

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**VLIV FLUBENDAZOLU NA PODÁNÍ  
TEMOZOLOMIDU  
V BUŇKÁCH GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Barbora Vítovcová

Hradec Králové 2022

Bc. Kateřina Dvořáková

## **Poděkování**

Chtěla bych tímto poděkovat své vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. a své konzultantce PharmDr. Barboře Vítovcové za jejich ochotu, odborné vedení práce, cenné rady, náměty a odborné připomínky. Také děkuji doc. RNDr. Věře Králové, Ph.D., RNDr. Veronice Skarkové, Ph.D. a všem dalším zaměstnancům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za ochotu a vstřícnost. Za provedení LC/MS analýzy děkuji PharmDr. Adamu Skarkovi, Ph.D. z UHK. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu po celou dobu studia.

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

V Hradci Králové

Bc. Kateřina Dvořáková

# OBSAH

OBSAH.....	4
ABSTRAKT .....	7
ABSTRACT.....	8
1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1 Vznik a vývoj nádoru .....	10
2.2 Glioblastoma multiforme .....	11
2.2.1 Etiologie a rizikové faktory vzniku GBM.....	12
2.2.2 Prognóza.....	12
2.2.3 Zobrazovací metody v diagnostice GBM .....	13
2.2.3.1 Počítačová tomografie.....	13
2.2.3.2 Magnetická rezonance.....	13
2.2.3.3 Pozitronová emisní tomografie .....	13
2.2.4 Molekulární patofyziologie.....	13
2.2.4.1 EGFR.....	14
2.2.4.2 IDH1.....	14
2.2.4.3 p53.....	14
2.2.4.4 STAT3.....	14
2.2.5 Léčba .....	15
2.2.5.1 Chirurgická léčba .....	15
2.2.5.2 Radioterapeutická léčba .....	15
2.2.5.3 Chemoterapeutická léčba - temozolomid.....	16
2.2.5.4 Alternativní způsoby léčby – bevacizumab a ivermektin .....	18
2.2.5.4.1 Bevacizumab .....	18
2.2.5.4.2 Ivermektin.....	19
2.3 Mikrotubuly jako cíl nádorové terapie .....	20
2.3.1 Flubendazol .....	22
3. CÍLE .....	24

4.	METODIKA A MATERIÁL .....	25
4.1	Materiál .....	25
4.1.1	Buněčné linie.....	25
4.1.2	Experimentální zvířata .....	25
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	26
4.1.4	Chemikálie .....	26
4.1.5	Pomůcky.....	28
4.2	Stanovení viability buněk metodou WST-1 .....	28
4.3	Fázový kontrast .....	29
4.4	Imunofluorescenční barvení buněk .....	29
4.5	Kvantifikace proteinů metodou Western blot .....	30
4.5.1	Příprava buněčného lyzátu .....	30
4.5.2	Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody.....	31
4.5.3	Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu.....	32
4.5.4	Imunoblotting.....	34
4.5.5	Detekce proteinů .....	35
4.6	Kvantifikace mRNA metodou RT-PCR.....	36
4.6.1	Izolace RNA pomocí kolonek.....	36
4.6.2	Příprava cDNA.....	37
4.6.3	PCR amplifikace jednovláknové cDNA .....	38
4.7	Luminiscenční test buněčné apoptózy .....	38
4.8	Stanovení léčiv v biologickém materiálu pomocí LC/MS.....	39
4.9	Experiment <i>in vivo</i> .....	40
4.9.1	Implantace buněk do modelového organismu.....	40
4.9.2	Zpracování nádorů z nu-nu myši pro RNA analýzu .....	42
4.9.3	Zpracování nádorů z nu-nu myši pro WB analýzu .....	42
4.10	Statistická analýza.....	43
5.	VÝSLEDKY .....	44
5.1	Experimenty <i>in vitro</i> .....	44
5.1.1	Vliv TMZ a FLU na proliferaci buněčných linií A172, T98G a U118MG.....	44
5.1.2	Vliv kombinace TMZ + FLU na proliferaci buněčných linií.....	46
5.1.2.1	Stanovení proliferace buněk ovlivněných kombinací TMZ + FLU.....	46

5.1.2.2	Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na morfologii buněk .....	48
5.1.3	Vliv kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet.....	50
5.1.3.1	Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU pomocí mikroskopie.....	50
5.1.3.2	Stanovení markerů spojených s mikrotubulárním cytoskeletem .....	52
5.1.4	Vliv kombinace TMZ + FLU na aktivitu STAT3 a apoptózu .....	53
5.1.4.1	Stanovení exprese mRNA vybraných markerů.....	53
5.1.4.2	Stanovení proteinové exprese vybraných markerů .....	54
5.1.4.3	Stanovení aktivity kaspáz 3/7.....	56
5.1.5	Vstup TMZ a FLU do buněk GBM při podání jejich kombinace.....	56
5.2	Experimenty <i>in vivo</i> .....	58
5.2.1	Implantace buněk U118MG do modelového organismu .....	58
5.2.1.1	Vliv kombinace TMZ + FLU na růst nádorů v nu-nu myších .....	58
5.2.1.2	Vliv kombinace TMZ + FLU na aktivitu STAT3 a vyvolání apoptotické buněčné smrti u vzorků získaných z nu-nu myší .....	59
5.2.1.2.1	Stanovení mRNA vybraných markerů u vzorků získaných z nu-nu myší .....	59
5.2.1.2.2	Stanovení proteinové exprese vybraných markerů u vzorků získaných z nu-nu myší.....	59
5.2.2	Implantace buněk U118MG do modelového organismu – 2. pokus.....	61
5.2.2.1	Vliv kombinace TMZ + FLU na růst nádorů v nu-nu myších .....	61
5.2.3	Hodnocení proliferačního indexu Ki67 u nádorů získaných z nu-nu myší .....	62
5.2.4	Stanovení distribuce testovaných léčiv při podání TMZ, FLU a jejich kombinace modelovému organismu <i>in vivo</i> .....	62
6.	DISKUSE .....	65
7.	ZÁVĚR.....	70
8.	POUŽITÉ ZKRATKY .....	71
9.	SEZNAM TABULEK .....	73
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	74
11.	POUŽITÁ LITERATURA .....	76

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Kateřina Dvořáková

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv flubendazolu na podání temozolomidu v buňkách glioblastoma multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM) je jedním z nejčastějších a nejagresivnějších nádorů mozku u dospělých. I přes značné pokroky v léčbě se jedná o nevléčitelné nádorové onemocnění s velmi špatnou prognózou a s mediánem přežití pouze 12 až 15 měsíců od stanovení diagnózy. Zlatým standardem léčby je maximální možná chirurgická resekce následovaná chemo-radioterapií za použití protinádorového léčiva temozolomidu (TMZ). Problémem u použití TMZ však bývá rychle se rozvíjející rezistence.

Cílem této práce bylo prozkoumat účinek potenciálního protinádorového léčiva, anthelmintika flubendazolu (FLU) a účinek FLU v kombinaci s TMZ na buňky GBM.

Pro tuto práci byly použity dvě GBM buněčné linie - A172 a T98G. FLU obecně vykazoval vyšší efekt na životnost buněk GBM, zejména u buněk T98G. Navíc použití různých kombinací TMZ + FLU prokázalo ještě vyšší inhibiční účinek na životaschopnost buněčných linií GBM. Kombinace TMZ + FLU také snižovala expresi  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ III-tubulinu, zároveň byly pozorovány zajímavé změny v expresi STAT3 a EGFR a dále snížení exprese cdc2 a cyklinu B1, což naznačuje zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M.

Kombinace TMZ + FLU také vykazovala inhibiční efekt *in vivo*, kde opět bylo možné pozorovat snížení exprese vybraných markerů buněčného cyklu potvrzující předchozí získané výsledky. Tyto výsledky naznačují možný profit z použití kombinace léčiv, který je nutné podrobit dalšímu výzkumu.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Dvořáková

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of flubendazole on temozolomide treatment in glioblastoma cells

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common and aggressive brain tumors in adults. Despite significant advances in treatment, GBM remains to have very poor prognosis and median survival of only 12 to 15 months after diagnosis. Standard treatment consists of maximal possible surgical resection followed by chemo-radiotherapy with antitumor drug temozolomide (TMZ), which use is problematic due to fast developing chemoresistance.

The aim of this study was to examine the effect of potential anticancer drug, anthelmintic flubendazole (FLU) and effect of FLU in combination with TMZ on GBM cells.

For this purpose, two GBM cell lines were used - A172 and T98G. In general FLU reduced cell proliferation more, especially in T98G cells. Moreover, the use of different combinations of TMZ + FLU showed even higher inhibitory effect on the viability of GBM cell lines. The combination of TMZ + FLU reduced the protein level of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ III-tubulin, simultaneously interesting changes in STAT3 and EGFR expression, as well as lower levels of cdc2 and cyclin B1 were observed, indicating possible cell cycle arrest in the G2/M phase.

TMZ + FLU combination also showed inhibitory effect *in vivo*, where the decrease of selected cell cycle markers was detected confirming our previous results. These results suggest possible benefit of the TMZ + FLU combination use prompting further investigation.



# 1. ÚVOD

Glioblastoma multiforme (GBM) je nejčastější a nejagresivnější maligní nádor mozku u dospělých. Vzniká z astrocytů a je Světovou zdravotnickou organizací označován jako gliom IV. stupně. Medián přežití je pouze 12 až 15 měsíců od stanovení diagnózy, neboť možnosti léčby jsou velmi omezené (Carlsson a kol., 2014; Jiapaer a kol., 2018).

Současným standardem léčby GBM je maximální možná chirurgická resekce nádoru s následnou radioterapií a chemoterapií. Úplná chirurgická resekce je často neproveditelná zejména z důvodu umístění nádoru v důležitých oblastech mozku (Carlsson a kol., 2014).

Omezené je také kvůli přítomnosti hematoencefalické bariéry podání cytostatik. Dnes nejpoužívanějším cytostatikem je alkylační činidlo temozolomid (TMZ). U některých pacientů je účinnost TMZ nízká od začátku léčby, u ostatních se účinnost snižuje po určité době, neboť buňky GBM se stávají na TMZ rezistentní. Z tohoto důvodu je v popředí vědeckého zájmu snaha o vývoj nových léčiv, která by zlepšila léčbu tohoto dnes nevléčitelného onemocnění. Jelikož je vývoj zcela nových léčiv velmi dlouhý a nákladný proces, výhodnou alternativní možností je hledání účinných látek mezi již běžně používanými léčivy a následná změna jejich indikace (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010; Carlsson a kol., 2014).

V této práci jsme studovali vliv potenciálního chemoterapeutika a dnes v humánní a veterinární medicíně běžně používaného anthelmintika flubendazolu (FLU) na účinek TMZ v buňkách GBM *in vitro* i *in vivo*.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 *Vznik a vývoj nádoru*

Rakovina je onemocnění, při kterém dochází k nekontrolovatelnému dělení a růstu buněk. Vzniká na základě kumulace genetických abnormalit. Ty mohou být způsobeny chybami při buněčném dělení, různými rizikovými faktory, jako jsou faktory biologické (např. onkogenní viry), faktory fyzikální (např. ionizující záření) či chemické (např. kancerogeny), nebo mohou být získány dědičně (Klener, 2011; <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>).

Mutace, které vedou k tvorbě nádorových buněk, postihují převážně protoonkogeny, tumor-supresorové geny a geny pro opravu DNA. Protoonkogeny jsou geny, které obecně podporují buněčný růst. Mutace v protoonkogenech jsou typicky dominantního charakteru, a proto stačí pouze jedna mutovaná alela k přeměně zdravé buňky v nádorovou. Mutované protoonkogeny nazýváme jako onkogeny (Wang a kol., 2019).

Tumor-supresorové geny se naopak podílejí na opravě poškozené DNA, inhibují buněčné dělení, indukují apoptózu a potlačují tvorbu metastáz. Mutace jsou v tomto případě recesivní povahy a je tedy potřeba přítomnosti obou mutovaných alel ke vzniku nádorové buňky. Mezi tumor-supresorové geny zařazujeme například Rb protein, p53 nebo homolog fosfatázy a tenzinu (PTEN) (Wang a kol., 2019).

Ke vzniku nádorového onemocnění stačí i pouze jedna nádorově zvrhlá buňka či malá skupina buněk. Nádorové buňky rostou na rozdíl od normálních buněk nezávisle na růstových faktorech a nereagují na inhibiční podněty z okolí. Často jsou schopné uniknout imunologickému dozoru díky odlišným povrchovým antigenům, či odlišnému tvaru. Zásadní je jejich schopnost šířit se i do jiných částí těla a vytvářet tak metastázy (<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>).

Přítomnost metastáz obecně svědčí o špatné prognóze. Samotný proces vzniku metastáz zahrnuje invazi buněk skrz extracelulární matrix, migraci buněk krevními a lymfatickými cévami a dělení buněk v místech vzdálených od primárního nádoru (Kramer a kol., 2013).

Rakovina dnes patří mezi nejčastější příčiny úmrtí po celém světě (Kramer a kol., 2013). Incidence stále stoupá, což je dáno mimo jiné zvyšujícím se průměrným věkem obyvatelstva (s rostoucím věkem se v těle snižuje schopnost likvidovat buňky s poškozenou DNA) a životním stylem (kouření, fyzická inaktivita, špatné stravovací návyky, obezita) (Roy a Saikia, 2016; <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>).

## ***2.2 Glioblastoma multiforme***

Glioblastom je jedním z nejběžnějších, nejinvazivnějších a nejagresivnějších primárních nádorů mozku u dospělých. Představuje až 70 % všech primárních nádorů mozku. Medián přežití se udává pouze 12 až 15 měsíců od stanovení diagnózy (Jiapaer a kol., 2018).

Glioblastoma multiforme (GBM) zařazujeme do skupiny astrocytomů tzv. astrogliálních nádorů. Dle klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) je GBM podle stupně malignity (grade) označován jako WHO grade IV (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010).

U starší populace se glioblastom nazývaný jako primární glioblastom (až 90 % případů GBM) vyvíjí většinou de novo (z astrocytů nebo prekurzorových buněk). Naopak u mladších pacientů (do 45 let) se častěji vyskytuje sekundární glioblastom (10 % případů GBM), který se vyvíjí z gliomu nižšího stupně malignity. Klinicky jsou si všechny glioblastomy velmi podobné. Charakteristická je hojná nekróza, pleomorfismus a vaskularizace. Buňky glioblastomu migrují podél nervových cest a krevních cév (Lah, Novak a Breznik, 2020; Vítovcová a kol., 2020).

I přestože exprimují značným množstvím proteáz umožňujících invazi, tak jen zřídka opouštějí centrální nervový systém (CNS). Metastázy jsou u tohoto onemocnění vzácné. Pacient umírá kvůli rychlé progresi a agresivnímu chování nádoru na nervová centra ještě dříve, než je možné případné metastázy detekovat. Hlavním důvodem časného relapsu onemocnění je hlavně difúzní invaze tzv. „partyzánských“ buněk a odolnost glioblastomu vůči radioterapii a chemoterapii (dáno zejména přítomností hematoencefalické bariéry) (Lah, Novak a Breznik, 2020).

GBM je nejčastěji lokalizovaný v mozkových hemisférách (hlavně v supratentoriální oblasti) a méně pak v mozečku, mozkovém kmeni a míše (Hanif a kol., 2017).

GBM se u pacientů často projevuje nespecifickými příznaky – bolestí hlavy, nevolnostmi, záchvaty, poruchami paměti, změnou osobnosti apod. (Sasmita a kol., 2018). Symptomy závisí zejména na oblastech mozku, které nádor ovlivňuje. Například poruchy sluchu a zraku jsou typické u nádoru lokalizovaného ve spánkovém laloku. Změna osobnosti se pak často objevuje u nádoru přítomného v oblasti čelního laloku. Zvýšený nitrolební tlak způsobený zvětšováním nádoru a okolního edému má za následek progresivní bolest hlavy (Hanif a kol., 2017).

Incidence tohoto nádorového onemocnění je zhruba 0,6 až 5 nových případů na 100 000 obyvatel za rok (Grech a kol., 2020). Častěji se vyskytuje u mužů než u žen. Výskyt tohoto onemocnění zřetelně koreluje s věkem (přibližně 50 % pacientů je starších 65 let) (Sasmita a kol., 2018).

### **2.2.1 Etiologie a rizikové faktory vzniku GBM**

I přes veškerou snahu mnoha studií zůstává původ glioblastomu a jeho patofyziologický mechanismus nejasný (Lukas a kol., 2019). Etiologie je zřejmě multifaktoriální (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010).

Na rozdíl od jiných typů nádorových onemocnění nejsou u GBM známé žádné rizikové faktory (ani např. kouření, dieta, expozice pesticidům) vzniku onemocnění kromě působení vysokých dávek ionizujícího záření. Genetická predispozice byla pozorována také pouze v jednotkách procent případů. Naopak protektivní účinek před vznikem GBM by mohli mít lidé trpící alergiemi (zřejmě z důvodu aktivace imunitního dohledu) (Hanif a kol., 2017).

### **2.2.2 Prognóza**

Lepší prognózu mají mladší pacienti a pacienti s dobrým celkovým fyzickým stavem. Příznivější prognózu vykazují také nádory supratentoriální a cerebelární oproti tumorům v mozkovém kmeni a diencephalonu. Nádory větší než 5 cm nebo nádory překračující středovou čáru mozku jsou pak spjaty s horší prognózou (Davis, 2016).

## **2.2.3 Zobrazovací metody v diagnostice GBM**

### **2.2.3.1 Počítačová tomografie**

Počítačová tomografie (CT vyšetření) je základní vyšetření při podezření na nádor mozku. Jedná se o neinvazivní metodu, která poskytuje základní informace o umístění a velikosti nádoru (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010). Značné využití má také v diagnostice u pacientů, kteří z nějakého důvodu nemohou podstoupit vyšetření magnetickou rezonancí (např. pacienti s kardiostimulátorem) (Hanif a kol., 2017). Typickým obrazem glioblastomu na CT jsou hypodenzní ložiska (Young a kol., 2015).

### **2.2.3.2 Magnetická rezonance**

Zlatým standardem mezi zobrazovacími technikami při diagnostice GBM je magnetická rezonance (MR). MR umožňuje díky vynikajícímu kontrastu měkkých tkání zobrazit složitost a heterogenitu nádoru lépe než CT vyšetření (Hanif a kol., 2017). Lépe také dokáže rozlišit bílou a šedou mozkovou hmotu a cévní a nervové struktury. Pro lepší zobrazení mozkových struktur se pacientovi aplikuje kontrastní látka (nejčastěji na bázi gadolinia). Pro GBM je typické výrazné postkontrastní syčení se známkami centrálních nekrotických a edémů kolem nádoru (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010). Okraje nádoru pak mohou být nepravidelné či špatně diferencované (Young a kol., 2015).

### **2.2.3.3 Pozitronová emisní tomografie**

Další, v praxi méně využívanou metodou, je pozitronová emisní tomografie (PET). Tato metoda spadající do nukleární medicíny přináší informace o metabolických změnách v tkáních. Při diagnostice nádorů CNS má však své omezení zejména kvůli fyziologickému intenzivnímu vychytávání glukózy v mozku (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010).

## **2.2.4 Molekulární patofyziologie**

Primární a sekundární GBM se vyvíjejí z různých genetických prekurzorů a nesou některé odlišné genetické změny. Pro primární GBM je typická nadměrná exprese receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), mutace PTEN a ztráta chromozomu 10. Naopak u sekundárního GBM pozorujeme častěji mutace

isocitrátdehydrogenázy-1 (IDH1, slouží také k diferenciaci sekundárního GBM od primárního), mutace p53 a ztrátu dlouhého raménka chromozomu 19 (19q) (Wilson, Karajannis a Harter, 2014).

#### **2.2.4.1 EGFR**

EGFR je transmembránová tyrosinkináza, jejíž navazující signální dráhy v GBM podporují buněčné dělení, invazivitu a odolnost nádoru vůči chemoterapii. Amplifikace EGFR je doprovázena zvýšenou expresí proteinu EGFR. Téměř u 40 % případů primárních GBM nacházíme amplifikaci EGFR (Thakkar a kol., 2014). V asi 50 % případů je amplifikace EGFR doprovázena také mutací genu kódujícího EGFRvIII (aktivní varianta EGFR), která vede ke zvýšené proliferaci nádorových buněk, k rychlejšímu růstu nádoru a je spojena s horší prognózou (Aldape a kol., 2014).

