

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klavdija GLAVAČ

**VPLIV MIKROOKOLJA NA PREŽIVETJE IN
MIGRACIJO MELANOMSKIH CELIC Z
RAZLIČNIM METASTATSKIM POTENCIALOM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klavdija GLAVAČ

**VPLIV MIKROOKOLJA NA PREŽIVETJE IN MIGRACIJO
MELANOMSKIH CELIC Z RAZLIČNIM METASTATSKIM
POTENCIJALOM**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**THE IMPACT OF THE MICROENVIRONMENT ON THE
SURVIVAL AND MIGRATION OF MELANOMA CELLS WITH
DIFFERENT METASTATIC POTENTIAL**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega progama 2. stopnje - Biotehnologija. Magistrsko delo je bilo pripravljeno v Skupini za nano- in biotehnoške aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, in v Laboratoriju za molekularno nevrobiologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje biotehnologije je 16. 2. 2015 sprejela temo in za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Mojco Pavlin in za somentorja doc. dr. Sergeja Pirkmajerja.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Mentorica: prof. dr. Mojca PAVLIN
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Skupina za nano in biotehnoške aplikacije

Somentor: doc. dr. Sergej PIRKMAJER
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo,
Laboratorij za molekularno nevrobiologijo

Recenzent: prof. dr. Matic LEGIŠA
Kemijski inštitut, Ljubljana, D-12 Odsek za sintezno biologijo in imunologijo

Datum zagovora: 10. 11. 2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Klavdija Glavač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|----|---|
| ŠD | Du2 |
| DK | UDK 606:616-006.6(043.2) |
| KG | melanomske celice/celične linije/B16F1/B16F10/mikrookolje/presnova/rakave celice/metastaziranje/ MTS/Hoechst/migracijski test/ |
| AV | GLAVAČ, Klavdija, dipl. bioteh. (UNI) |
| SA | PAVLIN, Mojca (mentorica)/PIRKMAJER, Sergej (somentor) |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije |
| LI | 2016 |
| IN | VPLIV MIKROOKOLJA NA PREŽIVETJE IN MIGRACIJO MELANOMSKIH CELIC Z RAZLIČNIM METASTATSKIM POTENCIALOM |
| TD | Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja) |
| OP | XI, 63 str., 1 pregl., 27 sl., 72 vir. |
| IJ | sl |
| JJ | sl/en |
| AI | Otto Warburg je leta 1931 dobil Nobelovo nagrado za svoje raziskave celičnega dihanja. Odkril je t.i. "Warburgov pojav", za katerega je ključna domneva, da je nastanek rakavega tkiva posledica disfunkcionalnega presnovnega stanja, v okviru katerega tudi v aerobnih razmerah prevladuje glikoliza, ki se konča s proizvodnjo laktata in je prisotna pri številnih rakavih obolenjih. Nova dognanja nakazujejo, da je presnova rakavih celic lahko boljša tarča za zdravljenje kot DNK, zato se poraja vse večje zanimanje za preučevanje sprememb v presnovi rakavih celic. Boljše poznavanje presnovnih poti in vpliva protirakavih učinkovin na njih lahko ponudi nove možnosti sinergističnih terapij s kemoterapeutiki in izboljšanje odziva na protirakavo radioterapijo. V magistrskem delu smo primerjali mišji melanomski celični liniji B16F1 in B16F10 <i>in vitro</i> ; slednja ima višji metastatski potencial. Rezultati so pokazali, da se linija B16F10 v primerjavi z linijo z nižjim metastatskim potencialom podvojuje hitreje. Med drugim smo pokazali, da testa MTS ne moremo uporabljati za prikaz realne živosti celic B16 med modulacijo presnovnih poti, saj test služi določevanju presnovnih aktivnosti. Na celicah B16 smo vzpostavili in optimizirali migracijski test (angl. <i>Transwell permeable support</i>), ki služi določevanju migracijskega potenciala rakavih celic. Rezultati so potrdili, da 5 mM metformin deluje citotoksično na celice B16 in zavira njihovo migracijo. Pri aktivaciji AMPK z Abbott A769662 je zelo pomembna koncentracija učinkovine, ki lahko tako zavira ali spodbuja migracijo tumorskih celic. Z določanjem vpliva učinkovin smo pokazali, da sinergistična uporaba 2DG in metformina v našem primeru najbolj zmanjša preživetje in zavira migracijo melanomskih celic. |

KEY DOCUMENTATION INFORMATION

ND Du1
DC UDC 606:616-006.6(043.2)
CX melanoma cells/cell line/B16F1/B16F10/microenvironment/metabolism/cancer cells/metastasis/MTS/Hoechst/migration test/
AU GLAVAČ, Klavdija
AA PAVLIN, Mojca (supervisor)/PIRKMAJER, Sergej (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study of Biotechnology
PY 2016
TI THE IMPACT OF THE MICROENVIRONMENT ON THE SURVIVAL AND MIGRATION OF MELANOMA CELLS WITH DIFFERENT METASTATIC POTENTIAL
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 63 p., 1 tab., 27 fig., 72 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Otto Warburg won the Nobel Prize in 1931 for his research on cell respiration. In the discovery, called the "Warburg effect", he assumed that the emergence of cancerous tissue is a consequence of a dysfunctional metabolic state, where even in aerobic conditions, glycolysis dominates. The effect is present in many cancerous illnesses. New findings indicate that the metabolism of cancer cells can be a better target for treatment than DNA, which is the reason for the growing interest in the study of changes in the metabolism of cancerous cells. A better understanding of the metabolic pathways and of the impact of anti-cancer substances on them can offer new opportunities for synergistic therapies with chemotherapeutic agents and for improving the response to anticancer radiotherapy. In this thesis we compared the B16F1 and B16F10 mouse melanoma cell lines *in vitro*, where B16F10 has a higher metastatic potential. We found that the B16F10 line doubles faster than the line with a lower metastatic potential. Among other things, we have shown that MTS test cannot be used for the display of the real vivacity of B16 cells during the modulation of metabolic pathways, since the test determines only the metabolic activity. We established and optimized the Transwell permeable support migration test on B16 cells that determines the migration potential of cancer cells. The results confirmed that the 5 mM metformin works in a cytotoxic manner on the B16 cells and inhibits their migration. With the activation of AMPK with Abbott A769662, the concentration of the agent is very important, because it can either inhibit or stimulate the migration. During the determination of the impact of the drug, we showed that a synergistic use of 2DG and metformin in our case reduces the survival and inhibits the migration of melanoma cells.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY DOCUMENTATION INFORMATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VII |
| KAZALO SLIK | VIII |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA | 1 |
| 1.2 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE | 1 |
| 1.3 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 MELANOM | 3 |
| 2.1.1 Celična linija B16 | 3 |
| 2.2 GLAVNE ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC | 4 |
| 2.3 INVAZIVNOST IN METASTAZIRANJE | 6 |
| 2.3.1 Definicija metastaziranja | 6 |
| 2.3.2 Definicija migracije in invazije | 6 |
| 2.3.3 Definicija metastatskega potenciala | 6 |
| 2.3.4 Koraki razširjanja metastaz in vivo | 7 |
| 2.3.5 Testi za oceno invazivnosti <i>in vitro</i> (migracijski testi) | 7 |
| 2.3.5.1 Migracijski test Transwell (angl. Boyden Transwell test) | 11 |
| 2.4 PRESNOVNE SPREMEMBE PRI RAKAVIH CELICAH | 12 |
| 2.5 URAVNAVANJE PRESNOVE PRI RAKAVIH CELICAH | 13 |
| 2.5.1 Z AMP aktivirana protein kinaza | 14 |
| 2.5.2 Aktivatorji AMPK | 16 |
| 2.5.2.1 Metformin | 16 |
| 2.5.2.2 AICAR | 16 |
| 2.5.2.3 2-deoksi-D-glukoza | 17 |
| 2.5.2.4 Spojina A769662 | 17 |
| 2.5.3 Inhibitor AMPK | 17 |
| 2.5.3.1 Spojina C | 17 |
| 2.5.4 Dikloroacetat (DCA) | 17 |
| 2.6 MIKROOKOLJE RAKAVIH CELIC | 18 |
| 2.6.1 Mikrookolje v tkivu | 18 |
| 2.6.2 Sestava gojišč za kulture rakavih celic v primerjavi z razmerami v tkivu | 19 |
| 2.6.2.1 Glukoza | 19 |
| 2.6.2.2 Glutamin | 19 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 21 |
| 3.1 MATERIALI | 21 |
| 3.1.1 Gojišča in kemikalije | 21 |
| 3.1.2 Drobni laboratorijski material | 21 |
| 3.1.3 Laboratorijska oprema | 22 |
| 3.1.4 Celična linija | 22 |

| | |
|--|----|
| 3.1.5 Gojišča | 23 |
| 3.2 METODE | 24 |
| 3.2.1 Gojenje celičnih kultur | 24 |
| 3.2.2 Določanje preživetja celic | 24 |
| 3.2.2.1 Določanje števila celic s hemocitometrom | 24 |
| 3.2.3 Določanje presnovne aktivnosti celic s testom MTS | 25 |
| 3.2.4 Določanje števila in preživetja celic z barvilom Hoechst 33342 | 27 |
| 3.2.5 Test difuzije s fluoresceinom na koših Transwell permeable support | 28 |
| 3.2.6 Migracijski test | 28 |
| 3.2.7 Statistična obdelava podatkov | 29 |
| 4 REZULTATI Z RAZPRAVO | 30 |
| 4.1 VPLIV SERUMA IN GLUTAMINA NA PROLIFERACIJO CELIC B16F1 IN B16F10 | 30 |
| 4.1.1 Odvisnost proliferacije celic B16F1 in B16F10 od prisotnosti seruma v gojišču | 30 |
| 4.1.2 Odvisnost proliferacije celic B16F1 in B16F10 od prisotnosti glutamina v gojišču | 31 |
| 4.2 OBČUTLJIVOST CELIC B16F1 IN B16F10 NA METFORMIN | 31 |
| 4.3 VPLIV GLUTAMINA NA PREŽIVETJE CELIC B16F1 IN B16F10 PRI TRETIRANJU Z METFORMINOM | 34 |
| 4.4 VPLIV FARMAKOLOŠKE AKTIVACIJE PIRUVAT DEHIDROGENAZE ZMANJŠA PREŽIVETJE CELIC B16F1 IN B16F10 OB IZPOSTAVITVI METFORMINU | 36 |
| 4.5 ANALIZA MIGRACIJE CELIC B16F10 IN OPTIMIZACIJA MIGRACIJSKEGA TESTA | 38 |
| 4.5.1 Odvisnost migracije od števila nasajenih celic B16F10 | 38 |
| 4.5.1.1 Časovna odvisnost migracije celic B16F10 | 39 |
| 4.5.1.2 Test difuzije s fluoresceinom | 40 |
| 4.5.1.3 Validacija migracijskega testa | 41 |
| 4.6 PRIMERJAVA MIGRACIJE CELIČNIH LINIJ B16F1 IN B16F10 | 43 |
| 4.7 VPLIV METFORMINA IN DRUGIH AKTIVATORJEV AMPK NA MIGRACIJO CELIC B16F10 | 46 |
| 5 SKLEPI | 51 |
| 6 POVZETEK (SUMMARY, ZUSAMMENFASSUNG) | 53 |
| 6.1 POVZETEK | 53 |
| 6.2 SUMMARY | 54 |
| 6.3 ZUSAMMENFASSUNG | 55 |
| 7 VIRI | 56 |
| ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikazuje sestavo gojišč, uporabljenih v raziskovalnem delu23

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Celice B6F10 <i>in vitro</i> | 4 |
| Slika 2: Sheme pogosto uporabljenih migracijskih testov 1. del (Kramer in sod., 2013)..... | 9 |
| Slika 3: Sheme pogosto uporabljenih migracijskih testov 2. del (Kramer in sod., 2013).... | 10 |
| Slika 4: Shema koša Transwell v jamici, ki smo ga uporabili za določitev migracijskega potenciala celic B16F1/B16F10. | 11 |
| Slika 5: Fotografija 12-jamične plošče z migracijskimi koši Transwell z 0,8- μm membrano..... | 11 |
| Slika 6: Celično dihanje in glikoliza (Samarasinghe, 2016). | 12 |
| Slika 7: Prikaz delovanja in regulacije AMPK, ki vodi v zmanjšanje raka (Kim in He, 2013). | 15 |
| Slika 8: Shema črt hemocitometra (Counting cells ..., 2016)..... | 25 |
| Slika 9: Shematski prikaz celične presnove reagenta MTS (Riss in sod., 2013) | 26 |
| Slika 10: Struktura barvil Hoechst (Hoechst Stains ..., 2005)..... | 27 |
| Slika 11: Shematski prikaz testa difuzije s fluoresceinom na koših Transwell permeable support glede na različne ponovitve. | 28 |
| Slika 12: Vpliv seruma na proliferacijo celic B16F1 in B16F10. | 30 |
| Slika 13: Vpliv glutamina na proliferacijo celic B16F1 in B16F10. | 31 |
| Slika 14: Vpliv metformina na odstotek živih celic B16F1 in B16F10..... | 32 |
| Slika 15: Celice B16F1 in B16F10 po 48-urni izpostavljenosti različnim koncentracijam metformina. | 33 |
| Slika 16: Vpliv glutamina na odstotek živih celic B16F1 in B16F10 ob izpostavitvi metforminu. | 35 |
| Slika 17: Vpliv DCA na preživetje celic B16F1 in B16F10. | 37 |
| Slika 18: Optimizacija časa migracije in števila nasajenih celic B16F10 na koš. | 38 |
| Slika 19: Optimizacija časa migracije celic B16F10. | 39 |
| Slika 20: Test difuzije s 10 μM fluoresceinom. | 40 |
| Slika 21: Test difuzije s 100 μM fluoresceinom..... | 41 |
| Slika 22: Celice B16F10 24 ur po migraciji. | 41 |
| Slika 23: Preliminarni poskus migracije. | 42 |
| Slika 24: Vpliv glutamina in seruma na migracijo celic B16F1..... | 44 |
| Slika 25: Vpliv glutamina in seruma na migracijo celic B16F10..... | 45 |
| Slika 26: Vpliv metformina, DCA ali različnih koncentracij 2DG na migracijo celic B16F10. | 47 |

Slika 27: Vpliv spojine C, različnih koncentracij AICAR in A769662 na migracijo celic B16F10.....49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| Okrajšava | Pomen |
|------------------|---|
| 2DG | 2-deoksi-D-glukoza |
| ACC1 | Acetil-CoA karboksilaza 1 |
| ACC2 | Acetil-CoA karboksilaza 2 |
| acetil-CoA | Acetil koencim A |
| ADP | Adenozin difosfat |
| AICAR | 5-aminoimidazol-4-karboksamid-β-D-ribofuranozid |
| AKT ali PKB | Protein kinaza B |
| AMP | 5' adenozin monofosfat |
| AMPK | Z AMP aktivirana protein-kinaza |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| BSA | Goveji serumski albumin |
| BRAF | B-Raf proto-onkogen |
| COX-2 | Ciklooksigenaza-2 |
| CTK | Cikel trikarboksilnih kislin |
| DCA | Dikloroacetat |
| ECM | Zunajcelični (ekstracelularni) matriks |
| FBS | Fetusni serum goveda |
| FLU | Fluorescein |
| Glu | L-glutamin |
| HIF | S hipoksijo inducirani dejavnik |
| IGF-1 | Inzulinu podoben rastni faktor-1 |
| LKB1 | Jetrna kinaza B1 |
| MAPK | Z mitogeni aktivirana protein-kinaza |
| Met | Metformin |
| mTOR | Mehanistična tarča rapamicina |
| MTS | 3-(4,5-dimethyltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij |

| | |
|-----------------|--|
| NADPH | Reducirana oblika nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata |
| n | Število bioloških ponovitev |
| N-glikolizacija | Vezava dušika amidne skupine asparagina |
| p27 | Tumorski zaviralec (supresor) p27 |
| p53 | Tumorski zaviralec (supresor) p53 |
| PBS | Fosfatni pufer v fiziološki raztopini |
| PES | Fenazin etil sulfat |
| PDH | Piruvat dehidrogenaza |
| PDK | Piruvat dehidrogenaza kinaza |
| PI3K | Fosfoinozitid 3-kinaza |
| PMS | Fenazin metil sulfat |
| PPP | Pentoza fosfatna pot |
| SEM | Standardna napaka povprečja (+/-) |
| Spojina C - CC | 6-[4-(2-piperidin-1-iletoksi)fenil]-3-piridin-4-ilpirazolo[1,5-a]pirimidin |
| TSC1 | Protein tuberozne skleroze 1 |
| TSC2 | Protein tuberozne skleroze 2 |
| ULK1 | Unc-51 podobna avtofagijsko aktivirana kinaza 1 |
| XPC | <i>Xeroderma pigmentosum</i> , dopolnjevalna skupina C |
| ZMP | 5-amino-4-imidazolkarboksamid ribozid 5'-monofosfat |

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Rak je drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu. Leta 2012 je za rakom umrlo 8,2 milijona ljudi; ta številka strmo narašča. Poznamo več kot 100 različnih tipov raka, ki so razvrščeni glede na vrsto celic, ki je sprva prizadeta. V magistrskem delu se osredotočamo na melanom, ki je najnevarnejša oblika kožnega raka in se pojavi, ko nepopravljiva poškodba DNK sproži mutacije, ki pospešijo nenadzorovano delitev pigmentnih kožnih celic ter povzročijo izoblikovanje maligne novotvorbe. Melanom ni najbolj pogosta oblika kožnega raka, je pa najbolj smrtna, in sicer zaradi agresivne oblike te vrste bolezni. Med bolniki, obolelimi za rakom, so metastaze zdaleč najpogostejši vzrok smrti. 90 % smrti bolnikov, obolelih za trdnimi raki, lahko pripišemo metastaziranju. Da bi bolje razumeli proces metastaziranja, moramo iskati nove pristope in metode, saj obstaja velika potreba po novih terapevtskih strategijah proti širjenju metastaz.

Za rakave celice so značilne bistvene spremembe v celični presnovi, ki tako predstavljajo eno glavnih tarč za razvoj novih oblik zdravljenja. Za celično delitev so potrebna hranila, energija in biosinteza aktivnost, zato je presnovna aktivnost v proliferirajočih celicah bistveno drugačna od tistih v neproliferirajočih. Rakave celice lahko proliferirajo neodvisno od zunanjih signalov, ki običajno uravnavajo rast in delitev celic. Poleg tega imajo mnogo drugih prednosti, ki jim omogočajo preživetje v neugodnih razmerah. V 20. letih 20. stoletja je kasnejši Nobelov nagrajenec Otto von Warburg opazil, da rakave celice tudi v prisotnosti kisika presnavljajo glukozo do laktata (Warburg, 1927). Aerobna glikoliza ali tako imenovani Warburgov pojav je danes ponovno v središču pozornosti, saj so raki z visoko stopnjo glikolize bolj agresivni in odporni na kemoterapijo. Izkaže se, da celotne spremembe presnovnih poti zajamejo več procesov, ki usmerijo presnovo v anabolne procese za hitrejšo izgradnjo novih molekul in s tem omogočijo celično proliferacijo. Prav tako lahko spremenjena presnova pomaga celicam pri migraciji in tvorbi metastaz.

Spremenjeno delovanje presnovnih poti je značilno tudi za rakave celice melanoma. Zanje je značilno tudi, da razvijejo odvisnost od glutamina in glukoue, ki sta ključnega pomena za rast in delitev.

Naše raziskave so obsegale analizo preživetja in migracije celic mišjega melanoma B16F1 (linija z nižjim metastatskim potencialom, ki tvori nižje število metastaz *in vivo*) in B16F10 (linija z višjim metastatskim potencialom, ki tvori večje število metastaz *in vivo*).

1.2 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Cilji magistrske naloge so optimizirati protokol za gojenje celic mišjega melanoma (B16F1, B16F10) v kulturi, določiti preživetje celic ob prisotnosti metformina v gojišču z različnimi

koncentracijami glutamina in seruma ter primerjati delovanje metformina na celice mišjega melanoma z različnim metastatskim potencialom (B16F1 in B16F10) v *in vitro* razmerah. Eden glavnih ciljev našega raziskovanja je bil vzpostavitev in validacija sistema za analizo migracije celične linije B16 *in vitro*. Prav tako smo si zastavili cilj določiti, ali ima aktivacija AMPK pozitiven ali negativen vpliv na rast, preživetje in migracijo celic B16 z aktivatorji AMPK in modulatorji energijske presnove (metformin, Abbott Compound A769662, CC – spojina C, AICAR - 5-aminoimidazol-4-karboksamid- β -D-ribofuranozid, 2DG - 2-deoksi-D-glukoza in DCA - dikloroacetat ter glutamin).

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Namen dela smo strnili v preučevanje sedmih hipotez:

1. Proliferacija celic B16F1 in B16F10 je odvisna od prisotnosti seruma in glutamina v rastnem gojišču.
2. Celice B16F1 in B16F10 so različno občutljive na metformin.
3. Glutamin poveča preživetje celic B16F1 in B16F10 ob izpostavitvi metforminu.
4. Farmakološka aktivacija piruvat dehidrogenaze zmanjša preživetje celic B16F1 in B16F10 ob izpostavitvi metforminu.
5. Migracija celic B16F10 je odvisna od števila nasajenih celic in časa inkubacije.
6. Celice B16F10 so bolj sposobne migracije kot celice B16F1.
7. Aktivacija AMPK spodbudi migracijo celic B16F10.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MELANOM

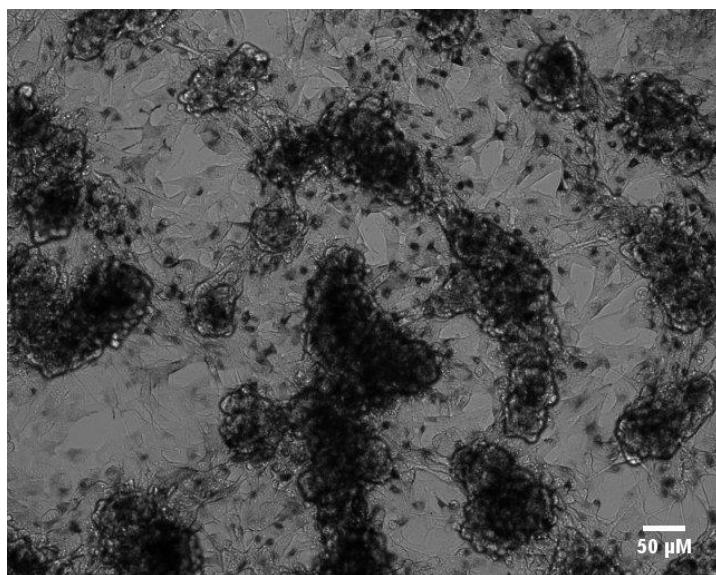
Melanom je eden izmed najpogostejših rakov na svetu in njegova pogostnost v zadnjih desetletjih hitro narašča. Melanom izhaja iz maligne transformacije pigmentnih celic kože, imenovanih melanociti. UV-sevanje je največkrat dokumentiran dejavnik tveganja za melanom. Drugi dejavniki tveganja so netipični kožni izrastki, genetske motnje (pigmentne kseroderme) in osebe s fototipom kože 1. Maligni melanom je ena izmed najbolj smrtonosnih oblik kožnega raka z visokim metastatskim potencialom in visoko odpornostjo na citotoksična zdravila (Hsu in sod., 2016).

Melanociti izvirajo iz celic nevralnega grebena med razvojem zarodka. Tako kot druge vrste celic enakega rodu morajo melanociti med razvojem opraviti obsežno migracijo, preden se popolnoma razvijejo v pigmentne celice epidermisa (povrhnjice), oči in lasnih mešičkov. Melanomske celice so maligne rakave celice melanocitov. Primarni melanomi, ki mejijo na povrhnjico, običajno niso življenjsko nevarni, vendar ne obstaja nobeno učinkovito zdravljenje po metastaziranju, saj so na splošno raki tega tipa zelo odporni na radiacijo in kemoterapijo. Zato je ključnega pomena razvoj novih oblik zdravljenja (White in Zon, 2008). Gupta in sod. (2005) so dokazali, da je diferencialni program, ki narekuje migracijo med embriogenezo, predispozicija za metastaziranje melanomskih celic. Po indukciji enakega nabora transformiranih genov za vsako vrsto celičnega tipa so primerjali metastazno obnašanje malanocitov, fibroblastov in epitelijskih celic ter ugotovili, da melanociti dosežejo najbolj učinkovito metastazno razširjanje.

Veliko raziskav o melanomu se je osredotočilo na gene in molekularne procese, ki usmerjajo kancerogenezo. Intenzivna večdesetletna prizadevanja so razkrila nekatere ključne genetske spremembe in pokazala, kako sodelujejo pri biokemičnih in celičnih poteh. Najnovejša dognanja kažejo, da mnogi onkogeni nadzirajo celično presnovo ter da mutacije v teh genih omogočajo melanomskim celicam proizvodnjo zadostne količine energije in gradnikov za preživetje ter rast melanoma (Abildgaard in Guldberg, 2014).

2.1.1 Celična linija B16

Celice B16 so adherentna, fibroblastom podobna linija, ki proizvaja melanin. V naših poskusih smo uporabili celično linijo mišjega melanoma B16, in sicer dve varianti te linije, B16F1 (linija z nizkim metastatskim potencialom) in B16F10 (linija z višim metastatskim potencialom). Prvi eksperimentalni dokaz za raznolikost v metastatskih lastnostih celic v neoplazmi sta opisala Fidler in Kripke (1977) v okviru dela s celicami B16. Hčerinska linija B16, poizvedena *in vitro*, je med rastjo pokazala zelo variabilen, vendar konstantno višji metastatski potencial (glej poglavje 2.3.3.) v primerjavi s starševsko linijo B16.



Slika 1: Celice B6F10 *in vitro*.

Črne pike predstavljajo proizveden melanin. Posnetek je bil zajet na svetlobnem mikroskopu pri 10-kratni povečavi.

Razlika med variantama se pokaže *in vivo*, saj celice B16F10 v primerjavi z B16F1 oblikujejo več pljučnih tumorjev, na enako število injiciranih celic, ne glede na način injiciranja. Gehlsen in Hendrix (1986) sta pokazala, da so po 21 dnevih inokulacije melanomskih celic v miši celice B16F10 oblikovale $225 \pm 37,2$ metastaznih kolonij v pljučih, medtem ko so celice B16F1 oblikovale le $75 \pm 11,4$ metastaznih kolonij v pljučih. Ti rezultati potrjujejo različni metastatski potencial teh dveh variant celične linije B16 *in vivo*. Obenem so izvedli tudi *in vitro* invazijski test, na katerem so bili rezultati med variantama celične linije B16 podobni. Tako je bilo dokazano, da imata celični liniji različen metastatski potencial, vendar nimata različnih karakteristik invazivnosti.

