

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

# **Ovariální karcinomy – vliv rodiny Rho kináz na migraci buněk**

**Veronika Barešová**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.**

**Konzultant: Mgr. Eva Peterová, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2023**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla srdečně poděkovat své konzultantce Mgr. Evě Peterové, Ph.D. z Ústavu lékařské biochemie LFHK za vedení a také za čas a cenné rady, které mi věnovala při vypracovávání experimentální i teoretické části mé práce. Dále také laborantkám Petře Kazimírové a Mileně Hajzlerové za veškerou pomoc v laboratoři. Také děkuji vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D., za revizi a připomínky. Velký dík také patří mé rodině a všem blízkým, kteří mě během celého studia podporovali.

„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, 2023**

**Veronika Barešová**

# Obsah

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
3.1    OVARIÁLNÍ KARCINOMY .....	10
3.1.1    Epidemiologie .....	10
3.1.2    Symptomy, diagnostika .....	12
3.1.3    Histologická klasifikace ovariálních karcinomů .....	13
3.1.4    Patogeneze .....	14
3.1.4.1    Sporadická forma.....	14
3.1.4.2    Dědičná forma.....	14
3.1.5    Rizikové a protektivní faktory .....	15
3.2    EXTRACELULÁRNÍ MATRIX A NÁDOROVÉ STROMA.....	16
3.2.1    Vliv kolagenu na ovariální karcinomy .....	17
3.3    METASTÁZOVÁNÍ A POHYB BUNĚK .....	19
3.3.1    Invaze buněk přes bazální membránu .....	20
3.3.2    Epitelo-mezenchymální tranzice.....	20
3.3.3    Typy pohybu buněk.....	22
3.3.3.1    Mezenchymální pohyb .....	23
3.3.3.2    Améboidní pohyb.....	24
3.3.4    Mezenchym-améboidní tranzice (MAT).....	25
3.4    INHIBITOR Y27632 .....	26
3.5    EGF .....	26
3.6    MECHANISMY REZISTENCE NA CISPLATINU .....	26
3.6.1    Thiolové sloučeniny.....	27
3.6.2    Efluxní receptory .....	27
3.6.3    Inhibice apoptózy.....	28
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
4.1    BUŇKY A2780 A A2780cis .....	30
4.1.1    A2780 .....	30
4.1.2    A2780cis .....	30
4.1.3    Počítání buněk .....	30
4.2    IZOLACE KOLAGENU Z OCASNÍCH ŠLACH POTKANA.....	30
4.3    PŘÍPRAVA KOLAGENNÍHO GELU .....	30
4.4    IZOLACE AKTIVNÍCH RHO-KINÁZ.....	31
4.4.1    Princip metody.....	31
4.4.2    Sklízení bílkovin z gelu na detekci aktivní Rho.....	31
4.4.3    Stanovení bílkoviny .....	32
4.4.4    Afinitní precipitace aktivovaného G proteinu .....	32

4.5	WESTERN BLOT.....	33
4.5.1	Princip metody.....	33
4.5.2	Příprava akrylamidového gelu.....	33
4.5.3	Elektroforéza.....	34
4.5.4	Přenos vzorků z gelu na membránu.....	35
4.5.5	Detekce.....	36
4.6	IMUNOHISTOCHEMIE.....	36
4.6.1	Princip metody.....	36
4.6.2	Použité protilátky.....	36
4.6.3	Barvení a mikroskopie.....	37
4.6.3.1	Barvení buněk.....	37
4.6.3.2	Mikroskopie.....	38
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....</b>	<b>39</b>
5.1	MORFOLOGIE BUNĚK.....	39
5.2	MARKERY AMÉBOIDNÍHO POHYBU.....	40
5.3	MARKERY MEZENCHYMÁLNÍHO POHYBU.....	42
<b>6.</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>48</b>
<b>9.</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>50</b>
<b>10.</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>51</b>
<b>11.</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>52</b>

## Abstrakt

Ovariální karcinomy jsou nejsmrtelnější skupinou gynekologických malignit. Je to dáno vysokou mírou metastázování a získané lékové rezistence. Metastázování je charakteristické změnou fenotypu buněk z epiteliálního na mezenchymální, čímž dochází ke ztrátě kontaktů buňka-buňka a buňka-extracelulární matrix a následnému pohybu buněk. Tento proces se nazývá epitel-mezenchymální tranzice a bylo prokázáno, že také hraje roli v rezistenci buněk na cisplatinu. Pohyb jednotlivých buněk je zprostředkován rodinou Rho GTPáz a můžeme ho rozdělit na mezenchymální a améboidní typ. Pro améboidní je typická signální dráha Rho/ROCK, kdežto mezenchymální pohyb je zprostředkován drahami Rac/Cdc42. V mé diplomové práci jsme sledovali rozdíly v expresi vybraných proteinů obou signálních drah v buňkách ovariálních karcinomů.

V první fázi jsme se zaměřili na porovnání buněčných linií A2780 a A2780cis, která je rezistentní na cisplatinu. Sledovali jsme markery améboidního pohybu RhoA a fosforylovaný myozin a markery pohybu mezenchymálního Wave-2, PAK a fosforylovaný PAK. Ve druhé fázi jsme sledovali vliv EGF a inhibitoru Y27632 na změnu pohybu buněk obou linií.

K dosažení našich cílů jsme kultivovali buňky v 3D prostředí kolagenního gelu, který simuluje přirozené prostředí nádorového stromatu v organismu. Po kultivaci a ovlivnění pomocí selektivního ROCK inhibitoru Y27632 a epidermálního růstového faktoru jsme vybrané proteiny imunochemicky obarvili a sledovali pod mikroskopem. Dále jsme izolovali aktivní formy Rho GTPáz, které jsme následně podrobili detekci pomocí western blotu.

Zjistili jsme, že rezistentní linie A2780cis exprimuje větší množství RhoA kinázy i fosforylovaného myozinu než senzitivní linie A2780. Linie A2780cis také vykazovala větší množství aktivních forem RhoA. To naznačuje, že buňky A2780cis využívají převážně améboidní typ pohybu a buňky linie A2780 využívají pohyb mezenchymální. Dále z experimentů vyplynulo, že EGF snižuje expresi RhoA i fosforylaci myozinu a naopak zvyšuje fosforylaci PAK. Z toho lze usoudit, že potencuje přesmyk z améboidního pohybu na mezenchymální. Podobné účinky má i inhibitor Y27632, který snížil fosforylaci myozinu, doprovázenou poklesem aktivity RhoA a naopak zvýšil fosforylaci PAK.

**Klíčová slova:** ovariální karcinomy, améboidní pohyb, mezenchymální pohyb

## Abstract

Ovarian carcinomas are the deadliest group of gynecological malignancies. This is due to a high rate of metastasis and acquired drug resistance. Metastasis is characterized by a phenotypic change of cells from epithelial to mesenchymal, resulting in the loss of cell-cell and cell-extracellular matrix contacts and subsequent cell movement. This process is called epithelial-mesenchymal transition and has been shown to also play a role in cell resistance to cisplatin. The movement of individual cells is mediated by the Rho GTPase family and can be divided into mesenchymal and amoeboid types. The amoeboid type is characterized by the Rho/ROCK signaling pathway, while mesenchymal movement is mediated by the Rac/Cdc42 pathways. In my thesis, we investigated the differences in expression of selected proteins in both signaling pathways in ovarian carcinoma cells.

Initially, we focused on comparing the A2780 and A2780cis cell lines, which are resistant to cisplatin. We monitored markers of amoeboid movement, RhoA and phosphorylated myosin, and markers of mesenchymal movement, Wave-2, PAK, and phosphorylated PAK. In the second phase, we studied the effect of EGF and the inhibitor Y27632 on the change in cell movement of both lines.

To achieve our goals, we cultured cells in a 3D environment of collagen gel, which simulates the natural environment of the tumor stroma in the organism. After culturing and influencing with the selective ROCK inhibitor Y27632 and epidermal growth factor, we immunohistochemically stained selected proteins and observed them under a microscope. We also isolated active forms of Rho GTPases, which we subsequently subjected to western blot detection.

We found that the resistant A2780cis line expressed a greater amount of RhoA kinase and phosphorylated myosin than the sensitive A2780 line. The A2780cis line also exhibited a greater amount of active forms of RhoA, indicating that A2780cis cells mainly use amoeboid movement, while A2780 cells mainly use mesenchymal movement. Furthermore, the experiments showed that EGF reduces the expression of RhoA and myosin phosphorylation and, conversely, increases PAK phosphorylation, suggesting that it potentiates the shift from amoeboid to mesenchymal movement. The inhibitor Y27632 had similar effects, reducing myosin phosphorylation, accompanied by a decrease in RhoA activity, and increasing PAK phosphorylation.

**Keywords:** ovarian carcinomas, amoeboid movement, mesenchymal movement.

## 1. Úvod

I přes obrovský pokrok medicíny v posledních letech zůstává rakovina vaječníků po celém světě stále velkou výzvou. Je jednou z nejčastějších příčin úmrtí u žen, protože přežití do značné míry závisí na stadiu onemocnění. Karcinomy ovaria jsou typicky diagnostikovány v pozdním stadiu (Záveský, 2011). Částečně je to přičítáno skutečnosti, že pacientky nevykazují žádné specifické příznaky, dokud rakovina nepokročí a nezačne metastázovat. Metastázy jsou ve skutečnosti hlavním faktorem zodpovědným za selhání léčby rakoviny (Hanahan et al., 2000), z tohoto důvodu roste snaha navrhnout nové léčebné strategie cílené přímo na proces metastázování. K vyvinutí bezpečné a účinné antimetastatické terapie je třeba porozumět mechanismu metastáz.

Při metastázování se nádorové buňky oddělí od primárního nádoru a migrují tkáněmi buď kolektivně ve shluku, nebo jako jednotlivé buňky. Jednotlivé buňky vykazují dva různé způsoby pohybu. Pohyb mezenchymálního typu je charakterizován prodlouženou buněčnou morfologií a vyžaduje extracelulární proteolýzu. Při améboidním pohybu jsou buňky zaoblené, nezávislé na proteázách a vyžadují vysokou Rho-kinázovou signalizaci k řízení zvýšených úrovní kontraktility aktomyozinu. Nádorové buňky mohou přepínat mezi oběma typy pohybu v závislosti na svém mikroprostředí. ECM obklopující nádorové buňky hraje významnou roli v progresi rakoviny. Poskytuje buňkám jak signály chemické, tak mechanické (Paňková et al., 2010).

Sloučeniny platiny samotné, nebo v kombinaci s jinými chemoterapeutiky jsou standardní léčbou rakoviny vaječníků. Bohužel, dochází velmi často k recidivě onemocnění, protože část nádorových buněk získá rezistenci (Záveský, 2011).

V této práci jsme se zaměřili na srovnání pohybu buněk ovariálních karcinomů na cisplatinu senzitivních a rezistentních v 3D prostředí kolagenního gelu.



## **2. Cíl práce**

Cílem této práce bylo zjistit jaký typ pohybu využívají cisplatina (CP) senzitivní linie buněk ovariálních karcinomů A2780 a CP rezistentní linie A2780cis. A poté sledovat vliv selektivního ROCK inhibitoru Y27632 a epidermálního růstového faktoru (EGF) na expresi RhoA a fosforylovaného myozinu (signální dráha améboidního pohybu) a Wave-2, PAK a fosforylovaného PAK (signální dráha mezenchymálního pohybu).

## **3. Teoretická část**

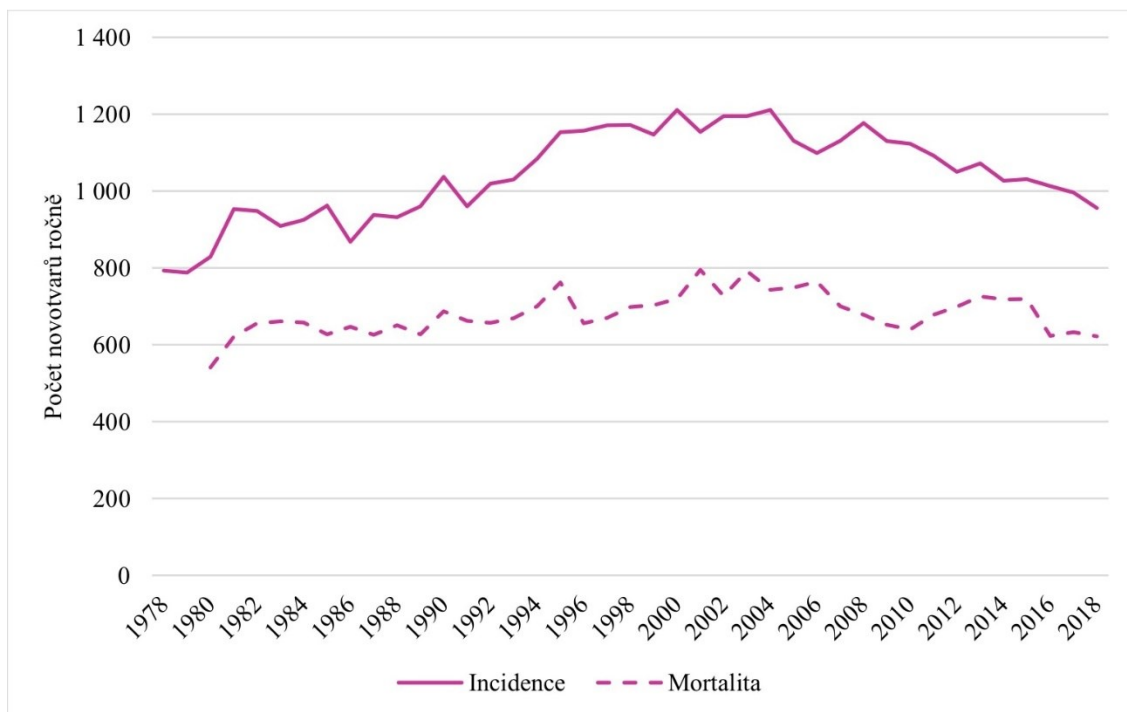
### **3.1 Ovariální karcinomy**

S prodlužující se délkou života neoddělitelně souvisí rostoucí prevalence nádorových onemocnění. Nejvíce ohroženou věkovou skupinou jsou lidé nad 70 let. Jako nástroj k prevenci a časnému odhalení, které je velice důležité k účinné terapii, se čím dál častěji využívají screeningové metody. Efektivní screeningové nástroje k zachycení ovariálních karcinomů však nejsou v současné době dispozici (Náležinská et al., 2020). Vzhledem k jejich nespecifickým symptomům je diagnóza často stanovena až v pokročilém stádiu. O to důležitější je návštěva preventivních gynekologických prohlídek.

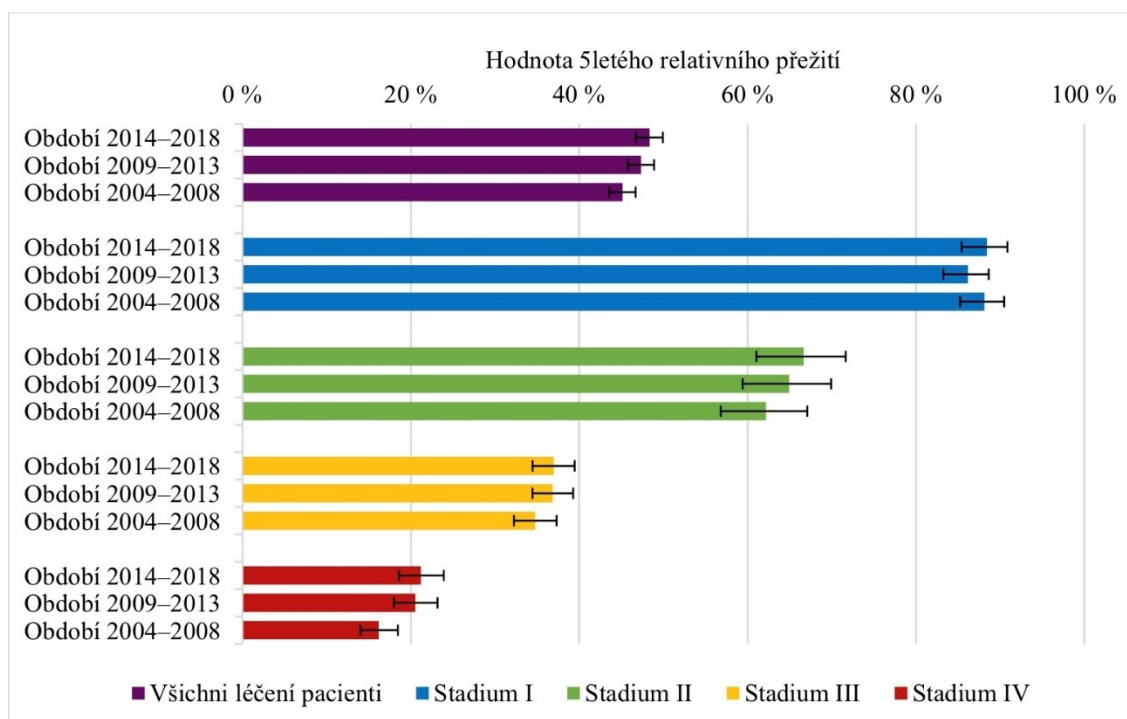
#### **3.1.1 Epidemiologie**

Přestože incidence v posledních letech lehce klesá, stále se jedná o nejsmrtelnější diagnózu mezi gynekologickými malignitami. V roce 2018 byly ovariální karcinomy 5. nejčastější onkologickou diagnózou vedoucí k úmrtí mezi ženami. Ve spojitosti se zhoubnými nádory vaječníků zemřelo v roce 2018 622 žen, což je o 1,7 % méně než v roce 2017 (Krejčí et al., 2018). V porovnání s ostatními evropskými státy je ČR v úmrtnosti na 23.-24. místě. Toto onemocnění se vyskytuje především u žen v perimenopauzálním a postmenopauzálním věku. Nejčastější věk nových pacientek je 55-74 let, nejvyšší věkově specifická incidence byla zaznamenána ve věku nad 60 let (Krejčí et al., 2018).

5leté přežití pacientek léčených v letech 2014-2018 dosahovalo 48,4 %, což je více než v předchozích obdobích. Zaleží zde samozřejmě na klinickém stadiu, ve kterém se daný novotvar diagnostikuje. U pacientek v I. stadiu je pozorováno 5leté přežití skoro 90 % (Krejčí et al., 2018).