#### **2.2.4.2 IDH1**

IDH1 je NADP<sup>+</sup>-dependentní enzym, který katalyzuje oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na 2-oxoglutarát. Současně se také redukuje NADP<sup>+</sup> na NADPH. Nejčastěji dochází k mutaci v aktivním místě enzymu v kodónu 132, což vede k abnormální enzymatické funkci a k produkci 2-hydroxyglutarátu. Mutace IDH1 také narušují metylaci histonů a vedou ke zvýšené proliferaci nádorových buněk (Cloughesy a kol., 2014). Mutace se vyskytují až v 80 % případů sekundárního GBM (Sasmita a kol., 2018).

#### **2.2.4.3 p53**

P53 je nádorový supresorový protein, který fyziologicky v buňkách iniciuje opravu DNA či apoptózu v případě nevratného poškození (Carlsson a kol., 2014). Mutace genu p53 silně koreluje se vznikem nádorů vysokého stupně. Mutace byla nalezena zhruba u 30 % primárních a 90 % sekundárních GBM a vyskytuje se častěji u mladších pacientů (Thakkar a kol., 2014; Sasmita a kol., 2018).

#### **2.2.4.4 STAT3**

STAT3 neboli převodník signálu a aktivátor transkripce 3 je onkogen, jehož exprese je zvýšena u zhruba 70 % nádorových onemocnění, včetně GBM. STAT3 podporuje proliferaci nádorových buněk, angiogenezi a metastazování. V současné době

je tak velká snaha najít vhodné látky, které by tento onkogen inhibovaly, a mohly tak zlepšit prognózu GBM a řady dalších nádorových onemocnění (Lin a kol., 2019).

## **2.2.5 Léčba**

GBM je nevléčitelné nádorové onemocnění. Cílem tedy není pacienta vyléčit, ale prodloužit a zkvalitnit dobu jeho života. Léčba je komplexní a spočívá v maximální možné chirurgické resekci s následnou radioterapií a chemoterapií (Thakkar a kol., 2014). Konkrétní strategie léčby se vždy odvíjí od velikosti a lokalizace nádoru, jeho biologického charakteru a v neposlední řadě od věku a celkového fyzického a psychického stavu samotného pacienta (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010).

### **2.2.5.1 Chirurgická léčba**

Chirurgická resekce nádoru v maximální bezpečné míře má zásadní roli v léčbě GBM. Maximální resekce je však pro každý nádor specifická a záleží zejména na jeho velikosti a na umístění cév a důležitých oblastí mozku.

Chirurgickou resekci klasifikujeme jako celkovou totální resekci či subtotální resekci v případě neúplného odstranění nádoru. Medián přežití je však větší u pacientů s více než 90 % resekci nádoru než v případě pacientů, u kterých bylo možné provést jen velmi omezenou resekci (Carlsson a kol., 2014).

Úplné chirurgické resekce je však kvůli umístění nádoru v důležitých částech mozku (včetně oblastí ovládající řeč a motorické funkce) a schopnosti buněk rychle proliferovat a infiltrovat (buňky vždy v okolních částech mozku zůstávají) velmi obtížné dosáhnout (Davis, 2016; Jiapaer a kol., 2018).

### **2.2.5.2 Radioterapeutická léčba**

Radioterapeutická léčba probíhá pomocí ionizujícího záření, které přímo vyvolává v proliferujících buňkách jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy DNA. Nepřímo pak může záření interagovat s jinými molekulami v buňce (např. s vodou), čímž dochází k radiolýze vody a následnému vzniku volných radikálů, které mohou iniciovat další reakce vedoucí k buněčné smrti (Wilson, Karajannis a Harter, 2014; Carvalho a Villar, 2018).

Před zahájením vlastní radioterapie čeká pacient po chirurgické resekci až 4 týdny, než dojde k zahojení rány po kraniotomii. Typická celková dávka záření je 60 Gy podávaná ve frakcích 1,8 až 2 Gy pět dní v týdnu po dobu šesti týdnů (Davis, 2016).

Kombinace radioterapie s podáním temozolomidu (TMZ) je účinnější než samotná radioterapie, protože dochází k synergii účinků ozáření s účinky TMZ, což zvyšuje pravděpodobnost smrti buněk GBM (Schreck a Grossman, 2018).

Radioterapie je spojena i s některými nežádoucími účinky. Mezi časté nežádoucí účinky patří únava, sucho v ústech, zarudlá pokožka hlavy, ztráta vlasů apod. (Lee a kol., 2013).

### **2.2.5.3 Chemoterapeutická léčba - temozolomid**

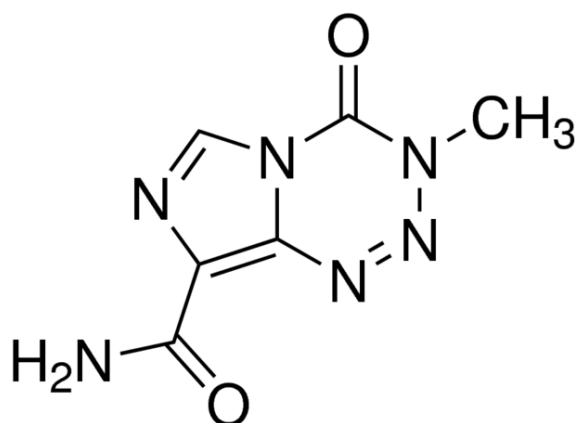
Účinnost chemoterapeutické léčby je značně omezena kvůli neprostupnosti chemoterapeutik skrz hematoencefalickou membránu. Existuje zatím pouze omezené množství cytostatik, které jsou schopné dosáhnout dostatečné koncentrace v mozковém nádoru (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010).

Nejpoužívanější chemoterapeutickou léčbou pacientů s GBM je podávání TMZ. TMZ je strukturně imidazotetrazinon (Schreck a Grossman, 2018). V organismu působí jako proléčivo. Je stabilní při kyselém pH, proto se podává hlavně perorálně. Při perorálním podání se rychle a úplně vstřebává v gastrointestinálním traktu (GIT) (Arora a Somasundaram, 2019; <https://go.drugbank.com/drugs/DB00853>). Při fyziologickém pH organismu se neenzymaticky hydrolyzuje na aktivní sloučeninu 5-(3-methyltriazin-1-yl)imidazol-4-karboxamid (MTIC). MTIC je pak rychle degradován na vysoce reaktivní methyldiazonium a na neaktivní metabolit 5-aminoimidazol-4-karboxamid (AIC), který je následně vyloučen ledvinami (Ostermann a kol., 2004; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Temozolomide>).

Farmakokinetika TMZ je v rozmezí terapeutického dávkování lineární (Ostermann a kol., 2004). Maximální plazmatická koncentrace roste přímo úměrně s podanou dávkou. *In vitro* je biologický poločas TMZ ve fosfátovém pufru při 37 °C a pH 7,4 1,9 hod. Jeho aktivní sloučenina MTIC má za stejných podmínek biologický poločas 2 minuty. V lidském těle se TMZ velmi rychle absorbuje a maximální plazmatické koncentrace dosahuje 1 hodinu po podání (Baker a kol., 1999).



Pacientům se TMZ obvykle podává denně v dávce 75 mg/m<sup>2</sup> po dobu šesti týdnů, po nichž následuje doba klidu přibližně jeden měsíc po dokončení radioterapie. Poté se TMZ podává v dávce 150 mg/m<sup>2</sup> jednou denně po dobu pěti dnů. Dále následuje 23 dnů bez léčby. Pokud je léčba tolerována, dávka se zvyšuje až na 200 mg/m<sup>2</sup> po dobu pěti po sobě jdoucích dnů v každém měsíci. Léčba je tedy dlouhodobá a opakuje se v cyklech (tzn. 5 dní podání TMZ + 23 dní bez léčby) (Davis, 2016).



**Obrázek 1** Chemická struktura temozolomidu  
(zdroj: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/t2577>)

TMZ patří do skupiny alkylačních cytostatik. Na buňky působí tak, že přidává methylovou skupinu k bázím purinu a pyrimidinu v DNA (Karachi a kol., 2018; Schreck a Grossman, 2018). To způsobí substituci thyminu za cytosin během replikace DNA, čímž se vytváří nekomplementární pár bází. To nakonec vede k poškození buněk, zastavení buněčného cyklu při přechodu z G2 fáze do M fáze a následné apoptóze (Schreck a Grossman, 2018).

TMZ je hlavně díky své schopnosti procházet hematoencefalickou bariérou (velikost 194 Da, lipofilní) nejčastěji používané protinádorové léčivo při léčbě pacientů s glioblastomem (Karachi a kol., 2018). Nádory mozku vykazují typicky zásaditější pH než zdravé tkáně, což podporuje aktivaci TMZ přímo v nádorové tkáni (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00853>).

Problémem podání TMZ však je, že u zhruba poloviny pacientů TMZ není účinný, neboť mají zvýšenou aktivitu methylguanin-DNA-methyltransferázy (MGMT), která opravuje DNA poškozenou TMZ. Nemá-li tedy pacient methylovaný promotor

genu MGMT, vytvoří se protein, který může snížit účinek TMZ. Naopak je-li promotor genu methylován (a tedy umlčen), nedochází k translaci proteinu MGMT a nádorové buňky jsou k TMZ citlivější, což zlepšuje odezvu na léčbu (Young a kol., 2015). Nicméně ani u pacientů citlivých na TMZ nevede jeho podání k uzdravení, protože se buňky GBM stávají na TMZ rezistentní. V nádorové tkáni se navíc nachází pouze cca 20 % plazmatické koncentrace a možnost dalšího zvýšení je omezena kvůli toxicitě TMZ (Karachi a kol., 2018; Schreck a Grossman, 2018; Skarková a kol., 2019).

TMZ může způsobovat významné vedlejší účinky, jako je myelosuprese (závažnější u žen a geriatrických pacientů) či poškození jater (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00853>). U některých pacientů se také objevuje zácpa, malátnost a nevolnost (Schreck a Grossman, 2018). Snížit riziko nevolnosti a zároveň zvýšit absorpci léčiva může užívání TMZ nalačno (jídlo absorpci snižuje) (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00853>).

Nejen kvůli výše zmíněným úskalím, které souvisejí s podáním TMZ, je v posledních letech velká snaha nalézt vhodná léčiva, která by v kombinaci s tímto chemoterapeutikem zlepšila účinek léčby. Jako slibná kombinace se zdá být například kombinace TMZ s irinotekanem a vinkristinem (popř. i s bevacizumabem) u mladších pacientů. Aktivní metabolit irinotekanu SN-38 inhibuje topoizomerázu I a následně i replikaci DNA. Vinkristin zase působí jako inhibitor tvorby mikrotubulů v mitotickém vřeténku, což vede k zastavení dělení buněk v metafázi. Tento režim terapie je však stále ve fázi výzkumu (Tsakatikas a kol., 2021).

Další slibnou kombinací léčiv, která je také ve fázi výzkumu, by mohla být kombinace TMZ, vinblastinu a mebendazolu. Zdá se, že kombinace těchto léčiv v dávkách, které se běžně používají, vykazuje synergický účinek při indukci poškození nádorových buněk a vede k zastavení jejich buněčného cyklu. Výhodou těchto léčiv je také pacienty obecně dobrá snášenlivost (Kipper a kol., 2018).

#### ***2.2.5.4 Alternativní způsoby léčby – bevacizumab a ivermektin***

##### **2.2.5.4.1 Bevacizumab**

Bevacizumab je lidská rekombinantní IgG monoklonální protilátka, která se specificky váže na vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). VEGF hraje důležitou roli v angiogenezi a tedy i v růstu a proliferaci nádorových buněk. Bevacizumab zabraňuje interakci VEGF s jeho receptory na povrchu endoteliálních

buněk, čímž se zamezuje tvorba nových krevních cév a dochází ke snížení prokrvení nádoru (Tsakatikas a kol., 2021, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00112>). Zároveň dochází i ke snížení intersticiálního tlaku v nádoru, což umožňuje lepší průnik nízkomolekulárních cytostatik. Proto se v terapii často kombinují cytostatika právě s bevacizumabem (Klener a Klener, 2010).

V klinické praxi se bevacizumab používá k léčbě pokročilé rakoviny plic, tlustého střeva, ledvin či v kombinaci s paklitaxelem nebo docetaxelem k léčbě metastazujícího karcinomu prsu. Slibné účinky může mít i v léčbě recidivujícího GBM (Klener a Klener, 2010; <https://go.drugbank.com/drugs/DB00112>).

Strukturou je bevacizumab velká molekula, která špatně prochází buněčnými membránami a není odolná vůči proteolýze v GITu, což vede ke špatné absorpci léčiva po perorálním podání. Z toho důvodu se podává nejčastěji intravenózně (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00112>).

Mezi nejčastější nežádoucí účinky spojené s podáním bevacizumabu patří epistaxe, bolesti hlavy, proteinurie, hypertenze apod. (Tsakatikas a kol., 2021).

#### **2.2.5.4.2 Ivermektin**

Ivermektin je anthelmintikum, které se používá k léčbě střevních infekcí způsobených červy. Patří do rodiny makrocyclických laktonových sloučenin zvaných avermektiny. Ivermektin se váže na glutamátém řízené chloridové iontové kanály v nervových a svalových buňkách, což vede k hromadění chloridových iontů v buňce a k následné paralýze a smrti parazita (Mudassar a kol., 2020).

Před toxickými účinky ivermektinu na nervové buňky člověka chrání intaktní hematoencefalická bariéra. Příjem léčiva do mozku je omezen v důsledku přítomnosti efluxní transmembránové pumpy P-glykoproteinu. Zdá se však, že obecně avermektiny mají potenciál inhibovat tento transportér a ve vhodných koncentracích by mohly skrz hematoencefalickou bariéru pronikat a mohly by tak být i slibným léčivem gliomů (Mudassar a kol., 2020).

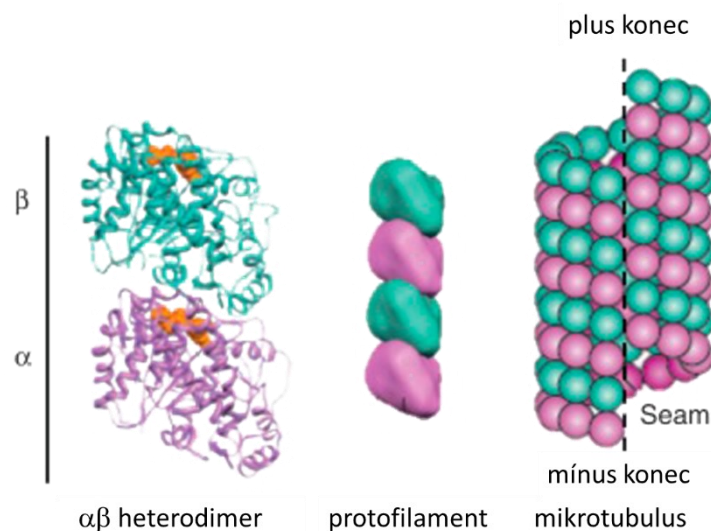
Liu a kol. (2016) již uvádí, že ivermektin účinně cílí na buňky glioblastomu. Inhibuje angiogenezi tím, že potlačuje tvorbu kapilár. Inhibuje také proliferaci a zároveň indukuje apoptózu. V neposlední řadě také ivermektin podporuje

mitochondriální dysfunkci a indukuje oxidační stres inhibicí Akt/mTOR dráhy (Liu a kol., 2016; Mudassar a kol., 2020).

### 2.3 Mikrotubuly jako cíl nádorové terapie

Mikrotubuly spolu s mikrofilamenty a intermediárními filamenty vytváří v eukaryotických buňkách cytoskelet. Jedná se o nejtlustší vlákna cytoskeletu, které mají v průměru zhruba 25 nm. Základní strukturou mikrotubulů je heterodimer tvořený  $\alpha$ -tubulinem a  $\beta$ -tubulinem ( $\alpha$ -tubulin navazuje na  $\beta$ -tubulin). Oba tubuliny vážou GTP, ale jen  $\beta$ -tubulin je schopen GTP v průběhu polymerace štěpit na GDP (Goodson a Jonasson, 2018).

Mikrotubuly jsou tvořeny přibližně 13 laterálně spojenými protofilamenty, které vytvářejí dutý válec. Výsledný polymer je polární a je tvořený plus koncem (zakončen  $\beta$ -tubulinem; umožňuje růst) a minus koncem (zakončen  $\alpha$ -tubulinem; umožňuje disociaci). Povrch mikrotubulů je záporně nabitý, což je dáno přítomností několika kyselých zbytků na C-konci  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu. C-konce jsou pak klíčové pro interakci s proteiny vázajícími mikrotubuly. Stěny mikrotubulů obsahují otvory, kterými může difundovat voda a malé molekuly (Goodson a Jonasson, 2018).



**Obrázek 2** Struktura mikrotubulů (zdroj: Goodson a Jonasson, 2018)

Mikrotubuly hrají zásadní roli v proliferaci, diferenciaci a migraci eukaryotických buněk. Určují umístění organel v buňce, stanovují buněčnou polaritu a vytvářejí

mitotické vřeténko. Důležité jsou také pro invazi a metastatické šíření rakovinných buněk (Králová a kol., 2013; Goodson a Jonasson, 2018).

S mikrotubuly jsou také spojeny již zmíněné tzv. „microtubule-associated proteins“ (MAPs). MAPs se podílejí na vazbě mikrotubulů s jinými buněčnými strukturami, stabilizují mikrotubuly, ovlivňují polymeraci a depolymeraci. U nádorových buněk často nacházíme zvýšenou expresi MAPs vedoucí ke zvýšené stabilitě mikrotubulů (Cirillo a kol., 2017).

Vzhledem k důležité roli mikrotubulů při rozvoji rakoviny a dalších onemocnění se mikrotubuly staly slibným terapeutickým cílem. Mezi látky působící na tubuliny či mikrotubuly patří antiparazitika (např. benzimidazoly) a antimykotika (např. griseofulvin) (Chatterji a kol., 2011).

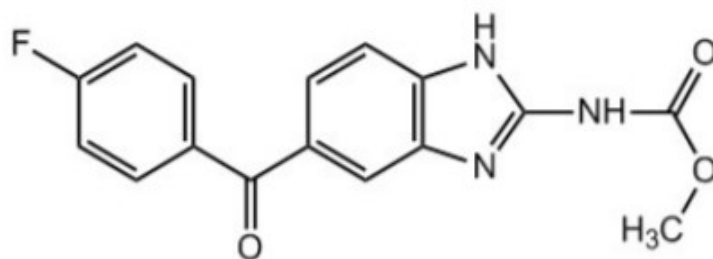
Další látky, které cílí na mikrotubuly, jsou vinca alkaloidy (látky destabilizující mikrotubuly inhibicí jejich polymerace) a docetaxel či paklitaxel ze skupiny taxanů (látky stabilizující mikrotubuly stimulací jejich polymerace). Jedná se o antimitotická činidla, která inhibují proliferaci (konkrétně blokují mitózu při přechodu z metafáze do anafáze a indukují buněčnou apoptózu) rakovinných buněk. Citlivost nádorových buněk na tyto látky je dána zřejmě tím, že se dělí podstatně rychleji než buňky normální (Mukhtar a kol., 2014).

Na  $\beta$ -tubulinu tedy rozlišujeme 3 vazebná místa pro léčiva. Vazebné místo pro vinca alkaloidy se nachází na plus konci mikrotubulu. Taxanové místo je uloženo v hydrofobní kapse na laterálním rozhraní mezi sousedními protofilamenty v lumen mikrotubulu. Třetí vazebné místo, kolchicinové, se nachází na intradimerním rozhraní mezi  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinem (Mukhtar a kol., 2014).

Podávání látek působících na tubuliny má však značná omezení při použití v klinické praxi, které spočívá hlavně v omezeném přestupu těchto látek skrz hematoencefalickou bariéru a existující chemorezistenci rakovinných buněk (Vítovcová a kol., 2020). Navíc tyto látky také často způsobují řadu nežádoucích účinků včetně neurotoxicity (periferní neuropatie) a hematologické toxicity (Mukhtar a kol., 2014).

### 2.3.1 Flubendazol

Flubendazol (FLU, methyl-N-[5-(4-fluorbenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl] karbamát) je organická sloučenina patřící do skupiny benzimidazolů (Čáňová a kol., 2017). Obsahuje typickou benzimidazolovou skupinu a od ostatních benzimidazolů se odlišuje navázaným atomem fluoru (Zhou a kol., 2018). V humánní a veterinární medicíně se používá jako anthelmintikum s účinky proti hlísticím (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flubendazole>). Podává se např. při léčbě infekcí GITu vyvolaných střevními hlísticemi u prasat, drůbeže i lidí (Čáňová a kol., 2017).