2.2 GLAVNE ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC

Rakave celice imajo nekaj temeljnih značilnosti, ki jih postopno pridobijo med kancerogenezo in po katerih se razlikujejo od zdravih celic.

Prva značilnost je sposobnost za vzdrževanje stimulacijskih rastnih signalov in ohranjanje kronične delitve. Normalno tkivo skrbno nadzoruje proizvodnjo in sprostitev signalov, ki uravnavajo celično rast in delitev, s čimer zagotavljajo homeostazo števila celic ter tako vzdržujejo normalno strukturo in funkcijo tkiva. Rakave celice ohranjajo neprekinjeno rast tako, da imajo zmanjšano ali celo povsem odsotno kontrolo nad zunajceličnimi signali rastnih in delitvenih faktorjev (Hanahan in Weinberg, 2011). Zaobidejo močne programe, ki z negativno povratno zvezo uravnavajo proliferacijo celic. Ti so odvisni od delovanja zaviralnih (supresorskih) genov. S pomočjo regulatornih proteinov, kot je p53, so se sposobne izogniti programirani celični smrti (Adams in Cory, 2007).

Druga značilnost rakavih celic je, da imajo omogočeno podvojevalno nesmrtnost. Ta značilnost je v močnem nasprotju z večino normalnih celičnih linij po telesu, ki so sposobne le določenega števila celičnih ciklov. Ta omejenost normalnih celic je povezana z dvema izrazitima kontrolnima mehanizmoma namnoževanja, ki so ju rakave celice uspele zaobiti, in sicer senescenco (tipičen ireverzibilen prehod v nedelitveno, vendar še živo stanje) ter proces, ki vključuje celično smrt z apoptozo (Hanahan in Weinberg, 2011).

Sprožitev angiogeneze je tudi ena izmed glavnih sposobnosti raka. Med embriogenezo razvoj ožilja vključuje nastajanje novih endotelijskih celic in njihovo sestavljanje v cevke (vaskulogeneza) ter poganjanje novih žil iz že obstoječih (angiogeneza). Pri odraslih v normalnem stanju je angiogeneza aktivna le prehodno, pri fizioloških procesih, kot sta celjenje ran in ženski reproduktivni cikel. Vendar je v nasprotju z normalnim delovanjem v času napredovanja raka "angiogensko stikalo" skoraj vedno aktivno. Ta aktivnost povzroča, da običajno mirujoče ožilje nenehno poganja nove žile, ki pomagajo preživljati raka z zagotavljanjem hranič in kisika ter odvajanjem ogljikovega dioksida in drugih presnovnih odpadkov (Baeriswyl in Chrisofori, 2009).

Napredovanje raka do višjih patoloških razredov malignosti se odraža v aktivaciji invazije in metastaziranju, pri čemer se običajno razvijejo spremembe tako v obliki pripadajočih rakavih celic, kot tudi v njihovi pritrjenosti na druge celice in na zunajcelični matriks (ECM). Invazijsko-metastatska kaskada se začne z lokalno invazijo, nadaljuje z intravazacijo rakavih celic v bližnje krvne in limfne žile, čemur sledi limfogeni ali hematogeni razsoj rakavih celic po telesu. Sledi izhod iz notranjosti žil v parenhim oddaljenih tkiv, kjer se oblikujejo majhni vozlički rakavih celic (metastaze), kar končno povzroči razrast mikrometastatskih lezij v makroskopske tumorje (kolonizacija) (Hanahan in Weinberg, 2011).

Pri razvoju raka je pomembno reprogramiranje presnove v prid podpore neprekinjeni celični rasti in delitvi. V aerobnih razmerah (normoksija) normalne celice predelajo glukozo preko glikolize v citosolu najprej do piruvata in potem v mitohondrij do ogljikovega dioksida. V anaerobnih razmerah pa je favorizirana glikoliza in tako v mitohondrij preide relativno malo piruvata. Rakave celice večinoma proizvajajo energijo z visoko stopnjo glikolize (200-krat višja hitrost glikolize kot v normalnem izvornem tkivu), pri čemer je kljub izdatnim količinam prisotnega kisika v okolju končni produkt mlečna kislina (v obliki laktata). Ta pojav se imenuje "aerobna glikoliza" (Warburg; 1956).

Različne učinkovine (npr. rastni dejavniki, ki vzdržujejo proliferativno signalizacijo, ECM-modificirajoči encimi, ki olajšajo angiogenezo, invazijski, metastatski in induksijski signali) spodbujajo napredovanje raka. Tudi povečana proizvodnja laktata, ki je povezana s sproščanjem protonov iz celic in zniževanjem pH, pripomore k razgradnji ECM. Rak se aktivno umika napadu in odstranjevanju s strani celic imunskega odziva, še posebej pred limfociti B in T, makrofagi in celicami naravnimi ubijalkami (Hanahan in Weinberg, 2011).

Vse te značilnosti omogočajo rakavim celicam proliferacijo in razširjanje. Pri tem jim pomaga razvoj mutabilnosti. Ta generira naključne mutacije, ki predstavljajo veliko prednost raka (Berdasco in Esteller, 2010).

2.3 INVAZIVNOST IN METASTAZIRANJE

2.3.1 Definicija metastaziranja

Kljud skoraj 200 let raziskav na tem področju je proces metastaziranja raka še vedno sporen. Termin metastaziranje je skoval Jean Claude Recamier leta 1829 in je definiran kot prenos bolezni iz enega organa oz. dela do drugega organa, ki ni direktno povezan z mestom izvora bolezni. To je lahko posledica prenosa patogenega organizma ali prenosa celic malignih tumorjev. Metastaziranje vključuje sprostitev rakavih celic iz primarnega raka, njihovo razširjanje do oddaljenih lokacij, zadrževanje v mikrocirkulaciji organov, ekstravazacijo in infiltracijo v stromo teh organov ter preživetje in razrast v novega raka (Nguyen in sod., 2009).

2.3.2 Definicija migracije in invazije

Migracija je krovni izraz, ki se v biologiji uporablja za opis katerega koli usmerjenega gibanja celic, ki spreminjajo položaj znotraj tkiv ali med različnimi organi. V patologiji je *invazija karcinoma* opredeljena kot prodiranje malignih tumorskih celic skozi tkivne pregrade, kot sta prehod bazalne membrane in infiltracija (vdor) v temeljna intersticijska tkiva. Migracija in invazija sta jasno ločena termina tudi v eksperimentalni celični biologiji. *Migracija* je definirana, kot usmerjeno gibanje celic na substratih, kot so bazalne membrane, vlakna ECM in plastične plošče, zato se migracija dogaja na dvodimensionalnih površinah, medtem, ko *invazija* pomeni premikanje skozi trodimenzionalno matrico. Da celica to lahko doseže, mora prilagoditi svojo obliko in interagirati z ECM, ki po eni strani predstavlja podlago za pritrditev, po drugi strani pa pregrado za premikajočo se celico. To pomeni, da je sposobnost migracije predhodnik invazije. Celica ne more prodirati (invadirati) v okoliško tkivo, če ne migrira. Po drugi strani pa lahko migrira, ne da bi pri tem prišlo do invazije. Normalni procesi celične migracije/invazije so gastrulacija, morfogeneza med embrionalnim razvojem, razvejana morfogeneza (npr. kanali dojk), razvoj živčnega sistema, vaskularno brstenje, razvoj placente in celjenje ran oziroma kopiranje imunskih celic na mestu vnetnega odziva (Kramer in sod., 2013).

2.3.3 Definicija metastatskega potenciala

Beseda potencial (iz lat. *potentia* "moč") pomeni sposobnost razvoja; še neizkorisčene možnosti. Metastatski potencial je potencial rakavih celic, da uspešno migrirajo, invadirajo in rastejo na drugi lokaciji, kot je izvor raka. Različni tipi raka imajo različen metastatski potencial in ta razlika je lahko signifikantna pri zdravljenju. Nekateri tipi raka so bolj

nagnjeni k agresivnosti in metastaziranju – ti raki imajo višji metastatski potencial. Večina sarkomov (rak, izvirajoč iz tkiv, kot so mišice, maščoba, kosti, krvne žile, koža in podobno) je slabo diferencirana z visokim metastatskim potencialom, kar zahteva agresivno zdravljenje. Tudi če ob začetnem zdravljenju ne zaznamo metastaz, lahko predvidevamo, da obstajajo mikroskopske metastaze v jetrih in pljučih. Tudi dva raka istega tipa lahko izkazujeta različen metastatski potencial. Ta razlika se po navadi odraža v nižji celični diferenciaciji, kar je indikator za višji metastatski potencial (Edelstein, 2014, str. 64–65).

2.3.4 Koraki razširjanja metastaz *in vivo*

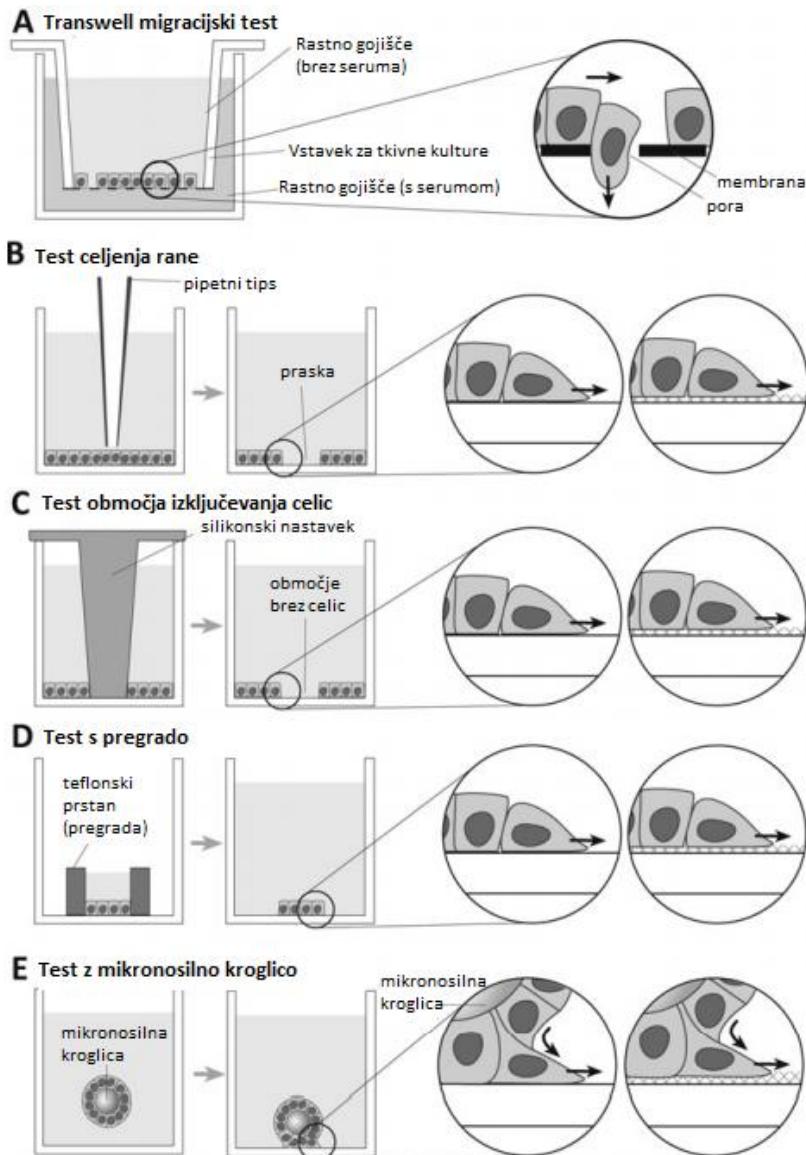
V bistvu so koraki oziroma dogodki, ki so potrebni za metastaziranje, enaki za vse maligne tumorje. Po začetni transformaciji neoplastične celice postopno in pogosto počasi rastejo. Za vaskularizacijo mora masa tumorja preseči od 1 do 2 mm premera. Obenem imata sinteza in izločanje angiogenih dejavnikov ključno vlogo pri vzpostavljanju žilnega omrežja znotraj obdajajočega tkiva gostitelja. Lokalna invazija rakavih celic v stromo se lahko zgodi na dva načina: i) prvi način ne vključuje vraščanja v žile; ii) drugi način vključuje vraščanje preko tankostenskih venul in limfnih kanalov, ki ponujajo le malo odpora invaziji rakavih celic. Sledita odlepljanje in embolizacija rakavih celičnih agregatov, ki se lahko povečajo z interakcijo s krvnimi celicami. Nato te embolije krožijo po limfnem in krvnem obtoku. Rakave celice, ki so preživele potovanje po limfnem in krvnem obtoku, se umestijo v kapilarno posteljo. Sledi njihova ekstravazacija. Mehanizmi ekstravazacije so podobni tistim, ki sodelujejo pri začetni invaziji tkiva. Rakave celice začnejo proliferirati znotraj parenhima organa, vzpostavijo vaskularizacijo in obrambo pred gostiteljskim imunskim odzivom. Nato ponovno uvedejo te procese za razvoj sekundarnih metastaz (metastaz iz metastaz) (Talmadge in Fidler, 2010).

2.3.5 Testi za oceno invazivnosti *in vitro* (migracijski testi)

Metastaze predstavljajo velik problem pri zdravljenju raka, ker jih ni mogoče predvideti in imajo zelo neugodne posledice za nadaljnji potek bolezni. Ravno zaradi tega je pomembno preučevanje molekulskih poti, ki poganjajo metastazno razširjanje. Ker je metastaziranje večstopenjski proces in traja mesece, če ne leta, je težko podati natančno klinično oceno, kar predstavlja ogromen izziv za raziskovanje protimetastaznih zdravil (Kramer in sod., 2013).

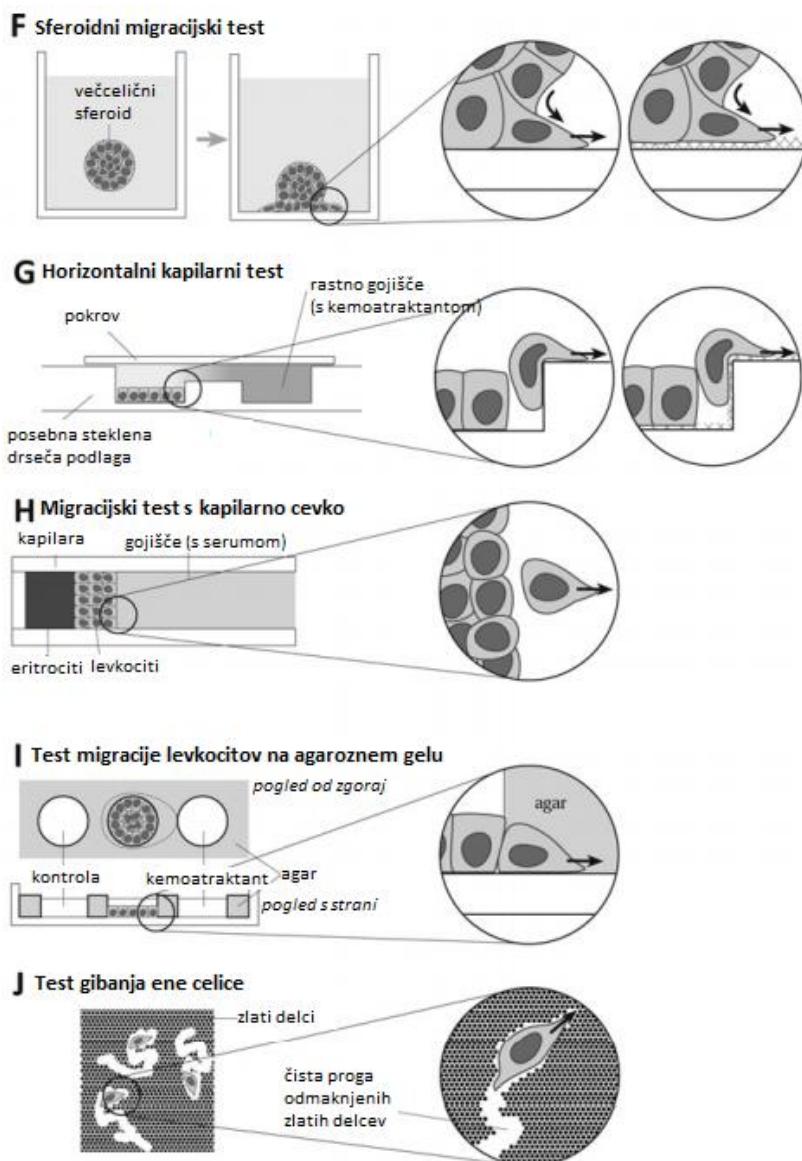
Za razvoj novih strategij v diagnozi raka, prognozi ter razvoju zdravil in zdravljenja sta zelo pomembni določitev migracijske in invazivne zmogljivosti rakavih in stromalnih celic ter razjasnitev osnovnih mehanizmov. Za oceno metastatskega potenciala (migracije in invazivnosti) z *in vitro* metodami se uporablja migracijski/invazijski testi. Glavni prednosti *in vitro* testov sta njihova relativno enostavna izvedba in visoka stopnja ponovljivosti. Omogočajo pregled in fenotipsko analizo med testom. So cenovno ugodnejši kot *in vivo* eksperimenti in ne povzročajo etičnih zadržkov (Wolf in sod., 2009).

Obstaja več različnih testov za določevanje migracijskega potenciala celic. Ti testi lahko obsegajo tako zelo enostavne in poceni kot tudi tehnično zahtevne in drage rešitve. Vendar je primernost specifične metode odvisna od določenega tipa celic ali specifičnega raziskovalnega vprašanja. Na slikah 2 in 3 so prestavljeni in upodobljeni najpogosteje uporabljeni testi.



Slika 2: SHEME POGOSTO UPORABLJENIH MIGRACIJSKIH TESTOV 1. del (Kramer in sod., 2013).

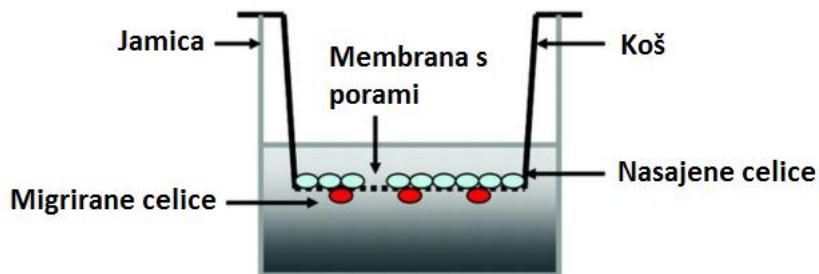
Pregled tehnične postavitev je shematično narisana za vsak test. Podan je tudi približan pogled (znotraj krogov). Puščice kažejo smer celičnega gibanja. Črtkane črte simbolizirajo ECM. **A:** Migracijski test Transwell (Boydenov koš). Upodobljena je migracija celice skozi poro. **B:** Test celjenja rane. Postrganje celic (s pipetnim tipsom) z gostega monosloja povzroči nastanek območja brez celic. Približan pogled ponazarja, da lahko celice nasajamo na plastično ali stekleno površino ali na površino, prekrito z ECM (črtkana črta). **C:** Test območja izključevanja celic (migracijski test Platypus). Območje brez celic zagotovimo ob nasajanju z uporabo silikonskih zaviralcev (ki preprečijo pritrditev), ki jih odstranimo pred začetkom eksperimenta. **D:** Test s pregrado. Celice nasadimo znotraj okrogle plastične naprave, ki se postavi na celično kulturno posodo. Ko so celice pritrjene, se krog odvzame in celice migrirajo z okroglega območja k neporaščeni okolici. Migracijo merimo kot povečanje območja, pokritega z migriranimi celicami. **E:** Test z mikronosilno kroglico. Mikronosilne kroglice konfluentno prekrijemo s celicami, jih položimo v celično kulturno posodo in inkubiramo. Celice se s kroglice pritrdijo na podlago posode in izvajajo radialno premikanje, katerega dolžino lahko izmerimo.



Slika 3: SHEME POGOSTO UPORABLJENIH MIGRACIJSKIH TESTOV 2. del (Kramer in sod., 2013).

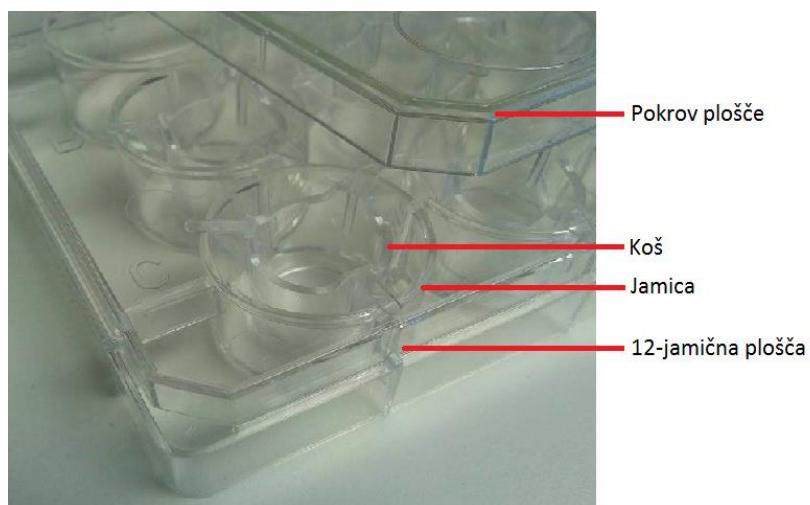
F: Sferodni migracijski test. Proizvedemo večcelične sferoide (skupke celic) določenega celičnega tipa in jih prestavimo v celično kulturno posodo. Skupki se pritrđijo na podlago in celice se začnejo koncentrično premikati navzven. Povečanje v območju širjenja lahko izmerimo glede na čas. **G:** Horizontalni kapilarni test (Dunnov koš, Zigmondov koš). Celice migrirajo vzdolž stabilnega gradiента kemoatraktanta skozi tanko premostitveno kapilaro. **H:** Migracijski test s kapilarno cevko. V majhnih kapilarah levkociti migrirajo izven plasti belih krvničk naproti serumu. Dolžino migracije celic lahko izmerimo direktno. **I:** Test migracije levkocitov na agaroznem gelu. Izdolbemo luknjice določene velikosti iz agaroznega gela. V eno od teh luknjic nasadimo levkocite, ki migrirajo pod agarozno plastjo k rezervoarju gojišča, ki vsebuje kemoatraktant (repelent), medtem ko migracija h gojišču služi kot kontrola. Območje migracije je vidno (črtkana črta) in dolžino migracije lahko določimo. **J:** Test gibanja ene celice. Normalne celične kulture plošče predinkubiramo s koloidnimi zlatimi delci. Zatem zgoraj nasadimo celice v nizki koncentraciji. Na svoji poti čez ploščo celice odmaknejo zlate delce in pustijo čiste proge, ki jih lahko izmerimo.

2.3.5.1 Migracijski test Transwell (angl. *Boyden Transwell test*)



Slika 4: Shema koša Transwell v jamici, ki smo ga uporabili za določitev migracijskega potenciala celic B16F1/B16F10.

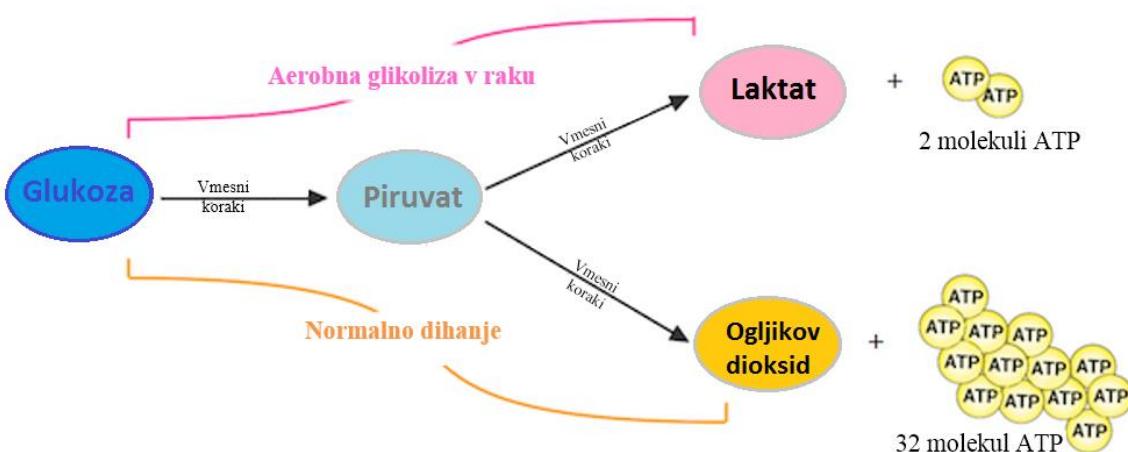
Migracijski test Transwell je prvi predstavil Boyden za analizo kemotaktičnih odgovorov levkocitov, zato se tudi imenuje po njem. Za tem so se razvile verzije, ki so izboljšane, poenostavljene in primerne za enkratno uporabo. Princip testa temelji na dveh gojiščih, ki ju ločuje komora (koš) s porozno membrano, skozi katero lahko celice migrirajo. Velikost celic določa velikost por v membrani. Pomembno je, da je premer pore manjši kot premer celice, da preprečimo nespecifično padanje celic. Membrane imajo lahko premer por od 3 do 12 μm . Največkrat celice nasadijo na zgornji del membrane v koš, tako da migrirajo vertikalno v spodnji predel, kjer je v gojišču prisoten atraktant ali višja koncentracija seruma. Za detekcijo in kvantifikacijo migriranih celic uporabljamo dve metodi. Pri prvi metodi celice fiksiramo na membrano, pobarvamo in preštejemo. Celice, ki niso migrirale, odstranimo z vatirano palčko. Pri drugi metodi pa celice pobarvamo s fluorescentnim barvilom, odlepimo od membrane (tripsiniziramo) in kvantificiramo s fluorescentnim čitalcem (Kramer in sod., 2013).



Slika 5: Fotografija 12-jamične plošče z migracijskimi koši Transwell z 0,8- μm membrano.

