

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie



**HODNOCENÍ VLIVU INHIBITORŮ CDK A FLT3 NA AKTIVITU ABC
EFLUXNÍCH TRANSPORTÉRŮ IN VITRO, VZTAH K MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ
REZISTENCI**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracovávání čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

V Hradci Králové

Jakub Poráč

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné poznámky a konzultace. Poděkovat bych chtěl také Mgr. Simoně Suché a PharmDr. Alešovi Šorfovi, Ph.D. za pomoc zejména v experimentální části diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Jakub Poráč

Školitel: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení vlivu inhibitorů CDK a FLT3 na aktivitu ABC efluxních transportérů *in vitro*, vztah k mnohočetné lékové rezistenci

P-gp a BCRP jsou transmembránové proteiny, které tvoří součást velké rodiny ABC transportérů. Jedná se o ATP-řízené transportéry, jejichž hlavním úkolem je eliminace exogenních i endogenních látek a jejich metabolitů z buněk, a to jak zdravých, tak nádorových tkání. Mnohdy je tato aktivita spojována s vypuzováním podaných terapeutik a mnohočetnou lékovou rezistencí (MDR) v nádorových buňkách. Slibnou terapii nádorových onemocnění představuje novější skupina léčiv cílících na tyrozínkinázy (TK) a cyklin-dependentní kinázy (CDK), což jsou buněčné enzymy zodpovídající za procesy proliferace, apoptózy a diferenciace. Inhibitory cyklin dependentních kináz (CDKI) jsou používány v terapii nádorů prsu, zároveň ale tvoří novou skupinu léčiv s potenciálem využití u hematologických malignit. V terapii AML představují nový úspěšný přístup zejména TK inhibitory (TKI), které cílí na mutovaný FLT3 receptor, konkrétně nedávno schválená léčiva midostaurin a gilteritinib. Tyto látky a nové investigativní léčivo FLX925, které se chová jako TKI a zároveň CDKI, byly předmětem této práce. Naším cílem bylo studium těchto léčiv ve smyslu inhibice ABC efluxních transportérů ABCB1 a ABCG2. Prvním krokem bylo provedení akumulčních studií se zvolenými substráty (daunorubicinem a mitoxantronem) na rezistentních buněčných liniích HL-60 ABCB1 a HL-60 ABCG2, a zároveň na kontrolní nerezistentní parentní buněčné linii HL-60. Prokazatelný inhibiční efekt vůči oběma transportérům byl nalezen u inhibitorů midostaurinu (MID) a gilteritinibu (GIL). FLX925 působil výraznější inhibici až při vysoké použité koncentraci (50 μ M). V následných apoptotických studiích prokázaly MID a GIL pozitivní potencovaný účinek oproti samotnému substrátu (mitoxantronu) a z práce vychází jako modulátory MDR nové generace, a tím kandidáti při pokračování do dalšího výzkumu.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Jakub Poráč

Supervisor: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of CDK and FLT3 inhibitors on activity of ABC efflux transporters *in vitro*, relation to multidrug resistance

P-gp and BCRP are transmembrane proteins that form part of a large family of ABC transporters. These are ATP-driven transporters, which main task is to eliminate exogenous and endogenous substances and their metabolites from cells of both, healthy and tumour tissues. This activity is often associated with the expulsion of administered therapeutics and multiple drug resistance (MDR) in tumour cells. A promising therapy of cancer represents a newer class of drugs target the tyrosine kinase (TK), and cyclin-dependent kinases (CDK), which are cell enzymes responsible for the processes of proliferation, apoptosis and differentiation. Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI) are used in the treatment of breast cancer, but at the same time they form a new group of drugs with the potential for use in hematological malignancies. In the treatment of AML, a new successful approach is TK inhibitors (TKI), which target the mutated FLT3 receptor, specifically the recently approved drugs midostaurin and gilteritinib. These substances and the new investigative drug FLX925, which acts as both, TKI and CDKI, were the subject of this thesis. Our aim was to study these drugs in terms of inhibition of ABC efflux transporters ABCB1 and ABCG2. The first step was to conduct accumulation studies with selected substrates (daunorubicin and mitoxantrone) on the resistant cell lines HL-60 ABCB1 and HL-60 ABCG2, as well as on the control non-resistant parent cell line HL-60. A clear inhibitory effect on both transporters was found with midostaurin (MID) and gilteritinib (GIL) inhibitors. FLX925 revealed more pronounced inhibition only at the high concentration used (50 μ M). In subsequent apoptotic studies, MID and GIL showed a positive potentiated effect over the substrate alone (mitoxantrone). Based on the thesis results, MID and GIL can be suggested as a new generation MDR modulators, and thereby candidates worthy follow up investigations.

Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Úvod	10
3. Teoretická část	12
3.1. Akutní myeloidní leukémie (AML)	12
3.2. ABC transportéry	13
3.2.1. Struktura a mechanismus působení ABC efluxních transportérů	13
3.2.2. Lokalizace ABC efluxních transportérů	14
3.2.3. Funkce ABC transportérů	16
3.2.4. Role ABC efluxních transportérů v mnohočetné lékové rezistenci	16
3.2.4.1. P-glykoprotein (ABCB1)	17
3.2.4.2. Breast cancer resistance protein (ABCG2)	19
3.3. Inhibitory tyrozinkináz (TKI)	20
3.3.1. Midostaurin	22
3.3.2. Gilteritinib	24
3.3.3. FLX925	26
3.3.4. Léková rezistence k tyrozinkinázovým inhibitorům	26
4. Cíl práce	29
5. Experimentální část	30
5.1. Chemikálie	30
5.2. Přístroje	30
5.3. Buněčná linie	30
5.4. Pasážování	31
5.5. Akumulační studie	31
5.5.1. Průběh experimentu	31
5.6. Detekce apoptózy buněk	32

5.6.1.	Studium apoptózy buněk pomocí duálního barvení annexinem V/PI.....	32
5.6.1.1.	Průběh experimentu.....	33
5.6.2.	Studium apoptotické subG1 fáze buněk.....	35
5.6.2.1.	Průběh experimentu.....	36
5.7.	Statistická analýza dat	36
6.	Výsledky	38
6.1.	Akumulační studie.....	38
6.1.1.	Inhibice ABCB1.....	38
6.1.2.	Inhibice ABCG2	39
6.2.	Kombinační studie.....	41
6.2.1.	Studium apoptózy u buněk exprimujících ABCB1 transportér	41
6.2.2.	Studium apoptózy u buněk exprimujících ABCG2 transportér.....	43
7.	Diskuze	45
8.	Závěr	48
9.	Zdroje.....	49
10.	Elektronické zdroje	62

1. Seznam zkratek

ABB	annexin V vázající pufr (z angl. „annexin V binding buffer“)
ABC	ATP-vázající transportní membránový protein (z angl. „ATP-binding cassette transporter“),
ABCB1	B1 člen rodiny ABC transportérů, P-gp, P-glykoprotein
ABCC2	C2 člen rodiny ABC transportérů, MRP2, multidrug resistance-associated protein 2
ABCG2	G2 člen rodiny ABC transportérů, BCRP (z angl. „breast cancer resistance protein“)
AML	akutní myeloidní leukémie
ATP	adenosintrifosfát
BCGR	pozadí (z angl. background)
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKI	inhibitor cyklin-dependentních kináz
DMSO	dimethylsulfoxid
DNR	daunorubicin
FBS	fetální hovězí sérum
GIL	gilteritinib
HL-60	lidská leukemická buněčná linie HL-60 (z angl. human promyelocytic leukemia cells)
MDR	mnohočetná léková rezistence
MID	midostaurin
MIT	mitoxantron
NBD	nukleotid vázající doména
NÚ	nežádoucí účinky

OPT	Opti-MEM®
PI	propidium jodid
PM	plazmatická membrána
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute, kultivační medium
RTK	receptorové tyrozínkinázy
SB	barvicí pufr = staining buffer
TK	tyrozínkinázy
TKI	tyrozínkinázové inhibitory
TMD	transmembránová doména

2. Úvod

Nádorová onemocnění jsou ve vyspělých zemích jednou z nejčastějších příčin úmrtí spolu s onemocněními kardiovaskulárního systému. Konvenční léčba jednotlivých typů rakoviny s sebou nese výrazná rizika. Vyvíjející se rezistence a nežádoucí účinky konvenční léčby, postihující mimo rakovinových buněk i rychle se dělící zdravé buňky, vedly v posledních deseti letech k významnému pokroku v terapii rakoviny (Pérez-Herrero, 2015). Úkolem nové generace chemoterapeutik („target cancer therapies“) je cílit selektivně na vybrané struktury. V současné době jsou popisovány tři hlavní skupiny cílené terapie, kterými jsou monoklonální protilátky, imunotoxiny a nízkomolekulární inhibitory zpravidla proteinových kináz (Baudino, 2015). Součástí poslední skupiny jsou tzv. inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKI) a především inhibitory tyrozin-kináz (TKI), které budou v této práci dále rozebrány. Tyrozin-kinázy (TK) jsou enzymy, které jsou aktivovány hydrolýzou ATP. Následně se spouští kaskáda reakcí vedoucí k nekontrolované proliferaci a růstu buněk. Zároveň však brání buňkám vstoupit do procesu apoptózy a vzniká tak riziko nádorového bujení (Arora, 2005). TKI jsou schopny tyto enzymy aktivně blokovat a stávají se tak jednou z důležitých strategií v boji proti rakovině (Grant, 2009). V případě akutní myeloidní leukémie (AML) je cílem úspěšného působení nových léčiv mutovaný TK receptor FLT3 (Smith, 2019).

ATP-binding cassette transporters (ABC) je nadrodina primárně aktivních transportních proteinů nacházejících se v plazmatických membránách buněk. Hydrolýzou adenosintrifosfátu (ATP) dochází k uvolnění energie potřebné k aktivaci transportéru a čerpání substrátů i proti koncentračnímu gradientu. ABC transportéry se široce objevují ve všech typech organismů, kde jsou zodpovědné za řadu klíčových fyziologických i patologických procesů (Theodoulou, 2015). Dle pohybu molekul přes membránu dělíme transportéry na základní dvě skupiny: importéry a exportéry. Zatímco bakterie využívají obou způsobů přepravy molekul, eukaryota využívají ABC transportéry v drtivé většině k vypuzování molekul ven z buňky, tedy exportu (Beis, 2015; Wilkens, 2015). Export molekul je mimo jiné úzce spjat s mnohočetnou lékovou rezistencí (MDR). Pro některé druhy rakovinových onemocnění je zvýšený výskyt efluxních transportérů (zejména ABCB1 a ABCG2) typický. Tyto buňky jsou schopny se aktivně zbavovat dodávaného chemoterapeutika a dochází k selhávání terapie (Li Wen et al., 2016). V posledních dvou desetiletích byla MDR věnována zvýšená pozornost s cílem najít specifické inhibitory zvané modulátory MDR, nicméně většina z nich vykazovala značnou toxicitu i na buňky zdravé. V poslední době se ukazuje, že tuto schopnost překonání MDR by mohli představovat právě nové generace léčiv ze skupiny inhibitorů proteinových kináz. V terapii

prsních nádorů představuje významný inovativní přístup inhibice deregulovaných CDK. V současné době se tato léčiva uvažují i pro terapii hematologických onemocnění (Heo et al., 2016; Rahaman et al., 2019). V předchozích pracích naší výzkumné skupiny byly přítomné inhibitory CDKI identifikovány i jako nové inhibitory transportérů schopné překonání MDR (Cihalova et al., 2015; Cihalova et al., 2015; Sorf et al., 2018). Podobně byl takový duální efekt (zahrnující nejen vlastní antiproliferativní aktivitu, ale též inhibici ABC transportérů) popsán u molekul TKI (Beretta et al., 2017). V terapii AML, onemocnění známém poměrně častou expresí ABC transportérů, jsou od roku 2017, resp. 2018 nově registrována léčiva cílící na FLT3 mutovaný TK receptor, midostaurin (MID) a gilteritinib (GIL). V době řešení této práce patřila mezi nadějná anti-AML léčiva molekula FLX925 kombinující vlastnosti TKI a CDKI.

Tato práce je založena na sloučení teoretických a praktických poznatků týkajících se inhibiční aktivity uvedených léčiv, MID, GIL a FLX na ABC efluxních transportérech ABCB1 a ABCG2. Pro zjednodušení označujeme dál v textu všechny tři molekuly jako „testované TKI“. Pro experimentální část práce byla zvolena lidská promyelocytární buněčná linie HL-60 a její rezistentní varianty s nadměrnou expresí transportérů ABCB1 (HL-60 ABCB1) a ABCG2 (HL-60 ABCG2). Při experimentech byla použita kombinace cytostatik a testovaných TKI a následně se pozorovalo, zda se při takto vedené léčbě nepřekonává MDR nebo zda mezi jednotlivými komponenty neprobíhají negativní interakce. Výsledky práce přináší nové informace o schopnostech jednotlivých TKI modulovat MDR zprostředkovanou ABC efluxními transportéry, což by představovalo novou možnost využití těchto léčiv v onkologické terapii.

3. Teoretická část

3.1. Akutní myeloidní leukémie (AML)

Akutní myeloidní leukémie je nádorové onemocnění hematopoetických buněk. Vzniká mutací, respektive mutacemi genů, kódující některé z TK nebo dalších faktorů příslušné signální kaskády. Výsledkem je zvýšená autonomní proliferace a blokáce diferenciací, což vede k nárůstu nezralých myeloidních blastů v kostní dřeni (kolem 20% obsahu buněk kostní dřene). Jejich množství evokuje dostatek buněk a dochází k redukci aktivity normální hematopoézy. Projeví se to poklesem ostatních buněk v podobě anémie, trombocytopenie a neutropenie. Klinické příznaky nemoci jsou odvozeny od nedostatečné funkce kostní dřene. Únava je způsobena anémií, teplota, která je zapříčiněna infekcí při granulocytopenii nebo spontánní krvácení sliznic a kůže z důvodu trombocytopenie. Pacienti umírají nejčastěji na nasedající infekční onemocnění nebo při hemorragické diatéze (De Kouchkovsky et al., 2016; Povýšil et al., 2007).

AML je velice heterogenní onemocnění, u kterého se jen v rámci USA pohybuje incidence každoročně okolo 20 000 případů (National cancer institute, 2020). Objevit se může u dětí i dospělých pacientů, nejčastěji ovšem okolo 60. roku života. Úspěšná terapie jednotlivých typů AML spočívá ve zhodnocení karyotypu pacienta a jeho zdravotního stavu (věk, tělesná kondice, jiné chronické onemocnění, oportunní infekce) (Mayer et al., 2016). Úspěšnost léčby se u jednotlivých typů AML liší a identifikací jednotlivých mutací (např. FLT3-ITD, NPM1 nebo CEBPA) se zlepšuje individuální prognóza pacienta a umožňuje efektivnější vedení léčby (Cai et al., 2019; De Kouchkovsky et al., 2016; Yang et al., 2018).

Základem léčby je ve většině případu intenzivní indukční terapie následovaná konsolidační chemoterapií a/nebo transplantací krvetvorných buněk. Standardní indukční chemoterapie „3+7“ se skládá ze sedmidenní terapie cytarabinem následovanou třídenní terapií antracykliny (daunorubicin, idarubicin). Cílem indukční terapie je kompletní remise onemocnění. Postremisní léčba u pacientů s příznivou cytogenetikou (pouze izolovaná NPM1 mutace nebo CEBPA) je tvořena třemi až čtyřmi cykly konsolidační terapie cytarabinem. U pacientů se středně až těžce nepříznivou cytogenetikou je nutná transplantace kostní dřene (Mayer et al., 2016).

U karyotypů se složitějšími genetickými změnami, např. mutace FLT3, je potvrzena horší odpověď na léčbu (Gazdová et al., 2009) a také zvýšený výskyt efluxních transportérů. Zavedení nových inhibitorů (modulátorů) těchto transportérů by mohlo představovat nový

přístup v terapii AML. Kombinace s konvenční terapií by zajistila zvýšenou expozici antracyklinů v nádorových buňkách a lepší odpověď na léčbu. Bylo by možné dávky cytostatik snížit a terapie by se stala přístupnější pro pacienty, kteří vysokodávkové režimy léčiv nezvládali z důvodu jejich toxicity.

3.2. ABC transportéry

Transport molekul přes plazmatickou membránu je jednou z nezbytných funkcí každého živého organismu. ABC patří mezi největší nadrodiny zajišťující tento proces. U člověka bylo dosud objeveno více než 40 ABC transportérů rozdělených do 7 podrodin (písemně označených jako A-G) dle genové informace, sekvence aminokyselin a uspořádání transmembránových domén (Vasiliou et al., 2014; Liu, 2019; Choi et al., 2014; Oswald et al., 2006).