**Obrázek 3** Chemická struktura flubendazolu (zdroj: Čáňová a kol., 2017)

FLU, stejně jako další zástupci benzimidazolů, je schopen se specificky navázat a interagovat s  $\beta$ -tubulinem mikrotubulů, čímž zabraňuje polymerizaci tubulinu na mikrotubuly (Čáňová a kol., 2017). FLU patří do látek destabilizujících mikrotubuly a váže se na kolchicinové vazebné místo (Michaelis a kol., 2015). Vazbou FLU dojde k narušení mnoha životně důležitých funkcí (narušení intracelulárního transportu, narušení transportu a metabolismu glukózy, snížení zásob glykogenu, snížení tvorby ATP, narušení tvaru buňky, proliferace, mitózy atd.), což vede k úmrtí parazita (Čáňová a kol., 2017; Lin a kol., 2019).

V posledních letech se ukázalo, že by FLU mohl vykazovat i protinádorový účinek. U gliomových buněčných liniích *in vitro* FLU inhibuje buněčnou proliferaci a podporuje apoptózu nádorových buněk. Snížená exprese cyklinu B1 a p-Cdc2 a zvýšená exprese p53 u buněk exponovaných FLU naznačuje, že k zastavení buněčného cyklu dochází v G2/M fázi (Zhou a kol., 2018).

Podle výsledků studie Lin a kol. (2019) se navíc zdá, že FLU vykazuje protinádorovou aktivitu blokováním translokace STAT3 a jeho aktivace pomocí

fosforylace, což vede k inhibici transkripce cílových genů STAT3 (BIRC5, VEGF a Mcl-1). Kromě účinku na STAT3 také FLU snižuje expresi p-mTOR, p62, BCL2 a p-STAT3. FLU tedy potlačuje progresi nádorů inhibicí exprese JAK/STAT3 signalizace (Lin a kol., 2019).

Řada studií také uvádí, že by FLU mohl v nanomolárních koncentracích vykazovat protinádorový účinek také na leukemické a myelomové buňky. V kombinaci se standardními léčebnými dávkami fluorouracilu a doxorubicinu pak FLU zvyšuje cytotoxicitu těchto chemoterapeutik proti buňkám karcinomu prsu (Čáňová a kol., 2017).

FLU se obvykle podává perorálně a vstřebává se v GITu. Je však velmi málo rozpustný ve vodném prostředí, což způsobuje nízkou absorpci do krevního řečiště a tím pádem velmi nízkou biologickou dostupnost. Ta je pak považována za hlavní omezení při použití FLU v léčbě nádorů. Zvýšit vstřebávání FLU je možné například užitím léčiva ihned po jídle. Modifikace (např. použití nanočástic či cyklodextrinů), které by zvyšovaly jeho biologickou dostupnost, jsou ve fázi výzkumu. Z těla se pak FLU vylučuje hlavně stolicí a velmi malé množství v jeho nezměněné formě se pak vylučuje močí (Čáňová a kol., 2017).

### 3. CÍLE

Cílem této práce bylo porovnat vliv samotného temozolomidu (TMZ) a flubendazolu (FLU) a jejich kombinace na buněčné linie A172, T98G a U118MG a sledovat vliv kombinace TMZ + FLU *in vivo* u modelového organismu.

Díličími cíli bylo:

1. stanovení vlivu TMZ, FLU a jejich kombinace na proliferaci buněk A172, T98G a U118MG
2. zhodnocení vlivu kombinace TMZ + FLU na morfologii buněk a mikrotubulární cytoskelet u buněk A172 a T98G
3. stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na expresi STAT3 a dalších vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu a na aktivitu kaspáz u buněk A172 a T98G
4. stanovení množství TMZ a FLU v buňkách A172 a T98G po podání kombinace TMZ + FLU
5. posouzení vlivu kombinace TMZ + FLU na růst nádoru a na proliferační index Ki67 v *in vivo* modelu
6. stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na expresi STAT3 a dalších vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu u *in vivo* modelu
7. stanovení distribuce testovaných léčiv při podání TMZ, FLU a jejich kombinace modelovému organismu *in vivo*



## 4. METODIKA A MATERIÁL

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Buněčné linie

Pro potreby tohoto výzkumu byly použity 3 buněčné linie – A172, T98G a U118MG. Pro *in vitro* experiment byly použity buňky A172 a T98G, které mají podobné základní vlastnosti, liší se ale expresí určitých genů a morfologií buněk. Obě linie vykazují také vysokou proliferační aktivitu. U zhruba 95 – 98 % buněk obou buněčných linií je přítomen proliferační marker Ki67 (Kiseleva a kol., 2016).

Buněčná linie A172 byla získána z GBM 53letého muže. Složena je z monomorfních vícejaderných buněk podobných fibroblastům (Kiseleva a kol., 2016).

Buněčná linie T98G je polyploidní derivát buněčné linie T98 získaný z GBM 61letého muže. Buňky této buněčné linie jsou vícejaderné, polymorfní, polygonální, sférické a připomínající fibroblasty (Kiseleva a kol., 2016).

Pro implantaci do modelového organismu byla použita buněčná linie U118MG. Jedná se o adherentní buněčnou linii odvozenou z GBM 50letého muže, jejíž jednou z vlastností je schopnost vytvářet nádory v tzv. „nude“ myších.

Buněčné linie byly pro náš výzkum zakoupeny od firmy ATCC. Buňky byly kultivovány v buněčných inkubátorech (při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>) v příslušných médiích v kultivačních lahvích s kultivační plochou 75 cm<sup>2</sup>. Buňky linie A172 (ATCC<sup>®</sup> CRL-1620<sup>™</sup>) a linie U118MG (ATCC<sup>®</sup> HTB-15<sup>™</sup>) byly kultivovány v DMEM médiu (LGC Standard, Lomianky, Poland). Buňky T98G (ATCC<sup>®</sup> CRL-1690<sup>™</sup>) byly kultivovány v EMEM médiu (LGC Standard). Obě média byla obohacena o 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin.

#### 4.1.2 Experimentální zvířata

Pro provedení *in vivo* pokusu byla zvolena jako modelový organismus „Athymic Nude Mouse“ (Hsd:Athymic *Nude-Foxn1<sup>nu</sup>*, stáří 6 týdnů, samice; dále jen nu-nu myš). Jedná se o nahou imunodeficitní myš, která postrádá normální brzlík a není schopna produkovat T-lymfocyty (<https://www.criver.com/products-services/find-model/athymic-nude-mouse?region=3616>).

### 4.1.3 Příkladové vybavení

- Laminární box
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5424
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R
- Inkubátor buněčných kultur
- Cellometer Auto
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200
- PCR laminární box
- Třepačka
- Termoblok
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Cyklér LightCycler® 96 Instrument (Roche Life Science)
- Zdroj stejnosměrného napětí
- Azure c600 Gel Imaging System (Azure Biosystems)
- Mikroskop Olympus IX-70 s fázovým kontrastem
- Mikroskop Nikon Eclipse E400

### 4.1.4 Chemikálie

- Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (ATCC, LGC Standard)
- Eagle's Minimum Essential Medium EMEM (ATCC, LGC Standard)
- Fetální bovinní sérum FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- Fosfátový pufr PBS
- Penicilin/Streptomycin (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Bovinní sérový albumin BSA (Sigma Aldrich)
- Kit pro měření proliferace buněk metodou WST-1
- DEPC voda (voda bez nukleáz) (InVitrogen)
- TRISOL reagent
- RNA Wash Buffer pufr (Amplicon)

- DNA Digestion Buffer pufr (Amplicon)
- DNAsa I (Amplicon)
- Direct Zol RNA PreWash pufr (Amplicon)
- Kit pro přípravu cDNA – RiboLock RNase inhibitor, 5x reakční pufr 10 mM dNTP mix, M-MuLV Reverzní Transkriptáza, Randomizovaný hexamer primer (Thermo Fisher Scientific)
- Kit pro přípravu Master mixu pro PCR – DEPC voda, SYBR GREEN, Forward a Reverse primer pro cílovou mRNA v koncentraci 10 mM (Roche; Geneti Biotech)
- Kit pro stanovení bílkoviny – kyselina bicinchoninová BCA (Thermo Fisher Scientific)
- Blotovací pufr
- DAPI (Sigma Aldrich)
- ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen Molecular Probes)
- 4 M kyselina chlorovodíková (HCl)
- Zásobní roztok akrylamidu (AA) a bis-akrylamidu (bisAA)
- 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- 0,1 TRIS pufr, pH 8,0
- 10xTBS
- 10% SDS – dodecylsírán sodný
- Koncentrovaný elektroodový pufr
- Isobutanol nasycený vodou
- TBST pufr
- 5% roztok mléka v TBST pufru
- 10% APS – persíran amonný
- Reakční činidlo pro kaspázy 3/7 (Promega Corporation)
- 4% roztok formaldehydu
- 1xPBS

### 4.1.5 Pomůcky

- Pipety (Eppendorf)
- Špičky o různých velikostech (Eppendorf)
- Mikrozkmavky (Eppendorf)
- 96-jamkové destičky (Thermo Scientific)
- 96-jamkové destičky pro LightCycler® 96 (Roche Life Science)
- Pomůcky pro přípravu elektroforetického gelu (stojánek, spony, hřeben, skla,...)
- Pomůcky pro blotting (blotovací houbičky, tlustý filtrační papír, PVDF membrána)
- Plastové nádoby s víčkem
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky (kádinky, jednorázové rukavice,...)

### 4.2 Stanovení viability buněk metodou WST-1

Stanovení WST-1 je jedním ze základních testů používaných k měření životaschopnosti buněk. Jedná se o kolorimetrickou metodu, při které dochází k redukci WST-1 činidla (4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát) na ve vodě rozpustný formazan pomocí buněčných dehydrogenáz. Standardní inkubační doba pro průběh této reakce jsou 2 hodiny. Po této inkubaci se měří absorbance vyjadřující intenzitu zbarvení vzniklého formazanu pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Hodnota absorbance pak odráží viabilitu buněk (Yin a kol., 2013).

Buňky testovaných buněčných linií (A172 a T98G) byly pipetovány na 96-jamkovou destičku v koncentraci 7500 buněk/jamku a následně umístěny na 24 hodin do inkubátoru.

Posléze byly buňky ovlivněny přidáním 100  $\mu$ l roztoku příslušného kultivačního média s testovanými látkami (FLU a TMZ v různých koncentracích) do každé jamky. Mikrotitrační destička byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru a byla inkubována 48 hodin při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Po stanovené době inkubace byl připraven pracovní roztok WST – zásobní WST-1 byl ředěn s příslušným médiem v poměru 1:20. Destičky byly vyjmuty z termostatu a bylo odsáto původní médium. Do každé jamky bylo pipetováno 100  $\mu$ l

připraveného pracovního roztoku WST-1. Posléze byly destičky vloženy zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru a byly inkubovány další 2 hodiny při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Po 2 hodinách inkubace byla změřena absorbance při 450 nm (za použití referenční vlnové délky 690 nm) na spektrofotometru Tecan Infinite M200.

### ***4.3 Fázový kontrast***

Fázový kontrast je mikroskopická technika, která se v biologii často využívá pro pozorování neobarvených buněk. Pro vizualizaci vzorku jsou využívány fázové posuny způsobené rozdíly v délce optické dráhy vzorku, která souvisí s indexem lomu a tloušťkou vzorku. Tyto fázové posuny (malé fázové posuny lidské oko nerozezná) je fázový mikroskop schopen měnit na posuny amplitudové (lidským okem pozorovatelně) (<https://www.baria.cz/blog/fazovy-kontrast/>).

Kontrolní buňky A172 a T98G a buňky ovlivněné kombinací TMZ + FLU byly kultivovány ve standardních lahvích pro buněčné kultury v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Po 24, 48 a 72 hodinách od ovlivnění byla pozorována morfologie a počet buněk pomocí mikroskopu Olympus IX-70 s fázovým kontrastem.

### ***4.4 Imunofluorescenční barvení buněk***

Imunofluorescence je laboratorní metoda, která využívá fluorescenčně značených protilátek k detekci specifických cílových antigenů. K vizualizaci fluorescenčně obarvených buněčných struktur se využívá fluorescenční mikroskop (Odell a Cook, 2013).

V našem pokusu byly imunofluorescenčně barveny buňky, které byly kultivovány v cytospinových komůrkách v přítomnosti příslušné kombinace léčiv po dobu 48 hod.

Po uplynutí inkubační doby bylo ve vodní lázni předehřáto 1xPBS a 4% roztok formaldehydu.

Mezitím bylo odstraněno médium z cytospinových komůrek a buňky byly dvakrát opláchnuty zahřátým roztokem 1xPBS (1 ml, 3 min). Poté bylo sklíčko překryto roztokem formaldehydu (asi 500 µl) a fixováno 30 min při laboratorní teplotě. Po 30 minutách fixace bylo sklíčko dvakrát opláchnuto roztokem 1xPBS (1 ml, 3 min).

Pro permeabilizaci buněk bylo sklíčko překryto 500  $\mu$ l 100% methanolu. Následovala 10 min inkubace při  $-20$  °C a oplach roztokem 1xPBS (1 ml, 3 min).

Dále byly buňky překryty 500  $\mu$ l roztoku blokovačního pufru (1% BSA + 0,3% TritonX-100 v 1xPBS) a inkubovány 60 min při laboratorní teplotě. Následně byl pufr odstraněn.

V dalším kroku byly buňky překryty primární protilátkou ředěnou roztokem blokovačního pufru dle instrukcí výrobce ( $\beta$ -aktin – 1:240;  $\alpha$ -tubulin – 1:100;  $\beta$ III-tubulin – 1:50). Následovala inkubace přes noc v lednici při 4 °C.

Druhý den byly buňky dvakrát opláchnuty roztokem 1xPBS (1 ml, 3 min) a překryty naředěným roztokem sekundárních protilátek (ředěny roztokem blokovačního pufru 1:250) s DAPI (ředění 1000x). Inkubovány byly bez přístupu světla asi 2 hod při pokojové teplotě. Po proběhlé inkubaci byly buňky dvakrát opláchnuty roztokem 1xPBS (1 ml, 3 min) a následně jedenkrát destilovanou vodou (1 ml, 3 min).

Poté byly komůrky rozebrány, byla odstraněna přebytečná tekutina a preparáty se nechaly volně osušit. Buňky byly zakryty krycími sklíčky, na kterých bylo nanášeno 7  $\mu$ l „ProLong™ Gold Antifade Mountant“. Hodnocení probíhalo pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E400.

## ***4.5 Kvantifikace proteinů metodou Western blot***

Western blot je metoda, která se využívá pro detekci a semikvantifikaci specifické bílkoviny ve vzorku. Metoda zahrnuje 3 kroky – rozdělení proteinů na základě jejich velikosti pomocí elektroforézy, přenesení separovaných proteinů na membránu a detekci proteinů pomocí specifických protilátek (<https://labguide.cz/metody/western-blot/>).

### **4.5.1 Příprava buněčného lyzátu**

Buňky byly kultivovány v 6-jamkových kultivačních miskách v koncentraci 150 tisíc buněk na jamku. Dále byly buňky ovlivněny testovanými látkami TMZ + FLU v příslušných koncentracích a inkubovány po dobu 48 hod. Po uplynutí inkubační doby bylo médium z jednotlivých jamek odsáto.

Do každé jamky byly přidány 3 ml ledového PBS, kýváním byly buňky opláchnuty a PBS bylo následně odsáto do sucha.

K buňkám bylo dále přidáno 100  $\mu$ l ledového lyzačního pufru s inhibitory proteáz a následovala 2 min inkubace. Poté byly buňky z kultivačních misek seškrabávány a přeneseny do 1,5 ml zkumavek umístěných na ledu.

Takto získané buňky ve zkumavkách byly homogenizovány pomocí injekční stříkačky. Homogenát se nechal stát asi 20 min na ledu. Poté byl homogenát centrifugován při 13000 rpm a 4 °C po dobu 10 min. Vzniklý supernatant byl odebrán do nových 1,5 ml zkumavek.

Takto připravené vzorky mohly být následně ihned použity pro stanovení koncentrace bílkoviny a pro naředění vzorků pro metodu Western blot, nebo je bylo možno do dalšího zpracování uchovávat při -20 °C.

#### **4.5.2 Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody**

BCA metoda se používá ke kvantifikaci celkové bílkoviny ve vzorku. Princip je založen na schopnosti bílkovin redukovat v alkalickém prostředí měďnaté ionty na ionty měďné. Měďné ionty dále chelatují s molekulami kyseliny bicinchoninové za vzniku fialového zbarvení. Množství redukovaných měďnatých iontů a vzniklého zbarvení je úměrné množství proteinu ve vzorku (He, 2011).

Pro každý vzorek bylo v duplikátech připraveno 50  $\mu$ l 5x – 10x ředěného vzorku. Zároveň byly podle tabulky (viz Tabulka 1) připraveny kalibrační roztoky bovinního sérového albuminu (BSA) pro stanovení kalibrační křivky.

**Tabulka 1** Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky pro BCA měření koncentrace bílkovin

	<b>koncentrace</b> [ $\mu\text{g/ml}$ ]	<b>množství 1% roztoku BSA</b> [ $\mu\text{l}$ ]	<b>množství destilované vody</b> [ $\mu\text{l}$ ]
<b>1</b>	0	0	500
<b>2</b>	200	10	490
<b>3</b>	400	20	480
<b>4</b>	600	30	470
<b>5</b>	800	40	460
<b>6</b>	1000	50	450

Připraven byl také pracovní roztok C smísením komerčních roztoků A (kyselina bicinchoninová, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný v 0,1 M NaOH) a B (4% (w/v) pentahydrát síranu měďnatého) v poměru 50:1.

Následně bylo do každé jamky 96-jamkové destičky pipetováno 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku C a 10  $\mu\text{l}$  příslušného kalibračního roztoku BSA nebo ředěného vzorku. Destička byla inkubována 30 min při 37 °C za konstantního třepání.

Absorbance byla měřena při 562 nm pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200.

Při hodnocení byl odečten průměr hodnot absorbance slepého vzorku od průměrné hodnoty absorbance příslušného vzorku. Pomocí rovnice kalibrační křivky byla následně vypočítána koncentrace bílkoviny ve vzorku.

### **4.5.3 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu**

Gelová elektroforéza je často využívaná separační metoda při analýze proteinů. Proteiny se dělí na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli, která je dána rozdílnou molekulovou hmotností proteinů (malé proteiny se pohybují rychleji, velké naopak pomaleji). Přítomný dodecylsulfát sodný způsobuje denaturaci proteinů, které tím pádem získávají záporný náboj a migrují ve stejnosměrném elektrickém poli směrem ke kladně nabitě elektrodě (anodě) (Kurien a Scofield, 2012; Beránek, 2016; <https://labguide.cz/metody/western-blot/>).



Vzorky byly pro elektroforézu ředěny na koncentraci bílkoviny 1 µg/µl pomocí 4xSDS vzorkového pufru a lyzačního pufru s roztokem inhibitorů proteáz.

Pro separaci bílkovin o velké molekulové hmotnosti byly připraveny gely o koncentraci 7,5 % a pro separaci bílkovin o menší molekulové hmotnosti gely o koncentraci 10 % (viz Tabulka 2 a Tabulka 3).

**Tabulka 2** Složení separačního gelu

	<b>2 gely o koncentraci 7,5 % a tloušťce 1,5 mm</b>	<b>2 gely o koncentraci 10 % a tloušťce 1,5 mm</b>
redistilovaná voda	9,8 ml	8,1 ml
1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8	5 ml	5 ml
roztok AA + bisAA	5 ml	6,7 ml
10% SDS	0,2 ml	0,2 ml
iniciace polymerace		
10% roztok APS	200 µl	200 µl
TEMED	16 µl	16 µl

**Tabulka 3** Složení 4% zaostřovacího gelu

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

Připraven byl nalévací stojánek, do kterého byla vložena skla spojená sponami. Připravený roztok separačního gelu byl ihned pipetou nalit mezi skla do výšky zhruba

4,5 cm od spodního okraje. Tento roztok byl následně opatrně převrstven asi 200  $\mu$ l isobutanolu nasyceného vodou a polymerován 30 až 60 min.

Po 60 minutách polymerace byl isobutanol odstraněn a separační gel byl převrstven roztokem zaostřovacího gelu, do kterého byl zasunut hřeben pro vytvoření jamek na dávkování vzorků. Následovalo 30 min polymerace.

Gely byly následně vyjmuty z nalévacího stojánku, opláchnuty vodou, byl odstraněn hřeben a gely byly vloženy do stojánku pro elektroforézu. Zároveň byl do vnitřního a vnějšího elektrodového prostoru přidán elektrodový pufr.