2.4 PRESNOVNE SPREMEMBE PRI RAKAVIH CELICAH

Celična presnova opisuje znotrajcelične kemijske reakcije, ki pretvarjajo hranila in endogene molekule v energijo in makromolekule (beljakovine, nukleinske kisline in lipide), ki vzdržujejo življenje. Adenozin trifosfat (ATP) je energetsko bogata molekula, ki v pretežni meri nastaja po dveh poteh, in sicer pri glikolizi in pri oksidativni fosforilaciji. Pri glikolizi se glukoza pretvori v piruvat, ob tem se sprostita dve molekuli ATP. Nastali piruvat se nato preusmeri v Krebsov cikel (CTK) v mitohondriih. Ko je stopnja kisika nizka ali če celica nima mitohondrijev, poteka anaerobna glikoliza, pri kateri se glukoza presnovi do piruvata in nato do laktata (Kaelin in Thompson, 2010).



Slika 6: Celično dihanje in glikoliza (Samarasinghe, 2016).

V procesu glikolize v rakavih celicah (roza pot) se glukoza pretvori v piruvat in do končnega produkta mlečne kisline. Ob tem se proizvedeta le dve molekuli ATP. V nerakavih celicah z normalno respiracijo (oranžna pot) glukoza popolnoma razpade v piruvat, ki se nadalje pretvori v ogljikov dioksid. Ob tem nastane 32 molekul ATP.

Otto Warburg je prvi opazil, da hitro proliferirajoče rakave celice privzemajo glukozo v prenenljivo visokih koncentracijah v primerjavi z normalnimi celicami in rajši izločajo ogljik, izhajajoč iz glukoze, v obliki laktata, kot pa da bi ga popolno oksidirale, čeprav živijo v okolju obogatenem s kisikom (normoksijo). Ta pojav imenujemo "Warburgov pojav". Do tega pojava pride iz več razlogov, med drugim, ker ima visoka glikolitična stopnja veliko prednosti za proliferirajoče celice. Zanimivo je, da so pokazali, da glioblastomske celice pretvorijo več kot 90 % privzete glukoze v laktat (DeBerardinis in sod., 2007)

Glikoliza celicam omogoča izkoristek bogatega ekstracelularnega hranila glukoze za proizvodnjo energetsko bogatega ATP. Čeprav je izkoristek proizvedenega ATP na privzeto glukozo nizek, lahko odstotek celičnega ATP, proizvedenega iz aerobne glikolize, preseže tistega, proizvedenega iz oksidativne fosforilacije, če je glikolitični tok dovolj visok. To je lahko posledica višje stopnje hitrosti proizvodnje ATP med glikolizo v primerjavi z oksidativno fosforilacijo. Razgradnja glukoze zagotavlja celicam tudi vmesne spojine

(intermediate), potrebne za biosinteze poti, vključno z riboznimi sladkorji za nukleotide, glicerolom in citratom za lipide, neesencialnimi aminokislinami in preko oksidativne pentoza fosfatne poti NADPH. Nadaljnja prednost visoke glikolitične stopnje je, da celicam omogoča izpopolnitev biosinteznih poti, ki uporabljajo vmesne spojine, pridobljene iz presnove glukoze. Tako Warburgov pojav koristi obema, visoki potrebi po energiji in biosintezi (DeBerardinis in sod., 2008; Kaelin in Thompson, 2010).

Obstaja več razlogov, zakaj povečana poraba glukoze za glikolitično proizvodnjo ATP ali anabolne reakcije pomeni prednost za rast raka (Kroemer in Pouyssegur, 2008):

1. V pogojih aerobne glikolize lahko rakave celice živijo v hipoksičnih razmerah (zaradi oddaljenosti krvnih žil), ki bi bile drugače smrtonosne za celice, ki se zanašajo na oksidativno fosforilacijo, da ustvarijo ATP;
2. Rakave celice proizvajajo laktat, ki je končni glavni produkt aerobne glikolize. Takšno kislo okolje je ugodnejše za invazijo raka in hkrati omogoča zaviranje protirakovih imunskih efektorjev (protiteles);
3. Rakave celice lahko presnavljajo del glukoze skozi pentoza-fosfatno pot (PPP), da proizvajajo NADPH, ki jim predstavlja antioksidantno obrambo in je potreben pri anabolnih procesih, kar omogoča preživetje rakavih celic v neugodnem mikrookolju ali pri izpostavitvi kemoterapevtskim učinkovinam;
4. Rakave celice uporabljajo intermediate glikolitične poti za anabolne reakcije (npr. glukoza 6-fosfat za sintezo glikogena in riboze 5-fosfat, dihidroksiacetonfosfat za sintezo trifliceridov in fosfolipidov ter piruvat za sintezo alanina in malata).

2.5 URAVNAVANJE PRESNOVE PRI RAKAVIH CELICAH

Konstitutivna aktivacija signalne poti PI3K/Akt/mTOR (fosfoinozitid 3-kinaza/protein kinaza B/mehanistična tarča rapamicina) je povezana z napredovanjem tumorja, odpornostjo na zdravljenje in na splošno s slabšo prognozo. Večino presnovnih sprememb nadzirajo specifični transkripcijski programi. Nedavne raziskave kažejo, da je aktivacija s hipoksijo induciranega faktorja (HIF) pri raku običajna posledica različnih mutacij. HIF stimulira izražanje glikolitičnih encimov in zmanjša odvisnost od mitohondrijske oksidativne fosforilacije v rakavih celicah. Poleg tega, so nedavna prizadevanja povezala enega izmed glavnih presnovnih regulatorjev, tj. z AMP aktivirano protein kinazo (AMPK), z mnogimi človeškimi tumorskimi supresorji (npr. LKB1 - jetrna kinaza B1). Obetajo se različne terapevtske strategije, ki temeljijo na modulaciji AMPK, HIF in drugih presnovnih tarč, ki izkoriščajo odvisnost rakavih celic od povišanega privzemanja glukoze in glikolize (Shaw, 2006).

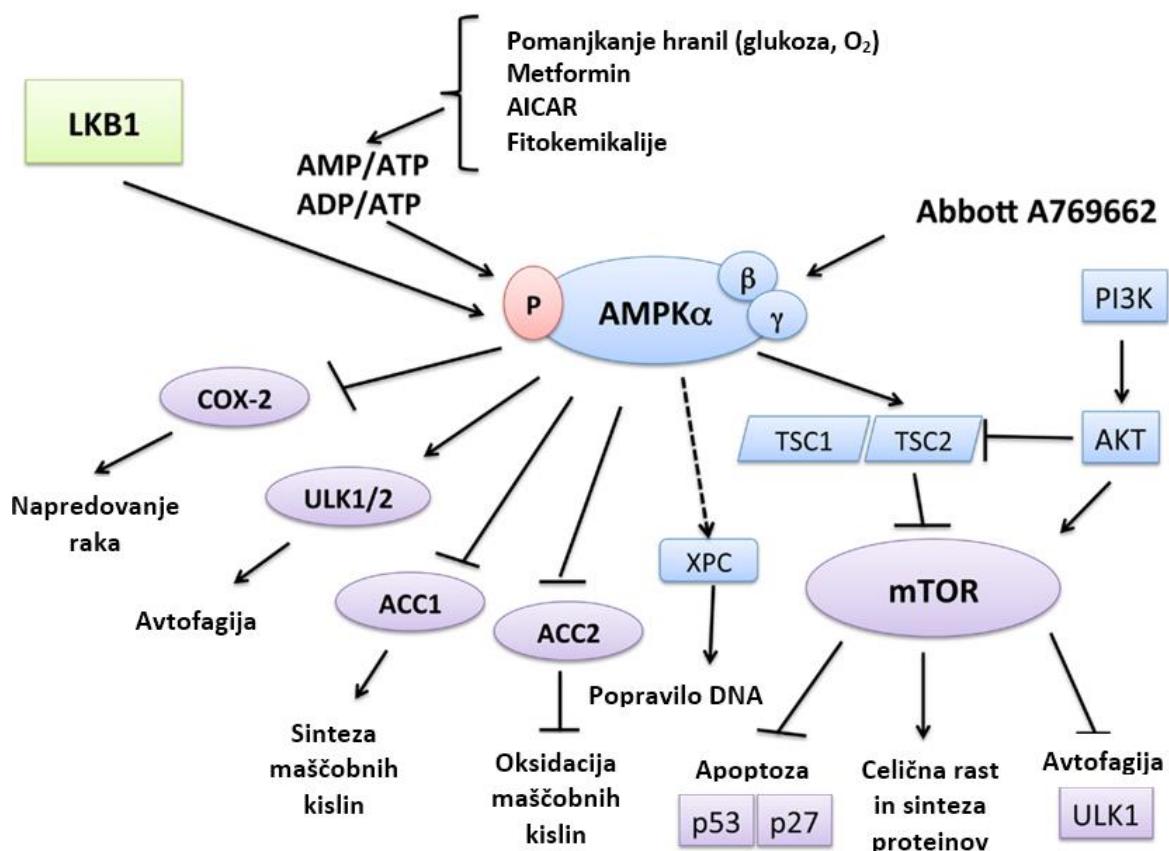
Eden izmed najbolj preučevanih onkogenskih učinkov v melanomu je mutacija onkogena BRAF, ki je proteinska kinaza, ki deluje v signalni transduksijski poti MAPK. Mutacije gena BRAF so prisotne v več kot 50 % melanomov, najbolj pogosta zamenjava (subtiticija) je

valin v glutaminsko kislino na 600-tem ostanku (V600E) (Abildgaard in Guldberg, 2015). Pomembna lastnost rakavih celic je sposobnost zatrepi kontrolno točko energetskega stresa z LKB1 in AMPK. V normalnih celicah ta signalna pot služi kot ključni mehanizem za zaviranje rasti celic in proliferacije v razmerah energetskega stresa. BRAF^{V600E} dokazano izključi to signalno pot s fosforilacijo na LKB1 in AMPK se posledično ne more aktivirati (Zheng in sod., 2009).

2.5.1 Z AMP aktivirana protein kinaza

Presnovne kontrolne točke in signalno-transdukcijske poti, ki uravnavaajo aerobno glikolizo (Warburgov pojav) med rakotvorbo, ter njihov pomen v napredovanju raka so slabo opredeljeni. Vendar je dokazano, da AMPK kot senzor celičnega energijskega statusa negativno uravnava aerobno glikolizo v rakavih celicah in zavira rast raka *in vivo*. AMPK je visoko ohranjen Ser/Thr proteinski kinazni kompleks, ki igra središčno vlogo pri regulaciji energijske homeostaze v celici. AMPK se *in vivo* aktivira kot odgovor na potencialno ali dejansko pomanjkanje energije in deluje tako, da sprejema odločitev razporeditve hranil k energijsko proizvodni (katabolni) ali k rast spodbujajoči presnovni (anabolni) poti. Skratka, aktivira se kot odgovor na presnovne strese, ki povečujejo razmerje AMP–ATP, bodisi da dvigajo presnovo ATP ali posegajo v katabolno proizvodnjo ATP. AMPK povrne energijsko ravnotesje z aktivacijo procesov, ki proizvajajo energijo, medtem ko zavira tiste, ki porabljajo energijo (Faubert in sod., 2012).

AMPK je heterotrimerni kinazni kompleks, ki je sestavljen iz katalitične α -podenote in dveh regulatornih podenot β in γ . AMPK γ ima tri funkcionalna nukleotidna vezavna mesta (mesto 1, 3 in 4), ki izmenično vežejo ATP, ADP in AMP. Vezava AMP ali ADP na γ -podeno kompleksa AMPK spodbuja povečano kinazno aktivnost α -podenote in fosforilacijo na Thr-172 z navzgor reguliranimi kinazami. Aktivacija AMPK zavira anabolne presnovne poti, ki porabljajo energijo, in spodbuja katabolne poti, pri katerih energija nastaja. Med drugim je glavni regulator sinteze lipidov, DNK in proteinov kot tudi celične migracije (Choudhury in sod., 2014).



Slika 7: Prikaz delovanja in regulacije AMPK, ki vodi v zmanjšanje raka (Kim in He, 2013).

LKB1 je konstitutivno aktivna in ves čas fosforilira AMPK, vendar se AMPK hkrati ves čas defosforilira. AMPK se aktivira, ko se razmerje med AMP-ATP ali ADP-ATP poveča zaradi različnih fizioloških stresov, kot sta hipoglikemija ali hipoksija. Ko se poveča koncentracija AMP, se ta veže na AMPK (podenota γ). Vezava aktivira AMPK alosterično in z inhibicijo defosforilacije. AICAR deluje tako, da se v obliki ZMP veže na enako vezavno mesto kot AMP. Metformin pa povzroči dvig koncentracije AMP, ker zavre oksidativno fosforilacijo. Med drugim AMPK aktivira katabolne poti, kot je oksidacija maščobnih kislin. Fosforilacija AMPK vodi do inaktivacije acetil CoA karboksilaze (ACC2). Po drugi strani pa AMPK inhibira anabolne poti, kot je sinteza maščobnih kislin, ki je nadzorovana s strani ACC1. Ena najbolj poznanih poti AMPK je preko kompleksa TSC1/TSC2, ki vodi do nižje ravni izražanja mTOR, ki jo je prav tako mogoče aktivirati preko signalne poti PI3K-AKT. Pot mTOR zavira apoptozo z učinkovanjem na tumorske zaviralce p53 in p27 ter zavira avtofagijo z utišanjem ULK1.

Aktivacija AMPK predstavlja pomembno tarčo za razvoj zdravil za zdravljenje presnovnih motenj, kot so odpornost na inzulin, debelost, kardiovaskularne bolezni, sladkorna bolezen tipa II in tudi rak (Horman in sod., 2012). Spojine, ki aktivirajo AMPK, bi se potencialno lahko uporabljale kot zdravila proti raku. AMPK agonisti, ki smo jih preučevali, so metformin, 2DG, A-769662 in AICAR.

2.5.2 Aktivatorji AMPK

2.5.2.1 Metformin

Zanimanje za potencialno uporabnost bigvanidov za zdravljenje neoplastičnih bolezni so znanstveniki vzbudili leta 2005, ko so prvič opisali, da je pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa II, ki se zdravijo z metforminom, pojavnost raka signifikantno nižja kot pri pacientih, zdravljenih z drugimi zdravili (Evans in sod., 2005). To ni vodilo samo do nadaljnjih raziskav v farmakoepidemiologiji, ampak tudi do laboratorijskih študij. Metformin je prvovrstno peroralno zdravilo za sladkorno bolezen tipa II. Trenutno obstajata dve osrednji hipotezi, ki pojasnjujeta antiproliferativne učinke metformina na rakave celice: i) metformin deluje posredno na rast rakavih celic z zniževanjem sistemskega inzulina in inzulinu podobnega rastnega faktorja 1 (IGF-1) preko zaviranja delovanja jetrne glukoneogeneze, s čimer zatira rast rakavih celic, ki so odvisne od insulina/IGF-1; ii) metformin deluje neposredno na rakave celice. Pri tem naj bi bil še posebej pomemben mehanizem zaviranja kompleksa I v mitohondrijski elektronski transportni verigi. Pri podkrepitvi druge hipoteze so pokazali, da metformin zavira oksidativno fosforilacijo (OXPHOS) in s tem spodbuja zvišanje razmerja med znotrajceličnima AMP in ATP, kar posledično indirektno aktivira energijski senzor AMPK. Tako celica upočasni porabo energije in pospeši njeno nastajanje. Še vedno pa ni znan natančen mehanizem, s katerim metformin inhibira kompleks I (Vincent in sod., 2014; Griss in sod. 2015). Prav tako ni jasno, ali so *in vitro* študije, ki so pokazale delovanje metformina z zaviranjem kompleksa I mnogokrat uporabile visoke (1 mM – 20 mM) koncentracije metformina, fiziološko relevantne. Nekateri raziskovalci so posredno sklepali, da bi se lahko metformin kopičil v celici zaradi svojega naboja, vendar direktnega dokaza za to ni. Zadnje študije kažejo, da je bolj verjetna prva hipoteza, torej da je ključno delovanje metformina na hepatocite z zmanjšanjem glukoneogeneze; nadaljnje študije bodo to hipotezo dokončno potrdile ali ovrgle (Madiraju in sod., 2014).

Raziskovanje potencialnih indikacij metformina v onkologiji je privlačno, ker je zdravilo poceni in relativno varno. Zdi se tudi, da vsaj deloma vpliva na energijsko presnovo, ki pa je tema raka, ki privlači vse več pozornosti. Poleg tega naj bi imel metformin še učinke proti staranju in kalorične restrikcije, ki vključujejo mehanizme, ki so relevantni tudi pri antineoplastičnem učinku (Pollak, 2012).

2.5.2.2 AICAR

Adenozidni analog 5-aminoimidazol-4-karboksamid- β -D-ribofuranozid (AICAR) je pogosto uporabljen aktivator AMPK. Celica privzame AICAR in pretvori adenozin kinazo do monofosforiliranega nukleotida ZMP, ki se direktno veže na podenoto γ in aktivira AMPK (Benziane in sod., 2009). Različne študije so pokazale, da lahko AICAR zavira rakavo celično proliferacijo (Guo in sod., 2009).

2.5.2.3 2-deoksi-D-glukoza

Glukozni analog 2-deoksi-D-glukoza je aktivator AMPK, ki vpliva na fosforilacijo stanj kompleksa tuberozne skleroze 2 (TSC2). Poleg aktivacije AMPK deluje 2DG tudi kot glikolizni inhibitor, ki učinkuje kot kompetitivni zaviralec transporta glukoze, ker si z glukozo deli iste transporterje, in kot inhibitor heksokinaze. 2DG se fosforilira s heksokinazami in oblikuje 2DG-6-fostfat, ki se ne presnavlja naprej v glikolizni poti in jo s tem zavira. Celico tako prikrajša za energijo. To spojino raziskujejo v eksperimentalnih kliničnih študijah, kjer so med drugim pokazali, da jo pacienti dobro prenašajo (Bénéteau in sod., 2012).

Učinkovito zaviranje proizvodnje laktata ima obetavno vlogo pri preprečevanju odpornosti raka na zdravila, ki jih zakisano mikrookolje rakavih celic onesposablja. Ker se nivo ATP ob zdravljenju z 2DG zniža, od ATP odvisne črpalke, ki izločajo citotoksična sredstva, prenehajo delovati, kar vodi v znotrajcelično akumulacijo zdravil in celično smrt. Ker rakave celice uporabljajo 2DG na enak način kot glukozo, je možno, da celice, ki so večje porabnice glukoze, sprožijo lastno smrt z akumulacijo 2DG. 2DG med drugim tudi zvišuje oksidativni stres, inhibira N-glikolizacijo in povzroča avtofagijo. Učinkovito lahko upočasni rast celic in posledično olajša apoptozo pri določenih rakavih celicah (Zhang in sod., 2014).

2.5.2.4 Spojina A769662

Majhna molekula A769662 je dobro raziskan in opisan direktni aktivator AMPK, ki ga stimulira z alosteričnim delovanjem in obenem obrani aktivno (fosforilirano) AMPK α na Thr172 pred defosforilacijo, z interakcijo na podenoti β 1 (Ducommun in sod., 2014).

2.5.3 Inhibitor AMPK

2.5.3.1 Spojina C

Spojina C (6-[4-(2-piperidin-1-iletoksi)fenil]-3-piridin-4-ilpirazolo[1,5-a]pirimidin), imenovana tudi dorzomorfin, je trenutno edini inhibitor AMPK, ki dobro prehaja skozi celično membrano. Ugotovili so, da spojina C deluje citotoksično naproti rakavim celicam in inhibira številne druge kinaze poleg AMPK (Liu in sod., 2014).

2.5.4 Dikloroacetat (DCA)

Dikloroacetat ima protirakov vpliv, ker zavira Warburgov pojav (Sun in sod., 2011). Ta strukturno enostaven in oralno biološko razpoložljiv dejavnik so znanstveniki obširno študirali v kliničnih študijah laktacidoze, kjer so pokazali, da je relativno skromno toksičen (Stockwin in sod., 2010). DCA inhibira mitohondrijski encim piruvat dehidrogenaza kinaza (PDK), tako da aktivira piruvat dehidrogenazo (PDH). Piruvat v citoplazmi lahko dokonča

glikolizo s proizvodnjo laktata, poleg tega pa lahko vstopi tudi v anaplerotične in različne aminokislinske biosinteze poti. PDH je nadzorni encim, ki oksidira piruvat do acetila-CoA, ko vstopi v mitohondrijski matriks. Ob tem se poveča oksidacija glukoze, medtem pa se glikoliza zmanjša. DCA tako lahko služi kot dobra tarča zdravljenja raka skozi presnovo. Predhodne raziskave so že pokazale, da 5 mM DCA zmanjša rast raka *in vitro* in *in vivo* brez vpliva na nerakave mitohondrije in tkiva (Michelakis in sod., 2010).

Predlog dikloroacetata, inhibitorja PDK, kot potencialnega zdravila za raka je zelo pomemben. Vendar obseg, s katerim DCA moti rast rakavih celic in osnovni mehanizem njegovega delovanja, nista znana. V raziskavah so pokazali, da farmakološko relevantni odmerki različno vplivajo na rakave celice in le pri nekaterih linijah povzročajo zaviranje rasti *in vitro* (Niewisch in sod., 2012).

2.6 MIKROOKOLJE RAKAVIH CELIC

2.6.1 Mikrookolje v tkivu

Maligne lastnosti rakavih celic je nemogoče razumeti brez medsebojnega odnosa rakavih celic in njihovega lokalnega okolja. Tumorski infiltrat sestavljajo različni podtipi levkocitov (imunske in vnetne celice), angiogene žilne celice, limfne endotelijske celice, z rakom povezane fibroblastne celice ter mezenhimske matične celice, izvirajoče iz kostnega mozga; vse skupaj aktivno prispeva k napredovanju raka. Sposobnost spremembe tega okolja je pomembna lastnost, na podlagi katere so rakave celice sposobne pridobiti nekatere glavne značilnosti za razrast raka in metastazno razširjanje. Zato bo postalo terapevtsko ciljanje na mikrookolja raka v kliničnem okolju zelo pomembno. Raznolikost stromalnih celic, kompleksnost molekularnih sestavin strome raka in podobnost z normalnim tkivom predstavljajo velik izziv pri razvoju terapije. Tudi necelični del mikrookolja raka je pomemben regulator razvoja raka. Poleg drugih stvari so pomembni sestavnici deli okolja raka, ki vplivajo na njegovo preživetje, molekule ECM (zunajceličnega matriksa) ter fizikalni in kemijski parametri, kot so pH, koncentracija kisika, intersticijski tlak in tok tekočine. Specifične modifikacije v mikrookolju raka jamčijo maligne lastnosti rakavih celic, ki na koncu pripeljejo do metastatskega razširjanja, ki ostaja glavni vzrok smrti bolnikov z rakom. Za izboljšanje terapije raka bo potrebno boljše razumevanje tega kompleksnega sistema (Sounni in Noel, 2013).

Rakave celice proizvajajo 40-krat več laktata kot normalne celice, zato ima laktat v mikrookolju raka zelo pomembno vlogo. Kot posledica Warburgovega pojava, rakave celice znižujejo ekstracelularni pH na 6,0 – 6,5. Laktat prispeva k acidozi, ki pri nekaterih rakih sproža metastaziranje, k signalom za angiogenezo, deluje kot presnovno gorivo za rakave celice in povzroča imuno supresijo (Romero-Garcia in sod., 2016).

2.6.2 Sestava gojišč za kulture rakavih celic v primerjavi z razmerami v tkivu

Ustrezno gojišče predstavlja najpomembnejši del umetnega celičnega okolja, saj celicam zagotavlja potrebna hranila, rastne faktorje in hormone ter uravnava pH in osmolarnost okolja. Optimalna sestava gojišča se razlikuje med celičnimi linijami. Osnovno gojišče je sestavljeno iz osnovnega gojišča in dodatka seruma. Možni ostali dodatki so na primer L-glutamin, antibiotiki, neesencialne aminokisline, antibiotiki za selekcijo, rastni faktorji, glukoza in drugi.

Rakavim celicam pogosto manjkajo proteini, ki supresirajo tumorje (npr. p53 ali LKB1 proteini), ki imajo sposobnost, da prilagodijo celico na upad oskrbe z hranili, zato razvijejo odvisnost od privzema glukoze ali/in glutamina (Kaelin in Thompson, 2010).

2.6.2.1 Glukoza

Glukoza je monosaharid, sestavljen iz ene enote ($C_6H_{12}O_6$), ki obstaja v različnih stereoizomernih oblikah in kot linearne ali ciklične molekule. D-glukoza je naravna oblika, ki jo živalske celice oziroma heterotrofi lahko izkoriščajo za pridobivanje energije v anaerobnih in aerobnih razmerah. Količina glukoze v celičnih gojiščih sega od 1 g/L (5,5 mM), ki se približuje normalni ravni sladkorja v krvi *in vivo*, vse do 10 g/L (55 mM), kar mnogo presega fiziološke vrednosti v krvi. Koncentracije glukoze na tešče nad 7 mM so analogne stanju sladkorne bolezni. Koncentracija glukoze je pomembna, ker se isti procesi, ki lahko vplivajo na celice in molekule *in vivo*, pojavijo tudi *in vitro* (Glucose in Cell ...).

2.6.2.2 Glutamin

L-glutamin je semi-esencialna aminokislina, ki je pri fiziološkem pH v tekočem gojišču nestabilna. Koncentracija L-glutamina se v celičnih gojiščih giblje od 0,5 mM do 10 mM. Najbolj tipična koncentracija za tkivno inženirstvo je 2 mM (L-Glutamine ...).

Rakave celice so v primerjavi z običajnimi celicami potratne, saj uporabljajo nesorazmeren delež hranil v svojem okolju. Deloma gre za to, da presnavljajo glukozo z aerobno glikolizo, poleg tega pa zelo učinkovito izrabljajo glutamin, ki je poleg glukoze najpogosteje hranilo v plazmi. V normalnih celicah se glutamin uporablja, da donira aminske in amidne skupine za sintezo aminokislin ter dušik za *de novo* tvorbo nukleotidov. Vendar rakave celice nasprotno od normalnih kot odpadni snovi izločajo znatno frakcijo dušika, pridobljenega z glutaminom, in ogljik, namesto da bi ju vključile v sintezo makromolekul (Kaelin in Thompson, 2010).

