v obou těchto kategoriích ať už ve srovnání s ostatními evropskými státy či celosvětově. Od 70. let incidence rostla až do roku 2000 a od té doby se drží okolo hodnoty 8000 nově diagnostikovaných případů CRC za rok, což odpovídá 80 onemocněním na 100 tisíc obyvatel (obr. 2). V incidenci je ale velmi výrazný rozdíl mezi pohlavími. Zatímco u mužů se tato hodnota pohybuje okolo 90 případů na 100 tisíc obyvatel, u žen je incidence o třetinu menší a to pouze kolem 60 případů na 100 tisíc obyvatel (Obr. 3). Mortalita je ročně kolem 4000 pacientů a stejně jako u incidence platí, že u mužů je větší než u žen. Mírné pozitivum můžeme nalézt v tom, že se v posledních letech mírně snížila mortalita, což je nejspíš důsledkem lepší zdravotní péče a její dostupnosti (7).



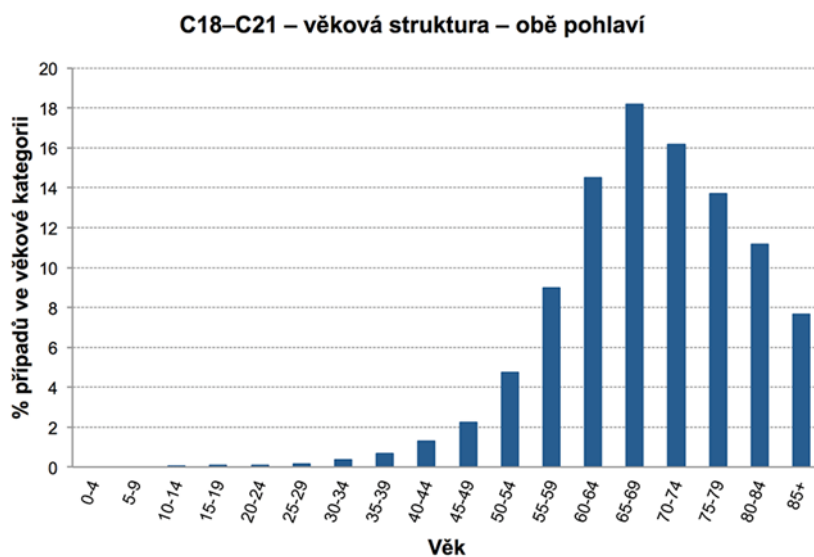
Obr. 3: Incidence a mortalita ČR v období let 1977-2014 (8)



Obr. 4: Rozdíly v incidenci a mortalitě CRC mezi pohlavními v ČR (8)

### 2.1.4 Věková struktura nemocných

Počet nemocných ve věkových skupinách roste až do období 65-69 let, kdy má svůj vrchol a odtud pozvolna klesá. Většina pacientů je starší 60 let, součet všech mladších skupin tvoří 19 % ze všech nemocných. Na obrázku 4 je vidět rozložení do věkových skupin z let 2010-2014 (8).

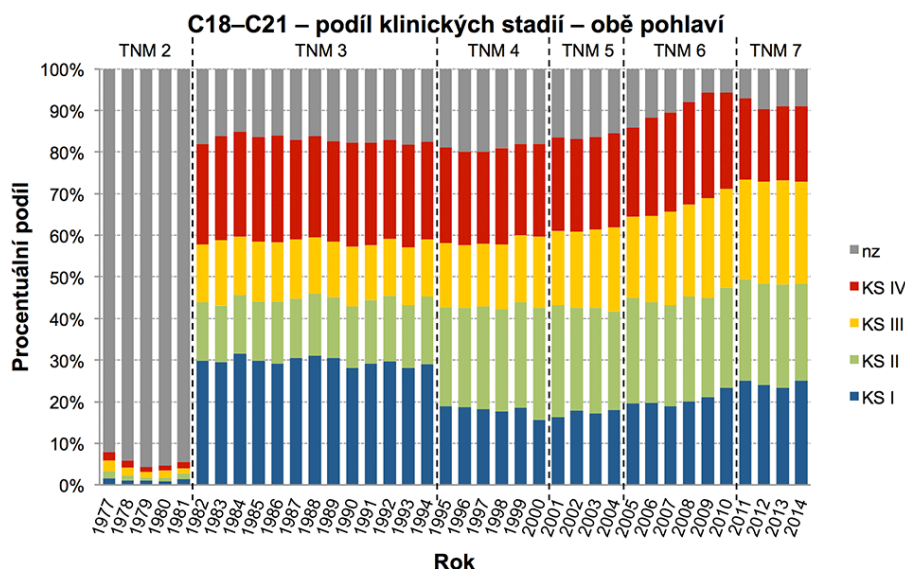


Obr. 5: Podíl pacientů v jednotlivých věkových skupinách (8)

### 2.1.5 Prevalence a klinicky diagnostikovaná stadia

Vzhledem ke stále rostoucí incidenci a mírnému poklesu mortality prevalence v posledních letech stále roste. Také se nedaří zlepšit poměr diagnostikovaných klinických stádií CRC, což je negativní jev, vzhledem k velmi odlišným prognózám jednotlivých stádií. Čím ranější stádium CRC je zachyceno, tím se výrazně zvyšuje šance na pozitivní výsledek léčby a dlouhodobé přežití. Jen asi 40-45 % případů je zachyceno ve stadiu 1 či 2 (obr. 5). To ovlivňuje dosažený výsledek léčby, zatímco pětileté relativní přežití pacienta ve stadiu 1 je 86

%, ve 4. stadiu je to jen 12,5 %. Tyto poznatky by nás měli vést k posilování prevence a screeningu tohoto onemocnění (7,8).



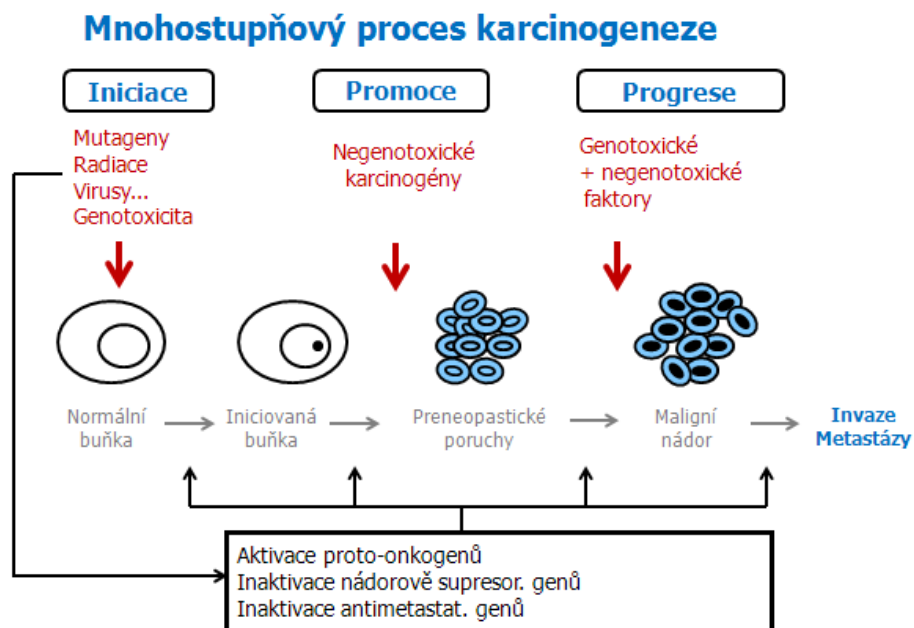
Obr. 6: Podíl klinických stádií v průběhu let v ČR (8)

### 2.1.6 Epidemiologická data ve světě

Celosvětově se řadí CRC na třetí místo v incidenci nově diagnostikovaných nádorů. V roce 2012 to bylo 1,4 milionu nově diagnostikovaných případů, což procentuálně odpovídá asi 10 % všech nádorových onemocnění. Mužských pacientů bylo stejně jako v ČR více než ženských pacientů. V podílu všech nádorových onemocnění byl CRC u žen na 2. místě a na 3. místě u mužů. Více postižené jsou státy s vysokou životní úrovní - oblast Severní Ameriky a Evropy, zatímco na opačném konci žebříčku jsou Asie a Afrika. V pořadí jednotlivých zemí je na prvních příčkách postupně Slovensko, Maďarsko a Nový Zéland. Česká republika zaujímá 5. místo v incidenci společně s Norskem. Co se týče mortality, ve srovnání se světem jsme bohužel na třetím místě za Slovenskem a Maďarskem (9,10,12). Prognózy do budoucna ohledně epidemiologických parametrů souvisí s oblastí zájmu. Zatímco v rozvinutých zemích s vysokou životní úrovní incidence roste jen mírně a mortalita dokonce mírně klesá, a to díky vysoké kvalitě a dostupnosti lékařské péče a screeningu. Ve středně rozvinutých a rozvojových zemích se předpokládá nárůst incidence a mortality, tak jako tomu bylo ve vyspělých zemích v minulých desetiletích. Kvůli nekvalitní, nedostatečné, nebo dokonce chybějící lékařské péči v těchto zemích bude nárůst oproti vyspělým zemím prudký. Pokud se i v těchto oblastech povede zajistit dostatečnou a dostupnou lékařskou péči, tak by se i tam měla situace ustálit tak, jako k tomu dochází v současné době v ČR (11).

## 2.2 Kancerogeneze a metastázování

Kancerogeneze je proces označující vícefázovou přeměnu buňky na buňku neoplastickou. Buňka pak neadekvátně odpovídá na růstové či inhibiční signály, může potlačovat mezibuněčnou komunikaci a apoptózu. Navíc začne upřednostňovat své vlastní dělení, což je pro organismus nežádoucí. Tento proces zahrnuje změny genetické a epigenetické. Proces kancerogeneze dělíme na tři stádia: fáze iniciace, promoce a progresu (Obr.6) (16).



Obr. 7: Karcinogeneze (2)

### 2.2.1 Fáze kancerogeneze

Fáze iniciace se vyznačuje vlastním poškozením DNA mutací či mutacemi, které jsou nevratné. Normální buňka tím získává predispozice stát se v budoucnu buňkou nádorovou. Dokud odpovídá správně na buněčnou regulaci, zůstává v latentním stádiu.

Následuje stadium promoční, které se vyznačuje velkou časovou variabilitou. Transformovaná buňka se v této fázi začíná působením promočních faktorů dělit. Jsou to látky působící negenotoxickými (epigenetickými) mechanismy. Mohou to být např. růstové signály, látky vnějšího původu – z diety, fyzikální či chemické faktory. Tyto faktory sami o sobě nevyvolávají maligní transformaci, ale mohou ji podpořit. Podle intenzity těchto faktorů jsou buňky buď stimulovány, nebo se při jejich odstranění proces kancerogeneze zpomaluje, někdy dokonce i zastavuje. Fáze promoce je zpočátku vratná, později už ne.

Poslední je fáze progresu, kdy se hromadí další mutace, obzvláště změny v počtu chromozomů a jejich přestavba. Dochází také k trvalé aktivaci růstových faktorů. To má za následek větší

rychlost proliferace, invazivnost a možnost tvorby metastáz. Přejíždí zde stadium benigní do stádia malignity a z populace buněk preneoplastických se stávají buňky neoplastické (2,16).

### **2.2.2 Mutageneze**

Genetické změny neboli mutace jsou kvalitativní či kvantitativní změny v DNA. Vznikají na úrovni genů i chromozomů, tato změna je ireverzibilní a může být indukována různými faktory. Toto poškození mohou vyvolat podněty fyzikální (např. RTG záření, UV záření aj.), chemické (alkylační, acetylační a jiné látky) či biologické (např. viry). Známe také kokarcinogeny, což jsou látky, které aktivují karcinogeny. Na druhé straně existují antikarcinogeny, což jsou látky působící proti karcinogenům tím, že se na ně váží, odbourávají je, deaktivují jejich aktivační enzymy, nebo působí jako kompetitivní inhibitory. Změna genu je výsledkem chybného párování, chyb v opravách DNA, nebo působení defektní DNA polymerázy. To může způsobit změnu funkce či množství proteinu, který je tímto genem kódovaný. Další možností je změna počtu chromozomů či jejich uspořádání. Chyba počtu genů v chromozomu oproti normálu může vyústit ve změnu jeho funkce, přestože je kódován správně. Velkým problémem je nestabilita genomu nádorových buněk, která způsobuje časté mutace. Ty pak blokují přirozené mechanismy regulace a mohou způsobovat rezistenci k chemoterapeutikům (2,13).

#### **2.2.2.1 Bodové mutace**

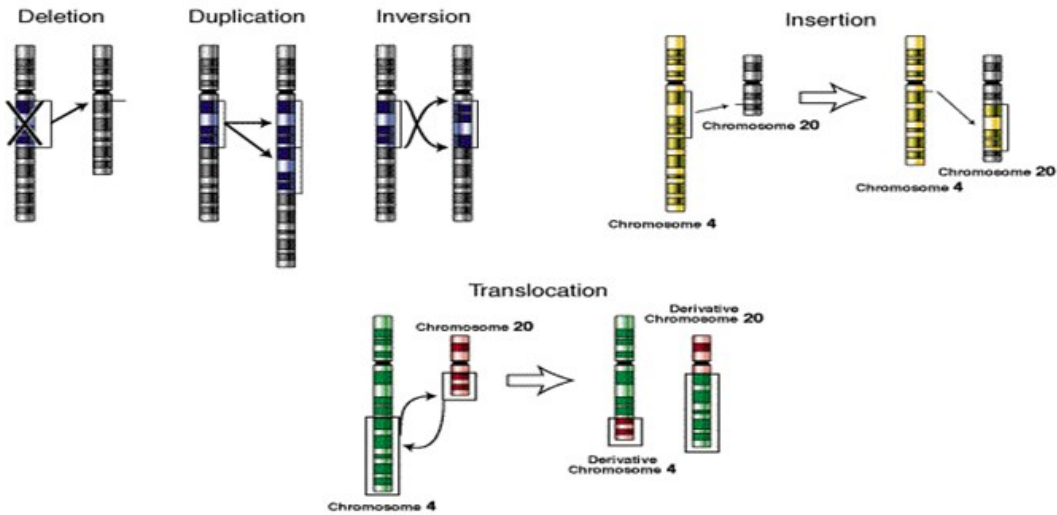
Poškození a reparace DNA probíhají v našem těle neustále. Způsobují ho nejen cizorodé látky, ale i látky endogenní. Samotné chyby v syntéze DNA nemusí nutně znamenat mutaci, pokud je zachytí a opraví kontrolní mechanismy buňky. Nepřesnosti v syntéze DNA se liší podle typu DNA polymerázy. U nádorů nebyly prokázány chyby v DNA polymeráze účastníci se replikace DNA, ale ve dvou hlavních reparačních systémech. Na nestabilitě nádorových buněk se podílejí dva mechanismy: 1) vzrůstající počet chyb v syntéze DNA způsobí nefunkční reparační proteiny; 2) hromadění mutací, které přinášejí buňkám nové generace výhodu oproti buňkám normálním, nebo oproti předchozím generacím (2,14).

#### **2.2.2.2 Chromozomové mutace**

Zdrojem genetické nestability jsou nejen bodové mutace, ale i mutace na úrovni celých chromozomů. Projevují se jako amplifikace, delece, translokace anebo aneuploidie (obr. 7). Amplifikace neboli zmnožení genů se často vyskytují u pozdních stadií maligních nádorů, mohou souviset s rezistencí k chemoterapeutikům a mívají nepříznivý prognostický vývoj. Aneuploidie je změna počtu chromozomů, která se vyskytuje u celé řady nádorů. Další podstatnou nestabilitou je chromozomální či genová delece, charakterizovaná ztrátou



příslušného genu. Jestliže k takovýmto změnám dojde u tumor-supresorových genů, může to způsobit zvýšenou proliferaci buňky, vytvořit předpoklad pro další genetické změny a v krajním případě vytvořit nádorový fenotyp buňky.



Obr. 8: Typy chromozomových mutací (28)

### 2.2.2.3 Změny v buněčném cyklu

Změny v kontrolních bodech buněčného cyklu jsou další adaptací nádorových fenotypů. V buněčném cyklu existují přirozené body, ve kterých se kontroluje správnost DNA a v případě její chybovosti dochází k reparaci, nebo v případě většího poškození k apoptóze buňky. Když dojde k vyřazení těchto kontrolních bodů, dochází k přežívání a dělení buněk s chybou DNA.

Jako příklad si můžeme uvést protein p53 kódovaný genem TP53 na chromozomu 17. Ve zdravé buňce je protein p53 vázán na MDM2. Při poškození DNA se MDM2 fosforyluje a uvolňuje se protein p53. Ten pak v jádře působí na gen p21. Produkt tohoto genu inhibuje cyklin-dependetní kinázy a zastavuje buněčný cyklus, aby mohlo dojít k opravě DNA. Dědičná choroba Li-Fraumeniho syndrom je způsobena zděděním mutované formy genu pro p53 od jednoho z rodičů. Důsledek pouze jedné funkční sady pro protein p53 jsou větší predispozice pro různé typy nádorů, vyskytující se také v dřívějším věku než je obvyklé (46).

### 2.2.3 Protoonkogeny

Geny odpovědné za vývoj rakoviny nazýváme protoonkogeny. Tyto geny mají svoji fyziologickou funkci v organismu, ale jejich mutací dochází k nežádoucí změně. Kódují proteiny důležité pro regulaci růstu, diferenciaci a apoptózu buněk. Onkogen je mutovaný protoonkogen vedoucí k vzrůstu aktivity jeho produktů. Protoonkogeny dělíme podle umístění

jejich produktu na sekreční proteiny, proteiny buněčného povrchu, cytoplazmatické proteiny a jaderné proteiny. Druhé dělení je podle funkce jejich produktů na růstové faktory, receptory pro růstové faktory, cytoplazmatické proteiny – proteinkinázy a G-proteiny, a jaderné proteiny (2,13,16).

Ze skupiny RAS onkogenů jsou ve vztahu k CRC podstatné zejména změny K-RAS (zastoupení asi u 40 % CRC). Proteinové produkty těchto genů patří mezi G-proteiny, které zprostředkovávají přenos signálu z cytoplazmy do jádra. Spadají do kaskády receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Tato kaskáda reguluje proliferaci, apoptózu, přežívání a schopnost migrace buněk sliznice kolorekta - zdravých i nádorových. Pokud je přítomna nemutovaná forma (wt-RAS), aktivita této cesty závisí na stimulaci EGFR navázáním aktivačního ligandu. V mutované formě se K-RAS aktivuje bez nutnosti signálů od EGFR. Proto se pacientům, kteří jsou adeпти pro léčbu anti-EGFR protilátkami (cetuximab, panitumumab), dělají testy na RAS formu. Buňky s mutací RAS jsou k těmto léčivům rezistentní. K aktivaci kaskády nepotřebují signál z EGFR, který tato léčiva blokují (47,48).

#### **2.2.4 Tumor-supresorové geny**

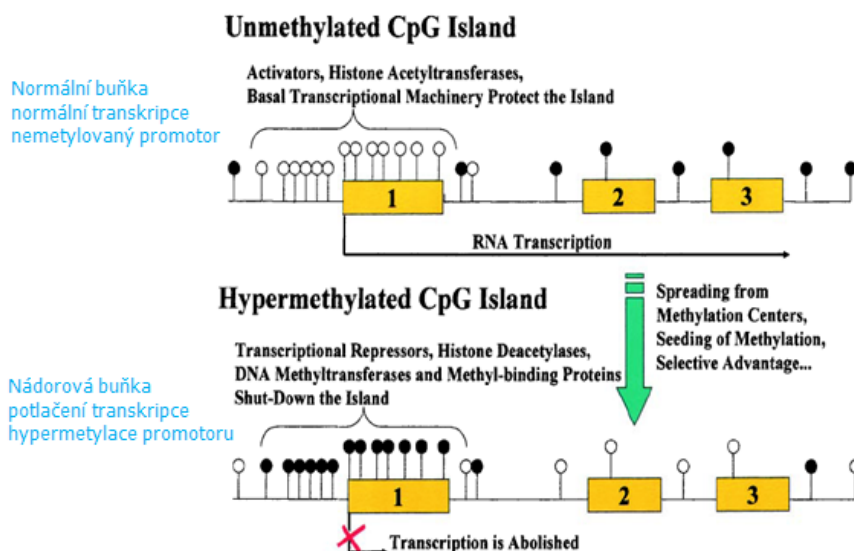
Produkty tumor-supresorových genů zastavují dělení, podporují diferenciaci, případně navozují apoptózu. Ztráta jejich funkce je jedním z předpokladů pro hromadění mutací a maligní zvrát buňky. Nazývají se také recesivní onkogeny, což znamená, že se projeví až při mutaci obou alel na homologních párech chromozomů. Pokud dojde k mutování alel během života, mluvíme o sporadickém výskytu. V případě zdědění jedné mutované a jedné zdravé alely se jedná o familiární výskyt. Když mutuje i druhá alela, mutace se projeví. Tomuto procesu říkáme ztráta heterozygoty (49,50).