Před nanesením vzorků na gel byly naředěné vzorky 5 min povařeny v termobloku předehřátém na 95 °C. Poté bylo do jamek v zaostřovacím gelu pipetováno 30  $\mu$ l vzorku a do jedné z jamek 5  $\mu$ l molekulárního standardu.

Elektroforéza probíhala na ledu při konstantním napětí 120 V.

#### **4.5.4 Imunoblotting**

Imunoblotting neboli Western blot s použitím polyvinylidendifluoridové (PVDF) membrány využívá k detekci proteinů tzv. primární protilátku, která je specifická pro hledaný protein. Pro vizualizaci je potřeba použít tzv. sekundární protilátku, která se váže na protilátku primární a je značena enzymem nebo fluorescenčně (Komatsu, 2015; <https://labguide.cz/metody/western-blot/>).

Pro imunoblotting byl nejprve připraven blotovací pufr. V cca 500 ml redestilované vody bylo rozpuštěno 6,06 g TRIS (25 mM) a 28,8 g glycinu (192 mM). Přidáno bylo 400 ml methanolu a roztok byl doplněn vodou do 2000 ml. Vzniklý blotovací pufr byl přelit do lahve a uchováván v lednici.

Po proběhlé elektroforéze byl odstraněn zaostřovací gel a u separačního gelu byla odstraněna dolní část s modrým barvivem. Získaný gel byl oddělen od skla.

Následně bylo potřeba aktivovat PVDF membránu namočením do methanolu po dobu 5 min.

Separační gel byl spolu s aktivovanou PVDF membránou vložen do plastové krabičky s víkem naplněné blotovacím pufrem. Do další krabičky s blotovacím pufrem byly pak vloženy blotovací houbičky a tlustý filtrační papír. Vše bylo ponecháno v blotovacím pufri po dobu 20 min.

Poté byl připraven blotovací sendvič, který byl postupně tvořen blotovací houbičkou, silným filtračním papírem, polyakrylamidovým gelem, PVDF membránou, silným filtračním papírem a blotovací houbičkou. Blotovací sendvič byl uzavřen a vložen do blotovacího nástavce. Blotovací nástavec byl umístěn do vany spolu s ledítkem a vana byla naplněna blotovacím pufrém a vložena do ledové lázně, aby se zabránilo přílišnému zahřívání.

Víko vany bylo připojeno kabely ke zdroji, kde bylo nastaveno napětí 100 V a proud 0,25 A. Poté následoval 1,5hod přenos proteinů z gelu na PVDF membránu. Po ukončení přenosu byla membránu vyjmuta a použita pro detekci proteinů.

#### **4.5.5 Detekce proteinů**

Po imunoblottingu byla membrána přenesena pomocí pinzety do plastové misky s víčkem, kam byla nalita destilovaná voda a membrána byla kývavým pohybem opláchnuta.

Poté bylo na membránu nalito cca 25 ml roztoku 5% mléka v TBST pufru. Miska byla umístěna na 1 – 2 hod na kývačku. Následně bylo mléko odstraněno a membrána byla opláchnuta.

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

Následující den byla odstraněna primární protilátka a membrána byla 4x po dobu 5 min oplachována TBST pufrém. Následně byla membrána inkubována 1 – 2 hod se sekundární protilátkou při pokojové teplotě. Sekundární protilátka byla ředěna podle instrukcí výrobce v roztoku 1% BSA v TBST pufru.

Po inkubaci byla sekundární protilátka odstraněna a membrána byla 4x po dobu 5 min oplachována TBST pufrém. Následně byl z misky TBST pufr vylit.

Pro chemiluminiscenční detekci proteinů byl použit „Amersham ECL Prime Western Blotting Detection reagent“ – smíchán byl roztok A („luminol solution“) a roztok B („peroxide solution“) v poměru 1:1. Na membránu bylo pipetováno cca 1,5 ml substrátu. Následovalo 5 min inkubace.

Po proběhlé inkubaci se nechala membrána okapat a poté byla vložena do přístroje Azure c600. Relativní kvantifikace proteinů byla provedena pomocí programu AzureSpot.

## **4.6 Kvantifikace mRNA metodou RT-PCR**

Real-time PCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) je molekulárně genetická metoda, která se mimo jiné používá k určení genové exprese v biologickém vzorku (Beránek, 2016).

Principem PCR je cyklické opakování 3 reakčních fází. V první fázi (tzv. denaturaci) se dvouvláknová DNA zahřívá na teplotu 95 – 96 °C po dobu 20 až 30 sekund. Tím dojde k rozrušení vodíkových můstků mezi dvěma vlákny a tedy k tvorbě dvou jednovláknových DNA molekul (Beránek, 2016; <https://labguide.cz/metody/pcr/>).

V druhém kroku (tzv. annealingu) dochází k nasednutí primerů na specifická místa DNA při teplotě 50 – 60 °C (Beránek, 2016; <https://labguide.cz/metody/pcr/>).

Poslední krok (tzv. elongace) představuje vlastní syntézu DNA, kdy ve směru 5'→3' dochází činností DNA polymerázy k syntéze nového nukleotidového řetězce komplementárního k původní DNA. Použitá teplota je závislá na výběru DNA polymerázy (pro Taq polymerázu je teplotní optimum 72 °C) (Beránek, 2016; <https://labguide.cz/metody/pcr/>).

U real-time PCR jsou navíc, oproti klasické PCR, k reakční směsi přidány interkalační látky schopné fluorescence (např. SYBR Green, ethidiumbromid) nebo fluorescenční sondy hybridizující během PCR k řetězcům vznikajících amplikonů. Produkt je tedy analyzován na základě fluorescence (nárůst fluorescence má typický esovitý tvar). RT-PCR tedy umožňuje kvantifikaci určité nukleotidové sekvence v reálném čase (Beránek, 2016).

### **4.6.1 Izolace RNA pomocí kolonek**

Buňky byly kultivovány v 6-jamkových kultivačních miskách v koncentraci 150 tisíc buněk na jamku. Poté byly ovlivněny příslušnými koncentracemi testovaných látek TMZ + FLU. Následovala 24hod inkubace.

Po uplynutí inkubační doby bylo médium z misek odstraněno a do každé jamky byly přidány 3 ml ledového PBS. Kýváním byly buňky opláchnuty a PBS bylo odsáto.

K buňkám bylo následně přidáno 200  $\mu$ l TRISOL reagentu a buňky se nechaly 2 minuty lyzovat. Následně byly buňky z kultivačních misek seškrabávány do 1,5 ml zkumavek bez nukleáz.

Ke vzorku lyzovanému v TRISOL reagentu bylo přidáno 200  $\mu$ l 100% ethanolu a překlápěním zkumavek byl vzorek promíchán. Posléze byla směs ethanolu a TRISOLu přenesena do „Zymo-Spin IIC Column“ (kolonky) vložené do „Collection Tube“. Následovala centrifugace při 13000 rpm a 4 °C po dobu 30 s.

Po zcentrifugování byly kolonky přeneseny do nové „Collection Tube“ a na kolonku bylo přidáno 400  $\mu$ l pufru („RNA Wash Buffer“). Opět následovala centrifugace při 13000 rpm a 4 °C po dobu 30 s. Prošlá tekutina byla vylita do toxického odpadu.

V „RNAsa-free“ mikrozkuhavce byla připravena směs DNAsy a pufru („DNA Digestion buffer“). Na 1 reakci bylo smícháno 5  $\mu$ l DNAsy a 75  $\mu$ l pufru. Směs byla přenesena na kolonky a ponechána stát při pokojové teplotě 15 min.

Následně bylo na kolonku přidáno 400  $\mu$ l „Direct Zol RNA PreWash“ a poté centrifugováno při 13000 rpm a 4 °C po dobu 30 s. Prošlá tekutina byla vylita do toxického odpadu. Tento krok byl znovu zopakován.

Dále bylo na kolonku napipetováno 700  $\mu$ l pufru („RNA Wash Buffer“) a opět centrifugováno při 13000 rpm a 4 °C po dobu 2 min. Poté byly kolonky přeneseny do čistých 1,5 ml „RNAsa-free“ mikrozkuhavek.

Pro vymytí RNA z kolonky bylo přidáno přímo na kolonku 20  $\mu$ l DEPC vody a na závěr centrifugováno při 13000 rpm a 4 °C po dobu 30 s.

V získaných vzorcích byla změřena koncentrace RNA pomocí přístroje NanoDrop 200. Do dalšího zpracování byly vzorky uloženy při -80°C.

## **4.6.2 Příprava cDNA**

Reverzní transkripce je proces přepisu primární sekvence nukleotidů RNA do struktury DNA. Reverzní transkripce probíhá díky tzv. RNA-dependentní DNA-polymeráze (reverzní transkriptáze). Produktem je jednovláknový řetěz DNA,

tzv. cDNA („complementary DNA“), který na rozdíl od molekul RNA nepodléhá rychlé degradaci. Této vlastnosti se využívá např. při klonování, sekvenování či studiu genové exprese (Beránek, 2016).

Ve sterilních 0,5 ml mikrozkušavkách (bez nukleáz) byla připravena směs A obsahující 1 µg celkové RNA, 1 µl „Random hexamer primeru“ a doplněna DEPC vodou do výsledného objemu 11 µl. Připravená směs byla promíchána pipetou a inkubována 5 min v inkubátoru při 70 °C. Poté byla směs zchlazena.

Mezitím byla připravena směs B, která obsahovala pro 1 vzorek 4 µl 5x reakčního pufru, 2 µl 10 nM dNTP mixu, 1 µl „RiboLock RNase“ inhibitoru a 2 µl „M-MuLV Reverse Transcriptase“.

Přidáním 9 µl směsi B k 11 µl směsi A vznikla směs A+B, která byla opatrně promíchána a následně inkubována 5 min při pokojové teplotě a dále 60 min v inkubátoru při 37 °C. Reakce byla zakončena zahřátím směsi na 70 °C po dobu 5 min.

#### **4.6.3 PCR amplifikace jednovláknové cDNA**

Vzorky získané v předchozím kroku byly ředěny v poměru 1:5 pro cílovou mRNA amplifikaci (80 µl DEPC vody + 20 µl směsi A+B) a v poměru 1:40 pro amplifikaci housekeepingového genu (195 µl DEPC vody + 5 µl ředěné směsi A+B).

Do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek byla připravena směs C obsahující pro 1 vzorek 25 µl „SYBR Greenu“, 1 µl „Forward primeru“ pro cílovou mRNA (10 µM), 1 µl „Reverse primeru“ pro cílovou mRNA (10 µM) a 13 µl DEPC vody.

Do jednotlivých jamek destičky pro LightCycler® 96 bylo pipetováno 20 µl směsi C (vždy v duplikátech pro každý vzorek). Poté bylo do příslušných jamek přidáno 5 µl naředěného vzorku směsi A+B.

Destička byla překryta přiloženou fólií a promíchána po dobu 30 sekund v ThermoMixeru při laboratorní teplotě. Analýza byla provedena pomocí přístroje LightCycler® 96.

### **4.7 Luminiscenční test buněčné apoptózy**

Principem testu je měření aktivity kaspáz. Přidání činidla k buňkám vede k lýze buněk a následnému štěpení přidaného substrátu kaspázou. Při štěpení dochází

ke vzniku luminiscence, která je úměrná aktivitě kaspáz ([https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase\\_glo-3\\_7-assay-systems/?catNum=G8090](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?catNum=G8090)).

Aktivita kaspázy 3 a 7 byla stanovena luminiscenční metodou pomocí kitu „Caspase-Glo® 3/7 Assay“ od firmy Promega (Madison, USA). Podle instrukcí výrobce byla také připravena reakční činidla.

Buňky A172 a T98G byly kultivovány v 96-jamkové destičce při koncentraci buněk 7500 buněk/jamku za ovlivnění příslušnými koncentracemi testovaných látek TMZ a FLU. Následně po 2, 4, 8 a 24 hodinách inkubace byl vytvořen buněčný lyzát přidáním 50 µl pufru obsahujícího 50 mM HEPES, 5 mM DTT a 5 mM CHAPS do každé jamky. Lyzát byl následně přenesen do mikrozkušavek a do další analýzy byl uchováván při -80 °C.

Pro samotné měření byla použita 384-jamková destička určená pro spektrofotometr. Do příslušné jamky bylo pipetováno vždy 25 µl buněčného lyzátu, ke kterému bylo následně přidáno 25 µl reakčního činidla.

Po 30 minutách inkubace byla měřena luminiscence pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200. Výsledná aktivit kaspáz byla vztažena k celkovému množství bílkoviny ve vzorku.

#### ***4.8 Stanovení léčiv v biologickém materiálu pomocí LC/MS***

Buňky A172 a T98G byly inkubovány v 6-jamkové destičce (150 000 buněk/ml) v příslušném médiu. Následně byly ovlivněny testovanými látkami v příslušných koncentracích a inkubovány při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Buňky byly sklizeny v časových intervalech 10 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 4 hod a 24 hod a uchovávány v 500 µl vody pro injekci při -20 °C.

Následně bylo změřeno celkové množství proteinů v buněčném homogenátu metodou BCA (viz výše).

Poté byla buněčná suspenze smíchána s acetonitrilem a methanolem v poměru 1:1:1 a 15 min vortexována. Dále byla směs ještě centrifugována při 13000 rpm po dobu 4 min. Supernatant byl přefiltrován přes 0,22 µm PTFE injekční filtr do skleněné lahvičky určené pro analýzu.

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

## ***4.9 Experiment in vivo***

### **4.9.1 Implantace buněk do modelového organismu**

Buňky linie U118MG byly do nu-nu myši implantovány do pravého a levého boku, tj. do každé myši ve dvou subkutánních vpichách, v koncentraci 3 miliony buněk na vpich.

Byly provedeny dva experimenty. Pro první experiment (v období květen až červen 2021) byla implantace provedena do 22 nu-nu myší, při druhém experimentu (v období listopad až prosinec 2021) byly buňky U118MG implantovány do 30 nu-nu myší. Testované modelové organismy byly rozděleny do šesti skupin podle následující tabulky (viz Tabulka 4).



**Tabulka 4** Rozdělení skupin *in vivo* experimentu

<b>Název skupiny</b>	<b>Počet myší (1./2. experiment)</b>	<b>Ovlivnění</b>
A	5/5 myší	Kontrolní skupina (bez léčby)
B	4/5 myší	FLU 10 mg/kg
C	4/5 myší	FLU 25 mg/kg
D	3/5 myší	TMZ 0,9 mg/kg
E	3/5 myší	FLU 10 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg
F	3/5 myší	FLU 25 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg

Nádory po implantaci rostly po dobu 2 týdnů, přičemž růst nádorů byl sledován dvakrát do týdne pohmatem a postupně zaznamenáván. Po 2 týdnech růstu nádorů bylo po dobu dalších 14 dní podáváno každý den příslušné testované léčivo perorální sondou. Podávaná léčiva TMZ i FLU byla připravena a ředěna do 1% roztoku methylcelulózy (MC), který byl připraven smícháním 900 mg MC se 45 ml horké redestilované vody a po důkladném protřepání byl promíchán ještě se 45 ml studené redestilované vody.

Pro každou skupinu bylo připraveno vždy 14 zkumavek pro jednotlivé složky roztoku, tj. pro každodenní podání. První sada zkumavek obsahovala 1 ml MC. V druhé sadě zkumavek byl navážen FLU-premix, a to v navážce 3 mg/ml pro skupiny B a E a v navážce 7,5 mg/ml pro skupiny C a F. Třetí sadu zkumavek tvořil napipetovaný roztok TMZ v koncentraci 10 mg/ml (rozpuštěný v DMSO) pro podání skupinám D, E a F.

Po dalších 2 týdnech došlo k usmrcení nu-nu myší.

Cílové tkáně a některé orgány (srdce, játra, plíce a mozek) byly odebrány a podrobeny LC/MS analýze. Získané nádory byly použity pro analýzu RNA a proteinů.

Pro potřeby této práce budou nadále zahrnuty především výsledky z analýzy vzorků ze skupin A, E a F.

#### **4.9.2 Zpracování nádorů z nu-nu myši pro RNA analýzu**

Nádory z nu-nu myši byly nejprve homogenizovány pomocí přístroje TissueLyser LT přidáním 200  $\mu$ l TRISOL reagentu a kovové kuličky. Vzniklý homogenát byl ponechán 5 min při pokojové teplotě.

K izolaci RNA z nádorů byl použit komerční kit „GeneAll® RNA Purification System“. V prvním kroku bylo přidáno k homogenátu 200  $\mu$ l chloroformu, směs byla promíchána, 2 min inkubována při pokojové teplotě a na závěr centrifugována při 12000 g a 4 °C po dobu 15 min.

Vodná fáze byla odebrána do čisté zkumavky a přidán byl stejný objem RBI pufru. Směs byla promíchána překlápěním zkumavky. Následně bylo 700  $\mu$ l této směsi přeneseno na kolonku a centrifugováno při 10000 g a 4 °C po dobu 30 sekund.

Poté bylo přidáno na kolonku 500  $\mu$ l SWI pufru. Následovala centrifugace při 10000 g a 4 °C po dobu 30 sekund.

Dále bylo přidáno 500  $\mu$ l RNW pufru a opět centrifugováno při 10000 g a 4 °C po dobu 30 sekund a nakonec ještě další 1 min pro vyloučení veškeré zbytkové tekutiny.

Pro eluci RNA byly kolonky přeneseny do čistých 1,5 ml „RNAsa-free“ mikrozkuvek a přímo na membránu kolonky bylo přidáno 50  $\mu$ l „RNAsa-free“ water. Následovala centrifugace při 10000 g a 4 °C po dobu 1 min.

V získaném vzorku byla změřena koncentrace RNA pomocí přístroje NanoDrop 200. Další příprava vzorku a vlastní analýza RNA byla provedena stejně jako v případě *in vitro* analýzy (viz výše).

#### **4.9.3 Zpracování nádorů z nu-nu myši pro WB analýzu**

K nádorům získaným z nu-nu myši byla přidána kovová kulička a 100  $\mu$ l lyzačního pufru. Nádory byly nejprve homogenizovány pomocí přístroje TissueLyser LT.

V dalším kroku byl vzorek homogenizován pomocí injekční stříkačky. Vzniklý homogenát byl ponechán asi 20 min na ledu. Poté byl centrifugován při 13000 rpm a 4 °C po dobu 10 min. Vzniklý supernatant byl odebrán do čistých 1,5 ml zkuvek.

Takto připravené vzorky, stejně jako při *in vitro* analýze, byly použity pro stanovení koncentrace bílkoviny a naředěné vzorky poté pro analýzu Western blot (viz výše).

#### ***4.10 Statistická analýza***

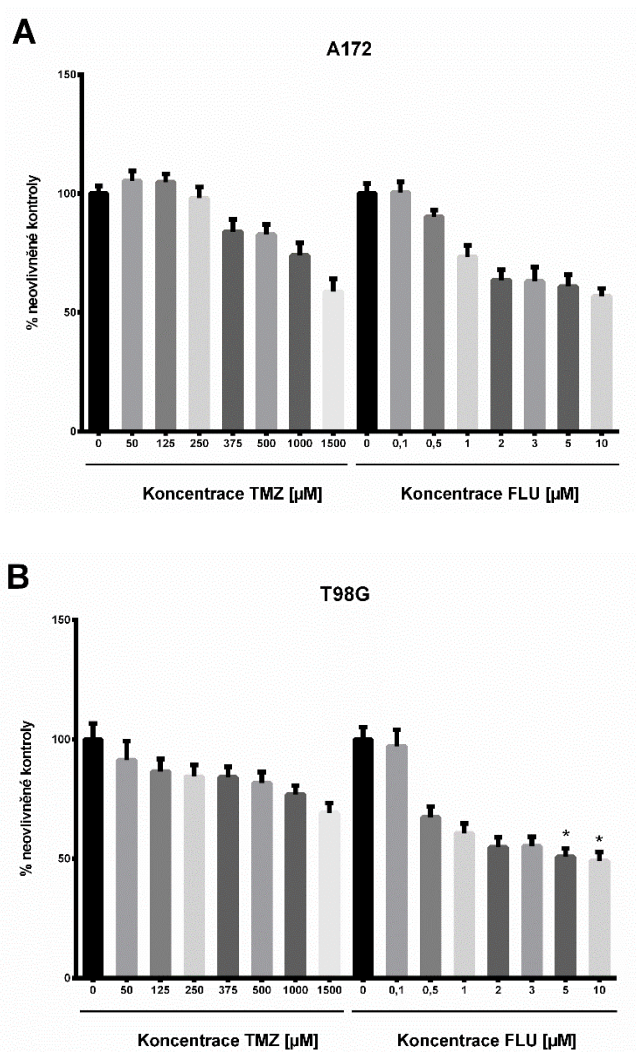
Výsledky měření jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota  $\pm$  SD z alespoň dvou nezávislých měření. Statistická analýza byla provedena pomocí Two-Way ANOVA testu, Bonferroniho testu. Statistická významnost je vyjádřena jako \* (případně #) a odpovídá hladině spolehlivosti  $p < 0,05$ . K analýze byl použit program GraphPad Prism 6.0.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Experimenty in vitro

#### 5.1.1 Vliv TMZ a FLU na proliferaci buněčných linií A172, T98G a U118MG

Proliferace buněk GBM byla nejprve stanovena na buněčných liniích A172 a T98G, přičemž buněčná linie A172 je považována za TMZ-senzitivní, zatímco buňky T98G jsou považovány za TMZ-rezistentní. Životnost buněk byla testována pomocí metody WST-1. Buňky byly po dobu 48 hod vystaveny působení TMZ v různých koncentracích (50  $\mu\text{M}$ ; 125  $\mu\text{M}$ ; 250  $\mu\text{M}$ ; 375  $\mu\text{M}$ ; 500  $\mu\text{M}$ ; 1000  $\mu\text{M}$  a 1500  $\mu\text{M}$ ) a FLU v různých koncentracích (0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 2  $\mu\text{M}$ ; 3  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ ).

