

Doktorský studijní program

Lékařská biologie

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

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

PharmDr. Barbora Vítovcová

Školitel: prof. PharmDr. Emil Rudolf, Ph.D.

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

Hradec Králové, 2023

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2023

Barbora Vítovcová

Poděkování autora

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli, prof. PharmDr. Emilu Rudolfovi, Ph.D., a své konzultantce, RNDr. Veronice Skarkové, Ph.D., za jejich ochotu, pomoc a vedení v průběhu mého postgraduálního studia a vypracování této disertační práce. Také bych ráda poděkovala celému kolektivu Ústavu lékařské biologie a genetiky v Hradci Králové za jejich vstřícnost, pomoc a přátelské prostředí v průběhu celého mého postgraduálního studia.

Za poskytnutí patientských vzorků bych ráda poděkovala lékařům Neurochirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, především MUDr. Michaelu Bartošovi a MUDr. Petru Krůpovi, Ph.D., dále Fingerlandově ústavu patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové, jmenovitě MUDr. Petře Kašparové, Ph.D. a MUDr. Jiřímu Soukupovi, Ph.D., za odebrání patientských vzorků a provedení imunohistochemické analýzy.

Ráda bych také poděkovala doc. RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. z Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové za pomoc s analýzou pomocí průtokového cytometru a doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za její pomoc s navržením primerů pro analýzu RT-PCR. Mé poděkování patří také zaměstnancům Vivária Lékařské fakulty v Hradci Králové, především Petře Kazimírové za její pomoc s provedením *in vivo* experimentu.

Děkuji také prof. Anně Akhmanové, Ph.D. a celému kolektivu Katedry biologie na Univerzitě v Utrechtu za jejich milé přijetí a jejich pomoc a sdílení cenných zkušeností v rámci mé zahraniční stáže.

Za finanční podporu děkuji Ministerstvu zdravotnictví České republiky (projekt NU20-03-00360) a Univerzitě Karlově (projekty PROGRES Q40/01; Cooperatio, vědní obor DIAG; SVV 260 543).

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu v průběhu celého mého studia.

Obsah

Prohlášení autora.....	2
Poděkování autora.....	3
Seznam použitých zkratk 7	7
Shrnutí.....	10
Summary.....	11
1. Úvod do problematiky	12
1.1. Gliomy.....	12
1.1.1. Vznik a vývoj nádoru.....	12
1.1.2. Nádory vznikající z gliových buněk	14
1.2. Glioblastoma multiforme (GBM)	16
1.2.1. Molekulární subtypy GBM.....	17
1.2.2. Molekulární a genetické změny vedoucí ke vzniku GBM	18
1.2.3. Diagnostika GBM	25
1.2.4. Terapie GBM	26
1.3. Mikrotubuly v GBM	31
1.3.1. Mikrotubuly – struktura a funkce	31
1.3.2. Mikrotubuly v GBM	34
1.3.3. Látky ovlivňující mikrotubuly	35
1.4. Benzimidazoly.....	38
2. Cíle.....	42
3. Metodika	43
3.1. Materiály	43
3.1.1. Chemikálie	43
3.1.2. Přístrojové vybavení	44
3.1.3. Stabilizované buněčné linie	44
3.1.4. Primární kultury	45

3.1.5.	Modelový organismus atymické myši	45
3.2.	Metodika	46
3.2.1.	Měření viability a proliferace buněk.....	46
3.2.2.	Transfekce buněk pomocí siRNA.....	47
3.2.3.	Fázově kontrastní mikroskopie.....	48
3.2.4.	Immunofluorescence buněk.....	48
3.2.5.	Obrazová analýza.....	50
3.2.6.	Analýza RT-PCR	50
3.2.7.	Analýza Western blot.....	51
3.2.8.	Analýza distribuce buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie.....	52
3.2.9.	Luminiscenční stanovení aktivity kaspáz	53
3.2.10.	Imunohistochemická analýza	53
3.2.11.	In vivo experiment	54
3.2.12.	Statistická analýza	56
4.	Výsledky	57
4.1.	Výsledky <i>in vitro</i> experimentu.....	57
4.1.1.	Vliv FLU a TMZ na viabilitu a proliferaci buněk A172 a T98G	57
4.1.2.	Vliv FLU a TMZ na morfologii buněk A172 a T98G.....	59
4.1.3.	Vliv FLU na mikrotubulární síť buněk A172 a T98G.....	60
4.1.4.	Vliv FLU na cytoskelet buněk A172 a T98G.....	66
4.1.5.	Vliv FLU na aktivaci a expresi STAT3 u buněk A172 a T98G	69
4.1.6.	Vliv FLU na buněčný cyklus a aktivaci kaspáz u buněk A172 a T98G.....	72
4.1.7.	Vliv FLU a TMZ na viabilitu a proliferaci GBM primárních kultur.....	75
4.1.8.	Vliv FLU a TMZ na morfologii vybraných GBM primárních kultur.....	80
4.1.9.	Vliv FLU na expresi tubulinů u GBM primárních kultur.....	81
4.1.10.	Vliv FLU na expresi STAT3 u GBM primárních kultur.....	82
4.1.11.	Analýza exprese STAT3 v klinických vzorcích GBM	85

4.1.12.	Vliv FLU na viabilitu, proliferaci a morfologii buněk U118MG	87
4.2.	Výsledky <i>in vivo</i> experimentu.....	89
4.2.1.	Vliv FLU a TMZ na růst nádorů a proliferační index Ki67 v nu-nu myších	89
4.2.2.	Vliv FLU a TMZ na expresi tubulinů u nádorů získaných z nu-nu myší	90
4.2.3.	Vliv FLU a TMZ na expresi STAT3 u nádorů získaných z nu-nu myší	92
5.	Diskuse.....	95
6.	Závěr	103
7.	Seznam použité literatury	104

Seznam použitých zkratek

- +TIPs – proteiny interagující s plus koncem mikrotubulů
- ATCC – „American Type Culture Collection“
- ATP – adenosintrifosfát
- B2M – beta-2-mikroglobulin
- BCA – kyselina bicinchoninová
- BSA – bovinní sérový album
- Cdk1 – cyklin dependentní kináza 1
- cDNA – komplementární DNA
- CT – výpočetní tomografie
- DMEM – „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- dNTP – deoxynukleotid trifosfáty
- DTT – dithiotretiol
- EBs – „end-binding proteins“
- EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
- EGF/EGFR – epidermální růstový faktor/receptor pro epidermální růstový faktor
- EGTA – kyselina egtázová
- EMEM – „Eagle’s Minimum Essential Medium“
- FBS – fetální bovinní sérum
- FFPE – formalínem fixované parafinové bločky
- FLU – flubendazol
- FLU-H – hydrolyzovaný flubendazol
- FLU-R – redukovaný flubendazol
- GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
- GBM – glioblastoma multiforme
- G-CIMP - „glioma CpG island methylator phenotype“
- GDP – guanosindisfosfát
- GTP – guanosintrifosfát
- HCl – kyselina chlorovodíková
- HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansolfonová

- HGG – „high grade glioma“, gliom vysokého stupně malignity
- HIF – „hypoxia inducible factor“
- CHAPS – 3-[(3-cholamidpropyl)dimethylamonio]-1-propansulfát
- IC50 – hodnota poloviny maximální inhibiční koncentrace
- IDH – isocitrát-dehydrogenáza
- IHC – imunohistochemická analýza
- JAK – Janusova kináza
- KPS – „Karnofsky performance score“
- LGG – „low grade glioma“, gliom nízkého stupně malignity
- LOH 10q – ztráta heterozygotnosti na dlouhém raménku chromozomu 10
- MAP kináza – „mitogen-activated protein kinase“, mitogenem aktivované proteinkinázy
- MAPs – s mikrotubuly asociované proteiny
- MDM2 – „mouse double minute homolog 2“
- MGMT – *O*⁶-methylguanin-DNA methyltransferázy
- MMP – matrixové metaloproteinázy
- MR – magnetická rezonance
- mRNA – „messenger RNA“, mediátorová RNA
- MTAs – „microtubule targeting agents“, látky ovlivňující mikrotubuly
- MTIC - 5-(3-methyltriazin-1-yl) imidazol-4-karboxamid
- MTOC – mikrotubuly organizující centrum
- mTOR – „mammalian target of rapamycin“
- Na₂HPO₄ – hydrogenfosforečnan sodný
- Na₃VO₄ – orthovanadičnan sodný
- NaCl – chlorid sodný
- NADP – nikotinamidadeninukleotidfosfát
- NaF – fluorid sodný
- PBS – fosfátový pufr
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- PDGF – „platelet-derived growth factor“
- PET – pozitronová emisní tomografie
- PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza

- PTEN – fosfatáza a homolog tenzinu
- RNA – ribonukleová kyselina
- siRNA – „small interfering RNA“, malá interferující RNA
- STAT3 – „signal transducer and activator of transcription 3“
- TBP – TATA vazbený protein
- TBST – Tris-NaCl pufr s 0,05 % Tween 20
- TMZ – temozolomid
- VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor
- WHO – Světová zdravotnická organizace
- WST – „Water-soluble tetrazolium salt“

Shrnutí

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 morfolonii 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 proliferační 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 inhibiční 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

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

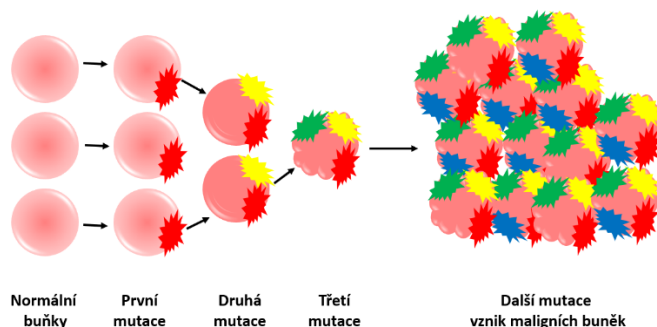
1.1. Gliomy

1.1.1. Vznik a vývoj nádoru

Nádorové buňky jakožto transformované buňky jsou definovány především dvěma vlastnostmi – nekontrolovatelnou schopností růst a dělit se a schopností napadat a kolonizovat místa v lidském těle určená pro jiné buňky. Tato změna v jejich chování je především připisována rozsáhlým genetickým změnám, které těmto buňkám umožňují podstoupit tzv. nádorovou transformaci [1, 2]. Takto transformované buňky vytváří neoplastický růst, nádor. V současné době rozeznáváme více než 100 druhů nádorových onemocnění, které můžeme tradičně rozlišovat podle typu buňky a tkáně, ze které byly odvozeny [1, 3].

Buněčný růst, dělení buňky a její programovaná smrt přispívají k udržení homeostázy organismu a jsou velmi přísně kontrolovány sérií buněčných signálních drah. Genetické mutace podmiňující vznik nádorového bujení se pak odehrávají právě v genech regulujících tyto buněčné děje. Buňky nesoucí takové genetické změny pak přestávají odpovídat na signály ovlivňující jejich růst a jejich dělení, navíc umožňují buňkám uniknout programované buněčné smrti [4].

Předpokládá se, že nádorové bujení vzniká z jedné buňky nebo z malé skupinky buněk, ve kterých došlo ke genetickým změnám. Jediná genetická mutace však není dostatečná, aby došlo k přeměně buňky na nádorovou, naopak existuje velké množství důkazů, které ukazují, že u většiny nádorových buněk dochází k akumulaci genetických změn (Obr. 1). Nádorová progresse často trvá několik let a během každé fáze této progresse buňka získává další změnu či mutaci na genetické nebo epigenetické úrovni [1].



Obr. 1. Vznik nádorového bujení

Velké množství těchto genetických změn přitom vzniká spontánně, v buňce se hromadí a způsobují její značnou genetickou nestabilitu. Buňka tak ztrácí svůj tvar a funkci, přestává odpovídat na regulující signály a začíná se nekontrolovatelně dělit [4, 5]. Mnoho genetických mutací postihuje především dva typy genů v buňce – protoonkogeny a tumor supresorové geny. V normálních buňkách jsou tyto geny důležitými regulátory biologických procesů, včetně regulace buněčného růstu, buněčného dělení a smrti. Tumorigeneze často vyžaduje kombinaci genetických změn v obou typech těchto genů, tedy aktivaci protoonkogenů na onkogeny a zároveň inaktivaci tumor supresorových genů [5, 6]. Aktivované onkogeny pak vyvolávají nadměrné dělení buňky, které kvůli inaktivaci tumor supresorových genů není možné potlačit.

Na vzniku nádorového bujení se kromě genetických změn podílejí také epigenetické změny a jejich vzájemnou interakcí je dotvářen nádorový fenotyp buněk. Nádorový epigenom je tvořen rozsáhlými změnami v metylaci DNA, v posttranslačních modifikacích histonů či v organizaci chromatinu, což vede k celkové deregulaci profilů exprese genů. Epigenetické změny tak napomáhají inaktivaci tumor supresorových genů, ale podílejí se i na aktivaci protoonkogenů [7, 8].

K nekontrolovatelnému dělení nádorových buněk také přispívají změny týkající se telomer a enzymu telomerázy. U normálních buněk dochází k postupnému zkracování koncových částí jejich chromozomů, tzv. telomer, což buňkám umožňuje kontrolovat jejich replikační aktivitu a celkovou délku existence. Naproti tomu u nádorových buněk dochází vlivem obnovené či trvale udržované aktivity telomerázy k zachování stabilní délky telomer, což opět přispívá k nekonečnému a nekontrolovatelnému buněčnému dělení [9, 10].

Vznik nádoru může být také spojován s populací tzv. nádorových kmenových buněk, jejichž přítomnost v nádorové masě souvisí nejen s prvotním rozvojem nádoru, ale také s jeho progresí a opakovaným výskytem. Nádorové kmenové buňky jsou charakterizovány svou schopností znovuoobnovení nebo možností diferenciací. Jejich vývoj je ovlivněn genetickými a epigenetickými změnami, ale zároveň udržují základní vlastnost všech kmenových buněk, tj. asymetrické dělení prostřednictvím kterého jednak vytvářejí nové diferencované buňky nádorové tkáně, ale také obnovují svou vlastní populaci kmenových buněk. Jejich přítomnost v nádorové masě také přispívá k metastazování nádorů a ke vzniku chemorezistence [11, 12].

Schopnost nekontrolovatelného růstu a dělení, možnost uniknout programované buněčné smrti nebo nekončící replikační potenciál patří spolu se schopností napadnout okolní tkáň a tvořit si vlastní cévní zásobení k hlavním charakteristickým znakům nádorového bujení [3].

1.1.2. Nádory vznikající z gliových buněk

Gliové buňky patří mezi základní typy buněk, které tvoří nervový systém. Zatímco neurony jsou přímo zapojeny do procesu elektrické transmise a zpracování informací, gliové buňky mají mnoho nepostradatelných funkcí jak ve vývoji, tak během normálního fungování nervového systému. Svým počtem navíc vysoce převyšují zastoupení neuronů a vytváří tak velkou část nervové tkáně [13].

Nádory vznikající z gliových buněk se obecně nazývají gliomy a patří mezi nejběžnější primární nádory centrálního nervového systému, tvoří 40-50 % všech nádorů mozku. Jsou to nádory odvozené z jednotlivých typů gliových buněk – např. z astrocytů, oligodendrocytů a ependymocytů. Jedná se velice širokou a heterogenní skupinu nádorů lišící se nejen svou morfologií, typickou lokalizací a stupněm malignity, ale také věkovou predispozicí a sklonem k progresi [14-16].

Gliomy můžeme podle jejich histopatologických znaků a jejich chování dělit na gliomy nízké 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.), přičemž stupeň 1 je považován za nejméně agresivní, zatímco stupeň 4 za nejvíce agresivní druh gliomového nádoru. Tato klasifikace z roku 2007 hodnotí jednotlivé nádory podle následujících histologických kritérií – hustoty buněk v nádorové mase, přítomnosti mitózy a jaderné atypie, endoteliální proliferace a přítomnosti nekrózy [14, 17].

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 nízkého stupně malignity reprezentují 10-15 % všech mozkových gliomů a zahrnují většinu nádorů ze stupňů WHO I. a II. Jsou charakterizovány pomalým růstem, který ale není dobře ohraničený od okolní mozkové tkáně, a tudíž u nich mluvíme o schopnosti difúzní infiltrace [14, 15].

Pro gliomy vysokého stupně malignity je typický rychlý invazivní růst nádorové masy s aktivní proliferací. Jejich nejčastějším a nejmalignějším zástupcem je glioblastoma multiforme (GBM, WHO stupeň IV), který se buď postupně rozvíjí z gliomů nižšího stupně malignity, nebo vzniká spontánně, bez předchozích známek diferenciovanějšího nádoru. Do této skupiny ale také patří další gliomy ze stupně WHO III, které na rozdíl od GBM mají lepší prognózu a zpravidla jsou také diagnostikovány u pacientů nižšího věku [14, 18].

Gliomy se téměř výhradně vyskytují ve čtyřech mozkových lalocích – čelním, spánkovém, parietálním a okcipitálním. Ve výjimečných případech byly gliomy také nalezeny v mozkovém kmeni, mozečku a páteřní míše. Umístění nádoru může korelovat s různorodostí jednotlivých subtypů, dále s charakterem růstu nádoru a také klinickými výstupy [18, 19].

Ačkoli gliomy většinou vznikají sporadicky bez zjevné přítomnosti genetických rizikových faktorů, existuje statisticky významný vztah mezi výskytem gliomů a přítomností několika vzácných genetických syndromů, jako je např. syndrom Li-Fraumeni, enchondochromatózy, nebo familiární polypózní syndrom [18].

1.2. Glioblastoma multiforme (GBM)

Glioblastoma multiforme (GBM) je primární nádor mozku řadící se mezi gliomy, jejichž je nejčastější, nejagresivnější a nejvíce invazivní variantou. GBM je zařazen do stupně IV podle WHO klasifikace 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 [20, 21].

Ačkoli GBM postihuje pacienty všech věkových kategorií, jeho největší výskyt se pohybuje mezi 65. a 75. rokem života, častěji u mužů než u žen. Vyšší výskyt byl také 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 byly nebo stále jsou spojovány s výskytem GBM. Jedná se o některá geneticky podmíněná onemocnění, jako např. neurofibromatóza typu I nebo tuberózní skleróza. Dalším etiologickým parametrem spojovaným s vývojem GBM je pozitivita na cytomegalovirus, který způsobuje dysregulaci řady signálních drah v zasažených buňkách. Mezi fyzikální faktory zvyšující pravděpodobnost vzniku tohoto typu nádoru patří ionizující záření a také některé chemikálie, např. pesticidy [18, 20, 22, 23].

Molekulární biologie vzniku GBM je komplexní a zahrnuje celou řadu specifických změn či jejich kombinací vedoucí ke značné heterogenitě v této skupině nádorů. Agresivní biologické chování GBM zahrnuje jeho progresivní invazivitu do rozsáhlých částí mozkové tkáně. Léze nádoru jsou obvykle rozsáhlé a zahrnují i více laloků. Až 90 % všech GBM se rozvíjí *de novo*, tedy přímo z gliových buněk skrz mnohostupňovou tumorigenezi. Takto vzniklé GBM označujeme jako primární a častěji se vyskytují ve starší populaci. Zbývající případy GBM připadají na tzv. sekundární GBM, který se rozvíjí postupně z gliomů nižšího stupně malignity po dobu několika let. Sekundární GBM se vyskytuje u mladších pacientů, diagnostikovaných v průměrném věku 45 let [22, 24-26].

Na základě nové klasifikace WHO z roku 2021 došlo ke změně nomenklatury nádorů centrálního nervového systému a zároveň došlo ke změně klasifikace a definice GBM. V rámci této nové klasifikace také zaniklo 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). Touto mutací se vyznačují především nádory označované podle původní klasifikace jako

sekundární GBM, ty jsou nově označovány jako IDH-mutantní gliomy [27, 28]. 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 a jejich velmi nízkou diferenciací. Vyskytující se buňky mohou být velmi variabilní ve své velikosti a tvaru, běžný je také výskyt obrovských buněk s mnohočetnými jádry. Zatímco na periferii nádorového ložiska je možné pozorovat infiltrující nádorové buňky, které zasahují do běžného parenchymu mozku a znesnadňují tak kompletní operativní resekci, zpravidla uprostřed nádorového ložiska se nachází nekrotická oblast. V nádorové masě se nachází další, velikostně menší nekrotické oblasti, které jsou od ostatních buněk odděleny tzv. pseudopalisádovými oblastmi tvořenými radiálně umístěnými buňkami. Vedle toho se v nádorovém ložisku mohou také vyskytovat oblasti, které histologicky připomínají spíše nádory nižšího stupně malignity. Typickým znakem GBM nádorové masy je také vysoký stupeň vaskularizace [22, 26].

Prognóza pacientů s GBM je nepříznivá, nádory mají tendenci se velmi rychle 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 a pouze 3-5 % pacientů přežívá více než 3 roky od diagnózy [22, 23, 29].

1.2.1. Molekulární subtypy GBM

Jedním z faktorů, který přispívá k nepříznivé prognóze pacientů s GBM, je také velká genotypická i fenotypická heterogenita nádoru, a to nejen mezi jednotlivými nádory, ale také heterogenita přímo uvnitř nádoru. Na základě molekulárních transkripčních profilů jednotlivých nádorů, zastoupení genetických mutací a DNA metylací je možné GBM dále kategorizovat do různých subtypů, což umožňuje lepší zacílení terapie [30, 31].

Studie Verhaak a kol. (2010) rozčlenila nádory GBM do čtyř základních kategorií subtypů – klasický, mesenchymální, proneurální a neurální [32].

Proneurální subtyp GBM se vyskytuje častěji u mladších pacientů a je spojen s delší dobou přežití pacientů, přestože pacienti s tímto GBM subtypem nevykazují lepší odpověď na chemoradioterapii. Neurální subtyp GBM vykazuje podobný genově expresní profil jako v normální nervové tkáni a bývá citlivější k ozáření nebo chemoterapii. Klasický subtyp vykazuje většinu nejčastějších molekulárních a genetických změn u 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 expresí genů spojených s angiogenezí. Pacienti s tímto subtypem GBM mají nejčastěji nejméně příznivou prognózu [30-32].

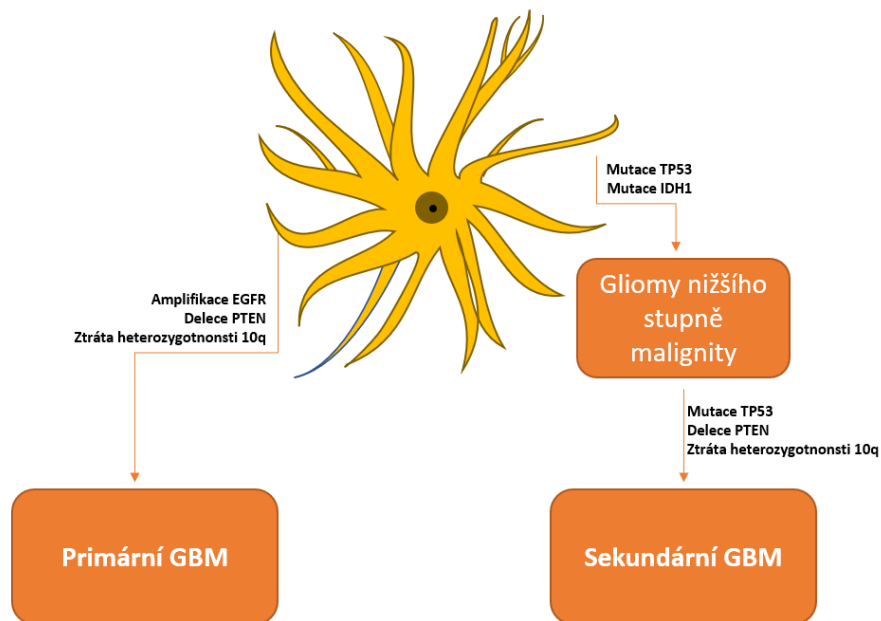
1.2.2. Molekulární a genetické změny vedoucí ke vzniku GBM

Komplexní molekulární biologické mechanismy vzniku GBM zahrnují významné změny v regulaci mnoha signálních drah podmíněné konkrétními genetickými a epigenetickými změnami. Proces nádorové transformace u GBM zahrnuje kombinaci zvýšené exprese a amplifikace onkogenů společně s nízkou expresí nebo až ztrátou exprese tumor supresorových genů. Vznik primárního a sekundárního GBM je definován významnými rozdíly v deregulaci signálních drah. Zatímco pro primární GBM jsou typické změny v signální dráze pro epidermální růstový faktor (EGF) a ovlivnění dráhy mitogene aktivované proteinkinázy (MAP kináza), u sekundárního GBM hraje významnou roli mutace ovlivňující *TP53* a mutační změny isocitrát-dehydrogenázy (*IDH*) [20, 24, 33].

Amplifikace receptoru pro EFG (EGFR), ztráta heterozygotnosti na dlouhém raménku chromozomu 10 (LOH 10q) a delece homologu fosfatázy a tensinu (PTEN) můžeme označovat za tzv. klasické mutace spojené se vznikem primárního GBM. Naproti tomu sekundární GBM je typický svou mutací genu *TP53*, což vede k ovlivnění jím kontrolované signální dráhy. Také mutací podmíněná změna metabolického enzymu *IDH* se pouze zřídka vyskytuje u primárního GBM, je však velmi často přítomná u sekundárních GBM a také u gliomů nižšího stupně malignity [33-35].

I přes původní rozdíly, sekundární GBM v průběhu vývoje získávají mutace typické především pro primární GBM, a to hlavně LOH 10q. Jejich četnost výskytu však tyto dva druhy rozvoje nádoru odlišuje. Kromě výše zmíněných mutačních změn dochází v GBM ještě k dalším změnám v signálních drahách, ať už následkem zvýšené aktivity již dříve mutovaných signálních drah, nebo dalšími hromadícími se mutacemi. Mezi další ovlivněné

molekuly patří 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, kde mezi jednu z nejvýznamnějších je považována metylace promotoru DNA reparačního genu *O*⁶-methylguanin-DNA methyltransferázy (MGMT) [20, 34, 36].



Obr. 2. Genetické změny v molekulách typických pro vznik a vývoj primárního a sekundárního GBM

1.2.2.1. EGFR

EGFR je transmembránový protein z rodiny tyrosin-kinázových receptorů a s ním spojená signální dráha patří ke klíčovým drahám důležitým pro rozvoj mnoha druhů nádorů, včetně primárního GBM. Amplifikace EGFR se objevuje u zhruba 40 % případů primárního GBM, nicméně jen zřídka u sekundárního GBM. Zvýšená exprese EGFR je pak pozorovatelná až u 60 % případů primárního GBM a u přibližně 10 % sekundárních GBM. Amplifikace EGFR je také často prekurzorem pro následný vznik mutace EGFR, kde nejčastější vznikající variantou je EGFRvIII mutant, který byl objeven ve více než 60 % EGFR-pozitivních nádorech. Všechny tyto změny vyvolávají v GBM buňkách mnoho odpovědí, které především zahrnují buněčný růst a přežití, takto mutované nádorové buňky navíc zvyšují svoji invazivitu [20, 24].

EGFRvIII mutant vykazuje nulovou nebo pouze velmi nízkou schopnost vázat aktivační ligandy receptoru, na druhou stranu má schopnost konstantně aktivovat následnou vnitřní signální dráhu fosforylací signálů fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) nebo Ras-guanosintrifosfátu (Ras-GTP). Buňky vykazující expresi tohoto mutantu také vykazují zvýšenou expresi matrixových metaloproteináz (MMPs) a komponentů extracelulární matrix, což dále nasvědčuje zvýšené invazivitě těchto buněk. EGFR a EGFRvIII také společně zvýšeně aktivují transkripční faktor STAT3, jehož aktivita ve výsledku vede k modulaci genů ovlivňujících buněčnou proliferaci, migraci a angiogenezi [36, 37].

Vzhledem k tomu, že pacienti s potvrzenou přítomností EGFRvIII mají obecně horší prognózu, kratší celkové přežití a rychlejší progresi nádoru, existují intenzivní snahy o vývoj cílené terapie proti této molekule a její signální dráze. Nejvíce studovanými léčivy jsou především EGFR inhibitory (např. erlotinib, gefitinib), které se v iniciálních stádiích testování vyznačovaly především nízkou molekulovou hmotností, což umožňovalo jejich perorální podávání. Nicméně, během klinického testování jejich výsledky nevykazovaly očekávaný efekt, a tak spolu s dalšími cílenými léčivy pro EGFR signální dráhu prozatím nepřinesly výrazný posun a terapeutický účinek. Jedním z důvodů tohoto neúspěchu testovaných inhibitorů by mohla být zvýšená aktivace dalších signálních drah spojených s přežitím buňky po zablokování EGFR, kam můžeme zařadit také zvýšenou aktivaci STAT3 [20, 38].

1.2.2.2. Ztráta heterozygotnosti 10q

Ztráta heterozygotnosti 10q patří mezi nejčastější genetické změny vyskytující se v primárním i v sekundárním GBM a objevující se u 60-80 % případů. U primárních GBM však často dochází také ke ztrátě druhého, krátkého raménka chromozomu 10, nebo až ke kompletní ztrátě chromozomu 10. K mutacím a delecím dochází nejčastěji na třech specifických lokusech, které kódují některé tumor supresorové geny. Na jednom z deletovaných lokusů na 10q se nachází také gen pro PTEN, jehož mutace, delece nebo inaktivace je jednou z nejčastějších genetických změn u GBM, které se zároveň nevyskytuje u gliomů s nižším stupněm malignity [24, 36].