Glutamin je ključnega pomena za rast rakavih celic – nenormalno povečanje biomase je znak raka. Igra bistveno vlogo pri sprejemu esencialnih aminokislin, lahko ohranja Krebsov cikel ali cikel trikarboksilnih kislin, in podpira proizvodnjo NADPH-specifično malat dehirogenazo, ki je potrebna za biosintezo lipidov in nukleotidov (DeBerardinis in Cheng,

2010). Zato nekatere rakave celične linije razvijejo odvisnost od glutamina, čeprav je glutamin neesencialna aminokislina, ki se lahko sintetizira iz glukoze. Sedanje raziskave skušajo ciljati ravno na to glutaminsko odvisnost raka. Rešitev za to lahko predstavlja različne metode, kot so preprečevanje privzemanja glutamina rakavim celicam z različnimi inhibitorji in glutaminskimi transporterji, preprečevanje od glutamina odvisne anapleroze, inhibicija kompleksa I, ciljanje od glutamina odvisne aktivacije mTOR ali encimatsko zniževanje ravni glutamina v krvi (Wise in Thompson, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

Eksperimentalno delo smo izvajali v dveh različnih laboratorijih. Migracijske teste smo izvedli delno na Medicinski fakulteti na Inštitutu za patofiziologijo (PAFI), vse ostale poskuse smo izvedli v prostorih Fakultete za elektrotehniko, največ v laboratoriju za nano- in biotehnoške aplikacije.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Gojišča in kemikalije

2-deoksi-D-glukoza (Sigma, ZDA), založna raztopina pripravljena v PBS
A769662 (Abcam, Velika Britanija), založna raztopina pripravljena v DMSO
AICAR (Sigma, ZDA), založna raztopina pripravljena v PBS
CaCl₂ (Sigma, ZDA)
Dikloroacetat
D-Manitol (Sigma, ZDA)
Etanol (Sigma, ZDA)
Fetal bovine serum FBS (Sigma, ZDA)
Flurescein (Sigma, ZDA)
Glukoza (Sigma, ZDA)
Gojišče Dulbecco's modified Eagle medium (Sigma, ZDA)
Goveji serumski albumin BSA (Sigma, ZDA)
HEPES (Sigma, ZDA)
Hoechst 33342 (Promega, ZDA)
L-glutamin 200 mM (Sigma, ZDA)
Metformin (Merck Millipore, ZDA), založna raztopina pripravljena v PBS
MgCl₂ (Sigma, ZDA)
NaCl (Braun, Nemčija)
PBS (Sigma, ZDA)
Reagent za test MTS (angl. *Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega, ZDA)
Spojina C (Abcam, Velika Britanija), založna raztopina pripravljena v DMSO
Tripsin/EDTA (0,5 g tripsina, 0,2 g EDTA, 0,85 g NaCl) (Sigma, ZDA)
Raztopina tripanskega modrila (angl. *TrypanBlue solution*) (Invitrogen, ZDA)

3.1.2 Droben laboratorijski material

Avtomatske pipete: 100–1000 µL, 10–100 µL (Eppendorf, Nemčija) in 0,5–10 µL (Satorius, Nemčija)
Hemocitometer – Neubauerjeva komora (Sigma, ZDA)

Krovna stekla (Sigma, ZDA)
Mikrocentrifugirke 0,5 mL, 1,5 mL in 2 mL (Sarstedt, Nemčija)
Mikrotitrske plošče za gojenje celičnih kultur s 6, 12, 24 in 96 jamicami (TPP, Švica)
Nastavki za pipete (do 10, 200 ali 1000 µL) (Sarstedt, Nemčija)
Pinceta (Sigma, ZDA)
Pipetni nastavki (Sarstedt, Nemčija)
Pipetor (Gilson, Francija)
Polipropilenske centrifugirke 15 mL in 50 mL (Sarstedt, Nemčija)
Posode za gojenje celičnih kultur T25 cm², T50 cm² in T75 cm² (TPP, Švica)
Ročni potisni števec za štetje celic (Sigma, ZDA)
Siringe (Ico, Italija)
Sterilizacijski filter Minisart 0,2 (Sartorius, Nemčija)
Transwell permeable support z 12 jamicami s polikarbonatno membrano in 8-µm porozno membrano (Greiner BIO-ONE GmbH, Nemčija)

3.1.3 Laboratorijska oprema

Analitska tehnica (Methler Toledo, Švica)
Centrifuga Cetric 350 (Tehnica, Slovenija)
CO₂ inkubator (Kambič, Slovenija)
Fluorescentni mikroskop Zeiss Axiovert 200 (Zeiss, Nemčija)
Hladilnik (+ 4 °C)/zamrzovalnik (- 20 °C) (Gorenje, Slovenija)
Invertni mikroskop Ae2000 (Motic, Nemčija)
Laminarij (Iskra PRO, Slovenija)
Mikrotitrski čitalec Tecan Infinite 200 (Tecan Group, Švica)
Namizna centifuga (Neolab, Nemčija)
Programska oprema za statistično obdelavo rezultatov GraphPad Prism 7.1 (GraphPad Software, ZDA)
Programska oprema za Tecan Magellan™ (Tecan Group, Švica)
Programska oprema za zajemanje slik pod svetlobnim mikroskopom MetaMorph 7.8 (Molecular Devices, Kitajska)
Računalniška programska oprema za štetje pobarvanih celic Cellcounter 2 (Slovenija)
Vibracijski mešalnik (Vortex, ZDA)
Stresalnik (Tehnica, Slovenija)
Vodna kopel (Unitherm, Nemčija)

3.1.4 Celična linija

Vsi poskusi so bili izvedeni s celičnima linijama B16F1 in B16F10. Celice smo gojili v inkubatorju CO₂ v navlaženem okolju pri + 37 °C in 5 % CO₂ v primernem gojišču.

3.1.5 Gojišča

Pri delu smo uporabljali naslednja gojišča:

Preglednica 1: Prikazuje sestavo gojišč, uporabljenih v raziskovalnem delu

| Gojišče | Sestava |
|---------------------------------------|---|
| Rastno gojišče | DMEM 4,5 g/L glukoze 10 % FBS 2 mM glutamina fenol rdeče |
| Kompletno gojišče | DMEM 1 g/L glukoze 10 % FBS 1 g/L manitola fenol rdeče |
| Testno gojišče | DMEM 1 g/L glukoze 10 % FBS fenol rdeče *Naknadno dodano po potrebi: - različne koncentracije glutamina - različne koncentracije metformina |
| Kontrolno gojišče | DMEM 1 g/L glukoze 0,2 % BSA fenol rdeče |
| Kontrolno gojišče z glutaminom | DMEM 1 g/L glukoze 0,2 % BSA 2 mM glutamina fenol rdeče |
| Kontrolno gojišče s serumom | DMEM 1 g/L glukoze 10 % FBS 1 g/L manitola fenol rdeče |

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje celičnih kultur

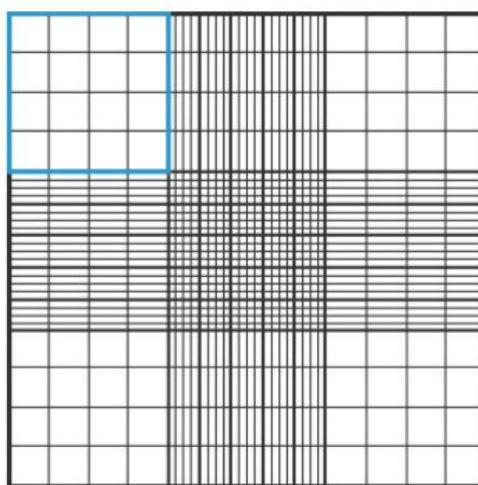
Celice smo gojili v sterilni komori z laminarnim pretokom zraka, da smo preprečili kontaminacijo. Komoro smo pred uporabo razkužili s polurnim obsevanjem z ultravijolično svetlobo. Tik pred pričetkom dela smo površine komore očistili s 70-odstotnim etanolom. Pri delu smo uporabljali zaščitne rokavice. Ves material vnesen v komoro, smo razkužili z etanolom. Celice B16F1 in B16F10 smo gojili v 25 cm^2 velikih gojitvenih posodicah s filtrom v rastnem gojišču DMEM (preglednica 1) pri $+37^\circ\text{C}$ in 5 % CO_2 . Ko smo dosegli 90-odstotno konfluentnost celic (približno čez 3-4 dni), smo celice tripsinizirali in subkultivirali. Pred pričetkom dela smo gojišče in tripsin ogreli na 37°C v vodni kopeli. Celicam smo odsesali gojišče, jih dvakrat sprali s PBS, ga odsesali in jih nato inkubirali 2 min v 1 mL tripsina v inkubatorju pri $+37^\circ\text{C}$. Odlepljene celice smo resuspendirali v 2 ml rastnega gojišča. S hemocitometrom smo določili število celic in 1×10^5 celic prenesli v gojitveno posodico, kjer je bilo 7 ml rastnega gojišča. Celice smo gojili do 20 pasaže, potem smo jih zavrgli in odmrznili novo vialo.

3.2.2 Določanje preživetja celic

Celice smo nasadili na 12-jamično oziroma na 24-jamično ploščo v kompletno gojišče DMEM (preglednica 1) in jih prestavili v inkubator na $+37^\circ\text{C}$ in 5 % CO_2 . Naslednje jutro (po 14 urah) smo celice iz 2 jamic prešteli s hemocitometrom (kot je opisano v točki 3.2.2.1) in to označili kot čas 0. Celice, ki smo jih gojili na vzporedni plošči, smo 2-krat sprali s PBS in jim dodali kompletno gojišče, ki nam je služilo kot kontrola, ali pa kontrolno gojišče (brez seruma ali brez L-glutamina). Gojišče smo vsak dan zamenjali. Po preteklih 24 in 48 urah inkubacije smo s hemocitometrom ponovno določili število celic. Hkrati smo delali v dveh tehničnih ponovitvah.

3.2.2.1 Določanje števila celic s hemocitometrom

Celice smo šteli s pomočjo hemocimetra pod invertnim mikroskopom. Ta metoda omogoča štetje celic v znanem volumnu in določitev koncentracije celic (št celic / mL). Celice smo 2-krat sprali s PBS, dodali tripsin in 5 min inkubirali pri $+37^\circ\text{C}$ in 5 % CO_2 . Nato smo tripsinizirane celice resuspendirali z dvojnim volumnom gojišča, v primerjavi s tripsinom. Iz suspenzije celic smo odvzeli 25 μL vzorca in mu dodali 75 μL gojišča. S pipeto smo nato 10 μL mešanice prenesli na hemocitometer, ki je bil pokrit s krovnim stekelcem. Pod mikroskopom smo nato pri 10-kratni povečavi prešteli celice v vseh štirih kvadratnih poljih (označenih na spodnji sliki). Če je bilo celic več kot 200, smo vzorec še enkrat redčili in ponovno določili število celic.



Slika 8: Shema črt hemocitometra (Counting cells ... , 2016).
 16 modro označenih kvadratov se uporablja za štetje (1 kvadratno polje).

Skupno število celic v suspenziji smo izračunali po formuli:

$$N = n * R * V * 10^4 \quad \dots (1)$$

N – Skupno število celic v suspenziji

n – povprečno število preštetih celic v enem kvadratnem polju

R – faktor redčenja (v našem primeru 4)

V – volumen celične suspenzije, iz katere smo vzeli vzorec

3.2.3 Določanje presnovne aktivnosti celic s testom MTS

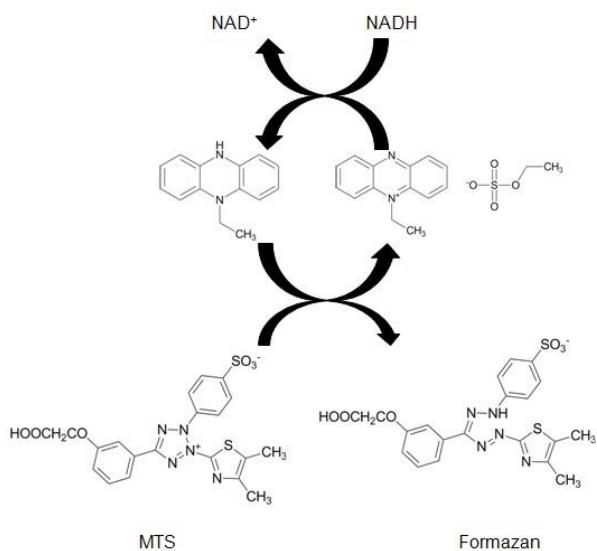
Test MTS je kolorimetrična metoda za merjenje aktivnosti presnovnih encimov in se uporablja za oceno števila živih celic na večjamičnih ploščah. Temelji na principu inkubacije reagenta s populacijo živih celic, ki pretvorijo substrat v barven fluorescentni produkt, ki ga je mogoče zaznati s čitalcem plošč. V standardnih pogojih gojenja inkubacija substrata z živimi celicami pripelje do tvorjenja signala, ki je proporcionalen številu prisotnih živih celic. Ko celice umrejo, hitro izgubijo sposobnost pretvorbe substrata do produkta.

Žive celice lahko tetrazolijeve reagente pretvorijo v formazanske produkte, ki so direktno topni v celičnem gojišču. Negativno nabiti formazanovi produkti, ki prispevajo k topnosti v celičnem gojišču, obenem tudi omejijo celično prepustnost za tetrazolij. Ta sklop tetrazolijevih reagentov se uporablja v kombinaciji z reagenti, ki so vmesni elektronski akceptorji, kot sta fenazin metil sulfat (PMS) ali fenazin etil sulfat (PES), ki lahko prodrejo v žive celice, se reducirajo v citoplazmi ali na celični površini in izstopijo iz celice, kjer lahko pretvorijo tetrazolij do topnega formazanskega produkta (slika 9).

Količina tvorjenega signala je odvisna od več parametrov, vključno s koncentracijo MTS, dolžino inkubacijske dobe, številom živih celic in njihovo presnovno aktivnostjo. Vse te

parametre je treba upoštevati pri optimizaciji testa, da se med testom proizvede zadostna količina produkta, ki jo je mogoče zaznati nad ozadjem.

Pomembno je omeniti, da je MTS marker, ki odraža presnovo živih celic, ne specifično celične proliferacije (Riss in sod., 2013).



Slika 9: Shematski prikaz celične presnove reagenta MTS (Riss in sod., 2013).

Vmesni elektronski akceptor PES prenese elektron iz NADH v citoplazmi, da reducira MTS v celičnem gojišču v vodi topen formazan.

Postopek:

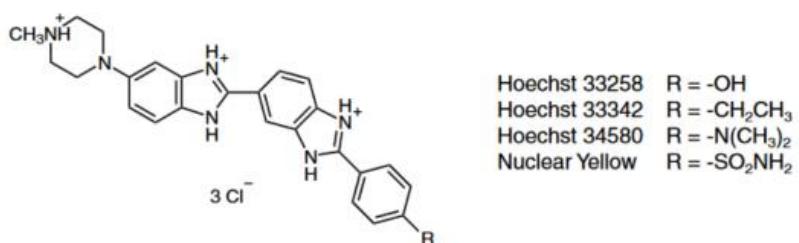
Celice smo nasadili na 24-jamično ploščo v kompletno gojišče in jih inkubirali 24 ur pri + 37 °C in 5 % CO₂. Naslednji dan smo celice 2-krat sprali s PBS in jim dodali kompletno gojišče, ki je služilo kot kontrola, ali pa testno gojišče, ki je vsebovalo različne koncentracije metformina ali/in L-glutamina ali dikloroacetata. Ploščo s celicami smo postavili v inkubator. Gojišče smo vsak dan zamenjali. Po preteklih 48 urah inkubacije smo izvedli test MTS. Uporabili smo kit za določanje viabilnosti (živosti) celic s kolorimetrično metodo (Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, ZDA).

Celicam, ki smo jih gojili na 24-jamičnih ploščah, smo odsesali gojišče in jim dodali PBS. Ko smo odsesali PBS, smo dodali 183 µL svežega gojišča brez seruma. Pri tem smo bili pozorni, da smo zamenjali gojišče le 6 jamicam naenkrat, da nebi bile nekatere celice v PBS predolgo in ne bi začele odstopati od površine. Nato smo ploščo 10 min inkubirali v inkubatorju pri + 37 °C in 5 % CO₂. Za tem smo dodali 36,7 µL reagenta MTS v vsako jamicu. Ploščo smo pretresli tako, da smo jo postavili na papirnato brisačko in zibali. Postavili smo jo v inkubator pri istih pogojih za 30 minut. Kot kontrolo smo uporabili 96-jamično ploščo, nanjo prenesli po 100 µL svežega gojišča brez seruma v 3 jamice in dodali po 20 µL reagenta MTS v vsako jamicu. Ploščo smo pretresli in inkubirali istočasno s

celicami. Po pojavu vijoličnega obarvanja pri neizpostavljenih celicah oziroma v našem primeru po 30 minutah smo prenesli po $100 \mu\text{L}$ supernatanta v dveh paralelkah iz vseh 24 jamic na 96-jamično ploščo. Z napravo Tecan Infinite 200 smo izmerili absorbanco pri 490 nm. Od dobljenih vrednosti smo odsteli ozadje in izračunali povprečja iz tehničnih in bioloških ponovitev. Rezultate smo predstavili kot odstotek relativne absorbance glede na kontrolo.

3.2.4 Določanje števila in preživetja celic z barvilom Hoechst 33342

Hoechst 33342 je celično propustno modro fluorescentno barvilo, ki obarva nukleinske kisline (DNK) in ima več aplikacij, med drugim tudi za senzitivno določanje števila fiksiranih ali živih celic. Barvanje celic s tem barvilm in analiza s spektrofluorometrijo ali fluorescenčno mikroskopijo omogočata neposredno določitev števila celic (Rajh in sod., 2016). Barvilo je topno v vodi. Fluorescanca tega barvila je zelo občutljiva na konformacijo DNK in kromatinsko stanje v celicah. Intenzivnost barvila Hoechst se stopnjuje tudi s pH topila (Hoechst Stains ...).



Slika 10: Struktura barvil Hoechst (Hoechst Stains ..., 2005).

Postopek:

Enako kot pri določanju presnovne aktivnosti z reagentom MTS smo tudi tukaj celice nasadili na 24-jamično ploščo v kompletno gojišče in jih inkubirali 24 ur pri + 37 °C in 5 % CO₂. Naslednji dan smo celice 2-krat sprali s PBS in jim dodali kompletno gojišče, ki je služilo kot kontrola, ali testno gojišče, ki je vsebovalo različne koncentracije metformina ali/in L-glutamina. Ploščo s celicami smo postavili v inkubator. Gojišče smo vsak dan zamenjali. Po preteklih 48 urah inkubacije smo izvedli barvanje s Hoechstom.

Reagent Hoechst 33342 smo pripravili tako, da smo redčili založno raztopino (pripravljeno v deionizirani vodi) v gojišču na končno koncentracijo $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in dobro premešali. Iz celic smo odstranili gojišče in ga zamenjali z gojiščem, ki vsebuje Hoechst. Volumen smo prilagajali posodicam. Za negativno kontrolo smo inkubirali prazne jamice brez celic v gojišču, potem pa enako kot ostale jamice z reagentom Hoechst po protokolu. Celice smo z barvilm Hoechst 33342 inkubirali 20–30 min v inkubatorju pri + 37 °C in 5 % CO₂. Medtem smo pripravili 100 mL PBS s Ca²⁺ in Mg²⁺ (90 mL ddH₂O, 0,4 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, mešanje in 10 mL 10x PBS). Po inkubaciji smo odstranili supernatant v odpad z nevarnimi

kemikalijami in dodali pripravljen pufer, da se celice niso odlepljale. Izmerili smo fluorescenco pri 350/461 nm na čitalcu Tecan in opazovali celice pod svetlobnim mikroskopom. Od dobljenih vrednosti na čitalcu smo odšteli ozadje in izračunali povprečja iz tehničnih in bioloških ponovitev. Rezultate smo predstavili kot odstotek relativne fluorescence glede na kontrolo.

3.2.5 Test difuzije s fluoresceinom na koših Transwell permeable support

Koš (Transwell permeable support) prekriva polikarbonatna membrana z 0,8-µm porami. S pomočjo fluoresceina (FLU) smo hoteli ugotoviti, ali lahko manjše molekule difundirajo skozi membrano iz koša v jamico oziroma obratno.

1 mL destilirane vode smo prenesli v jamice, vstavili koš v jamico in na koš nanesli 385 µL destilirane vode. V dva koša smo dodali dve različni koncentraciji fluoresceina (10, 100 µM), medtem ko v jamici nismo dodali ničesar. V naslednja dva koša nismo dodali FLU, vendar smo v njihovi jamicici dodali dve različni koncentraciji fluoresceina (10, 100 µM). Za kontrolo smo uporabili 3 jamice, kamor smo odpipetirali samo 1 mL vode, 1 mL 10 µM fluoresceina ter 1 mL 100 µM fluoresceina, na jamicice smo postavili koše in odpipetirali 385 µL ujemajočih raztopin. Vse skupaj smo nato inkubirali 6 ur v inkubatorju, pri + 37 °C in 5 % CO₂. Pazljivo in brez mešanja smo prenesli raztopine ločeno iz košev in iz jamic na 96-jamično ploščo v 3 ponovitvah ter izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 490/514. Od dobljenih vrednosti smo odšteli ozadje in izračunali povprečja iz 3 tehničnih pri vsaki od 3 bioloških ponovitev. Rezultate smo predstavili kot odstotek relativne absorbance.

| Ponovitve | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---|
| Koš (V = 385 µL) | 10 µM FLU | 100 µM FLU | / | / | 10 µM FLU | 100 µM FLU | / |
| Jamica (V = 1000 µL) | / | / | 10 µM FLU | 100 µM FLU | 10 µM FLU | 100 µM FLU | / |

Slika 11: Shematski prikaz testa difuzije s fluoresceinom na koših Transwell permeable support glede na različne ponovitve.

V vodo v košu in jamicici smo odpipetirali ustrezne volumne fluoresceina, da smo prišli do spodaj prikazanih koncentracij in nismo presegli navedenih skupnih volumnov.

3.2.6 Migracijski test

Predhodno smo nasadili celice v posodice T25 cm², tako da na dan začetka poskusa niso bile več kot 50-odstotno konfluentne. To je pomembno, da se celice pravilno stradajo, ko jim zamenjamo gojišče. Celicam smo odstranili rastno gojišče, jih 2-krat sprali s PBS in dodali kontrolno gojišče DMEM brez seruma (preglednica 1) ter jih nato postavili nazaj v inkubator

za 24 h pri + 37 °C in 5 % CO₂. Po stradanju v gojišču brez seruma smo celicam odsesali gojišče, jih 2-krat sprali s PBS in tripsinizirali. Nato smo jih resuspendirali v kontrolnem gojišču (brez seruma in L-glutamina) ter določili njihovo število s hemocitometrom. Celice smo nasadili na koše (Transwell permeable support) na 12-jamično ploščo (1×10^5 celic v 200 µL). Predhodno smo v koš dodali še 185 µL kontrolnega gojišča, tako da je bil skupni volumen v košu 385 µL. V jamico smo odpipetirali 1000 µL testnega gojišča ali kontrolnega gojišča. Ob izpostavitvi celic v koših z različnimi snovmi nismo presegli danih volumnov. Preračunali smo vrednosti in jih dodali v jamico/koš/oboje. Celice smo inkubirali 24 ur v inkubatorju pri + 37 °C in 5 % CO₂. Nato smo določili celice, ki so migrirale skozi membrano. Za to smo koše prestavili v drugo 12-jamično ploščo, kjer je bil 1 ml kontrolnega gojišča z reagentom Hoechst 33342 (po protokolu iz poglavja 3.2.4.). Po barvanju smo koše prestavili v 6-jamične plošče, napolnjene z 2 ml PBS s Ca²⁺ in Mg²⁺, zato da smo celice lahko posneli pod svetlobnim mikroskopom pri 10-kratni povečavi in se med tem niso odlepljale. Najprej smo zajeli slike vseh celic, da smo določili preživetje. Nato smo celice z zgornjega dela koša postrgali z vatirano palčko in še enkrat zajeli slike pod mikroskopom. Število celic smo določili tako, da smo zajemali slike pobarvanih celic na naključno izbranih mikroskopskih vidnih poljih. Na podlagi povprečja 20 do 30 slik smo s programom Cellcounter2 prešteli celice na slikah in izračunali povprečje celic na eni sliki/vidnem polju fluorescenčnega mikroskopa. Rezultate smo statistično obdelali v programu Excel, in sicer tako, da smo skupno število celic normirali na pozitivno kontrolo in rezultate predstavili v odstotkih. Migrirane celice smo prestavili tako, da smo povprečje migriranih celic delili s povprečjem skupnega števila in dobili odstotek migriranih celic na vidno polje mikroskopa. Koše smo uporabljali večkrat, zato smo jih po uporabi sprali z vodo, dodali 300 µL tripsina in inkubirali 15 min v inkubatorju pri + 37 °C in 5 % CO₂. Potem smo odstranili tripsin in koše čez noč namočili v destilirano vodo. Odsesali smo vodo in namočili koše v etanol za dve uri ali čez noč in jih nato posušili v laminarijo.

3.2.7 Statistična obdelava podatkov

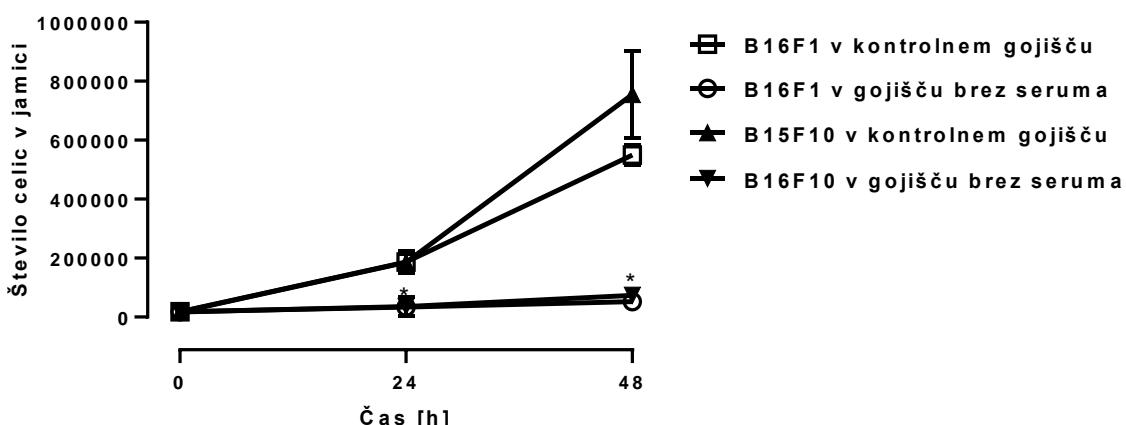
Pridobljene podatke meritev in analiz smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa MS Excel 2010, in sicer tako, da smo najprej združili rezultate tehničnih ponovitev, rezultate normirali na kontrolo in jih predstavili v procentih ter nato izpovprečili vse biološke ponovitve (n). Spremenljivkam smo izračunali opisne statistike (npr. standardni odklon in standardno napako povprečja (SEM)). Grafe smo izrisali s programom GraphPad Prism 7.1. Nato smo naredili analizo variance ali enosmerni test ANOVA ali dvosmerni test ANOVA. Rezultati so bili primerni za analizo z Dunnettovim t-testom ali Bonferronijevim testom. Za mejo statistične značilnosti smo vzeli P < 0,05. Statistično značilne razlike smo označili z zvezdico (*).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 VPLIV SERUMA IN GLUTAMINA NA PROLIFERACIJO CELIC B16F1 IN B16F10

4.1.1 Odvisnost proliferacije celic B16F1 in B16F10 od prisotnosti seruma v gojišču

Za določitev odvisnosti rasti celic od seruma smo celice B16F1 in B16F10 nasadili v koncentraciji 25.000 celic/jamico na 24-jamično ploščo v 500 µL kompletnega gojišča v dveh tehničnih ponovitvah. Naslednji dan, ko so se celice pritrstile na podlago, smo jim zamenjali gojišče in dodali kontrolno gojišče z glutaminom. Inkubirali smo jih 24 in 48 ur, zamenjali gojišče po 24 urah ter pod invertnim mikroskopom s hemocitometrom določili število vseh celic.