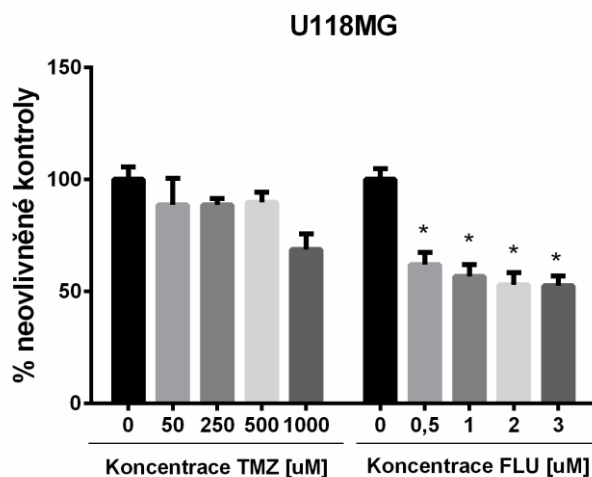


**Obrázek 4** Stanovení vlivu TMZ a FLU na proliferaci buněk A172 a T98G metodou WST-1. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

U obou buněčných linií docházelo ke snižování buněčné proliferace v závislosti na zvyšující se koncentraci TMZ a FLU. Větší efekt na životnost buněk vykazoval FLU, a to u obou buněčných linií. Vyšší citlivost k FLU pak vykazovala buněčná linie T98G, statisticky významné snížení bylo pozorováno u těchto buněk po podání FLU v koncentraci 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M.

Obecně je však možné pozorovat efekt FLU již při nižších koncentracích, zatímco TMZ snižoval životnosti buněk jen při vyšších koncentracích. Vliv vyšších koncentrací TMZ na buněčnou proliferaci je pak nepatrně výraznější u buněk A172, avšak ani u jedné z buněčných linií nebylo pozorováno statisticky významné snížení životnosti po podání TMZ.

Životnost buněk po ovlivnění vybranými koncentracemi TMZ a FLU byla kvůli možnosti následné implantace buněk do modelového organismu také testována u buněčné linie U118MG, kde bylo, vzhledem k hodnocení vlivu TMZ a FLU na životnost této buněčné linie v rámci jiných prací, zvoleno pro ovlivnění pouze omezené množství koncentrací (viz Obrázek 5).



**Obrázek 5** Stanovení vlivu TMZ a FLU na proliferaci buněk U118MG metodou WST-1. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

Z našich výsledků je patrné, že U118MG vykazuje výrazně větší citlivost k podání FLU než k podání TMZ, a to již při nízkých koncentracích podávaného léčiva. Snižování životaschopnosti je dokonce po podání všech testovaných koncentrací FLU

statisticky významné, zatímco ani podání vysokých koncentrací TMZ nevykazuje výrazný vliv na proliferaci buněk U118MG.

Na základě testování vlivu TMZ a FLU na buňky GBM byla stanovena střední inhibiční koncentrace IC50 pro tato léčiva u jednotlivých testovaných linií (viz Tabulka 5).

**Tabulka 5** Hodnoty IC50 TMZ a FLU

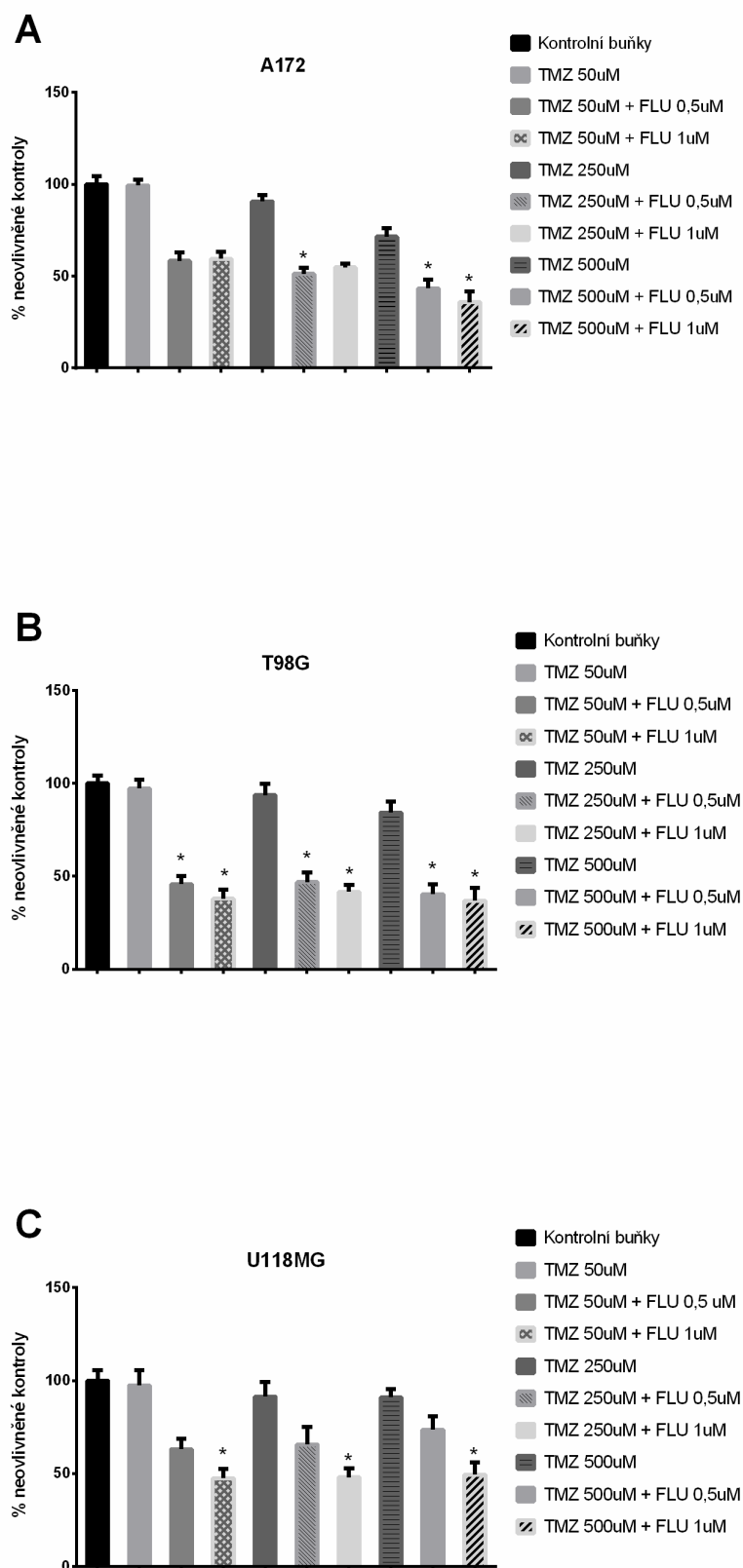
	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]	
	TMZ	FLU
A172	2567,0	6,530
T98G	2714,0	3,480
U118MG	3056,0	1,359

Z tohoto stanovení vyplývá, že nejcitlivější k TMZ byla buněčná linie A172 s hodnotou IC50 2567,0  $\mu\text{M}$ , zatímco citlivost k FLU byla nejvyšší u linie U118MG. Zde se hodnota IC50 rovnala 1,359  $\mu\text{M}$  koncentraci.

## 5.1.2 Vliv kombinace TMZ + FLU na proliferaci buněčných linií

### 5.1.2.1 Stanovení proliferace buněk ovlivněných kombinací TMZ + FLU

Následně byla testována proliferace buněk A172, T98G a U118MG po ovlivnění kombinacemi TMZ a FLU, opět pomocí metody WST-1. Buňky byly po dobu 48 hod vystaveny různým kombinacím TMZ + FLU (viz Obrázek 6).



**Obrázek 6** Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na proliferaci buněk A172, T98G a U118MG metodou WST-1. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

Všechny zkoumané kombinace TMZ + FLU u buněčných linií A172, T98G a U118MG obecně snižují buněčnou proliferaci více než samotný TMZ. Vyšší citlivost vůči jednotlivým kombinacím TMZ + FLU opět vykazovala buněčná linie T98G, kde všechny zkoumané kombinace léčiv snižují životnost buněk signifikantně.

V případě buněk A172 docházelo ke statisticky významnému snížení proliferace u kombinací TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 1  $\mu\text{M}$ , TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a TMZ 250  $\mu\text{M}$  + 0,5  $\mu\text{M}$ .

U buněčné linie U118MG je patrný výrazný efekt především při podání kombinace TMZ s FLU 1  $\mu\text{M}$ , kde dochází k statisticky významnému snížení proliferace buněk při podání všech takových kombinací.

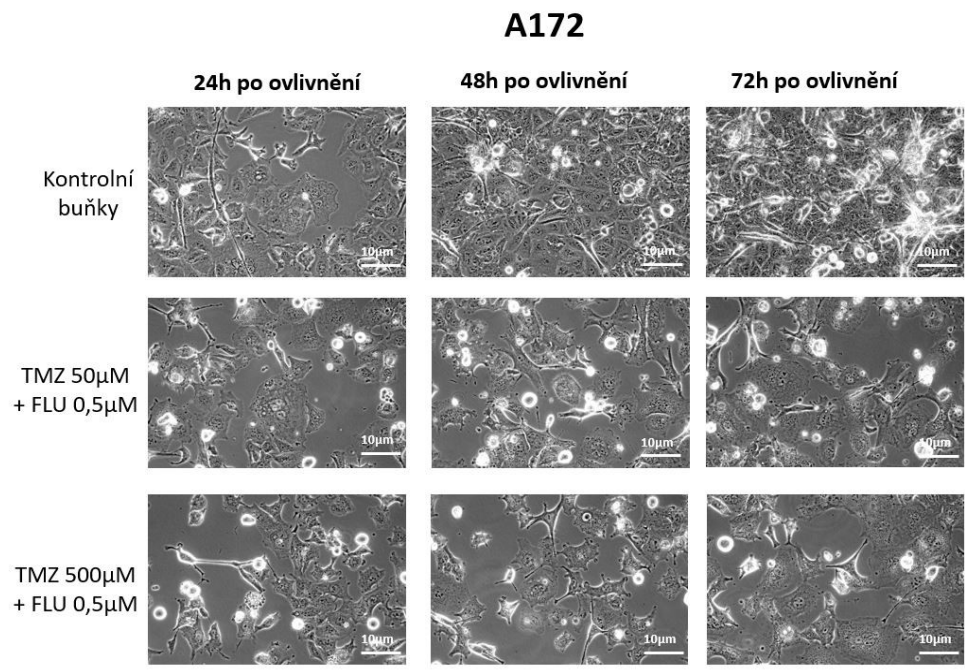
Z výše uvedených grafů je dále zřejmé, že dostačující nebo větší efekt na životnost a proliferaci buněk vykazují kombinace s nižšími koncentracemi TMZ.

Na základě výsledků testování životnosti buněk po podání kombinace TMZ + FLU byly pro další testování vybrány dvě kombinace látek, a sice TMZ 50  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$ . Pro další *in vitro* experimenty byly použity buněčné linie A172 a T98G.

#### **5.1.2.2 Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na morfologii buněk**

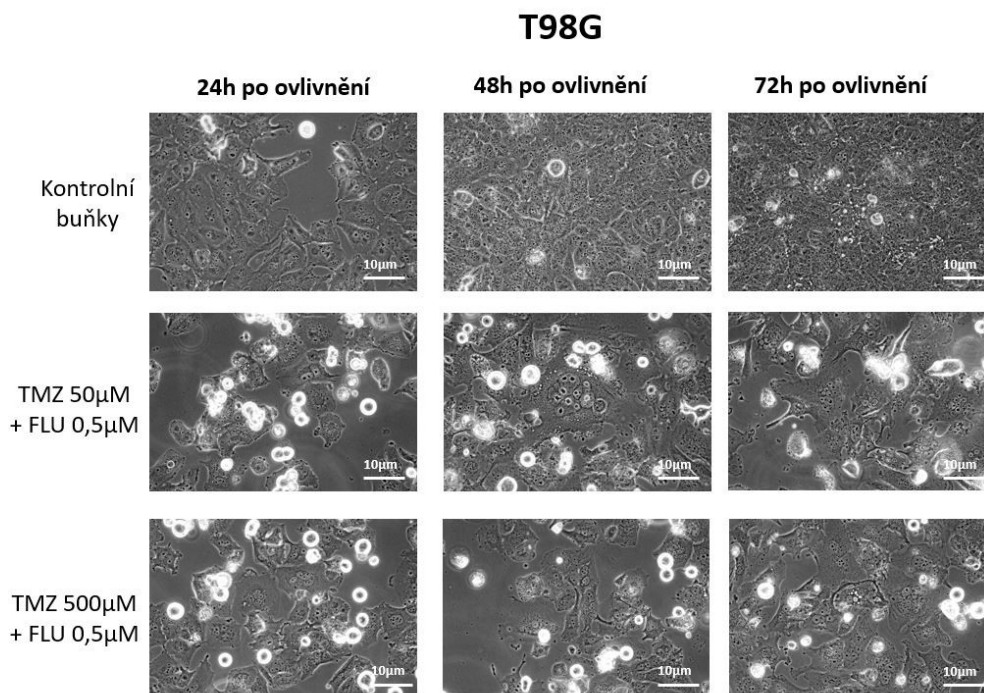
Morfologie buněk a její případné změny po ovlivnění vybranými kombinacemi TMZ + FLU byly pozorovány za použití metody fázového kontrastu. Buňky A172 a T98G byly ovlivněny příslušnou kombinací léčiv (TMZ 50  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  nebo TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$ ) a po 24, 48 a 72 hod od ovlivnění byly pozorovány pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem.





**Obrázek 7** Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na morfologii buněk A172 za použití fázového kontrastu, zvětšení 400x.

Efekt obou zvolených kombinací na buňky A172 je pozorovatelný již od prvního časového intervalu (tedy 24 hod po ovlivnění), kdy dochází ke snížení proliferace buněk oproti kontrolnímu vzorku. Tento efekt je dále možné pozorovat i ve zbývajících časových intervalech, kdy dále dochází ke změnám v morfologii buněk, zaoblování jejich tvaru a vzniku vícejaderných buněk (především v intervalu 72 hod po ovlivnění).



**Obrázek 8** Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na morfologii buněk T98G za použití fázového kontrastu, zvětšení 400x.

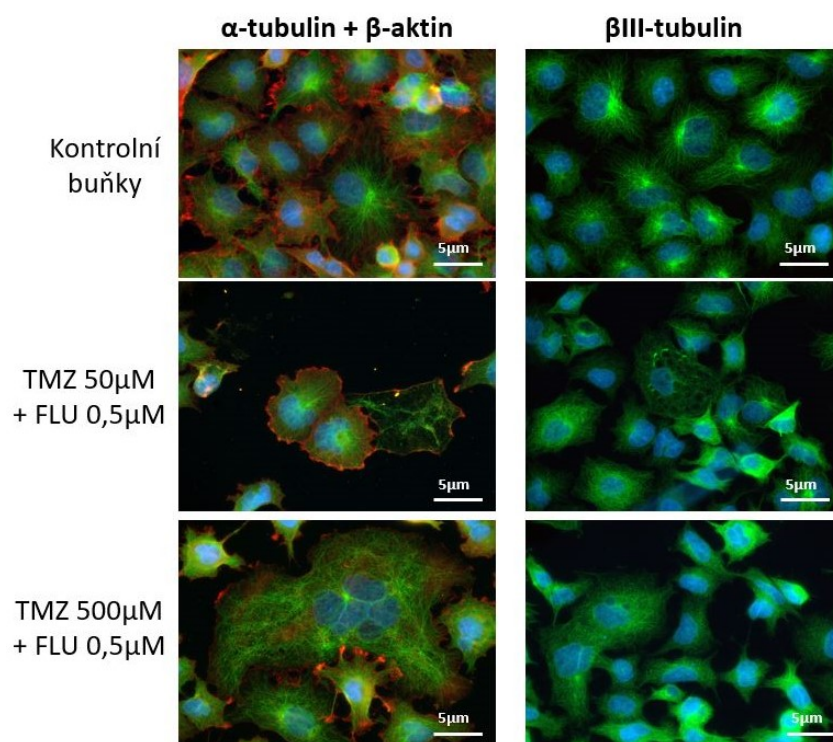
Také u buněk T98G je efekt kombinace TMZ + FLU viditelný již po 24 hod od ovlivnění. Zřetelná je snížená proliferace u buněk ovlivněných v porovnání s buňkami kontrolními. U buněk T98G je také možné pozorovat výraznější tvorbu vícejaderných buněk, změny v morfologii buněk a nastupující buněčnou smrt.

### 5.1.3 Vliv kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet

#### 5.1.3.1 Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU pomocí mikroskopie

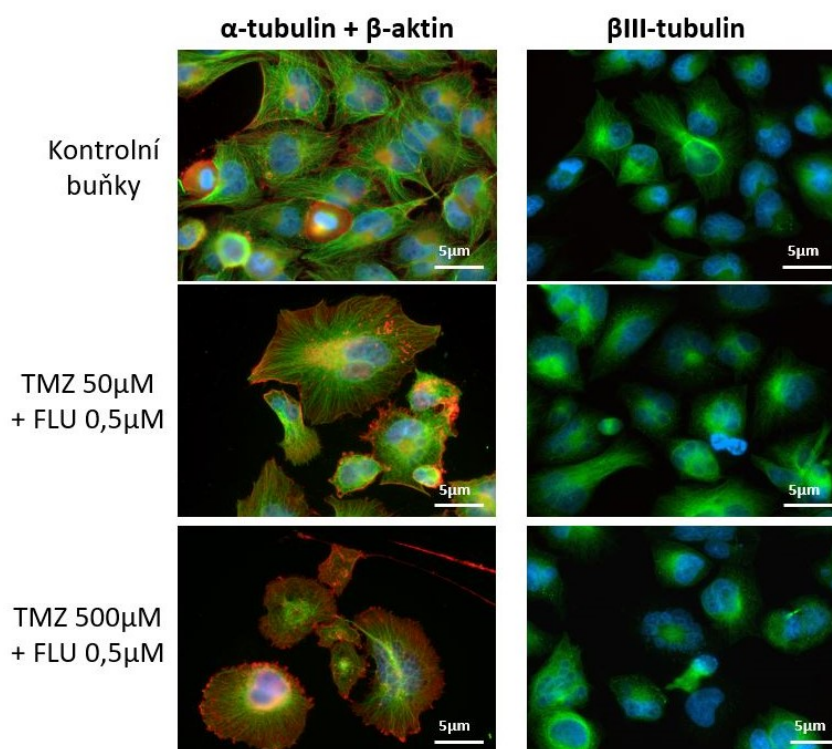
Vliv kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet byl pozorován pomocí fluorescenční mikroskopie. Buňky A172 a T98G byly vystaveny příslušné kombinaci léčiv (TMZ 50 μM + FLU 0,5 μM nebo TMZ 500 μM + FLU 0,5 μM) po dobu 48 hod, následně byly fixovány, fluorescenčně obarveny a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem.

## A172



**Obrázek 9** Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk A172 pomocí fluorescenčního barvení, zvětšení 600x (červená:  $\beta$ -aktin + zelená:  $\alpha$ -tubulin; zelená:  $\beta$ III-tubulin; modrá: DAPI).