Mutace PTEN se častěji vyskytují u primárních GBM a bývají spojovány s amplifikací nebo mutací EGFR. Nicméně, ztráta exprese PTEN proteinu se vyskytuje u 70-95 % případů GBM, což naznačuje další mechanismy jeho ztráty, jako např. inaktivace

genu. PTEN vykazuje fosfatázovou aktivitu a v normálních buňkách působí jako tumor supresorový gen, který přímo blokuje aktivitu signálu PI3K, jehož dráha je vinou zvýšené aktivity EGFR a zároveň ztráty nebo mutace PTEN u GBM vysoce aktivní, což vede ke zvýšenému růstu buňky, jejímu přežití a uniknutí programové buněčné smrti [20, 36].

Snížená aktivita PTEN vede ke zvýšené aktivaci signální dráhy PI3K/Akt, což vede dále k aktivaci řady následných signálních drah, mezi něž můžeme také zařadit signalizaci mTOR („mammalian target of rapamycin“), který ve zdravé buňce mimo jiné působí jako kontrola vnitřní homeostázy a jeho nadměrná aktivace podporuje buněčný růst, angiogenezi (prostřednictvím molekuly HIF-1 α ; „hypoxia inducible factor 1 α) a invazivitu (prostřednictvím zvýšené regulace MMP). Akt se také dále podílí na aktivaci MDM2, což vede k degradaci proteinu p53 a zvýšené aktivitě buněčného cyklu, a zároveň inhibuje pro-apoptické signály [20, 39].

1.2.2.3. *TP53*

Protein p53, někdy také označován jako strážce genomu, je centrální molekulou pro udržení buněčné homeostázy a jeho signální dráha hraje důležitou roli v buněčné proliferaci, přežití, diferenciaci a zachování integrity genomu. Tato molekula působí jako transkripční faktor, který v reakci na stres nebo poškození DNA buňky může vyvolat zástavu buněčného cyklu, koordinovat opravu DNA, nebo iniciovat vstup buněk do programované buněčné smrti. Dráha proteinu p53 je nejčastěji deregulovanou signální dráhou při rozvoji nádorového bujení [39, 40].

Mutace v genu *TP53* jsou centrálním dějem spojeným s rozvojem sekundárního GBM a jsou také běžné u gliomů s nízkým stupněm malignity, ze kterých se sekundární GBM vyvíjí. Specifická mutace u tohoto proteinu se také zdá být spouštěcím signálem pro maligní přeměnu vedoucí k rozvoji sekundárního GBM. Spolu s mutací *TP53* se jak u gliomů s nízkým stupněm malignity, tak u GBM objevují mutace v genu pro metabolický protein IDH1/2, přičemž u gliomů s nižším stupněm malignity se jednalo o více než 90 % případů [24, 39, 40].

Také u primárních GBM se vyskytuje mutace tohoto proteinu, ale ve významně nižším množství případů (okolo 25 %). Mutace *TP53* jsou jen zřídka k nalezení společně s amplifikací EGFR, což je jedna z hlavních genetických změn u primárního GBM. I přesto je možné u primárních GBM pozorovat změny v signální dráze proteinu p53, jejichž vznik

však bývá vysvětlován spíše změnami regulačních proteinů této signální dráhy, jako je např. MDM2 [24, 36, 40].

MDM2 funguje jako regulátor funkce p53, jednak inhibicí jeho transkripční aktivity, ale také katalýzou jeho degradace. Ve více než 50 % případů, GBM vykazuje zvýšenou expresi tohoto proteinu, aniž by však docházelo k amplifikaci jeho genu. Jen u menší skupiny GBM (přibližně 5-10 % případů) dochází zároveň k amplifikaci genu MDM2, striktně ale pouze u takových nádorů, které nevykazují mutaci v *TP53* [36, 40].

Inhibice genové exprese p53 může také být způsobena zvýšenou aktivitou signálních drah spojených s růstovými faktory, jejichž signál je přenášen pomocí molekuly STAT3. Ta je v buňkách GBM zvýšeně exprimována a aktivována, přičemž právě aktivovaná STAT3 se váže na promotor genu pro p53, čímž přispívá k potlačení funkce tohoto proteinu [41].

1.2.2.4. *STAT3*

STAT3 patří do rodiny cytoplasmatických transkripčních faktorů, které jsou spojeny s kinázami JAK („Janus tyrosine kinases“) a podílejí se na přenosu signálů souvisejících s mnoha buněčnými ději. Po navázání na aktivovaný JAK dochází k jejich aktivaci fosforylací a vytvoření homo- nebo heterodimerů, které následně přecházejí do jádra a podílejí se na regulaci genové transkripce. STAT3 je kontinuálně aktivován v celé řadě nádorových buněk včetně GBM [36, 42, 43].

Molekula STAT3 je aktivována fosforylací především ve dvou polohách – na tyrosinu v pozici 705 a na serinu v pozici 727. Tato aktivace vede ke zvýšené syntéze mnoha molekul zapojených do regulace buněčného cyklu, buněčné proliferace, programované buněčné smrti, buněčné migrace a angiogeneze. Jeho působení v roli transkripčního faktoru zahrnuje mimo jiné rodinu anti-apoptotických proteinů Bcl-2, nebo molekul důležitých pro buněčnou proliferaci [42, 43].

Významný vliv má STAT3 dále na invazivní schopnosti GBM buněk a jejich angiogenezi. Aktivovaný STAT3 zvyšuje transkripci některých proinvazivních molekul, jako např. MMPs, nebo proteinů fokálních adhezí. STAT3 ovšem také interaguje s HIF-1 α a vaskulárním endotelovým růstovým faktorem (VEGF) a napomáhá tak angiogenezi

nádoru. V GBM se nachází četné vysoce hypoxické oblasti, a právě hypoxie se podílí na zvýšené aktivaci STAT3, což následně vede ke zvýšené expresi VEGF [42, 44-46].

Zvýšený stupeň aktivace STAT3 byl nalezen v mnoha nádorových buňkách, včetně GBM, ovšem bez zjevné mutace způsobující tuto konstantní aktivitu. STAT3 ovšem může být aktivován velkým množstvím růstových faktorů a cytokinů, přičemž u GBM bylo prokázáno, že k této aktivaci dochází pomocí spolupráci EGFR a mutovaného EGFRvIII. Tato signalizace je však zpětně regulována a při inhibici aktivity STAT3 dochází k dalšímu zvýšení aktivity EGFR [37, 47, 48].

STAT3 vykazuje také důležitou roli při samotné tumorigenezi GBM. Proteiny z rodiny STAT nesou svou důležitou roli při vývoji astrocytů a konkrétně STAT3 hraje důležitou roli v jejich diferenciaci a dozrávání. Aktivace STAT3 také hraje důležitou roli v buňkách iniciujících vznik gliomů, kde napomáhá regulaci protumorigenní buněčné progresi, přeměně extracelulární matrix a reguluje také geny kódující cytokiny a růstové faktory [49, 50].

Inhibice STAT3 aktivity by se dala vhodně využít při léčbě různých typů nádorů. Ačkoli existuje několik molekul, které jsou v současné době ve výzkumu či ve fázi klinického testování, žádná z nich nebyla schválena pro klinické využití v praxi [36, 43].

1.2.2.5. *IDH1*

Mnoho let byl vznik mozkových nádorů, a především GBM, spojován pouze s genetickými změnami v onkogenech a/nebo na tumor supresorových genech. Později pak byl vznik a vývoj určité skupiny GBM spojen také s mutací metabolického enzymu IDH. V lidských buňkách tento enzym existuje ve třech základních isoformách a účastní se řady významných metabolických procesů, jako např. Krebsův cyklus a lipogeneze. IDH dále katalyzuje přeměnu isocitrátu na α -ketoglutarát za účasti nikotin-adenin-dinukleotidfosfátu (NADP⁺) jako kofaktoru [34, 51].

IDH mutace související s rozvojem GBM se týkají především isomerů 1 a 2, které pro vznik metabolické aktivity vytvářejí homodimery. Ve velké většině případů (až 85 %) se jedná o mutaci, která postihuje kodon 132 vedoucí k záměně aminokyseliny arginin za histidin. Vzhledem k tomu, že právě tato aminokyselina se nachází v aktivním místě enzymu, vede tato mutace k neschopnosti enzymu vázat isocitrát. V konečné důsledku tak

vzniká omezené množství α -ketoglutarátu, mutovaný enzym navíc získává schopnost jej dále metabolizovat na 2-hydroxyglutarát, který má toxický vliv na DNA [34, 52].

IDH také hraje významnou roli v obraně organismu proti oxidativnímu stresu. Buňky se sníženou expresí IDH jsou náchylnější k oxidativnímu poškození, jehož kumulace je zároveň známkou nádorového bujení spojeného s IDH mutací. V přítomnosti těchto mutací dále dochází k aktivaci hypoxických signálních drah i v přítomnosti normoxie, k tzv. pseudohypoxii. Enzymy degradující HIF-1 α vyžadují ke svému správnému fungování dostatečné hladiny α -ketoglutarátu a jejich snížení v IDH mutovaných buňkách vede k akumulaci HIF-1 α , který následně indukuje cílové geny podílející se buněčné angiogenezi, růstu i diferenciaci [51, 52].

GBM s mutací na IDH1 nebo IDH2 také vykazují vysokou míru hypermetylace DNA. Podobně se mutované formy IDH1/2 podílejí na metylaci histonů. Mutace isoform tohoto metabolického enzymu bývá spojována se vznikem hypermetylovaných tzv. CpG ostrůvků a vede ke vzniku G-CIMP fenotypu („glioma CpG island methylator phenotype“) [34, 35, 51].

Mutace IDH1/2 je spojena přednostně se sekundárním GBM a jen zřídka se vyskytuje u primárních GBM. Jedná se pravděpodobně o časnou mutaci při rozvoji GBM, která je také přítomna u vysokého procenta gliomů s nižším stupněm malignity (80-90 % gliomů stupně II a III). Mutace IDH je v nádorech se často vyskytuje společně s mutací v proteinu p53 (přibližně 80 % GBM) [52, 53].

GBM s mutovanou IDH obvykle vykazují lepší prognózu a jejich diagnostika je prováděna imunohistochemickou detekcí IDH mutace argininu 132 na histidin, což je mutace vyskytující se asi v 95 % případů. Problematický je ovšem fakt, že IDH-mutované gliomy mají větší pravděpodobnost rozvinutí hypermetylací, které naopak přispívají ke zhoršené prognóze [34, 51].

1.2.2.6. *MGMT*

MGMT je DNA reparační gen a metylace jeho promotoru v GBM buňkách je jednou z nejprominentnějších epigenetických změn při rozvoji tohoto nádoru. Tento protein odstraňuje mutagenní a cytotoxické addukty DNA vzniklé na O⁶-guaninu, které následně váže na svou vlastní strukturu a tím označuje sám sebe pro degradaci. Jeho správné

fungování je tak důležité pro zachování buněčné integrity. V GBM buňkách však dochází k epigenetické inaktivaci tohoto proteinu metylací jeho promotoru v oblasti CpG ostrůvků [35, 54, 55].

Metylace promotoru MGMT je prognostickým markerem pro léčbu pacientů s GBM za pomoci alkylačních činidel. Ty ve většině případů alkylují DNA právě na pozici O6-guaninu, čímž vytvářejí vnitřní vazby ve struktuře DNA, které vedou k jejímu poškození. Aktivní MGMT však tento efekt rychle eliminují odstraněním alkylů navázaných na DNA, čímž snižují účinnost takovéto léčby a přispívají tak ke vzniku rezistence [56, 57].

Inaktivace MGMT metylací jeho promotoru tak vede ke zvýšení účinku léčby alkylačními činidly a ke zvýšení doby přežití pacientů, u kterých byla metylace prokázána, protože nedochází k opravě poškození DNA způsobených touto léčbou. Metylace MGMT se vyskytuje přibližně u 35 % pacientů s MGMT a až u 80 % pacientů s gliomy nižšího stupně malignity a je tak vnímána jako vhodný prognostický marker pro zvýšené přežití pacientů s GBM léčených alkylačními činidly [34, 35].

1.2.3. Diagnostika GBM

GBM patří mezi primární nádory mozku a jeho incidence 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. Obecnou charakteristikou tohoto nádoru je jeho rychlý růst a schopnost buněk přímo infiltrovat okolní mozkovou tkáň. 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 [22, 34, 58, 59].

Klinické projevy nádoru se odvíjí od jeho lokalizace. Nejčastějšími příznaky jsou bolesti hlavy, nevolnost, až zvracení, ataxie nebo poruchy vidění. Tyto příznaky bývají spojovány se zvyšujícím se nitrolebním tlakem, který souvisí se stádiem onemocnění. Objevují se dále poruchy psychiky a vědomí, může docházet i k poruchám řeči a kognitivních funkcí. Častým příznakem spojeným s výskytem gliomů a GBM je výskyt epileptických záchvatů. Vzhledem k značné nespecifičnosti těchto příznaků a jejich rychlému výskytu a krátké historii trvání jsou postižení pacienti často nesprávně diagnostikováni [22, 26, 58].

Hodnocení příznaků a celkového stavu pacienta není prováděno pouze při stanovení diagnózy. Také během léčby dochází k hodnocení neurologického stavu pacienta a celkového stavu pacienta („Karnofsky Performance Score“, KPS), kdy dochází k posouzení jeho celkové soběstačnosti a schopnosti zvládat běžné úkony a aktivity. Podrobná diagnóza a pečlivé zhodnocení prognostických klinických faktorů pomáhá vypracovat vhodnou strategii léčby [14, 58].

Hlavní diagnostickou metodikou pro GBM je magnetická rezonance (MR). Tato neinvazivní metoda má v současnosti největší přínos při určování diagnózy všech mozkových nádorů, u GBM se objevuje především výrazné postkontrastní sycení s výskytem nekrotických a náznaků expanze nádoru. Často se také objevuje edém v okolí nálezu. Nezastupitelný význam má také výpočetní tomografie (CT), která nejčastěji s využitím kontrastní látky umožňuje určení lokalizace nádoru, jeho velikosti a vztahu k okolním strukturám. K odlišení mozkového nádoru od jiných nálezů, jako jsou např. metastázy nebo gliózy, je využívána pozitronová emisní tomografie (PET), která informuje o metabolických změnách v nádoru [14, 22, 58, 59].

Definitivní potvrzení diagnózy probíhá na základě histologického vyšetření vzorku tkáně získaného během chirurgického odstranění nádoru. Pokud takové operativní řešení není možné, dochází k provedení biopsie, při které je odebráno přibližně 10 % nádoru, který je následně využit jednak k histologickému vyšetření, tak i k molekulárně genetické analýze [22, 60].

Některé diagnostické markery umožňují přesnější zařazení nádoru a mohou napomoci při predikci reakce na léčbu. Především určení přítomnosti mutované varianty IDH, mutací EGFR nebo metylace promotoru MGMT může potenciálně přispívat k větší personalizaci léčebné strategie [34, 61].

1.2.4. Terapie GBM

GBM je vysoce agresivní nádorové onemocnění a prognóza pacientů je velmi nepříznivá. Volba terapeutické strategie závisí jednak na vlastnostech samotného nádoru, jakými jsou jeho lokalizace nebo velikost, ale také na celkovém stavu pacienta a přítomnosti klinických prognostických faktorů, např. věku pacienta nebo délce trvání jeho příznaků [14, 21].

Současným standardem terapie je co nejrozsáhlejší možná chirurgická resekce, následovaná radioterapií s případnou adjuvantní chemoterapií za použití alkylačního protinádorového léčiva temozolomidu (TMZ). Tato terapeutická strategie je však nedostatečná, často dochází ke vzniku recidiv a resistance na léčbu a medián přežití pacientů i po léčbě je 12-15 měsíců. Ačkoli zařazení TMZ do léčebné strategie přineslo zlepšení v podobě prodloužení průměrného přežití léčeného pacienta o přibližně 3 měsíce, ani tento přístup nezvyšuje dlouhodobé přežití (více než 5 let) nad 10 % případů [21, 62, 63].

1.2.4.1. Chirurgická léčba

Komplexní terapie GBM, podobně jako u jiných nádorů mozku, bývá zahájena chirurgickým výkonem, díky kterému je možné dosáhnout dočasného zmírnění či odstranění příznaků onemocnění. Cílem je provedení co nejrozsáhlejší možné chirurgické resekce. Vzhledem k rychlému, invazivnímu a vysoce proliferativnímu růstu GBM lze však maximální radikality dosáhnout jen málokdy. Cílem tedy zůstává takové odstranění nádorové masy, které zároveň nepovede k poškození funkcí důležitých částí mozku [14, 59].

Na základě pooperační MR kontroly je možné rozlišit několik typů resekcí podle velikosti odstraněné nádorové masy. Radikální, radiologicky totální resekce, při které dochází k odstranění 100 % předoperační nádorové masy, vykazuje úplnou nepřítomnost postkontrastního syčení při pooperačním MR vyšetření. U GBM a obecněji všech gliomů s vysokým stupněm malignity je však využití takovéto kurativní resekce prakticky nemožné. Téměř totální resekce je označení použitelné, pokud došlo k odstranění zhruba 90 % původní nádorové masy. Při subtotalní resekcí dochází k odstranění 51-90 % původního nádoru a dochází tak k nálezů residuálních ložisek nádoru. U některých typů nádorů, zejména umístěných v mozkovém kmeni, bazálních gangliích, nebo prorůstající corpus callosum (tzv. butterfly glioma), je však k anatomického hlediska nemožné provádět chirurgickou resekci. Zde pak přichází v úvahu provedení biopsie, během které je odstraněno méně než 10 % nádoru a takto získaný materiál je využit k definitivnímu určení diagnózy [14, 60].

Do 48-72 h od provedení operace je také nezbytné provedení kontrolního CT nebo MR vyšetření, které vede k odhalení postoperačních reziduí a případného krvácení. Úspěšnost a radikálnost chirurgického výkonu je důležitým prognostickým faktorem. V případě úspěšného provedení radikální resekce odstraňující více než 90 % původní

nádorové masy dochází k zvýšení průměrného přežití pacientů z 9 měsíců na více než 13 měsíců [59, 60].

1.2.4.2. Radioterapie

Radioterapie je nezastupitelnou součástí léčby nádorů mozku a k pilířům léčby gliomů patří od 70. let 20. století – tehdy bylo prokázáno zlepšení přežití pacientů, kteří podstoupili po operativním zákroku ozařování. Radiační terapie navíc zůstává hlavním léčebným přístupem u inoperabilních nádorů. V mnoha případech je u pacientů s vyhovujícím pooperačním stavem podávána radioterapie konkomitantně s chemoterapií [14, 64, 65].

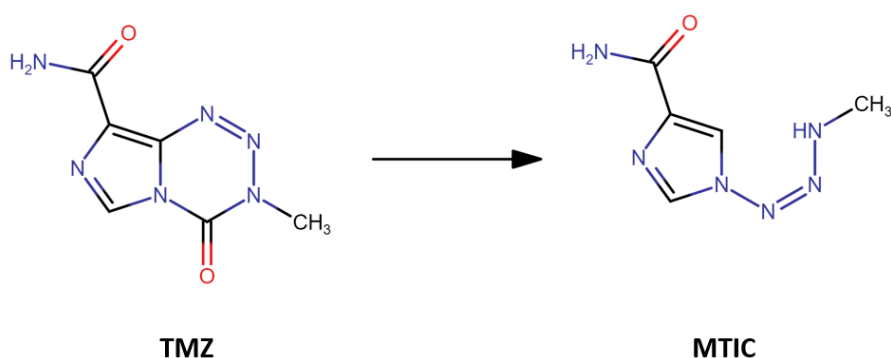
Standardním terapeutickým přístupem je v současné době ozařování v celkové dávce 60 Gy rozložené ve 30-33 frakcích. Velmi zásadní je přitom určení oblasti ozáření, k čemuž je u GBM a ostatních gliomů rutinně využívána magnetická rezonance. Existuje několik základních přístupů k volbě vhodné oblasti ozáření, jako např. ozařování větší oblasti v první fázi, v další následně ozáření menší oblasti. U pacientů s limitovanou očekávanou délkou života je možné také přistoupit k tzv. hypofrakcionaci, kdy dochází ke snížení počtu frakcí ozáření. Jedná se především o pacienty staršího věku (nad 70 let) a pacienty s nepříznivými prognostickými faktory, kteří běžný radioterapeutický přístup hůře tolerují. Terapeutické režimy u těchto pacientů zahrnují ozáření o dávce 40 Gy v 15 frakcích, nebo dávce 50 Gy ve 20 frakcích. U některých pacientů tohoto typu dokonce dochází k upuštění od radioterapeutické léčby a zařazení pouze chemoterapie [64, 66].

Radioterapie má také nezastupitelnou roli při léčbě rekurentního GBM. Rostoucí zájem o tuto léčebnou techniku je spojen především s příznivými výsledky společného užití ozáření s podáváním bevacizumabu, monoklonální protilátkou proti VEGF, který se vyznačoval mimo jiné schopností redukovat potenciální toxicitu tohoto postupu [65, 66].

1.2.4.3. Chemoterapie

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 [14, 59].

TMZ je chemicky imidazotetrazinový derivát alkylačního činidla dacarbazinu, jehož lipofilní charakter umožňuje přestup hematoencefalické bariéry. Jedná se ve své podstatě o proléčivo, které se za fyziologických podmínek rozkládá na aktivní částici MTIC (5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazol-4-karboxamid) s velmi krátkým poločasem rozpadu (Obr. 3). Tato aktivní částice následně připojuje methylové skupiny na O⁶- a N⁷-guanin a O³-adenin v DNA. O⁶-methylguanin je pak chybně párován s thyminem, což je rozpoznáno systémem pro opravu nesprávně spárované DNA. Tento systém však není schopen nesprávné párování opravit kvůli přetrvávající metylaci guaninu, což vede k zastavení cyklu replikace DNA, vzniku DNA zlomů a postupně až ke smrti buňky [62, 63].



Obr. 3. Struktura a metabolismus temozolomidu (TMZ). Vytvořeno pomocí softwaru Chemaxon Marvin JS

Ačkoli je metylace O⁶-guaninu hlavním zdrojem cytotoxického účinku TMZ, její vznik je pozorován pouze v 5 % vzniklých metylovaných adduktů. Dále vzniká ještě N⁷-methylguanin (až 70 % všech adduktů), jehož zařazení do DNA ovšem nevede ke vzniku žádného chybného párování. Vznikající O³-methyladenin také nevede ke vzniku chybného párování, přesto vykazuje schopnost hydrolyzovat DNA a *in vitro* blokovat DNA polymerizaci [67, 68].

Pooperační chemoradioterapie a následná udržovací chemoterapie TMZ je zlatým standardem při léčbě GBM. TMZ je podáván pacientům perorálně, což je umožněno jeho charakterem a stálostí při nižším pH, které je přítomno v oblasti trávicího traktu. Standardně je podáván v dávce 75 mg/m² po dobu 42 dnů (včetně víkendů) při provádění radioterapie standardní frakcionací. Po ukončení ozařování je TMZ podáván monoterapií v dávce 150-200 mg/m² 5 dnů v týdnu po celkovou dobu 28 dnů. Tento cyklus je čtyřikrát až šestkrát

opakován, případně je terapie upravována při progresi onemocnění. U starších pacientů (více než 70 let), kteří mají prokázanou metylaci promotoru MGMT, se doporučuje podávání samotné chemoterapie TMZ, která zlepšuje jejich prognózu [14, 59, 64].

Použití TMZ při léčbě GBM se ovšem setkává s problémem častého a rychlého rozvoje rezistence vůči této léčbě. Více než 50 % pacientů s GBM neodpovídá na léčbu TMZ, ať už z důvodu přirozené, tělu vlastní rezistence na léčbu, nebo rezistence vznikající v průběhu léčby TMZ. Jednou z cest vzniku rezistence je aktivace MGMT proteinu, který se účastní opravy DNA a odstraňuje O⁶-methylové addukty z guaninu DNA, čímž eliminuje cytotoxický efekt TMZ. Tento efekt může být potlačen v případě deaktivace vzniku proteinu MGMT, což nastává také metylací jeho promotoru. Proto pacienti se zjištěnou metylací promotoru MGMT výrazně profitují z léčby TMZ [68, 69].

Rezistence vůči TMZ může vzniknout také vlivem hypoxického prostředí nádoru, ve kterém dochází k aktivaci VEGF a vzniku vysoce vaskularizovaného GBM, který snížene odpovídá na léčbu TMZ. U rezistentních GBM buněk také nalézáme zvýšeně aktivovaný STAT3, což vede jednak k stimulaci exprese MGMT, ale také opět ke zvýšené expresi VEGF. Mutační změny mohou nastat také v dalších proteinech podílejících se na opravě DNA poškozené působením TMZ [68, 69].

Ačkoli vedlejší účinky v současnosti podávané dávky TMZ nejsou tak markantní, dalším problémem spojeným s užitím TMZ je především nízká dostupnost léčiva v mozku oproti koncentracím dosaženým v krevním řečišti. Ačkoli TMZ prostupuje hematoencefalickou bariérou, v mozku dosahuje pouze 15-20 % koncentrace, která je dostupná v krvi. Další zvýšení dávky, které by umožnilo i zvýšení množství TMZ prostupujícího do mozku, je však omezené z důvodu toxických účinků spojených s vysokými dávkami TMZ [70].

1.2.4.4. Alternativní způsoby léčby

Nízká účinnost současné léčby, vznikající rezistence i opakovaný vznik ložisek GBM jsou důvody pro stálou snahu o vylepšení terapie GBM. V současné době probíhá velké množství klinických studií zaměřujících se především na cílenou biologickou léčbu. Největší pozornost je již delší dobu věnována monoklonálním protilátkám, jakými jsou např. bevacizumab, který zabraňuje vazbě VEGF na jeho odpovídající receptor a tím blokuje jeho signální dráhu. Několik klinických studií hlásí ve fázích I a II příznivé výsledky

působení bevacizumabu na přežití pacientů, a to jak při použití samotného léčiva, tak v jeho kombinaci s dalšími léčivy (např. irinotekanem), nebo v kombinaci se s používanou chemoradioterapií [59].

Inhibicí angiogeneze a proliferace buněk GBM účinně působí také ivermektin. Toto anthelmintikum vykazuje nadějně výsledky při testování působení na GBM buňky, problémem by však mohla být jeho zdánlivá neprostupnost přes hematoencefalickou bariéru související s P-glykoproteinem. Podle některých výsledků je však ivermektin aktivitu tohoto proteinu schopen inhibovat a v nižších koncentracích do mozku vstupovat [71].

Dalšími intenzivně testovanými látkami pro léčbu GBM jsou malé molekuly inhibující amplifikovaný EGFR protein (erlotinib, gefotinib), jejichž prvotní testování naznačovalo zvýšený účinek na GBM a díky jejich malé molekulové hmotnosti také vhodnost pro perorální podání. Nicméně doposud nebylo možné tento efekt ověřit a potvrdit v následných studiích včetně klinických testů [20].

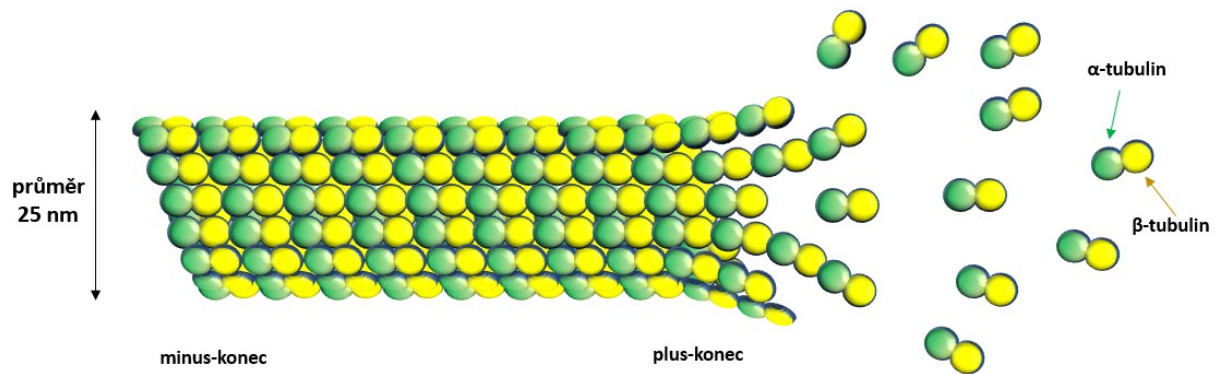
1.3. Mikrotubuly v GBM

1.3.1. Mikrotubuly – struktura a funkce

Další významnou charakteristikou gliových buněk je jejich morfoloická heterogenita, což platí i u buněk GBM, které se liší nejenom tvarově, ale i svou individuální velikostí. Hlavní roli ve vytváření a udržování tvaru a velikosti jednotlivých buněk hrají proteiny buněčného cytoskeletu. Kromě toho však cytoskeletální proteiny napomáhají řídit vnitřní buněčný transport, podílí se na velkém množství buněčných funkcí, umožňují buňkám růst, dělit se a adaptovat se na podmínky okolního prostředí, např. prostřednictvím změn v adhezi či migraci. Cytoskelet gliových buněk, podobně jako cytoskelet ostatních buněk lidského organismu, se skládá ze tří hlavních částí – mikrofilament, mikrotubulů a intermediárních filament [1, 72].

