

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Studium vlivu overexprese ABC lékových transportérů
na antiproliferační schopnosti vybraných konvenčních cytostatik**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Lucie Malečová

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

V Hradci Králové

Lucie Malečová

Poděkování

Za naprosto výborné vedení této diplomové práce, bezmeznou ochotu, věnovaný čas a skvělý přístup, který ve mně vyvolal nadšení pro vědu, děkuji vedoucímu práce doc. RNDr. Jakobovi Hofmanovi, Ph.D. Konzultanti Yu Zhang, M.Sc. a Youssif A Youssif Budagaga, M.Sc. si zaslouží obrovské poděkování za ochotu, všechny praktické rady, odhodlání podrobně a srozumitelně odpovědět na jakékoliv otázky a také za nezapomenutelnou atmosféru po celou dobu mé práce v laboratoři, ale i při samotném psaní diplomové práce. V neposlední řadě děkuji mé rodině a přátelům, kteří byli v průběhu psaní hlavními kritiky mé práce a zároveň obrovskou podporou.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lucie Malečová

Školitel: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium vlivu overexprese ABC lékových transportérů na antiproliferační schopnosti vybraných konvenčních cytostatik

Overexprese ABC lékových transportérů je jedním z mechanismů rozvoje mnohočetné lékové rezistence, která je příčinou selhávání terapie u nádorových onemocnění. ABC transportéry jako ABCB1, ABCG2 a ABCC1 mají široké spektrum substrátů, mezi kterými je i řada konvenčních cytostatik.

Cílem této práce bylo popsat možný vliv overexprese zmíněných efluxních transportérů na antiproliferační účinky docetaxelu, etoposidu, paklitaxelu, methotrexátu, pemetrexedu, topotekanu a vinblastinu. Výsledky byly získány pomocí MTT testů prováděných na buněčných liniích MDCKII a A431 se/bez zvýšenou(é) expresí(e) studovaných transportérů. U pěti ze sedmi testovaných cytostatik byl pozorován pokles cytotoxicity v buňkách se zvýšenou expresí, pokaždé alespoň u jednoho z transportérů. Pouze topotekan byl vyhodnocen jako oběť rezistence zprostředkované všemi třemi testovanými transportéry. Pro ověření využitelnosti získaných výsledků jsem topotekan použila jako modelové cytostatikum v následné kombinační studii. V rámci této studie byly v kombinaci použity kapmatinib, pralsetinib a tazemetostat jako inhibitory transportéru ABCG2 a potenciální modulátory rezistence. Dle výsledků MTT testu projeví všechny tři testované sloučeniny v kombinaci s topotekánem modulační potenciál.

I přes několikaletý výzkum stále nemáme transportérové inhibitory, které by byly úspěšnými modulátory rezistence v klinických podmínkách. Proto je důležité hledat nové modulační molekuly, stejně tak jako popsat léčiva, která jsou obětí rezistence. Tato práce může být přínosem pro další studie zabývající se problematikou overexprese ABC transportérů a jejího vlivu na selhávání chemoterapie. Zároveň přináší nové poznatky o využití kapmatinibu, pralsetinibu a tazemetostatu jakožto modulátorů rezistence zprostředkované transportérem ABCG2.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lucie Malečová

Supervisor: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of the effect of ABC drug transporters' overexpression on the antiproliferative capacities of selected conventional cytostatics

Overexpression of ABC drug transporters is one of the mechanisms of multiple drug resistance development, which results in therapy failure in cancer. ABC transporters such as ABCB1, ABCG2 and ABCC1 have a wide range of substrates, including several conventional cytostatics.

This study aimed to examine the influence of overexpression of the mentioned transporters on the antiproliferation effects of docetaxel, etoposide, paclitaxel, methotrexate, pemetrexed, topotecan and vinblastin. The results were obtained with the MTT assay in which the MDCKII and A431 cell lines with/without overexpression of mentioned transporters were used. A decrease of cytotoxicity in the presence of at least one of the transporters was observed in five of seven tested cytostatics. Only topotecan has been proven to be the victim of overexpression of all of the tested transporters.

To prove the applicability of the obtained results, topotecan was used in the follow-up combination study. Within this study, I have tested capmatinib, pralsetinib and tazemetostat as potential inhibitors of ABCG2 transporter. According to the MTT assay results, all of these drugs had shown a potential to be transporter modulators in combination with topotecan.

Despite several years of research, we still do not have ABC transporter inhibitors that would be successful in clinical conditions. Therefore, it is important to constantly look for new modulators as well as to describe molecules that are victims of the MDR. This work may be beneficial for further studies dealing with the issue of overexpression of ABC transporters and its impact on chemotherapy failure. In addition, it brings new knowledge about capmatinib, pralsetinib and tazemetostat as potential ABCG2 modulators.

Obsah

1.	Seznam zkratk	8
2.	Úvod.....	9
3.	Teoretická část	11
3.1	Protinádorová léčba.....	11
3.1.1	Konvenční léčba	12
3.1.2	Cílená léčba a aktuální trendy ve vývoji protinádorových léčiv	13
3.2	Rezistence vůči protinádorové farmakoterapii.....	16
3.2.1	Obecná charakteristika.....	16
3.2.2	Role ABC efluxních lékových transportérů.....	18
3.2.2.1	P-glykoprotein	20
3.2.2.2	Breast cancer resistance protein.....	22
3.2.2.3	Multidrug resistance-associated protein 1	23
4.	Cíle práce	25
5.	Experimentální část.....	26
5.1	Materiál a metody	26
5.1.1	Chemikálie	26
5.1.2	Přístroje.....	26
5.1.3	Buněčné linie	27
5.1.4	Komparativní proliferační MTT testy.....	27
5.1.5	Kombinační studie	30
5.1.6	Statistická analýza.....	31
5.2	Výsledky	32
5.2.1	Komparativní proliferační MTT testy v MDCKII a A431 buňkách	32
5.2.2	Kombinační studie s topotekanem v MDCKII buňkách.....	41
6.	Diskuze	43

7.	Závěr.....	47
8.	Seznam literatury.....	49

1. Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette
ABCB1	P-glykoprotein (P-gp, MDR1)
ABCC1	multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)
ABCG2	breast cancer resistance protein (BCRP, MXR, ABCP)
ATP	adenosintrifosfát
Cap	kapmatinib
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	dimethylsulfoxid
FBS	fetální bovinní sérum
MDCKII	Madin-Darby Canine Kidney II, buněčná linie
MDR	z ang. multidrug resistance, mnohočetná léková rezistence
MTT	methylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid
NBD	z ang. nucleotide-binding domain, doména vázající nukleotid
PBS	fosfátový pufr
Pra	pralsetinib
Taze	tazemetostat
Topo	topotekan
TKIs	tyrosinkinázové inhibitory
TMD	z ang. transmembrane domain, transmembránová doména

2. Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě. V dnešní době existuje několik typů protinádorové léčby, jako např. chirurgické odstranění solidních nádorů, radioterapie, hormonální terapie a široce využívaná chemoterapie. V posledních letech k těmto možnostem přibyly moderní strategie, a to imunoterapie a cílená léčba. Obvykle se v jednom léčebném procesu kombinuje několik typů terapie, přičemž základem bývá velmi často chemoterapie (Faguet, 2015; Sung et al., 2021; Švihovec Jan, 2018). I přes možnost těchto kombinací terapie v mnoha případech nedosahuje pozitivních výsledků. Toto selhání chemoterapeutické léčby je spojováno se vznikem mnohočetné lékové rezistence (MDR), která se v posledních letech stala předmětem mnoha výzkumů (Bukowski et al., 2020; Holohan et al., 2013; Mansoori et al., 2017).

MDR je komplexní problém, jelikož je její vznik spojován s řadou různých mechanismů. Kromě snížení absorpce, změn metabolismu a eliminace cytostatik jde i o změnu aktivity cíle léčiv nebo zrychlení procesu opravy DNA. Jedním z mechanismů vzniku MDR je i snížení akumulace léčiv v nádorových buňkách v důsledku zvýšeného efluxu těchto léčiv (Rang Humphrey et al., 2016; Szakács et al., 2006). S tímto mechanismem je nejčastěji spojována rodina ABC lékových transportérů, jejíž schopností je transportovat řadu fyziologických molekul ale také protinádorových léčiv skrz membránu nádorových buněk. Konkrétními transportéry spojovanými se vznikem MDR jsou ABCB1 (P-glykoprotein), ABCC1 (multidrug-resistance protein 1) a ABCG2 (breast cancer resistance protein), na něž je tato práce zaměřena (Choi & Yu, 2014; Housman et al., 2014; Liu, 2019).

Jednotlivé transportéry jsou exprimované v mnoha tkáních lidského organismu, kde plní rozličné fyziologické funkce, nicméně v nádorové tkáni může jejich zvýšená exprese zásadně ovlivnit průběh protinádorové léčby. Celá řada konvenčních cytostatik patří mezi substráty transportérů ABCB1, ABCC1 a ABCG2. Právě jejich overexprese v nádorových buňkách je spojována se sníženou účinností cytostatik a v důsledku toho i s nedosahováním stanovených cílů a selháním terapie (Housman et al., 2014; Ward et al., 2021). Tato práce se zabývá změnami antiproliferačního účinku sedmi zvolených konvenčních cytostatik v přítomnosti overexprimovaných ABC transportérů zmíněných dříve. Role oběti těchto cytostatik byla naznačena již dříve, nicméně se studie

ve svých výsledcích často neshodují, ať už jde o úroveň rezistence či substrátovou specifitu. Dalším problémem je to, že se některá léčiva nemusí chovat dle sigmoidální dose-response kinetiky, což znemožňuje analýzu kombinačního efektu metodou Chou-Talalay. Cytostatika vybraná pro tuto práci jsou užívána v léčbě nemalobuněčného karcinomu, což je indikace, které se aktuálně věnuje pracovní skupina mého školitele. Podrobný popis chování vybraných léčiv v modelech MDCKII a A431 je nenahraditelný pro možnost jejich využití v kombinačních studiích, které odhalují modulační schopnosti nových cílených léčiv. Výsledky tohoto výzkumu tak budou sloužit jako odrazový můstek pro velké množství navazujících studií.

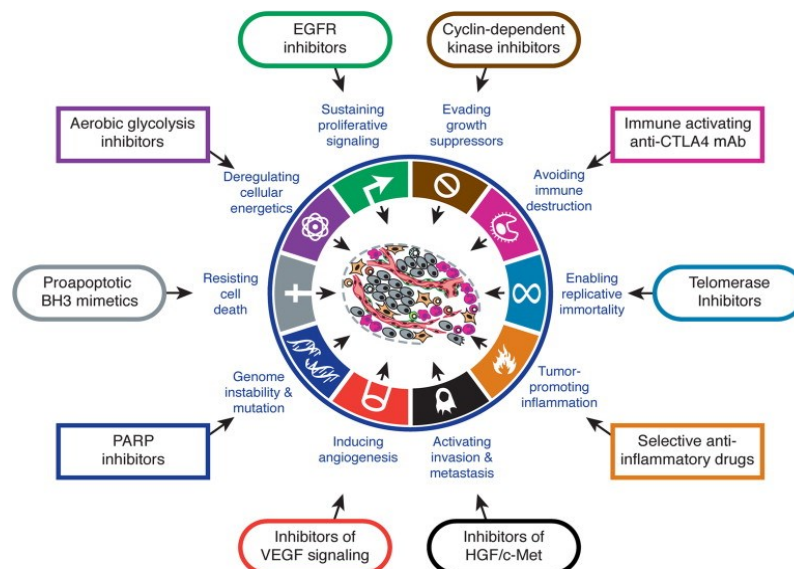
Rodina ABC efluxních transportérů je předmětem velkého množství studií, zabývajících se nejen jejich strukturou a mechanismem transportu, ale také jejich rolí ve vzniku MDR. Avšak neméně důležité jsou studie věnující se hledání způsobu modulace MDR zprostředkované těmito transportéry. V dnešní době jsou zkoumány nové cesty, jak eliminovat zvýšený eflux protinádorových léčiv, a to např. pomocí tzv. drug delivery systems či monoklonálních protilátek. Nicméně základním principem je inhibice těchto transportérů, a proto je neustále vyvíjena snaha nalézt molekuly, které by mohly být použity jako inhibitory efluxu protinádorových léčiv (Assaraf et al., 2019; Li et al., 2016). Z toho důvodu je součástí práce kromě komparativních proliferačních MTT testů i kombinační studie. Jejím cílem bylo ověřit využitelnost získaných výsledků pro kombinaci cytostatik s potenciálními inhibitory ABC efluxních transportérů. V těchto experimentech byla použita tři cílená léčiva jakožto potenciální modulatory a sledovány změny antiproliferačního účinku topotekanu jako oběti rezistence zprostředkované overexpresí ABCG2 transportéru.

3. Teoretická část

3.1 Protinádorová léčba

Nádorová onemocnění se řadí mezi hlavní příčiny úmrtí v každé zemi světa. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou první či druhou nejčastější příčinou smrti ve věku do 70 let ve 112 ze 183 zemí, ve zbylých 23 jsou pak třetí či čtvrtou příčinou. Neustále narůstající incidence a mortalita je důsledkem stárnoucí populace a samozřejmě i řady rizikových faktorů (Sung et al., 2021).

Nádorové onemocnění je charakterizováno nekontrolovanou proliferací tělu vlastních buněk a šířením jejich abnormálních forem v celém organismu. Příčinou tohoto děje jsou genetické a epigenetické změny, které způsobují inaktivaci tumor supresorových genů či aktivaci onkogenů. Rozlišujeme dva typy nádorů, a sice benigní a maligní, přičemž druhý typ je navíc charakteristický svou schopností prorůstat do okolní tkáně, měnit stupeň diferenciacce a metastázovat (Rang Humphrey et al., 2016). Zdravé buňky pečlivě kontrolují celý svůj buněčný cyklus pomocí produkce a uvolňování růstových faktorů, zatímco u nádorových buněk dochází k deregulaci těchto procesů. Kromě schopnosti unikat buněčné smrti a faktorům potlačujícím proliferaci mají nádory několik dalších vlastností, které jim umožňují jejich neustálý růst. Tyto vlastnosti se stávají cílem terapie, jak je znázorněno na **Obr. 1** (Hanahan & Weinberg, 2011).