## T98G



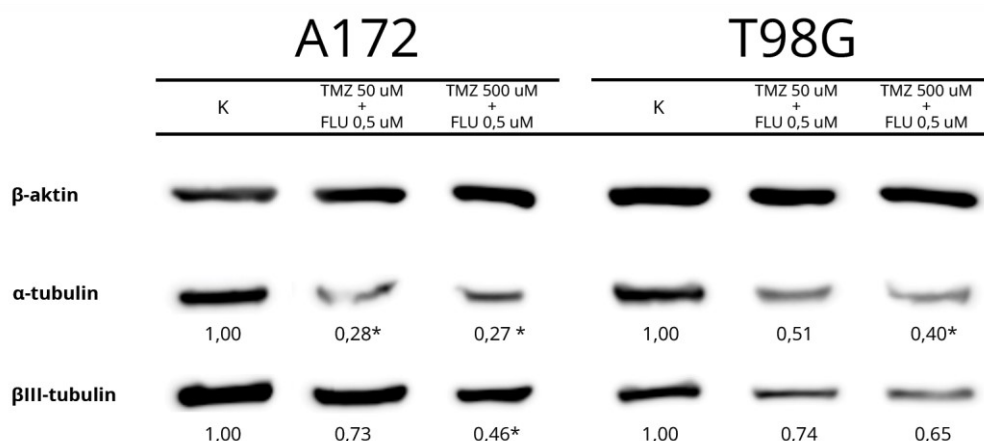
**Obrázek 10** Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk T98G pomocí fluorescenčního barvení, zvětšení 600x (červená:  $\beta$ -aktin + zelená:  $\alpha$ -tubulin; zelená:  $\beta$ III-tubulin; modrá: DAPI).

Efekt kombinace TMZ + FLU na mikrotubuly buněk A172 a T98G je viditelný již při ovlivnění buněk nižší koncentrací léčiv, tedy kombinací TMZ 50  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M. Viditelně dochází k narušení struktury tubulinových i aktinových vláken. Dochází také, hlavně u buněk T98G, ke vzniku vícejaderných buněk.

Podáním kombinace TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M je ještě více zřejmé, že dochází ke snížení buněčné proliferace oproti kontrolnímu vzorku a k narušení struktur mikrofilament. Patrná je také přítomnost buněk nepravidelných tvarů a velikostí. Zejména pak u buněk T98G jsou viditelné vícejaderné a rozpadlé buňky.

### 5.1.3.2 Stanovení markerů spojených s mikrotubulárním cytoskeletem

Markery spojené s mikrotubulárním cytoskeletem ( $\alpha$ -tubulin a  $\beta$ III-tubulin) byly také stanoveny na úrovni proteinů pomocí metody Western blot. Buňky buněčných linií A172 a T98G byly ovlivněny kombinací TMZ 50  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M a kombinací TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M po dobu 48 hod.



**Obrázek 11** Stanovení exprese markerů spojených s mikrotubuly na úrovni proteinů pomocí metody Western blot u buněčných linií A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

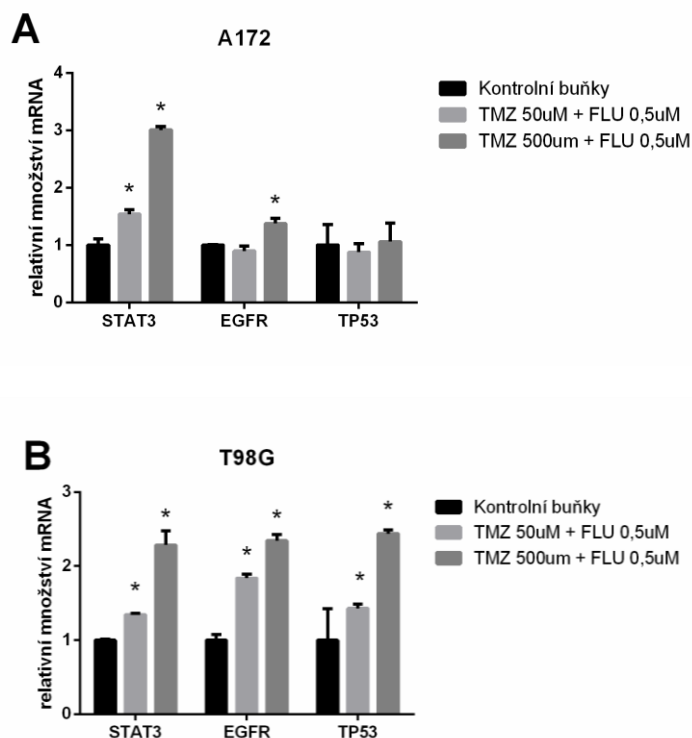
Po podání kombinace TMZ + FLU docházelo ke snížení exprese  $\alpha$ -tubulinu u obou testovaných buněčných linií, u buněk A172 bylo snížení exprese statisticky významné. Rozdíly v expresi po podání nižší či vyšší koncentrace TMZ spolu s FLU (TMZ 50  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M vs. TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M) nebyly nijak zásadní. Podobný trend je možné pozorovat také u buněk T98G, u kterých docházelo k signifikantnímu snížení exprese  $\alpha$ -tubulinu po ovlivnění buněk kombinací TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M.

I v případě  $\beta$ III-tubulinu je po podání kombinace TMZ + FLU (v obou koncentracích) viditelné snížení exprese u obou buněčných linií, které je však méně výrazné než u  $\alpha$ -tubulinu.

## 5.1.4 Vliv kombinace TMZ + FLU na aktivitu STAT3 a apoptózu

### 5.1.4.1 Stanovení exprese mRNA vybraných markerů

Stanovení relativního množství STAT3, EGFR a TP53 na úrovni mRNA bylo provedeno metodou RT-PCR. Buňky A172 a T98G byly ovlivněny TMZ 50  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M a TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M po dobu 24 hod.



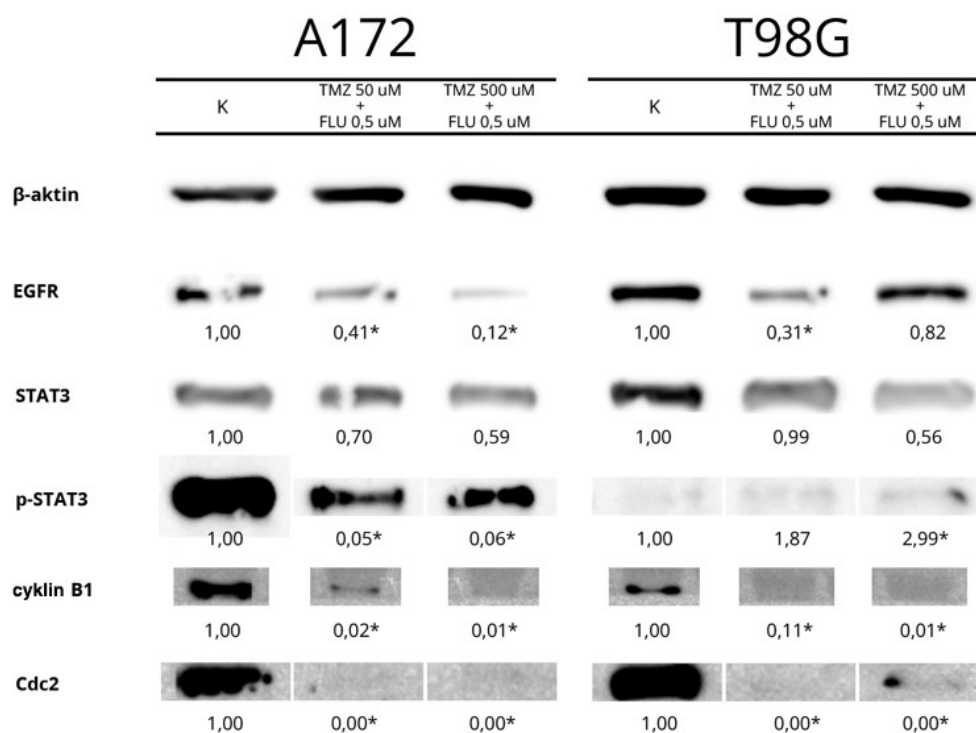
**Obrázek 12** Stanovení relativního množství STAT3, EGFR a TP53 na úrovni mRNA metodou RT-PCR u buněčných linií A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

Ovlivněním buněk kombinací TMZ + FLU docházelo u linií A172 i T98G ke statisticky významnému zvýšení relativního množství STAT3 v závislosti na použité kombinaci TMZ + FLU. Zvýšení hladiny STAT3 je v případě buněčné linie T98G doprovázeno i signifikantním zvýšením relativního množství EGFR a TP53.

V případě linie A172 nedocházelo, kromě signifikantního zvýšení množství EGFR po podání kombinace TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$ , u těchto molekul k žádné výrazné změně v jejich hladinách po podání testovaných kombinací látek.

#### 5.1.4.2 Stanovení proteinové exprese vybraných markerů

Ke stanovení exprese STAT3 a dalších vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu (phospho-STAT3, EGFR, cyklin B1, cdc2) na úrovni proteinů byla použita metoda Western blot. Expese těchto molekul byla stanovena u buněk A172 a T98G ovlivněných TMZ 50  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  po dobu 48 hod.



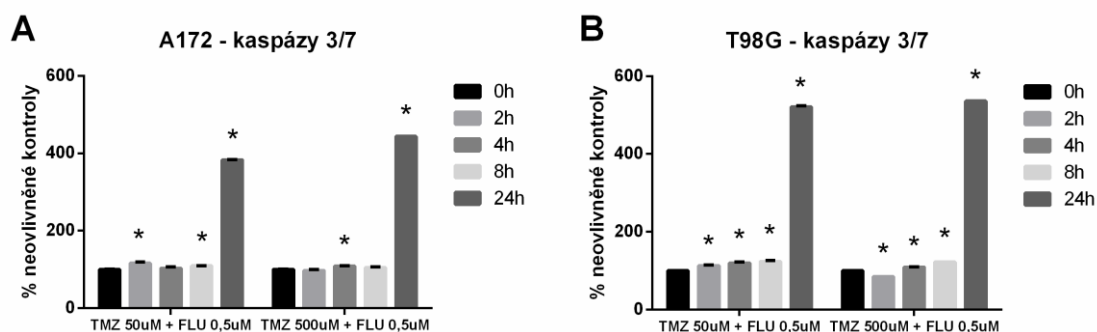
**Obrázek 13** Stanovení exprese STAT3 a dalších vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu na úrovni proteinů metodou Western blot u buněk A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

U buněk A172 docházelo ke snížení exprese STAT3, aktivovaného STAT3 (phospho-STAT3) a také molekuly EGFR. Podobně také docházelo ke snížení exprese regulátorů buněčného cyklu v přechodu z G2 do M fáze, cdc2 a cyklinu B1, u buněk ovlivněných oběma kombinacemi TMZ + FLU. S výjimkou exprese molekuly EGFR nebyl pozorován výraznější rozdíl v efektu jednotlivých kombinací, pouze u exprese EGFR docházelo k většímu snížení při použití kombinace TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M.

Také u buněk T98G docházelo ke snížení exprese cdc2 a cyklinu B1, a to bez ohledu na zvolenou kombinaci. Bylo pozorováno snížení exprese STAT3 po podání kombinace TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M, naopak exprese phospho-STAT3 byla po podání testovaných látek zvýšena. Exprese EGFR byla u buněk T98G snížena po ovlivnění kombinací TMZ 50  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M.

### 5.1.4.3 Stanovení aktivity kaspáz 3/7

Aktivita kaspáz 3/7 byla stanovena luminiscenčním měřením. Buňky byly ovlivněny vybranými kombinacemi TMZ a FLU (TMZ 50  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M nebo TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M) a aktivita kaspáz byla sledována v časových intervalech 2, 4, 8 a 24 hod po ovlivnění.



**Obrázek 14** Stanovení aktivity kaspáz 3/7 u buněčných linií A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

U buněk A172 i T98G docházelo k nejvýraznějšímu nárůstu aktivity efektorových kaspáz 3 a 7 po 24 hod od ovlivnění, a to v případě obou kombinací TMZ + FLU. U buněk A172 však nebyl pozorován nárůst aktivity kaspáz 3/7 v závislosti na čase. Po ovlivnění buněk kombinací TMZ 50  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M docházelo v porovnání s kontrolními buňkami ke statisticky významnému zvýšení aktivity kaspáz 3/7 pouze po 2, 8 a 24 hod. Po podání TMZ 500  $\mu$ M + FLU 0,5  $\mu$ M je pozorovatelná signifikantně zvýšená aktivita kaspáz 3/7 jen po 4 a 24 hod.

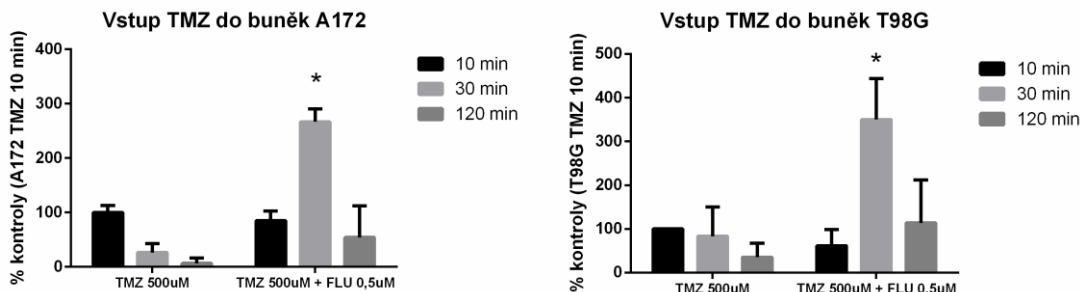
Naopak u buněk T98G ovlivněných oběma kombinacemi TMZ + FLU je možné v závislosti na čase pozorovat signifikantní nárůsty aktivity kaspáz 3/7, nejvýrazněji pak 24 hod po ovlivnění buněk.

### 5.1.5 Vstup TMZ a FLU do buněk GBM při podání jejich kombinace

Pro stanovení množství TMZ a FLU po podání jejich kombinace v buněčných liniích A172 a T98G byla použita LC/MS analýza. Ta byla provedena PharmDr. Adamem Skarkou, Ph.D. na Univerzitě Hradec Králové.



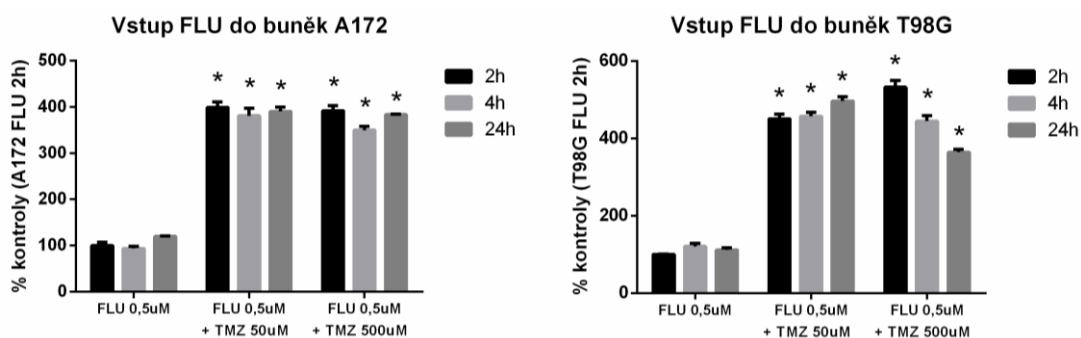
Pro stanovení koncentrace TMZ uvnitř buněk byly buněčné linie ovlivněny TMZ 500  $\mu\text{M}$  a kombinací TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a inkubovány po dobu 10 min, 30 min, 120 min.



**Obrázek 15** Stanovení množství TMZ v buněčných liniích A172 a T98G pomocí LC/MS analýzy po ovlivnění samotným TMZ a kombinací TMZ + FLU.  
\* $p < 0,05$  vs. TMZ 500  $\mu\text{M}$  10 min.

Ovlivnění buněk A172 a T98G kombinací TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  signifikantně zvyšovalo množství TMZ nacházejícího se v buňkách po 30min inkubaci v porovnání s ovlivněním samotným TMZ. Po podání kombinace léčiv navíc není patrný trend snižujícího se množství TMZ v závislosti na čase inkubace, který je viditelný při podání samotného TMZ.

Následně bylo stanoveno množství FLU vstupujícího do buněk. Pro toto stanovení byly buňky ovlivněny FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a kombinacemi TMZ 50  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a TMZ 500  $\mu\text{M}$  + FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a inkubovány po dobu 2 hod, 4 hod a 24 hod.



**Obrázek 16** Stanovení množství FLU v buněčných liniích A172 a T98G pomocí LC/MS analýzy po ovlivnění samotným FLU a kombinacemi TMZ + FLU.  
\* $p < 0,05$  vs. FLU 0,5  $\mu\text{M}$  2 hod.

Podáním obou testovaných kombinací TMZ + FLU se v buňkách A172 i T98G nacházelo signifikantně větší množství FLU než po ovlivnění buněk samotným FLU. Konkrétní podaná kombinace pak neměla na výsledné množství FLU v buňkách výraznější vliv. U buněk T98G zároveň docházelo k časově závislému poklesu hladiny FLU po podání kombinace s vyšší koncentrací TMZ, zatímco při podání kombinace s nižší koncentrací TMZ toto snižování hladiny pozorováno nebylo.

## 5.2 Experimenty in vivo

### 5.2.1 Implantace buněk U118MG do modelového organismu

#### 5.2.1.1 Vliv kombinace TMZ + FLU na růst nádorů v nu-nu myších

Pro implantaci do modelového organismu (nu-nu myši) byla zvolena GBM buněčná linie U118MG, která je tumorigenní v myších. Buněčná linie byla implantována do nu-nu myši a po dvou týdnech růstu nádorů bylo zahájeno podávání testovaných léčiv a jejich kombinací nu-nu myším po dobu následujících 14 dnů. K usmrcení nu-nu myši došlo 24 hodin od podání poslední dávky léčiv.

Nádory získané z nu-nu myši byly zváženy a zaznamenány. Počet získaných a analyzovaných nádorů byl ale menší, než se na začátku experimentu předpokládalo, vzhledem k faktu, že některé nu-nu myši pokus nepřežily a u některých nu-nu myši nádory nenarostly.

**Tabulka 6** Vliv podání jednotlivých testovaných léčiv na velikost nádorů získaných z nu-nu myši – 1. pokus

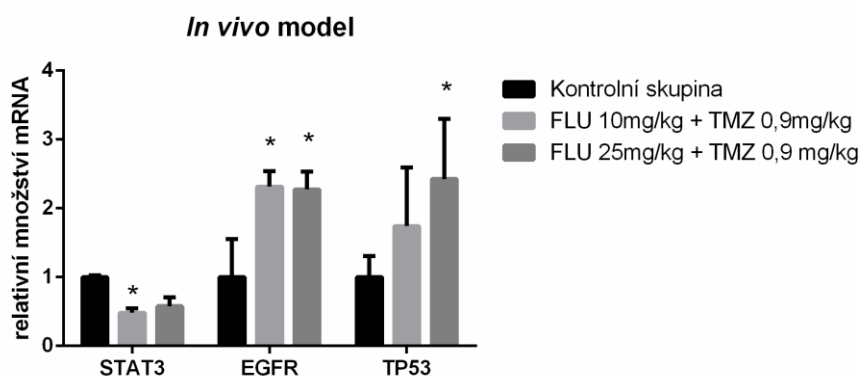
	Průměrná váha [g]	SD	Počet nádorů
Kontrolní skupina	0,13	± 0,02	n = 2
FLU 10 mg/kg	0,03*	± 0,01	n = 2
FLU 25 mg/kg	0,05*	± 0,02	n = 4
TMZ 0,9 mg/kg	0,05*	± 0,03	n = 6
FLU 10 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg	0,055*	± 0,02	n = 4
FLU 25 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg	0,065*	± 0,01	n = 4

Podle průměrných hmotností nádorů ve výše uvedené tabulce (viz Tabulka 6) můžeme pozorovat, že podání jak TMZ či FLU samotných, tak i kombinace TMZ + FLU snižuje statisticky významně váhu nádorů. Největší vliv pak vykazuje FLU 10 mg/kg.

### 5.2.1.2 Vliv kombinace TMZ + FLU na aktivitu STAT3 a vyvolání apoptotické buněčné smrti u vzorků získaných z nu-nu myší

#### 5.2.1.2.1 Stanovení mRNA vybraných markerů u vzorků získaných z nu-nu myší

Stanovení relativního množství STAT3, EGFR a TP53 na úrovni mRNA bylo provedeno metodou RT-PCR. Pro toto stanovení byly použity nádory získané z pokusů na nu-nu myších, kterým byly podávány kombinace léčiv TMZ + FLU.