**Obrázek 1 Incidence a mortalita ovariálních malignit v ČR (Krejčí et al., 2018)**



**Obrázek 2 Relativní pětileté přežití dle stádií při stanovení diagnózy (Krejčí et al., 2018)**

### 3.1.2 Symptomy, diagnostika

Časná stadia ovariálních karcinomů jsou velmi často asymptomatická nebo se projevují nejasně. Může tak jednoduše dojít k záměně za jiné, běžné a méně závažné onemocnění. Mezi klasické symptomy karcinomu ovaria patří pocit plnosti, nadýmání, snížení apetitu. Mohou se objevit i trávicí obtíže jako např. zácpa nebo průjem a výrazný úbytek na váze. Dále se mohou dostavit silná únava, poruchy menstruačního cyklu a změněná frekvence močení (Goff et al., 2004; Berek et al., 2021). V pokročilejších stádiích se projevuje i zvětšený objem břicha, což může být způsobeno buď samotnou rostoucí masou nádoru, nebo jím vyprodukovaným výpotkem v dutině břišní (ascites) (Náležinská et al., 2020). V pozdních stádiích často dochází k metastázování do endometria.

Až dvě třetiny pacientek bývá diagnostikováno v pozdních stádiích, kvůli již zmíněným nejasným symptomům a také proto, že neexistuje žádný jednoduchý test, který by se dal rutinně provádět při preventivních prohlídkách u gynekologa. Při podezření je nutné odebrání detailní anamnézy – potíže, jak dlouho trvají, menstruační cyklus, užívání hormonální antikoncepce/hormonální substituční terapie apod. Velice důležitá je v tomto případě i rodinná anamnéza, jelikož relativně velké procento těchto nádorů je dědičných. Následuje transvaginální ultrazvuk, vyšetření pánve. Z odebrané krve se stanoví marker CA-125, který může být zvýšen u nádoru vaječníku, ale je slabě senzitivní, zvláště pro časná stadia onemocnění (Záveský, 2011). Právě kvůli nízké senzitivitě, a s ní spojeného vyššího rizika falešně pozitivního výsledku, se vyšetřování tohoto markeru nevyužívá k preventivnímu screeningu.

### 3.1.3 Histologická klasifikace ovariálních karcinomů

Nádory vaječníků tvoří skupinu histologicky heterogenních onemocnění. Liší se od sebe svým původem, morfologií, molekulárními mechanismy vzniku a také rizikovými faktory a prognózou. Na základě histologické analýzy je můžeme rozdělit do tří základních skupin: 1. nádory povrchového epitelu (90 %), 2. nádory germinálních buněk (3 %) a 3. stromální nádory (7 %). Epiteliální ovariální karcinomy (EOC) se dále dělí na serózní, mucinózní, endometrioidní, clear cell karcinomy, Brennerův tumor a karcinomy nediferencované a smíšené (Müllerová, 2016).

Nejběžnější histologické typy nádorů jsou dle dělení EOC rozděleny do dvou hlavních skupin: na karcinomy I. a II. typu. Za karcinomy typu I se považují low-grade serózní a endometrioidní karcinomy, ale patří sem také clear cell karcinomy, maligní Brennerovy tumory a mucinózní karcinomy. Vyznačují se pomalou proliferací a postupným růstem od premaligních lézí až v LG tumory. Charakteristické pro ně jsou mutace genů KRAS a BRAF, jejichž signální dráhy potom zůstávají aktivovány, a naopak se u nich neobjevují mutace genu TP53 (Müllerová, 2016; Kossaï, 2018). Tyto nádory jsou většinou odhaleny v časnějším stadiu a mají obecně lepší prognózu než nádory typu II. Pokud je ale nádor typu I diagnostikován v pozdním stadiu, prognóza je srovnatelná s tumory typu II (Kossaï, 2018).

Typ II EOC zahrnuje high-grade serózní karcinom, který tvoří převážnou část nádorů tohoto typu, dále do této skupiny patří nediferencované karcinomy a karcinosarkomy. U těchto tumorů dochází k častým mutacím ve specifických onkogenech, především jsou pro ně typické mutace tumor supresorového genu TP53 – jsou geneticky nestabilní. Mají agresivnější povahu a rychle metastázuje (Kossaï, 2018; Müllerová, 2016). Tumor supresorový gen TP53 kóduje protein p53, který hraje zásadní roli při poškození DNA, nedostatku kyslíku nebo při aktivaci onkogenů. Když k poškození dojde, protein p53 se aktivuje a nepřímo zastavuje buněčný cyklus v G1 fázi. Buňka má poté čas na reparaci poškozené DNA. Pokud se reparace nezdaří, dochází k apoptóze. Při rozvoji karcinomů je funkce tohoto proteinu inaktivována.

### **3.1.4 Patogeneze**

Ovariální karcinomy zahrnují heterogenní skupinu malignit. Je to dáno rozlišností patogenních mechanismů a molekulárních změn spojených s rozvojem odlišných histologických subtypů. Pouhých 5-10 % ovariálních karcinomů je dědičných, zbylých 90 % je sporadických. Sporadická forma je častější u starších pacientek, hlavně ve skupině 50-79 let (Karlíková, 2012).

#### **3.1.4.1 Sporadická forma**

Dlouhodobě existují hypotézy, které popisují etiologii ovariálních karcinomů. Ani jedna z hypotéz však nepopisuje přesný mechanismus vzniku a jsou více či méně překonány.

První z nich je hypotéza neustálé ovulace. Ta předpokládá, že riziko vzniku karcinomu ovaria roste s počtem ovulací (Reid et al., 2017). Karcinom tak vzniká po opravách povrchového epitelu vaječnicků, který praská při každé ovulaci. Dochází zde ke zvýšení počtu buněčného dělení, a tedy i ke zvýšení počtu spontánních mutací, které mohou vést ke vzniku maligních buněk. Tato hypotéza vznikla na základě pozorování, že se tyto karcinomy objevují častěji u žen, které nerodily (Gong et al., 2013; Reid et al., 2017).

Druhá hypotéza se nazývá gonadotropinová a předpokládá, že vliv vysokých hladin gonadotropinů vede k produkci estrogenů stimulujících povrchový epitel ovarii, ten poté nadměrně proliferuje a vznikají v něm cysty. Tento proces může opět vést k maligní transformaci. Rizikem je tedy doba, kdy jsou vaječnisky vystaveny vlivu gonadotropinů (Reid et al., 2017).

#### **3.1.4.2 Dědičná forma**

Hereditární karcinomy bývají diagnostikovány v pokročilejších stádiích a je to nejčastější forma ovariálních karcinomů u mladších žen. Byly popsány syndromy spojené s rozvojem různých onkologických onemocnění. Asi nejznámějším je hereditární karcinom prsu a ovaria s mutací tumor-supresorových genů BRCA1 a BRCA2 (Andrews et al., 2017). Geny BRCA1 a BRCA2 jsou tumor supresorové geny podílející se na opravách dvouvláknových zlomů DNA, dále na regulaci buněčného cyklu a transkripce DNA. Tato mutace je autozomálně dominantně dědičná a je zodpovědná za nejméně 90 % hereditárních karcinomů ovarii. Z celkového počtu ovariálních karcinomů jsou původci asi 8-18 %. Celoživotní riziko ovariálních karcinomů je u mutace BRCA1 39-56 % a u mutace BRCA2 10-37 % (Štellmachová et al., 2022). Tento syndrom je zodpovědný za vysoké celoživotní riziko rozvoje karcinomu prsu a vaječnicků, navíc se přidává i středně vysoké riziko vzniku dalších nádorů (tlusté střevo, žlučník, pankreas, oko, kůže). Za

účelem snížení těchto rizik je ženám s potvrzenou mutací BRCA1 a BRCA2 doporučováno preventivní chirurgické odstranění vaječníků a vejcovodů. Nejčastějším subtypem u těchto mutací je high-grade serózní karcinom (Štellmachová et al., 2022; Andrews et al., 2017).

Dalším je Lynchův syndrom (LS). Je to dědičné onemocnění, kdy dochází k brzkému rozvoji kolorektálního karcinomu, endometriálního karcinomu a dalších nádorových onemocnění. Podkladem jsou nejčastěji mutace mutátorových genů, např. mismatch repair geny (MMR), čímž se následně hromadí mutace v buňce. Mezi tyto geny patří geny MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2 (Štellmachová et al., 2022). V rodinách postižených tímto syndromem je vysoké riziko rozvoje karcinomu nejen tlustého střeva, ale i ovarií, endometria a dalších tkání. U pacientek s LS a ovariálním karcinomem je častější mutace genů MLH1 a MSH2. Až 22 % gynekologických malignit spojených s LS je souběžných endometriálních a ovariálních karcinomů. Celková prognóza u žen s ovariálním karcinomem a LS je lepší než u žen s mutacemi genů BRCA1 a BRCA2, hlavně kvůli častějším neserózním histologickým podtypům karcinomů, ale i díky tomu, že jsou tyto karcinomy odhaleny v dřívějších stádiích (nejčastěji I a II) a nízkému věku pacientek při diagnóze (Andrews et al., 2017).

Mezi autozomálně dominantně dědičné syndromy patří také Li-Fraumeniho, Peutz-Jegersův a Gorlinův syndrom. Tyto syndromy jsou však celkem vzácné a obecně zvyšují riziko vzniku celého spektra onkologických onemocnění.

### **3.1.5 Rizikové a protektivní faktory**

Jedním z nejzásadnějších rizikových faktorů je pozitivní rodinná anamnéza. Výskyt onemocnění u příbuzného prvního stupně 3-7krát zvyšuje riziko onemocnění. Zvláště vysoké riziko potom hrozí, pokud byl v rodině karcinom ovaria diagnostikován více ženám a také pokud byl karcinom diagnostikován v nízkém věku (Reid et al., 2017). Mnohé studie prokázaly, že velké množství rizikových faktorů souvisí s různými histotypy.

Epidemiologická data naznačují, že vznik karcinomu ovarií je pozitivně ovlivněn anovulačními cykly, což odpovídá hypotéze neustálé ovulace. Z toho vyplývá, že těhotenství a užívání hormonální antikoncepce (HAK) snižuje riziko vzniku ovariálního karcinomu (Štellmachová et al., 2022). Stejně tak gonadotropinová hypotéza může vysvětlovat protektivní účinek HAK a těhotenství. Dalšími protektivními faktory mohou být ze stejného důvodu také pozdní nástup první menstruace (Gong et al., 2013), brzká menopauza, laktace a multiparita (Roett et al., 2009).

Po menopauze se velice rychle sníží hladina produkovaných estrogenů, ale produkce androgenů klesá postupně časem během několika let. Dohromady tyto dva děje mohou vést k hormonální dysbalanci a k hyperandrogenemii (Brzowska et al., 2020). To odpovídá androgen-progesteronové teorii. Literatura podporující tuto hypotézu říká, že byla prokázána souvislost se vznikem neserózních podtypů ovariálních karcinomů, nejvíce s endometrioidním a mucinózním podtypem nádorů (Trabert et al., 2020; Ose et al., 2017). Syndrom polycystických ovaríí (PCOS) tuto teorii také podporuje, sám o sobě je rizikovým faktorem pro vznik ovariálního karcinomu a je spojený se zvýšenou hladinou androgenů.

V souladu s touto teorií také existují literární zdroje zabývající se souvislostí mezi vznikem ovariálních karcinomů a obezitou. Největší roli hraje body mass index (BMI) u premenopauzálních žen (Olsen et al., 2013; Schouten et al., 2008). Vysoké BMI bylo spojeno s vyšším rizikem hlavně borderline serózního karcinomu, invazivního endometrioidního a invazivního mucinózního karcinomu. Dále také s invazivním low-grade serózním karcinomem. Nejčastěji se objevující high-grade serózní karcinomy však nejeví souvislosti s hodnotou BMI, z čehož tak vyplývá, že snížení BMI nejspíše nezabrání převážné většině úmrtí na ovariální karcinom (Olsen et al., 2013). Jiná studie říká, že abdominální obezita zvyšuje riziko vzniku především endometrioidního a clear-cell karcinomu (Freuer et al., 2021).

Vliv hormonální substituční terapie (HRT) je, na rozdíl od jednoznačně pozitivního vlivu hormonální antikoncepce, nejasný. HRT snižuje sekreci gonadotropinů, a tím pádem by měla mít pozitivní dopad, ale i tyto redukováné hladiny jsou vyšší než u premenopauzálních žen. Navíc může zvyšovat proliferaci ovariálních buněk indukovanou estrogenem a může tímto způsobem riziko zvyšovat. Největší vliv má HRT na vznik serózních a endometrioidních karcinomů (Liu Y et al., 2019).

Moderní zdroje naznačují, že rizikovým faktorem pro mucinózní karcinom je i kouření cigaret (Jordan, 2006; Reid et al., 2017). Naopak u kuřáček došlo ke snížení rizika u endometrioidního. U serózních a clear-cell karcinomů nebyla zjištěna žádná souvislost (Reid et al., 2017).

### **3.2 Extracelulární matrix a nádorové stroma**

Nádor je složen z vlastních nádorových buněk a nádorového stroma, které buňky těsně obklopuje. Toto mikroprostředí se svým složením liší dle potřeby tkáně, ve které se nádor nachází (Anderson et al., 2020). Nádorové stroma všech nádorů má však základní znaky společné. Obsahuje mimo jiné ECM, fibroblasty (CAFs), buňky získané (T



a B-lymfocyty) i vrozené (makrofágy, neutrofilny atd.) imunity, endoteliální buňky a neurony. Dalšími složkami jsou také enzymy se schopností remodelace ECM a růstové faktory (Cho et al., 2015).

Nejvíce zastoupenými nerakovinými buňkami nádorového mikroprostředí jsou fibroblasty. Jsou to buňky pojivových tkání, které jsou schopné produkovat ECM bohatou na kolagen a zajišťují také regeneraci a udržování těchto tkání (Da Silva et al., 2020). Fibroblasty tvoří podstatnou část nádorového stroma jak v primárním nádoru, tak i v metastatických ložiscích. Ovlivňují nádorové buňky, jejich progresi, invazivitu a metastazování tím, že produkují růstové faktory (EGF, apod.) (Novák et al., 2019), chemokiny, cytokiny a enzymy schopné degradovat ECM (Lacina et al., 2015; Yoshida, 2020). Tyto látky mohou ovlivňovat progresi nádoru stimulací proliferace buněk, angiogenezi, podporou metastazování, invazivity a působením zánětlivých faktorů (Hale et al. 2013). Stroma je důležité pro angiogenezi a metastazování (Yoshida, 2020). Mikroprostředí také ovlivňuje dostupnost kyslíku, mění pH a tuhost nádoru (Kozlova et al., 2020).

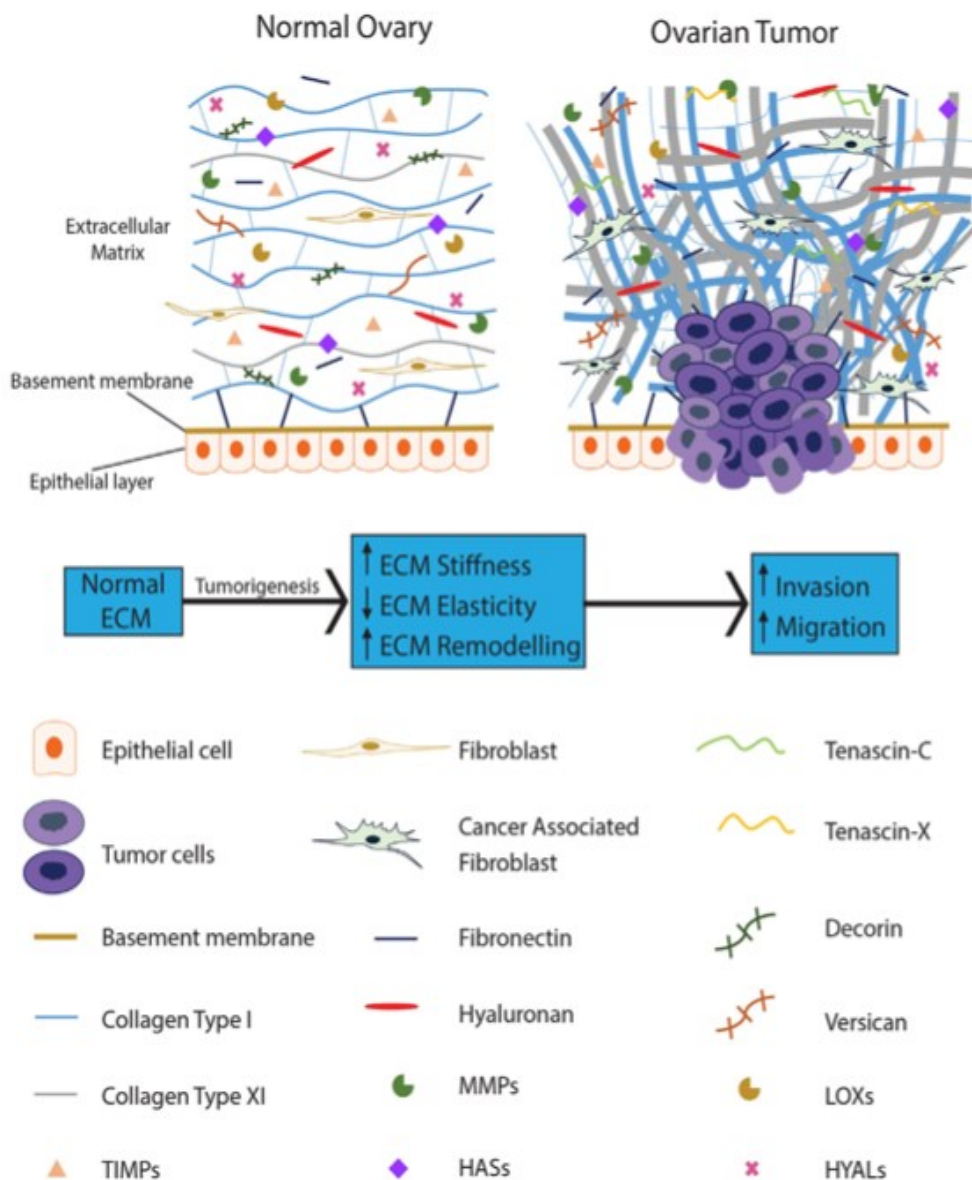
ECM je vysoce organizovaná nebuněčná dynamická struktura s mnoha fyziologickými a patologickými funkcemi. Poskytuje buňkám jak strukturální, tak biochemickou podporu. Je zodpovědná za komunikaci mezi buňkami, buněčnou adhezi ale také za diferenciaci a proliferaci, což může hrát klíčovou roli v progresi nádorů.

