



UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

**CHARAKTERIZACE REZISTENCE VŮČI
GILTERITINIBU U LEUKEMICKÉ BUNĚČNÉ
LINIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Konzultant: Mgr. Simona Suchá, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2023

LUCIE ZLESÁKOVÁ

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Lucie Zlesáková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za vedení při zpracování mé diplomové práce na Katedře farmakologie a toxikologie, za veškeré rady a připomínky při práci a za korekci mé diplomové práce.

Díky také patří konzultantce Mgr. Simoně Suché, Ph.D. za pomoc při realizaci mé práce, za její poznatky, rady, zasvěcení při experimentální části a následně i při korekci diplomové práce. A hlavně za přátelské a vřelé prostředí, ve kterém jsem mohla pracovat.

A především děkuji mým rodičům, rodině, kamarádům a spolužačkám za všechnu podporu, které se mi během celého studia dostávalo.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Lucie Zlesáková

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

Konzultant: Mgr. Simona Suchá, Ph.D.

Název diplomové práce: Charakterizace rezistence vůči gilteritinibu u leukemické buněčné linie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je agresivní nádorové onemocnění se špatnou prognózou, za kterou často stojí selhání léčby. Mezi nejčastější příčiny selhání léčby patří rozvoj lékové rezistence. Přesné mechanismy vedoucí k rezistenci nejsou známy, zejména u léků nedávno zavedených do klinické praxe, jako je například gilteritinib. Proto byla v naší laboratoři vytvořena a charakterizována leukemická buněčná linie rezistentní na gilteritinib (označovaná jako HL-60 g75). Cílem této studie bylo zhodnotit citlivost buněk HL-60 g75 na gilteritinib a objasnit stabilitu získané rezistence. Odhalili jsme, že rezistence buněk HL-60 g75 je dočasná, protože už po 4 týdnech kultivace bez gilteritinibu se citlivost těchto buněk obnovila. Zatímco gilteritinib indukoval apoptózu podobně u buněk citlivých na gilteritinib (HL-60 wt) i rezistentních, analýza buněčného cyklu odhalila nižší citlivost HL-60 g75 na gilteritinib než HL 60 wt. Dále byla zjištěna citlivost HL-60 g75 na midostaurin a sunitinib, léčiva s podobným mechanismem účinku jako gilteritinib. HL-60 g75 vykazoval zkříženou rezistenci k sunitinibu, ale ne k midostaurinu. Vzhledem k fyzikálně-chemické podobnosti gilteritinibu a sunitinibu a skutečnosti, že rezistence na sunitinib nastává důsledkem lysozomální sekvestrace, jsme se rozhodli otestovat možnou souvislost lysozomů a gilteritinibu. Buněčné linie byly obarveny barvivem LysoTracker, specifickým pro lysozomy, které odhalilo vyšší medián intenzity fluorescence (MFI) LysoTrackeru u HL-60 g75 než u HL-60 wt. Naopak vystavení buněk sunitinibu vykazovalo nižší MFI u HL-60 g75, což naznačuje možné změny lysozomálního pH, zapojení efluxních transportérů nebo saturaci lysozomů.

Nicméně k úplnému odhalení buněčných mechanismů navozujících rezistence na gilteritinib bude třeba provést další experimenty.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lucie Zlesáková

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

Consultant: Mgr. Simona Suchá, Ph.D.

Title of diploma thesis: Characterization of gilteritinib-resistant leukemic cell line

Acute myeloid leukemia (AML) is an aggressive cancer with a poor prognosis for which therapy failure is often responsible. Development of drug resistance is among the most common causes of treatment failure. The exact mechanisms leading to the resistance are not known, especially for drugs recently introduced into the clinical practice such as gilteritinib. Therefore, the gilteritinib-resistant leukemic cell line (referred to as HL-60 g75) has been established in our lab and further characterized. The aim of this study was to evaluate the sensitivity of HL-60 g75 cells to gilteritinib and to clarify the stability of acquired resistance. We revealed that the resistance of HL-60 g75 cells is transient, since only after 4 weeks of gilteritinib-free cell culture, sensitivity of these cells was restored. While gilteritinib induced apoptosis similarly in both gilteritinib-sensitive (HL-60 wt) and -resistant cells, cell cycle analysis revealed lower responsiveness of HL-60 g75 to gilteritinib than HL-60 wt. Furthermore, sensitivity of HL-60 g75 to midostaurin and sunitinib, drugs with similar mechanism of action as gilteritinib, was established. HL-60 g75 showed cross-resistance to sunitinib, but not to midostaurin. Given the physicochemical similarities between gilteritinib and sunitinib, and the fact that sunitinib resistance results from lysosomal sequestration, we decided to test the possible association of lysosomes and gilteritinib. Cell lines were stained with LysoTracker, a lysosome-specific dye, which revealed a higher median fluorescence intensity (MFI) of LysoTracker in HL-60 g75 than HL-60 wt. On the contrary, cell exposure to sunitinib showed lower MFI in HL-60 g75 suggesting alterations of lysosomal pH, involvement of efflux transporters or saturation of lysosomes. Nevertheless,

further experiments will have to be performed to fully uncover cellular mechanisms leading to gilteritinib resistance.

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	1
2	ÚVOD.....	3
3	TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1	Akutní myeloidní leukémie	4
3.1.1	Charakteristika onemocnění.....	4
3.1.2	Diagnostika, prognóza.....	5
3.1.3	Rizikové faktory	6
3.1.4	FLT3 mutace	7
3.1.5	Léčba.....	8
3.1.5.1	Indukční & paliativní terapie.....	8
3.1.5.2	Konsolidační terapie	9
3.1.5.3	Relaps a refrakterní nemoc.....	9
3.1.5.4	Cílená léčba inhibitory FLT3	10
3.2	Rezistence v léčbě akutní myeloidní leukemie.....	13
3.2.1	Lysozomy	14
3.2.1.1	Lysozomální sekvestrace.....	14
4	CÍLE.....	15
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
5.1	Materiál a metody	16
5.1.1	Chemikálie.....	16

5.1.2	Přístroje	16
5.1.3	Buněčné linie	17
5.1.4	MTT test	18
5.1.4.1	Princip metody	18
5.1.4.2	Průběh metody.....	18
5.1.5	Apoptóza a buněčný cyklus	20
5.1.5.1	Princip metody – apoptóza.....	20
5.1.5.2	Princip metody – buněčný cyklus.....	22
5.1.5.3	Průběh metod – apoptóza + buněčný cyklus	24
5.1.6	Akumulace lysozomální sondy a sunitinibu	25
5.1.6.1	Princip metody	25
5.1.6.2	Průběh metody.....	25
5.1.7	Statistická analýza.....	26
6	VÝSLEDKY	27
6.1	Rezistence HL-60 g75 vůči gilteritinibu a její stabilita	27
6.2	Efekt gilteritinibu na buněčný cyklus	29
6.3	Indukce apoptózy vlivem gilteritinibu.....	31
6.4	Zkřížená rezistence HL-60 g75 vůči midostaurinu a sunitinibu	32
6.5	Akumulace lysozomální sondy	35
6.6	Akumulace sunitinibu	36
7	DISKUSE	37

8	ZÁVĚR.....	41
9	CITOVANÁ LITERATURA	42

1 SEZNAM ZKRATEK

ABB	Annexin vážící pufr (Annexin binding buffer)
AML	Akutní myeloidní leukémie
BMI	Body Mass Index
EMA	Evropská léková agentura
Ex./em.	Excitační/emisní
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FITC	Fluorescein
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3, tyrosinkináza
HSC	Hematopoetické kmenové buňky
ITD	Interní tandemová duplikace
MFI	Medián intenzity fluorescence
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolin bromid
PBS	Fosfátový pufr
PI	Propidium jodid
PS	Fosfatidylserin
RF	Rezistenční faktor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)
SD	Směrodatná odchylka
TKD	Tyrosinkinázová doména

wt

wild-type

2 ÚVOD

Akutní myeloidní leukémie (AML) je nádorové onemocnění, které postihuje myeloidní krevní řadu. Začíná v kostní dřeni, kdy se krevní buňky nevyvíjejí tak, jak by fyziologicky měly. Je to onemocnění se špatnou prognózou, kdy 5letého dožití je dosahováno u 27 % pacientů [1].

Léčba AML se v dnešní době skládá z klasické terapie cytostatiky, kde se léčba dělí na indukční a udržovací léčbu po dosažení remise. V léčbě cytostatiky se používá cytarabin a některý z antracyklinů (daunorubicin nebo idarubicin) v terapeutickém schématu 7+3. U pacientů, u kterých je dosaženo remise je prováděna transplantace kostní dřene. U pacientů se berou v úvahu výsledky předchozí léčby, věk a celkový zdravotní stav pacienta [2]. Pro pacienty s prokázanou mutací ve FLT3 (FML-like tyrosine kinase 3), což znamená horší prognózu, jsou nově využívány inhibitory FLT3. V první generaci je používaný midostaurin, který se podává jak v indukční, tak také v udržovací léčbě. U něj je problém výskytu sekundárních mutací a ztrátě léčebné odpovědi, v takovém případě je nově používán gilteritinib. Gilteritinib je FLT3 inhibitor druhé generace a je indikován u pacientů s mutací FLT3 u rezistentní/refrakterní formy AML. Podáván je jako monoterapie [3].