**Obrázek 17** Stanovení relativního množství STAT3, EGFR a TP53 na úrovni mRNA metodou RT-PCR u nu-nu myší po podání kombinace TMZ + FLU.

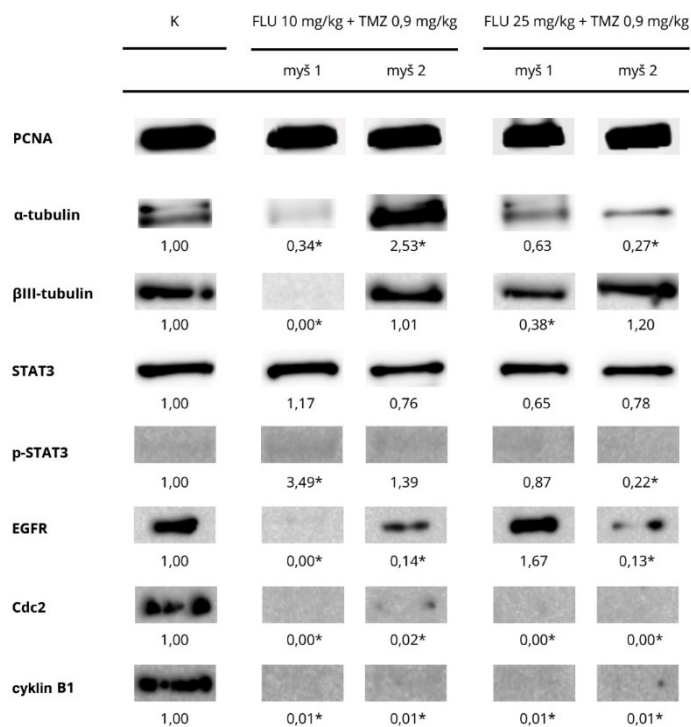
\* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

U myší po podání kombinace FLU 10 mg/kg + TMZ 0,9 mg/došlo ke snížení exprese markeru STAT3. U myší, kterým byla podána kombinace FLU 25 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg, byla zjištěna zvýšená exprese markeru TP53. Expresse EGFR se s podáním obou kombinací TMZ + FLU statisticky významně zvýšila.

#### 5.2.1.2.2 Stanovení proteinové exprese vybraných markerů u vzorků získaných z nu-nu myší

Expresse markerů spojených s mikrotubulárním cytoskeletem ( $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ III-tubulinu) a exprese vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu (STAT3, phospho-STAT3, EGFR, cdc2, cyklin B1) byly stanoveny na úrovni proteinů

pomocí metody Western blot. K analýze byly použity nádory získané z kontrolní myši, nádory ze 2 myši, kterým byla podávána kombinace FLU 10 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg, a nádory z dalších 2 myši, kterým byla podávána naopak kombinace FLU 25 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg.



**Obrázek 18** Stanovení exprese STAT3 a dalších vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu na úrovni proteinů metodou Western blot u nu-nu myši po podání kombinace TMZ + FLU. \* $p < 0,05$  vs. neovlivněná kontrola.

U nádorů získaných z modelového organismu je patrné v případě vzorku myši 1 snížení exprese  $\alpha$ -tubulinu i  $\beta$ III-tubulinu po podání kombinace TMZ + FLU v obou koncentracích FLU. U vzorku myši 2 však tento trend patrný není. Naopak dokonce dochází v případě podání kombinace FLU 10 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg ke statisticky významnému zvýšení exprese  $\alpha$ -tubulinu.

Podáním kombinace TMZ + FLU v obou zkoumaných koncentracích FLU dochází k mírnému snížení exprese STAT3. Snížení exprese phospho-STAT3 je pak pozorovatelné po podání kombinace FLU 25 mg/kg + TMZ 0,9-mg/kg, kombinace s nižší koncentrací FLU naopak expresi phospho-STAT3 zvyšuje. Expresi molekuly EGFR je po podání obou kombinací TMZ + FLU statisticky významně snižena v případě alespoň jednoho vzorku.

U regulátorů buněčného cyklu v přechodu z G2 do M fáze, cyklinu B1 a cdc2, bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese po podání kombinace TMZ + FLU bez ohledu na konkrétní koncentraci FLU.

## 5.2.2 Implantace buněk U118MG do modelového organismu – 2. pokus

### 5.2.2.1 Vliv kombinace TMZ + FLU na růst nádorů v nu-nu myších

Buněčná linie U118MG byla opět implantována do modelového organismu a ponechána po dobu dvou týdnů pro umožnění růstu. Poté bylo zahájeno podávání testovaných léčiv a jejich kombinací ve stejných koncentracích jako v předchozím pokusu, a to po dobu 14 dní. K usmrcení myší došlo přibližně 60 minut po podání poslední dávky – přesný časový interval spolu s váhou získaných nádorů byl zaznamenán. Opět z důvodu předčasného úmrtí některých nu-nu myší a z důvodu omezeného růstu nádorů v některých nu-nu myších byl celkový počet analyzovaných nádorů nižší, než byl původní předpoklad.

**Tabulka 7** Vliv podání jednotlivých testovaných léčiv na velikost nádorů získaných z nu-nu myší – 2. pokus

	<b>Průměrná váha [g]</b>	<b>SD</b>	<b>Počet nádorů</b>
Kontrolní skupina	0,03	± 0,02	n = 9
FLU 10 mg/kg	0,04	± 0,03	n = 6
FLU 25 mg/kg	0,06	± 0,03	n = 10
TMZ 0,9 mg/kg	0,06	± 0,02	n = 10
FLU 10 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg	0,06	± 0,03	n = 10
FLU 25 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg	0,04	± 0,02	n = 10

Po podání testovaných léčiv nedocházelo ke snížení velikosti nádorů oproti kontrole, protože i u kontrolních neléčených myší nádory nerostly. Na základě získaných výsledků bylo dále přistoupeno k testování proliferačního indexu Ki67 u získaných vzorků pro lepší posouzení vlivu jednotlivých testovaných léčiv a jejich kombinací na nádory získané z nu-nu myší.

### 5.2.3 Hodnocení proliferačního indexu Ki67 u nádorů získaných z nu-nu myší

Hodnocení proliferačního indexu Ki67 u nádorů získaných z nu-nu myší bylo provedeno na Fingerlandově ústavu patologie ve Fakultní nemocnici Hradec Králové pomocí imunohistochemického barvení.

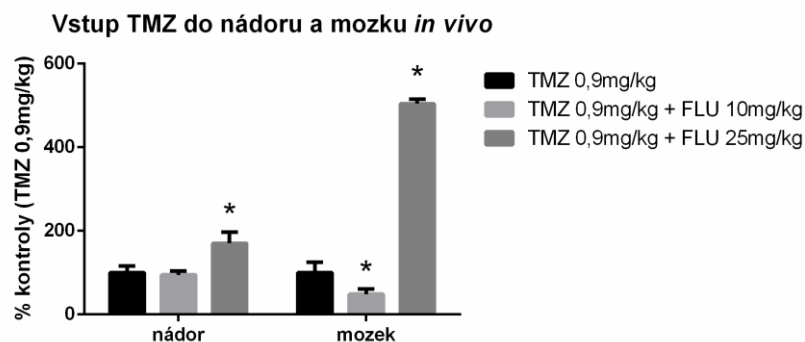
**Tabulka 8** Vliv podání TMZ a FLU na proliferační index Ki67 u nádorů z nu-nu myší

	<b>proliferační index Ki67 [%]</b>
Kontrolní skupina	25
FLU 10 mg/kg	10
FLU 25 mg/kg	20
TMZ 0,9 mg/kg	30
FLU 10 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg	25
FLU 25 mg/kg + TMZ 0,9 mg/kg	25

Největší vliv na proliferační index Ki67 má dle tabulky výše (viz Tabulka 8) podání FLU 10 mg/kg. FLU v této koncentraci snižuje proliferační index Ki67 o více jak polovinu v porovnání s kontrolní skupinou. Snížení je viditelné i u FLU 25 mg/kg. Naopak podáním samotného TMZ (TMZ 0,9 mg/kg) se proliferační index Ki67 zvýšil. V případě podání kombinace TMZ + FLU v obou koncentracích FLU nedošlo k žádné změně proliferačního indexu Ki67 oproti kontrolní skupině.

### 5.2.4 Stanovení distribuce testovaných léčiv při podání TMZ, FLU a jejich kombinace modelovému organismu *in vivo*

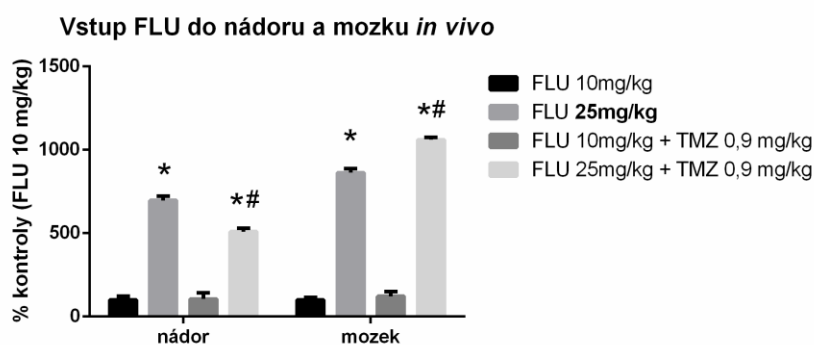
Pro stanovení množství TMZ a FLU při podání TMZ, FLU a jejich kombinace modelovému organismu *in vivo* byla použita LC/MS analýza. Ta byla provedena PharmDr. Adamem Skarkou, Ph.D. na Univerzitě Hradec Králové.



**Obrázek 19** Stanovení množství TMZ v nádoru a mozku modelového organismu po podání samotného TMZ a kombinace TMZ + FLU. \* $p < 0,05$  vs. TMZ 0,9 mg/kg.

Podáním kombinace TMZ + FLU s nižší koncentrací FLU (TMZ 0,9 mg/kg + FLU 10 mg/kg) modelovému organismu se množství TMZ v nádoru prakticky nezměnilo v porovnání s podáním samotného TMZ. Avšak po podání kombinace TMZ 0,9 mg/kg + FLU 25 mg/kg se v nádoru nacházelo signifikantně vyšší množství TMZ.

V případě mozku bylo množství TMZ po podání kombinace TMZ 0,9 mg/kg + FLU 10 mg/kg dokonce statisticky významně nižší než u modelového organismu, kterému byl podán samotný TMZ. Naopak po podání kombinace s vyšší koncentrací FLU (TMZ 0,9 mg/kg + FLU 25 mg/kg) se v mozku nacházelo signifikantně vyšší množství TMZ.



**Obrázek 20** Stanovení množství FLU v nádoru a mozku modelového organismu po podání samotného FLU a kombinace TMZ + FLU. \* $p < 0,05$  vs. FLU 10 mg/kg, # $p < 0,05$  vs. FLU 25 mg/kg.

Po podání samotného FLU modelovým organismům se množství FLU v nádoru a v mozku zvyšuje v závislosti na podané koncentraci FLU. Podáním kombinace TMZ + FLU s nižší koncentrací FLU bylo množství FLU v nádoru i v mozku prakticky

stejně jako po podání samotného FLU 10 mg/kg. Naopak porovnáme-li množství FLU v těchto tkáních po podání samotného FLU 25 mg/kg a po podání kombinace TMZ 0,9 mg/kg + FLU 25 mg/kg, je zřejmé, že po podání kombinace TMZ + FLU bylo množství FLU v mozku vyšší než po podání samotného FLU. V případě nádoru je ale viditelný opačný trend, tedy snížené množství FLU po podání kombinace TMZ + FLU.



## 6. DISKUSE

Glioblastoma multiforme je nejčastější a nejagresivnější primární nádor mozku s velmi špatnou prognózou (Jiapaer a kol., 2018).

Podání chemoterapeutické léčby jakožto součásti komplexní léčby GBM je stále značně omezené, a to zejména z důvodu nepropustnosti hematoencefalické bariéry pro běžná chemoterapeutika (Adam, Krejčí a Vorlíček, 2010). Dnes nepoužívanějším chemoterapeutikem při léčbě GBM je TMZ. Značným problémem při podání TMZ je však již přítomná nebo postupně se rozvíjející rezistence vůči léčbě (Young a kol., 2015; Karachi a kol., 2018).

Nejen kvůli úskalím souvisejícím s podáním TMZ existuje neustále snaha nalézt vhodné látky, které by zlepšily účinek TMZ a snížily jeho toxicitu. Klasický vývoj nových protinádorových léčiv je však extrémně zdlouhavý a finančně velmi náročný proces. Slibnou alternativou ale může být využití léčiv původně používaných pro jinou indikaci, u kterých byl objeven protinádorový efekt. Testování takových látek v praxi přináší značné výhody díky jejich často již běžnému použití v klinické praxi, což přináší informace o jejich bezpečnosti a toxicitě (Hanušová a kol., 2015).

Jedním z potenciálních chemoterapeutik je anthelmintikum FLU, které inhibuje polymeraci mikrotubulů a zabraňuje tak jejich vzniku. FLU již v předchozích studiích vykazoval inhibiční účinek na celou řadu nádorových buněk, např. karcinomu prsu, leukemické a myelomové buňky (Čáňová a kol., 2017). Kromě toho byl prokázán účinek FLU na inhibici proliferace také u buněk gliomů, kde byla pozorována jeho schopnost vyvolat zastavení buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze (Zhou a kol., 2018).

V rámci našeho projektu byl nejprve testován vliv FLU na proliferaci buněk GBM, konkrétně u buněk A172 označovaných jako TMZ-sensitivní a T98G vykazujících vysokou expresi MGMT a tudíž i rezistenci k ovlivnění TMZ (Alonso a kol., 2007). U obou buněčných linií docházelo ke snížení buněčné proliferace již při nízkých koncentracích podávané látky, na rozdíl od TMZ, který vykazoval vliv na snížení životaschopnosti buněk jen při vyšších, v praxi nedosažitelných, koncentracích. Vyšší citlivost k FLU pak vykazovala buněčná linie T98G, jejíž IC50 pro FLU odpovídala 3,480  $\mu\text{M}$  koncentraci. Testování vlivu jednotlivých léčiv dále

proběhlo ve zkrácené míře také u buněčné linie U118MG, u které bylo zjištěno, že je výrazně citlivější k podání FLU než k podání TMZ a IC50 pro FLU dosahovala hodnoty 1,359  $\mu\text{M}$ .

FLU není jediným léčivem z anthelmintické skupiny, které je testováno pro jeho protinádorový účinek. Podání příbuzné látky mebendazolu v kombinaci s TMZ je v současné době testováno v rámci klinické studie (Gallia a kol., 2021). Také FLU byl již dříve testován pro možné zvýšení účinnosti běžně používaných cytostatik, a to jak s léčivy ze skupiny se stejným mechanismem účinku (vinblastin a vinkristin), tak dále i s léčivy působícími na nádorové buňky jiným mechanismem účinku (doxorubicin a 5-fluorouracil) (Spagnuolo a kol., 2010; Hou a kol., 2015).

Na základě těchto informací byl FLU v naší práci testován z hlediska možné potenciace účinku TMZ. V porovnání s podáním samotného TMZ byl při podání různých kombinací TMZ a FLU pozorován výraznější inhibiční efekt na buněčnou proliferaci u všech buněčných linií. U buněk T98G bylo dokonce možné pozorovat nejvyšší inhibici proliferace při podání nejnižší testované koncentrace TMZ v kombinaci s FLU 0,5  $\mu\text{M}$  a FLU 1  $\mu\text{M}$ , což naznačilo potenciaci protinádorového účinku obou látek.

Efekt vybraných kombinací TMZ (50  $\mu\text{M}$ ; 500  $\mu\text{M}$ ) + FLU (0,5  $\mu\text{M}$ ) na proliferaci buněk byl dále potvrzen pomocí fázové kontrastní mikroskopie, kdy již po 24 hodinách od ovlivnění zřetelně docházelo k snížení buněčné proliferace oproti kontrolnímu vzorku. Zároveň bylo možné pozorovat morfologické změny buněk, jejich zaoblování, vznik vícejaderných buněk a nastupující buněčnou smrt.

Mechanismus účinku FLU spočívá ve schopnosti se specificky vázat na  $\beta$ -tubulin mikrotubulů a zabraňovat tak polymerizaci tubulinu (Čáňová a kol., 2017). To otevírá možnost pro cílené působení na buňky GBM vzhledem ke dříve prokázané zvýšené expresi  $\beta$ III-tubulinu (Katsetos a kol., 2015). V našem experimentu jsme také zkoumali vliv kombinací TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk A172 a T98G. Při pozorování pomocí fluorescenční mikroskopie bylo zřetelné, že podáním kombinací TMZ + FLU dochází k narušení struktury tubulinových vláken, ke vzniku vícejaderných buněk a buněk nepravidelných tvarů a velikostí a v neposlední řadě dochází k rozpadu buněk. Vliv kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet byl pak potvrzen

na úrovni proteinů, kde bylo jasně pozorovatelné snížení exprese  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ III-tubulinu.

Dle studie Lin a kol. (2019) FLU vykazuje protinádorovou aktivitu také tím, že blokuje translokaci a aktivaci STAT3. Tato molekula je v buňkách GBM aktivována a také často zvýšeně exprimována, čímž dochází k negativnímu ovlivnění exprese TP53. Proto se zdá být zablokování aktivity STAT3 cestou vedoucí k apoptóze nádorové buňky.

Také v naší studii byla zkoumána exprese markerů souvisejících se signální dráhou STAT3 po ovlivnění buněk kombinacemi TMZ + FLU. Z našich výsledků je možné pozorovat snížení aktivace STAT3 (ve formě snížení exprese markeru phospho-STAT3) na úrovni proteinů a dále také snížení markerů cyklinu B1 a cdc2 po ovlivnění kombinacemi TMZ + FLU, což naznačuje možné zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi (Zhou a kol., 2018). Ačkoli při stanovení relativního množství STAT3 na úrovni mRNA metodou RT-PCR byl pozorován opačný trend, zároveň docházelo ke zvýšení relativního množství TP53, jakožto supresorového proteinu iniciujícího fyziologicky v buňkách opravu DNA či apoptózu v případě nevratného poškození (Carlsson a kol., 2014). Z dosavadních studií ovšem není jasné, zda má FLU také inhibiční efekt na expresi STAT3, nebo pouze na jeho aktivaci.

Vzhledem k tomu, že naše předchozí výsledky naznačovaly možné zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi, studovali jsme také účinky podání kombinací TMZ + FLU na aktivitu kaspáz 3/7 jakožto klíčových faktorů apoptózy. U obou studovaných buněčných linií byl pozorován postupný mírný nárůst aktivity těchto kaspáz v závislosti na čase (především u buněk T98G), k nejvýraznějšímu nárůstu pak došlo u obou linií po 24 hod od ovlivnění. Tyto výsledky odpovídají předchozímu časosběrnému pozorování působení kombinací TMZ + FLU na buňky GBM, které vykazovaly výrazný nástup účinku právě v intervalu 24 hod od ovlivnění.

V poslední části naší *in vitro* studie bylo kvantitativně stanoveno množství TMZ a FLU vstupujících do buněk A172 a T98G po podání samotných léčiv a po podání testovaných kombinací. Dle získaných výsledků je zřejmé, že při podání kombinace TMZ + FLU dochází ke zvýšení koncentrace jednotlivých látek uvnitř buněk, a to v případě TMZ i FLU. Navíc v případě podání kombinace TMZ + FLU zároveň nepozorujeme postupné a velmi rychlé snižování parentního TMZ uvnitř buněk jako

po podání samotného léčiva. Tyto výsledky naznačují, že výrazný efekt kombinace léčiv na buňky GBM může být způsoben inhibicí efluxních transportérů.

Námi získané *in vitro* výsledky byly ověřeny i na *in vivo* modelovém organismu. Jako modelový organismus byly vybrány nu-nu myši, do kterých byla implantována buněčná linie U118MG.

Kombinace TMZ + FLU vykazovala inhibiční efekt na růst nádorů v nu-nu myších, kdy docházelo ke snížení váhy nádorů. Tyto výsledky však nebyly potvrzeny při opakovaném pokusu, který byl ovšem komplikovaný velmi omezeným růstem nádorů v modelových organismech obecně. U těchto vzorků tak bylo přistoupeno k testování proliferačního indexu Ki67, který byl výrazně snížený po podání samotného FLU (především pak po podání FLU s nižší koncentrací). Nicméně ale nebyl pozorován žádný efekt na expresi Ki67 po podání kombinací TMZ + FLU.

