

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Studium vlivu flubendazolu na buňky glioblastoma multiforme *in vitro* a *in vivo*

Barbora Vítovcová

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Lékařská biologie

Hradec Králové
2023

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

Autor: PharmDr. Barbora Vítovcová
Ústav lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové

Školitel: prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.
Ústav lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové

Školitel konzultant: RNDr. Veronika Skarková, Ph.D.
Ústav lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové

Oponenti: prof. MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.
Biologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity

doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D.
Ústav experimentální medicíny Akademie věd České republiky

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská biologie dne.....
v..... od..... do..... hod.
(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

Tato práce vznikla za podpory grantů SVV 260 543; PROGRES Q40/01; Cooperatio, vědní obor DIAG; MZ NU20-03-00360.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská biologie
Garant studijního programu

Obsah

Souhrn	5
Summary	5
1. Úvod do problematiky.....	6
1.1. Gliomy	7
1.1.1. Vznik a vývoj nádoru	7
1.1.2. Nádory vznikající z gliových buněk.....	7
1.2. Glioblastoma multiforme.....	8
1.2.1. Molekulární subtypy GBM	8
1.2.2. Molekulární a genetické změny vedoucí ke vzniku GBM.....	9
1.2.3. Diagnostika GBM	9
1.2.4. Terapie GBM.....	9
1.3. Mikrotubuly v GBM.....	10
1.3.1. Mikrotubuly – struktura a funkce.....	10
1.3.2. Mikrotubuly v GBM.....	10
1.3.3. Látky ovlivňující mikrotubuly	11
1.4. Benzimidazoly	11
2. Cíle	12
3. Metodika.....	13
3.1. Buněčné linie a jejich kultivace	13
3.2. Primární kultury.....	13
3.3. Modelový organismus pro <i>in vivo</i> experiment	13
3.4. Měření viability metodou WST-1.....	13
3.5. Měření proliferace buněk systémem xCELLigence	13
3.6. Transfekce buněk pomocí siRNA.....	13
3.7. Fázově kontrastní mikroskopie	14
3.8. Immunofluorescence buněk.....	14
3.9. Obrazová analýza	14
3.10. Analýza RT-PCR	14
3.11. Analýza Western blot.....	14
3.12. Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie.....	15
3.13. Luminiscenční stanovení aktivity kaspáz	15
3.14. Imunohistochemická analýza.....	15
3.15. In vivo experiment	15
3.16. Statistická analýza.....	16
4. Výsledky.....	17
4.1. Výsledky <i>in vitro</i> experimentu	17

4.1.1.	Vliv FLU a TMZ na viabilitu a proliferaci buněk A172, T98G, U118MG	17
4.1.2.	Vliv FLU a TMZ na morfologii buněk A172 a T98G	18
4.1.3.	Vliv FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk A172 a T98G	18
4.1.4.	Vliv FLU na cytoskelet buněk A172 a T98G	20
4.1.5.	Vliv FLU na aktivaci a expresi STAT3 u buněk A172 a T98G.....	21
4.1.6.	Vliv FLU na buněčný cyklus a aktivaci kaspáz u buněk A172 a T98G	21
4.1.7.	Vliv FLU a TMZ na viabilitu a proliferaci GBM primárních kultur	23
4.1.8.	Vliv FLU na morfologii buněk GBM49, GBM50 a GBM72	24
4.1.9.	Vliv FLU na expresi tubulinů u GBM primárních kultur	24
4.1.10.	Vliv FLU na expresi STAT3 u GBM primárních kultur	25
4.1.11.	Analýza exprese STAT3 v klinických vzorcích GBM.....	26
4.1.12.	Vliv FLU na buňky U118MG	26
4.2.	Výsledky <i>in vivo</i> experimentu	27
4.2.1.	Vliv FLU a TMZ na růst nádorů a proliferační index Ki67 v nu-nu myších.....	27
4.2.2.	Vliv FLU a TMZ na expresi tubulinů u nádorů získaných z nu-nu myší	27
4.2.3.	Vliv FLU a TMZ na expresi STAT3 u nádorů získaných z nu-nu myší.....	27
5.	Diskuse	29
6.	Závěr.....	34
7.	Seznam použité literatury	35
8.	Přehled publikační činnosti	38

Souhrn

Studium vlivu flubendazolu na buňky glioblastoma multiforme *in vitro* a *in vivo*

Glioblastoma multiforme (GBM) je nejčastější a nejagresivnější primární nádor mozku u dospělých. Současná terapeutická strategie tohoto onemocnění je nedostatečná a prognóza pacientů je nepříznivá, proto existuje intenzivní snaha o vylepšení terapeutických možností GBM. Výzkumy se zaměřují především na identifikaci nových potenciálních cílů terapie nebo na optimalizaci již existujících léčebných strategií u GBM. Hojně diskutovaným přístupem k terapii GBM je zacílení na mikrotubuly, které patří mezi základní přístupy k léčbě nádorového bujení. Pro tento účel by bylo možné využít již v běžné praxi využívaná chemoterapeutika nebo také léčiva původně určená pro jinou indikaci, jako je např. flubendazol (FLU), původně humánní i veterinární anthelmintikum. FLU již v předchozích studiích demonstroval inhibiční účinek na buňky rozličných solidních tumorů i hematologických malignit specifickou interakcí s mikrotubuly. Cílem této práce bylo otestovat inhibiční účinek FLU na různých *in vitro* a *in vivo* GBM modelových systémech.

Studium účinku FLU bylo prováděno *in vitro* za využití stabilizovaných GBM buněčných linií (A172, T98G a U118MG) a GBM primárních kultur odvozených ze vzorků získaných od pacientů operovaných ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. FLU prokázal inhibiční účinek na viabilitu a proliferaci GBM buněk, a to v několikanásobně nižších koncentracích než běžně využívané chemoterapeutikum temozolomid. FLU zároveň významně ovlivňoval morfologii GBM buněk, poškozoval strukturu a organizaci mikrotubulární sítě i dalších složek buněčného cytoskeletu s následným výrazným smršťováním buněk. FLU také ovlivňoval expresi a aktivaci molekuly STAT3, jeho podání vedlo k zastavení buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze s následnou apoptotickou buněčnou smrtí.

Účinek FLU byl také ověřen *in vivo*, v nádorech vzniklých implantací GBM buněčné linie U118MG do modelového organismu, tzv. atymické myši. V přítomnosti FLU vznikaly až 4x menší nádory s nižší proliferací aktivitou. U takto vzniklých nádorů bylo navíc možné potvrdit inhibiční účinek FLU na expresi molekuly STAT3.

FLU se ukázal jako vhodné potenciální protinádorové léčivo s inhibičním účinkem na GBM buňky. Výsledky této práce akcentují nezbytnost dalšího testování mechanismů účinku tohoto léčiva na GBM, především se zaměřením na interakci FLU s mikrotubulárním cytoskeletem a STAT3 signální dráhou.

Summary

Study of the effect of flubendazole on the glioblastoma multiforme cells *in vitro* and *in vivo*

Glioblastoma multiforme (GBM) belongs to one of the most common and most aggressive primary brain tumours in adults. Current therapeutic strategy is insufficient, and patient's prognosis is unfavourable, therefore prompting an intensive effort to improve therapeutic options of GBM. Present research focuses mainly on the identification of the new possible targets for therapy or on the optimization of already existing treatment strategies in GBM. Highly discussed approach to GBM therapy is microtubule targeting, which is one of the fundamental ways to tumour treatment. For this purpose, chemotherapeutics already in current common practice or drugs originally intended for a different indication, such as flubendazole (FLU), originally human and veterinary anthelmintic, could be used. In previous studies FLU has already demonstrated an inhibitory effect on cells of various solid tumours and haematological malignancies through a specific interaction with microtubules. The aim of this work was to evaluate the inhibitory effect of FLU in different *in vitro* and *in vivo* GBM models.

Study of FLU effect was performed *in vitro* using stabilized GBM cell lines (A172, T98G and U118MG) and GBM primary cultures derived from samples obtained from patients undergoing surgery at the University Hospital Hradec Králové. FLU demonstrated an inhibitory effect on the GBM cell viability and proliferation at significantly lower concentrations than the commonly used chemotherapeutic agent temozolomide. Concurrently FLU significantly affected GBM cell morphology, damaged microtubule structure and organisations, altered other components of GBM cell cytoskeleton leading to significant cell shrinkage. FLU also affected the expression and activation of the STAT3 molecule, its administration led to G2/M cell cycle arrest with subsequent apoptotic cell death.

The effect of FLU was further verified *in vivo*, in tumours generated after implantation of the GBM cell line U118MG into the model organism, the athymic mouse. After FLU administration, up to 4 times smaller tumours with lower proliferative activity were formed. In addition, the inhibitory effect of FLU on the STAT3 molecule expression was confirmed in such tumours.

FLU was demonstrated as a suitable potential antitumor drug with inhibitory effect on GBM cells. Results of this work emphasize the necessity of further research in FLU mechanism of action, focusing mainly on the interaction of FLU with the microtubules and STAT3 signalling pathway.

1. Úvod do problematiky

1.1. Gliomy

1.1.1. Vznik a vývoj nádoru

Nádorové buňky jsou definovány nekontrolovatelnou schopností růst a dělit se a schopností napadat místa v lidském těle určená pro jiné buňky, což je způsobeno rozsáhlými genetickými změnami. Takové buňky dávají vznik neoplasmatickému růstu [1-3]

Genetické mutace dávající vznik nádorovému bujení se odehrávají především na genech regulujících buněčný růst, dělení buňky a její programovanou smrt. Vznikem takové genetické změny buňky ztrácí schopnost odpovídat na signály ovlivňující právě tyto děje. Jedna mutace však není dostatečná pro nádorovou přeměnu, u většiny nádorových buněk dochází k akumulaci genetických a epigenetických změn. Řada genetických mutací vzniká především na protoonkogenech a tumor supresorových genech, které patří mezi důležité regulátory biologických procesů v normálních buňkách [1, 4, 5].

Na vzniku nádorového bujení se kromě genetických změn podílejí také epigenetické změny (rozsáhlé změny v metylaci DNA a posttranslačních modifikacích histonů) a jejich vzájemnou interakcí je dotvářen nádorový fenotyp buněk. K nekontrolovanému dělení buněk přispívají změny na enzymu telomeráza umožňující zachování stabilní délky telomer. Vznik nádoru může být také spojován s populací kmenových nádorových buněk, které jsou spojeny nejen se vznikem nádoru, ale také s jeho opakovaným výskytem, vznikem metastáz a rozvojem chemorezistence [6-8].

1.1.2. Nádory vznikající z gliových buněk

Gliové buňky spolu-tvořící nervový systém mají řadu nepostradatelných funkcí ve vývoji i běžném fungování nervového systému. Nádory vznikající z gliových buněk se nazývají gliomy a patří mezi nejběžnější primární nádory mozku. Jedná se o velmi širokou a heterogenní skupinu nádorů [9, 10].

Gliomy můžeme podle jejich histopatologických znaků a jejich chování dělit na gliomy nízkého stupně malignity („low-grade gliomas“, LGG) a na gliomy vysokého stupně malignity („high-grade gliomas“, HGG). Světová zdravotnická organizace (WHO) gliomy rozčleňuje do čtyřech stupňů (WHO I.-IV.; Tab.1). LGG s charakteristicky pomalým růstem a schopností difúzní infiltrace reprezentují 10-15 % všech mozkových gliomů. Nejčastějším a nejmalignějším zástupcem HGG je glioblastoma multiforme (GBM), pro který je, stejně jako pro ostatní HGG, typický rychlý invazivní růst nádoru s aktivním proliferací [10-13].

Tab. 1. Klasifikace gliomů podle kritérií WHO z roku 2007

WHO stupeň	Histologická kritéria	Mozkové gliomy
I.	Nízká agresivita, příležitostná jaderná atypie	Pilocytární astrocytom, subependymom
II.	Mírně zvýšená hustota buněk, příležitostná mitóza a jaderná atypie	Difúzní astrocytom, oligodendrogliom, oligoastrocytom
III.	Zvýšená hustota buněk, přítomná mitóza a jaderná atypie	Anaplastický astrocytom, anaplastický oligodendrogliom
IV.	Vysoká hustota buněk, vysoká mitóza a jaderná atypie, přítomná nekróza a endoteliální proliferace	Glioblastom

Gliomy se téměř výhradně vyskytují ve čtyřech mozkových lalocích – čelním, spánkovém, parietálním a okcipitálním. Umístění nádoru může korelovat s různorodostí jednotlivých subtypů, s charakterem růstu nádoru a také klinickými výstupy. Gliomy většinou vznikají

sporadicky, existuje však statisticky významný vztah mezi výskytem gliomů a přítomností několika vzácných genetických syndromů, jako je např. syndrom Li-Fraumeni, enchondochromatózy, nebo familiární polypózní syndrom [12, 14].

1.2. Glioblastoma multiforme

GBM je nejagresivnější a nejvíce invazivní primární nádor mozku patřící mezi gliomy a jedná se o nejčastější primární nádor mozku u dospělých. Přibližně 40 % všech případů primárních nádorů mozku a až 80 % všech vysoko-stupňových primárních tumorů centrálního nervového systému je tvořeno právě GBM [13, 15].

GBM postihuje pacienty všech věkových kategorií, největší výskyt se pohybuje mezi 65. a 75. rokem života, častěji u mužů, vyšší výskyt byl zaznamenán u osob europoidní rasy žijících především v industriálních oblastech. Ačkoli se předpokládá, že GBM je spontánně se vyskytující nádorové onemocnění, existuje několik rizikových faktorů, které jsou spojovány s výskytem GBM, jako např. některá geneticky podmíněná onemocnění (neurofibromatóza typu I, tuberózní skleróza), přítomnost cytomegaloviru, nebo různé fyzikální faktory (ionizující záření, některé chemikálie) [12, 13, 16, 17].

Molekulární biologie vzniku GBM je komplexní, agresivní biologické chování nádoru zahrnuje jeho progresivní invazivitu do rozsáhlých částí mozkové tkáně. Až 90 % všech GBM se rozvíjí *de novo*, tedy přímo z gliových buněk skrz mnohostupňovou tumorigenezi, a tyto nádory jsou označovány jako primární GBM. Naproti tomu tzv. sekundární GBM se rozvíjí postupně z LGG po dobu několika let [16, 18-20].

Na základě nové klasifikace WHO z roku 2021 došlo k zániku dělení GBM na primární a sekundární, toto dělení je však i nadále široce využíváno v klinické praxi. Jako GBM jsou tak podle nové klasifikace označovány pouze nádory, které nenesou mutaci v enzymu isocitrát-dehydrogenáze (IDH), kterou se vyznačují především sekundární GBM [21]. Vzhledem k tomu, že tato práce byla započata ještě před zavedením nové klasifikace a vzhledem k stále širokému klinickému užívání původního rozdělení GBM na primární a sekundární bude v rámci této práce dále postupováno s využitím původní klasifikace GBM.

Mikroskopicky je GBM charakterizován vysokou hustotou buněk, jejich velmi nízkou diferenciací a velkou variabilitou v jejich velikosti a tvaru, běžný je také výskyt obrovských buněk s mnohočetnými jádry. Zatímco na periferii nádorového ložiska je možné pozorovat infiltrující nádorové buňky, uprostřed nádorového ložiska se nachází nekrotická oblast. V nádorové masě se nachází menší nekrotické oblasti, které jsou od ostatních buněk odděleny tzv. pseudopalisádovými oblastmi. Typickým znakem GBM nádorové masy je také vysoký stupeň vaskularizace [16, 20].

Prognóza pacientů s GBM je nepříznivá, nádory mají tendenci se velmi rapidně šířit a vracet se i po iniciální léčbě. GBM je považováno za nevléčitelné onemocnění, současné léčebné protokoly nevedou k úplné kontrole onemocnění a medián přežití pacientů je 12-15 měsíců, pouze u přibližně 10 % pacientů s touto diagnózou bylo prokázáno delší přežití od iniciální diagnózy [16, 17, 22].

1.2.1. Molekulární subtypy GBM

K nepříznivé prognóze pacientů s GBM přispívá také velká heterogenita nádoru i přímo uvnitř nádoru. GBM je možné dále kategorizovat do různých subtypů, což umožňuje lepší zaměření terapie na základě těchto specifických charakteristik nádoru [23, 24].

Studie Verhaak a kol. (2010) rozčlenila nádory GBM do čtyř základních kategorií subtypů – klasický, mesenchymální, proneurální a neurální [25].

Proneurální subtyp GBM se vyskytuje častěji u mladších pacientů a je spojen s delší dobou přežití pacientů. Neurální subtyp GBM obsahuje podobný genetický profil jako v normální nervové tkáni a bývá citlivější k ozáření nebo chemoterapii. Klasický subtyp vykazuje většinu nejčastějších molekulárních a genetických změn v GBM a pacienti s tímto subtypem nádoru vykazují výrazně lepší přežití při využití vysoce agresivní léčby. Mesenchymální subtyp je

charakteristický vysokým výskytem nekrózy a zánětlivých ložisek a zvýšenou regulací genů spojených s angiogenezí. Pacienti s tímto subtypem GBM mají nejčastěji nepříznivou prognózu [23-25].