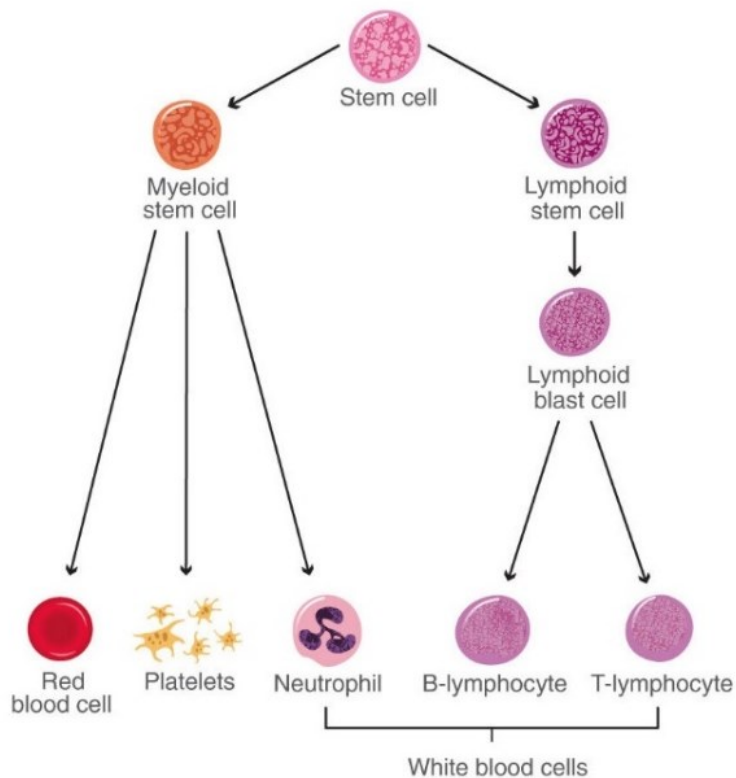
Gilteritinib je nové léčivo používané v léčbě AML, ale už se objevují případy výskytu rezistence, proto se v této práci budu zabývat charakterizací gilteritinib-rezistentní leukemické buněčné linie.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Akutní myeloidní leukémie

3.1.1 Charakteristika onemocnění

AML je nádorové onemocnění kostní dřeně, kdy dochází k narušení krvetvorby, což vede k nekontrolované proliferaci nezralých krevních buněk. Za normálních okolností hematopoetické kmenové buňky (HSC) dozrávají v myeloidní a lymfoidní prekurzory a následně diferencují do svých terminálních stádií, které představují krevní buňky jako jsou erytrocyty, trombocyty či leukocyty (Obr. 1). V případě, že dojde k maligní transformaci HSC, dochází ke vzniku tzv. leukemických kmenových buněk, které jsou zodpovědné za vznik leukemických blastů. Tyto blasty představují nezralá stadia myeloidních buněk a jsou charakteristické svou schopností neomezeně proliferovat a akumulovat se v kostní dřeni čímž nenechávají žádný prostor normální krvetvorbě. Maligní transformace HSC může být způsobena několika faktory. Nejčastěji se jedná o genetické mutace v HSC a prekursorech krevních buněk, které brání buňkám dozrávat a také je chrání před apoptózou či jinou formou buněčné smrti. Menší část případů onemocnění AML je dávaná do souvislosti s přímými faktory, důsledkem, kterých, se toto onemocnění vyvinulo. Takovými faktory může být předchozí chemoterapie, expozice určitým chemickým látkám či onkogenním virům [4].

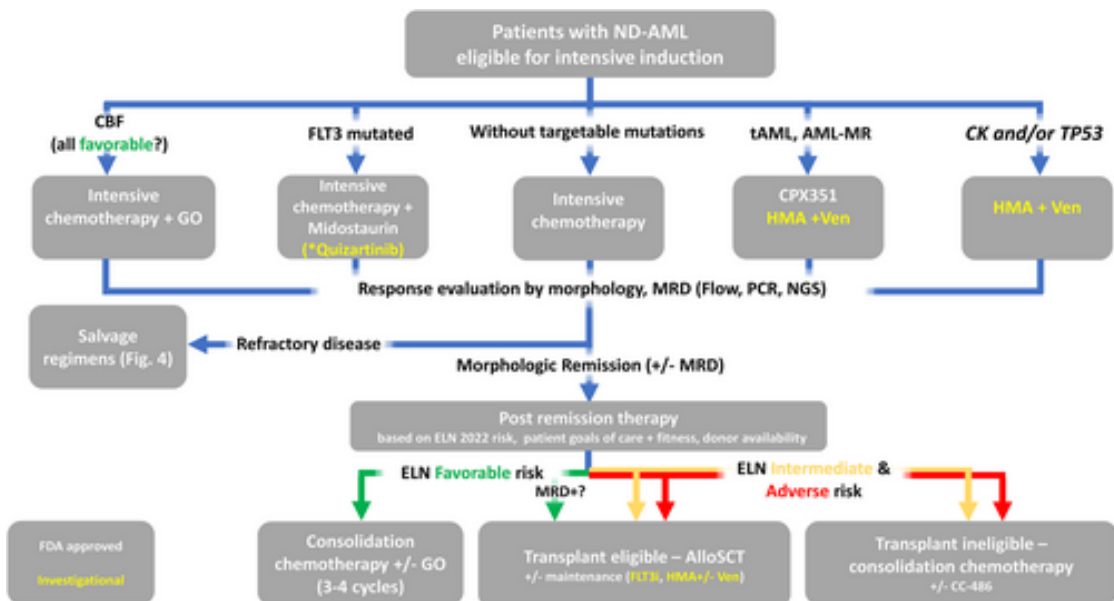


Obr. 1. Hierarchické uspořádání krvetvorby. Z hematopoetické kmenové buňky (stem cell) dochází v procesu krvetvorby ke vzniku myeloidních a lymfoidních prekurzorů (myeloid/ lymphoid stem cell), které pak diferencují na různé typy krevních buněk, např. erytrocyty (red blood cell), trombocyty (platelets) či buňky patřící do skupiny leukocytů (white blood cells). Převzato z: [5].

3.1.2 Diagnostika, prognóza

Symptomy provázející onemocnění jsou spojeny se špatnou funkcí krevních elementů v důsledku poškození kostní dřeně, kde se krevní elementy tvoří. Často se vyskytují anémie z nedostatku červených krvinek, infekce v důsledku ovlivnění bílých krvinek nebo časté modřiny, krvácení z dásní nebo nosu kvůli nízkému počtu krevních destiček [5].

Diagnóza onemocnění AML je nespecifický a složitý systém. Klasifikace a diagnóza zahrnuje i informace o tom, zda byl pacient dříve vystaven cytotoxickým léčivům a případně má určitou genetickou predispozici. Dále se hodnotí přítomnost blastů, která určuje AML definovanou diferenciací a hodnota blastů je požadována alespoň 20 %. Dále se hodnotí a diagnostickými metodami určují genové mutace a abnormality (Obr. 2), pro nastavení lepší léčby s lepší odpovědí pro daného pacienta [6].



Obr. 2. Možnosti terapie AML po diagnostikování možných mutací. Převzato z: [6].

Co se týká prognózy, měla by být léčba dostatečně agresivní, aby u pacientů došlo ke kompletní remisi. U 60-70 % pacientů je po indukční léčbě dosaženo kompletní remise a u 30 % je dosahováno 5letého přežití. Prognóza je však velice závislá na typu AML [7, 8]. Onemocnění se vyskytuje u pacientů ve věku s mediánem 72 a s průměrným věkem 68 let [9].

3.1.3 Rizikové faktory

Jedním z rizikových faktorů je **genetická a familiární predispozice**, vyskytuje se ale pouze v malé části případů. Jedná se především o postižení genů zodpovídajících za regulaci myeloidní diferenciace (*CEBPA*, *GATA2*, *RUNX1*), genů kódujících proteiny regulující autofagii či geny kódující různé transkripční faktory a proteiny zapojeny v transkripci [10]. Dalšími faktory

uplatňujícími se v rizikovosti vzniku AML jsou **reprodukční faktory a expozice rodičů**. Hlavním reprodukčním faktorem je porodní váha novorozence, kdy porodní hmotnost vyšší než 4 000 g nebo nižší než 2 500 g je asociovaná s vyšším rizikem výskytu AML [11]. Zvýšený výskyt AML byl také prokázán u dětí, jejichž matky byly v těhotenství exponovány pesticidům nebo alkoholu [12, 13].