Slika 12: Vpliv seruma na proliferacijo celic B16F1 in B16F10.

Celice smo gojili v kontrolnem gojišču DMEM v prisotnosti ali odsotnosti (10 %) seruma \pm SEM. ($n = 3$).
* $P < 0,05$ v primerjavi s kontrolo (ANOVA – Bonferronijev test).

Naš rezultat kaže, da je proliferacija celic B16F1 in B16F10 povsem odvisna od prisotnosti seruma v gojišču, saj celice ne proliferirajo v gojišču brez seruma, medtem ko celice v kontrolnem gojišču s serumom rastejo in se podvojujejo. Za hitrejšo analizo rezultatov bi bilo priporočljivo uporabiti avtomatski števec celic.

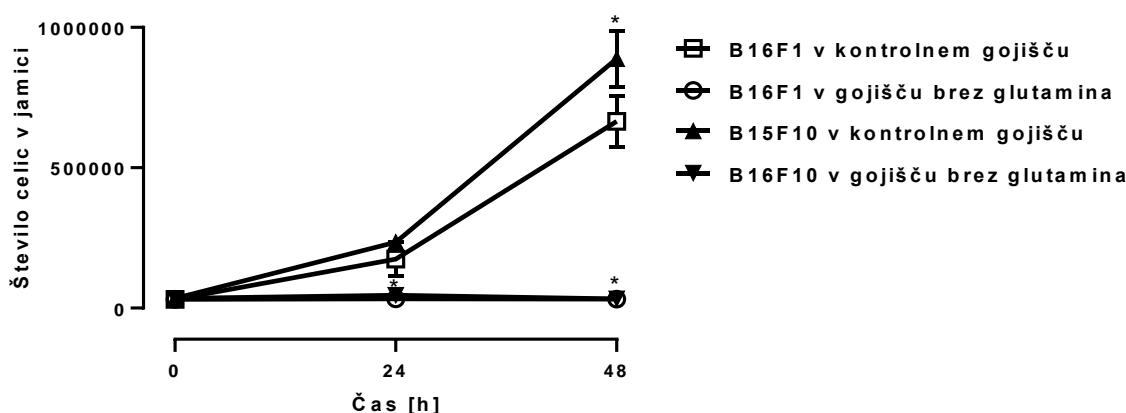
Poskuse smo izvedli v gojišču z 1 g/L glukoze, da smo se približali fiziološkemu stanju v telesu. Ob tem nismo opazili nobene spremembe v celični rasti ali morfologiji pri obeh celičnih linijah v primerjavi s celicami, gojenimi v gojišču z višjo koncentracijo glukoze (4,5 g/L), ki se standardno uporablja v *in vitro* poskusih.

Pomembno je omeniti, da je v našem primeru znižanje števila celic lahko posledica odmiranja ali posledica upočasnjenje delitve celic, zato izraz preživetje ni najbolj točen. Z

našimi metodami ne moremo razločevati med celično smrtjo in celično proliferacijo, in bi za dokaz tega, potrebovali teste z laktat dehidrogenazo, propidijevim jodididom, aneksinom, tripanskim modriliom ali bromodeoskiuridinom. Lahko pa se preživetje določi tudi s časovno odvisnimi testi, npr. krivuljo rasti.

4.1.2 Odvisnost proliferacije celic B16F1 in B16F10 od prisotnosti glutamina v gojišču

Za določitev proliferacije celic B16F1 in B16F10 ob odvzemu L-glutamina iz gojišča smo celice nasadili na 12-jamično ploščo. Naslednji dan, ko so se celice pritrstile na podlago, smo jim zamenjali gojišče in dodali gojišče brez glutamina. Inkubirali smo jih 24 in 48 ur ter pod mikroskopom s hemocitometrom določili število vseh celic.



Slika 13: Vpliv glutamina na proliferacijo celic B16F1 in B16F10.

Celice smo gojili v gojišču DMEM v prisotnosti ali odsotnosti (2 mM) glutamina. $+/-$ SEM. ($n = 2$). * $P < 0,05$ v primerjavi s kontrolo (ANOVA – Bonferronijev test).

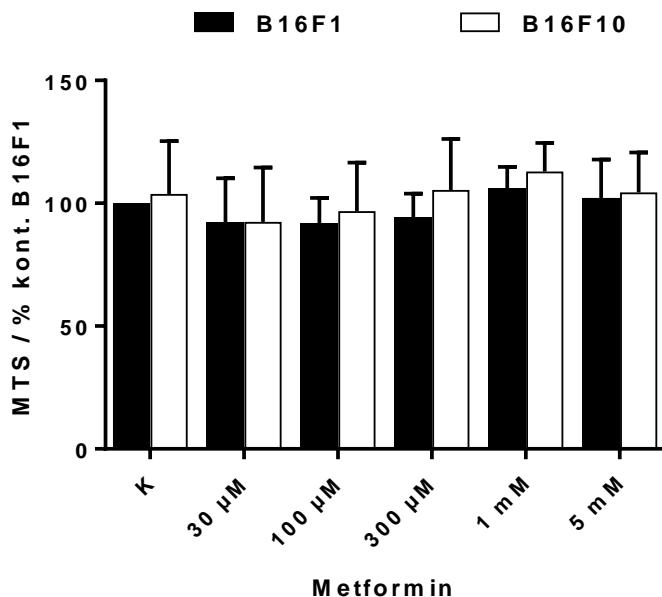
Ugotovili smo, da se število celic B16F1 in B16F10 po 48-urni inkubaciji v gojišču brez glutamina ni spremenilo. Ta rezultat kaže na to, da je proliferacija melanomskih celic B16 ne glede na njihov metastatski potencial zelo odvisna od prisotnosti glutamina (Ratnikov in sod., 2015). Opazili smo razliko v hitrosti podvojevanja med celičnima linijama. Celice B16F10 se hitreje podvojujejo kot celice iste linije z nižjim metastatskim potencialom B16F1. Da bi bolje opredelili vpliv glutamina na proliferacijo, bi morali uporabiti še kakšno metodo za merjenje proliferacije, kot je na primer vgradnja BRDU ali ^3H -timidina.

4.2 OBČUTLJIVOST CELIC B16F1 IN B16F10 NA METFORMIN

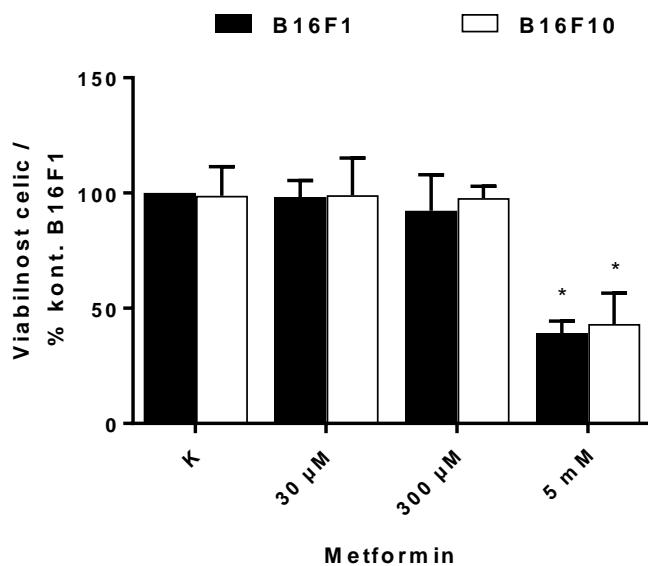
Metformin se je v vrsti *in vitro* ter *in vivo* študij izkazal kot učinkovina, ki zavira proliferacijo ter deluje protitumorsko. Za določanje učinkovitosti metformina na celicah B16F1 in B16F10 smo jih nasadili v 24-jamično ploščo v kompletno gojišče. Naslednji dan smo zamenjali gojišče s testnim gojiščem in dodali različne koncentracije metformina za test

MTS. Glede na dobljene rezultate pri testu MTS smo število različnih koncentracij metformina pri barvanju s Hoechstom zmanjšali. Celice smo v gojišču z metforminom inkubirali 48 ur, po 24 urah zamenjali gojišče in nato izvedli test MTS ali barvanje s Hoechstom.

A



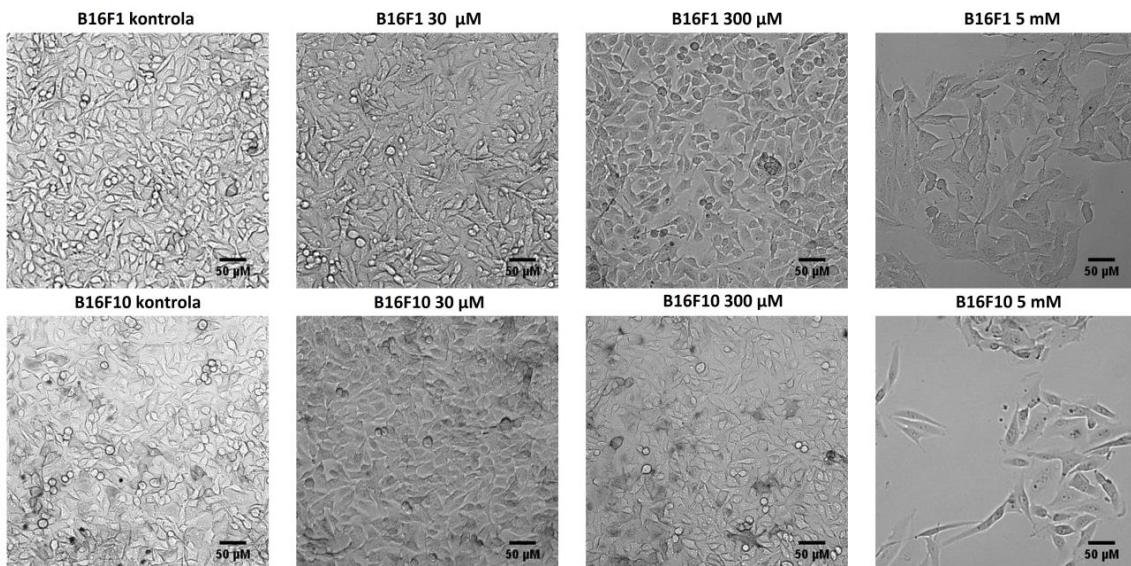
B



Slika 14: Vpliv metformina na odstotek živih celic B16F1 in B16F10.

Izvedli smo test MTS in barvanje s Hoechstom 33342 pri 48-urni inkubaciji v testnem gojišču DMEM (10 % serum in 2 mM glutamin) v prisotnosti ali odsotnosti metformina. A: Test MTS. B: Barvanje s Hoechstom. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam metformina (0, ki služi kot kontrola; 30 μM; 100 μM; 300 μM; 1 mM in 5 mM). Vrednosti so predstavljene v odstotkih intenzitete absorbance pri A in fluorescence pri

B ter normirane na kontrolo B16F1. +/- SEM. (n = 3). *P < 0,05 v primerjavi s kontrolo (ANOVA – Bonferronijev test).



Slika 15: Celice B16F1 in B16F10 po 48-urni izpostavljenosti različnim koncentracijam metformina.
Slike so bile zajete s svetlobnim mikroskopom pri 10-kratni povečavi.

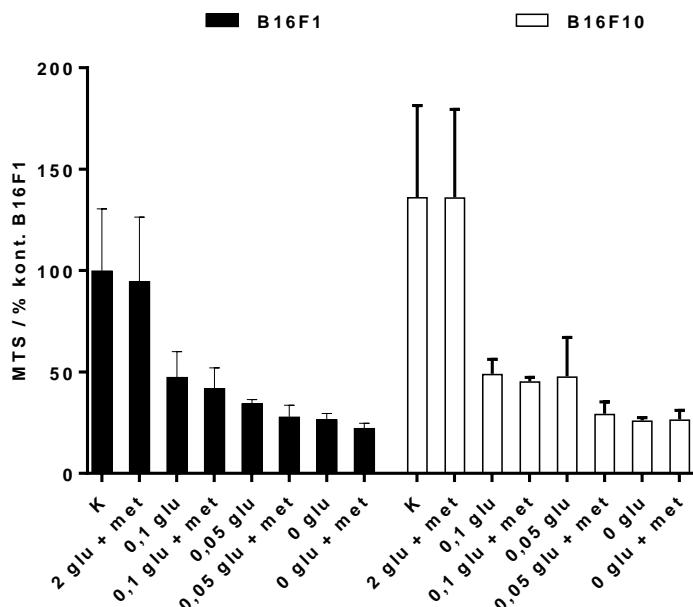
Iz rezultatov barvanja s Hoechstom je razvidno, da najvišja koncentracija metformina (5 mM), na celice B16F1 in B16F10 deluje citotoksično, kar smo istočasno preverili tudi z mikroskopskim slikanjem celic (slika 15). Na obe melanomske celične linije z različnim metastatskim potencialom deluje 5 mM metformin zelo podobno, in sicer pri obeh zmanjša živost za več kot polovico v primerjavi s kontrolo. Pri nižjih koncentracijah (nič; 30 μM in 300 μM) metformina ni bilo opaziti vpliva na živost celic, celice tudi niso izkazovale sprememb v celični morfologiji ali gostoti. Delovanje metformina na melanomske celice se šele pri višjih – milimolarnih – koncentracijah ujema z več študijami *in vitro*. V različnih celičnih linijah so namreč raziskave kazale, da 5 mM ali višja koncentracija metformina povzroča antineoplastično aktivnost (Decensi in sod., 2010). Nižje koncentracije metformina, ki smo jih uporabili, so bile izbrane kot koncentracije, ki so dosegljive pri uporabi metformina v kliničnem okolju, vendar pri teh koncentracijah ni bilo opaziti učinkov na celice v skladu z obstoječo literaturo (Hadad in sod., 2014). Fiziološke učinke metformina so avtorji razložili z njegovim kopiranjem v celicah. Celice z višjo stopnjo oksidativne fosforilacije so najbolj občutljive na metformin (Madiraju in sod., 2014). Pri tem je pomembno opozoriti, da lahko precejšnja razhajanja med študijami o učinkovitosti metformina *in vitro* pripisemo samemu protokolu gojenja celic in nivoju glukoze v gojišču. Pri zelo nizkih koncentracijah glukoze je lahko učinek metformina posledično toliko večji (Zordoky in sod., 2014; Rajh in sod., 2016). Zaključimo lahko, da metformin na obe liniji B16 z različnim metastatskim potencialom deluje podobno.

Zanimivo je, da smo ugotovili, da lahko test MTS da drugačne rezultate v primerjavi z barvanjem s Hoechstom. Naši rezultati testa MTS nakazujejo, da pri nobeni od različnih koncentracij metformina, tudi pri najvišji, ni bilo učinka na preživetje celic v kulturi, medtem ko je Hoechst pokazal drugače. MTS tetrazolijev sol ali Ownov reagent smo v kombinaciji z reagentom PES izpostavili celicam, ki so z encimom dehidrogenaza tvorile NADPH. Tako je prišlo do prenosa elektronov na PES. Reduciran PES je direktno reduciral MTS do vodotopnega vijolično obarvanega formazana, ki smo ga zaznali s čitalcem. To pomeni, da je rezultat testa MTS odvisen od aktivnosti dehidrogenaz in števila celic, rezultat barvanja s Hoechstom pa predvsem od števila celic, ker pobarva DNK. S testom MTS smo prikazali povisano presnovno aktivnost preživelih celic. Zato lahko ta test pri učinkovinah, ki modulirajo celično presnovo, predstavlja problem in ga ne moremo uporabljati kot realno oceno živosti celic in delovanja citotoksičnih spojin. Iz naših rezultatov je razvidno, da so celice, ki so bile izpostavljene metforminu, bolj presnovno aktivne oziroma imajo povisan nivo NADPH. Ker metformin inhibira kompleks I, lahko sklepamo, da reduksijski ekvivalenti (NADH) težje vstopajo v dihalno verigo. Če težje vstopajo, je koncentracija NADH in NADPH lahko posledično višja v celici kot normalno. To bi pojasnilo razkorak med Hoechstom in MTS. Za dodatno pojasnitev razhajanj med barvanjem s Hoechstom in testom MTS bi morali izvesti dodatne eksperimente, v okviru katerih bi preverili aktivacijo AMPK in vpliv metformina na presnovne poti.

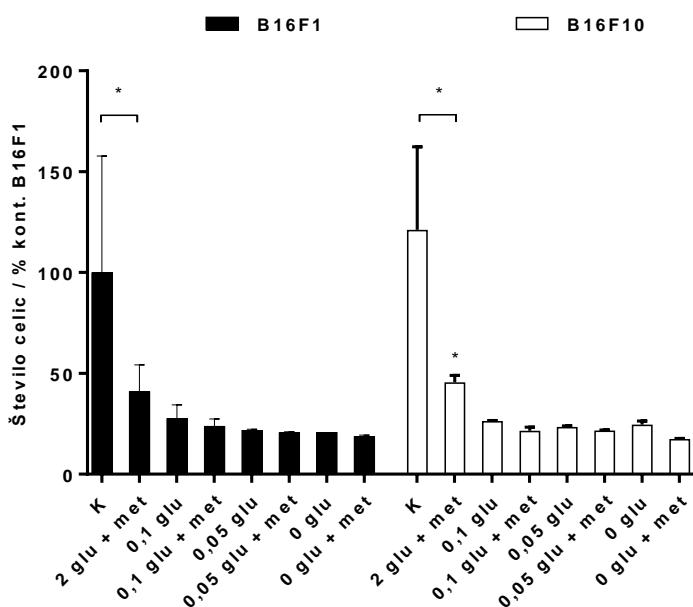
4.3 VPLIV GLUTAMINA NA PREŽIVETJE CELIC B16F1 IN B16F10 PRI TRETIJANJU Z METFORMINOM

Rakave celice uporabljajo nesorazmerno večji delež hranil v svojem okolju, kot zdrave celice. Poleg tega zelo učinkovito izrabljajo glutamin, kar povzroča odvisnost od njega. Da bi ugotovili vpliv metformina na preživetje celic v odvisnosti od koncentracije glutamina, smo celice nasadili v 24-jamično ploščo v kompletno gojišče. Da smo dobili na koncu rezultate, ki so bili bolj primerljivi med celičnima linijama, smo celice B16F10 nasadili v manjšem številu kot celice z nižjim metastatskim potencialom. Naslednji dan smo zamenjali gojišče s testnim gojiščem ter dodali različne koncentracije glutamina in iste koncentracije glutamina v kombinaciji s 5 mM metforminom, saj se je ta koncentracija se je izkazala za najučinkovitejšo, ker je imela največji citotoksični učinek, kot smo pokazali v predhodnih raziskavah (Ben Sahra in sod., 2010; Decensi in sod., 2010; Rajh in sod., 2016) in rezultatih (poglavje 4.2). Celice smo inkubirali 72 ur, vsak dan zamenjali gojišče in nato izvedli test MTS ali barvanje s Hoechstom.

A



B



C

| | | | | | | | |
|----------|----------------------|------------|------------------------|-------------|-------------------------|-------|-------------|
| 2 mM glu | 2 mM glu 5 mM met | 0,1 mM glu | 0,1 mM glu 5 mM met | 0,05 mM glu | 0,05 mM glu 5 mM met | / | 5 mM met |
| K | 2 glu + met | 0,1 glu | 0,1 glu + met | 0,05 glu | 0,05 glu + met | 0 glu | 0 glu + met |

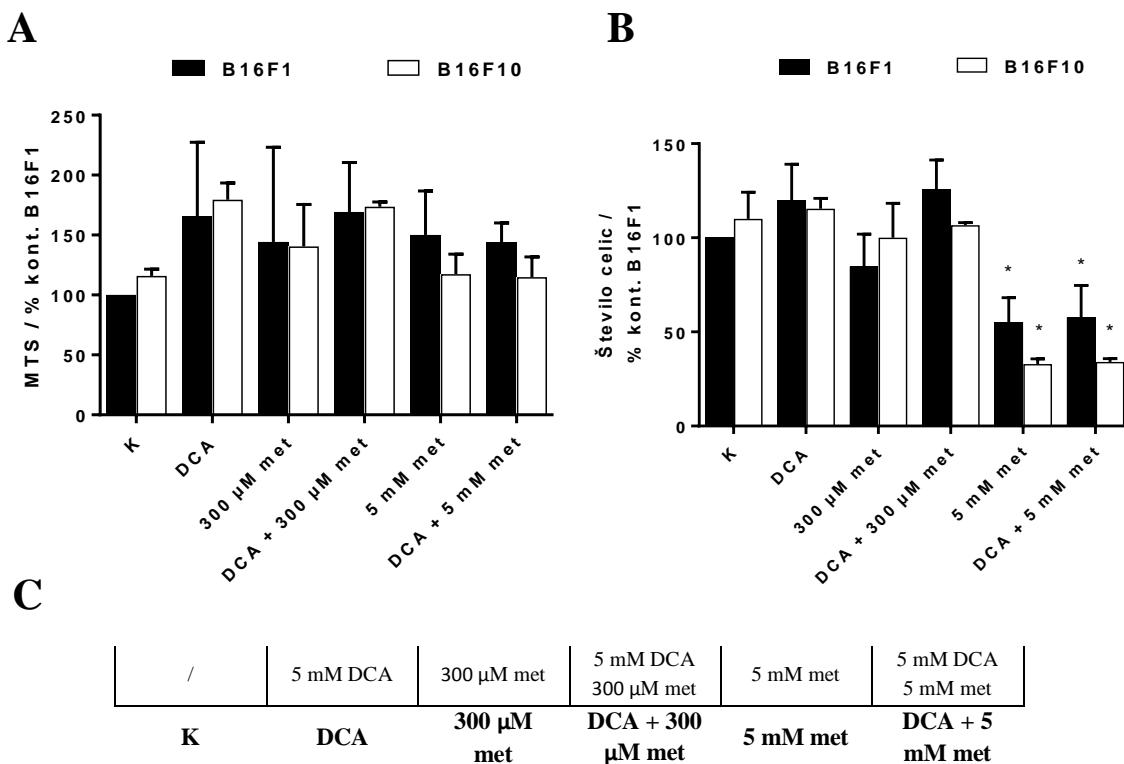
Slika 16: Vpliv glutamina na odstotek živih celic B16F1 in B16F10 ob izpostavitvi metforminu.

A: Test MTS. B: Določanje števila celic z barvilom Hoechst. C: Legenda predstavlja sestavo gojišča. Celice smo inkubirali 72 ur v gojišču DMEM z 1 g/L glukoze in 10% FBS ob prisotnosti ali odsotnosti metformina in glutamina ter izvedli test MTS in barvanje s Hoechstom 33342. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam glutamina (2 mM, ki služi kot kontrola; 0,1 mM; 0,05 mM in 0) ter istim koncentracijam glutamina v kombinaciji s 5 mM metforminom. Vrednosti so predstavljene v odstotkih intenzitete absorbance pri A in fluorescence pri B ter normirane na kontrolo B16F1. +/- SEM. (n = 3). * P < 0,05 v primerjavi s kontrolo (ANOVA – Bonferronijev test).

Preverili smo, ali glutamin ščiti celice B16 pred 5 mM metforminom. Pri 2 mM glutaminu se na grafu B kaže manjši zaščitni učinek v primerjavi z nižjimi vrednostmi glutamina (0; 0,05 mM in 0,1 mM), kjer prisotnost oziroma odsotnost glutamina nima posebnega učinka na učinkovanje metformina, pri nobeni od obeh celičnih linij B16. Pri celicah B16F10 je zaviralni učinek glutamina na delovanje metformina statistično značilen. Glede na rezultate barvanja s Hoechstom in na vizualno oceno živosti test MTS na grafu A (podobno kot na sliki 14) ne pokaže znižanega preživetja pri izpostavitvi kombinaciji učinkovin 2 mM glutamina in 5 mM metformina. Pri nižjih koncentracijah glutamina je sicer razvidno precejšnje ujemanje testov MTS in barvanja s Hoechstom. Pri nizkih koncentracijah glutamina (0,1 mM; 0,05 mM in 0) 5 mM metformin ne deluje bolj ali manj citotoksično na mišje melanomske celice, ker je tukaj proliferacija že zelo upočasnjena. Kjer glutamina ni, se celice sploh ne delijo. Metformin zavira proliferacijo rakavih celic *in vitro* z več mehanizmi, med drugim z zaviranjem oksidativne fosforilacije ter posledično aktivacijo AMPK in od mitohondrijev odvisne biosinteze aktivnosti, ki je potrebna za celično rast in delitev (Hadad in sod., 2014; Jeon in sod., 2012; Rajh in sod., 2016). Glukoza vstopa v cikel trikarboksilnih kislin prek piruvata in acetil-CoA, glutamin pa prek glutamata in α -ketoglutarata. Poleg drugih so Griss in sod. (2015) pokazali, da metformin *in vitro* zmanjša dotok vmesnih spojin pridobljenih iz glukoze in glutamina v cikel trikarboksilnih spojin. To zmanjša citratno proizvodnjo in biosintezo novih lipidov.