Tumor-supresorové geny regulují buněčný cyklus. Zástupce této skupiny protein p53 je již zmíněn v kapitole 2.2.3. Dalším příkladem z této skupiny je retinoblastomový gen a jeho produkt Rb-protein. Funkcí Rb-proteinu je regulace buněčného cyklu inhibicí transkripčního faktoru E2F. Hypofosforylovaný Rb-protein váže E2F faktor a blokuje přechod buňky z G<sub>1</sub> do S fáze buněčného cyklu. Při patologických změnách se uvolňováním nadměrného množství E2F faktoru buňka posouvá do další fáze buněčného cyklu a dochází k nežádoucímu dělení. Dále můžeme zmínit APC gen. Jeho mutace jsou spojeny s deregulací dráhy inaktivující β-katenin. Dědičné mutace tohoto genu způsobují familiární adenomatózní polypózu, projevující se vznikem velkého množství adenomů s vysokým rizikem vzniku kolorektálního karcinomu (49,50).

## 2.2.5 Epigenetické změny

### 2.2.5.1 Methylace DNA

Epigenetické změny ovlivňují expresi genů bez změn v sekvenci DNA. Jednou z možností je methylace DNA. Je to modifikace genomu navázáním metylových zbytků do polohy 5 cytosinu v dinukleotidu CpG. Rozložení metylovaných skupin je nerovnoměrné (obr. 8). Většina genomu má nízkou metylaci, ta se soustředí v krátkých úsecích bohatých na CpG, nebo na opakujících se sekvencích. Úseky nemetylované DNA jsou připraveny k transkripci, zatímco silná methylace tento proces blokuje. To je také jeden z regulačních procesů buňky pro selektivní výběr genů, které budou aktivovány v žádoucím čase na žádoucím místě. Nadměrná, nebo naopak nedostatečná methylace tak může v nádorových buňkách vést k potlačení exprese tumor-supresorových genů, nebo umožnění zvýšené exprese růstových faktorů. Tímto způsobem může methylace usnadnit mutagenizi (17,15).



Obr. 9: Zabránění transkripce metylací DNA (2)

### 2.2.5.2 Modifikace histonů

Další epigenetickou možností změny funkce je modifikace histonů. Histony též podléhají posttranslačním úpravám. Úpravou těchto dějů je ovlivněna genová aktivita. Společně s metylací se významně podílejí na aktivaci a utlumení genové exprese. Mezi nejběžnější modifikace patří acetylace, methylace a fosforylace. Tyto změny se dějí obvykle na N-konci histonu. Methylace histonových proteinů probíhají především na lysinových a argininových zbytcích. Výsledný účinek závisí na místě úpravy. Na některých místech dojde metylací k aktivaci místa pro transkripci, jinde naopak k inaktivaci. Acetylace lysinových zbytků v histonu probíhá za pomoci histonacetyltransferáz (HAT). Touto reakcí se destabilizuje struktura nukleozomu a geny se zpřístupňují transkripčním faktorům. Acetylace tedy

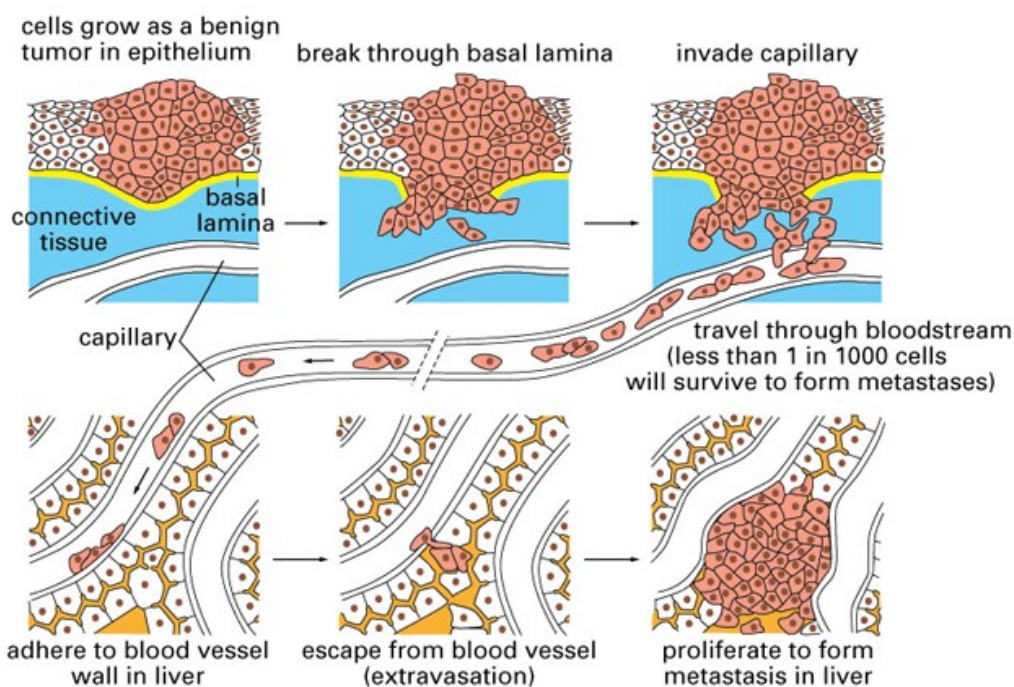
podporuje transkripci. Opačně působí histondeacetylázy (HDAC), které způsobují kondenzaci chromatinu a potlačení transkripce (51).

### **2.2.5.3 Změny mikroRNA**

Součástí epigenetické regulace jsou také mikroRNA. To jsou malé nekódující molekuly RNA o délce 17-24 bází, které nekódují žádný gen. Jejich funkcí je post-transkripční represe protein kódujících genů. Toho dosahují inhibicí translačního mechanismu, nebo destabilizací mRNA. MikroRNA se naváže na úseky mRNA a zabrání její translaci. Ačkoliv jsou regulátory, tak samy podléhají systému regulací, která probíhá jak na úrovni jejich metabolismu, tak realizace jejich vlastní regulační funkce. Poruchy těchto regulací jsou významnou událostí v patogenezi nádorových onemocnění. Při nádorovém onemocnění může docházet k změnám hladin mikroRNA. Je to jak zvýšení hladin, tak i jejich snížení. Z toho můžeme usuzovat, že působí jako onkogeny i tumor-supresorové geny. Funkce mikroRNA je individuální pro každou z nich a zároveň je ovlivněna tkání/tumorem, ve kterém se vyskytuje. Ve vztahu k CRC jako tumor-supresorové geny působí mikroRNA-143 a mikroRNA-145, jejichž hladiny jsou sníženy. Naopak hladina mikroRNA-21 je zvýšena, proto předpokládáme, že působí jako onkogen. Změn těchto hladin můžeme využít pro diagnózu a určení prognózy onemocnění. Dále může mikroRNA sloužit jako cíl pro terapii, kde budeme snižovat hladiny onkogenních mikroRNA a zvyšovat hladiny tumor-supresorových mikroRNA (2,14,17,52,53).

### **2.2.6 Metastázování**

Poslední fází rozšiřování maligního nádoru je metastázování, což je tvorba nových ložisek nádorů, které nejsou přímo spojené s ložiskem primárním (obr. 9). Tkáně jsou mezi sebou odděleny bazálními membránami a intersticiální pojivovou tkání. Při normálním stavu jsou zde exprimovány integriny, díky nimž jsou k sobě vázány epitelové buňky s laminy bazálních membrán a kolageny. Mají na starost celistvost tkáně. Naopak po příslušných změnách v maligních buňkách, dojde k vytvoření a expresi genů degradující proteiny a adhezivní molekuly. Tyto enzymy napomáhají dovršit sérii kroků nutnou pro vytvoření metastáz známou jako metastatická kaskáda (13,14,18).



Obr. 10: Tvorba metastáz (2)

#### 2.2.6.1 *Metastatická kaskáda*

Metastatická kaskáda začíná uvolněním nádorové buňky či shluku buněk od primárního ložiska, což je umožněno mutacemi genu vzájemných buněčných vazeb (kadherinů) a vazeb buněk k extracelulární matrix (integriny). Za normálních okolností by buňka nebyla schopna přežít, avšak mutací dojde k poruše apoptózy a tím i zvýšené proliferaci buněk. Dalším krokem je degradace mezibuněčné hmoty (ECM) a vazba na nové složky ECM, zprostředkované proteolytickými enzymy, jako jsou metaloproteinázy, urokináza aj. Po degradaci ECM se z ní uvolní růstové faktory podporující růst, chemotaxi a neovaskularizaci. Poté dochází k migraci nádorových buněk směrem k cévnímu řečišti.

Pokud nádorové buňky prostoupí do cévního řečiště, jsou následně odklizeny imunitním systémem (NK buňky, monocyty). Ve formě mikroembolů (společně s leukocyty, destičkami, fibrinem) mají větší šanci na přežití, než osamocené. K zachycení buňky v cílové tkáni dojde buď embolizací kapiláry, nebo adhezí na endotelové buňky cév. Nejdříve dojde k slabé adhezi pomocí povrchových uhlovodíků. Silná adheze je zprostředkována adhezivními molekulami (např. ICAM, VCAM, E-selektin) a dále pak integrinovými receptory, které svými působky vyvolají kaskádu následujících dějů, mezi které patří interakce s ECM, proteolýza, pohyb buněk aj.

Vlastní průnik nádorových buněk do tkáně se pak děje třemi mechanismy: 1) paracelulárně mezi spoji endotelových buněk, 2) vytvořením mozaikové chimérické vrstvy obou typů

buněk, anebo 3) transcelulárním průnikem skrz buňky ve velké vakuole. K navázání v nové tkáni využívají adhezivní molekuly (např. hyaluronan). Expresí receptorů pro hyaluronan (jako např. CD44) podporuje vznik metastáz. Další takové molekuly podporující vznik metastáz jsou selektiny a integriny. Po uchycení na novém místě přijdou opět na řadu proteázy degradující ECM. U řady nádorů byla nalezena souvislost mezi množstvím proteáz a agresivitou a invazivitou nádoru (2,54).

### 2.2.7 Účast mucinu na karcinogenezi

Poslední možností, kterou se nádorové buňky mohou vyvinout, a který zde zmíním, je využití mucinu. Mucin je glykoprotein fyziologicky se tvořící na apikální straně buněk v dýchacích, močové a GIT soustavě. Jeho funkcí je chránit epitel proti poškození. Nádorové buňky ho však vylučují po celém povrchu, což vede k jejich usnadněnému uvolňování z nádorové masy, uniknutí pozornosti imunitního systému zakrytím receptorů na povrchu a zlepšení adheze k endotelu díky adhezivním vlastnostem mucinu (2,13,18).

## 2.3 Metastázy v lymfatických uzlinách a prognóza onemocnění

Když nádor dosáhne určité velikosti, získá schopnost vytvářet nová ložiska - metastázy na místech nepřímo spojených s primárním nádorem. Jednou z prvních možností, kam má karcinom možnost metastazovat, jsou mizní cévy a lymfatické uzliny. Přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách je důležitý ukazatel míry rozsahu zasažení těla nádorem. Je to jeden z parametrů určujících *staging* nádoru. Zasažení lymfatických uzlin je také klíčové pro prognózu a budoucí léčbu pacienta. Pro klasifikaci nádorů se používá jednotný klasifikační systém TNM: T (tumor) – rozsah primárního nádoru, N (noduli) – stav mizních uzlin v okolí nádoru, M (metastases) – přítomnost/nepřítomnost metastáz (tab. 1) (2,21).

Tab. 1: Klasifikace TNM (21)

<b>Primary tumour (T)</b>	
<b>TX</b>	<b>Primary tumour cannot be evaluated</b>
<b>T0</b>	<b>No evidence of primary tumour</b>
<b>Tis</b>	<b>Carcinoma in situ (CIS; abnormal cells are present but have not spread to neighboring tissue; although not cancer, CIS may become cancer and is sometimes called preinvasive cancer)</b>
<b>T1, T2, T3, T4</b>	<b>Size and/or extent of the primary tumour</b>
<b>Regional lymph nodes (N)</b>	
<b>NX</b>	<b>Regional lymph nodes cannot be evaluated</b>
<b>N0</b>	<b>No regional lymph node involvement</b>
<b>N1, N2, N3</b>	<b>Involvement of regional lymph nodes (number of lymph nodes and/or extent of spread)</b>
<b>Distant metastasis (M)</b>	
<b>MX</b>	<b>Distant metastasis cannot be evaluated</b>
<b>M0</b>	<b>No distant metastasis</b>
<b>M1</b>	<b>Distant metastasis is present</b>

Pokud má pacient pouze primární ložisko a rakovina se ještě nerozšířila, jsou vyhlídky dobré a nádor se může odstranit chirurgickým zákrokem. S rozšířením do lymfatických uzlin toto řešení přestává stačit a je nutné pak přistoupit k chemoterapii. Důležité je určit míru zasažení lymfatického systému. Zde je také riziko falešně negativního výsledku, kdy již mohou v těle existovat mikrometastázy, které nejsou zjistitelné. V případě, že primární ložisko dosáhne velikosti, při které je schopno tvořit metastázy, předpokládáme již zasažení i dalších míst a podle toho pak přistupujeme k léčbě (22,23).

Pacienti s kolorektálním karcinomem s nezasaženým lymfatickým systémem mají míru přežití kolem 70-80 % (23). Navíc podle výsledků některých studií zde nalézáme komplikaci, že se nádor nešíří postupně po lymfatickém řečišti od nejbližších uzlin ke vzdáleným, jako je tomu typicky i u jiných typů nádorů, ale může dokonce „přeskočit“ a rovnou tvořit metastázy ve vzdálených uzlinách. K tomuto jevu došlo ve studii Fujiiho a kol. (2011) u 9 ze 46 pacientů, což není zanedbatelný počet (20). Všechny tyto faktory samozřejmě komplikují správnou diagnostiku a nasazení odpovídající léčby.

Proto je někdy i přes provedení biopsie a určení *stagingu* obtížné určit míru zasažení lymfatických uzlin a to kolik jich bude třeba odstranit. Míra přežití u pacientů s postiženými lymfatickými uzlinami je jen 22-66 %. S rostoucím zasažením lymfatického systému se snižuje šance na přežití (21). Při pouhém chirurgickém řešení kolorektálního-peritoneálního karcinomu byly šance na přežití u pacientů se zasaženými i nepostiženými uzlinami přibližně stejné oproti situaci, kdy byli pacienti dále léčeni pomocí CRS (cytoreduktive surgery) či PIC (perioperative intraperitoneal chemotherapy). V těchto případech se již doba přežití v závislosti na zasažení mízních uzlin lišila (19).

## 2.4 Příznaky, diagnostika a léčba CRC

### 2.4.1 Příznaky CRC

Jako u spousty jiných onemocnění tkví nebezpečí CRC v tom, že jeho příznaky jsou nespecifické a překrývají se s příznaky méně závažných onemocnění. Někdy CRC dokonce až do pozdních stádií může probíhat bez příznaků. Je třeba si všimnout každé dlouhotrvající změny střevní činnosti, která se může projevit zácpou, průjmem, pocitem nedokonalého vyprazdňování, nebo obtížným vyprazdňováním. Varovným signálem je krev ve stolici a to jak červená, tak tmavá. Dlouhodobé ztráty krve mohou vést k anemizaci pacienta, která se projevuje únavou, dušností a slabostí. Dalšími příznaky mohou být bolest břicha, plynatost,

horší odchod plynů či pocit plnosti. Pokud nádor svým růstem způsobí střevní neprůchodnost, projevuje se to křečovitými bolestmi, zácpou, slabostí, někdy zvracením. Jak je vidět, jedná se o příznaky, které mohou způsobovat i jiná nenádorová onemocnění jako např. hemeroidy, infekční a zánětlivá onemocnění. Proto je důležitý screeningový program pro včasné odhalení, obzvláště u rizikových pacientů (31).

## **2.4.2 Diagnostika CRC**

### **2.4.2.1 Test na okultní krvácení do stolice (TOKS)**

TOKS patří v ČR mezi běžné screeningové vyšetření. Test prokáže i drobné okem nezjistitelné množství krve ve stolici a měl by být prováděn od 50 let věku ve dvouletých intervalech. Pozitivní nález neznamená diagnózu CRC, je jím prokázána krev ve stolici. Pak je pacient odeslán na další vyšetření, obvykle kolonoskopii. TOKS zachytí existující nádor pouze u 17 % případů, proto by měl být důraz kladen na kolonoskopii, jakkoliv je pro pacienty nepříjemná. Zde je míra záchytu podstatně větší (34).

### **2.4.2.2 Kolonoskopie**

Toto vyšetření má v dnešní době nejdůležitější postavení v diagnostice. Neměli bychom uvažovat, zda ho provést, ale kdy a za jak dlouho opakovat. Při tomto vyšetření je prohlédnuta celá délka tlustého střeva a je možné odebrat vzorky k biopsii. I zde existuje riziko přehlednutí, které se zvyšuje se špatnou přípravou střeva pacienta. Ukazuje se, že nejkratší čas nutný pro správné vyšetření je 6 minut.

Další z endoskopických metod, která se používá jako kontrolní vyšetření, je sigmoideoskopie. Ta je blízka kolonoskopii a vyšetřujeme se při ní pouze poslední část tlustého střeva (32,33).

### **2.4.2.3 Kontrastní iridografie**

Vyšetření se provádí, pokud je endoskopické vyšetření neproveditelné. Provádí se jako dvojkontrastní vyšetření pomocí suspenze kontrastní látky (např. barya) a vzduchu. Jako zobrazovací metodu lze použít rentgen či CT (32).

### **2.4.2.4 Ostatní vyšetření**

Mezi ostatní méně častá vyšetření patří endosonografie rektu, krevní obraz na chudokrevnost a metody používané již při diagnóze CRC. Pro zjištění metastáz v plicích se používá RTG. Dalším vyšetřením je pozitivní emisní tomografie, při ní je radioaktivně označená glukóza podaná do žíly. Ta je pak vychytávána nádorem, který je zachycen pomocí kamery. Metoda je



výhodná ke zjištění případných metastáz. U pacientů s již prokázaným nádorem se v přítomnosti nádoru mohou zvyšovat hladiny nádorových markerů. Markery, jejichž hladiny bývají zvýšené při CRC, jsou např. karcinoembryonální antigen (CEA), tkáňový polypeptidový/specifický antigen (TPA/S) a CA 19-9. Jejich pokles ukazuje úspěšnost léčby, naopak vzestup může být prvním znamením relapsu. Normální hodnota však nevylučuje nádor, některé nádory tyto markery neprodukuje a zároveň pozitivní test mohou způsobit i jiná nenádorová onemocnění (31).

### **2.4.3 Léčba CRC**

#### **2.4.3.1 Chirurgická léčba**

Operativní řešení CRC můžeme považovat za základní léčebnou metodu. Zvolení správné chirurgické metody a rozsah vyjmutých tkání závisí na pokročilosti onemocnění. Pro budoucí prognózu je velice důležité správně určit míru zasažení střeva, lymfatických uzlin a vzdálených metastáz. Důležité je také histopatologické hodnocení. Po získání dostatku informací se rozhodne o použité metodě. Cílem chirurgické léčby je R0-resektce, což znamená kompletní odstranění zhoubně postižené tkáně střeva spolu se spádovou lymfatickou oblastí a sousedících orgánů, pokud jsou zasaženy. Dále je snaha, aby byl výkon definitivní a nebyla nutná reoperace (35).

Lokální resektce patří mezi nejméně invazivní metody. Používají se u pacientů s málo rozvinutými nádory, nebo v případech kdy stav nedovoluje standardní radikální resekci. Metoda je dobře použitelná u nádorů menších než 3-4 cm, v průměru zaujímající méně než polovinu obvodu rekta, spadající do T2 klasifikace a patřící mezi dobře diferenciované tumory. Podle histopatologických vlastností nádoru a podle (ne)přítomnosti mikrometastáz ve spádových lymfatických uzlinách se rozhoduje o adjuvantní chemoterapii či radioterapii. Slibná metoda je transanální endoskopická mikrochirurgie (TEM), která je vhodná ale pouze při lokalizaci tumoru do 15 cm od řitního otvoru.

Další z méně invazivních metod jsou laparoskopické resektce. U správného provedení je míra přežití stejná jako u zákroků laparotomických. Těto metody se využívá hlavně k odstranění polypů tračníku (35,36).

Větší nádory se řeší radikální resekci, což znamená, že je odstraněn nádor s dostatečným množstvím zdravé tkáně okolo, včetně přilehlých lymfatických uzlin. Podle umístění nádoru

se pak bavíme o pravostranné nebo levostranné hemikolektomii, resekci tračnicku, nízké přední resekci a dalších typech (37).

Lokálně pokročilé formy CRC (infiltrované již do okolních tkání) se vyskytují asi v 10 % případů. Srůsty k okolním tkáním je vždy nutné považovat za maligní. Pokud je to možné, je provedeno odstranění všech postižených tkání s dostatečně velkým lemlem zdravé tkáně. Po takto provedené resekci mají pacienti stejnou šanci na přežití jako lidé s lokálně nepokročilým nádorem (36,37).