Fyzikální a chemické faktory jsou faktory, které provází všechna onemocnění a není tomu jinak ani tady. Z fyzikálních faktorů se na vzniku onemocnění podílí ionizující záření. Záření má akutní i chronické účinky na hematopoézu a výskyt leukémie je v tomto případě dřívějším projevem než jiné malignity [14]. Mezi fyzikální faktory řadíme i specifickou postterapeutickou nebo sekundární AML, která vzniká u pacientů podstupující celotělové ozařování v rámci léčby nebo přípravy na operace. K chemickým látkám řadíme také cytotoxickou léčbu v rámci cytotoxické terapie ostatních nádorů jako látky alkylující, inhibitory topoizomerázy nebo antimetabolity [15].

3.1.4 FLT3 mutace

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) je protein ze skupiny tyrosinkináz, který se vyskytuje především u HSC a nezralých stádií krevních buněk a podílí se na jejich proliferaci a diferenciaci. Za normálních okolností reaguje na přítomnost svého specifického ligandu a posílá signál dále ve své signální dráze. Mutace ve *FLT3* genu způsobují neustálou aktivaci FLT3 receptoru, což vede k nadměrné a nekontrolované proliferaci leukemických buněk a také k inhibici jejich apoptózy [16].

K mutaci ve *FLT3* genu může docházet buď vnitřní tandemovou duplikací (*FLT3-ITD*) nebo bodovou mutací (*FLT3-TKD*), která nastává především v tyrosinkinázové doméně FLT3 receptoru. *FLT3* mutace jsou jedny z nejčastěji se vyskytujících mutací u AML pacientů, přičemž *FLT3-ITD* postihuje až 30 % pacientů, zatímco *FLT3-TKD* se vyskytuje jen přibližně u 7-10 %. Pacienti s *FLT3-ITD* mutací mají výrazně horší prognózu, nižší odezvu na indukční terapii, větší riziko relapsu, a tedy i nižší pravděpodobnost plného vyléčení. Právě kvůli nepříznivým prognostickým vlastnostem, které sebou nesou *FLT3* mutace se intenzivně pracovalo na vývoji účinných léčiv, které by vedly k inhibici nadměrně

aktivního FLT3 receptoru. Na základě účinnosti a specifčnosti těchto léčiv rozlišujeme dvě generace FLT3 inhibitorů. První generace, která je méně selektivní a druhá generace, která je svým účinkem specifčtější (více v podkapitole 3.1.5.4) [17].

3.1.5 Léčba

Léčba AML je velmi náročná pro organismus, proto se při ní přihlíží k věku, celkovému zdravotnímu stavu pacienta a dalším faktorům jako jsou např. komorbidity. Pacienty pak dělíme na tzv. fit pacienty, kteří intenzivní terapii mohou podstoupit a non-fit pacienty, u kterých se volí méně intenzivní varianta léčby. Léčba AML se typicky začíná indukční chemoterapií (u fit pacientů) nebo paliativní léčbou (u non-fit pacientů), které mají za cíl zbavit se co možná nejvíce nádorových buněk pacienta. Po této fázi léčby následuje léčba konsolidační (nazývaná také post-remisní) cílící na nádorové buňky, které i po indukční/paliativní terapii zůstaly v krvi a dřeni pacienta. Jejím cílem je zbavit se těchto buněk a minimalizovat tak návrat aktivní nemoci. V této fázi může dojít také k autologní nebo alogenní transplantaci kmenových buněk pacienta [18].

3.1.5.1 Indukční & paliativní terapie

Indukční terapie u fit pacientů mladších 60 let je typicky kombinace dvou chemoterapeutických látek, a to cytarabinu a antracyklinu, nejčastěji daunorubicinu nebo idarubicinu. Tato kombinace se nazývá 7+3, co je odvozeno z jejich chemoterapeutického schématu, jelikož cytarabin se podává nepřetržitě po dobu 7 dní a antracyklin se spolu s cytarabinem podává první 3 dny v krátkých infuzích. V případech, kdy je u pacientů prokázána přítomnost *FLT3* mutace se po indukční terapii podává také léčivo cílící právě na tuto mutaci, a to midostaurin (blíže popsáno v podkapitole 3.1.5.4).

U pacientů spadajících do non-fit kategorie tato kombinace nemůže být použita, proto se volí jiná chemoterapeutika, např. hypometylační látky (decitabin nebo azacitidin), které se podávají samotné nebo v kombinaci s venetoklaxem. Po prvním cyklu chemoterapie se provádí vyšetření kostní dřene pacienta, které ukáže, zda se v ní stále vyskytují leukemické buňky. Pokud ano, uvedený

terapeutický cyklus se zopakuje. Pokud biopsie prokáže remisi, přechází se na léčbu konsolidační, která udržuje pacienta v remisi a brání návratu aktivní nemoci [19].

3.1.5.2 Konsolidační terapie

Jak již bylo zmíněno, konsolidační léčba vede ke zničení zbylých leukemických buněk a k zabránění návratu aktivní nemoci, tedy relapsu. Podobně jako při indukční/paliativní léčbě, i tady zohledňujeme zařazení pacientů do fit a non-fit kategorie. Také se ale zohledňuje prognóza jednotlivých pacientů, a tedy riziko návratu leukémie po indukční léčbě. Pacientům s nízkým rizikem se podávají vysoké dávky cytarabinu po dobu 5 dnů a to ve 3 až 4 cyklech, přičemž doba mezi jednotlivými cykly činí 4 týdny. V této mezifázi není pacient léčený cytarabinem. V případě, že pacient v indukční fázi dostával i midostaurin, tedy látku cílící na *FLT3* mutaci, doporučuje se v jeho podávání pokračovat i v konsolidační léčbě [20]. Pacientům s vysokým rizikem je ideální co možná nejdříve po dosažení remise transplantovat kmenové buňky, protože bylo prokázáno, že transplantace kostní dřeně u těchto pacientů snižuje riziko relapsu až na 50-55 %. Přednost se dává alogenní transplantaci, kdy jsou pacientovi podané kmenové buňky dárce. Pokud není možné najít vhodného dárce, volí se transplantace autologní, kdy se pacientovi podávají jeho vlastní kmenové buňky [21].

3.1.5.3 Relaps a refrakterní nemoc

Pokud pacient na indukční, resp. paliativní terapii neodpovídá, hovoříme o tzv. refrakterní nemoci, při které pacient není schopen dosáhnout remise. V případech, kdy výše uvedené způsoby léčby nejsou účinné a nedojde tak k úplné eradikaci leukemických buněk, se může aktivní nemoc vrátit a tehdy hovoříme o relapsu. V obou těchto případech se pacientům zkouší navodit remise vysokodávkovanou chemoterapií a následně transplantovat kmenové buňky. Ne vždy je tato varianta úspěšná, proto se často volí terapie specifická pro každého pacienta. Ta se určuje na základě různých charakteristik pacienta, nejčastěji na základě přítomných mutací. Příkladem jsou pacienti s detekovanou *FLT3* mutací, u kterých se používá gilteritinib (blíže popsáno v podkapitole

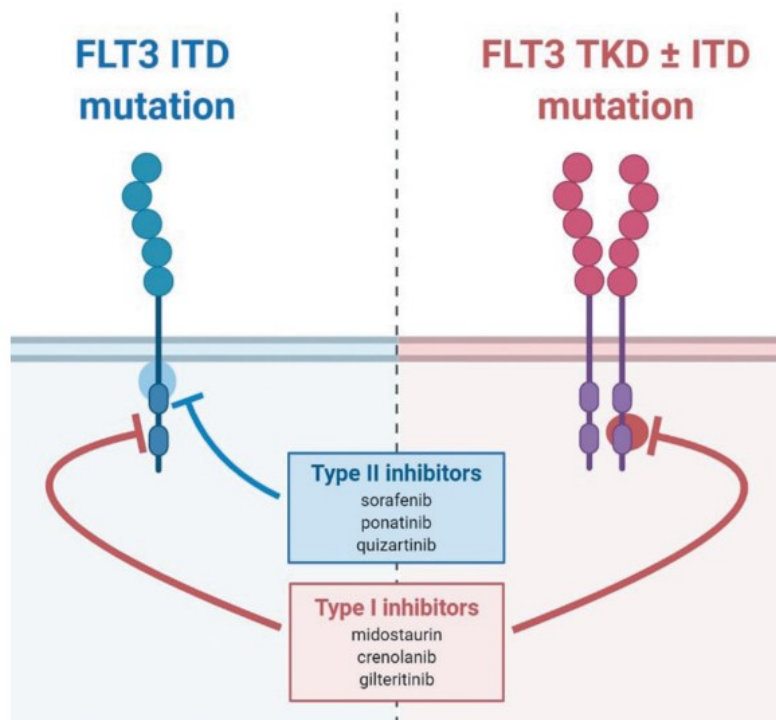
3.1.5.4) nebo pacienti s prokázanou *IDH1* mutací, kterým se podává ivosidenib. Pacientům trpícím relabující nebo refrakterní nemocí se doporučuje také zapojení do klinických studií, které testují mnohdy velmi slibné, ale zatím neschválené látky [22].

