

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VLIV FLUBENDAZOLU NA PROLIFERACI, MIGRACI A ADHEZI
BUNĚK ORÁLNÍHO KARCINOMU *IN VITRO***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Školitel specialista: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Jana Kamarýtová

Prohlášení:

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

Datum:

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Věře Králové, Ph.D. za odborné vedení v průběhu této práce, cenné rady a připomínky. Děkuji také prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. a dále děkuji všem pracovníkům Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za ochotu a pomoc.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Jana Kamarýtová

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

Školitel specialista: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv flubendazolu na proliferaci, migraci a adhezi buněk orálního karcinomu *in vitro*

Flubendazol (FLU) patří do skupiny benzimidazolových anthelmintik a je široce používán při léčbě parazitárních onemocnění v humánní i veterinární medicíně. Molekulární mechanismus působení FLU spočívá v inhibici proteinových β -tubulinových subjednotek. To způsobí narušení tvorby mikrotubulů a tím dojde k poškození funkčnosti celé buňky. FLU také inhibuje energetický metabolismus parazitární buňky a ta postupně odumírá. Schopnost narušovat tvorbu mikrotubulů vede k teoretické možnosti využití FLU a dalších benzimidazolových anthelmintik v protinádorové léčbě. V této práci jsme se zabývali vlivem FLU na proliferaci, migraci a adhezi buněk orálního skvamózního karcinomu *in vitro*. Pro náš experiment jsme použili 2 buněčné linie odvozené od orálního skvamózního karcinomu DOK a PE/CA-PJ15 a buněčnou linii GF odvozenou od buněk gingivy zdravého člověka. Buňky jsme ovlivnili FLU v koncentrační řadě od 0,01 do 10 μ M a po 72-hodinové inkubaci jsme stanovili počet živých buněk pomocí testu WST-1. Pomocí xCELLigence analyzátoru jsme sledovali vliv FLU na buněčnou migraci a adhezi. FLU inhiboval proliferaci buněk u všech tří testovaných linií, nejméně citlivá na FLU byla buněčná linie GF. FLU ovlivňoval migraci a adhezi v závislosti na koncentraci a na typu buněčné linie.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Jana Kamarýtová

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

Supervisor specialist: RNDr. Věra Králová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Impact of flubendazol on proliferation, migration and adhesion of cells of oral carcinoma *in vitro*

Flubendazol (FLU) belongs to the group of benzimidazole anthelmintics and is widely used for treatment of parasitic diseases in human and veterinary medicine. Molecular mechanism of FLU action consists in inhibition of protein β -tubulin subunits. It interferes with microtubule polymerization, eventually causing cell damage. FLU also inhibits the energetic metabolism of parasite cell which leads gradually to the death of the parasite. The ability to disrupt the production of microtubules leads to a theoretical possibility to use FLU and other benzimidazole anthelmintics in cancer treatment. In this thesis we studied the impact of FLU on proliferation, migration and adhesion of oral squamous carcinoma cells *in vitro*. For our experiment we used two cell lines derived from oral squamous carcinoma DOK and PE/CA-PJ15 and cell line GF derived from gingiva of a healthy human donor. We treated cells by FLU in concentration range from 0,01 to 10 μ M and after 72-hour incubation we measured the number of viable cells by the WST-1 assay. The xCELLigence analyzer was used to follow up the effect of FLU on cell migration and adhesion. FLU inhibited cell proliferation in all three tested cell lines with GF cell line being the less sensitive. FLU influenced the migration and adhesion depending on the concentration and type of cell line.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Nádorová onemocnění	11
2.1.1 Definice	11
2.1.2 Základní rozdělení nádorů	12
2.1.3 Vznik nádorové buňky	12
2.1.4 Charakteristické znaky nádoru	13
2.1.5 Invazivita a metastazování	14
2.1.6 Rizikové faktory	15
2.1.7 Evropský kodex proti rakovině	15
2.2 Karcinomy dutiny ústní	15
2.2.1 Epidemiologie	15
2.2.2 Rizikové faktory	17
2.2.3 Klinický obraz	17
2.2.4 Stádia onemocnění	17
2.2.5 Prognóza	18
2.2.6 Terapie	18
2.3 Flubendazol	19
2.3.1 Farmakodynamické vlastnosti	19
2.3.2 Farmakokinetické vlastnosti	20
2.3.3 Metabolismus FLU	20
2.3.4 Toxicita	22
2.3.5 Protinádorová účinnost	22
3. CÍL PRÁCE	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1 Biologický materiál	27
4.1.1 Buněčná linie DOK	27
4.1.2 Buněčná linie PE/CA-PJ15	27
4.1.3 Buněčná linie GF	27
4.2 Chemikálie	28
4.3 Přístrojové vybavení	28

4.4	Spotřební materiál	29
4.5	Pasážování buněk	30
4.6	Počítání buněk pomocí přístroje Cellometer Auto T4	30
4.7	Příprava pracovních roztoků FLU	31
4.8	Testování vlivu FLU na proliferaci buněk	32
4.8.1	Ovlivňování buněčných linií v médiu se sérem	32
4.8.2	Ovlivňování buněčných linií v médiu bez séra	33
4.9	Stanovení počtu živých buněk testem WST-1	34
4.10	Analýza vlivu FLU na migraci a adhezi buněk	36
4.10.1	Stanovení vlivu FLU na migraci buněk	36
4.10.2	Stanovení vlivu FLU na adhezi buněk	38
4.11	Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení	39
5.	VÝSLEDKY	40
5.1	Testování vlivu FLU na proliferaci buněk pomocí testu WST-1	41
5.1.1	Buněčná linie DOK v médiu se sérem	41
5.1.2	Buněčná linie PE/CA-PJ15 v médiu se sérem	42
5.1.3	Buněčná linie GF v médiu se sérem	43
5.1.4	Buněčná linie PE/CA-PJ15 v médiu bez séra	44
5.2	Stanovení hodnoty EC ₅₀	45
5.3	Vliv FLU na migraci buněk	46
5.3.1	Vliv FLU na migraci buněčné linie PE/CA-PJ15	46
5.3.2	Vliv FLU na migraci buněčné linie GF	47
5.4	Vliv FLU na adhezi buněk	49
5.4.1	Vliv FLU na adhezi buněčné linie PE/CA-PJ15	49
5.4.2	Vliv FLU na adhezi buněčné linie GF	50
6.	DISKUZE	52
7.	ZÁVĚR	56
8.	SEZNAM ZKRATEK	58
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění celosvětově patří hned po onemocnění kardiovaskulární soustavy mezi nejčastější příčiny morbidity a mortality. Národní onkologický registr (NOR) ČR v roce 2011 evidoval 83 581 nových případů zhoubných novotvarů a novotvarů *in situ*.

U mužů byl v roce 2012 nejčastějším diagnostikovaným nádorem karcinom plic, na druhém místě karcinom prostaty. Mezi další velmi časté nádory u mužů patří kolorektální karcinom, karcinom žaludku a karcinom jater. U žen bylo nejčastěji diagnostikováno těchto šest nádorů: karcinom prsu, kolorektální karcinom, karcinom plic, rakovina děložního čípku, karcinom žaludku a rakovina těla děložního. Na jedenáctém místě u mužů a na sedmnáctém místě u žen byl diagnostikován karcinom dutiny ústní a rtů (web 1).

Problém při detekci karcinomu dutiny ústní spočívá v tom, že nádorové bujení je dlouho asymptomatické. Karcinom je obvykle zjištěn až v pokročilém stádiu, kdy už dochází ke vzniku metastáz a léčba je komplikovanější. Dalším problémem je, že symptomy tohoto onemocnění někdy bývají mylně identifikovány jako infekce v dutině ústní.

Z histologického hlediska dlaždicobuněčný neboli skvamózní karcinom spolu s adenokarcinomem patří mezi typy karcinomů, které se vyskytují nejčastěji. A právě dlaždicobuněčný karcinom je nejčastějším typem u nádorů dutiny ústní (Slabý et al. 2015, Klener et al. 2002).

Výzkum v oblasti medicíny hledá stále nové účinné látky a další prostředky, u kterých by se mohl prokázat pozitivní vliv při terapii onemocněním nádory.

V této práci jsme zkoumali vliv benzimidazolového anthelmintika FLU na proliferaci, migraci a adhezi buněčných linií orálního skvamózního karcinomu DOK a PE/CA-PJ15 a buněčné linie gingiválních fibroblastů zdravého člověka. Použili jsme k tomu metodu testu WST-1 a xCELLigence RTCA analyzátor.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nádorová onemocnění

První zmínka o nádorovém onemocnění u člověka byla zobrazena na tzv. Edwin Smithově papyru, což je chirurgická učebnice z období 1700 př. n. l., v níž je zaznamenán karcinom prsu a jeho chirurgická léčba. Zajímavým faktem o zhoubných nádorech je i to, že nepostihují pouze lidskou populaci nebo savce obecně, ale jsou rozšířeny téměř v celé živočišné říši. Nádory byly popsány například u žahavců, ostnokožců nebo hlavonožců. Naopak u hlístic, želvušek nebo vírníků nebyly nádory nikdy pozorovány (Slabý et al. 2015).

Z toho vyplývá, že nádorová onemocnění se v živočišné říši vyskytují odedávna, u lidské populace nevyjímaje. Je bohužel paradoxním jevem, že s neustále se prodlužující délkou života se zvyšuje i pravděpodobnost, že člověka postihne zhoubné nádorové onemocnění. Věk je hlavním rizikovým faktorem vzniku zhoubného bujení především kvůli kumulativnímu vlivu rizikových faktorů (web 2).

Nádorové onemocnění je druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR, na prvním místě jsou úmrtí způsobená nemocemi oběhové soustavy. Ze statistik plyne, že nádorové onemocnění postihne během života každého třetího obyvatele žijícího v České republice a každý čtvrtý občan mu podlehně. Incidence nádorových onemocnění se neustále navyšuje. Ale pozitivní je, že se statistik vyplývá, že mortalita na nádorová onemocnění klesá. Dochází tedy k tzv. trendu rozevírajících se nůžek. To je dáno tím, že dochází k významným pokrokům v terapeutických možnostech a také díky sekundární prevenci, tedy včasnému zachycení nemoci (web 2).

2.1.1 Definice

Nádor neboli novotvar, tumor, neoplazie, či blastom je z *patologického hlediska* definován jako nově vzniklý tkáňový útvar či buněčné populace v organismu, které vznikají jako fyziologická odezva na vnější i vnitřní podněty, jeví známky abnormality a více či méně unikají z regulačního vlivu okolních buněk a organismu (Kolář et al. 2003).

Na molekulární úrovni nádory představují genetickou nemoc, která vzniká v důsledku patologických změn v informaci, kterou nese DNA. Od jiných genetických nemocí se liší tím, že s vývojem nádoru souvisí především somatické mutace, tedy mutace, které se objevují v jednotlivých tělních buňkách, na rozdíl od vrozených mutací,

kteřé jsou v buňkách zárodečné linie dávajících vznik celému mnohobuněčnému organismu (Šmardová et al. 2010).

Maligní transformace je proces, při kterém se ze zdravých buněk stávají buňky nádorové. Vzniku nádoru mohou předcházet následující změny v histologickém uspořádaní tkání:

- **Hyperplazie** - zmnožení buněk, u kterých ale nedochází k morfologickým změnám.
- **Metaplazie** – změna typu tkáně pro danou oblast neobvyklou, např. přechod dlaždicového epitelu na cylindrický epitel v jícnu.
- **Dysplazie** – stav, kdy u buněk dochází k cytologickým abnormalitám, např. změna velikosti, tvaru, barvitelnosti jádra, poměru jádra a cytoplazmy, mitotické aktivity.

2.1.2 Základní rozdělení nádorů

- **Nádor benigní neboli nezhoubný** - nádor roste autonomně a pomalu, ale buňky tvořící tento nádor neinvadují do okolních struktur, nádor bývá opouzdřený a spíše okolní struktury utlačuje.
- **Nádor maligní neboli zhoubný** - nádor roste rychle a invazivně, má schopnost tvorby sekundárních nádorů (metastáz).

2.1.3 Vznik nádorové buňky

Nádory jsou útvary vznikající z naší vlastní tkáně. Vznik nádorové buňky tedy není *de novo*, ale vzniká z původně zdravé buňky. Jde o novou a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která je ale bez fyziologické funkce a neregulovatelně roste. Je to tedy abnormální přírůstek buněčné tkáně klonálního charakteru, který je geneticky podmíněný. Pro zdravou buňku je typický definovaný tvar a struktura, odpovídání na podněty, regulace tvorby dceřiných buněk. Bohužel při replikačních procesech hrozí vznik mutací neboli náhodných změn, které mohou narušit regulační cyklus zdravých buněk. V důsledku genetické nestability se kumulují genetické změny, které vedou k tomu, že dceřiná buňka ztratí svůj tvar a strukturu, přestane reagovat na růstově inhibiční signály a může se nekontrolovatelně dělit (Hofmanová 2013).