Obrázek 1: Cílená léčba a charakteristické znaky nádorů. Známé znaky nádorů, jako např. indukce angiogeneze, vyhybání se imunitní reakci, genové mutace a další znázorněné se stávají obětí cílené léčby. Převzato z: (Hanahan & Weinberg, 2011).

První poznatky o nádorových onemocněních jsou staré několik tisíciletí. Nejstarší dochovaný případ nádoru prsu pochází ze starověkého Egypta z roku 1500 př.n.l., pojmenováním a popisem nádorových onemocnění se zabýval starověký řecký lékař Hippokrates. Již v této době byla snaha o vyléčení nádorových onemocnění pomocí chirurgických zákroků. Po mnoho staletí šlo o jedinou dostupnou terapii. S rozvojem vědy v 19. a 20. století byly objeveny nové diagnostické i terapeutické postupy, konkrétně radioterapie, chemoterapie a hormonální terapie, které se dnes často kombinují. V posledních desetiletích věda pracuje na rozvoji imunoterapie a cílené léčby, ale také na zdokonalení již známých terapeutických postupů (Faguet, 2015; Sudhakar, 2009).

3.1.1 Konvenční léčba

V současné době tvoří základ terapie chirurgická léčba, radioterapie a protinádorová léčba neboli chemoterapie. Podstatou konvenční léčby je užití cytostatik, jejichž cílem je inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy nádorových buněk (Švihovec Jan, 2018).

Vzhledem k neselektivnímu systémovému působení těchto látek dochází k poškození všech ostatních proliferujících buněk, z čehož vyplývají mnohé nežádoucí účinky této terapie. Jsou jimi toxické působení na kostní dřeň, snížená produkce leukocytů, a tím pádem snížená odolnost vůči infekcím, ztráta vlasů, zhoršené hojení ran, poškození gastrointestinálního epitelu a v neposlední řadě i teratogenita a karcinogenita. Velmi častým jevem spojeným s chemoterapií je nauzea a zvracení, v dnešní době už naštěstí dobře ovlivnitelná profylaktickou antiemetickou farmakoterapií (Rang Humphrey et al., 2016).

Cytostatika cílí na různé fáze buněčného cyklu a jejich místem účinku je buněčná DNA, RNA či jejich metabolismus. Dělíme je na různé typy také podle jejich mechanismu účinku, např. alkylační látky, alkaloidy, cytotoxická antibiotika či antimetabolity (Schirmacher, 2019). Přehled příkladů vybraných skupin cytostatik, jejich mechanismů účinku a konkrétních látek uvádí **Tabulka 1**. V protinádorové léčbě se běžně užívají i glukokortikoidy, u hormon-dependentních nádorů se využívá účinku inhibitorů aromatázy, antiestrogenů a antiandrogenů (Rang Humphrey et al., 2016).

Tabulka 1: Přehled některých skupin cytostatik včetně mechanismu účinku a příkladů. Cílem konvenční protinádorové terapie jsou různé fáze buněčného cyklu. Jednotlivé skupiny cílí na DNA, RNA či jejich metabolismus. Volně převzato z: (Rang Humphrey et al., 2016).

skupina	mechanismus účinku	příklad
alkylační látky	tvorba kovalentních vazeb s DNA → zabránění replikace	cyklofosfamid, cisplatina, thiotepa
antimetabolity	blokování nebo rozvrat metabolických cest syntézy DNA	methotrexát, fluorouracil, merkaptopurin
cytotoxická antibiotika	interkalace, inhibice syntézy DNA a RNA, fragmentace DNA	doxorubicin, bleomycin, pemetrexed
deriváty alkaloidů, inhibitory topoizomeráz	inhibice topoizomeráz I a II → zlomy v DNA a zabránění replikace	topotekan, irinotekan, etoposid
deriváty alkaloidů, antimitotika	inhibice polymerace nebo depolymerace mikrotubulů → zastavení buň. cyklu, apoptóza	vinblastin, vinkristin, paklitaxel, docetaxel

3.1.2 Cílená léčba a aktuální trendy ve vývoji protinádorových léčiv

Jak bylo popsáno v minulé kapitole, konvenční chemoterapie postihuje inhibicí proliferace a indukci apoptózy nejen nádorové buňky, ale též všechny rychle proliferující buňky v celém těle, z čehož vyplývá řada závažných nežádoucích účinků. Oproti tomu by cílená léčba měla být efektivnější a méně toxická. Základním principem je specifické působení na jednotlivé signální proteiny či signální dráhy typické pro nádory, např. zablokování konkrétní signální dráhy spojené s karcinogenezí, dále úprava funkce proteinů, které ovlivňují genovou expresi nebo blokování specifických enzymů a růstových faktorů (Joo et al., 2013; Rang Humphrey et al., 2016).

Díky objevu onkogenů, tumor supresorových genů a také sekvenování lidského genomu se podařilo detailněji porozumět molekulárním mechanismům, které vedou k rozvoji nádorových onemocnění. Přestože se tyto objevy odehrály až v posledních dvaceti letech, první užívaná cílená terapie je známá již od 40. let minulého století, kdy se začal užívat radioaktivní jód pro léčbu nádorů štítné žlázy. Dalším známým příkladem je použití tamoxifenu v léčbě ER-pozitivního karcinomu prsu v 70. letech. Vazbou na estrogenové receptory zabraňuje estrogenu stimulovat růst nádorových buněk (Joo et al., 2013; Yan et al., 2011). Nová léčiva můžeme kategorizovat na základě různých kritérií – jedním z nich je rozdělení dle působení na různé úrovně signálních drah (ligand, receptor, přenašeč či transkripční faktor). Dalším způsobem je rozdělení dle samotného účinku cílené léčby, kdy míříme proti nádorovým buňkám nebo proti faktorům mikroprostředí nádorové tkáně, jako jsou např. inhibice invazivity, neovaskularizace a metastázování. Dvě hlavní kategorie tvoří tzv. malé molekuly a monoklonální protilátky. Malé molekuly mohou penetrovat do buněk a zde ovlivňovat mnohé signální dráhy, většinou jde o inhibitory tyrozinkináz. Monoklonální protilátky se vážou na specifické cíle vně buněk. Jsou jimi např. ligandy a extracelulární domény receptorů signálních drah. Mimo jiné se mohou využít i jako nosiče dalších léčiv (tzv. drug delivery systems), konjugáty s radionuklidy či toxiny, případně pro imunomodulaci (blokáda inhibičních molekul a stimulace kostimulačních faktorů) (Joo et al., 2013; Švihovec Jan, 2018).

Velký rozvoj zaznamenala v posledních letech i imunoterapie, neboť imunitní systém hraje důležitou roli v patofyziologii nádorů. Velkým přínosem byl vývoj monoklonálních protilátek, které cílí na regulační receptory, např. CTLA-4 či PD-1. Dalšími přístupy a prostředky imunoterapie jsou protinádorové vakcíny, hematopoetické růstové faktory, interferony a interleukiny (Joo et al., 2013; Santhosh et al., 2015; Švihovec Jan, 2018). Trendem posledních let je genová terapie, která obnáší použití nukleových kyselin k léčbě a prevenci nejen nádorových onemocnění. Podstatou je zejména výměna poškozených či chybějících genů za terapeutické funkční geny s pomocí nástrojů jako jsou virové i neviróvé vektory. Uplatňuje se též změna exprese (potlačení nebo naopak zvýšení) pomocí terapeutických oligonukleotidů a velkou pozornost přitahuje též systém CRISPR-Cas9, který umožňuje libovolně editovat genetickou informaci (Kaufmann et al., 2013). Rozvoj nanomedicíny a teranostatiky umožňuje kombinovat diagnostiku a terapii. Do budoucna to znamená možnost propojit sledování

distribuce a uvolňování léčiv, preventivní screening a personalizovanou terapii (Lammers et al., 2011).

Ve vývoji protinádorové léčby je mnohem více strategií, nicméně jejich vyjmenování a popis je nad rámec rozsahu této diplomové práce. Kromě vývoje nových postupů je velmi zásadní i neustálé prohlubování znalostí o patofyziologii nádorů a také zdokonalování již známých terapeutických postupů, které se zaměřuje především na zvýšení účinnosti, přesnosti, a především omezení výskytu závažných nežádoucích účinků.

3.2 Rezistence vůči protinádorové farmakoterapii

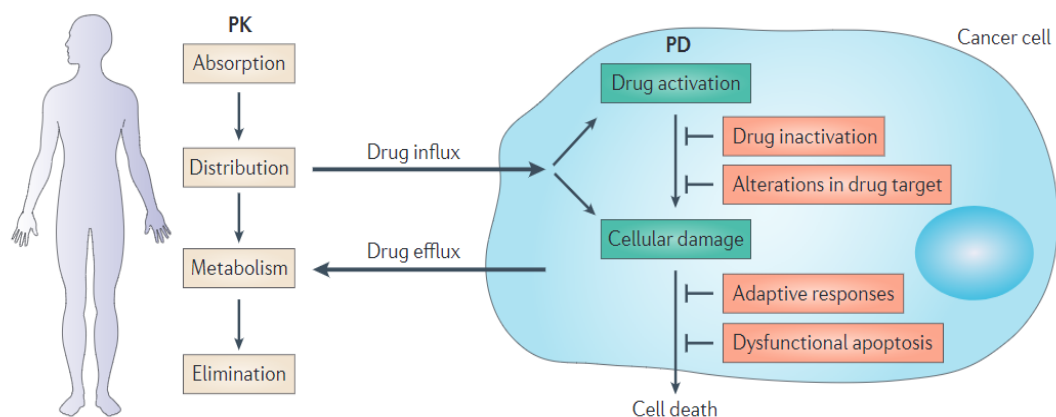
Jednou ze zásadních překážek úspěšné léčby nádorových onemocnění je rezistence vůči protinádorové terapii. V mnoha případech se u prvotně účinné chemoterapie dříve či později objevuje ztráta účinku, která vede k opětovnému růstu nádoru a zhoršení prognózy (Holohan et al., 2013; Luqmani, 2005). V případě užití pouze jedné účinné látky je vznik rezistence velmi častý, a proto se v terapii užívají kombinace různých léčiv, které mají odlišné mechanismy účinku. Mechanizmy rezistence týkající se konvenčních cytostatik i cílené terapie sdílí mnoho podobných rysů, jako např. změny cílových struktur a zabránění indukce buněčné smrti (Holohan et al., 2013). Rezistence tedy hrozí i v případě kombinace léčiv, jinými slovy jde o tzv. mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR). Proto je v dnešní době zásadní osvětlit mechanismy simultánní rezistence na různá léčiva, která mají odlišné mechanismy účinku a chemické struktury (Szakács et al., 2006).

3.2.1 Obecná charakteristika

U některých pacientů dochází ke ztrátě účinku léčby až v průběhu terapie, v tom případě jde o rezistenci získanou. Důvodem pro ztrátu citlivosti na danou léčbu nádoru mohou být mutace a také další adaptační děje, jako je kupříkladu zvýšená exprese cílové struktury léčiva a aktivace náhradních kompenzačních signálních drah. Druhým základním typem je rezistence vnitřní, která existuje již před zahájením terapie (Haider et al., 2020; Rang Humphrey et al., 2016). Je známo mnoho mechanismů MDR, některými z nich jsou následující vyjmenované (Rang Humphrey et al., 2016):

- snížená akumulace cytotoxických látek v nádorových buňkách v důsledku zvýšené exprese transportních proteinů (doxorubicin, vinblastin, daktinomycin)
- nedostatečná aktivace účinné látky (cytarabin, merkaptopurin)
- změna v aktivitě cíle terapie, např. modifikace topoizomerázy II (doxorubicin)
- zrychlení obnovy lékem poškozené DNA (alkylační látky)
- zvýšení koncentrace enzymu, který je cílem účinné látky (methotrexát)

Na problematiku MDR v léčbě nádorů můžeme nahlížet dvěma způsoby, a sice z hlediska farmakodynamiky a farmakokinetiky. Zjednodušené schéma a rozlišení představuje **Obrázek 2**.



Obrázek 2: Základní principy lékové rezistence. Farmakokinetické faktory (PK) jako absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace mají vliv na množství systémově podávaného léčiva, které dosáhne nádoru. Zásadní vliv mají i influxní a efluxní transportéry samotných buněk. Účinky samotného léčiva v nádoru pak označujeme jako farmakodynamické (PD) procesy. Protinádorový účinek léčiv může být omezen kvůli inaktivaci nebo nedostatečné aktivaci léčiv; adaptačním změnám v podobě zvýšené exprese cílové struktury či nefunkční apoptóze, což je jedna ze základních charakteristik nádorů. Převzato z: (Holohan et al., 2013).

Jedním z nejvíce studovaných mechanismů zahrnuje snížení akumulace léčiva v důsledku zvýšení efluxu. Děje se tak pomocí overexpresy membránových efluxních transportérů. Ty hrají důležitou roli v předcházení akumulace toxinů v buňkách, proto jsou typické pro epitel jater a střev nebo pro hematoencefalickou bariéru, zároveň jsou i důvodem vzniku lékové rezistence u nádorových buněk (Housman et al., 2014). Na jejím vzniku se nejvíce podílí nadrodina ATP-binding cassette (ABC) efluxních transportérů, kterým se detailněji věnují následující kapitoly.

3.2.2 Role ABC efluxních lékových transportérů

MDR je jednou z hlavních příčin selhání protinádorové léčby. Velmi důležitou roli v tomto procesu hrají membránové transportéry, které jsou z fyziologického hlediska esenciální pro správnou funkci organismu. Největší skupinou je nadrodina ATP-binding cassette (ABC) transportérů. Po navázání ATP využívají energii k transportu mnoha různých molekul včetně sacharidů, aminokyselin, peptidů, proteinů ale i xenobiotik (Amawi et al., 2019). Dodnes bylo popsáno již 49 podtypů ABC transportérů, jež jsou dále rozděleny do 7 podskupin (ABCA až ABCG) na základě jejich genové struktury, sekvence aminokyselin, organizace domén a fylogenetické analýzy. ABC transportéry jsou exprimovány ve tkáních ledvin, jater, střev a mozku, kde hrají důležitou roli v absorpci, distribuci a exkreci léčiv. Dalším místem exprese těchto transportérů je nádorová tkáň, ve které se pak podílejí na vzniku MDR zprostředkováním efluxu protinádorových léčiv, ale i dalších molekul (Amawi et al., 2019; Li et al., 2016).