4.4 VPLIV FARMAKOLOŠKE AKTIVACIJE PIRUVAT DEHIDROGENAZE ZMANJŠA PREŽIVETJE CELIC B16F1 IN B16F10 OB IZPOSTAVITVI METFORMINU

Učinkovina DCA se je v zadnjih desetih letih pojavila kot potencialno zdravilo za raka, saj naj bi omogočala zaviranje Warburgovega pojava (povečane glikolize v normoksičnih pogojih) s povečanim pritokom piruvata (prek acetil-CoA) v mitohondrije. Z zmanjšanjem glikolize naj bi se zmanjšal tudi nastanek laktata, s tem pa bi DCA posledično lahko vplival tudi na manjšo invazivnost raka. Zato smo preverili potencialni sinergistični učinek DCA in metformina (Choi in Lim, 2014). Citotoksični učinek metformina v kombinaciji z DCA smo na celičnih linijah B16F1 in B16F10 določali tako, da smo jih nasadili v 24-jamično ploščo v kompletno gojišče. Naslednji dan smo zamenjali gojišče s testnim gojiščem ter dodali različne koncentracije metformina in iste koncentracije metformina v kombinaciji s 5 mM DCA. Celice smo inkubirali 72 ur, vsak dan zamenjali gojišče in nato izvedli test MTS ali barvanje s Hoechstom.



Slika 17: Vpliv DCA na preživetje celic B16F1 in B16F10.

A: Test MTS. **B:** Določanje števila celic z barvilom Hoechst.. **C:** Legenda predstavlja sestavo gojišča. Celice smo inkubirali 72 ur v gojišču DMEM z 1 g/L glukoze, 10% FBS in 2 mM glutaminom ob prisotnosti ali odsotnosti metformina in DCA ter izvedli test MTS in barvanje s Hoechstom 33342. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam metformina (brez, ki služi kot kontrola; 300 µM in 5 mM) in istim koncentracijam metformina v kombinaciji z 5 mM DCA. Vrednosti so predstavljene v odstotkih intenzitete absorbance pri A in fluorescence pri B ter normirane na kontrolo B16F1. +/- SEM. (n = 3). *P < 0,05 v primerjavi s kontrolo (ANOVA – Bonferronijev test).

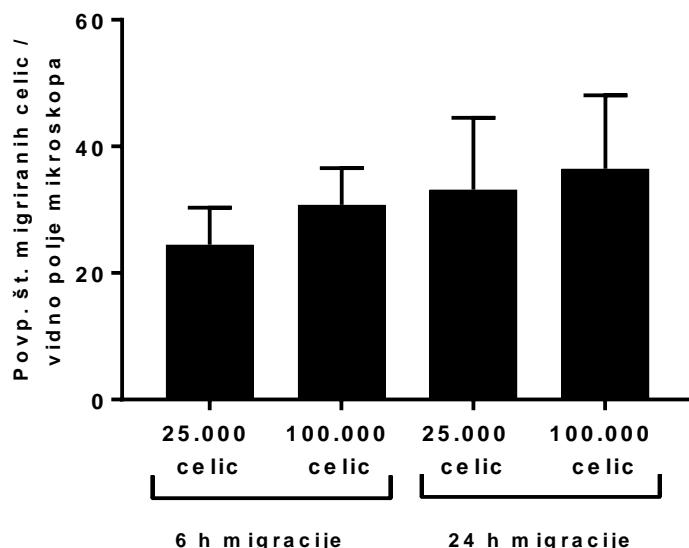
Pri celičnih linijah B16F1 in B16F10 so rezultati pričakovani. 5 mM DCA nima citotoksičnega učinka na melanomske celice, test MTS pa kaže malenkost povišane vrednosti pri vseh izpostavitvah v primerjavi s kontrolo. Takšna meritev je lahko posledica višje presnovne aktivnosti ali kopičenja redukcijskih ekvivalentov v citosolu zaradi inhibicije dihalne verige. DCA spodbuja vstopanje piruvata v cikel trikarboksilnih kislin. Ker vstopi več piruvata (prek acetil-CoA), nastane tudi več NADH. Hkrati metformin inhibira kompleks I. Pospešena tvorba NADH in inhibicija kompleksa I lahko povzročita višjo "aktivnost", izmerjeno z MTS, ker nastalega NADH celice enostavno niso mogle uporabiti. Tudi sinergističnega učinka DCA in metformina na zmanjšanje preživetja celic nismo opazili. V nadaljevanju (Poglavlje 4.7) smo še preverili, ali bi DCA potencialno lahko deloval na migracijo celic. Rezultati različnih raziskav so pokazali, da je DCA različno učinkovit za različne rakave celic. Pokazali so, da je IC₅₀ (koncentracija, kjer pride do 50% zmanjšanja števila celic) za DCA med 17 in 40 mM pri 48-urni inkubaciji. Vendar je v splošnem veliko raziskav na različnih rakavih celičnih linijah pokazalo, da DCA ni imel

vpliva na preživetje celic pri koncentracijah nižjih od 5 mM. Podaljšanje časa inkubacije celic z DCA iz 2 na 6 dni prav tako ni privelo do drugačnih rezultatov (Stockwin in sod., 2010).

4.5 ANALIZA MIGRACIJE CELIC B16F10 IN OPTIMIZACIJA MIGRACIJSKEGA TESTA

4.5.1 Odvisnost migracije od števila nasajenih celic B16F10

Za test migracije celic smo najprej določili optimalni čas migracije in optimalno število nasajenih celic na koš. Celice B16F10 smo nasadili na koše v koncentracijah $2,5 \times 10^4$ in 1×10^5 celic v kontrolno gojišče z glutaminom. Ti dve števili sta se najpogosteje pojavljali v literaturi. Celice smo inkubirali 6 in 24 ur, nato smo jih pobarvali z reagentom Hoechst in zajeli fotografije migriranih celic na fluorescenčnem mikroskopu.



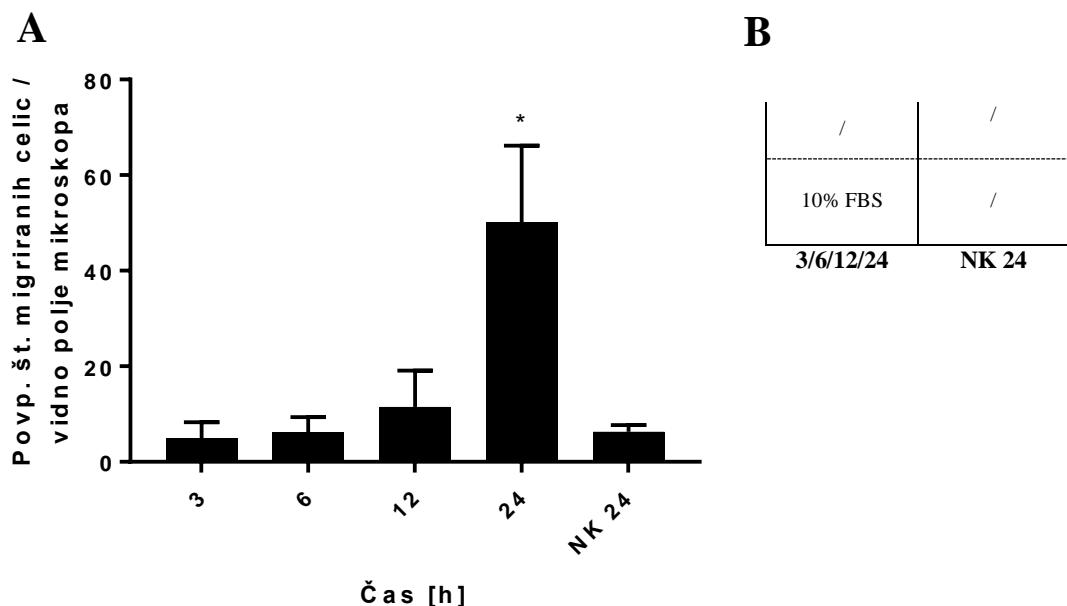
Slika 18: Optimizacija časa migracije in števila nasajenih celic B16F10 na koš.

Predstavljeno je povprečno število celic na sliki vidnega polja fluorescenčnega mikroskopa. Na koše smo nasadili različno število celic; 25.000 in 100.000 v gojišče DMEM z 1 g/L glukoze in 2 mM glutaminom. V jamice smo dodali 10 % seruma, ki je služil kot kemoatraktant. Migracijo celic smo testirali pri dveh časih: 6 in 24 ur. +/- SEM. (n = 1).

Kot najučinkovitejša se je izkazala 24-urna migracija celic B16F10, kjer je bilo nasajenih 100.000 celic. Pri teh pogojih celice na košu še niso dosegle confluentnosti po 24 urah in posledično je migriralo največ celic. Pri nasajanju celic na koš je koš s celicami treba potresti, preden se umesti v jamico, da se celice razporedijo po celotni površini in se ne nakopičijo samo na del površine. To bi lahko privelo do popolnoma drugačnih rezultatov, saj se tesnem stiku z drugimi celicami spremeni mikrookolje celic, kar vpliva na migracijo.

4.5.1.1 Časovna odvisnost migracije celic B16F10

Še enkrat smo preverili optimalni čas migracije celic. Nasadili smo 1×10^5 celic B16F10 na koš v kontrolno gojišče z 2 mM glutaminom. V jamice smo kontrolnemu gojišču dodali serum kot kemoatraktant. Pri negativni kontroli nismo v jamico dodali seruma. Celice smo inkubirali 3, 6, 12 in 24 ur, nato smo jih pobarvali z reagentom Hoechst 33342 in zajeli fotografije migriranih celic na fluorescenčnem mikroskopu.



Slika 19: Optimizacija časa migracije celic B16F10.

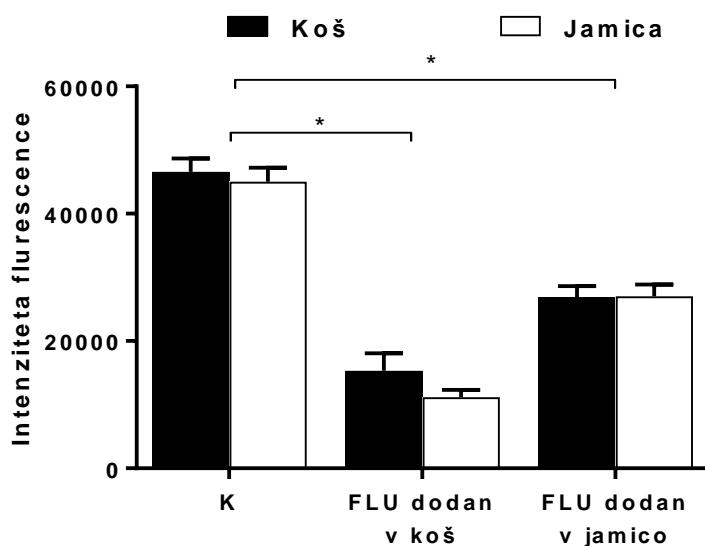
A: Povprečno število migriranih celic na vidno polje fluorescenčnega mikroskopa. Številke predstavljajo čas migracije v urah. **B:** Legenda predstavlja sestavo gojišča. Na koše smo nasadili 1×10^5 celic B16F10 v gojišče DMEM z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in dodatki, ki so razvidni iz legende. NK je označeno kot negativna kontrola, kjer so celice migrirale 24 ur. Predstavljeno je povprečno število celic na sliko vidnega polja fluorescenčnega mikroskopa. +/- SEM. (n = 1). *P < 0,05 v primerjavi s NK 24 (ANOVA – Dunnettov test).

Iz rezultatov je razvidno, da je največ celic migriralo pri 24-urni inkubaciji. Hkrati je pri negativni kontroli (24 ur NK) migriralo malo celic in je bila statistična razlika največja. Migracijski test je pomembno izvesti v pogojih minimalne koncentracije seruma (angl. *serum starvation*), da se zmanjša proliferacija celic med testom.

Z uporabo migracijskega testa Transwell smo spoznali prednosti in slabosti tega testa. Prednosti sta dobavljanost različnih košev in velikosti ter relativno enostavna zastavitev eksperimenta. Ta test največkrat uporabljamo za določitev celične migracije. Poleg košev ne potrebujemo nobene dodatne opreme. Slabost testa je, da je za vsako novo celično linijo treba določiti optimalni čas. Odstranjevanje nemigriranih celic z vatirano palčko se velikokrat izkaže kot težavna in nekvantitativna tehnika s spremenljivim uspehom.

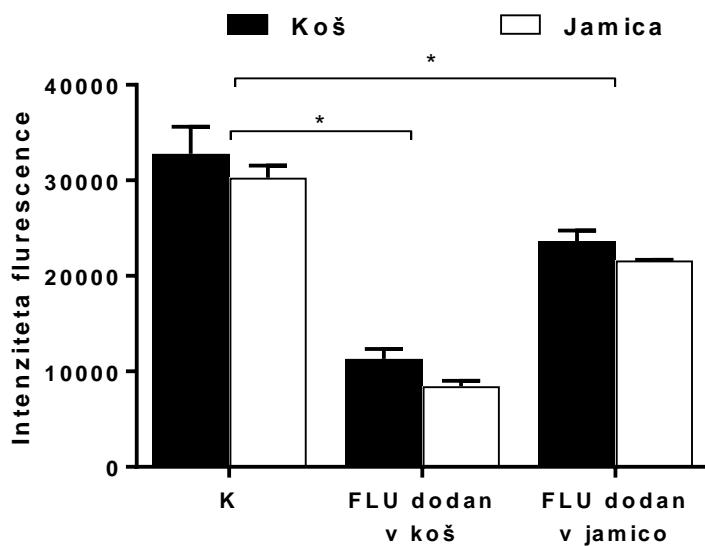
4.5.1.2 Test difuzije s fluoresceinom

V literaturi uporabljajo dva načina izpostavitev učinkovinam: i) učinkovino dodajo samo v jamicu; ali ii) učinkovino dodajo v jamicu in košek. Slednje edino natančno zagotavlja izhodiščno koncentracijo zaradi difuzije molekul. Da bi da bi dodatno potrdili prehajanje molekul čez membrano, iz koša v jamicu ali obratno, smo izvedli test difuzije s fluoresceinom. Dve različni koncentraciji fluoresceina ($10 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$) smo prenesli v koš ali v jamicu, kjer je že bila destilirana voda, in inkubirali 6 ur v inkubatorju (preglednica 2). Za kontrolo smo dodali fluorescein obenem v koš in jamicu. Po 6 urah smo gojišče pazljivo in brez mešanja prenesli iz jamic in iz košev na 96-jamično ploščo ter izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah $490/514 \text{ nm}$.



Slika 20: Test difuzije s $10 \mu\text{M}$ fluoresceinom.

$10 \mu\text{M}$ fluorescein smo dodali v koš, jamicu ali pa v oboje za kontrolo in inkubirali 6 ur. Koncentracija fluoresceina v košu ali jamici je predstavljena kot intenziteta fluorescence. \pm SEM. ($n = 3$). * $P < 0,05$ v primerjavi s K (ANOVA – Bonferronijev test).

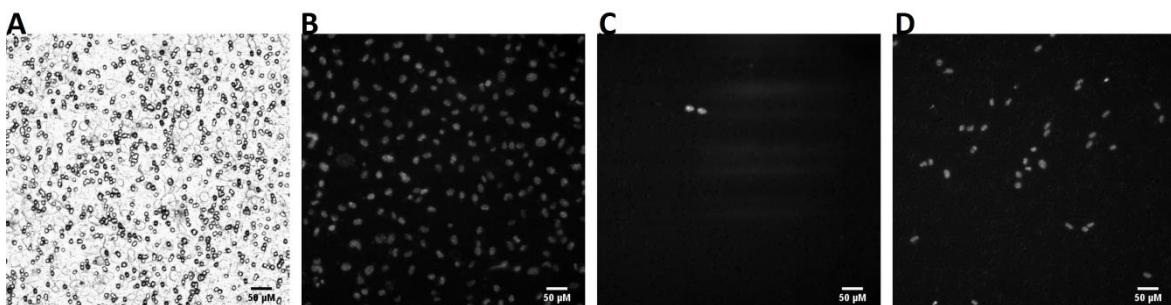


Slika 21: Test difuzije s 100 µM fluoresceinom.

100 µM fluorescein smo dodali v koš, jamico ali pa v oboje za kontrolo in inkubirali 6 ur. Koncentracija fluoresceina v košu ali jamico je predstavljena kot intenziteta fluorescence. +/- SEM. (n = 3). *P < 0,05 v primerjavi s K (ANOVA – Bonferronijev test).

V literaturi nismo nikjer zasledili, da bi kdo testiral, kako snovi prehajajo skozi membrano koša. Zato smo izvedli poskus, iz katerega je razvidno, da se koncentracija fluoresceina po 6 urah inkubacije izravna, če je dodan samo v jamico ali samo v koš. Vizualno smo ocenili, da je fluorescein prehajal že takoj po dodatku, kar je bilo tudi pričakovano, saj je difuzija majhne molekule, kot je fluorescein, skozi pore velikosti 0,8 µm na teh razdaljah relativno hitra.

4.5.1.3 Validacija migracijskega testa

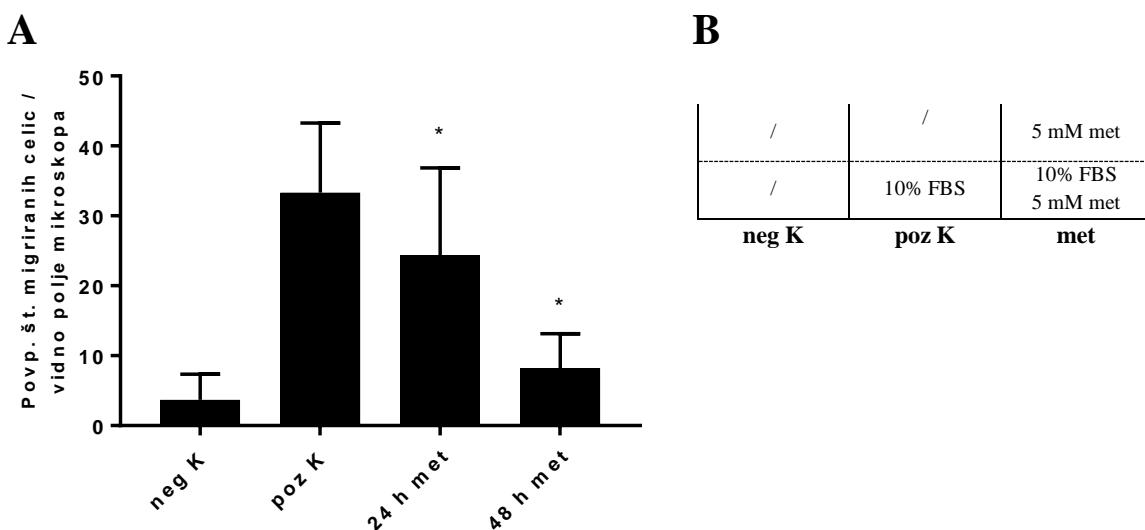


Slika 22: Celice B16F10 24 ur po migraciji.

Slike so zajete s fluorescentnim mikroskopom pri 10-kratni povečavi. Celice so bile pobarvane z barvilom Hoechst 33342. **A:** Polikarbonska membrana koša s porami velikosti 0,8 µm. **B:** Celice nad membrano in pod njo. **C in D:** Migrirane celice pod membrano koša, ki so ostale po strganju z vatirano palčko. **C:** Negativna kontrola, **D:** Pozitivna kontrola.

Glavni cilj magistrske naloge je bila vzpostavitev in optimizacija migracijskega testa na Transwell permeable support. Najprej smo primerjali migracijo linije B16F10 s celično linijo B16F1 ter delovanje glutamina in seruma na migracijo. V nadaljevanju smo nadaljevali poskuse samo na celicah B16F10. V literaturi so večkrat omenjeni kemoatraktanti, ki naj bi še posebej vzpodbudili celice k migraciji. Kemoatraktant deluje tako, da ga je na nekem mestu veliko, drugod pa ne. Celice se nato vzdolž koncentracijskega gradiента usmerijo proti višji koncentraciji atraktanta (ozioroma stran od snovi, ki jih odbijajo). Kot kemoatraktant smo uporabili serum, ki je bil največkrat dokumentiran (Kramer in sod., 2013). Na enem košu smo v gojišče DMEM (1 g/L glukoze) z 2 mM glutaminom nasadili celice in jih prestavili v jamico, kjer je bil h gojišču dodan 10 % serum. Ta koš smo uporabili kot pozitivno kontrolo (slika 22, D). Kot negativna kontrola nam je služil nasajeni koš, prestavljen v jamico, kjer je bilo gojišče DMEM (1 g/L glukoze) z 2 mM glutaminom brez seruma (slika 22, C). Ti dve kontroli smo uporabili kot stalinico pri vsaki ponovitvi, da smo preverjali uspešnost in ponovljivost poskusa.

Da bi validirali migracijski test smo, izvedli preliminarni poskus migracije, kjer smo nasadili 1×10^5 celic B16F10 na koš. Nato smo koše izpostavili različnim pogojem, tako da smo jih položili v jamice, kjer so bili kompletno gojišče (z 10 % serumom in 2 mM glutaminom), kontrolno gojišče, in kontrolno gojišče z glutaminom z dodanim 5 mM metforminom. Ploščo smo prestavili v inkubator, da so celice migrirale 24 ur.



Slika 23: Preliminarni poskus migracije.

A: Povprečno število migriranih celic na vidno polje fluorescenčnega mikroskopa **B:** Legenda predstavlja sestavo gojišča. Na koše smo nasadili 1×10^5 celic B16F10 v gojišče DMEM z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in dodatki ki so razvidni iz legende, ter pustili migrirati 24 ur. **24 h met** – celice smo med migracijo izpostavili 5 mM metforminu; **48 h met** – celice smo pred migracijo 24 ur izpostavili metforminu in nato še enkrat 24 ur med migracijo (skupno so torej 5 mM metforminu izpostavljene 48 h). +/- SEM. (n = 1). *P < 0,05 v primerjavi s poz K (ANOVA – Dunnettov test).

Uporabili smo negativno in pozitivno kontrolo ter tako primerjali učinke metformina. 24-urna izpostavljenost 5mM metforminu vpliva na migracijo celic. Še bolj učinkovita je 48-urna izpostavitev, ki občutno zmanjša migracijo. Celična migracija je energijsko zahteven proces, ki potrebuje preoblikovanje aktina in usklajeno celično površino ter endomembranski promet. Tako je celična migracija dobro nadzorovana, da se obseg celične migracije ujema z razpoložljivostjo energije. S hipoksijo vodena aktivacija AMPK zmanjšuje pritrjenost (adhezijo) celic v endotelijskih celicah. Učinkovine, ki sprožijo aktivacijo AMPK regulirajo celično pritrjenost in migracijo: AICAR, metformin, A769662 (Ross in sod., 2015). Ker imajo mnoge od teh snovi poleg aktivacije AMPK dodatne celične učinke, jih je treba dodatno raziskati.

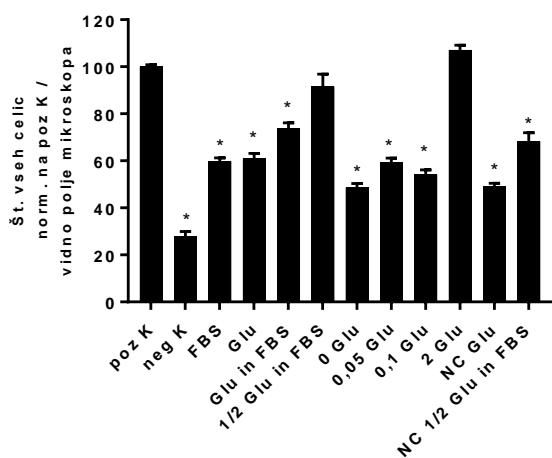
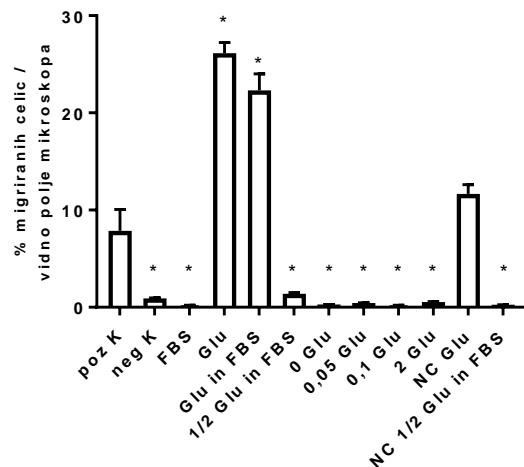
V literaturi so mnogokrat predstavljeni rezultati kot surovi podatki števila migriranih celic. Vendar pa je iz slike 23 razvidno, da je manjše število migriranih celic lahko posledica vpliva metformina na preživetje po 48 urah. Zato smo ugotovili, da je zelo pomembno, da predstavimo migrirane celice, normirane na preživetje, saj nam odstotek števila migriranih celic glede na število vseh celic (odvisno od preživetja celic) da največjo informativno vrednost, ker hkrati upoštevamo vpliv učinkovin na preživetje celic in s tem posredno tudi na število celic, ki lahko migrirajo.

4.6 PRIMERJAVA MIGRACIJE CELIČNIH LINIJ B16F1 IN B16F10

1×10^5 celic B16F10, predhodno izpostavljenih gojišču brez seruma (stradanje celic), smo nasadili na koš (Transwell permeable support) na 12-jamično ploščo. Uporabili smo kontrolno gojišče mu dodali ustrezne dodatke in koše izpostavili različnim koncentracijam glutamina in 10 % serumu. Istočasno smo na koše nasadili tudi nestradane celice (NC) in testirali učinkovine. Po 24-urni migraciji smo celice pobarvali z barvilom Hoechst 33342 in jih prešteli pod mikroskopom. Najprej smo posneli vse celice, iz česar smo določili skupno število, nato smo postrgali zgornji (nemigriran) sloj in posneli še migrirane celice. Celice B16F1 in B16F10 smo izpostavili istim razmeram in primerjali, ali se pojavijo kakšne razlike med celičnima linijama.