2.1.4 Charakteristické znaky nádoru

Jde o znaky nebo schopnosti, které vykazuje většina nádorových buněk. Tyto schopnosti vedou k růstu a dalšímu rozšiřování nádoru. Definovali je společně Hanahan a Weinberg v roce 2000, původně se jednalo o šest získaných znaků. Byly to: 1. autonomní stimulace růstu, 2. necitlivost k růstovým supresorům, 3. schopnost invaze a tvorby metastáz, 4. neomezený replikační potenciál, 5. podpora angiogeneze a 6. rezistence k apoptóze (Hanahan a Weinberg, 2000). V roce 2011 je rozšířili o další 4 znaky: 7. únik před zničením imunitním systémem, 8. zánětlivý proces, 9. genomová nestabilita spojená s mutací a 10. přeprogramování buněčného metabolismu. Svou práci publikovali v časopise *Cell* pod názvem *Hallmarks of Cancer: The Next Generation* (Hanahan a Weinberg, 2011). Dohromady tedy sestavili 8 získaných znaků nádoru (tzv. Hallmarks of Cancer) a 2 mechanismy, které vedou ke spuštění vzniku nádoru (viz. Obr. č. 1).

Stabilitu genomu chrání řada molekulárních mechanismů, které vytvářejí ochranné bariéry. Pokud ale dojde k porušení těchto bariér a buňka není schopna reparace DNA, může to vést k senescenci nebo apoptóze buňky nebo naopak ke vzniku mutací. Právě genomová nestabilita vede k rychlému vzniku náhodných mutací, může jít i o chromozomové přestavby nebo aneuploidie. Důsledkem genomové nestability je možnost rozvoje dalších získaných znaků maligního nádoru. Také zánět, který je řízený buňkami imunitního systému, podporuje šíření nádorového onemocnění. Zánět se může objevit buď v premaligní lézi, nebo v již maligním nádoru. Zánět podporuje proliferaci a zvyšuje schopnost přežívání buněk nádoru, podporuje angiogenezi a metastazování, může zeslabit odpověď imunitního systému a má vliv na působení hormonů a cytostatik (Slabý et al. 2015).



Obr. č. 1 – Hallmarks of Cancer – The Next Generation – na obrázku je zobrazeno prvních šest získaných znaků nádoru a doplněno o další 2 znaky. Dále jsou zobrazeny 2 mechanismy vedoucí ke spuštění vzniku nádoru (genomová nestabilita spojená s mutací, zánětlivý proces) (Zdroj: Hanahan a Weinberg, 2011).

2.1.5 Invazivita a metastazování

Mezi základní vlastnosti buněk maligního nádoru patří schopnost metastazování, což znamená, že se nádory mohou šířit do anatomicky vzdálených oblastí od primárního ložiska. Právě metastazování je největším medicínským problémem ve spojitosti s nádorovými chorobami. Nádorové buňky získávají se zvyšující se heterogenitou vlastnosti, které jsou nezbytné k tvorbě metastázy. Buňky s těmito vlastnostmi postupují metastatickou kaskádou. Metastatická kaskáda zahrnuje tyto kroky:

- a) migrace buněk z primárního nádoru a lokální invaze
- b) intravazace, tedy prostoupení stěnou krevní nebo lymfatické cévy, přežívání v cirkulaci a hledání vhodného místa pro tvorbu sekundárního nádoru (metastázy)
- c) extravazace, vystoupení skrz cévní stěnu
- d) metastatická kolonizace, tvorba metastatického ložiska (Slabý et al. 2015).

2.1.6 Rizikové faktory

Rizikové faktory, které mají obecně vliv na vznik a rozvoj zhoubných nádorů, se dělí na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi rizikové faktory neovlivnitelné patří dědičnost a do značné míry i vnější faktory jako UV záření, ionizující záření, elektromagnetické záření, infekce a znečištěné životní prostředí. Rizikové faktory, které můžeme ovlivnit, jsou kouření, výživa, překrmování dětí a přejídání dospělých, nedostatečný tělesný pohyb, alkohol (web 3).

2.1.7 Evropský kodex proti rakovině

Jedná se o iniciativu Evropské komise EU. Cílem tohoto kodexu je informovat občany EU, jakými způsoby mohou snížit riziko onemocnění zhoubnými nádory. Čtvrtá verze kodexu je z roku 2014 a je v ní celkem 12 doporučení. Vychází z ovlivnitelných rizikových faktorů a doporučuje např. nekouřit tabákové výrobky, dodržovat pravidelné fyzické aktivity, zdravě se stravovat, vyhýbat se dlouhodobému slunění, účastnit se očkovacích programů, absolvovat organizované screeningové programy (rakovina tlustého střeva a konečníku, prsu a děložního čípku) (web 4).

2.2 Karcinomy dutiny ústní

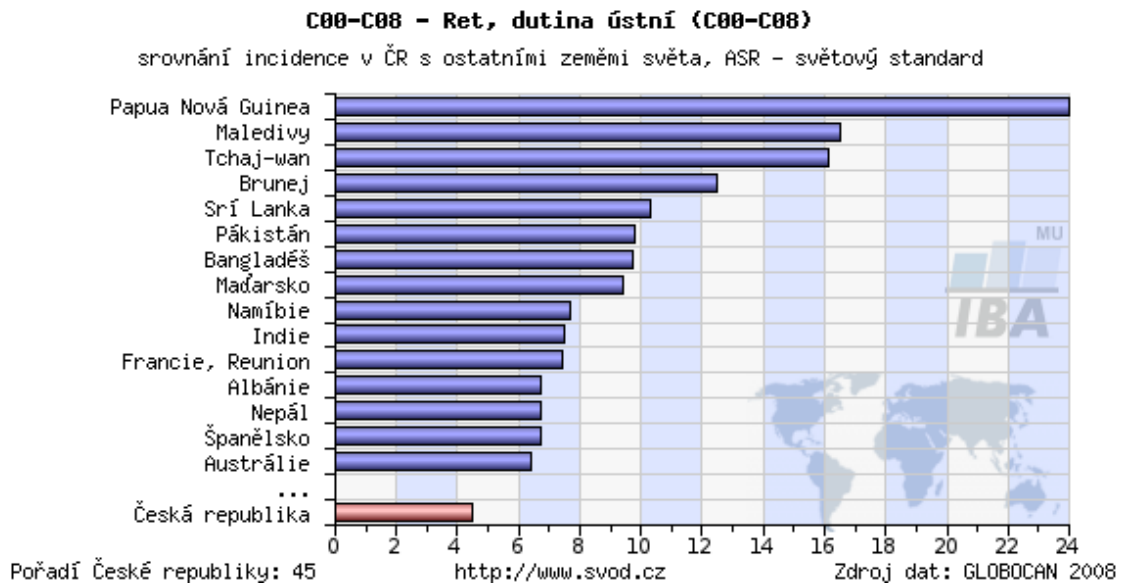
Dle klasifikace MKN – 10: C01-C06 ZN Dutiny ústní.

Karcinom dutiny ústní vyrůstá v těchto strukturách: sliznice tváře, dásní, spodiny ústní, tvrdého patra, přední 2/3 jazyka (volná část jazyka), retromolární oblast a bukoalveolární rýha. Z histologického hlediska se nejčastěji jedná o skvamózní (dlaždicobuněčný) karcinom (Klener et al. 2002).

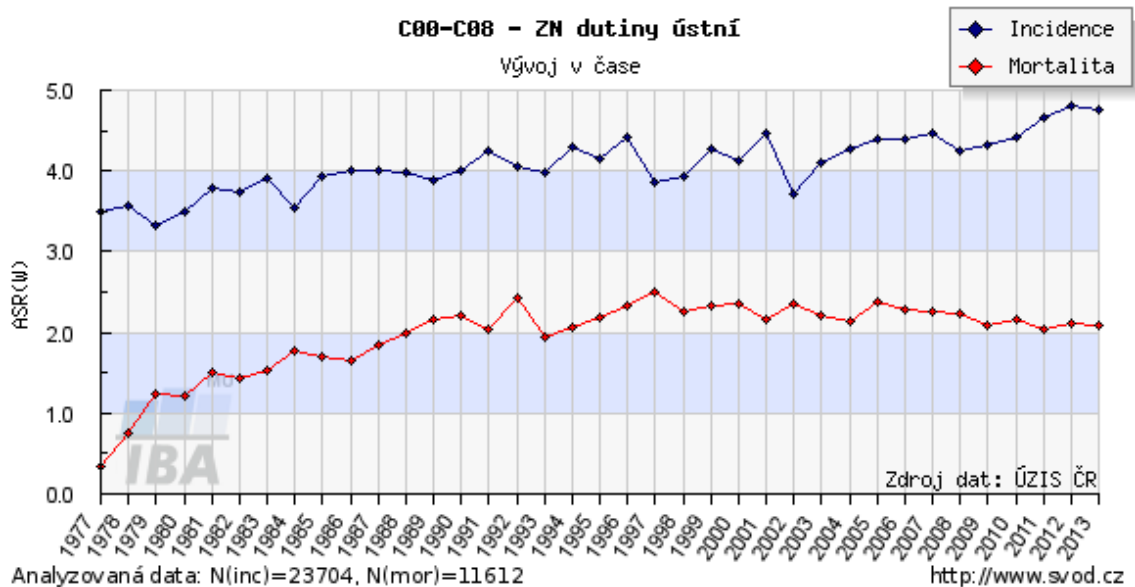
2.2.1 Epidemiologie

Každým rokem je na celém světě diagnostikováno kolem ½ milionu pacientů se skvamózním karcinomem hlavy a krku (Saba et al. 2011). Až dvě třetiny pacientů s tímto onemocněním žijí v rozvojových zemích. V Indii je karcinom postihující dutinu ústní a krk nejčastějším typem nádorového onemocnění u mužů a třetím nejčastějším nádorem u žen. Tvoří tam až 40% případů nádorového onemocnění (Sharma et al. 2010). Karcinom dutiny ústní častěji postihuje muže než ženy a to v poměru 3:1. Nejčastěji to bývá po

čtyřicátém roku života. Zajímavostí je, že celosvětově nejvyšší incidence karcinomu dutiny ústní je u žen ve státě Papua Nová Guinea. Podle Dr. W. Adu-Krowa je hlavním rizikovým faktorem tradiční žvýkání betelových ořechů. Kombinací betelových ořechů, tabáku a alkoholu se riziko zvyšuje (web 5).



Obr. č. 2 Incidence zhoubných nádorů dutiny ústní celosvětově – porovnání ČR s ostatními zeměmi, data jsou z roku 2008 a ČR je v pořadí 45. země (web 6)



Obr. č. 3 – Incidence a mortalita zhoubných nádorů dutiny ústní v ČR v období 1977 až 2013 (web 6)

2.2.2 Rizikové faktory

Mezi nevýznamnější rizikové faktory vzniku karcinomu patří kouření tabákových výrobků a zvýšená konzumace koncentrovanějších alkoholických nápojů. Při současném užívání tabákových výrobků a alkoholu se riziko vzniku ještě umocňuje. Dalším rizikovým faktorem je nízká úroveň hygieny dutiny ústní a celkově špatná péče o své zdraví. Prevencí je tedy především odvykání kouření, omezení konzumace alkoholu. Také pravidelné preventivní návštěvy zubního lékaře mohou pomoci k včasnému odhalení počátečních stádií onemocnění (web 7).

Pacienti se sníženou imunitou kvůli HIV pozitivitě nebo AIDS mají vyšší riziko vzniku onemocnění než ostatní populace. Riziko tohoto onemocnění je vyšší také u lidí, kteří užívají imunosupresiva po transplantaci orgánů (web 8).

2.2.3 Klinický obraz

V časném stádiu jsou karcinomatózní léze většinou asymptomatické. Poté, co dojde k progresi, se začne nádorové onemocnění projevovat bolestí, dále se objevují polykací potíže a také ztížená mluva. V této fázi bývá onemocnění mylně diagnostikováno jako infekce v dutině ústní. V případě nádoru však příznaky přetrvávají a nedochází k hojení. Vzhledem k asymptomatickému začátku onemocnění má až 40% pacientů v době diagnostikování nádoru regionální uzlinové metastázy. Až teprve zvětšené krční uzliny přivedou pacienta k lékaři. Dalším symptomem je zápach z úst, který je způsoben rozpadajícím se nádorem. Dále jsou to neurologické potíže způsobené prorůstáním nádoru nebo jeho útlakem větví lícního nervu (Klener et al. 2002, web 7).

2.2.4 Stádia onemocnění

Stádium 0 – jde o velmi ranou fázi onemocnění, někdy bývá lékaři označováno jako prekanceróza, nádorové buňky se již vyskytují ve sliznici, ale nedochází k jejich šíření. Pokud však nedojde k nálezu těchto buněk, buňky získají invazivní charakter.

Stádium I – toto je nejranější stádium invazivního nádoru, buňky rostou a dostávají se i do hlubší tkáně, ale nedochází k tvorbě metastáz v lymfatických uzlinách a dalších orgánech, nádor má na průměru méně než 2 cm.

Stádium II – v tomto stádiu také ještě nedochází k tvorbě metastáz, avšak nádorová tkáň se zvětšuje, na průměru je větší než 2 cm, ale menší než 4 cm.

Stádium III – pokud je nádorové onemocnění ve stádiu III, znamená to buď to, že nádorová tkáň se zvětšila na průměru na více než 4 cm a avšak nešíří se do okolních mízních uzlin, nebo naopak došlo tomu, že se nádor příliš nezvětšuje, ale šíří se do blízkých mízních uzlin.