1.2.2. Molekulární a genetické změny vedoucí ke vzniku GBM

Proces nádorové transformace u GBM zahrnuje kombinaci zvýšené exprese a amplifikace onkogenů společně s nedostatečnou expresí nebo až ztrátou exprese tumor supresorových genů. Vznik primárního a sekundárního GBM je definován značnými rozdíly v mutacích a změnách signálních drah. Pro primární GBM jsou typické změny na signální dráze pro epidermální růstový faktor (EGF) a ovlivnění dráhy MAP kinázy, u sekundárního GBM hraje významnou roli mutace ovlivňující protein p53 a mutační změny IDH. Mutační změny enzymu IDH se jen zřídka vyskytují u primárního GBM, jsou ale typické pro LGG. Sekundární GBM v průběhu vývoje také získávají mutace typické pro primární GBM, jejich četnost výskytu se však liší. Typickou mutací vyskytující v obou typech GBM je ztráta heterozygotnosti krátkého raménka chromozomu 10 (LOH 10q) spojená s mutací homologu fosfatázy a tensinu (PTEN), která se nevyskytuje u LGG [13, 18, 26].

Kromě výše zmíněných mutačních změn dochází v GBM ještě k dalším změnám na signálních drahách, jako např. zvýšená exprese MDM2 („mouse double minute homolog 2“), abnormální aktivace receptoru pro růstový faktor PDGF („platelet-derived growth factor“) nebo nadměrná aktivace STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“). Vývoj GBM také značně ovlivňují epigenetické změny, z nichž za jednu z nejvýznamnějších je považována metylace promotoru DNA reparačního genu *O⁶*-methylguanin-DNA methyltransferázy (MGMT), který zároveň slouží jako prognostický marker pro zvýšené přežití pacientů s GBM léčených alkylačními činidly [13, 18, 27, 28].

1.2.3. Diagnostika GBM

Incidence GBM se v České republice pohybuje mezi 3 až 5 případy na 100 000 obyvatel za rok, přičemž více než 80 % pacientů je starších 50 let v době první diagnózy. Většina primárních GBM vyvíjejících se *de novo* vznikne během pouhých 3 měsíců, u sekundárních GBM dochází k postupnému rozvoji nádoru po dobu až 5 let [16, 28-30].

Klinické projevy nádoru se odvíjí od jeho lokalizace, nejčastějšími příznaky jsou bolesti hlavy, nevolnost až zvracení, ataxie nebo poruchy vidění, objevují se dále poruchy psychiky, vědomí, řeči a kognitivních funkcí. Častým příznakem spojeným s výskytem GBM jsou epileptické záchvaty. Vzhledem k značné nespecifičnosti těchto příznaků, jejich rychlému výskytu a krátké historii trvání jsou postižení pacienti často nesprávně diagnostikováni [16, 29].

Hodnocení příznaků a celkového stavu („Karnofsky Performance Score“, KPS) je prováděno při stanovení diagnózy a také během léčby. Podrobná diagnóza a zhodnocení prognostických klinických faktorů pomáhá vypracovat vhodnou strategii léčby [10, 29].

Hlavní diagnostickou metodikou pro GBM je magnetická rezonance (MR), nezastupitelný význam má také výpočetní tomografie (CT), využívána je také pozitronová emisní tomografie (PET). Definitivní potvrzení diagnózy probíhá na základě histologického vyšetření vzorku tkáně získaného během chirurgického odstranění nádoru nebo provedením biopsie [10, 29, 31]. Některé diagnostické markery umožňují přesnější zařazení nádoru a mohou napomoci při predikci reakce na léčbu. Patří sem především určení přítomnosti mutované varianty IDH, mutací EGFR nebo metylace promotoru MGMT [28, 32].

1.2.4. Terapie GBM

Volba terapeutické strategie závisí na vlastnostech samotného nádoru a na celkovém stavu pacienta a přítomnosti klinických prognostických faktorů. Současným standardem terapie je největší možná chirurgická resekce, následovaná radioterapií s případnou adjuvantní chemoterapií za využití alkylačního protinádorového léčiva temozolomidu (TMZ). Tato terapie je však nedostatečná, často dochází ke vzniku recidiv a rezistence na léčbu, medián přežití pacientů je i po léčbě 12-15 měsíců [10, 15, 33].

Přestože je použití chemoterapie u nádorů mozku obecně komplikované především z důvodu přítomnosti hematoencefalické bariéry a její nedostatečné propustnosti pro většinu chemoterapeutik, konkomitantní podání TMZ spolu s radioterapií přináší značnou výhodu a prodloužení mediánu přežití pacientů. TMZ alkyluje buněčnou DNA, což ve výsledku vede k zastavení replikace DNA, vzniku DNA zlomů a k postupné smrti buňky [10, 30, 33].

Použití TMZ při léčbě GBM je komplikováno častým a rychlým rozvoje rezistence, více než 50 % pacientů s GBM neodpovídá na léčbu TMZ. Jednou z cest vzniku rezistence je aktivace MGMT proteinu, který se účastní opravy DNA. Tento efekt může být potlačen v případě deaktivace vzniku proteinu MGMT metylací jeho promotoru, což může přinášet benefit z léčby TMZ. Rezistence vůči TMZ může vzniknout také vlivem hypoxického prostředí nádoru, je také spojena se zvýšenou aktivací STAT3 [34, 35].

Dalším problémem spojeným s užitím TMZ je především nízká dostupnost léčiva v mozku oproti koncentracím dosaženým v krevním řečišti. Ačkoli TMZ prostupuje hematoencefalickou membránou, v mozku dosahuje pouze 15-20 % koncentrace, která je dostupná v krvi [36]. Výše uvedené důvody vedou ke snaze o vylepšení terapie GBM, současný výzkum se zaměřuje především na cílenou biologickou léčbu. Největší pozornost je již delší dobu věnována monoklonálním protilátkám, jako je např. bevacizumab. Dalšími hojně testovanými látkami pro léčbu GBM jsou malé molekuly inhibující amplifikovaný EGFR protein (erlotinib, gefotinib) [13, 30].

1.3. Mikrotubuly v GBM

1.3.1. Mikrotubuly – struktura a funkce

U GBM můžeme pozorovat velkou heterogenitu tvarů a velikostí jednotlivých nádorových buněk, kde významnou roli hrají proteiny buněčného cytoskeletu, mezi nimi také mikrotubuly. Jedná se o polymery tvořené $\alpha\beta$ -tubulinovými heterodimery se strukturně polárním uspořádáním. Jejich polymerizace probíhá postupným navazováním těchto heterodimerů na konce vznikajících mikrotubulů, které jsou ukotveny v mikrotubuly organizujícím centru (MTOC) [1, 37].

S mikrotubuly interaguje velké množství proteinů a mnoho z nich se zapojuje přímo do dynamiky mikrotubulů, ať už se jedná o proteiny podporující stabilitu mikrotubulů nebo proteiny mikrotubuly destabilizující. Dalšími proteiny jsou mikrotubulární motory, které se podílejí na přenosu celé řady buněčných nákladů [1, 38, 39].

Mikrotubuly mají v buňkách mnoho funkcí, podílejí se na udržení buněčného tvaru, buněčné polaritě, účastní se vnitrobuněčného transportu a hrají velkou roli při buněčném dělení, kdy vytváří mitotické vřeténko umožňující rovnoměrné rozdělení genetické informace v buňce. Velká rozličnost funkcí mikrotubulů v buňce je také způsobena odlišnostmi v jejich vlastnostech, odlišností proteinů asociovaných s daným proteinem a posttranslačními modifikacemi jejich tubulinové podjednotky [38, 40, 41].

1.3.2. Mikrotubuly v GBM

Mikrotubuly vytvářejí v buňkách mozkové tkáně hustou síť, jsou velmi bohatě zastoupeny a tvoří až 20 % celkového obsahu proteinů těchto buněk. V GBM buňkách je možné pozorovat mnoho specifických změn v zastoupení jednotlivých isoformů mikrotubulárních podjednotek tubulinů. U GBM byla pozorována především zvýšená exprese β III-tubulinu spojená s dediferenciací buněk, zvýšenou invazivitou a horšími klinickými výsledky. Zvýšená exprese této isoformy je také spojena s přítomností hypoxického prostředí a rezistencí na některé mikrotubuly ovlivňující látky [42-44].

Zvýšená je v GBM buňkách také exprese γ -tubulinu vedoucí ke strukturním a funkčním změnám centrosomů a abnormalitám na mitotických vřetencích, což ve výsledku může způsobovat různé poruchy při správném rozdělení genetické informace při dělení buňky [45, 46].

Posttranslační modifikace mikrotubulů hrají svou důležitou roli v nádorových buňkách včetně GBM. V GBM jsou přednostně zastoupeny tři druhy této modifikace, a sice tyrosinace, polyglutamylace a acetylace. Především acetylace hraje v GBM buňkách důležitou roli, protože je často spojována s difúzní invazivitou a adhezivitou nádorových buněk, pojí se také se zvýšenou stabilitou mikrotubulů [47].

1.3.3. Látky ovlivňující mikrotubuly

Ovlivnění mikrotubulů patří mezi jeden ze základních přístupů k protinádorové léčbě. Látky ovlivňující mikrotubuly („microtubule targeting agents“, MTAs) jsou širokou a rozmanitou skupinou látek, které se váží na mikrotubuly a ovlivňují jejich polymerizaci a jejich funkce. Značná řada těchto látek pochází původně z přírodních zdrojů a jejich použití přineslo značný postup v protinádorové terapii [48, 49].

Velmi jednoduše lze MTAs rozdělit do dvou základních skupiny – na látky stabilizující polymerizaci mikrotubulů a na látky mikrotubuly destabilizující, a tudíž podporující jejich depolymerizaci. Dalším způsobem, jak rozdělit látky působící na mikrotubuly, je podle jejich vazebného místa na mikrotubulu, a to na látky působící na vinka vazebné místo, látky působící na kolchicinové vazebné místo a látky působící na taxanové vazebné místo [48, 49].

Klinický úspěch MTAs je však značně poznamenán vznikající rezistencí proti těmto léčivům. Ta je často spojena se zvýšenou expresí ABC transportérů, také některé isoformy tubulinu, např. β III-tubulin, mohou snižovat citlivost buněk k jednotlivým léčivům a způsobovat tak selhání terapie [49].

1.4. Benzimidazoly

Vzhledem k časové a finanční náročnosti vývoje nových protinádorových léčiv se zlepšenými vlastnostmi se jako výhodnější jeví proces využití již existujících léčiv původně určených pro jinou indikaci při cílení na nádorové buňky. Mezi vhodné kandidáty tohoto procesu patří léčiva ze skupiny anthelmintických benzimidazolů, kam řadíme např. flubendazol, mebendazol nebo albendazol. Flubendazol (FLU) je originálně humánní i veterinární anthelmintikum vyznačující se především nízkou toxicitou. FLU, podobně jako ostatní benzimidazoly, na molekulární úrovni interaguje s β -tubulinovou podjednotkou mikrotubulů, což vede k ovlivnění jejich polymerizace a k jejich poškození [50-52].

Protinádorový efekt FLU byl demonstrován u celé řady solidních tumorů a hematologických malignit, jako např. u buněk leukemií, myelomu, melanomu nebo kolorektálního karcinomu. FLU také vykazoval inhibiční účinek na buňky rezistentní vůči MTAs z důvodu zvýšené exprese ABC transportérů. Ve srovnání s dalšími benzimidazolovými látkami, FLU navíc vykazoval největší afinitu při vazbě na mikrotubuly [51-55].

FLU je v současné době administrován perorálně a vstřebává se gastrointestinálním traktem. Závažné vedlejší účinky nevyvolávalo ani jednorázové podání velmi vysoké dávky. Problémem podání FLU je ovšem jeho nízká biodostupnost, v současné době však již existují systémy, které biodostupnost FLU zvyšují [52, 56].

V souvislosti s použitím FLU byla popsána řada dalších mechanismů účinku, zahrnujících kromě účinku na mikrotubuly také inhibici epiteliálně-mesenchymální transformace, zvýšení hladiny reaktivních forem kyslíku, vyvolání autofagie, nebo inhibici aktivace molekuly STAT3 a její následně signální dráhy [57, 58].

Také u buněk gliomů a GBM byl demonstrován inhibiční účinek FLU, ale především jeho příbuzného benzimidazolového derivátu mebendazolu. Aktivita mebendazolu proti GBM buňkám a myším modelům a jeho schopnost přestupovat hematoencefalickou bariéru umožnili jeho vstup do první fáze klinického testování pro pacienty s nově diagnostikovanými gliomy s vysokým stupněm malignity [59].

Benzimidazoly obecně jsou vnímány jako prospektivní skupina pro inhibiční působení na buňky GBM a prvotní výsledky jejich testování proti buňkám tohoto nádoru demonstrují nadějně výsledky, které je potřeba podrobit dalšímu testování [60, 61].

2. Cíle

Cílem této práce bylo stanovit inhibiční vliv flubendazolu (FLU) na buňky glioblastoma multiforme (GBM) *in vitro* a *in vivo*. Pro účely této práce byl vliv FLU testován na stabilizovaných GBM buněčných liniích A172 a T98G a na GBM primárních kulturách. Dále byla pro testování využita tumorigenní linie U118MG, která byla následně implantována do atymických myší.

Díličními cíli této práce bylo:

- Porovnat vliv FLU a TMZ na viabilitu, proliferaci a morfologii GBM buněčných linií A172 a T98G
- Zhodnotit vliv FLU na mikrotubulární cytoskelet a expresi tubulinů a na další složky buněčného cytoskeletu, a následně studovat možné změny ve tvaru buněk a jejich velikosti u GBM buněčných linií A172 a T98G
- Stanovit vliv FLU na expresi a aktivaci molekuly STAT3, distribuci buněčného cyklu a aktivitu kaspáz u GBM buněčných linií A172 a T98G
- Porovnat vliv FLU a TMZ na viabilitu, proliferaci a morfologii GBM primárních kultur
- Posoudit vliv FLU na expresi tubulinů a molekuly STAT3 u GBM primárních kultur
- Analyzovat expresi STAT3 v klinických vzorcích GBM
- Porovnat vliv FLU a TMZ na proliferační schopnosti GBM buněčné linie U118MG *in vitro* a po její implantaci do atymických myší sledovat růst vzniklých nádorů *in vivo*
- Zhodnotit vliv FLU a TMZ na expresi tubulinů a expresi a aktivaci STAT3 u nádorů získaných z atymických myší

3. Metodika

3.1. Stabilizované buněčné linie a jejich kultivace

Pro potřeby této disertační práce byly využity tři nádorové buněčné linie A172, T98G a U118MG, které byly získány od společnosti ATCC. Buňky A172 (ATCC® CRL-1620™) a U118MG (ATCC® HTB-15™) byly kultivovány v DMEM médiu (LGC Standard), buňky T98G (ATCC® CRL-1690™) v EMEM médiu (LGC Standard). Obě média byla obohacena o 10 % fetálního bovinního séra (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific) a 1 % směsi penicilinu/streptomycinu (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích o ploše 75 cm² v buněčných inkubátorech při 37 °C a 5 % CO₂.

3.2. Primární kultury

Primární kultury GBM byly odvozeny z patientských vzorků získaných od pacientů podstupujících GBM resekci ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Tento projekt byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (referenční číslo 201709 S13P) a od pacientů byl získán informovaný souhlas se zařazením do studie. Získané vzorky byly zpracovány pomocí mechanické disociace, jak bylo popsáno v publikaci Skarková a kol. [36]. Buňky byly dále kultivovány v kultivačním médiu, které bylo složeno z média RPMI 1640 (Sigma Aldrich) obohaceného o 15 % FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific), inzulín (100 IU/ml, Eli Lilly) a transferin (2 mg/ml, Sigma-Aldrich). Buňky byly kultivovány v buněčných inkubátorech při 37 °C a 5 % CO₂. Všechny experimenty na takto získaných primárních kulturách byly provedeny u buněk v nižším stupni subkultivací.

3.3. Modelový organismus pro *in vivo* experiment

Pro implantaci buněk U118MG a pro provedení *in vivo* experimentu byla jako modelový organismus využita Athymic Nude Mouse (Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu), dále jen nu-nu myš. Jedná se o imunodeficientní model nahé myši, která byla odvozena v „National Cancer Institute“ v Marylandu [62]. Pro účel tohoto projektu byly využity samice nu-nu myši, stáří 6 týdnů na počátku experimentu. Pro tento projekt byl etickou komisí schválen projekt pokusu MSMT-18476/2020-3.

3.4. Měření viability metodou WST-1

Buněčné linie A172, T98G a U118MG a GBM primokultury byly ovlivněny roztoky TMZ o různé koncentraci (50 μM; 125 μM; 250 μM; 500 μM; 1000 μM) a roztoky FLU o různé koncentraci (0,5 μM; 1 μM; 2 μM; 3 μM; 5 μM). Takto ovlivněné buňky byly kultivovány po dobu 48 hodin a následně bylo přidáno činidlo WST-1. Absorbance byla změřena za použití destičkového spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan) při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 650 nm.