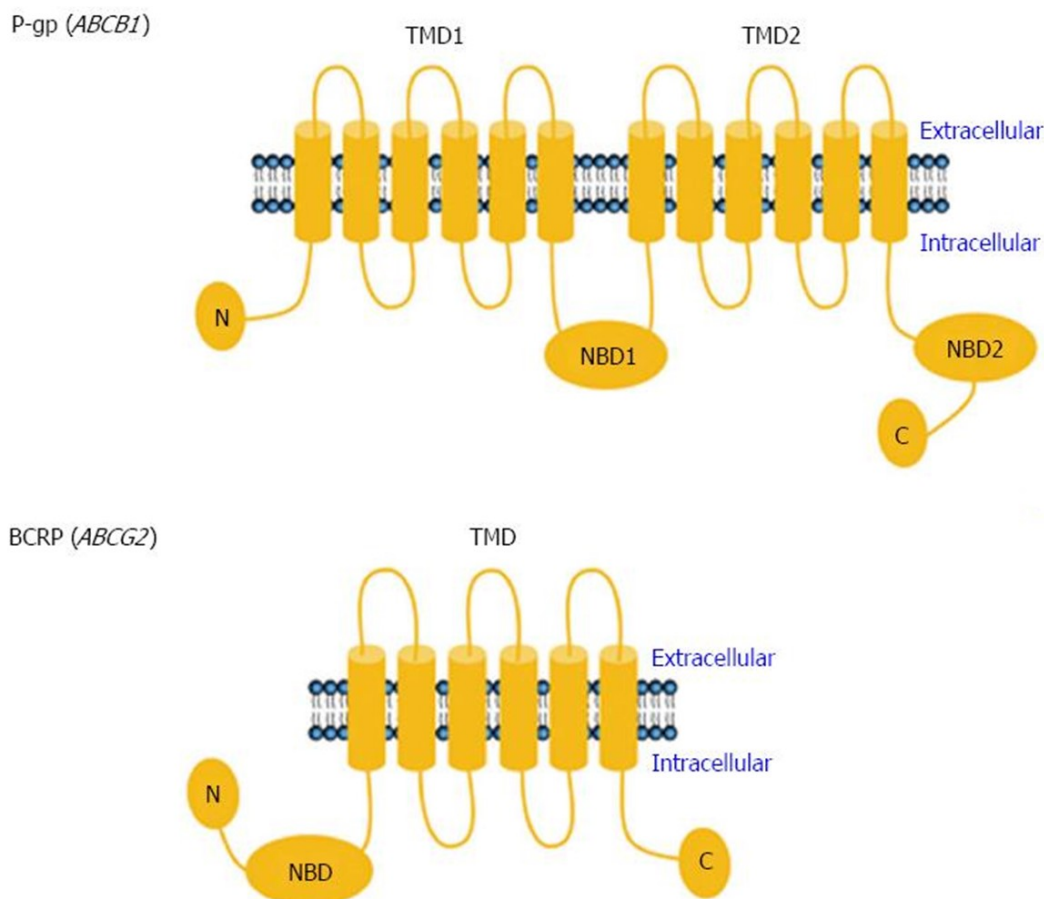
V organismu jsou zodpovědné za řadu fyziologických funkcí. Ovlivňují svou přítomností základní farmakokinetické parametry, absorpci, distribuci, metabolismus a také exkreci. Výrazně tak mění množství a následný efekt exogenních i endogenních látek (Szakács et al., 2008). Jejich opětovný výzkum široce propukl po zjištění, že některé z nich jsou schopny aktivně vypuzovat cizorodé látky, včetně chemoterapeutik, ven z buněk (Benadiba et al., 2016). Konkrétně se jedná o transportéry ABCB1, ABCG2 a ABCC1, u kterých byla tato funkce vícekrát potvrzena v literatuře a široce spájená s MDR (Gottesman et al., 2002). Zmíněná schopnost buněk zbavovat se některých látek je stěžejním tématem této práce, a proto bude podrobněji popisována v následujících podkapitolách 3.2.1., 3.2.2.

3.2.1. Struktura a mechanismus působení ABC efluxních transportérů

Základní strukturu ABC efluxních transportních proteinů tvoří dvě transmembránové domény (TMD) a dvě ABC domény, známy také pod názvem nukleotid vázající domény (NBD). Každá TMD se skládá ze 6-ti segmentů. Hydrofobní charakter jim umožňuje vmezeřit se do plazmatické membrány (PM). Jejich struktury se mohou lišit, a proto při rozpoznávání molekul a následné translokaci vykazují substrátovou specifitu. Naproti tomu, NBD, lokalizované na vnitřní straně buňky, disponují konstantním proteinovým složením, aby mohlo dojít k navázání molekul ATP. Pro uvolnění energie je nutná hydrolýza ATP, což zajistí enzym ATP-áza. Další složkou NBD jsou tzv. Walker A a B motivy proteinové povahy, které se podílí na hydrolýze ATP a využití vzniklé energie (Jones et al., 2004; Chen et al., 2016; Beis, 2015).

Funkční ABC transportér často vyžaduje dvě podjednotky (TMD + NBD). Klasické uspořádání domén TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 do jednoho polypeptidového řetězce je charakteristické pro ABCB1 transportér, tzv. P-glykoprotein (P-gp). Naproti tomu, ABCG2

(BCRP) obsahuje pouze jednu TMD a jednu NBD doménu a v obráceném pořadí (NBD1-TMD1). Byl označený jako „half-transporter“ a jeho aktivace probíhá pomocí disulfidických můstků, kdy dochází ke zdvojení proteinu (Locher et al., 2008; Chen et al., 2016). Charakteristické znázornění struktury jednotlivých efluxních transportérů je zobrazeno na Obr. 1.

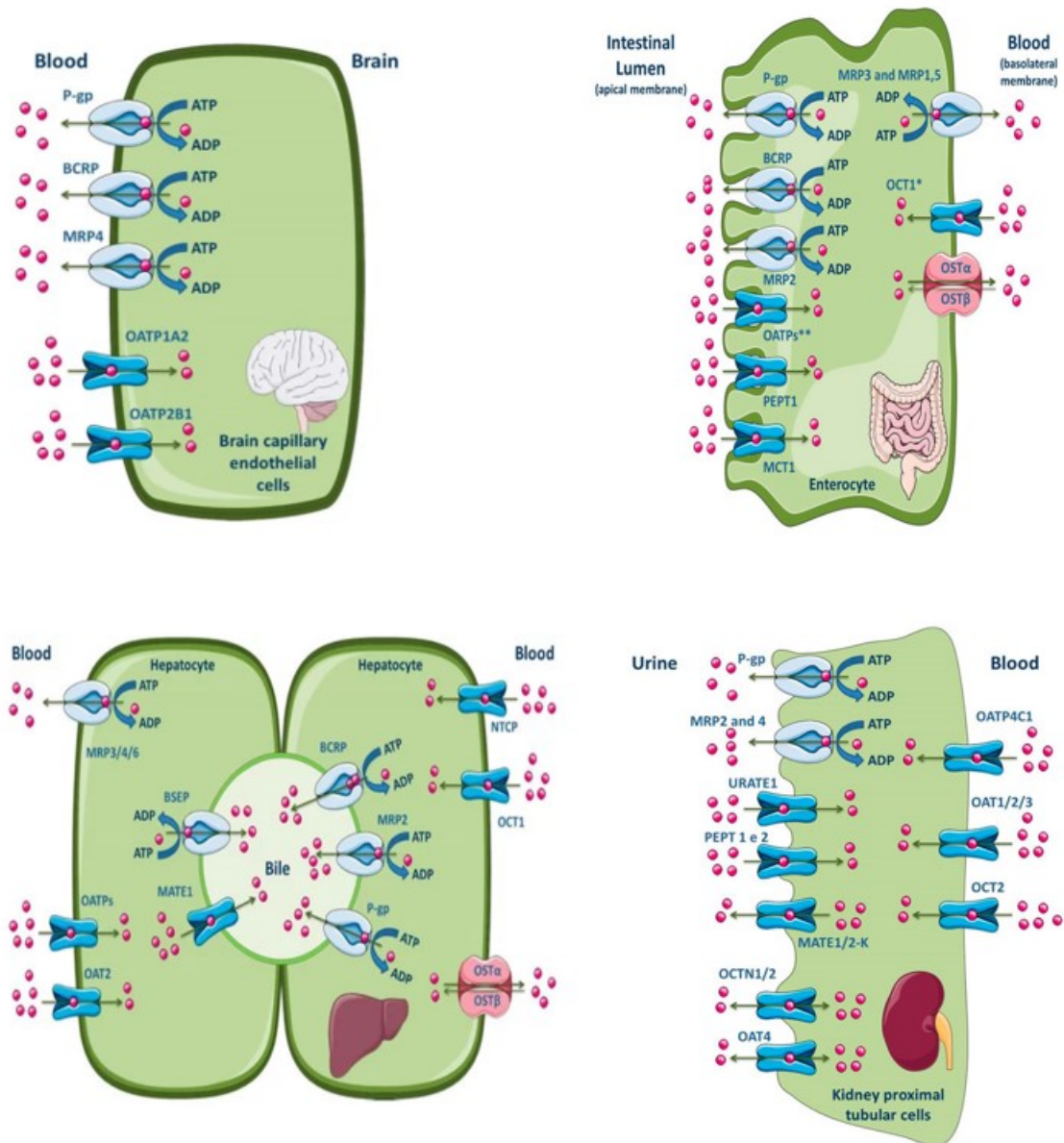


Obr. 1 Sekundární struktura ABC lékových efluxních transportérů: Transmembránové domény (TMD) ukazující jejich jednotlivé segmenty a domény vázající nukleotid (NBD). V horní části se nachází ABCB1 (P-gp) složený ze dvou jednotek. „Half-transporter“ ABCG2 (BCRP) je znázorněn ve spodní části. Převzato z: Sarkadi et al., 2004.

3.2.2. Lokalizace ABC efluxních transportérů

ABC transportéry jsou přítomné v celém organismu a poskytují mu za fyziologických podmínek ochranu před cizorodými látkami snížením jejich vstřebání do krve, omezením jejich přestupu do citlivých orgánů a naopak následně pak i zajištěním aktivní exkrece těchto potenciálně toxických látek a jejich metabolitů z organismu. V některých tkáních se vyskytuje

i více typů těchto transportérů, ale jejich distribuce v jednotlivých tkáních se liší. ABCB1 transportér se ve vyšší míře nachází ve tkáních zajišťující absorpci a exkreci, tzn. v epitelových buňkách gastrointestinálního traktu, obzvláště tenkého střeva, proximálních tubulech ledvin nebo membráně hepatocytů. Své zastoupení má také v hematoencefalické bariéře. Vysoký obsah ABCG2 transportéru můžeme pozorovat v placentě, játrech, střevech a různých kmenových buňkách (Glavinas et al., 2004; Gameiro et al., 2017). Lokalizace jednotlivých ABC efluxních transportérů je pak znázorněna na Obr. 2.



Obr. 2 Lokalizace ABC efluxních transportérů ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP) a ABCC (MRP transportéry), stejně jako zástupců sekundárně aktivních přenašečů SLC rodiny (solute carriers) ve vybraných tkáních. Převzato z: Gameiro et al., 2017.

3.2.3. Funkce ABC transportérů

U lidí zajišťují ABC transportéry mnoho fyziologických funkcí. Ovlivňují pohyb endogenních i exogenních sloučenin přes buněčné membrány. V rámci transportu cizorodých sloučenin (xenobiotik) přenáší celou řadu léčiv a ovlivňují tak jejich farmakokinetiku, konkrétně zejména absorpci, distribuci do cílových tkání a eliminaci zahrnující též exkreci metabolitů eliminačními orgány. Hlavním cílem zmíněných procesů je zajistit bezpečnost příslušných tkání a udržení homeostázy organismu (Montanari et al., 2015).

Jako u jiných membránových proteinů je nutné počítat s případnými interakcemi při podávání dvou a více léčiv nebo příjmu nevhodné stravy. Výsledkem takové interakce může být změna koncentrace některého z léčiv v krvi nebo tělesných tkání, kterou lze dosáhnout několika způsoby. Jednou z možností je kompetice dvou substrátů přímo na daném transportéru, nebo situace, kdy jedno z léčiv činnost transportéru a tím přenos jeho substrátu inhibuje, popř. v dalším případě dovede expresi transportéru indukovat, což vede ke zvýšení počtu transportérových molekul na plazmatické membráně buňky a urychlení přenosu substrátu. Kompetice, inhibice i indukce mohou vést ke změnám plazmatických hladin druhého současně podaného léčiva, a tím k selhání terapie z důvodu nedostatečných plazmatických hladin, nebo naopak k vyššímu výskytu toxických nežádoucích účinků (NÚ) (Montanari et al., 2015). Dle doporučení mezinárodního transportérového konsorcia a následně regulačních autorit (EMA, FDA) je nutné poznat profil léčiv i z pohledu rizika interakce s lékovými transportéry (The International Transporter Consortium, 2010; Zamek-Glyszczynski et al., 2018).

3.2.4. Role ABC efluxních transportérů v mnohočetné lékové rezistenci

MDR je schopnost rakovinových buněk odolávat chemoterapeutickým látkám a je považována za jeden z hlavních důvodů selhávání terapie. Transportéry na povrchu buněk jsou většinou nespecifické a dokáží exportovat z buněk látky odlišné struktury (Chen et al., 2016).

MDR se rozděluje dle vzniku na primární a sekundární. Primární MDR, někdy označována také jako „okamžitá“, je stav, kdy nádorové buňky nereagují na terapii ihned po jejím nasazení. Naproti tomu rezistence sekundární je získána buňkami v průběhu léčby a začíná se tedy projevovat až po nějaké době pozvolně klesající odezvou k terapii (Deng et al., 2014; Chen et al., 2016).

Způsobů, jakými nádorové buňky získávají svou rezistenci, je celá řada. Většinou se mechanismy zodpovědné za vznik MDR navzájem kombinují a mohou se u jednotlivých nádorů

lišit. Lze je rozdělit do několika hlavních skupin zahrnující aktivaci mechanismů pro reparaci DNA, modifikaci metabolismu a detoxifikaci léčivé látky, inhibici signálních drah vedoucích k apoptóze, snížení influxu a v neposlední řadě zvýšení efluxu buněk. Poslední zmíněný mechanismus zajišťuje právě nadrodina ABC efluxních transportérů, konkrétně její zástupci ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1) a ABCG2 (BCRP) (Chen et al., 2016; Choi et al., 2014; Deng et al., 2014; Wu et al., 2014).

3.2.4.1.P-glykoprotein (ABCB1)

Nejlépe popsáním transportérem z celé nadrodiny ABC transportérů je P-glykoprotein, někdy označovaný také jako MDR1 nebo ABCB1 (Steinbach et al., 2007). Byl objeven a izolován z ovariálních buněk čínského křečka rezistentního na kolchicin a jeho pojmenování bylo založeno na myšlence, že se jedná o glykoprotein, měnící membránovou permeabilitu buněk. ABCB1 je jednoduchý 170 kDa polypeptid, (Juliano et al., 1976; Silva et al., 2015).

ABCB1 transportér byl podrobně zkoumán z důvodu buněčné rezistence k podávané protinádorové léčbě. Ukázalo se, že ABCB1 transportér se svou substrátovou specifitou nezaměřuje pouze na tradiční protinádorové látky jako doxorubicin, daunorubicin, metotrexát, mitoxantron nebo vinkristin, ale i celou řadu léčiv z dalších terapeutických skupin. Jejich vybraní zástupci jsou shrnuti v Tab. 1. Lepší a rychlejší transport látek ven z buňky je popisován u substrátů hydrofobních a v podobě kationtů, nelze to ovšem vztáhnout na všechny látky (Steinbach et al., 2007; Silva et al., 2015; The International Transporter Consortium, 2010).

Inhibitory P-glykoproteinu jsou rozdělovány do 4 kategorií dle jejich účinnosti, selektivity a potenciálu interakce, nikoli podle časové osy. Do první generace patří látky, které již prošly klinickými studiemi nebo jsou klinicky využívány, ale jejich vztah k ABCB1 byl prokázán později. Úplně první objevenou molekulou byl verapamil ze skupiny blokátorů vápníkových kanálů. Další látky spadající do první generace jsou imunosupresiva (např. cyklosporin A), antiarytmika (např. chinidin) nebo antiestrogeny (tamoxifen a toremifen). Jejich klinické působení je ovšem limitováno toxicitou, protože z důvodu jejich nízké afinity je potřeba dodávat vysoké dávky, aby proběhla efektivní inhibice transportéru (Varma, 2003; Palmeira et al., 2012; Silva et al., 2015). Za účelem vyšší specifity a snížení nežádoucích účinků proběhla strukturální úprava původních molekul, která vedla ke vzniku druhé generace. Tyto sloučeniny postrádají farmakologickou aktivitu prvotních molekul a obvykle mají vyšší afinitu k P-gp. Z verapamilu vznikl účinnější dexverapamil a podobně byly syntetizovány také inhibitory jako biricodar, dofequidar nebo valsopodar. Obě tyto generace se vyznačují nízkou selektivitou a inhibují i další ABC transportéry této rodiny. Nevýhodou těchto látek je zásah do

farmakokinetiky organismu, zvláště do metabolismu a vylučování cytotoxických látek. Působí jako substráty CYP450, následně vede k interakcím a nepřijatelné toxicitě (Palmeira et al., 2012). K překonání nedostatků první a druhé generace bylo vyvinuto několik blokátorů ABCB1 transportéru, vznikajících převážně za účelem léčby MDR nádorů. Do této skupiny patří laniquidar, ontogen, sesuquidar nebo tariquidar. Vyznačují se přibližně desetkrát vyšší účinností a omezením interakcí (v příslušných koncentracích neovlivňují CYP3A4). I přes jejich potenciál se u některých zástupců vyskytla vysoká toxicita a probíhající klinické studie byly ukončeny (Varma, 2003; Palmeira et al., 2012; Silva et al., 2015). Z tohoto důvodu byly použity nové strategie k nalezení nových inhibitorů ABCB1 (inhibitory 4. generace), které tvoří sloučeniny extrahované z přírodních zdrojů, povrchově aktivní látky a lipidy, peptidomimetika nebo duální ligandy (látky kombinující inhibici transportéru s další biologicky prospěšnou aktivitou). Cílem této skupiny inhibitorů je interakce s více cíli souvisejícími se specifickým patologickým stavem (Palmeira et al., 2012; Silva et al., 2015).

Dosavadní výsledky klinických studií s inhibitory ABC transportérů u terapie AML ukazují, že navzdory rostoucí specifitě inhibitorů, stále není dosahováno signifikantních přínosů terapie. Mnohdy je to způsobeno i rostoucí toxicitou, která je důvodem snižování podávaných cytostatik. Mezi další způsoby, pro které nevykazuje terapie v klinické praxi selhává, patří interakce s metabolickými systémy, výskyt jiných mechanismů pro eflux molekul, špatná volba cytostatika do kombinačních studií a další závislosti, které se dosud stále objasňují (Shaffer et al., 2012).

Tab.1 Znáznornění vybraných substrátů a inhibitorů ABCB1 a ABCG2 efluxních transportérů.