Mikrotubuly jsou polymery tvořené proteinem tubulinem, podjednotkou o velikosti zhruba 50 kDa. Je možné rozlišit dva druhy tubulinu, α - a β -tubulin, které se podílejí na tvorbě finálních mikrotubulů. Vytváří heterodimery s navázanou molekulou GTP, která je později důležitá při polymerizaci a depolymerizaci mikrotubulů. Samotný mikrotubulus je dutá cylindrická trubice tvořená 13 protofilamenty – tato protofilamenta jsou tvořena za sebou naskládanými heterodimery $\alpha\beta$ -tubulinu stále ve stejném směru. Zatímco „spodní

část“ protofilamenta tvoří α -tubulin, „horní část“ protofilamenta je tvořena β -tubulinem. Díky tomu můžeme pozorovat jisté strukturně polární uspořádání, což umožňuje nazývat α -tubulinový konec mikrotubulu jako minus-konec, zatímco β -tubulinový konec mikrotubulu je možné označit za plus-konec [1].



Obr. 4. Struktura mikrotubulů

Polymerizace mikrotubulů probíhá postupným navazováním $\alpha\beta$ -heterodimerů na plus-konec vznikajícího mikrotubulu. Během tohoto děje dochází k využití energie z navázaného GTP a jeho hydrolyze na GDP. Mikrotubuly však většinou nevznikají volně a náhodně v cytoplazmě buňky, ale jsou svým minus koncem, na kterém neprobíhá tak intenzivní růst, ukotveny ve struktuře nazývané mikrotubuly organizující centrum (MTOC). To je tvořeno značným množstvím proteinů, z nichž důležitý pro tvorbu mikrotubulů je γ -tubulin, který v MTOC vytváří prstencový komplex sloužící jako templát pro vytvoření mikrotubulu z protofilament [1, 73].

Při velmi rychlém růstu mikrotubulů nedochází ke kompletní hydrolyze navázaného GTP a na plus-konci mikrotubulů tak vzniká tzv. GTP čepička. Ta zvyšuje stabilitu vznikajícího mikrotubulu a snižuje frekvenci rozpadu mikrotubulu. Naopak konce mikrotubulů, které nejsou touto čepičkou chráněny a jsou označeny molekulou GDP vstupují do tzv. mikrotubulární katastrofy a začínají se zkracovat. Změny mezi růstem a zmenšováním mikrotubulu nastávají velmi rychle a jsou znakem dynamické nestability mikrotubulů [1, 73].

S mikrotubuly interaguje velké množství proteinů a mnoho z nich se zapojuje přímo do regulace dynamiky mikrotubulů. Jedná se o s mikrotubuly asociované proteiny (MAPs),

kteře interagují s mikrotubuly po celé jejich délce a pomáhají je stabilizovat. Další skupinou jsou proteiny interagující s plus-koncem mikrotubulů (+TIPs). Jejich hlavním zástupcem jsou EBs („end-binding proteins“), které jsou zároveň hlavním regulátorem zapojení ostatních proteinů této skupiny a polymerizace mikrotubulů. Obecně se dá říct, že tyto proteiny stimulují nepřetržitý růst mikrotubulů a jsou spojeny s redukcí mikrotubulárních katastrof [73].

Kromě proteinů stabilizujících růst mikrotubulů jsou s mikrotubuly spojeny také proteiny, které růst a polymerizaci mikrotubulů destabilizují. Protein stathmin se váže na $\alpha\beta$ -heterodimer a zabraňuje tak jeho vazbě na rostoucí mikrotubuly, čímž podporuje depolymerizaci mikrotubulů z důvodů snížené dostupnosti celkového tubulinu. Jiné proteiny, jakými jsou například katanin a spastin, mají přímo schopnost fyzicky oddělovat tubuliny, čímž přispívají k další destabilizaci mikrotubulární sítě [1, 73].

Jednou z důležitých vlastností mikrotubulů, podobně jako u dalších částí buněčného cytoskeletu, je schopnost podílet se na přenosu celé řady buněčných nákladů. Tuto schopnost zprostředkovávají proteiny mikrotubulárních motorů, které jsou asociovány s mikrotubuly a využívají je jako „naváděcí dráhy“ pro svůj specifický pohyb v buňce. Rozeznáváme dva základní mikrotubulární motory, a sice kinesin, který přenáší buněčný náklad směrem k rostoucímu plus-konci mikrotubulů, tedy zpravidla ze středu buňky k jejím okrajům, a dále dynein, který se specificky pohybuje se svým nákladem k minus-konci mikrotubulů ukotveném v MTOC. Oba tyto motory k pohybu po mikrotubulech využívají energii získanou hydrolyzou ATP, jehož molekula je s nimi asociována [1, 74, 75].

Mikrotubuly mají v buňkách mnoho funkcí, podílejí se na udržení buněčného tvaru, buněčné polarity, účastní se vnitrobuněčného transportu a hrají velkou roli při buněčném dělení. Právě mikrotubuly vytváří mitotické vřeténko, které se tvoří při mitóze a umožňuje rovnoměrné rozdělení genetické informace v buňce. Právě velká dynamická nestabilita mikrotubulů a jejich schopnost rychle přecházet mezi růstem a zkracováním (tedy polymerizací a depolymerizací) umožňuje rozdělení sesterských chromatid během mitózy a jejich rozestoupení se k jednotlivým pólům buňky. Při tomto procesu dochází také k zapojení mikrotubulárních motorů, které napomáhají přitahování mikrotubulů k jednotlivým pólům [73, 76].

Velká rozmanitost funkcí, do kterých jsou mikrotubuly v buňce zapojeny, je také způsobena značnými odlišnostmi v jejich vlastnostech. Ačkoli jsou stále tvořeny stejnými

podjednotkami, jejich výsledné vlastnosti jsou značně heterogenní. To je způsobeno jednak různými proteiny, které jsou s danými mikrotubuly asociovány, ale také posttranslačními modifikacemi jejich podjednotky tubulinu. U mikrotubulů existuje celá řada modifikací, jakými jsou např. acetylace, polyglutamylace, tyrosinace nebo detyrosinace. S výjimkou acetylace se posttranslační modifikace odehrávají na karboxy-konci tubulinu, acetylace tubulinu se odehrává na lysinovém zbytku v pozici 40 a právě tato modifikace hraje velkou roli při vzniku vysoce stabilních mikrotubulárních struktur [77, 78].

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 isoform tubulinů. V případě β -tubulinu je možné rozeznávat 7 jeho isoform (I, II, III, Iva, IVb, V, a VI), které se liší především ve struktuře na C-konci proteinu, který je zároveň vazebným místem pro MAPs. Jednotlivé isoformy se v organismu liší svou distribucí a stupněm své exprese. Pro vyvíjející se nervovou tkáň je důležitý především β III-tubulin, kdy je zastoupen jak v diferencujících se neuronech, tak i fetálních astrocytech. U dospělého člověka je však β III-tubulin zastoupen v neuronech, a ne v gliových buňkách [79, 80].

Ačkoli je β III-tubulinu je v normálním organismu lokalizován především v nervových buňkách, jeho zvýšená exprese byla pozorována ve značném množství nádorových buněk, včetně gliomových buněk. Především u GBM je jeho exprese vysoká a je spojena s dediferenciací těchto buněk, jejich zvýšenou schopností invazivity a nepříznivými klinickými výsledky. Naproti tomu zvýšená exprese této isoformy u neuronálních nádorů vede ke snížené proliferaci buněk a příznivější prognóze [80, 81].

β III-tubulin je také významným faktorem přežití nádorových buněk a je součástí komplexní signální dráhy vyvolané přítomností hypoxického prostředí a nutričního nedostatku. U GBM buněk bylo prokázáno přímé spojení mezi přítomností markerů hypoxického prostředí HIF a zvýšenou expresí β III-tubulinu. Tato isoforma je také spojována s resistencí k léčbě některými látkami ovlivňujícími mikrotubuly. [79, 82].

Také exprese γ -tubulinu je v GBM buňkách zvýšená, což může vést jednak ke zvýšené novotvorbě mikrotubulů, ale také působit změny ve funkci a četnosti vznikajících centrosomů při buněčném dělení. Zvýšená exprese způsobuje u některých GBM buněk také

změny v lokalizaci γ -tubulinu, který pak nebývá uložen pouze v γ -tubulinovém prstencovém komplexu MTOC, ale je také difúzně exprimován v cytoplazmě buněk [81, 83].

Změny v expresi γ -tubulinu vedou ke strukturním a funkčním změnám centrosomů, které ve výsledku mohou vést k abnormalitám na mitotických vřetencích. Ty mohou způsobovat různé poruchy rozdělení genetické informace při dělení buňky, jakými jsou chromozomové zlomy, nesprávné dělení sesterských chromatid až vznik aneuploidních dceřiných buněk [81].

Posttranslační modifikace mikrotubulů jsou přítomny v nádorových buňkách včetně GBM. V GBM jsou přednostně zastoupeny tři druhy těchto modifikací, 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. Acetylace a polyglutamylace se potom pojí s mikrotubulárními strukturami s vysokou stabilitou, a proto jsou zvýšeně přítomny také v nervových buňkách. Přítomnost posttranslačních modifikací také ovlivňuje vaznost jednotlivých MAPs a mikrotubulárních motorů. Zatímco u jiných buněk se mikrotubulární motor kinesin váže preferenčně na acetylované formy tubulinu, u GBM buněk tento motor zdánlivě preferuje vazbu na tyrosinované formy tubulinu [84, 85].

1.3.3. Látky ovlivňující mikrotubuly

Vzhledem k významu mikrotubulů pro široké spektrum biologických procesů představují tradičně základní cíl protinádorové léčby. Látky ovlivňující mikrotubuly („microtubule targeting agents“, MTAs), jinak označované jako mitotické jedy, jsou širokou a rozmanitou skupinou látek, které se váží na mikrotubuly a ovlivňují jejich polymerizaci a jejich funkce. Většina těchto látek pochází původně z přírodních zdrojů a jejich použití přineslo značný postup v protinádorové terapii [86, 87].

Velmi zjednodušeně lze mitotické jedy rozdělit do dvou základních skupin – 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. Zde rozeznáváme tři základní místa, vždy pojmenovaná podle jejich nejznámějšího zástupce – rozlišujeme vinka vazebné místo, kolchicinové místo a taxanové vazebné místo [86, 87].

Mikrotubuly obsahují výrazně vyšší množství vazebných míst, z nichž některé již byly podrobně popsány (např. maytasinové vazebné místo, pironetinové vazebné místo) a zároveň byly také definovány látky působící na mikrotubuly právě vazbou na tato vazebná místa. Kromě toho jsou v mikrotubulech také vazebná místa, na která prozatím žádné látky zacíleny nebyly. Tři výše zmíněná vazebná místa přesto zůstávají nejvýznamnějšími vazebnými místy pro látky ovlivňující mikrotubuly [88, 89].

Klinický úspěch mitotických jedů je však značně poznamenán vznikající rezistencí proti těmto léčivům. Ta je často spojena se zvýšenou expresí ABC transportérů, především efluxního transportéru P-glykoproteinu, který je jednou z příčin vzniku multirezistence. Také některé isoformy tubulinu, např. β III-tubulin, mohou snižovat citlivost buněk k jednotlivým léčivům a způsobovat tak selhání terapie. Isoforma β III-tubulin je konkrétně spojována s rezistencí na léčbu látkami ze skupiny taxanů, které obecně stabilizují inhibicí jejich depolymerizace. Vzhledem k tomu, že je exprese β III-tubulinu v nádorových buňkách spojena se závažnější prognózou a vyšší agresivitou nádoru především formou zvýšené depolymerizace mikrotubulů, stabilizace mikrotubulů vyvolaná taxany nepřináší očekávané zlepšení a nádorové buňky tak vykazují resistenci vůči této léčbě [79, 87, 90].

1.3.3.1. Látky působící na taxanové vazebné místo

Taxanové vazebné místo je umístěno na β -tubulinové podjednotce na vnitřní straně povrchu mikrotubulů. Poprvé bylo popsáno v 90. letech 20. století, což podnítilo značnou aktivitu ve strukturálním výzkumu. Nejvýznamnějšími léčivy vázajícími se do tohoto vazebného místa jsou paklitaxel a jeho semisyntetický analog docetaxel. Obě léčiva svou vazbou stabilizují mikrotubuly a podporují jejich polymerizaci. Jsou využívány především při léčbě nádorů prsu a ovarií, schváleny jsou ale také k léčbě některých nádorů plic [90, 91].

Dalšími látkami vázajícími se přímo na taxanové vazebné místo, nebo do jeho blízkosti, jsou epothilony. Tato makrolidová léčiva podobně jako paklitaxel stabilizují polymerizaci mikrotubulů, vyvolávají zástavu buněčného cyklu a programovanou buněčnou smrt. Výhodou těchto látek také je, že vykazují účinnost i proti nádorovým buňkám rezistentním na léčbu paklitaxelem [81, 86, 90].

1.3.3.2. *Látky působící na kolchicinové vazebné místo*

Kolchicinové vazebné místo je umístěno na β -tubulinu v blízkosti dimerového rozhraní s α -tubulinem. Látky vázající se na toto vazebné místo, které byly do současné doby součástí výzkumu, patří mezi látky mikrotubuly destabilizující. Hlavním představitelem této skupiny je kolchicin, po kterém vazebné místo nese i své jméno. Kolchicin svou vazbou na mikrotubuly může vyvolat dva opačné efekty, a to v závislosti na použité koncentraci. V nižších koncentracích kolchicin stabilizuje dynamiku mikrotubulů, zatímco ve vyšších koncentracích vyvolává depolymerizaci mikrotubulů [86, 90, 92].

Využití kolchicinu v léčbě nádorového bujení je značně omezeno jeho toxicitou, úzkým terapeutickým oknem a rozvojem multirezistence, proto není v současné době v klinické praxi pro léčbu nádorů indikován. Další látky vázající se na kolchicinové vazebné místo patří k nejvíce studovaným mitotickým jedům. Patří mezi ně také combretastatiny, které jsou strukturálně podobné kolchicinu a vyvolávají depolymerizaci mikrotubulů [92, 93].

Některé studie navíc odhalily, že combretastatiny a další látky vázající se na kolchicinové vazebné místo inhibují tvorbu nového cévního zásobení nádoru a combretastatiny tak s výhodou vykazují také antiangiogenní efekt [93].

1.3.3.3. *Látky působící na vinka vazebné místo*

Velká většina látek depolymerizujících mikrotubuly se váže právě do vinka vazebného místa, které se nachází na β -tubulinu na rozhraní dvou tubulinových dimerů. Hlavními skupinami léčiv, které toto místo využívají, jsou vinka alkaloidy a eribulin. Vinka alkaloidy, jejichž hlavními zástupci jsou vinkristin a vinblastin, se používají při léčbě širokého spektra solidních tumorů, ale také hematologických malignit. Hlavním problémem jejich indikace jsou jejich nežádoucí účinky, zahrnující myelosupresi a neurotoxicitu [86, 89, 90, 94].

V blízkosti vinka vazebného místa na β -tubulinu se nachází také maytasinové vazebné místo a látky přirozeně se vázající na toto vazebné místo na tubulinu mohou tak interagovat s vazbou vinka alkaloidů na mikrotubuly. Vazbu některých vinka alkaloidů může také inhibovat další látka vázající se na vinka vazebné místo, eribulin. Tento syntetický derivát látky izolované z mořské houby ve vysokých koncentracích vyvolává

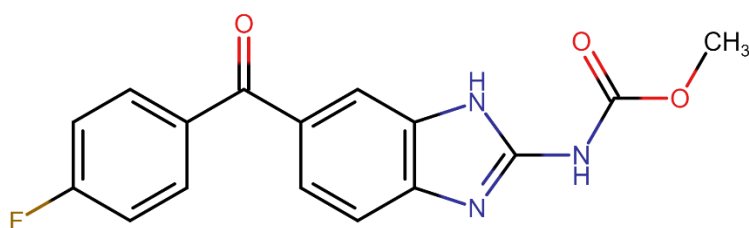
depolymerizaci mikrotubulů a v nižších koncentracích inhibuje dynamickou nestabilitu mikrotubulů [89, 95].

Mnoho dalších látek cílících na toto vazebné místo je stále v intenzivním klinickém testování, např. dolastatin, který je schopen indukovat apoptózu v celé řadě buněk solidních nádorů [87, 96].

1.4. Benzimidazoly

Vývoj nových protinádorových léčiv se zvýšenou účinností a nízkými vedlejšími účinky je časově a finančně velmi náročný proces, jehož účinnost v podobě vstupu léčiva do klinického testování je nízká. Jako mnohem výhodnější se jeví proces zvaný „drug repurposing“, tedy využití již existujících léčiv původně určených pro jinou indikaci při cílení na nádorové buňky. Výhodou této strategie je především již známý farmakokinetický a farmakodynamický profil takových léčiv a také již získaná informace o jejich toxicitě, což snižuje riziko selhání takového léčiva v dalších testováních z důvodu vysokého výskytu nežádoucích účinků [97, 98].

Mezi vhodné kandidáty pro využití léčiv původně určených pro jinou indikaci patří léčiva ze skupiny anthelmintických benzimidazolů, kam řadíme např. flubendazol, mebendazol nebo albendazol. Jedná se o látky se společným chemickým základem v podobě benzimidazol-karbamátu, které se užívají jako anthelmintika i v lidské terapii a vyznačují se především nízkou toxicitou a efektivitou proti širokému spektru helmintů. Flubendazol (FLU), jeden ze zástupců této skupiny, je originálně veterinární anthelmintikum, v současné době využívaný také v humánní medicíně (Obr. 4). Od ostatních benzimidazolů se odlišuje především přidaným atomem fluoru [98-100].



Obr. 5. Chemická struktura flubendazolu (FLU). Vytvořeno pomocí softwaru Chemaxon Marvin JS

FLU je v Evropě schválen pro léčbu lidských nematod v dávce 5mg/kg po dobu 3 dnů, proti střevním nematodám vykazuje účinek také u drůbeže, prasat a mnoha druhů domácích zvířat se stejným navrženým dávkováním jako u lidí, nicméně existuje předpoklad, že i jednodávkové podání navozuje požadovaný účinek. Účinek FLU na helminty je velmi komplexní a není zcela objasněný, na molekulární úrovni však dochází k vazbě FLU na mikrotubuly, což vede k jejich poškození a k poškození organismu helminta. Výhodou jeho použití jako anthelmintika je, že podobně jako ostatní léčiva z benzimidazolové skupiny vykazuje výrazně větší afinitu k mikrotubulům helminta než k lidským mikrotubulům [98, 99, 101].

Právě schopnost FLU vázat se na mikrotubuly a inhibovat je, naznačuje možnost použití tohoto léčiva v protinádorové terapii. FLU interaguje specificky s β -tubulinem a váže se na kolchicinové vazebné místo. Při porovnání jeho afinity s dalšími benzimidazolovými látkami, např. mebendazolem nebo nocardazolem, FLU vykazoval největší afinitu k vazbě na mikrotubuly. Svou vazbou na mikrotubuly ovlivňuje jejich polymerizaci, pozměňuje jejich strukturu a vykazuje také vliv na některé funkce spojené s mikrotubulárním cytoskeletem [99, 102, 103].

FLU je v současné době administrován perorálně a vstřebává se gastrointestinálním traktem. V několika studiích při testování jeho podání jako anthelmintika proti systémovým helmintózám nevykazoval vznik závažných vedlejších účinků ani při podání v dávce 50 mg/kg kontinuálně po dobu 24 měsíců. Závažné vedlejší účinky nevyvolávalo ani jednorázové podání dávky 2000 mg. Problémem podání FLU je ovšem jeho nízká biodostupnost. Tato látka je velmi špatně rozpustná ve vodném prostředí gastrointestinálního traktu, což způsobuje její nízké vstřebávání do krevního řečiště. V současné době však již existují systémy, které zvyšují rozpustnost FLU ve vodných systémech, a tak i jeho

biodostupnost. Vysokou efektivitu v myších modelech vykazovalo také subkutánní podání [99-101].

Metabolismus FLU byl prostudován u mnoha živočišných druhů, kde bylo ověřeno, že existují dvě hlavní metabolické cesty – redukce karbonylu za vzniku redukovaného FLU (FLU-R) nebo hydrolyza karbamátu za vzniku hydrolyzovaného FLU (FLU-H). V lidských nádorových buněčných liniích a lidských jaterních řezech byl hlavním metabolitem FLU-R, při inkubaci FLU s lidskými jaterními řezy a lidskými jaterními mikrosomy byl dokonce nalezen pouze redukovaný metabolit, což naznačuje, že redukce je dominantní metabolickou cestou FLU v lidských játrech. Hlavní roli v této metabolické cestě hraje karbonyl-reduktáza 1, která je však zároveň metabolickým enzymem dalších léčiv v lidském organismu. Během testování interakce FLU s docetaxelem, který je dalším substrátem tohoto enzymu, však nedocházelo ke vzniku žádných interakcí a celkově nízká afinita FLU k tomu enzymu naznačuje, že riziko takových interakcí je nízké [99, 104].

Protinádorový efekt FLU byl demonstrován u buněk celé řady solidních tumorů i hematologických malignit, a to jak u buněk stabilizovaných buněčných linií, tak u buněk odvozených z patientských vzorků. Poprvé byl inhibiční efekt FLU na nádorové buňky zaznamenán u leukemických buněk a buněk myelomu. Během dalších studií prokázal FLU efekt také proti buňkám nádorů prsu, jater, kolorektálního karcinomu, neuroblastomu nebo melanomu. Výhodou je také účinnost FLU na buňky vykazující rezistenci vůči vinka alkaloidům z důvodu zvýšené exprese P-glykoproteinu. FLU také prokázal svou účinnost proti buňkám nádorů střev, kde byl také testován v kombinaci s paklitaxelem, jehož účinek potencoval [98, 99, 105-107].

FLU působí na nádorové buňky inhibicí mikrotubulů a také inhibicí progresu buněčného cyklu, což vede k zástavě buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze. Tento efekt byl potvrzen u buněk nádorů prsu, melanomu, kolorektálního karcinomu nebo u buněk gliomů. Také u buněk nádoru prostaty docházelo účinkem FLU k zástavě buněčného cyklu na přechodu z G2 do M fáze, zde byl tento efekt ovšem spojován se zvýšením exprese p53. V souvislosti s použitím FLU byla popsána řada dalších mechanismů účinku, např. u buněk nádorů prsu FLU signifikantně zvýšil hladiny reaktivních forem kyslíku s následným navozením autofagie a buněčné smrti. Autofagickou buněčnou smrt FLU vyvolával také u buněk plicního nádoru. U buněk spinocelulárního karcinomu ústní dutiny FLU inhiboval

jejich migraci a epiteliálně-mesenchymální transformaci, která je úzce spojena se vznikem rakovinného bujení [100, 103, 108-111].

Dalším možným mechanismem účinku FLU by mohlo být jeho fungování jako inhibitoru molekuly STAT3. U buněk nádorů prsu, nemalobuněčného karcinomu plic a kolorektálního karcinomu FLU inhiboval aktivaci STAT3 a tím i blokoval STAT3-závislou signální dráhu. V buňkách melanomu FLU přímo snižoval expresi STAT3 společně s hladinami proteinu CD31, což naznačovalo sníženou úroveň schopnosti angiogeneze těchto buněk [100, 112-115].

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 umožnily jeho vstup do první fáze klinického testování pro pacienty s nově diagnostikovanými gliomy s vysokým stupněm malignity. Mebendazol byl také s úspěchem testován v kombinaci s TMZ a vinblastinem, kdy docházelo k inhibici proliferace GBM buněčných linií [116-118].

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 [111, 119].

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 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. Materiály

3.1.1. Chemikálie

- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (ATCC, LGC Standard)
- EMEM – Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC, LGC Standard)
- RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich)
- Humulin N (Eli Lilly)
- Transferin (Sigma-Aldrich)
- FBS – Fetální bovinní sérum (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- Penicilin/Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- Fosfátový pufr 10x PBS (PanBiotech)
- Temozolomid (Sigma-Aldrich)
- Flubendazol (Sigma-Aldrich)
- 1x Opti-MEM (Sigma-Aldrich)
- X-tremeGENE™ siRNA Transfection Reagent (Sigma-Aldrich)
- SignalSilence® STAT3 siRNA (CellSignaling Technology)
- SignalSilence® Control siRNA – Fluorescein conjugate (CellSignaling Technology)
- Bovinní sérový albumin BSA (Sigma Aldrich)
- Cell proliferation reagent WST-1 (Roche)
- DEPC voda (voda bez nukleáz) (InVitrogen)
- VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories)
- VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)
- TRISOL reagent (Sigma-Aldrich)
- Direct-Zol RNA MiniPrep (Zymo Research)
- First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific)
- SYBR GREEN I (Roche)
- BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific)
- Blotting-Grade Blocker (Bio-rad)
- ECL Prime Western Blotting (Amersham, GE Healthcare Life Science)
- Promega Caspase-Glo Assay – kaspázy 3/7, kaspáza 8, kaspáza 9 (Promega)

3.1.2. Přístrojové vybavení

- Laminární box Alpina
- CO₂ inkubátor Sanyo (Schoeller)
- Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience)
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200 (Tecan)
- Olympus IX-70 s fázovým kontrastem (Olympus)
- Zeiss LSM 700 konfokální mikroskop (Zeiss)
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf)
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf)
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)
- LightCycler 96 Instrument (Roche Life Science)
- Azure c600 Gel Imaging System (Azure Biosystems)
- TissueLyser LT (Qiagen)

3.1.3. Stabilizované buněčné linie

Pro potřeby této disertační práce byly využity tři nádorové buněčné linie A172, T98G a U118MG, které byly získány od společnosti ATCC. Buňky A172 a T98 patří mezi nejčastěji používané experimentální modely pro studium GBM, vyznačující se především vysokou proliferační aktivitou. Buněčná linie A172 byla odvozena z GBM získaného od 53-letého muže, zatímco buněčná linie T98G je polyploidní variantou buněk T98 odvozených z GBM 61-letého muže [120].

Buňky U118MG jsou odvozeny z buněk maligního GBM získaných od 50-letého muže, které vykazují podobné vlastnosti jako předchozí buněčné linie, zároveň však vykazují schopnost vytvářet nádory v atymických myších [121].

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 % směs 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.

3.1.4. 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. [70].

Vzorek nádorové tkáně byl umístěn na Petriho misku, rozřezán na malé kousky a transportován v transportním médiu. Získaná tkáň byla několikrát důkladně promyta, aby došlo ke zbavení erytrocytů. Zbývající vzorek byl mechanicky rozmělněn za využití nůžek a skalpelu a dále několikrát protlačen skrz stříkačku s jehlou. Takto zpracované buňky byly přeneseny do kultivační lahve o ploše 25 cm² a resuspendovány s kultivačním médiem.

Buňky byly dále kultivovány v kultivačním médiu, které bylo složeno z média RPMI 1640 (Sigma Aldrich) obohaceného o 15 % FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific), inzulin (100 IU/ml, Eli Lilly) a transferin (2 mg/ml, Sigma-Aldrich). Po dobu 14 dní po přípravě primární kultury byly buňky kontrolovány každé 3 dny a bylo vyměňováno médium do doby, než buňky vytvořily souvislou vrstvu na kultivační lahvi. Následně byly buňky subkultivovány za pomoci směsi trypsin/EDTA a umístěny do nových kultivačních lahví. 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.

3.1.5. Modelový organismus atymické myši

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. Nu-nu myši postrádají brzlík a nejsou schopné produkovat T-lymfocyty [122].

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.

3.2. Metodika

3.2.1. Měření viability a proliferace buněk

3.2.1.1 Testování viability buněk metodou WST-1

Viabilita stabilizovaných buněčných linií a GBM primárních kultur a ovlivnění jejich viability působením TMZ a FLU bylo stanoveno metodou WST-1. Principem tohoto stanovení je kolorimetrický test, při kterém dochází ke štěpení tetrazoliové soli na barevný produkt formazan buněčnými enzymy přítomnými v aktivních buňkách. Zvýšené množství viabilních buněk tak zvyšuje množství vzniklého formazanu, což je následně spektrofotometricky stanoveno [123].

Buněčné linie A172, T98G a U118MG a GBM primokultury byly nasazeny do 96jamkových destiček (7500 buněk/jamku) a po 24 h kultivaci 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 do každé jamky přidáno 100 μl roztoku WST-1 (zředěného v poměru 1:20) a buňky byly kultivovány další 2 hodiny.

Absorbance byla změřena za použití destičkového spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan) při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 650 nm.

3.2.1.2. Měření proliferace buněk systémem xCELLigence

Systém xCELLigence (ACEA Biosciences) umožňuje analýzu buněk a monitorování jejich proliferace v reálném čase. Pro měření se používají speciální kultivační destičky („E-Plate“), které obsahují zlaté mikroelektrody zabudované na dně každé jamky. Tyto mikroelektrody měří impedanci a její rozdíly jsou pak vyjádřeny reprezentativní hodnotou buněčného indexu. Jeho hodnota může být ovlivněna mnoha proměnnými, jako jsou např. velikost buněk, počet buněk, množství buněčných spojů [124].