3.5. Měření proliferace buněk systémem xCELLigence

Testování proliferace bylo provedeno na 16jamkové destičce („E-Plate“), na kterou bylo pipetováno 100 μl buněčné suspenze. Buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin a každou hodinu byla měřena impedance. Po počáteční inkubaci byly buňky ovlivněny FLU 0,5 μM a 2 μM. Destičky byly vloženy zpátky do přístroje a impedance byla měřena každou hodinu po dobu 72 h.

3.6. Transfekce buněk pomocí siRNA

Pro účely tohoto projektu byla použita siRNA proti STAT3 (SignalSilence® STAT3 siRNA; CellSignaling Technology) a odpovídající kontrolní siRNA (SignalSilence® Control siRNA – Fluorescein conjugate; CellSignaling Technology). Transfekce byla provedena za využití transfekčního reagensu X-tremeGENE siRNA. Buňky A172 a T98G rozděleny do tří skupin – kontrolní transfekované buňky (transfekované pomocí kontrolní siRNA), buňky transfekované pomocí siRNA proti STAT3, a netransfekované buňky ovlivněné 0,5 μM FLU. Transfekční roztoky byly připraveny v médiu 1x Opti-MEM podle instrukcí výrobce. Buňky

byly transfekovány takto připravenými roztoky, případně ovlivněny 0,5 μM FLU a inkubovány 48 h při 37 °C a 5 % CO_2 . Takto připravené buňky byly následně podrobeny dalším analýzám.

3.7. Fázově kontrastní mikroskopie

Pro stanovení efektu testovaných chemoterapeutik TMZ a FLU na buněčnou morfologii byla využita fázově kontrastní mikroskopie. Buňky A172, T98G, U118MG a GBM primokultur byly ovlivněny 0,5 μM FLU nebo 500 μM TMZ a kultivovány v buněčném inkubátoru při 37 °C a 5 % CO_2 . Po 24 h, 48 h a 72 h inkubace byly buňky pozorovány pomocí mikroskopu Olympus IX-70 s fázovým kontrastem (Olympus).

3.8. Imunofluorescence buněk

Pro posouzení vlivu FLU na cytoskelet buněk A172 a T98G byla využita fluorescenční mikroskopie. Buňky byly ovlivněny různými koncentracemi FLU (100 nM; 250 nM; 500 nM; 750 nM; 1000 nM) a inkubovány po dobu 2 h a následně fixovány jedním z následujících způsobů:

- kombinací ledového metanolu a 4 % paraformaldehydu (pro protilátky anti-EB1/EB3, anti- γ -tubulin, anti-pericentrin, anti- α -tubulin)
- kombinací 0,1 % glutaraldehydu a 4 % paraformaldehydu (pro protilátky anti-tyr-tubulin, anti-ac-tubulin, anti- α -tubulin)
- ledovým metanolem (pro protilátku anti-vimentin)

Po fixaci byly buňky permeabilizovány 0,3 % triton X-100 a blokovány 2 % roztokem bovinního sérového albuminu (BSA). Následně byly vzorky inkubovány s primární protilátkou a následně se sekundárními protilátkami. Vzorky byly zamontovány za použití média Vectashield (Vector Laboratories) a pozorovány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 700 (Zeiss).

3.9. Obrazová analýza

Obrazová analýza byla provedena v programu Fiji, normalizace dat proběhla pomocí programu MS Excel a statistická analýza takto získaných dat byla realizována v programu GraphPad Prism 6.0. Pro úpravu intenzity a kontrastu získaných mikroskopických obrazů a také pro stanovení velikosti buněk (na základě přepočtu množství pixelů/ μm) byl využit program Fiji. Komety EB1/EB3 byly spočítány v programu Fiji za využití ComDet pluginu (se svolením autora, Dr. E. Katrukha, Univerzita Utrecht).

3.10. Analýza RT-PCR

Buňky A172, T98G a GBM primokultur byly ovlivněny různými koncentracemi FLU (0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM) a inkubovány po dobu 24 h, 48 h a 72 h. RNA z buněk byla izolována kolonkovou metodou za využití komerčního kitu Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research). Koncentrace izolované RNA byla stanovena na přístroji NanoDrop ND-2000 UV/Vis spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific) a kvalita získané RNA byla ověřena pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Jednovláknová cDNA byla syntetizována pomocí komerčního kitu First Strand cDNA Synthesis kit (Biogen). Získaná cDNA byla pětkrát zředěna před provedením kvantitativní PCR. Primery pro kvantifikaci mRNA byly navrženy za využití programu Primer3, jejich specifita byla ověřena programem NCBI Blast a jejich syntéza byla provedena komerčně společností Generi Biotech. Kvantitativní PCR byla provedena detekčním systémem LightCycler96 Real-Time PCR (Roche) za využití detekce pomocí SYBR Green I. Všechny PCR analýzy byly provedeny v duplikátech a výsledky byly spočítány na základě využití delta-delta Ct metody. Data jsou vyobrazena jako změna relativního množství mRNA.

3.11. Analýza Western blot

Buňky A172, T98G a GBM primokultur byly ovlivněny různými koncentracemi FLU (0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM) a inkubovány po dobu 24 h, 48 h nebo 72 h. Buňky byly následně ve zkumavce homogenizovány v lyzačním pufru a koncentrace bílkoviny byla změřena pomocí BCA stanovení bílkoviny. Vzorky byly rozděleny pomocí gelové elektroforézy a následně

přeneseny na PVDF membránu. Membrány byly inkubovány s primárními protilátkami při 4 °C přes noc a následně se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenuvou peroxidázou. Chemiluminiscenční detekce byla provedena za pomoci detekčního reagentu ECL Prime Western Blotting (Amersham, GE Healthcare Life Science) a zobrazení membrán a relativní kvantifikace získaných výsledků byla provedena v systému Azure c600 Imaging System (Azure Biosystems).

3.12. Analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie

Tato analýza byla provedena ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Buňky A172 a T98G byly ovlivněny FLU 0,5 µM a inkubovány po dobu 12 h nebo 24 h. Buňky byly fixovány pomocí 70 % ethanolu a následně označeny propidium jodidem ve Vindelově roztoku. Obsah DNA byl stanoven použitím průtokového cytometru CytoFLEX LX (Beckman Coulter) s excitační vlnovou délkou 488 nm. Data byla analyzována pomocí softwaru Kaluza Analysis 2.1. (Beckman Coulter).

3.13. Luminiscenční stanovení aktivity kaspáz

Aktivita efektorových kaspáz 3 a 7 a iniciačních kaspáz 8 a 9 byla stanovena luminiscenční metodou komerčně dostupným kitem Promega Caspase-Glo Assay (Promega) podle instrukcí výrobce. K měření byla využita 384jamková destička s bílými stěnami určená pro luminometr a luminiscence byla zaznamenána přesně po 30 minutách inkubace při pokojové teplotě za pomoci spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan). Luminiscence byla vztažena ke stanovené koncentraci proteinů jednotlivých vzorků a aktivita byla vyjádřena jako procento neovlivněné kontroly.

3.14. Imunohistochemická analýza

Imunohistochemická analýza (IHC) byla provedena ve spolupráci s Fingerlandovým ústavem patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové. Vzorky nádorové tkáně byly fixovány 4 % formalínem a zalité do parafinových bločků (FFPE). Pro toto stanovení byly použity primární protilátky proti STAT3, STAT3p705 a Ki67. Detekce STAT3 a Ki67 byla provedena na Benchmark Ultra stainer (Ventana/Roche) za využití detekčního kitu Ventana OptiView DAB IHC. Detekce STAT3p705 byla provedena na systému Agilent/Dako Omnis (Agilent) za využití detekčního kitu EnVision Flex. Připravené vzorky byly digitalizovány pomocí Leica Aperio AT2 slide scanner (Leica Biosystems) a vyhodnoceny softwarem Aperio ImageScope (Leica Biosystems). Zhodnocení IHC zbarvení bylo provedeno jedním patologem a bylo zaznamenáno procento pozitivně zbarvených buněk a intenzita zbarvení.

3.15. In vivo experiment

Implantace buněk U118MG do modelového organismu byla provedena ve spolupráci s viváriem Lékařské fakulty v Hradci Králové subkutánně do pravého a levého boku. Implantace byla provedena do 16 nu-nu myší rozdělených do 4 skupin (viz Tab. 2). Nádory byly ponechány růstu po dobu 2 týdnů, během nichž byl jejich vývoj sledován pohledem a pohmatem.

Tab. 2. Rozdělení skupin *in vivo* experimentu

Název skupiny	Počet myší	Ovlivnění
A	3	Kontrolní skupina
B	2	FLU 10 mg/kg
C	2	FLU 25 mg/kg
D	3	TMZ 0,9 mg/kg

Od 15. dne od implantace bylo příslušné léčivo podáváno perorální sondou po dobu dalších 2 týdnů, a to každý den. Léčiva TMZ a FLU byla připravena rozpuštěním v 1 % roztoku methylcelulózy. Ukončení pokusu bylo provedeno usmrcením nu-nu myší 24 h po podání poslední dávky příslušného léčiva. Cílové tkáně po usmrcení zvířete byly odebrány

do připravených zkumavek a podrobeny dalším analýzám. Velikost a hmotnost vzniklých nádorů byla zaznamenána a získané nádory byly použity pro IHC analýzu, analýzu RNA a proteinů. Nádory určené pro IHC analýzu byly uloženy do 4 % formalínu a posléze zalité do FFPE bločku. Nádory určené pro analýzu RNA a proteinů byly zamrazeny v tekutém dusíku a uloženy do -80 °C. Následně byly homogenizovány pomocí přístroje TissueLyser. Izolace RNA byla provedena použitím komerčně dostupného kitu GeneAll Hybrid-R kolonkovou metodou, její koncentrace byla na přístroji NanoDrop ND-2000 UV/Vis spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific) a kvalita získané RNA byla ověřena pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Další analýza RNA vzorku byla provedena stejně jako v případě *in vitro* analýzy, jak bylo popsáno výše. Izolace proteinů byla provedena pomocí homogenizace v prostředí lyzačního pufru. Takto připravené vzorky byly použity ke stanovení koncentrace bílkoviny BCA metodou a k provedení analýzy Western blot (viz výše).

3.16. Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena v softwaru GraphPad Prism 6.0. Pro jejich zhodnocení byla využita metoda TWO-WAY ANOVA následovaná Sidakovým testem pro vícečetná porovnání. Výsledky měření jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka z nejméně dvou nezávislých experimentů. Statistická významnost vyjádřená symbolem * odpovídá hladině spolehlivosti až do $p < 0,05$. Hodnota poloviny maximální inhibiční koncentrace IC50 byla vypočítána metodou nelineární regrese v programu GraphPad Prism 6.0.

4. Výsledky

4.1. Výsledky *in vitro* experimentu

4.1.1. Vliv FLU a TMZ na viabilitu a proliferaci buněk A172 a T98G

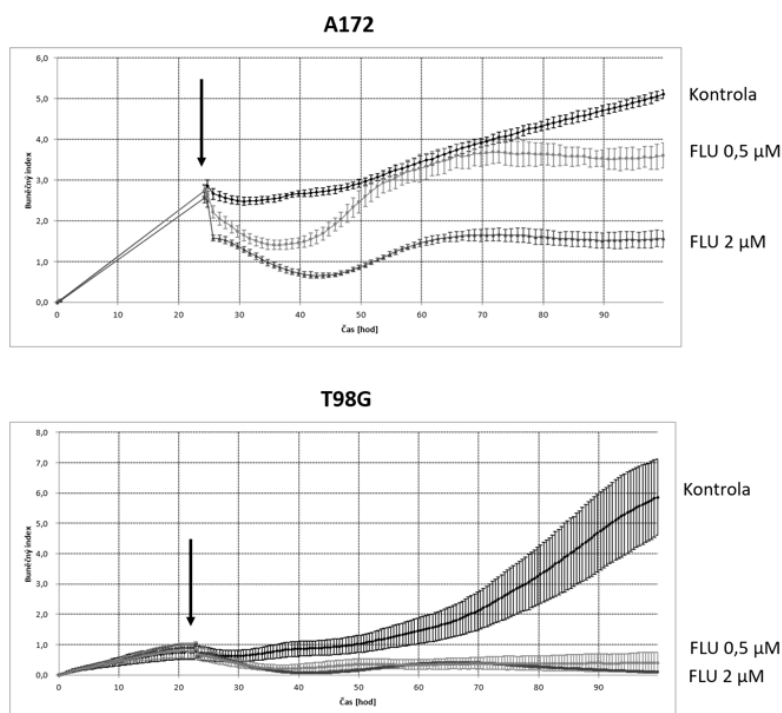
Efekt FLU a TMZ na viabilitu GBM buněk byl stanoven u buněčných linií A172 a T98G, které byly ovlivněny různými koncentracemi TMZ a různými koncentracemi FLU po 48 h inkubaci. Na základě získaných dat byla stanovena hodnota IC50 pro obě testovaná léčiva.

Tab. 3. Hodnoty IC50 u stabilizovaných buněčných linií GBM
IC50 [μM]

	TMZ	FLU
A172	1840,0	3,959
T98G	3255,0	2,181

Obě testované GBM buněčné linie vykazovaly vyšší citlivost k ovlivnění FLU, přičemž citlivější byly buňky T98G, jejichž IC50 FLU bylo 2,181 μM. Nejvyšší citlivost k léčbě TMZ vykazovaly buňky A172, jejichž koncentrace IC50 byla 1840 μM.

Na základě prvotního testování byl dále posouzen vliv TMZ a FLU na viabilitu buněk v dalších časových intervalech (24 h, 48 h a 72 h), kdy FLU vykazoval větší efekt na viabilitu buněk v delších časových intervalech, a to především u buněk T98G.



Obr. 1. Vliv 0,5 μM a 2 μM FLU na proliferaci GBM buněk A172 a T98G stanovený systémem xCELLigence. Čas ovlivnění je označen šipkou.

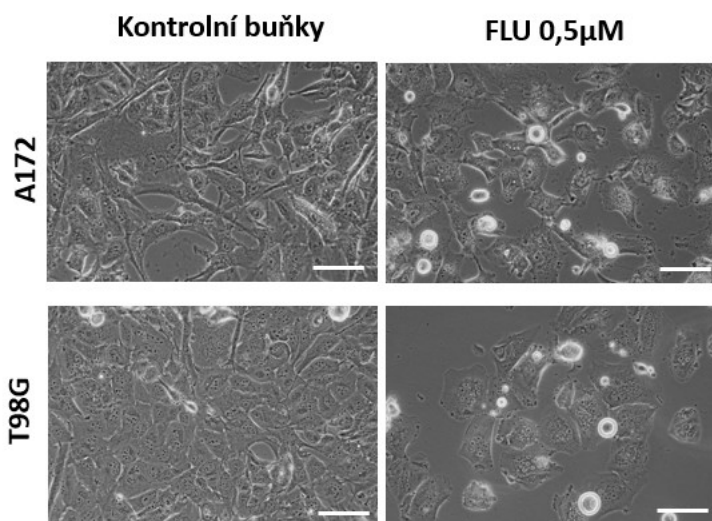
Výrazný efekt FLU na proliferaci GBM buněčných linií byl dále potvrzen také za využití systému xCELLigence (Obr.1). U buněk T98G došlo po iniciálním ovlivnění FLU k postupnému snížení proliferace a v průběhu celého sledovaného období nedošlo k jejímu obnovení. U buněk A172 bylo možné pozorovat postupné

obnovení proliferace buněk po jejím počátečním snížení, po celé sledované období však proliferací schopnost buněk zůstávala snižena.

Na základě těchto výsledků byly pro další testování zvoleny koncentrace 500 μM pro TMZ a 0,5 μM pro FLU.

4.1.2. Vliv FLU a TMZ na morfologii buněk A172 a T98G

Morfologie buněk a její změny byly pozorovány pomocí fázově kontrastní mikroskopie.



Obr. 2. Vliv 500 μM TMZ a 0,5 μM FLU na morfologii GBM buněk A172 a T98G po 48 h ovlivnění. Zvětšení 400x, měřítko 30 μm .

Po podání 0,5 μM FLU docházelo ke změnám v morfologii buněk, u buněk T98G i k viditelným změnám v počtu buněk. Buňky se zmenšovaly, zaoblovaly, u buněk A172 docházelo k viditelným ztrátám dlouhých buněčných výběžků. Buňky postupně ztrácely svou adherenci ke dnu kultivační lahve,

bylo možné pozorovat vznik vícejaderných buněk a nastupující buněčnou smrt.