ABCB1 substrát	ABCB1 inhibitor	ABCG2 substrát	ABCG2 inhibitor
morfin	verapamil	kamptotecin	mykotoxin FTC
verapamil	cyklosporin A	daunorubicin	Ko143
digoxin	chinidin	doxorubicin	febuxostat
lovastatin	tamoxifen	mitoxantron	sirolimus
amitriptylin	toemifen	topotecan	takrolimus
ondasetron	dexverapamil	pitavastatin	nitredipin
daunorubicin	dofequidar	pravastatin	dipyridamol
mitoxantron	valspodar	rosuvastatin	quercetin
nifedipin	biricodar	albendazol	imatinib
ranitidin	laniquidar	fenbendazol	reserpin
aldsteron	sesuquidar	ofloxacin	silymarin
metotrexát	tariquidar		

3.2.4.2. Breast cancer resistance protein (ABCG2)

ABCG2 transportér byl objeven nezávisle na sobě dvěma vědeckými týmy až na konci 20. století a patří tak mezi jeden z posledních popsaných transportérů ABC rodiny. Izolován byl z prsních nádorových buněk rezistentních na doxorubicin, odkud také nese své označení breast cancer resistance protein (Doyle et al., 1998). Zároveň byl ale paralelně popsán i v placentě a označen jako placentární ABC transportní protein ABCP (Alikmets et al., 1998). Dnes je považován za jeden ze tří hlavních ABC transportérů zodpovědných za MDR. Přestože se jedná o „poloviční“ transportér, složený na rozdíl od ABCB1 z polypeptidového řetězce čítajícího pouze 655 aminokyselin, byla u něj popsána schopnost efektivně zbavovat buňku širokého spektra xenobiotik a dalších nežádoucích látek (Staud et al., 2005).

Nalézt je můžeme také v nádorových kmenových buňkách disponující značnou schopností sebeobnovy (Nakanishi et al., 2012). Cytostatika daunorubicin i mitoxantron patří mezi substráty ABCG2 transportéru a spolu s dalšími terapeutiky z jiných farmakologických skupin vystupujících jako substráty jsou shrnuty v Tab.1. (Robey et al., 2007).

Stejně jako u ABCB1 a ABCC1 se od jeho objevení hledaly vhodné molekuly, které by dokázaly efektivně aktivitu ABCG2 blokovat a nezpůsobovat výrazné NÚ. Prvním uvedeným

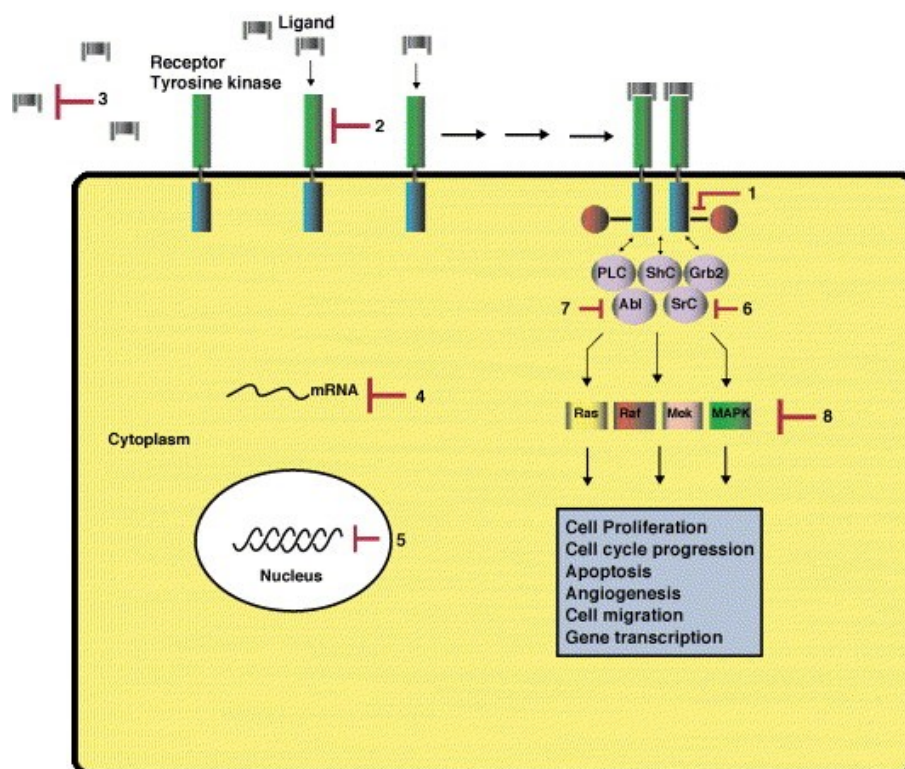
inhibitorem ABCG2 byl mykotoxin FTC produkovaný organismem *Aspergillus fumigatus*. Pro jeho neurotoxicitu byl krátce po uvedení na trh stažen. Mezi jeho deriváty byla nalezena látka s označením Ko143, která přinášela při *in vitro* testování na potkanech nulovou neurotoxicitu a vyšší afinitu k BCRP transportéru. V rámci experimentů se dnes využívá i jako modelový inhibitor. Po upřesnění některých molekulárních vlastností, jenž by měl ABCG2 transportér obsahovat, se na trh dostalo velké množství nových molekul. Některé z nich byly zároveň i substráty ABCG2 a dalších transportérů (konkurenční inhibitory). V poslední době je pozorována významná inhibiční aktivita febuxostatu, který je běžně užíván při léčbě hyperurikémie a dny. Při *in vitro* testování prokázal masivní inhibici ABCG2 transportéru a zároveň mírně blokuje i ABCB1, v plazmatických koncentracích přitom vykazuje dobrý bezpečnostní profil. V posledních letech se objevují nové malé molekuly ze skupiny TKI nebo cyklin-dependentních kinázových inhibitorů (CDKI), které mají potenciál uspět jako modulátory MDR nové generace (Myiata et al., 2016; Toyoda et al., 2019). Souhrn vybraných inhibitorů ABCG2 transportéru je v Tab. 1.

3.3. Inhibitory tyrozinkináz (TKI)

Tyrozinkinázy (TK) jsou proteinové enzymatické komplexy, které jsou schopny fosforylovat hydroxylové skupiny serinových, tyrozinových a treoninových zbytků proteinových cílových struktur (Beretta et al., 2017). Dnes rozeznáváme 90 typů TK, které jsou dle jejich struktury a lokalizace rozděleny do dvou velkých skupin. Receptorové tyrozinkinázy (RTK), kterých je v současné době popisováno 58, jsou ukotveny do PM a tyrozinkinázy nereceptorové (NRTK), jejichž aktivita „je“ uvnitř buňky (32 typů). Všechny RTK obsahují extracelulární doménu obsahující místo pro nasedající ligand, transmembránovou oblast a doménu intracelulární neboli cytosolickou, jejíž součástí je i oblast s proteinovou tyrozinkinázovou aktivitou (Yamaoka et al., 2018). NRTK pro své umístění mají pouze intracelulární katalytickou doménu, obdobné struktury jako u RTK, zajišťující samotnou aktivitu TK (Madhusudan et al., 2004).

Kaskáda reakcí je odstartována vazbou ligandu na extracelulární část TK. Po aktivaci dochází ke konformační změně a spojení dvou nebo více TK, tzv. dimerizaci / oligomeraci. Předchozí děje vedou k aktivaci cytoplazmatické tyrozinkinázy a autofosforylaci tyrozinových zbytků. Jedná se o komplexní buněčné signální dráhy, které zasahují do základních dějů probíhajících v každém organismu (vývoj, diferenciace, proliferace, růst, přežití, apoptóza, migrace, kontrola buněčného cyklu, angiogeneze, aktivace buněk imunitního systému nebo

prostý tvar buněk) (Beretta et al., 2017; Madhusudan et al., 2004; Yamaoka et al., 2018). Pohled na sled jednotlivých reakcí kaskády je ilustrativně popsán na Obr. 3.



Obr. 3 Tyrozinkinázové signální dráhy a potenciální cíle pro terapii: Vazba ligandu (EGF, TGF nebo jiné) na extracelulární doménu receptoru EGF vede k dimerizaci / oligomerizaci receptoru, vedoucí k aktivaci cytoplazmatické tyrozinkinázové aktivity a fosforylaci C-koncových tyrozinových zbytků. Autofosforylované zbytky tyrozinu slouží jako platforma pro rozpoznávání a nábor specifické sady proteinů přenášejících signál (proteiny obsahující SH2 (Src homologie 2) a PTB (fosfotyrozinové vazby) domény), které modulují různé buněčné signalizační reakce. Převzato z: Madhusudan et al., 2004.

Za fyziologických podmínek je aktivita TK přísně kontrolována a regulována. Mutací genu nebo inaktivací inhibičních proteinů může dojít k deregulaci těchto kontrolních mechanismů. Výsledkem je amplifikace, anebo zvýšená exprese TK, která často vede k výskytu rakoviny. Nadměrná exprese TK a ligandů dané TK je spojována se špatnou prognózou mimo jiné i u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Madhusudan et al., 2004).

Inhibitory tyrozinkináz (TKI) jsou nízkomolekulární látky cíleně působící na vybrané buněčné struktury, v našem případě na TK. Pro samotný vstup do buňky využívají svého hydrofobního charakteru, který jim pomáhá snadněji difundovat buněčnou membránou (Boutayeb et al., 2012). Zde soupeří o vazebné místo katalytické domény TK a brání fosforylaci.

Pro svou specifitu vykazují také příznivý bezpečnostní profil a lze je pro kvantifikaci efektu kombinovat s dalšími typy konvenční terapie. Výhodou je i možnost perorální terapie (Arora et al., 2005; Sola et al., 2019; Steeghs et al., 2007). Použití těchto cílených typů terapií není ovšem zcela bez omezení, je nutné počítat s výskytem specifických NÚ, možné rozvíjející se rezistence nebo absence odpovědi v obecné populaci (Arora et al., 2005).

TKI mohou být rozdělovány dle jednotlivých charakteristik do různých skupin. Z pohledu selektivity rozdělujeme TKI na monofunkční inhibitory působící specificky na jeden daný receptor nebo inhibitory multifunkční, které jsou schopny zacílit na několik různých TK receptorů. Vše je podmíněno podobností katalytických domén proteinových struktur. Rozlišit TKI je možné také podle povahy jejich vazby na reversibilní či nereversibilní. V praxi se ovšem jednotlivá léčiva rozdělují podle cílové TK, na kterou působí. Mezi hlavní skupiny řadíme receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR), receptory vaskulárního epidermálního růstového faktoru (VEGFR), receptory lidského epidermálního receptoru 2 (HER2) a c-KIT (Boutayeb et al., 2012; Madhusudan et al., 2004).

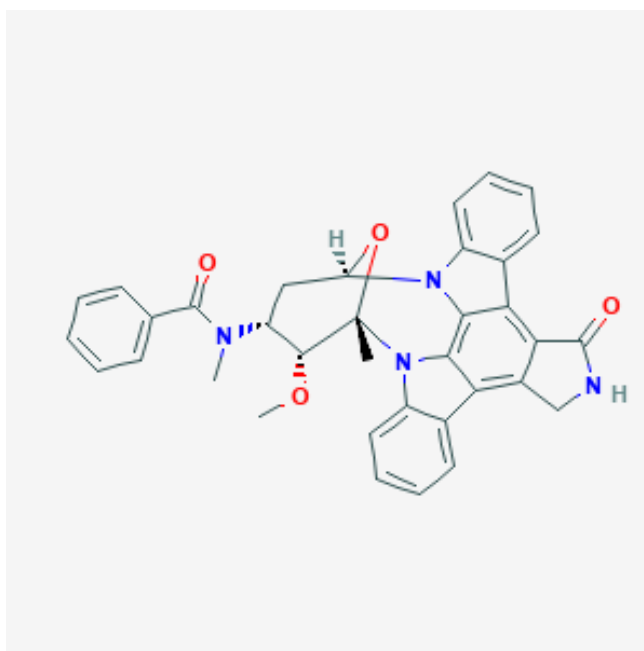
Prvním úspěšným TKI byl imatinib, který v roce 2001 získal od americké agentury Food and Drug Administration (FDA) rozhodnutí o registraci pro léčbu onkologických pacientů s chronickou myeloidní leukémií s pozitivním Filadelfským chromozomem. Registrace následovaly u dalších TKI, např. u gefitinibu, erlotinibu, lapatinibu, sunitinibu, sorafenibu, nilotinibu, dasatinibu, pazopanibu a vandetanibu. TKI jsou v současné době v bouřlivém rozkvětu a probíhá jejich vývoj na úrovni preklinických i klinických studií (Boutayeb et al., 2012; Krause et al., 2005; Roskoski, 2015).

3.3.1. Midostaurin

Midostaurin (MID) byl původně vyvinut jako inhibitor proteinkinázy C pro léčbu pacientů se solidními tumory. Dnes je řazen mezi inhibitory s multikinázovou aktivitou. Na základě preklinických testů, které prokázaly synergii mezi chemoterapií a samotným MID byly provedeny další studie zahrnující výhradně pacienty s nově diagnostikovanou AML. Vzhledem k pozitivním výsledkům testování byl 28. dubna 2017 schválen FDA midostaurin u dospělých pacientů s nově diagnostikovanou AML podmíněnou mutací FLT3 (Levis, 2017; Stone et al., 2017).

Z chemického hlediska se jedná o derivát staurosporinu, přesněji N-benzoyl staurosporin (viz Obr. 4). Je prvním perorálně podávaným TKI a zástupcem první generace tohoto typu TKI pro léčbu AML. Při léčbě AML s přítomností FLT3 mutace je aplikován pouze v kombinované

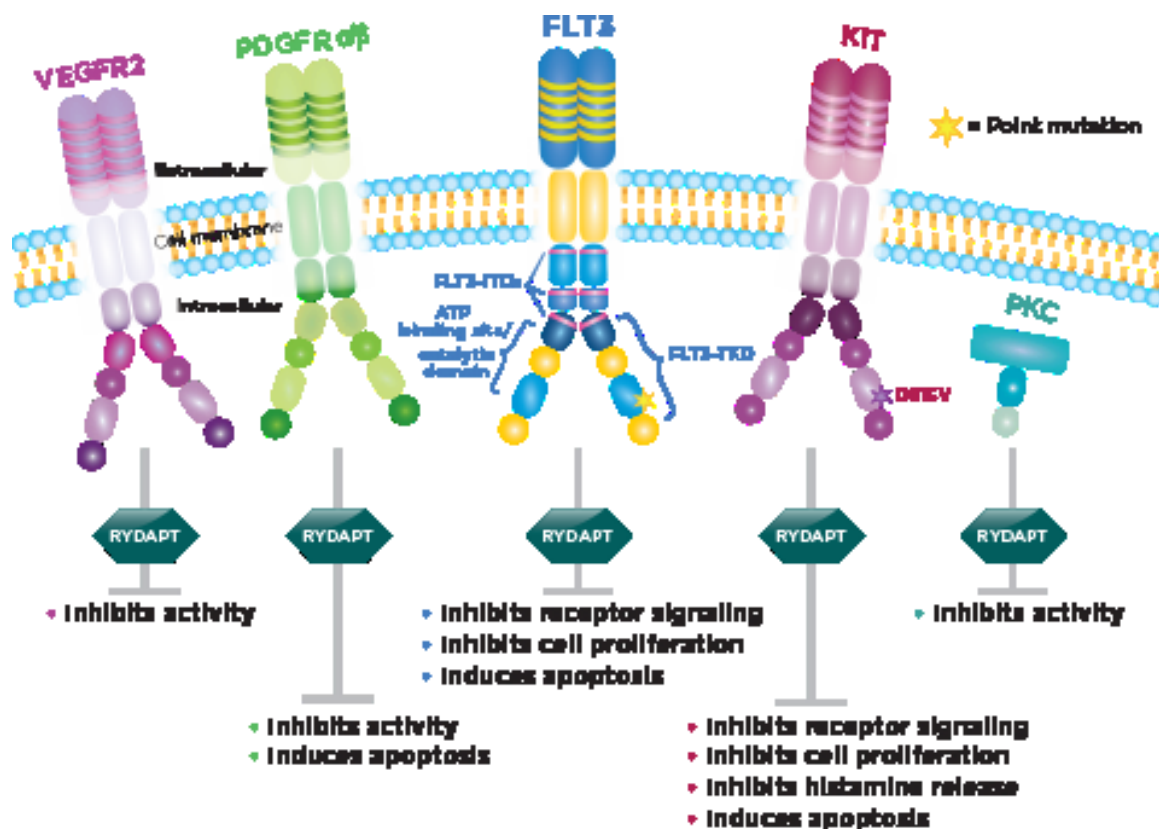
formě s konvenčními chemoterapeutiky jako jsou např. cytarabin nebo daunorubicin. MID je možno podávat i v monoterapii, u pacientů s diagnostikovanou agresivní systémovou mastocytózou (SM), SM spojenou s hematologickým neoplasmem nebo u leukémie žírných buněk vykazující mutaci c-KIT. Často se při jeho užívání vyskytují gastrointestinální vedlejší účinky pozorované v monoterapii i při kombinacích chemoterapeutik (Kayser et al., 2017; Levis, 2017; Stansfield et al., 2017; Stone et al., 2017).



Obr. 4 Chemická struktura midostaurinu. Převzato z: *National Center for Biotechnology Information, 2020.*

Jednou z dosud nejobsáhlejších studií je GALGB10603 („RATIFI“), která pozorovala dobu přežití u pacientů léčených kombinací cytostatika a MID oproti referenční skupině užívající cytostatikum a placebo. Jednalo se o randomizovanou globální studii 3. fáze prováděnou v 17 zemích. Závěr studie ukázal, že mezi pacienty ve věku 18 až 59 let, kterým byla diagnostikována FLT3 mutovaná forma AML, vedlo přidání MID k chemoterapii ke snížení rizika úmrtí o 22% oproti pacientům, kteří dostávali chemoterapii plus placebo. Důležité je ovšem říci, že v této studii nebylo bráno v úvahu dělení dle jednotlivých mutací FLT3 (FLT3-ITD, FLT3-TKD)(Levis, 2017; Stone et al., 2017). Oblasti podléhající mutacím jsou znázorněny na Obr. 5. Pro svou multikinázovou aktivitu je midostaurin stále považován za zajímavou molekulu v oblasti výzkumu, kde je snaha využít jeho schopnosti inhibice i v léčbě dalších nádorových onemocnění. Mimo receptor FLT3 kinázy je jeho aktivita potvrzena také u PKC α , VEGFR2, C-KIT, PDGFR (viz. Obr. 5). U midostaurinu je pozorován tzv. duální

efekt inhibitoru, kdy přidává ke své multikinázové aktivitě ještě schopnost aktivně inhibovat ABC efluxní transportéry. To by mohlo vést k překonání vést ke splnění podaných cílů v této práci. Dnes je MID považován za standart při léčbě FLT3-mutované AML a slouží jako výchozí molekula při hledání TKI novějších generací (Kayser et al., 2017; National center for biotechnology information).