3.1.5.4 Cílená léčba inhibitory FLT3

Mimo standardní chemoterapeutika, které působí nescificky na všechny buňky organismu, zdravé i nádorové, se používají i léčiva cílené, které nepoškozují zdravé buňky. Tyto léčiva se liší svým mechanismem účinku a každé z nich cílí na svůj konkrétní cíl. Jedním z takových cílů jsou i specifické genové mutace častokrát vedoucí k pozměněné funkci proteinů, které kódují. V téhle diplomové práci se budeme věnovat léčivům blokujícím jednu z takových mutací, a to mutaci ve *FLT3* genu.

FLT3 inhibitory lze obecně rozdělit do dvou generací. Ta první je méně specifická, má širokou protikinázovou aktivitu a tím, že působí na vícero cílů, může být její terapeutický efekt doprovázen i různými vedlejšími účinky či toxickými účinky. Inhibitory první generace se silně vážou na plazmatické bílkoviny, což snižuje jejich účinnost a mají také kratší poločasy. Tyto vlastnosti mají za následek omezenou účinnost těchto léčiv v monoterapeutickém podání, proto se spíše využívají v kombinaci s jinými léčivy. Do této generace patří léčiva jako sunitinib, midostaurin nebo sorafenib. Druhá generace je na rozdíl od té první navržena tak, aby působila jenom na konkrétní cíle a tím pádem je u ní i snížené riziko vedlejších účinků. Patří do ní např. gilteritinib či quizartinib [23].

FLT3 inhibitory lze také rozdělit na základě jejich účinku vůči *FLT3*, a to na typ I a typ II. Pod typ I spadají léčiva, které působí na mutaci *FLT3*-ITD, ale i na *FLT3*-TKD (např. midostaurin, gilteritinib), zatímco typ II představují léčiva působící výlučně na *FLT3*-ITD (např. sorafenib či quizartinib) (Obr. 3).



Obr. 3. Rozdělení FLT3 inhibitorů na typ I a typ II. FLT3 inhibitory patřící k typu I (midostaurin, crenolanib, gilteritinib) působí na obě mutace vyskytující se u AML ve FLT3 genu (ITD i TKD), zatímco léčiva patřící k typu II (sorafenib, ponatinib, quizartinib) účinkují jenom na FLT3-ITD mutaci. Převzato z: [24].

Midostaurin

Midostaurin je řazen mezi FLT3 inhibitory typu I a působí tak proti mutacím ITD (interní tandemová duplikace) i TKD (tyrosinkinázová doména) ve FLT3 genu [25]. Další cíle, na které midostaurin působí, jsou PKC, VEGFR2, PDGFR nebo c-kit [26]. Midostaurin byl schválen pod výrobním názvem RYDAPT, a to v roce 2017 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou agenturou pro léky (EMA), pro léčbu nově diagnostikované AML s mutací ve FLT3 [27, 28]. Midostaurin se v léčbě používá spolu se standardní chemoterapií (cytarabin a daunorubicin), která se podává v terapeutickém schématu 7+3. Midostaurin se pacientům nasazuje po ní, tedy 8. až 22. den léčby. Midostaurin se nepodává současně s chemoterapií kvůli nepříznivé gastrointestinální snášenlivosti. Stejně tak se používá v konsolidační léčbě AML spolu s chemoterapií [29].

Gilteritinib

Gilteritinib patří do druhé generace FLT3 inhibitorů a svou specifickou aktivitou vůči *FLT3*-ITD spadá pod typ II FLT3 inhibitorů. Doposud je jediným schváleným inhibitorem druhé generace. V klinické praxi je používán jako monoterapie pro léčbu relabované a refrakterní AML s prokázanou *FLT3* mutací pod výrobním názvem Xospata [30]. Pro tuto indikaci byl schválen v roce 2018 regulační autoritou FDA a v roce 2019 EMA [31,32]. Vzhledem ke stále rostoucímu množství FLT3 pozitivních pacientů nereagujících na midostaurin se volí gilteritinib jako další volba v terapii FLT3⁺ AML. Gilteritinib je selektivnější než midostaurin, nepůsobí jenom na FLT3. Mezi jeho terapeutické cíle patří také AXL, ALT nebo ALK. Navázáním gilteritinibu na tyto tyrosinkinázové receptory dochází k inhibici jejich funkce a jejich signalizace, což má za následek sníženou proliferaci anebo zvýšenou apoptózu nádorových buněk. Co se jeho farmakologických vlastností týče, méně se váže na plazmatické bílkoviny, a proto je i účinnější, má dlouhý plazmatický poločas a jeho plazmatická koncentrace v ustáleném stavu je 282 ng/mL. Jeho plný účinek a ustálení plazmatické koncentrace nastává 15. den léčby [33].

Sunitinib

Sunitinib je dalším z inhibitorů FLT3, který vstoupil na trh v roce 2006 v USA a v roce 2007 v Evropské Unii [34, 35]. Používá se v léčbě solidních nádorů jako jsou např. gastrointestinální tumor žaludku a střeva nebo nádor slinivky břišní, dále při selhání léčby jinými protinádorovými léčivy, a v roce 2017 byl FDA indikován k adjuvantní léčbě renálního karcinomu [36]. Sunitinib je multikinázový inhibitor působící na VEGFR-2, PDGFR, FLT3, KIT [37]. I u sunitinibu vzniká v léčbě rezistence a nedávno byl popsán jeden z jejích mechanismus, kterým je lysozomální sekvestrace léčiva. Sunitinib je slabě bazické léčivo, které proniká do kyselých lysozomů a tam se sekvestruje a tím ho buňky zadržují, tudíž na ně nemůže působit protinádorově a tlumit jejich další dělení [38].

3.2 Rezistence v léčbě akutní myeloidní leukemie

Leukemické buňky jsou mimořádně odolné a vysoce heterogenní, proto je velmi náročné na ně úspěšně terapeuticky zacílit. Terapie navíc mnohdy není dostatečně úspěšná. Jednou z nejčastějších příčin, proč chemoterapie u nádorových onemocnění včetně AML selhává je vyvinutí lékové rezistence leukemickými buňkami. Ty jsou schopny si vytvořit vysokou odolnost jak na chemoterapeutika používaná v první řadě léčby, tak i na cílená léčiva z řad FLT3 inhibitorů.

Fenomén rezistence představuje obrovský problém, jelikož i krátce používaná léčiva přestávají v organizmu pacientů adekvátně účinkovat. Příkladem je midostaurin patřící do skupiny FLT3 inhibitorů, který byl schválen pro léčbu FLT3-mutované AML v roce 2017 a už pár let se zkoušejí různé kombinace léčiv, které by zvýšili jeho účinnost či způsoby, kterými zabránit rozvoji rezistence či umožnit její překonání. Dalším příkladem je gilteritinib, také ze skupiny FLT3 inhibitorů, který se volí častokrát u pacientů neodpovídajících právě na midostaurin. Avšak už i u pacientů léčených gilteritinibem byla pozorována vyvíjející se rezistence na toto léčivo.

Rezistenci k inhibitorům FLT3 můžeme rozdělit na primární (vrozenou) a sekundární (získanou). Při primární rezistenci je účinkům FLT3 inhibitorů zabráněno již při počátečním podávání. Tento efekt závisí na přítomnosti ligandů FLT3, stromálním výskytu CYP3A4 a také na aktivaci dalších signálních drah. K sekundární rezistenci dochází v důsledku mutací přímo ve *FLT3* genu (tzv. „on-target“ rezistence) nebo na místech jiných než FLT3 (tzv. „off-target“ rezistence). U FLT3 inhibitorů typu II byly doposud popsány sekundární bodové mutace v kinázové doméně FLT3 receptoru jako nejčastěji se vyskytující. Uvedené mutace byly pozorovány i u pacientů léčených gilteritinibem, ale v poslední době se objevují studie, které zaznamenaly rezistenci zprostředkovanou i jinými buněčnými mechanismy [39].

3.2.1 Lysozomy

Lysozomy jsou intracelulární orgány, které mají kyselé prostředí a obsahují kyselé hydrolázy a proteiny specificky asociované na membráně. Kyselé prostředí lysozomů je udržováno V-ATPázou a je nezbytné pro optimální činnost hydroláz. Funkce lysozomu není jen degradační, ale má i významnou roli v několika patologických stavech jako kardiovaskulární onemocnění, Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza nebo nádorové onemocnění [40].