Kromě zachování strukturální integrity obsahují složky ECM vazebná místa pro cytokiny a růstové faktory, které mohou být v případě potřeby uvolněny a prezentovány cílovým buňkám (Cho et al., 2015; Yoshida, 2020).

### **3.2.1 Vliv kolagenu na ovariální karcinomy**

ECM se skládá z fibrilárních proteinů, glykoproteinů a glykosaminoglykanů. V nádorech dochází k přeměně její fyziologické struktury a složení (viz Obrázek 3). Tyto změny, včetně zvýšené sekrece fibronektinu a kolagenů I, III a IV, ukazují, že progresi nádoru vyžaduje kontinuální interakci mezi ECM a nádorovými buňkami. Kolagen zodpovídá za pevnost a elasticitu tkáně. V běžných tkáních, včetně ovarií, jsou kolagenní vlákna vysoce uspořádaná do jednotlivých vrstev rovnoběžných s bazální laminou buněk epitelu. Při nádorovém bujení jsou jeho vlákna kratší a tlustější, nahodile uspořádaná, zesíťovaná a k bazální lamině jsou téměř kolmo. Tyto změny vedou k tuhosti a snížené elasticitě tkáně. Nedávné studie ukázaly, že zvýšené zesíťování a ukládání kolagenu vede k progresi nádoru prostřednictvím zvýšené integrinové signalizace (Levental et al., 2009). Kolagen tak usnadňuje migraci nádorových buněk do stromatu. Navíc se předpokládá, že zvýšení koncentrace kolagenu v nádorové tkáni ohrožuje distribuci

léčiva přímo do nádorové tkáně a je spojena s cisplatinovou rezistencí u ovariálních karcinomů (Cho et al., 2015). Vlivem zvýšené proliferace nádorových buněk dochází k remodelaci okolní ECM prostřednictvím matrix metaloproteáz (MMP). MMP degradují okolní ECM a usnadňují tím invazi nádorových buněk do stromatu hned několika mechanismy. Dochází k rozrušení mechanické bariéry ECM, ale také k uvolňování růstových faktorů a cytokinů.

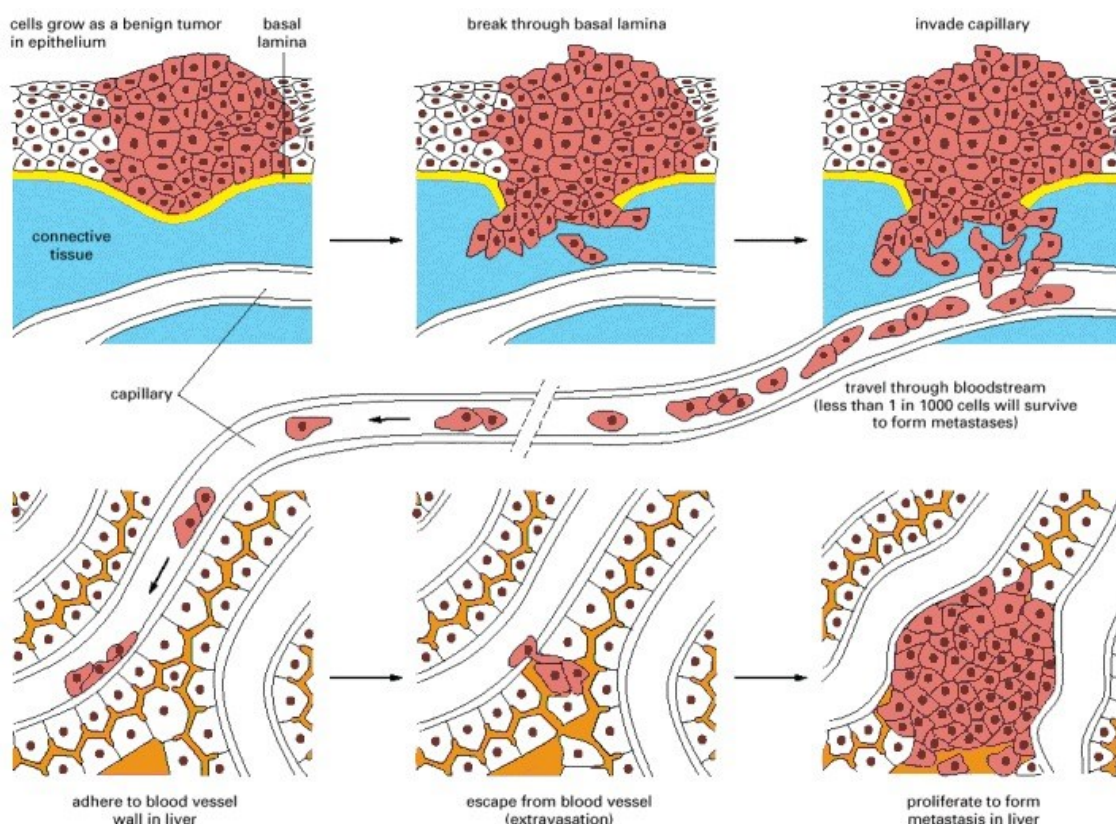


**Obrázek 3** Proměna ECM během vzniku nádoru ve tkáni ovaria (Cho et al., 2015). Epiteliální buňky (Epithelial cell) se mění na nádorové (Tumor cells). Při remodelaci ECM dochází k zesílení kolagenních vláken (Collagen Type I, XI) a jejich zesítnění. Ve tkáni se objevují nádorově asociované fibroblasty (Cancer Associated Fibroblast), které tyto změny samy iniciují.

### 3.3 Metastázování a pohyb buněk

Metastázování je proces tvorby sekundárních nádorů v místech, které není spojeno s původním primárním nádorem. Je charakteristickým znakem rakoviny, který je zodpovědný za nejvíce úmrtí spojených s nádorovými onemocněními. Je také často spojováno s neúčinností terapie.

Nejprve musí dojít k uvolnění buňky od buněk primárního nádoru, překonání bazální membrány v epitelu (Bravo-Cordero et al., 2012), poté membrány endotelu cév. Nádorová buňka poté může krevním nebo lymfatickým řečištěm postupovat do jiné tkáně. Z endotelu musí opět prostoupit bazálními membránami do nové tkáně, kde se uchytí na základě své velikosti nebo vazbou na specifické molekuly v cílovém orgánu a začnou proliferovat. Nádorové buňky se takto mohou pohybovat samostatně, nebo ve shlucích (Alberts et al., 2002).



**Obrázek 4 Metastatická kaskáda** (Alberts et al., 2002). Nejprve dochází k uvolnění buněk od okolní tkáně, buňky překonávají bazální membránu epitelu a také endotelu cév. Poté putují krevním nebo také lymfatickým řečištěm (méně než 1 buňka z 1000 přežije a je schopna vytvořit metastatické ložisko). Poté opět přecházejí skrz endotel a bazální membránu v místě tvorby metastáz. V tomto místě se uchytávají, proliferují zde a tvoří metastázy.

Epiteliální buňky jsou schopné metastázovat pouze za předpokladu, že dokážou projít alespoň částečnou epitel-mezenchymální tranzicí (EMT), díky čemuž jsou schopné pohybu.

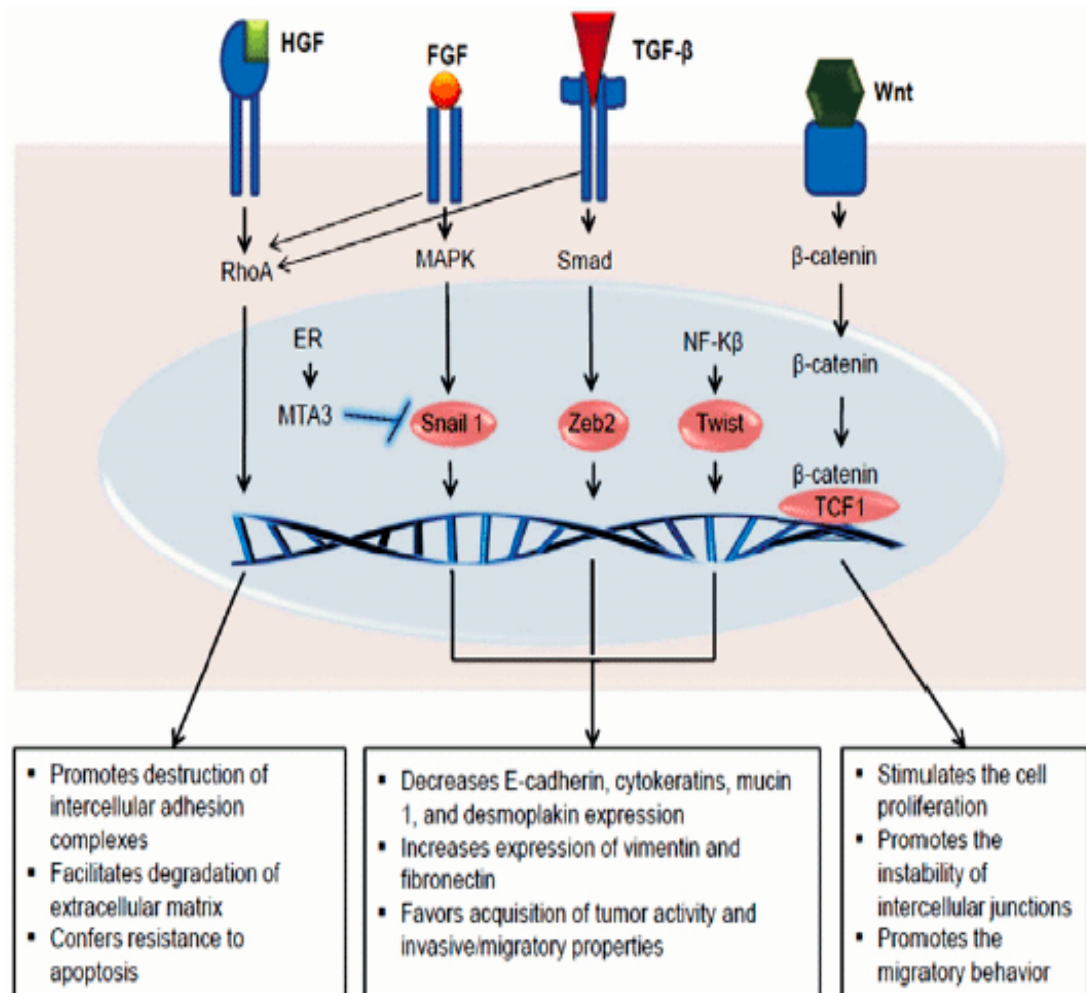
### **3.3.1 Invaze buněk přes bazální membránu**

Bazální membrána a ECM jsou hlavními bariérami pro invazi buněk a jejich migraci (Perrin et al., 2022). Prvním krokem buňky, pokud se chce stát invazivní, tedy musí být její únik přes bazální membránu a také rozklad ECM. Aby toho byla buňka schopná, musí vytvářet invadopodia. Je to také pravděpodobně první krok EMT (Bravo-Cordero et al., 2012). Invadopodia jsou membránové výčnělky bohaté na aktin a specifické pro nádorové buňky schopné rozkládat ECM pomocí proteolytických MMP. Alterace ECM můžou být vyvolány samotnými nádorovými buňkami, ale také fibroblasty a buňkami imunitního systému, které se nacházejí v nádorovém mikroprostředí. Po rozložení okolní ECM invadopodia zaniknou a umožní buňce její přesun. Buňka takto střídá stav migrace a stav kdy invadopodium rozkládá okolní ECM, čímž vytváří místo k migraci (Perrin et al., 2022).

### **3.3.2 Epitel-mezenchymální tranzice**

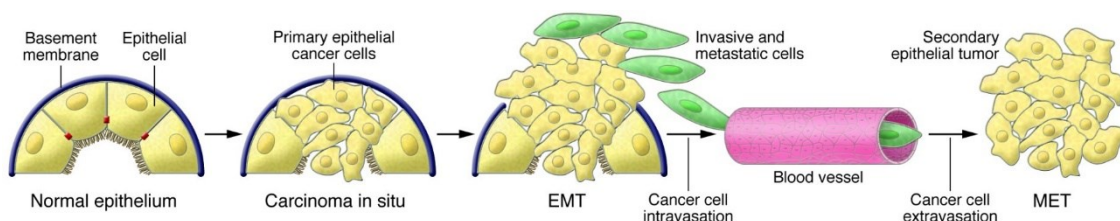
Epitel-mezenchymální tranzice umožňuje polarizované epiteliální buňce, která normálně interaguje s bazální membránou, podstoupit řadu biochemických změn a získat tak fenotyp buňky mezenchymální. EMT je nezbytná pro normální průběh embryonálního vývoje, ale objevuje se i při patologických stavech, například karcinogenezi (Davidson et al., 2012; Kalluri et al., 2009). EMT probíhá po indukci transkripčních faktorů, které ovlivňují expresi genů zodpovědných za soudržnost buněk, dynamiku cytoskeletu a přeměnu epiteliálních buněk na mezenchymální. Tyto transkripční faktory jsou např. Snail, Slug, Twist nebo ZEB (Gonzalez et al., 2015). Během změn v expresi proteinů dochází ke snížení exprese epiteliálních proteinů, které se účastní formace mezibuněčných spojů a spojů s ECM. Dochází k tomu proto, aby se zamezilo opětovnému spojení buněk a zároveň se tak i zvýší prostupnost epiteliální bariéry. Jsou také exprimovány geny, které zajišťují vazbu epiteliálních buněk k buňkám mezenchymálním. Charakteristickým znakem EMT je snížená exprese E-kadherinu, která vede k destabilizaci adhezních komplexů. Reakcí na to je zvýšená exprese mezenchymálního N-kadherinu, který vytvoří mnohem slabší vazbu mezi buňkami – tento proces se nazývá kadherinová záměna (Lamouille et al., 2014; Loh et al., 2019).

Díky této záměně dochází k oslabení mezibuněčných spojů. Slabší vazba potom buňkám dovoluje jejich migraci a invazivitu (Lamouille et al., 2014).



**Obrázek 5 Hlavní signální dráhy ovlivňující EMT při nádorové progresi (Franco-Churaire et al., 2013).** Řada růstových (HGF, FGF, TGF-β) a transkripčních faktorů (Snail1, Zeb2, Twist, TCF1) vyskytujících se v nádorovém stromatu a jejich transdukčních proteiny (MAPK, Smad, RhoA, β-catenin) umožňují realizaci EMT. Signální dráha Rho/ROCK podporuje destrukci mezibuněčných adhezí, usnadňuje degradaci ECM a zajišťuje odolnost vůči apoptóze. Mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) pomocí svého efektoru Snail1, stejně jako Smad protein s efektozem Zeb2 a transkripční faktor Twist, snižuje E-cadherin a další látky potřebné k udržení epiteliálního fenotypu buňky. Dále také zvyšují expresi vimentinu a fibronektinu (důležité pro vazbu dalších složek ECM) a podporuje osvojení invazivních vlastností buněk. Signální dráha Wnt/β-catenin stimuluje po translokaci β-cateninu do jádra proliferaci buněk, nestabilitu mezibuněčných spojů a podporuje schopnost migrace.



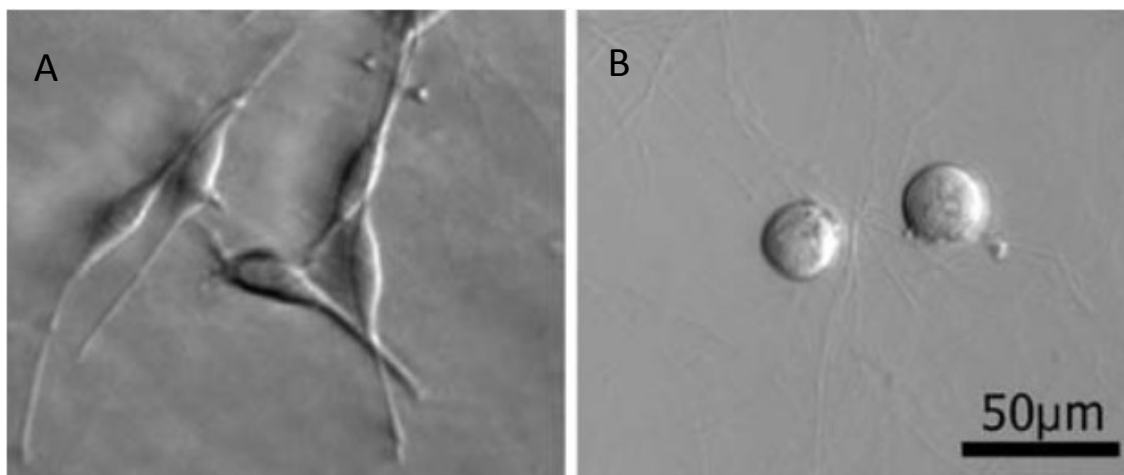


**Obrázek 6** *Progrese normálního epitelu k invazivnímu karcinomu. Epiteliální buňky ztrácejí svoji polaritu a oddělují se od bazální membrány. Mění se tak interakce mezi buňkami a ECM. Dalším krokem je EMT, kdy se buňky stanou invazivními (zelené buňky) a je jim umožněn vstup do krevního řečiště, z něho pak i vystoupit a tvořit metastázy na vzdáleném místě v organismu. Zde mohou poté podstoupit MET (mezenchymově-epitelová tranzice) a znovu si tak osvojit epitheliální fenotyp.*

Integriny jsou transmembránové receptory zodpovědné za buněčnou adhezi buď se složkami ECM, nebo s ostatními buňkami. Po navázání ligandu aktivují signální dráhy, nejčastěji růstových faktorů nebo onkogenů, ovlivňující buněčný cyklus, organizaci cytoskeletu a pohyb nových receptorů na membráně buňky. To vše je potřebné pro iniciaci a progresi metastazování nádorů. Integriny jsou vázány k ECM a zajišťují hybnou sílu pro pohyb buňky a následnou invazi. Jsou také schopny ovlivňovat remodelaci ECM díky tomu, že regulují aktivitu a umístění proteáz (Desgrosellier et al., 2010).