Typický ABC transportér se skládá ze dvou odlišných struktur, konkrétně transmembránové domény (TMD) a domény vázající nukleotid (NBD). Pro transport substrátů přes membránu je potřeba navázání ATP jako zdroje energie na hydrofobní NBD, která se nachází na straně cytoplazmy. TMD prochází buněčnou membránou a tvoří v ní kanály pro transport látek. Díky strukturní různorodosti a konformačním změnám TMD umožňují rozeznávání a transport široké škály substrátů. Proces je spuštěn navázáním substrátu, dále následuje navázání ATP. To indukuje dimerizaci NBD a hydrolýzu ATP, což poskytuje energii pro uskutečnění celého děje (Choi & Yu, 2014).

Chemoterapeutické léky se do/z buněk nejčastěji dostávají pasivní difuzí, ale řada z nich využívá též aktivní transport či facilitovanou difuzi. Příčinou selhávající léčby u onkologických pacientů bývá často nadměrná exprese některých ABC transportérů, která vede ke snížení akumulace protinádorového léčiva v buňce. Prvním ABC transportérem, u kterého byla objevena spojitost s MDR, je P-glykoprotein (ABCB1). Dalšími jsou multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) a breast cancer resistance protein (ABCG2) (Li et al., 2016; Sui et al., 2012). Jednou z možností, jak překonat MDR způsobenou těmito transportéry, je použití jejich inhibitorů, které by umožnily zvýšit citlivost nádorových buněk vůči působení protinádorových léčiv. Snaha najít tyto inhibitory trvá už několik desítek let. Nicméně i přes úspěšné výsledky klinických studií nebyly dosud vyvinuty a schváleny inhibitory, které by zajišťovaly dostatečný účinek protinádorové léčby bez nadměrných toxických

účinků (Choi & Yu, 2014). Přehled některých substrátů a také zkoumaných inhibitorů těchto ABC transportérů uvádějí **Tabulka 2** a **Tabulka 3**. Podrobnější popis jmenovaných transportérů včetně jejich role v MDR je v následujících kapitolách.

Tabulka 2: Přehled substrátů vybraných ABC transportérů. Mnoho protinádorových léčiv se stává obětí overexprese efluxních transportérů, což vede k selhání terapie nádorových onemocnění. Převzato z: (Choi & Yu, 2014).

	substráty – protinádorová léčiva
ABCB1	doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, kolchicin, etoposid, teniposid, methotrexát, paklitaxel, mitoxantron, docetaxel, vinblastin, vinkristin
ABCC1	doxorubicin, daunorubicin, kolchicin, topotekan, irinotekan, SN-38, methotrexát, etoposid, teniposid, vinkristin, vinblastin, imatinib, gefitinib
ABCG2	doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, methotrexát, SN-38, topotekan, irinotekan, etoposid, teniposid, imatinib, gefitinib

*Tabulka 3: Vybrané inhibitory ABC transportérů, které byly testovány jako chemosenzitivizéry. Pozn.: * inhibitory první generace, ** inhibitory druhé generace, *** inhibitory třetí generace. Převzato z: (Choi & Yu, 2014).*

	inhibitory
ABCB1	verapamil, cyklosporin A, vinkristin, reserpin, tamoxifen * (R)-verapamil, valsopodar (PSC-833), dexniguldipine, dofequidar ** tariquidar (XR9576), laniquidar (R101933), mitotane (NSC-38721) ***
ABCC1	cyklosporin, chinidin, chinin, verapamil, VX-710, LY475776, V-104, disulfiram, MK571, tricyklické isoxazoly
ABCG2	cyklosporin, VX-710, GF120918, XR-9576, fumitremorgin C

3.2.2.1 P-glykoprotein

P-glykoprotein (ABCB1), jinak také známý pod pojmem multidrug resistance protein 1 (MDR1), má přibližně 170 kDa a je jedním z nejvíce studovaných efluxních transportérů. ABCB1 je produktem *ABCB1* genu a je součástí hematoencefalické bariéry, mukózní membrány střev, apikální membrány hepatocytů a epitelu proximálního kanálku v ledvinách. V hematoencefalické bariéře má důležitou funkci v omezování vstupu různých xenobiotik do centrálního nervového systému. Dále také hraje roli v omezení absorpce ve střevech či urychlení eliminace xenobiotik ledvinami. Úroveň exprese a aktivity ABCB1 může být regulována inhibicí a indukci, což může následně ovlivnit množství substrátů v daných tkáních, jejich účinnost anebo bezpečnost (Choi & Yu, 2014; International Transporter Consortium et al., 2010; Liu, 2019).

Mezi substráty ABCB1 patří lipofilní sloučeniny, sloučeniny s aromatickými kruhy a s kladným nábojem při fyziologickém pH. Jde tedy o efluxní transportér, který je schopný transportovat širokou škálu xenobiotik, včetně cytostatik (např. kolchicin, doxorubicin, vinblastin), inhibitorů HIV-proteázy, analgetik, antihistaminik, imunosupresiv, antiarytmik a dalších. Navíc je důležitý pro transport mnoha endogenních sloučenin, jako jsou steroidní hormony, lipidy, peptidy a cytokiny (Choi & Yu, 2014; Liu, 2019). Mimo jeho velmi důležité eliminační funkce v organismu je ABCB1 také dobře známý jako jeden z efluxních transportérů způsobujících vznik MDR. Jeho nadměrná exprese je spojována se selháním terapie u nádoru ledvin, jater, střev a také u lymfomu a leukémie (Fletcher et al., 2010).

Díky velké flexibilitě místa vázacího substráty je umožněno současné navázání různých molekul. Tato skutečnost umožňuje využít některé sloučeniny jako inhibitory transportu substrátů ABCB1. Takové inhibitory by měly inhibovat funkci ABCB1 prostřednictvím přerušování hydrolyzy ATP, dále pomocí změn v expresi *ABCB1* nebo díky reverzibilní či ireverzibilní kompetici o vazebné místo. Poslední jmenovaný způsob patří mezi nejčastější mechanismus, který je typický pro klasické inhibitory ABCB1. Mnoho z nich, např. verapamil, chinidin a cyklosporin A, jsou samy o sobě zároveň substráty ABCB1, což naznačuje, že působí právě jako kompetitivní inhibitory. Některé z inhibitorů jsou transportovány velmi slabě, a proto se předpokládá, že mají jiný mechanismus inhibice (Li et al., 2016; Liu, 2019).

Inhibitory ABCB1 jsou děleny do třech generací na základě jejich specifity, afinity a toxicity. V první generaci můžeme nalézt skupinu sloučenin, které jsou rovněž substráty i inhibitory ABCB1. Jde o poměrně slabé inhibitory, proto je potřeba použití vysoké koncentrace pro dostatečnou inhibici. Další nevýhodou je jejich vlastní farmakologický účinek, který může být velmi často příčinou nežádoucích účinků. Kombinace s protinádorovými léčivými vedla k toxickým vedlejším účinkům a prokázala pouze omezené nebo žádné benefity. Proto nejsou inhibitory první generace, např. verapamil a cyklosporin A, vhodné pro užití ve formě inhibitoru v klinické praxi (Choi & Yu, 2014; Liu, 2019).

Druhá generace ABCB1 inhibitorů obsahuje sloučeniny bez terapeutického účinku, např. valsopodar a dexniguldipin. Mají větší afinitu k ABCB1 ve srovnání s první generací. Valsopodar je velmi účinný inhibitor ABCB1, nicméně také inhibuje CYP3A4. To vede k nežádoucím farmakokinetickým interakcím, které se objevují i v případě dalších kombinací inhibitorů druhé generace s protinádorovou léčbou. Cíleně vyvíjené inhibitory třetí generace prokazují vyšší specifitu, nízkou toxicitu a také méně farmakokinetických interakcí. Přestože mnoho *in vivo* studií prokázalo zvýšení senzitivity buněk vůči antiproliferačnímu účinku protinádorových léčiv, v klinických studiích se toto zlepšení neprojevilo (Choi & Yu, 2014; Liu, 2019).

Existuje mnoho různých důvodů, proč všechny generace inhibitorů v klinických studiích selhávají. Můžou jimi být např.: a) nespecifická toxicita; b) vysoká variabilita odpovědi na inhibitor ABCB1 spojená s nedostatečnou úrovní exprese ABCB1 a aktivitou dalších ABC transportérů a c) interakce mezi substráty a inhibitory ABCB1. Dalším problémem může být i zvýšená toxicita současně podávaného léčiva v důsledku inhibice ABCB1 ve zdravé tkáni. Víra v překonání MDR pomocí inhibice ABC transportérů je stále i přes tyto komplikace velmi silná. Proto je stále potřeba identifikovat nové, efektivnější a méně toxické inhibitory neprojevující systémové lékové interakce (Choi & Yu, 2014; Liu, 2019).

3.2.2.2 Breast cancer resistance protein

Breast cancer resistance protein (ABCG2) je atypický poloviční ABC transportér s molekulovou hmotností 72 kDa, jinak také známý pod názvem mitoxantrone resistance-associated protein (MXR). Skládá se z 655 aminokyselin a dvou transmembránových domén. Byl poprvé identifikován v buněčné prsní linii MCF-7 vysoce rezistentní na doxorubicin (Choi & Yu, 2014; Liu, 2019). ABCG2 je exprimován v gastrointestinálním traktu, ledvinách, játrech, endotelu mozku, tkáni prsu, varlat a v placentě. V mnoha tkáních je exprimován současně s ABCB1, proto se předpokládá, že mají v organismu oba tyto transportéry důležitou farmakologickou a toxikologickou protektivní funkci. Role ABCG2 zahrnuje dohled nad transportem substrátů přes placentu, hematoencefalickou a hematotestikulární bariéru. Dále se ABCG2 podílí na efluxu porfyrinů z hematopoetických buněk a hepatocytů a také na sekreci vitamínu B₂ do mateřského mléka. ABCG2 je dalším transportérem spojeným s MDR, konkrétně u nádorů prsu a leukémií (Fletcher et al., 2010; International Transporter Consortium et al., 2010; Liu, 2019).

ABCG2 je aktivním transportérem mnoha endogenních i exogenních látek, mezi které můžeme řadit sulfátové konjugáty, taxany, karcinogeny a porfyriny. Důležitou strukturou, která se objevuje u mnoha substrátů, je amin vázaný na uhlík heterocyklu anebo kondenzované heterocykly. Takové struktury mají často tyrosinkinázové inhibitory (TKIs), např. imatimib (International Transporter Consortium et al., 2010). Substráty ABCG2, které byly identifikovány přímo buněčnými, vezikulárními transportními či cytotoxickými testy, zahrnují např. sulfátové a glukuronidové konjugáty sterolů a xenobiotik, přírodní sloučeniny, toxiny a široké spektrum protinádorových léčiv. Mezi známé oběti overexprese ABCG2 patří mitoxantron, topotekan a SN-38, zatímco vinkristin, paklitaxel a cisplatina nikoli (International Transporter Consortium et al., 2010; Liu, 2019).

V několika studiích bylo prokázáno, že výskyt ABCG2 je spojený se špatným průběhem nádorových onemocnění a že jeho exprese může být jedním z prognostických faktorů pro některé typy nádorů. U ABCG2-pozitivních nádorů byla míra odpovědi na chemoterapii nižší (24 %) než u ABCG2-negativních nádorů (44 %). Další skutečností je významně kratší doba přežití bez progresu a celkové přežití pacientů s ABCG2-pozitivním nádorem (Liu, 2019). Expres ABCG2 může být také alternativní strategií při nedostatku ABCB1 a ABCC transportérů u nádorových buněk (Alfarouk et al., 2015).

Stejně jako u ABCB1 je snaha nalézt sloučeniny, které by mohly ovlivňovat aktivitu a/nebo expresi ABCG2. Jejich společnými inhibitory jsou elacridar, cyklosporin A, reserpin a valspodar. Specifickým inhibitorem ABCG2 je mykotoxin fumitremorgin C (FTC), který nelze využít v klinické praxi kvůli neurotoxicitě. Proto byla připravena série analogů FTC, přičemž dva z analogů (Ko132 a Ko134) prokázaly stejnou či dokonce vyšší aktivitu než FTC. Několik TKIs, např. gefitinib, imatinib mesylát, nilotinib, erlotinib a sunitinib, prokázalo schopnost ovlivnit vznik MDR způsobené overexpresí ABCG2. TKIs jsou zároveň i substráty, což naznačuje, že by mohlo jít o kompetitivní inhibitory ABCG2 (Liu, 2019).

3.2.2.3 Multidrug resistance-associated protein 1

Zkráceně nazývaný ABCC1 byl identifikován na základě nadměrné exprese v buněčné linii odvozené od multirezistentního nádoru plic. Tento transportér s molekulovou hmotností 190 kDa se skládá z 1531 aminokyselin a má dvě NBD a tři TMD. ABCC1 je velmi často detekován v nádorových vzorcích od pacientů. V současnosti je ABCC1 považován za klinicky nejrelevantnější transportér z rodiny ABCC s ohledem na lékovou rezistenci u nádorových onemocnění, což je jedna z hlavních překážek úspěšné chemoterapie. Kromě nádorových buněk je exprimován v mnoha tkáních, konkrétně v plicích, varlatech, ledvinách, kosterní svalovině, mozku a mononukleárních buňkách periferní krve. Velmi málo je naopak exprimován v játrech. Výsledkem činnosti ABCC1 je transport substrátů do krve, což potvrzuje jeho důležitou roli v ochraně tkání (Alfarouk et al., 2015; Liu, 2019).

Stejně jako ABCB1 je ABCC1 příčinou vzniku rezistence u mnoha chemoterapeutických léčiv, např. methotrexátu, etoposidu, teniposidu, vinkristinu, vinblastinu, doxorubicinu a topotekanu. Substráty ABCC1 zahrnují různé hydrofobní sloučeniny, organické aniontové sloučeniny a aniontové nekonjugované látky. Kromě chemoterapeutik, antivirotik, některých fluorescenčních látek a toxinů transportuje také endogenní sloučeniny včetně volného glutathionu či sulfátových konjugátů. (Choi & Yu, 2014; Liu, 2019). Společnou charakteristikou ABCB1, ABCG2 a ABCC1 je jejich schopnost snižovat intracelulární hladiny léčiv a závislost na energii získané z ATP. ABCC1 navíc pro eflux xenobiotik vyžaduje glutathion (Alfarouk et al., 2015).