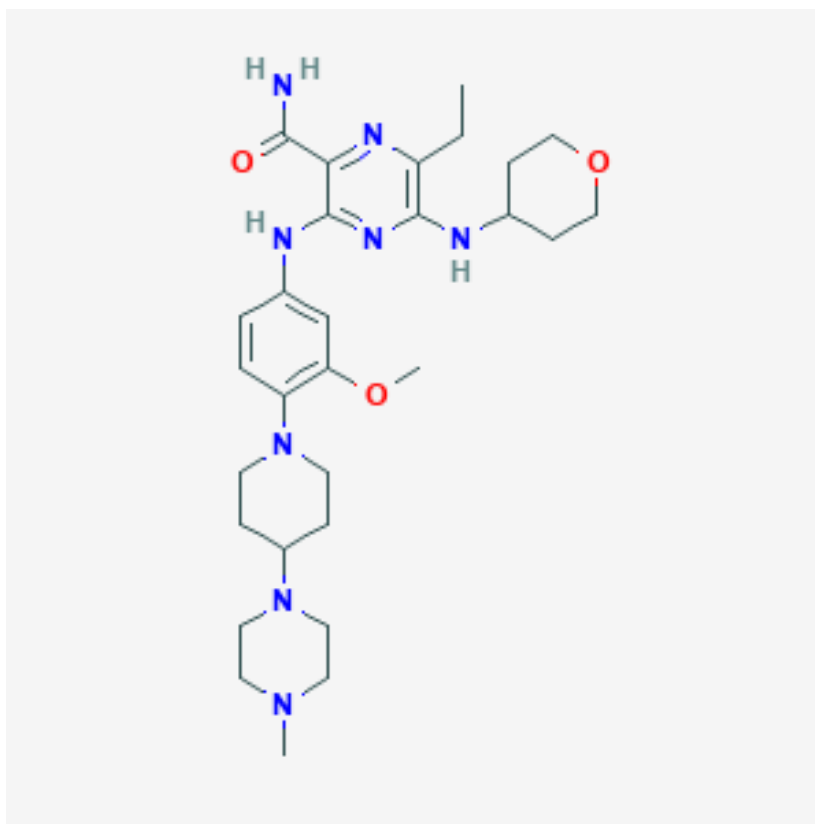


Obr. 5 Jednotlivé tyrozinkinázy reagující na přítomnost midostaurinu (obchodní název RYDAPT) a výsledky jejich inhibice. Podrobněji znázorňuje také strukturu TK FLT3 včetně částí FLT3-TKD a FLT3-ITD, na kterých často dochází k mutacím. Převzato z: Novartis oncology, 2018.

3.3.2. Gilteritinib

Gilteritinib (GIL) (Obr. 6) je považován za silný, vysoce selektivní TKI podávaný perorální cestou. Jeho mechanismus účinku je založen na duální inhibici TK rodiny FLT3 a AXL (receptorová TK kódovaná AXL genem). Zároveň je schopen inhibovat vybrané ABC efluxní transportéry, a proto ho lze též považovat za inhibitor s dualním účinkem. Spolu s midostaurinem tvoří dosud jediná dvě léčiva, která byla schválena a registrována regulační agenturou FDA pro léčbu FLT3-mutované AML, GIL konkrétně v listopadu 2018. Řadí se do

druhé generace FLT3-TKI a je určen pro pacienty s relaps/refrakterní akutní myeloidní leukémií (R/R AML) s mutací tyrozinkinázového receptoru FLT3 (Mori et al., 2017; National center for biotechnology information; Short et al., 2019).



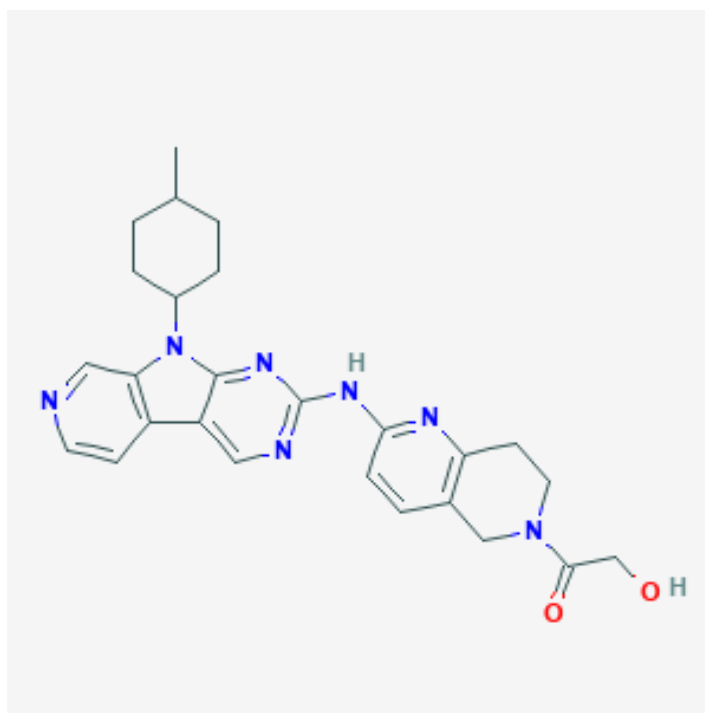
Obr. 6 Chemická struktura gilteritinibu. Převzato z: *National Center for Biotechnology Information, 2020.*

Klinické studie 1. a 2. fáze se zabývaly hlavně bezpečností léčiva. U některých pacientů se objevovaly příznaky toxicity v podobě průjmů, anémie, únavy a zvýšených jaterních enzymů. Souhrnně lze ale říci, že GIL je dobře tolerovaný u pacientů s R/R AML. Velkou klinickou studií 3. fáze byla otevřená, multicentrická, randomizovaná studie ADMIRAL porovnávající podávaný GIL v monoterapii a klasickou záchranou terapii (nízké dávky cytarabinu, azacitidin...). Zakladními parametry zkoumání byla doba přežití pacientů (OS) a úplná remise s částečným hematologickým zotavením (ORR). Na závěr této studie lze říci, že GIL vede k významně delšímu OS a vyššímu ORR než konvenční terapie. Výsledky studie vedly k udělení registrace gilteritinibu regulační agenturou FDA a vyzývají otázku, zda by neměl být GIL zahrnut do standardní terapie R/R AML. Jeho použití v kombinačních terapeutických programech nicméně není dosud zcela potvrzeno (Short et al., 2019; Zhao et al., 2019), a i z tohoto důvodu je kombinace GIL s konvenčními cytostatiky předmětem této práce.

3.3.3. FLX925

Látka FLX925 (Obr. 7) je považována za silný a selektivní inhibitor TK, blíže typu FLT3. Svou roli mohutné inhibice využívá dále u CDK4 a CDK6. Tím je staven do výhodné pozice, kdy efektivně inhibuje signální dráhy na několika místech a potencuje svůj účinek. Vzhledem k častému relapsu onemocnění AML, bylo užití tohoto léčiva směřováno pro pacienty s opakovaným výskytem (Marubayashi et al., 2016).

Svou aktivitu prokazovalo zejména v rámci preklinických studií. Molekula FLX925 byla vyvinuta tak, aby se vyhnula klasickým mechanismům vzniku rezistence a zachovala si svou buněčnou účinnost proti klinicky relevantním mutacím sekundární rezistence u FLT3 (Li et al., 2015; Daver et al., 2015). Dle dostupných informací proběhla v roce 2015 1. fáze klinického testování, v současné době je ale výzkum pro rozhodnutí investora pozastaven (Clinicaltrials.gov, identifikátor NCT02335814).

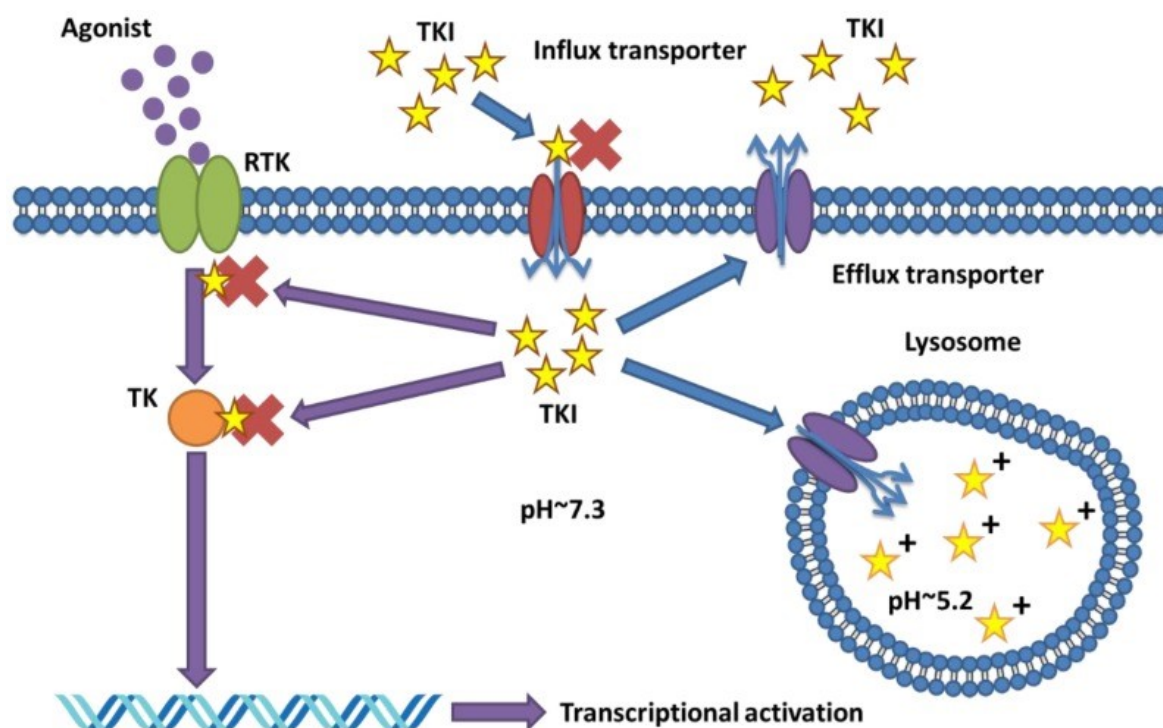


Obr. 7 Chemická struktura FLX925. Převzato z: *National Center for Biotechnology Information, 2020.*

3.3.4. Léková rezistence k tyrozinkinázovým inhibitorům

Objevením TKI dosáhl výzkum velkého pokroku v léčbě rakoviny. Fenomén rezistence, který se ovšem po nějaké době také objevuje, je nevyhnutelný a výrazně léčbu omezuje (Jiao

et al., 2018). Pro vývoj nových molekul zabezpečujících vyšší selektivitu a odolnost proti MDR bylo nutné lépe zmapovat jednotlivé mechanismy jejího vzniku. Dnes se vysvětluje rezistence u TKI několika způsoby. Nejsnadnějším typem rezistence je vznik mutace (rezistence na konkrétní molekulu TKI) na samotném cíli TKI, tedy přímo na vazebném místě TK nebo v pokračující signální dráze. Složitější formy rezistence léčiv způsobují odolnost vůči velkému množství molekul. Často jsou přisuzovány transportním proteinům, které jsou zodpovědné za influx/efflux látek přes PM. Další, nedávno objevený mechanismus vzniku rezistence je způsoben lysozomální schopností pohlcovat buňce cizorodé látky. Oba popisované způsoby MDR vyústí v pokles molekul TKI schopných aktivní inhibice a sníží terapeutický potenciál (De Klerk et al., 2018; Jiao et al., 2018)



Obr. 8 Obecný přehled jednotlivých mechanismů vzniku rezistence TKI. Receptorové tyrozinkinázy (RTK) aktivují cytosolické tyrozinkinázy (TK) a následné signální kaskády vedoucí ke transkripční aktivitě. Většina případů rezistence zahrnuje bodové mutace v cíli léčiva (místa označená červeným křížkem). Mohutná MDR je způsobena pohlcením léčiva lysozomem nebo ABC transportérem zajišťující eflux léčiv. Převzato z: De Klerk et al., 2018.

Jak už bylo uvedeno výše, ABC transportéry jsou považovány za jeden z hlavních důvodů selhávání terapie u rakovinových buněk. I přes jejich bohaté zastoupení je MDR spojována hlavně s transportéry ABCB1, ABCC1 a zejména ABCG2. Postupem času přinesl výzkum

několik generací TKI, většina z nich vystupuje bohužel zároveň i jako substrát ABC transportérů a z důvodu efluxu klesá jejich aktivita v cílených buňkách. Řada nezávislých studií ovšem informovala, že při klinicky dosažitelných koncentracích jsou některé TKI schopny vázat substrát vázající místo na ABC transportérech souvisejících s MDR a inhibovat jejich efluxní aktivitu. Tím dochází ke zvýšení koncentrace samotného TKI i cytostatika a opětovné odpovědi na léčbu (Colabufo et al., 2011; De Klerk et al., 2018; He et al., 2012; Jiao et al., 2018). Podobné studie byly prováděny v rámci vědecké skupiny již dříve. Byl pozorován efekt inhibitorů CDK (např. ribociclibu) na aktivitu ABC efluxních transportérů a jejich podávání s konvenční terapií za účelem překonání MDR (Sorf et al. 2018).

4. Cíl práce

Cílem této práce je stanovení inhibiční aktivity vybraných proteinkinázových inhibitorů (midostaurin, gilteritinib, FLX925) vůči ABC transportérům ABCB1 a ABCG2 a hodnocení jejich proapoptického působení při kombinaci s konvenčními cytostatiky, jež jsou substráty těchto transportérů. Za tím účelem byla využita lidská leukemická buněčná linie HL-60, její rezistentní varianty s expresí uvedených ABC efluxních transportérů a akumulární studie s využitím analýzy fluorescence na průtokovém buněčném spektrálním analyzátoru. Pro hodnocení apoptózy byla využita metoda stanovení annexinu V a zastoupení buněk s fragmentací DNA odpovídající indukované subG1 fázi buněčného cyklu.

5. Experimentální část

5.1. Chemikálie

- RPMI-1640 kultivační médium, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Opti-MEM® médium, Gibco BRL Life Technologies (Rokville, MD, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakousko)
- Midostaurin, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Gilteritinib, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- FLX925, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Mitoxantron, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Daunorubicin, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Fosfátový fufir (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Ko 143, Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)
- LY 335979, Toronto Research Chemicals (North York, ON, Kanada)
- Ethanol absolutní, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- RNAsa A, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Propidium-iodid, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Annexin V kit pro apoptózu, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

5.2. Přístroje

- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- Inkubátor SANYO MCO-18AC (UV), (Honmachi, Coriguchi City, Osaka)
- Centrifuga Hettich Universal 32R (A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo)
- Centrifuga Hettich Mikro 22R (A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo)
- Inverzní optický mikroskop Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Itálie)
- Průtokový cytometr BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- Spektrální analyzátor SONY SA3800 (SONY Biotechnnology, San Jose, CA, USA)

5.3. Buněčná linie

HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) buňky jsou využívány při výzkumu v oblasti poruch krevní řady. Poprvé došlo k izolaci těchto buněk z periferní krve pacientky s akutní promyelocytární leukémií v roce 1977 (Birnie, 1988). Tato buněčná linie roste v suspenzní kultuře a doba jejich zdvojení se pohybuje mezi 20-45 hodinami (Birnie, 1988).

V našem experimentu byly použity rezistentní HL-60 linie, které byly transdukovány ABC transportéry, jejichž přítomnost je spojena s MDR (HL-60 ABCB1, HL-60 ABCG2) a parentní buňky HL-60 vykazující pouze bazální expresi efluxních transportérů. Buňky byly poskytnuty od Dr. Balasz Sarkadi (Hungarian Academy of Sciences, Budapešť, Maďarsko). Tyto buňky simulovali leukemického pacienta, u kterého je prokázána zvýšená exprese ABC transportérů (Shaffer et al., 2012).

5.4. Pasážování

Pasážování buněčné linie HL-60 probíhalo pravidelně každé 3 až 4 dny, kdy buňky dosahovaly koncentrace 10^6 buněk na 1 ml média. Buňky byly kultivovány v živném médiu RPMI-1640 obohaceném o 10% fetální hovězí sérum (FBS) v prostředí inkubátoru za standardních podmínek (37°C , 5% CO_2). Připravené medium neobsahovalo žádná antibiotika.

Před začátkem vlastní pasáže bylo vždy potřeba zahřát medium ve vodní lázni na teplotu 37°C . Mezitím se za pomoci Bürkerovy komůrky zkontrolovalo, zda konfluence buněk v kultivační lánvi dosahuje požadovaných 70 – 90%. Buněčná suspenze byla poté přemístěna z kultivační lahve do centrifugační zkumavky a centrifugována 5 minut při 150 g. Po centrifugaci se odsálo původní médium a buňková peleta se intenzivně resuspendovala v 5 ml média. V dalším kroku se odebrala potřebná část buněk z 5 ml a přenesla se do nové kultivační lahve obsahující 7 ml čistého média (koncentrace buněk po pasáži byla přibližně 150 000 buněk/ml). Po dokončení procesu proběhla kontrola viability buněk pod mikroskopem a návrat do inkubátoru. Do experimentů byly použity buňky z 5. až 20. pasáže. Obsah DMSO v buněčném médiu nikdy nepřekročil doporučený limit 0,5%.