Někdy není odstranění nádoru možné a provede se zákrok paliativní, který nemoc sice nevyлéčí, ale může prodloužit život či zlepšit jeho kvalitu.

Další součástí chirurgických zákroků je léčba metastatického a rekurentního CRC. K recidivě onemocnění po kurativní chirurgické léčbě dojde až u 50 % pacientů. Může jít o lokální recidivu, vzdálené metastázy či kombinaci obojího. Samotná lokální recidiva se vyskytuje jen málo a může ukazovat na nedostatečně provedený primární výkon. Metastázy se vyskytují nejčastěji v oblasti jater (50 %), plic (20 %), kostí (5 %), mozku (5 %) a vaječnicků (2-8 %). U 90 % pacientů s jaterními či plicními metastázami není možné chirurgické odstranění, kvůli pokročilosti onemocnění či existujícím komorbiditám. U zbývajících 10 % je úspěšnost léčby zhruba 30 %.

U pacientů, kde není chirurgická léčba dostatečná či možná, nasazujeme další metody, jako je chemoterapie, cílena biologická léčba či radioterapie (35,36).

#### **2.4.3.2 Chemoterapie a používaná léčiva**

Léčiva používaná při terapii zhoubných nádorů se nazývají cytostatika či antineoplastika. Cíle terapie těmito léčivy mohou být adjuvantní (neoadjuvantní) nebo paliativní. Z hlediska terapie je vhodné podávat co nejvyšší tolerované dávky a vhodné jsou i kombinace látek, kvůli předcházení vzniku rezistence. Léčbu je třeba aplikovat opakovaně v cyklech, protože jeden cyklus nezabije celou populaci zhoubných buněk. Léčiva jsou podávána většinou ve formě infuzí, méně často ve formě tablet.

#### **5-Fluorouracil**

5-Fluorouracil patří do skupiny antimetabolitů, jedná se o analog pyrimidinu. Jeho mechanismus účinku spočívá v blokaci tymidylátsyntázy, která se podílí na syntéze tymidinu, tj. součást DNA. Ve výsledku je tedy blokována syntéza DNA. Je nejčastěji používaným

cytostatikem v léčbě CRC. Nejběžnější nežádoucí účinky 5-fluorouracilu jsou agranulocytóza, leukopenie, trombocytopenie, stomatitida, ezofagitida, průjem, nauzea, nechut' k jídlu a přechodná ztráta vlasů – trvá po dobu užívání 5-fluorouracilu.

### **Irinotekan**

Irinotekan je semisyntetický derivát, jeho předlohou látkou alkaloid kamptotecin byla izolována z rostliny *Camptotheca acuminata* (Cornaceae). Irinotekan se váže na DNA topoisomerázu I, poškozuje její funkci a brání tím replikaci DNA. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří neutropenie, trombocytopenie, nauzea, zvracení, průjem a přechodná ztráta vlasů.

### **Kapecitabin**

Jedná se o proléčivo 5-fluorouracilu, proto patří do stejné skupiny. Má ovšem lepší distribuci do nádorových buněk. Jeho nežádoucí účinky odpovídají nežádoucím účinkům 5-fluorouracilu.

### **Oxaliplatin**

Oxaliplatin se váže na DNA a tvoří mezi jejími řetězci můstky, případně tvoří vazbu DNA-protein. Jelikož jsou tyto vazby silné a DNA je pak nefunkční, dochází k odumření buňky. Nejčastější nežádoucí účinky jsou anemie, trombocytopenie, neutropenie, bakteriální či virové infekce, alergická reakce, periferní neuropatie, nauzea, průjem a zvracení.

### **Raltitrexed**

Raltitrexed je lék ze skupiny antimetabolitů, jedná se o analog kyseliny listové. Blokuje dihydrofolátreduktázu, syntézu purinu a tymidylátu, což jsou důležité stavební jednotky DNA. Mezi nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky patří neutropenie, anemie, anorexie, nauzea, průjem a zvracení (34,38,39).

#### **2.4.3.3 Biologická léčba**

Biologická léčba je zaměřena na odlišnosti mezi nádorovými a zdravými buňkami. Na rozdíl od většiny cytostatik nepoškozuje DNA, ale ovlivňuje signální a regulační kaskády. Tyto látky jsou používány v kombinaci s cytostatiky a jsou indikovány u pacientů s metastatickým CRC.

### **Bevacizumab**

Bevacizumab patří mezi rekombinantní humanizované monoklonální protilátky. Působí proti vaskulárnímu růstovému faktoru (VEGF), kterému zabraňuje v interakci s jeho receptory

(VEGFR1 a VEGFR2). Tato cesta se podílí na angiogenezi v nádoru. Inhibuje růst metastáz i primárního nádoru. Může negativně ovlivňovat hojení, proto se nepodává 4 týdny před nebo po chirurgickém zákroku.

### **Cetuximab**

Cetuximab je chimérická monoklonální protilátka proti EGFR. Blokuje jeho funkci a tím inhibuje buněčnou proliferaci a apoptózu. Může se vyskytnout až anafylaxe, proto je před jeho nasazením nutná premedikace kortikoidy a antihistaminiky.

### **Panitumumab**

Panitumumab je plně humánní protilátka působící také proti EGFR. Indikuje se pouze u případů, kdy není přítomná mutovaná forma genu *ras* (*wild type RAS*). Nejčastější nežádoucí účinek je opět alergická reakce.

### **Regorafenib**

Regorafenib je perorální inhibitor VEGFR (receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru) ovlivňující angiogenezi. Dále působí na FGFR (receptor pro fibroblastový růstový), který se účastní proliferace, diferenciaci a migrace nádorových buněk. Posledním místem účinku je receptor pro destičkový růstový faktor (PDGFR $\beta$ ). Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří únava, hypertenze, zhoršené hojení ran a průjem.

### **Aflibercept**

Aflibercept je rekombinantní fúzní protein, tvořený extracelulárními doménami lidských VEGF receptorů 1 a 2 připojených k lidskému IgG1. Váže cirkulující VEGF a PlGF (placentární růstový faktor). Mechanismus účinku stejně jako nežádoucí účinky jsou obdobné bevacizumabu (34,40,41).

#### **2.4.3.4 Radioterapie**

Radioterapie je používána především v lokální léčbě nádorů konečníku. Používá se neoadjuvantně s cílem zmenšit nádor před operací nebo adjuvantně ke zničení možných reziduí nádorových buněk. Často je kombinována s chemoterapií. Nejčastější nežádoucí účinky jsou slabost, průjem, nevolnost a podráždění močového měchýře (34).

## 2.5 Buněčné kultury

Buněčné kultury dnes neodmyslitelně patří k základnímu i aplikovanému výzkumu a mají celou řadu využití. Při výzkumu slouží jako zdroj materiálu, využívá se jich ale i např. pro syntézu bílkovinných molekul a peptidů. První pokusy o izolaci a dlouhodobé udržení buněk či tkání *in vitro* se datují na počátek 20. století. První, který položil základy pro možnost studia živých tkání, buněk a jejich podjednotek *in vitro*, byl Alexis Carrel. Pomocí pěstování buněk *in vitro* můžeme detailně sledovat jejich růst, metabolismus, funkce jednotlivých komponent a mnoho dalšího. Výhody buněčných kmenů a linií spočívají v pozorování a pokusech na definovaných buňkách, při nichž dostaneme odpověď této definované linie bez vlivu okolních buněk a tkání. Mezi nevýhody patří například to, že výsledky budou specifické pouze pro tuto buněčnou linii a nemusí tak platit obecně pro ostatní buňky daného typu. Další může být rozdíl mezi chováním v těle, kdy proces bude ovlivňovat celá řada dalších činitelů, v porovnání se situací *in vitro*, kde ovlivňujeme selektovanou buněčnou linii jasně definovanými podmínkami (24).

### 2.5.1 Typy buněčných kultur

Při odebrání vzorku buněk pro kultivaci většinou získáme směs buněk a před kultivací musíme selektovat námi požadované. Toho se dosahuje různými postupy: 1) využitím různé rychlosti adherence daných buněk na kultivační medium; 2) použitím selekčních medií, která zabrání růstu kontaminujících buněk; 3) izopyknickou sedimentací, která využívá různých hmotností daných buněčných typů, za použití spojitých i nespojitých gradientů.

Bavíme-li se o živočišných buněčných kulturách, musíme je rozdělit a definovat podle jejich vlastností a životnosti. První skupinou jsou primární kultury, které získáme izolací ze tkání. Tyto primární kultury mají pouze krátkou životnost a to jen několik dní a v budoucnu z nich přežijí jen ty klony, které se lépe přizpůsobí kultivačním podmínkám. Buňky mohou pocházet z normální či nádorové tkáně. Obecně platí, že nádorové buňky se kultivují snáze, než buňky normální. U kultur normálních buněk také dochází k tzv. zestárnutí kultury – buňky změni své vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky tento problém většinou nemívají. Pokud k zestárnutí kultury nedojde a buněčnou linii je možné pěstovat neomezeně, jedná se o kontinuální či imortalizované kultury. Mohou vzniknout spontánní transformací buněčné kultury či transformací chemickou, nebo virovou. Rozdílně se také chovají kultury z buněk dospělého jedince a z embrya. Embryonální kultury se snáze pěstují a mají delší životnost.

Poté co se primární kultura namnoží, nařadí se a přenesse se do nových kultivačních nádob. Tomuto postupu se říká pasáž a vznikají tak sekundární kultury. Pasáže pak můžeme provádět opakovaně, dokud nemáme potřebné množství materiálu pro pokus (25,26).

### 2.5.2 Fáze růstu buněčné populace

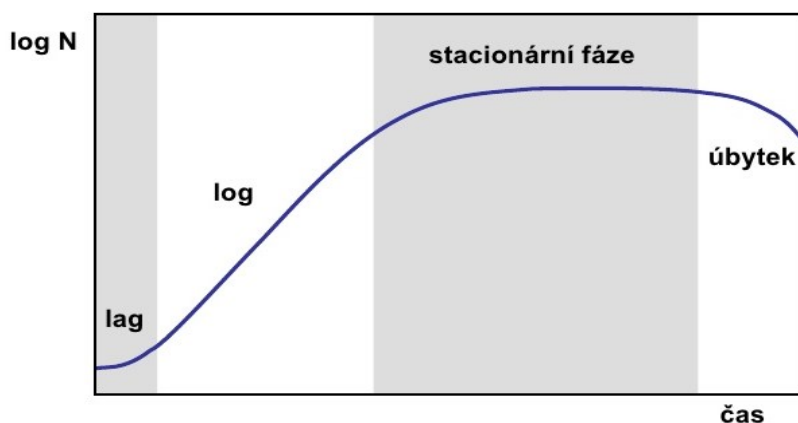
Růst buněk při kultivaci lze popsat podle růstové křivky (obr. 10). Ta se skládá ze čtyř fází: lag fáze, log fáze, stacionární fáze a fáze úbytku buněk.

Lag fáze je počáteční fáze, kdy se počet buněk nejprve mírně sníží v důsledku přizpůsobování buněk kultivačním podmínkám. Buňky se připravují k buněčnému dělení a poté začne jejich počet rychle vzrůstat.

V log fázi počet buněk exponenciálně roste a buňky využívají pro metabolismus všechny dostupné zdroje. Najdeme zde nejvíce buněk v mitóze, log fáze růstové křivky se proto využívá pro chromozomové vyšetření.

Následuje stacionární fáze, která je typická zpomalováním až zastavením růstu buněčné populace. Začíná se projevovat vyčerpání živin, hromadění metabolitů nebo inhibiční mechanismy, jako je např. produkce růstových inhibitorů, nebo kontaktní inhibice.

Pokud se buňky v kultuře včas nenařadí, následuje fáze odumírání buněk. Udržení kultury v tomto případě již není možné a dochází k postupnému odumírání buněk v důsledku vyčerpání živin, hromadění metabolitů/toxických látek a snížení pH (kvůli hromadění  $\text{CO}_2$  a jiných kyselinotvorných látek). Pokud nedojde k přenesení do nového média, buněčná kultura odumře.



Obr. 11: Růstová křivka buněčné kultury (30)

Naším cílem je však množení a dobrý stav buněk, proto by k fázi odumírání buněk nemělo dojít. Ve chvíli, kdy se logaritmičká fáze blíží ke svému konci, dojde k pasážování, tedy

vytvoření tzv. subkultur. Během tohoto procesu se buňky oddělí od kultivačního povrchu a sebe navzájem. Disociace buněk probíhá pomocí proteáz (nejčastěji trypsinu) a odstranění dvojmocných iontů z média. Jiné postupy (např. mechanická disociace) se používají mnohem méně. Dále se naředí a přenesou do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem (25,26).

### 2.5.3 Získávání primárních kultur

Prvním krokem je vždy získání vzorku od pacienta. Důležité je určit správně histopatologické hodnocení. Poté je vzorek transportován ve sterilním pufru s antibiotiky do laboratoře k dalšímu zpracování. Pro získání primokultur se používá několik metod, které mají své výhody a nevýhody.

První metodou je mechanická disociace tkáně. Vzorek je nejdříve rozřezán na malé kousky pomocí nůžek či skalpelu. Poté se kousky tkáně rozmělní přes sítko. Takto zpracovaná tkáň se pomocí centrifugace zbaví nežádoucí tkáně (např. vaziva) a po přidání čerstvého média se vytvoří suspenze vhodná ke kultivaci. Tato metoda vystavuje buňky vysokému mechanickému namáhání a často vede ke smrti buněk.

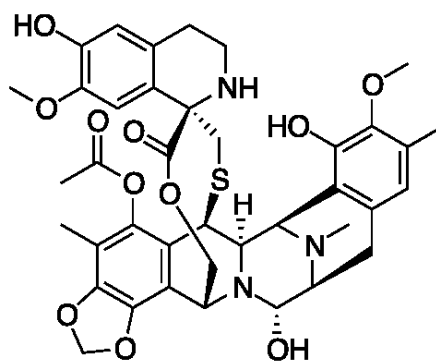
Druhou možností je rozrušení mezibuněčných vazeb pomocí chelatačních činidel, jako jsou etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) nebo etylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA). Místo nich lze také použít enzymy, jako např. trypsin, hyaluronidázu, kolagenázu či elastázu. Tato technika se může kombinovat s mechanickou disociací pro získání co nejlepšího výtěžku.

Třetí možností je využití magnetických nanočástic, které jsou potaženy protilátkami specifickými k různým adhezním molekulám. Tato metoda umožňuje selektivní odebrání buněčných populací s požadovanými vlastnostmi.

Poslední metodou je kultivace malých kousků tkáně v mediu obohaceném o fetální bovinní sérum. Při použití větších kousků však nastává riziko, že uvnitř tkáně nebudou mít buňky dostatek živin a kyslíku, čímž dojde k jejich nekróze. Další nevýhodou je, že kousky tkáně nelze dlouhodobě kultivovat. Naopak výhodou této metody je zachování architektury původní tkáně a mezibuněčné komunikace (27).

## 2.6 Yondelis (trabektedin)

Trabektedin (Obr. 11) je alkaloid tvořený třemi tetraisochinolinovými jednotkami. Byl objevený v mořských pláštěncích *Ecteinascidia turbinata*. Patří do skupiny cytostatik tvořících komplexy s DNA. Svými dvěma tetraisochinolinovými jednotkami se váže na malý zářez DNA. Váže se kovalentní vazbou na N2 aminoskupinu guaninu a dále se pak na místě stabilizuje vodíkovými vazbami na blízké nukleotidy stejného či protilehlého řetězce. Třetí tetraisochinolinový kruh se neúčastní těchto vazeb a vyčnívá z DNA, kde může vázat transkripční faktory či proteiny opravující DNA. To následně způsobí blokádu transkripce, poruchy v reparačních mechanismech DNA a ovlivní i jaderné proteiny (43).



Obr. 12: Molekula trabektedinu (45)

### 2.6.1 Farmakokinetika

Jelikož je podáván v intravenózní infuzi, odpadá fáze absorpce. U člověka vykazuje trabektedin velký zdánlivý distribuční objem (více než 5000 l), což odpovídá jeho vysokým vazbám na plazmatické a tkáňové proteiny (94-98 %). Biotransformace probíhá pomocí cytochromu P450 (CYP), hlavně isoformou CYP3A4. K metabolismu mohou přispívat i ostatní CYP. Trabektedin není inhibitorem ani induktorem CYP. Co se týče eliminačních parametrů, eliminační poločas je 180 hodin a clearance 35l/hod. Vylučování metabolitů probíhá především stolicí, méně močí. Eliminace trabektedinu v nezměněné podobě močí je nízká (< 1 %) (42,44).

### 2.6.2 Použití

Trabektedin se používá u dospělých pacientů trpících sarkomem měkkých tkání, pokud je léčba antracykliny a ifosfamidem neúčinná. Další indikace jsou karcinom prsu, nemalobuněčný karcinom plic, nádory vaječníků a melanom. Při citlivosti na platinu je v kombinaci s pegylovaným liposomálním doxorubicinem používán u relabujících ovariálních karcinomů (44).

### 2.6.3 Nežádoucí účinky

U trabektedinu lze, jako u všech cytostatik, očekávat výskyt nežádoucích účinků a to téměř ve všech případech. Riziko je vyšší při použití kombinace, než při podání samotného trabektedinu. Mezi nejčastější nežádoucí účinky můžeme zařadit nevolnost, únavu, zvracení, zácpu, sníženou chuť k jídlu, průjem, bolesti hlavy, dušnost, bolesti svalů, kloubů a další už



méně časté. Kvůli vlivu na kostní dřen a játra se také vyskytují změněné laboratorní hodnoty u aminotransferas (zvýšení poměru ALT/AST), dále může nastat anémie, neutropenie, trombocytopenie, hypoalbuminémie, nebo leukopenie (42).

#### **2.6.4 Fertilita, těhotenství a kojení**

Neexistuje dostatek klinických údajů o podávání v těhotenství, avšak na základě známého mechanismu účinku lze usuzovat na možné vrozené vady, pokud by byl v těhotenství podáván. Při testech na březích potkanek trabektedin prošel placentou, není tedy doporučeno podávat ho v těhotenství. Použití u žen ve fertilním věku je možné, ale je třeba dbát na to, aby po dobu léčby a 3 měsíce po ní užívaly účinnou antikoncepci. Přestup do mateřského mléka není znám. Kojení je během léčby a tři měsíce po ní kontraindikováno. Trabektedin může mít genotoxické účinky a vést k ireverzibilní neplodnosti, proto se doporučuje zvážit odběr spermatu a vajíček, pokud by pacienti po léčbě chtěli mít děti (44).

#### **2.6.5 Ostatní**

Mezi kontraindikace patří přecitlivost na trabektedin či jinou látku obsaženou v přípravku Yondelis, dále závažná nebo nekontrolovaná infekce. Zvláštní opatření platí také pro pacienty s poškozenou funkcí jater, ledvin, neutropenií či trombocytopenií, rhabdomyolýzou či zvýšenou kreatinínázou.

Souběžné podávání trabektedinu s induktory či inhibitory CYP 3A4 se nedoporučuje kvůli změně jeho koncentrace v důsledku metabolismu touto isoformou enzymu. Dále nesmí být během léčby užíván alkohol z důvodu hepatotoxicity (44).

### 3 Cíle práce

Náplní mé diplomové práce bylo zjistit vliv trabektedinu na procesy, jako jsou migrace a proliferace nádorových buněk, a jeho schopnost tyto procesy inhibovat. Pro porovnání byly použity nádorové buněčné linie kolorektálního karcinomu SW 480 (z primárního ložiska CRC), SW 620 (z metastázy lymfatické uzliny) a primární buněčné kultury 36B a 39B odebrané z ložisek nádoru tlustého střeva pacientů ve FN HK.