Je potvrzeno, že ABCC1 hraje důležitou roli jak v lidském zdraví, tak i v průběhu nemocí. Zprostředkovává transport mnoha antineoplastických látek, z čehož vyplývá jeho účast na vzniku MDR u nádorových onemocnění. ABCC1 je spojován s MDR u nádoru prostaty, plic a prsu, stejně jako u dětského neuroblastomu, akutní myeloidní leukémie a akutní lymfoblastické leukémie. U většiny z těchto nemocí je ABCC1 prognostickým indikátorem a je spojován se špatnými klinickými výsledky léčby. Prozatím nedošlo k vývoji dostatečně účinných a bezpečných inhibitorů, přestože jich bylo popsáno už mnoho. Mezi zkoumané inhibitory patří MK571, S-decylglutathion, sulfinpyrazon, benzbromaron a probenecid. Většina z nich se jen velmi těžko dostává do buněk, a proto je obtížné dosáhnout dostatečné intracelulární koncentrace pro efektivní inhibici. Některé ze známých inhibitorů ABCB1 (cyklosporin A, PSC 833) inhibují zároveň i ABCC1. Nicméně je jejich afinita a specifita příliš nízká, značně ovlivňují funkce jiných transportérů a musí se používat v relativně vysokých koncentracích, a proto nejsou vhodné pro využití v *in vivo* studiích (Fletcher et al., 2010; Liu, 2019).

4. Cíle práce

Cílem této práce bylo prozkoumat vliv overexprese ABC efluxních transportérů (ABCB1, ABCC1, ABCG2) na antiproliferační účinek vybraných konvenčních cytostatik (docetaxel, paklitaxel, etoposid, methotrexát, pemetrexed, topotekan a vinblastin) v buněčných modelech MDCKII a A431. Dalším cílem bylo prozkoumat kombinační efekt potenciálních rezistenčních modulátorů (kapmatinib, pralsetinib, tazemetostat) s potvrzenou obětí MDR (topotekan) v MDCKII buňkách parentních a transdukovaných ABCG2.

5. Experimentální část

5.1 Materiál a metody

5.1.1 Chemikálie

- Kapmatinib (Cap), Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
- Docetaxel, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma-Aldrich, (St Louis, MO, USA)
- Etoposid, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakousko)
- Fosfátový pufr (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Methotrexát, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Methylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid (MTT) Cell Growth Assay Kit, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Paklitaxel, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Pemetrexed, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Pralsetinib (Pra), Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Opti-MEM®, Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Topotekan (Topo), MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Tazemetostat (Taze), MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Trypsin, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Vinblastin, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)

5.1.2 Přístroje

- Optický mikroskop, Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Itálie)
- Laboratorní váhy Kern 770 (Ziegelei, Balingen, Německo)
- Inkubátor, SANYO MCO 18-AC (UV) (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Tecan microplate reader, Tecan Infinite M200 Pro (Salzburg, Rakousko)

5.1.3 Buněčné linie

Pro experimenty v této práci byla použita buněčná linie MDCKII (Madin-Darby canine kidney). Nejdříve byly MDCKI buňky využívány při studiu virových infekcí. Až na přelomu 70. a 80. let začaly být velmi široce využívány jako modelové buňky při studiu epitelu. Hlavním důvodem jsou dobře známé vlastnosti, jako např. přesně definované buněčné spoje (tzv. tight junctions), jasná apiko-bazolaterální polarita a rychlý růst. V práci byly využity specifické vlastnosti subtypu MDCKII, který je jedním z nejvyužívanějších. Buňky subtypu II se získávají z vyšších parentních pasáží, v porovnání s MDCKI buňkami jsou větší a delší (Dukes et al., 2011). Kromě parentních MDCKII buněk byly využity i buňky transdukované lidskými ABC lékovými efluxními transportéry, konkrétně MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC1. Buňky používané v experimentech byly získány od Dr. Alfreda Schinkela (The Netherlands Cancer Institute – Antoni van Leeuwenhoek hospital, Amsterdam, Nizozemí).

Pro porovnání a ověření chování vybraných léčiv v lidských buňkách byla v experimentech použita i lidská nádorová buněčná linie A431. Charakteristická je svou vysokou mírou proliferace a nízkou diferenciací (Bortolomai et al., 2010). I v tomto případě byly využity buňky jak parentní, tak s overexpresí ABCB1, ABCG2 a ABCC1 poskytnuté prof. Balaszem Sarkadim (Hungarian Academy of Sciences, Budapešť, Maďarsko).

5.1.4 Komparativní proliferační MTT testy

V rámci komparativních proliferačních studií bylo zkoumáno několik konvenčních cytostatik. Konkrétně byly vybrány vinblastin, topotekan, etoposid, methotrexát, pemetrexed, paklitaxel a docetaxel. Nejdříve byla prověřována cytotoxicita daných látek u parentních a transdukovaných MDCKII buněk. Následně se pro porovnání a ověření získaných pozitivních výsledků testovaly antiproliferační účinky i na lidské nádorové buněčné linii A431, opět na parentní a transdukovaných subliniích.

Cytotoxicita vybraných konvenčních léčiv byla zjišťována pomocí MTT (methylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid) testu, který slouží k určení životaschopnosti buněk po expozici toxickým látkám. Principem je konverze žluté tetrazoliové soli MTT na fialové krystalky formazanu pomocí dehydrogenázové aktivity v mitochondriích

živých buněk. Formazan je pro buněčné membrány nepropustný, a proto se v buňkách kumuluje. Po dostatečné disoluci krystalů formazanu je možné provést měření změny absorbance vzorků pomocí spektrofotometru (Fotakis & Timbrell, 2006).

Celý proces se skládal z několika navazujících kroků, a to pasážování, nasazení buněk jednotlivých linií do 96-jamkových destiček, jejich kultivace při expozici danému léčivu a následně provedení samotného MTT testu. Pomocí spektrofotometru byla naměřena absorbance a na základě její změny bylo možné rozlišit živé a mrtvé buňky.

Kultivace a pasážování buněk

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích v roztoku DMEM s 10 % fetálního bovinního séra (FBS) o objemu 7 ml/20 ml podle velikosti lahve. První den experimentu se z kultivační lahve odebralo všechno médium. Poté se buňky opláchly pomocí 5 ml/8 ml fosfátového pufru (PBS) a následně se přidalo 1 ml/3 ml trypsinu. S ním byly buňky umístěny na 5-10 min do inkubátoru. Pro zastavení působení trypsinu se do lahve přidalo 5 ml/10 ml média. Celý objem byl potom pomocí pipety odebrán do sterilní zkumavky. Z ní se pak část odebrala pro počítání buněk a nasazení do 96-jamkových buněk pro experimenty. Zároveň byla část objemu použita pro kultivaci v nových kultivačních lahvích pro další experimenty. Kultivace probíhala při 37 °C a 5 % CO₂.

Nasazení suspenze buněk

Při dosažení 80% konfluency po pasážování se odebrala všechna suspenze z kultivační lahve do sterilní zkumavky. Před každým novým nasazením bylo vypočítáno množství buněk v zásobní suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky. Pro provedení výpočtu byly připravovány dva roztoky v mikrozkušnicích. Do mikrozkušnice s prvním roztokem bylo přidáno 0,25 µl zásobní suspenze buněk a 0,75 µl média. Ve druhé zkumavce bylo 50 µl prvního roztoku naředěno 50 µl 4% roztoku trypan blue v PBS.

Z druhé zkumavky bylo odebráno 10 µl pomocí pipety a přidalo se do jedné poloviny Bürkerovy komůrky. Při počítání byla využívána celá plocha, tedy všech 9 čtverců. Započítávány byly pouze buňky nacházející se u střední linky horní a levé strany čtverce. Do následujícího výpočtu se nezapočítávala nejnižší a nejvyšší hodnota, celkem šlo tedy o 7 hodnot. Přesný objem suspenze pro nasazení do 96-jamkových destiček se zjišťovala pomocí dvou výpočtů.

Nejdříve byl zjištěn ředící faktor pomocí vzorce:

$$\frac{x}{7} \times 10^4 \times a \times b \times \frac{1}{c}$$

x = celkový počet buněk; a = ředící faktor 1. roztoku; b = ředící faktor 2. roztoku; c = požadovaný počet buněk na 1 ml

Pro celou 96-jamkovou destičku při objemu 100 μ l na jamku je potřeba 9,6 ml suspenze, nicméně pro rezervu bylo používáno vždy o 2 ml více, celkem tedy 11,6 ml. Objem zásobní suspenze se pak získal jako podíl celkového objemu a ředícího faktoru, např.:

$$11,6 \div 8 = 1,45 \text{ ml zásobní suspenze}$$

$$11,6 - 1,45 = 10,15 \text{ ml média}$$

Vzniklá suspenze byla potom použita pro nasazení buněk v množství 17 000 buněk/jamku/100 μ l pro buněčné linie MDCKII a 20 000 buněk/jamku/100 μ l pro buněčné linie A431.

Kultivace a expozice vybraných léčiv

Po nasazení buněk do destiček probíhala 24-hodinová inkubace za podmínek zmíněných výše. Druhý den experimentu byly ve sterilním prostředí připraveny roztoky zkoumaných léčiv v několika koncentracích. V prvních experimentech byly zkoumány roztoky cytostatik v koncentracích 0,01 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M a 25 μ M. V následujících opakováních byly použity širší rozmezí koncentrací dle pozorovaného antiproliferačního účinku. Před aplikací jednotlivých roztoků léčiv (100 μ l) se z destiček odsálo staré médium. Kromě nich byly do několika jamek přidány roztok samotného média a 40% roztok DMSO jako kontrolní roztoky zastupující 100%, resp. 0% životaschopnost. Následovala 48-hodinová inkubace.

MTT test

Čtvrtý den experimentu byla prvním krokem příprava roztoku MTT v Opti-MEM v koncentraci 1 mg/ml. Důkladného rozpuštění bylo docíleno pomocí vortexování. Ve sterilním prostředí se z 96-jamkových destiček obsahujících buněčné linie a roztoky cytostatik odsálo všechno médium a následně byly jamky opláchnuty pomocí PBS. Po odsátí PBS bylo přidáno 100 μ l roztoku MTT a poté se nechaly destičky inkubovat 1 hodinu v inkubátoru.

Po skončení inkubace se odsál všechn roztok MTT. Dál byl do každé jamky přidán roztok 100 μ l DMSO, který zajistil lýzu buněk a rozpuštění krystalů formazanu. Tento proces probíhal v inkubátoru po dobu 10 minut. Posledním krokem MTT testu bylo měření absorbance pomocí spektrometru Tecan při vlnové délce 570 nm (MTT) a 690 nm (background).

Výsledná absorbance byla normalizována pomocí programu GraphPad na základě kontrolních hodnot 0 a 100% životaschopnosti. Tímto způsobem bylo možné porovnat životaschopnost buněk u jednotlivých koncentrací léčiv, jinými slovy míru antiproliferačního účinku daných koncentrací cytostatik na všechny testované buněčné linie.

5.1.5 Kombinační studie

Pro kombinační studii bylo použito jedno z léčiv z předchozích komparativních proliferačních MTT testů, u něhož overexprese všech tří zkoumaných transportérů vedla ke statisticky významnému snížení antiproliferační aktivity. Pro tuto studii byly využity buněčné linie MDCKII parentní a transdukovávané ABCG2. Do kombinace k vybranému cytostatiku byly přidány potenciální inhibitory těchto transportérů, a sice pralsetinib, tazemetostat a kapmatinib.

Buněčné linie se nasadily do 96-jamkových destiček v množství 17 000 buněk/jamku/100 μ l. Po 24 hodinové kultivaci se pomocí mikroskopu zkontrolovala konfluence. Poté bylo odebráno médium a přidaly se připravené roztoky s testovanými sloučeninami. Roztoky obsahovaly jednotnou koncentraci jednoho z testovaných inhibitorů a topotekan v několika koncentracích. Koncentrace roztoků topotekanu se v kombinaci s kapmatinibem pohybovaly v rozmezí 0,1 μ M až 75 μ M; s pralsetinibem a tazemetostatem 1,0 μ M až 75 μ M. Roztoky testovaných inhibitorů byly použity v koncentraci 1 μ M (tato koncentrace vykazovala dostatečný inhibiční efekt

na ABCG2 transportér v předchozích studiích a zároveň nebyla toxická na použitých MDCKII liniích). Do destičky byly rovněž přidány dva kontrolní roztoky, a sice samotné médium a 40% roztok DMSO.

Závěrem experimentu byl MTT test (postup viz. výše 5.1.4).

5.1.6 Statistická analýza

Statistická analýza byla vyhotovena pomocí software GraphPad Prism verze 7.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Pro kalkulaci hodnot p byl použit nepárový t -test s Welschovou korekcí. V případě komparativních proliferačních testů byly porovnány hodnoty IC_{50} testovaných cytostatik získané na liniích transdukovaných transportéry s hodnotami IC_{50} z parentní linie. U kombinační studie byly srovnány hodnoty IC_{50} topotekanu s vs. bez modulátorem(u) v příslušné linii. Všechna prezentovaná data prochází z minimálně tří nezávislých opakování.

5.2 Výsledky

V této práci bylo zkoumáno sedm vybraných konvenčních cytostatik a ověřován vliv overexprese ABC efluxních transportérů na jejich antiproliferační aktivitu ve dvou buněčných modelech. Antiproliferační aktivita cytostatik byla zkoumána pomocí MTT testů. Pro potvrzení výsledků z MDCKII buněk, které poukazovaly na roli příslušného cytostatika jakožto oběti MDR, byly provedeny následující experimenty na lidském modelu A431.