### 3.3.3 Typy pohybu buněk

Nádorové buňky využívají dva typy pohybu – améboidní a mezenchymální. Mezi typy pohybů může buňka přepínat a o tom, jaký typ pohybu bude právě využívat, rozhoduje potlačení, nebo naopak posílení aktivity různých signálních drah. Proces přepnutí mezi těmito dvěma pohyby se nazývá mezenchymálně-améboidní přechod (MAT) nebo améboidně-mezenchymální přechod (AMT) a je závislý především na aktuálním složení okolního prostředí a nutnosti nádorové buňky se na něj adaptovat (Paňková et al., 2010).

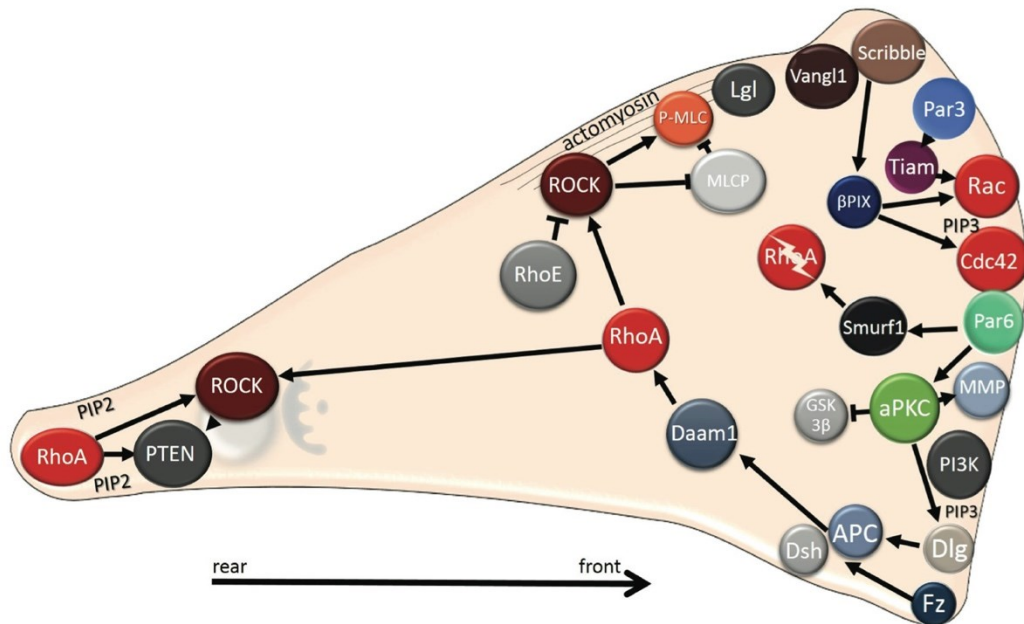


**Obrázek 7** Tvar mezenchymálních (A) a améboidních (B) buněk (převzato z Paňková et al., 2010)

### 3.3.3.1 Mezenchymální pohyb

Mezenchymální buňky mají podlouhlý tvar a jsou polarizované. Polarita buňky je dána rozložením proteinů (viz Obrázek 8). Ty jsou lokalizovány v přední části buňky, kde regulují Rho GTPázy. Nejvýznamnějšími členy rodiny Rho GTPáz jsou RhoA, Rac a Cdc42. U mezenchymálních buněk jsou v přední části buňky aktivovány Cdc42 a Rac a naopak díky degradaci enzymem Smurf je suprimovaná RhoA. V zadní části buňky je oproti tomu exprese RhoA vyšší (Gandalovičová et al., 2015). Pro jejich pohyb je nutná tvorba filopodií a lamelipodií, která jsou bohatá na aktin. Jejich tvorba je závislá na polymerizaci aktinových vláken. Polymerizace je řízena zejména Rac a Cdc42, jejich efektozem je protein WAVE. Aktivací této dráhy je potlačena aktomyozinová kontraktilita, která je nutná pro améboidní pohyb (Sanz-Moreno et al., 2008). Lamelipodia a filopodia jsou stabilizována fokálními adhezemi zprostředkovanými vazbou myozinu s ECM (Graziani et al., 2022) na obou pólech buňky pomocí integrinů. Kvůli nim je tento pohyb pomalejší. Na rozdíl od améboidního pohybu nedochází k porušení vazeb buňky s ECM, buňka pouze ztratí kontakt s okolními buňkami tkáně (Gandalovičová et al., 2015). Kontrakce jsou způsobeny vznikem stresových vláken ukotvených ve fokálních adhezích, která vznikají aktivací dráhy Rho/ROCK. Dochází zde také k fosforylaci myozinu (MLC). Zadní část buňky se smrští a buňka se posune kupředu. K pohybu 3D prostředím ECM potřebují proteolytické enzymy k jeho degradaci (Paňková et al., 2010).

Rac řídí schopnost pohybu dopředu, Cdc42 má za úkol udávat směr pohybu a Rho u mezenchymálního pohybu indukuje přisunutí zadní části buňky k přední (Gandalovičová et al., 2015).



**Obrázek 8** Lokalizace proteinů ovlivňujících polaritu buňky (Gandalovičová et al., 2015)

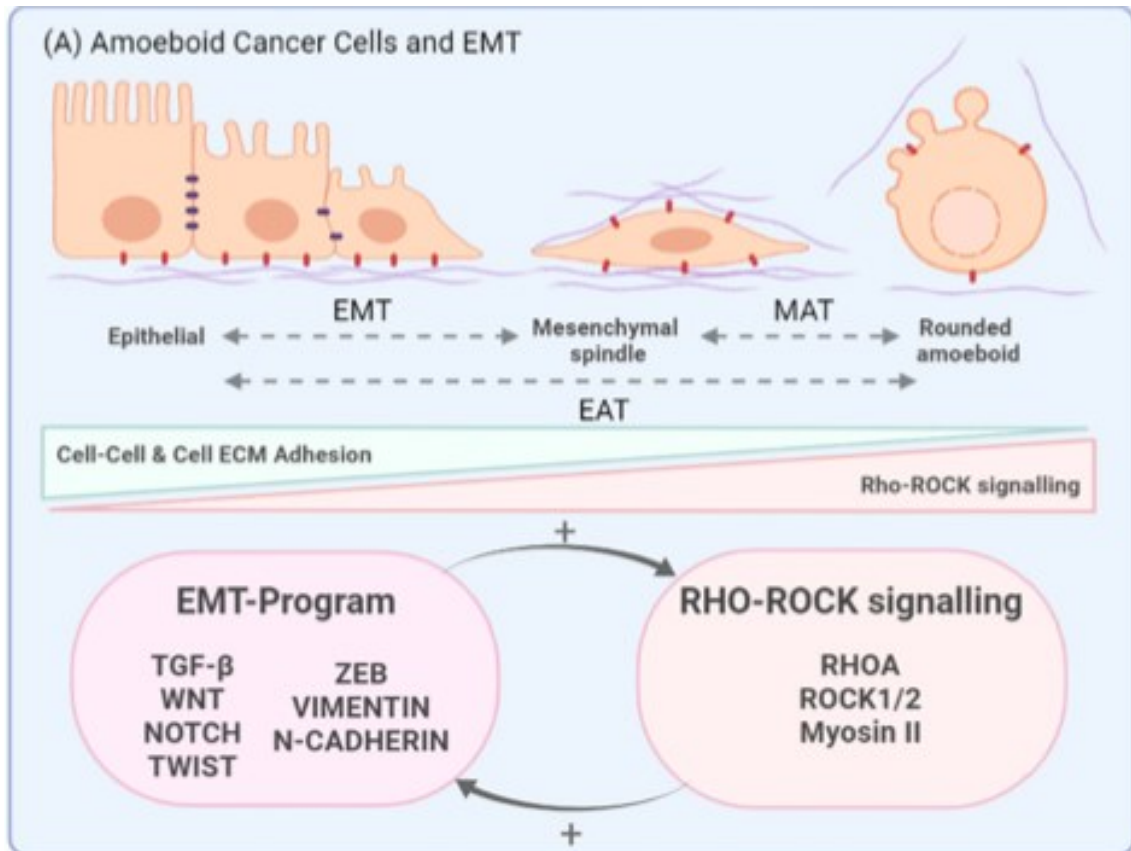
### 3.3.3.2 Améboidní pohyb

Améboidní pohyb je charakterizován vznikem kontraktilní aktomyozinové sítě a je podněcován Rho/ROCK signální dráhou. Rho aktivuje svůj efektor – ROCK, tím je aktivována myozinkináza (MLCK), která fosforyluje MLC. Fosforylovaný MLC poté zajistí vyšší kontrakce.

Buňky mají kulovitý tvar (Paňková et al., 2010). Pohyb je zajištěn kontraktilitou sítě a je nezávislý na vazbě s ECM, protože vykazuje nízkou expresi  $\beta 1$ -integrinů (Gandalovičová et al., 2015), takže je rychlejší než mezenchymální typ (Graziani et al., 2022). Dále u améboidních buněk nevznikají stresová vlákna (Friedl et al., 2010). Neobjevují se u nich lamelipodia ani filopodia, ale malé puchýřky, které vznikají na membránách pravděpodobně kvůli slabšímu propojení membrány a cytoskeletu a sníženému intracelulárnímu tlaku (Petrie et al., 2017). Přispívá tomu i samotná aktomyozinová síť a s ní spojené proteiny, které se oddělují od buněčné membrány díky hydrostatickému tlaku cytoplazmy (Gandalovičová et al., 2015). Díky tomu se mohou pohybovat nezávisle na degradaci ECM. Pouze se protlačí skrze vlákna matrix a přizpůsobí svůj tvar již existujícím volným prostorům v ECM.



### 3.3.4 Mezenchym-améboidní tranzice (MAT)



**Obrázek 9** Přechody mezi jednotlivými buněčnými fenotypy a signální dráhy je ovlivňující (Graziani et al., 2022). V první části obrázku jsou zobrazeny typické tvary buněk jednotlivých fenotypů a jak mezi sebou mohou přecházet na základě stimulů z nádorového stromatu. Pro améboidní buňky je typický kulatý tvar a silná signalizace dráhy Rho/ROCK, která dále fosforyluje myozin). Améboidní i vřetenovité (spindle) mezenchymální buňky migrují jako samostatné buňky. Naopak epiteliální buňky mají silné mezibuněčné spoje a také spoje s ECM. Těchto spojů ubývá u mezenchymálních buněk a nejméně spojů vytváří buňky využívající améboidního pohybu. EMT je řízeno řadou růstových a transkripčních faktorů (TGF- $\beta$ , Wnt, Notch, Twist, Zeb) a jejich dalších působků.

Při MAT spontánně dochází k přechodu od mezenchymálních buněk závislých na fokálních adhezích k buňkám, které jsou závislé na buněčné kontraktilitě bez větší potřeby adheze. *In vitro* je možné tohoto přechodu dosáhnout např. aktivací Rho kináz nebo inhibicí MMP (Holle et al., 2019). Opakem MAT je améboidně-mezenchymální tranzice (AMT) a díky těmto protichůdným dějům se může buňka adaptovat na aktuální podmínky a složení mikroprostředí a osvojit si tak fenotyp vhodný k přežití (Paňková et al., 2010).

### 3.4 Inhibitor Y27632

Inhibitor Y27632 je selektivní pro ROCK kinázu. Inhibuje ROCK1 i ROCK2 a ve vyšších koncentracích také proteinkinázu C (PKC) a proteinkinázu A (PKA) a MLCK. Vykazuje zpomalení pohybu, narušuje invazivnost a také proliferaci rakovinných buněk. Indukuje reorganizaci skeletu. Je negativním efektem Rho/ROCK signální dráhy, což vede k posílení cytotoxického působení cisplatinu na buňky ovariálního karcinomu. Oslabuje fosforylaci lehkého MLC. Problémem ve využití inhibitorů ROCK v klinické praxi je jejich častý rozdíl mezi účinky *in vitro* a *in vivo*. Je to dáno hlavně početností rodiny kináz, kdy inhibitor není schopný specificky inhibovat pouze cílené kinázy (de Sousa et al., 2020).

### 3.5 EGF

Epidermální růstový faktor (EGF) je látkou stimulující buněčné dělení, diferenciaci a migraci zejména epitelových buněk. Podílí se také na procesu hojení. Váže se ke specifickým receptorům (EGFR). Jeho zvýšená aktivita byla zjištěna u řady nádorů, včetně karcinomu ovarií. Zvýšená exprese EGFR je spojena s vysokým stupněm proliferace buněk, pokročilým nádorem a také horšími výsledky terapie. Bylo také zjištěno, že exprese EGFR reguluje adhezi buněk a může ovlivňovat jejich růst a invazivnost (Skirnisdottir et al., 2018).

### 3.6 Mechanismy rezistence na cisplatinu

Cisplatina je léčivo ze skupiny platinových cytostatik. Je velice účinné na celou škálu onkologických onemocnění. Mechanismy účinku jsou značně pleiotropní. Váže se pevnými vazbami na DNA a poškozuje ji alkylací. DNA v tomto stavu není schopna replikace, čímž dochází i k inhibici transkripce. Dále je schopna vyvolat zvýšenou expresi death receptorů na povrchu buňky a zvýšenou syntézu death ligandů pomocí aktivace stresových kináz. Tím dochází k eliminaci buněk díky aktivaci apoptotické dráhy. Její cytotoxicita je také zapříčiněna tvorbou volných radikálů, čímž působí na buňku oxidačním stresem (Ghosh, 2019). Předpokládá se také, že cisplatina, díky preferenční vazbě na guanin, inhibuje telomery bohaté na opakující se sekvence TTAGGG (Švihovec et al., 2018).

Nejběžněji využívaným postupem v léčbě ovariálního karcinomu je chirurgické odstranění nádoru, které je následováno kombinovanou chemoterapií. K té se nejčastěji využívá kombinace cisplatinu a dalších cytostatik. Cisplatina bývá velmi účinná, u pacientek s ovariálním karcinomem však často dochází k recidivám, kdy je už nádor

k cisplatině necitlivý (Dasari et al., 2014; Galluzzi et al., 2012). Aby se zamezilo této rezistenci, užívá se kombinace platinových a taxanových cytostatik. Díky této kombinaci může také dojít ke snížení dávky cisplatiny, a tedy i ke snížení jejích nežádoucích účinků, mezi které patří nauzea, zvracení, nefrotoxicita, neurotoxicita atd. (Švihovec et al., 2018).

### **3.6.1 Thiolové sloučeniny**

U platinových derivátů snadno dochází k reakcím se sloučeninami obsahujícími thiolové funkční skupiny. Tyto reakce lze vysvětlit na základě Pearsonova konceptu kyselin a zásad, kdy platina zde působí jako Lewisova měkká kyselina a thiolová skupina jako měkká zásada. Thiolová skupina má proto vysokou afinitu k vazbě s těžkými kovy, mezi které řadíme i platínu (Ghosh, 2019).

Pokud dojde ke zvýšení koncentrací nukleofilních látek, např. redukovaného glutathionu (GSH), sulfátů nebo metalothioneinu, které jsou vysoce reaktivní s cisplatinou, dojde ke snížení oxidačního stresu vyvolaného cisplatinou. Ten je ale potřeba k zajištění její účinnosti, a tak můžeme říci, že se jedná o další z mechanismů vzniku rezistence. Vliv na tento děj má i úroveň exprese glutathion-S-transferázy. Katalyzuje totiž vazbu GSH s platinovými deriváty a vysoké hladiny tohoto enzymu u pacientů s ovariálními karcinomy mohou být spojeny s rezistencí k těmto léčivům a také se špatnou prognózou (Song et al., 2022; Ghosh, 2019). Komplex cisplatiny s GSH je dále vyloučen pomocí exportní pumpy.

Na stejném principu se cisplatina v krvi váže na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin (HSA). Při této vazbě dochází k deaktivaci cisplatiny. Nejčastěji se váže v místě výskytu aminokyselin (AMK) cysteinu a methioninu (Ferraro et al., 2015; Esposito, 2002), kdy obě ve své struktuře obsahují síru. V literatuře je uváděno, že 65-98 % cisplatiny je navázáno na HSA během prvního dne po podání (Ferraro et al., 2015). Navázání cisplatiny na plazmatické bílkoviny vede dle některých zdrojů ke snížení její účinnosti, a tedy k rezistenci k terapii (Bal et al., 2013), jiné zdroje naopak uvádějí, že komplex HSA-cisplatina slouží jako rezervoár, ze kterého je léčivo opět postupně uvolňováno (Ferraro et al., 2015).

### **3.6.2 Efluxní receptory**

Pro optimální účinek léčiva je nutné ho dostat do místa jeho účinku a zajistit jeho akumulaci v tomto místě. Právě tomu zabraňují mechanismy, které buď zvyšují eflux léčiva mimo buňku, nebo zabraňují jeho vstupu dovnitř. Cisplatina se do buňky dostává pasivní difuzí a také pomocí různých transportních proteinů. Jedním z těchto proteinů je

i protein CTR1. Přítomnost cisplatiny v buňce však způsobuje snižování koncentrace CTR1 a časem tak vzniká rezistence, jelikož se cisplatina nestihne navázat na DNA (Song et al., 2022; Ghosh, 2019). Transportéry ATP7A a ATP7B, nadměrně exprimované u velkého množství malignit, naopak zajišťují odtok cisplatiny ven z buňky, tím pádem v buňce není zajištěna její dostatečná koncentrace a dochází k rezistenci k terapii (Ghosh, 2019; Li et al., 2018). Za rozvoj mnohočetné lékové rezistence je zodpovědných nejméně 11 transportérů ze skupiny ATP-binding cassette. Mezi ně patří například P-glykoprotein nebo multidrug resistance-associated proteins. Tyto proteiny se běžně vyskytují v různých tkáních a jsou zapojeny i do fyziologických procesů organismu. V nádorových buňkách je však jejich exprese několikanásobně větší (Liu W et al., 2019; Amawi et al., 2019).

### **3.6.3 Inhibice apoptózy**

Apoptóza je programovaná buněčná smrt sloužící k eliminaci poškozených a nepoužívaných buněk. Svoje místo má jak ve fyziologických procesech, tak i v patologických. Za normálního stavu je v buňce udržována rovnováha mezi proapoptotickými a antiapoptotickými faktory, pokud je tato rovnováha narušena, dojde k apoptóze (Hanahan et al., 2011). Iniciaci apoptózy propagují různé faktory, mezi které patří zlomy v DNA, přítomnost reaktivních forem kyslíku, stres endoplazmatického retikula nebo přítomnost ligandů membránových či cytoplazmatických receptorů.