3.2.1.1 Lysozomální sekvestrace

Lysozomální sekvestrace léčiv neboli zachycení léčiv je důležitým mechanismem získání rezistence k chemoterapeutikům. Většina používaných chemoterapeutik jsou lipofilní, slabě bazická a volně difundují přes membrány včetně plazmatické a lysozomální, nebo jsou alternativně transportována dovnitř obrácenými efluxními transportéry s nadrodiny ATP-vázajících transportérů. Kyselé prostředí lysozomů usnadňuje rychlou protonizaci slabě bazických léčiv, a to snižuje schopnost procházet membránou zpět z lysozomů, tím dochází k výrazné lysozomální akumulaci. Chemoterapeutika, která jsou sekvestrována v lysozomech, jsou spojená s jevy lékové rezistence a patří mezi ně inhibitory tyrosinkináz, antimetabolity, alkylační látky, inhibitory topoizomeráz. Lysozomy jsou zřídka kdy cílem působení chemoterapeutik, a proto lysozomální sekvestrace snižuje subcelulární distribuci a tím snižuje i účinnost léčby [41].

4 CÍLE

Cílem mé diplomové práce bylo charakterizovat gilteritinib-rezistentní buněčnou linii HL-60 g75, která byla vytvořena v laboratořích Výzkumné skupiny buněčné farmakologie & onkologie, na Farmaceutické fakultě UK, a to z pohledu:

- míry a stability rezistence vůči gilteritinibu,
- odpovědi na gilteritinib v souvislosti změn fází v buněčném cyklu a pohotovosti buněk k apoptóze,
- možnosti zkřížené rezistence k vybraným léčivům – midostaurin a sunitinib
- možné role lysozomů v rezistenci ke gilteritinibu.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál a metody

5.1.1 Chemikálie

- Roswell Park Memorial Institut (RPMI) Medium, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Fetální bovinní sérum (FBS), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Trypanová modř, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Fosfátový pufr (PBS), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Roztok 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolin bromid (MTT), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Isopropanol, Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Absolutní etanol, Penta Chemicals (Praha, Česká republika)
- Propidium jodid (PI), Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- RNáza A, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Gilteritinib, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Sunitinib, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Midostaurin, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- LysoTracker™ Deep Red, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

5.1.2 Přístroje

- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- Centrifugy Hettich Universal 32R & Hettich Mikro 22R (A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo)
- Centrifuga Boeco C-28 (Boeckel+Co GmbH+Co, Hamburg, Německo)
- Reader mikrodestiček Hidex Sense Beta Plus 425-311 (Hidex, Francie)
- Spektrální analyzátor SONY SA3800 (SONY Biotechnology, San Jose, CA, USA)
- Automatizovaná počítačka buněk Bio-Rad TC20™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

5.1.3 Buněčné linie

V našich experimentech byly použity leukemické buňky zvané HL-60 (dále označovány jako HL-60 wt), které byly získané z periferní krve 36leté ženy trpící akutní promyelocytární leukémií [42]. Buňky byly poskytnuty Dr. Balaszem Sarkadim z Maďarské akademie věd v Budapešti. Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI s L-glutaminem a 10 % při standardních kultivačních podmínkách (37 °C, 5 % CO₂) [43].

Buněčnou linii HL-60 g75 jsme získali dlouhodobým kultivováním výše uvedených HL-60 wt v přítomnosti gilteritinibu, kdy se v čase postupně zvyšovala jeho koncentrace v kultivačním médiu. Nejprve se stanovila hodnota IC₅₀ pro gilteritinib na HL-60 wt na základě které se určila výchozí koncentrace gilteritinibu pro vytvářenou HL-60 g75. Tato koncentrace odpovídala 20 % stanovené IC₅₀. V průběhu kultivace se koncentrace gilteritinibu zvyšovala vždy o 5 % každé 2-3 týdny, dokud buňky nevykazovali maximální možnou rezistenci ke gilteritinibu. Této maximální rezistence jsme dosáhli při koncentraci 1,8 µM, co odpovídalo 75 % stanovené IC₅₀. Tato koncentrace pro buňky nebyla toxická a další navýšení už nevedlo ke zvýšení rezistence HL-60 buněk vůči gilteritinibu. Vytvořená buněčná linie HL-60 g75 byla kultivována v RPMI obohaceném o L-glutamin, 10 % FBS a 1,8 µM roztok gilteritinibu. Její rezistence vůči gilteritinibu byla pravidelně testována pomocí MTT testu (viz podkapitulu 5.1.4).

5.1.4 MTT test

5.1.4.1 Princip metody

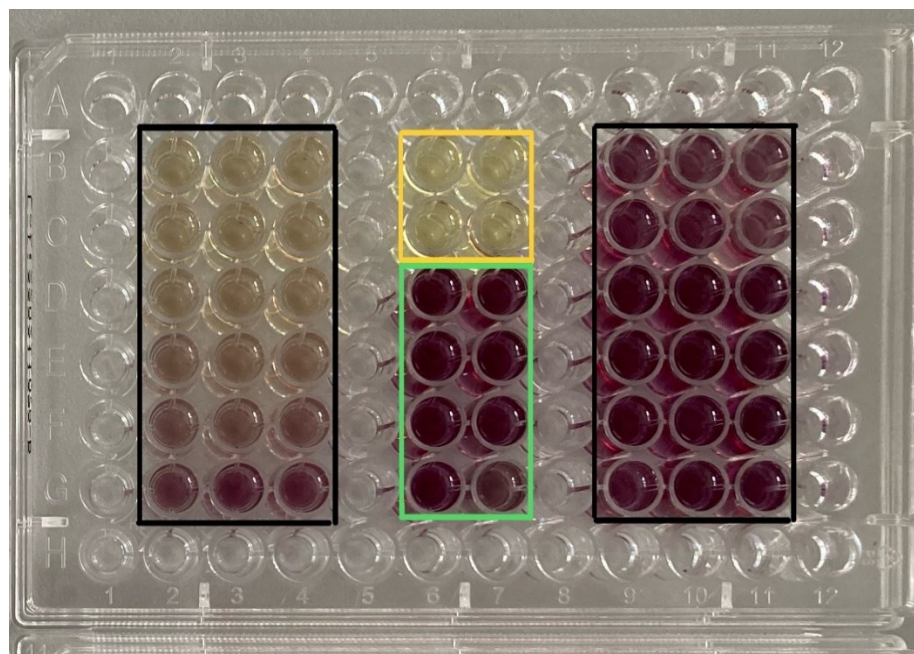
MTT test je kolorimetrický test, který určuje metabolickou aktivitu buněk. Principem tohoto testu je přeměna žluté tetrazolinové soli MTT na fialové krystaly formazanu, ke které dochází prostřednictvím oxidoreduktáz. Tuto přeměnu jsou schopné zajistit pouze mitochondrie živých buněk, proto je díky tomuto testu možné odlišit životaschopné buňky (zbarveny do fialova) od těch mrtvých (zbarveny do žluta). Tento test lze také použít pro stanovení cytotoxicity potenciálních léčiv nebo pro stanovení jejich cytostatické aktivity [44].

5.1.4.2 Průběh metody

První den experimentu byly buňky HL-60 wt i HL-60 g75 překultivovány do kultivačního média (RPMI + 10 % FBS) bez přídavku gilteritinibu, aby se zamezilo zkreslení výsledků v důsledku jeho pozůstatků v kultuře. Po 24 h byly obě buněčné linie nasazeny na 96jamkovou destičku v koncentraci 9000 buněk/jamku a v konečném objemu 150 μL /jamku. Čtyři jamky obsahovaly 150 μL samotného kultivačního média RPMI obohaceného o 10 % FBS a sloužily jako negativní kontrola (viz Obr. 4). Do osmi jamek bylo přidáno 150 μL jednotlivých buněčných linií v požadované koncentraci, které sloužily jako pozitivní kontrola. Do dalších 32 jamek bylo napipetováno dvanáct triplikátů s postupně se snižujícími koncentracemi testovaných léčiv, a to v objemu 30 μL . K těmto léčivům bylo následně přidáno 120 μL jednotlivých buněčných suspenzí v požadovaných koncentracích. Do zbylých jamek bylo napipetováno 150 μL PBS, aby se předešlo evaporaci jednotlivých jamek. Takto připravené destičky se nechaly inkubovat 96 h při standardních kultivačních podmínkách (37 °C / 5 % CO₂).

Po této inkubaci bylo do každé jamky kromě těch s PBS přidáno 15 μL MTT činidla (5 mg/ μL). MTT je fotosenzitivní, proto celé pokračování experimentu bylo prováděno ve tmě. Buňky se spolu s MTT činidlem nechaly lehce promíchat po dobu 5 min na třepačce a poté byly inkubovány 4 h ve tmě (37 °C / 5 % CO₂). Poté bylo ke všem jamkám přidáno 150 μL isopropanolu, který byl předem okyselený 2M HCl, čím došlo k rozpuštění vytvořených formazanových krystalů.