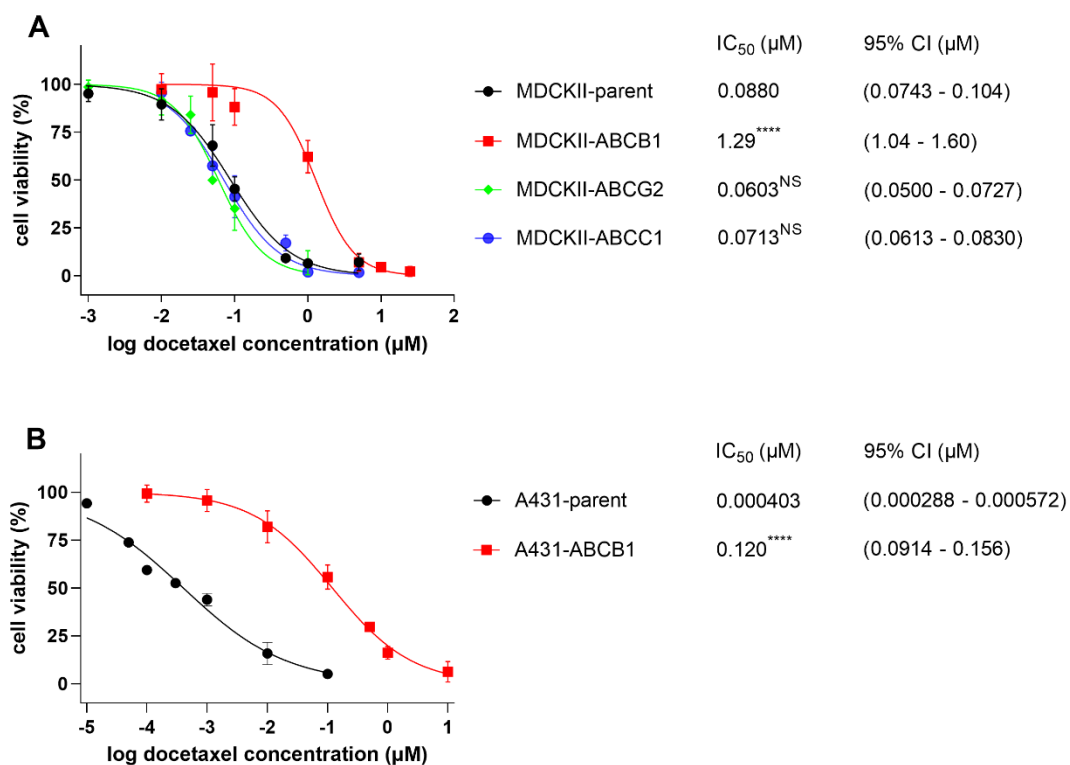
Pro ověření využitelnosti získaných výsledků byl vybrán topotekan jako oběť overexprese ABCG2 pro kombinační studii s potenciálními modulátory MDR (kapmatinib, pralsetinib, tazemetostat).

5.2.1 Komparativní proliferační MTT testy v MDCKII a A431 buňkách

5.2.1.1. Docetaxel

Antiproliferační aktivita docetaxelu byla pozorována na buněčné linii MDCKII v řádu mikro/nanomolárních koncentrací. Přítomnost ABCB1 významně snížila senzitivitu buněk k tomuto cytostatiku. Míra rezistence vyjádřená pomocí resistance ratio (RR) faktoru se v tomto případě rovnala hodnotě 14,6. RR faktor je definován jako poměr IC_{50} cytostatika z linie transdukované příslušným transportérem ku IC_{50} z linie parentní. Na základě získaných dat tedy můžeme předpokládat, že je docetaxel obětí rezistence zprostředkované ABCB1. Při porovnání hodnot IC_{50} u parentních buněk vs. buněk s funkční overexpresí ABCG2 nebo ABC1 transportéru (0,0880 μ M; 0,0603 μ M; 0,0713 μ M) nebyl sledován signifikantní rozdíl. Z dat vyplývá, že tyto transportéry nejsou schopny zprostředkovat rezistenci vůči docetaxelu (**Obr. 3A**).

Předpoklad, že je docetaxel obětí rezistence zprostředkované ABCB1, byl ověřen i na buněčné linii A431. Vliv přítomnosti ABCB1 na aktivitu docetaxelu a signifikantní rozdíl naměřených IC_{50} hodnot na linii A431-parentní a sublinii A431-ABCB1 ukazuje **Obrázek 3B**.



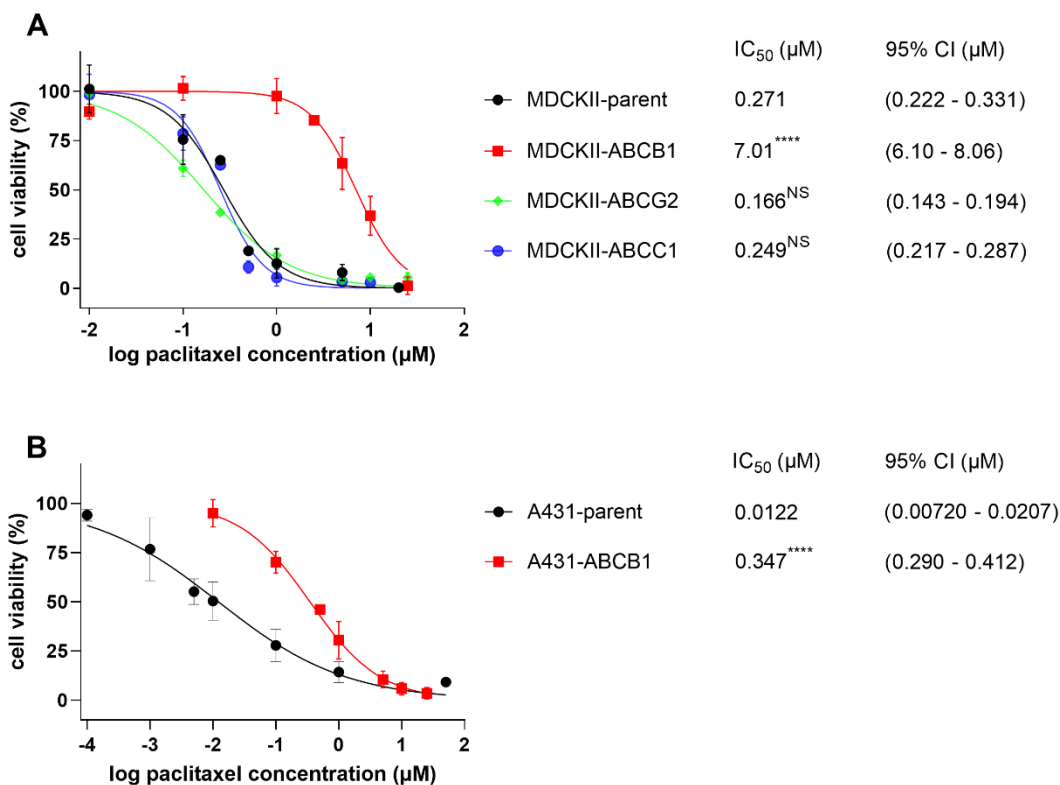
Obrázek 3: Grafické znázornění antiproliferační aktivity docetaxelu (A) v parentní linii MDCKII (černá) a MDCKII liniích transdukovaných jednotlivými lidskými ABC transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená), ABCC1 (modrá); (B) v parentní linii A431 (černá) a A431 transdukované ABCB1 (červená). Pozn.: **: $p < 0,0001$; NS: nesignifikantní.**

5.2.1.2. Paklitaxel

Podobně jako u docetaxelu měl na antiproliferační aktivitu statisticky významný vliv pouze jeden z testovaných efluxních transportérů, a to ABCB1 (RR = 25,9). Lze tak očekávat, že toto léčivo je obětí MDR zprostředkované ABCB1. Zásadní změna citlivosti nebyla sledována u buněk s efluxními transportéry ABCG2 ani ABCC1, jak znázorňuje **Obrázek 4A**. U buněk transdukovaných těmito transportéry hodnoty IC₅₀ dosáhly 0,166 µM a 0,249 µM, přičemž parentní MDCKII linie vykazovala hodnotu IC₅₀ 0,271 µM.

Pro ověření výsledků z MDCKII linií byl proveden experiment i v lidské buněčné linii A431 parentní a transdukované ABCB1. V případě parentní linie byla IC₅₀ nižší (0,0122 µM) než u parentních MDCKII buněk (0,271 µM), což koreluje s faktem, že studovaná léčiva by měla být účinnější vůči lidským cílovým strukturám nežli psím.

V buňkách overexprimujících ABCB1 byl pozorován jeho jasný vliv na snížení citlivosti vůči paklitaxelu (RR = 28,4; **Obr. 4B**).

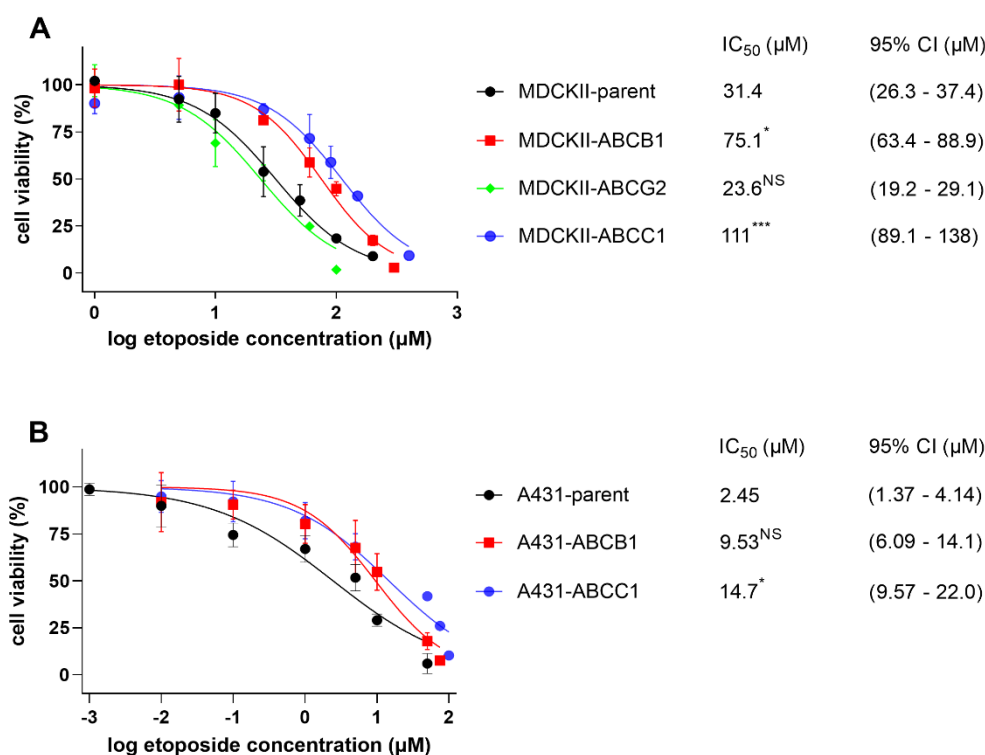


Obrázek 4: Grafické znázornění antiproliferační aktivity paklitaxelu (A) v parentní linii MDCKII (černá) a MDCKII liniích transdukovaných jednotlivými lidskými ABC transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená), ABCC1 (modrá); (B) v parentní linii A431 (černá) a A431 transdukované ABCB1 (červená). Pozn.: **: $p > 0,0001$; NS: nesignifikantní.**

5.2.1.3. Etoposid

Dalším zkoumaným cytostatikem byl inhibitor topoizomerázy II, etoposid. V první řadě byla jeho aktivita sledována v buněčné linii MDCKII. Zde byla pozorována změna (snížení) antiproliferační aktivity u dvou transdukovaných linií, a to u buněk overexprimujících ABCB1 (RR = 2,39) a ABCC1 (RR = 3,53). U buněčné linie overexprimující ABCG2 (IC₅₀ = 23,6 μM) nebylo pozorováno signifikantní ovlivnění cytotoxicity etoposidu v porovnání s parentní linií (IC₅₀ = 31,4 μM; **Obr. 5A**).

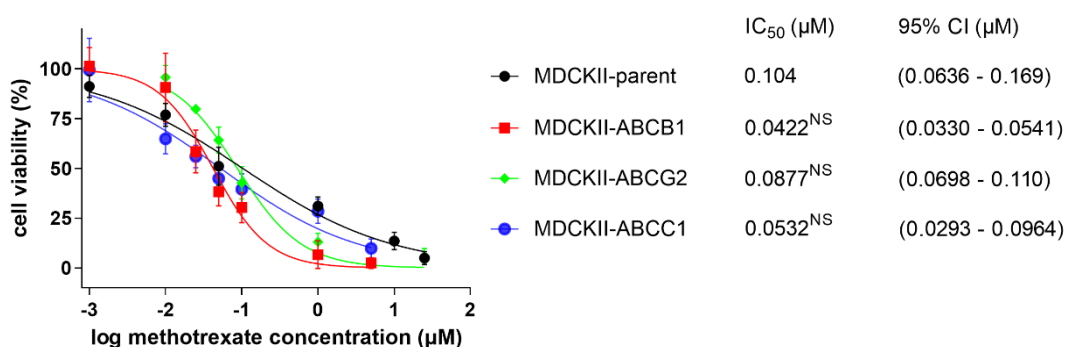
Následně proběhlo ověření chování u lidské buněčné linie A431 jak v parentní linii, tak v linii transdukované ABCC1 a ABCB1 (**Obr. 5B**). Stejně jako u MDCKII linie overexprese ABCB1 korelovala s trendem snížení antiproliferační aktivity, nicméně v tomto případě nešlo o statisticky významnou změnu. Jak je zřejmé z grafického znázornění, u buněk transdukovaných ABCC1 (IC₅₀ 14,7 μM) bylo pozorováno významné snížení citlivosti vůči etoposidu v porovnání s parentní linií (IC₅₀ 2,45 μM) s výslednou hodnotou RR 6,00.