Dílčí cíle vytčené k dosažení výsledků:

- Zjistit vliv trabektedinu na životaschopnost nádorových buněčných linií i primárních buněčných kultur a vypočítat hodnoty střední inhibiční koncentrace  $IC_{50}$
- Sledovat schopnost migrace primárních buněčných kultur 36B a 39B a porovnat ji s migrací těchto kultur ovlivněných trabektedinem
- Zjistit vliv trabektedinu na expresi molekul účastnících se migrace a adheze na úrovni mRNA pomocí RT-PCR
- Zjistit vliv trabektedinu na expresi molekul účastnících se migrace a adheze na úrovni proteinu pomocí imunoblotingu

## 4 Metodika

### 4.1 Chemikálie

- Akrylamid (BIO-RAD)
- APS (persíran amonný) (BIO-RAD)
- Bis-Akrylamid (BIO-RAD)
- Blokovací mléko (BIO-RAD)
- Bovinní sérový albumin 96% (BSA – Sigma Aldrich)
- D-PBS (PAN Biotech)
- DEPC voda (Invitrogen)
- Destilovaná voda
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma Aldrich) TRIZOL reagent
- Dodecylsulfát sodný (SDS – Sigma Aldrich)
- EGF (epidermální růstový faktor) (Sigma Aldrich)
- Etanol (Dr. Kulich Pharma)
- FBS (fetální bovinní sérum) (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- Glycin (Sigma Aldrich)
- Chloroform (SERVA)
- Isobutanol (PENTA)
- Isopropanol (100% bez RNA) (SERVA)
- Kit pro přípravu cDNA (Thermo Scientific):
  - Směs náhodných hexamerů, primer, 5x reakční pufr, 10 mM dNTP mix
  - RiboLock RNase inhibitor
  - M-MULV Reverzní Transkriptáza
- Kit pro stanovení bílkoviny metodou BCA (kyselina bicinchoninová) (Sigma Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (Penta)
- Master mix (Roche): SYBR®GREEN, Forward a Reverse primery (10 mM), DEPC voda
- Metanol (Dr. Kulich Pharma)
- Paraformaldehyd (BIO-RAD)
- Primární protilátky (Cell signaling technologies)
- Sekundární protilátky (DAKO)
- TRISMA-Base (Sigma Aldrich)
- Tween 20 (Sigma Aldrich)

## 4.2 Přístroje a pomůcky

### 4.2.1 Přístroje

- Buněčný inkubátor (Sanyo, MCO-18AIC (UV))
- Cellometer AutoT4 (Nexcelom Bioscience)
- Centrifuga (Jouan MR23; Eppendorf 5415R)
- Epifluorescenční mikroskop (Nikon Eclipse E400)
- Laminární box (Thermo Scientific, MSC Advantage)
- Laminární box na PCR (Captair Bio, Erlab)
- Magnetická míchačka (IKA, RCT Basic)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- PCR cyklér (Corbett Research PCR Rotogene 6000)
- Spektrofotometr (Tecan Infinite M200 PRO)
- Termoblok (Major Science)
- Třepačka (IKA, M+S 2/4 Digital)
- Třepačka vortex (IKA MS2)
- X-celligence (RTCA DP, Roche)
- Zdroj stejnosměrného napětí (BIO-RAD)
- Zobrazovací systém pro gely a bloty (Gel Logic 2200 PRO, Carestream)

### 4.2.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní vybavení
- Injekční stříkačky, jehly (Braun)
- Migrační komůrky (Roche)
- Mikrozkuhavky (Thermo Scientific)
- Nástavce pro kultivaci a barvení buněk na podložních sklíčkách
- Pipetovací nástavce
- Pipety a špičky různého objemu (Finnpipete; Eppendorf)
- Plastové nádobky s víčkem (TPP)
- Podložní a krycí sklíčka
- Pomůcky na přípravu gelu a provedení elektroforézy – nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, stojany, hřeben, filtrační papír, blotovací houbičky, vanička (BIO-RAD)
- PVDF membrána (polyvinyliden difluoridová membrána – GE Healthcare)
- Sterilní pipety (TPP)
- Škrabky (TPP)
- 96ti-jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem (NUNC, Thermo Scientific)

### 4.3 Buněčné linie

Přípravu (kultivace, pasážování) těchto buněčných linií na experimenty zajišťovali paní laborantky v Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

#### 4.3.1 SW 480

Buněčná linie SW 480 pochází od mužského pacienta. Jedná se o primární adenokarcinom tlustého střeva. Z morfologického hlediska jsou to tedy buňky epiteliální. Tato buněčná linie nese mutaci v kodonu 12 RAS protoonkogenu. Mohou se použít jako pozitivní kontrola pro mutaci tohoto kodonu při PCR (55).

#### 4.3.2 SW 620

Buněčná linie SW 620 byla izolována od stejného pacienta jako linie SW 480. Pochází z metastáz v lymfatických uzlinách. Primární ložisko byl kolorektální adenokarcinom. Jedná se opět o buňky epiteliální. Obě tyto linie vykazují zvýšené hladiny některých onkogenů, např. K-RAS, N-RAS a c-myc (56).

#### 4.3.3 Linie 36B a 39B

Tyto vzorky pocházejí od pacientů, kteří podstoupili chirurgický zákrok na odstranění kolorektálního karcinomu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Oba vzorky byly použity ke kultivaci buněčných linií pocházejících z primárního nádoru rakoviny tlustého střeva.

### 4.4 Test cytotoxicity

Testování proběhlo pomocí kolorimetrického testu, který je založený na štěpení tetrazoliové soli WST na barevný formazan mitochondriálními dehydrogenázami v životaschopných buňkách. Podle míry aktivity těchto enzymů kvantifikujeme proliferaci či životaschopnost v testovaných buňkách. V jamkách mikrotitračních destiček byly buňky o koncentraci 50 000 b./ml ovlivněny různými koncentracemi léčiva a měřeny po určitých časových úsecích. Absorbance byla měřena na přístroji Tecan Infinite M200 při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 650 nm. V našem případě jsme měřili životaschopnost buněk při koncentraci trabektedinu 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$  v časových intervalech 24; 48 a 72 hodin.

### 4.5 X-celligence – stanovení migrace buněk

#### Princip

Tento přístroj nám pomáhá sledovat míru buněčné proliferace, migrace, invazivity a adheze a vliv chemotaxe a cytotoxicity na ně v reálném čase. Vlastní měření spočívá ve změnách

impedance. Přístroj pracuje na principu Boydenovy komůrky. Jamky v destičce se skládají ze dvou komůrek oddělených mikroporézní PET membránou. Horní komůrka obsahuje sledované buňky a živné médium. Spodní pak médium a chemoatraktant. Při průchodu buněk membránou se mění impedance v závislosti na množství migrujících buněk (61).

## **Postup**

Do horní komůrky jsme přidali 130  $\mu$ l předeřátého bezsérového média s přidaným 1% BSA. Spodní komůrku jsme naplnili předeřátým médiem s 10% FBS a trabektedinem v koncentraci odpovídající  $IC_{50}$ . Následně jsme komůrky spojili dohromady a z horní odebrali 100  $\mu$ l media. Destičku jsme vložili na 1 hodinu do inkubátoru s nastavenou teplotou 37°C, aby se ustálila rovnováha na membráně. Poté jsme změřili pozadí.

Do horní komůrky jsme přidali 100  $\mu$ l buněčné suspenze s koncentrací 30 000 buněk/jamka. Poté byla destička s buňkami umístěna zpět do inkubátoru. Tam byla ponechána 30 min, aby mohly buňky dosednout na membránu. Migrace byla pak měřena při teplotě 37°C v 5-10 minutových intervalech po dobu 24 hodin.

## **4.6 Stanovení exprese mRNA pomocí Real-Time PCR**

### **Princip**

RT-PCR je metodou odvozenou od klasické polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR slouží k zmožnění (amplifikaci) molekul DNA. Řetězec DNA se pomocí vysokých teplot (92-96°C) denaturuje a vzniknou dvě samostatná vlákna. Po snížení teploty (57°C) se na řetězce DNA nejprve musí navázat primer, což je krátký, 20-25 nukleotidů dlouhý řetězec DNA komplementární k vybranému úseku DNA. Při následovném zvýšení teploty (72°C) provádí termostabilní DNA polymeráza syntézu nových DNA řetězců. Poté se vlákna opět denaturují a celý cyklus se opakuje. Při každém cyklu dojde k zdvojnásobení množství DNA. V RT-PCR navíc dochází ke kvantifikaci vzniklého produktu v průběhu reakce – odtud RT („*real time*“). Při detekci produktů je využíváno fluorescenčních molekul. Míra fluorescence je přímo úměrná množství vzniklé DNA. Pro detekci bylo v této práci použito fluorescenční barvivo SYBR®GREEN (57,58).

### **Příprava vzorků na RNA extrakci**

Z jamek s nainkubovanými buňkami bylo odsáto médium. Přidáním 2 ml ledového PBS a kývavým pohybem byly buňky opláchnuty. Poté bylo odsáto i PBS. Dalším krokem bylo přidání 0,5 ml TRIreagentu, což je přípravek pro simultánní izolaci DNA, RNA a proteinů. Po

1-2 minutách byly misky seškrabány a buňky přeneseny do sterilních 2 ml Eppendorf zkumavek, které byly postavené na ledu.

Následovalo přidání 200 $\mu$ l chloroformu a promíchání zkumavek otáčením po dobu asi 60 sekund. Buňky se pak inkubovaly při laboratorní teplotě po dobu 3 minut. Poté jsme zkumavky zcentrifugovali v předchlazené centrifuze po dobu 10 min při 13000 rpm a 4°C. Po skončení jsme odebrali 500  $\mu$ l vodné fáze do nových 2 ml Eppendorf zkumavek. Po přidání 500  $\mu$ l isopropanolu (100% bez RNA) k vodné fázi se směs promíchala otáčením nahoru a dolů. Zkumavky se pak nechaly inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 10 minut poté se zcentrifugovaly 10 minut při 13000 rpm a 4°C a odebral se všechen isopropanol.

Dalším krokem bylo přidání 1 ml 75% ledového etanolu v DEPC vodě. Obsah zkumavek byl poté důkladně promíchán. Následovalo zcentrifugování zkumavek po dobu 5 min při 13000 rpm a 4°C. Po ukončení byl odebrán etanol a zbytek pelety se nechal vysušit na vzduchu. Peleta se rozpustila v 50  $\mu$ l DEPC vody a roztok byl zahříván 10 min na 55 °C. Poté byl vzorek krátce zcentrifugován (5s, 13000 rpm, 4°C) a postaven na led. Koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop.

### **Příprava cDNA**

Po zjištění koncentrací RNA na Nanodropu jsme vypočetli potřebné množství DEPC vody, které je nutné přidat k jednotlivým vzorkům, aby koncentrace RNA byla 1  $\mu$ g.

Ve sterilní nukleáze prosté zkumavce jsme vytvořili následující směs A (11  $\mu$ l):

<b>Nařaděné vzorky RNA</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>
<b>Náhodné hexamery</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>

Směs jsme opatrně promíchali pipetou, stočili v centrifuze, nechali inkubovat při 70°C po dobu 5 minut a opět stočili.

Poté jsme si připravili směs B (množství na 1 vzorek):

<b>5x reakční pufr</b>	<b>4 <math>\mu</math>l</b>
<b>10 mM dNTP mix</b>	<b>2 <math>\mu</math>l</b>
<b>RiboLock RNase inhibitor (20 U/<math>\mu</math>l)</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>
<b>M-MULV reverzní transkriptáza (20 U/<math>\mu</math>l)</b>	<b>2 <math>\mu</math>l</b>

- Směs B jsme zamíchali a poté přidali směs A. Opět jsme nově vzniklou směs promíchali, stočili a nechali inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Následovala

další inkubace po dobu 60 minut při 37°C. Reakci jsme ukončili zahřátím v Termoblok (Major Science) směsi na 70°C po dobu 5 minut.

### **Real-Time PCR, kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)**

Nejprve jsme připravili směs A+B s DEPC vodou v poměru 1:4, tzn. k 20 µl směsi jsme přidali 80 µl DEPC vody. Kontrolní vzorky jsme naředili z 2 µl směsi A+B a 198 µl DEPC vody (ředění 1:500).

Dále jsme si připravili směs C:

<b>SYBR GREEN</b>	<b>25 µl</b>
<b>Forward primer pro cílovou mRNA (10 mM)</b>	<b>1 µl</b>
<b>Reverse primer pro cílovou mRNA (10 mM)</b>	<b>1 µl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>13 µl</b>

Do nových sterilních zkumavek o objemu 0,2 ml jsme napipetovali 20 µl směsi C a 5 µl vzorku (směs A+B). Od každého vzorku jsme připravili duplikáty. Pro negativní kontrolu jsme místo vzorku pipetovali DEPC vodu. Nakonec se vzorky promíchali a vložili do Corbet Rotorgene Real Time PCR cykleru a spustili jsme měření.

## **4.7 Stanovení koncentrace bílkoviny metodou BCA**

### **Princip**

Touto metodou se zjišťuje celkové množství bílkovin ve vzorku pomocí spektrofotometrického stanovení. Využívá se k tomu kyseliny bicinchoninové (BCA). Při BCA metodě redukuje proteiny v alkalickém prostředí měďnaté ionty na měďné a následně dochází k chelataci těchto iontů na kyselinu bicinchonovou za vzniku modrého zbarvení. Modré zbarvení je přímo úměrné množství bílkoviny a stanovuje se fotometricky (59).

### **Použité roztoky pro stanovení:**

- Roztok A: NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B: 4% CuSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O
- Roztok C: smíchání roztoku A s roztokem B v poměru 50:1



## Kalibrační křivka

Pro vytvoření kalibrační křivky byl jako standard použit 1% roztok hovězího sérového albuminu (BSA). Koncentrace stanovované bílkoviny se nacházela v rozmezí 0-1000 µg/ml. K vytvoření kalibrační křivky byl 1% BSA naředěn destilovanou vodou podle rozpisu:

	Koncentrace	Roztok 1% BSA	Destilovaná voda
1	0 µg/ml	0 µl	500 µl
2	200 µg/ml	10 µl	490 µl
3	400 µg/ml	20 µl	480 µl
4	600 µg/ml	30 µl	470 µl
5	800 µg/ml	40 µl	460 µl
6	1000 µg/ml	50 µl	450 µl

## Postup

Každý ze vzorků byl 5x naředěn (10 µl vzorku a 40 µl destilované vody) a připraven v duplikátu. Poté byly tyto duplikáty pipetovány do 96-jamkové destičky po 10 µl a bylo k nim přidáno 200 µl roztoku C.

Destička se vzorky se dala inkubovat na 30 min při 37 °C. Po ukončení inkubace se na spektrofotometru Tecan Infinite M200 změřila absorbance při 562 nm proti destilované vodě. Poté co byl od absorbance vzorků odečten průměr absorbance slepých vzorků, určila se koncentrace proteinů ve vzorcích srovnáním absorbance vzorků s kalibrační křivkou.

## 4.8 Stanovení proteinové exprese pomocí elektroforézy a imunoblotingu

### Denaturující gelová elektroforéza

#### Princip

Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) je metoda používaná výhradně k separaci bílkovin. K rozdělení proteinů dochází na základě jejich schopnosti pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost pohybu závisí hlavně na velikosti molekuly proteinu a jejím náboji. Aby rozdělení neovlivňovaly náboje molekul, přidává se dodecylsulfát sodný (SDS). SDS je anionaktivní detergent s poměrně vysokým záporným nábojem. Při vazbě na bílkoviny vyrovnává jejich nábojové rozdíly a ty se pak při elektroforéze pohybují jen podle své velikosti. Byla prokázána přímá úměra mezi

elektroforetickou pohyblivostí komplexů SDS-bílkovina a logaritmu jejich molekulové hmotnosti. Stanovené hodnoty molekulových hmotností pak můžeme použít pro charakterizaci bílkovinného preparátu. Protože však SDS inaktivuje biologicky aktivní látky, nemůžeme je po SDS-PAGE dokázat na základě jejich specifické reakce (např. katalytická aktivita enzymu) (60).

### **Zásobní roztoky**

- 4 M HCl
- Zásobní roztok AA + bisAA
- 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- 10% SDS
- Koncentrovaný elektrodový pufr
- Isobutanol nasycený vodou

### **Zásobní roztoky na ředění vzorků**

#### **4x SDS vzorkový pufr**

Zásobní 4 x SDS vzorkový pufr pro SDS-PAGE se připraví podle následujícího rozpisu a výsledný roztok se uchovává v mrazáku při -20°C.

<b>Složka (konečná koncentrace)</b>	<b>Koncentrace zásobního roztoku</b>	<b>Pipetované/navážované množství</b>
<b>200 mM Tris/HCl pH 6,8</b>	1 M	4 ml
<b>40% glycerol</b>	85%	9,41 ml
<b>6% SDS</b>	prášek	1,2 g
<b>0,2 M DTT</b>	prášek	0,617 g
<b>0,1 g bromfenolová modř</b>	prášek	špetka
<b>redestilovaná H<sub>2</sub>O</b>		20 ml

#### **Lyzační pufr**

Zásobní lyzační pufr připravíme podle následujícího rozpisu a uchováváme ho v mrazáku při -20°C. Před použitím se k 13 ml zásobního lyzačního pufru přidá 130 µl směsi inhibitorů proteas a 130 µl 100 mM fenylmethansulfonylfluoridu (PMSF). Roztok 100 mM PMSF se

připraví rozpuštěním navážky 17,42 mg PMSF v ethanolu. Takto upravený lyzační pufr se uchovává v lednici při 4°C.

<b>Složka (konečná koncentrace)</b>	<b>Koncentrace zásobního roztoku</b>	<b>Pipetované/navážované množství</b>
<b>50 mM Tris/HCl pH 7,4</b>	1 M	50 ml
<b>150 mM NaCl</b>	prášek	8,766 g
<b>10% glycerol</b>	85%	117,65 ml
<b>1% Triton X-100</b>	100%	10 ml
<b>2 mM EDTA</b>	prášek	0,58 g
<b>2 mM EGTA</b>	prášek	0,76 g
<b>40 mM β-glycerolfosfát</b>	prášek	8,52 g
<b>50 mM fluorid sodný</b>	prášek	2,09 g
<b>10 mM pyrofosfát sodný</b>	prášek	4,46 g
<b>2 mM dithiotreitol</b>	prášek	0,3085 g
<b>200 μM vanadičnan sodný</b>	prášek	0,03678 g
<b>H<sub>2</sub>O</b>		doplnit na objem 1 l

### Pracovní roztoky

#### 10% APS

Připravíme rozpuštěním 25 mg persíranu amonného ve 250 μl redestilované vody. Nutno naředit těsně před použitím.

#### Separáční gel (spodní)

	<b>7,5% - 2 gely; 1,5 mm</b>	<b>10% - 2 gely; 1,5 mm</b>
<b>Redestilovaná voda</b>	9,8 ml	8,1 ml
<b>Pufr 1,5M Tris-HCl pH 8,8</b>	5 ml	5 ml
<b>Roztok AA + bis AA</b>	6,7 ml	6,7 ml
<b>10% SDS</b>	0,2 ml	0,2 ml
<b>Iniciace polymerace</b>		
<b>Roztok APS</b>	200 μl	200 μl
<b>TEMED</b>	16 μl	16 μl

## Zaostřovací gel 4% (horní)

	2 gely; 1,5 mm	4 gely; 1,5 mm
<b>Redestilovaná voda</b>	3,05 ml	6,1 ml
<b>Pufr 0,5M Tris-HCl pH6,8</b>	1,25 ml	2,5 ml
<b>Roztok AA + bis AA</b>	0,65 ml	1,3 ml
<b>10% SDS</b>	0,05 ml	0,1 ml
<b>Iniciace polymerace</b>		
<b>Roztok APS</b>	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	8 $\mu$ l	16 $\mu$ l

### Elektrodový pufr

Tento pufr byl připraven smícháním 70 ml zásobního elektrodového pufru a 280 ml redestilované vody.

### Ředění vzorku

Vzorky byly podle svého obsahu bílkovin naředěny tak, aby měly koncentraci 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Vzorky byly naředěny pomocí 4x SDS vzorkového pufru a lyzačního pufru s roztokem inhibitorů tak, aby SDS tvořilo  $\frac{1}{4}$  celkového objemu.

### Postup

#### Příprava gelu

Nejprve jsme si připravili nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, spony a hřebec. Skla se přiložila k sobě a spojila sponami. Poté se skla postavila na gumovou podložku v nalévacím stojánku a přichytila se kolíkem. Dalším krokem byla příprava spodního gelu, který jsme po promíchání nalili mezi skla do výšky cca 4,5 cm od spodního okraje. Gel jsme převrstvili isobutanolem nasyceným vodou (cca 200  $\mu$ l) a nechali 30 – 60 minut polymerovat.

Následně jsme slili isobutanol a namíchali roztok na zaostřovací gel. Po lehkém promíchání jsme ho ihned nalili mezi skla na spodní gel až po horní okraj. Do zaostřovacího gelu jsme zasunuli hřebec až po drážky a gel nechali polymerovat minimálně 30 min.

## **Provedení SDS-PAGE**

V předehřátém termobloku jsme povařili naředěné vzorky při teplotě 95°C po dobu 5 min. Mezitím jsme gely vyndali ze stojánku a vysunuli z nich hřeben. Připravili jsme stojan na elektroforézu, do kterého jsme následně umístili skla s gelem, tak aby silná skla byla na vnější straně. Stojan jsme následně vložili do vaničky na elektroforézu.

Poté jsme si připravili 5x zředěný elektrodotový pufr a ten jsme nalili do vnitřního elektrodotového prostoru tak, aby byl ponořený celý gel. Tento zředěný elektrodotový pufr jsme nalili také do vnějšího elektrodotového prostoru. Hladina pufru by měla být nad elektrodou.

Do každé jamky jsme následně nanесли 30  $\mu$ l vzorku. Do jedné z jamek jsme napipetovali 5  $\mu$ l molekulového standardu. Elektroforetickou vaničku, která byla přiklopena víkem, jsme dali do ledové lázně a připojili ke zdroji, na kterém bylo nastaveno napětí 120V. Reakce se nechá běžet, dokud čelo nedoběhne na spodní okraj gelu.