Destičky se nechaly 10 min stát a následně byla změřena jejich absorbance při vlnových délkách 540 nm a 720 nm na multidetekčním destičkovém systému zvaném Hidex Microplate Reader. Ze získaných hodnot se následně stanovila hodnota IC_{50} označující koncentraci testované látky, která způsobila 50% inhibici růstu buněk.



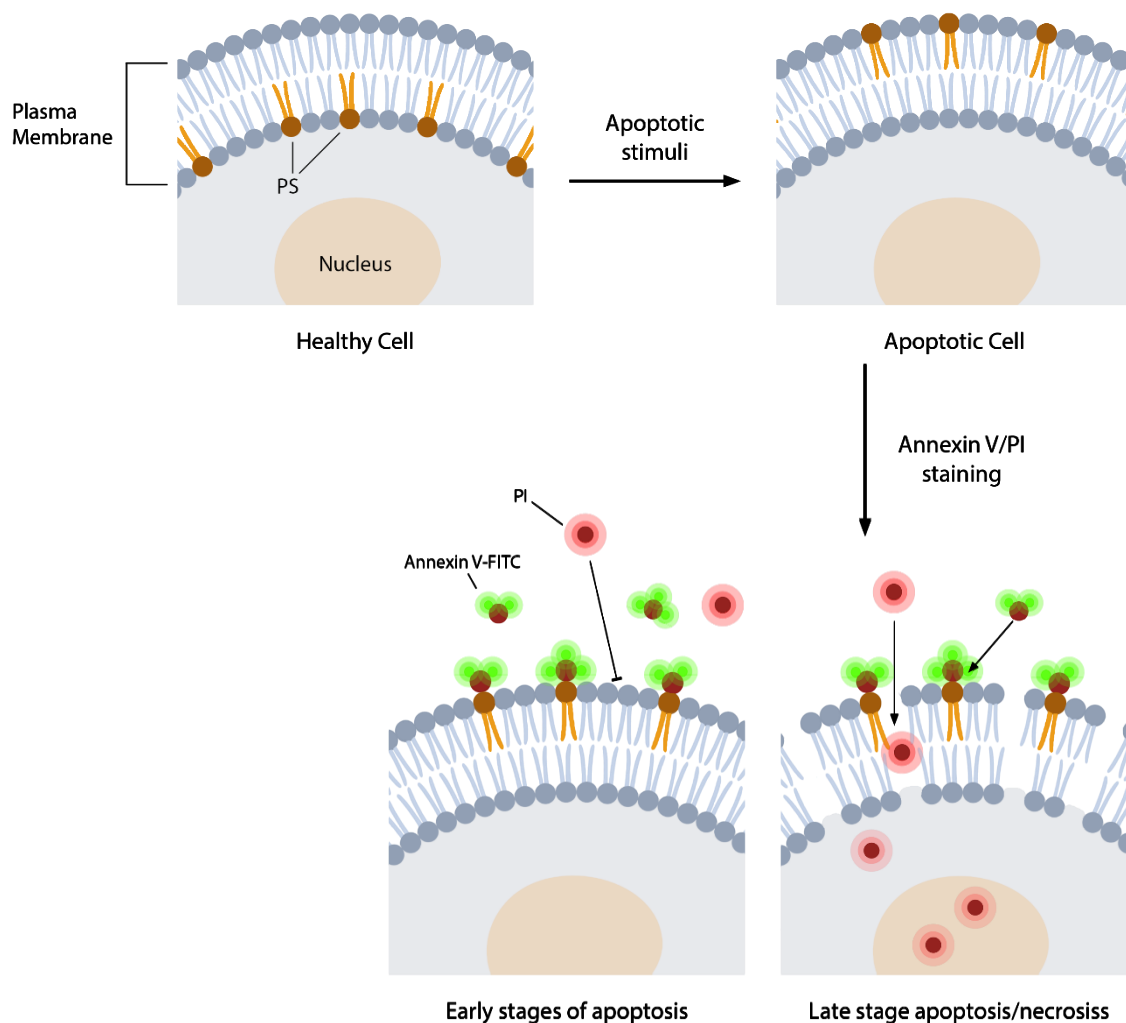
Obr. 4. Vzorový příklad napipetované destičky pro MTT test. Na vyobrazené 96jamkové destičce jsou žlutě znázorněny jamky, které obsahovaly negativní kontrolu (samotné kultivační médium bez buněk), zelená představuje jamky s pozitivní kontrolou (buňky v kultivačním médiu) a černou jsou znázorněny jamky, ve kterých byly buňky vystavené testované látce (gilteritinibu, midostaurinu nebo sunitinibu). U každé z testovaných látek byla použita koncentrační řada, přičemž nejvyšší koncentrace byla napipetována do levé horní části destičky a ta nejnižší do pravé spodní části. Všechny ostatní jamky byly vyplněny PBS.

5.1.5 Apoptóza a buněčný cyklus

5.1.5.1 Princip metody – apoptóza

Apoptóza je programovaná smrt buňky, která slouží k odstranění nepotřebných, poškozených nebo nesprávně fungujících buněk. Navozena může být několika faktory, např. porušením DNA, úbytkem růstových faktorů, radiací nebo ligandy, které se vážou na membránové a cytoplazmatické receptory. Samotný proces apoptózy je spuštěn nejčastěji vnější nebo vnitřní cestou. Při té vnitřní dochází k poškození mitochondrií, zatímco vnější cesta začíná na cytoplazmatické membráně a souvisí s aktivací imunitních buněk jako jsou T-lymfocyty či NK-buňky [45]. Buňky podléhající apoptóze se vyznačují specifickými morfologickými změnami jako je smrštění buňky, rozklad cytoskeletu či pyknóza chromatinu. Jednou z takových změn je i externalizace fosfolipidu zvaného fosfatidylserin (PS), který se za normálních okolností vyskytuje výhradně na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. V procesu apoptózy je vystaven na její vnější straně a slouží jako tzv. „eat-me“ signál, díky kterému je buňka rozpoznána fagocyty a následně zlikvidována [46].

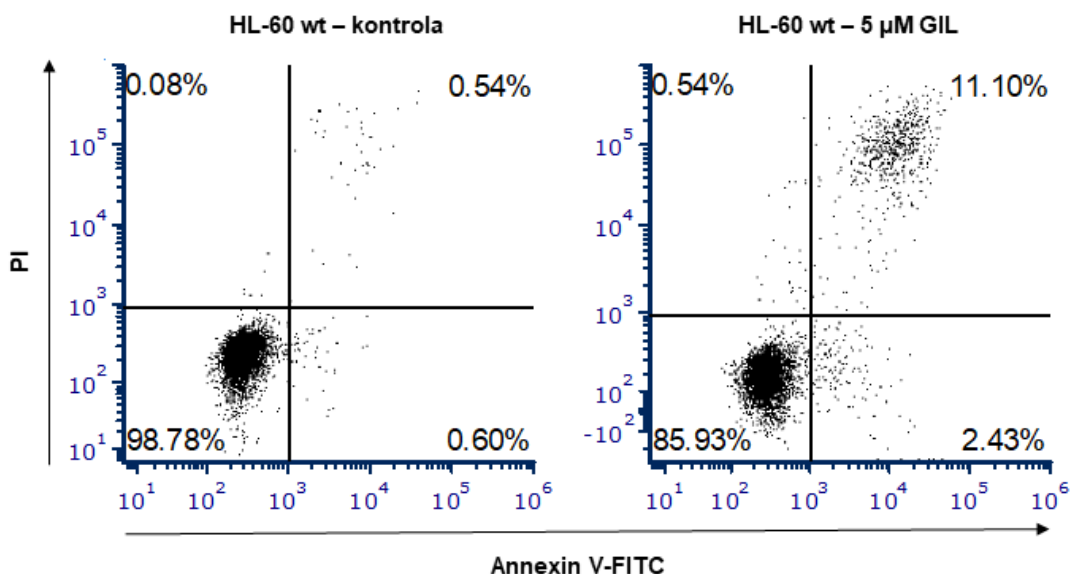
V této diplomové práci jsme apoptózu detekovali právě prostřednictvím externalizovaných PS, na které se váže protein annexin V konjugovaný s fluorescenčním barvivem fluoresceinem (FITC). Pomocí annexin V-FITC jsme schopni odlišit buňky v brzké apoptóze od těch zdravých, jelikož annexin V není schopen přestupovat membránou buňky a vázat se na PS lokalizované na její vnitřní straně. Avšak v případech nekrózy, kdy dojde k narušení buněčné membrány se annexin V dostává i dovnitř buňky a váže se i na tyto PS. Tím může dojít k falešné pozitivitě, proto se buňky současně značí také PI. Toto barvivo vážící se na jadernu DNA se dostane jedině do buněk s narušenou membránou, zatímco buňky s neporušenou membránou zůstávají pro PI neprostupné (Obr. 5) [47, 48].