Testování proliferace bylo provedeno na 16jamkové destičce („E-Plate“), na kterou bylo nejprve pipetováno 90 μl příslušného média do každé jamky a destička byla vložena do přístroje pro změření pozadí. Následně bylo na destičku přidáno 100 μl buněčné suspenze (buněk A172, T98G, U118MG a GBM primokultur) obsahujících 5000 buněk/jamku. Buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin a každou hodinu byla měřena impedance.

Po počáteční inkubaci byly buňky ovlivněny přidáním 10 µl média obsahujícího FLU tak, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace ovlivnění pro FLU 0,5 µM a 2 µM. Destičky byly vloženy zpátky do přístroje a impedance byla měřena každou hodinu po dobu 72 h.

3.2.2. Transfekce buněk pomocí siRNA

Malé interferující RNA („small interfering RNA“, siRNA) jsou schopné regulovat genovou expresi pomocí jevu zvaného RNA interference, kdy dochází k ztišení genu zacílením siRNA na komplementární mRNA a její následnou degradací [125]. 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 reagens X-tremeGENE siRNA.

Buňky A172 a T98G byly inkubovány v 6jamkové destičce a 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 následující tabulky (viz Tab. 2).

Tab. 2. Příprava transfekčních roztoků (pro 2 jamky)

	Kontrolní transfekce (SignalSilence® Control siRNA – Fluorescein conjugate)	Transfekce proti siRNA (SignalSilence® STAT3 siRNA)
siRNA	10 µl kontrolní siRNA	10 µl siRNA proti STAT3
1x Opti-MEM	180 µl	180 µl
X-tremeGENE siRNA	10 µl	10 µl

Buňky byly transfekovány výše zmíněnými připravenými roztoky, případně ovlivněny 0,5 µM FLU a inkubovány 48 h při 37 °C a 5 % CO₂. Takto připravené buňky byly následně podrobeny dalším analýzám.

3.2.3. Fázově kontrastní mikroskopie

Pro stanovení efektu testovaných chemoterapeutik TMZ a FLU na buněčnou morfologii a subcelulární organizaci buněk byla využita fázově kontrastní mikroskopie. Buňky A172, T98G, U118MG a GBM primokultur byly pro tento účel kultivovány v kultivační lahvi o ploše 12,5 cm². Buňky byly ovlivněny 0,5 μM FLU nebo 500 μM TMZ a kultivovány v buněčném inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

Po 24 h, 48 h a 72 h inkubace byly buňky, jejich morfologie a jejich chování pozorovány pomocí mikroskopu Olympus IX-70 s fázovým kontrastem (Olympus) za využití objektivů LCPlanFI 40x a LCPlanFI 60x.

3.2.4. Immunofluorescence buněk

Pro posouzení vlivu FLU na cytoskelet buněk A172 a T98G, se zaměřením na jeho mikrotubulární složku, byla využita fluorescenční mikroskopie. Buňky byly nasazeny na krycí sklíčka umístěná v 12jamkové destičce a po 24 h inkubaci ovlivněny různými koncentracemi FLU (100 nM; 250 nM; 500 nM; 750 nM; 1000 nM). Buňky ovlivněné FLU byly dále 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) – buňky byly převrstveny 500 μl ledového methanolu a inkubovány 15 minut při -20 °C, poté byl methanol odstraněn a buňky byly okamžitě překryty 500 μl 4 % paraformaldehydu a inkubovány 15 minut při pokojové teplotě
- kombinací 0,1 % glutaraldehydu a 4 % paraformaldehydu (pro protilátky anti-tyr-tubulin, anti-ac-tubulin, anti-α-tubulin) – buňky byly převrstveny 500 μl 0,1 % glutaraldehydu a inkubovány 1 minutu při pokojové teplotě, následně byl roztok glutaraldehydu odstraněn a buňky byly převrstveny 500 μl 4 % paraformaldehydu a inkubovány 15 minut při pokojové teplotě
- ledovým metanolem (pro protilátku anti-vimentin) – buňky byly převrstveny 500 μl ledového ethanolu a inkubovány 15 minut při -20 °C.

Po fixaci byly buňky dvakrát opláchnuty fosfátovým pufrem (1xPBS), permeabilizovány 0,3 % triton X-100 po dobu 3 minut při pokojové teplotě a následně ihned blokovány 2 % roztokem bovinního sérového albuminu (BSA) 60 minut při pokojové teplotě. Následovala inkubace vzorků s primární protilátkou (viz Tab. 3) při pokojové teplotě

po dobu 60 minut, po které byly vzorky dvakrát opláchnuty 1x PBS a následně inkubovány se sekundárními protilátkami (viz Tab. 4) po dobu 60 minut při pokojové teplotě za nepřístupu světla. Vzorky byly dvakrát opláchnuty 1x PBS, zamontovány za použití média Vectashield (Vector Laboratories) a pozorovány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 700 (Zeiss) za využití objektivů EC Plan-Neofluar 40x a Plan-Apochromat 63x a laserů o vlnové délce 405 nm, 488 nm a 555 nm.

Tab. 3. Přehled použitých primárních protilátek pro imunofluorescenční barvení

Název protilátky	Výrobce	Ředění protilátky
anti-EB1/EB3 (klon 15H11)	Absea	1:10
anti- α -tubulin	Sigma-Aldrich	1:300
anti-tyrosinovaný- α -tubulin	Thermo Fisher	1:300
anti-acetylovaný- α -tubulin	Sigma-Aldrich	1:200
anti- γ -tubulin	Sigma-Aldrich	1:200
anti-pericentrin	Abcam	1:100
anti-vimentin	Sigma-Aldrich	1:200

Tab. 4. Přehled použitých sekundárních protilátek pro imunofluorescenční barvení

Název protilátky	Výrobce	Ředění protilátky
anti-mouse AF488	Invitrogen	1:250
anti-mouse AF555	Invitrogen	1:250
anti-rabbit AF405	Invitrogen	1:250
anti-rabbit AF488	Invitrogen	1:250
anti-rabbit AF555	Invitrogen	1:250
anti-rat AF488	Invitrogen	1:250
anti-rat AF555	Invitrogen	1:250
AF488 Phalloidin	Invitrogen	1:250

3.2.5. Obrazová analýza

Obrazová analýza byla provedena v programu Fiji, normalizace dat proběhla pomocí programu MS Excel a statistická analýza takto získaných dat byla provedena 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), jejich množství bylo normalizováno na velikost buněk a vyjádřeno jako počet EB1/EB3 komet/ μm^2 .

3.2.6. Analýza RT-PCR

Buňky A172, T98G a GBM primokultur byly nasazeny do 6jamkové destičky (150 000 buněk/jamku) a inkubovány 24 h při 37 °C a 5 % CO₂. Následně byly ovlivněny různými koncentracemi FLU (0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM), dále inkubovány a v příslušných časových intervalech (24 h, 48 h a 72 h) sklizeny do TRISOL reagentu. Buňky byly následně promíchány se 100 % ethanolem a RNA z nich 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 poměr absorpcí A260/A280 byl u všech využitých vzorků větší než 1,8. Kvalita získané RNA byla ověřena pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) a hodnota RNA integračního čísla (RIN) byla u všech vzorků vyšší než 8.

Jednovláknová cDNA byla syntetizována z 1 μg RNA pomocí komerčního kitu First Strand cDNA Synthesis kit (Biogen) podle instrukcí výrobce. V první kroku byla provedena tepelná denaturace vzorku (5 min při 70 °C), následně byla ke každému vzorku přidána směs reakčního pufru, dNTP mixu, reverzní transkriptázy a inhibitoru RNasy a takto vzniklé směsi byly inkubovány 60 min při 37 °C. Reakce byla zakončena 5 min inkubací při 70 °C a 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. Reakční

směs pro stanovení byla připravena podle instrukcí výrobce s primery o finální koncentraci 100 nM a 5 μ l zředěné cDNA.

Kvantitativní analýza PCR byla zahájena denaturací (95 °C, 10 min), která byla následována 40 opakujícími se amplifikačními cykly – denaturace při 95 °C (10 s), nasedání primerů při 60 °C (10 s) a prodloužení řetězce při 72 °C (10 s). Během posledního kroku každého cyklu byla zaznamenána fluorescenční data. Všechny PCR analýzy byly provedeny v duplikátech a výsledky byly spočítány na základě využití delta-delta Ct metody. Data jsou vyjádřena jako změna relativního množství mRNA.

3.2.7. Analýza Western blot

Buňky A172, T98G a GBM primokultur byly nasazeny do 6jamkové destičky (150 000 buněk/jamku) a po počáteční 24 h inkubaci ovlivněny různými koncentracemi FLU (0,25 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M). Takto připravené buňky byly inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂ a v příslušných časových intervalech (po 24 h, 48 h nebo 72 h) byly buňky opláchnuty ledovým PBS a sklizeny za využití lyzačního pufru (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 40 mM β -glycerolfosfát, 50 mM NaF, 10 mM pyrofosfát sodný, 200 μ M Na₃VO₄, 2 mM DTT). Buňky byly následně ve zkumavce homogenizovány za využití injekční stříkačky s jehlou, vzniklý homogenát se ponechal 20 minut stát na ledu a následovala jeho centrifugace při 13 000 rpm, 4 °C po dobu 10 minut. U takto připravených vzorků byla změřena koncentrace bílkoviny pomocí BCA stanovení bílkoviny. Na základě zjištěné koncentrace bílkoviny byly jednotlivé vzorky naředěny lyzačním pufrem a 4xSDS vzorkovým pufrem na výslednou koncentraci 1 μ g/ μ l vzorku.

Zředěné vzorky byly povařeny 5 minut při 95 °C a 30 μ g každého vzorku bylo nanášeno na 10 % nebo 12 % SDS/polyakrylamidový gel a bylo provedeno elektroforetické rozdělení proteinů podle jejich velikosti při konstantním napětí 120 V. Rozdělené proteiny byly následně přeneseny na PVDF membránu (100 V; 0,25 A; 90 min) a blokovány v 5 % roztoku mléka v TBST pufru (Tris-NaCl pufr s 0,05 % Tween 20) po dobu 2 hodin. Posléze byly membrány inkubovány s primárními protilátkami (viz Tab. 5) zředěnými dle instrukcí výrobce v 2 % roztoku mléka v TBST nebo v 2 % roztoku BSA v TBST při 4 °C přes noc.

Po inkubaci s primárními protilátkami byly membrány opláchnuty čtyřikrát TBST pufrem a inkubovány se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou zředěnými v poměru 1:10 000 v 1 % roztoku BSA v TBST po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Membrány byly opláchnuty čtyřikrát TBST pufrem.

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).

Tab. 5. Přehled použitých primárních protilátek při stanovení Western blot

Název protilátky	Výrobce	Ředění protilátky
anti- α -tubulin	Abcam	1:5000
anti- β III-tubulin	CellSignaling Technology	1:2000
anti-STAT3	CellSignaling Technology	1:2000
anti-phospho-STAT3 (Tyr705)	CellSignaling Technology	1:2000
anti-p21	Santa Cruz Biotechnology	1:2500
anti-p53	CellSignaling Technology	1:1000
anti-cyclin B1	CellSignaling Technology	1:1000
anti-cdc2	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti-GAPDH	CellSignaling Technology	1:2000

3.2.8. Analýza distribuce 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 kultivovány v kultivačních lahvích o ploše 75 cm² a ovlivněny FLU 0,5 μ M. Po 12 h nebo 24 h inkubace byly buňky trypsinovány, přeneseny do 15 ml zkumavky a centrifugovány. Buňky byly dvakrát promyty ledovým PBS a fixovány pomocí 70 % ethanolu. Fixované vzorky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě v pufru (0,2 M Na₂HPO₄ v 0,1 M kyselině citrónové, pH 7,8) a označeny propidium jodidem ve Vindelově roztoku 1 hodinu při 37 °C.

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).

3.2.9. Luminiscenční stanovení aktivity kaspáz

Aktivita iniciačních kaspáz 8 a 9 a efektorových kaspáz 3 a 7 byla stanovena luminiscenční metodou komerčně dostupným kitem Promega Caspase-Glo Assay (Promega). Buňky A172 a T98G byly nasazeny do 96jamkové destičky (7500 buněk/jamku) a ovlivněny 0,5 μ M FLU. Po 4 h, 8 h, 16 h a 24 h inkubaci byly buňky sklizeny do kaspázového lyzačního pufru (50 mM HEPES, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) a u buněčných lyzátů byla stanovena koncentrace bílkoviny pomocí BCA stanovení.

K měření byla využita 384jamková destička s bílými stěnami určená pro luminometr. Reakční činidla pro kaspázy 3/7, kaspázu 8 a kaspázu 9 byly připraveny podle instrukcí výrobce. Do destičky bylo pipetována 25 μ l příslušného buněčného lyzátu a 25 μ l reakčního činidla. 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.

3.2.10. 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). Tyto FFPE bločky byly následně použity na konstrukci tkáňových mikročipů za využití TMA Master II systému (3DHISTECH Ltd.), kdy pro každý vzorek byl reprezentativní vzorek tkáně (o průměru 1 mm) přenesen z původního FFPE do nového bločku. Z těchto mikročipů byly nakrájeny 3 μ m tenké plátky, které byly následně použity pro IHC barvení.

Pro toto stanovení byly použity primární protilátky proti STAT3, STAT3p705 a Ki67 (viz Tab. 6). 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 proveden jedním patologem a bylo zaznamenáno procento pozitivně zbarvených buněk a intenzita zbarvení.

Tab. 6. Přehled použitých primárních protilátek pro IHC

Název protilátky	Výrobce	Ředění
anti-Ki67	Ventana	„ready to use“
anti-STAT3	CellSignaling Technology	1:400
anti-STAT3p705	CellSignaling Technology	1:100

3.2.11. In vivo experiment

3.2.11.1 Implantace buněk U118MG do modelového organismu

Implantace buněk U118MG do modelového organismu, tzv. nu-nu myši, byla provedena ve spolupráci s viváriem Lékařské fakulty v Hradci Králové subkutánně do pravého a levého boku, tj. ve dvou vpiších do každé myši. Buněčná suspenze pro jeden vpich obsahovala 3 miliony buněk resuspendovaných v 1x PBS. Implantace byla provedena do 16 nu-nu myší rozdělených do 4 skupin (viz Tab. 7). Nádory rostly po dobu 2 týdnů, během nichž byl jejich vývoj sledován pohledem a pohmatem.

Tab. 7. 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.

3.2.11.2. Zpracování nádorů z modelového organismu pro analýzu RNA

Nádory získané z nu-nu myší byly homogenizovány pomocí přístroje TissueLyser – k nádoru v 2 ml mikrozkušavce bylo přidáno 200 µl TRISOL reagentu a kovová kulička. Takto připravené zkumavky byly vloženy do přechlazeného nástavce a homogenizovány.

Izolace RNA byla provedena použitím komerčně dostupného kitu GeneAll Hybrid-R. V prvním kroku bylo k homogenátu přidáno 200 µl chloroformu a po 2 min inkubace při pokojové teplotě byla směs centrifugována 15 min při 4 °C. Následně byla RNA izolována kolonkovou metodou a její koncentrace byla určena na přístroji NanoDrop ND-2000 UV/Vis spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific), přičemž poměr absorpcí A260/A280 byl u všech vzorků větší než 1,8. Kvalita získané RNA byla ověřena pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) a hodnota RIN byla u všech vzorků vyšší než 8.

Další analýza RNA vzorku byla provedena stejně jako v případě *in vitro* analýzy, jak bylo popsáno výše.

3.2.11.3. Zpracování nádorů z modelového organismu pro analýzu proteinů

K nádorům získaným z nu-nu myší bylo přidáno v závislosti na jejich velikosti 50-100 µl lyzačního pufru (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 40 mM β-glycerolfosfát, 50 mM NaF, 10 mM pyrofosfát sodný, 200 µM Na₃VO₄, 2 mM DTT). Ke všem vzorkům byla do mikrozkušavek přidána kovová kulička a vzorky byly vloženy do předchlazeného nástavce přístroje TissueLyser, jehož pomocí byly homogenizovány.

Homogenizované vzorky byly umístěny na led a dále zpracovány pomocí injekční stříkačky s jehlou. Zpracovaný homogenát byl ponechán 20 min na ledu a centrifugován 10 min při 4 °C.

Takto připravené vzorky byly použity ke stanovení koncentrace bílkoviny BCA metodou a k provedení analýzy Western blot (viz výše).

3.2.12. 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

Vliv FLU a TMZ na viabilitu GBM buněk byl stanoven u buněčných linií A172 a T98G, které byly ovlivněny různými koncentracemi TMZ (10 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 250 μM ; 375 μM ; 500 μM ; 1000 μM a 1500 μM) a různými koncentracemi FLU (0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 3 μM ; 5 μM a 10 μM) po 48 h inkubaci. Na základě získaných dat byla stanovena hodnota IC50 pro obě testovaná léčiva.

Tab. 8. Hodnoty IC50 u stabilizovaných buněčných linií GBM

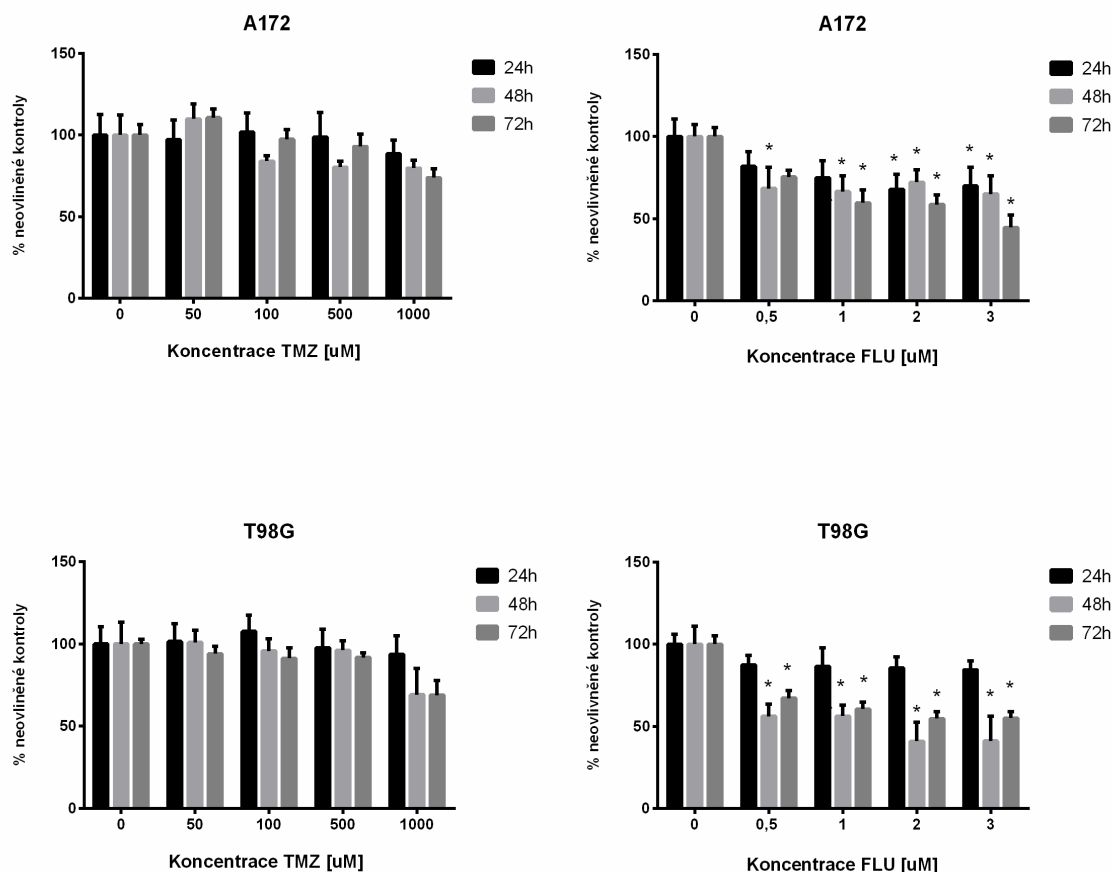
	IC50 [μM]	
	TMZ	FLU
A172	1840,0	3,959
T98G	3255,0	2,181

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; viz Obr. 6).

TMZ nevyvolával ani u jedné testované GBM buněčné linie signifikantní snížení viability ve všech testovaných časových intervalech.

FLU vyvolával časově a koncentračně závislý efekt na viabilitu buněk, a to především u buněk T98G, ve vyšších koncentracích také u buněk A172. Již při ovlivnění nejnižší testovanou koncentrací (0,5 μM) docházelo ke statisticky signifikantnímu snížení viability buněk u všech testovaných buněčných linií po 48 h inkubace.



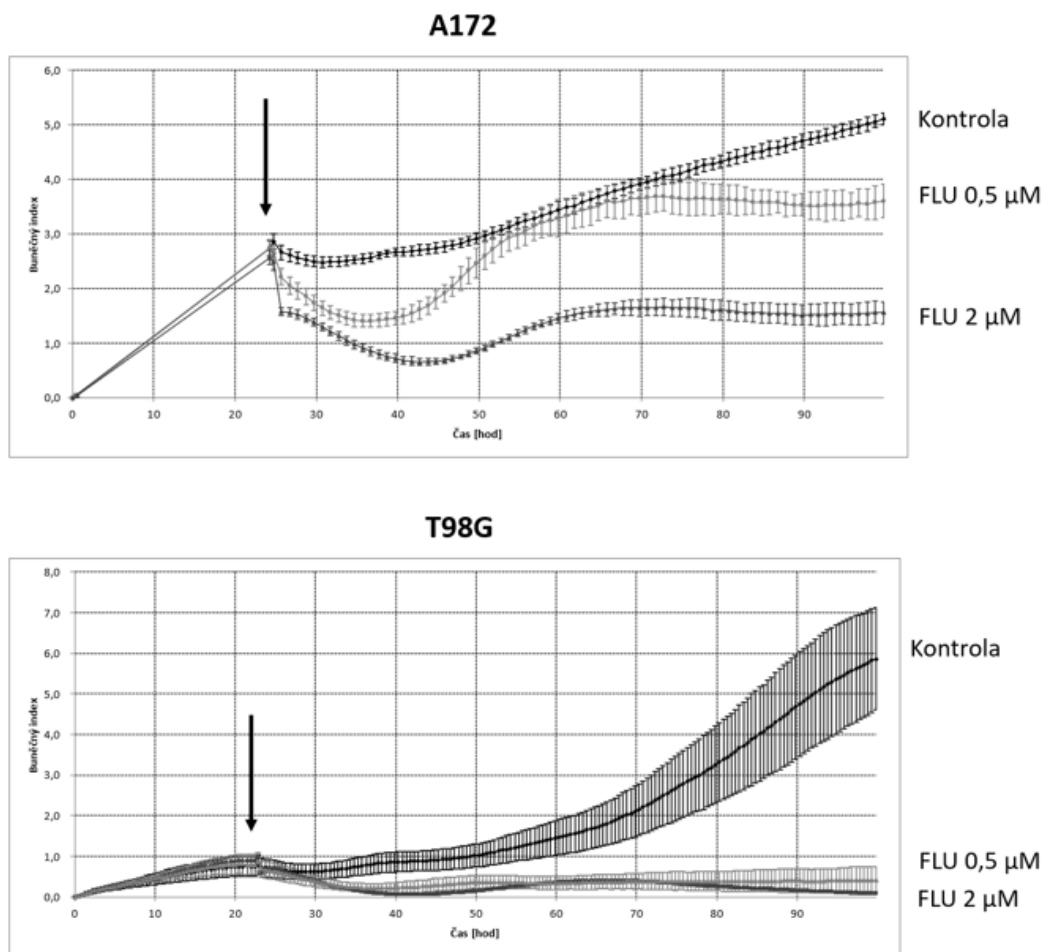
Obr. 6. Vliv vybraných koncentrací TMZ a FLU na viabilitu GBM buněk A172 a T98G v různých časových intervalech (24 h, 48 h, 72 h) stanovený metodou WST-1. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

U buněk T98G docházelo také po ovlivnění 0,5 μM FLU k signifikantnímu snížení viability i po 72 h od ovlivnění.

Výrazný efekt FLU na proliferaci GBM buněčných linií byl dále potvrzen také za využití systému xCELLigence (Obr.7). Buňky A172 a T98G byly ovlivněny 0,5 μM a 2 μM FLU a jejich proliferace byla sledována kontinuálně po celkovou dobu 96 h (tedy 72 h po ovlivnění).

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 proliferační schopnost buněk zůstávala snižena.

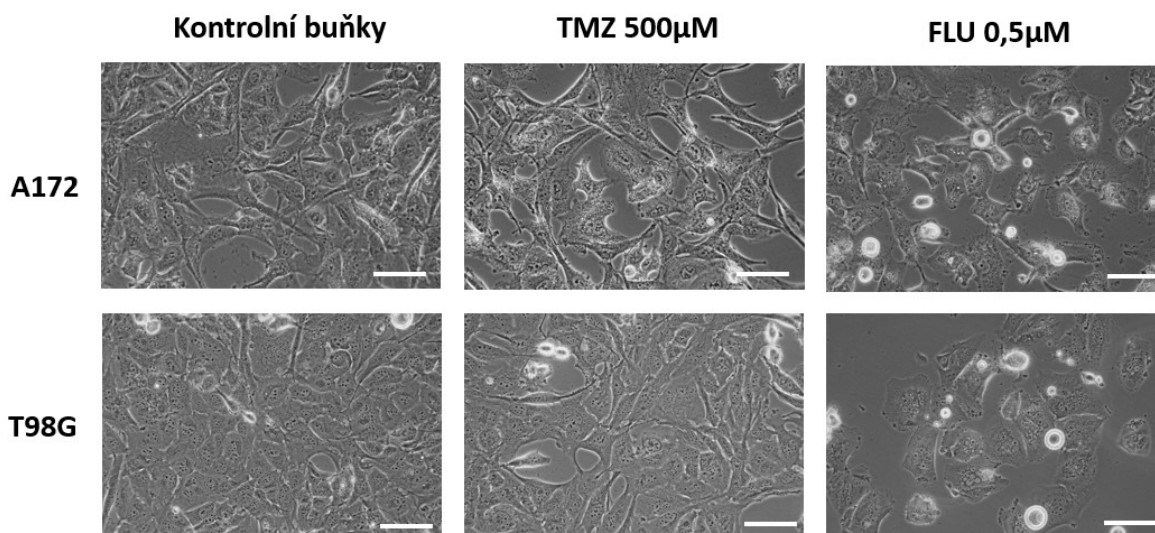
Na základě těchto výsledků byly pro další testování zvoleny koncentrace 500 μM pro TMZ a 0,5 μM pro FLU.



Obr. 7. Vliv 0,5 μM a 2 μM FLU na proliferaci GBM buněk A172 a T98G stanovený systémem xCELLigence. Čas ovlivnění je označen šipkou.

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

Morfologie buněk a její změny byly pozorovány pomocí fázově kontrastní mikroskopie. Buňky A172 a T98G byly ovlivněny 500 μM TMZ a 0,5 μM FLU a pozorovány 24 h, 48 h a 72 h po ovlivnění.



Obr. 8. Vliv 500 μ M TMZ a 0,5 μ M FLU na morfologii GBM buněk A172 a T98G po 48 h od ovlivnění. Zvětšení 400x, měřítko 30 μ m.

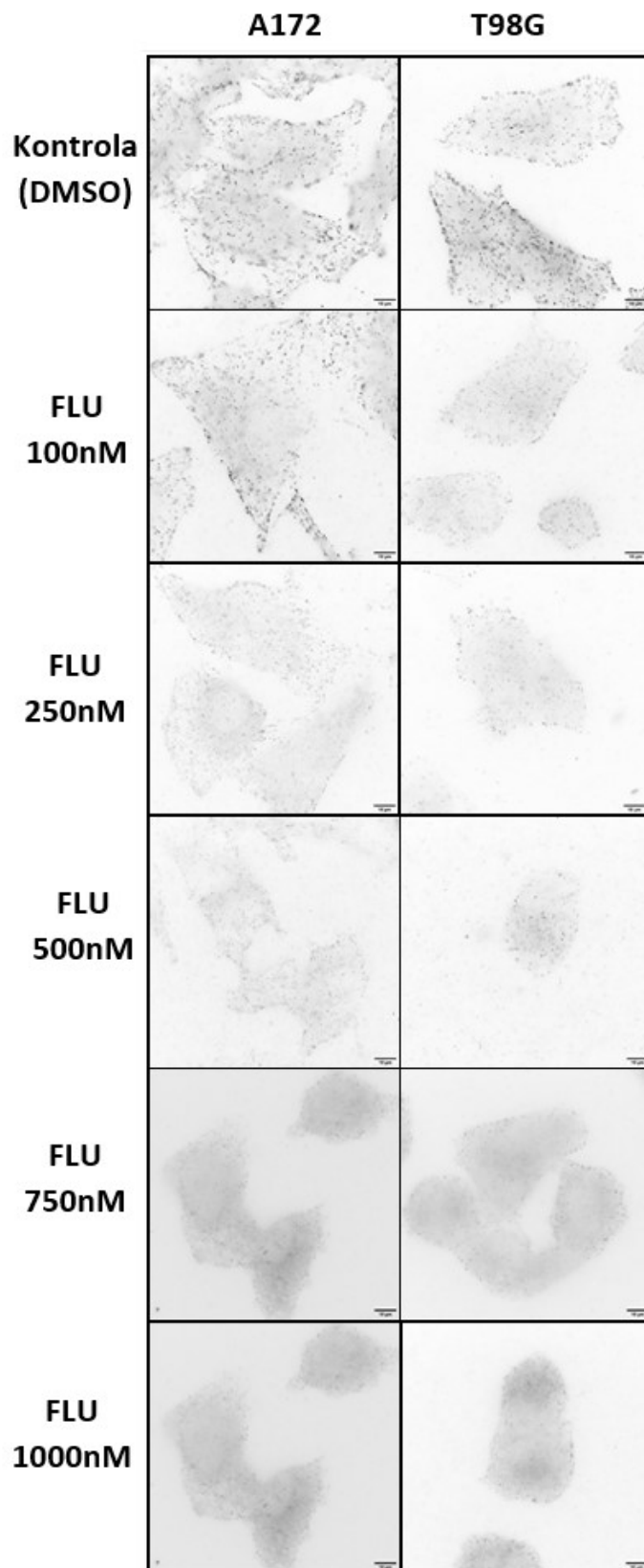
Po podání 500 μ M TMZ nedocházelo k výraznějším změnám v počtu nebo morfologii buněk, jejich tvar zůstával stejný jako u kontrolních, neovlivněných buněk. Naproti tomu po podání 0,5 μ M FLU docházelo ke změnám v morfologii buněk a v případě buněk T98G i k viditelným změnám v počtu buněk. Jednotlivé buňky se zmenšovaly, zaoblovaly a u buněk A172 docházelo k viditelným ztrátám dlouhých buněčných výběžků.