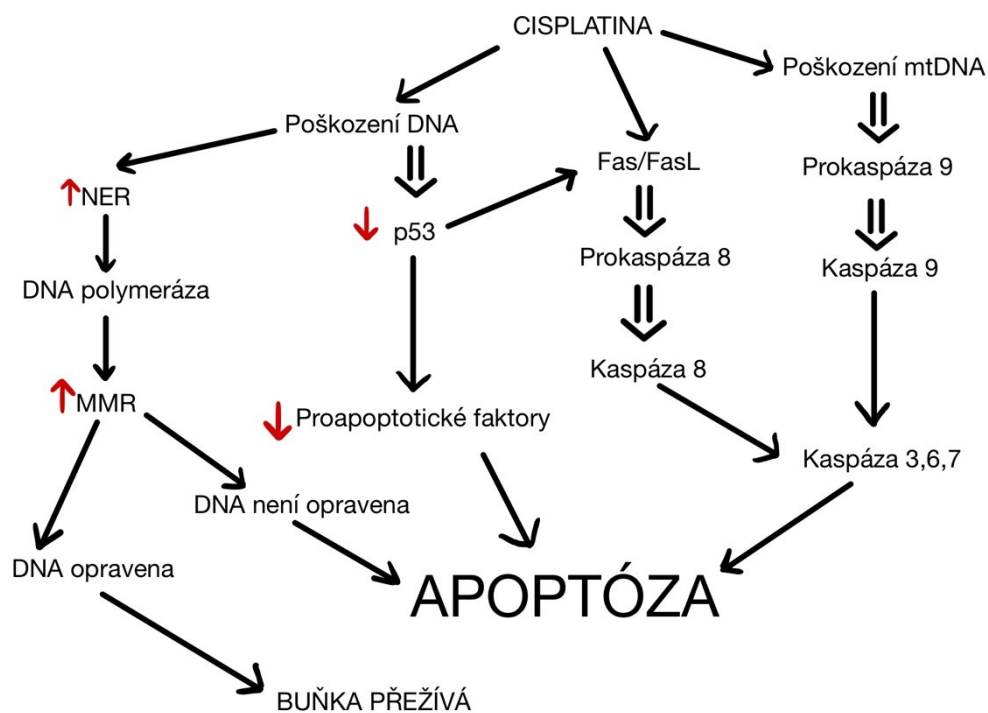
Při rozvoji onkologického onemocnění dochází k nerovnováze mezi buněčným dělením a apoptózou. Buňky, které měly zemřít, nedostanou signál k apoptóze a mohou dále proliferovat a formovat nádor. Obecně buňka získává schopnost reparovat poškozenou DNA nebo je snížena její schopnost podléhat apoptotickému procesu. K poruše apoptózy může docházet v podstatě v jakémkoli jejím kroku (Hanahan et al., 2011).

Po vazbě cisplatiny na DNA k ní může vznikat rezistence několika různými způsoby. Přítomnost několika opravných mechanismů buňce zajišťuje možnost opravy části DNA zničené vazbou cisplatiny. Pokud je poškození DNA příliš velké, dojde k zastavení buněčného cyklu ve fázi S nebo G2 a opravě DNA (Galluzzi et al., 2012). Nucleotide excision repair (NER) systém buňce zajišťuje vystřížení nukleotidů postižených vazbou k cisplatině. K obnovení celistvosti genu následně probíhá syntéza DNA. Buňky s vysokou expresí NER naznačují velmi nízkou senzitivitu k terapii cisplatinou. MMR protein má funkci rozpoznávat a opravovat chybně spárované baze v DNA a také dokáže opravovat léze způsobené cisplatinou. Pokud je schopný tuto lézi opravit, buňka přežívá. Pokud ho ale opravit nedokáže, buňka podlehně apoptóze.

Vyšší exprese tohoto proteinu vede k častějším opravám a buňka uniká před apoptózou (Ghosh, 2019). Pokud je funkce MMR odstraněna díky mutaci nebo snížené expresi, nádorová buňka ignoruje poničenou DNA a dále ji v tomto stavu replikuje (Song et al., 2022).

Poruchy tumor supresorových genu, např. TP53, vedou k jejich inaktivaci a buňka tak má možnost se vyhnout apoptóze. Jejich normální funkcí je regulace buněčného cyklu. K apoptóze dochází, pokud produkt TP53, protein p53, indukuje syntézu proapoptotických proteinů (Bykov et al., 2018; Florea et al., 2011). Vliv na sníženou citlivost k cisplatině má i mutace nebo zvýšená exprese protoonkogenu H-ras nebo receptoru a jeho ligandu Fas/FasL, dále také onkogenu Her2 nebo snížená aktivita kaspáz (Seifertová et al., 2010).

Metylace DNA patří mezi epigenetické modifikace a je důležitá pro umlčení genů spojených s rakovinným bujením. Je schopna vyvolat zastavení buněčného cyklu, apoptózu a umlčují tumor supresorové geny. Tyto epigenetické modifikace mohou být následkem užívání cisplatiny a mohou následně způsobovat rezistenci k ní samotné. (Florea et al., 2011).



**Obrázek 10** Mechanismus protinádorového účinku cisplatiny s vyznačenými principy rezistence s vlivem na apoptózu (upraveno dle Ghosh, 2019)

## **4. Experimentální část**

### **4.1 Buňky A2780 a A2780cis**

#### **4.1.1 A2780**

Pro naše účely byla tato buněčná linie získána z katalogu European Collection of Animal Cultures (ECACC, katalogové číslo 93112519). Linie byla odvozena z lidské nádorové tkáně ovariálního karcinomu neléčené pacientky.

#### **4.1.2 A2780cis**

Buněčná linie A2780cis (Sigma, katalogové číslo 93112520) je rezistentní na cisplatinu (CP). Rezistence byla vyvinuta opakovanou expozicí mateřské linie A2780 zvyšujícími se dávkami CP. K udržení rezistence na CP buněčné linie A2780cis byl do média každou třetí pasáž přidán dichlorid cis-diaminplatnatý (Sigma Aldrich). Výsledná koncentrace CP byla 3mM.

#### **4.1.3 Počítání buněk**

Po pasáži byly buňky spočítány pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Buňky byly rozsuspendovány v 10 ml média. 10  $\mu$ l suspenze bylo smícháno 1:1 s trypanovou modří a nanášeno do komůrky. Buňky byly počítány třikrát ve 25 čtvercích. Průměrný počet byl vynásoben dvěma. Výsledek odpovídá počtu  $\times 10^4$  buněk v 1 ml základní suspenze. Následně byly buňky obou linií kultivovány na kolagenním gelu v médiu RPMI (Sigma Aldrich) obohaceném o 10% fetální bovinní sérum (FBS) při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub>.

### **4.2 Izolace kolagenu z ocasních šlach potkana**

K získání kolagenu pro přípravu gelu byly použity ocasní šlachy mladého potkana o hmotnosti 180-200 g. Šlachy byly vypreparovány ve fyziologickém roztoku, aby se zamezilo jejich vyschnutí, a nastříhány na menší kusy. Suspenze byla ponechána přes noc při 4 °C, přefiltrována a resuspendována v 0,25M kyselině octové. Rozpouštění probíhalo při 4 °C za stálého míchání po dobu 48 hodin. Roztok kolagenu byl dialyzován proti 0,02M kyselině octové, centrifugován při 9 000 RPM a výsledná koncentrace byla upravena na 1,33 mg/ml.

### **4.3 Příprava kolagenního gelu**

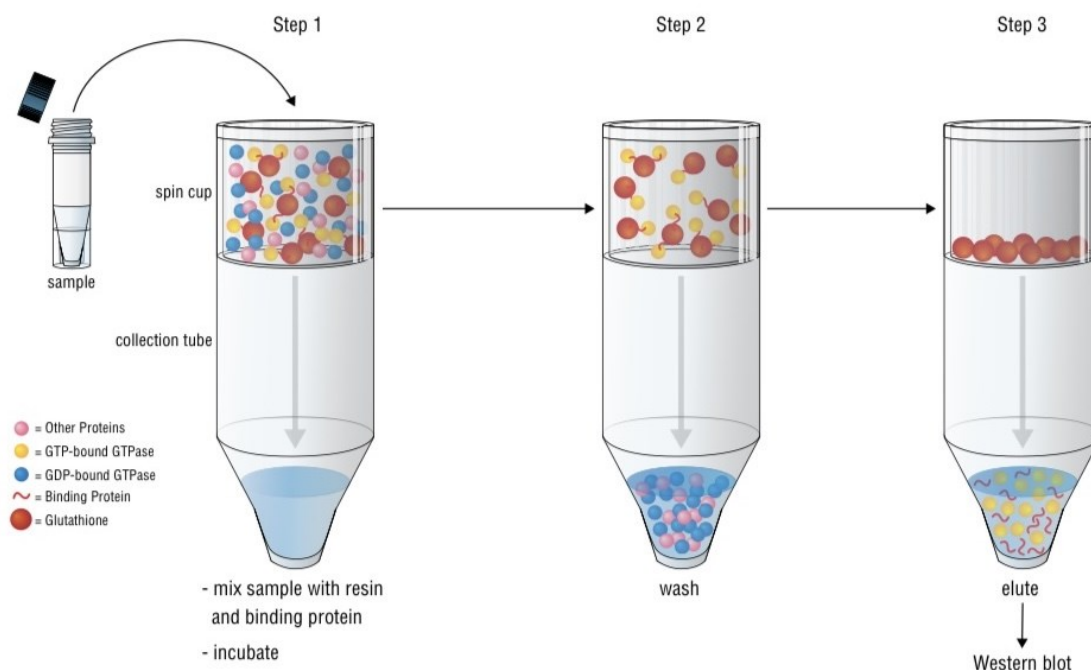
Kolagenní gel ke kultivaci byl připraven z roztoku kolagenu v 0,02M kyselině octové a čtyřikrát koncentrovaném roztoku RPMI v poměru 3:1. Výsledná koncentrace

kolagenu byla 0,1 %. Na Petriho misky o ploše 8 cm<sup>2</sup> byl pipetován 1 ml směsi (western blot) a do jamek mikrotitrační desky 50 µl (imunochemické barvení).

## 4.4 Izolace aktivních Rho-kináz

### 4.4.1 Princip metody

K navázání aktivované formy Rho je využíván fúzní protein GST-Rhotekin-RBD. Reakcí s glutathionovou pryskyřicí jsou poté Rho kinázy navázané na GTP precipitovány. Z precipitátu jsou následně aktivní Rho eluovány pomocí SDS redukujícího pufru.



**Obrázek 11 Princip izolace aktivních Rho-kináz** (převzato z *Cell Signaling Technology, Inc. Active Rho Detection Kit*, str.1 [online]).

### 4.4.2 Sklizení bílkovin z gelu na detekci aktivní Rho

Buňky byly vysazeny na Petriho misky o ploše 8 cm<sup>2</sup> s 1 ml gelu. Počet vysazených buněk byl 1,5 mil pro kontrolní skupinu a EGF a 2 mil buněk pro skupinu s inhibitorem Y27632. Buňky byly inkubovány 24 hodin za standardních podmínek a poté byly ovlivňovány EGF (50ng/ml) a inhibitorem Y27632 (30 µmol/l) po dobu 6 hodin. Po uplynutí inkubační doby bylo odsáto médium a misky byly omyty ledovým PBS. Po promytí bylo přidáno 0,5 ml ledového Lysis/binding/wash pufru (Active Rho Detection Kit, Cell Signaling) obohaceného o inhibitor serinových proteáz PMFS (Fenylmetansulfonyl fluorid, Cell Signaling), o výsledné koncentraci 5µl/ml. Po inkubaci

za stálého třepání 10 minut při 4 °C, byl lyzát přenesen do mikrozkušavky a centrifugován 15 minut při 4 °C a 16 000g. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky.

#### 4.4.3 Stanovení bílkoviny

Bílkoviny byly stanoveny pomocí Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific), kdy nejprve dojde k redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$  a následně  $\text{Cu}^+$  reaguje s kyselinou bicinchoninovou (BCA) za vzniku purpurového komplexu. Dle tabulky 1 byla do mikrotitrační desky napipetována koncentrační řada standardů v duplikátu a vzorky v triplikátu. Vzorky byly připraveny z 9  $\mu\text{l}$  destilované vody a 1  $\mu\text{l}$  vzorku. Ředění kalibrační řady je uvedeno v tabulce 2. Pracovní roztok byl připraven z  $\text{CuSO}_4$  a BCA v poměru 1:50. Do okolních jamek byla pipetována destilovaná voda, aby se zabránilo vyschnutí vzorku. Mikrotitrační deska byla umístěna do spektrofotometru Spark (Tecan). Po promíchání a 30minutové inkubaci při 37 °C byla změřena absorbance při 562 nm. Z naměřených absorbancí byla sestavena kalibrační křivka a pomocí rovnice regrese byla vypočtena koncentrace vzorků.

**Tabulka 1 Rozložení na mikrotitrační desce při stanovení koncentrace bílkoviny**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
B	H <sub>2</sub> O	S1	S2	S3	S4	S5	S6	A2780	A2780 EGF	A2780 INH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
C	H <sub>2</sub> O	S1	S2	S3	S4	S5	S6	A2780	A2780 EGF	A2780 INH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
D	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	A2780	A2780 EGF	A2780 INH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
E	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	A2780cis	A2780cisEGF	A2780cisINH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
F	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	A2780cis	A2780cisEGF	A2780cisINH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
G	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	A2780cis	A2780cisEGF	A2780cisINH	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
H	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Tabulka 2 Ředění standardu (kalibrační řady)**

	STANDARD [ $\mu\text{l}$ ]	H <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]
S1	0	10
S2	1	9
S3	2	8
S4	3	7
S5	4	6
S6	5	5

#### 4.4.4 Afinitní precipitace aktivovaného G proteinu

K afinitní precipitaci byl použit Active Rho Detection Kit (Cell Signaling). Práce probíhala na ledu a veškeré reagenty byly vychlazené. Izolační kolony byly vloženy do



záchytných mikrozkušavek. Na každou membránu v kolonce bylo napipetováno 100  $\mu$ l glutathionové pryskyřice. Poté byly kolonky centrifugovány 1 min při 6 000g a 4°C. Po odstranění eluátu byly kolonky promyty 400  $\mu$ l Lysis/binding/wash pufru a centrifugovány 1 min při 6 000g a 4°C. Kolonky byly přeneseny do nové záchytné zkumavky. Poté bylo přidáno 400 mg GST-Rhotekin-RBD a lyzát proteinu. Nanáška proteinu byla 600 mg na kolonku. Kolonky byly hodinu inkubovány za stálého třepání při 4 °C a poté centrifugovány při 6 000 a 4 °C. Po odstranění eluátu byly kolonky třikrát promyty 400  $\mu$ l promývacího pufru. Po poslední centrifugaci byly kolonky přeneseny do nové záchytné zkumavky. Aktivované G-proteiny byly z kolonky eluovány 50  $\mu$ l elučního pufru obohaceného o dithiotreitol (Sigma Aldrich) o výsledné koncentraci 200 mmol/l. Eluované vzorky byly inkubovány 5 min při 95 °C a poté zamrazeny na -20 °C do další analýzy.

## **4.5 Western blot**

### **4.5.1 Princip metody**

Western blot je metoda využívaná ke stanovení nebo detekci určitého proteinu. Směs proteinů je při ní nanášena na gel, kde je poté pomocí gelové elektroforézy rozdělena dle molekulové hmotnosti nebo náboje. Následně jsou proteiny přeneseny z gelu na membránu a na membráně se cílový specifický protein zvýrazní reakcí s protilátkou.

### **4.5.2 Příprava akrylamidového gelu**

Nejprve byla sestavena aparatura na nalévání gelu (BioRad Laboratories). Do stojánku byla zafixována obě skla očištěná etanolem. Po sestavení aparatury byl připraven roztok 12% akrylamidového rozdělovacího gelu dle tabulky 3 (BioRad Laboratories). Roztok byl nalit mezi skla těsně pod spodní hranu stojánku. Poté byl převrstven 650  $\mu$ l butanolu (Lachema). Polymerace gelu probíhala 60 min. Butanol byl vymyt destilovanou vodou pomocí stříčky zbytky byly vysušeny filtračním papírem. Byl připraven roztok 4% akrylamidového zaostřovacího gelu (BioRad Laboratories) podle tabulky 3. Roztok byl nalit na vrstvu rozdělovacího gelu a byl vložen desetijamkový hřebínek. Po hodině polymerace byl gel připraven k použití.

**Tabulka 3 Příprava akrylamidového gelu**

Na přípravu 2 gelů	Rozdělovací 12% gel	Zaostřovací 4% gel
H <sub>2</sub> O	5 ml	3,05 ml
Rozdělovací pufr 1,5M	3,75 ml	x
Zaostřovací pufr 0,5M	x	1,25 ml
Akrylamid	6 ml	0,65 ml
SDS	75 μl	75 μl
APS	37,5 μl	37,5 μl
TEMED	5 μl	3,75 μl

### 4.5.3 Elektroforéza

Z gelu byl vyjmut hřebínek a jamky byly promyty elektroforetickým pufrem. Skla s připraveným gelem byla umístěna do kazety. Celá kazeta byla poté vložena do rámu a uzavřena. Sestava byla vložena do elektroforetické vany (BioRad Laboratories) a byl nalit Laemmli pufr. Tento pufr byl připraven podle tabulky 4 a pH bylo upraveno na 8,3. Před použitím byl naředěn na koncentraci 1x a byly jím ředěny vzorky.

Vzorky byly do jamek nanášeny pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky. Do prvního gelu bylo nanášeno 25 μl a do druhého 20 μl vzorku na jamku. Do obou gelů bylo též nanášeno 5 μl proteinového markeru (BioRad Laboratories). Elektroforéza probíhala při napětí 220 V a elektrickém proudu 240 mA. Po celou dobu byla vana chlazená ledem. Elektroforézu byla ukončena po přibližně 40 minutách, kdy vzorky doputovaly ke spodní hraně kazety. Skla s gelem byla vyjmuta z kazety a opláchnuta destilovanou vodou. Po oddělení skel byl vyjmut gel, ze kterého byl odstraněn okraj s jamkami. Gel byl promýván 5 min v transferovém pufu (viz Tabulka 5).