Stádium IV – nádorové onemocnění ve velmi pokročilé fázi, toto stádium se dělí na tři podskupiny:

- Stádium IV a – nádorová tkáň zasahuje do oblasti rtů a úst, lymfatické uzliny v okolí mohou být zasaženy nádorovými buňkami
- Stádium IV b – nádorová tkáň je různé velikosti a navíc je zasažena jedna nebo obě mízní uzliny v oblasti krku, nebo se jakákoliv mízní uzlina zvětší na více než 6 cm
- Stádium IV c – došlo k tvorbě metastáz, nejčastěji bývají zasaženy plíce nebo kosti (web 8).

2.2.5 Prognóza

Na prognózu má vliv to, jak rozsáhlý je primární nádor a zda již došlo k metastazování. Ze statistik vyplývá, že celková pravděpodobnost pětiletého přežití je kolem 50%. Pokud je nádor zjištěn ve stádiu I, je pravděpodobnost 80%. Ve stádiu II je to 60%. A pro stádia III/IV je to 15-35%. Pokud jsou přítomny uzlinové metastázy, pravděpodobné přežití se sníží o 50% (Klener et al. 2002).

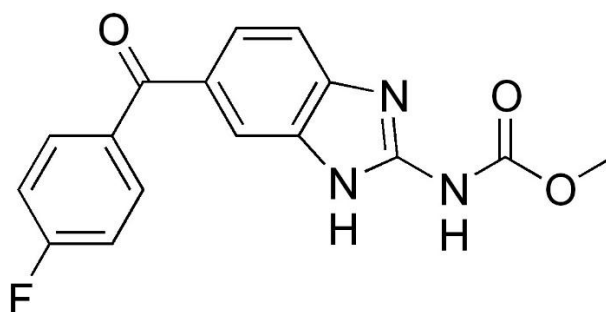
2.2.6 Terapie

Terapie se odvíjí od lokalizace nádorové tkáně. Základem léčby je chirurgické odstranění nádorové tkáně, to bývá kombinováno s radioterapií. A eventuálně se doplňuje chemoterapií a cílenou biologickou léčbou. Volba léčebné strategie je závislá na lokalizaci a rozsahu primárního nádoru, na histologickém vyšetření, dále zda jsou přítomné regionální nebo vzdálené metastázy. Důležitý je celkový stav pacienta, věk, jeho výživa, případné komorbidity, v neposlední řadě preference pacienta. Chemoterapie pomáhá k úlevě od příznaků a také ke zmenšení nádorové tkáně nebo ke zpomalení jejího růstu. K chemoterapii se většinou přistupuje při místně pokročilých

neoperabilních, metastazujících nebo recidivujících nádorech. Jako nejčastější cytostatika se používají deriváty platiny – cisplatina a karboplatina, antimetabolity metotrexát a 5-fluoruracil, taxany paklitaxel a docetaxel, dále se jako cílená biologická léčba používá monoklonální protilátka cetuximab (web 9).

2.3 Flubendazol (FLU)

FLU patří do farmakoterapeutické skupiny benzimidazolů. Léčiva z této skupiny se používají jako anthelmintika s velmi širokým účinkem ve veterinárním i humánním lékařství. Kromě FLU patří do této skupiny také albendazol, mebendazol, oxibendazol, fenbendazol a febantel. Tyto benzimidazoly mají též anticestodní účinky (Lamka a Ducháček 2006).



Obr. č. 4 – Strukturní vzorec FLU (web 14)

Systematický název FLU je methyl-N-[6-(4-flubenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát, jehož sumární vzorec je $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ a molekulární hmotnost je $M_r = 313,29$ g/mol. Toto léčivo je prakticky nerozpustné ve vodě, v 96% ethanolu a dichlormethanu. Je bílé nebo téměř bílé barvy (Český lékopis 2009). Analogem flubendazolu je mebendazol, liší se od něj absencí kovalentně vázaného fluoru (web 11).

2.3.1 Farmakodynamické vlastnosti

Anthelmintický účinek FLU je dán inhibicí proteinových β -tubulinových subjednotek, které jsou nezbytné k tvorbě mikrotubulů v buňkách parazitů. Tím, že dojde k narušení tvorby mikrotubulů, je poškozena funkčnost celé buňky parazita

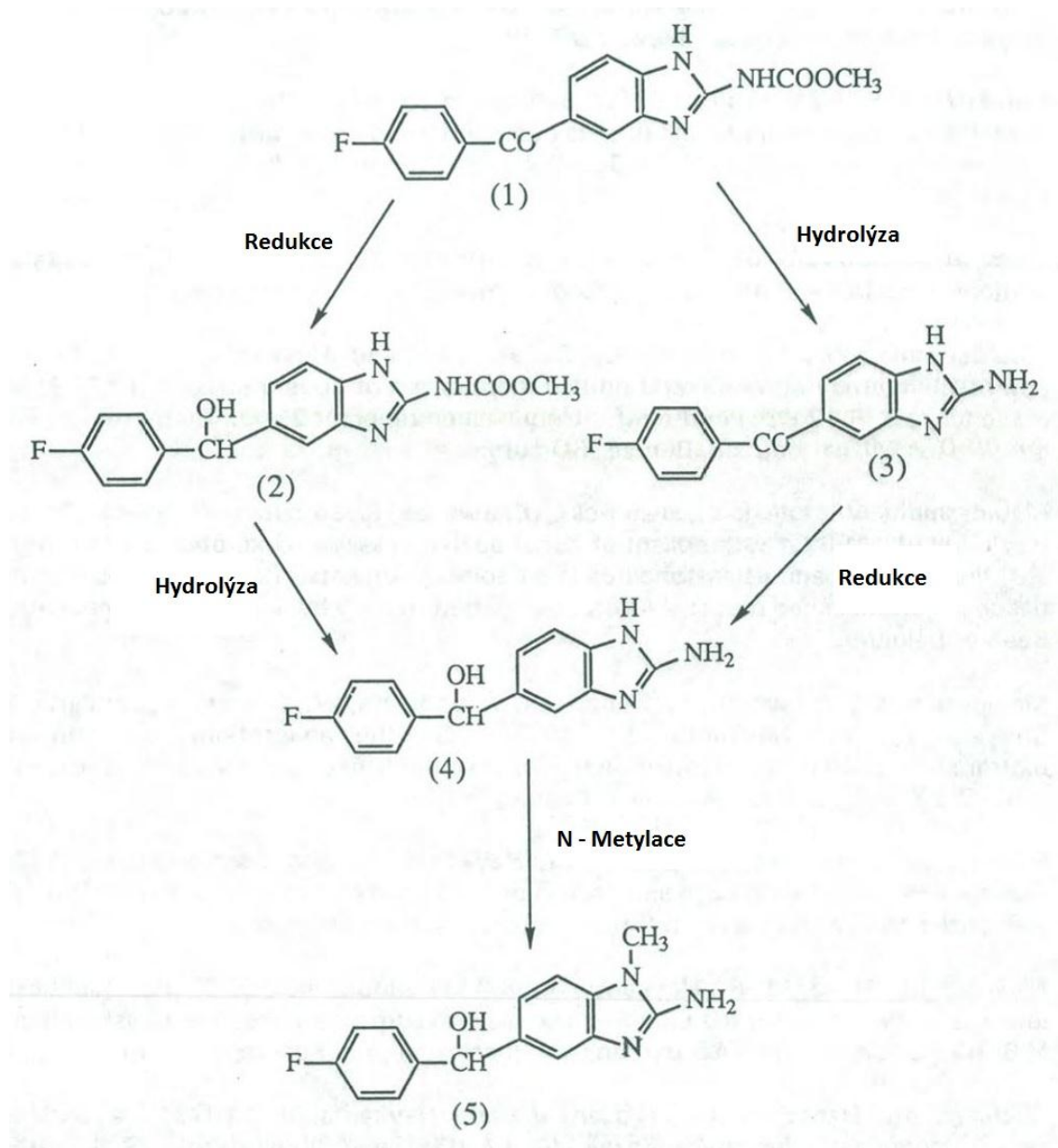
(Lamka a Ducháček 2006). FLU inhibuje energetický metabolismus parazitární buňky. Způsobí narušení transportu a metabolismu glukózy, tím dojde k vyčerpání energie. Buňka tím ztratí schopnost pohyblivosti a postupně odumírá (Ducháček a Lamka 2006).

2.3.2 Farmakokinetické vlastnosti

FLU je velmi málo rozpustný ve vodných systémech, které se nacházejí v gastrointestinálním traktu, to působí jeho nízkou rozpustnost a velmi nízkou absorpci (web 10). Absorpce FLU se zvýší, pokud se látka užije těsně po jídle. Více než 80% perorálně podané látky se vyloučí stolicí. Močí se vylučují metabolity FLU a jen velmi malé množství nezměněné látky (méně než 0,1%). Biologický poločas FLU ve tkáních je 1 až 2 dny (web 11).

2.3.3 Metabolismus FLU

Biotransformace FLU je možná dvěma cestami. Jednou cestou metabolismu je redukce ketoskupiny, metabolitem je metyl[5-[(fluorofenyl)hydrohymetyl]-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát. Redukce je hlavní metabolickou cestou FLU u kuřat a krocanů. Druhou metabolickou cestou je hydrolyza karbamátu, vzniká metabolit (2-amino-1*H*-benzimidazol-5-yl)(4-fluorofenyl)metadon. Tato metabolická cesta FLU je typická pro prasata. Oba metabolity FLU poté přecházejí na 2-amino- α -(4-fluorfenyl)-1*H*-benzimidazol-5-metanol (web 11). Metabolické cesty FLU jsou zobrazeny na schématu (Obr. č. 5).



Obr. č. 5 Metabolické cesty FLU – redukce a hydrolýza, následná N-metylace (1) - methyl-N-[6-(4-flubenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát (FLU); (2) - metyl[5-[(fluorofenyl)hydroxymetyl]-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát; (3) - (2-amino-1H-benzimidazol-5-yl)(4-fluorofenyl)metanol; (4) - 2-amino- α -(4-fluorofenyl)-1H-benzimidazol-5-metanol; (5) – 2-amino- α -(4-fluorofenyl)-1-metyl-1H-benzimidazol-5-metanol (Van Leemput et al. 1991, upraveno)

2.3.4 Toxicita

FLU byl testován, zda má vliv na fertilitu a teratogenitu u vybraných druhů zvířat. U těchto druhů byl dobře tolerován. Nepůsobil na fertilitu ani nezpůsobil teratogenitu při studii u prasat. U bažantů neměl vliv plodnost. U slepic neměl vliv na reprodukční schopnosti ani neovlivňoval kvalitu vajec. U studie na potkanech nebyla prokázána embryotoxicita, fetotoxicita ani teratogenita. U psů FLU neměl žádný efekt na jejich fertilitu a reprodukční schopnosti (web 11). Obecně benzimidazoly mají nízkou toxicitu u savců. To lze vysvětlit tím, že mají nižší afinitu k savčímu tubulinu než k tubulinu helmintů (Lacey 1988).

2.3.5 Protinádorová účinnost

Mechanismem působení FLU je změna struktury mikrotubulů a inhibice tubulinové polymerizace. FLU se váže na molekulu tubulinu na stejném místě jako kolchicin, ale na jiném než vinca alkaloidy. Vinca alkaloidy inhibují polymerizaci mikrotubulu vazbou na β -tubulin v blízkosti vazebného místa guanosintrifosfátu. Kolchicin inhibuje polymerizaci mikrotubulu vazbou na rozhraní α/β tubulinového heterodimeru. Právě pro tyto vlastnosti byl FLU preklinicky testován na buněčných liniích leukémie a myelomu. Díky rozdílnému mechanismu by mohl být FLU používán do kombinace s vinca alkaloidy k posílení účinku v této léčbě (Spanguolo et al. 2010).

Protinádorové účinky FLU byly dále testovány na buňkách odvozených od nádorů střeva. FLU inhiboval růst těchto buněk zastavením buněčného cyklu v G2/M fázi. FLU také v tomto buněčném modelu potencoval účinek paklitaxelu (Králová et al. 2013).

Rakovinné buňky prsní tkáně byly také testovány na účinnost FLU. FLU inhiboval proliferaci prsních rakovinných buněk *in vitro* a potlačoval nádorový růst *in vivo*. Indukoval buněčnou diferenciaci, potlačoval buněčnou migraci a povedlo se mu překonat rezistenci prsních nádorových buněk. FLU inhiboval polymerizaci tubulinu, což vedlo k zablokování buněčného cyklu prsních nádorových buněk ve fázi G2/M. Léčba FLU výrazně posílila cytotoxický efekt fluorouracilu a doxorubicinu na buňky karcinomu prsu (Hou et al. 2015).