Buňky postupně ztrácely svou adherenci ke dnu kultivační lahve, uvolňovaly se do média a v jejich membránách vznikaly puchýřkovité výběžky. Dále bylo možné pozorovat vznik vícejaderných buněk a buněk vykazujících známky buněčné smrti.

4.1.3. Vliv FLU na mikrotubulární síť buněk A172 a T98G

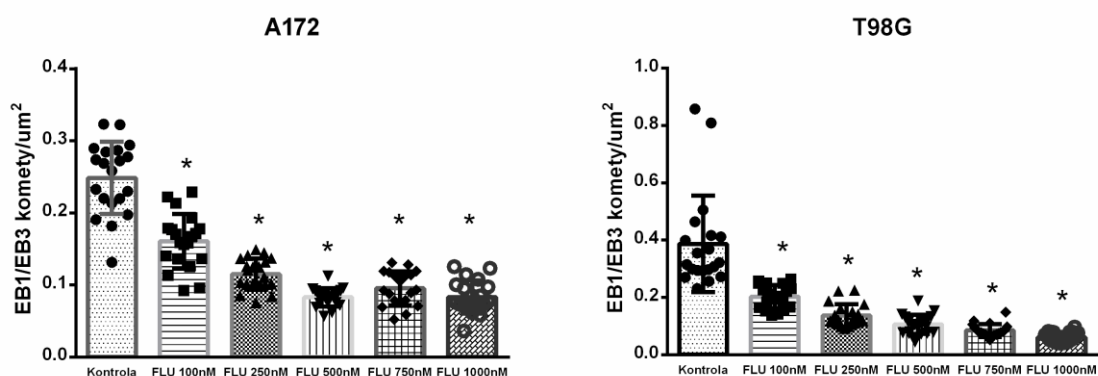
Vliv FLU na polymerizaci mikrotubulů a mikrotubulární cytoskelet buněk A172 a T98G byl pozorován pomocí fluorescenční mikroskopie. Buňky byly ovlivněny různými koncentracemi FLU (100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM a 1000 nM) po dobu 2 h a následně imunofluorescenčně obarveny.

Pro stanovení vlivu FLU na polymerizaci mikrotubulů byla pozorována přítomnost a množství EB1/EB3 proteinů. Už po ovlivnění nejnižší koncentrací FLU (100 nM) bylo možné pozorovat výrazné snížení množství EB1/EB3 komet u obou testovaných buněčných linií, k výraznějšímu snížení docházelo u buněk T98G. Při ovlivnění vyššími koncentracemi FLU (500 nM, 750 nM a 1000 nM) došlo k velkému vymizení EB1/EB3 komet (Obr. 9).



Obr. 9. Vliv vybraných koncentrací FLU na polymerizaci mikrotubulů pozorovaný prostřednictvím imunofluorescenčního barvení proti EB1/EB3 proteinům u GBM buněčných linií A172 a T98G. Zvětšení 1000x, měřítko 10 μ m.

Následným určením množství EB1/EB3 komet v jednotlivých pozorovaných buňkách a jejich znormailování na jednotku velikosti buněk (EB1/EB3 komety/ μm^2) bylo možné také kvantitativně porovnat efekt na snížení polymerizace u buněk A172 a T98G. Byl potvrzen výraznější efekt FLU u buněk T98G a obecně výrazného inhibičního efektu FLU na polymerizaci mikrotubulů. Snížení množství EB1/EB3 částic bylo u všech testovaných koncentrací FLU statisticky významné.

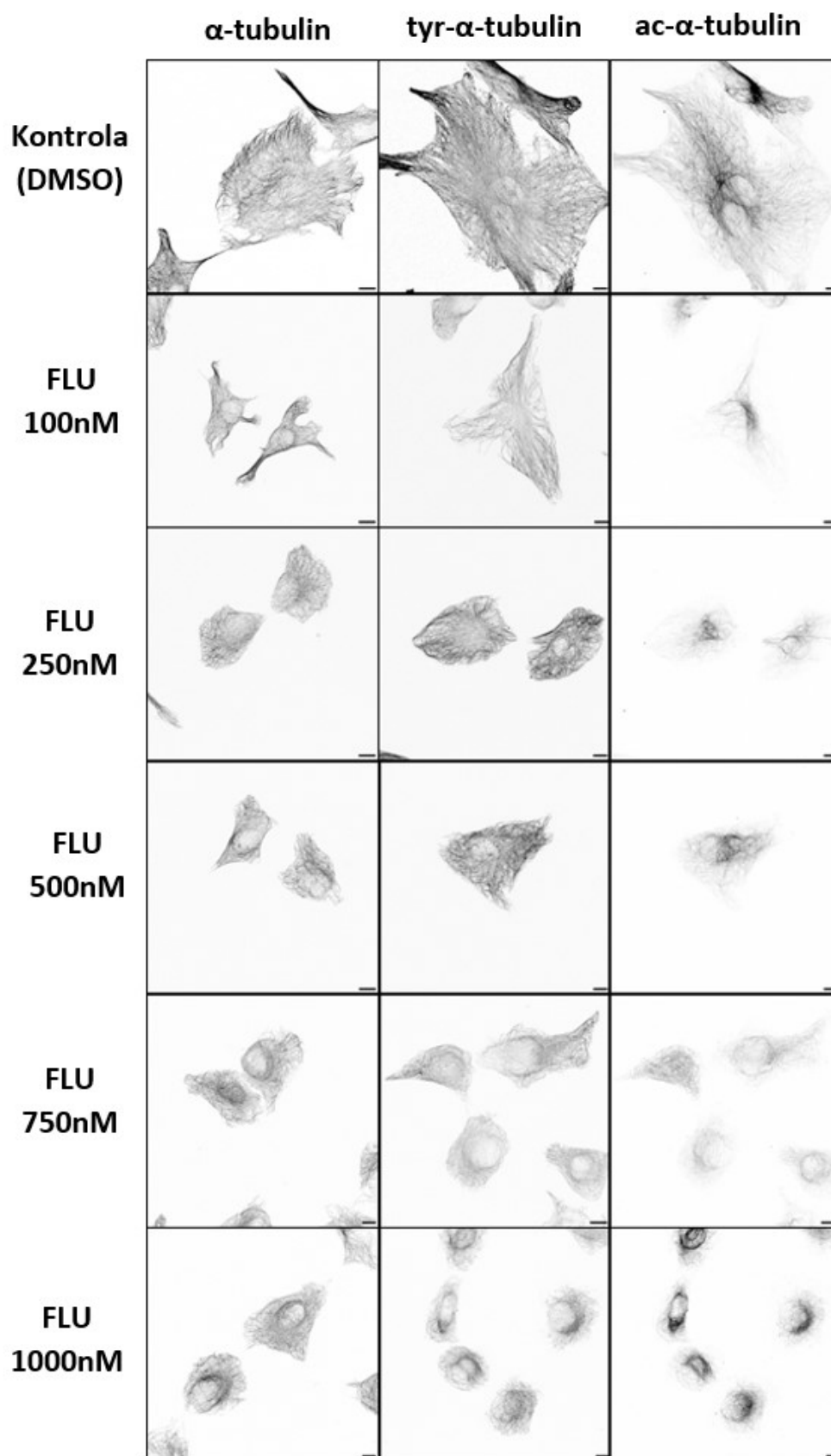


Obr. 10. Inhibiční efekt FLU na polymerizaci mikrotubulů u GBM buněčných linií A172 a T98G. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

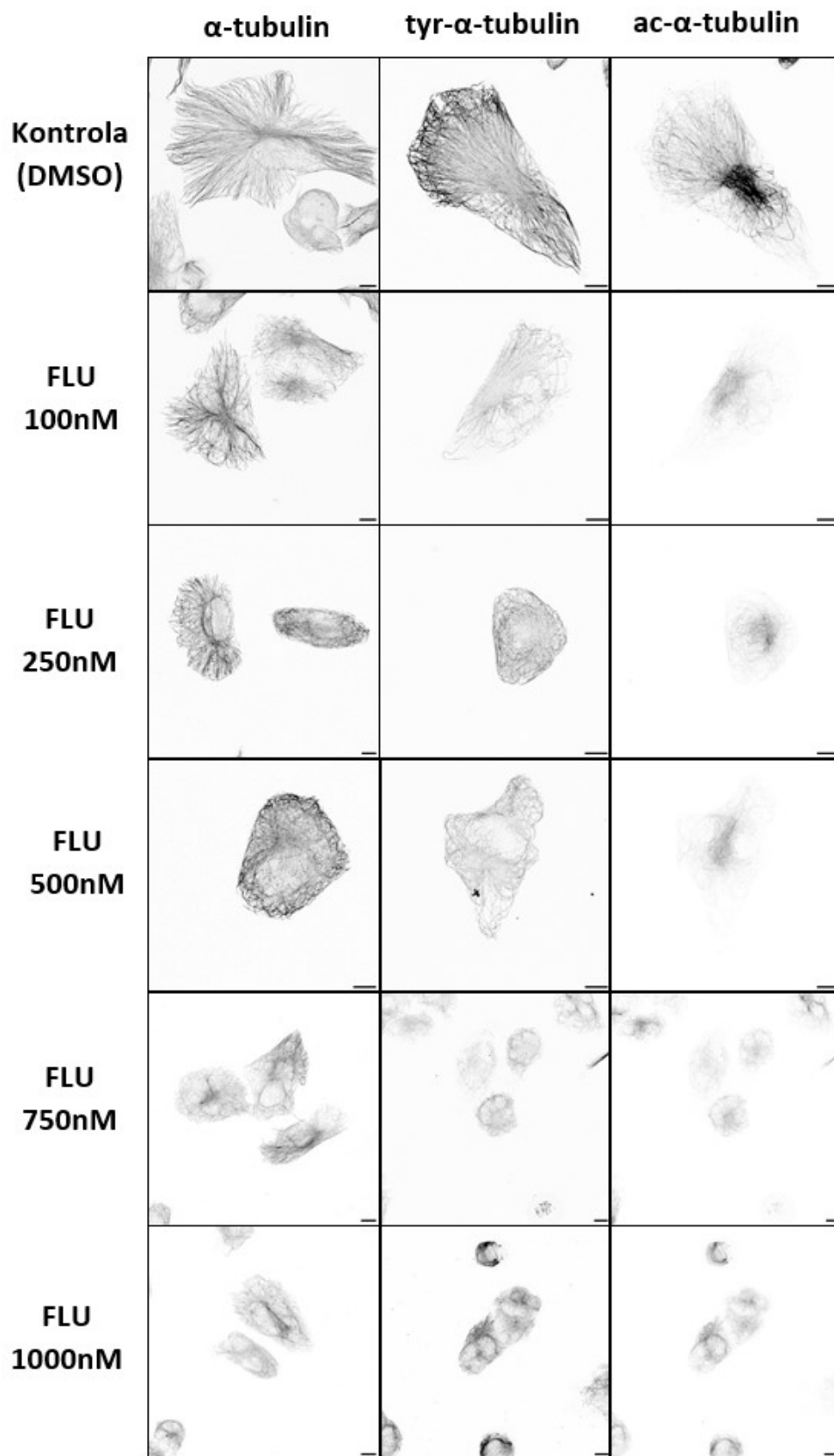
Následně jsme pozorovali vliv FLU na strukturu a organizaci mikrotubulů v buňkách A172 a T98G. Pro stanovení tohoto vlivu byla pozorována architektura α -tubulinové sítě v buňkách a také organizace dvou nejčastějších posttranslačních modifikací α -tubulinu (tyrosinovaného a acetylovaného α -tubulinu).

Již po podání nejnižší koncentrace FLU (100 nM), ale především u ovlivnění vyššími koncentrací FLU (500 nM, 750 nM a 1000 nM) docházelo k porušení základní sítě α -tubulinu a změnám v distribuci jeho posttranslačních modifikací u obou testovaných buněčných linií (Obr. 11 a Obr. 12). Tvar tubulinové sítě se zaobloval, konce tubulinových vláken se stáčely a celková organizace tubulinů byla působením FLU porušena.

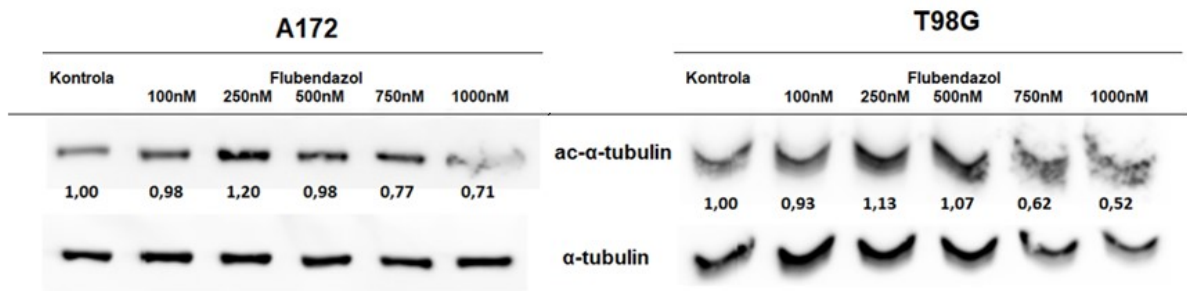
Především u buněk T98G, v menší míře také u buněk A172 docházelo ke zdánlivému snížení intenzity zbarvení acetylovaného- α -tubulinu. Proto jsme pro stanovení případného snížení exprese této posttranslační modifikace provedli testování hladin proteinů acetylovaného- α -tubulinu u buněk A172 a T98G pomocí Western blotu (Obr. 13).



Obr. 11. Vliv různých koncentrací FLU na mikrotubulární cytoskelet u GBM buněčné linie A172 pozorovaný pomocí fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x, měřítko 10 μ m.



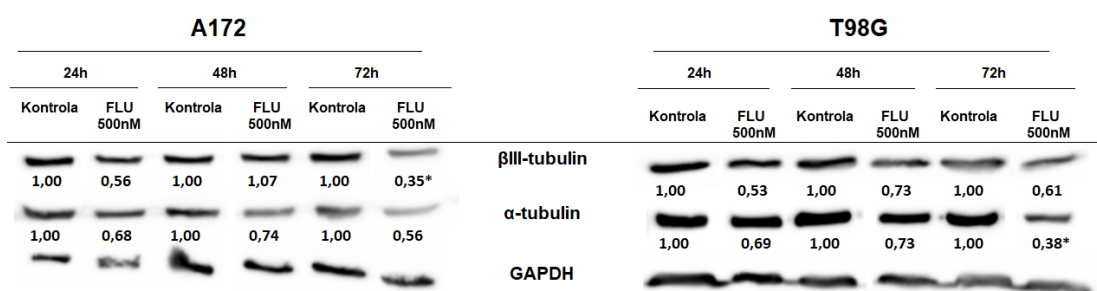
Obr. 12. Vliv různých koncentrací FLU na mikrotubulární cytoskelet u GBM buněčné linie T98G pozorovaný pomocí fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x, měřítko 10 μ m.



Obr. 13. Expresa acetylovaného- α -tubulinu na úrovni proteinů stanovená metodou Western blot u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných různými koncentracemi FLU za využití α -tubulinu jako referenčního proteinu.

Údaje zobrazené na Obr. 13 dokazují, že při ovlivnění buněk vyššími koncentracemi FLU (750 nM a 1000 nM) docházelo ke snížení hladiny acetylované modifikace α -tubulinu (v poměru k celkové hladině α -tubulinu v buňkách), ovšem toto snížení nebylo signifikantní.

Dále jsme u buněk A172 a T98G stanovovali změny v hladinách přítomnosti proteinů α -tubulinu a β III-tubulinu (za využití GAPDH jako referenčního genu) po ovlivnění 500 nM FLU v různých časových intervalech (24 h, 48 h a 72 h).



Obr. 14. Expresa α - a β III-tubulinu na úrovni proteinů stanovená 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.

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 docházelo k signifikantnímu snížení hladiny α -tubulinu po 72 h inkubace. Hladina α -tubulinu se snižovala 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.

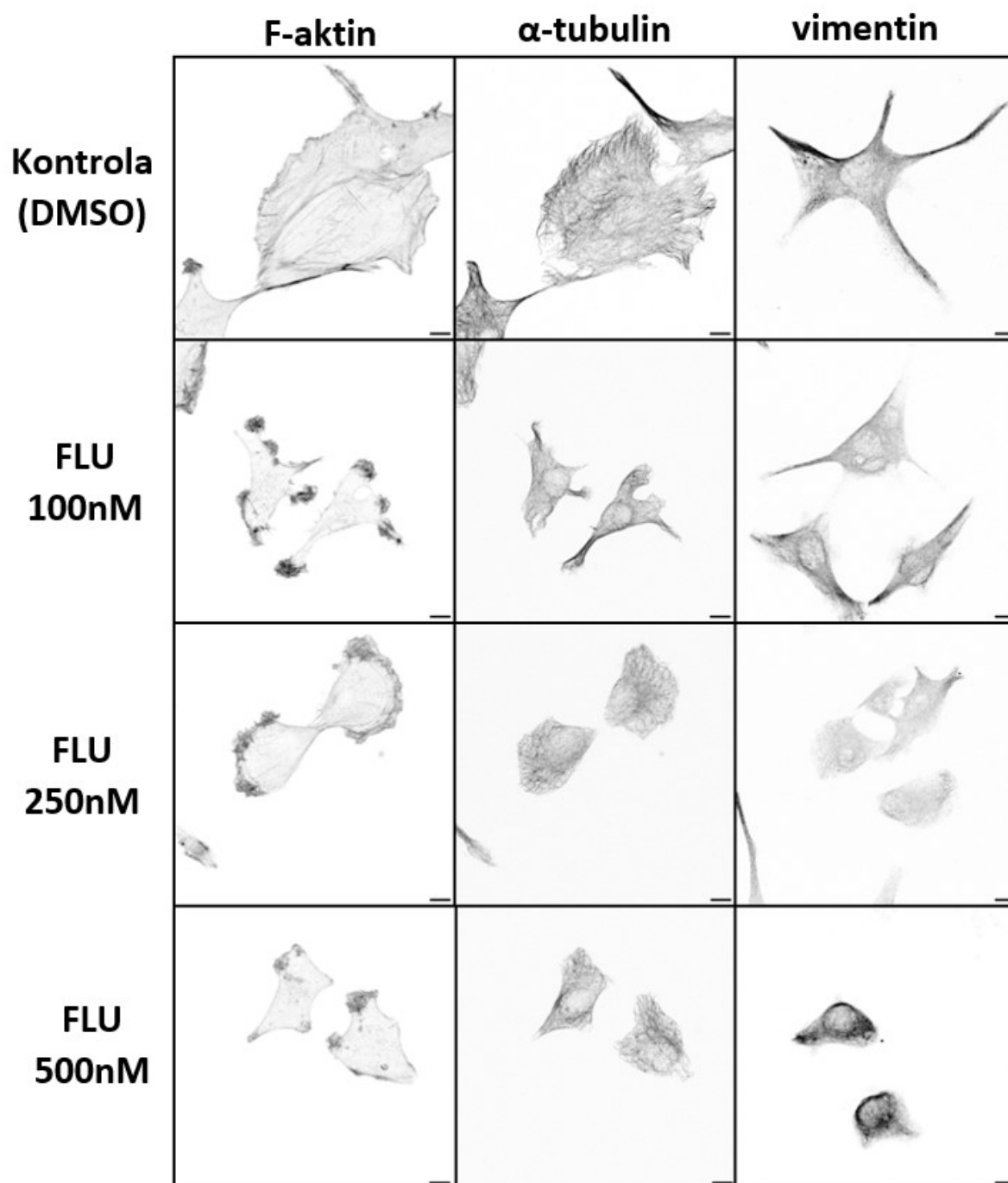
4.1.4. Vliv FLU na cytoskelet buněk A172 a T98G

Vliv FLU na další části buněčného cytoskeletu byl stanoven u buněk A172 a T98G ovlivněných různými koncentracemi FLU (100 nM, 250 nM a 500 nM). Buňky byly ovlivněny, inkubovány 2 h a poté imunofluorescenčně obarveny protilátkami proti F-aktinu zastupujícím mikrofilamenta a vimentinu zastupujícím intermediární filamenta.

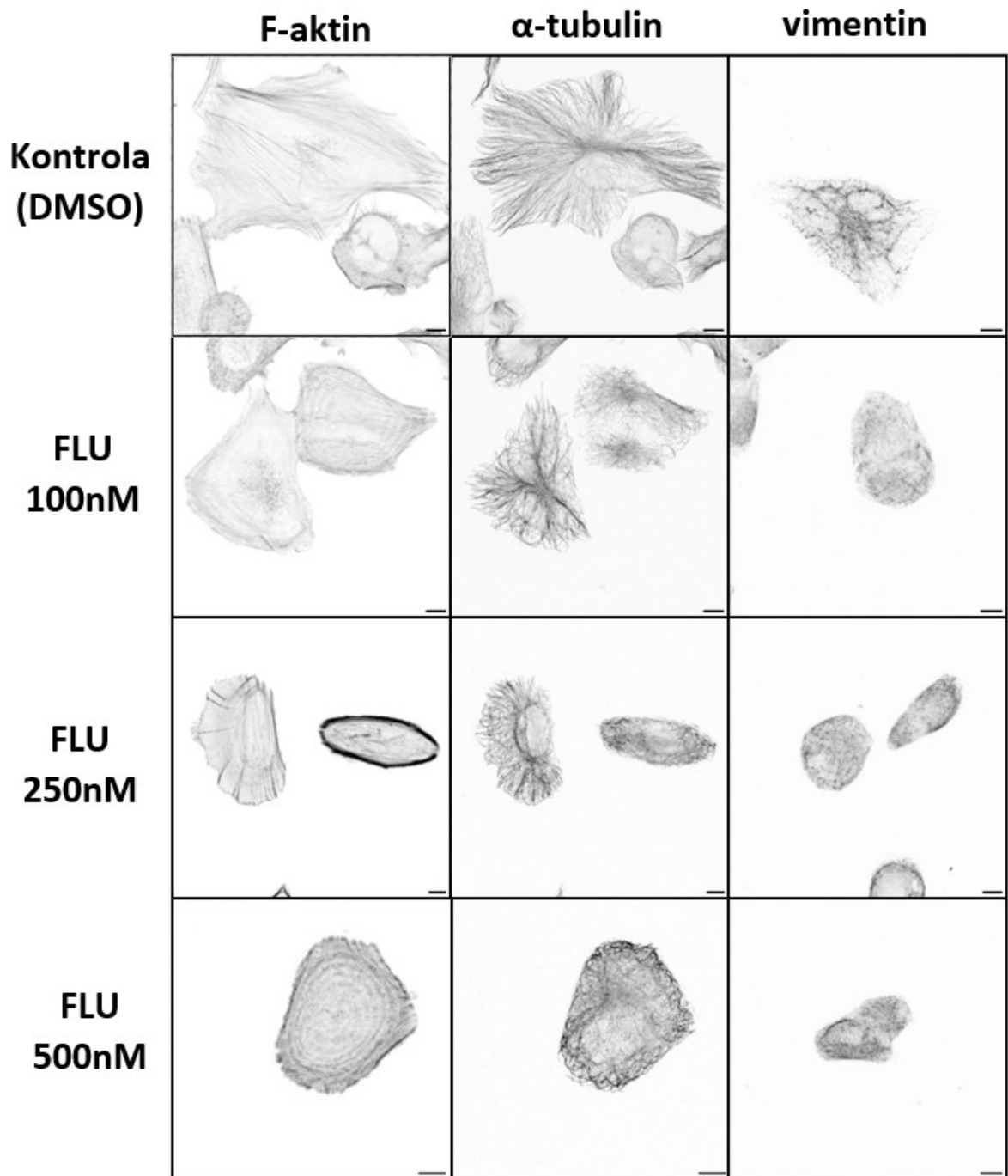
U buněk A172 i T98G (Obr. 15 a Obr. 16) docházelo již po podání nejnižší koncentrace FLU (100 nM), ale také po podání všech ostatních koncentrací ke změnám ve struktuře a organizaci všech tří složek buněčného cytoskeletu. U buněk A172 docházelo ke kondenzaci F-aktinu v okrajových částech buňky, k postupnému zakrucování α -tubulinových vláken a ve vyšších koncentracích FLU (500 nM) buňky ztrácely výběžky tvořené α -tubulinem. Po podání 500 nM FLU byla u buněk A172 vyvolána také ztráta dlouhých buněčných výběžků tvořených vimentinem a kondenzace vimentinu v centru buňky.

Také u buněk T98G docházelo k porušení cytoskeletální sítě. U všech tří pozorovaných složek docházelo k postupnému zakřivení konců vláken a celkovému zakulacování buněk. U obou buněčných linií bylo možné po podání FLU pozorovat výrazné zmenšování buněčného objemu.

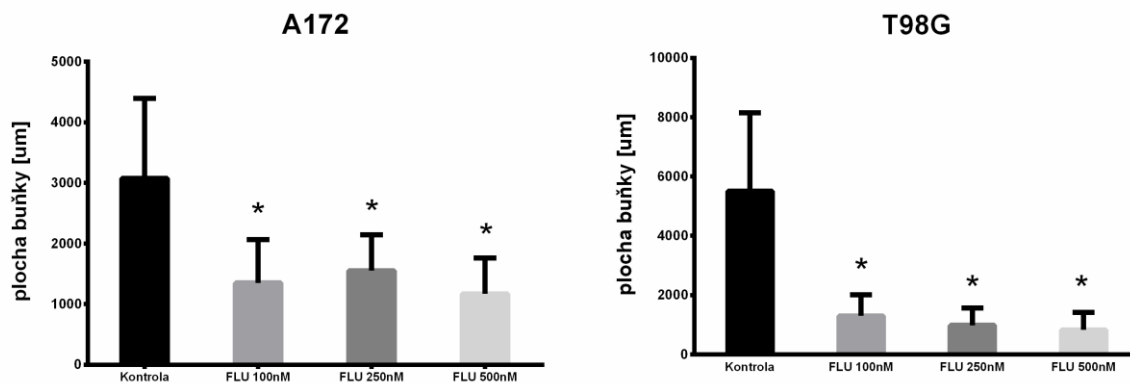
Na základě získaných mikroskopických obrazů byla dále provedena analýza velikosti buněk obou GBM buněčných linií A172 a T98G (Obr. 17) a porovnání této velikosti u buněk kontrolních a buněk ovlivněných jednotlivými koncentracemi FLU (100 nM, 250 nM a 500 nM).



Obr. 15. Vliv různých koncentrací FLU na cytoskelet GBM buněčné linie A172 pozorovaný pomocí fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x, měřítko 10 μ m.



Obr. 16. Vliv různých koncentrací FLU na cytoskelet GBM buněčné linie T98G pozorovaný pomocí fluorescenční mikroskopie. Zvětšení 600x, měřítko 10 μ m.



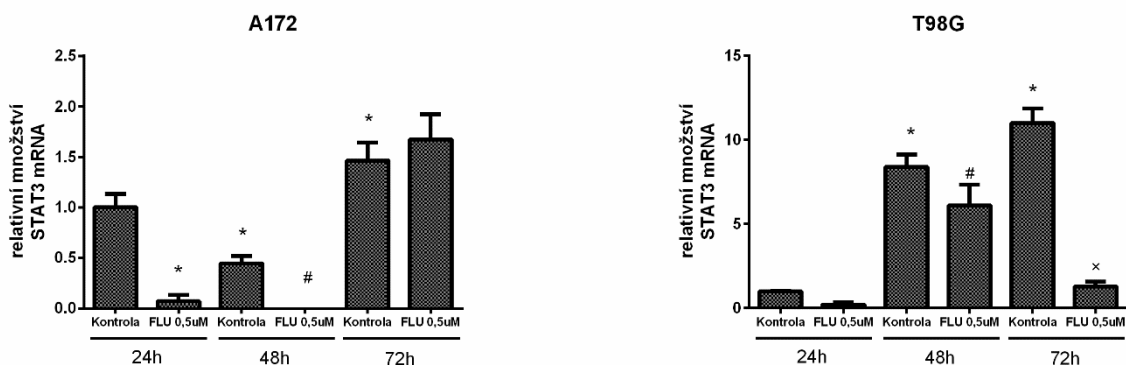
Obr. 17. Změny velikosti buněk GBM buněčných linií A172 a T98G po ovlivnění FLU různými koncentracemi. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

U obou testovaných buněčných linií se statisticky významně snižovala velikost buněk již po podání nejnižší testované koncentrace FLU (100 nM). Tento efekt byl výraznější u buněk T98G, jejichž velikost v neovlivněné kontrole byla výrazně větší.