**Tabulka 4 Příprava Laemmli elektroforetického pufu**

Na přípravu 10x koncentrovaného Laemmli running pufu	
H <sub>2</sub> O	1000 ml
Tris Base (Sigma Aldrich)	30,0 g
Glycin (Sigma Aldrich)	144,0 g
SDS (Sigma Aldrich)	10,0 g

#### 4.5.4 Přenos vzorků z gelu na membránu

Nitrocelulózová membrána (BioRad Laboratories) byla inkubována 10 min v 30% metanolu (Lachema). Poté byla sestavena kazeta na přenos proteinů v tomto pořadí: vycpávka, chromatografický papír (Whatman), gel, membrána, chromatografický papír, vycpávka. Byly vytlačeny bublinky mezi membránou a gelem a kazeta byla zasvorkována. Poté byla umístěna do transferové vany (ThermoFisher Scientific) naplněné transferovým pufrem (viz Tabulka 5). Přenos probíhal 120 min při napětí 200 V a proudu 350 mA za stálého chlazení vodou.

Membrána byla po vyjmutí z kazety opláchnuta destilovanou vodou a obarvena 0,5% roztokem Ponceau S (ThermoFisher Scientific), čímž došlo k obarvení proteinů na membráně a vizuální kontrole úspěšného přenosu. Membrána byla zastřížena na potřebnou velikost a Ponceau S bylo odmyto pomocí TBS pufru. Složení TBS pufru je uvedeno v tabulce 9. Volná vazebná místa na membráně byla blokována roztokem 5% kaseinu (BioRad Laboratories) v TBS s 0,1% tweenem (VWR). Blokace probíhala 1 hod. Poté byly membrány vloženy do parafilmových kapsiček (VWR) spolu s roztokem primární protilátky. Na první gel byl požit roztok Rho protilátky (součást Active Rho Detection Kit, Cell Signaling) v 5% kaseinu a na druhý gel byla použita protilátka proti RhoA (Cell Signaling). Obě protilátky byly ředěny v poměru 1:500. Kapsičky s membránami byly inkubovány za stálého třepání při 4 °C přes noc. Druhý den byly membrány vyjmuty z kapsiček a promývány 5x 10 min v TBS pufru s tweenem a 1x 10 min v TBS pufru. Poté byly membrány inkubovány 60 min se sekundární anti-rabbit protilátkou (ThermoFisher Scientific) v 5% kaseinu. Ředění protilátky bylo 1:2000. Následně byly membrány opět promývány, a to 3x v TBS s tweenem a 1x v TBS.

**Tabulka 5 Příprava transferového pufru**

Na přípravu 1 l transfer pufru	
H <sub>2</sub> O	doplnit do celkového objemu 1000 ml
Tris Base (Sigma Aldrich)	3,03 g
Glycin (Sigma Aldrich)	14,4 g
Methanol (Lachema)	200 ml

**Tabulka 6 Příprava TBS pufru**

Na přípravu 1 l TBS pufru	
H <sub>2</sub> O	doplnit do celkového objemu 1000 ml
Tris Base (Sigma Aldrich)	24,2 g
NaCl (Sigma Aldrich)	80,0 g
HCl (Lachema)	úprava úH 7,6

### 4.5.5 Detekce

Detekce proteinů byla provedena pomocí SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific). Byly smíchány roztoky A a B v poměru 1:1. Množství bylo zvoleno tak, aby směs překryla celý povrch membrány. Po 1 min byla membrána lehce osušena a uložena do eurofólie. Ke snímání chemiluminiscence byla použita kamera Syngene.

## 4.6 Imunohistochemie

### 4.6.1 Princip metody

Imunohistochemické metody fungují na principu interakce antigen-protilátka. Specifické primární protilátky se vážou na specifický cílový antigen. Využívají se za účelem zobrazení určitých struktur v buňce nebo na jejím povrchu. V případě pozitivní reakce je tato struktura zvýrazněna barevně. V našem případě jsme využili DAPI k barvení buněčných jader (4',6-diamidin-2-fenylindol) – modrá fluorescence a testované protilátky byly označeny fluorescenčním barvivem FITC (fluorescein isothiokyanát) – zelená fluorescence.

### 4.6.2 Použité protilátky

**Tabulka 7 Použité protilátky**

Protilátka	Katalogové číslo	Výrobce
RhoA	2117	Cell Signaling
P-Myosin Light Chain 2 (Ser19)	3675	Cell Signaling
Wave-2	3659	Cell Signaling
PAK1/2/3	2604	Cell Signaling
P-PAK1(Ser199/204)/PAK2(Ser192/197)	2606	Cell Signaling
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	111-545-144	Jackson ImmunoResearch
Rhodamine (TRITC) AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	715-025-150	Jackson ImmunoResearch

## 4.6.3 Barvení a mikroskopie

**Tabulka 8 Rozložení pipetovaných buněk A2780, A2780cis, EGF a Y27632**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
B	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF	EGF
C	INH	INH	INH	INH	INH	INH	INH	INH	INH	INH	INH	INH
D												
E												
F												
G												
H												

Ze základní suspenze bylo do 96jamkové mikrotitrační desky (Techno Plastic Products) vysazeno 25 tisíc buněk linie A2780 a 50 tisíc buněk linie A2780cis na jamku. Deska byla inkubována 24 hodin za standardních podmínek. Poté byly buňky ovlivněny EGF (Peprotech) a inhibítozem Y27632 (VWR) dle rozpisu (viz Tabulka 8). Výsledná koncentrace EGF byla 50 ng/ml a koncentrace inhibitoru Y27632 byla 30  $\mu$ mol/l. Po 48hodinové inkubaci byly buňky zafixovány.

### 4.6.3.1 Barvení buněk

Prvním krokem fixace bylo opláchnutí buněk 200  $\mu$ l PBS, poté bylo přidáno 200  $\mu$ l paraformaldehydu po dobu 10 minut a opět byly buňky opláchnuty PBS. K permeabilizaci membrány buněk bylo použito 200  $\mu$ l vychlazeného roztoku 1 % citrátu sodného s 0,1 % Triton X-100 po dobu 10 minut. Poté byly buňky třikrát opláchnuty 200  $\mu$ l PBS. Pokaždé bylo PBS ponecháno na buňkách 5 minut, aby došlo k dokonalému vymytí předchozího roztoku z kolagenního gelu. Dalším krokem bylo blokování nespecifických vazeb bílkovin po dobu 30 minut pomocí 200  $\mu$ l 1 % FBS. Inkubace s 50  $\mu$ l primární protilátky probíhala přes noc při 4°C. Primární protilátky byly ředěny v PBS v poměru viz Tabulka 9.

Druhý den byla primární protilátka odmyta pomocí PBS (třikrát po 5 minutách). Následně byly buňky inkubovány s 50  $\mu$ l sekundární protilátky po dobu jedné hodiny ve tmě. Sekundární protilátku byla volena dle typu primární protilátky (viz Tabulka 9). Po inkubaci byly buňky opět třikrát opláchnuty PBS. Posledním krokem bylo dobarvení jader pomocí 100  $\mu$ l DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) s inkubací po dobu 2 minut. Preparát byl dvakrát opláchnut PBS po dobu 2 minut. Nakonec byl gel s buňkami opatrně vyjmut z jamky pomocí pipety na podložní sklíčko a zamontován do kapky fluorescenčního montovadla na vodné bázi Vectashield mounting medium.

**Tabulka 9 Ředění a kombinace protilátek**

Primární protilátka		Sekundární protilátka	
RhoA	1:300	Anti-rabbit	1:200
P-myo	1:300	Anti-mouse	1:200
Wave-2	1:500	Anti-rabbit	1:200
PAK	1:500	Anti-rabbit	1:200
P-PAK	1:500	Anti-rabbit	1:200

#### **4.6.3.2 Mikroskopie**

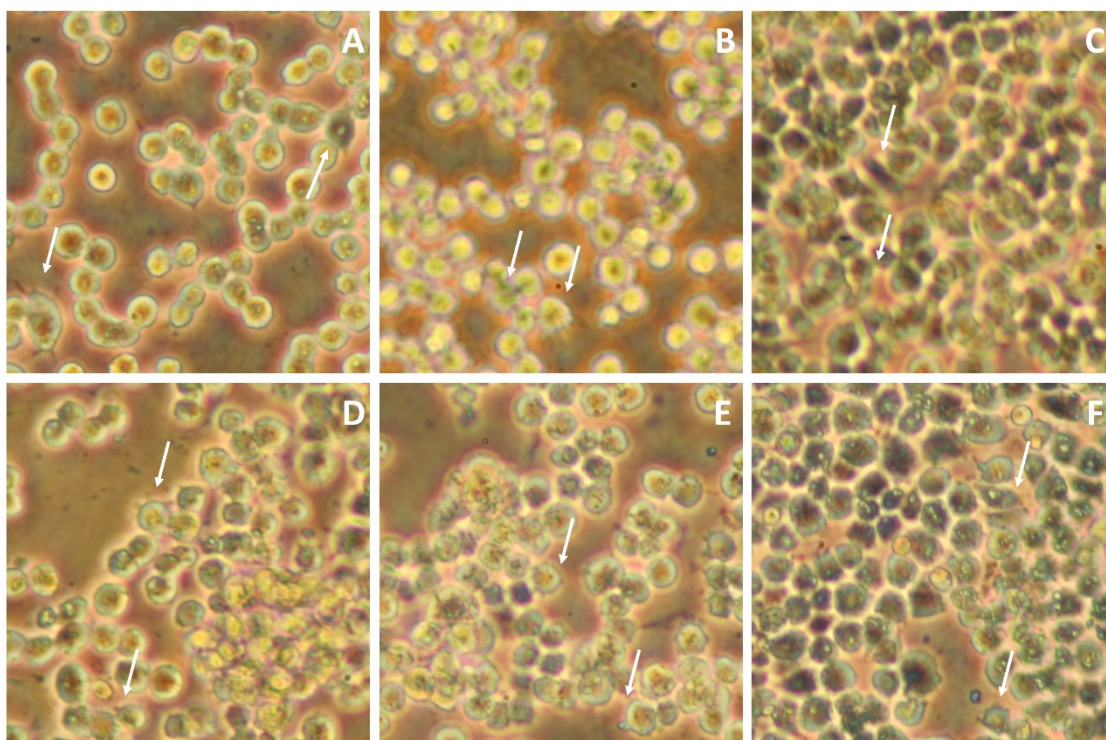
K mikroskopii byl použit mikroskop Nikon Eclipse 80i (zvětšení 600x) s monochromatickou kamerou COOL-1300Q a softwarem NIS-Elements.

## 5. Výsledková část

V této práci jsme se věnovali studiu buněk ovariálních karcinomů linií A2780 a na CP rezistentní A2780cis kultivovaných ve 3D prostředí kolagenního gelu. Sledovali jsme markery mezenchymálního a améboidního pohybu – RhoA, fosforylovaný myozin (P-my), PAK, fosforylovaný PAK a Wave-2. Porovnávali jsme nejen buněčné linie mezi sebou, ale také vliv růstového faktoru EGF, který aktivuje RAC1 a Cdc42 a specifického ROCK inhibitoru Y27632.

### 5.1 Morfologie buněk

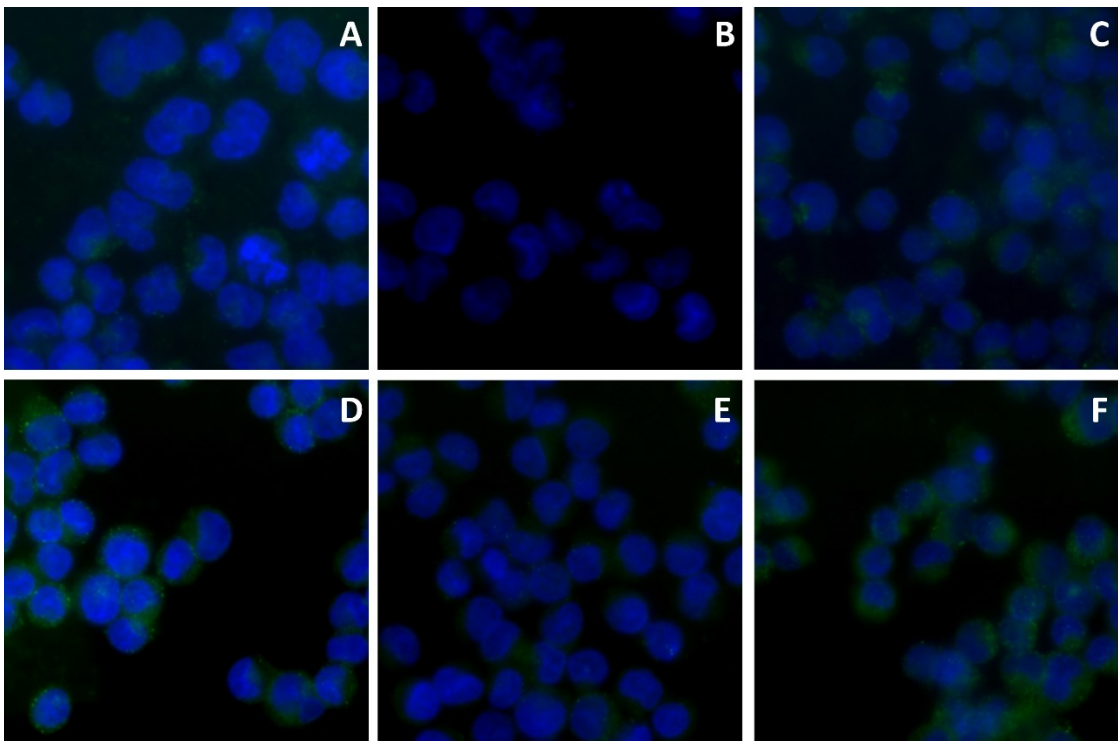
Buňky využívající mezenchymální pohyb mají podlouhlý tvar a tvoří lamelipodia a filopodia. Oproti tomu, buňky využívající pohyb améboidní, výběžky netvoří a mají zaoblený tvar. Morfologie námi využívaných buněk je zobrazena na obrázku 12. V buněčné linii A2780 se mez zaoblenými buňkami nachází i malé procento buněk podlouhlého tvaru s výběžky (A). Počet protáhlých buněk se po ovlivnění EGF (B) ani Y27632 (C) nezvyšuje. Oproti tomu buněčná linie A2780cis (D, E) obsahuje kulaté buňky s patrnými výchlípkami cytoplazmy. Ve skupině ovlivněné Y27632 (F) se však kromě těchto buněk objevují i protáhlé buňky.



**Obrázek 12** Morfologie buněk A2780 (A) po ovlivnění EGF (B) a Y27632 (C) a buněk A2780cis (D) po ovlivnění EGF (E) a Y27632 (F), zvětšení 400x

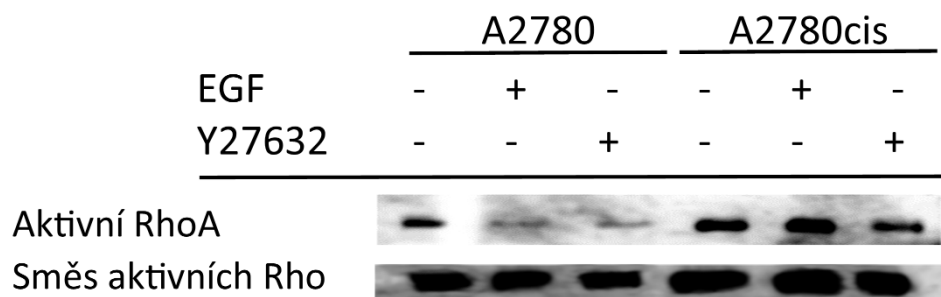
## 5.2 Markery améboidního pohybu

Améboidní pohyb je závislý na RhoA kináze, která prostřednictvím svého efektoru ROCK fosforyluje myozin. Na obrázku 13 jsou viditelné rozdíly v expresi RhoA kinázy mezi oběma buněčnými liniemi. Rezistentní linie A2780cis (D) exprimuje větší množství RhoA než linie A2780 (A). Růstový faktor EGF (B, E) snižuje expresi RhoA u obou linií. Naopak Y27632 (C, F) vliv na expresi nemá. Rozdíl mezi liniemi je patrný i na úrovni aktivity Rho kináz (obrázek 14). Linie A2780cis obsahuje větší množství aktivních Rho kináz i samotné RhoA kinázy. EGF ani Y27632 nemají vliv na celkovou aktivitu. Aktivita RhoA klesá v linii A2780 jak vlivem EGF, tak vlivem inhibitoru. V linii A2780cis pouze vlivem Y27632. Rozdíly v aktivitě RhoA mezi buněčnými liniemi se projeví i na úrovni fosforylovaného myozinu (Obrázek 15 A, D). Dále dochází k poklesu fosforylovaného myozinu vlivem inhibitoru u linie A2780cis (Obrázek 15 F).