4.1.3. Vliv FLU na mikrotubulární cytoskelet buněk A172 a T98G

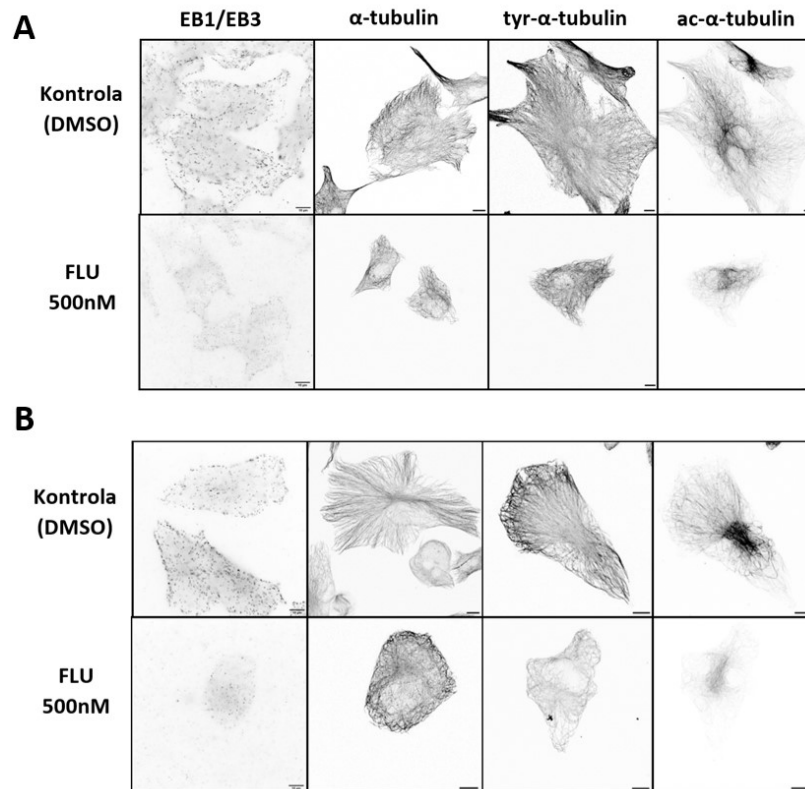
Vliv FLU na polymerizaci mikrotubulů a mikrotubulární cytoskelet buněk A172 a T98G byl pozorován pomocí fluorescenční mikroskopie.

Pro stanovení vlivu FLU na polymerizaci mikrotubulů byla pozorována přítomnost a množství EB1/EB3 proteinů. Po ovlivnění 500 nM FLU bylo možné pozorovat výrazné snížení množství EB1/EB3 komet u obou testovaných buněčných linií, k výraznějšímu snížení docházelo u buněk T98G (Obr. 3). Docházelo také k porušení základní sítě α -tubulinu i jeho posttranslačních modifikací u obou testovaných buněčných linií. Bylo možné pozorovat postupné zaoblování tvaru tubulinové sítě, konce tubulinových vláken se zakrucovaly a celková organizace tubulinů byla působením FLU porušena.

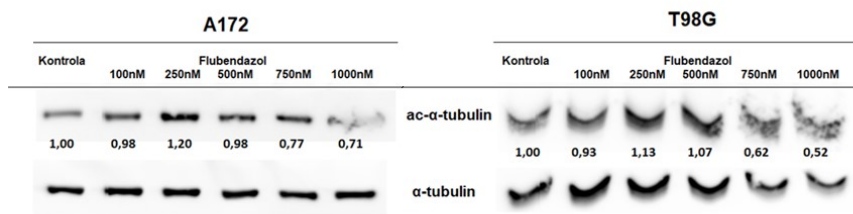
Kvantitativní porovnání množství EB1/EB3 komet normalizovaných na jednotku velikosti buněk (EB1/EB3 kometry/ μm^2) byl potvrzen výraznější efekt FLU u buněk T98G a obecně výrazný inhibiční efekt FLU na polymerizaci mikrotubulů.

Především u buněk T98G, v menší míře také u buněk A172 docházelo ke zdánlivému snížení intenzity zbarvení acetylovaného- α -tubulinu, proto jsme provedli ověření na úrovni proteinů metodou Western blot (Obr. 4). U buněk A172, a především T98G při ovlivnění buněk vyššími koncentracemi FLU (750 nM a 1000 nM) bylo pozorováno nesignifikantní snížení hladiny acetylované modifikace α -tubulinu (v poměru k celkové hladině α -tubulinu v buňkách).

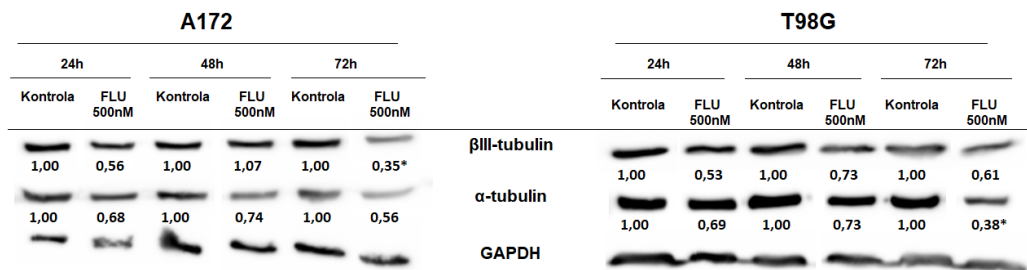
Dále jsme u buněk A172 a T98G stanovovali změny v hladinách přítomnosti proteinů α -tubulinu a β III-tubulinu (Obr. 5). U obou testovaných buněčných linií docházelo vlivem 500 nM FLU k ovlivnění hladin proteinů α - a β III-tubulinu, k nejvýraznějšímu poklesu docházelo u buněk A172 po 72 h inkubace. U buněk T98G se signifikantně snižovaly hladiny α -tubulinu po 72 h inkubace. Snížení hladiny α -tubulinu bylo pozorováno u obou testovaných buněčných linií ve všech časových intervalech, zatímco hladiny β III-tubulinu byly působením FLU sníženy ve všech časových intervalech u buněk T98G a u buněk A172 pouze po 24 h a 72 h inkubace.



Obr. 3. Vliv 500 nM FLU na polymerizaci mikrotubulů (EB1/EB3 proteiny) a strukturu a posttranslační modifikace tubulinů pozorovaný prostřednictvím imunofluorescenčního barvení u GBM buněčných linií A172 (A) a T98G (B). Zvětšení 1000x (EB1/EB3 protein), 60x (α -tubulin, tyr- α -tubulin, ac- α -tubulin), měřítko 10 μ m.



Obr. 4. Expres acetylovaného- α -tubulinu na úrovni proteinů stanovený pomocí metody Western blot u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných různými koncentracemi FLU za využití α -tubulinu jako referenčního proteinu.



Obr. 5. Expres α - a β III-tubulinu na úrovni proteinů stanovený metodou Western blot u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 500 nM FLU po dobu 24 h, 48 h a 72 h za využití GAPDH jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

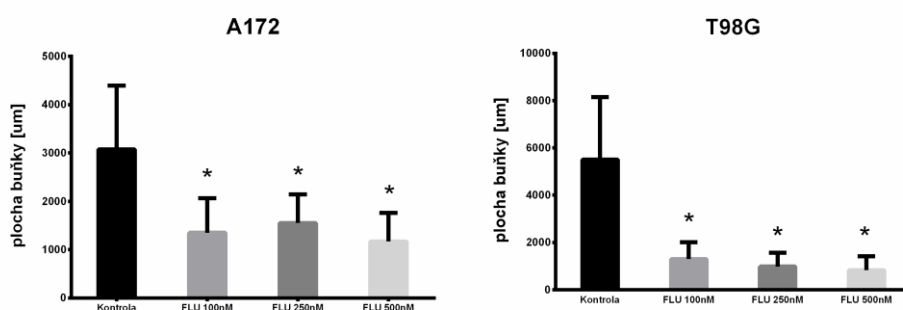
4.1.4. Vliv FLU na cytoskelet buněk A172 a T98G

Vliv FLU na další části buněčného cytoskeletu byl stanoven u buněk A172 a T98G pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 7).

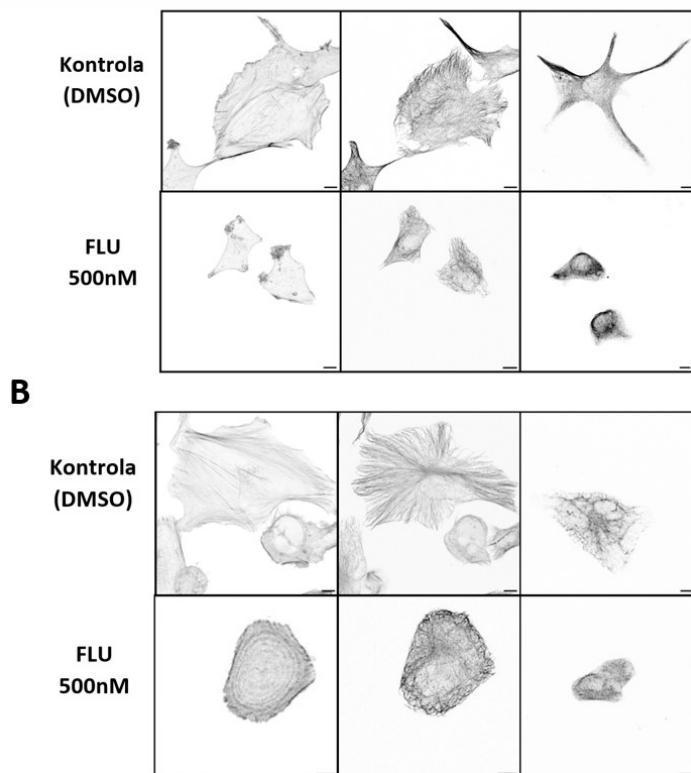
U buněk A172 i T98G docházelo po podání FLU ke změnám ve struktuře a organizaci všech tří složek buněčného cytoskeletu. U buněk A172 docházelo ke kondenzaci F-aktinu v okrajových částech buňky, k postupnému zakrucování α -tubulinových vláken a ke ztrátě výběžků tvořených α -tubulinem a vimentinem. Také u buněk T98G se u všech tří pozorovaných složek postupně zakrucovaly konce vláken a celkově zaoblovaly jednotlivé buňky. U obou buněčných linií bylo možné po podání FLU pozorovat výrazné zmenšování buněk, které bylo dále kvantifikováno analýzou velikosti buněk (Obr. 6.).

U obou testovaných buněčných linií docházelo k statisticky významnému snížení velikosti buněk již po podání nejnižší testované koncentrace FLU (100 nM). Tento efekt byl výraznější u buněk T98G, jejichž velikost byla v neovlivněné kontrole větší.

U buněk A172 měly všechny použité koncentrace FLU stejný vliv na zmenšení exponovaných buněk.



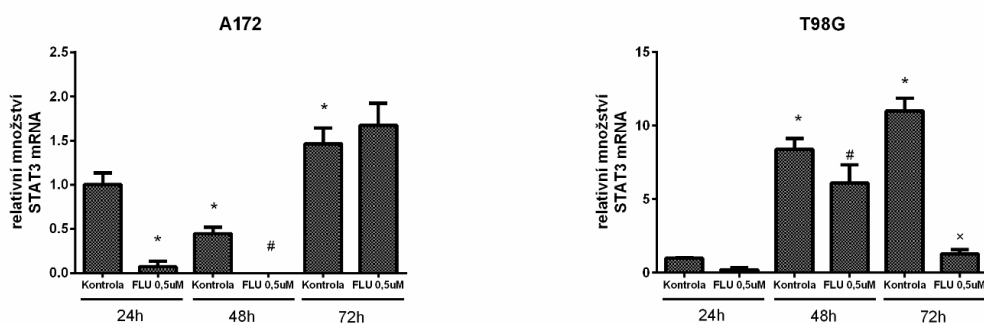
Obr. 6. Změny velikosti buněk GBM buněčných linií A172 a T98G po ovlivnění FLU různých koncentrací. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.



Obr. 7. Vliv 500 nM FLU na cytoskelet GBM buněčných linií A172 (A) a T98G (B) pozorovaný pomocí fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x, měřítko 10 µm.

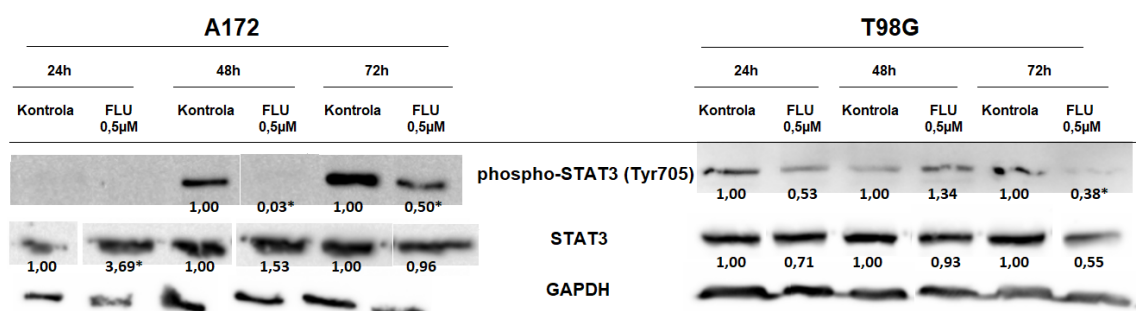
4.1.5. Vliv FLU na aktivaci a expresi STAT3 u buněk A172 a T98G

Vliv FLU na expresi STAT3 byl testován na úrovni proteinů metodou Western blot a na úrovni mRNA pomocí RT-PCR, vliv FLU na aktivaci STAT3 byl testován na úrovni proteinů stanovením hladiny aktivované formy proteinu (phospho-STAT3 (Tyr705)).



Obr. 8. Relativní množství STAT3 mRNA u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 µM FLU po dobu 24 h, 48 h a 72 h analyzováno metodou RT-PCR za využití TBP jako referenčního genu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola 24 h, # $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola 48 h, × $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola 72 h.

U obou testovaných buněčných linií se snižovalo relativního množství STAT3 mRNA po ovlivnění 0,5 µM po dobu 24 h a 48 h (Obr. 8). U buněčné linie T98G se zároveň významně snižovalo relativního množství STAT3 mRNA po 72 h ovlivnění. U buněk T98G bylo zároveň možné pozorovat výrazné zvyšování relativního množství STAT3 mRNA v čase.



Obr. 9. Expres STAT3 a jeho fosforylované formy na úrovni proteinů u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 µM FLU po dobu 24 h, 48 h a 72 h stanovená metodou Western blot za využití GAPDH jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Také na úrovni proteinů bylo možné pozorovat nesignifikantní snížení exprese STAT3 u buněk T98G ve všech časových intervalech, naproti tomu u buněk A172 nebylo pozorováno snížení exprese STAT3 po ovlivnění 0,5 µM FLU. U obou testovaných buněčných linií ale docházelo působením 0,5 µM FLU ke snížení hladiny fosforylovaného STAT3 (Obr. 9).

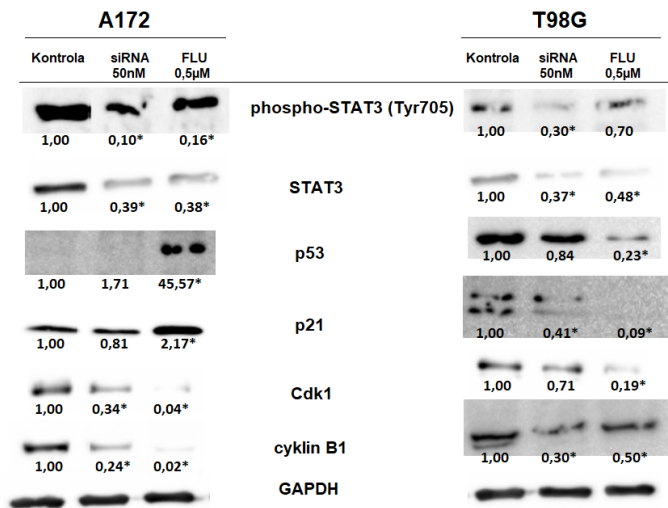
U buněk A172 bylo také možné pozorovat snížení exprese fosforylovaného STAT3 po ovlivnění vyššími koncentracemi FLU (0,5 µM a 1 µM), objevilo se dále mírné snížení exprese STAT3 ve všech třech testovaných koncentracích. Sníženou expresi STAT3 bylo možné pozorovat také u buněk T98G ovlivněných všemi testovanými koncentracemi FLU. Snížení exprese fosforylovaného STAT3 bylo možné pozorovat po podání 0,25 µM FLU a 1 µM FLU.