Obr. 5. Princip značení apoptotických buněk pomocí annexin V/PI.

U zdravých buněk je fosfatidylserin (PS) na vnitřní straně membrány. Pokud buňka přechází do apoptózy vystavuje PS zbytky na vnější stranu a tím pádem jsou k dispozici annexinu V konjugovanému s fluoresceinem FITC (annexin V-FITC), který se na PS naváže. Takto označené buňky představují buňky v brzké apoptóze. U pozdní apoptózy se nejen annexin V-FITC váže na PS zbytky, ale dochází také k navázání propidium jodidu (PI) na nukleové kyseliny buňky. Buňky v pozdní apoptóze mají totiž narušenou buněčnou membránu a umožní PI dostat se dovnitř buňky, který není schopen přejít do neporušených buněk. Převzato a upraveno z [49].

Na základě značení pomocí annexin V-FITC a PI můžeme tedy identifikovat čtyři populace buněk (Obr. 6),



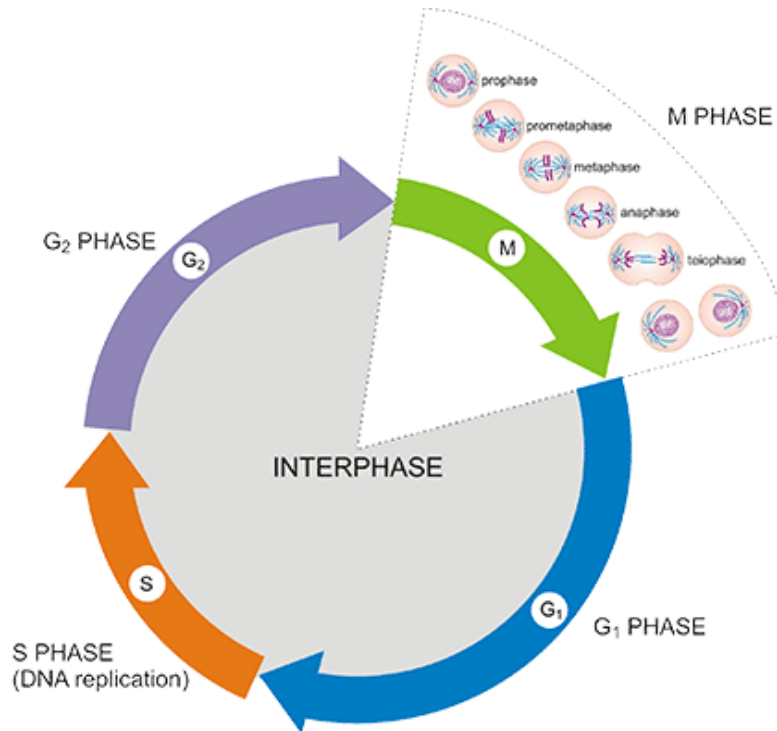
Obr. 6. Dvoupparametrový graf neboli „dot plot“ znázorňující apoptotické buňky. Buňky životaschopné jako annexin V-FITC negativní / PI negativní, buňky v brzké apoptóze jako annexin V-FITC pozitivní / PI negativní, buňky v pozdní apoptóze jsou annexin V-FITC pozitivní / PI pozitivní a nekrotické buňky jsou annexin V-FITC negativní / PI pozitivní.

5.1.5.2 Princip metody – buněčný cyklus

Buněčný cyklus je období, kterým buňka přechází mezi svými děleními (Obr. 7). Je tvořen několika procesy, které mohou být rozděleny do těchto fází:

- Interfáze – je charakterizována přípravou na vlastní dělení buňky a zdvojováním genetického materiálu. Nachází se tu kontrolní body, které mají za úkol zkontrolovat připravenost buňky před vstupem do další fáze buněčného cyklu. Skládá se ze tří fází:
 - G1 fáze – dochází ke zdvojení buněčné hmoty, k růstu buňky a k přípravě na replikaci DNA (tvorba RNA a proteinů, nukleotidů a enzymů),
 - S fáze – dochází k replikaci DNA,
 - G2 fáze – genetický materiál se zhušťuje a připravuje se na rozdělení na dvě identické části.

- Mitóza (M fáze – dochází zde k rozdělení jádra s identickým genetickým materiálem a rozdělení samotné buňky do dvou dceřiných buněk. Cyklus se touhle fází uzavírá a začíná znovu [50].



Obr. 7. Buněčný cyklus. Převzato z: [51].

Ke kontrole správného fungování buněčného cyklu slouží buňce kontrolní uzly, přičemž těmi nejdůležitějšími jsou uzly G₁ a G₂. Tyto kontrolní body zabezpečují, že k přesunu buňky do další fáze dojde až po dokončení všech potřebných procesů v dané fázi. Důležitou funkci kontrolních bodů je také monitorovat poškození DNA během interfáze. Jakmile je zaznamenáno poškození DNA, kontrolní body pozastaví buněčný cyklus a iniciují opravu DNA nebo u buňky naprogramují buněčnou smrt. Dalšími důležitými procesy, které kontrolní body sledují jsou ztráta replikační vidličky v S fázi a sestavení dělicího vřeténka během M fáze.

Pro rozlišení jednotlivých fází buněčného cyklu se využívá PI, což je fluorescenční barvivo, které se stechiometricky váže na DNA. Vzhledem k tomu, že v každé fázi buněčného cyklu je jiné množství DNA, můžeme snadno identifikovat buňky v G₁, S i G₂ fázi. Před samotným barvením a vlastním měřením musí být vzorek fixován ledovým 70% etanolem, aby se předešlo lýze

buněk a autolytické degradaci, a zároveň se permeabilizovala membrána buněk, co umožní PI vstoupit do buňky a navázat se na DNA [52].

5.1.5.3 Průběh metod – apoptóza + buněčný cyklus

Podobně jako u MTT testu, i v případě detekce apoptózy a buněčného cyklu byly buňky HL-60 wt a HL-60 g75 překultivovány do kultivačního média (RPMI + 10 % FBS) bez přídavku gilteritinibu. Po 24 h byly buněčné linie nasazeny na 12jamkovou destičku v koncentraci $0,5 \times 10^6$ buněk/jamku pro 24 h inkubaci nebo v koncentraci $0,25 \times 10^6$ buněk/jamku pro 48 h inkubaci v konečném objemu 1 mL. V každém pokusu byla na destičku zařazena jamka se samotnými buňkami, která sloužila jako negativní kontrola. K ostatním jamkám obsahujícím buněčnou suspenzi se přidala koncentrační řada gilteritinibu (1, 3, 5, 10 μM) Takto připravené destičky byly inkubovány po dobu 24 nebo 48 h při 37 °C / 5 % CO₂.

Po inkubaci byl objem každé jamky rozdělen do připravených zkumavek pro analýzu apoptózy a buněčného cyklu. Pro detekci apoptózy bylo z každé jamky odebráno 200 μL , které se promyly 3 mL PBS a stočili po dobu 5 min při 200 g. Mezitím se připravil annexin vázící pufr (annexin binding buffer, ABB) obsažený v „Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit“, který byl použit v následujících krocích experimentu. Buňky se ještě jednou promyly, tentokrát v 200 μL ABB a nechaly se stočit po dobu 5 min při 200 g. Poté se k buňkám přidalo 200 μL roztoku annexin V-FITC v ABB, a to v poměru 1:40. Vzorky byly inkubovány 1 h ve tmě. Po inkubaci byly vzorky promyty 200 μL ABB a centrifugovány 5 min při 200 g. Následně se k buňkám přidalo 400 μL PBS a 10 μL PI (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Vzorky byly okamžitě změřeny na průtokovém cytometru pomocí laseru o vlnové délce 488 nm (excitační/emisná [ex./em.] vlnová délka pro FITC – 488/530 nm, pro PI – 488/620 nm).

Pro detekci buněčného cyklu bylo z každé jamky odebráno 800 μL . Buňky se promyly 1,5 mL PBS a stočily po dobu 5 min při 200 g. K peletě byl přidán 1 mL ledového 70% etanolu, a to po kapkách a za stálého míchání. Buňky se nechaly stát přes noc v lednici (4 °C), aby se zajistila jejich fixace. Na další den byly buňky dvakrát promyty v PBS. Při prvním promytí bylo přidáno 2 mL PBS

a buňky byly centrifugovány 5 min při 200 g, při druhém promytí bylo přidáno 3 mL PBS a opět centrifugováno 5 min při 200 g. Poté se k buněčným peletám přidalo 50 μ L RNasy o koncentraci 100 μ g/mL, aby se v následujícím kroku zamezilo nespecifické vázání PI na nukleové kyseliny. Vzorky se nechaly inkubovat 30 min při 37 °C / 5 % CO₂ a poté se k nim přidalo 200 μ L 50 μ g/mL PI. Vzorky byly okamžitě analyzovány na průtokovém cytometru s laserem o vlnové délce 488 nm (ex./em. vlnová délka pro PI – 488/620 nm).