5.5. Akumulační studie

Akumulační studie jsou využívány ke zjištění ovlivnění substrátu transportéru uvnitř buňky. Pokud buňky exprimují ve zvýšené míře ABC transportéry, dochází k úniku substrátu z buňky ven a intenzita fluorescence klesá. Pokud jsou testované látky inhibitory efluxních transportérů, dojde k blokáde odčerpávání, a tím ke zvýšené retenci substrátu uvnitř buňky. V této studii jsme využili jako substráty ABCB1 a ABCG2 transportérů DNR a MIT, které mají fluorescenční vlastnosti. Detekce hladiny substrátu v buňce tak mohla proběhnout na principu fluorimetrie, a to pomocí analýzy na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II (viz. část přístroje).

5.5.1. Průběh experimentu

Před samotným začátkem pokusu bylo nutné zkontrolovat viabilitu buněk. Následovalo počítání buněk a jejich přenesení do centrifugační zkumavky (500 000 buněk na vzorek).

Centrifugace probíhala po dobu pěti minut při zatížení 150 g při pokojové teplotě. Následovalo odsátí přebytečného supernatantu a buňky byly několikrát resuspendovány v Opti-MEM za vzniku buněčné suspenze o denzitě 10^6 buněk/ml. Takto připravené buňky mohly být použity do další části pokusu.

Příprava roztoků inhibitoru vychází z postupného ředění zásobních roztoků inhibitorů na koncentrace 0,1-10 μ l v případě midostaurinu, 0,1-10 μ l u gilteritinibu a 1-50 μ l u FLX925.

Výsledný objem každého vzorku byl 500 μ l. Mimo hlavní koncentrační řadu roztoků inhibitorů bylo nutné připravit kontrolní roztok, který obsahoval jen čistý Opti-MEM a roztok s modelovým inhibitorem (1 μ l LY 335979 nebo 1 μ l KO 143). V dalším kroku bylo ke všem vzorkům přidáno 500 μ l výše zmíněné buněčné suspenze a vzorky se preinkubovaly 15 minut při 37°C a 5% CO₂. Při sloučení roztoků inhibitorů s buněčnou suspenzí klesla koncentrace obou komponent na polovinu, proto bylo nutné připravovat obě složky ve dvojnásobné koncentraci.

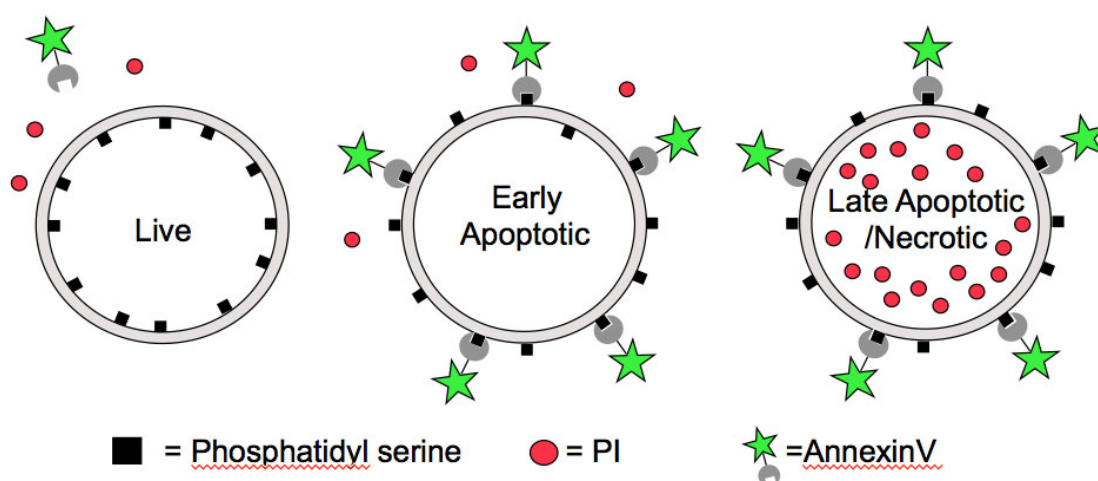
Po 15-ti minutové preinkubaci se přidaly 4 μ l 250 μ M roztoku substrátu (MIT jako substrát ABCG2 transportéru nebo DNR jako substrát ABCB1 transportéru) a vzorky se daly inkubovat na 1 hodinu za stejných podmínek jako v případě preinkubace. Během hodinového inkubačního intervalu bylo nutné vychladit centrifugu na 4°C a zajistit box s ledem. Všechny další operace probíhaly na ledu nebo při chlazení. Po vyjmutí z inkubátoru byly vzorky vloženy do ledu a následně centrifugovány v centrifuze Hettich Mikro 22R 5 minut při zatížení 150 g. Buňky se 1x propláchly 500 μ l ledového fosfátového pufru (PBS) a znovu se stočily za stejných podmínek. Nakonec se buňky několikrát resuspendovaly v ledovém PBS a změřila se jejich fluorescence na průtokovém cytometru BD FACSCanto™ II (DNR - ex: 480 nm, em: 560 nm; MIT - ex: 640 nm, em: 670 nm).

5.6. Detekce apoptózy buněk

5.6.1. Studium apoptózy buněk pomocí duálního barvení annexinem V/PI

Povrch buněk je tvořen lipidy, které jsou asymetricky uspořádány na vnitřní a vnější stranu plazmatické membrány (PM). Součástí membrány je také lipid fosfatidylserin (FS), který se u zdravých buněk nachází pouze na vnitřní straně membrány. Pokud dostává buňka impuls a je vyslána do apoptózy, asymetrická PM je narušena a FS se dostává do vnější vrstvy membrány. FS fungují následně jako opsoniny a iniciují proces fagocytózy (Komoriya et al. 2000).

Annexin V je protein, který se dokáže selektivně vázat na FS. Díky jeho konjugaci s fluorochromem zvaným fluorescein izotiokyanát (FITC) je možný pomocí průtokové cytometrie identifikovat apoptotické buňky (Crowley et al. 2016). Translokace FS předchází narušení integrity PM, která je spojená s dalšími fázemi buněčné smrti, či už pozdějšími apoptotickými nebo nekrotickými procesy. Proto se jako viabilní barvivo používá propidium jodid (PI), který projde jen do poškozených či mrtvých buněk s narušenou PM, zatím co viabilní buňky zůstávají nedotknuté. Pomocí těchto dvou látek s fluorescenční aktivitou lze bezpečně kvantifikovat a odlišit buňky živé (annexin V-/PI-), buňky v brzké apoptóze (annexin V+/PI-), pozdní apoptóze (annexin V+/PI+) a nekrotické buňky (annexin V-/PI+) (Obr. 9 a Obr. 10). Je třeba, aby detekce buněk proběhla co nejdříve, protože všechny buňky postupně přechází do procesu sekundární nekrózy (D'amours et al. 1998).



Obr. 9 Ilustrativní náhled jednotlivých fází buněčné proměny (zleva) od živé buňky (annexin V-/PI-) přes nastupující apoptózu (annexin V+/PI-) až po konečnou fázi nekrózy (annexin V-/PI+). Převzato z: *School of Life Sciences, 2020.*

5.6.1.1. Průběh experimentu

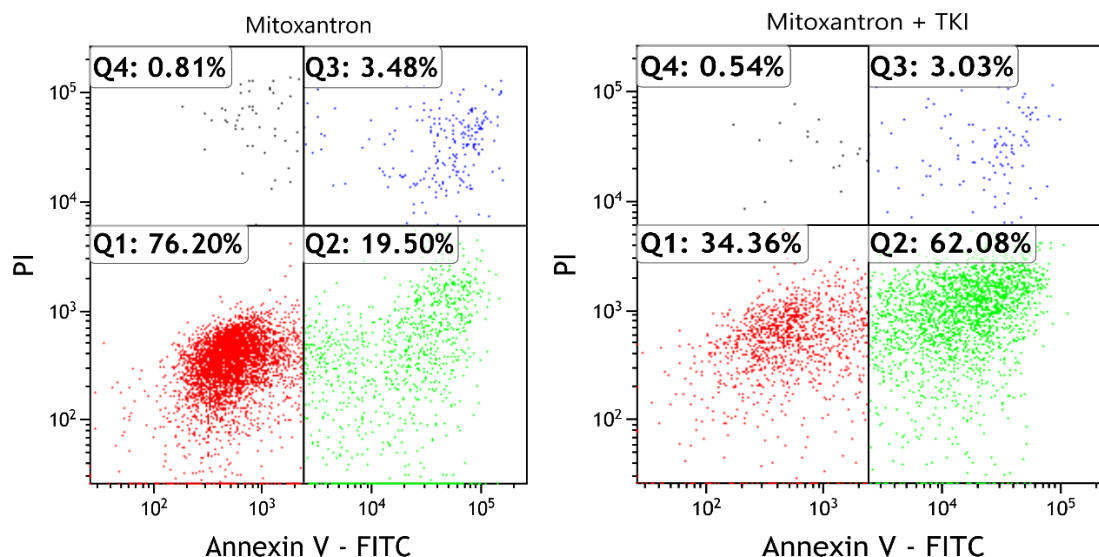
Prvním krokem experimentu byla příprava roztoků inhibitorů v Opti-MEM o dvojnásobné koncentraci do mikrozkušavek dle Tab.2. Roztoky jsme přidali do příslušných zkušavek v objemu 150 μ l, připojili jsme negativní kontrolu obsahující jen čistý Opti-MEM (BCGR) a pozitivní kontrolu, která bude později obsahovat substrát (MIT nebo DNR).

Tab.2 Schéma přípravy roztoků inhibitorů MID, GIL, FLX925

Zásobní roztoky	Připravované roztoky	Objemy jednotlivých složek
	BCGR	150 µl OPT
	Substrát (MIT; DNR)	150 µl OPT
MID 1 mM	MID 1 µM	0,6 µl 1 mM MID + 299,4 µl OPT
	MID 1 µM + substrát	
GIL 1 mM	GIL 2,5 µM	1,5 µl 1 mM GIL + 298,5 µl OPT
	GIL 2,5 µM + substrát	
FLX 10 mM	FLX 50 µM	3 µl 10 mM FLX + 297 µl OPT
	FLX 50 µM + substrát	

Proces přípravy buněčné suspenze v Opti-MEM o denzitě buněk 10^6 buněk/ml byl shodný s průběhem pokusu v podkapitole 2.5.1., lišilo se pouze připravované množství suspenze. Do každé mikrozkušavky s výše zmíněnými roztoky bylo přidáno 150 µl buněčné suspenze a následně se vzorky nechaly 10 minut pre-inkubovat (37°C a 5% CO_2).

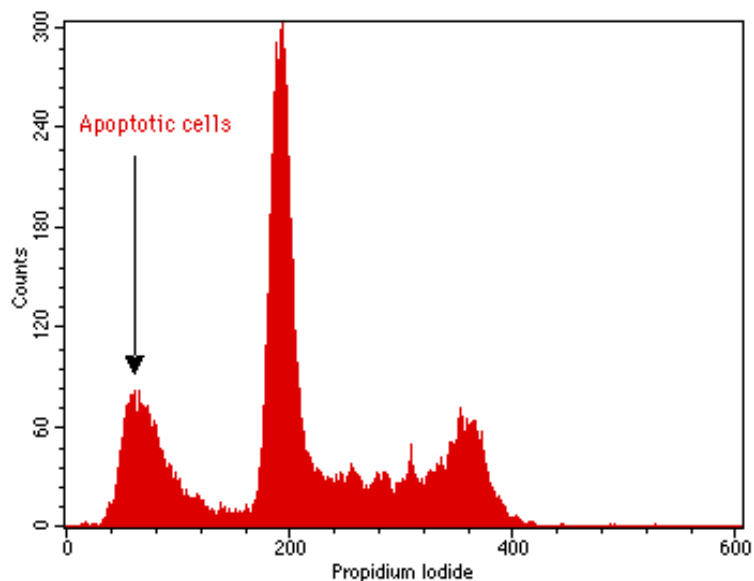
Následně jsme do vybraných zkumavek přidali 1,2 µl 250 mM substrátu (MIT; DNR) pro finální koncentrace substrátu 1 µM. Takto připravené vzorky se nechaly inkubovat další 4 hodiny (37°C a 5% CO_2). Buňky se stočily na centrifuze při přetížení 150 g při pokojové teplotě po dobu pěti minut. Následoval jeden oplach 200 µl annexin V vázajícím pufrem (ABB) a vzorky se znovu stočily za stejných podmínek. Odstranil se přebytečný supernatant a přisedlé buňky se resuspendovaly ve 195 µl ABB. Vzápětí se přidalo 5 µl annexinu V a buňky se nechali 10 minut inkubovat při pokojové teplotě v temném prostředí. Po navázání annexinu V na FS proběhl poslední oplach a buňky byly resuspendovány ve 400 µl PBS. Těsně před analýzou bylo přidáno 10 µl PI. Jednotlivé vzorky byly měřeny na spektrálním analyzátoru SONY SA3800 s využitím excitačních/emisních spekter 488/530 nm pro FITC, 488/670 nm pro PI/DNR a 633/660 nm pro MIT.



Obr. 10 Ilustrativní obr. detekce apoptotických buněk na základě dualního barvení annexinem V/PI. Pomocí těchto dvou látek lze bezpečně kvantifikovat a odlišit buňky živé (Q1: annexin V-/PI-), buňky v brzké apoptóze (Q2: annexin V+/PI-), pozdní apoptóze (Q3: annexin V+/PI+) a nekrotické buňky (Q4: annexin V-/PI+). Měření bylo provedeno nejprve u vzorku, který obsahoval samotný substrát (zleva), poté v jeho kombinaci s inhibítorem. Převzato z: Soňa Štefániková, 2019).

5.6.2. Studium apoptotické subG1 fáze buněk

Během procesu apoptózy dochází ke štěpení DNA na fragmenty o přibližné velikosti 50-300 bp (Ortiz-Ferron, 2016). Zvýšená permeabilita membrán, která je způsobená 70% ethanolem, umožňuje těmto fragmentům dostat se ven z buňky. Apoptotické buňky ztrácí genetický materiál a tím je možné je později odlišit od zbytku zdravých buněk pomocí značení PI. Jelikož PI představuje fluorescenční interkalační barvivo, buňky s nižším obsahem DNA se barví méně intenzivně a ve výsledku tvoří vlastní pík lokalizovaný nalevo od G0/G1 píku označovaný „subG1“ (viz. Obr. 11).



Obr. 11 Znárodnění apoptotických buněk detekovaných v subG1 fázi buněčného cyklu spektrálním analyzátozem. Převezato z webové str.: Shively et Robinson, 1997.

5.6.2.1. Průběh experimentu

Počátek experimentu je totožný s průběhem experimentu popisujícím pozorování apoptózy pomocí annexinu V v předchozí kapitole 2.6.1.1. Rozdíl nastává po čtyřhodinové inkubaci. Buňky byly stočeny na centrifuze (300 g, při pokojové teplotě, 5 minut) a dále se resuspendovaly v 1ml ledového 2% FBS v PBS (dále označovaného jako „barvicí pufr“ = staining buffer, SB). Vzorky se stočily a za stálého vortexování se přidával 70% ethanol. Ethanol byl připraven v průběhu inkubace z důvodu vychlazení na -20°C . Roztok ethanolu musel být přidáván postupně v malém množství, aby nedocházelo ke vzniku shluků buněk a následnému zkreslení výsledků experimentu. Buňky zafixované ethanolem se daly na 30 minut inkubovat do mrazáku vychlazeného na -20°C . Po inkubaci se vzorky zředily 0,5 ml SB a stočily za stejných podmínek. Následoval dvojitý proces oplachu 1 ml SB a buňky se opět stočily. V dalším kroku jsme odebrali přebytečný supernatant a rozrušili peletu na dně zkumavky. Nakonec bylo přidáno 50 μl 100 $\mu\text{g/ml}$ RNAsy a 200 μl 50 $\mu\text{g/ml}$ PI a vzorky se vložily na 1 hodinu do inkubátoru (37°C a 5% CO_2). Měření výsledků probíhalo na spektrálním analyzátozem jako v předchozí kapitole 2.6.1.1.

5.7. Statistická analýza dat

Statistická analýza dat spolu s grafickým zpracováním výsledků byla provedena v programu GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software, Inc.; San Diego, CA, USA).

Vyhodnocování výsledků akumulačních studií bylo provedeno za pomoci jednosměrné analýzy ANOVA s následným Dunnettovým post hoc testem, zatímco apoptotické studie byly analyzovány nepárovým *t*-testem. Statisticky signifikantní hodnoty byly značeny následovně: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,01$. Prezentovaná data představují průměr 3 a více nezávislých měření \pm směrodatná odchylka.

6. Výsledky

6.1. Akumulační studie

Úvodní část experimentu spočívala v hodnocení inhibičního účinku MID, GIL, FLX925 vůči ABC transportérům ABCB1 a ABCG2 s využitím rezistentních buněčných linií HL-60 ABCB1 a HL-60 ABCG2. Výsledné hodnoty byly vztaženy na kontrolní inhibitory, LY 335979 pro ABCB1 a Ko 143 pro ABCG2 a porovnány s výsledky v kontrolní nerezistentní linii HL-60.