## **Imunobloting**

Imunobloting (Western blotting) je metoda, která se využívá k přenosu proteinů (rozdělených po elektroforéze) z gelu na nosnou polyvinylidendifluoridovou (PVDF) nebo nitrocelulózovou membránu. Proteiny, které jsou stále díky SDS záporně nabitě, jsou donuceny vhodným elektrickým polem k přestupu z gelu na membránu. Na membráně pak proteiny detekujeme pomocí specifických protilátek (61).

## **Zásobní roztoky**

- Blotovací pufr

Navázili jsme 6,06 g TRIS (25 mM) a 28,8 g glycinu (192 mM) a ty jsme rozpustily přibližně v 500 ml redestilované vody. Poté jsme přidali 400 ml methanolu a doplnili v odměrné baňce na 2000 ml. Roztok jsme přilili do 1l lahví a uchovávali v lednici.

## **Postup**

Nejprve jsme si propiskou popsali PVDF membránu názvem detekovaného proteinu a buněčnou linií. Aby byla membrána schopná vázat proteiny, nechali jsme ji 5 min aktivovat v metanolu. Po elektroforéze jsme opatrně odstranili krycí sklo a odřízli gel od spacerů spodního skla. Odstranili jsme zaostřovací gel a u separačního gelu jsme odřízly spodní část s

modrým barvivem. Gel jsme vložili do plastové krabičky s víčkem, ve které byl nalit blotovací pufr. V této krabičce byla také namáčena PVDF membrána. V jiné krabičce jsme zatím namočili filtrační papíry a blotovací houbičky. Doba namáčení byla cca 20 min.

Poté jsme do blotovacího sendviče naskládali jednotlivé části následovně (počítano od černé strany):

- Blotovací houbička
- 1 filtrační papír
- Gel (marker = žebříček na pravé straně) – lehce uhladit gel kvůli odstranění bublin
- PVDF membrána – položit tak, aby byl nápis dole a na stejné straně jako marker. Membránu znovu uhladit kvůli odstranění bublin.
- 1 filtrační papír – od středu opět uhladit
- Blotovací houbička

Po uzavření blotovacího sendviče jsme sendvič vložili do blotovacího nástavce. Nástavec jsme do vany vložili tak, aby byl kolíky uprostřed. Do volného prostoru vany jsme vložili ledítko.

Aby nedocházelo k přílišnému zahřívání, tak jsme celou vanu vložili do ledové lázně. Poté byla přes víko připojena ke zdroji a bylo nastaveno napětí 100 V a proud 0,25 A. Po 90 minutách jsme opatrně vyjmuli membrány a pokračovali chemiluminiscenční detekcí proteinů.

### **Chemiluminiscenční detekce proteinů**

Volné pozice se na membráně s navázanými proteiny nejprve zablokuje pomocí blokovacího mléka, aby nedocházelo k nespecifické vazbě protilátek na membránu. Poté je membrána inkubována s primární protilátkou proti sledovanému proteinu, následuje inkubace se sekundární protilátkou, která je konjugována s alkalickou fosfatázou, nebo křenovou peroxidázou. Detekce sledovaných proteinů probíhá pomocí chemiluminiscence. Ta vzniká reakcí substrátu s enzymem, který je umístěn na sekundární protilátce. Podle umístění a síly proužků můžeme hodnotit druh a relativní množství sledovaného proteinu.

### **Zásobní roztoky**

- 0,1 M TRIS pufr, pH 8,8

Navážili jsme 12,11g TRIS, který jsme následně rozpustili v 800 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl jsme upravili pH na hodnotu 8,0. Poté jsme doplnili redestilovanou vodou do 1000 ml. Takto připravený roztok je třeba uchovávat v lednici.

- 10xTBS

Navážili jsme 24,2g Tris Base, 80g NaCl a rozpustili přibližně v 700 ml redestilované vody. Následně jsme přidali 38 ml 1M HCl a upravili pH na 7,6. V odměrné baňce jsme doplnili roztok na 1000 ml. Uchovávat při pokojové teplotě.

- TBST

Smíchali jsme 450 ml redestilované vody, 50 ml 10xTBS a 250 µl Tween 20. Rozmíchali jsme v lahvi a uchovávali v lednici.

### **Primární protilátky**

Podle instrukcí výrobce jsme zásobní protilátku zředili TBST pufrem s 5% BSA.

### **Sekundární protilátky**

Opět jsme zásobní protilátky naředili podle instrukcí výrobce (1:20 000) TBST pufrem s 2% BSA.

### **Postup**

Pomocí pinzety jsme do plastové misky přenesli membránu. Tato miska byla naplněna destilovanou vodou a membrána se v ní kývavým pohybem opláchla. Následně jsme membránu polili roztokem 5% blotovacího odtučněného mléka v TBST pufru. Krabičky jsme umístili na kývačku a membrána se nechala blokovat 1-2 hodiny. Po slití mléka a opláchnutí membrány destilovanou vodou jsme nechali membránu inkubovat přes noc s primární protilátkou.

Druhý den jsme primární protilátku slili a membránu opakovaně oplachovali (6x 5 min) TBST pufrem. Následovala inkubace se sekundární protilátkou, která trvala 1-2 hodiny. Poté jsme opět opakovaně (6x 5 min) oplachovali membránu TBST pufrem.

### **Chemiluminiscenční detekce**

Nejprve jsme z krabičky s membránou vylili TBST pufr. Poté jsme na membránu nanесли tolik substrátu, aby byl pokryt celý povrch membrány a nechali jsme ji inkubovat po dobu 5 minut. Po inkubaci jsme membránu vyndali ze substrátu a přenesli do přístroje Gel Logic. K detekci jsme používali počítačový program Carestream. Dobu osvitů membrán jsme měnili podle aktuálních podmínek.

#### **4.9 Statistická analýza dat**

Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SD z alespoň dvou pokusů. Statistická analýza byla provedena pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (ANOVA), po níž následoval Sidakův vícečetný srovnávací test významný na úrovni  $p < 0,05$ . Analýza dat byla provedena pomocí GraphPad Prism 6.0. Koncentrace selektivního inhibitoru způsobující 50% pokles životaschopnosti buněk ( $IC_{50}$ ) byla stanovena metodou GraphPad Prism 6.0.



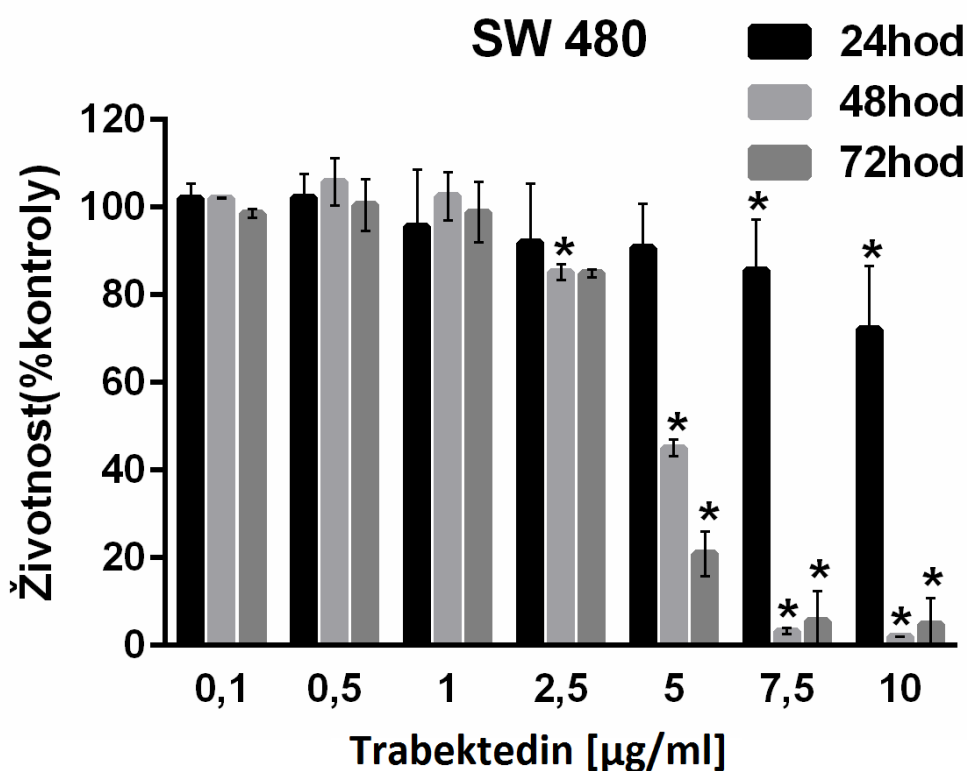
## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv trabektedinu na životaschopnost buněk CRC

#### 5.1.1 Buněčné linie SW 480 a SW 620

Tyto nádorové buněčné linie jsme ovlivňovali trabektedinem v koncentracích 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Pro každou koncentraci proběhla tři měření ve 24; 48 a 72 hodinách. Ze získaných hodnot se vypočítala  $\text{IC}_{50}$  uvedená níže v tabulce 2.

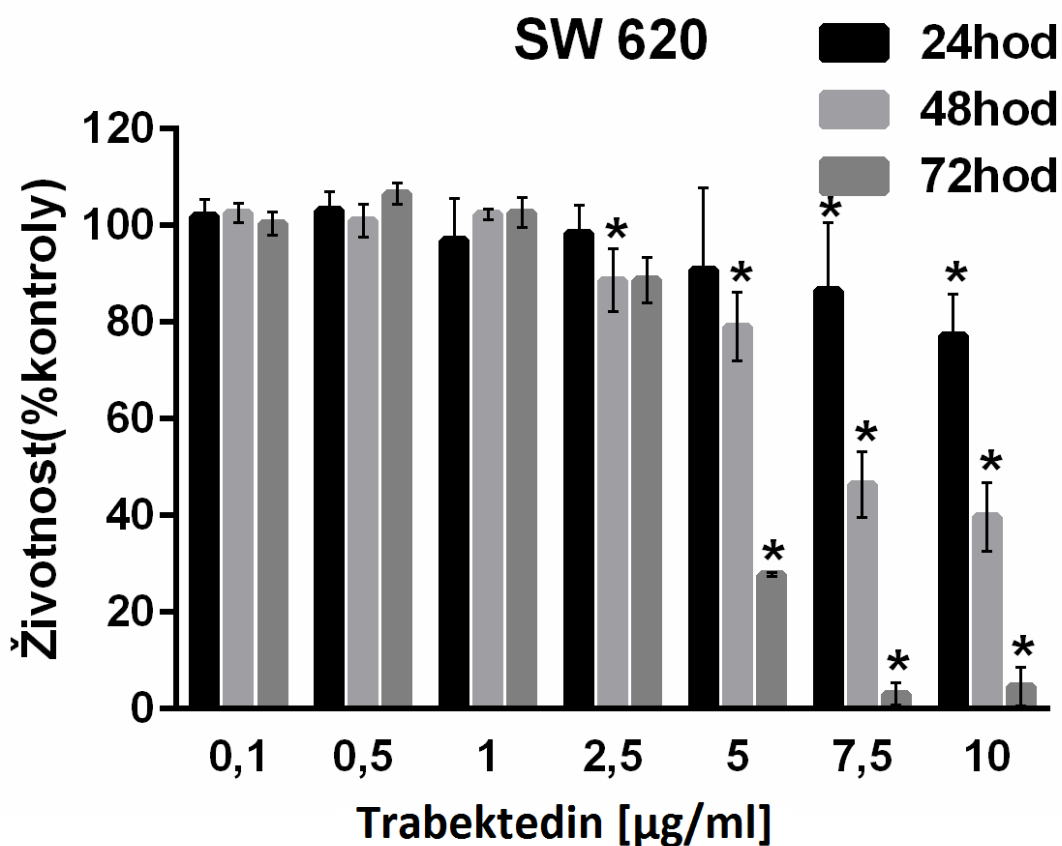
Při měření po 24 hodinách došlo u buněk SW 480 k výraznějšímu poklesu životaschopnosti při koncentracích trabektedinu 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Signifikantně snížené hodnoty následujícího měření (po 48 hodinách od počátku) jsme zaznamenali již v koncentracích 2,5; 5; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledné hodnoty po 72 hodinách byly sníženy při koncentracích 5; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$  (obr. 12).



Obr. 13: Ovlivnění buněčné linie SW 480 různými koncentracemi trabektedinu v intervalech 24; 48 a 72 hodin. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )

U buněčné linie SW 620 jsme po 24 hodinách inkubace zaznamenali statisticky významné snížení viability při koncentraci trabektedinu 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$  (obr. 13). V následujícím měření

byly signifikantně snižené hodnoty při koncentracích 2,5; 5; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ , při měření po 72 hodinách došlo k poklesu viability v koncentracích 5; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

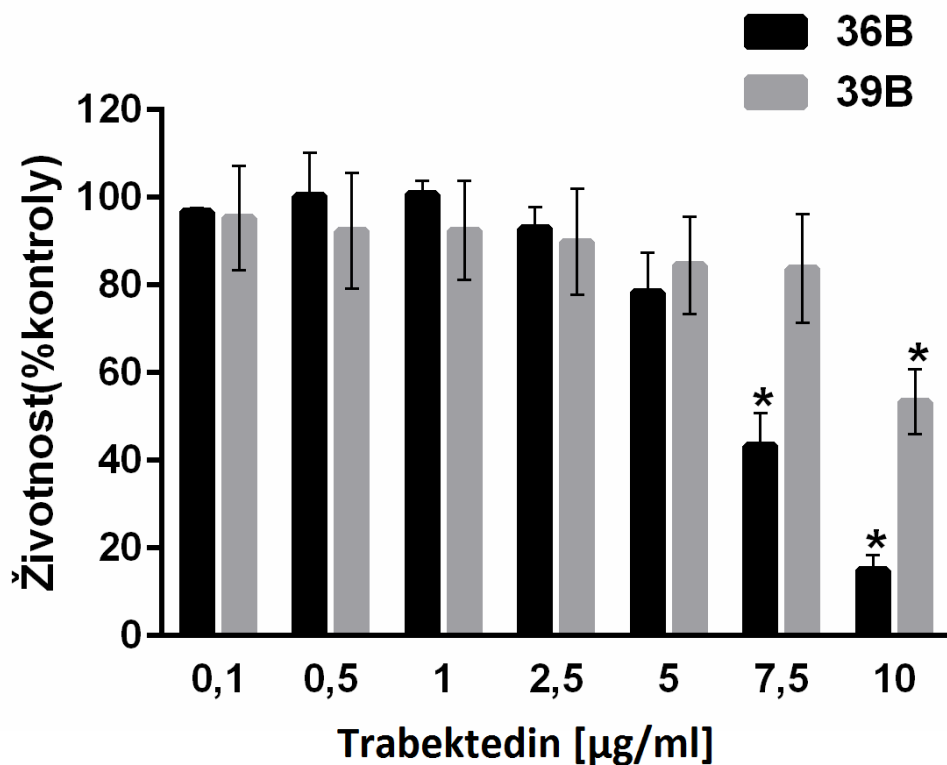


Obr. 14: Ovlivnění buněčné linie SW 620 různými koncentracemi trabektedinu v intervalech 24; 48 a 72 hodin. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )

### 5.1.2 Buněčné linie 36B a 39B

Z důvodu nedostatku materiálu jsme měření těchto buněk prováděli pouze v intervalu 48 hodin. Koncentrace trabektedinu byly nastaveny stejně jako u buněk SW 480 a SW 620, tzn. 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Byla také vypočítána hodnota  $IC_{50}$  uvedená v tabulce 2.

U buněk primární kultury 36B došlo k signifikantnímu poklesu životnosti při koncentraci 7,5  $\mu\text{g/ml}$ . Při 10  $\mu\text{g/ml}$  bylo pak snížení ještě výraznější. Výsledky u buněk 39B nám ukazují statisticky významný pokles až při koncentraci trabektedinu 10  $\mu\text{g/ml}$  (obr. 14).



Obr. 15: Ovlivnění buněk 36B a 39B různými koncentracemi trabektedinu v intervalu 48 hodin. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )

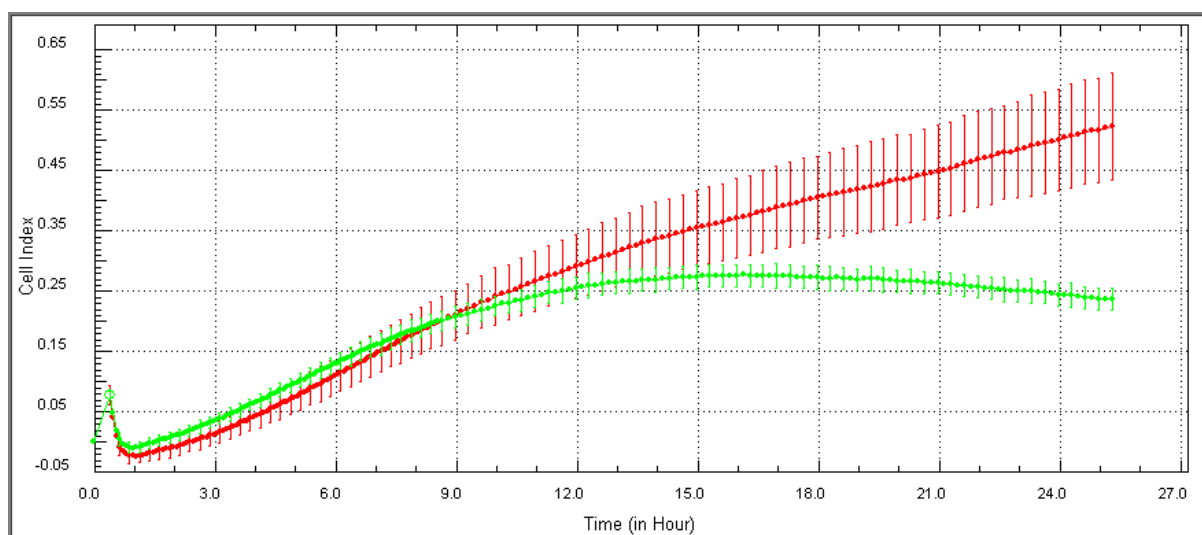
Tab. 2: Koncentrace  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) trabektedinu pro primární kultury 36B a 39B v čase 48 hod a pro nádorové linie SW 480 a SW 620 v čase 24; 48 a 72 hodin.

	$IC_{50}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
	24 hod	48 hod	72 hod
36B		7,758	
39B		19,67	
SW620	42,55	10,08	3,530
SW480	33,98	3,836	3,192

## 5.2 Ovlivnění schopnosti migrace buněk

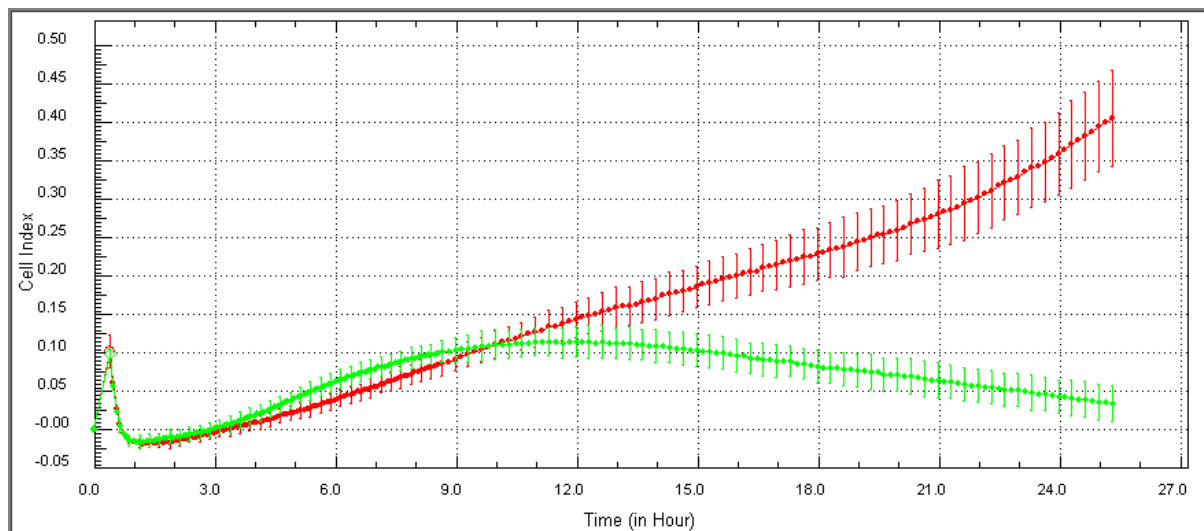
Testování migrace bylo provedeno pomocí přístroje x-CELLigence pouze u buněk označených 36B a 39B. Migraci buněčných linií SW 480 a SW 620 jsme neprováděli, protože již byla zhotovena v rámci jiné práce předtím. Obě patří mezi primární linie kolorektálního karcinomu. Porovnávali jsme buňky ovlivněné trabektedinem, jehož koncentraci jsme vždy zvolili podle dosažené hodnoty  $IC_{50}$ , s neovlivněnými buňkami téže linie.