Obrázek 5: Grafické znázornění antiproliferační aktivity etoposidu (A) v parentní linii MDCKII (černá) a MDCKII liniích transdukovaných jednotlivými lidskými ABC transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená), ABCC1 (modrá); (B) v parentní linii A431 (černá) a A431 transdukované transportéry ABCB1 (červená) a ABCC1 (modrá). Pozn.: *: $p < 0,05$; *: $p > 0,001$; NS: nesignifikantní.**

5.2.1.4. Methotrexát

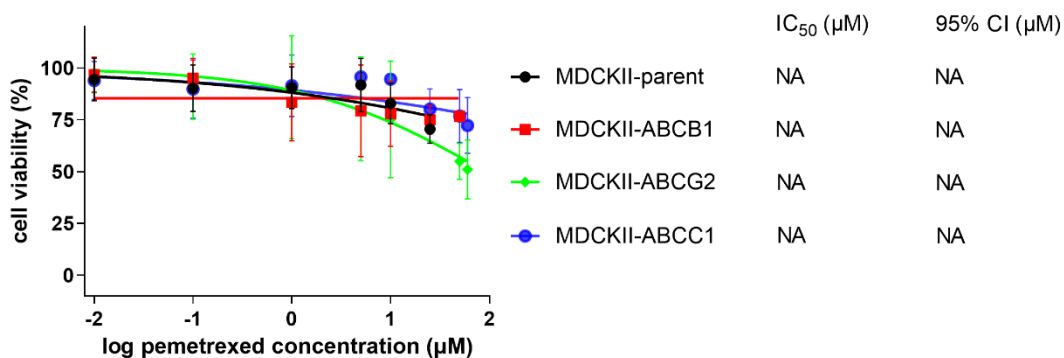
Jedním ze dvou pozorovaných cytostatik, u kterých nebyl pozorován významný vliv přítomnosti efluxních transportérů, je methotrexát. Stejně jako u ostatních cytostatik byla antiproliferační aktivita zkoumána v parentní buněčné linii MDCKII a také v transdukovaných formách. Na **Obrázku 6** můžeme vidět, že v případě parentní linie byla IC_{50} rovna $0,104 \mu\text{M}$. Přítomnost každého z transportérů prokázala odlišný vliv, ale hodnoty IC_{50} se mezi sebou zásadně nelišily – $0,0422 \mu\text{M}$ pro ABCB1, $0,0877 \mu\text{M}$ pro ABCG2 a $0,0532 \mu\text{M}$ pro ABCC1.



Obrázek 6: Grafické znázornění antiproliferační aktivity methotrexátu v parentní linii MDCKII (černá) a MDCKII liniích transdukovaných jednotlivými humánními ABC transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená), ABCC1 (modrá). Pozn.: NS: nesignifikantní.

5.2.1.5. Pemetrexed

Pemetrexed je jediným cytostatikem, u kterého nebyla v použitém koncentračním rozmezí pozorována dostatečná cytotoxicita v žádné ze zkoumaných buněčných liniích (Obr. 7). Z toho důvodu nebylo možné vypočítat hodnoty IC_{50} a formulovat příslušné závěry. Podobný trend byl pozorován v pilotních experimentech na linii A431 (data neuvedena).



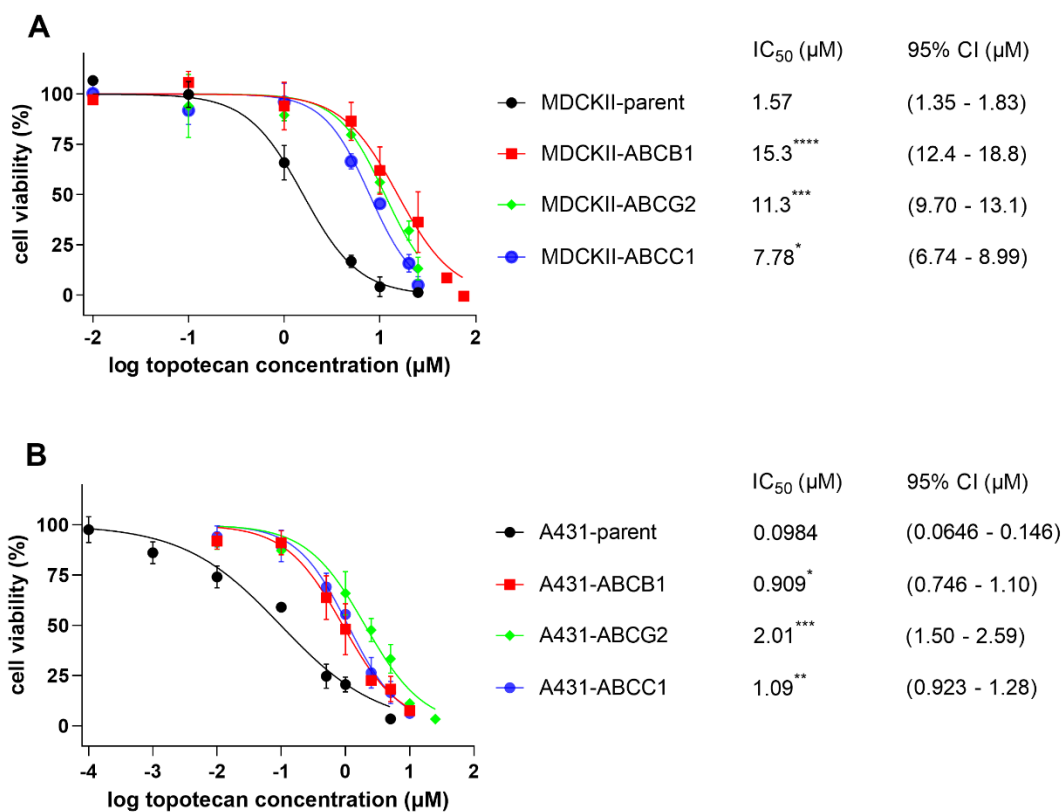
Obrázek 7: Grafické znázornění antiproliferační aktivity pemetrexedu v parentní linii MDCKII (černá) a MDCKII liniích transdukovaných jednotlivými lidskými ABC transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená), ABCC1 (modrá). Pozn.: NA: nedostupný.

5.2.1.6. Topotekan

Topotekan je jediným konvenčním cytostatikem, u kterého byl pozorován významný vliv přítomnosti overexprese všech zkoumaných efluxních transportérů, a to jak u buněčné linie MDCKII, tak A431. V úvodních experimentech na MDCKII buňkách měla největší vliv na snížení antiproliferačního účinku přítomnost transportéru ABCB1, kdy RR dosáhl hodnoty 9,75. V případě overexprese ABCG2 ($IC_{50} = 11,3 \mu M$) a ABCC1 ($IC_{50} = 7,78 \mu M$) byl antiproliferační účinek také signifikantně nižší než u parentní linie ($IC_{50} = 1,57 \mu M$). Nicméně hodnoty RR byly v přítomnosti těchto transportérů nižší (7,20 a 4,96) než u ABCB1 (Obr. 8A).

V navazujícím experimentu s buněčnou linií A431 bylo potvrzeno, že by topotekan mohl být obětí rezistence zprostředkované všemi zkoumanými transportéry. Zatímco u MDCKII buněk byl největší pokles citlivosti vůči topotekanu sledován u buněk overexprimujících ABCB1, v buněčné linii A431 se tak stalo u buněk se zvýšenou expresí ABCG2. Jak můžeme vidět na grafu (Obr. 8B), hodnota IC_{50} je

2,01 μM v případě A431-ABCG2 linie (parentní linie vykazuje $\text{IC}_{50} = 0.0984 \mu\text{M}$) a RR je rovno 20,43. Vliv overexprese ABCB1 na citlivost linie A431 vůči topotecanu je ve srovnání s ABCG2 nižší s hodnotou IC_{50} 0,909 μM a RR 9,24. Podobný výstup byl pozorován u transportéru ABCC1 (RR 11,1).

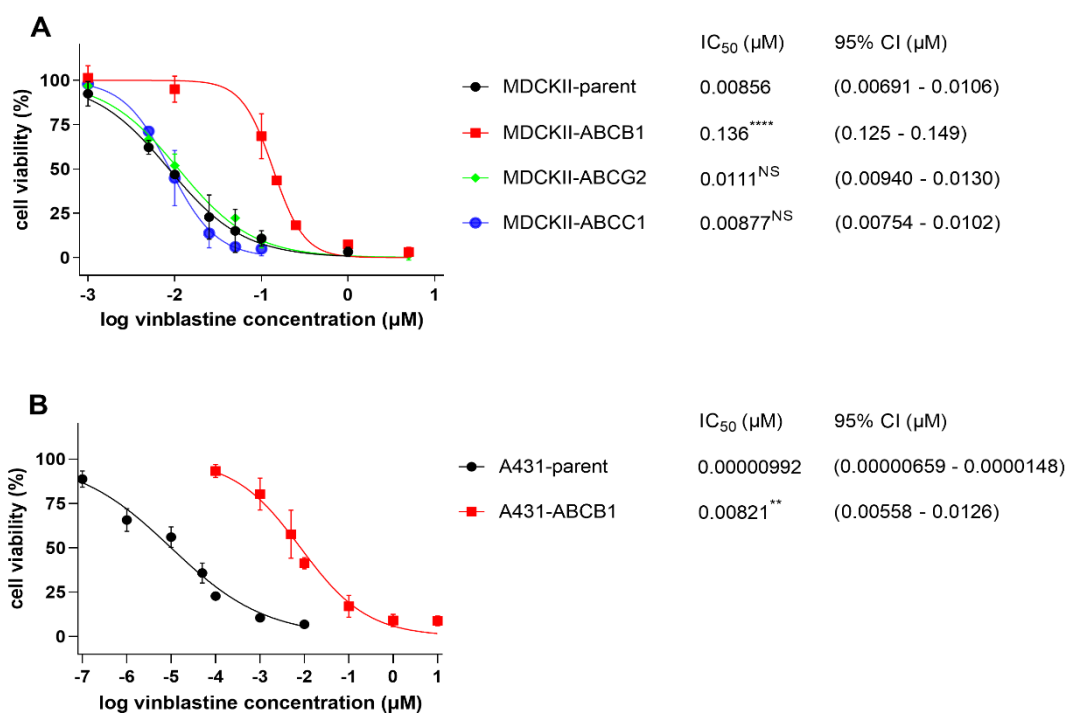


Obrázek 8: Grafické znázornění antiproliferační aktivity topotecanu (A) v parentní linii MDCKII (černá) a MDCKII liniích transdukovaných jednotlivými lidskými ABC transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená), ABCC1 (modrá); (B) v parentní linii A431 (černá) a A431 transdukované transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená) a ABCC1 (modrá). Pozn.: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$**

5.2.1.7. Vinblastin

Podobně jako u většiny testovaných cytostatik byla u vinblastinu zaznamenána pravděpodobná rezistenční role pouze u jednoho z efluxních transportérů. V buněčné linii MDCKII transdukované ABCB1 bylo dosaženo hodnoty IC_{50} rovné $0,136 \mu\text{M}$. Tyto buňky byly v porovnání s parentními ($IC_{50} = 0,00856 \mu\text{M}$) v důsledku přítomnosti overexprese ABCB1 $15,9\text{x}$ odolnější vůči antiproliferačnímu účinku vinblastinu. V případě buněk overexprimujících transportéry ABCG2 a ABCC1 nebyly hodnoty IC_{50} ($0,0111 \mu\text{M}$ a $0,00877 \mu\text{M}$) statisticky významně rozdílné od hodnoty IC_{50} naměřené u parentních buněk (**Obr. 9A**).

V dalším kroku byl ověřován vliv přítomnosti ABCB1 také v buněčné linii A431. Na **Obrázku 9B** můžeme stejně jako u buněčného modelu MDCKII sledovat signifikantní posun křivky buněk transdukovaných ABCB1 ($0,00821 \mu\text{M}$) ve srovnání s křivkou parentních buněk ($0,0000092 \mu\text{M}$). Na základě získaných dat můžeme konstatovat, že overexprese ABCB1 může mít významný vliv na snížení citlivosti buněk vůči vinblastinu.



Obrázek 9: Grafické znázornění antiproliferační aktivity vinblastinu (A) v parentní linii MDCKII (černá) a MDCKII liniích transdukovaných jednotlivými lidskými ABC transportéry ABCB1 (červená), ABCG2 (zelená), ABCC1 (modrá); (B) v parentní linii A431 (černá) a A431 transdukované transportérem ABCB1 (červená). Pozn.: **: $p < 0,01$; **: $p < 0,0001$; NS: nesignifikantní.**

Souhrn všech výsledků získaných v komparativních proliferačních MTT testech je zaznamenán v **Tabulce 4**.

*Tabulka 4: Souhrn dat získaných v komparativních proliferačních MTT testech. Výsledné působení antiproliferačního účinku vybraných léčiv na parentní buněčné linie MDCKII-par a A431-par a na buněčné linie transdukované efluxními transportéry ABCB1, ABCG2 a ABCC1. Pozn.: RR: resistance ratio; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; NS: nesignifikantní.*

léčivo	buněčná linie						
	MDCKII-par	MDCKII-ABCB1	MDCKII-ABCG2		MDCKII-ABCC1		
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	RR	IC ₅₀ (μM)	RR	IC ₅₀ (μM)	RR
docetaxel	0,088	1,29****	14,7	0,0603 ^{NS}	/	0,0713 ^{NS}	/
paklitaxel	0,271	7,01****	25,9	0,166 ^{NS}	/	0,249 ^{NS}	/
etoposid	31,4	75,1*	2,39	23,6 ^{NS}	/	111***	3,53
methotrexát	0,104	0,0422 ^{NS}	/	0,0877 ^{NS}	/	0,0532 ^{NS}	/
pemetrexed	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
topotekan	1,57	15,3****	9,75	11,3***	7,2	7,78*	4,96
vinblastin	0,00856	0,136****	15,9	0,0111 ^{NS}	/	0,00877 ^{NS}	/
léčivo	buněčná linie						
	A431-par	A431-ABCB1	A431-ABCG2		A431-ABCC1		
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	RR	IC ₅₀ (μM)	RR	IC ₅₀ (μM)	RR
docetaxel	0,000403	0,12****	297	/	/	/	/
paklitaxel	0,0122	0,347****	28,4	/	/	/	/
etoposid	2,45	9,35 ^{NS}	/	/	/	14,7*	6,00
topotekan	0,0984	0,909*	9,24	2,01***	20,43	1,09**	11,1
vinblastin	0,00000992	0,00821**	827	/	/	/	/