6.1.1. Inhibice ABCB1

Midostaurin (MID)

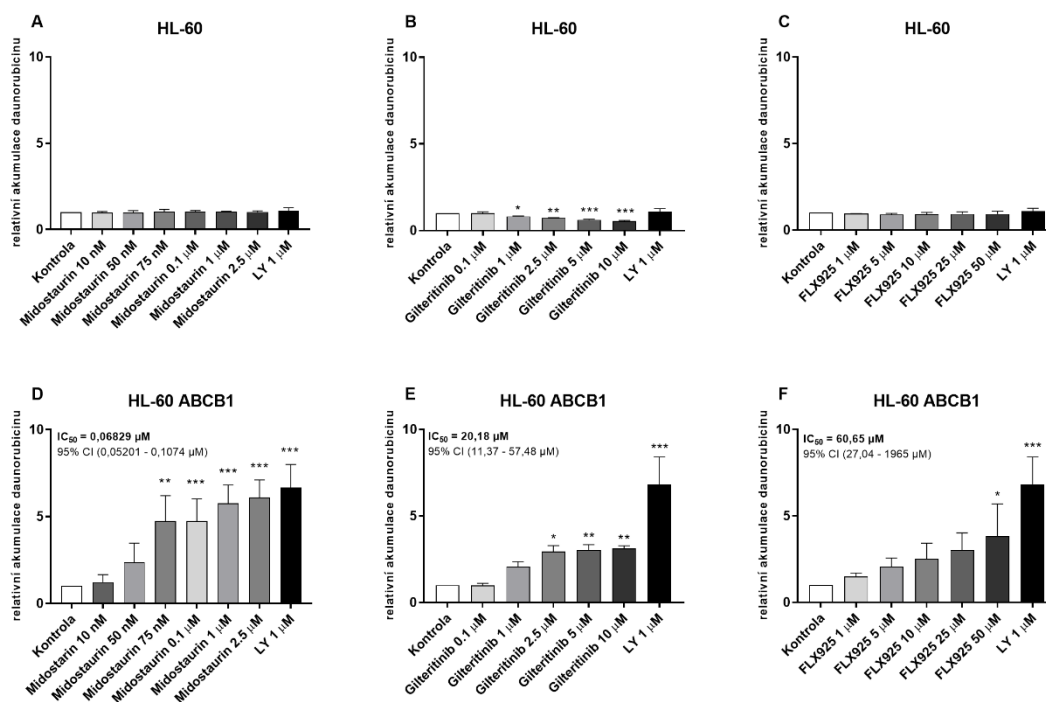
První testovanou molekulou byl midostaurin. V našem experimentu prokázal schopnost zvýšení akumulace DNR od 75 nM koncentrace výše (Obr. 12D), přičemž se zvyšující se koncentrací MID docházelo k nárůstu akumulace DNR téměř na úroveň způsobenou kontrolním inhibitorem LY 335979. Naměřené hodnoty koncentrací potřebných pro 50% inhibici (IC_{50}) potvrzují silnou inhibiční aktivitu midostaurinu u ABCB1 transportéru se získanou výslednou IC_{50} hodnotou 0,06829 μ M (Obr. 12D). Testovaný MID neměl žádný vliv na akumulaci DNR v parentních HL-60 buňkách.

Gilteritinib (GIL)

Dalším testovaným léčivem ze skupiny nedávno registrovaných FLT3 inhibitorů byl gilteritinib. Stejně jako u MID jsme pozorovali nárůst akumulace DNR v přítomnosti GIL se významnými hodnotami od koncentrace 2,5 μ M. Tyto hodnoty potvrzují inhibiční aktivitu GIL vůči ABCB1 transportéru, a to s IC_{50} 20,18 μ M (Obr. 12E). Překvapivě, u parentní linie HL-60 jsme pozorovali se zvyšující se koncentrací GIL mírně se snižující hodnoty fluorescence uvnitř buněk, což by odpovídalo snižování množství naakumulovaného substrátu DNR se zvyšující se koncentrací inhibitoru (Obr. 12B).

FLX925

Posledním testovaným léčivem v tomto experimentu byl FLX925. Podobně jako předchozí dvě testované látky prokázal FLX925 inhibiční účinek vůči ABCB1, a to s IC_{50} 60,65 μ M (Obr. 12F). Testovaný FLX925 neměl žádný vliv na akumulaci DNR v parentních HL-60 buňkách.



Obr. 12 Grafické znázornění akumulace substrátu (DNR) u parentní linie HL-60 a linií transfekovaných lidskými ABC efluxními transportéry při stupňujících se koncentracích TKI (MID, GIL, FLX925) a kontrolního inhibitoru (LY 335979). Součástí obrázku jsou také IC_{50} a 95% rozmezí intervalu spolehlivosti (CI) uvedených inhibitorů. Uvedená data jsou výsledkem průměru ze tří měření \pm směrodatná odchylka.

6.1.2. Inhibice ABCG2

Midostaurin

Stejně jako u ABCB1 transportéru prokázal midostaurin schopnost inhibice i u linie exprimující transportér ABCG2. Významné hodnoty inhibičních koncentrací jsou v porovnání s ABCB1 transportérem vyšší, což potvrzuje i IC_{50} 4,436 μM (Obr. 13D). Účinná inhibice se projevila na obou transportérových podrodinách. Z doložených dat ovšem vyplývá, že midostaurin působí s určitou mírou selektivity spíše k ABCB1 transportéru.

Gilteritinib

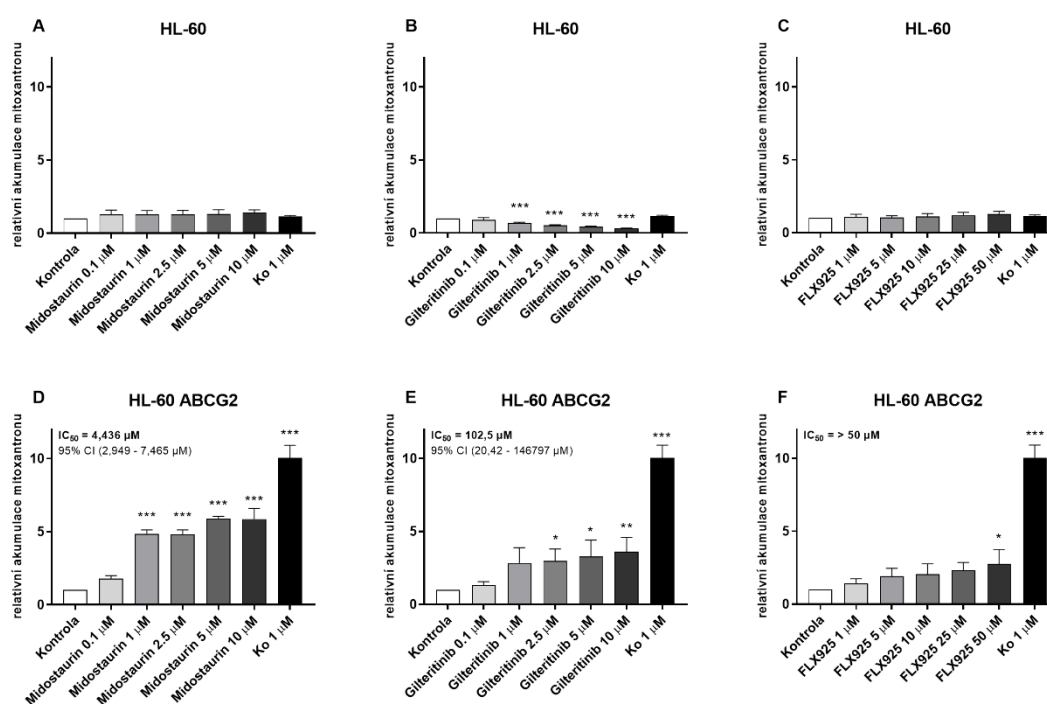
U buněčné linie HL-60 ABCG2 se objevil stejný trend jako u buněk s ABCB1 transportérem. Klesající množství naakumulovaného substrátu, v tomto případě MIT, jsme

sledovali s rostoucí koncentrací inhibitoru (viz. 6.1.1.). Lze tedy předpokládat, že inhibiční efekt gilteritinibu je o něco silnější, než ukazuje Obr. 13B.

Výsledky experimentu udávající IC_{50} 102,5 μ M a grafické znázornění ukazují na inhibiční schopnost gilteritinibu, která ovšem nastává při vyšších koncentracích (Obr. 13E).

FLX925

U molekuly FLX925 je při zvyšujících se koncentracích také pozorována inhibiční aktivita na linii exprimující ABCG2 transportér. Signifikantní koncentrace, při kterých by docházelo k dostatečné inhibici, se ovšem pohybují mnohem výše (pozorovaná rostoucí tendence naakumulovaného MIT nedosahuje ve zvolených koncentracích hladiny MIT při inhibici kontrolním inhibitorem Ko 143 o koncentraci 1 μ M). Grafický pohled (Obr. 13F) je podpořen i hodnotou IC_{50} , která vystupuje vysoko nad námi zvolenými koncentracemi (>50 μ M).



Obr. 13 Grafické znázornění akumulace substrátu (MIT) u parentní linie HL-60 a linií transfekovaných lidskými ABC efluxními transportéry při stupňujících se koncentracích TKI (MID, GIL, FLX925) a kontrolního inhibitoru (Ko 143). Součástí obrázku jsou také IC_{50} a 95% rozmezí intervalu spolehlivosti (CI) uvedených inhibitorů. Uvedená data jsou výsledkem průměru ze tří měření \pm směrodatná odchylka.

6.2. Kombinační studie

V návaznosti na prokázání schopnosti inhibice ABCB1 a ABCG2 všemi testovanými látkami, byl následně hodnocen vliv těchto nových TKI na proapoptotickou aktivitu konvenčních cytostatik v závislosti na ovlivnění jejich efluxu z buněk. Výběr koncentrací testovaných látek proběhl na základě vyhodnocení předchozích akumulčních studií. Nejpodstatnějším parametrem výběru byla signifikantní inhibice jednotlivých koncentrací inhibitorů spolu s respektováním fyziologických plazmatických hladin a toxicity inhibitorů. Použité koncentrace TKI tak byly: MID = 1 μ M, GIL = 2,5 μ M, FLX925 = 50 μ M.

6.2.1. Studium apoptózy u buněk exprimujících ABCB1 transportér

Barvení apoptotických buněk Annexinem V/PI

První metodu, kterou jsme využili k hodnocení míry navozené apoptózy bylo v případě obou linií barvení buněk annexinem V a následně PI pro označení nekrotických buněk (viz. kapitola 5.6.1.) V experimentu byla sledována celá populace apoptotických buněk (annexin+/PI-, annexin+/PI+). Pro srovnání výsledku a průkaz, že pozorované změny jsou způsobeny efluxními transportéry, je přiložen i graf znázorňující výsledek téhož experimentu na parentní buněčné linii HL-60 (Obr. 14A), bez exprese uvedených efluxních transportérů. Zatímco žádná ze samotných testovaných látek nevedla v použité koncentraci ke zvýšení procenta apoptotických buněk, přidání daunorubicinu navodilo zvýšení počtu Annexin V pozitivních apoptotických buněk o více než 20% (Obr. 14A). Jak jsme předpokládali, žádné z přidávaných testovaných léčiv nevedlo u této parentní linie k zvýšení apoptózy daunorubicinu. Překvapivé výsledky přineslo měření u linie HL-60 ABCB1, u které zůstaly hodnoty buněk vyslaných do apoptózy ve všech vzorcích na úrovni kontroly (vzorek obsahující jen čisté buňky) (Obr. 14B). Měření bylo opakováno, aby se vyloučila možnost chyby, nicméně u testované linie nedošlo ani po několika měřeních k původně očekávaným proapoptotickým změnám. Proto byla následně zvolena odlišná metoda studia apoptózy buněk analýzou počtu buněk v subG1 fázi (viz Obr. 14C a Obr. 14D).

Studium apoptotické subG1 fáze buněk

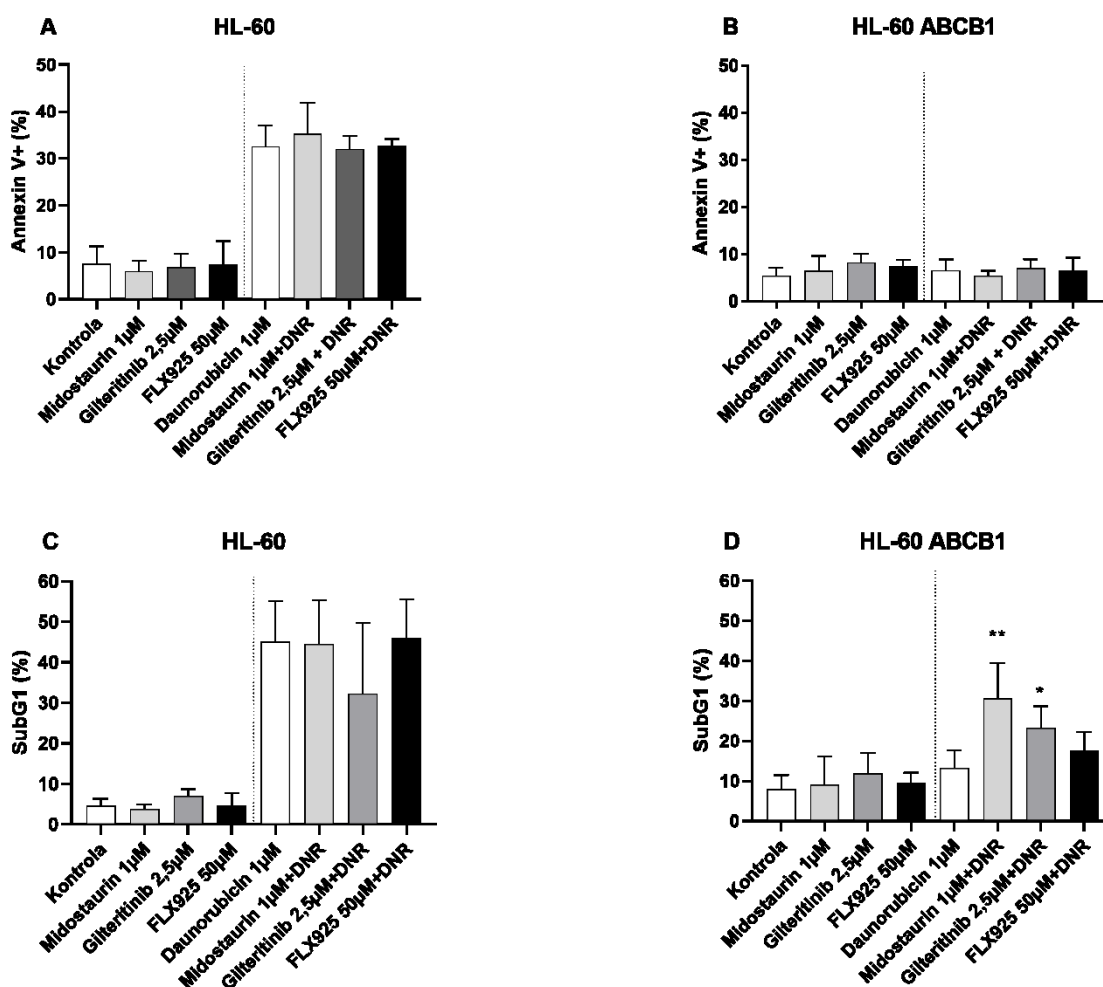
Metoda, jejíž detekce je založena na stanovení míry fragmentace DNA, a tím ztrátě genetické informace buněk. Intenzita signálu PI, který se na DNA váže, ve výsledku u apoptotických buněk slábne a dochází k promítnutí vlastního píku („subG1 pík“), blíže popsáno v kapitole 5.6.2. Grafické znázornění na Obr. 14D ukazuje, že kombinační léčba (TKI + DNR)

dosahuje vyšší odezvy než samotný substrát. Inhibiční schopnosti jednotlivých TKI se v použitých koncentracích v kombinaci s DNR výrazně liší.

Největší a signifikantní inhibici způsobuje MID v kombinaci s DNR, který v porovnání se samotným substrátem vede buňky do apoptózy (subG1 fáze) přibližně 2,5x více (Obr. 14D).

Potenciaci účinku lze pozorovat i u kombinace GIL v kombinaci s DNR, která předčila samotný substrát cca 2x takovým množstvím buněk vyslaných do apoptózy. Mírné zvýšení sloupce apoptických buněk oproti kontrole je viditelné i u samotného GIL, dle našeho měření se vyrovnává efektu samotného DNR v monoterapii (Obr. 14D). Tato myšlenka je podpořena i registrací léčiva gilteritinib v samostatné léčbě AML (viz. kapitola 3.3.2.).

Nejslabší známky posílení samotného efektu DNR přinesl FLX925, u kterého se nepotvrdil proapoptotický účinek kombinační terapie. I tyto výsledky tak částečně potvrzují správné rozhodnutí o dosavadním přerušení dalšího výzkumu tohoto investigativního léčiva.

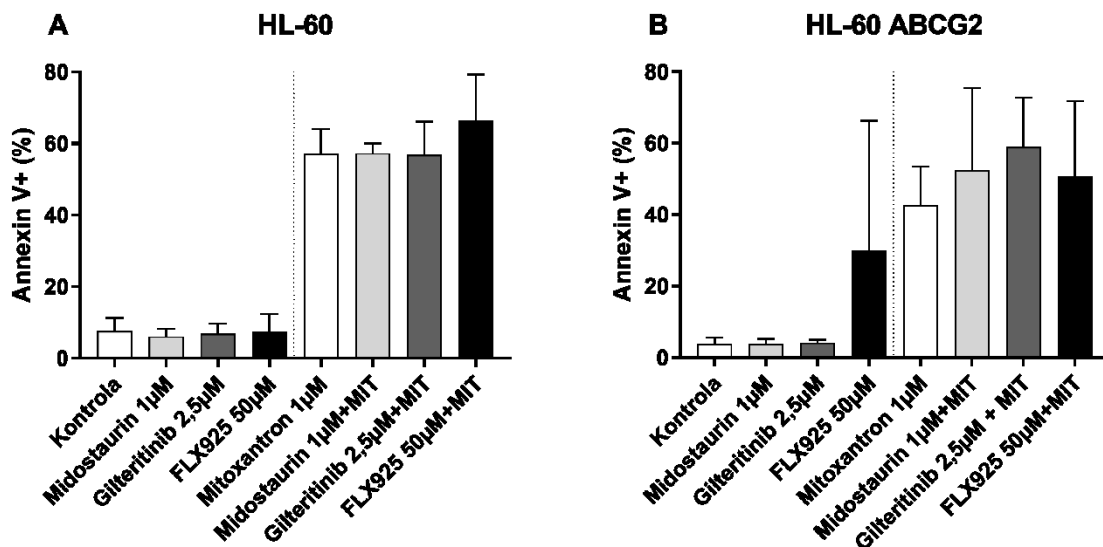


Obr. 14 Grafické znázornění indukce apoptózy substrátem DNR a její potence TKI (MID, GIL, FLX925) u linie HL-60 a HL-60 ABCB1. Snímek A, B ukazuje procento annexin pozitivní populace buněk (annexin+/PI-, annexin+/PI+) v závislosti na podání jednotlivých inhibitorů. Snímek C a D popisuje metodu poukazující na apoptózu pomocí subG1 fáze. Uvedená data jsou výsledkem průměru ze tří měření \pm směrodatná odchylka.