FLU představuje potenciální možnost léčby neuroblastomu. Neuroblastom je nejčastější solidní nádor s extrakraniální lokalizací u dětí. FLU ve studii *in vitro* prokazuje

aktivitu jak na primární neuroblastom, tak i na buňky neuroblastomu se získanou rezistencí (Michaelis et al. 2015).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- Zjistit, zda FLU snižuje proliferaci buněk orálního skvamózního karcinomu a stanovit hodnoty EC_{50} . Porovnat účinek FLU na nádorové buňky s jeho účinkem na normální gingivální fibroblasty.
- Zjistit, zda FLU ovlivňuje migraci a adhezi buněk orálního skvamózního karcinomu a normálních gingiválních fibroblastů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Buněčná linie DOK

Zdroj: The European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Katalogové číslo: 94122104

Původ: lidský orální skvamózní karcinom ze hřbetní části jazyka

Morfologie: epiteliální

Kultivace: médium D-MEM + 2 mM glutamin + 5 µg/ml hydrokortison + 10% FBS, 5% CO₂, 37 °C

Pasážování: 2 x týdně za použití trypsinu 0,25% + EDTA, suspenze se ředí v poměru 1 : 5

4.1.2 Buněčná linie PE/CA-PJ15

Zdroj: The European Collection of Cell Cultures (ECACC)

Katalogové číslo: 96121230

Původ: lidský orální skvamózní karcinom

Morfologie: podobná epiteliální, změněná

Kultivace: médium D-MEM + 2 mM glutamin + 10% FBS, 5% CO₂, 37 °C

Pasážování: 2 x týdně za použití trypsinu 0,25% + EDTA, suspenze se ředí v poměru 1 : 10

4.1.3 Buněčná linie GF

Zdroj: Ústav lékařské biologie a genetiky, LF HK

Původ: gingiva zdravého pacienta

Morfologie: fibroblasty

Kultivace: D-MEM + 10% FBS, 5% CO₂, 37 °C

Pasážování: 1 x za 10 dní za použití trypsinu 0,05% + EDTA, ředění suspenze v poměru 1 : 5

4.2 Chemikálie

- Destilovaná voda
- D-MEM (Dulbeccoovo modifikované Eagleovo médium, Sigma Aldrich)
- DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich)
- FBS (Fetální bovinní sérum, Gibco)
- Flubendazol (Toronto Research Chemicals, Inc.)
- Kolagen (z lidské placenty, Sigma Aldrich)
- PBS bez iontů Ca^{2+} a Mg^{2+}
- Penicilin/Streptomycin (Gibco)
- Trypsin 0,05% + EDTA (Sigma Aldrich)
- WST-1 (4-[3(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát) (Roche)

4.3 Přístrojové vybavení

- Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience
- Centrifuga Allegra™ X-12 R Centrifuge, Beckman Coulter
- Invertovaný mikroskop CK2, Olympus
- Laminární box MSC – ADVANTAGE 1.2, Thermo Scientific
- Laminární box Telstar Bio-II-A/G
- Lednice – BRANDT Apollo
- Pipetboy Swiftpet, Thermo Scientific
- Počítač ASUS
- Počítač HP
- Spektrofotometr Tecan infinite M200pro, Tecan
- Termostat CO_2 Incubateur IG 150, JOUAN
- Termostat Sanyo CO_2 incubator MCO-18 AIC (UV), Sanyo
- Vodní lázeň Memmert
- Vortex MS2 Minishaker, IKA
- xCELLigence RTCA Analyzer, Boehringer Mannheim - Roche

4.4 Spotřební materiál

- 96-jamkové transparentní mikrotitrační destičky s víčkem, Nunc, Thermo Scientific
- Automatické pipety a jednorázové špičky, FinnpiPETTE
- E-plates, Boehringer, Mannheim - Roche
- Injekční stříkačka, Sartorius
- Invertovaný mikroskop, CK2, Olympus
- Korýtka
- Kultivační láhve s filtrem, Nunc, Thermo Scientific
- Lahve pro média, Pyrex
- Mikrozkušavky Eppendorf
- Odměrné sklo – odměrné válce, pipety, kádinky
- Petriho misky
- Počítací komůrky Cellometer Counting Chambers, Nexcelom Bioscience
- Rukavice – latex, nitro
- Stojánky na zkumavky

4.5 Pasážování buněk

Většina buněčných kultur roste adherentně (přisedle), při svém růstu postupně pokrývají celé dno kultivační láhve dle své růstové rychlosti. Vytváří tzv. monovrstvu. Poté, co dosáhnou 100% konfluence, již nemohou dále proliferovat, a je tedy nezbytné buňky pasážovat. Při pasáži dojde k přenesení pouze části buněčné kultury z původní kultivační láhve do nové, kde buňky získávají živiny z nového média a mohou zase růst (Čedíková et al. 2012).

Postup při pasáži buněk:

- Na vodní lázni byl zahřát roztok kultivačního media a roztok trypsinu na 37 °C.
- Buňky v kultivační lahvi byly vyndány z inkubátoru a prohlédnuty pod invertovaným mikroskopem.
- Staré médium bylo vylito do sterilní odpadní láhve.
- Do kultivační lahve bylo přidáno 1,5 ml trypsinu a buňky byly kývavým pohybem promývány. Slití do odpadní láhve. Promývání bylo opakováno 3x. Při posledním promývání bylo v lahvi necháno nepatrné množství trypsinu, aby se vytvořil tenký film.
- Buňky se nechaly inkubovat 2-5 minut.
- Poté bylo zkontrolováno, zda se buňky pouštějí ode dna kultivační láhve.
- Poté byly uvolněné buňky opláchnuty a resuspendovány médiem (5-10 ml).
- Byla odebrána část suspenze do nové lahve a naředěna množstvím čerstvého média dle typu buněčné linie.
- Láhev byla popsána datem, typem buněčné linie a číslem pasáže a vložena do inkubátoru.

4.6 Počítání buněk pomocí přístroje Cellometer Auto T4

Před dalším postupem je potřeba zjistit koncentraci buněk v suspenzi připravené k pasáži. K počítání buněk se použije přístroj Cellometer Auto T4, Nexcelom Bioscience. Tento přístroj využívá světlé zobrazovací pole a software na rozpoznání buněk, který rychle a přesně identifikuje a počítá jednotlivé buňky. Přístroj automaticky vypočítá a

nahlásí počet, koncentraci a průměr buněk a jejich procentuální životaschopnost (web 12).

Postup při měření koncentrace buněk:

- Připravená suspenze byla pečlivě promíchána.
- Do počítací komůrky pro přístroj Cellometer Auto T4 bylo napipetováno 20 μ l buněčné suspenze.
- Komůrka byla vložena do analyzátoru.
- Bylo provedeno měření.

4.7 Příprava pracovních roztoků FLU

Pro pokusy byly připraveny pracovní roztoky FLU v DMSO o koncentracích 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM.

Postup:

- Zásobní roztok FLU o koncentraci 10 mM se nechal volně na vzduchu rozmraznout.
- Mikrozkušavky byly popsány dle jednotlivých koncentrací.
- 10 mM roztok zásobního FLU byl naředěn pomocí DMSO dle tabulky č. 1.
- Připravené pracovní roztoky byly uchovávány bez přístupu světla při 4 °C.

Tabulka č. 1 – Pracovní roztoky FLU – jednotlivé koncentrace

Koncentrace pracovních roztoků FLU	Množství přidaného FLU (o koncentraci uvedené v závorce)	Množství přidaného DMSO
5 mM	100 μ M (10 mM)	100 μ l DMSO
1 mM	40 μ M (5 mM)	160 μ l DMSO
0,5 mM	100 μ M (1 mM)	100 μ l DMSO
0,1 mM	40 μ M (0,5 mM)	160 μ l DMSO
0,05 mM	100 μ M (0,1 mM)	100 μ l DMSO
0,01 mM	40 μ M (0,5 mM)	160 μ l DMSO

4.8 Testování vlivu FLU na proliferaci buněk

4.8.1 Ovlivnění buněčných linií v médiu se sérem

Testované buněčné linie byly ovlivněny jednotlivými koncentracemi pracovních roztoků FLU a poté byly inkubovány 72 hodin.

Postup:

Pondělí:

- Buňky byly nasazeny do 96-jamkových destiček, 200 μ l buněčné suspenze o koncentraci 6000 buněk/jamka
- Buňky byly inkubovány 24 hodin za podmínek 37 °C a 5% CO₂.

Úterý:

- Na vodní lázni bylo zahřáto kultivační médium na 37°C. Pracovní roztoky FLU se nechaly rozmraznout. Byl připraven roztok DMSO.
- Byla připravena a popsána korýtka pro naředění pracovních roztoků.
- Bylo připraveno médium s různými koncentracemi FLU. Pracovní roztoky FLU v DMSO byly médiem ředěny 1000x (viz tabulka č. 2), tedy 5 μ l pracovního roztoku FLU v DMSO a 4995 μ l média.
- Dále bylo připraveno médium 0,1% DMSO, tedy 5 μ l DMSO a 4995 μ l média.
- Destičky byly vyndány z inkubátoru a bylo z nich odsáto staré médium.
- Do jamek bylo napipetováno 200 μ l média s FLU dle Tabulky č. 3.
- Do sloupce 3 byl napipetováno médium 0,1% DMSO (kontrola).
- Destičky byly vloženy zpět do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).

Tabulka č. 2 – Výsledná koncentrace FLU v jamce

Pracovní roztok FLU v DMSO	Koncentrace FLU v jamce
10 mM	10 μ M
5 mM	5 μ M
1 mM	1 μ M
0,5 mM	0,5 μ M
0,1 mM	0,1 μ M
0,05 mM	0,05 μ M
0,01 mM	0,01 μ M

Koncentrace DMSO je ve všech jamkách 0,1%.

Tabulka č. 3 – Rozložení koncentrací FLU na 96-jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
B	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
C	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
D	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
E	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
F	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
G	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		
H	Bl		K	0,01 μ M	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M		

Bl.....slepý vzorek (pro odečet absorbance pozadí)

K.....kontrola, 0,1% DMSO v médiu

4.8.2 Ovlivnění buněčných linií v médiu bez séra

Testované buněčné linie byly ovlivněny jednotlivými koncentracemi pracovních roztoků FLU a poté byly inkubovány 24 hodin.

Postup:

- Nasazení buněčných linií do 96-jamkových destiček, 200 μ l buněčné suspenze o koncentraci 40000 buněk/jamka
- Buňky byly inkubovány 4 hodiny za podmínek 37 °C a 5% CO₂, konstantní vlhkost 95%.
- Na vodní lázni bylo zahřáto kultivační médium bez séra na 37°C. Pracovní roztoky FLU se nechaly pomalu rozmraznout. Byl připraven roztok DMSO.
- Byla připravena a popsána korýtkka pro naředění pracovních roztoků.
- Bylo připraveno médium s FLU. Pracovní roztoky FLU v DMSO byly ředěny 1000x médiem bez séra. Výsledné koncentrace: 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M.
- Dále bylo připraveno médium s 0,1% DMSO.
- Destičky byly vyndány z inkubátoru a bylo z nich odsáto původní médium.
- Do jamek bylo napipetováno 200 μ l média s FLU dle Tabulky č. 3.
- Do sloupce 3 bylo napipetováno médium s 0,1% DMSO.
- Destičky byly vloženy na 24 hod zpět do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂, 95% vlhkost).

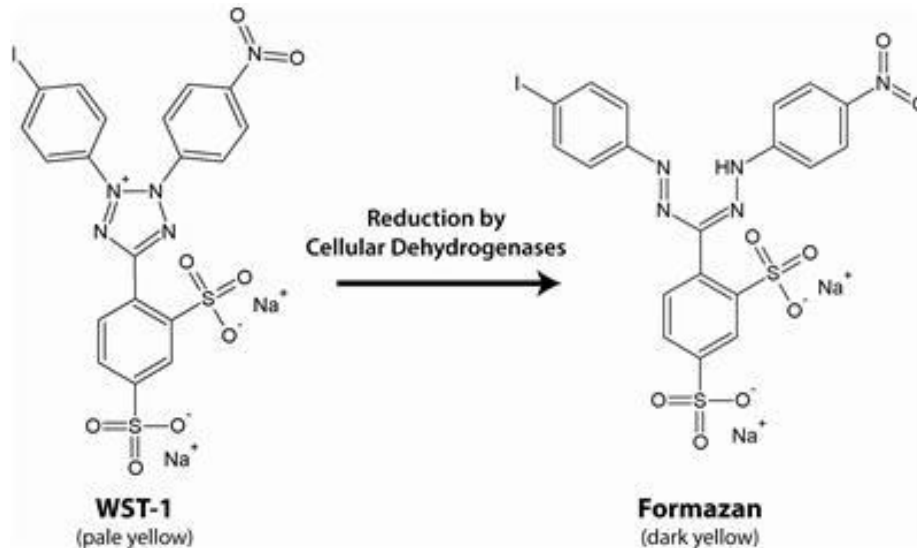
4.9 Stanovení počtu živých buněk testem WST-1

Test WST-1 využívá ke stanovení buněčné proliferace a životnosti buněk. Stejně jako další podobné testy - MTT, MTS, XTT- je WST-1 hojně používaný v buněčné biologii. WST-1 je typickým testem na měření metabolické aktivity buněk (Slabý et al. 2015).

Toto kvantitativní stanovení životaschopných buněk je založeno na štěpení nerozpustné tetrazoliové soli WST-1, chemickým složením 4-[3(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát. Redukcí vzniká tmavě zbarvený formazan, který je ve vodě rozpustný (Obr. č. 4). K redukci dochází v živých buňkách působením mitochondriální reductasy.