Na Obr. 15 můžeme pozorovat 2 křivky vztahující se k buněčné linii 36B. Červená křivka znázorňuje kontrolu, tedy neovlivněné buňky. Zelená pak buňky, ke kterým byl přidán trabektedin o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Na obrázku je patrná inhibice migrace po přidání trabektedinu, která se začíná projevovat 9 hodin po ovlivnění.



Obr. 16: Porovnání vlivu trabektedinu na migraci buněk 36B (zelená křivka) s kontrolou (červená křivka)

Na Obr. 16 sledujeme primární buněčnou kulturu 39B. Červená křivka opět představuje kontrolu, zelená křivka jsou buňky s přidáním trabektedinu o koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ . I zde můžeme vidět inhibici migrace projevující se 9 hodin po ovlivnění buněk. Inhibice migrace je zde výraznější než u buněk 36B.



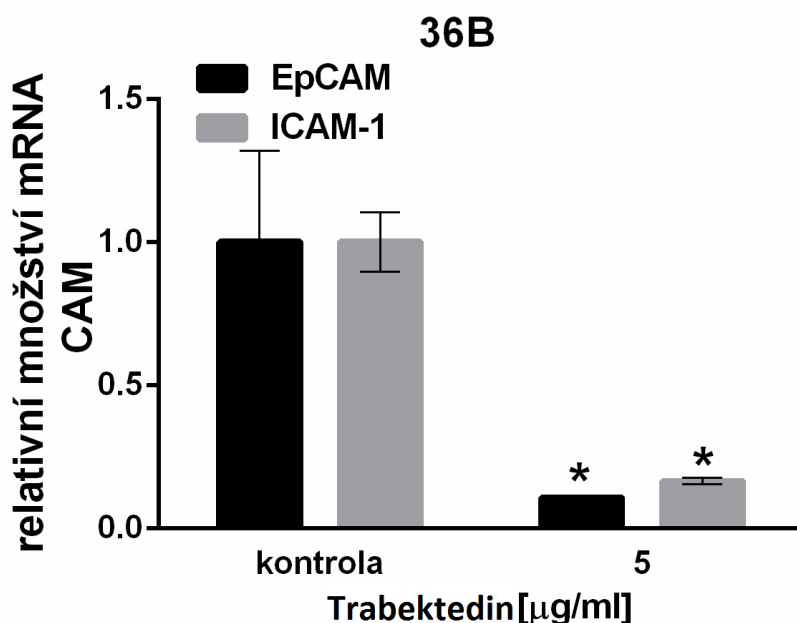
Obr. 17: Porovnání vlivu trabektedinu na migraci buněk 39B (zelená křivka) s kontrolou (červená křivka)

### 5.3 Vliv trabektedinu expresi molekul účastnících se migrace a adheze na úrovni mRNA

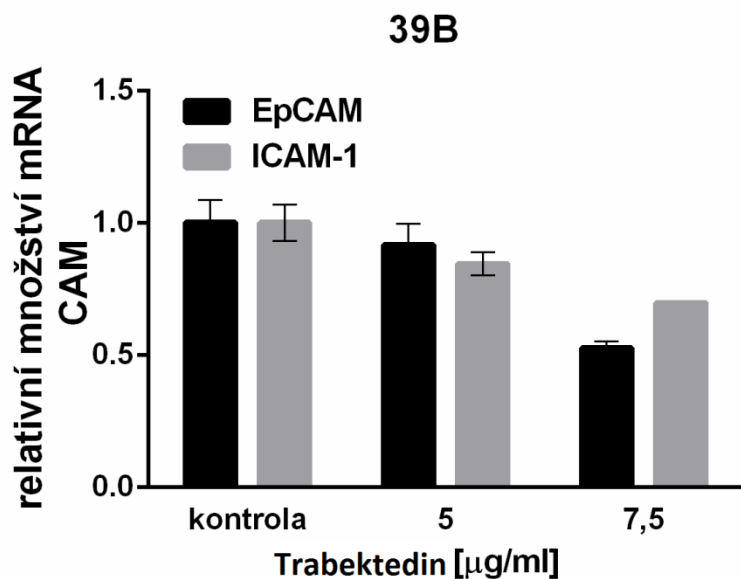
Testování probíhalo u všech čtyř buněčných linií, tj. 36B, 39B, SW 480 a SW 620 a byly ovlivňovány po dobu 24 hodin. Sledovali jsme molekuly E-kadherin, N-kadherin, EpCAM a ICAM-1. U buněčné linie SW 480 byly zvoleny koncentrace trabektedinu 2,5 a 5 µg/ml, u linie 36B 5 µg/ml a u linií SW 620 a 39B koncentrace 5 a 7,5 µg/ml. Všechny linie byly porovnávány s kontrolou (0 µg/ml trabektedinu).

#### 5.3.1 EpCAM a ICAM-1

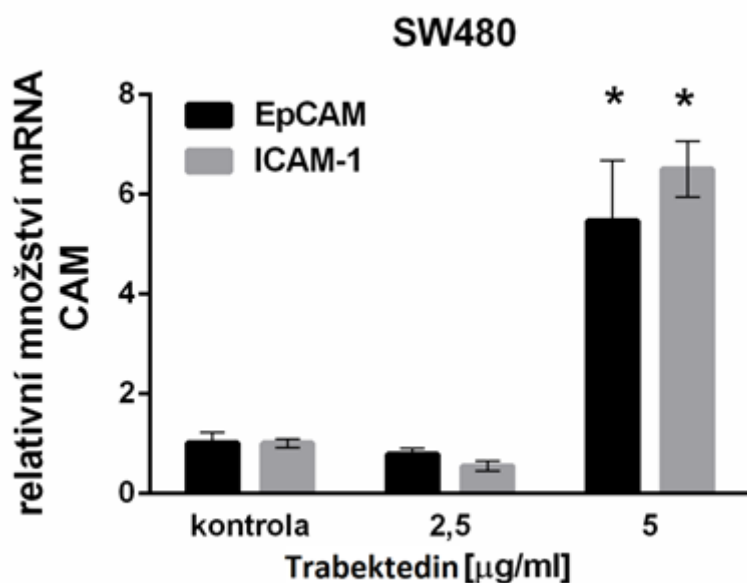
Na Obr. 17, 18, 19 a 20 můžeme vidět vliv zvolených koncentrací trabektedinu na expresi mRNA molekul EpCAM a ICAM-1 u jednotlivých linií. U linie 36B došlo k statisticky významnému poklesu exprese mRNA EpCAMu. Stejně tak u molekuly ICAM-1 můžeme pozorovat výrazný pokles exprese u této linie. Ani u jedné ze sledovaných molekul nedošlo u buněk 39B k výraznější změně exprese mRNA. U buněk SW 480 nedošlo při koncentraci 2,5 µg/ml k výraznější změně, ale při koncentraci 5 µg/ml hladina EpCAM i ICAM-1 výrazně vzrostla. K významné změně v expresi mRNA u molekuly EpCAM můžeme u buněk SW 620 pozorovat při koncentraci trabektedinu 7,5 µg/ml.



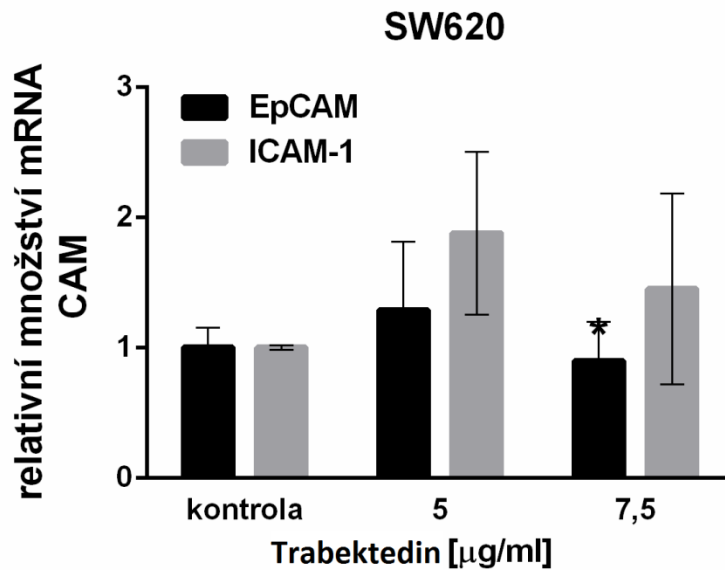
Obr. 18: Změny v relativní expresi mRNA molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk 36B při koncentracích 0 (kontrola) a 5 µg/ml trabektedinu. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )



Obr. 19: Změny v relativní expresi mRNA molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk 39B při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu



Obr. 20: Změny v relativní expresi mRNA molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk SW 480 při koncentracích 0 (kontrola); 2,5 a 5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )

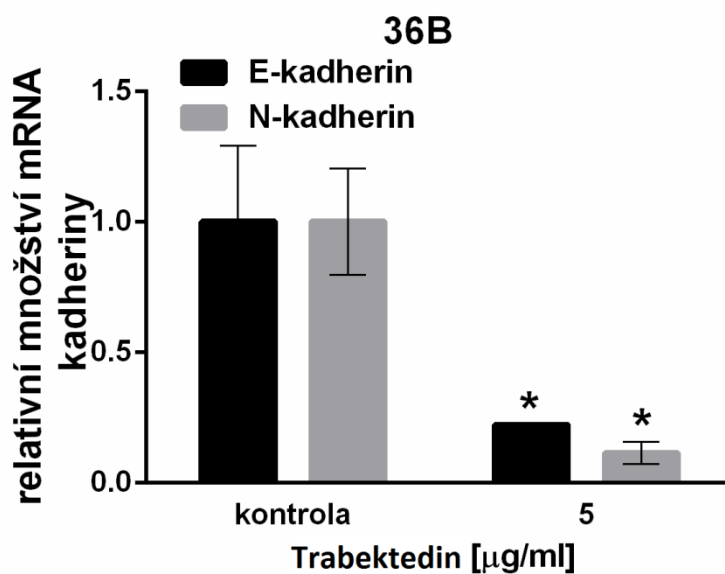


Obr. 21: Změny v relativní expresi mRNA molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk SW 620 při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5 µg/ml trabektedinu. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )

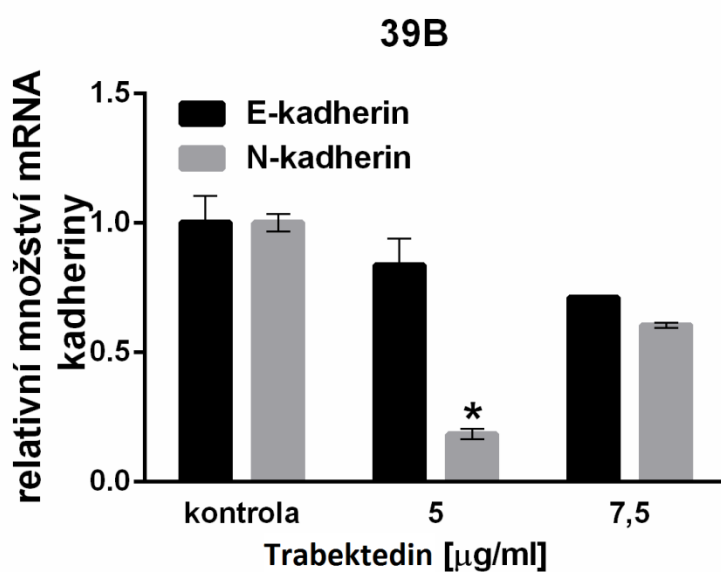
### 5.3.2 E-kadherin a N-kadherin

Relativní exprese mRNA molekuly E-kadherinu byla u linie 36B při koncentraci trabektedinu 5 µg/ml výrazně snížena. Podobně nastal pokles také u N-kadherinu. U buněk linie 39B jsme zaznamenali jedinou významnou změnu a to při koncentraci trabektedinu 5 µg/ml u molekuly N-kadherinu. Relativní exprese mRNA molekuly E-kadherin u SW 480 vzrostla při koncentraci trabektedinu 5 µg/ml, zatímco u N-kadherinu nebyla zaznamenána podstatná změna. Poslední z testovaných linií byla SW 620. Tam nastal významný pokles exprese mRNA u E-kadherinu při koncentraci trabektedinu 7,5 µg/ml. Výsledky jsou znázorněny na obrázcích 21, 22, 23 a 24.

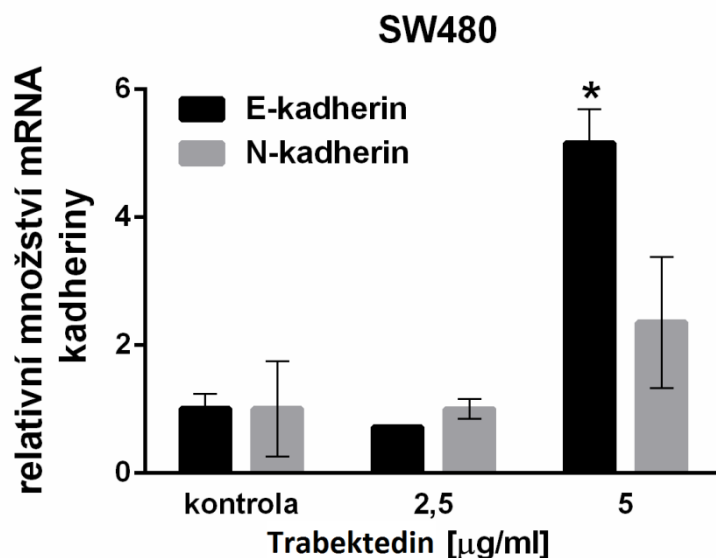




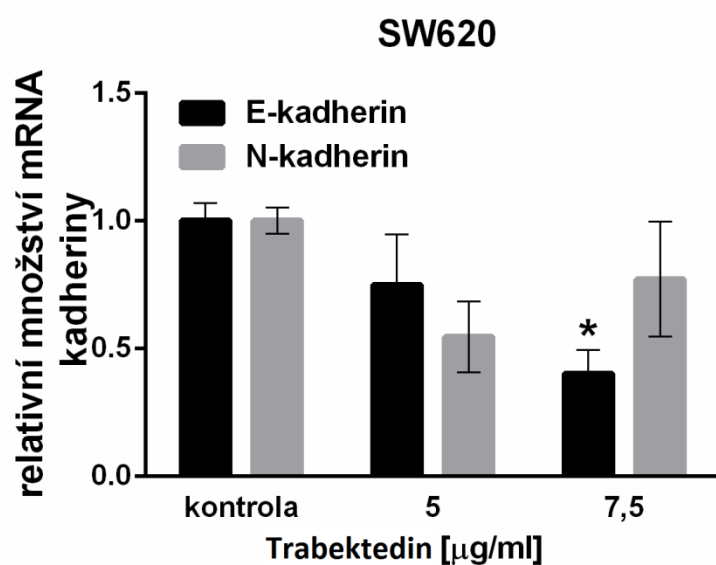
Obr. 22: Změny v relativní expresi mRNA molekul E-kadherinu a N-kadherinu u linie 36B při koncentracích 0 (kontrola) a 5 a  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )



Obr. 23: Změny v relativní expresi mRNA molekul E-kadherinu a N-kadherinu u buněk 39B při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )



Obr. 24: Změny v relativní expresi mRNA molekul E-kadherinu a N-kadherinu u buněk SW 480 při koncentracích 0 (kontrola); 2,5 a 5 µg/ml trabektedinu. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )



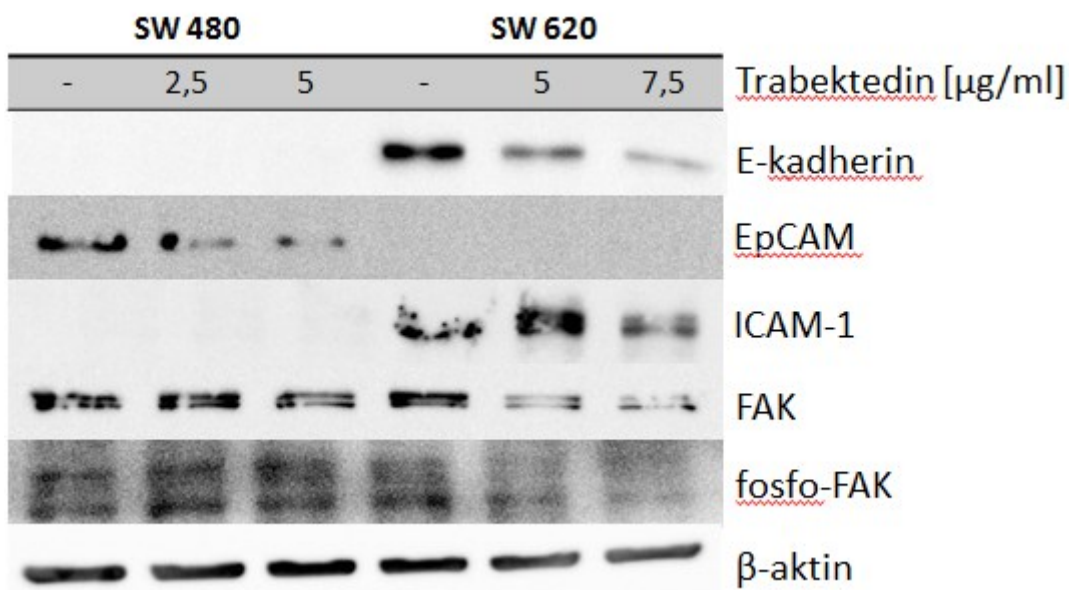
Obr. 25: Změny v relativní expresi mRNA molekul E-kadherinu a N-kadherinu u buněk SW 620 při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5 µg/ml trabektedinu. \* signifikantně se liší od kontroly (Sidakův vícečetný srovnávací test,  $p < 0,05$ )

## 5.4 Vliv trabektedinu na expresi molekul účastnících se migrace a adheze buněk na úrovni proteinu pomocí imunoblotingu

### 5.4.1 Vliv na buněčné linie SW 480, SW 620

Metodou imunoblotingu (Western blotting) jsme zjišťovali proteinovou expresi molekul  $\beta$ -aktinu, E-kadherin, N-kadherin, EpCAM, ICAM-1, FAK, fosfo-FAK. Tyto měření jsme prováděli na buněčných liniích SW 480 a SW 620, které byly nejprve ovlivněny trabektedinem o různých koncentracích po dobu 24 hodin. Pro linii SW 480 byly použity koncentrace trabektedinu 0  $\mu\text{g/ml}$  (kontrola), 2,5  $\mu\text{g/ml}$  a 5  $\mu\text{g/ml}$ , zatímco pro linii SW 620 to byly koncentrace 0 (kontrola), 5  $\mu\text{g/ml}$  a 7,5  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledky chemiluminiscenčního stanovení proteinů (proužky) jsou vidět na obrázku 25.

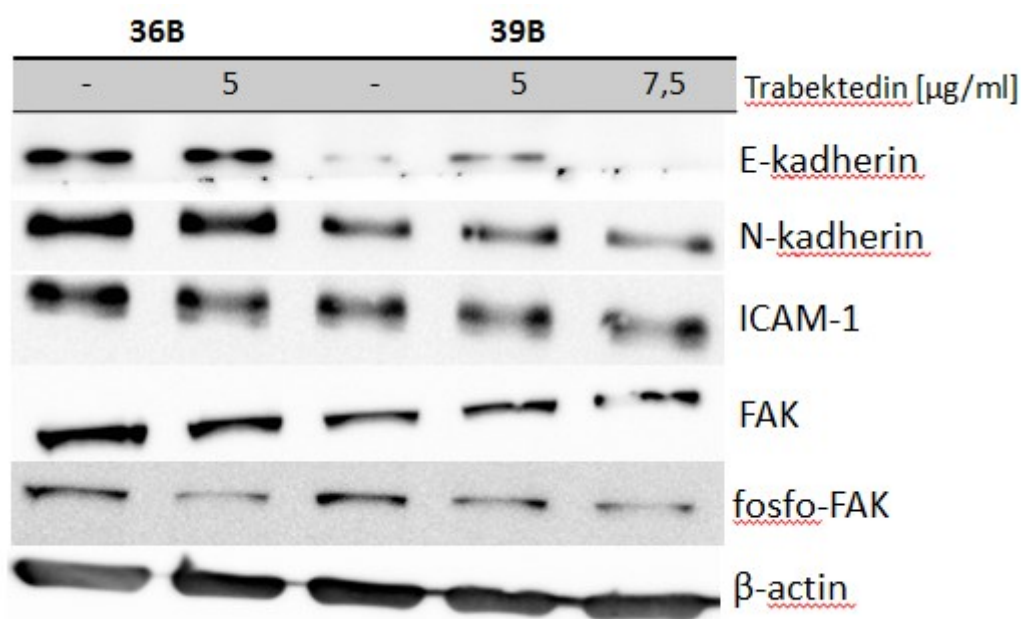
U buněčné linie SW 480 došlo k podstatnému snížení proteinu EpCAM po ovlivnění trabektedinem v koncentraci 2,5 i 5  $\mu\text{g/ml}$  oproti kontrole. Množství proteinu ICAM-1 vzrostlo při koncentraci trabektedinu 5  $\mu\text{g/ml}$ . Dále došlo k poklesu proteinové exprese FAK s rostoucí koncentrací trabektedinu, naopak u fosforylovaného FAK došlo při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  k nárůstu. U buněčné linie SW 620 protein E-kadherin s rostoucí koncentrací trabektedinu klesal. Proteinová exprese molekuly EpCAM vzrostla v obou koncentracích trabektedinu. U ICAM-1 došlo při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  ke zvýšení oproti kontrole, avšak při koncentraci 7,5  $\mu\text{g/ml}$  došlo k snížení hodnoty v porovnání s předchozí koncentrací. Hodnota FAK byla snížena v obou použitých koncentracích trabektedinu.