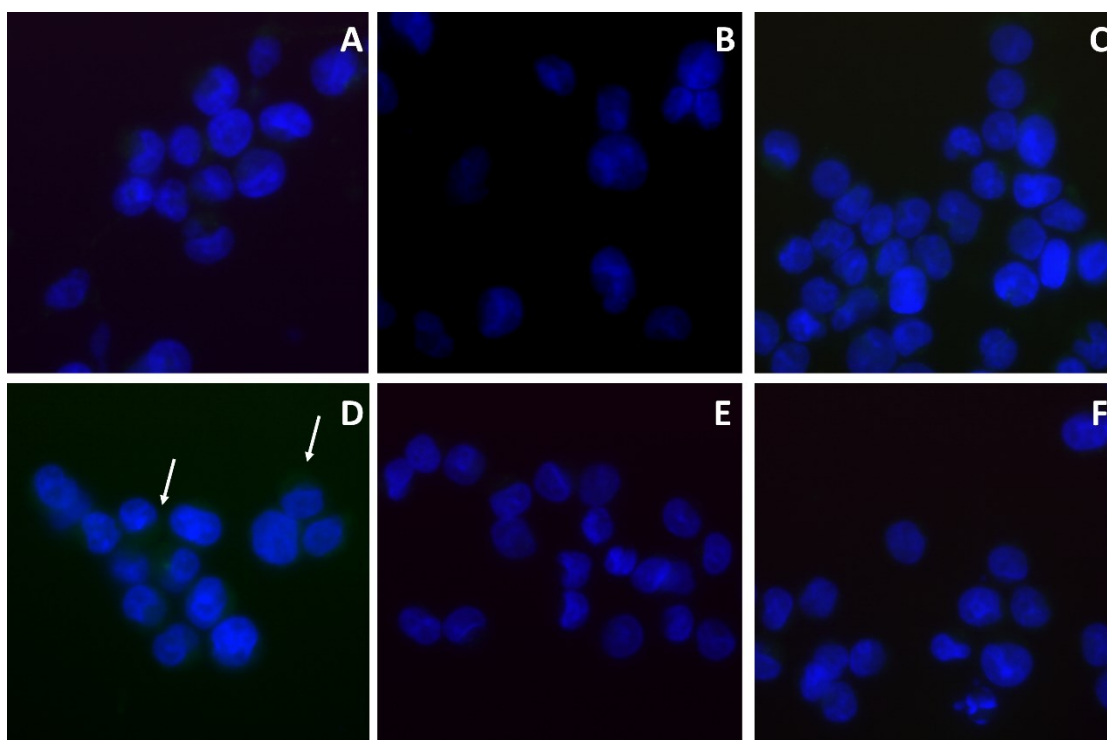


**Obrázek 13** Imunochemické barvení RhoA v buňkách A2780 (A), po ovlivnění EGF (B) a Y27632 (C) a v buňkách A2780cis (D), po ovlivnění EGF (E) a Y27632 (D), zvětšení 600x





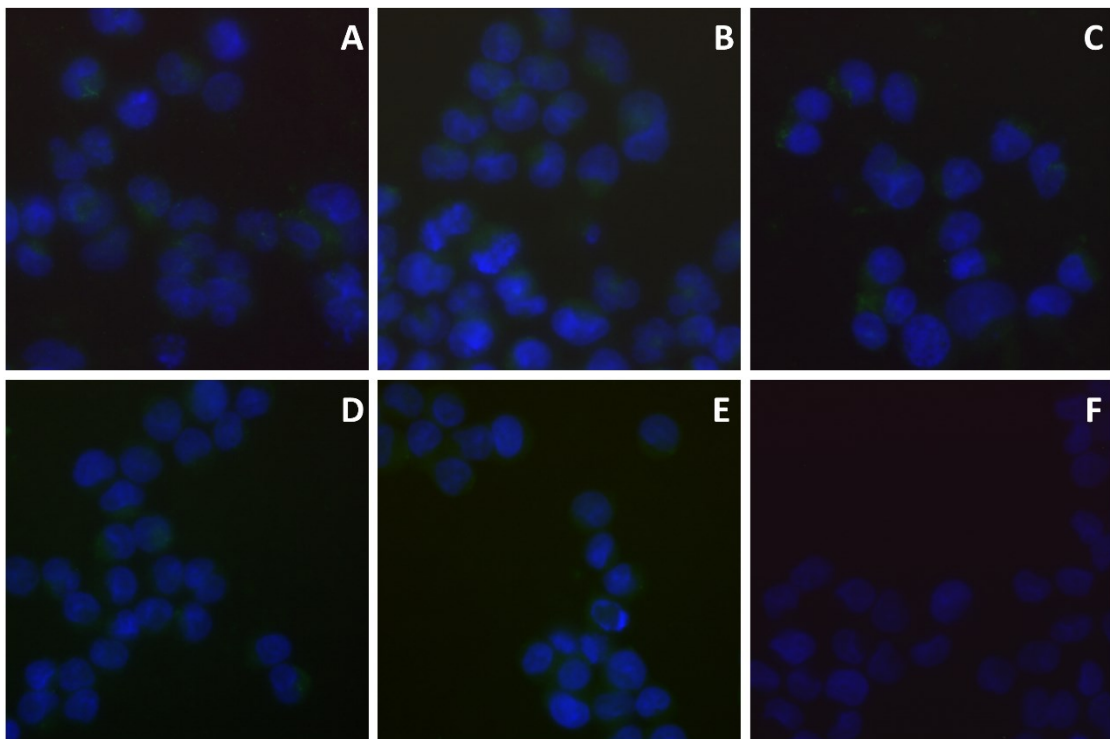
**Obrázek 14** Aktivita Rho kináz



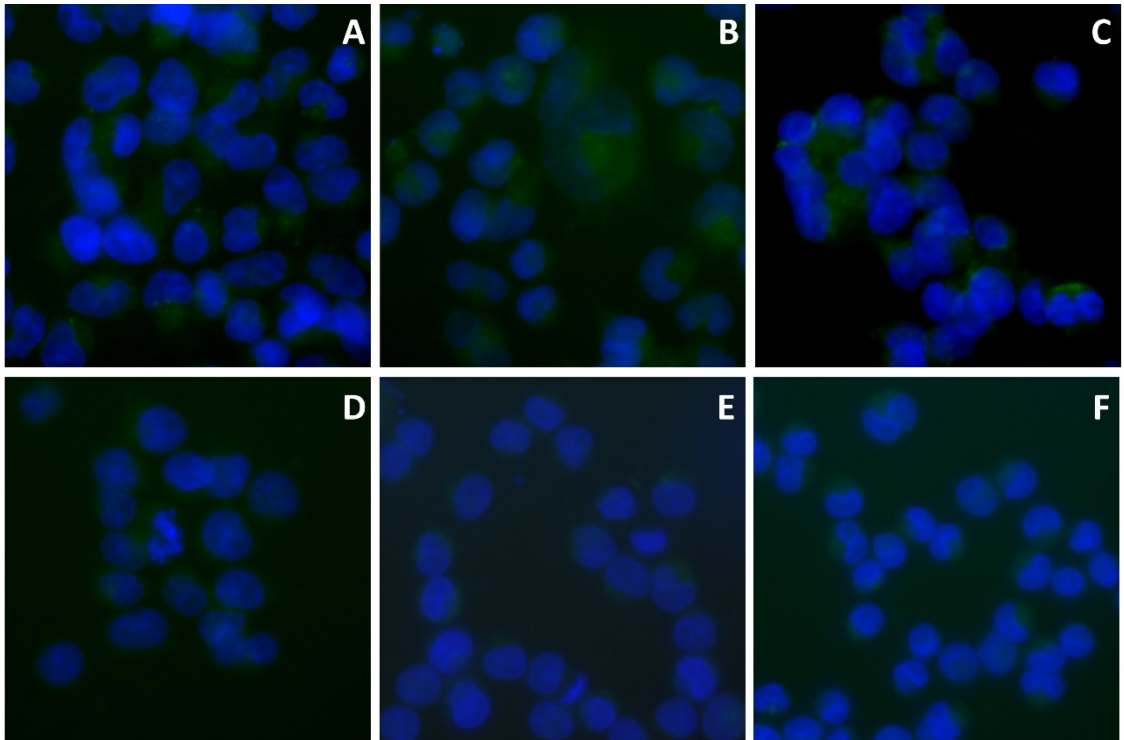
**Obrázek 15** Imunochemické barvení fosforylovaného myozinu v buňkách A2780 (A), po ovlivnění EGF (B) a Y27632 (C) a v buňkách A2780cis (D), ovlivněných EGF (E) a Y27632 (F), zvětšení 600x

### 5.3 Markery mezenchymálního pohybu

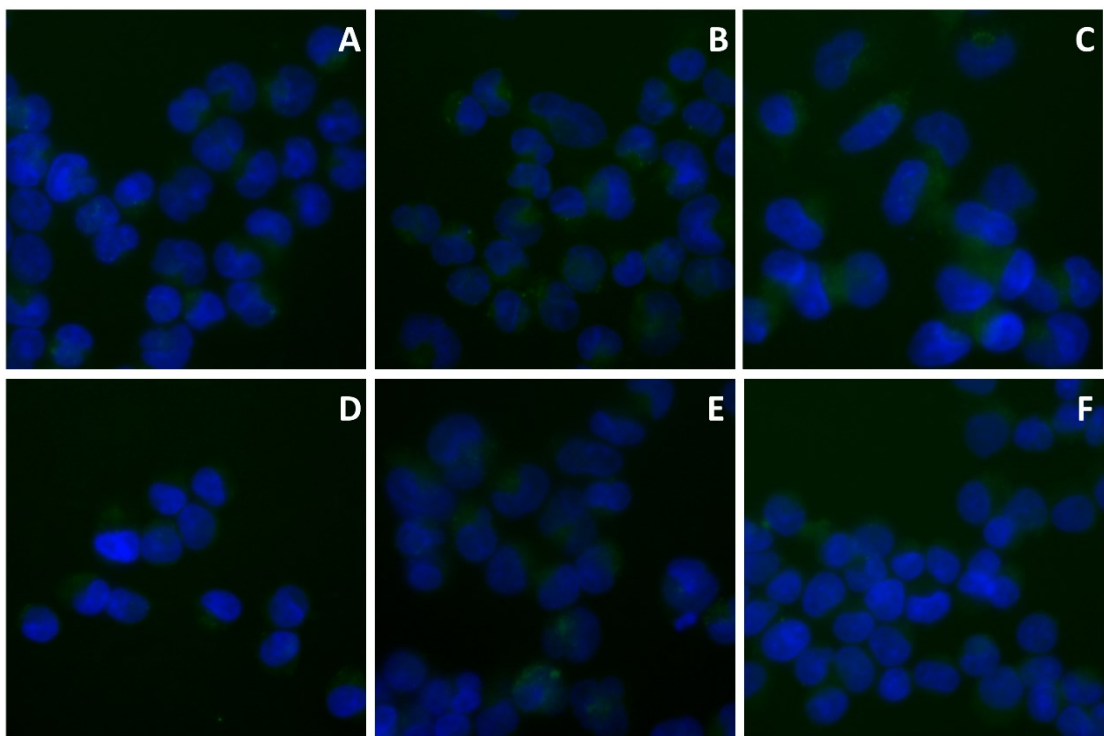
Mezenchymální pohyb buněk je zprostředkováván kinázami Rac1 a Cdc42. Efektory Rac1 jsou potom Wave-2 a PAK1/2/3 a jejich fosforylovaná forma (P-PAK). Díky nim dochází k polymeraci aktinu v lamelipódiích. Kontrolní skupiny obou linií nevykazují rozdíly v expresi Wave-2 (Obrázek 16 A, D). EGF v obou liniích zvyšuje expresi tohoto proteinu (Obrázek 16 B, E). Naproti tomu Y27632 sice nemá vliv na expresi Wave-2 v linii A2780 (Obrázek 16 C), ale v linii A2780cis (Obrázek 16 F) expresi snižuje. Expresce PAK 1/2/3 (Obrázek 17 A, D) ani fosforylovaných forem (Obrázek 18 A, D) se v obou kontrolních skupinách neliší. Linie A2780 však vykazuje nárůst exprese po ovlivnění jak EGF (Obrázek 17 B), tak Y27632 (Obrázek 17 C). Naopak v linii A2780cis nepozorujeme žádné změny v expresi (Obrázek 17 E, F). Ke zvýšené expresi fosforylované formy PAK1/2 vlivem EGF a Y27632 dochází v obou liniích (Obrázek 18 B, C, E, F).



**Obrázek 16** Imunochemické barvení Wave-2 v buňkách A2780 (A), po ovlivnění EGF (B) a Y27632 (C) a v buňkách A2780cis (D), po ovlivnění EGF (E) a Y27632 (F), zvětšení 600x



**Obrázek 17** Imunochemické barvení PAK1/2/3 v buňkách A2780 (A), po ovlivnění EGF (B) a Y27632 (C) a v buňkách A2780cis (D), po ovlivnění EGF (E) a Y27632 (F), zvětšení 600x



**Obrázek 18** Imunochemické barvení P-PAK1/2 v buňkách A2780 (A), po ovlivnění EGF (B) a Y27632 (C) a v buňkách A2780cis (D), po ovlivnění EGF (E) a Y27632 (F), zvětšení 600x

## 6. Diskuze

Metastázování je celosvětově hlavní příčinou úmrtí souvisejících s rakovinou. Epiteliální buňky jsou schopné metastázovat pouze za předpokladu, že dokážou projít alespoň částečnou epitel-mezenchymální tranzicí (EMT). Jedná se o proces, kdy dochází ke ztrátě adheze buňka-buňka a buňka-ECM, což vede k migraci nádorových buněk a metastázování (Ashrafizadeh et al., 2020). Částečná EMT umožňuje buňkám kolektivní migraci buněk ve formě shluků. Projdou-li buňky úplnou EMT, netvoří již shluky, ale pohybují se jednotlivě, a to pomocí mezenchymální nebo améboidní migrace. Nádorové buňky mohou mezi kolektivní a samostatnou migrací přepínat v závislosti na podnětech prostředí, ve kterém se zrovna nacházejí (Saxena et al., 2020). V této diplomové práci jsme se zaměřili na exprese markerů améboidního a mezenchymálního pohybu v buněčných liniích ovariálních karcinomů, a to jak v linii na CP senzitivní, tak v linii na CP rezistentní. Recidiva onemocnění se vznikem nádorových buněk rezistentních na platinové sloučeniny je další překážkou léčby ovariálních karcinomů. K mechanismům rezistence také významně přispívá EMT, která může být CP přímo indukována prostřednictvím chemokinů produkovaných tumor asociovanými makrofágy (Ashrafizadeh et al., 2020; Liu et al., 2020). Buňky byly kultivovány ve 3D prostředí kolagenního gelu, protože právě kolagen je hlavním proteinem nádorového mikroprostředí.

V morfologii jednotlivých linií jsou patrné rozdíly. V senzitivní buněčné linii A2780 jsme pozorovali buňky protáhlého tvaru se zřetelnými výběžky, kdežto v rezistentní linii A2780cis byly viditelné zaoblené buňky s bleby. Morfologie buněk naznačuje, že buňky linie A2780cis mohou vykazovat převážně améboidní typ pohybu. U buněk linie A2780 bylo evidentní, že se mohou pohybovat pomocí migrace mezenchymální. V řadě studií bylo popsáno, že nádorové buňky mohou přepínat mezi jednotlivými typy pohybu v závislosti na signálech mikroprostředí (Paňková et al., 2010). Přičemž aktivace signální dráhy jednoho typu pohybu inhibuje signální dráhu pohybu druhého. Zjišťovali jsme, zda jsou buňky ochotné změnit svůj tvar a využívaný způsob pohybu pomocí selektivního inhibitoru ROCK Y27632 a epidermálního růstového faktoru (EGF), který stimuluje tvorbu lamelipodií (Itoh et al., 2008; Yilmaz et al., 2009). Jak Y27632, tak EGF by tedy měly stimulovat mezenchymální typ migrace. Což je v souladu se zvýšením počtu podlouhlých buněk s výběžky, které byly po ošetření Y27632 i EGF patrné v obou liniích.

Pohyb buněk je zprostředkován rodinou Rho GTPáz. Pro améboidní pohyb je charakteristická aktivace signální dráhy Rho/ROCK, čímž dochází k fosforylaci myozinu. Fosforylaci myozinu se zvyšuje jeho asociace s F-aktinem a kontraktilita buňky tak roste.

Mezenchymální typ migrace je zprostředkován dalšími členy Rho GTPáz - kinázami Rac1 a Cdc42, které regulují tvorbu lamelipodií prostřednictvím Wave-2 a PAK (Bravo-Cordero et al., 2012).

U buněk A2780cis jsme oproti buňkám A2780 pozorovali zvýšenou expresi RhoA i P-myo. Také aktivita RhoA kinázy byla v linii A2780cis vyšší. Což odpovídá počáteční teorii odvozené z morfologie buněk. Tedy, že A2780cis využívají především améboidní pohyb, který je spojován s vyšší invazivitou nádoru (de Toledo et al., 2012). Kdežto buňky A2780 využívají způsob migrace převážně mezenchymální. Při porovnání celkové aktivity Rho kináz jsme zjistili, že linie A2780cis obsahuje větší množství aktivních forem než linie A2780. Jelikož jsme nezjistili markantní rozdíly mezi expresí fosforylovaného PAK v kontrolních skupinách, domníváme se, že k nárůstu aktivních forem Rho kináz dochází vlivem zvýšení hladiny aktivní RhoA. V buňkách cervikálního karcinomu rezistentních na CP byla prokázána zvýšená exprese proteinů Rac a Wave-2 v porovnání s buňkami senzitivními (Wang et al., 2018), což se v případě našich experimentů s buňkami ovariálních karcinomů nepotvrdilo.

EGF podporuje přesmyk z améboidního pohybu na mezenchymální prostřednictvím aktivace Rac a Cdc42 (Kurokawa et al., 2004; Kim et al., 2009). S tímto zjištěním korespondují i naše výsledky, kdy po ovlivnění EGF u obou linií došlo ke snížení exprese RhoA a tím pádem i fosforylovaného myozinu. Zapojení EGF do aktivace Rac1 a Cdc42 (Itoh et al., 2008) bylo potvrzeno zvýšením fosforylace PAK v obou buněčných liniích. Pozorovali jsme nejen nárůst fosforylace PAK vlivem EGF, ale i zvýšení exprese Wave-2. Protein Wave-2 snižuje fosforylaci myozinu (Sanz-Moreno et al., 2008) a jeho exprese byla zvýšená v buňkách rezistentních na cisplatinu (Wang et al., 2018). Naše experimenty však vyšší expresi v CP rezistentních buňkách nepotvrdily. Dále z našich výsledků vyplývá, že EGF indukuje expresi PAK 1/2/3 v buňkách A2780, kdežto na linii A2780cis nemá vliv. I přesto jsou hladiny fosforylovaného PAK v obou liniích srovnatelné. Zvýšená exprese PAK1 byla objevena nejen v buňkách ovariálních karcinomů ale také u buněk kolorektálního karcinomu a v buňkách glioblastomu. Délka přežití pacientů s diagnostikovaným glioblastomem koreluje s přítomností aktivní fosforylované formy P-PAK1 v cytoplazmě (Whale et al., 2011).

ROCK inhibitor Y27632 prokazatelně oslabuje nejen pohyblivost a metastázování, ale i proliferaci buněk karcinomu prostaty buněk linie PC3 a zlepšuje citlivost buněk ovariálního karcinomu a karcinomu plic na CP (de Sousa et al., 2020). Inhibice ROCK má za následek pokles fosforylace myozinu (Wu et al., 2014; Sanz-Moreno et al., 2008). Také naše experimenty prokázaly, že v buňkách A2780cis nedochází po

ovlivnění ke snížení exprese RhoA, ale pouze k poklesu fosforylace myozinu. Pokles fosforylace myozinu doprovázela zvýšená fosforylace PAK. Z čehož usuzujeme, že v linii A2780cis dochází k aktivaci signálních drah mezenchymálního pohybu na úkor améboidního. Tato teorie je podpořena sníženou aktivitou RhoA kinázy. V buněčné linii A2780 převažuje mezenchymální typ pohybu, který je inhibítoem Y27632 ještě více stimulován, jak dokazuje zvýšené hladiny fosforylovaného PAK i pokles aktivity RhoA.