Stanovení se provádí na 96-jamkové destičce. Po dvouhodinové inkubaci (standardní inkubační doba) se pak měří na spektrofotometru absorbance vzniklého

produktu. Hodnota absorbance roztoku odpovídá intenzitě metabolismu buněk, tedy počtu živých buněk (Michalová et al. 2008).



Obr. č. 4 – Princip WST-1 testu, tj. redukce tetrazoliové soli WST-1 na Formazan

(zdroj: G-biosciences)

Postup měření:

- Byl připraven pracovní roztok WST-1. Na jednu 96-jamkovou destičku bylo potřeba připravit 8 ml roztoku. WST-1 bylo médiem naředěno 20x, tj. 400 μ l WST-1 a 7,6 ml média. Médium s WST-1 bylo dobře promícháno.
- Destičky s buňkami byly vyndány z inkubátoru a bylo z nich odstraněno staré médium s FLU.
- Do šesti jamek (B-G) ve sloupcích 1, 3 – 10 bylo napipetováno 100 μ l média s WST-1.
- Zapnul se počítačový program a spektrofotometr (Tecan infinite M200pro). Byla změřena absorbance v čase 0 hodin (450 nm, referenční vlnová délka 650 nm).
- Po změření byly destičky dány na 2 hodiny do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂, 95% vlhkost).

- Po dvou hodinách byly destičky vyndány z inkubátoru a byla změřena absorbance v čase 2 hodiny (450 nm, referenční vlnová délka 650 nm).

4.10 Analýza vlivu FLU na migraci a adhezi buněk

Ke sledování vlivu FLU na migraci a adhezi buněk byl využit xCelligence analyzátor (Real-time Cell Analyzer Dual Purpose). Tato technologie je založena na měření elektrické impedance. Používá zvláštní elektronické 16-ti jamkové kultivační destičky pro sledování buněčné proliferace a adheze, pro testy buněčné migrace se používají elektronické destičky na principu Boydenovy komůrky. Umožňuje sledovat buněčnou proliferaci, adhezi, migraci a invazivitu v reálném čase. Buňky se během testu monitorují nepřetržitě a ne až po skončení experimentu (Kovaříková et al. 2014). Tato technologie navíc šetří používání drahých reakčních činidel, která se používají u konvenčních buněčných analýz (Urcan et al. 2010).

Výstupem z měření v tomto systému je buněčný index (CI). Jedná se o bezrozměrnou veličinu. K výpočtu této hodnoty se používá vztah: $CI = (Z_i - Z_0)/15 W$; Z_i – impedance v daném okamžiku měření, Z_0 – impedance pozadí (médium před přidáním testovaných buněk) (Kovaříková et al. 2014).

4.10.1 Stanovení vlivu FLU na migraci buněk

A. Příprava pracovního roztoku FLU

- Testované koncentrace: 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M
Kontrolní roztok 1% DMSO
Pozitivní kontrola – v dolních jamkách jen sérové médium, v horních jamkách jen bezsérové médium
Negativní kontrola – v dolních i horních jamkách jen bezsérové médium
- Pracovní roztok FLU pro dolní komůrky: 999 μ l média se sérem + 1 μ l zásobního roztoku FLU dle koncentrační řady nebo 1 μ l DMSO
- Pracovní roztok FLU pro horní komůrky: 999 μ l média bez séra + 1 μ l zásobního roztoku FLU dle koncentrační řady nebo 1 μ l DMSO
- Mikrozukmavky s pracovními roztoky byly dobře promíchány.

B. Příprava destiček

- Do dolních jamek bylo napipetováno 175 μl pracovního roztoku FLU v médiu se sérem dle rozpisu viz. Tabulka č. 4.
- Do horních jamek se bylo napipetováno 150 μl pracovního roztoku FLU v bezsérovém médiu.
Horní a dolní část destičky byly zamknuty dohromady a z horních jamek bylo odebráno 100 μl média.
- Takto připravené destičky byly vloženy na 1 hodinu do inkubátoru.
- V počítačovém programu byly nastaveny parametry měření.
- Bylo změřeno pozadí destiček.

C. Příprava buněčné suspenze

- Byla připravena buněčná suspenze v médiu bez séra o hustotě buněk 4×10^5 buněk/ml.
- K 1 ml buněčné suspenze byl přidán 1 μl zásobního roztoku FLU dle koncentrační řady nebo 1 μl DMSO.
- Do horních jamek destičky bylo napipetováno 100 μl připravené buněčné suspenze s FLU.
- Připravené destičky byly vloženy na půl hodiny do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂, 95% vlhkost).

D. Měření na přístroji RTCA

- Po půl hodině byly destičky vloženy do přístroje a provedlo se měření, snímání probíhalo v 30 minutových intervalech po dobu 24 hodin.

Tabulka č. 4 Rozpis testovaných koncentrací FLU a kontrol v 16-jamkových destičkách

D1		1	2
A	h	DMSO 0,1%	
	d	sérum	
B	h		
	d		
C	h	FLU 50 nM	
	d		
D	h		
	d		
E	h	FLU 100 nM	
	d		
F	h		
	d		
G	h	FLU 250 nM	
	d		
H	h		
	d		

D2		1	2
A	h	FLU 500 nM	
	d		
B	h		
	d		
C	h	FLU 1 μ M	
	d		
D	h		
	d		
E	h	FLU 5 μ M	
	d		
F	h		
	d		
G	h		
	d		
H	h		
	d		

4.10.2 Stanovení vlivu FLU na adhezi buněk

Postup:

1. den

- Příprava roztoku kolagenu – kolagen byl naředěn destilovanou vodou na koncentraci 20 μ g/ml
- Do každé jamky 16-jamkové destičky bylo napipetováno 50 μ l roztoku kolagenu, destička byla ponechána v laminárním boxu 1 hodinu v klidu stát.
- Přebytek roztoku kolagenu byl opatrně odsát.
- Destička byla uložena do druhého dne v inkubátoru.

2. den

- Byla připravena buněčná suspenze v médiu bez séra o hustotě 4 x 10⁵ buněk/ml. Tedy 40 000 buněk/jamka.

- Byla připravena koncentrační řada:

Testované koncentrace FLU: 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M

Kontrolní roztok 1% DMSO.

K 1 ml buněčné suspenze byl přidán 1 μ l zásobního roztoku FLU dle koncentrační řady nebo 1 μ l DMSO.

- V počítačovém programu byly nastaveny parametry měření.
- Do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l bezsérového média s FLU dle testované koncentrační řady nebo s 0,1% DMSO.
- Bylo změřeno pozadí destiček (background).
- Do jamek bylo napipetováno 100 μ l připravené buněčné suspenze s FLU dle koncentrační řady nebo 0,1% DMSO.
- Destička byla vložena do přístroje a bylo provedeno měření, snímání probíhalo v 5 minutových intervalech po dobu 5 hodin.

4.11 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení

Všechny pokusy byly opakovány třikrát, kromě testu buněčné adheze s linií GF, který byl opakován dvakrát. Grafy pro hodnocení proliferace buněk metodou WST-1 byly vytvořeny v programu Microsoft Excel 2013. Grafy pro hodnocení výsledků získaných analyzátozem xCELLigence byly vytvořeny přímo v softwaru RTCA DP a v programu GraphPad Prism 6. Statistické vyhodnocení bylo provedeno také v programu GraphPad Prism 6 za pomoci metody ANOVA (one-way analysis of variance). Hodnoty EC₅₀ byly vypočítány v programu GraphPad Prism 6.

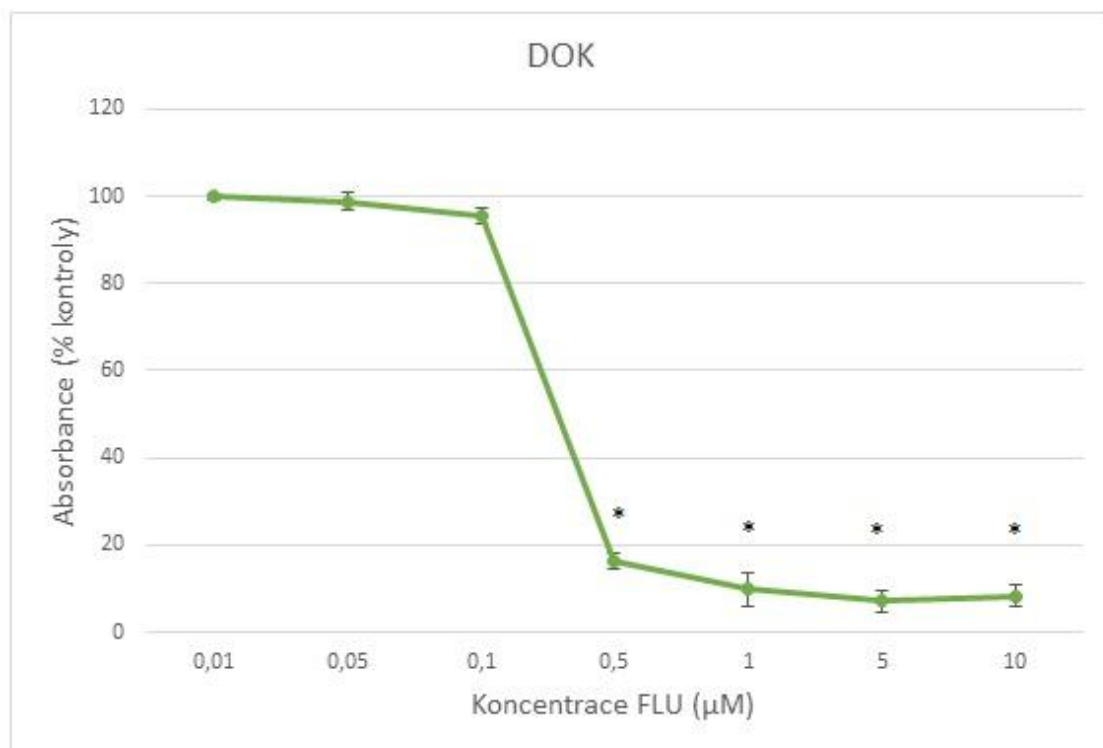
5. VÝSLEDKY

5.1 Testování vlivu FLU na proliferaci buněk pomocí testu WST-1

Testem WST-1 jsme sledovali vliv FLU na metabolickou aktivitu buněčných linií DOK, PE/CA-PJ15 a GF. Buňky byly ovlivněny koncentracemi FLU 0,01 - 10 μM . Měření probíhalo za 72 hodin po ovlivnění.

5.1.1 Buněčná linie DOK v médiu se sérem

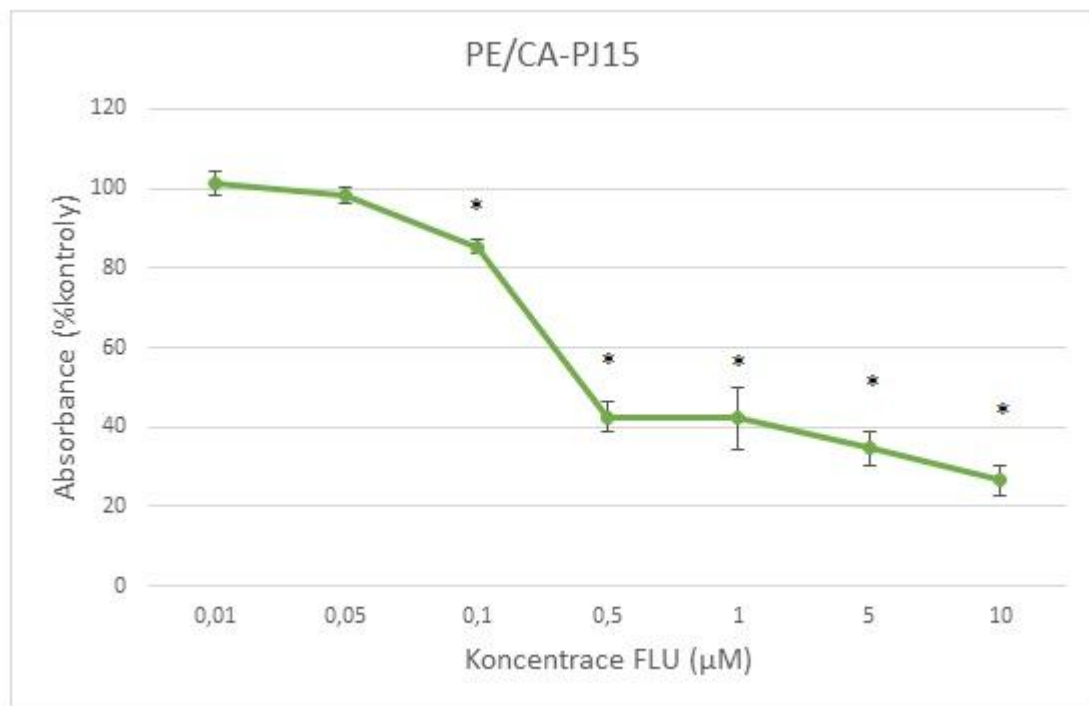
V grafu (Obr. č. 5) z vyhodnocených výsledků lze vidět vliv zvyšující se koncentrace FLU na proliferaci buněčné linie DOK. Počet živých buněk klesal v závislosti na koncentraci FLU.