Obr. 26: Imunobloting u buněčných linie SW 480 ovlivněných trabektedinem o koncentraci 0; 2,5; 5  $\mu\text{g/ml}$  a SW 620 s trabektedinem o koncentraci 0; 5; 7,5  $\mu\text{g/ml}$

### 5.4.2 Vliv na buněčné linie 36B, 39B

Stejně proteiny jako u nádorových buněčných linií SW 480 a SW 620 jsme stanovovali u primárních buněčných kultur 36B a 39B, které byly odebrány pacientům ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. U buněk 36B byla změřena kontrola a exprese proteinů po 24 hodinovém ovlivnění koncentrací 5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu. U buněk 39B byla stanovena proteinová exprese u kontroly a u buněk ovlivněných trabektedinem v koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  a 7,5  $\mu\text{g/ml}$ . Na obrázku 26 můžeme vidět proužky proteinů po chemiluminiscenčním stanovení. Vlivem vystavení trabektedinu pokleslo u buněk 36B množství ICAM-1 oproti kontrole. Významné snížení jsme zaznamenali i u proteinu FAK. Exprese fosforylované formy proteinu FAK byla také snížena. U buněčné kultury 39B se zvýšilo množství E-kadherinu při koncentraci trabektedinu 5  $\mu\text{g/ml}$ . Exprese fosforylované formy proteinu FAK s rostoucí koncentrací trabektedinu klesala. U ostatních molekul nedošlo ke statisticky významné změně.



Obr. 27: Imunoblotting u buněčné kultury 36B ovlivněné trabektedinem o koncentraci 0 a 5  $\mu\text{g/ml}$  a buněčné kultury 39B s trabektedinem o koncentraci 0; 5 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$

### 5.4.3 Denzitometrické vyhodnocení blotů

Výsledné hodnoty exprese proteinů byly stanoveny denzitometricky. Množství proteinů bylo vždy porovnáváno ke kontrole nanášení, což bylo v tomto případě množství  $\beta$ -aktinu. Výsledné hodnoty jsou zapsány v tabulce 3.

Tab. 3: Denzitometrické vyhodnocení proteinové exprese v nádorových buňkách ovlivněných trabektedinem (relativní exprese vztažená k expresi  $\beta$ -aktinu)

	SW 480			SW 620			36B		39B		
	-	2,5	5	-	5	7,5	-	5	-	5	7,5
E-kadherin	-	-	-	1,00	0,50	0,20	1,00	0,76	1,00	3,31	0,97
N-kadherin	-	-	-	-	-	-	1,00	0,59	1,00	1,17	0,63
EpCAM	1,00	0,50	0,02	1,00	2,94	4,37	-	-	-	-	-
ICAM-1	-	-	-	1,00	2,00	1,27	1,00	0,57	1,00	1,08	1,09
FAK	1,00	0,80	0,47	1,00	0,26	0,34	1,00	0,51	1,00	1,29	0,92
fosfo-FAK	1,00	1,04	1,59	1,00	0,72	0,58	1,00	0,22	1,00	0,71	0,41

## 6 Diskuze

Trabektedin je tetraisochinolinový přírodní alkaloid izolovaný z mořských pláštěnců. Dnes je již vyráběn synteticky. V *in vitro* a *in vivo* testech bylo prokázáno jeho protinádorové působení. To zahrnuje více mechanismů a některé nejsou ještě zcela objasněny. Prvním z nich je navázání molekuly trabektedinu na DNA. Této vazby se neúčastní spirocyklicky připojený kruh C molekuly, který vyčnívá z dvoušroubovice a je zodpovědný za další účinky trabektedinu. Mezi ty patří interakce s proteiny opravujícími DNA. Dále je možná vazba trabektedinu s transkripčními faktory, která zabrání jejich navázání na příslušný úsek DNA. Některé z nich trabektedin neovlivňuje (např. Maf, MYB, MYC), ale u jiných byla pozorována inhibice vazby na DNA v závislosti na koncentraci tohoto alkaloidu (např. TBP, E2F, SRF, NF-Y). Také může u některých typů nádorů ovlivňovat mikroprostředí nádoru tím, že inhibuje tvorbu prozánětlivých cytokinů (např. monocytárního chemotaktického proteinu MCP-1, interleukinu-6), dále VEGF a reaktantu akutní fáze pentraxinu-3 (46,62,63).

V roce 2007 byl v Evropské unii trabektedin registrován k léčbě nádorů měkkých tkání poté, co selhala léčba antracykliny a ifosfamidem. Od roku 2009 je též indikován k léčbě rakoviny vaječníků v kombinaci s pegylovaným doxorubicinem. Slibné výsledky vykazují také studie zkoumající jeho vliv na určité typy rakoviny prsu a prostaty (46, 64,65, 66).

V našich experimentech jsme stanovili hodnoty  $IC_{50}$  pro čtyři buněčné linie kolorektálního karcinomu (2 primární buněčné linie odvozené od pacientů a 2 nádorové buněčné linie), které byly vystavené působení trabektedinu po dobu 24-72 hodin. Nejnižší hodnoty  $IC_{50}$  bylo dosaženo u linie SW 480 po 72 hodinách a to 3,192  $\mu\text{g/ml}$ , což je přibližně 4,2  $\mu\text{M}$ . Všechny čtyři buněčné linie se dají porovnat pouze v čase 48 hodin, kde hodnoty  $IC_{50}$  klesaly v následujícím pořadí: 26  $\mu\text{M}$  (39B) > 13  $\mu\text{M}$  (SW 620) > 10  $\mu\text{M}$  (36B) > 5  $\mu\text{M}$  (SW 480).

Při porovnání testu cytotoxicity, který jsme provedli, s jinými studiemi můžeme říci, že hladina  $IC_{50}$  u nádorových buněk kolorektálního karcinomu je v porovnání s jinými typy nádorových buněk vyšší. Z toho by vyplývala nutnost nasazení vyšší dávky léčiva pacientům s kolorektálním karcinomem a tím pádem i vyšší riziko nežádoucích účinků a nižší terapeutický index. Ve studii Ghielmini-Colliho (1998) byla použita  $IC_{70}$  a její hodnoty byly u buněčných linií následující: A375M (melanom) 0,6 ng/ml, MFC7 (karcinom prsu) 0,6 ng/ml, OVCAR-3, IGROV-1, SW 626 (všechny karcinom vaječníků) 0,3-2,1 ng/ml, A549 (karcinom plic) 5,6 ng/ml, LoVo, LoVo/DX, SW 620 (všechny karcinom tlustého střeva) 3,3-

30,1 ng/ml (68). Můžeme tedy říci, že podle testů cytotoxicity máme pro léčbu trabektedinem vhodnější indikace, než je kolorektální karcinom (67,68).

Pro rozvoj nádorového onemocnění je důležitá schopnost buněk migrovat, která umožní zakládat vzdálená ložiska nádoru (metastázy). Jejich přítomnost je jedním z klasifikačních kritérií při hodnocení stupně závažnosti nádorového onemocnění. Proto se u protinádorových léčiv zjišťuje také schopnost ovlivnit migraci postižených buněk.

Vliv trabektedinu na migraci buněk kolorektálního karcinomu jsme zjišťovali u primárních buněčných kultur 36B a 39B za použití koncentrací shodných s  $IC_{50}$  dosaženou u jednotlivých kultur. Vlastní měření migrace buněk probíhalo v přístroji x-CELLigence. U obou linií došlo vlivem trabektedinu ke snížení schopnosti migrace. Primární kultura 36B vykazovala o něco výraznější schopnost migrace a po ovlivnění léčivem byla tato schopnost méně inhibována, než tomu bylo u linie 39B.

Námi získané výsledky jsou srovnatelné s těmi, kterých bylo dosaženo ve studiích prováděných na buněčných liniích MCF-7, MDA-MB-231 (oboje buňky lidského adenokarcinomu prsu) a MT-CHC01 (buňky lidského intrahepatálního cholangiokarcinomu). U obou studií byla použita koncentrace trabektedinu shodná s hodnotou  $IC_{50}$  a k hodnocení jeho vlivu na migraci buněk byl použit tzv. „*scratch-wound healing assay*“. Trabektedin u všech zmíněných buněčných linií signifikantně snížil schopnost jejich migrace (69,70).

Změny v hladinách adhezivních molekul jsou podstatnou součástí přirozených procesů v buňce (např. při zánětu, hojení ran a funkci imunitního systému). Svou podstatnou roli hrají také při nádorovém onemocnění, kde ovlivňují např. schopnost tvořit metastázy nebo invazivitu nádoru. Mezi významné adhezivní molekuly, kterými jsem se experimentálně zabýval i ve své diplomové práci, patří E-kadherin, N-kadherin, EpCAM, ICAM-1 a FAK.

E-kadherin je protein, který se nachází na povrchu epiteliálních buněk a vytváří spoje mezi buňkami. Tím zvyšuje integritu tkáně. Snížení jeho hladin, nebo ztráta funkce v nádorových buňkách podporuje jejich invazivitu a metastázování (2,71). Při našem testování na buněčných liniích kolorektálního karcinomu došlo k významným změnám exprese E-kadherinu na úrovni mRNA u tří linií. U buněčných linií 36B a SW 620 (koncentrace trabektedinu 5  $\mu$ g/ml resp. 7,5  $\mu$ g/ml) došlo ke snížení hladin mRNA E-kadherinu, naopak u linie SW480 (trabektedin 5  $\mu$ g/ml) se jeho hladina zvýšila. Na úrovni proteinů došlo u linie SW 620 ke snížení exprese E-kadherinu při obou studovaných koncentracích trabektedinu,

zatímco u linie 39B se při 5 µg/ml trabektedinu exprese proteinu E-kadherinu zvýšila. Ve studii zabývající se vlivem trabektedinu na buňky PC-3 (lidský malobuněčný karcinom prostaty) a DU145 (metastázy lidského karcinomu prostaty) byla zjištěna snížená proteinová exprese E-kadherinu při použití toho léčiva (72).

Další z testovaných molekul byl transmembránový protein N-kadherin. Jeho vliv na nádorové tkáně je opačný než u E-kadherinu, protože podporuje motilitu a migraci buněk (73). Naše měření ukázalo snížení exprese mRNA pro tento protein při koncentraci trabektedinu 5 µg/ml u linií 36B a 39B. U linií SW 480 a SW 620 nedošlo k významnějším změnám exprese mRNA N-kadherinu. Na úrovni proteinů rovněž nebyly prokázány žádné výrazné změny. Při preklinické studii bylo u myších xenograftů, nesoucích buňky lidského extrahepatálního cholangiokarcinomu EGI-1, nebo intrahepatálního lidského cholangiokarcinomu získaného od pacienta, zjištěno snížení hladiny exprese mRNA N-kadherinu po ovlivnění trabektedinem (74).

Adhezivní molekula EpCAM je přítomna hlavně v epiteliálních buňkách. Tento transmembránový protein se podílí na proliferaci, migraci a diferenciaci buněk (75). Výsledky našeho měření ukázaly snížení množství EpCAM u linií 36B a SW 620 na úrovni mRNA. Linie SW 480 měla hladinu EpCAM naopak zvýšenou. Množství proteinů detekované densitometricky vykazovalo u linií SW 480 a SW 620 opačný trend než změna hladin mRNA, u linie SW 480 došlo ke snížení množství EpCAM a u SW 620 se hladina zvýšila. U studie vypracované na nádorových kmenových buňkách různých typů sarkomů po ovlivnění trabektedinem zjistily snížení množství mRNA EpCAM (76).

Další sledovanou adhezivní molekulou byla ICAM-1. Tento protein se nachází hlavně na buňkách endotelu a imunitního systému. S jeho pomocí přecházejí buňky z krevního oběhu do tkání. Jeho zvýšené hladiny se objevují u mnoha typů nádorových onemocnění (např. kolorektální karcinom, melanom, rakovina prsu a žaludku) (77). Při našem měření jsme zjistili snížení hladiny mRNA ICAM-1 u primární kultury 36B, zatímco ostatní linie nevykázaly významnou změnu. Na úrovni proteinu byla nalezena zvýšená hladina ICAM-1 u linie SW 620. Jednalo se o koncentrace trabektedinu 5 µg/ml.

FAK („*Focal Adhesive Kinase*“) je cytoplazmatická tyrozinkináza umožňující aktivaci nádorových buněk pomocí růstových faktorů nebo integrinů u různých typů nádorových onemocnění. Uplatňuje se v adhezi, šíření, invazivitě, metastázování, angiogenezi a mnoha dalších procesech kancerogeneze. Při tolika funkcích je FAK vhodným terapeutickým cílem a



nyň se v klinickém testování nachází sloučeniny fungující jako inhibitory FAK (78,79). Vliv trabektedinu na hladiny FAK jsme sledovali pouze na úrovni proteinové exprese. Významné snížení hladin tohoto proteinu jsme zaznamenali u tří buněčných linií – 36B, SW 480 a SW 620. Pouze primární kultura 39B nevykázala signifikantní změnu ani při jedné z koncentrací trabektedinu.

Posledním sledovaným proteinem byla fosforylovaná forma FAK. Tato fosforylace probíhá na dvou místech – prvním krokem je fosforylace Ser732, která umožní aktivaci druhého místa, kterým je Tyr407. Fosforylace obou míst aktivuje buňky, které jsou pak schopny lépe migrovat (80,81). Ve své diplomové práci jsem sledoval vliv trabektedinu na expresi fosforylované FAK pouze na úrovni proteinu. Fosforylovaná FAK byla snížena u obou primárních kultur 36B a 39B. Naopak u SW 480 její množství stouplu při ovlivnění koncentrací trabektedinu 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Celkově výsledky našich experimentů ukázaly snížení schopnosti migrace u obou primárních buněčných kultur 36B i 39B získaných od pacientů léčených ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Ke zvoleným hladinám trabektedinu se jako nejcitlivější jevila primární kultura 36B, u které došlo k nejvíce změnám v hladinách měřených mRNA a proteinů. Na úrovni proteinů se jevil trabektedin nejslibněji při snížení hladin FAK a fosforylované formy FAK, které zaznamenaly významný pokles alespoň při jedné koncentraci téměř u všech použitých buněčných linií a primárních kultur.

## 7 Závěr

Výsledky práce lze shrnout do následujících bodů:

- Trabektedin ve zvolených koncentracích významně snižoval životaschopnost obou nádorových buněčných linií i obou primárních buněčných kultur. Z dosažených výsledků byly vypočítány hodnoty  $IC_{50}$ , které se pohybovaly v rozmezí 3,836 - 19,67  $\mu\text{g/ml}$  (tj.  $\sim 5 - 26 \mu\text{M}$ ) po 48 hodinách inkubace.
- Schopnost migrace byla větší u primární kultury 36B než u 39B a byla rovněž méně ovlivněna působením trabektedinu v koncentraci shodné s hodnotou  $IC_{50}$ .
- Trabektedin způsobil změnu v expresi mRNA studovaných adhezních molekul hlavně v primární kultuře 36B, kde došlo k významnému poklesu exprese mRNA E-kadherinu, N-kadherinu, EpCAM a ICAM-1. U ostatních buněčných linií se hladiny těchto molekul změnily méně – u nádorové linie SW 620 došlo k poklesu exprese E-kadherinu a EpCAM, zatímco u linie SW 480 se exprese E-kadherinu a EpCAM zvyšovala. U primární kultury došlo pouze ke snížení exprese mRNA N-kadherinu.
- Nejvíce změn v proteinové expresi adhezních molekul vyvolaných působením trabektedinu bylo nalezeno u primární kultury 36B, kde došlo k poklesu exprese E-kadherinu, N-kadherinu, ICAM-1, FAK i fosfo-FAK. U buněčné linie SW 620 došlo k poklesu exprese E-kadherinu, FAK a fosfo-FAK, zatímco množství EpCAM a ICAM-1 bylo vlivem trabektedinu zvýšeno. Jako slibné se ukázalo působení trabektedinu na FAK a fosfo-FAK, jejichž hladiny se u většiny buněčných linií a primárních kultur snížily.

## 8 Seznam zkratek

- AA - akrylamid
- ALT/AST – alaninaminotransferáza/aspartátaminotransferáza
- APC gen – gen kontrolující buněčný cyklus
- APS – persíran amonný
- bis AA – bis-akrylamid
- BCA – bicinchonová kyselina
- BSA – hovězí sérový albumin
- cDNA – komplementární DNA
- CRC – kolorektální karcinom
- CT – počítačová tomografie
- CYP – cytochrom P450
- DEPC – diethylpyrokarbonát
- DEPC voda – voda bez RNAs
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DTT - dithiotreitol
- ECM – extracelulární matrix
- EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová
- EDTA – kyselina ethylenglykoltetraoctová
- EGFR – epidermální růstový faktor
- EpCAM – epiteliální buněčná adhezivní molekula
- E2F – transkripční faktor regulující buněčný cyklus
- FAK - fokální adhezivní kináza
- FBS - fetální hovězí sérum
- FGFR – fibroblastový růstový receptor
- GIT – gastrointestinální trakt
- HAT – histonacetyltransferáza
- HCl – kyselina chlorovodíková
- HDAC – histondeacetyláza
- ICAM – intercelulární adhezivní molekula
- IgG – Imunoglobulin G
- K-RAS – gen patřící do skupiny RAS
- MDM2 – protoonkogen, jehož proteinový produkt pracuje jako ubiquitin-proteinligáza
- MK – mastné kyseliny

- mRNA – messenger ribonukleová kyselina
- NaCl – chlorid sodný
- PBS – fosfátový pufr s fyziologickým pH
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- PDGFR - receptor pro destičkový růstový faktor
- PIGF – placentální růstový faktor
- PVDF membrána – polyviniliden difluoridová membrána
- RAS – skupina genů kódující proteiny účastnící se v signálních drahách buněk RNA – ribonukleová kyselina
- RT-PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase
- RTG – rentgenové
- SDS – dodecylsírán sodný
- TEM – transanální endoskopická mikrochirurgie
- TOKS – test na okultní krvácení stolice
- UV – ultrafialové
- VCAM – adhezivní molekula
- VEGF – růstový faktor pro endoteliální buňky

## 9 Seznam tabulek

Tab. 1: Klasifikace TNM (21)

Tab. 2: Koncentrace IC50 pro 36B, 39B v 48 hod a pro SW 480, SW 620 v 24; 48; 72 hodinách

Tab. 3: Vyhodnocení blotů denzitometricky

## 10 Seznam obrázků

- Obr. 1: Celosvětový výskyt nejčastějších typů rakoviny v roce 2012 (83)
- Obr. 2: Různá stádia přeměny tkáně ve střevě (6)
- Obr. 3: Incidence a mortalita ČR v průběhu let (8)
- Obr. 4: Rozdíly mezi pohlavními u incidence a mortality CRC v ČR (8)
- Obr. 5: Podíl pacientů v jednotlivých věkových skupinách (8)
- Obr. 6: Podíl klinických stádií v průběhu let v ČR (8)
- Obr. 7: Karcinogeneze (2)
- Obr. 8: Typy chromozomových mutací (30)
- Obr. 9: Zabránění transkripce metylací DNA (29)
- Obr. 10: Tvorba metastáz (28)
- Obr. 11: Růstová křivka při kultivaci buněk (33)
- Obr. 12: Molekula trabektedinu (48)
- Obr. 13: Ovlivnění buněčné linie SW 480 různými koncentracemi trabektedinu v intervalech 24; 48 a 72 hodin
- Obr. 14: Ovlivnění buněčné linie SW 620 různými koncentracemi trabektedinu v intervalech 24; 48 a 72 hodin
- Obr. 15: Ovlivnění buněk 36B a 39B různými koncentracemi trabektedinu v intervalu 48 hodin
- Obr. 16: Porovnání vlivu trabektedinu na migraci buněk 36B (zelená křivka) s kontrolou (červená křivka)
- Obr. 17: Porovnání vlivu trabektedinu na migraci buněk 39B (zelená křivka) s kontrolou (červená křivka)
- Obr. 18: Změny v relativním množství molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk 36B při koncentracích 0 (kontrola) a 5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 19: Změny v relativním množství molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk 39B při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 20: Změny v relativním množství molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk SW 480 při koncentracích 0 (kontrola); 2,5 a 5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 21: Změny v relativním množství molekul EpCAM a ICAM-1 u buněk SW 620 při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 22: Změny v relativním množství molekul E-cadherinu a N-cadherinu u linie 36B při koncentracích 0 (kontrola) a 5 a  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 23: Změny v relativním množství molekul E-cadherinu a N-cadherinu u buněk 39B při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 24: Změny v relativním množství molekul E-cadherinu a N-cadherinu u buněk SW 480 při koncentracích 0 (kontrola); 2,5 a 5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 25: Změny v relativním množství molekul E-cadherinu a N-cadherinu u buněk SW 620 při koncentracích 0 (kontrola); 5 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$  trabektedinu