5.2.2 Kombinační studie s topotekanem v MDCKII buňkách

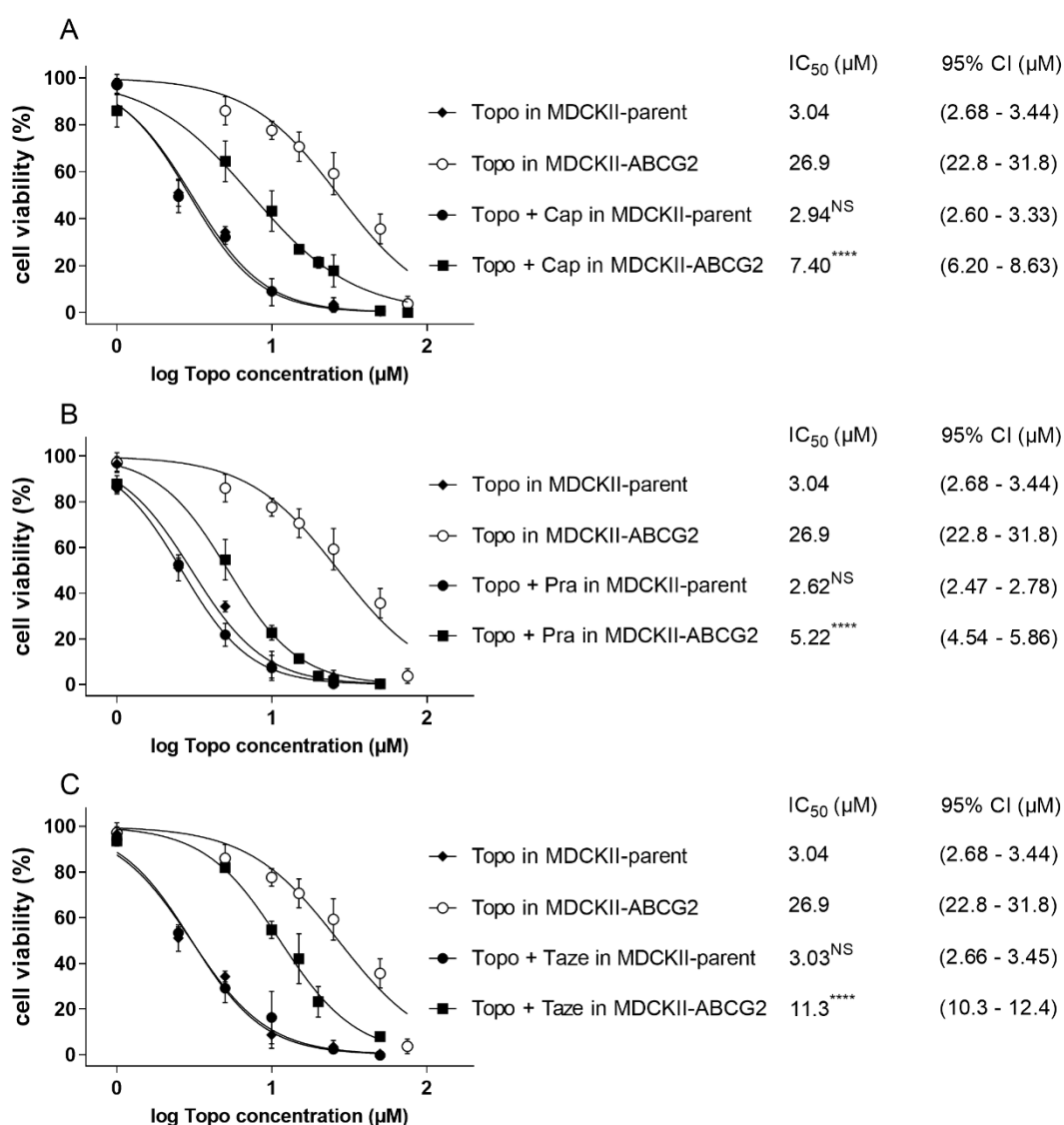
V předchozích komparativních proliferačních MTT testech bylo cílem ověřit roli oběti rezistence zprostředkované transportéry u několika vybraných cytostatik. Topotekan byl jediným léčivem, u něhož byla tato role prokázána v souvislosti s transportérem ABCG2. V návazných kombinačních experimentech bylo cílem ověřit, zda je topotekan vhodným adeptem pro kombinační studie, ve kterých je sledován vliv inhibice ABCG2 na překonání MDR. Antiproliferační účinek topotekanu byl testován v kombinaci s potenciálními modulátory MDR, a sice kapmatinibem, pralsetinibem a tazemetostatem. Účinek kombinace těchto látek byl sledován na MDCKII parentních buňkách a MDCKII buňkách transdukovaných ABCG2.

Na **Obrázku 10A** můžeme sledovat 3,64-násobné zvýšení citlivosti MDCKII-ABCG2 buněk vůči topotekanu v případě kombinace s inhibitorem ABCG2 transportéru kapmatinibem. Kombinace těchto léčiv naopak nevykázala signifikantní změnu ve srovnání se samotným topotekanem u parentních MDCKII buněk (IC_{50} 2,94 μ M vs. 3,04 μ M u samotného topotekanu).

Podobný výstup byl dosažen též v případě pralsetinibu, dalšího cíleného léčiva schopného inhibovat ABCG2 (**Obr. 10B**). Pralsetinib zvýšil vnímavost linie MDCKII—ABCG2 vůči antiproliferačním účinkům topotekanu 5,15krát, přičemž přidání testovaného potenciálního MDR modulátoru k topotekanu signifikantně neovlivnilo citlivost linie parentní (hodnoty IC_{50} pro samotný topotekan a kombinaci byly 3,04 a 2,62 μ M v parentní linii).

Poslední zkoumanou látkou v kombinaci byl tazemetostat (**Obr. 10C****Obrázek 10**). Stejně jako v předešlých případech nebyla očekávána zásadní změna hodnoty IC_{50} u parentních buněk, jelikož potenciální modulátory byly aplikovány v netoxické koncentraci. Na grafu je vidět, že se výsledek použití kombinace topotekanu a tazemetostatu u parentních buněk (IC_{50} 3,03 μ M) opravdu neliší od výsledku použití samotného topotekanu (IC_{50} 3,04 μ M). Přidáním tazemetostatu do kombinace se podařilo zvýšit citlivost MDCKII-ABCG2 buněk vůči topotekanu, hodnota IC_{50} signifikantně klesla z 26,9 na 11,3 μ M.

Ze získaných výsledků vyplývá, že kombinace topotekanu se všemi třemi testovanými cílenými léčivy má potenciál pro překonání MDR zprostředkované ABCG2 transportérem. Výsledky budou sloužit jako podklad pro *ex vivo* studie v primárních kulturách odvozených z biopsií nemalobuněčných plicních karcinomů, které ověří reálný dosah tohoto závěru.



Obrázek 10: Grafické znázornění antiproliferačního účinku topotekanu v parentní buněčné linii MDCKII a MDCKII transdukované ABCG2, (A) v kombinaci s kapmatinibem (Cap), (B) v kombinaci s pralsetinibem (Pra) a (C) v kombinaci s tazemetostatem (Taze). Pozn.: ****: $p < 0,0001$; NS: nesignifikantní.

6. Diskuze

Chemoterapie je stále jedním z nejvíce využívaných typů terapie nádorových onemocnění. Velkým problémem je časté selhávání této terapie, jejíž příčinou je mimo jiné vznik mnohočetné lékové rezistence (MDR). Jedním z mechanismů MDR je zvýšený eflux chemoterapeutik z nádorových buněk zprostředkovaný rodinou ABC transportérů (Haider et al., 2020; Liu, 2019; Mansoori et al., 2017).

V současnosti existuje mnoho studií, které uvádějí mezi substráty transportérů ABCB1, ABCC1 a ABCG2 i řadu konvenčních cytostatik běžně používaných v praxi. V určitých případech selhání terapie byla potvrzena spojitost právě s výskytem overexprese efluxních transportérů nádorovými buňkami (Fletcher et al., 2010; Liu, 2019). Role overexprese ABC transportérů může kromě efluxu cytostatik spočívat i v ovlivnění samotné patofyziologie nádorů, jelikož jsou schopné transportovat řadu substrátů podílejících se na vzniku nádorů. Také bylo pozorováno mnoho různých fenotypů v souvislosti s delecí a expresí ABC transportérů, jejichž vliv se projevil např. v agresivitě a invazivitě nádorů či ve změně procesu apoptózy (Bhattacharya et al., 2007; Fletcher et al., 2010; Robinson et al., 1996; Vander Borghet et al., 2008). Na vzniku MDR se může podílet mnoho procesů a mechanismů zároveň vzhledem k jedinečným vlastnostem a charakteristikám jednotlivých typů nádorů. Klíčová role v procesu ztráty účinku chemoterapie je přisuzována právě skupině ABC efluxních transportérů, a proto se stále pracuje na detailním pochopení celého mechanismu (Fletcher et al., 2010; Housman et al., 2014; Liu, 2019). Ačkoliv byla role oběti v minulosti přisouzena mnoha cytostatikům, údaje o úrovni rezistence a transportérové specificitě se v literatuře ne vždy shodují. Právě proto bylo prvním zvoleným cílem této práce prozkoumat vliv overexprese ABCB1, ABCC1 a ABCG2 na antiproliferační účinek několika zvolených konvenčních cytostatik.

Pomocí metody MTT testů v buněčném modelu MDCKII bylo zjištěno, že oběti overexprese 1) ABCB1 mohou být docetaxel, etoposid, paklitaxel, topotekan a vinblastin; 2) ABCC1 mohou být etoposid a topotekan; 3) ABCG2 může být topotekan. Většina těchto výsledků se shoduje s publikovanými studiemi, nicméně v některých případech můžeme najít informace odlišné (Choi & Yu, 2014; Liu, 2019; Luqmani, 2005; M F Gonçalves et al., 2020; Mimeault et al., 2008; Szakács et al., 2006). Příčin těchto nesrovnalostí může být více, mezi nimiž mohou být použití odlišných metod a za jiných podmínek. Velký vliv mohou mít rozdíly ve vybraných buněčných modelech a míra

overexprese studovaných transportérů v nich. Pro potvrzení získaných výsledků z MDCKII linie byly v následujícím kroku ověřovány pozitivní výsledky i na lidské buněčné linii A431. U etoposidu v případě buněk overexprimujících transportér ABCB1 nebyla pozorována signifikantní změna v citlivosti buněk v porovnání s parentní linií. Důvodem může být široké rozpětí naměřených hodnot u A431-ABCB1 buněk, z nichž některé byly blízké hodnotám naměřených u buněk parentních. Všechny ostatní pozitivní výsledky získané v MDCKII linii se podařilo potvrdit i u linie A431.

Pokud bych měla příležitost své výsledky znovu ověřit a detailněji rozvést, vyzkoušela bych další metody pro testování antiproliferačních/cytotoxických vlastností léčiv (např. metody pro sledování apoptózy), případně akumulární studie a také studie ověřující míru overexprese jednotlivých efluxních transportérů. Vhodné by bylo studium vlivu modelových inhibitorů (např. LY335979, Ko143 nebo MK571) na antiproliferační aktivitu cytostatik, jež jsem ve své práci označila jako možné oběti MDR. Tímto přístupem bych jejich roli oběti definitivně potvrdila. Vzhledem k omezenému časovému rozsahu experimentální části jsem nebyla schopná tyto studie provést. Ve skupině mého školitele však právě probíhají. V rámci svých experimentů jsem pozorovala nedostatečnou aktivitu pemetrexedu na obou testovaných buněčných liniích, která neumožnila vyvození příslušných závěrů. Ve svém testování jsem bohužel nemohla použít vyšší koncentrace kvůli omezené rozpustnosti léčiva a limitu množství DMSO v buněčných experimentech. Za povšimnutí stojí také fakt, že citlivost MDCKII buněk vůči topotekanu se liší mezi komparativními a kombinačními studii (absolutní hodnoty IC_{50} , ne však RR). Za touto nesrovnalostí může stát celá řada faktorů, jako např. časový rozdíl mezi experimenty, který je spojen s využitím jiné šarže a pasáže buněk i testovaného cytostatika. Důležité je, že hodnota RR je prakticky srovnatelná, tudíž závěr týkající se role oběti zůstává nezměněn.

Pochopení důsledků overexprese a funkcí ABC transportérů ve fenoménu MDR je zásadní pro hledání cest, jak těmto procesům zabránit. Jednou z možností, jak překonat snížení citlivosti nádorových buněk vůči protinádorovým léčivům v důsledku overexprese efluxních transportérů, je současné podání účinných inhibitorů těchto transportérů. V posledních dvou desetiletích se v preklinických studiích podařilo najít řadu potenciálních inhibitorů, nicméně v pozdějších klinických studiích tyto látky nedosáhly úspěchu, ať už z důvodu vysoké toxicity, lékových interakcí nebo špatného designu studií (Assaraf et al., 2019; Bukowski et al., 2020; M F Gonçalves et al., 2020).

Původní přístup překonání MDR využíval sloučeniny, které měly potenciál inhibovat ABC transportéry, ale samy o sobě neměly žádné protinádorové účinky. Mnohokrát bylo potvrzeno, že je tento přístup spíše slepou uličkou, jelikož kombinace testovaných inhibitorů a cytostatik často vedly ke zvýšené cytotoxicitě (Fletcher et al., 2016; Szakács et al., 2006). Nový přístup představují tzv. duální modulátory neboli látky, které kromě schopnosti inhibovat efluxní transportéry mají zároveň i vlastní protinádorový účinek. Výsledkem kombinace duálních modulátorů s konvenčními cytostatiky by měl být synergistický účinek, který umožní snížit dávky podávaných léčiv a bude předcházet problémům pozorovaným u přechozích generací modulátorů MDR. Kriticky důležitou vlastností duálních modulátorů je jejich cílené působení, které zajistí rozvoj synergistického účinku selektivně v nádorové tkáni (Beretta et al., 2017; Kathawala et al., 2015; Wang et al., 2014). Studie věnující se testování cílených léčiv, které by mohly být duálními modulátory, jsou tedy důležité a mohou být přínosem pro optimalizaci personalizované protinádorové terapie. V další části své práce jsem proto získané výsledky aplikovala v kombinační studii provedené na MDCKII buněčné linii. Předmětem experimentu bylo ověření využití topotekanu jakožto modelového substrátu ABCG2 pro kombinační studie. V experimentu jsem kombinovala topotekan se třemi inhibitory ABCG2 ze skupiny cílených léčiv, a to kapmatinibem, pralsetinibem a tazemetostatem. Topotekan se ukázal jako vhodný modelový substrát a všechny tři inhibitory byly prokázány jako potenciální modulátory MDR.