Obr. č. 5 Test WST-1 – vliv FLU na proliferaci buněčné linie DOK (* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$)

5.1.2 Buněčná linie PE/CA-PJ15 v médiu se sérem

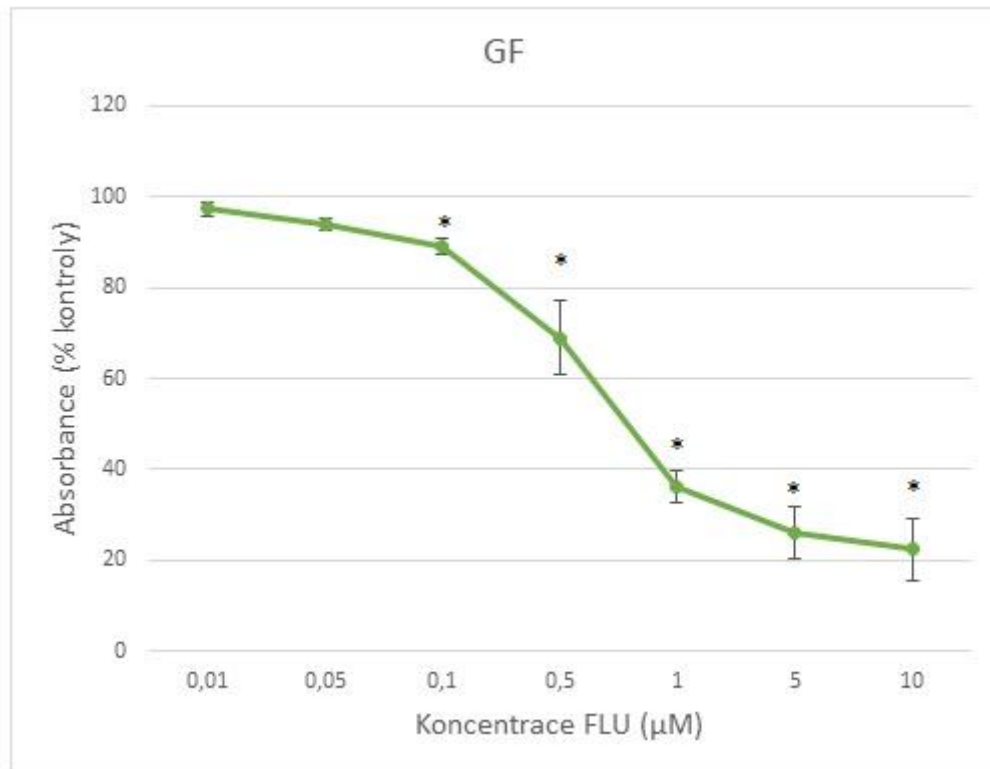
V grafu (Obr. č. 6) jsou uvedeny výsledky vlivu FLU na proliferaci buněčné linie PE/CA-PJ15. Je zde patrné snížení počtu živých buněk v závislosti na zvyšující se koncentraci FLU.



Obr. č. 6 Test WST-1 – vliv FLU na proliferaci buněčné linie PE/CA-PJ15 (* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$)

5.1.3 Buněčná linie GF v médiu se sérem

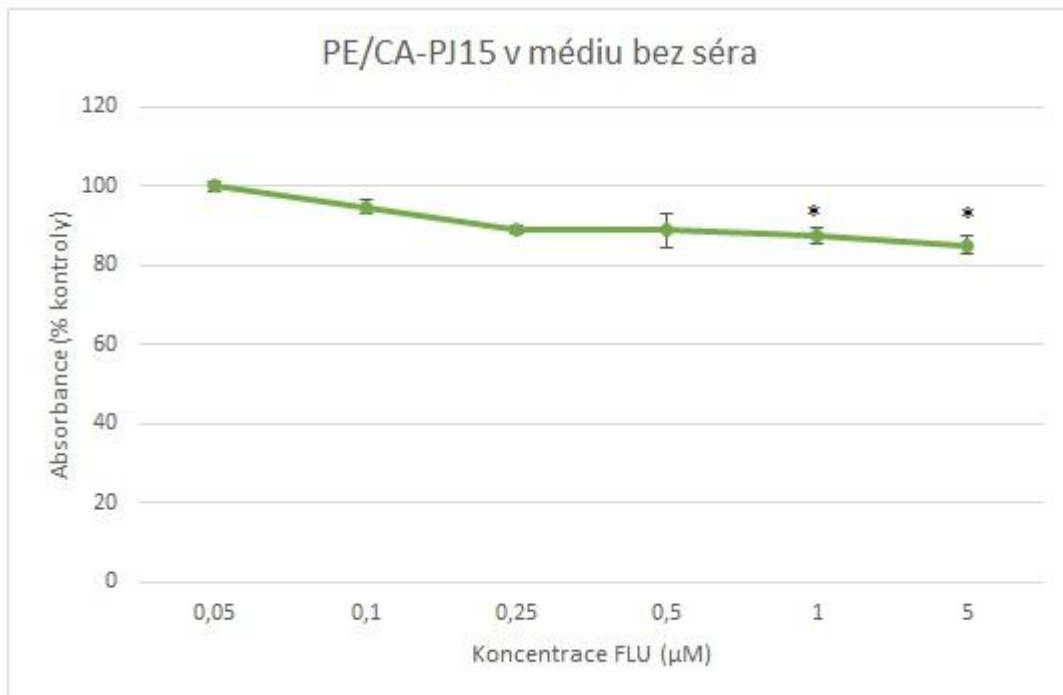
V grafu (Obr. č. 7) je zaznamenán vliv FLU na buněčnou proliferaci linie GF. V závislosti na zvyšující se koncentraci FLU klesá počet živých buněk.



Obr. č. 7 Test WST-1 – vliv FLU na proliferaci buněčné linie GF (* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$)

5.1.4 Buněčná linie PE/CA-PJ15 v médiu bez séra

Na buněčné linii PE/CA-PJ15 byl rovněž sledován vliv FLU na proliferaci buněk v médiu bez séra. Výsledky z tohoto měření jsou uvedeny v grafu (Obr. č. 8). Na grafu je vidět, že počet živých buněk ovlivněných koncentracemi FLU 0,05 – 5 μM v čase 24 hodin neklesl pod hranici 80%.



Obr. č. 8 Test WST-1 – vliv FLU na proliferaci buněčné linie PE/CA-PJ15 v médiu bez séra (* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$)

5.2 Stanovení hodnoty EC₅₀

V programu GraphPad Prism 6 byly z naměřených dat vypočítány u jednotlivých buněčných linií hodnoty EC₅₀ v čase 72 hod po ovlivnění FLU. Pro jejich výpočet byly použity průměrné hodnoty ze tří nezávislých měření. Výsledné hodnoty EC₅₀ jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5 Výsledné hodnoty EC₅₀ pro buněčné linie DOK, PE/CA-PJ15 A GF

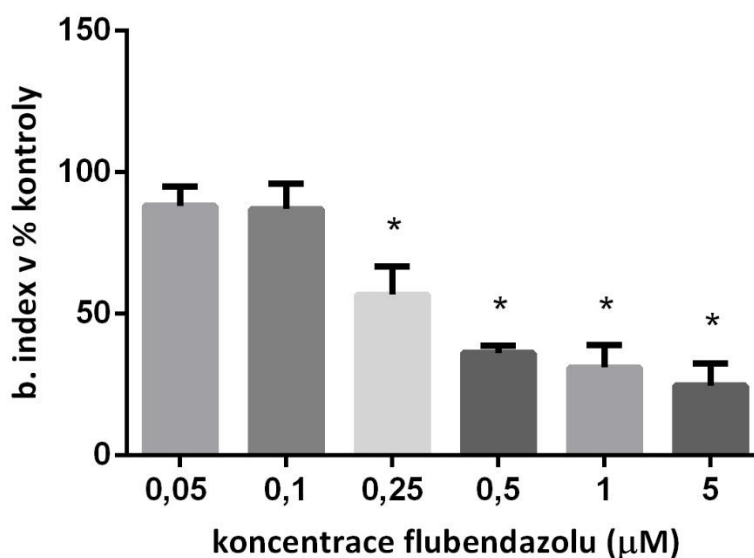
	EC ₅₀	SD (%)
DOK	0,21 μM	0,5
PE/CA-PJ15	0,20 μM	0,8
GF	0,56 μM	5,7

5.3 Vliv FLU na migraci buněk

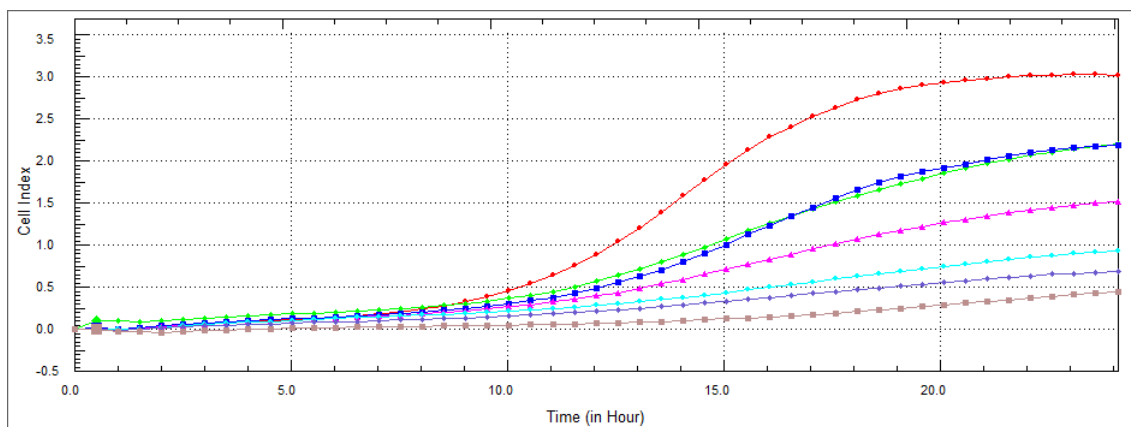
Na analyzátoru xCELLigence bylo provedeno měření změn buněčného indexu vlivem FLU u buněčných linií PE/CA-PJ15 a GF. Buněčné linie byly ovlivněny koncentrační řadou FLU 0,05 – 5 μM . Snímání změn buněčného indexu probíhalo v 30 minutových intervalech po dobu 24 hodin. Výsledné hodnoty buněčného indexu po 24-hodinové inkubaci jsou uvedeny v procentech kontroly ve sloupcových grafech (Obr. č. 9 a 11), jde o průměrné hodnoty ze tří měření. Dále jsou zobrazeny záznamy z xCELLigence RTCA analyzátoru (Obr. č. 10 a 12).

5.3.1 Vliv FLU na migraci buněčné linie PE/CA-PJ15

Na grafu (Obr. č. 9) lze vidět, že se zvyšující se koncentrací FLU docházelo k poklesu hodnot buněčného indexu u buněčné linie PE/CA-PJ15 po 24-hodinové inkubaci. Stoupající koncentrace FLU vedla k postupnému snížení migrace buněk nádorové linie PE/CA-PJ15.



Obr. č. 9 Vliv FLU na buněčnou migraci linie PE/CA-PJ15 v čase 24h (* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$)

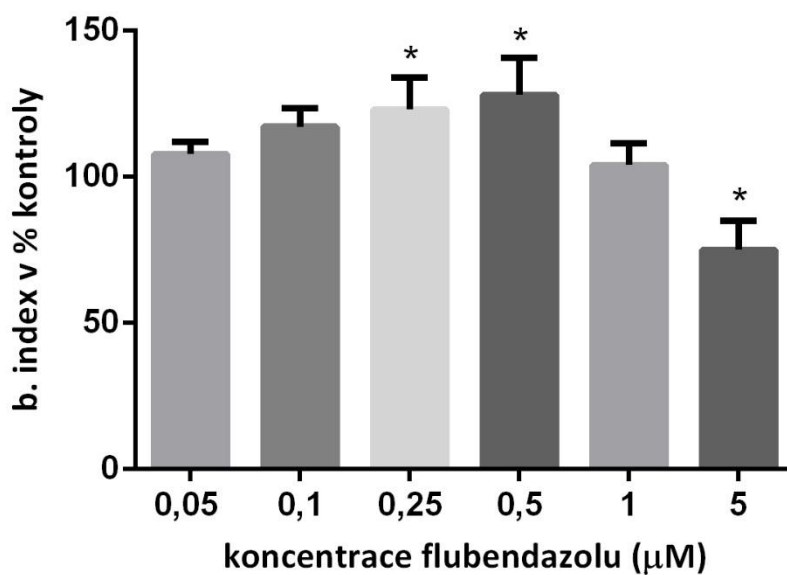


Kontrola 0,05 μM 0,1 μM 0,25 μM 0,5 μM 1 μM 5 μM

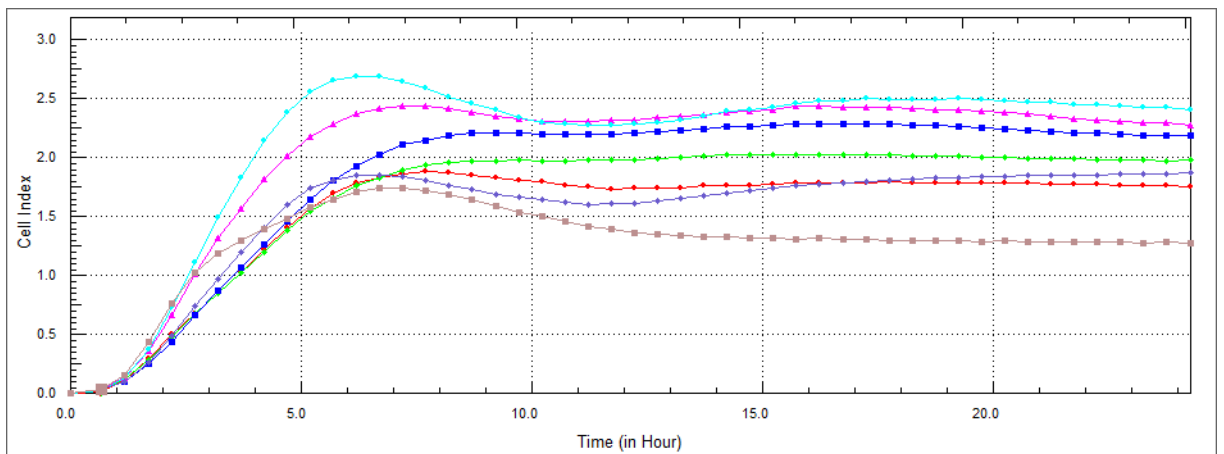
Obr. č. 10 Vliv FLU na migraci linie PE/CA-PJ15 - záznam z xCELLigence analyzátoru (24-hodinové monitorování)

5.3.2 Vliv FLU na migraci buněčné linie GF

Na grafu (Obr. č. 8) lze vidět, že FLU v nižších koncentracích vedl k mírnému zvyšování hodnot buněčného indexu buněčné linie GF po 24-hodinové inkubaci. Docházelo tedy ke stimulaci migrace buněčné linie GF. FLU v koncentraci 5 μM naopak migraci gingiválních fibroblastů inhiboval.