Rho GTPázy představují potenciální cíle protinádorové léčby. Jak však naznačuje naše práce, je třeba zohlednit vztahy mezi jednotlivými členy této rodiny. Schopnost nádorových buněk přepínat mezi améboidním a mezenchymálním typem migrace zvyšuje šanci nádorových buněk na přežití v nepříznivém prostředí. K účinné eliminaci nádorových buněk bude tedy pravděpodobně zapotřebí využít kombinaci inhibitorů signálních molekul obou typů migrace.

## 7. Závěr

V této diplomové práci jsme se snažili zjistit, jaký typ pohybu využívají buňky ovariálních karcinomů linie A2780 a A2780cis při migraci a zda jsou ochotné měnit svůj tvar a způsob pohybu.

Zjistili jsme, že buňky linie A2780, původně vykazující mezenchymální typ pohybu, byly po ovlivnění inhibitorem Y27632 ještě více podpořeny k využívání tohoto typu migrace, jelikož vykazovaly zvýšené hladiny fosforylovaného PAK a klesala u nich aktivita RhoA. EGF v této linii opět stimulovalo zvýšení hladiny exprese fosforylovaného PAK a došlo k patrnému zvýšení počtu podlouhlých buněk.

Buněčná linie A2780cis, původně využívající převážně améboidní pohyb, vykazovala po ovlivnění inhibitorem Y27632 snížené hladiny P-myo doprovázených zvýšenou fosforylací PAK. Z toho vyplývá, že docházelo k převážením mezenchymálního pohybu na úkor améboidního. Potvrzuje to i snížená aktivita RhoA.

Důkladné prostudování mechanismů buněčného pohybu představuje potenciální strategii pro cílení antimetastatické léčby. Prokázali jsme, že buňky ovariálních karcinomů mohou za určitých okolností měnit typ pohybu a tím i svoji invazivitu. K vytvoření účinné léčby je tedy třeba cílit na signální dráhy obou typů pohybů.

## 8. Seznam zkratek

	VÝZNAM
AMK	Aminokyselina
AMT	Améboidně-mezenchymální tranzice
BCA	Bicinchoninová kyselina
BMI	Body mass index
BRCA1/2	Breast cancer gene 1/2
CAF	Nádorově asociovaný fibroblast
CP	Cisplatina
ECM	Extracelulární matrix
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EOC	Epiteliální ovariální karcinom
EMT	Epitelo-mezenchymální tranzice
FBS	Fetální bovinní sérum
FGF	Fibroblastový růstový faktor
GSH	Glutathion
HAK	Hormonální antikoncepce
HGF	Růstový faktor hepatocytů
HRT	Hormonální substituční terapie
HSA	Lidský sérový albumin
MAPK	Mitogeny aktivovaná proteinkináza
MAT	Mezenchymálně-améboidní tranzice
MLC	Lehký řetězec myozinu
MLCK	Kináza lehkého řetězce myozinu
MMP	Matrixové metaloproteázy



MMR	Mismatch repair gen
NER	System opravy DNA vystřizžením nukleotidu
PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PCOS	Syndrom polycystických ovarií
P-MYO	Fosforylovaný myozin
RBD	Rho-vazebná doména
SDS	Dodecylsírán sodný
TCF1	Faktor T-lymfocytů
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor $\beta$

## 9. Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b>	Rozložení na mikrotitrační desce při stanovení koncentrace bílkoviny..	32
<b>Tabulka 2</b>	Ředění standardů.....	32
<b>Tabulka 3</b>	Příprava akrylamidového gelu.....	34
<b>Tabulka 4</b>	Příprava Laemmli elektroforetického pufru.....	34
<b>Tabulka 5</b>	Příprava transferového pufru.....	35
<b>Tabulka 6</b>	Příprava TBS pufru.....	35
<b>Tabulka 7</b>	Použité protilátky.....	36
<b>Tabulka 8</b>	Rozložení pipetovaných buněk A2780, A2780cis, EGF a Y27632.....	37
<b>Tabulka 9</b>	Kombinace a ředění protilátek.....	38

## 10. Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b>	Incidence a mortalita ovariálních malignit v ČR.....	11
<b>Obrázek 2</b>	Relativní přežití dle stádia při stanovení diagnózy.....	11
<b>Obrázek 3</b>	Proměna ECM během vzniku nádoru ve tkáni ovaria.....	18
<b>Obrázek 4</b>	Metastatická kaskáda.....	19
<b>Obrázek 5</b>	Hlavní signální dráhy ovlivňující EMT při nádorové progresi.....	21
<b>Obrázek 6</b>	Progrese normálního epitelu k invazivnímu karcinomu.....	22
<b>Obrázek 7</b>	Tvar mezenchymálních a améboidních buněk.....	23
<b>Obrázek 8</b>	Lokalizace proteinů ovlivňujících polaritu buňky.....	24
<b>Obrázek 9</b>	Přechody mezi jednotlivými fenotypy a signální dráhy je ovlivňující.....	25
<b>Obrázek 10</b>	Mechanismus protinádorového účinku cisplatiny s vyznačenými principy rezistence s vlivem na apoptózu.....	29
<b>Obrázek 11</b>	Princip izolace aktivních Rho kináz.....	31
<b>Obrázek 12</b>	Morfologie buněk A2780 a A2780 cis po ovlivnění EGF a Y27632.....	39
<b>Obrázek 13</b>	Imunochemické barvení RhoA v buňkách A2780 a A2780cis po ovlivnění EGF a Y27632.....	40
<b>Obrázek 14</b>	Aktivita Rho kináz.....	41
<b>Obrázek 15</b>	Imunochemické barvení fosforylovaného myozinu v buňkách A2780 a A2780cis po ovlivnění EGF a Y27632.....	41
<b>Obrázek 16</b>	Imunochemické barvení Wave-2 v buňkách A2780 a A2780cis po ovlivnění EGF a Y27632.....	42
<b>Obrázek 17</b>	Imunochemické barvení PAK1/2/3 v buňkách A2780 a A2780cis po ovlivnění EGF a Y27632.....	43
<b>Obrázek 18</b>	Imunochemické barvení P-PAK1/2 v buňkách A2780 a A2780cis po ovlivnění EGF a Y27632.....	43

## 11. Seznam literatury

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition [online]. New York: Garland Science; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
2. Amawi H, Sim HM, Tiwari AK, Ambudkar SV, Shukla S. ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1141:549-580. doi:10.1007/978-981-13-7647-4\_12
3. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020;30(16):R921-R925. doi:10.1016/j.cub.2020.06.081
4. Andrews L, Mutch DG. Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;41:31-48. doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.10.017
5. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, et al. Association of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) with Cisplatin Resistance. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4002. Published 2020 Jun 3. doi:10.3390/ijms21114002
6. Bal W, Sokołowska M, Kurowska E, Faller P. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5444-5455. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.018
7. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*. 2021;155 Suppl 1(Suppl 1):61-85. doi:10.1002/ijgo.13878
8. Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(2):277-283. doi:10.1016/j.ceb.2011.12.004
9. Brzozowska M, Lewiński A. Changes of androgens levels in menopausal women. *Prz Menopauzalny*. 2020;19(4):151-154. doi:10.5114/pm.2020.101941
10. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):89-102. doi:10.1038/nrc.2017.109
11. Da Silva AC, Jammal MP, Crispim PCA, Murta EFC, Nomelini RS. The Role of Stroma in Ovarian Cancer. *Immunol Invest*. 2020;49(4):406-424. doi:10.1080/08820139.2019.1658770
12. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025

13. Davidson B, Tropé CG, Reich R. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Front Oncol.* 2012;2:33. Published 2012 Apr 10. doi:10.3389/fonc.2012.00033
14. de Sousa GR, Vieira GM, das Chagas PF, Pezuk JA, Brassesco MS. Should we keep rocking? Portraits from targeting Rho kinases in cancer. *Pharmacol Res.* 2020;160:105093. doi:10.1016/j.phrs.2020.105093
15. de Toledo M, Anguille C, Roger L, Roux P, Gadea G. Cooperative anti-invasive effect of Cdc42/Rac1 activation and ROCK inhibition in SW620 colorectal cancer cells with elevated blebbing activity. *PLoS One.* 2012;7(11):e48344. doi:10.1371/journal.pone.0048344
16. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(1):9-22. doi:10.1038/nrc2748
17. ESPÓSITO BP, NAJJAR R. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. *Coordination Chemistry Reviews.* 2002; 232(1-2), 137-149. doi:10.1016/S0010-8545(02)00049-8
18. Ferraro G, Massai L, Messori L, Merlino A. Cisplatin binding to human serum albumin: a structural study. *Chem Commun (Camb).* 2015;51(46):9436-9439. doi:10.1039/c5cc01751c
19. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351-1371. Published 2011 Mar 15. doi:10.3390/cancers3011351
20. Franco-Chuaire ML, Magda Carolina SC, Chuaire-Noack L. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): principles and clinical impact in cancer therapy. *Invest Clin.* 2013;54(2):186-205.
21. Freuer D, Linseisen J, O'Mara TA, et al. Body Fat Distribution and Risk of Breast, Endometrial, and Ovarian Cancer: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. *Cancers (Basel).* 2021;13(20):5053. Published 2021 Oct 9. doi:10.3390/cancers13205053
22. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 2010;188(1):11-19. doi:10.1083/jcb.200909003
23. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012;31(15):1869-1883. doi:10.1038/onc.2011.384

24. Gandalovičová A, Vomastek T, Rosel D, Brábek J. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget*. 2016;7(18):25022-25049. doi:10.18632/oncotarget.7214
25. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*. 2019;88:102925. doi:10.1016/j.bioorg.2019.102925
26. Goff BA, Mandel LS, Melancon CH, Muntz HG. Frequency of symptoms of Ovarian Cancer in Women Presenting to Primary Care Clinics. *JAMA*. 2004;291(22):2705-2712. doi:10.1001/jama.291.22.2705
27. Gong TT, Wu QJ, Vogtmann E, Lin B, Wang YL. Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2013;132(12):2894-2900. doi:10.1002/ijc.27952
28. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014;7(344):re8. Published 2014 Sep 23. doi:10.1126/scisignal.2005189
29. Graziani V, Rodriguez-Hernandez I, Maiques O, Sanz-Moreno V. The amoeboid state as part of the epithelial-to-mesenchymal transition programme. *Trends Cell Biol*. 2022;32(3):228-242. doi:10.1016/j.tcb.2021.10.004
30. Hale MD, Hayden JD, Grabsch HI. Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cell Oncol (Dordr)*. 2013;36(2):95-112. doi:10.1007/s13402-013-0127-7
31. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100.1 (2000): 57-70. doi:[10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
33. Holle AW, Govindan Kutty Devi N, Clar K, et al. Cancer Cells Invade Confined Microchannels via a Self-Directed Mesenchymal-to-Amoeboid Transition. *Nano Lett*. 2019;19(4):2280-2290. doi:10.1021/acs.nanolett.8b04720
34. Cho A, Howell VM, Colvin EK. The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer - A Piece of a Puzzle. *Front Oncol*. 2015;5:245. Published 2015 Nov 2. doi:10.3389/fonc.2015.00245
35. Itoh RE, Kiyokawa E, Aoki K, Nishioka T, Akiyama T, Matsuda M. Phosphorylation and activation of the Rac1 and Cdc42 GEF Asef in A431 cells

- stimulated by EGF. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 16):2635-2642. doi:10.1242/jcs.028647
36. Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM. Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review. *Gynecol Oncol.* 2006;103(3):1122-1129. doi:10.1016/j.ygyno.2006.08.012
37. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [published correction appears in *J Clin Invest.* 2010 May 3;120(5):1786]. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
38. KARLÍKOVÁ M et al. Biomarkery u karcinomu prsu, ovarií a prostaty. Brno: *Tribun EU*, 2012. ISBN 978-80-263-0318-3.
39. Kim TJ, Xu J, Dong R, Lu S, Nuzzo R, Wang Y. Visualizing the effect of microenvironment on the spatiotemporal RhoA and Src activities in living cells by FRET. *Small.* 2009;5(12):1453-1459. doi:10.1002/smll.200801846
40. Kossai M, Leary A, Scoazec JY, Genestie C. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):41-49. doi:10.1159/000479006
41. Kozlova N, Grossman JE, Iwanicki MP, Muranen T. The Interplay of the Extracellular Matrix and Stromal Cells as a Drug Target in Stroma-Rich Cancers. *Trends Pharmacol Sci.* 2020;41(3):183-198. doi:10.1016/j.tips.2020.01.001
42. Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YO, Matsuda M. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1003-1010. doi:10.1091/mbc.e03-08-0609
43. Lacina L, Plzak J, Kodet O, et al. Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24094-24110. Published 2015 Oct 12. doi:10.3390/ijms161024094
44. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758
45. Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* 2009;139(5):891-906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027
46. Li YQ, Yin JY, Liu ZQ, Li XP. Copper efflux transporters ATP7A and ATP7B: Novel biomarkers for platinum drug resistance and targets for therapy. *IUBMB Life.* 2018;70(3):183-191. doi:10.1002/iub.1722

47. Liu W, Wang W, Wang X, Xu C, Zhang N, Di W. Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the CCL20-CCR6 axis. *Cancer Lett.* 2020;472:59-69. doi:10.1016/j.canlet.2019.12.024
48. Liu Y, Ma L, Yang X, et al. Menopausal Hormone Replacement Therapy and the Risk of Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:801. Published 2019 Dec 3. doi:10.3389/fendo.2019.00801
49. Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells.* 2019;8(10):1118. Published 2019 Sep 20. doi:10.3390/cells8101118
50. Müllerová Z, Müller T, Křivánková K, et al. Molekulární podstata kancerogeneze epiteliálních ovariálních karcinomů. *Klinická onkologie*, 2016; 29 (Suppl 4): 46-53, doi:10.14735/amko20164S46
51. Náležinská M, Zdražilová Dubská L, Valík D, et al. Úskalí laboratorních metod v ovariálním skríninku – doba „-omická“?. *Onkologie*, 2020; 14(2):88-92
52. Novák Š, Bandurová V, Mifková A, et al. Nádorové mikroprostředí. *Otorinolaryngol Foniatrie*, 68, 2019, (1):41-51
53. Krejčí D, et al. Novotvary 2018 ČR: Cancer incidence 2018 in the Czech Republic [online]. Praha: Národní onkologický registr ČR, 2021. Zdravotnická statistika. [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>
54. Olsen CM, Nagle CM, Whiteman DC, et al. Obesity and risk of ovarian cancer subtypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(2):251-262. Published 2013 Mar 22. doi:10.1530/ERC-12-0395
55. Ose J, Poole EM, Schock H, et al. Androgens Are Differentially Associated with Ovarian Cancer Subtypes in the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *Cancer Res.* 2017;77(14):3951-3960. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3322
56. Paňková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(1):63-71. doi:10.1007/s00018-009-0132-1
57. Perrin L, Gligorijevic B. Proteolytic and mechanical remodeling of the extracellular matrix by invadopodia in cancer. *Phys Biol.* 2022;20(1):10.1088/1478-3975/aca0d8. Published 2022 Nov 21. doi:10.1088/1478-3975/aca0d8



58. Petrie RJ, Yamada KM. Multiple mechanisms of 3D migration: the origins of plasticity. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;42:7-12. doi:10.1016/j.ceb.2016.03.025
59. Princip afinitní precipitace aktivovaného G proteinu. Cell Signalling Technology, Inc. Active Rho Detection Kit, str.1 [online]. [cit. 2022-12-10]. Dostupné z: <https://media.cellsignal.com/pdf/8820.pdf>
60. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017;14(1):9-32. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084
61. Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician.* 2009;80(6):609-616.
62. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 2008;135(3):510-523. doi:10.1016/j.cell.2008.09.043
63. Saxena K, Jolly MK, Balamurugan K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis. *Transl Oncol.* 2020;13(11):100845. doi:10.1016/j.tranon.2020.100845
64. Seifertová M, Řezáčová M. Molekulární mechanismy účinku cisplatinu. *Zdraví.euro.cz* [online]. 2010 [cit. 2022-01-14]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/molekularni-mechanismy-ucinku-cisplatinu-455575>
65. Schouten LJ, Rivera C, Hunter DJ, et al. Height, body mass index, and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(4):902-912. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2524
66. Skirnisdottir I, Åkerud H, Seidal T. Clinical significance of growth factor receptor EGFR and angiogenesis regulator VEGF-R2 in patients with ovarian cancer at FIGO stages I-II. *Int J Oncol.* 2018;53(4):1633-1642. doi:10.3892/ijo.2018.4511
67. Song M, Cui M, Liu K. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer. *Eur J Med Chem.* 2022;232:114205. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114205
68. Štellmachová, J. et al. Nádory ovaria a genetická predispozice. *Česká gynekologie*, 2022; 87(3): 211-216. ISSN: 12107832.
69. Švihovec J, Bultas J, Anzenbacher P, et al. *Farmakologie*. 1.vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. 1008 str. ISBN 978-80-247-5558-8
70. Trabert B, Michels KA, Anderson GL, et al. Circulating androgens and postmenopausal ovarian cancer risk in the Women's Health Initiative

- Observational Study. *Int J Cancer*. 2019;145(8):2051-2060. doi:10.1002/ijc.32157
71. Wang J, Feng Y, Chen X, et al. SH3BP1-induced Rac-Wave2 pathway activation regulates cervical cancer cell migration, invasion, and chemoresistance to cisplatin. *J Cell Biochem*. 2018;119(2):1733-1745. doi:10.1002/jcb.26334
72. Whale A, Hashim FN, Fram S, Jones GE, Wells CM. Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16(3):849-864. Published 2011 Jan 1. doi:10.2741/3724
73. Wu YJ, Tang Y, Li ZF, et al. Expression and significance of Rac1, Pak1 and Rock1 in gastric carcinoma. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2014;10(2):e33-e39. doi:10.1111/ajco.12052
74. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):15-33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0
75. Yoshida GJ. Regulation of heterogeneous cancer-associated fibroblasts: the molecular pathology of activated signaling pathways. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):112. Published 2020 Jun 16. doi:10.1186/s13046-020-01611-0
76. Závěský L. Karcinom ovaria – na cestě k lepší diagnostice a léčbě. *Interní medicína pro praxi*, 2011; 13(12): 490-492