A

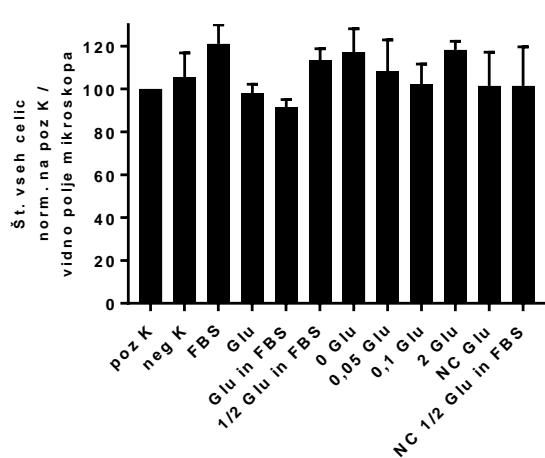
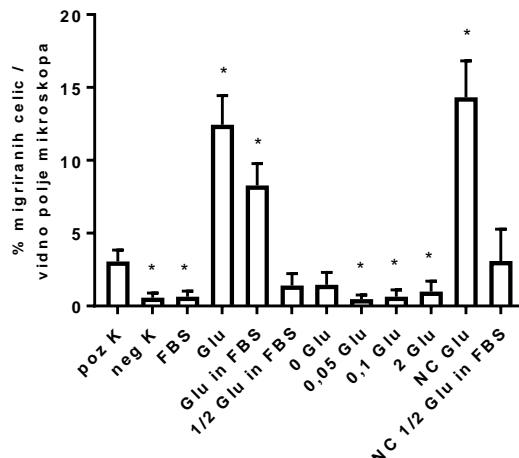
| | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------------|-------|----------|----------|----------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|----------|----------------------|----------------------|
| Koš | 2 mM Glu | / | 10 % FBS | 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 10 % FBS | / | / | / | / | NC 2 mM Glu | NC 10 % FBS |
| Jamica | 10 % FBS 2 mM Glu | / | 10 % FBS | 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 10 % FBS 0.05 mM Glu | 10 % FBS 0.1 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu |
| | poz K | neg K | FBS | Glu | Glu in FBS | ½ Glu in FBS | 0 Glu | 0.05 Glu | 0,1 Glu | 2 Glu | NC Glu | NC ½ Glu in FBS |

B**C****Slika 24: Vpliv glutamina in serumna na migracijo celic B16F1.**

A: Legenda predstavlja sestavo gojišča. Na koše smo nasadili 1×10^5 celic B16F10 v gojišče DMEM z 1 g/L glukoze in dodatki ki so razvidni iz legende, ter jih pustili migrirati 24 ur. B: Preživetje – število vseh celic, normirano na pozitivno kontrolo. C: Odstotek migriranih celic glede na skupno število preživelih celic. Število celic, prikazano na grafu, predstavlja povprečno število preživelih celic na vidno polje fluorescenčnega mikroskopa. \pm SEM. ($n = 1$). * $P < 0,05$ v primerjavi s poz K (ANOVA – Dunnettov test).

A

| | 2 mM Glu | / | 10 % FBS | 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 10 % FBS | / | / | / | / | NC 2 mM Glu | NC 10 % FBS |
|--------|----------------------------|-------|-------------|-------------|----------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|
| Koš | | | | | | | | | | | | |
| Jamica | 10 % FBS 2 mM Glu | / | 10 % FBS | 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 10 % FBS | 10 % FBS 0,05 mM Glu | 10 % FBS 0,1 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu | 2 mM Glu | 10 % FBS 2 mM Glu |
| | poz K | neg K | FBS | Glu | Glu in FBS | % Glu in FBS | 0 Glu | 0,05 Glu | 0,1 Glu | 2 Glu | NC Glu | NC ½ Glu in FBS |

B**C**

Slika 25: Vpliv glutamina in serumna na migracijo celic B16F10.

A: Legenda predstavlja sestavo gojišča. Na koše smo nasadili 1×10^5 celic B16F10 v gojišče DMEM z 1 g/L glukoze in dodatki ki so razvidni iz legende, ter jih pustili migrirati 24 ur. B: Preživetje – število vseh celic, normirano na pozitivno kontrolo. C: Odstotek migriranih celic glede na skupno število preživelih celic. Število celic, prikazano na grafu, predstavlja povprečno število celic na vidno polje fluorescenčnega mikroskopa. +/- SEM. ($n = 3$). * $P < 0,05$ v primerjavi s poz K (ANOVA – Dunnettov test).

Pri celični liniji B16F1 z nižjim metastatskim potencialom migrira približno enako število celic kot pri B16F10, kar ni v skladu z našimi pričakovanjimi, saj ima linija z višjim metastatskim potencialom višjo invazijsko moč in s tem lahko *in vivo* tvori več metastaz. Da bi prišli do nedvoumnega zaključka, bi bilo treba poskus s celicami B16F1 še ponoviti ($n = 1$). Iz rezultatov je razvidno, da je pri izpostavitvi celic 2 mM glutaminu in prisotnemu serumu v gojišču ne glede na to, ali sta glutamin in serum prisotna samo v košu ali jamici ali kar v obeh, migriralo največ celic. Pri negativni kontroli, kjer h kontrolnemu gojišču ni dodan ne serum ne glutamin, je bilo preživetje celic najnižje, obenem je bila nizka tudi migracija celic. Pri celicah, ki niso bile predhodno izpostavljene gojišču brez serumata (nestradane celice – NC), sta obe izpostavitvi direktno primerljivi s predhodno stradanimi celicami (Glu; Glu in FBS). Opazno je, da dodatek serumata kot kemoatraktanta, ki ga navajajo v literaturi, ni najuspešnejši. V primerih "FBS" in "0 Glu", kjer je h kontrolnemu

gojišču dodan samo serum in ni prisotnega glutamina, se je preživetje celic zmanjšalo in celice tudi niso migrirale. Ugotovili smo, da na migracijo najbolj vpliva izpostavljenost glutaminu, kar potrjuje primer “2 Glu”, kjer glutamina ni bilo v košu, ampak je bil le v jamici, in celice niso migrirale. Največ celic je migriralo, če je bilo v košu in hkrati tudi v jamici prisotnega 2 mM glutamina. Zato menimo, da glutamin deluje kot pospeševalec migracije.

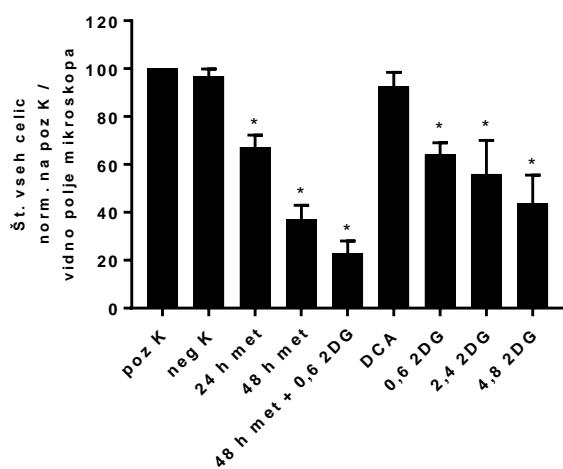
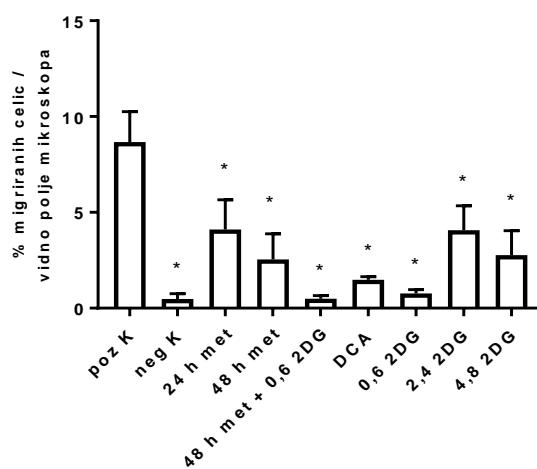
4.7 VPLIV METFORMINA IN DRUGIH AKTIVATORJEV AMPK NA MIGRACIJO CELIC B16F10

1×10^5 celic B16F10, predhodno izpostavljenih gojišču brez seruma smo nasadili na koš (Transwell permeable support) na 12-jamično ploščo. Uporabili smo kontrolno gojišče z glutaminom, mu dodali ustrezne dodatke in koše izpostavili različnim učinkovinam ter 10 % serumu v jamici kot kemoatraktantu. Po 24-urni migraciji smo celice pobarvali z barvilm Hoechst in jih detektirali pod mikroskopom. Najprej smo posneli vse celice, iz česar smo določili skupno število, nato smo postrgali zgornji (nemigriran) sloj in posneli še migrirane celice, iz česar smo določili število migriranih celic ter posledično odstotek migriranih celic glede na vse preštete celice.

A

| Koš | / | / | 5 mM met | 5 mM met 48 h | 5 mM met 48 h | 5 mM DCA | 0,6 mM 2DG | 2,4 mM 2DG | 4,8 mM 2DG |
|--------|----------|---|----------------------|-------------------------|---|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Jamica | 10 % FBS | / | 10 % FBS 5 mM met | 10 % FBS 5 mM met | 10 % FBS 5 mM met 0,6 mM 2DG 48 h met + 0,6 2DG | 10 % FBS 5 mM DCA | 10 % FBS 0,6 mM 2DG | 10 % FBS 2,4 mM 2DG | 10 % FBS 4,8 mM 2DG |

poz K neg K 24 h met 48 h met 48 h met + 0,6 2DG DCA 0,6 2DG 2,4 2DG 4,8 2DG

B**C**

Slika 26: Vpliv metformina, DCA ali različnih koncentracij 2DG na migracijo celic B16F10.

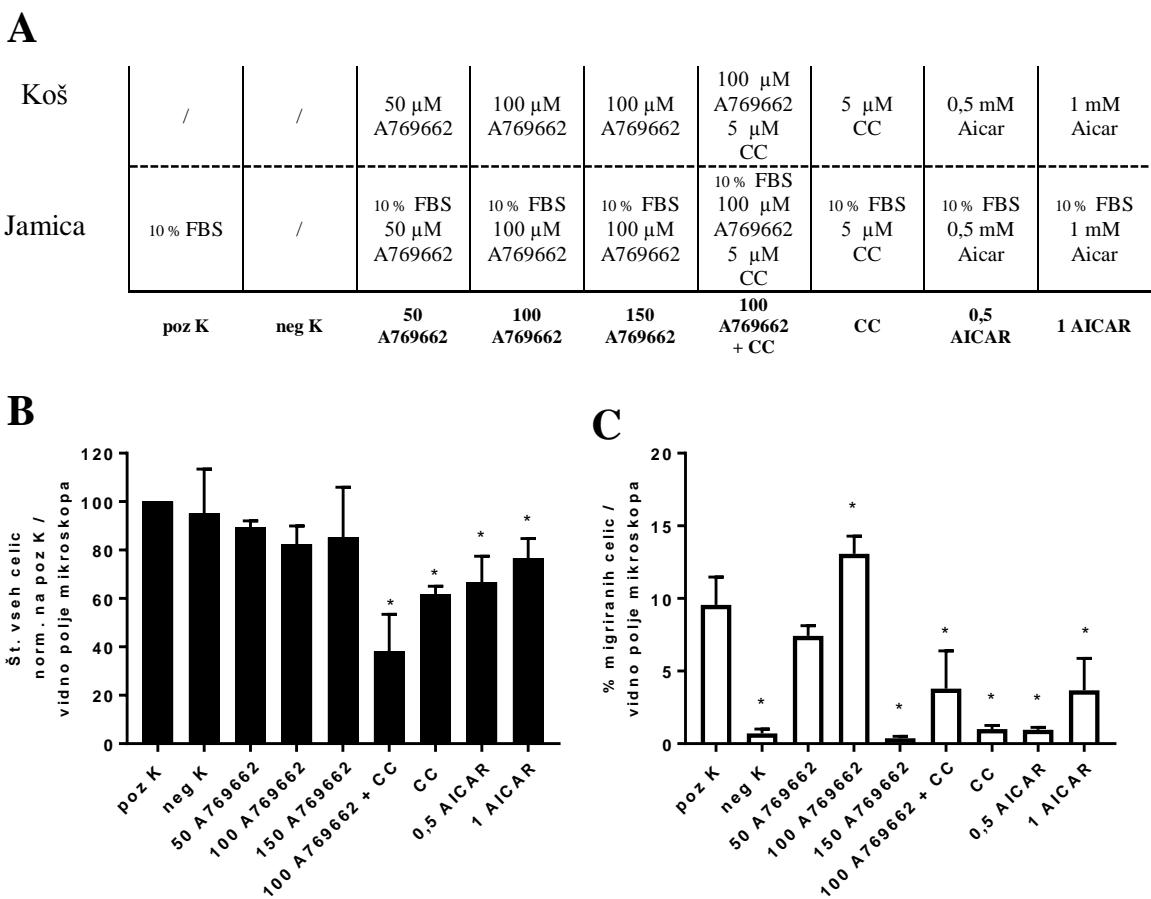
A: Legenda predstavlja sestavo gojišča. Na koše smo nasadili 1×10^5 celic B16F10 v gojišče DMEM z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in dodatki, ki so razvidni iz legende, ter jih pustili migrirati 24 ur. B: Preživetje – število vseh celic, normirano na pozitivno kontrolo. C: Odstotek migriranih celic glede na skupno število preživelih celic. Število celic, prikazano na grafu, predstavlja povprečno število celic na vidno polje fluorescenčnega mikroskopa. **48 h met** – celice smo pred migracijo 24 ur izpostavili metforminu in nato še enkrat 24 ur med migracijo (skupno so torej 5 mM metforminu izpostavljene 48 h). +/- SEM. (n = 3). *P < 0,05 v primerjavi s poz K (ANOVA – Dunnettov test).

Po pričakovanju je v naših rezultatih skupno število preživelih celic ob dodatku 5 mM metformina nižje od kontrole. Še nižje preživetje je bilo pri 48-urni inkubaciji z metforminom, kar se ujema s predhodnimi testi MTS in z barvanjem s Hoechstom. Hkrati je razvidno, da inkubacija z metforminom zmanjša tudi migracijo celic, saj pri daljši izpostavitvi migrira manj celic. Pri analizah kombinacije metformina in 2DG je preživetje najbolj zmanjšal 5 mM metformin v kombinaciji z 0,6 mM 2DG, saj je preživetje (število vseh celic, normirano na pozitivno kontrolo) padlo na 25 %, hkrati pa je migriralo tudi mnogo manj celic. 2DG se je kot inhibitor AMPK izkazal z antineoplastičnim učinkom pri različnih celičnih linijah (rak debelega črevesja, rak prostate) *in vitro* ter tudi *in vivo* pri miših ozziroma v kliničnih študijah (Zhang in sod. 2014). Metformin je široko uporabljen zdravilo za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2, ki se ga predpisuje skoraj 120 milijonom ljudi. Podobno kot 2DG metformin inhibira energijsko občutljive signalne poti mTOR in

vpliva na celično presnovo. Čeprav ima 2DG omejen terapevtski učinek, bi to spojino lahko pri določenih tipih raka kombinirali z drugimi terapevtskimi sredstvi ali radioterapijo, da se pokaže sinergističen protirakavi učinek (Zhang in sod. 2014). Najbolj učinkovita je kombinacija 2DG in metformina. Dokazali so, da lahko povzroči znatno smrt celic raka prostate, kar je povezano z znižano celično koncentracijo ATP in dolgotrajno aktivacijo AMPK ter trajno avtofagijo. Metformin lahko deluje sinergistično z 2DG, saj spremeni odziv celic na 2DG, in sicer od avtofagije do apoptoze. Kombinacija teh dveh učinkovin je veliko bolj uspešna kot tretiranje z metforminom ali 2DG samim, saj je znižala preživetje celic človeškega adenokarcinoma prostate za 96% medtem ko se je pri normalnih eipitelijskih celicah prostate pokazal le zmeren učinek (Sahra in sod., 2010). Predhodno so v raziskavah že pokazali, da 2DG in metformin delujeta sinergistično na različne tipe raka in inducirata apoptozo (Ben Sahra in sod., 2010; Fu in sod., 2013) oz. izboljšata terapevtsko uspešnost tarčnega zdravljenja raka dojk z radioaktivnim jodom (Chatterjee in sod., 2015). Klinične študije so se osredotočile tudi na varnost uporabe 2DG in pri tem prišle do spoznanja, da čeprav lahko visoka presnovna tkiva v telesu, kot so možgani in srce, privzamejo veliko količino 2DG, to tudi pri višjih dozah 2DG (0,2 g/kg) ne predstavlja težav. Zdravilo je samo ali v kombinaciji s kemoterapijo in radioterapijo varno in pacienti ga dobro prenašajo (Zhang in sod. 2014).

Samostojno 2DG zmanjša preživetje melanomskih celic v vseh treh testiranih koncentracijah, in sicer na 65 % pri 0,6 in 2,4 mM in na približno 40 % pri 4,8 mM 2DG. Kot zanimivost smo ugotovili, da različne koncentracije 2DG zelo različno vplivajo na migracijo celic, kar si lahko razlagamo tako, da odvzem energije rakavim celicam ne zadošča za antitumorni učinek, saj je ATP potreben za apoptozo, posledično pa imajo apoptotične celice na splošno povišano raven ATP. To pomeni, da lahko 2DG paradoksalno povzroča citoprotективni učinek (Kurtoglu in sod., 2007). Poleg tega zdravljenje z 2DG, ki posnema odvzem glukoze, pri nekaterih celicah ne poveča dovzetnosti za smrt, ker lahko še naprej pridobivajo energijo z oksidacijo maščobnih kislin in aminokislin (Raez in sod., 2013).

Stockwin in sod. (2010) so ugotovili, da DCA kot samostojna učinkovina nima citotoksičnega učinka na rakave celice, kar se ujema tudi z našimi rezultati, vendar pa vpliva na migracijo celic, kot je vidno iz grafa, saj zmanjša delež migriranih celic. Tudi Pyo in sodelavci (2015) so objavili članek, kjer so pokazali, da že 200 µM DCA signifikantno zavira migracijo celic želodčnega karcinoma. DCA naj bi zmanjšal proizvodnjo laktata, zato posledično ne pride do nižanja pH, kar bi lahko vplivalo na invazivnost *in vivo* (Niewirsch in sod. 2012).



Slika 27: Vpliv spojine C, različnih koncentracij AICAR in A769662 na migracijo celic B16F10.

A: Legenda predstavlja sestavo gojišča. Na koše smo nasadili 1×10^5 celic B16F10 v gojišče DMEM z 1 g/L glukoze, 2 mM glutaminom in dodatki ki so razvidni iz legende, ter jih pustili migrirati 24 ur. B: Preživetje – število vseh celic, normirano na pozitivno kontrolo. C: Odstotek migriranih celic glede na skupno število preživelih celic. Število celic prikazano na grafu, predstavlja povprečno število celic na vidno polje fluorescenčnega mikroskopa. \pm SEM. ($n = 3$). * $P < 0,05$ v primerjavi s poz K (ANOVA – Dunnettov test).

Ross in sod. (2015) so izvedli študijo migracijskega testa, tipa celjenja ran na pigmentnih epitelijskih celicah mrežnice, kjer so preverjali učinek učinkovine A769662. A769662 je dobro opisan aktivator AMPK, ki izraža manj izventarčnih učinkov v primerjavi z drugimi zdravili, ki prav tako aktivirajo AMPK (npr. AICAR). Pokazali so, da A769662 močno zmanjša migracijo tega tipa celic. V naši študiji migracije melanomskih celic smo ta učinek zaznali pri 150 µM koncentraciji A769662, kjer se je migracija skoraj popolnoma ustavila. Pri nižjih koncentracijah (50 µM) A769662 je bila migracija enaka kot pri pozitivni kontroli, pri 100 µM A769662 se je celo za približno 30 % povečala. Pričakovali smo, da se bo vsaj pri višjih koncentracijah A769662 zmanjšalo preživetje celic B16F10, kot je bilo opisano v raziskavah (Choudhury in sod., 2014), vendar tega učinka nismo zaznali. Naši rezultati so v nasprotju s pogledom, da aktivacija AMPK zavira preživetje in migracijo rakavih celic. Vendar si jih lahko razlagamo tako, da so med drugim tudi ugotovili, da aktivacija AMPK z A769662 lahko daje selektivno proliferativno prednost rakavim celicam, če rastejo s pomanjkanjem hranil (Vincent in sod., 2014), saj je AMPK centralni regulator odgovora na

energijski stres in tako omogoča prilagoditev celic na negativno mikrookolje ter preživetje v neugodnih razmerah. Spojina C se kljub svoji neselektivnosti še vedno uporablja kot inhibitor AMPK. V nedavni študiji so Rios in sodelavci CC uporabili kot inhibitor AMPK *in vitro* in *in vivo* ter s tem učinkovito zmanjšali širjenje in rast astrocitomov. Tudi v naših rezultatih je pri skupnem številu celic izraženo, da CC zmanjuje preživetje, obenem pa zavira tudi migracijo celic v primerjavi s pozitivno kontrolo. Hkraten učinek 5 µM spojine C in 100 µM A769662 močno zmanjša preživetje celic B16F10, vendar ima le malo vpliva na zmanjšanje migracije. Mogoče bi višja koncentracija A769662 (npr. 150 µM) imela večji učinek, saj tudi samostojno zelo zniža migracijo. Kot predhodno pokazano (Peyton in sod., 2012; Ross in sod., 2015), deluje aktivator AMPK AICAR citotoksično na epiteljske rakave celice. Tudi iz naših rezultatov je razvidno, da AICAR znižuje preživetje in migracijo melanomskih celic. Skupno število celic je po 24 urah inkubacije zmanjšano pri obeh koncentracijah AICAR, tudi migracija celic je zavirana. V splošnem pa iz pridobljenih rezultatov ne moremo sklepati, da bi aktivatorji AMPK povečali migracijo, saj je bilo povečanje opaziti samo pri eni koncentraciji spojine Abbott A769662.

Med testi migracije smo med drugim tudi pokazali, da se lahko koši za migracijo celic ponovno uporabijo, saj so bili rezultati ponovljivi. Hkrati smo tudi optimizirali njihovo čiščenje.

5 SKLEPI

1. Pokazali smo, da je rast celic B16F1 in B16F10 zelo odvisna od ravni hranil v gojišču, predvsem pa od glutamina in seruma. Če sta glutamin ali serum odsotna iz gojišča, se celice ne samo ne podvojujejo več, ampak celo umirajo.
2. Naši rezultati so na obeh linijah B16 potrdili, da 5 mmol/L metformin znižuje število živih celic. Učinek je bil podoben pri obeh linijah (B16F1 in B16F10), kljub različnemu metastatskemu potencialu. Po 48-urni izpostavitevi 5 mmol/L metforminu se je število celic zmanjšalo na polovico. Izpostavljenost celic nižjim koncentracijam metformina ni kazala vpliva na preživetje.
3. Hipoteze, da glutamin poveča preživetje celic B16F1 in B16F10 ob izpostavljenosti metforminu ne moremo popolnoma ovreči. Pri nižjih koncentracijah glutamina (0; 0,05; 0,1 mM) ni bilo signifikantne razlike v primerjavi s celicami, ki so bile izpostavljene kontroli brez metformina. Pri standardni 2 mM koncentraciji ima glutamin ob dodatku metformina manjši zaščitni učinek. Ta učinek bi bilo vsekakor smiselno še nadalje raziskati.
4. Pri celičnih linijah B16F1 in B16F10 farmakološka aktivacija piruvat dehidrogenaze s 5 mM učinkovino DCA nima vpliva na preživetje celic. Tudi sinergističnega učinka DCA in metformina nismo opazili (ne poveča in ne zmanjša živosti celic v primerjavi s kontrolo z metforminom). Test MTS pokaže povisane vrednosti pri izpostavitvah učinkovin v primerjavi s kontrolo, kar je verjetno posledica povisane koncentracije NADH. Ob tem poskusu smo prišli do zanimivega rezultata, da testa MTS ne moremo uporabljati za določanje realnega preživetja ozziroma števila celic B16 pri preverjanju učinkovin, ki modulirajo celično presnovu.
5. Migracija celic B16F10 je bila najuspešnejša, ko smo na koš nasadili 1×10^5 celic, ki so bile razporejene po celotni porozni površini membrane na košu. Največ celic migrira pri 24-urni časovni inkubaciji.
6. Pomembna razlika med celičnima linijama, ki smo jo opazili *in vitro* je bila v hitrosti proliferacije. Linija z višjim metastatskim potencialom B16F10 se je pri istih pogojih podvojevala hitreje kot linija z nižjim metastatskim potencialom B16F1. Hipoteze, da so celice B16F10 bolj sposobne migracije kot celice B16F1, nismo potrdili, saj smo dobili podoben delež migriranih celic znotraj napake. Ker pa smo pri celicah B16F1 naredili le eno biološko ponovitev poskusa, bi za dokončno potrditev ali zavrnitev hipoteze morali migracijski test ponoviti.
7. Naša hipoteza je bila, da ima aktivacija AMPK lahko v določenih razmerah negativen vpliv – torej pripomore k preživetju celic/ozziroma poveča agresivnost (migracijo) celic B16F10. Na podlagi pridobljenih rezultatov ne moremo sklepati, da bi aktivatorji AMPK

povečali migracijo, saj je bilo povečanje opaziti samo pri eni koncentraciji spojine A769662. Za zelo učinkovita pri zmanjšanju živosti rakavih celic B16F10 ter zmanjšanju migracije se je izkazalo hkratno delovanje 5 mM metformina in 0,6 mM 2DG. Pomembna ugotovitev pri migracijskem testu je bila, da smo v rezultatih prikazali migrirane celice, ki smo jih normirali na skupno število preživelih celic. To nam je dalo mnogo bolj realno sliko delovanja učinkovin. Prišli smo tudi do rezultata, da glutamin deluje kot pospeševalec migracije.

6 POVZETEK (SUMMARY, ZUSAMMENFASSUNG)

6.1 POVZETEK

Izhodišče: Melanom je eden izmed najpogostejših rakov. Zelo pogost vzrok smrti bolnikov z melanomom so metastaze. Rakave celice imajo drugačen presnovni profil kot normalne celice, zato bi boljše poznavanje presnovnih poti rakavih celic lahko pripeljalo do odkritja novih farmakoloških tarč in s tem do oblik zdravljenja melanoma z metastazami. Raziskave so pokazale, da aktivacija z AMP aktivirane protein-kinaze (AMPK), senzorja celičnega energijskega statusa, negativno uravnava aerobno glikolizo v rakavih celicah in zavira rast raka *in vivo*.

Namen in hipoteze: Namen dela je bil preučiti vpliv mikrookolja in aktivatorjev AMPK na migracijo melanomskih celic. Namen dela smo strnili v preučevanje sedmih hipotez: 1. Proliferacija celic B16F1 in B16F10 je odvisna od prisotnosti seruma in glutamina v gojišču; 2. Celice B16F1 in B16F10 so različno občutljive na metformin; 3. Glutamin poveča preživetje celic B16F1 in B16F10 ob izpostavitvi metforminu; 4. Farmakološka aktivacija piruvat dehidrogenaze zmanjša preživetje celic B16F1 in B16F10 ob izpostavitvi metforminu; 5. Migracija celic B16F10 je odvisna od števila nasajenih celic in časa inkubacije; 6. Celice B16F10 so bolj sposobne migracije kot celice B16F1; 7. Aktivacija AMPK spodbudi migracijo celic B16F10.