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

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

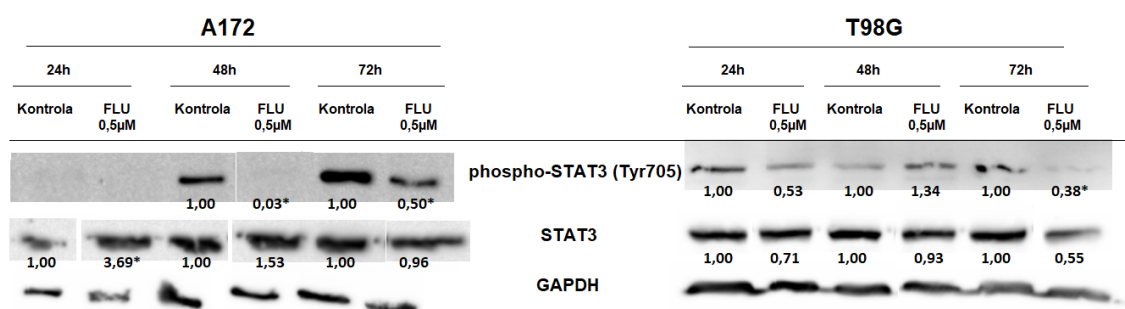
Vliv FLU na expresi STAT3 byl stanoven na úrovni proteinů metodou Western blot a na úrovni mRNA pomocí RT-PCR, zatímco vliv FLU na aktivaci STAT3 byl stanoven na úrovni proteinů měřením hladiny aktivované formy proteinu (phospho-STAT3 (Tyr705)) metodou Western blot. GBM buněčné linie A172 a T98G byly ovlivněny různými koncentracemi FLU (0,25 μM ; 0,5 μM a 1 μM) a inkubovány v různých časových intervalech (24 h, 48 h a 72 h).



Obr. 18. 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, stanoveno 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 relativní množství STAT3 mRNA po ovlivnění 0,5 µM FLU po dobu 24 h a 48 h. Toto snížení bylo statisticky významné u buněčné linie A172 po 24 h i 48 h od ovlivnění. U buněčné linie T98G pak bylo toto snížení signifikantní pouze po 48 h, zároveň docházelo k statisticky významnému snížení relativního množství STAT3 mRNA po 72 h od ovlivnění 0,5 µM FLU.

U buněk T98G bylo zároveň možné pozorovat výrazné zvyšování relativního množství STAT3 mRNA v čase, u buněk A172 naproti tomu docházelo po 48 h inkubace ke snížení relativního množství STAT3 mRNA a po 72 h inkubace k jeho signifikantnímu zvýšení.



Obr. 19. Expresa 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, stanoveno za využití GAPDH jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

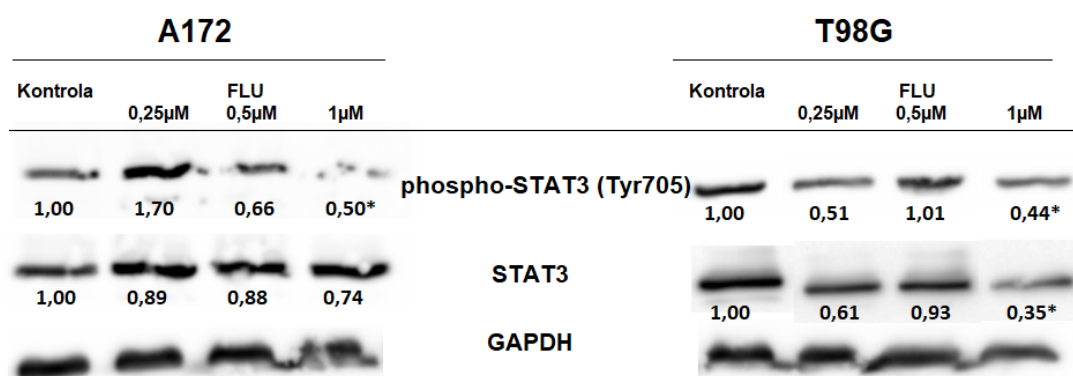
Na základě výsledků získaných stanovením relativního množství STAT3 mRNA byla exprese a také aktivace molekuly STAT3 u buněk A172 a T98G ovlivněných 0,5 μ M FLU po dobu 24 h, 48 h a 72 h stanovena dále na úrovni proteinů.

Také na úrovni proteinů bylo možné pozorovat nesignifikantní snížení exprese STAT3 u buněk T98G ve všech časových intervalech, nejvýraznější snížení exprese pak bylo pozorováno 72 h po ovlivnění. Naproti tomu u buněk A172 nebylo pozorováno snížení exprese STAT3 po ovlivnění 0,5 μ M FLU na úrovni proteinů v žádném z testovaných časových intervalů.

Výsledky získané stanovením relativního množství STAT3 mRNA a exprese STAT3 na úrovni proteinů nevykazovaly vzájemnou korelaci.

U obou testovaných buněčných linií ale docházelo působením 0,5 μ M FLU ke snížení hladiny fosforylovaného STAT3 (phospho-STAT3 (Tyr705)) a tedy aktivované formy STAT3. U buněk A172 bylo toto snížení přítomnosti aktivované formy STAT3 pozorovatelné 48 h a 72 h po ovlivnění, přičemž k nejvýraznějšímu snížení hladiny fosforylovaného STAT3 docházelo 48 h po ovlivnění FLU. U buněk T98G se hladiny aktivovaného STAT3 snižovaly po 24 h a 72 h od ovlivnění, přičemž statisticky signifikantní snížení jeho hladiny bylo možné pozorovat 72 h po ovlivnění FLU.

Pro širší testování efektu FLU na aktivaci a expresi STAT3 na úrovni proteinů byly dále buněčné linie A172 a T98G ovlivněny různými koncentracemi FLU (0,25 μ M; 0,5 μ M a 1 μ M) po dobu 48 h.



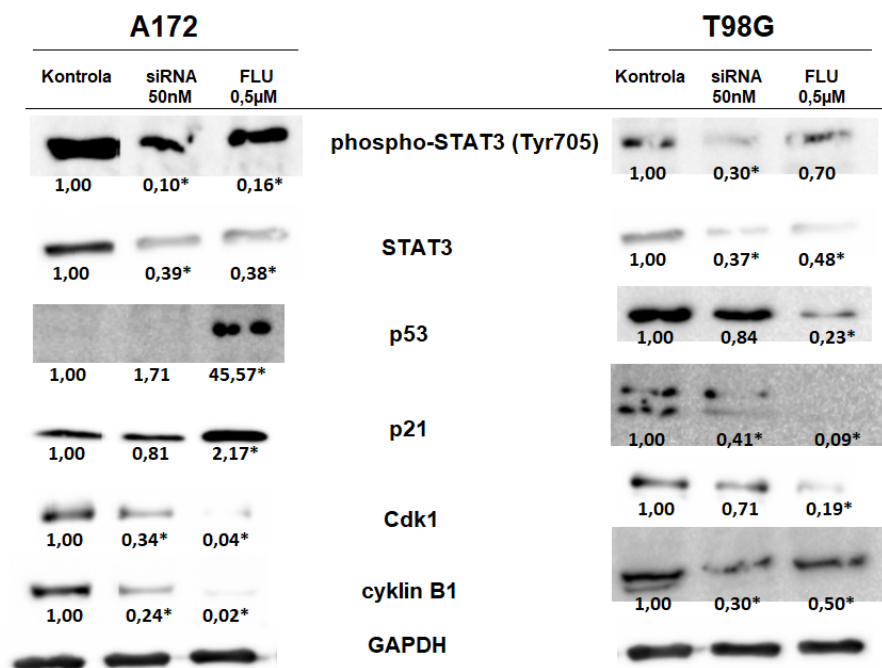
Obr. 20. Expres STAT3 a jeho fosforylované formy na úrovni proteinů u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných různými koncentracemi FLU po dobu 48 h, stanoveno za využití GAPDH jako referenčního proteinu. *p < 0,05 vs neovlivněná kontrola.

U buněk A172 bylo možné pozorovat snížení exprese fosforylovaného STAT3 po ovlivnění vyššími koncentracemi FLU (0,5 μM a 1 μM), přičemž statisticky signifikantní snížení jeho hladiny bylo možné pozorovat po ovlivnění 1 μM FLU. Byl také zaznamenán koncentračně závislý účinek FLU na expresi STAT3 a jeho fosforylované formy u buněk A172.

Sníženou expresi STAT3 bylo možné pozorovat také u buněk T98G ovlivněných všemi testovanými koncentracemi FLU, toto snížení ale nevykazovalo závislost na podané koncentraci látky. Ke statisticky významnému snížení hladiny STAT3 docházelo po ovlivnění 1 μM 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 byly buňky A172 a T98G ovlivněny 0,5 μM FLU po dobu 48 h a markery byly stanoveny na úrovni proteinů metodou 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. Také u takto připravených buněk byla stanovena exprese markerů souvisejících s buněčným cyklem metodou Western blot.



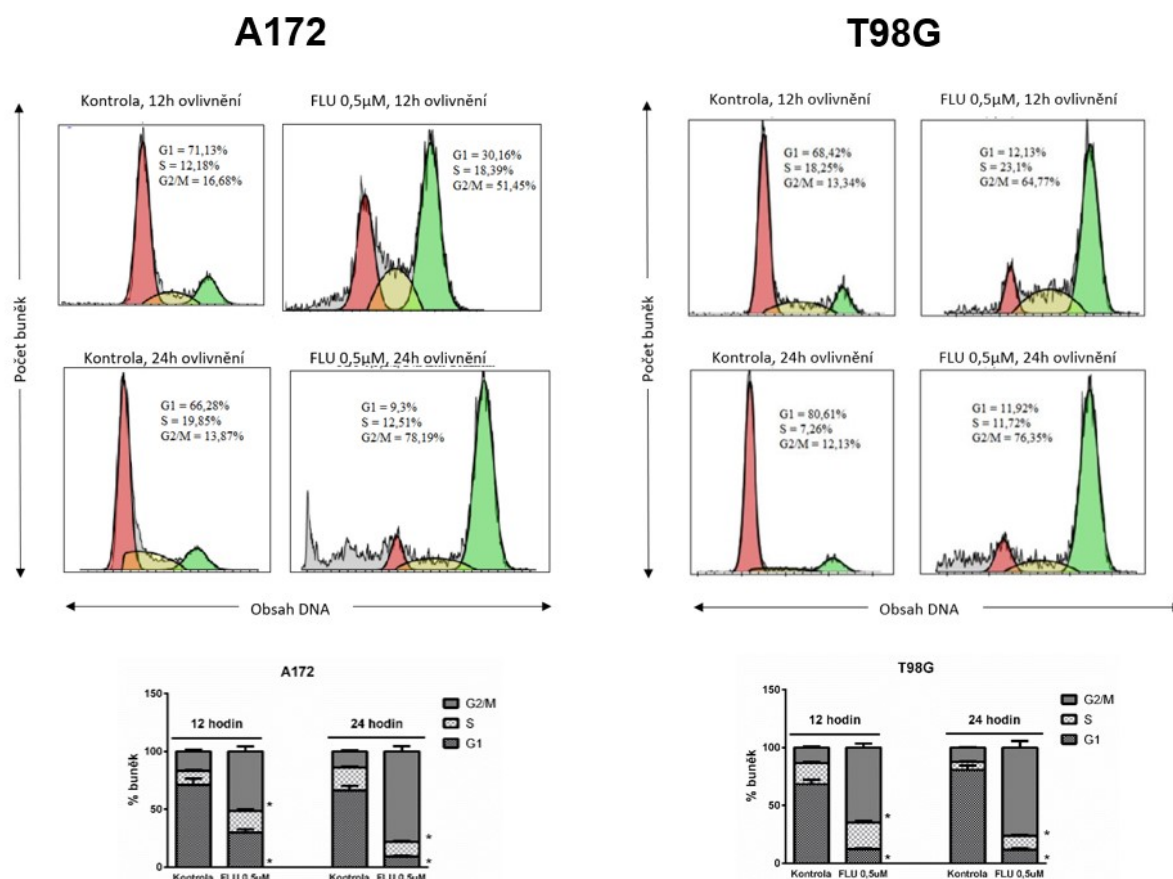
Obr. 21. Expres markerů spojených s buněčným cyklem u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 µM FLU po dobu 48 h nebo transfekovaných STAT3-siRNA (50 nM) stanovená na úrovni proteinů pomocí metody Western blot za využití GAPDH jako referenčního proteinu. *p < 0,05 vs neovlivněná kontrola.

FLU snižoval u obou buněčných linií A172 a T98G expresi STAT3 a jeho fosforylované formy (Obr. 21), u buněk A172 bylo toto snížení exprese srovnatelné jako u buněk transfekovaných pomocí STAT3-siRNA. U buněk T98G docházelo po ovlivnění FLU k významnému snížení exprese STAT3, zatímco u buněk T98G transfekovaných pomocí STAT3-siRNA významně poklesla exprese STAT3 i jeho fosforylované formy.

U buněk A172 vyvolávala 0,5 µM FLU zvýšení exprese proteinů p53 a p21. Zvýšení exprese p53 bylo možné pozorovat také u buněk A172 transfekovaných STAT3-siRNA. FLU dále vyvolával také výrazné snížení exprese cdk1 a cyklinu B1, které bylo také viditelné u buněk transfekovaných pomocí STAT3-siRNA.

Po ovlivnění FLU docházelo u buněk T98G ke snížení exprese proteinů p53, p21, cdk1 a cyklinu B1. Snížení hladin těchto proteinů bylo možné pozorovat také u buněk T98G transfekovaných pomocí STAT3-siRNA, přičemž statisticky významné bylo toto snížení v případě proteinů p21 a cyklinu B1.

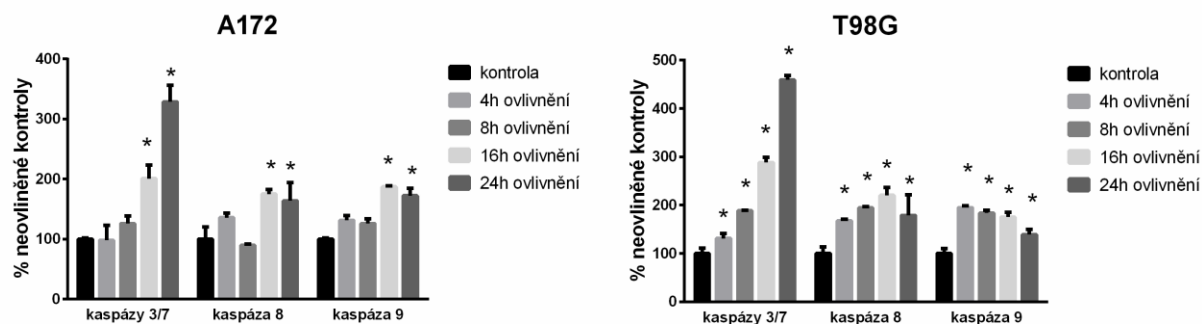
Vzhledem k těmto výsledkům naznačujícím ovlivnění buněčného cyklu působením 0,5 μM FLU byla provedena analýza distribuce buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Buňky A172 a T98G byly ovlivněny 0,5 μM po dobu 12 h a 24 h a následně analyzovány (Obr. 22).



Obr. 22. Distribuce buněčného cyklu u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 μM FLU po dobu 12 h a 24 h analyzována pomocí průtokové cytometrie. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Již po 12 h od ovlivnění pomocí 0,5 μM 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 (30,16 % u buněk A172 a 12,13 % u buněk T98G) a zároveň se buňky hromadily v G2/M fázi (51,45 % u buněk A172 a 64,77 % u buněk T98G). Tento efekt byl ještě zřetelnější po 24 h ovlivnění 0,5 μM FLU, kdy se podíl buněk v G1 fázi dále snižoval (9,3 % u buněk A172 a 11,92 % u buněk T98G) a naopak výrazně zvyšoval počet buněk v G2/M fázi (78,19 % u buněk A172 a 76,35 % u buněk T98G).

Dále byl hodnocen vliv FLU na aktivaci iniciačních kaspáz 8 a 9 a efektorových kaspáz 3 a 7 u buněčných linií A172 a T98G. Buňky byly ovlivněny 0,5 μM FLU po dobu 4 h, 8 h, 16 h a 24 h a aktivita kaspáz byla stanovena luminiscenčním testem.



Obr. 23. Aktivita iniciačních kaspáz 8 a 9 a efektorových kaspáz 3/7 u GBM buněčných linií A172 a T98G ovlivněných 0,5 μM FLU po dobu 4 h, 8 h, 16 h a 24 h stanovena 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 bylo toto zvýšení pozorováno především v delších časových intervalech (16 h a 24 h), zatímco u buněk T98G docházelo ke statisticky významnému zvýšení aktivity těchto kaspáz ve všech testovaných časových intervalech.

Po ovlivnění FLU se také zvyšovaly aktivity efektorových kaspáz 3/7 u obou buněčných linií A172 a T98G. Zvýšení aktivity vykazovalo časovou závislost, u obou linií bylo pozorováno nejvýraznější zvýšení aktivity kaspáz 3/7 po 24 h inkubace. U buněk A172 docházelo ke statisticky významnému zvýšení aktivity kaspáz 3/7 v delších časových intervalech (16 h a 24 h). Naproti tomu u buněk T98G bylo zvýšení aktivity těchto kaspáz statisticky signifikantní ve všech testovaných časových intervalech.

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 viabilitu a proliferaci GBM primárních kultur odvozených 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. 9), které byly ovlivněny různými koncentracemi FLU (0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 3 μM a 5 μM).

Pro porovnání byly stejné primární kultury dále ovlivněny různými koncentracemi TMZ (50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM a 1000 μM) a pro obě testovaná léčiva byl stanoven jejich vliv na viabilitu GBM primárních kultur. Na základě získaných dat byly stanoveny hodnoty IC50 pro jednotlivá léčiva u každé testované GBM primární kultury.

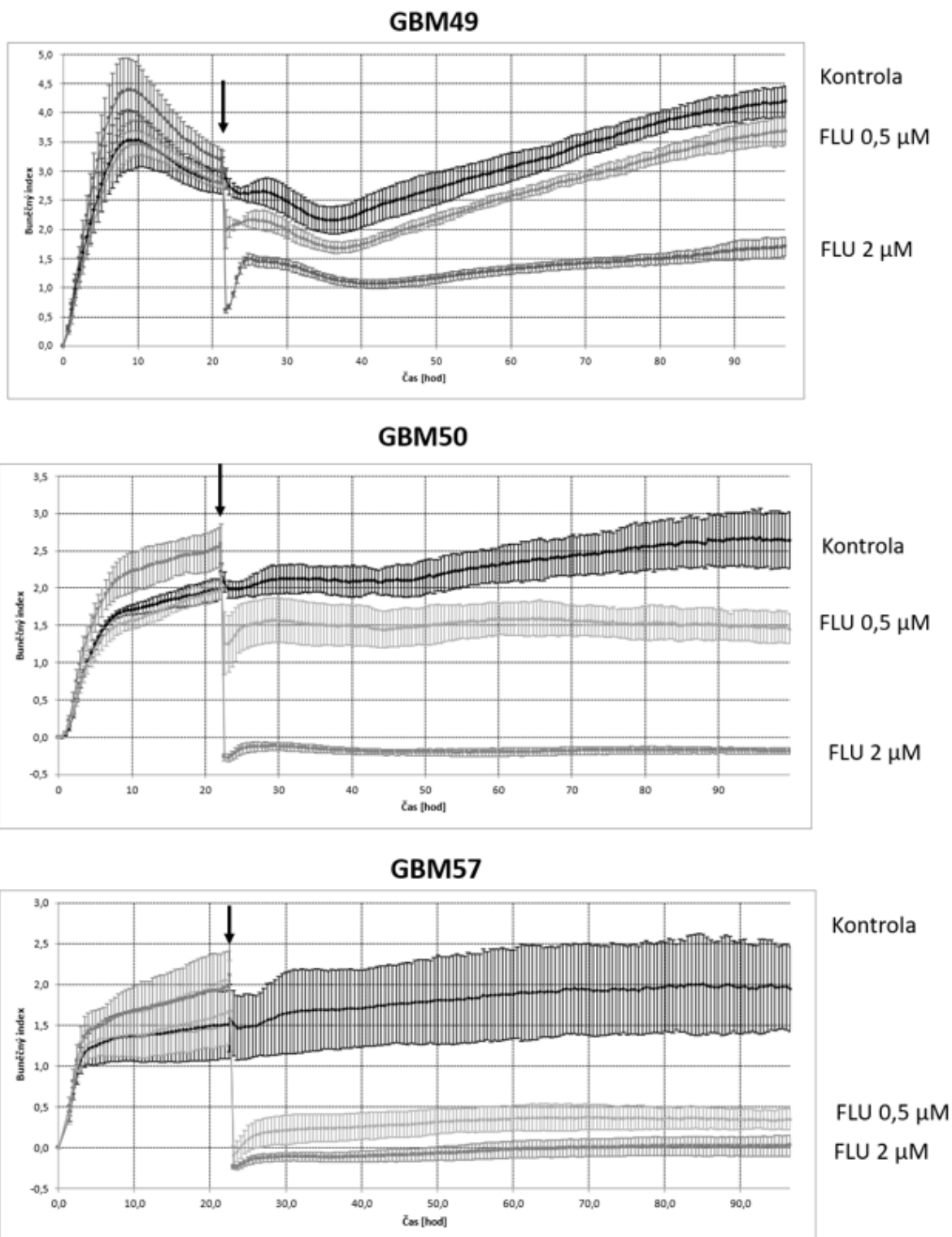
Tab. 9. Hodnoty IC50 u GBM primárních kultur

	IC50 [μM]	
	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

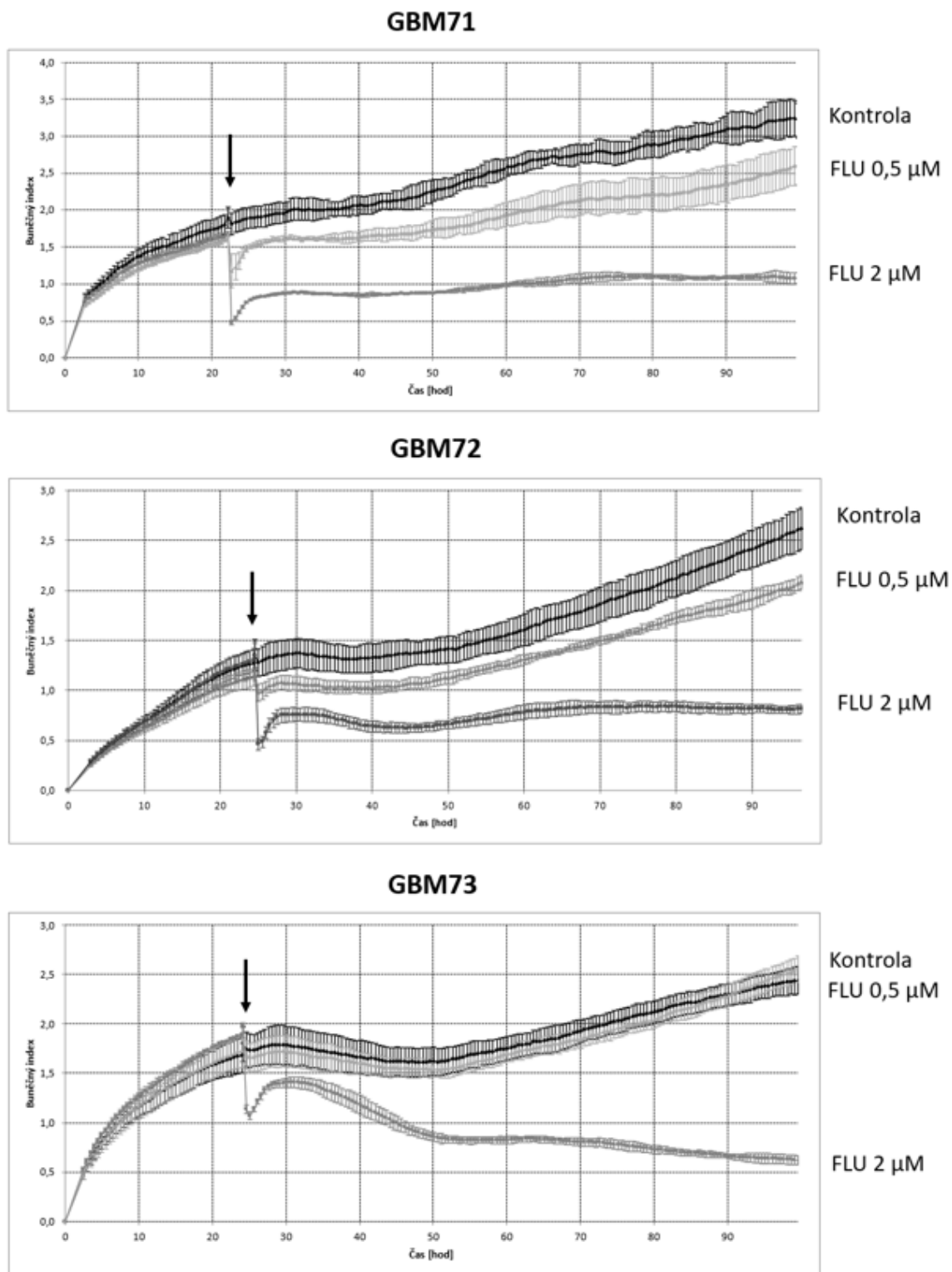
Všechny testované GBM primární kultury vykazovaly vyšší citlivost k FLU, IC50 pro toto léčivo se pohybovala mezi nejnižší hodnotou 0,510 μM (pro GBM24) a nejvyšší hodnotou 9,350 μM (pro GBM51). Citlivost těchto GBM primárních kultur k TMZ byla výrazně nižší, hodnoty IC50 pro toto léčivo byly u všech testovaných primárních kultur násobně vyšší. Největší citlivost k TMZ vykazovaly buňky GBM50, u kterých byla IC50 pro TMZ rovna 990,3 μM , nejvyšší IC50 pro TMZ pak bylo stanoveno u buněk GBM59 (35 435,0 μM).

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.

Účinek FLU na vybrané GBM primární kultury byl následně potvrzen také při analýze jejich proliferace pomocí přístroje xCELLigence (Obr. 19 a Obr. 20). Buňky GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73 byly ovlivněny 0,5 μM FLU a 2 μM FLU a vliv léčiva na jejich proliferaci byl sledován dalších 72 h po ovlivnění (tedy celkově po dobu 96 h).



Obr. 24. Vliv 0,5 μM a 2 μM FLU na proliferaci GBM primárních kultur GBM49, GBM50 a GBM57 stanovený za využití systému xCELLigence. Čas ovlivnění je vyznačen šipkou.



Obr. 25. Vliv 0,5 μM a 2 μM FLU na proliferaci GBM primárních kultur GBM 71, GBM72 a GBM73 stanovený za využití systému xCELLigence. Čas ovlivnění je vyznačen šipkou.