4.1.6. Vliv FLU na buněčný cyklus a aktivaci kaspáz u buněk A172 a T98G

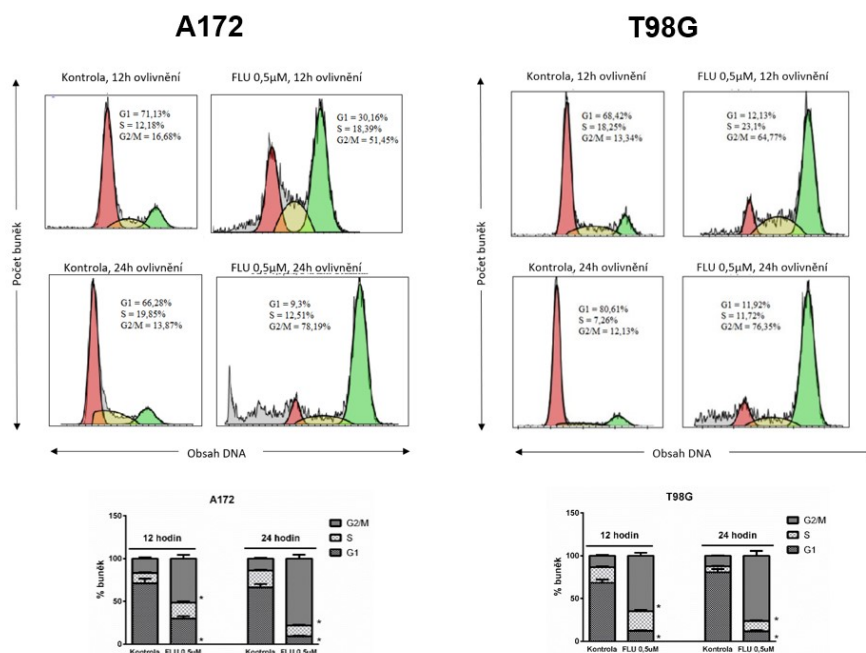
Pro stanovení vlivu FLU na expresi markerů buněčného cyklu u buněk A172 a T98G na úrovni proteinů byla využita metoda Western blot. Na základě výsledků získaných z předchozích experimentů, vypovídajících o vlivu FLU na expresi a aktivaci STAT3, byly do této analýzy zařazeny buňky A172 a T98G, které byly transfekovány siRNA proti STAT3.

Působení FLU snižovalo u obou buněčných linií A172 a T98G expresi STAT3 a jeho fosforylované formy (Obr. 10) podobně jako u buněk transfekovaných pomocí STAT3-siRNA. U buněk A172 se působením 0,5 μ M FLU zvyšovala exprese proteinů p53 a p21, zvýšení exprese p53 bylo možné pozorovat také u buněk A172 transfekovaných STAT3-siRNA. Působením FLU docházelo také k výraznému snížení exprese cdk1 a cyklinu B1 podobně jako u buněk transfekovaných pomocí STAT3-siRNA. Po ovlivnění FLU docházelo u buněk T98G ke snížení exprese proteinů p53, p21, cdk1 a cyklinu B1 a snížení hladin těchto proteinů bylo možné pozorovat také u buněk T98G transfekovaných pomocí STAT3-siRNA.

Vzhledem k výsledkům naznačujícím ovlivnění buněčného cyklu byla provedena analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie u buněk A172 a T98G (Obr. 11).



Obr. 10. Expres markerů spojených s buněčným cyklem u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 μ M FLU po dobu 48 h nebo transfekovaných STAT3-siRNA (50 nM) stanovená na úrovni proteinů pomocí metody Western blot za využití GAPDH jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

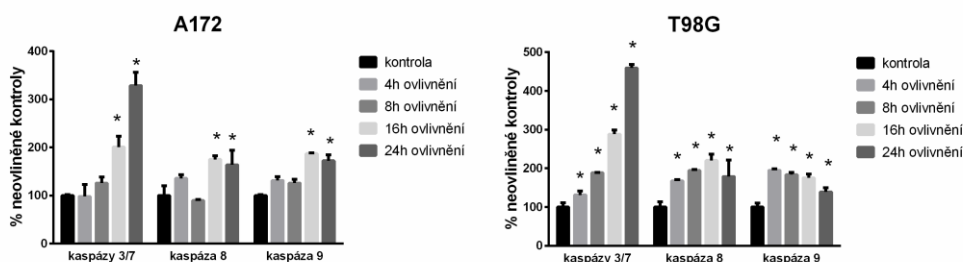


Obr. 11. Distribuce buněčného cyklu u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 μ M FLU po dobu 12 h a 24 h analyzovaná pomocí průtokové cytometrie. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Již po 12 h od ovlivnění pomocí 0,5 μ M FLU docházelo k významným změnám buněčného cyklu u obou testovaných buněčných linií A172 a T98G. Po 12 h se

výrazně snižoval počet buněk v G1 fázi a zároveň se buňky hromadily v G2/M fázi oproti neovlivněné kontrole. Tento efekt byl ještě zřetelnější po 24 h ovlivnění 0,5 μ M FLU.

Dále byl hodnocen vliv FLU na aktivaci iniciačních kaspáz 8 a 9 a efektorových kaspáz 3 a 7 u buněčných linií A172 a T98G (Obr. 12).



Obr. 12. Aktivita iniciačních kaspáz 8 a 9 a efektorových kaspáz 3/7 u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 μ M FLU po dobu 4 h, 8 h, 16 h a 24 h stanovená pomocí luminiscenčního měření. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

U buněk A172 a T98G docházelo působením FLU ke zvýšení aktivity iniciačních kaspáz 8 a 9, u buněk A172 především v delších časových intervalech (16 h a 24 h), u buněk T98G ve všech testovaných časových intervalech. Zvyšovala se také aktivita efektorových kaspáz 3/7 u obou buněčných linií A172 a T98G a zvýšení vykazovalo časovou závislost efektu.

4.1.7. Vliv FLU a TMZ na viabilitu a proliferaci GBM primárních kultur

V dalším kroku tohoto projektu bylo přistoupeno k ověření efektu FLU na GBM primární kultury odvozené z patientských vzorků získaných od pacientů podstupujících chirurgickou resekci GBM ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Pro toto stanovení bylo využito 23 GBM primárních kultur (viz Tab. 4), které byly ovlivněny různými koncentracemi FLU a různými koncentracemi TMZ.

Tab. 4. Hodnoty IC50 u GBM primárních kultur

	IC50 [μ M]	
	TMZ	FLU
GBM24	6249,0	0,510
GBM25	2742,0	1,026
GBM26	2941,0	8,145
GBM27	7383,0	2,024
GBM31	1664,0	4,153
GBM40	2830,0	7,655
GBM41	2317,0	7,382
GBM44	3898,0	1,433
GBM46	3219,0	1,444
GBM49	1601,0	0,661
GBM50	990,3	2,762
GBM51	2946,0	9,350
GBM53	1835,0	2,422
GBM57	5480,0	2,937
GBM58	2572,0	3,013
GBM59	35 435,0	2,978
GBM64	2076,0	2,119
GBM66	6945,0	1,736
GBM67	1187,0	8,618
GBM69	1468,0	2,093
GBM71	25 852,0	2,084
GBM72	11 236,0	3,376
GBM73	1300,0	1,753

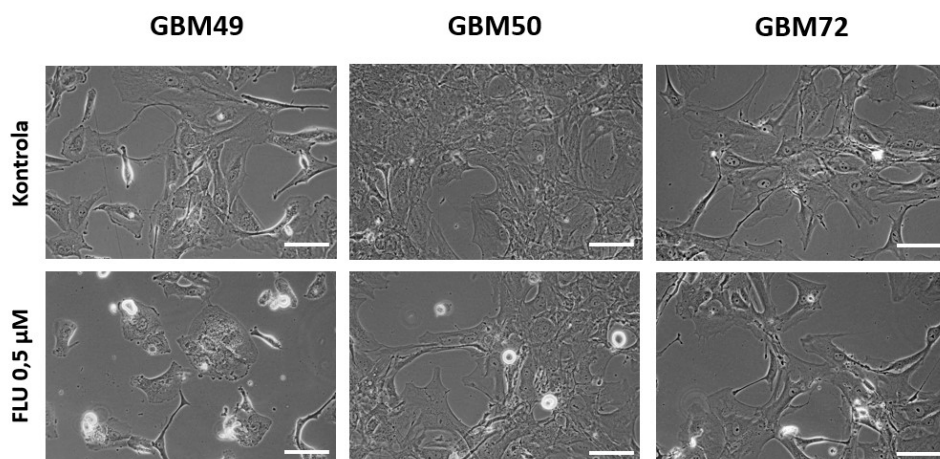
Všechny testované GBM primární kultury vykazovaly vyšší citlivost k FLU, zatímco citlivost těchto GBM primárních kultur k TMZ byla výrazně nižší. Na základě výsledků

primárního stanovení citlivosti buněk k FLU a s ohledem na jejich množství a schopnost růstu v rámci buněčné kultivace byly pro další testování vybrány GBM primární kultury GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73.

Efekt FLU na vybrané GBM primární kultury byl následně potvrzen také při analýze jejich proliferace pomocí přístroje xCELLigence, kde po ovlivnění 2 μ M FLU docházelo u všech testovaných GBM primárních kultur k výraznému snížení proliferace buněk, efekt 0,5 μ M FLU však nebyl jednoznačný.

4.1.8. Vliv FLU na morfologii buněk GBM49, GBM50 a GBM72

Vliv FLU na buněčnou morfologii vybraných GBM primárních kultur byl pozorován pomocí fázově kontrastní mikroskopie (Obr. 13).

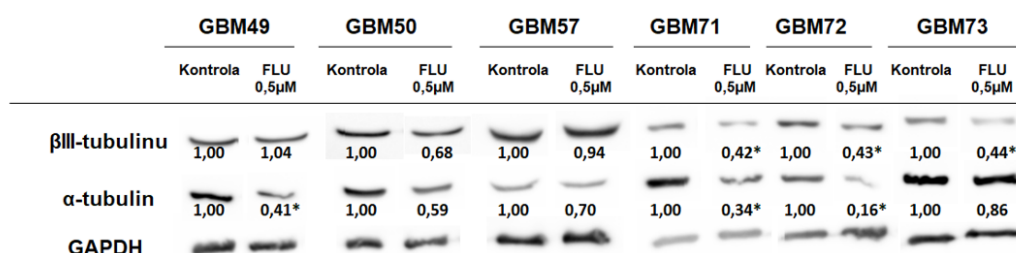


Obr. 13. Vliv 0,5 μ M FLU na morfologii GBM primárních kultur GBM49, GBM50 a GBM72 po 48 h od ovlivnění pozorovaný pomocí fázově kontrastní mikroskopie. Zvětšení 400x, měřítko 30 μ M.

Po ovlivnění 0,5 μ M FLU po dobu 48 h bylo pozorováno u všech zobrazených GBM primárních kontrol optické snížení počtu buněk, nejvýraznější byl tento efekt u buněk GBM49, kde zároveň bylo možné pozorovat změny v morfologii buněk, zaoblování buněk a také vznik vícejaderných buněk.

4.1.9. Vliv FLU na expresi tubulinů u GBM primárních kultur

U všech testovaných GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) byl následně stanoven vliv FLU na expresi α - a β III-tubulinu na úrovni proteinů metodou Western blot (Obr. 14).

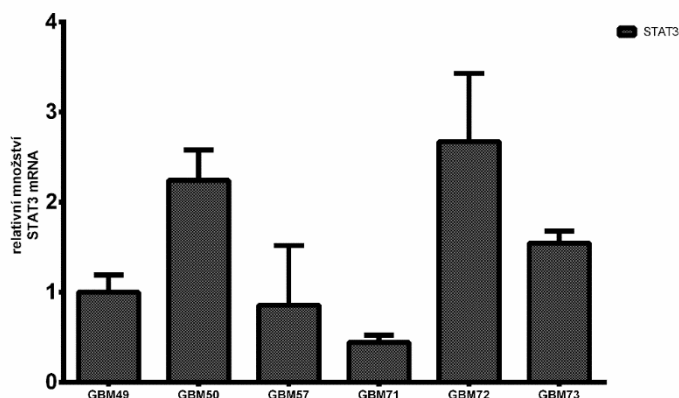


Obr. 14. Vliv 0,5 μ M FLU na expresi α - a β III-tubulinu na úrovni proteinů u GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) po 48 h od ovlivnění stanovený metodou Western blot za využití GAPDH jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

FLU po 48 h působení snižoval expresi α -tubulinu u všech testovaných GBM primárních kultur. U buněk GBM71, GBM72 a GBM73 dále docházelo po 48 h působení 0,5 μ M FLU k signifikantnímu poklesu hladiny β III-tubulinu oproti neovlivněné kontrole.

4.1.10. Vliv FLU na expresi STAT3 u GBM primárních kultur

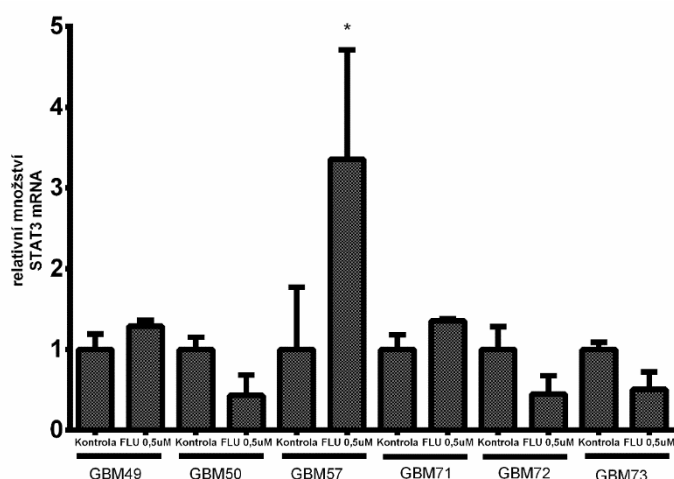
Vliv FLU na expresi STAT3 byl u GBM primárních kultur stanoven na úrovni mRNA a proteinů.



Obr. 15. Relativní množství STAT3 mRNA u GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) inkubovaných po dobu 48 h analyzované metodou RT-PCR za využití TBP jako referenčního genu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

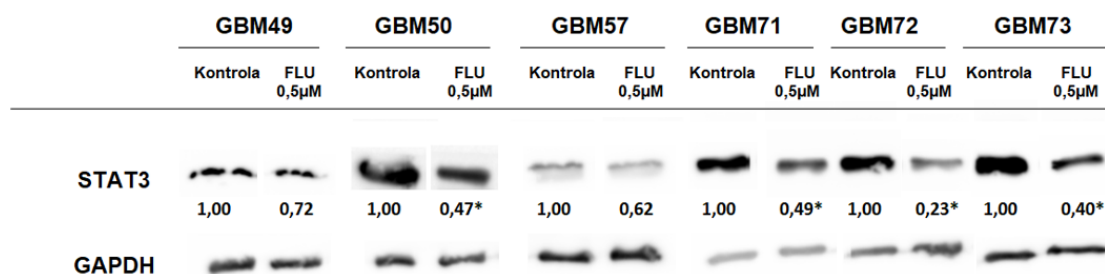
Relativní množství STAT3 mRNA vykazovalo značné rozdíly mezi jednotlivými testovanými GBM primárními kulturami, vyšší relativní množství byla nalezena u buněk GBM50, GBM72 a GBM73, zatímco značně snížené relativní množství STAT3 mRNA bylo demonstrováno u buněk GBM71 (Obr. 15).

Po ovlivnění 0,5 μM FLU se snižovalo relativní množství STAT3 mRNA u buněk GBM50, GBM72 a GBM73, u buněk GBM57 a GBM71 docházelo působením FLU naopak ke zvýšení relativního množství STAT3 mRNA, zatímco u buněk GBM49 zůstávala hladina STAT3 mRNA přibližně stejná jako u neovlivněné kontroly (Obr. 16).



Obr. 16. Relativní množství STAT3 mRNA u GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) ovlivněných 0,5 μM po dobu 48 h analyzované metodou RT-PCR za využití TBP jako referenčního genu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Také na úrovni proteinů docházelo ke snížení exprese STAT3, a to u všech testovaných GBM primárních kultur. Snížení hladiny STAT3 bylo statisticky signifikantní u primárních kultur GBM50, GBM71, GBM72 a GBM73. K mírnému snížení exprese STAT3 docházelo také u primárních kultur GBM49 a GBM57 (Obr. 17).

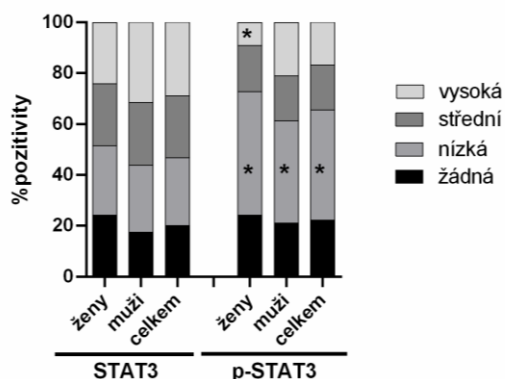


Obr. 17. Expres STAT3 u GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) ovlivněných 0,5 μM FLU po dobu 48 h stanovená metodou Western blot za využití GAPDH jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

4.1.11. Analýza exprese STAT3 v klinických vzorcích GBM

Pro zhodnocení klinické relevance STAT3 a jeho fosforylované formy v GBM byla provedena IHC analýza exprese STAT3 a phospho-STAT3 (Tyr705). Pro tuto analýzu bylo použito 90 vzorků GBM diagnostikovaných mezi lety 2012–2015.

Porovnání exprese STAT3 a p-STAT3



Obr. 18. IHC analýza exprese STAT3 a phospho-STAT3 (Tyr705) v GBM klinických vzorcích a porovnání exprese proteinů na základě pohlaví pacientů a jejich věku. * $p < 0,05$ signifikantní rozdíl v expresi STAT3, resp. p-STAT3 vs žádná pozitivita.