6.2.2. Studium apoptózy u buněk exprimujících ABCG2 transportér

U HL-60 ABCG2 linie byla pro studium apoptózy zvolena metoda dvojího barvení annexinemV/PI stejně jako u HL-60 ABCB1. V průběhu této fáze experimentu začala bohužel buněčná linie HL-60 ABCG2 ztrácet své signifikantní znaky v podobě BCRP transportérů, a proto jsou následující dva grafy shrnuté na Obr. 15 výsledkem průměru pouze dvou měření.

Pokud budeme vycházet z dat, která byla získána za normálních podmínek, kdy zkumavky obsahovaly čistou linii HL-60 ABCG2, budou výsledky následující. Pozorujeme přibližně 10% nárůst po přidání midostaurinu k samotnému substrátu. Ještě zajímavější výsledky prezentuje inhibitor gilteritinib, který v kombinační terapii uvádí do apoptózy o 15% více buněk než samotný MIT. Slabou odezvu přináší FLX925, který se projevuje stejně jako ve zbytku všech doposavad provedených testech velmi mizivou inhibicí a v kombinaci s MIT dosahuje nevýznamných výsledků (Obr. 15B).



Obr. 15 Grafické znázornění indukce apoptózy substrátem MIT a její potenciace TKI (MID, GIL, FLX925) u linie HL-60 a HL-60 ABCB1. Snímek A, B ukazuje procento annexin pozitivní populace buněk (annexin+/PI-, annexin+/PI+) v závislosti na podání jednotlivých inhibitorů. Uvedená data jsou výsledkem průměru ze dvou měření \pm směrodatná odchylka.

7. Diskuze

Léčba nádorových onemocnění je dlouhodobě diskutovaná oblast a spolu s tímto zájmem probíhá i řada medicínských programů a výzkumů. Současná medicína využívá několika způsobů léčby onkologických pacientů, přes řadu inovativních terapeutických přístupů a registraci nových léčiv, převažuje nicméně stále radioterapie a léčba konvenčními chemoterapeutiky. Nádorové buňky jsou bohužel schopné si v průběhu léčby na podávaná léčiva vytvářet rezistenci (Deng et al., 2014; Chen et al., 2016). Jedním z hlavních důvodů selhávání terapie u AML jsou efluxní transportéry, mezi nimiž jsou v souvislosti s rezistencí klíčové především ABCB1 a ABCG2, na které se zaměřuje tato práce. Dnes je odborníky ve vědecké sféře dokázáno, že vyřazením ABC transportérů je možné efekt cytostatik zvýšit. S nimi dokážou některé rakovinové buňky efektivně klasická chemoterapeutika vypuzovat, koncentrace chemoterapeutik klesne pod minimální terapeutickou dávku a léčba přestává být úspěšná (Beretta et al., 2017; Madhusudan et al., 2004). „Small molecular inhibitors“ míří selektivně na proteinové kinázy ve zvýšené míře exprimované nádorovými buňkami. Mimo to však již několik studií naznačuje, že řada těchto nových léčiv dovede ovlivnit i aktivitu ABC transportních proteinů, a tím překonávat MDR (Kathawala et al., 2015). Pro jejich účinek je zásadní, aby byla určitá podobnost mezi ATP vazebným místem TKI a ABC rodiny transportérů.

Do diplomové práce byly vybrány tři nové TKI pro terapii AML, konkrétně nedávno registrovaná léčiva midostaurin a gilteritinib a investigativní léčivo FLX925. Náplní práce bylo pozorovat jejich schopnost inhibice efluxních transportérů, a to v kombinaci s cytostatickou terapií. Pro výzkum byly zvoleny substráty ABCB1 a ABCG2, DNR a MIT, jejichž schopnosti fluorescence se využívalo v měření. K experimentu byla zvolena lidská promyelocytární buněčná linie HL-60, resp. její rezistentní varianty exprimující ABCB1 a ABCG2. Naše výsledky prokazují inhibiční efekt všech testovaných léčiv vůči ABCB1 i ABCG2. Nejvýraznější inhibiční účinek vykazoval midostaurin, jehož IC_{50} u ABCB1 a ABCG2 byla $0,06829 \mu\text{M}$ a $4,436 \mu\text{M}$, což svědčí pro inhibici. Z uvedených hodnot vyplývá, že midostaurin vykazuje vyšší inhibiční účinek vůči ABCB1 v porovnání s ABCG2, o čemž hovoří i další literární zdroje (Hsiao et al., 2019; Ji et al., 2019). Plazmatické koncentrace midostaurinu dosažené v organismu při standardním dávkování tohoto léčiva se pohybují v rozmezí hodnot $0,2$ až $0,7 \mu\text{mol/L}$ (Hsiao et al., 2019), což odpovídá $0,2$ až $0,7 \mu\text{M}$ koncentraci.

Druhou molekulou, na které byly prováděny akumulární testy, je gilteritinib. Ten je v současné době registrován FDA pro léčbu AML s tandemovou mutací FLT3, ovšem v podobě

monoterapie (Short et al.,2019). Po prokázání jeho účinnosti je v rámci klinického hodnocení i jako součást kombinované léčby, bohužel nejsou dosud známé výsledky probíhajících studií. V této práci poprvé prokazujeme inhibiční účinek gilteritinibu vůči ABCB1 a ABCG2 (odpovídající IC_{50} 20,18 μ M a 102,5 μ M). Ve srovnání s midostaurinem je tak inhibiční efekt gilteritinibu na oba transportéry výrazně nižší. Plazmatické koncentrace gilteritinibu dosahují 374(\pm 190) ng/ml, což odpovídá hodnotě 0,333 až 1,02 μ M (Dhillon, 2019). U nerezistentních parentních HL-60 buněk jsme v akumulčních studiích překvapivě pozorovali mírný, ale statisticky významný pokles fluorescence daunorubicinu i mitoxantronu v závislosti na stoupající koncentraci gilteritinibu. Jedním z prvních možných vysvětlení se nabízí zablokování případného dosud neidentifikovaného influxního transportéru, který by přenášel substrát (DNR, MIT) do buňky. Pokud bychom tuto skutečnost zahrnuli do celkové schopnosti GIL inhibovat buněčný eflux, vystupují oba typy transportů jako protichůdné a snižují tak efekt GIL udržet léčivo v buňce. Dalším možným vysvětlením je, že GIL zde vystupuje jako tzv. „přímý zhášec fluorescence“. S jeho rostoucí koncentrací by tlumil vlastní schopnost fluorescence substrátů a průtokový cytometr by následně vyhodnotil jejich akumulace jako nižší než ve skutečnosti jsou (akumulace (DNR, MIT) = vlastní fluorescence substrátu – tlumivý efekt jednotlivých koncentrací GIL). Tato skutečnost pozmění i výsledky u testovaných linií HL-60 ABCB1 a HL-60 ABCG2, kde i přes sledovaný potenciál akumulčního růstu substrátů nedosahují zvolené koncentrace hodnot kontrolních inhibitorů (LY 335979 a Ko 143) (Obr. 12E, Obr. 13E). I za předpokladu, že skutečná inhibice je dosahována za nižších koncentrací přibližujících se plazmatickým, je třeba v budoucnu tuto skutečnost podpořit dalšími probíhajícími studiemi (např. Clinicaltrials.gov, identifikátor NCT02752035).

Viditelně nejslabší inhibicí se prezentoval FLX925. Signifikantní inhibiční schopnost prokázal až v nejvyšší testované koncentraci 50 μ M, viz. Obr. 12F a Obr. 13F. Takové množství je bohužel pro tělo toxické a nemůže být pacientovi podáno. Podobných výsledků se dobrala pravděpodobně i další klinická studie 1. fáze vedená RAPT Therapeutics, Inc., která ukončila studie FLX925 po fázi eskalace dávky. Je pravděpodobné, že také nebylo dosaženo potřebné inhibice ve vymezených fyziologických mezích.

Po zmapování inhibičních schopností jednotlivých TKI jsme se přesunuly ke kombinačním experimentům, jejichž úkolem bylo popsat apoptotickou aktivitu po dodání kombinace TKI a klasického cytostatika, zde DNR nebo MIT dle linie. Pro testování apoptózy buněk byla zvolena nejprve metoda barvení buněk annexinem V a PI, u které dochází k vazbě komplexu annexinV-FITC na FS na rozvolněném povrchu buněk. Hned u první sledované linie HL-60

ABCB1 nedopadlo dle očekávání (Obr. 14B). Měření přinášelo opakovaně konstantní výsledky na úrovni kontroly (backgroundu). Výsledky měření zcela neodpovídaly teoretickým předpokladům ani některým literárním zdrojům (Hsiao et al., 2019) popisujícím potencování účinku po přidání TKI k substrátu. Naše buňky vykazovaly nízkou citlivost k dané metodice. Pravděpodobnou překážkou byla vazba mezi sfingolipidy a komplexem annexinV-FITC.

Pro prokázání naší hypotézy byla později zvolena metoda studia apoptózy buněk v subG1 fázi, za účelem potvrzení teoretických předpokladů, které nepřinesla předchozí metoda. Výsledky měření u buněk exprimujících ABCB1 transportér přinesly na první pohled příznivější data. Oba registrované TKI přinesly v porovnání se samotným DNR zvýšení počtů buněk vstupujících do apoptózy (midostaurin cca 2,5x a gilteritinib cca 2x více než DNR). FLX925, u kterého nebyla v plazmatických koncentracích potvrzena inhibiční schopnost, byl v kombinačních studiích ponechán, aby zůstaly z pohledu TKI kompletní.

Kombinační studie testované na buněčné linii HL-60 ABCG2 prokázaly dostatečnou citlivost k 1. zvolené metodě, a proto zde nebylo třeba přecházet na metodu subG1. Od prvního měření bylo zřejmé, že kombinační efekt (TKI + MIT) by mohl mít potenciál k dosažení pozitivních výsledků. V průběhu experimentu začalo bohužel docházet ke ztracení rezistence (ABCG2 efluxních transportérů) pozorované linie. I přes snahu tyto dvě linie oddělovat po určité době docházelo ke zpětnému ztracení rezistence. Nakonec byl experiment v této fázi ukončen a prezentována byla data z dvou prvních měření. Jsem přesvědčen, že pokud bychom získali čistou buněčnou suspenzi obsahující jen linii HL-60 s ABCG2 transportéry, poté bychom dosáhli signifikantních výsledků. V současné chvíli nelze výsledkům přisuzovat významnost pro jejich nízký počet opakování, a to i přes jejich počáteční pozitivní hodnoty. Získaná data nicméně naznačují, že inhibice transportérů pomocí MID a GIL by mohla vést k vyššímu protinádorovému účinku konvenčních cytostatik, jež jsou substráty ABC transportérů a k překonávání MDR. Uvedené poznatky je nicméně nutné potvrdit ještě na vhodných *ex vivo/in vivo* modelech.

8. Závěr

Tato diplomová práce poskytuje informace o interakčním potenciálu vybraných TKI (midostaurin, gilteritinib, FLX925) s efluxními ABC transportéry (ABCB1 a ABCG2) u buněčné linii HL-60.

Na závěr můžeme konstatovat, že TKI midostaurin a gilteritinib působí jako inhibitory u obou testovaných transportérů, ABCB1 i ABCG2. Midostaurin disponuje vyšší inhibiční schopností než gilteritinib, a to zejména k ABCB1 transportéru. Inhibitor FLX925 požadovaný inhibiční potenciál nepotvrdil. Gilteritinib přinesl z počátku experimentu neočekávané výsledky v podobě snížené akumulace po jeho přidávání. Původ této interakce nebyl blíže pozorovaný, ale lze očekávat, že samotný inhibiční efekt bude výraznější, než dokládají naše výsledky.

Obě látky by tak v budoucnu mohli působit jako protinádorová léčiva s duálním efektem. Kromě inhibice TK způsobují inhibici efluxních transportérů a fungují jako jejich modulátory. Dnes jsou tyto TKI registrované s indikačním omezením u pacientů s AML s mutací FLT3 receptoru, ale vzhledem k jejich multimodálnímu účinku je možné předpokládat, že se jedná o perspektivní léčiva a modulátory MDR nové generace. Ty by pak mohly nalézt terapeutické uplatnění především u nádorů s vysokou expresí ABC transportérů, a to případně i bez ohledu na přítomnost FLT3 mutace. Ve vztahu k dalšímu výzkumu mohou naše *in vitro* testy sloužit jako cenná data pro pokračující *in vivo* studie a do budoucna teoreticky přinést i novou možnost léčby pro onkologicky nemocné pacienty.

9. Zdroje

ALLIKMETS, Rando, Lynn M SCHRIML, Amy HUTCHINSON, Vincenzo ROMANO-SPICA a Michael DEAN. A Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance. *American Association for Cancer Research*. 1998, 1.12.1998, 58(23), 5337-5339. ISSN 1538-7445. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/58/23/5337>

ARORA, Amit a Eric M. SCHOLAR. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005, 315(3), 971-979. DOI: 10.1124/jpet.105.084145. ISSN 0022-3565. Dostupné z: <http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.105.084145>

BAUDINO, Troy. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*. 2015, 12(1), 3-20. DOI: 10.2174/1570163812666150602144310. ISSN 15701638. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-1638&volume=12&issue=1&spage=3>

BEIS, Konstantinos. Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*. 2015, 43(5), 889-893. DOI: 10.1042/BST20150047. ISSN 0300-5127. Dostupné z: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/43/5/889/65480/Structural-basis-for-the-mechanism-of-ABC>

BENADIBA, Marcel a Yehoshua MAOR. Importance of ABC Transporters in Drug Development. *Current Pharmaceutical*. 2016, 22(38), 5817-5829. DOI: 10.2174/1381612822666160810120359. ISSN 13816128. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=22&issue=38&spage=5817>

BERETTA, Giovanni Luca, Giuliana CASSINELLI, Marzia PENNATI, Valentina ZUCO a Laura GATTI. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, 142, 271-289. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.062. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417305846>

BIRNIE GD. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl.* 1988;9 41–45.

BOUTAYEB, S., F.Z. ZAKKOURI, M. AITELHAJ, M. MESMOUDI, A. BOUTAYEB, W. BOUTAYEB, H. MRABTI a H. ERRIHANI. Bilan des inhibiteurs de protéine tyrosine kinase dans le traitement des cancers. *Pathologie Biologie.* 2012, 60(4), 229-233. DOI: 10.1016/j.patbio.2012.05.007. ISSN 03698114. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0369811412000880>

CAI, Sheng F. a Ross L. LEVINE. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. *Seminars in Hematology* 2019, 56(2), 84-89. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.001. ISSN 00371963. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0037196318300970>

CIHALOVA, Daniela, Frantisek STAUD a Martina CECKOVA. Interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors AT-7519, flavopiridol and SNS-032 with ABCB1, ABCG2 and ABCC1 transporters and their potential to overcome multidrug resistance in vitro. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 2015, 76(1), 105-116. DOI: 10.1007/s00280-015-2772-1. ISSN 0344-5704. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-015-2772-1>

CIHALOVA, Daniela, Martina CECKOVA, Radim KUCERA, Jiri KLIMES a Frantisek STAUD. Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 in vitro. *Biochemical Pharmacology.* 2015, 98(3), 465-472. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.08.099. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295215005444>

COLABUFO, Nicola, A. EGFR tyrosine kinase inhibitors and multidrug resistance: perspectives. *Frontiers in Bioscience.* 2011, 16(1). DOI: 10.2741/3823. ISSN 10939946. Dostupné z: <http://www.bioscience.org/2011/v16/af/3823/list.htm>

CROWLEY, Lisa C., Brooke J. MARFELL, Adrian P. SCOTT, Jeanne A. BOUGHABA, Grace CHOJNOWSKI, Melinda E. CHRISTENSEN a Nigel J. WATERHOUSE. Dead Cert: Measuring Cell Death. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016;12 DOI: 10.1101/pdb.top070318. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.top070318>

CROWLEY, Lisa C., Brooke J. MARFELL, Adrian P. SCOTT a Nigel J. WATERHOUSE. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016;11 DOI: 10.1101/pdb.prot087288. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot087288>

D'AMOURS Damien, Marc GERMAIN, Kim ORTH, Vishva M. DIXIT a Guy G. POIRIER. Proteolysis of Poly(ADP-Ribose) Polymerase by Caspase 3: Kinetics of Cleavage of Mono(ADP-Ribosyl)ated and DNA-Bound Substrates. *Radiation Research* 1998;1. DOI: 10.2307/3579638. ISSN 00337587. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/3579638?origin=crossref>

DAVER, Naval Guastad, Marina KONOPLEVA, Holbrook Edwin KOHRT, Jordan Scott FRIDMAN, Dan JOHNSON, Juan C. JAEN, Hagop M. KANTARJIAN a Jorge E. CORTES. First-in-human study of FLX925, an orally administered FLT3/CDK4/CDK6 inhibitor, in subjects with relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML). *Journal of Clinical Oncology*. 2015, **33**(15_suppl), TPS7098-TPS7098. DOI: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.tps7098. ISSN 0732-183X. Dostupné z: https://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.tps7098

DE KLERK, Daniel, Richard HONEYWELL, Gerrit JANSEN a Godefridus PETERS. Transporter and Lysosomal Mediated (Multi)drug Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors and Potential Strategies to Overcome Resistance. *Cancers*. 2018, 10(12). DOI: 10.3390/cancers10120503. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/12/503>

DE KOUCHKOVSKY, I a M ABDUL-HAY. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer Journal*. 2016, 6(7), e441-e441. DOI: 10.1038/bcj.2016.50. ISSN 2044-5385. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/bcj201650>

DEAN, M., Y. HAMON, and G. CHIMINI. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res*. 2001. 42: 1007–1017

DENG, Jiexin, Jie SHAO, John S. MARKOWITZ a Guohua AN. ABC Transporters in Multi-Drug Resistance and ADME-Tox of Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors. *Pharmaceutical Research*. 2014, 31(9), 2237-2255. DOI: 10.1007/s11095-014-1389-0. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-014-1389-0>

DHILLON, Sohita. Gilteritinib: First Global Approval. *Drugs*. 2019, 79(3), 331-339. DOI: 10.1007/s40265-019-1062-3. ISSN 0012-6667. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-019-1062-3>

DOYLE, L. A., W. YANG, L. V. ABRUZZO, T. KROGMANN, Y. GAO, A. K. RISHI a D. D. ROSS. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998, 95(26), 15665-15670. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15665. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.26.15665>

GAMEIRO, Mariline, Renata SILVA, Carolina ROCHA-PEREIRA, Helena CARMO, Félix CARVALHO, Maria BASTOS a Fernando REMIÃO. Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules*. 2017, 22(4). DOI: 10.3390/molecules22040600. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/4/600>

GAZDOVÁ, Jana, Dana DVOŘÁKOVÁ, Ivana JEŽÍŠKOVÁ, Filip RÁZGA, Tomáš JURČEK a Jiří MAYER. Úloha FLT3 mutací v patogenezi akutní myeloidní leukemie. *Transfúze a hematologie dnes*. 2009, 9(4), 229-236. ISSN 1805-4587.