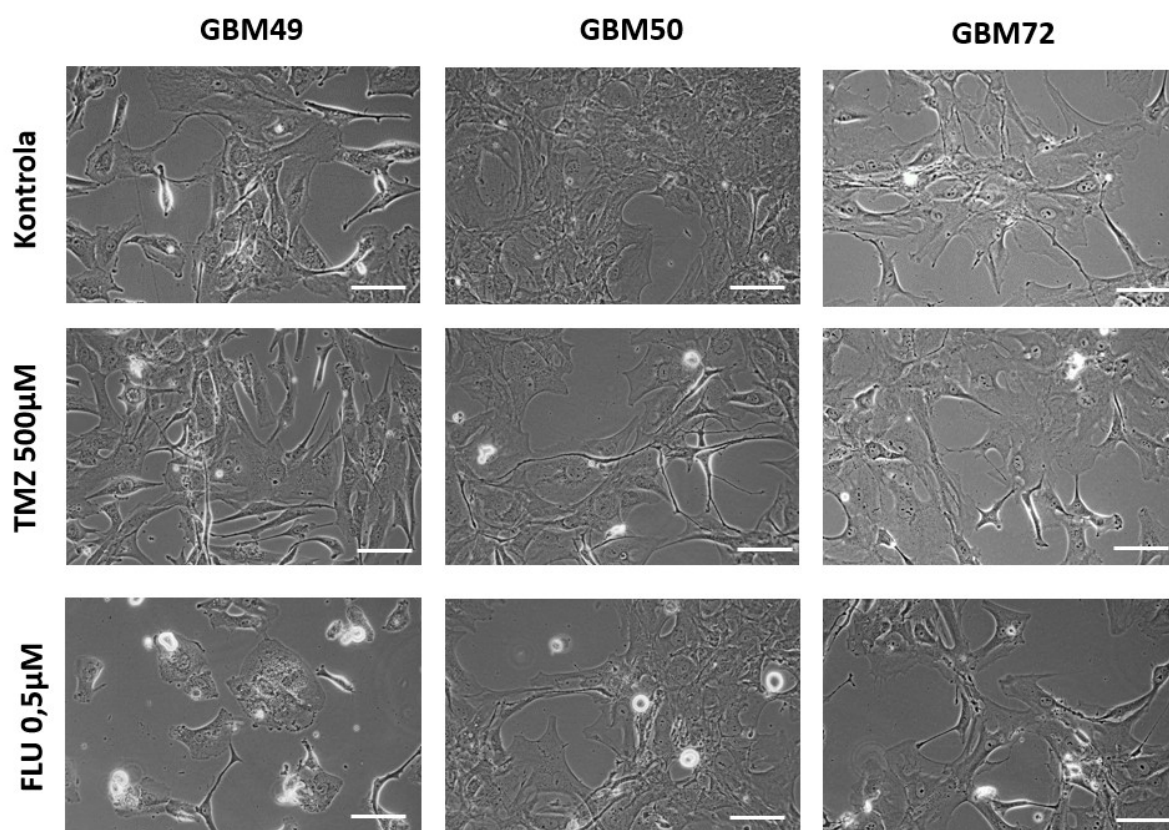
Po ovlivnění 2 μM FLU docházelo u všech testovaných GBM primárních kultur k výraznému snížení proliferace buněk. U primárních kultur GBM50, GBM57, GBM71 a GBM72 zůstávaly hodnoty buněčného indexu po iniciálním ovlivnění téměř neměnné po celou dobu inkubace. U buněk GBM49 bylo v delších časových intervalech pozorováno mírné obnovení proliferace po iniciálním prudkém poklesu, zatímco u buněk GBM73 byl zaznamenán odlišný trend, a to nevýznamné iniciální snížení proliferace s postupným dalším a setrvalým poklesem hodnot buněčného indexu v čase.

U primárních kultur GBM50 a GBM57 docházelo také po ovlivnění 0,5 μM FLU ke snížení buněčné proliferace, jejíž hladina pak zůstávala po celou inkubační dobu neměnná. Výraznější snížení proliferace pak bylo možné pozorovat u GBM primární kultury GBM57, kde snížení hodnoty buněčného indexu po ovlivnění 0,5 μM FLU bylo srovnatelné s jeho snížením po ovlivnění 2 μM FLU.

Po podání 0,5 μM FLU docházelo u primárních kultur GBM49, GBM71 a GBM72 k iniciálnímu snížení buněčné proliferace, v průběhu další inkubace byl však tento trend zvrácen, hladiny buněčného indexu však zůstávaly nižší než u neovlivněné kontroly. Ovlivnění 0,5 μM FLU nemělo u primární kultury GBM73 žádný vliv na proliferaci těchto buněk.

4.1.8. Vliv FLU a TMZ na morfologii vybraných GBM primárních kultur

Na základě rozdílných hodnot v předchozím testování buněčné viability a proliferace byla studována morfologie GBM primárních kultur GBM49, GBM50 a GBM72 a její ovlivnění působením 500 μM TMZ a 0,5 μM FLU. Buňky byly pozorovány 24 h, 48 h a 72 h po ovlivnění pomocí fázově kontrastní mikroskopie.



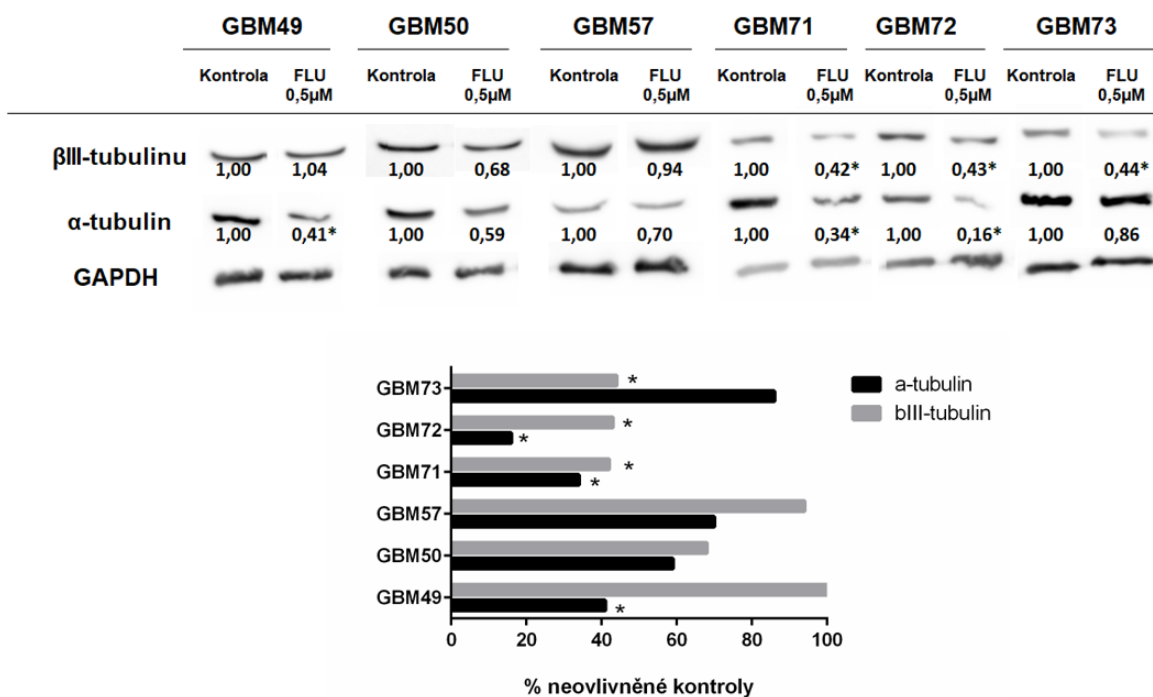
Obr. 26. Vliv 500 µM TMZ a 0,5 µM FLU na morfologii GBM primárních kultur GBM49, GBM50 a GBM72 po 48 h od ovlivnění pozorovaný pomocí fázově kontrastní mikroskopie. Zvětšení 400x, měřítko 30 µM.

U primárních kultur GBM49 a GBM72 nevyvolávala 500 µM TMZ výrazné změny v morfologii buněk a jejich počtu, buňky si zachovávaly stejný tvar jako u neovlivněné kontroly. U buněk GBM50 docházelo po podání 500 µM TMZ k optickému snížení počtu buněk, buňky si však i nadále zachovávaly charakteristický tvar a morfologii.

Po ovlivnění GBM primárních kultur 0,5 µM FLU po dobu 48 h klesal u všech testovaných linií počet buněk, nejvýraznější byl tento efekt u buněk GBM49, kde bylo také možné pozorovat změny v morfologii buněk, zakulacování buněk a vznik mnohojadernosti.

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 0,5 µM FLU na expresi α - a β III-tubulinu na úrovni proteinů metodou Western blot. Buňky byly ovlivněny výše uvedenou koncentrací FLU, inkubovány 48 h a následně použity pro analýzu.



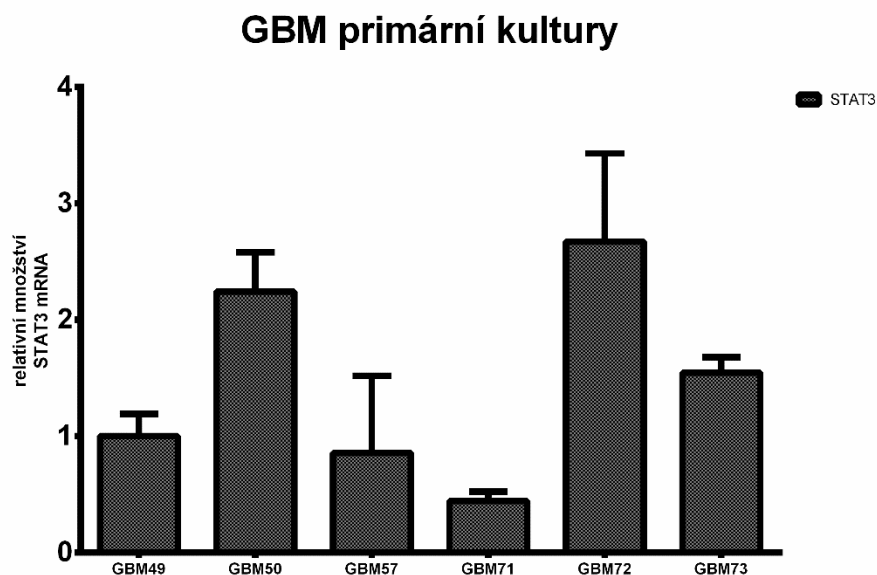
Obr. 27. Vliv 0,5 µM FLU na expresi α- a βIII-tubulinu na úrovni proteinů u GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) po 48 h od ovlivnění stanovený metodou Western blot za využití GAPDH jako referenčního proteinu. *p < 0,05 vs neovlivněná kontrola.

FLU po 48 h působení snižoval expresi α-tubulinu u všech testovaných GBM primárních kultur, statisticky významné bylo toto snížení u buněk GBM49, GBM71 a GBM72. U ostatních testovaných GBM primárních kultur (GBM50, GBM57 a GBM73) také docházelo k mírnému snížení hladiny α-tubulinu působením 0,5 µM FLU.

U buněk GBM71, GBM72 a GBM73 dále významně klesala po 48 h působení 0,5 µM FLU hladina βIII-tubulinu oproti neovlivněné kontrole. Také u buněk GBM50 docházelo po ovlivnění FLU k mírnému snížení exprese tohoto proteinu, u primárních kultur GBM49 a GBM57 zůstávaly hladiny βIII-tubulinu po ovlivnění FLU přibližně neměnné.

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. V prvním kroku byla porovnána exprese STAT3 u jednotlivých testovaných GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) na úrovni mRNA metodou RT-PCR.

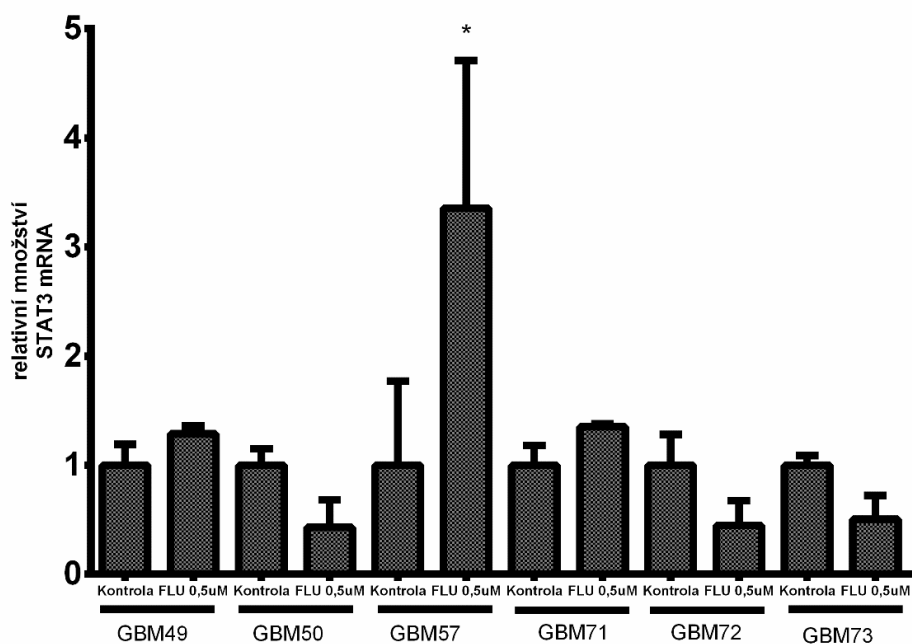


Obr. 28. Relativní množství STAT3 mRNA u GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) inkubovaných po dobu 48 h analyzované metodou RT-PCR za využití TBP jako referenčního genu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Jednotlivé testované GBM primární kultury vykazovaly značné rozdíly v relativním množství STAT3 mRNA. Vyšší relativní množství vykazovaly buňky GBM50, GBM72 a GBM73, zatímco značně snížené relativní množství STAT3 mRNA bylo přítomno u buněk GBM71.

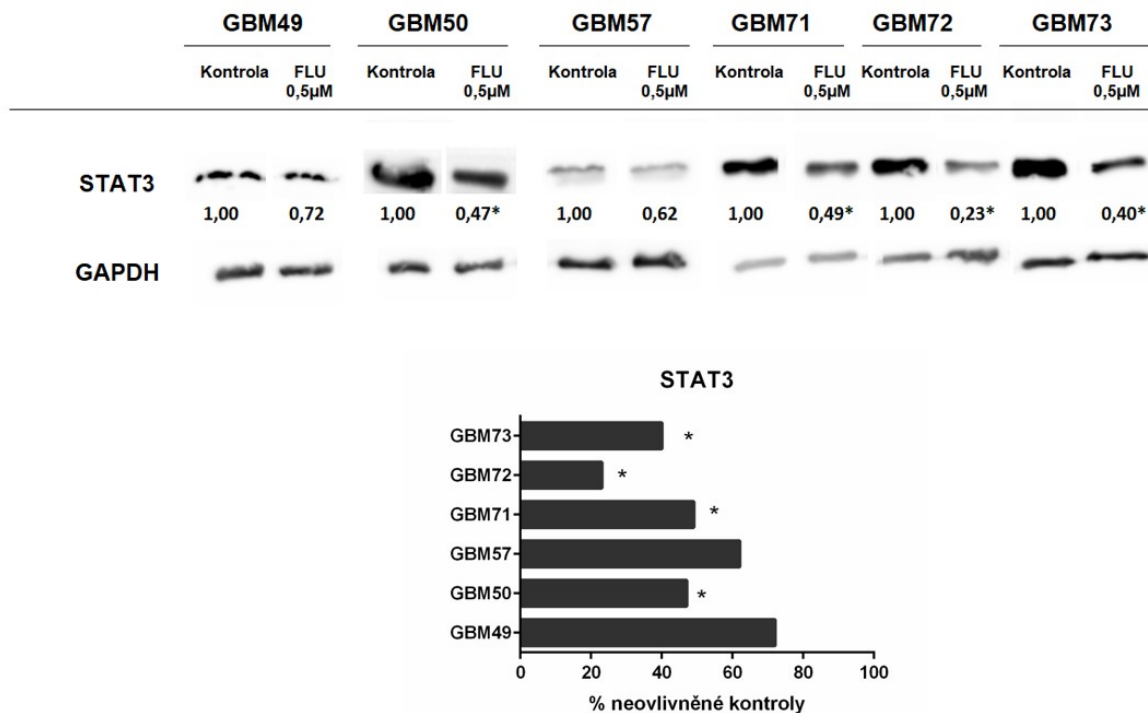
V dalším kroku byly výše testované GBM primární kultury ovlivněny 0,5 μM FLU a inkubovány 48 h. Relativní množství STAT3 mRNA a jejího ovlivnění FLU bylo stanoveno pomocí RT-PCR, exprese proteinu STAT3 a její změny po ovlivnění FLU byly stanoveny metodou Western blot.

GBM primární kultury



Obr. 29. Relativní množství STAT3 mRNA u GBM primárních kultur (GBM49, GBM50, GBM57, GBM71, GBM72 a GBM73) ovlivněných 0,5 μ M po dobu 48 h analyzované metodou RT-PCR za využití TBP jako referenčního genu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Koncentrace 0,5 μ M FLU snižovala relativní množství STAT3 mRNA u buněk GBM50, GBM72 a GBM73, toto snížení ale nebylo statisticky signifikantní. U buněk GBM57 a GBM71 se naopak vlivem FLU zvyšovalo relativní množství STAT3 mRNA, zatímco u buněk GBM49 zůstávala hladina STAT3 mRNA přibližně stejná jako u neovlivněné kontroly.



Obr. 30. 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.

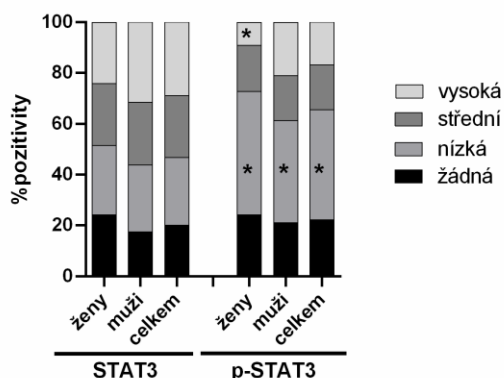
Také na úrovni proteinů docházelo ke snížení exprese STAT3, a to u všech testovaných GBM primárních kultur. Snížení hladiny STAT3 bylo statisticky signifikantní u primárních kultur GBM50, GBM71, GBM72 a GBM73. K mírnému snížení exprese STAT3 docházelo také u primárních kultur GBM49 a GBM57.

U GBM primárních kultur jsme se dále pokusili stanovit také hladiny fosforylovaného STAT3 na úrovni proteinů. Detekce při výše popsaných podmínkách a za využití výše uvedené protilátky však nepřinesla žádný měřitelný výsledek.

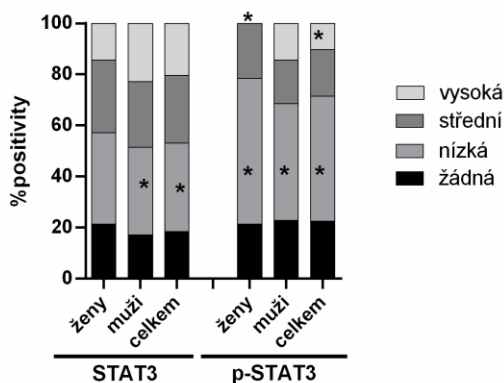
4.1.11. Analýza exprese STAT3 v klinických vzorcích GBM

Pro zhodnocení klinické relevance STAT3 a jeho fosforylované formy v GBM byla ve spolupráci s Fingerlandovým ústavem patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové provedena IHC analýza exprese STAT3 a phospho-STAT3 (Tyr705). Pro tuto analýzu bylo použito 90 vzorků GBM diagnostikovaných mezi lety 2012–2015 v Královéhradeckém kraji, u kterých bylo po provedení IHC zaznamenáno procento pozitivně zbarvených buněk.

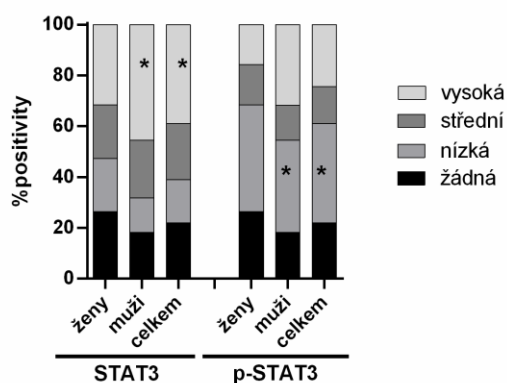
Porovnání exprese STAT3 a p-STAT3



Porovnání exprese STAT3 a p-STAT3 - pacienti pod 70 let věku



Porovnání exprese STAT3 a p-STAT3 - pacienti nad 70 let věku



Obr. 31. 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 přítomna ve více než 75 % analyzovaných GBM klinických vzorků, vysoká exprese STAT3 pak byla zaznamenána u téměř 30 % všech testovaných vzorků, zatímco vysoká exprese phospho-STAT3 (Tyr705) byla potvrzena pouze u přibližně 15 % vzorků. Vysoká exprese STAT3 i jeho fosforylované formy se pak častěji vyskytovala u mužů. Výrazně vyšší zastoupení vzorků vykazujících vysokou expresi STAT3 a phospho-STAT3 (Tyr705) bylo odhaleno u pacientů nad 70 let věku, vysoká exprese STAT3 u pacientů nad 70 let věku byla popsána u 40 % GBM klinických vzorků, častěji se opět vyskytovala u mužů.

Také u pacientů pod 70 let věku byla potvrzena alespoň nízká exprese STAT3, resp. jeho fosforylované formy u více než 75 % testovaných vzorků, přičemž největší

zastoupení měly u obou forem vzorky vykazující nízkou expresi proteinů. Obecně vyšší exprese testovaných proteinů byly opět pozorovány u mužů.

4.1.12. Vliv FLU na viabilitu, proliferaci a morfologii buněk U118MG

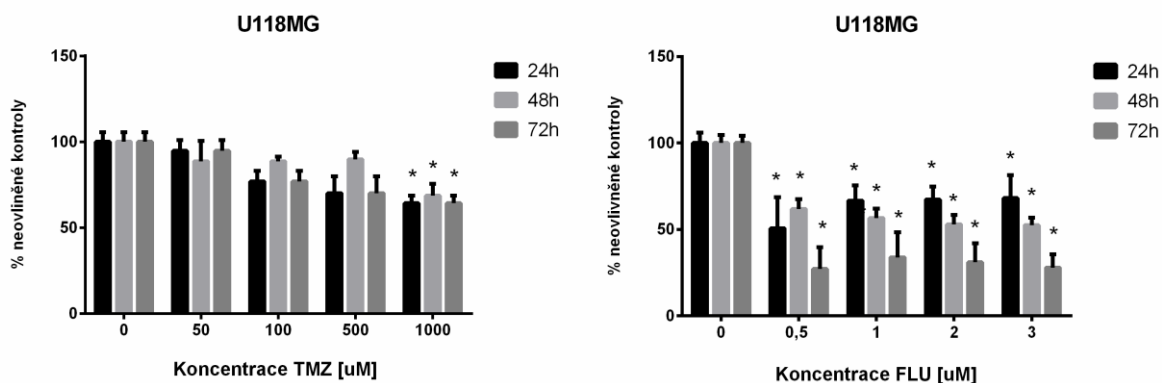
Na základě předchozích výsledků experimentů bylo rozhodnuto o zavedení *in vivo* modelu a jeho využití k dalšímu testování účinku FLU. Vzhledem k tomu, že žádná z předchozích testovaných GBM stabilizovaných buněčných linií nebyla tumorigenní, byl efekt FLU otestován na GBM buněčné linii U118MG, která vykazuje schopnost vytvářet nádory v atymických myších.

Buňky U118MG byly nejprve ovlivněny různými koncentracemi TMZ (10 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 250 μM ; 375 μM ; 500 μM ; 1000 μM a 1500 μM) a různými koncentracemi FLU (0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 3 μM ; 5 μM a 10 μM) a po 48 h inkubace byla stanovena jejich viabilita, která byla následně využita k výpočtu hodnoty IC50 (Tab. 10). U této buněčné linie byla následně posouzen vliv TMZ a FLU v delších časových intervalech (24 h, 48 h a 72 h, Obr. 27).

Tab. 10. Hodnoty IC50 u GBM buněčné linie U118MG

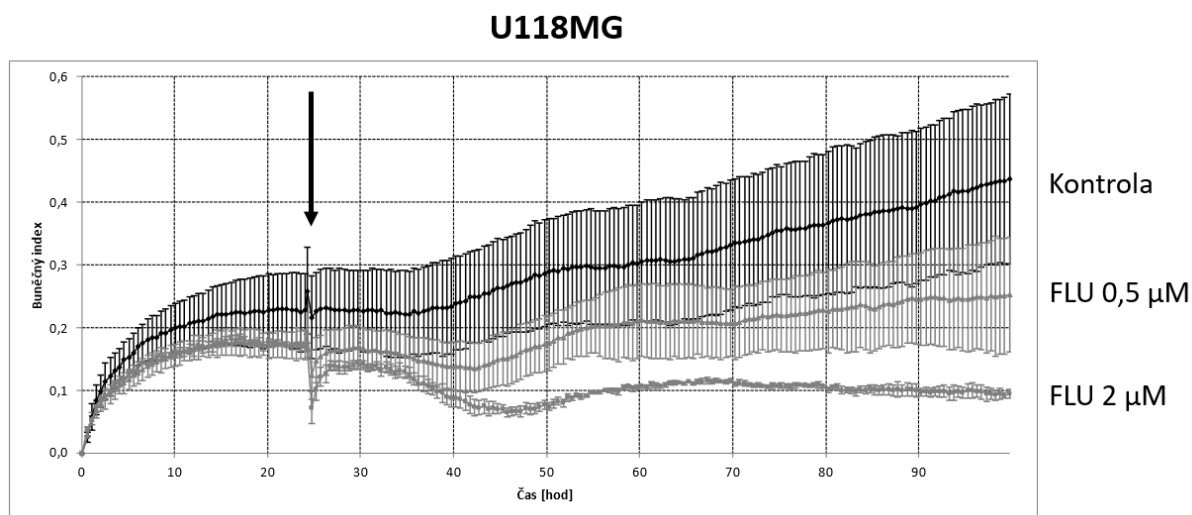
	IC50 [μM]	
	TMZ	FLU
U118MG	3056,0	1,329

GBM buněčná linie U118MG vykazovala výrazně vyšší citlivost k ovlivnění FLU; IC50 pro tuto látku bylo 1,329 μM , zatímco IC50 pro TMZ dosahovalo hodnoty 3056,0 μM . K signifikantnímu snížení viability docházelo působením klinicky nedosažitelné koncentrace TMZ (1000 μM), a to ve všech třech testovaných časových intervalech. Působení všech v grafu uvedených koncentrací FLU vyvolávalo statisticky významné snížení viability buněk ve všech testovaných časových intervalech. Při ovlivnění vyššími koncentracemi FLU (1 μM ; 2 μM a 3 μM) bylo možné pozorovat časovou závislost inhibičního účinku FLU.



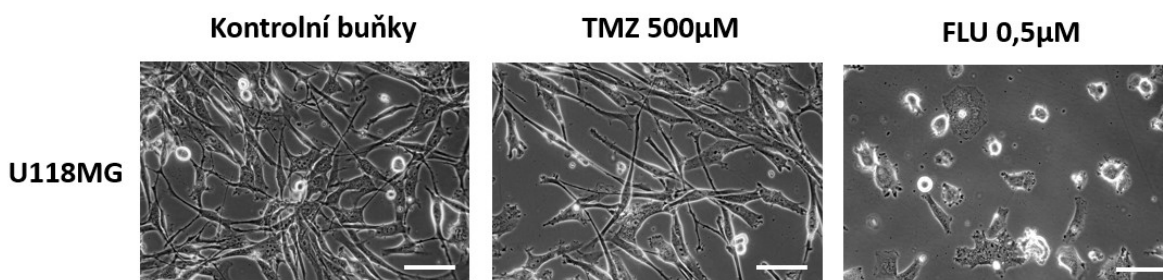
Obr. 32. Vliv vybraných koncentrací TMZ a FLU na viabilitu GBM buněk U118MG v různých časových intervalech (24 h, 48 h, 72 h) stanovený metodou WST-1. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Účinky FLU na buňky U118MG byly dále potvrzeny za využití systému xCELLigence, kdy bylo možné pozorovat výrazné snížení buněčného indexu po ovlivnění 2 μM FLU. Po iniciálním poklesu navíc nedocházelo k žádným časově podmíněným změnám. Také koncentrace 0,5 μM FLU mírně snižovala hodnoty buněčného indexu, po iniciálním snížení však došlo k opětovnému růstu této hodnoty ve snížené hladině oproti neovlivněné kontrole.



Obr. 33. Vliv 0,5 μM a 2 μM FLU na proliferaci GBM buněk U118MG měřený systémem xCELLigence. Čas ovlivnění je označen šipkou.

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. 34. Vliv 500 μM TMZ a 0,5 μM FLU na morfolologii GBM buněk U118MG po 48 h ovlivnění. Zvětšení 400x, měřítko 30 μm .

Výraznější změny v morfolologii a počtu buněk byly pozorovány po podání 0,5 μM FLU. Buňky se zakulacovaly, projasňovaly, postupně ztrácely adheenci a uvolňovaly se do kultivačního média. U některých z nich se objevovaly změny v dynamice membránových výběžků a nastupovaly charakteristické známky degradace a umírání.

4.2. Výsledky *in vivo* experimentu

Pro implantaci do modelového organismu (nu-nu myši) byla zvolena GBM buněčná linie U118MG, a to na základě svých vlastností a schopnosti vytvářet nádory v podmínkách živého organismu a také s ohledem na výsledky získané v předchozím *in vitro* experimentu. Dva týdny po implantaci buněčné linie do nu-nu myši bylo zahájeno každodenní podávání testovaných léčiv FLU (v koncentracích 10 mg/kg a 25 mg/kg) a TMZ (v koncentraci 0,9 mg/kg) po dobu následujících 14 dnů. K ukončení pokusu došlo usmrcením zvířat 24 h po podání poslední dávky léčiva.

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 zaznamenána jejich velikost pro posouzení vlivu testovaných léčiv TMZ a FLU na růst nádorů vzniklých implantací buněk U118MG. Z každé skupiny nu-nu myši byl jeden vzniklý nádor použit pro stanovení proliferačního indexu pomocí IHC analýzy markeru Ki67.