Naše výsledky ukazují, že alespoň nízká exprese STAT3, resp. jeho fosforylované formy byla ve více než 75 % analyzovaných GBM klinických vzorcích, vysoká exprese STAT3 pak byla zaznamenána u téměř 30 % všech testovaných vzorků, zatímco vysoká exprese phospho-STAT3 (Tyr705) byla demonstrována pouze u přibližně 15 % vzorků. Vysoká exprese STAT3 i jeho fosforylované formy se pak častěji vyskytovala u mužů, častěji u pacientů nad 70 let věku.

4.1.12. Vliv FLU na buňky U118MG

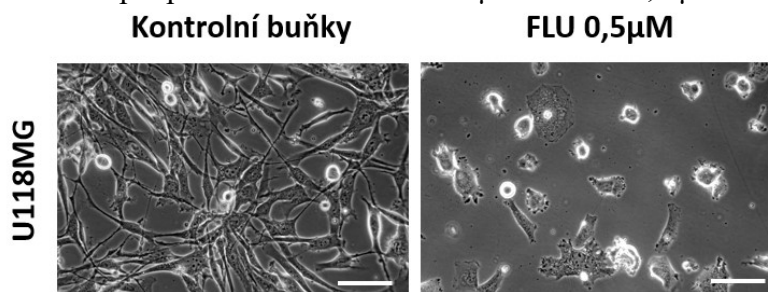
Pro možnost provedení *in vivo* implantace byl efekt FLU otestován na linii U118MG. Bylo provedeno testování vlivu FLU na viabilitu, proliferaci a buněčnou morfologii.

Tab. 5. Hodnoty IC50 u GBM buněčné linie U118MG

U118MG	IC50 [μM]	
	TMZ	FLU
	3056,0	1,329

GBM buněčná linie U118MG vykazovala výrazně vyšší citlivost k ovlivnění FLU, při ovlivnění vyššími koncentracemi FLU (1 μM ; 2 μM a 3 μM) pak bylo možné pozorovat časovou závislost inhibičního účinku FLU. Tyto výsledky byly dále potvrzeny také systémem xCELLigence.

Účinek FLU na GBM buněčnou linii byl dále pozorován pomocí fázově kontrastní mikroskopie po ovlivnění buněk 500 μM TMZ a 0,5 μM FLU.



Obr. 19. Vliv 0,5 μM FLU na morfologii GBM buněk U118MG po 48 h ovlivnění. Zvětšení 400x, měřítko 30 μm .

Výraznější změny v morfologii a počtu buněk byly pozorovány po podání 0,5 μM FLU, buňky se zmenšovaly a zaoblovaly a uvolňovaly se do kultivačního média. Působením FLU také u buněk U118MG docházelo ke ztrátám jejich výrazných buněčných výběžků a bylo možné pozorovat nastupující buněčnou smrt.

4.2. Výsledky *in vivo* experimentu

4.2.1. Vliv FLU a TMZ na růst nádorů a proliferační index Ki67 v nu-nu myších

Po ukončení pokusu byly narostlé nádory odebrány a byla porovnána jejich velikost a procento proliferačního markeru Ki67.

Tab. 6. Vliv FLU a TMZ na velikost nádorů a hodnotu proliferačního markeru Ki67 získaných z nu-nu myší. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

	počet nádorů	průměrná váha [g]	proliferační marker Ki67 [%]
A – Kontrolní skupina	n = 6	0,13 ± 0,02	25
B – FLU 10 mg/kg	n = 4	0,03 ± 0,01*	10
C – FLU 25 mg/kg	n = 4	0,05 ± 0,02*	15
D – TMZ 0,9 mg/kg	n = 6	0,05 ± 0,03*	15

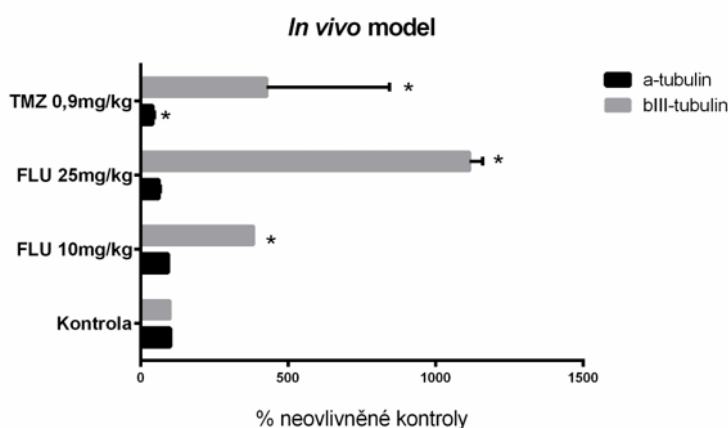
Po podání obou testovaných léčiv docházelo k statisticky významnému poklesu hmotnosti nádorů vzniklých po implantaci buněčné linie U118MG, k největšímu poklesu hmotnosti docházelo u skupiny atymických myší ovlivněných FLU o koncentraci 10 mg/kg, u kterých docházelo k poklesu hmotnosti nádorů více než 4x.

Ovlivněním TMZ a FLU docházelo také ke snížení hodnoty proliferačního markeru Ki67, největší snížení jeho exprese bylo pozorováno u nádorů z nu-nu myší, kterým byl podáván FLU o koncentraci 10 mg/kg.

4.2.2. Vliv FLU a TMZ na expresi tubulinů u nádorů získaných z nu-nu myší

Nádory získané z nu-nu myší byly dále využity k analýze exprese markerů spojených s mikrotubulárním cytoskeletem na úrovni proteinů metodou Western blot.

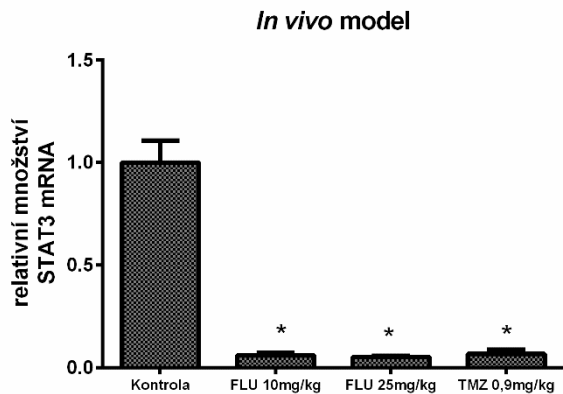
U nádorů získaných z nu-nu myší, kterým byl podáván FLU, se snižovala exprese α -tubulinu, naopak u těchto nádorů se zvyšovala exprese β III-tubulinu. Po podání TMZ byla u nádorů získaných z těchto myší statisticky signifikantně snížena hladina α -tubulinu, zatímco hladina β III-tubulinu byla u všech tří skupin nádorů zvýšena (Obr. 20).



Obr. 20. Vliv FLU (10 mg/kg a 25 mg/kg) a TMZ (0,9 mg/kg) na expresi α -tubulinu a β III tubulinu u nádorů získaných po implantaci GBM buněčné linie U118MG do nu-nu myší stanovená na úrovni proteinů metodou Western blot za využití PCNA jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

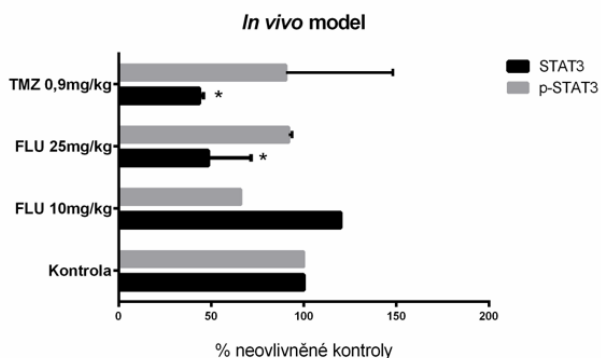
4.2.3. Vliv FLU a TMZ na expresi STAT3 u nádorů získaných z nu-nu myší

U nádorů získaných z nu-nu myší bylo dále sledováno relativní množství STAT3 mRNA pomocí metody RT-PCR a exprese STAT3 a jeho fosforylované formy na úrovni proteinů metodou Western blot (Obr. 22).



Obr. 21. Vliv FLU (10 mg/kg a 25 mg/kg) a TMZ (0,9 mg/kg) na relativní množství STAT3 mRNA u nádorů získaných po implantaci GBM buněčné linie U118MG do nu-nu myši analyzované na úrovni mRNA metodou RT-PCR za využití B2M jako referenčního genu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Podání obou koncentrací FLU snižovalo u nádorů získaných z příslušných nu-nu myši relativní množství STAT3 mRNA. Toto signifikantní snížení relativního množství bylo srovnatelné po podání obou testovaných koncentrací. Také nádory získané z nu-nu myši ovlivněných TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg vykazovaly snížené relativní množství STAT3 mRNA (Obr. 21).



Obr. 22. Vliv FLU (10 mg/kg a 25 mg/kg) a TMZ (0,9 mg/kg) na expresi STAT3 a fosfo-STAT3 (Tyr705) u nádorů získaných po implantaci GBM buněčné linie U118MG do nu-nu myši stanovené na úrovni proteinů metodou Western blot za využití PCNA jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Po podání FLU o koncentraci 25 mg/kg docházelo u nádorů získaných z příslušných nu-nu myši ke snížení exprese STAT3. Hladiny fosforylovaného STAT3 se naopak snižovaly u nádorů získaných z nu-nu myši ovlivněných FLU o koncentraci 10 mg/kg. U vzorků získaných z nu-nu myši ovlivněných TMZ docházelo ke snížení exprese STAT3, hladiny fosforylovaného STAT3 nevykazovaly mezi jednotlivými vzorky jednoznačný výsledek (Obr. 22).

5. Diskuse

Glioblastoma multiforme (GBM) je nejčastější primární nádor mozku u dospělých s typickým rychlým invazivním růstem, vysokou agresivitou a aktivní proliferací. Za nepříznivou prognózou pacientů s GBM stojí rychlé šíření nádorové masy, rekurence onemocnění i po iniciační léčbě, ale také vysoká rezistence k léčbě. Vzhledem k infiltrativnímu charakteru nádoru jsou možnosti chirurgického odstranění pouze omezené a ačkoli zařazení konkomitantní chemoradioterapie do standardního léčebného protokolu zvýšilo průměrné přežití pacientů, nízká prostupnost chemoterapeutik přes hematoencefalickou bariéru a rozvíjející se rezistence k léčbě činí současnou terapeutickou strategii nedostatečnou [10, 15, 30].

Právě nízká účinnost současné léčby je jedním z důvodů intenzivního výzkumu ve snaze o nalezení nových terapeutických možností GBM. Řada klinických studií se v současnosti zaměřuje na využití cílené biologické léčby a monoklonálních protilátek při léčbě GBM. Dalším ze záměrů současného výzkumu GBM je lepší porozumění biologickým charakteristikám GBM a identifikace nových potenciálních cílů nádorové terapie, jejichž objevení by dále vedlo k vývoji efektivnějších a účinnějších terapeutických protokolů [26-28, 30].

Cílení nové potenciální terapie však může být zaměřeno také na již studované významné biomarkery v GBM, nebo využití již zavedených terapeutických přístupů pro nové aplikace v léčbě. Jedním ze základních přístupů k léčbě nádorového bujení je inhibice a odstranění nádorových buněk prostřednictvím interference s mikrotubulárním cytoskeletem nádorových buněk, který se u GBM vzhledem k hojnému zastoupení mikrotubulů v buňkách mozkové masy a specifickým změnám v přítomnosti jednotlivých isoformů jeví jako potenciálně vhodný cíl působení [42, 63].

Klinická úspěšnost v současnosti využívaných látek působících na mikrotubuly je však limitována jejich rozsáhlými vedlejšími účinky, což vede ke snaze o nalezení nových látek se stejnými mechanismy účinku, ale vylepšenými vlastnostmi. Klasický proces vývoje nového protinádorového léčiva je ovšem velmi zdlouhavý a finančně náročný, slibnou alternativou proto může být využití léčiv původně určených pro jinou indikaci, u kterých byla objevena protinádorová aktivita. Tento přístup přináší výhodu především v již známých informacích o bezpečnosti a toxicitě díky často běžnému použití takových látek v klinické praxi [51, 64].

Protinádorový účinek na celou řadu buněk solidních nádorů i hematologických malignit byl takto prokázán u léčiv ze skupiny benzimidazolů, které jsou původní indikací anthelmintika používaná v humánní i veterinární medicíně. Tyto látky mají schopnost se vázat na mikrotubuly a modulovat jejich polymerizaci a strukturu. Také u GBM byl s úspěchem testován zástupce této skupiny léčiv mebendazol a jeho inhibiční aktivita a schopnost přestupu přes hematoencefalickou bariéru umožnily jeho vstup do klinického testování [65, 66].

Vyšší afinitu při vazbě na mikrotubuly vykazoval další zástupce této skupiny léčiv, flubendazol (FLU), u kterého již v předchozích studiích byla popsána protinádorová aktivita u buněk nádorů prsu, melanomu, kolorektálního karcinomu atd, inhibiční účinek FLU byl dále popsán také u buněk gliomů [55, 60, 67-69]. Na základě těchto dříve publikovaných výsledků naznačujících potenciál využití FLU, bylo cílem této práce otestovat cytotoxický efekt FLU v rozličných *in vitro* a *in vivo* GBM modelech.

Nejprve byl otestován vliv FLU na viabilitu a proliferaci GBM buněk za využití tří stabilizovaných GBM buněčných linií A172, T98G a U118MG, u kterých byl účinek FLU porovnán s u GBM standardně využívaným chemoterapeutikem temozolomidem (TMZ). Všechny tři testované GBM buněčné linie vykazovaly výrazně vyšší citlivost k FLU, jejich IC50 pro FLU se pohybovalo mezi 1,3 μM a 3,9 μM . Tyto hodnoty jsou podobné dříve

zjištěným hodnotám IC50 u různých druhů nádorových buněk, IC50 pro FLU se v rozličných nádorových modelech pohybovala mezi 0,25 μM a 6,8 μM [54, 60, 67-71]. V rozsáhlé studii Michaelis a kol. (2015) byla testována citlivost 321 nádorových buněčných linií různých typů nádorů za účelem stanovení jejich IC90 (indikující úplnou inhibici buněk), což vedlo ke zjištění, že tato hodnota je pro 36 % testovaných buněčných linií ovlivněných FLU nižší než 1 μM [55]. Naproti tomu IC50 pro TMZ u všech tří GBM buněčných linií přesahovala 1800 μM , což vysoce přesahuje klinicky relevantní koncentrace TMZ i maximální dosažitelné koncentrace TMZ v organismu [72, 73]. Ačkoli inhibiční efekt FLU nevykazoval jasnou časovou závislost, již při ovlivnění 0,5 μM FLU bylo prokázáno snížení viability i proliferace GBM buněčných linií v celém časovém intervalu ovlivnění (do 72 h).

Pro další verifikaci efektu FLU na viabilitu a proliferaci GBM buněk bylo toto testování dále provedeno na GBM primárních kulturách, které byly v rámci této práce odvozeny z patientských vzorků získaných od pacientů podstupujících chirurgické ošetření ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Také citlivost těchto GBM primárních kultur k FLU byla výrazně vyšší než citlivost k běžně využívanému TMZ, IC50 pro FLU se pohybovala mezi 0,6 μM a 9,3 μM . Proliferace vybraných GBM primárních kultur byla inhibována po podání 2 μM FLU po celou testovanou inkubační dobu (do 72 h), efekt 0,5 μM FLU na inhibici proliferace buněk ale nebyl jednoznačný a vykazoval odlišnosti v různých GBM primárních kulturách.

Vliv 0,5 μM FLU na buněčnou viabilitu, ale také na buněčnou morfologii byl dále u GBM buněčných linií a vybraných GBM primárních kultur hodnocen pomocí fázově kontrastní mikroskopie, která prokázala nejen kvantitativní vliv (snížení počtu buněk), ale také výrazné změny kvalitativní – v buněčné morfologii a chování. Buňky GBM buněčných linií i GBM primárních kultur působením FLU ztrácely svůj typický tvar, zakulacovaly se, ztrácely adharenci a vytvářely odlišné morfologické figury včetně vícejaderných buněk. Také pomocí mikroskopického zobrazení bylo možné pozorovat rozdílnou citlivost jednotlivých testovaných buněčných modelů k působení FLU, což může být způsobeno celou řadou důvodů zahrnujících také velkou heterogenitu nádoru nebo možné rozdíly v biologických charakteristikách mezi použitými buněčnými modely.

Rozdílná citlivost k podání FLU může být také způsobena měnící se expresí intercelulárních cílů, na které daná látka působí. Studie Abbassi a kol. (2019) naznačila korelaci citlivosti jednotlivých GBM buněčných modelů k látkám ovlivňujícím mikrotubuly s jejich základní expresí α/β -tubulinu [74]. Ačkoli v rámci této práce nebylo provedeno srovnání základní hladiny α/β -tubulinu v jednotlivých testovaných GBM modelech, je nutné uvažovat i o možnosti jejich rozdílné exprese. V tomto případě pak tato možná souvislost mezi kolísající citlivostí jednotlivých GBM buněk k FLU a základní úrovní exprese α/β -tubulinu zakládá nutnost dalšímu výzkumu.