Obr. č. 11 Vliv FLU na buněčnou migraci linie GF v čase 24h (* statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$)



Kontrola 0,05 μM 0,1 μM 0,25 μM 0,5 μM 1 μM 5 μM

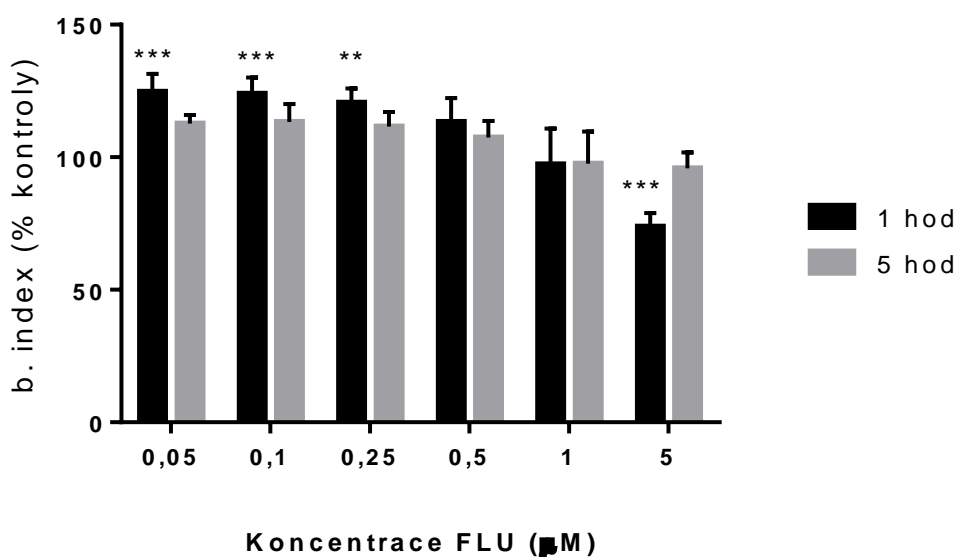
**Obr. č. 12 Vliv FLU na migraci linie GF - záznam z xCELLigence analyzátoru
(24-hodinové monitorování)**

5.4 Vliv FLU na adhezi buněk

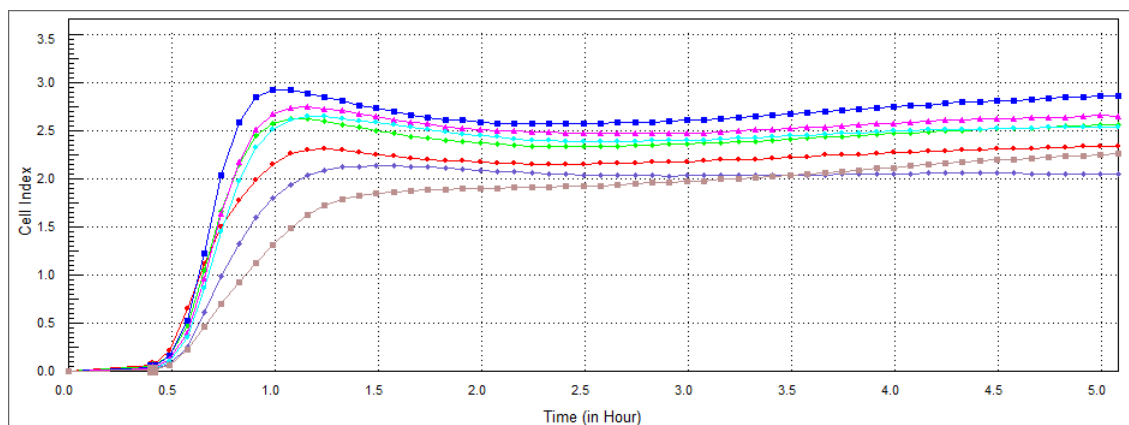
Na analyzátoru xCELLigence bylo provedeno měření adheze buněk po ovlivnění FLU o koncentracích 0,05 – 5 μM . Buněčné linie PE/CA-PJ15 a GF byly snímány v 5 minutových intervalech po dobu 24 hodin. Výsledné hodnoty buněčného indexu naměřené v časech 1 hodina a 5 hodin jsou uvedeny v procentech kontroly ve sloupcových grafech (Obr. č. 13 a 15). Dále jsou zobrazeny záznamy z xCELLigence RTCA analyzátoru (Obr. č. 14 a 16).

5.4.1 Vliv FLU na adhezi buněčné linie PE/CA-PJ15

Na grafu (Obr. č. 13) je vidět, že po 1-hodinové inkubaci FLU v nižších koncentracích zvyšoval adhezi buněčné linie PE/CA-PJ15. Pouze u koncentrace 5 μM FLU došlo ke snížení adheze buněk. V intervalu 5 hod jsou už rozdíly nevýznamné.



Obr. č. 13 Vliv FLU na adhezi buněčné linie PE/CA-PJ15 v časech 1 hod a 5 hod
(statisticky významný rozdíl proti kontrole: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

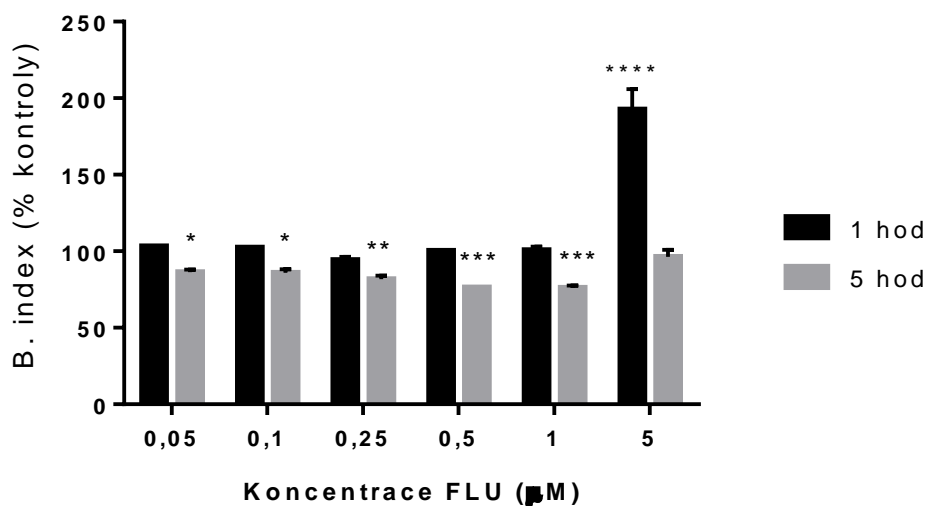


Kontrola 0,05 μM 0,1 μM 0,25 μM 0,5 μM 1 μM 5 μM

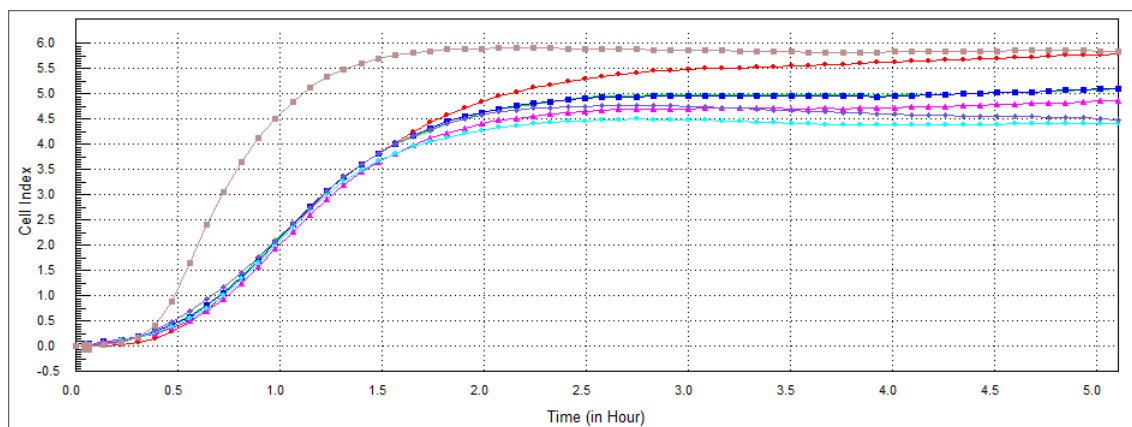
Obr. č. 14 Vliv FLU na adhezi linie PE/CA-PJ15 - záznam z xCELLigence analyzátoru (5-hodinové monitorování)

5.4.2 Vliv FLU na adhezi buněčné linie GF

Z grafu (Obr. č. 15) vyplývá, že v průběhu měření docházelo k postupnému snižování adheze buněčné linie GF u koncentrací FLU 0,05 – 1 μM . Naopak u nejvyšší koncentrace FLU (5 μM) došlo v čase 1 hod k výraznému zvýšení adheze.



Obr. č. 15 Vliv Flu na adhezi buněčné linie GF v časech 1 hod a 5 hod (statisticky významný rozdíl proti kontrole: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)**



Kontrola 0,05 μM 0,1 μM 0,25 μM 0,5 μM 1 μM 5 μM

Obr. č. 16 Vliv FLU na adhezi linie GF - záznam z xCELLigence analyzátoru
(5-hodinové monitorování)

6. DISKUZE

Výskyt karcinomu dutiny ústní je celosvětovým problémem a má souvislost s nezdravým životním stylem. Toto onemocnění se objevuje častěji u mužů ve středním věku než u jejich vrstevnic ženského pohlaví. V západním světě je hlavním rizikovým faktorem kouření tabákových výrobků a nadměrná konzumace alkoholických nápojů. V rozvojových zemích, kde lidé přímo žvýkají tabák nebo betelové ořechy, je riziko vzniku nádorového onemocnění dokonce ještě vyšší. U tohoto onemocnění mají velkou roli preventivní opatření. Pravidelné návštěvy u zubního lékaře mohou pomoci k včasnému odhalení nemoci. Důležitá je samozřejmě každodenní pečlivá ústní hygiena. V zemích, kde je dostupnost lékařské péče hůře dostupná, je pravděpodobnost včasného zachytu onemocnění nižší. Léčba karcinomu dutiny ústní je především chirurgická, kdy dochází k vyoperování nádoru, často bývá doplněna radioterapií. Operaci může předcházet neoadjuvantní chemoterapie, která zmenší velikost nádoru a usnadní operaci. Po operaci následuje adjuvantní terapie, která má za úkol eliminovat zbylé nádorové buňky a slouží jako prevence návratu onemocnění (web 8).

V této práci byl studován vliv FLU na nádorové buňky. V sedmdesátých letech minulého století FLU vyvinuli ve farmaceutické firmě Janssen. FLU je heterocyklická aromatická sloučenina. Patří mezi benzimidazoly a v klinické praxi se používá při léčbě helmintóz lidí i zvířat (Mackenzie a Geary 2011). Výhodou léčiv, která byla již schválena pro léčbu jiných nemocí, než jsou nádorová onemocnění, je to, že u nich bylo provedeno testování toxicity na zvířatech a lidech (Spagnuolo et al. 2010). To je výhoda právě i námi testovaného FLU.

Mechanismem účinku FLU a dalších benzimidazolů je jejich vazba na proteinové tubulinové subjednotky mikrotubulů. To vede k narušení struktury a funkce mikrotubulů v buňkách helminta. Také působí na narušení transportu a metabolismu glukózy, což vede k energetickému kolapsu a odumírání helminta.