Metode: Vpliv seruma, glutamina in aktivatorjev AMPK smo preverjali na mišjih melanomskih celicah B16F1 (linija z nižjim metastatskim potencialom) in B16F10 (linija z višjim metastatskim potencialom) s štetjem celic na hemocitometru, testom MTS in barvanjem jeder z reagentom Hoechst 33342. Metastatski potencial celic smo določali z migracijskim testom Transwell permeable support. Za statistično analizo smo uporabili analizo variance (ANOVA) in ustrezne *post hoc* teste za navzkrižne primerjave.

Rezultati: Rast celic B16F1 in B16F10 je bila povsem odvisna od prisotnosti glutamina (2 mM) in seruma (10 %) v gojišču. Celice B16F10, ki imajo visok metastatski potencial, so se hitreje podvojevale kot celice B16F1, ki imajo nizek metastatski potencial. Aktivator AMPK metformin (5 mM) je po 48-urni izpostavitvi zmanjšal število celic B16F1 in B16F10 za 50 %, medtem ko aktivator piruvat dehidrogenaze dikloroacetat (5 mM) ni imel vpliva na njihovo preživetje. Metformin in drugi aktivatorji AMPK niso spodbudili migracije celic B16F10. Pri poskusih z metforminom test MTS ni bil zanesljiv pokazatelj preživetja melanomskih celic.

Zaključki: Pokazali smo, da je test migracije, ki temelji na metodologiji Transwell permeable support, uporaben za preučevanje vplivov mikrookolja in aktivatorjev AMPK. Z uporabo te metodologije smo ugotovili, da mikrookolje odločilno vpliva na preživetje in migracijo melanomskih celic. Nenazadnje naši rezultati nakazujejo tudi, da aktivatorji AMPK večinoma znižujejo preživetje in/ali migracijo melanomskih celic.

6.2 SUMMARY

Basis: Melanoma is one of the most common types of cancer. Among patients with melanoma, metastases are very common cause of death. Cancer cells have a different metabolic profile compared to normal cells. Therefore, a better understanding of the metabolic pathways of cancer cells could lead to the discovery of new pharmacological targets and with it to new forms of treatment of melanoma with metastases. Research shows that activation with the AMP activated protein kinase (AMPK), a sensor of cellular energy status, negatively regulates aerobic glycolysis in cancer cells and inhibits the growth of cancer *in vivo*.

Purpose and hypotheses: The purpose of the thesis was to study the impact of the microenvironment and the AMPK activators on melanoma cell migration. The purpose was condensed in the study of seven hypotheses: 1. The proliferation of B16F1 and B16F10 cells depends on the presence of the serum and glutamine in the growth medium; 2. B16F1 and B16F10 cells have a different sensitivity to metformin; 3. Glutamine increases B16F1 and B16F10 cell survival upon exposure to metformin; 4. The pharmacological activation of pyruvate dehydrogenase reduces B16F1 and B16F10 cell survival upon exposure to metformin; 5. Migration of B16F10 cells depends on the number of cells seeded and time of incubation; 6. B16F10 cells are more capable of migration than B16F1 cells; 7. Activation of AMPK promotes the migration of B16F10 cells.

Methods: The influence of serum, glutamine and AMPK activators was checked on mouse melanoma cells B16F1 (a line with a lower metastatic potential) and B16F10 (a line with a higher metastatic potential), with counting the cells on a haemocytometer, MTS test and the staining of nuclei with the reagent Hoechst 33342. The metastatic potential of cells was determined with the Transwell permeable support migration test. For the statistical analysis we used the analysis of variance (ANOVA) and the appropriate *post-hoc* tests for cross-comparisons.

Results: B16F1 and B16F10 cell growth was completely dependent on the presence of glutamine (2 mM) and serum (10%) in the growth medium. B16F10 cells, which have a high metastatic potential, duplicated faster than B16F1 cells, which have a low metastatic potential. After a 48 hour exposure the AMPK activator metformin (5 mM) reduced the number of B16F1 and B16F10 cells by 50%, while the activator of pyruvate dehydrogenase dichloroacetate (5 mM) had no effect on their survival. Metformin and other AMPK activators did not induce the migration of B16F10 cells. In experiments with metformin the MTS test was not a reliable indicator of melanoma cell survival.

Conclusions: We have shown that the migration test, based on the methodology of Transwell permeable support, is useful for studying the effects of a microenvironment and AMPK activators. Using this methodology we have found that the microenvironment has a decisive impact on the survival and migration of melanoma cells. Finally, our results also indicate that AMPK activators generally decrease the survival and/or migration of melanoma cells.

6.3 ZUSAMMENFASSUNG

Grundlage: Das Melanom ist eine der meist verbreiteten Arten von Krebs. Unter den Patienten die an Krebs leiden, sind Metastasen eine sehr häufige Todesursache. Krebszellen haben ein anderes Stoffwechselprofil im Vergleich zu normalen Zellen, deshalb kann ein besseres Verstehen der Stoffwechselwege von Krebszellen dazu führen neue pharmakologische Ziele zu entdecken und damit neue Möglichkeiten zur Behandlung des Melanoms mit Metastasen bieten. Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), ein Sensor des zellulären Energiestatus, negativ die aerobe Glykolyse in Krebszellen reguliert und das Wachstum des Krebses *in vivo* hemmt.

Zweck und Hypothesen: Der Zweck der Arbeit war die Wirkung der Mikroumgebung und der AMPK Aktivatoren auf die Migration der Melanom Zellen zu studieren. Der Zweck wurde mit der Studie von sieben Hypothesen zusammengefasst: 1. Die Proliferation von B16F1- und B16F10-Zellen, hängt von der Gegenwart des Serums und Glutamins im Wachstums Medium ab; 2. Die B16F1- und B16F10-Zellen sind unterschiedlich empfindlich auf Metformin; 3. Glutamin erhöht das Überleben der B16F1- und B16F10-Zellen bei der Behandlung mit Metformin; 4. Pharmakologische Aktivierung von Pyruvat-Dehydrogenase reduziert das Überleben der B16F1- und B16F10-Zellen bei der Behandlung mit Metformin; 5. Die Migration der B16F10-Zellen hängt von der Anzahl der ausgesäten Zellen, und der Zeit der Inkubation ab; 6. B16F10-Zellen sind in der Lage besser zu migrieren als B16F1-Zellen; 7. AMPK Aktivierung fördert die B16F10- Zellmigration.

Methoden: Die Wirkung von Serum, Glutamin und AMPK Aktivatoren untersuchten wir mit den Maus Melanom B16F1- (Linie mit einem niedrigeren Metastasierungspotential), und B16F10-Zellen (Linie mit höheren Metastasierungspotential), mit dem Zählen auf einem Hämozytometer, dem Test MTS und dem Färben der Kerne mit Hoechst-33342 Reagenz. Das metastatische Potential der Zellen bestimmten wir durch den Migrationstest Transwell permeable support. Für die statistische Analyse verwendeten wir die Weg-Varianzanalyse (ANOVA) und die entsprechenden *Post-hoc*-Tests für die Quervergleiche.

Ergebnisse: Das B16F1- und B16F10-Zellwachstum war vollständig abhängig von der Anwesenheit von Glutamin (2 mM) und Serum (10%) im Medium. B16F10-Zellen, die ein hohes metastatisches Potential haben, teilten sich schneller als B16F1-Zellen, die ein niedriges metastatisches Potential haben. Der AMPK Aktivator Metformin (5 mM) reduzierte nach 48-stündiger Exposition, die Anzahl von B16F1- und B16F10-Zellen, um 50%, während der Aktivator von Pyruvat-Dehydrogenase Dichloracetat (5 mM) auf ihr Überleben keine Wirkung hatte. Metformin und andere AMPK-Aktivatoren haben die Migration von B16F10-Zellen nicht gefördert. Bei den Experimenten mit Metformin war der Test MTS kein verlässlicher Indikator für das Überleben von Melanom Zellen.

Schlussfolgerungen: Wir haben gezeigt, dass der Migrationstest, basierend auf der Methode Transwell permeable support, für das Studieren von Wirkungen der Mikroumgebung und AMPK-Aktivatoren, brauchbar ist. Mit der Verwendung dieser Methode haben wir festgestellt, dass die Mikroumgebung von entscheidender Bedeutung für das Überleben und die Migration der Melanom Zellen ist. Schließlich zeigen unsere Ergebnisse auch, dass AMPK-Aktivatoren im Allgemeinen das Überleben und/oder die Migration von Melanom Zellen reduzieren.

7 VIRI

- Abildgaard C., Guldberg P. 2015. Molecular Drivers of Cellular Metabolic Reprogramming in Melanoma. *Trends in Molecular Medicine*, 21, 3: 164–171
- Albini A., Iwamoto Y., Kleinman H. K., Martin G. R., Aaronson S. A., Kozlowski J. M., McEwan R. N. 1987. A Rapid *in Vitro* Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells. *Cancer Research*, 47, 12: 3239–3245
- Ben Sahra I., Laurent K., Giuliano S., Larbret F., Ponzio G., Gounon P., Le Marchand-Brustel Y., Giorgetti-Peraldi S., Cormont M., Bertolotto C., Deckert M., Auberger P., Tanti J.-F., Bost F. 2010. Targeting Cancer Cell Metabolism: The Combination of Metformin and 2-Deoxyglucose Induces p53-Dependent Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 70, 6: 2465–2475
- Bénéteau M., Zunino B., Jacquin M. A., Meynet O., Chiche J., Pradelli L. A., Marchetti S., Cornille A., Carles M., Ricci J.-E. 2012. Combination of Glycolysis Inhibition with Chemotherapy Results in an Antitumor Immune Response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 49: 20071–20076
- Benziane B., Björnholm M., Lantier L., Viollet B., Zierath J. R., Chibalin A. V. 2009. AMP-Activated Protein Kinase Activator A-769662 Is an Inhibitor of the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 297, 6: 1554–1566
- Chatterjee S., Thaker N., De A. 2015. Combined 2-Deoxy Glucose and Metformin Improves Therapeutic Efficacy of Sodium-Iodide Symporter-Mediated Targeted Radioiodine Therapy in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer*, 7: 251–265
- Choi Y. W., Lim K. 2014. Sensitization of metformin-cytotoxicity by dichloroacetate via reprogramming glucose metabolism in cancer cells. *Cancer Letters*, 346, 2: 300–308
- Choudhury Y., Yang Z., Ahmad I., Nixon C., Salt I. P., Leung H. Y. 2014. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) as a Potential Therapeutic Target Independent of PI3K/Akt Signaling in Prostate Cancer. *Oncoscience*, 1, 6: 446–456
- Counting cells using a hemocytometer. 2016. Abcam.
<http://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer> (9. jul. 2016)
- DeBerardinis R. J., Lum J. J., Hatzivassiliou G., Thompson C. B. 2008. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, 7, 1: 11–20

- DeBerardinis R. J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S., Thompson C. B. 2007. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 49: 19345–19350
- Decensi A., Puntoni M., Goodwin P., Cazzaniga M., Gennari A., Bonanni B., Gandini S. 2010. Metformin and Cancer Risk in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Prevention Research*, 3, 11: 1451–1461
- Ducommun S., Ford R. J., Bultot L., Deak M., Bertrand L., Kemp B. E., Steinberg G. R., Sakamoto K. 2014. Enhanced Activation of Cellular AMPK by Dual-Small Molecule Treatment: AICAR and A769662. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 306, 6: 688–696
- Edelstein Peter. 2014. Own your cancer: a take-charge guide for the recently diagnosed and those who love them. Connecticut, Lyons Press: 255 str.
- Evans J. M. M., Donnelly L. A., Emslie-Smith A. M., Alessi D. R., Morris A. D. 2005. Metformin and Reduced Risk of Cancer in Diabetic Patients. *British Medical Journal*, 330, 7503: 1304–1305
- Faubert B., Boily G., Izreig S., Griss T., Samborska B., Dong Z., Dupuy F., Chambers C., Fuerth B. J., Viollet B., Mamer O. A., Avizonis D., DeBerardinis R. J., Siegel P. M., Jones R. G. 2013. AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth in Vivo. *Cell Metabolism*, 17, 1: 113–124
- Fidler I. J. in Kripke M. L. 1977. Metastasis Results from Preexisting Variant Cells within a Malignant Tumor. *Science*, 197, 4306: 893–895
- Fu K., Jiang C., Huang X., Chan W. C., McKeithan T. 2013. The Combination Of 2-DG and Metformin Inhibits The mTORC1 Pathway and Suppresses Aggressive B Cell Lymphoma Growth and Survival. *Blood*, 122, 21: 1665–1665
- Gehlsen K. R., Hendrix M. J. 1986. *In Vitro* Assay Demonstrates Similar Invasion Profiles for B16F1 and B16F10 Murine Melanoma Cells. *Cancer Letters*, 30, 2: 207–212
- Glucose in Cell Culture. Sigma-Aldrich.
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glucose.html> (8. jul. 2016)

- Göransson O., McBride A., Hawley S. A., Ross F. A., Shpiro N., Foretz M., Viollet B., Grahame Hardie D., Sakamoto K. 2007. Mechanism of Action of A-769662, a Valuable Tool for Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 45: 32549–32560
- Griss T., Vincent E. E., Egnatchik R., Chen J., Ma E. H., Faubert B., Viollet B., DeBerardinis R. J., Jones R. G. 2015. Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis. *PLoS Biology*, 13, 12: e1002309, doi: 10.1371/journal.pbio.1002309: 23 str.
- Guo D., Hildebrandt I. J., Prins R. M., Soto H., Mazzotta M. M., Dang J., Czernin J., Shyy J. Y.-J., Watson A. D., Phelps M., Radu C. G., Cloughesy T. F., Mischel P. S. 2009. The AMPK Agonist AICAR Inhibits the Growth of EGFRvIII-Expressing Glioblastomas by Inhibiting Lipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 31: 12932–12937
- Gupta P. B., Kuperwasser C., Brunet J.-P., Ramaswamy S., Kuo W.-L., Gray J. W., Naber S. P., Weinberg R. A. 2005. The Melanocyte Differentiation Program Predisposes to Metastasis after Neoplastic Transformation. *Nature Genetics*, 37, 10: 1047–1054
- Hadad S. M., Hardie D. G., Appleyard V., Thompson A.M. 2014. Effects of metformin on breast cancer cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle. *Clinical and Translational Oncology*, 16: 746–752
- Hanahan D., Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*, 144, 5: 646–764
- Hess J. A., Khasawneh M. K. 2015. Cancer Metabolism and Oxidative Stress: Insights into Carcinogenesis and Chemotherapy via the Non-Dihydrofolate Reductase Effects of Methotrexate. *BBA Clinical*, 3: 152–161
- Hoechst Stains. Invitrogen. 2005.
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp21486.pdf> (8. jul. 2016)
- Horman S., Beauloye C., Vanoverschelde J.-L., Bertrand L. 2012. AMP-Activated Protein Kinase in the Control of Cardiac Metabolism and Remodeling. *Current Heart Failure Reports*, 9, 3: 164–173
- Hseu Y.-C., Thiagarajan V., Tsou H.-T., Lin K.-Y., Chen H.-J., Lin C.-M., Liao J.-W., Yang H.-L. 2016. *In Vitro* and *in Vivo* Anti-Tumor Activity of CoQ0 against Melanoma Cells: Inhibition of Metastasis and Induction of Cell-Cycle Arrest and Apoptosis through Modulation of Wnt/β-Catenin Signaling Pathways. *Oncotarget*, 7, 16: 22409-22426

- Jeon S. M., Chandel N.S., Hay N. 2012. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485: 661–665
- Jongsma M., Matas-Rico E., Rzadkowski A., Jalink K., Moolenaar W. H. 2011. LPA Is a Chemorepellent for B16 Melanoma Cells: Action through the cAMP-Elevating LPA5 Receptor. *PloS One*, 6, 12: e29260, doi: 10.1371/journal.pone.0029260: 10 str.
- Kaelin W. G., Thompson C. B. 2010. Q&A: Cancer: Clues from Cell Metabolism. *Nature*, 465, 7298: 562–564
- Kim I., He Y. Y. 2013. Targeting the AMP-activated protein kinase for cancer prevention and therapy. *Frontriers in Oncology*, 3:175
- Kramer N., Walzl A., Unger C., Rosner M., Krupitza G., Hengstschläger M., Dolznig H. 2013. *In Vitro* Cell Migration and Invasion Assays. *Mutation Research*, 752, 1: 10–24
- Kroemer G., Pouyssegur J. 2008. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*, 13, 6: 472–482
- Kurtoglu M., Maher J. C., Lampidis T. J. 2007. Differential Toxic Mechanisms of 2-Deoxy-D-Glucose versus 2-Fluorodeoxy-D-Glucose in Hypoxic and Normoxic Tumor Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 9: 1383–90
- L-Glutamine in Cell Culture. Sigma-Aldrich.
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glutamine.html>. (7. jul. 2016)
- Luo, Z., Zang M., Guo W. 2010. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future oncology*, 6, 3: 457–470
- Liu X., Chhipa R. R., Nakano I., Dasgupta B. 2014. The AMPK Inhibitor Compound C Is a Potent AMPK-Independent Antiglioma Agent. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13, 3: 596–605
- Madiraju A. K., Erion D. M., Rahimi Y., Zhang X. M., Braddock D. T., Albright R. A., Prigaro B. J., Wood J. L., Bhanot S., MacDonald M. J., Jurczak M. J., Camporez J. P., Lee H .Y., Cline G. W., Samuel V. T., Kibbey R. G., Shulman G. I. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510, 7506: 542–572
- Masters J. R., Stacey G. N. 2007. Changing Medium and Passaging Cell Lines. *Nature Protocols*, 2, 9: 2276–2284

Michelakis, E. D., Sutendra G., Dromparis P., Webster L., Haromy A., Niven E., Maguire C., Gammer T.-L., Mackey J. R., Fulton D., Abdulkarim B., McMurtry M. S., Petruk K. C. 2010. Metabolic Modulation of Glioblastoma with Dichloroacetate. *Science Translational Medicine*, 2, 3: 31–34

Nguyen D. X., Bos P. D., Massagué J. 2009. Metastasis: From Dissemination to Organ-Specific Colonization. *Nature Reviews. Cancer*, 9, 4: 274–284

Niewisch M. R., Kuči Z., Wolburg H., Sautter M., Krampen L., Deubzer B., Handgretinger R., Bruchelt G. 2012. Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy?. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29, 3–4:373–80

Peyton K. J., Liu X., Yu Y., Yates B., Durante W. 2012. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Inhibits the Proliferation of Human Endothelial Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342, 3: 827–34

Pollak M. N. 2012. Investigating Metformin for Cancer Prevention and Treatment: The End of the Beginning. *Cancer Discovery*, 2, 9: 778–790

Pyo J. S., Ko Y. S., Kang G., Kim D. H., Kim W. H., Lee B. L., Sohn J. H. 2015. Bile acid induces MUC2 expression and inhibits tumor invasion in gastric carcinomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141, 7:1181–1188

Raez L. E., Papadopoulos K., Ricart A. D., Chiorean E. G., Dipaola R. S., Stein M. N., C. Rocha Lima M., Schlesselman J. J., Tolba K., Langmuir V. K., Kroll S., Jung D. T., Kurtoglu M., Rosenblatt J., Lampidis T. J. 2013. A Phase I Dose-Escalation Trial of 2-Deoxy-D-Glucose Alone or Combined with Docetaxel in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71, 2: 523–530

Rajh M., Dolinar K., Miš K., Pavlin M., Pirkmajer S. 2016. Medium Renewal Blocks Anti-Proliferative Effects of Metformin in Cultured MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PloS One*, 11, 5: e0154747, doi: 10.1371/journal.pone.0154747: 18 str.

Ratnikov B., Aza-Blanc P., Ronai Z. A., Smith J. W., Osterman A. L., Scott D. A. 2015. Glutamate and asparagine catabolism underlie glutamine addiction in melanoma. *Oncotarget*, 6, 10: 7379–7389

Ríos M., Foretz M., Viollet B., Prieto A., Fraga M., Costoya J. A., Señarís R. 2013. AMPK Activation by Oncogenesis Is Required to Maintain Cancer Cell Proliferation in Astrocytic Tumors. *Cancer Research*, 73, 8: 2628–2638

- Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. 2004. Cell viability assays. W: Assay Guidance Manual. Sittampalam G. S. (UR). Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: 1–30
- Romero-Garcia S., Moreno-Altamirano M. M. B., Prado-Garcia H., Sánchez-Garcia F. J. 2016. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Frontiers in Immunology*, 7, 52: 1–11
- Ross E., Ata R., Thavarajah T., Medvedev S., Bowden P., Marshall J. G., Antonescu C. N. 2015. AMP-Activated Protein Kinase Regulates the Cell Surface Proteome and Integrin Membrane Traffic. *PloS One*, 10, 5: e0128013, doi: 10.1371/journal.pone.0128013: 29 str.
- Samarasinghe B. The Hallmarks of Cancer 9: Reprogramming Energy Metabolism. Scientific American Blog Network. (8. okt. 2014).
<http://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-9-reprogramming-energy-metabolism/> (7. jun. 2016)
- Seong I., Jung Min H., Lee J.-H., Yeo C.-Y., Min Kang D., Oh E.-S., Sook Hwang E., Kim J. 2012. Sox10 Controls Migration of B16F10 Melanoma Cells through Multiple Regulatory Target Genes. *PloS One*, 7, 2: e31477, doi:10.1371/journal.pone.0031477: 11 str.
- Seyfried T. N., Shelton L. M. 2010. Cancer as a Metabolic Disease. *Nutrition & Metabolism*, 7, 7: 1–22
- Shaw R. J. 2006. Glucose Metabolism and Cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 6: 598–608
- Sounni E., Noel A. 2013. Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Clinical Chemistry*, 59, 1: 85–93
- Stockwin L. H., Yu S. X., Borgel S., Hancock C., Wolfe T. L., Phillips L. R., Hollingshead M. G., Newton D. L. 2010. Sodium Dichloroacetate Selectively Targets Cells with Defects in the Mitochondrial ETC. *International Journal of Cancer*. 127, 11: 2510–2519
- Sun R. C., Board P. G., Blackburn A. C. 2011. Targeting Metabolism with Arsenic Trioxide and Dichloroacetate in Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer*, 10: 142
- Vincent E. E., Coelho P. P., Blagih J., Griss T., Viollet B., Jones R. G. 2015. Differential Effects of AMPK Agonists on Cell Growth and Metabolism. *Oncogene*, 34, 28: 3627–3639

- Viollet B., Foretz M., Schlattner U. 2014. Bypassing AMPK Phosphorylation. *Chemistry & Biology*, 21, 5: 567–569
- Warburg, O. 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123, 3191: 309–314
- Warburg O., Wind F., Negelein E. 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, 8, 6: 519–530
- White R. M., Zon L. I. 2008. Melanocytes in Development, Regeneration, and Cancer. *Cell Stem Cell*, 3, 3: 242–252
- Wise D. R., Thompson C. B. 2010. Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 8: 427–433
- Wolf K., Alexander S., Schacht V., Coussens L. M., von Andrian U. H., van Rheenen J., Deryugina E., Friedl P. 2009. Collagen-Based Cell Migration Models *in Vitro* and *in Vivo*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 8: 931–941
- Xu W., Mezencev R., Kim B., Wang L., McDonald J., Sulchek T. 2012. Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7, 10: e46609, doi: 10.13171/journal.pone.0046609: 12 str.
- Zhang D., Li J., Wang F., Hu J., Wang S., Sun Y. 2014. 2-Deoxy-D-Glucose Targeting of Glucose Metabolism in Cancer Cells as a Potential Therapy. *Cancer Letters*. 355, 2: 176–183
- Zheng B., Jeong J. H., Asara J. M., Yuan Y.-Y., Granter S. R., Chin L., Cantley L. C. 2009. Oncogenic B-RAF Negatively Regulates the Tumor Suppressor LKB1 to Promote Melanoma Cell Proliferation. *Molecular Cell*, 33, 2: 237–247
- Zordoky B. N., Bark D., Soltys C. L., Sung M. M., Dyck J. R. 2014. The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: implications for cancer therapy and prevention. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 6: 1943–1957

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Pavlin in somentorju doc. dr. Sergeju Pirkmajerju za zanimivo temo magistrske naloge ter za izvrstno vodenje in konstruktivne pogovore. Pod njunim mentorstvom sem pridobila vpogled v znanost z vidika, ki ga je deležen le malokdo, za kar sem jima zelo hvaležna. Hvala tudi recenzentu prof. dr. Maticu Legiši za hiter in temeljit pregled naloge.

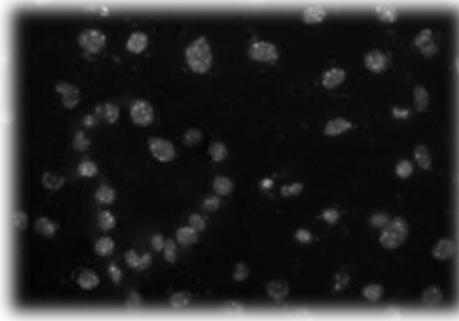
Posebna zahvala gre Maruši Rajh za vso pomoč pri izvedbi poskusov in nasvete v času priprave magistrskega dela. Za podporo bi se rada zahvalila tudi celotni skupini za nano- in biotehniške aplikacije na Fakulteti za elektrotehniko ter vsem v laboratoriju za molekularno nevrobiologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo, še posebej Klemnu Dolinarju.

Zahvaljujem se družini, ki je poskrbela za razvoj moje radovednosti, najbolj fantu Alešu in sestri Saši, ki sta mi v času študija stala ob strani in me spodbujala. Moji dragi, hvala vam, da me v življenju neprestano podpirate, me učite živeti in mi omogočate, da lahko sledim svojim ciljem.

Zahvala gre tudi Kaji, s katero sva se med študijem, tako na fakulteti kot izven nje, motivirali, zabavali in si pomagali, da je študij postal prijetna izkušnja.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki ste pripomogli k temu, da so bila moja študentska leta nepozabna.

Za vse, ki mi stojite ob strani:



Slika predstavlja celice B16F10 na migracijskem testu Transwell permeable support, pobarvane z barvilom Hoechst 33342 in zajete s fluorescentnim mikroskopom pri 10-kratni povečavi.

Ne nazadnje gre zahvala še vsem znanstvenikom in strokovnjakom, katerih študije in članki so mi bili v veliko pomoč pri pisanju magistrskega dela.