Základní anthelmintický účinek FLU se na molekulární úrovni projevuje vazbou léčiva na β -tubulin a také v předchozích studiích byl efekt FLU na mikrotubuly potvrzen u celé řady nádorových buněk [52, 57]. Dalším cílem této práce tak bylo posoudit vliv FLU na mikrotubulární cytoskelet a posléze i další složky cytoskeletu u GBM buněčných linií A172 a T98G. Tyto dvě linie patří mezi nejčastější experimentální modely pro GBM výzkum [75], zároveň na základě našeho předchozího testování vykazují rozdílnou citlivost k FLU i TMZ. Naše výsledky potvrzují předchozí závěry, totiž že FLU již ve velmi nízké dávce (0,1 μM) byl schopen inhibovat polymeraci mikrotubulů a ovlivňovat strukturu a organizaci mikrotubulární sítě. Ve vyšších testovaných dávkách navíc FLU snižoval expresi acetylovaného- α -tubulinu, což naznačuje možné změny v celkovém rozložení posttranslačních modifikací tubulinů působením FLU.

FLU navíc ovlivňoval expresi α - a β III-tubulinu u GBM buněčných linií A172 a T98G a také u GBM primárních kultur, a to působením léčiva již v koncentraci 0,5 μM . U GBM buněčných linií A172 a T98G byl dále posouzen vliv FLU na další složky buněčného cytoskeletu, kdy jsme

pozorovali značné zmeny ve struktuře a organizaci všech tří základních složek cytoskeletu. Výraznou změnou byla především ztráta dlouhých výběžků buněk tvořených α -tubulinovými a vimentinovými vlákny, a především značné zmenšování buněk působením již nízkých koncentrací FLU.

Inhibice mikrotubulů může být u buněk spojena se zastavením buněčného cyklu vyvolaným zvýšenou expresí proteinu p21 [76], což výsledky této práce potvrzují. U GBM buněčných linií A172 a T98G byla již při působení 0,5 μ M FLU zvýšena hladina proteinu p21 a zároveň docházelo ke snížení exprese proteinů cdk1 a cyklinu B1, naznačující zastavení buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze. To bylo dále potvrzeno analýzou distribuce buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie, které odhalilo zvýšení podílu buněk v G2/M fázi po 12 h působení 0,5 μ M FLU (na 51,45 % u buněk A172 a 64,77 % u buněk T98G) a ještě výrazněji pak po 24 h působení 0,5 μ M FLU (na 78,19 % u buněk A172 a 76,35 % u buněk T98G).

Ačkoli cílení FLU na mikrotubulární cytoskelet a jeho efekt na rozložení buněčného cyklu jsou v současné době již známy [57, 60, 67, 69, 77], přesný mechanismus účinku jeho protinádorového působení zůstává neobjasněný. Existuje celá řada studií navrhuje různé další mechanismy působení FLU, zahrnující ovlivnění imunitního prostředí nádoru nebo vliv na STAT3 signální dráhu [57].

Molekula STAT3 patří mezi intenzivně studované potenciální cíle nádorové terapie GBM. Její kontinuální aktivace v GBM hraje významnou roli v samotné tumorigenezi nádoru, přispívá ke zvýšené invazivitě GBM buněk a ke vzniku agresivnějšího fenotypu GBM. Nedávné studie také identifikovaly STAT3 jako jeden z iniciátorů epiteliálně-mesenchymální transformace v GBM, aktivace STAT3 dále reguluje imunitní prostředí nádoru a vede k potlačení imunitní odpovědi. Molekula STAT3 je také nezbytná pro proliferaci a zachování populace pluripotentních GBM kmenových buněk. Inhibice STAT3 by tak mohla blokovat proliferaci GBM buněk a vést k indukci apoptózy, přesto je důležité brát i nadále v potaz vysokou heterogenost GBM, kvůli které je odpověď těchto buněk na inhibici STAT3 nepředvídatelná [78-80].

Již v předchozích studiích byl demonstrován inhibiční efekt FLU na aktivaci STAT3 např. u buněk nádorů prsu nebo kolorektálního karcinomu [58, 70]. Také v rámci této práce byl testován vliv FLU na expresi a aktivaci molekuly STAT3 a naše výsledky ukazují snížení aktivace a také exprese STAT3 u GBM buněčných linií A172 a T98G po ovlivnění 0,5 μ M FLU. Pro větší objasnění efektu FLU na STAT3 bylo dále provedeno testování možné koncentrační nebo časové závislosti tohoto efektu, nicméně pouze u GBM buněk A172 bylo možné pozorovat mírnou koncentrační závislost efektu FLU na aktivaci molekuly STAT3. Časová závislost tohoto efektu nebyla pozorována ani u jedné z testovaných GBM buněčných linií. Při porovnání relativního množství STAT3 na úrovni mRNA v jednotlivých testovaných časových intervalech (24 h, 48 h a 72 h) však byly pozorovány velmi výrazné změny, u GBM buněčné linie T98G docházelo k časově závislému zvyšování relativního množství STAT3, což může také ovlivňovat efekt FLU na expresi a aktivaci této molekuly.

Expresie a aktivace STAT3 se výrazně liší mezi jednotlivými buněčnými modely GBM a také studie zabývající se zkoumáním hladiny STAT3 a její aktivace v patientských kohortách reportují velmi rozdílné výsledky, pohybující se mezi 9 % a 83 % zastoupením aktivní fosforylace STAT3 [81-86]. Pro získání lepší představy o klinické relevanci exprese a aktivace STAT3 jsme v rámci této práce dále provedli imunohistochemickou analýzu tohoto markeru u 90 klinických vzorků GBM diagnostikovaných v letech 2012-2015 v Králověhradeckém kraji. Naše patientská kohorta pak vykazovala více než 75 % případů s alespoň nízkou expresí STAT3 a jeho aktivované (tzn. fosforylované formy). Vyšší exprese STAT3 pak byla častěji nalezena u pacientů nad 70 let věku, častěji u mužů. Tento výsledek naznačuje možnou terapeutickou výhodu těchto pacientů při využití látek cílících na molekulu STAT3 a její aktivaci.

Také u jednotlivých GBM primárních kultur byly nalezeny značné rozdíly v relativním množství STAT3 na úrovni mRNA, které mohou vysvětlovat rozdílnou odpověď na působení STAT3. Zatímco u GBM primárních kultur se zvýšeným relativním množstvím STAT3 (GBM50, GBM72 a GBM73) docházelo k inhibičnímu efektu STAT3 na úrovni mRNA a také na úrovni proteinu, inhibiční efekt na relativní množství STAT3 mRNA nebyl pozorován v GBM primárních kulturách se sníženým množstvím mRNA (GBM71), na úrovni proteinů však ke snížení exprese docházelo.

Studie Niu a kol. (2004) demonstrovala negativní korelaci mezi aktivací molekuly STAT3 a expresí proteinu p53 naznačující možnost vyvolání buněčné smrti aktivované proteinem p53 po zablokování aktivace STAT3. Také naše výsledky ukazují, že inhibicí molekuly STAT3 pomocí specifické siRNA docházelo u GBM buněčné A172 linie ke zvýšení hladiny proteinu p53 a ke snížení exprese cdk1 a cyklinu B1, naznačující zablokování buněčného cyklu na přechodu G2 a M fáze. Zatímco snížení exprese a aktivace STAT3 bylo při ovlivnění GBM buněčné linie A172 0,5 μM FLU srovnatelné s použitím specifické siRNA proti STAT3, zvýšení exprese proteinu p53 a snížení exprese cdk1 a cyklinu B1 byla po ovlivnění FLU výraznější. Také u GBM buněčné linie T98G docházelo použitím STAT3-siRNA a 0,5 μM FLU ke snížení hladiny cdk1 a cyklinu B1. Inhibice STAT3 nebo ovlivnění hladiny proteinu p53 prostřednictvím FLU bylo však nejasné, a proto je nezbytné jeho další testování za použití různých koncentrací FLU a STAT3-siRNA a také dalších časových intervalů.

Na základě dosavadních výsledků, které naznačovaly zastavení buněčného cyklu a vyvolání buněčné smrti po ovlivnění 0,5 μM FLU byla testována aktivita iniciačních a efektorových kaspáz u GBM buněčných linií A172 a T98G. Efekt FLU na zvýšení aktivity především efektorové kaspázy 3 byl již dříve prokázán u rozličných typů nádorových buněk, a to již ve velmi nízkých koncentracích (např. 0,1 μM u buněk nádorů prsu, 0,3 μM u buněk kolorektálního karcinomu, nebo 1 μM u buněk melanomu), často tento efekt FLU vykazoval také koncentrační a časovou závislost [58, 60, 67, 70, 77]. Také v této práci bylo prokázáno, že testovaná koncentrace FLU vyvolává časově aktivaci iniciačních kaspáz 8 a 9 u ovlivněných buněk. K signifikantnímu nárůstu aktivity těchto kaspáz docházelo u GBM buněčné linie T98G již po 4 h ovlivnění 0,5 μM FLU, zatímco signifikantní zvýšení aktivity iniciačních kaspáz u GBM buněk A172 bylo pozorováno až ve vyšších časových intervalech (16 h a 24 h). Tomu následně odpovídalo také časově závislé zvýšení aktivity efektorových kaspáz 3 a 7, jejichž významný nárůst byl u GBM buněk pozorovatelný již po 4 h od ovlivnění FLU, zatímco u GBM buněčné linie A172 docházelo k signifikantnímu zvýšení opět až v delších časových intervalech. Tyto výsledky naznačují rychlejší nástup účinku FLU u buněk T98G, u kterých také dochází k větší inhibici polymerizace mikrotubulů a k výraznějšímu smršťování buněk působením FLU. Tento rychlý inhibiční účinek FLU na GBM buněčnou linii T98G může být také důvodem neměnné exprese proteinů p21 a p53 po 48 h inkubaci s 0,5 μM FLU a zdůrazňuje důležitost dalšího testování vlivu FLU na tyto buňky především v nižších časových intervalech ovlivnění.

Testování *in vitro* patří mezi základní nástroje buněčné biologie využívané ve výzkumu GBM, jeho využití však přináší kromě značných výhod i své nedostatky. V současnosti využívané buněčné modely nemohou reprodukovat komplexní mikroprostředí GBM a heterogenitu nádoru, jejich dlouhodobá subkultivace navíc může přinášet změny v biologických a molekulárních vlastnostech buněk. Využití většího množství rozličných stabilizovaných buněčných linií je tak nezbytné pro získání relevantních výsledků. Také využití GBM primárních kultur odvozených z patientských vzorků přináší individualizaci testování nových potenciálních léčiv díky své schopnosti uchovávat si heterogenní vlastnosti původního nádoru po určité množství subkultivací. Chybějící nádorové mikroprostředí však vyžaduje využití dalších buněčných modelů [87, 88].

Realističtější model GBM respektujícím nádorové mikroprostředí by mohly být 3D buněčné kultury, jejichž využití je v současné době na vzestupu. Přesto jsou s jejich použitím stále spojeny určité limitace, zahrnující také chybějící jasně definovaný experimentální protokol pro jejich přípravu, který by umožňoval mezi-laboratorní reprodukovatelnost [88, 89].

Dalším modelem dlouhodobě využívaným ve výzkumu nádorů jsou *in vivo* implantace GBM buněk do zvířecích modelových organismů. Nejčastějším způsobem *in vivo* implantace u buněk GBM je subkutánní umístění na boku modelového organismu, což umožňuje vizuální pozorování nádoru [87, 90]. Také v této práci bylo na základě předchozích výsledků přistoupeno k implantaci GBM buněk do modelového organismu a testování vlivu FLU na takto vzniklé nádory.

Na základě své schopnosti tumorigenity byla pro implantaci zvolena GBM buněčná linie U118MG, které byla subkutánně injikována do atymických myší, kterým byl následně po zahájení růstu nádorů podáván perorálně FLU. Také u takto vzniklých nádorů bylo možné pozorovat inhibiční vliv FLU na jejich růst a hmotnost. Při podání FLU o koncentraci 10 mg/kg byla v porovnání s kontrolou výsledná hmotnost nádorů více než 4x nižší. Kromě toho byly podáním FLU sníženy také hodnoty proliferačního indexu měřeného expresí markeru Ki67.

V *in vivo* modelu naopak nebylo potvrzeno snížení exprese β III-tubulinu po ovlivnění FLU, což může být také způsobeno reakcí buněk na opakované podávání FLU inhibujícího polymerizaci mikrotubulů. Bylo však zaznamenáno snížení hladiny exprese molekuly STAT3 u nádorů získaných z myších modelů ovlivněných FLU o koncentraci 25 mg/kg, a to především na úrovni mRNA. Vzhledem k tomu, jak důležitou roli hraje nádorové mikroprostředí v GBM je nezbytné vnímat limitaci zvoleného *in vivo* modelu se subkutánní implantací [91]. *In vivo* modely vzniklé přímou implantací buněk do mozku modelového organismu jsou pro studium chování nádoru vhodnější díky přítomnosti mikroprostředí mozku a zachování integrity buněk iniciujících GBM [87]. Zavedení takového modelu, případně využití GBM primárních kultur pro implantaci do *in vivo* modelového systému je tak dalším důležitým krokem pro ověření účinku FLU na buňky GBM.

Na základě výsledků této disertační práce je možné konstatovat, že FLU je nadějným protinádorovým léčivem vykazujícím inhibiční účinek na proliferaci GBM buněk, což bylo potvrzeno s využitím několika GBM buněčných modelů. Je však nezbytné další testování, které by se zaměřilo jednak na detailní posouzení vlivu FLU na mikrotubulární cytoskelet a souvislost tohoto účinku se základní expresí tubulinů. Stejně tak je další testování důležité pro hlubší posouzení efektu FLU na expresi a aktivaci STAT3 signální dráhy.

6. Závěr

Tato práce se zabývala studiem inhibičního vlivu FLU na buňky GBM v různých buněčných modelech *in vitro* a *in vivo*. Na základě našich získaných výsledků je možné závěry práce shrnout následovně:

- FLU účinně inhiboval viabilitu a proliferaci GBM stabilizovaných buněčných linií (A172, T98G a U118MG) a GBM primárních kultur, a to několikanásobně účinněji než v současnosti běžně používané chemoterapeutikum TMZ. FLU také účinně snižoval růst nádorů v *in vivo* modelovém systému, kde byla velikost a hmotnost výsledného nádoru po aplikaci FLU srovnatelná s hmotností hmotnosti nádoru po aplikaci TMZ.
- FLU ovlivňoval celkovou morfolonii buněk ve všech testovaných GBM buněčných systémech, způsoboval zaoblování buněk a jejich zmenšování, vznik vícejaderných buněk, případně ztrátu dlouhých buněčných výběžků.
- FLU inhiboval polymerizaci mikrotubulů, měl výrazný vliv na jejich strukturu a organizaci u GBM buněčných linií A172 a T98G. U všech testovaných buněčných systému (GBM buněčných linií a GBM primárních kultur) FLU snižoval expresi α - a β III-tubulinu, u GBM buněčných linií A172 a T98G navíc snižoval přítomnost acetylovaného- α -tubulinu.
- Tento efekt na expresi β III-tubulinu však nebyl potvrzen v nádorech získaných z *in vivo* modelového systému.
- Působením FLU docházelo ke snížení exprese a aktivace molekuly STAT3 u GBM buněčných linií A172 a T98G, které bylo srovnatelné s inhibicí exprese STAT3 pomocí specifické siRNA. U vybraných GBM primárních kultur docházelo působením FLU ke snížení exprese STAT3, snížení exprese STAT3 bylo také potvrzeno u nádorů získaných z *in vivo* modelového systému.
- Klinická relevance cílení na molekulu STAT3 byla potvrzena v patientské kohortě, která vykazovala u více než 75 % případů pozitivitu exprese STAT3 a jeho aktivované formy.
- Působení FLU vedlo k zastavení buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze a k aktivaci iniciačních a efektorových kaspáz u GBM buněčných linií A172 a T98G.