Schopnost benzimidazolů narušovat mikrotubuly a transport glukózy v buňkách vede teoreticky k možným protinádorovým účinkům. Právě mikrotubuly mají velmi důležitou roli při proliferaci a migraci eukaryotických buněk včetně invaze a metastazování nádorových buněk (Králová et al. 2013). Testy potenciálního antiproliferativního účinku FLU byly provedeny na buněčných liniích leukemie a myelomu (Spagnuolo et al. 2010), neuroblastomu (Michaelis et al. 2015), karcinomu

prsu (Hou et al. 2015) a kolorektálního karcinomu (Králová et al. 2013). Tyto studie prokazují možné protinádorové působení FLU. Molekula FLU stejně jako vinca alkaloidy působí na strukturu mikrotubulů, váže se však na jiném místě. Vinca alkaloidy se již v protinádorové léčbě používají. Výzkum naznačuje, že by FLU mohl potencovat účinky těchto alkaloidů, nebo je dokonce nahradit (Spagnuolo et al. 2010).

V našem experimentu jsme sledovali vliv FLU na proliferaci, migraci a adhezi nádorových buněčných linií DOK a PE/CA-PJ15 a porovnávali je s vlivem FLU na buňky gingivy zdravého člověka. Buněčná linie DOK byla izolována ze zadní části jazyka 57 - letého muže, z dysplastické tkáně obklopující skvamózní karcinom, který byl předtím chirurgicky odstraněn (Chang et al. 1992). Tyto buňky tedy představují časně stádium vývoje nádoru. Buněčná linie PE/CA-PJ15 pochází z tkáně jazyka 45 – letého muže, z plně vyvinutého orálního skvamózního karcinomu (Berndt et al. 1997). V naší studii jsme tedy zjišťovali a porovnávali vliv FLU na buňky ve dvou různých stádiích vývoje orálního skvamózního karcinomu. Gingivální fibroblasty jsme použili jako model nenádorové ale proliferující tkáně.

U všech testovaných linií FLU ovlivňoval proliferaci buněk v závislosti na koncentraci. Abychom mohli porovnat citlivost jednotlivých buněčných linií k vlivu FLU, vypočítali jsme pro všechny tři buněčné linie hodnoty EC_{50} . Ze získaných hodnot vychází jako nejméně citlivá buněčná linie GF s hodnotou $EC_{50} = 0,56 \mu\text{M}$, tedy linie normálních zdravých buněk. Naopak buněčné linie DOK a PE/CA-PJ15 měli nižší a velmi podobnou hodnotu EC_{50} . Pro linii DOK jsme vypočítali hodnotu $EC_{50} = 0,21 \mu\text{M}$ a pro linii PE/CA-PJ15 nám vyšla hodnota $EC_{50} = 0,20 \mu\text{M}$.

Z našich výsledků hodnot EC_{50} tedy vyplývá, že obě buněčné linie orálního skvamózního karcinomu jsou citlivější na působení FLU než zdravé gingivální buňky. Podle údajů v literatuře hladiny FLU v plazmě mohou dosahovat $1 \mu\text{M}$ (Spagnuolo et al. 2010), námi zjištěné hodnoty účinných koncentrací FLU jsou tedy klinicky snadno dosažitelné. Michaelis et al. otestovali citlivost k FLU u 321 buněčných linií odvozených z 26 různých typů nádorů. Linie odvozené od nádorů dutiny ústní patřily celkově mezi citlivější, protože dosáhly hodnot IC_{50} méně než $1 \mu\text{M}$ (konkrétně 82-379 nM), tři z těchto linií vykazaly i podobně nízké hodnoty IC_{90} (Michaelis et al. 2015). Naše výsledky

jsou v souladu s těmito údaji a potvrzují citlivost buněk orálního skvamózního karcinomu k FLU.

Orální skvamózní karcinom je vysoce invazivní typ nádoru. Aby byly buňky schopné invaze do okolních tkání, musí být také schopné pohybu a k tomu potřebují funkční mikrotubuly (Oliveira a Ribeiro-Silva 2011). Proto jsme sledovali vliv FLU na migraci a adhezi u nádorové linie PE/CA-PJ15. Zároveň nás zajímalo, zda FLU ovlivní tyto parametry u normálních gingiválních fibroblastů. K měření buněčné migrace a adheze jsme použili xCELLigence systém. Výhodou této metody je nepřetržité sledování buněk během měření a také skutečnost, že metoda je tzv. „label-free“, to znamená, že nemusíme buňky barvit nebo jiným způsobem ovlivňovat. Při testování vlivu FLU na migraci buněčné linie PE/CA-PJ15 jsme pozorovali významné snížení migrace buněk od koncentrace 0,25 μM . Naopak testování vlivu FLU na migraci buněčné linie GF ukázalo, že FLU již od nejnižších koncentrací vedl k podpoře migrace buněk GF. Vliv FLU na migraci nádorových buněk je tedy tlumivý, naproti tomu jeho vliv na migraci zdravých buněk je stimulační.

Při měření adheze jsme porovnávali hodnoty naměřené v čase 1 hodina a v čase 5 hodin. U buněčné linie PE/CA-PJ15 docházelo v čase 1 hodina v nejnižších koncentracích 0,05 – 0,25 μM k významnému zvýšení adheze, ke konci experimentu však již rozdíl mezi ovlivněnými a kontrolními buňkami nebyl signifikantní. U buněčné linie GF docházelo k postupnému snižování adheze vlivem všech testovaných koncentrací FLU kromě nejvyšší. Zdá se, že linie reagují i v případě adheze na FLU rozdílně. Bude však třeba dalších experimentů, které by měly prozkoumat i signální dráhy spojené s migrací a adhezí u obou typů sledovaných buněk.

Ze studií, které byly publikovány, vyplývá, že anthelmintikum FLU by se mohl v budoucnu používat k terapii pacientů s některými nádorovými onemocněními. Naše výsledky ukazují, že FLU již v nízkých koncentracích snižuje proliferaci a migraci buněk orálního skvamózního karcinomu *in vitro*.

7. ZÁVĚR

1. FLU inhibuje proliferaci buněk u všech tří testovaných linií DOK, PE/CA-PJ15 a GF v závislosti na jeho koncentraci. Nádorové linie (DOK a PE/CA-PJ15) jsou k působení FLU citlivější než nenádorová buněčná linie GF.
2. FLU má vliv i na migraci buněk. U nádorové buněčné linie PE/CA-PJ15 inhibuje migraci, naopak na migraci gingiválních fibroblastů (GF) působí stimulačně. FLU rovněž ovlivňuje adhezi buněk v závislosti na jeho koncentraci a typu buněčné linie.

8. SEZNAM ZKRATEK

D-MEM	Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC ₅₀	efektivní koncentrace (50%)
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
FLU	flubendazol
GF	gingivální fibroblasty
NOR	Národní onkologický registr
PBS	fosfátový pufr
WHO	World Health Organization

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Berndt A., Hyckel P., Könneker A., Katenkamp D., Kosmehl H. (1997). Oral squamous cell carcinoma invasion is associated with a laminin-5 matrix re-organization but independent of basement membrane and hemidesmosome formation. clues from an in vitro invasion model. *Invasion Metastasis*. 17(5). s. 251-258
- Čedíková M., Krakorová K., Miklíková M., Hronová M., Balandová A., Pitule P., Králíčková M. On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů, 2012, LFP UK, s. 5-10
- Český lékopis 2009
- Ducháček L., Lamka J., 2006, Veterinární vademecum pro farmaceuty, Karolinum, Praha, ISBN 80-246-1263-1
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000). Hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1), s. 57-70
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), s. 646-674
- Hofmanová Jiřina, 2013, Genotoxicita a kancerogeneze, Masarykova univerzita, Brno, ISSN 18-02-128X
- Hou Z.-J., Luo X., Zhang W. et al. (2015). Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. *Ocotarget*. 6(8). s. 6326-6340
- Chang S.E., Foster S., Betts D., Marnock W.E. (1992). DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. *Int J Cancer*. 52(6) s.896-902
- Klener Pavel et al., 2002, Klinická Onkologie, Galén, Praha, ISBN 80-7262-151-3
- Kolář a kol., 2003 Molekulární patologie nádorů, Epava, Olomouc, ISBN 80-86297-15-2
- Králová V. et al. (2013). Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*. 24(9). s. 911-919
- Kovaříková P., Michalová E., Knopfová L., Bouchal P. (2014) Methods for Studing Tumor Cell Migration and Invasiveness. *Klinická onkologie*. 27. s. 22-27
- Lacey E. (1988) The role of the cytoskeletal protein, tubulinm in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol*. 18(7). s. 885-936

- Lamka J., Ducháček L., 2006, Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha, ISBN 80-8246-1243-7
- Mackenzie Ch. D, Geary T. G (2011) Flubendazole: a candidate macrofilaricide for lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9(5). s. 497-501
- Michaelis M., Agha B., Rothweiler F. et al. (2015). Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. *Scientific reports.* 5. s. 1-9
- Michalová E., Poprach A., Němečková I., Nenutil R., Valík D., Žaloudík J., Vyzula R., Vojtěšek B. (2008). Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům *ex vivo* – úskalí a limitace vlastní metody. *Klinická onkologie.* 21. s. 93-97
- Oliveira L.R., Ribeiro-Silva A. (2011). Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* (2011)40(3). s. 298-307
- Saba N.F., Goodman M., Ward K., Flowers Ch., Remalingam S., Owonikoko T., Chen A., Grist W., Wadsworth T., Beitler J.J., Khuri F.R., Shin D.M. (2011). Gender and Ethnic Disparities in Incidence and Survival of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue, Base of Tongue, and Tonsils: A Surveillance Epidemiology and End Results Program-Based Analysis. *Oncology.* 80, 12-20
- Sharma P., Saxena S., Aggarwal P. (2010). Trends in the epidemiology of oral squamous cell carcinoma in Western UP: An institutional study. *Indian J Dent Res.*[Online] [Citace 29.4.2016] 21, s. 316-319 Dostupné z: <http://www.ijdr.in/text.asp?2010/21/3/316/70782>
- Spagnuolo P. A., Hu J., Hurren R. et al. (2010). The anthelmimintic flubendazole inhibits mikrotubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood.* 115(23), s. 4824-4833
- Slabý Ondřej et al., 2015, Molekulární Medicína. Galén, Praha, ISBN 978-80-7492-121-6
- Šmardová. J., Kopítková J., Sabo A., Špajdelová J., in Jurda L. et al., 2010, Klinická a radiačná onkologia, Martin, Osvěta, ISBN 978-80-8063-302-8

- Urcan E., Heartel U., Styliou M., Hickel R., Scherthan H., Reichl F. X. (2010). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental materials*. 26. s. 51-58
- Van Leemput L., Heykants J. (1991). Flubendazole: concentrations in plasma and residues in edible tissues of pheasants after a 7-day treatment at 60 ppm in the feed.
- Web 1: World Cancer Research Fund International.[Online] [Citace 20.4.2016] Dostupné z: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>
- Web 2: Linkos.cz: ČR a rakovina v číslech. [Online] [Citace 20.3.2016] Dostupné z: <http://www.linkos.cz/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech>
- Web 3: Masarykův Onkologický Ústav – Rizikové faktory nádorových onemocnění [Online] [Citace 5.4.2016] Dostupné z: <https://www.mou.cz/rizikove-factory-nadorovych-onemocneni/t3019>
- Web 4: Evropský kodex proti rakovině [Online] [Citace 5.4.2016] Dostupné z: <http://cancer-code-europe.iarc.fr/index.php/cs/>
- Web 5: WHO - Papua Nová Guinea [Online] [Citace 8.4.2016] Dostupné z: http://www.wpro.who.int/papuanewguinea/mediacentre/mouth_cancer/en/
- Web 6: www.svod.cz [Online] [Citace 8.4.2016]
- Web 7: Masarykův Onkologický Ústav – Nádory dutiny ústní. [Online] [Citace 10.4.2016] Dostupné z: <https://www.mou.cz/nadory-ustni-dutiny/t3318>
- Web 8: Cancer Research UK – Mouth and oropharyngeal cancer [Online] [Citace 11.4.2016] Dostupné z: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/mouth-cancer/>
- Web 9: Modrá kniha české onkologické společnosti, 20. aktualizace (2015) [Online] [Citace 11.4.2016] Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/modra-kniha/13.pdf>
- Web 10: Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Souhrn údajů o přípravku - *FlubenoI*® [Online] [Citace 20.4.2016] Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz>
- Web 11: EMEA – Committee for products for veterinary use – flubendazol-summary report (2006) [Online] [Citace 20.4.2016] Dostupné z:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014292.pdf

- Web 12: Nexcelom Bioscience LLC, Cellometer Auto T4 Cell Counter [Online]. [cit. 4. 2. 2016]. Dostupné z: <http://www.nexcelom.com/Cellometer-Auto-T4/index.html>
- Web 13: G-biosciences, CytoScan™ WST-1 Cell Proliferation Assay [Online] [citace:18.1.2016] Dostupné z: <http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/cytoscanwst1-desc.aspx>
- Web 14: Flubendazole [Online] [Citace 20.4.2016] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Flubendazole>