GLAVINAS, Hristos, Peter KRAJCSI, Judit CSEREPES a Balazs SARKADI. The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Current Drug Delivery*. 2004, 1(1), 27-42. DOI: 10.2174/1567201043480036. ISSN 15672018. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=1&issue=1&spage=27>

GRANT, S. K. Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, 66(7), 1163-1177. DOI: 10.1007/s00018-008-8539-7. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-008-8539-7>

HE, Miao a Min-Jie WEI. Reversing multidrug resistance by tyrosine kinase inhibitors. *Chinese Journal of Cancer*. 2012, 31(3), 126-133. DOI: 10.5732/cjc.011.10315. ISSN 1000467X. Dostupné z: <http://www.cjcsysu.cn/abstract.asp?fr=doi&idno=18028>

HEO, Sook-Kyoung, Eui-Kyu NOH, Gi-Dong GWON, et al. Radotinib inhibits acute myeloid leukemia cell proliferation via induction of mitochondrial-dependent apoptosis and

CDK inhibitors. *European Journal of Pharmacology*. 2016, 789, 280-290. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.07.049. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299916304897>

HOWLADER, N, AM NOONE, M KRAPCHO, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. National cancer institut: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Bethesda: National Cancer Institut, 2020. Dostupné z: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html?fbclid=IwAR39nVPQoZGzb-qXVAdqP9SVF1huednCpl_mFswEAFbf6VUcV8f4MzpgVfo

HSIAO, Sung-Han, Sabrina LUSVARGHI, Yang-Hui HUANG, Suresh V. AMBUDKAR, Sheng-Chieh HSU a Chung-Pu WU. The FLT3 inhibitor midostaurin selectively resensitizes ABCB1-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Letters*. 2019, 445, 34-44. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.01.001. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383519300114>

CHEN, Zhaolin, Tianlu SHI, Lei ZHANG, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters* 2016, 370(1), 153-164. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.010. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383515006278>

CHOI, Young a Ai-Ming YU. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development. *Current Pharmaceutical Design*. 2014, 20(5), 793-807. DOI: 10.2174/138161282005140214165212. ISSN 13816128. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=20&issue=5&spage=793>

INTERNATIONAL TRANSPORTER CONSORTIUM. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010, 9(3), 215-236. DOI: 10.1038/nrd3028. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrd3028>

JI, Ning, Yuqi YANG, Chao-Yun CAI, et al. Midostaurin Reverses ABCB1-Mediated Multidrug Resistance, an in vitro Study. *Frontiers in Oncology*. 2019, 9. DOI: 10.3389/fonc.2019.00514. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00514/full>

JIAO, Qinlian, Lei BI, Yidan REN, Shuliang SONG, Qin WANG a Yun-shan WANG. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*. 2018, 17(1). DOI: 10.1186/s12943-018-0801-5. ISSN 1476-4598. Dostupné z: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-018-0801-5>

JONES, P. M. a A. M. GEORGE. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004, 61(6), 682-699. DOI: 10.1007/s00018-003-3336-9. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-003-3336-9>

JULIANO, R.L. a V. LING. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1976, 455(1), 152-162. DOI: 10.1016/0005-2736(76)90160-7. ISSN 00052736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273676901607>

KATHAWALA, Rishil J., Pranav GUPTA, Charles R. ASHBY a Zhe-Sheng CHEN. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates*. 2015, 18, 1-17. DOI: 10.1016/j.drug.2014.11.002. ISSN 13687646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764614000788>

KAYSER, Sabine, Mark J LEVIS a Richard F SCHLENK. Midostaurin treatment in FLT3 -mutated acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2017, 10(11), 1177-1189. DOI: 10.1080/17512433.2017.1387051. ISSN 1751-2433. Dostupné z:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17512433.2017.1387051> KOMORIYA

A, Packard BZ, Brown MJ, Wu ML, Henkart PA. 2000. Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *J Exp Med* 191: 1819–1828.

KRAUSE, Daniela S. a Richard A. VAN ETTEN. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *New England Journal of Medicine*. 2005, 353(2), 172-187. DOI: 10.1056/NEJMra044389. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra044389>

LEVIS, Mark. Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood*. 2017, 129(26), 3403-3406. DOI: 10.1182/blood-2017-05-782292. ISSN 0006-4971. Dostupné z:

<https://ashpublications.org/blood/article/129/26/3403/36251/Midostaurin-approved-for-FLT3mutated-AML>

LI, Cong, Lingming LIANG, Liqin LIU, et al. Abstract 787: FLX925 (AMG 925) is a rationally designed FLT3, CDK4/6 inhibitor that retains potency against clinically relevant secondary resistance mutations in FLT3. In: *Experimental and Molecular Therapeutics*. American Association for Cancer Research, 2015, 2015-08-02, s. 787-787. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-787. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.AM2015-787>

LI, Wen, Han ZHANG, Yehuda G. ASSARAF, Kun ZHAO, Xiaojun XU, Jinbing XIE, Dong-Hua YANG a Zhe-Sheng CHEN. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*. 2016, 27, 14-29. DOI: 10.1016/j.drug.2016.05.001. ISSN 13687646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764616300127>

LIU, Xiaodong. ABC Family Transporters. LIU, Xiaodong a Guoyu PAN, ed. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*. Singapore: Springer Singapore, 2019, 2019-10-01, s. 13-100. Advances in Experimental Medicine and Biology. DOI: 10.1007/978-981-13-7647-4_2. ISBN 978-981-13-7646-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-7647-4_2

LOCHER, Kaspar P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008, 364(1514), 239-245. DOI: 10.1098/rstb.2008.0125. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0125>

MADHUSUDAN, Srinivasan a Trivadi S. GANESAN. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry*. 2004, 37(7), 618-635 DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.05.006. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912004001298>

MARUBAYASHI, Sachie, Adam PARK, Rajkumar NOUBADE, Huyen PHAN, Gene CUTLER, Paul KASSNER a Jordan S FRIDMAN. FLX925 Is a Rationally Designed FLT3, CDK4/6 Inhibitor with a Desirable Resistance Profile. *Blood* 2016, 128(22), 2323-2323. DOI: 10.1182/blood.V128.22.2323.2323. ISSN 0006-4971. Dostupné z:

<https://ashpublications.org/blood/article/128/22/2323/98713/FLX925-Is-a-Rationally-Designed-FLT3-CDK46>

MAYER, Jiří, ed. Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. *Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně*, 2016. ISBN 978-80-260-9718-1.

MIYATA, Hiroshi, Tappei TAKADA, Yu TOYODA, Hirotaka MATSUO, Kimiyoshi ICHIDA a Hiroshi SUZUKI. Identification of Febuxostat as a New Strong ABCG2 Inhibitor: Potential Applications and Risks in Clinical Situations. *Frontiers in Pharmacology*. 2016, 7. DOI: 10.3389/fphar.2016.00518. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00518/full>

MONTANARI, Floriane a Gerhard F. ECKER. Prediction of drug–ABC-transporter interaction — Recent advances and future challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015, 17-26. DOI: 10.1016/j.addr.2015.03.001. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000204>

MORI, Masamichi, Naoki KANEKO, Yoko UENO, et al. Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Investigational New Drugs*. 2017, 35(5), 556-565. DOI: 10.1007/s10637-017-0470-z. ISSN 0167-6997. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10637-017-0470-z>

NAKANISHI, Takeo a Douglas D. ROSS. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese Journal of Cancer*. 2012, 31(2), 73-99. DOI: 10.5732/cjc.011.10320. ISSN 1000467X. Dostupné z: <http://www.cjcsysu.cn/abstract.asp?fr=doi&idno=18036>

OSWALD, Christine, I. Barry HOLLAND a Lutz SCHMITT. The motor domains of ABC-transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2006, 372(6), 385-399. DOI: 10.1007/s00210-005-0031-4. ISSN 0028-1298. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00210-005-0031-4>

PALMEIRA, A., E. SOUSA, M. H. VASCONCELOS a M. M. PINTO. Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, 19(13), 1946-2025. DOI: 10.2174/092986712800167392. ISSN 09298673.

Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=13&spage=1946>

PÉREZ-HERRERO, Edgar a Alberto FERNÁNDEZ-MEDARDE. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015, 93, 52-79. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641115001514>

POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-494-2.

RAHAMAN, Muhammed H., Yingyi YU, Longjin ZHONG, et al. CDKI-73: an orally bioavailable and highly efficacious CDK9 inhibitor against acute myeloid leukemia. *Investigational New Drugs*. 2019, 37(4), 625-635. DOI: 10.1007/s10637-018-0661-2. ISSN 0167-6997. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10637-018-0661-2>

RICCARDI, Carlo a Ildo NICOLETTI. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* 2006, 1(3), 1458-1461 DOI: 10.1038/nprot.2006.238. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.238>

ROBEY, Robert W., Orsolya POLGAR, John DEEKEN, Kin Wah TO a Susan E. BATES. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007, 26(1), 39-57. DOI: 10.1007/s10555-007-9042-6. ISSN 0167-7659. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-007-9042-6>

ROSKOSKI, Robert. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*. 2015, 100, 1-23. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.07.010. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661815001437>

SHAFFER, Brian C., Jean-Pierre GILLET, Chirayu PATEL, Maria R. BAER, Susan E. BATES a Michael M. GOTTESMAN. Drug resistance: Still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resistance Updates*, 2012, 15(1-2), 62-69 DOI: 10.1016/j.drug.2012.02.001. ISSN 13687646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764612000118>

SHORT, Nicholas J., Hagop KANTARJIAN, Farhad RAVANDI a Naval DAVER. Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2019, 10. DOI: 10.1177/2040620719827310. ISSN 2040-6207. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2040620719827310>

SILVA, Renata, Vânia VILAS-BOAS, Helena CARMO, Ricardo Jorge DINIS-OLIVEIRA, Félix CARVALHO, Maria DE LOURDES BASTOS a Fernando REMIÃO. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015, 149, 1-123. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.013. ISSN 01637258. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725814002137>

SMITH, Catherine C. The growing landscape of FLT3 inhibition in AML. *Hematology*. 2019, 2019(1), 539-547. DOI: 10.1182/hematology.2019000058. ISSN 1520-4391. Dostupné z: <https://ashpublications.org/hematology/article/2019/1/539/422599/The-growing-landscape-of-FLT3-inhibition-in-AML>

SOLA, Ana Marija, Daniel E. JOHNSON a Jennifer R. GRANDIS. Investigational multitargeted kinase inhibitors in development for head and neck neoplasms. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2019, 28(4), 351-363. DOI: 10.1080/13543784.2019.1581172. ISSN 1354-3784. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543784.2019.1581172>

SORF, Ales, Jakub HOFMAN, Radim KUČERA, Frantisek STAUD a Martina CECKOVA. Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 2018, 154, 10-17. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.04.013. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295218301564>

STANSFIELD, Lindsay C. a Daniel A. POLLYEA. Midostaurin: A New Oral Agent Targeting FMS-Like Tyrosine Kinase 3-Mutant Acute Myeloid Leukemia. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2017, 37(12), 1586-1599. DOI: 10.1002/phar.2039. ISSN 02770008. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/phar.2039>

STAUD, Frantisek a Petr PAVEK. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005, 37(4), 720-725. DOI:

10.1016/j.biocel.2004.11.004. ISSN 13572725. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135727250400398X>

STEEGHS, Neeltje, Johan W. R. NORTIER a Hans GELDERBLUM. Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Solid Tumors: An Update of Recent Developments. *Annals of Surgical Oncology*. 2007, 14(2), 942-953. DOI: 10.1245/s10434-006-9227-1. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1245/s10434-006-9227-1>

STEINBACH, D a O LEGRAND. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? *Leukemia*. 2007, 21(6), 1172-1176. DOI: 10.1038/sj.leu.2404692. ISSN 0887-6924. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/2404692>

STONE, Richard M., Sumithra J. MANDREKAR, Ben L. SANFORD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017, 377(5), 454-464. DOI: 10.1056/NEJMoa1614359. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1614359>

SZABÓ, Edit, Dóra TÜRK, Ágnes TELBISZ, et al. A new fluorescent dye accumulation assay for parallel measurements of the ABCG2, ABCB1 and ABCC1 multidrug transporter functions. 2018, 13(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0190629. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190629>

SZAKÁCS, Gergely, András VÁRADI, Csilla ÖZVEGY-LACZKA a Balázs SARKADI. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today*. 2008, 13(9-10), 379-393. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.12.010. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135964460800007X>

ŠTEFÁNIKOVÁ, Soňa. Role CDK4/6 inhibitorů v překonání lékové rezistence zprostředkované efluxními transportéry u leukemických buněk. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2019

THEODOULOU, Frederica L. a Ian D. KERR. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*. 2015, 43(5), 1033-1040. DOI:

10.1042/BST20150139. ISSN 0300-5127. Dostupné z:
<https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/43/5/1033/65495/ABC-transporter-research-going-strong-40-years-on>

TOYODA, Yu, Tappei TAKADA a Hiroshi SUZUKI. Inhibitors of Human ABCG2: From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, 10. DOI: 10.3389/fphar.2019.00208. ISSN 1663-9812. Dostupné z:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00208/full>

VARMA, M. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological Research*. 2003, 48(4), 347-359. DOI: 10.1016/S1043-6618(03)00158-0. ISSN 10436618. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661803001580>

VASILIOU, Vasilis, Konstandinos VASILIOU a Daniel W NEBERT. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*. 2008, 3(3). DOI: 10.1186/1479-7364-3-3-281. ISSN 1479-7364. Dostupné z:
<http://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-7364-3-3-281>

WILKENS, Stephan. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*. 2015, 7. DOI: 10.12703/P7-14. ISSN 20517599. Dostupné z:
<http://www.f1000.com/prime/reports/b/7/14>

WLODKOWIC, Donald, William TELFORD, Joanna SKOMMER a Zbigniew DARZYNKIEWICZ. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Recent Advances in Cytometry, Part B-Advances in Applications* Elsevier, 2011, s. 55-98 Methods in Cell Biology. DOI: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00004-8. ISBN 9780123854933. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123854933000048>

WU, Qiong, Zhiping YANG, Yongzhan NIE, Yongquan SHI a Daiming FAN. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters* 2014, 347(2), 159-166. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.03.013. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438351400158X>

YAMAOKA, Toshimitsu, Sojiro KUSUMOTO, Koichi ANDO, Motoi OHBA a Tohru OHMORI. Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(11). DOI: 10.3390/ijms19113491. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3491>

YANG, Xue a Jianxiang WANG. Precision therapy for acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*. 2018, 11. DOI: 10.1186/s13045-017-0543-7. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0543-7>

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, Maciej J., Mitchell E. TAUB, Paresh P. CHOTHE, et al. Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2018, 104(5), 890-899. DOI: 10.1002/cpt.1112. ISSN 00099236. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt.1112>

ZHAO, Juanjuan, Yongping SONG a Delong LIU. Gilteritinib: a novel FLT3 inhibitor for acute myeloid leukemia. *Biomarker Research*. 2019, 7(1) DOI: 10.1186/s40364-019-0170-2. ISSN 2050-7771. Dostupné z: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-019-0170-2>

10. Elektronické zdroje

National Center for Biotechnology Information. In: PubChem Database, Amg-925, CID=60202647, 2020, Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amg-925>, Datum přístupu 3.5.2020

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Gilteritinib, CID=49803313, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gilteritinib>, Datum přístupu: 15.3.2020

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Midostaurin, CID=9829523, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Midostaurin>, Datum přístupu: 12.3.2020

Novartis oncology. Mechanism of action in AML, In: *Rydapt*, 2018, Dostupné z: <https://www.hcp.novartis.com/products/rydapt/acute-myeloid-leukemia/mechanism-of-action/>, Datum přístupu 3.5.2020

ORTIZ-FERRON, Gustavo. The Proper Way To Use The Sub-G1 Assay. *Bite Size Bio*. Granada, 2016. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/25876/the-proper-way-to-use-the-sub-g1-assay-tips-tricks-and-secrets/>

SARKADI, Balázs, Gergely SZAKÁZ a András VÁRADI. Drug Metabolism Tech Review: Multi-Drug Resistance in Cancer-Role of ABC Transporter Proteins. *Merck*, Budapest, Hungary: Merck, 2004. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/xenobiotics/drug-metabolism-tech-review.html>

SHIVELY M. Monica, J. Paul Robinson. Purdue University Cytometry Laboratories, In: *Imperial Cancer Research Found – Flow Cytometry Laboratory*, 1997, Dostupné z: <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto3/8/data/icrf/subg1.gif>, Datum přístupu 3.5.2020

School of Life Sciences. University of Dundee, In: *Home Annexin.png*, 2020, Dostupné z: <https://www.lifesci.dundee.ac.uk/file/3830>, Datum přístupu 3.5.2020