Poznatky získané v provedené kombinační studii považuji za důležité informace pro další studie, které by se mohly podrobněji zabývat kombinacemi těchto inhibitorů s dalšími cytostatiky-substráty ABCG2 a ověření dopadu výsledků v *ex vivo/in vivo* modelech. Jeden ze známých *in vivo* modelů využívá xenografty buněk s overexpresí ABC transportérů. Chování xenograftů je sledováno v živých organismech, kterým jsou podávány kombinace substrátu a modulátoru v různých koncentracích. To umožňuje kromě účinku kombinace sledovat i možné toxické účinky v celém organismu. Testování kombinací je možné provádět i v odebraných vzorcích z nádorů pacientů, u kterých byla potvrzena overexprese zkoumaných transportérů (Chen et al., 2016; Yang et al., 2017). Dále by bylo možné využít novější preklinický model 3D-strukturovaných organoidů s expresí efluxních transportérů. Tento model nedávno získal velkou popularitu a lze najít studie věnující se expresi a aktivitě ABC transportérů i v přítomnosti jejich inhibitorů (Lu et al., 2017; Onozato et al., 2018; L. Zhang et al., 2017; Y. Zhang et al., 2021).

Některé z vybraných testovaných cílených léčiv jsme v dřívějších studiích prokázali také jako inhibitory ABCB1, popř. též ABCC1. Kombinační studie zaměřené na tyto transportéry prováděla v rámci diplomové práce kolegyně Markéta Svobodová. Pokud bych měla možnost rozvést svou práci, otestovala bych cílená léčiva inhibující ABCB1 s některými z cytostatik, které jsem popsala jako oběti ABCB1-zprostředkované MDR, např. paklitaxelem nebo vinblastinem. Případné potvrzení dvojitého (např. ABCB1 a ABCG2) nebo dokonce trojitého (ABCB1/ABCG2/ABCC1) ovlivnění MDR může mít velkou hodnotu. Je známo, že nádorové buňky overexprimují současně více typů transportérů, které mají široké a překrývající se spektrum substrátů (Robey et al., 2018). Proto dopad inhibice pouze jednoho z transportérů může být anulován zvýšenou expresí ostatních (M F Gonçalves et al., 2020). Zasažení dvou nebo dokonce všech tří hlavních mechanismů MDR tuto překážku může překonat.

Pochopení vztahů a procesů týkajících se role ABC transportérů ve vzniku MDR je a bude předmětem vědeckých studií i nadále. Výsledky získané v této práci jsou pouze dalším střípkem, který se může stát určitým vodítkem a nasměrováním pro následující experimenty a studie. V dnešní době se stále objevují nové přístupy v překonání MDR, jako např. inaktivace genů asociovaných s MDR pomocí miRNA/siRNA, použití monoklonálních protilátek proti P-gp nebo vývoj nových protinádorových léčiv, které by nebyly substráty ABC lékových transportérů (Li et al., 2016; M F Gonçalves et al., 2020; Wang et al., 2014; Ward et al., 2021). Přesto je výzkum zabývající se hledáním inhibitorů stále neméně důležitý. Doposud se testovaly většinou inhibitory bez vlastní protinádorové aktivity. Jak bylo rozvedeno výše, novým cílem současných výzkumů je snaha najít tzv. duální modulátory, které by mimo inhibice ABC transportérů měly i vlastní cytotoxický účinek (Kathawala et al., 2015; Wang et al., 2014). Pro klinickou aplikaci duálních modulátorů MDR je klíčové následování přístupu personalizované medicíny, jmenovitě analýzy exprese transportérů v nádorech (Robey et al., 2018).

7. Závěr

Tato práce se zabývala vlivem overexprese ABC lékových transportérů na antiproliferační účinky několika konvenčních cytostatik a následně aplikaci jedné z potvrzených obětí MDR, topotekanu, v kombinačních studiích s potenciálními modulátory MDR. Díky poznatkům v teoretické části lze konstatovat, že je důležité chápat a objasňovat funkci a vliv těchto transportérů na rozvoj MDR, která je příčinou selhávání protinádorové terapie u mnoha pacientů. V rámci experimentální části proběhly dva typy studií, a to komparativní proliferační MTT testy a kombinační studie.

V první studii byl zkoumán antiproliferační účinek sedmi vybraných cytostatik na dvou buněčných modelech. V úvodních experimentech byla testována cytotoxicita na modelu MDCKII. Získané výsledky ukazují, že ve vybraném souboru léčiv byl nejčastější příčinou MDR transportér ABCB1, jelikož v jeho přítomnosti došlo ke snížení citlivosti buněk vůči docetaxelu, etoposidu, paklitaxelu, topotekanu a vinblastinu. V případě overexprese ABCG2 šlo pouze o topotekan. Obětí overexprese ABCC1 byly v experimentu etoposid a topotekan. Léčiva, u kterých se projevil významně snížený antiproliferační účinek v přítomnosti některého ze zkoumaných transportérů, byly následně použity i v lidské buněčné linii A431. V této buněčné linii se podařilo ověřit předchozí výsledky až na jeden případ, a sice etoposid v přítomnosti ABCB1.

Přínosem této práce jsou důležité poznatky týkající se chování vybraných cytostatik v buněčných modelech MDCKII a A431 s/bez overexpresí(e) ABCB1, ABCG2 a ABCC1. Řada testovaných léčiv je v roli oběti těchto transportérů již v literatuře popsána, nicméně se jednotlivé informace často neshodují z hlediska úrovně rezistence nebo substrátové specifity. Zároveň jsem nenalezla studie, které by poskytovaly komplexní popis MDR chování větší skupiny léčiv ve vybraných buněčných modelech. Data získaná v uskutečněných experimentech může využít výzkumná skupina mého školitele v probíhajících i budoucích studiích a v případě publikace i vědci po celém světě.

Topotekan je jediné zkoumané cytostatikum, které se stalo obětí rezistence zprostředkované ABCG2. Z toho důvodu bylo vybráno pro druhou část experimentální části, již byla kombinační studie s cílenými léčivy prokázanými v předchozích studiích jako ABCG2 inhibitory (kapmatinib, pralsetinib a tazemetostat). Topotekan se osvědčil jako vhodný modelový substrát pro MDCKII linii a taktéž se potvrdilo, že všechna

testovaná cílená léčiva mají schopnost antagonizovat MDR zprostředkovanou efluxní aktivitou ABCG2. Dalším přínosem této práce jsou tak výsledky této kombinační studie. Získaná data mohou být vodítkem pro další studie, které by se mohly zaměřit na modulační potenciál kapmatinibu, pralsetinibu či tazemetostatu v *ex vivo/in vivo* modelech. Po ověření výsledků na klinické úrovni by získaná data mohla sloužit jako podklad pro personalizovanou terapeutickou strategii cílící na nádory s overexpresí ABCG2.

8. Seznam literatury

Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H., Mohammed, O. Y., Elhassan, G. O., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Ibrahim, M. E., & Rauch, C. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer cell international*, 15, 71. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>

Amawi, H., Sim, H. M., Tiwari, A. K., Ambudkar, S. V., & Shukla, S. (2019). ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1141, 549–580. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_12

Assaraf, Y. G., Brozovic, A., Gonçalves, A. C., Jurkovicova, D., Linē, A., Machuqueiro, M., Saponara, S., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Xavier, C., & Vasconcelos, M. H. (2019). The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 46, 100645. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100645>

Beretta, G. L., Cassinelli, G., Pennati, M., Zuco, V., & Gatti, L. (2017). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European journal of medicinal chemistry*, 142, 271–289. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.062>

Bhattacharya, S., Das, A., Mallya, K., & Ahmad, I. (2007). Maintenance of retinal stem cells by Abcg2 is regulated by notch signaling. *Journal of cell science*, 120(Pt 15), 2652–2662. <https://doi.org/10.1242/jcs.008417>

Bortolomai, I., Canevari, S., Facetti, I., De Cecco, L., Castellano, G., Zacchetti, A., Alison, M. R., & Miotti, S. (2010). Tumor initiating cells: development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(6), 1194–1206. <https://doi.org/10.4161/cc.9.6.11108>

Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>

Chen, L. M., Li, Y. F., Zhang, X., Yan, S. L., Liang, Y. J., & Fu, L. W. (2005). Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer, 24(2), 189–193.

Choi, Y. H., & Yu, A. M. (2014). ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Current pharmaceutical design*, 20(5), 793–807. <https://doi.org/10.2174/138161282005140214165212>

Dukes, J.D., Whitley, P. & Chalmers, A.D. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol* 12, 43 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-43>

Faguet G. B. (2015). A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *International journal of cancer*, 136(9), 2022–2036. <https://doi.org/10.1002/ijc.29134>

Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J., & Norris, M. D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature reviews. Cancer*, 10(2), 147–156. <https://doi.org/10.1038/nrc2789>

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride *Toxicology letters*, 160(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>

Haider, T., Pandey, V., Banjare, N., Gupta, P. N., & Soni, V. (2020). Drug resistance in cancer: mechanisms and tackling strategies. *Pharmacological reports : PR*, 72(5), 1125–1151. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00138-7>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 13(10), 714–726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769–1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>

- International Transporter Consortium, Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., ... Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(3), 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>
- Joo, W. D., Visintin, I., & Mor, G. (2013). Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered?. *Maturitas*, 76(4), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.09.008>
- Kathawala, R. J., Gupta, P., Ashby, C. R., Jr, & Chen, Z. S. (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 18, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.11.002>
- Kaufmann, K. B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., & Grez, M. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO molecular medicine*, 5(11), 1642–1661. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202287>
- Lammers, T., Aime, S., Hennink, W. E., Storm, G., & Kiessling, F. (2011). Theranostic nanomedicine. *Accounts of chemical research*, 44(10), 1029–1038. <https://doi.org/10.1021/ar200019c>
- Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y. G., Zhao, K., Xu, X., Xie, J., Yang, D. H., & Chen, Z. S. (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 27, 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.05.001>
- Liu X. (2019). ABC Family Transporters. *Advances in experimental medicine and biology*, 1141, 13–100. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2
- Lu, J., Zhang, Y., Sun, M., Liu, M., & Wang, X. (2017). Comprehensive assessment of Cucurbitacin E related hepatotoxicity and drug-drug interactions involving CYP3A and P-glycoprotein. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 26, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.01.004>

- Luqmani Y. A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 14 Suppl 1, 35–48. <https://doi.org/10.1159/000086183>
- M F Gonçalves, B., S P Cardoso, D., & U Ferreira, M. J. (2020). Overcoming Multidrug Resistance: Flavonoid and Terpenoid Nitrogen-Containing Derivatives as ABC Transporter Modulators. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(15), 3364. <https://doi.org/10.3390/molecules25153364>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(3), 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- Mimeault, M., Hauke, R., & Batra, S. K. (2008). Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 83(5), 673–691. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100296>
- Onozato, D., Yamashita, M., Nakanishi, A., Akagawa, T., Kida, Y., Ogawa, I., Hashita, T., Iwao, T., & Matsunaga, T. (2018). Generation of Intestinal Organoids Suitable for Pharmacokinetic Studies from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 46(11), 1572–1580. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.080374>
- Rang, H. P., et al. (2016). *Rang and Dale's pharmacology*. Elsevier, 676-691
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature reviews. Cancer*, 18(7), 452–464. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>
- Robinson, L. J., Roberts, W. K., Ling, T. T., Lamming, D., Sternberg, S. S., & Roepe, P. D. (1997). Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry*, 36(37), 11169–11178. <https://doi.org/10.1021/bi9627830>
- Santhosh, S., Kumar, P., Ramprasad, V., & Chaudhuri, A. (2015). Evolution of targeted therapies in cancer: opportunities and challenges in the clinic. *Future oncology (London, England)*, 11(2), 279–293. <https://doi.org/10.2217/fon.14.198>

- Schirmacher V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International journal of oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>
- Sudhakar A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1–4. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>
- Sui, H., Fan, Z. Z., & Li, Q. (2012). Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *The Journal of international medical research*, 40(2), 426–435. <https://doi.org/10.1177/147323001204000204>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(3), 219–234. <https://doi.org/10.1038/nrd1984>
- Švihovec, J., et al. (2018). *Farmakologie*. Grada Publishing, 1-962
- Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2011). The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays in biochemistry*, 50(1), 209–232. <https://doi.org/10.1042/bse0500209>
- Vander Borgh, S., Komuta, M., Libbrecht, L., Katoonizadeh, A., Aerts, R., Dymarkowski, S., Verslype, C., Nevens, F., & Roskams, T. (2008). Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 28(10), 1370–1380. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01889.x>
- Wang, Y. J., Zhang, Y. K., Kathawala, R. J., & Chen, Z. S. (2014). Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in Anticancer Drug Resistance. *Cancers*, 6(4), 1925–1952. <https://doi.org/10.3390/cancers6041925>

- Ward, R. A., Fawell, S., Floc'h, N., Flemington, V., McKerrecher, D., & Smith, P. D. (2021). Challenges and Opportunities in Cancer Drug Resistance. *Chemical reviews*, 121(6), 3297–3351. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00383>
- Yan, L., Rosen, N., & Arteaga, C. (2011). Targeted cancer therapies. *Chinese journal of cancer*, 30(1), 1–4. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10553>
- Yang, K., Chen, Y., To, K. K., Wang, F., Li, D., Chen, L., & Fu, L. (2017). Alectinib (CH5424802) antagonizes ABCB1- and ABCG2-mediated multidrug resistance in vitro, in vivo and ex vivo. *Experimental & molecular medicine*, 49(3), e303. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.168>
- Yu, D. M., Huynh, T., Truong, A. M., Haber, M., & Norris, M. D. (2015). ABC transporters and neuroblastoma. *Advances in cancer research*, 125, 139–170. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.10.005>
- Zhang, L., Zhao, J., Liang, C., Liu, M., Xu, F., & Wang, X. (2017). A novel biosensor based on intestinal 3D organoids for detecting the function of BCRP. *Drug delivery*, 24(1), 1453–1459. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1381199>
- Zhang, Y., Huang, S., Zhong, W., Chen, W., Yao, B., & Wang, X. (2021). 3D organoids derived from the small intestine: An emerging tool for drug transport research. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 11(7), 1697–1707. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.12.002>