7. Seznam použité literatury

1. Alberts B., J.A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell. Sixth Edition.* 2014, New York and Abingdon, UK: Garland Science. 1464 Pages with 1492 Illustrations.
2. Cree, I.A., *Cancer biology.* Methods Mol Biol, 2011. **731**: p. 1-11.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Bertram, J.S., *The molecular biology of cancer.* Mol Aspects Med, 2000. **21**(6): p. 167-223.
5. KONTOMANOLIS, E.N., et al., *Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review.* Anticancer Research, 2020. **40**(11): p. 6009-6015.
6. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer.* Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
7. Holt, S.E. and J.W. Shay, *Role of telomerase in cellular proliferation and cancer.* J Cell Physiol, 1999. **180**(1): p. 10-8.
8. Ayob, A.Z. and T.S. Ramasamy, *Cancer stem cells as key drivers of tumour progression.* Journal of Biomedical Science, 2018. **25**(1): p. 20.
9. Jessen, K.R., *Glial cells.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(10): p. 1861-1867.
10. Fadrus, P., et al., *Komplexní terapie gliomů mozku.* 2015. **9**(5): p. 214-217.
11. Marquet, G., et al., *Grading glioma tumors using OWL-DL and NCI Thesaurus.* AMIA Annu Symp Proc, 2007. **2007**: p. 508-12.
12. Davis, M.E., *Epidemiology and Overview of Gliomas.* Semin Oncol Nurs, 2018. **34**(5): p. 420-429.
13. Newton, H.B., *Overview of the Molecular Genetics and Molecular Chemotherapy of GBM, in Glioblastoma: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies,* S.K. Ray, Editor. 2010, Springer New York: New York, NY. p. 1-42.
14. Cahill, D. and S. Turcan, *Origin of Gliomas.* Semin Neurol, 2018. **38**(1): p. 5-10.
15. de Gooijer, M.C., et al., *An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways.* Trends Mol Med, 2018. **24**(9): p. 763-780.
16. Urbanska, K., et al., *Glioblastoma multiforme - an overview.* Contemp Oncol (Pozn), 2014. **18**(5): p. 307-12.
17. Miranda, A., et al., *Breaching barriers in glioblastoma. Part I: Molecular pathways and novel treatment approaches.* Int J Pharm, 2017. **531**(1): p. 372-388.
18. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma.* Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
19. Balca-Silva, J., et al., *Cellular and molecular mechanisms of glioblastoma malignancy: Implications in resistance and therapeutic strategies.* Semin Cancer Biol, 2019. **58**: p. 130-141.
20. Ray-Chaudhury, A., *Pathology of Glioblastoma Multiforme, in Glioblastoma: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies,* S.K. Ray, Editor. 2010, Springer New York: New York, NY. p. 77-84.
21. Louis, D.N., et al., *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.* Neuro-Oncology, 2021. **23**(8): p. 1231-1251.
22. Jovčevska, I., *Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors.* Bosn J Basic Med Sci, 2019. **19**(2): p. 116-124.
23. Zhang, P., et al., *Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy.* Frontiers in Molecular Biosciences, 2020. **7**.
24. Steponaitis, G. and A. Tamasauskas, *Mesenchymal and Proneural Subtypes of Glioblastoma Disclose Branching Based on GSC Associated Signature.* International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(9): p. 4964.
25. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.* Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
26. Carrabba, G., D. Mukhopadhyay, and A. Guha, *Aberrant Signalling Complexes in GBMs: Prognostic and Therapeutic Implications, in Glioblastoma: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies,* S.K. Ray, Editor. 2010, Springer New York: New York, NY. p. 95-129.
27. Ramos, A.D., R.S. Magge, and R. Ramakrishna, *Molecular Pathogenesis and Emerging Treatment for Glioblastoma.* World Neurosurg, 2018. **116**: p. 495-504.
28. Kramář F., M.M., Belšánová B., Hálková T., Bradáč O., Netuka D., Beneš V., *Genetické a epigenetické faktory podmiňující vznik a prognózu mozkových gliomů – souhrn současných poznatků.* Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, 2016(4): p. 400-405.
29. Fadrus, P., et al. *Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie.* 2010.
30. Lakomý, R., Burkoň, Petr, Burkoňová, Daniela, Jančálek, Radim, *Nové možnosti léčby glioblastoma multiforme.* Klinická onkologie, 2010(23(6)): p. 381-387.
31. Fadrus, P., et al., *Surgical treatment of brain gliomas.* Onkologie, 2021. **15**(5): p. 213-217.
32. Szopa, W., et al., *Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives.* Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 8013575.
33. Strobel, H., et al., *Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy.* Biomedicines, 2019. **7**(3).
34. Arora, A. and K. Somasundaram, *Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won?* Cancer Biol Ther, 2019. **20**(8): p. 1083-1090.
35. Singh, N., et al., *Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review.* Cancer Drug Resist, 2021. **4**(1): p. 17-43.
36. Skarkova, V., et al., *The Evaluation of Glioblastoma Cell Dissociation and Its Influence on Its Behavior.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(18).

37. Pigino, G., et al., *Chapter 6 - The Cytoskeleton of Neurons and Glia*, in *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*, S.T. Brady, et al., Editors. 2012, Academic Press: New York. p. 101-118.
38. Hohmann, T. and F. Dehghani, *The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork*. Cells, 2019. **8**(4).
39. Barlan, K. and V.I. Gelfand, *Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(5).
40. Vicente, J.J. and L. Wordeman, *Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins*. Exp Cell Res, 2015. **334**(1): p. 61-9.
41. Westermann, S. and K. Weber, *Post-translational modifications regulate microtubule function*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(12): p. 938-948.
42. Katsetos, C.D., et al., *Emerging microtubule targets in glioma therapy*. Semin Pediatr Neurol, 2015. **22**(1): p. 49-72.
43. Zottel, A., et al., *Cytoskeletal proteins as glioblastoma biomarkers and targets for therapy: A systematic review*. Crit Rev Oncol Hematol, 2021. **160**: p. 103283.
44. Mariani, M., et al., *Class III β -tubulin in normal and cancer tissues*. Gene, 2015. **563**(2): p. 109-14.
45. Katsetos, C.D. and P. Draber, *Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(19): p. 2778-92.
46. Katsetos, C.D., et al., *Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. II. gamma-Tubulin*. J Cell Physiol, 2009. **221**(3): p. 514-20.
47. Gadau, S.D., *Morphological and quantitative analysis on alpha-tubulin modifications in glioblastoma cells*. Neurosci Lett, 2018. **687**: p. 111-118.
48. Kaul, R., A.L. Risinger, and S.L. Mooberry, *Microtubule-Targeting Drugs: More than Antimitotics*. J Nat Prod, 2019. **82**(3): p. 680-685.
49. Čermák, V., et al., *Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment*. European Journal of Cell Biology, 2020. **99**(4): p. 151075.
50. Pantziarka, P., L. Vandeborne, and G. Bouche, *A Database of Drug Repurposing Clinical Trials in Oncology*. Frontiers in Pharmacology, 2021. **12**.
51. Hanusova, V., et al., *Potential anti-cancer drugs commonly used for other indications*. Curr Cancer Drug Targets, 2015. **15**(1): p. 35-52.
52. Canova, K., L. Rozkydalova, and E. Rudolf, *Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2017. **60**(1): p. 5-11.
53. Bui, L., et al., *Brain Tumor Genetic Modification Yields Increased Resistance to Paclitaxel in Physical Confinement*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26134.
54. Kralova, V., et al., *Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines*. Anticancer Drugs, 2013. **24**(9): p. 911-9.
55. Michaelis, M., et al., *Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8202.
56. Mackenzie, C.D. and T.G. Geary, *Flubendazole: a candidate macrofilaricide for lymphatic filariasis and onchocerciasis field programs*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2011. **9**(5): p. 497-501.
57. Chen, C., et al., *Flubendazole Plays an Important Anti-Tumor Role in Different Types of Cancers*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(1).
58. Lin, S., et al., *Flubendazole demonstrates valid antitumor effects by inhibiting STAT3 and activating autophagy*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2019. **38**(1): p. 293.
59. Bai, R.Y., et al., *Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme*. Neuro Oncol, 2011. **13**(9): p. 974-82.
60. Zhou, X., et al., *Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis*. Cell Death Discov, 2018. **4**: p. 18.
61. Ren, L.W., et al., *Benzimidazoles induce concurrent apoptosis and pyroptosis of human glioblastoma cells via arresting cell cycle*. Acta Pharmacol Sin, 2022. **43**(1): p. 194-208.
62. *Athymic nude mice*. [cited 2023 May 16th]; Available from: <https://www.inotivco.com/model/hsd-athymic-nude-foxn1nu>.
63. Katsetos, C.D., et al., *Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells*. Neurochem Res, 2007. **32**(8): p. 1387-98.
64. Zhou, J. and P. Giannakakou, *Targeting microtubules for cancer chemotherapy*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2005. **5**(1): p. 65-71.
65. Nath, J., et al., *Drug repurposing and relabeling for cancer therapy: Emerging benzimidazole anthelmintics with potent anticancer effects*. Life Sci, 2020. **258**: p. 118189.
66. Gallia, G.L., et al., *Mebendazole and temozolomide in patients with newly diagnosed high-grade gliomas: results of a phase I clinical trial*. Neurooncol Adv, 2021. **3**(1): p. vdaa154.
67. Čánová, K., et al., *Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells*. Toxicol In Vitro, 2018. **46**: p. 313-322.
68. Hou, Z.-J., et al., *Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells*. 2015. **6**(8).
69. Kralova, V., et al., *Flubendazole induces mitotic catastrophe and senescence in colon cancer cells in vitro*. J Pharm Pharmacol, 2016. **68**(2): p. 208-18.
70. Oh, E., et al., *Flubendazole elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition*. Int J Cancer, 2018. **143**(8): p. 1978-1993.
71. Xie, X., et al., *Flubendazole Elicits Antitumor Effects by Inhibiting STAT3 and Activating Autophagy in Non-small Cell Lung Cancer*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 680600.

72. Stepanenko, A.A. and V.P. Chekhonin, *On the Critical Issues in Temozolomide Research in Glioblastoma: Clinically Relevant Concentrations and MGMT-independent Resistance*. Biomedicines, 2019. **7**(4).
73. Beltzig, L., B. Stratenwerth, and B. Kaina, *Accumulation of Temozolomide-Induced Apoptosis, Senescence and DNA Damage by Metronomic Dose Schedule: A Proof-of-Principle Study with Glioblastoma Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(24).
74. Abbassi, R.H., et al., *Lower Tubulin Expression in Glioblastoma Stem Cells Attenuates Efficacy of Microtubule-Targeting Agents*. ACS Pharmacol Transl Sci, 2019. **2**(6): p. 402-413.
75. Kiseleva, L.N., et al., *A172 and T98G cell lines characteristics*. Cell and Tissue Biology, 2016. **10**(5): p. 341-348.
76. Blajeski, A.L., et al., *G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells*. J Clin Invest, 2002. **110**(1): p. 91-9.
77. Zhou, X., et al., *Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, elicits valid antitumor effects by targeting P53 and promoting ferroptosis in castration-resistant prostate cancer*. Pharmacological Research, 2021. **164**: p. 105305.
78. Liu, Y., C. Li, and J. Lin, *STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma*. Anticancer Agents Med Chem, 2010. **10**(7): p. 512-9.
79. Piperi, C., K.A. Papavassiliou, and A.G. Papavassiliou, *Pivotal Role of STAT3 in Shaping Glioblastoma Immune Microenvironment*. Cells, 2019. **8**(11).
80. Fu, W., et al., *Roles of STAT3 in the pathogenesis and treatment of glioblastoma*. Front Cell Dev Biol, 2023. **11**: p. 1098482.
81. Kohsaka, S., et al., *STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression*. Molecular Cancer Therapeutics, 2012. **11**(6): p. 1289-1299.
82. Mizoguchi, M., et al., *Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(12): p. 1181-8.
83. Abou-Ghazal, M., et al., *The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(24): p. 8228-35.
84. Lo, H.W., et al., *Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(19): p. 6042-54.
85. Rahaman, S.O., et al., *Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells*. Oncogene, 2002. **21**(55): p. 8404-8413.
86. Wang, H., et al., *Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas*. Lab Invest, 2004. **84**(8): p. 941-51.
87. Gómez-Oliva, R., et al., *Evolution of Experimental Models in the Study of Glioblastoma: Toward Finding Efficient Treatments*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 614295.
88. Paolillo, M., S. Comincini, and S. Schinelli, *In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension*. Cancers (Basel), 2021. **13**(10).
89. Fabbri, R., et al., *Advanced 3D Models of Human Brain Tissue Using Neural Cell Lines: State-of-the-Art and Future Prospects*. Cells, 2023. **12**(8).
90. Malatesta, P., F. Calzolari, and I. Appolloni, *Experimental Models of Glioma*, in *Glioma Cell Biology*, A. Sedo and R. Mentlein, Editors. 2014, Springer Vienna: Vienna. p. 399-431.
91. Dapash, M., et al., *The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment*. Cells, 2021. **10**(9).

8. Přehled publikační činnosti

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise:

1. **Vítovcová, B.**, Skarková, V., Havelek, R., Soukup, J., Pande, A., Caltová, K., & Rudolf, E. (2023). Flubendazole exhibits anti-glioblastoma effect by inhibiting STAT3 and promoting cell cycle arrest. *Scientific reports*, 13(1), 5993. (IF 4,996)
2. Soukup, J., Manethova, M., Kohout, A., Soukup, T., Dvorakova, R., Drugda, J., **Vítovcova, B.**, Gabalec, F., Kaiser, M., Kanta, M., Kasparova, P., Kozak, J., Michnova, L., Netuka, D., Reguli, S., Rychly, B., Trnkova, M., Vachata, P., Wozniakova, M., & Cesak, T. (2023). Cauda equina neuroendocrine tumors show biological features distinct from other paragangliomas and visceral neuroendocrine tumors. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 482(2), 325–338. (IF 4,548)
3. Skarkova, V., **Vítovcova, B.**, Matouskova, P., Manethova, M., Kazimirova, P., Skarka, A., Brynychova, V., Soucek, P., Vosmikova, H., & Rudolf, E. (2022). Role of N-Cadherin in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Chemosensitivity of Colon Carcinoma Cells. *Cancers*, 14(20), 5146. (IF 6,575)
4. Soukup, J., Manethova, M., Faistova, H., Krbal, L., **Vítovcova, B.**, Hornychova, H., Drugda, J., Cesak, T., Netuka, D., Gabalec, F., & Ryska, A. (2022). Pitx2 is a useful marker of midgut-derived neuroendocrine tumours - an immunohistochemical study of 224 cases. *Histopathology*, 81(6), 799–807. (IF 7,778)
5. Soukup, J., Cesak, T., Hornychova, H., Manethova, M., Michnova, L., Netuka, D., **Vítovcova, B.**, Cap, J., Ryska, A., & Gabalec, F. (2021). Cytokeratin 8/18-negative somatotroph pituitary neuroendocrine tumours (PitNETs, adenomas) show variable morphological features and do not represent a clinicopathologically distinct entity. *Histopathology*, 79(3), 406–415. (IF 7,778)
6. Skarkova, V., Krupova, M., **Vítovcova, B.**, Skarka, A., Kasparova, P., Krupa, P., Kralova, V., & Rudolf, E. (2019). The Evaluation of Glioblastoma Cell Dissociation and Its Influence on Its Behavior. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4630. (IF 6,208)

Ostatní práce v impaktovaném časopise:

7. **Vítovcova, B.**, Skarkova, V., Rudolf, K., & Rudolf, E. (2020). Biology of Glioblastoma Multiforme-Exploration of Mitotic Catastrophe as a Potential Treatment Modality. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5324. (IF 6,208)
8. Skarkova, V., Kralova, V., **Vítovcova, B.**, & Rudolf, E. (2019). Selected Aspects of Chemoresistance Mechanisms in Colorectal Carcinoma-A Focus on Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Autophagy, and Apoptosis. *Cells*, 8(3), 234. (IF 7,666)

Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních:

1. **Vítovcová, B.**, Meiring, J.C.M, Skarková, V., Akhmanova, A., Rudolf, E. (2022). Microscopic evaluation of flubendazole effect on microtubule organization, distribution of posttranslational modifications and cell shrinkage in glioblastoma cells. *Abstract Book of the 19th International Medical Postgraduate Conference*
2. **Vítovcova, B.**, Caltova, K., Dvorakova, K., Skarkova, V., Meiring, J.C.M., Akhmanova, A., Rudolf, E. (2022). The effect of flubendazole on microtubule polymerization and posttranslational modifications. *Annals of Oncology (2022) 33 (suppl_8): Abstract Book of the Molecular Analysis for Precision Oncology Congress (MAP 2022)*
3. Dvoráková, K., **Vítovcova, B.**, Skarka, A., Caltová, K., Rudolf, E. (2022). The effect of flubendazole on temozolomide treatment in glioblastoma cell. *Annals of Oncology (2022) 33 (suppl_8): Abstract Book of the Molecular Analysis for Precision Oncology Congress (MAP 2022)*
4. **Vítovcová, B.**, Skarková, V., Havelek, R., Rudolf, E. (2021). Flubendazole inhibits STAT3 activation and promotes cell cycle arrest at G2/M in glioblastoma cells. *Abstract Book of the 18th International Medical Postgraduate Conference*
5. **Vítovcová, B.**, Skarková, V., Havelek, R., Rudolf, E. (2021). Flubendazole inhibits STAT3 activation and promotes cell cycle arrest at G2/M in glioblastoma cells. *Abstract Book of the 17th Faculty Medical Postgraduate Conference*
6. **Vítovcová, B.**, Skarková, V., Skarka, A., Rudolf, E. (2020). Evaluation of temozolomide and flubendazole effects on glioblastoma cells. *Abstract Book of the 16th Faculty Medical Postgraduate Conference*