Obr. 26: Imunobloting u buněčných linie SW 480 s trabektedinem o koncentraci 0; 2,5; 5  $\mu\text{g/ml}$  a SW 620 s trabektedinem o koncentraci 0; 5; 7,5  $\mu\text{g/ml}$

Obr. 27: Imunobloting u buněčných linie 36B s trabektedinem o koncentraci 0; 5 a 39B s trabektedinem o koncentraci 0; 5; 7,5

## 11 Seznam literatury

- (1) BORTLÍK, MUDr. Martin. *Karcinogeneze kolorektálního karcinomu a karcinom asociovaný s idiopatickými střevními záněty: teoretická východiska a jejich důsledky pro klinickou praxi*. Praha, 2009. Disertační práce. 1. lékařská fakulta. str. 4-5
- (2) HOFMANOVÁ, Jiřina. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. 1 vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2017-12-09]. Elportál. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=1126513>. ISSN 1802-128X.
- (3) Colorectal cancer: Symptoms, treatments, risk factors, and causes. *Health News – Medicinal News Today* [online]. Copyright © 2004 [cit. 9.12.2017]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/155598.php>
- (4) MUDr. Diviš P., MUDr. Divišová K., MUDr. Katolická J., MUDr. Rotnágllová S., Kolorektální karcinom – současný pohled na diagnostiku a léčbu, *Med. Praxi* 2016; 13(1); str 34-38
- (5) What Is Colorectal Cancer?. *American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin* [online]. Copyright © 2018 American Cancer Society, Inc. All rights reserved. The American Cancer Society is a qualified 501 [cit. 10.12.2017]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html>
- (6) Swiss colorectal cancer Blood Test joins Liquid Biopsies Race. *Labiotech.eu - Europe's leading Biotech News Website* [online]. Copyright © ktsdesign [cit. 10.12.2017]. Dostupné z: <https://labiotech.eu/swiss-blood-test-for-colorectal-cancer-joins-race-of-liquid-biopsies/>
- (7) SUCHÁNEK Š., VEPŘEKOVÁ G., MÁJEK O., DUŠEK L. a ZVORAL M. Epidemiologie, etiologie, screening a diagnostika kolorektálního karcinomu, včetně diagnosticko-terapeutických zákroků na tlustém střevě. *Onkologie*. 2011, 5(5), 261-266.
- (8) Kolorektum.cz: Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice. *Kolorektum.cz: Program kolorektálního screeningu v České republice. Prevence a vyšetření rakoviny tlustého střeva a konečníku*. [online]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu--epidemiologie-kolorektalniho-karcinomu-v-cr>
- (9) Worldwide data | World Cancer Research Fund International. *World Cancer Research Fund International* [online]. Dostupné z: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>
- (10) Colorectal cancer statistics | World Cancer Research Fund International. *World Cancer Research Fund International* [online]. Dostupné z: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics>



(11) Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al., *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality*, Gut Published Online First: [10.12.2017] doi:10.1136/gutjnl-2015-310912

(12) <http://www.svod.cz>

(13) NEČAS, Emanuel. *Obecná patologická fyziologie*. Praha: Karolinum, 2000. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0051-x. str. 150-172

(14) B. Alberts et al. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Překlad z anglického originálu *Essential Cell Biology*, Garland Publishing, New York, 1998 str. 197-206, 257-274

(15) LIPSKÁ, Ludmila a Vladimír VISOKAI. *Recidiva kolorektálního karcinomu: komplexní přístup z pohledu chirurga*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3026-4.

(16) <http://www.wikiskripta.eu>

(17) LUDVÍKOVÁ, M., M. PEŠTA, R. HOLUBEC JR. a D. KALFERT. Nové aspekty patobiologie nádorů. *Česko-slovenská patologie*. 2009, **45**(4), 94-99.

(18) ŠMARDOVÁ, J. a J. ŠMARDA JR. Jak vznikají nádory? *Universitas*. 2005, **3**(4), 29-37.

(19) CHUA, Terence C., Tristan D. YAN, Keh M. NG, Jing ZHAO a David L. MORRIS. Significance of Lymph Node Metastasis in Patients with Colorectal Cancer Peritoneal Carcinomatosis. *World Journal of Surgery* [online]. 2009, **33**(7), 1488-1494 [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1007/s00268-009-0059-6. ISSN 0364-2313. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00268-009-0059-6>

(20) FUJII, Takaaki, Yuichi TABE, Reina YAJIMA, Satoru YAMAGUCHI, Soichi TSUTSUMI, Takayuki ASAO a Hiroyuki KUWANO. Process of distant lymph node metastasis in colorectal carcinoma: Implication of extracapsular invasion of lymph node metastasis. *BMC Cancer* [online]. 2011, **11**(1), - [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1186/1471-2407-11-216. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-11-216>

(21) DHAR, Dipok Kumar, Hiroshi YOSHIMURA, Naoko KINUKAWA, Riruke MARUYAMA, Mitsuo TACHIBANA, Hitoshi KOHNO, Hirofumi KUBOTA a Naofumi NAGASUE. Metastatic lymph node size and colorectal cancer prognosis. *Journal of the American College of Surgeons* [online]. 2005, **200**(1), 20-28 [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2004.09.037. ISSN 10727515. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751504012578>

(22) RESCH, Annika. Lymph node staging in colorectal cancer: Old controversies and recent advances. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2013, **19**(46), 8515- [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.3748/wjg.v19.i46.8515. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v19/i46/8515.htm>

(23) ONG, Mark L H a John B SCHOFIELD. Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Surgery* [online]. 2016, **8**(3), 179- [cit.

2018-12-12]. DOI: 10.4240/wjgs.v8.i3.179. ISSN 1948-9366. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1948-9366/full/v8/i3/179.htm>

(24) Buněčné kultury – WikiSkripta. [online]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/w/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A9\\_kultury](http://www.wikiskripta.eu/w/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A9_kultury)

(25) *Lékařská fakulta Masarykovy univerzity* [online]. Copyright © [cit. 18.12.2017]. Dostupné z: [http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky\\_MM09.pdf](http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf)

(26) *Bioprojekty* [online]. Copyright © [cit. 18.12.2017]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

(27) KRBAL, Lukáš, Veronika HANUŠOVÁ, Jiří SOUKUP, Stanislav JOHN, Petra MATOUŠKOVÁ a Aleš RYŠKA. Contribution of in vitro comparison of colorectal carcinoma cells from primary and metastatic lesions to elucidation of mechanisms of tumor progression and response to anticancer therapy. *Tumor Biology*[online]. 2016, **37**(7), 9565-9578 [cit. 2017-12-20]. DOI: 10.1007/s13277-016-4839-y. ISSN 1010-4283. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-016-4839-y>

(28) File:Types-of-mutation.png - Wikimedia Commons. [online]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Types-of-mutation.png>

(29) Categories in the TNM staging system . *ResearchGate | Share and discover research* [online]. Copyright © 2008 [cit. 20.12.2017]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Table-12-Categories-in-the-TNM-staging-system\\_261946510\\_tbl6](https://www.researchgate.net/figure/Table-12-Categories-in-the-TNM-staging-system_261946510_tbl6)

(30) Biologie pro bakaláře - Praktikum 2. *Share and Discover Knowledge on LinkedIn SlideShare* [online]. Copyright © 2018 [cit. 4.01.2018]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-praktikum-2>

(31) Kolorektum.cz: Příznaky onemocnění. *Kolorektum.cz: Program kolorektálního screeningu v České republice. Prevence a vyšetření rakoviny tlustého střeva a konečníku.* [online]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-verejnost--kolorektalni-karcinom--priznaky-onemocneni>

(32) *zdravi.euro.cz - Zdravotnictví a medicína* [online]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vysetreni-travici-trubice-moznosti-radiologie-170728>

(33) URBAN, O. DIAGNOSTIKA KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU. *Onkologie* [online]. 2008, **2**(1), 9-11 [cit. 2018-01-10]. Dostupné z: <http://onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/01/02.pdf>

(34) O nádorech tlustého střeva a konečníku » *Linkos.cz. Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* » *Linkos.cz* [online]. Copyright © 2018 ČOS ČLS JEP [cit. 10.01.2018]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a->

[rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-travici-trubice-jicen-zaludek-tenke-strevo-tluste-strevo-konecnik-rit-c15/o-nadorech-tlusteho-streva-a-konecniku/](#)

(35) PENKA, I. a Z. KALA. CHIRURGICKÁ LÉČBA KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU. *Onkologie* [online]. 2008, **2**(1), 12-16 [cit. 2018-01-12]. Dostupné z: [https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-200801-0003\\_Chirurgicka\\_lecba\\_kolorektalniho\\_karcinomu.php](https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-200801-0003_Chirurgicka_lecba_kolorektalniho_karcinomu.php)

(36) JECH, Z. a J. HOCH. CHIRURGICKÁ LÉČBA KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2004, **6**(2), 81-84 [cit. 2018-01-12]. Dostupné z: <http://www.internimedcina.cz/artkey/int-200402-0007.php>

(37) DUŠEK, Ladislav. *Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat*. Praha: Fakultní nemocnice v Motole, 2012. ISBN 978-80-87347-07-2.

(38) Medicabáze.cz - váš online lékařský slovník - Detail hesla. *Medicabáze.cz - váš online lékařský slovník - Vítejte* [online]. Copyright © 2007 MedicaBaze.cz [cit. 12.01.2018]. Dostupné z: [http://www.medicabaze.cz/index.php?&sec=term\\_detail&termId=3021&name=](http://www.medicabaze.cz/index.php?&sec=term_detail&termId=3021&name=)

(39) ČWIERTKA, K. Přehled nechirurgické léčby kolorektálního karcinomu. *Onkologie* [online]. 2008, **2**(1), 17-22 [cit. 2018-01-13]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/01/04.pdf>

(40) HALÁMKOVÁ, J., J. TOMÁŠEK a I. KISS. Pokroky v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. *Remedia*. 2013, **12**(6), 390-394.

(41) Biologická léčba kolorektálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2008, **10**(2), 54-57 [cit. 2018-01-13]. Dostupné z: <https://www.internimedcina.cz/pdfs/int/2008/02/03.pdf>

(42) Yondelis (trabectedin) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. *Medscape Drugs & Diseases - Comprehensive peer-reviewed medical condition, surgery, and clinical procedure articles with symptoms, diagnosis, staging, treatment, drugs and medications, prognosis, follow-up, and pictures* [online]. Copyright © 1994 [cit. 15.01.2018]. Dostupné z: <https://reference.medscape.com/drug/yondelis-trabectedin-999997#4>

(43) D'INCALCI, M. a C. M. GALMARINI. A Review of Trabectedin (ET-743): A Unique Mechanism of Action. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2010, **9**(8), 2157-2163 [cit. 2018-01-15]. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0263. ISSN 1535-7163. Dostupné z: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-10-0263>

(44) [online]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170616137936/anx\\_137936\\_cs.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170616137936/anx_137936_cs.pdf)

(45) Inspirována přírodou: moderní léčiva | www.scienceinschool.org. *Science in School* | www.scienceinschool.org [online]. Dostupné

z: <http://www.scienceinschool.org/cs/content/inspirov%C3%A1na-p%C5%99%C3%ADrodou-modern%C3%AD-l%C3%A9%C4%8Diva>

(46) The p53 tumor suppressor protein - Genes and Disease - NCBI Bookshelf. *National Center for Biotechnology Information* [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/>

(47) *Onkologie* [online]. 2015, **9**(4) [cit. 2018-03-02].

(48) *Klinická onkologie* [online]. 2013, **26**(5) [cit. 2018-03-02].

(49) KLENER, Pavel. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7, 31-32

(50) OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8, 157-159

(51) Epigenetické alterace a jejich klinický význam (1. část). *Labor Aktuell* [online]. 2010, **16**(2), 4-7 [cit. 2018-03-10]. Dostupné z: [http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics\\_czechrepublic/cs\\_CZ/documents/Labor\\_Aktuell/LA2010/LA0210/Epigeneticke.pdf](http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2010/LA0210/Epigeneticke.pdf)

(52) Epigenetické alterace a jejich klinický význam (2. část). *Labor Aktuell* [online]. 2010, **16**(3), 4-8 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: [http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics\\_czechrepublic/cs\\_CZ/documents/Labor\\_Aktuell/LA2010/LA0310/Epigeneticke.pdf](http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2010/LA0310/Epigeneticke.pdf)

(53) SCHETTER, Aaron J., Hirokazu OKAYAMA a Curtis C. HARRIS. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer. *The Cancer Journal* [online]. 2012, **18**(3), 244-252 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1097/PPO.0b013e318258b78f. ISSN 1528-9117. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00130404-201205000-00006>

(54) MATĚJKA, Vít Martin, Jindřich FÍNEK a Milena KRÁLÍČKOVÁ. Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer. *Klinická onkologie* [online]. 2017, **30**(1), 20-27 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.14735/amko201720. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/5117/>

(55) SW480 [SW-480] (ATCC® CCL-228™). ATCC/ in partnership with LGC standards. [Online] 2014. [cit. 2018-04-10]. [http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CCL-228.aspx?geo\\_country=cz#generalinformation](http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CCL-228.aspx?geo_country=cz#generalinformation).

(56) SW620 [SW-620] (ATCC® CCL-227™) . ATCC/ IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS. [Online] 2014. [cit. 2018-04-10]. [http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo\\_country=cz#generalinformation](http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=cz#generalinformation).

(57) Kvantitativní real-time PCR. Labguide [Online][ cit. 2018-04-12]Dostupné:

<http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

(58) HRSTKA, Roman, Tamara KOLÁŘOVÁ, Eva MICHALOVÁ a Bořivoj VOJTĚŠEK. Development of PCR Methods and Their Applications in Oncological Research and Practice. *Klinická onkologie* [online]. 2014, 27(Suppl 1), S69-S74 [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.14735/amko20141S69. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4486/>

(59) Stanovení množství proteinů v buněčném lyzátu [online]. [cit. 2018-04-12]. Dostupné z: <http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/Stanoven%C3%AD%20mno%C5%BEstv%C3%AD%20protein%C5%AF%20v%20bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A9m%20lyz%C3%A1tu.pdf>

(60) Elektrofóreza. *Biochemie*. [Online][ cit. 2018-04-18]. Dostupné: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>

(61) Kovaříková P., et al. Metody studia buněčné migrace a invazivity. *Linkos*. [Online] 2014. [Citace: 18. Srpna 2018.] <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4472.pdf>. ISSN 1802-5307

(62) Larsen, A.K., Galmarini, C.M. & D'Incalci, M. *Cancer Chemother Pharmacol* (2016) 77: 663. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2918-1>

(63) GERMANO, G., R. FRAPOLLI, M. SIMONE, et al. Antitumor and Anti-inflammatory Effects of Trabectedin on Human Myxoid Liposarcoma Cells. *Cancer Research* [online]. 2010, **70**(6), 2235-2244 [cit. 2018-08-22]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2335. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-2335>

(64) DELALOGUE, S., R. WOLP-DINIZ, T. BYRSKI, et al. Activity of trabectedin in germline BRCA1/2-mutated metastatic breast cancer: results of an international first-in-class phase II study. *Annals of Oncology* [online]. 2014, **25**(6), 1152-1158 [cit. 2018-08-22]. DOI: 10.1093/annonc/mdu134. ISSN 0923-7534. Dostupné z: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu134>

(65) BLUM, Joanne L., Anthony GONÇALVES, Noa EFRAT, et al. A phase II trial of trabectedin in triple-negative and HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2016, **155**(2), 295-302 [cit. 2018-08-22]. DOI: 10.1007/s10549-015-3675-x. ISSN 0167-6806. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-015-3675-x>

(66) MICHAELSON, M. D., J. BELLMUNT, G. R. HUDES, et al. Multicenter phase II study of trabectedin in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Annals of Oncology* [online]. 2012, **23**(5), 1234-1240 [cit. 2018-08-22]. DOI: 10.1093/annonc/mdr399. ISSN 0923-7534. Dostupné z: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdr399>

- (67) PREUSSER, Matthias, Sabine SPIEGL-KREINECKER, Daniela LÖTSCH, et al. Trabectedin has promising antineoplastic activity in high-grade meningioma. *Cancer* [online]. 2012, **118**(20), 5038-5049 [cit. 2018-08-22]. DOI: 10.1002/cncr.27460. ISSN 0008543X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.27460>
- (68) M. Ghielmini, E. Colli, E. Erba, D. Bergamaschi, S. Pampallona, J. Jimeno, G. Faircloth, C. Sessa; *In vitroschedule-dependency of myelotoxicity and cytotoxicity of Ecteinascidin 743 (ET-743)*, *Annals of Oncology*, Volume 9, Issue 9, 1 September 1998, Pages 989–993, <https://doi.org/10.1023/A:1008430827281>
- (69) Atmaca, H. & Uzunoglu, S. *Eur Cytokine Netw* (2014) 25: 1. <https://doi.org/10.1684/ecn.2014.0347>
- (70) Peraldo Neia, C., Cavalloni, G., Chiorino, G., Ostano, P., Aglietta, M., & Leone, F. (2016). Gene and microRNA modulation upon trabectedin treatment in a human intrahepatic cholangiocarcinoma paired patient derived xenograft and cell line. *Oncotarget*, 7(52), 86766–86780. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.13575>
- (71) PEĆINA-ŠLAUS, Nives. *Cancer Cell International* [online]. **3**(1), 17- [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1186/1475-2867-3-17. ISSN 14752867. Dostupné z: <http://cancer-ci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2867-3-17>
- (72) Acikgoz E, Guven U, Duzagac F, Uslu R, Kara M, Soner BC, et al. (2015) Enhanced G2/M Arrest, Caspase Related Apoptosis and Reduced E-Cadherin Dependent Intercellular Adhesion by Trabectedin in Prostate Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 10(10): e0141090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141090>
- (73) DERYCKE, Lara D.M. a Marc E. BRACKE. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *The International Journal of Developmental Biology*[online]. 2004, **48**(5-6), 463-476 [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1387/ijdb.041793ld. ISSN 0214-6282. Dostupné z: <http://www.intjdevbiol.com/paper.php?doi=041793ld>
- (74) Peraldo-Neia, C., Cavalloni, G., Soster, M., Gammaitoni, L., Marchiò, S., Sassi, F., ... Leone, F. (2014). Anti-cancer effect and gene modulation of ET-743 in human biliary tract carcinoma preclinical models. *BMC Cancer*, 14, 918. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-14-918>
- (75) BAEUERLE, P A a O GIRES. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer* [online]. 2007, **96**(3), 417-423 [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603494. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/6603494>
- (76) MARTINEZ-CRUZADO, Lucia, Juan TORNIN, Aida RODRIGUEZ, et al. Trabectedin and Camptothecin Synergistically Eliminate Cancer Stem Cells in Cell-of-Origin Sarcoma Models. *Neoplasia* [online]. 2017, **19**(6), 460-470 [cit. 2018-08-23]. DOI:

10.1016/j.neo.2017.03.004. ISSN 14765586. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147655861730088X>

(77) ALEXIOU, D, A.J KARAYIANNAKIS, K.N SYRIGOS, A ZBAR, A KREMMYDA, I BRAMIS a C TSIGRIS. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *European Journal of Cancer* [online]. 2001, **37**(18), 2392-2397 [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1016/S0959-8049(01)00318-5. ISSN 09598049. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804901003185>

(78) SULZMAIER, Florian J., Christine JEAN a David D. SCHLAEPFER. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2014, **14**(9), 598-610 [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1038/nrc3792. ISSN 1474-175X. Dostupné z:  
<http://www.nature.com/articles/nrc3792>

(79) Golubovskaya, V. M. (2014). Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *19*, 687–706.

(80) LE BOEUF, Fabrice, François HOULE, Mark SUSSMAN, Jacques HUOT a Mark GINSBERG. Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK) on Ser732 Is Induced by Rho-dependent Kinase and Is Essential for Proline-rich Tyrosine Kinase-2-mediated Phosphorylation of FAK on Tyr407 in Response to Vascular Endothelial Growth Factor. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2006, **17**(8), 3508-3520 [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1091/mbc.e05-12-1158. ISSN 1059-1524. Dostupné z:  
<http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e05-12-1158>

(81) WESTHOFF, M. A., B. SERRELS, V. J. FINCHAM, M. C. FRAME a N. O. CARRAGHER. Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2004, **24**(18), 8113-8133 [cit. 2018-08-23]. DOI: 10.1128/MCB.24.18.8113-8133.2004. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.24.18.8113-8133.2004>

(82) WHO | Cancer. *WHO | World Health Organization* [online]. Copyright © [cit. 28.08.2018]. Dostupné z: <http://www.who.int/cancer/en/>

(83) Cancer Today . *Global Cancer Observatory* [online]. Dostupné z: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color\\_palette=default](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default)