Tab. 11. 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

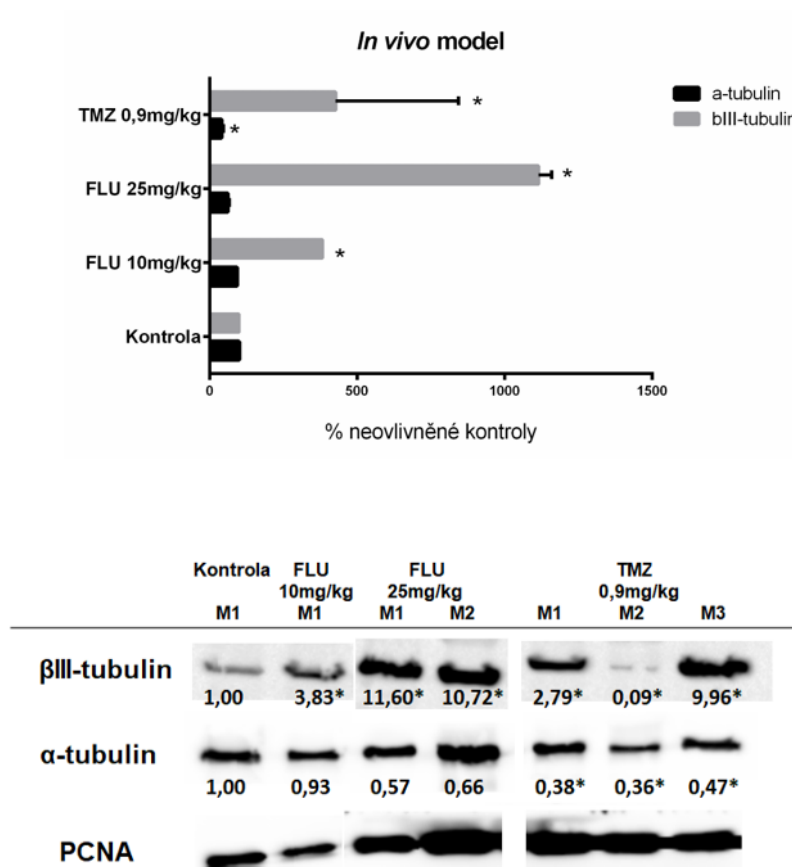
Implantace buněčné linie U118MG do atymických myší vyvolala růst nádorů, jejichž velikost (hmotnost) byla významně nižší u zvířat, kterým byl podáván FLU a TMZ. K největšímu poklesu hmotnosti docházelo u skupiny atymických myší ovlivněných FLU o koncentraci 10 mg/kg, u kterých docházelo k poklesu hmotnosti nádorů více než 4x.

Naopak nejvyšší použitá koncentrace FLU (25 mg/kg) vykazovalo srovnatelný účinek na velikost nádorů jako při podání TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg. U obou těchto skupin docházelo ke snížení průměrné hmotnosti nádorů 2,6x.

TMZ a FLU dále také snižovaly 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. Po podání FLU o koncentraci 25 mg/kg a TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg docházelo opět k srovnatelnému snížení exprese proliferačního markeru Ki67, a to na 15 %.

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

Nádory získané z nu-nu myší po implantaci buněčné linie U118MG byly dále zpracovány a využity k analýze exprese markerů spojených s mikrotubulárním cytoskeletem (α -tubulinu a β III-tubulinu) na úrovni proteinů metodou Western blot.



Obr. 35. 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 myši na úrovni proteinů stanovený metodou Western blot za využití PCNA jako referenčního proteinu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

U nádorů získaných z nu-nu myši, kterým byl podáván FLU, se snižovala exprese α -tubulinu, přičemž k výraznějšímu snížení docházelo po podání FLU o koncentraci 25 mg/kg. Naopak u těchto nádorů se zvyšovala exprese β III-tubulinu, tento efekt byl opět výraznější u nádorů získaných z nu-nu myši ovlivněných FLU o koncentraci 25 mg/kg.

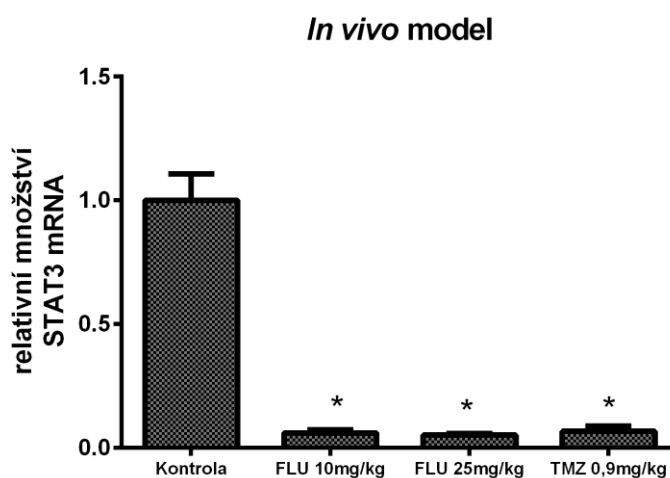
TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg významně snižoval u nádorů získaných z těchto myši expresi α -tubulinu. U testovaných vzorků z myši 1 a myši 3 ovlivněných TMZ (0,9 mg/kg) docházelo ke statisticky významnému snížení hladiny β III-tubulinu, naopak u vzorku získaného z myši 2 ovlivněné TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg docházelo k signifikantnímu poklesu exprese β III-tubulinu.

Při zprůměrování hodnot získaných ze všech testovaných vzorků z dané skupiny nádorů získaných z nu-nu myši bylo pozorováno statisticky významné zvýšení exprese

β III-tubulinu po podání obou koncentrací FLU (10 mg/kg a 25 mg/kg) a také po podání TMZ (0,9 mg/kg).

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

U nádorů získaných z nu-nu myší po implantaci GBM buněčné linie U118MG bylo dále sledováno relativní množství STAT3 mRNA a jeho změny u nádorů ovlivněných FLU a TMZ pomocí metody RT-PCR.

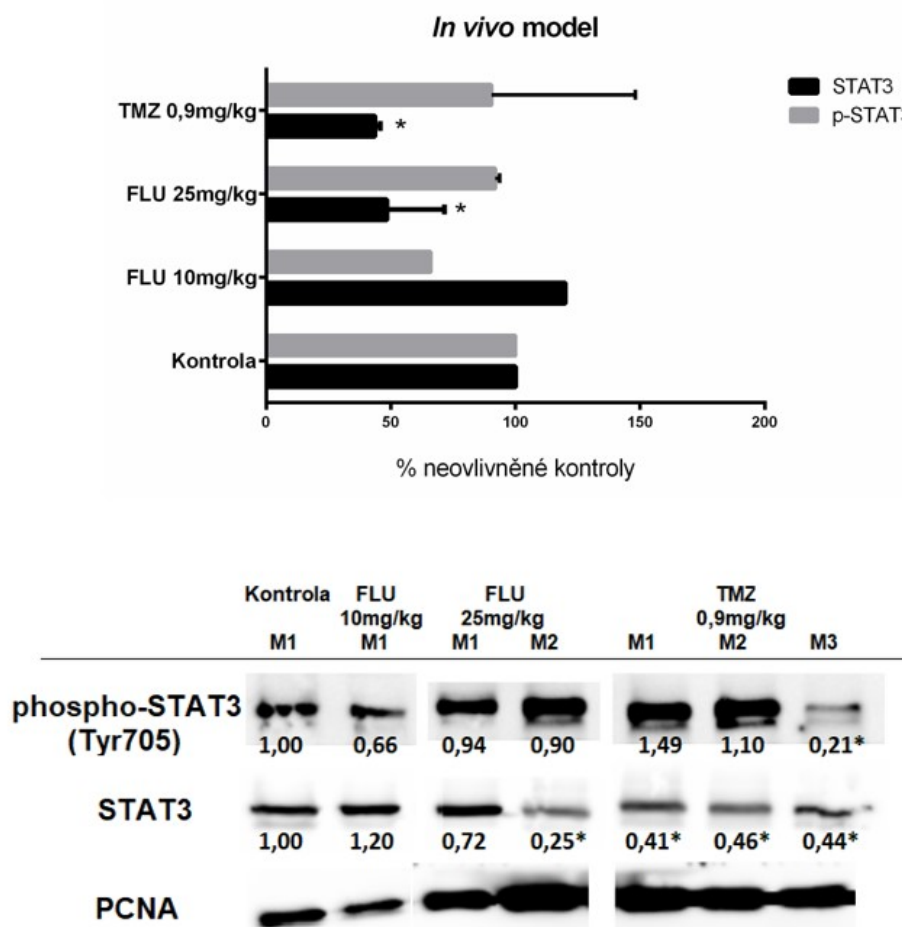


Obr. 36. Vliv FLU (10 mg/kg a 25 mg/kg) a TMZ (0,9 mg/kg) na relativní množství STAT3 mRNA u nádorů získaných po implantaci GBM buněčné linie U118MG do nu-nu myší analyzovaný na úrovni mRNA metodou RT-PCR za využití B2M jako referenčního genu. * $p < 0,05$ vs neovlivněná kontrola.

Podání obou koncentrací FLU (10 mg/kg a 25 mg/kg) snižovalo u nádorů získaných z příslušných nu-nu myší relativní množství STAT3 mRNA. Toto signifikantní snížení relativního množství bylo srovnatelné po podání obou testovaných koncentrací.

Také nádory získané z nu-nu myší ovlivněných TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg vykazovaly snížené relativní množství STAT3 mRNA. Ačkoli relativní množství STAT3 mRNA zůstávalo působením TMZ mírně vyšší než u nádorů ovlivněných FLU, jednalo se také o výrazné a statisticky významné snížení.

Expresí STAT3 a jeho fosforylované formy byla dále u nádorů získaných z nu-nu myší ovlivněných FLU a TMZ stanovena na úrovni proteinů metodou Western blot.



Obr. 37. Vliv FLU (10 mg/kg a 25 mg/kg) a TMZ (0,9 mg/kg) na expresi STAT3 a phospho-STAT3 (Tyr705) u nádorů získaných po implantaci GBM buněčné linie U118MG do nu-nu myši stanovená 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, především u vzorku získaného z myši 2, kde bylo toto snížení statisticky významné. U nádorů získaných z nu-nu myši ovlivněných FLU o koncentraci 10 mg/kg zůstávala hladina STAT3 proteinu srovnatelná se vzorky získanými z kontrolních nu-nu myši.

Ke snížení hladiny fosforylovaného STAT3 docházelo naopak u nádorů získaných z nu-nu myši ovlivněných FLU o koncentraci 10 mg/kg, zatímco u nádorů získaných z nu-nu myši, kterým byl podáván FLU o vyšší koncentraci zůstávaly hladiny fosforylované formy STAT3 srovnatelné se vzorky z kontrolních nu-nu myši.

U vzorků získaných z nu-nu myši ovlivněných TMZ (0,9 mg/kg) se snižovala exprese STAT3, toto signifikantní snížení bylo srovnatelné ve všech testovaných vzorcích z myši 1, myši 2 i myši 3. Hladiny fosforylovaného STAT3 byly mírně zvýšené u nádorů získaných z nu-nu myši 1 a nu-nu myši 2, kterým byl podáván TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg, zatímco u vzorku získaného z myši 3 docházelo ke statisticky významnému snížení exprese fosforylovaného STAT3.

Po zprůměrování hodnot získaných ze všech testovaných vzorků z dané skupiny ovlivnění bylo možné konstatovat, že FLU o koncentraci 25 mg/kg a TMZ o koncentraci 0,9 mg/kg statisticky signifikantně snižoval expresi STAT3.

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 [14, 21, 59].

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 [33, 34, 36, 59].

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 [79, 126].

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 [98, 127].

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 [118, 128].

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 [107-111]. 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* 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 rozličných druhů nádorových buněk, IC₅₀ pro FLU se v různých nádorových modelech pohybovala mezi 0,25 μM a 6,8 μM [106, 108-111, 114, 115]. 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 [107].

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 [129, 130]. 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 μ M a 9,3 μ M. Proliferace vybraných GBM primárních kultur byla inhibována po podání 2 μ M FLU po celou testovanou inkubační dobu (do 72 h), efekt 0,5 μ M FLU na inhibici proliferace buněk ale nebyl jednoznačný a vykazoval odlišnosti v různých GBM primárních kulturách.

Vliv 0,5 μ M 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 FLU (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 [131]. 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 takovém případě pak tato možná souvislost mezi kolísající citlivostí jednotlivých buněk k FLU a jejich 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 [99, 100]. 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

[120], zároveň na základě naše 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 již léčiva 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 změny 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 při nízkých koncentracích FLU.

Inhibice mikrotubulů může být u buněk spojena se zastavením buněčného cyklu vyvolaném zvýšenou expresí proteinu p21 [132], což výsledky této práce potvrzují. U GBM buněčných linií A172 a T98G byla již působení 0,5 μM FLU zvýšena hladina proteinu p21 a zároveň docházelo ke snížení exprese proteinů cdk1 a cyclinu 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 μM FLU (na 51,45 % u buněk A172 a 64,77 % u buněk T98G) a ještě výrazněji pak po 24 h působení 0,5 μM 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 [100, 108, 110, 111, 133], 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 [100].

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 [42, 45, 134].

Již v předchozích studiích byl demonstrován inhibiční efekt FLU na aktivaci STAT3 např. u buněk nádorů prsu nebo kolorektálního karcinomu [113, 114]. Také v rámci této práce byl testován vliv FLU na expresi a aktivaci molekuly STAT3 a naše výsledky ukazují snížení aktivity 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 aktivity v patientských kohortách reportují velmi rozdílné výsledky, pohybující se mezi 9 % a 83 % zastoupením aktivní fosforylace STAT3 [135-140]. Pro získání lepší představy o klinické relevanci exprese a aktivity 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 na 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 STAT3 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 byly při ovlivnění GBM buněčné linie A172 0,5 μ M FLU srovnatelné s použitím specifické siRNA proti STAT3, zvýšení exprese proteinu p53 a snížení exprese cdk1 a cyklinu B1 bylo po ovlivnění FLU výraznější. Také u GBM buněčné linie T98G docházelo použitím STAT3-siRNA a 0,5 μ M 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 rozličných koncentrací FLU a STAT3-siRNA a také dalších časových intervalů ovlivnění.

Na základě dosavadních výsledků, které naznačovaly zastavení buněčného cyklu a vyvolání buněčné smrti po ovlivnění 0,5 μ M 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 μ M u buněk nádorů prsu, 0,3 μ M u buněk kolorektálního karcinomu, nebo 1 μ M u buněk melanomu), často tento efekt FLU vykazoval také koncentrační a časovou závislost [108, 111, 113, 114, 133]. Také v této práci bylo prokázáno, že testovaná koncentrace FLU vyvolává 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 μ M 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 odpovídala 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 [141, 142].

Realističtější modelem 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 [142, 143].

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 [141, 144]. 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, která 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 [145]. *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 [141]. 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 také pro hlubšího 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 hmotnosti výsledného nádoru po aplikaci FLU srovnatelná s hmotností 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. Yu, P., et al., *p53: The Barrier or Guardian for Cell Dedifferentiation?* BioScience, 2014. **64**(10): p. 883-892.
6. KONTOMANOLIS, E.N., et al., *Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review.* Anticancer Research, 2020. **40**(11): p. 6009-6015.
7. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *Epigenetic Determinants of Cancer.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(9).
8. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer.* Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
9. Hahn, W.C. and M. Meyerson, *Telomerase activation, cellular immortalization and cancer.* Ann Med, 2001. **33**(2): p. 123-9.
10. Holt, S.E. and J.W. Shay, *Role of telomerase in cellular proliferation and cancer.* J Cell Physiol, 1999. **180**(1): p. 10-8.
11. 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.
12. Osman, A., et al., *Revisiting Cancer Stem Cells as the Origin of Cancer-Associated Cells in the Tumor Microenvironment: A Hypothetical View from the Potential of iPSCs.* Cancers, 2020. **12**(4): p. 879.
13. Jessen, K.R., *Glial cells.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(10): p. 1861-1867.
14. Fadrus, P., et al., *Komplexní terapie gliomů mozku.* 2015. **9**(5): p. 214-217.
15. Zárubová, J.J.N.f.p., *Nizkostupňový gliom (fibrilární astrocytom) a epilepsie.* 2009. **10**(5): p. 324-327.
16. Alcantara Llaguno, S.R. and L.F. Parada, *Cell of origin of glioma: biological and clinical implications.* Br J Cancer, 2016. **115**(12): p. 1445-1450.

17. Marquet, G., et al., *Grading glioma tumors using OWL-DL and NCI Thesaurus*. AMIA Annu Symp Proc, 2007. **2007**: p. 508-12.
18. Davis, M.E., *Epidemiology and Overview of Gliomas*. Semin Oncol Nurs, 2018. **34**(5): p. 420-429.
19. Cahill, D. and S. Turcan, *Origin of Gliomas*. Semin Neurol, 2018. **38**(1): p. 5-10.
20. 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.
21. de Gooijer, M.C., et al., *An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways*. Trends Mol Med, 2018. **24**(9): p. 763-780.
22. Urbanska, K., et al., *Glioblastoma multiforme - an overview*. Contemp Oncol (Pozn), 2014. **18**(5): p. 307-12.
23. 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.
24. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Stoyanov, G.S., et al., *Reclassification of Glioblastoma Multiforme According to the 2021 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: A Single Institution Report and Practical Significance*. Cureus, 2022. **14**(2): p. e21822.
29. Jovčevska, I., *Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors*. Bosn J Basic Med Sci, 2019. **19**(2): p. 116-124.
30. 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**.

31. 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.
32. 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.
33. Ramos, A.D., R.S. Magge, and R. Ramakrishna, *Molecular Pathogenesis and Emerging Treatment for Glioblastoma*. World Neurosurg, 2018. **116**: p. 495-504.
34. 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.
35. Gussyatiner, O. and M.E. Hegi, *Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options*. Semin Cancer Biol, 2018. **51**: p. 50-58.
36. 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.
37. Fritah, S. and S.P. Niclou, *Dual blockade of STAT3 and EGFR: a key to unlock drug resistance in glioblastoma?* Neuro Oncol, 2020. **22**(4): p. 440-441.
38. Jensen, K.V., et al., *EGFR blockade in GBM brain tumor stem cells synergizes with JAK2/STAT3 pathway inhibition to abrogate compensatory mechanisms in vitro and in vivo*. Neurooncol Adv, 2020. **2**(1): p. vdaa020.
39. Nakada, M., et al., *Signaling Cascades Driving the Malignant Phenotype of Glioma Cells*, in *Glioma Cell Biology*, A. Sedo and R. Mentlein, Editors. 2014, Springer Vienna: Vienna. p. 47-75.
40. Zhang, Y., et al., *The p53 Pathway in Glioblastoma*. Cancers (Basel), 2018. **10**(9).
41. Niu, G., et al., *Role of Stat3 in regulating p53 expression and function*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7432-40.
42. Liu, Y., C. Li, and J. Lin, *STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma*. Anticancer Agents Med Chem, 2010. **10**(7): p. 512-9.
43. Luwor, R.B., S.S. Stylli, and A.H. Kaye, *The role of Stat3 in glioblastoma multiforme*. J Clin Neurosci, 2013. **20**(7): p. 907-11.

44. Bild, A.H., J. Turkson, and R. Jove, *Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis*. *Embo j*, 2002. **21**(13): p. 3255-63.
45. Piperi, C., K.A. Papavassiliou, and A.G. Papavassiliou, *Pivotal Role of STAT3 in Shaping Glioblastoma Immune Microenvironment*. *Cells*, 2019. **8**(11).
46. Domènech, M., et al., *Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(22): p. 12608.
47. Swiatek-Machado, K. and B. Kaminska, *STAT Signaling in Glioma Cells*. *Adv Exp Med Biol*, 2020. **1202**: p. 203-222.
48. Fan, Q., et al., *Betacellulin drives therapy resistance in glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2020. **22**(4): p. 457-469.
49. Hong, S. and M.R. Song, *STAT3 but not STAT1 is required for astrocyte differentiation*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e86851.
50. Ganguly, D., et al., *The critical role that STAT3 plays in glioma-initiating cells: STAT3 addiction in glioma*. *Oncotarget*, 2018. **9**(31): p. 22095-22112.
51. Han, S., et al., *IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets*. *British Journal of Cancer*, 2020. **122**(11): p. 1580-1589.
52. Cohen, A.L., S.L. Holmen, and H. Colman, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2013. **13**(5): p. 345.
53. Huang, J., et al., *Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development*. *Frontiers in Oncology*, 2019. **9**.
54. Rivera, A.L., et al., *MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(2): p. 116-21.
55. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. *Cancer Res*, 1999. **59**(4): p. 793-7.
56. Oldrini, B., et al., *MGMT genomic rearrangements contribute to chemotherapy resistance in gliomas*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 3883.
57. Uno, M., et al., *Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2011. **66**(10): p. 1747-55.
58. Fadrus, P., et al. *Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie*. 2010.
59. Lakomý, R., Burkoň, Petr, Burkoňová, Daniela, Jančálek, Radim, *Nové možnosti léčby glioblastoma multiforme*. *Klinická onkologie*, 2010(23(6)): p. 381-387.

60. Fadrus, P., et al., *Surgical treatment of brain gliomas*. *Onkologie*, 2021. **15**(5): p. 213-217.
61. Szopa, W., et al., *Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 8013575.
62. Lee, S.Y., *Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme*. *Genes Dis*, 2016. **3**(3): p. 198-210.
63. Strobel, H., et al., *Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy*. *Biomedicines*, 2019. **7**(3).
64. Pospíšil, P., et al., *Aktuální onkologická léčba high-grade gliomů*. 2016. **17**(5): p. 287-292.
65. Barani, I.J. and D.A. Larson, *Radiation Therapy of Glioblastoma*, in *Current Understanding and Treatment of Gliomas*, J. Raizer and A. Parsa, Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 49-73.
66. Gzell, C., et al., *Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future*. *Clinical Oncology*, 2017. **29**(1): p. 15-25.
67. Friedman, H.S., T. Kerby, and H. Calvert, *Temozolomide and treatment of malignant glioma*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(7): p. 2585-97.
68. Arora, A. and K. Somasundaram, *Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won?* *Cancer Biol Ther*, 2019. **20**(8): p. 1083-1090.
69. Singh, N., et al., *Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review*. *Cancer Drug Resist*, 2021. **4**(1): p. 17-43.
70. Skarkova, V., et al., *The Evaluation of Glioblastoma Cell Dissociation and Its Influence on Its Behavior*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(18).
71. Mudassar, F., et al., *Targeting tumor hypoxia and mitochondrial metabolism with anti-parasitic drugs to improve radiation response in high-grade gliomas*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2020. **39**(1): p. 208.
72. 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.
73. Hohmann, T. and F. Dehghani, *The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork*. *Cells*, 2019. **8**(4).
74. 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).

75. Gennerich, A. and R.D. Vale, *Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(1): p. 59-67.
76. Vicente, J.J. and L. Wordeman, *Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins*. *Exp Cell Res*, 2015. **334**(1): p. 61-9.
77. Westermann, S. and K. Weber, *Post-translational modifications regulate microtubule function*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003. **4**(12): p. 938-948.
78. Wloga, D., E. Joachimiak, and H. Fabczak, *Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).
79. Katsetos, C.D., et al., *Emerging microtubule targets in glioma therapy*. *Semin Pediatr Neurol*, 2015. **22**(1): p. 49-72.
80. Zottel, A., et al., *Cytoskeletal proteins as glioblastoma biomarkers and targets for therapy: A systematic review*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021. **160**: p. 103283.
81. 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.
82. Mariani, M., et al., *Class III β -tubulin in normal and cancer tissues*. *Gene*, 2015. **563**(2): p. 109-14.
83. 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.
84. Gadau, S.D., *Morphological and quantitative analysis on alpha-tubulin modifications in glioblastoma cells*. *Neurosci Lett*, 2018. **687**: p. 111-118.
85. Arru, C., et al., *Confocal investigation on colocalization between tubulin posttranslational modifications and associated proteins in rat C6 glioma cells*. *Journal of Structural Biology*, 2021. **213**(1): p. 107676.
86. Kaul, R., A.L. Risinger, and S.L. Mooberry, *Microtubule-Targeting Drugs: More than Antimitotics*. *J Nat Prod*, 2019. **82**(3): p. 680-685.
87. Čermák, V., et al., *Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment*. *European Journal of Cell Biology*, 2020. **99**(4): p. 151075.
88. Mühlethaler, T., et al., *Comprehensive Analysis of Binding Sites in Tubulin*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021. **60**(24): p. 13331-13342.
89. Steinmetz, M.O. and A.E. Prota, *Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton*. *Trends in Cell Biology*, 2018. **28**(10): p. 776-792.

90. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-265.
91. Field, Jessica J., José F. Díaz, and John H. Miller, *The Binding Sites of Microtubule-Stabilizing Agents*. Chemistry & Biology, 2013. **20**(3): p. 301-315.
92. McLoughlin, E.C. and N.M. O'Boyle, *Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review*. Pharmaceuticals (Basel), 2020. **13**(1).
93. Karatoprak, G., et al., *Combretastatins: An Overview of Structure, Probable Mechanisms of Action and Potential Applications*. Molecules, 2020. **25**(11).
94. Cormier, A., et al., *Chapter 20 - The Binding of Vinca Domain Agents to Tubulin: Structural and Biochemical Studies*, in *Methods in Cell Biology*, L. Wilson and J.J. Correia, Editors. 2010, Academic Press. p. 373-390.
95. Smith, J.A., et al., *Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability*. Biochemistry, 2010. **49**(6): p. 1331-7.
96. Gao, G., et al., *Marine Antitumor Peptide Dolastatin 10: Biological Activity, Structural Modification and Synthetic Chemistry*. Mar Drugs, 2021. **19**(7).
97. Pantziarka, P., L. Vandeborne, and G. Bouche, *A Database of Drug Repurposing Clinical Trials in Oncology*. Frontiers in Pharmacology, 2021. **12**.
98. Hanusova, V., et al., *Potential anti-cancer drugs commonly used for other indications*. Curr Cancer Drug Targets, 2015. **15**(1): p. 35-52.
99. 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.
100. Chen, C., et al., *Flubendazole Plays an Important Anti-Tumor Role in Different Types of Cancers*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(1).
101. 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.
102. Khattab, M. and A.A. Al-Karmalawy, *Computational repurposing of benzimidazole anthelmintic drugs as potential colchicine binding site inhibitors*. Future Med Chem, 2021. **13**(19): p. 1623-1638.
103. Spagnuolo, P.A., et al., *The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma*. Blood, 2010. **115**(23): p. 4824-33.

104. Kubíček, V., et al., *Carbonyl Reduction of Flubendazole in the Human Liver: Strict Stereospecificity, Sex Difference, Low Risk of Drug Interactions*. 2019. **10**(600).
105. Bui, L., et al., *Brain Tumor Genetic Modification Yields Increased Resistance to Paclitaxel in Physical Confinement*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 26134.
106. 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.
107. Michaelis, M., et al., *Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 8202.
108. Čáňová, K., et al., *Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells*. *Toxicol In Vitro*, 2018. **46**: p. 313-322.
109. Hou, Z.-J., et al., *Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells*. 2015. **6**(8).
110. 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.
111. Zhou, X., et al., *Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis*. *Cell Death Discov*, 2018. **4**: p. 18.
112. Li, Y., et al., *The anthelmintic flubendazole blocks human melanoma growth and metastasis and suppresses programmed cell death protein-1 and myeloid-derived suppressor cell accumulation*. *Cancer Lett*, 2019. **459**: p. 268-276.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. Kipper, F.C., et al., *Vinblastine and antihelmintic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas*. *Invest New Drugs*, 2018. **36**(2): p. 323-331.

118. 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.
119. 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.
120. Kiseleva, L.N., et al., *A172 and T98G cell lines characteristics*. *Cell and Tissue Biology*, 2016. **10**(5): p. 341-348.
121. *U-118 MG - HTB-15™*. 2022 [cited 2023 May 15th]; Available from: <https://www.atcc.org/products/htb-15>.
122. *Athymic nude mice*. [cited 2023 May 16th]; Available from: <https://www.inotivco.com/model/hsd-athymic-nude-foxn1nu>.
123. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. *Biotechnol Annu Rev*, 2005. **11**: p. 127-52.
124. Martinez-Serra, J., et al., *xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies*. *Onco Targets Ther*, 2014. **7**: p. 985-94.
125. Dana, H., et al., *Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA*. *Int J Biomed Sci*, 2017. **13**(2): p. 48-57.
126. 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.
127. Zhou, J. and P. Giannakakou, *Targeting microtubules for cancer chemotherapy*. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2005. **5**(1): p. 65-71.
128. Nath, J., et al., *Drug repurposing and relabeling for cancer therapy: Emerging benzimidazole antihelminthics with potent anticancer effects*. *Life Sci*, 2020. **258**: p. 118189.
129. 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).
130. 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).

131. 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.
132. 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.
133. 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.
134. Fu, W., et al., *Roles of STAT3 in the pathogenesis and treatment of glioblastoma*. Front Cell Dev Biol, 2023. **11**: p. 1098482.
135. Kohsaka, S., et al., *STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression*. Molecular Cancer Therapeutics, 2012. **11**(6): p. 1289-1299.
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. Gómez-Oliva, R., et al., *Evolution of Experimental Models in the Study of Glioblastoma: Toward Finding Efficient Treatments*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 614295.
142. Paolillo, M., S. Comincini, and S. Schinelli, *In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension*. Cancers (Basel), 2021. **13**(10).
143. 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).

144. 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.
145. Dapash, M., et al., *The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment*. *Cells*, 2021. **10**(9).