Nádorová tkáň získaná z nu-nu myši byla dále analyzována na úrovni proteinů a na úrovni mRNA z hlediska efektu podaných léčiv na mikrotubulární cytoskelet a na ovlivnění drah souvisejících s regulací buněčného cyklu. Podobně jako při našem experimentu na ustálených buněčných liniích docházelo u nádorů získaných z nu-nu myši, jimž byly podávány kombinace TMZ + FLU, ke snížení exprese markerů  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ III-tubulinu a vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu (STAT3, phospho-STAT3, EGFR, cdc2, cyklin B1). Výraznějších výsledků bylo obecně dosaženo podáním kombinace léčiv s nižší koncentrací TMZ.

Také u nádorové tkáně získané z nu-nu myši jsme stanovovali množství TMZ a FLU vstupujícího do nádoru. Stanovení vstupu jednotlivých testovaných látek jsme rovněž provedli u klíčových orgánů, především u mozku. Z výsledků bylo patrné, že podáním kombinace TMZ + FLU se jak v nádoru, tak v mozku nachází větší množství TMZ i FLU než po podání látek samotných. Především pak po podání kombinace s vyšší koncentrací FLU dochází k výraznému zvýšení hladiny TMZ v těchto orgánech.

Na základě našich výsledků je možné konstatovat, že FLU je nadějným protinádorovým léčivem a jeho kombinace s běžně používaným chemoterapeutikem TMZ vykazuje velmi výrazný inhibiční efekt na proliferaci buněk GBM. Naše výsledky také naznačují, že podání kombinace TMZ + FLU zvyšuje vstup jednotlivých látek do buněk. Zdá se tedy, že by podání kombinace TMZ + FLU mohlo vyřešit současná úskalí spojená s podáním TMZ (nízká koncentrace léčiva, jež se běžně do nádoru

dostává) a FLU (nízká biologická dostupnost kvůli omezené absorpci do krevního řečiště). Další pokračování experimentu je nezbytné především pro hlubší prozkoumání mechanismu účinku stojícího za výrazným efektem kombinace těchto dvou testovaných látek. Dále by bylo vhodné se zaměřit na kombinace TMZ + FLU s nižšími koncentracemi léčiv, které se zdají být pro účinek dostatečné, v některých případech vykazují i lepší účinky než kombinace s vyšší koncentrací, a jejichž podání by mohlo snižovat toxicitu jednotlivých podávaných léčiv.

## 7. ZÁVĚR

Na základě provedených experimentů lze získané výsledky shrnout do následujících bodů:

1. Podání FLU a kombinací TMZ + FLU snižovalo proliferaci buněk A172, T98G a U118MG více než podání samotného TMZ.
2. Ovlivněním buněk kombinacemi TMZ + FLU docházelo viditelně ke změnám v morfologii buněk a k narušení struktur mikrofilament, zároveň docházelo ke snížení exprese  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ III-tubulinu.
3. U buněk A172 a T98G docházelo podáním kombinací TMZ + FLU ke snížení exprese STAT3, EGFR, cyklinu B1 a cdc2 na úrovni proteinů, což naznačuje zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi. Výrazný nárůst aktivity kaspáz 3/7 byl u buněk A172 a T98G pozorován 24 hod po ovlivnění kombinacemi TMZ + FLU, zvýšení bylo po podání obou kombinací přibližně stejné.
4. V buňkách A172 i T98G se po ovlivnění kombinacemi TMZ + FLU nacházela větší koncentrace TMZ a FLU než v případě podání samotných léčiv.
5. Vliv FLU, TMZ a jejich kombinace na růst nádorů v nu-nu myších nebyl jednoznačný vzhledem ke zcela odlišným výsledkům získaných ze dvou nezávislých experimentů.
6. Vliv kombinace TMZ + FLU na snížení exprese markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu na úrovni proteinů byl potvrzen i u nádorů získaných z nu-nu myší, lepších výsledků bylo dosaženo po podání kombinace s nižší koncentrací TMZ.
7. Podáním kombinace TMZ + FLU se v nádoru a v mozku nu-nu myší zvyšovalo množství TMZ i FLU v porovnání s tkáněmi získanými z nu-nu myší, kterým bylo podáno jen samotné léčivo.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

AA – akrylamid

AIC – 5-aminoimidazol-4-karboxamid

APS – persíran amonný

bisAA – bis-akrylamid

BSA – bovinní sérový albumin

cDNA – complementary DNA

CNS – centrální nervový systém

CT – počítačová tomografie

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru

EMEM – Eagle's Minimum Essential Medium

FBS – fetální bovinní sérum

FLU – flubendazol

FLU-R – redukovaný flubendazol

GIT – gastrointestinální trakt

GBM – glioblastoma multiforme

HCl – kyselina chlorovodíková

IDH1 – isocitrátdehydrogenáza-1

LC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

MAPS – microtubule-associated proteins

MC – methylcelulóza

MGMT – O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA-methyltransferáza

MR – magnetická rezonance

MTIC – 5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazol-4-karboxamid

PBS – fosfátový pufr

PET – pozitronová emisní tomografie

PTEN – homolog fosfatázy a tenzinu

PVDF membrána – polyvinylidendifluoridová membrána

RT-PCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

SD – směrodatná odchylka

SDS – dodecylsírán sodný

STAT3 – převodník signálu a aktivátor transkripce 3

TBS – tris-buffered saline

TMZ – temozolomid

VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor

WHO – Světová zdravotnická organizace



## 9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Ředění roztoků pro stanovení kalibrační křivky pro BCA měření koncentrace bílkovin .....	32
Tabulka 2 Složení separačního gelu .....	33
Tabulka 3 Složení 4% zaostřovacího gelu .....	33
Tabulka 4 Rozdělení skupin in vivo experimentu .....	41
Tabulka 5 Hodnoty IC50 TMZ a FLU.....	46
Tabulka 6 Vliv podání jednotlivých testovaných léčiv na velikost nádorů získaných z nu-nu myši – 1. pokus .....	58
Tabulka 7 Vliv podání jednotlivých testovaných léčiv na velikost nádorů získaných z nu-nu myši – 2. pokus .....	61
Tabulka 8 Vliv podání TMZ a FLU na proliferační index Ki67 u nádorů z nu-nu myši	62

## 10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura temozolomidu (zdroj: <a href="https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/t2577">https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/t2577</a> ) .....	17
Obrázek 2 Struktura mikrotubulů (zdroj: Goodson a Jonasson, 2018).....	20
Obrázek 3 Chemická struktura flubendazolu (zdroj: Čáňová a kol., 2017) .....	22
Obrázek 4 Stanovení vlivu TMZ a FLU na proliferaci buněk A172 a T98G metodou WST-1. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola. ....	44
Obrázek 5 Stanovení vlivu TMZ a FLU na proliferaci buněk U118MG metodou WST-1. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola. ....	45
Obrázek 6 Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na proliferaci buněk A172, T98G a U118MG metodou WST-1. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola. ....	47
Obrázek 7 Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na morfologii buněk A172 za použití fázového kontrastu, zvětšení 400x. ....	49
Obrázek 8 Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na morfologii buněk T98G za použití fázového kontrastu, zvětšení 400x. ....	50
Obrázek 9 Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk A172 pomocí fluorescenčního barvení, zvětšení 600x (červená: $\beta$ -aktin + zelená: $\alpha$ -tubulin; zelená: $\beta$ III-tubulin; modrá: DAPI).....	51
Obrázek 10 Stanovení vlivu kombinace TMZ + FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk T98G pomocí fluorescenčního barvení, zvětšení 600x (červená: $\beta$ -aktin + zelená: $\alpha$ -tubulin; zelená: $\beta$ III-tubulin; modrá: DAPI).....	52
Obrázek 11 Stanovení exprese markerů spojených s mikrotubuly na úrovni proteinů pomocí metody Western blot u buněčných linií A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola.....	53
Obrázek 12 Stanovení relativního množství STAT3, EGFR a TP53 na úrovni mRNA metodou RT-PCR u buněčných linií A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola. ....	54
Obrázek 13 Stanovení exprese STAT3 a dalších vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu na úrovni proteinů metodou Western blot u buněk A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola...	55
Obrázek 14 Stanovení aktivity kaspáz 3/7 u buněčných linií A172 a T98G ovlivněných kombinacemi TMZ + FLU. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola.....	56
Obrázek 15 Stanovení množství TMZ v buněčných liniích A172 a T98G pomocí LC/MS analýzy po ovlivnění samotným TMZ a kombinací TMZ + FLU. *p <0,05 vs. TMZ 500 $\mu$ M 10 min. ....	57
Obrázek 16 Stanovení množství FLU v buněčných liniích A172 a T98G pomocí LC/MS analýzy po ovlivnění samotným FLU a kombinacemi TMZ + FLU. *p <0,05 vs. FLU 0,5 $\mu$ M 2 hod.....	57
Obrázek 17 Stanovení relativního množství STAT3, EGFR a TP53 na úrovni mRNA metodou RT-PCR u nu-nu myši po podání kombinace TMZ + FLU. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola.....	59

Obrázek 18 Stanovení exprese STAT3 a dalších vybraných markerů souvisejících s regulací buněčného cyklu na úrovni proteinů metodou Western blot u nu-nu myši po podání kombinace TMZ + FLU. *p <0,05 vs. neovlivněná kontrola. ....	60
Obrázek 19 Stanovení množství TMZ v nádoru a mozku modelového organismu po podání samotného TMZ a kombinace TMZ + FLU. *p <0,05 vs. TMZ 0,9 mg/kg.....	63
Obrázek 20 Stanovení množství FLU v nádoru a mozku modelového organismu po podání samotného FLU a kombinace TMZ + FLU. *p <0,05 vs. FLU 10 mg/kg, #p <0,05 vs. FLU 25 mg/kg.....	63

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

Adam Z, Krejčí M a Vorlíček J. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén, **2010**. ISBN 978-80-7262-648-9.

Aldape K a kol. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica* [online]. **2015**, 129(6), 829-848 [cit. 2021-10-28]. ISSN 0001-6322. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-015-1432-1

Alonso M M a kol. Adenovirus-Based Strategies Overcome Temozolomide Resistance by Silencing the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter. *Cancer Research* [online]. **2007**, 67(24), 11499-11504 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5312

Arora A a Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biology & Therapy* [online]. **2019**, 20(8), 1083-1090 [cit. 2021-04-15]. ISSN 1538-4047. Dostupné z: doi:10.1080/15384047.2019.1599662

Athymic Nude Mouse. *Charles River Laboratories* [online]. [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: <https://www.criver.com/products-services/find-model/athymic-nude-mouse?region=3616>

Baker S D a kol. Absorption, Metabolism, and Excretion of <sup>14</sup>C-Temozolomide following Oral Administration to Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. **1999**, 5(2), 309-317 [cit. 2021-11-25]. Dostupné z: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/2/309.full#ref-list-1>

Beránek M. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, **2016**. ISBN 978-80-246-3224-7.

Bevacizumab. *DrugBank Online* [online]. [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00112>

Carlsson S K a kol. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Molecular Medicine* [online]. **2014**, 6(11), 1359-1370 [cit. 2021-8-21]. ISSN 1757-4676. Dostupné z: doi:10.15252/emmm.201302627

Carvalho H A a Villar R C. Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment. *Clinics* [online]. **2018**, 73(1) [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: doi:10.6061/clinics/2018/e557s

Caspase-Glo® 3/7 Assay System. *Promega* [online]. [cit. 2021-10-29]. Dostupné z: [https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase\\_glo-3\\_7-assay-systems/?catNum=G8090](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?catNum=G8090)

Chatterji B P a kol. Microtubules as antifungal and antiparasitic drug targets. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. **2011**, 21(2), 167-186 [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2011.545349

Cirillo L a kol. The Elephant in the Room: The Role of Microtubules in Cancer. *Cell Division Machinery and Disease* [online]. **2017**, 93-124 [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-57127-0\_5

Cloughesy T F a kol. Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. **2014**, 9(1), 1-25 [cit. 2021-10-28]. ISSN 1553-4006. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130324

Čáňová K a kol. Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. *Acta Medica* (Hradec Kralove, Czech Republic) [online]. **2017**, 60(1), 5-11 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1211-4286. Dostupné z: doi:10.14712/18059694.2017.44

Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing* [online]. **2016**, 20(5), S2-S8 [cit. 2021-9-17]. ISSN 1092-1095. Dostupné z: doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8

Fázový kontrast. *BARIA* [online]. [cit. 2022-01-09]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/fazovy-kontrast/>

Flubendazole. *National Center for Biotechnology: PubChem* [online]. [cit. 2021-11-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flubendazole>

Gallia G L a kol. Mebendazole and temozolomide in patients with newly diagnosed high-grade gliomas: results of a phase 1 clinical trial. *Neuro-Oncology Advances* [online]. **2021**, 3(1) [cit. 2022-03-29]. ISSN 2632-2498. Dostupné z: doi:10.1093/noajnl/vdaa154

Goodson H V a Jonasson E M. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **2018**, 10(6) [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a022608

- Grech N a kol. Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population. *Cureus* [online]. **2020**, 12(5) [cit. 2022-03-02]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.8195
- Hanif F a kol. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention* [online]. **2017**, 18(1), 3-9 [cit. 2021-10-29]. Dostupné z: doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.3
- Hanušová V a kol. Potential Anti-cancer Drugs Commonly Used for Other Indications. *Current Cancer Drug Targets* [online]. **2015**, 15(1), 35-52 [cit. 2022-04-20]. ISSN 15680096. Dostupné z: doi:10.2174/1568009615666141229152812
- He F. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *BIO-PROTOCOL* [online]. **2011**, 1(5) [cit. 2021-9-1]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.44
- Hou Z-J a kol. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. *Oncotarget* [online]. **2015**, 6(8), 6326-6340 [cit. 2022-03-29]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.3436
- Jiapaer S a kol. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica* [online]. **2018**, 58(10), 405-421 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0470-8105. Dostupné z: doi:10.2176/nmc.ra.2018-0141
- Journal of Medical Sciences* [online]. **2013**, 10(1), 68-72 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1449-1907. Dostupné z: doi:10.7150/ijms.5256
- Karachi A a kol. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncology* [online]. **2018**, 20(12), 1566-1572 [cit. 2021-04-14]. ISSN 1522-8517. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/noy072
- Katsetos Ch D a kol. Emerging Microtubule Targets in Glioma Therapy. *Seminars in Pediatric Neurology* [online]. **2015**, 22(1), 49-72 [cit. 2022-03-29]. ISSN 10719091. Dostupné z: doi:10.1016/j.spen.2015.03.009
- Kipper F C a kol. Vinblastine and antihelmintic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas. *Investigational New Drugs* [online]. **2018**, 36(2), 323-331 [cit. 2021-11-27]. Dostupné z: doi:10.1007/s10637-017-0503-7

Kiseleva L N a kol. A172 and T98G cell lines characteristics. *Cell and Tissue Biology* [online]. **2016**, 10(5), 341-348 [cit. 2021-8-15]. ISSN 1990-519X. Dostupné z: doi:10.1134/S1990519X16050072

Klener P a Klener P. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, **2010**. ISBN 978-80-247-2808-7.

Klener P. *Základy klinické onkologie*. Praha: Galén, **2011**. ISBN 978-80-7262-716-5.

Komatsu S. Western Blotting Using PVDF Membranes and Its Downstream Applications. *Western Blotting* [online]. **2015**, 227-236 [cit. 2021-8-28]. Dostupné z: [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2694-7\\_24](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2694-7_24)

Králová V a kol. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs* [online]. **2013**, 24(9), 911-919 [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: doi:10.1097/CAD.0b013e3283648c69

Kramer N a kol. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. **2013**, 752(1), 10-24 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2012.08.001

Kurien B T a Scofield R H. Extraction of Proteins from Gels: A Brief Review. *Protein Electrophoresis* [online]. **2012**, 403-405 [cit. 2021-10-9]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-821-4\_33

Lah T T, Novak M a Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Seminars in Cancer Biology* [online]. **2020**, 60, 262-273 [cit. 2021-7-26]. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2019.10.010

Lee E Q a kol. Treatment Options in Newly Diagnosed Glioblastoma. *Current Treatment Options in Neurology* [online]. **2013**, 15(3), 281-288 [cit. 2021-10-31]. Dostupné z: doi:10.1007/s11940-013-0226-9

Lin S a kol. Flubendazole demonstrates valid antitumor effects by inhibiting STAT3 and activating autophagy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [online]. **2019**, 38(1) [cit. 2021-8-15]. ISSN 1756-9966. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6615228/>

Liu Y a kol. Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative

stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **2016**, 480(3), 415-421 [cit. 2021-11-29]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.064

Lukas R V a kol. Newly Diagnosed Glioblastoma: A Review on Clinical Management. *Oncology (Williston Park)* [online]. **2019**, 33(3), 91-100 [cit. 2021-10-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7278092/>

Michaelis M a kol. Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. *Scientific Reports* [online]. **2015**, 5(1) [cit. 2021-11-29]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep08202

Mudassar F a kol. Targeting tumor hypoxia and mitochondrial metabolism with anti-parasitic drugs to improve radiation response in high-grade gliomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [online]. **2020**, 39(1) [cit. 2021-11-29]. ISSN 1756-9966. Dostupné z: doi:10.1186/s13046-020-01724-

Mukhtar E V a kol. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. **2014**, 13(2), 275-284 [cit. 2021-11-13]. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0791

Odell I D a Cook D. Immunofluorescence Techniques. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **2013**, 133(1), 1-4 [cit. 2021-10-8]. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2012.455

Ostermann S a kol. Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clinical Cancer Research* [online]. **2004**, 10(11), 3728-3736 [cit. 2021-9-17]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0807

PCR. *LabGuide – Průvodce laboratoři* [online]. [cit. 2021-10-29]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>

Roy P a Saikia B. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer* [online]. **2016**, 53(3), 441-442 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: doi:10.4103/0019-509X.200658

Sasmita A O a kol. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* [online]. **2018**, 14(1), 40-51 [cit.



2021-8-19]. ISSN 17437555. Dostupné z:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ajco.12756>

Schreck K C a Grossman S A. Role of Temozolomide in the Treatment of Cancers Involving the Central Nervous System. *Oncology (Williston Park)* [online]. **2018**, 32(11), 555-60, 569 [cit. 2021-04-14]. Dostupné z:  
<https://www.cancernetwork.com/view/role-temozolomide-cns>

Skarková V a kol. The Evaluation of Glioblastoma Cell Dissociation and Its Influence on Its Behavior. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **2019**, 20(18) [cit. 2022-03-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20184630

Spagnuolo P A a kol. The antihelminthic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood* [online]. **2010**, 115(23), 4824-4833 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-09-243055

Temozolomide. *DrugBank Online* [online]. [cit. 2021-10-29]. Dostupné z:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00853>

Temozolomide. *National Center for Biotechnology: PubChem* [online]. [cit. 2021-10-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Temozolomide>

Temozolomide. *Merck: Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2021-10-30]. Dostupné z:  
<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/t2577>

Thakkar J P a kol. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [online]. **2014**, 23(10), 1985-1996 [cit. 2021-8-19]. ISSN 1055-9965. Dostupné z: doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

Tsakatikas S G. An overview of current results with the vincristine-irinotecan-temozolomide combination with or without bevacizumab in pediatric, adolescence and adult solid tumors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. **2021**, 166 [cit. 2021-11-27]. Dostupné z: doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103457

Vítovcová B a kol. Biology of Glioblastoma Multiforme—Exploration of Mitotic Catastrophe as a Potential Treatment Modality. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **2020**, 21(15) [cit. 2022-03-16]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21155324

Wang L-H a kol. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. **2019**, 51(6), 2647-2693 [cit. 2021-11-30]. ISSN 1015-8987. Dostupné z: doi:10.1159/000495956

Western blot. *LabGuide – Průvodce laboratoří* [online]. [cit. 2021-10-29]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/western-blot/>

What Is Cancer? *National Cancer Institute* [online]. [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

Wilson T A, Karajannis M A a Harter D H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical Neurology International* [online]. **2014**, 5(1) [cit. 2021-9-18]. ISSN 2152-7806. Dostupné z: doi:10.4103/2152-7806.132138

Yin L-M a kol. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *International*

Young R M a kol. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of translational medicine* [online]. **2015**, 3(9), 121 [cit. 2021-10-29]. Dostupné z: doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10

Zhou X a kol. Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis. *Cell Death Discovery* [online]. **2018**, 4(1) [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi:10.1038/s41420-017-0017-2