5.1.6 Akumulace lysozomální sondy a sunitinibu

5.1.6.1 Princip metody

Akumulační studie jsou založeny na sledování intenzity fluorescence testovaných látek, v našem případě sunitinibu a lysozomální sondy zvané LysoTracker™ Deep Red (dále LysoTracker). Sunitinib byl v našich experimentech použit jako alternativa gilteritinibu, jelikož má porovnatelné fyzikálně-chemické vlastnosti jako gilteritinib, podléhá lysozomální sekvestraci a na rozdíl od gilteritinibu vykazuje fluorescenční vlastnosti.

LysoTracker je slabě zásaditý amin, který se hromadí v buněčných organelách s nízkým vnitřním pH jako jsou lysozomy. Tato selektivní fluorescenční sonda je schopna volně přecházet buněčnou membránou, proto slouží jako výborný nástroj na sledování těchto kyselých buněčných organel. Jakmile se LysoTracker dostane do kyselého prostředí, dochází k jeho protonizaci a retenci v těchto organelách [53].

5.1.6.2 Průběh metody

Koncentrace 5×10^5 buněk/mL byla použita pro obě linie HL-60 wt i HL-60 g75. K 300 μ L buněčné suspenze byl přidán 300 nM LysoTracker nebo koncentrační řada sunitinibu (1, 5, 10, 20 μ M) a vzorky byly inkubovány 1 h při 37 °C/ 5 % CO₂. Do každého pokusu byl zařazen jeden vzorek, který obsahoval samotné buňky a sloužil jako negativní kontrola. Po inkubaci byly vzorky dvakrát omyty 2 mL PBS a stočeny po dobu 5 min při 200 g. Následně bylo k buňkám přidáno 400 μ L PBS, 10 μ L PI (20 μ g/mL) a vzorky byly okamžitě analyzovány na průtokovém cytometru za použití laserů 488 a 638 nm v případě LysoTrackeru

a 405 a 488 nm v případě sunitinibu (ex./em. vlnové délky pro Lysotracker – 638/670 nm, pro PI – 488/620 nm a pro sunitinib – 420/470 nm). Jen živé buňky byly použité pro analýzu

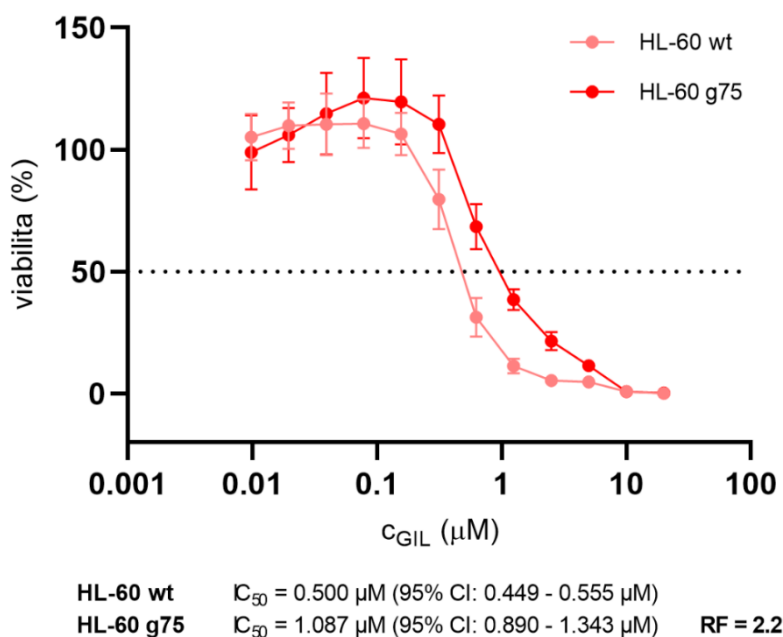
5.1.7 Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). MTT testy byly vyhodnoceny pomocí nelineární regrese, zatímco apoptóza a akumulární studie s Lysotrackerem i sunitinibem byly analyzovány pomocí nepárového *t*-testu. Všechna data jsou prezentována jako průměr alespoň třech nezávislých měření \pm směrodatná odchylka (SD). Statisticky významné hodnoty byly označeny následovně: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

6 VÝSLEDKY

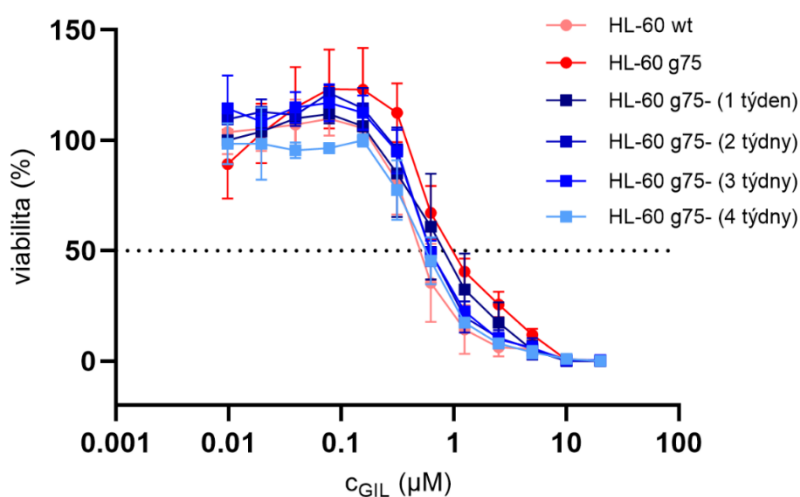
6.1 Rezistence HL-60 g75 vůči gilteritinibu a její stabilita

K ověření, zdali si námi vytvořená linie HL-60 g75 vyvinula rezistenci vůči gilteritinibu, jsme využili MTT test. Touto metodou jsme stanovili hodnotu IC_{50} pro gilteritinib u obou linií (HL-60 wt i HL-60 g75), což je koncentrace gilteritinibu, při které došlo k 50% inhibici růstu buněk. Výsledky ukázali, že HL-60 g75 buňky byly méně citlivé vůči gilteritinibu ($IC_{50} = 1,087 \mu\text{M}$) než linie HL-60 wt ($IC_{50} = 0,500 \mu\text{M}$). Poměrem jejich hodnot IC_{50} jsme získali tzv. rezistenční faktor (RF), který nám říká o kolik rezistentnější jsou buňky HL-60 g75 oproti HL-60 wt. V našem případě se RF rovnal 2,2, což znamená, že pro 50% inhibici růstu HL-60 g75 byla potřebná 2,2-násobně vyšší koncentrace gilteritinibu než pro HL-60 wt (Obr. 8).



Obr. 8. Proliferační schopnost HL-60 wt senzitivní linie a HL-60 g75 rezistentní linie po 96 h inkubaci s gilteritinibem provedena MTT testem. Buňky rezistentní ke gilteritinibu HL-60 g75 vykazují rezistenci s rezistenčním faktorem (RF) 2,2. Rezistenční faktor je poměr IC_{50} rezistentní ku IC_{50} senzitivní linie, které jsou uvedeny v obrázku. Uvedené výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm SD z nejméně 3 nezávislých měření a na obrázku jsou uvedeny intervaly spolehlivosti (CI), metoda byla hodnocena nelineární regresí.

Po prokázání rezistence HL-60 g75 na gilteritinib nás zajímalo, nakolik stabilní tato rezistence je. Buněčné linii HL-60 g75 jsme vysadili gilteritinib a každý týden jsme prováděli MTT a sledovali, jestli dochází ke změnám v hodnotách RF, které vyjadřují poměr hodnot IC_{50} pro HL-60 g75 a HL-60 g75-. Jako HL-60 g75- byla označena právě linie, které byl vysazen gilteritinib. Výsledky vyobrazeny na Obr. 9 níže ukazují, že RF každým týdnem klesal, a tedy i rezistence vůči gilteritinibu se postupem času ztrácela. Už po čtyřech týdnech od vysazení gilteritinibu se HL-60 g75- přiblížili svou hodnotou IC_{50} parentním buňkám HL-60 wt. Tyto výsledky tedy ukázali, že HL-60 g75 si vytvořili dočasnou rezistenci vůči gilteritinibu. Jelikož se tato rezistence už po čtyřech týdnech zcela vytratila, můžeme konstatovat, že k její vzniku nedošlo prostřednictvím mutací, které bývají spojeny výhradně s trvale přetrvávající rezistencí. V našem případě pravděpodobně došlo k ovlivnění obecných buněčných mechanismů, díky čemuž byly HL-60 g75 schopny lépe odolávat gilteritinibu.

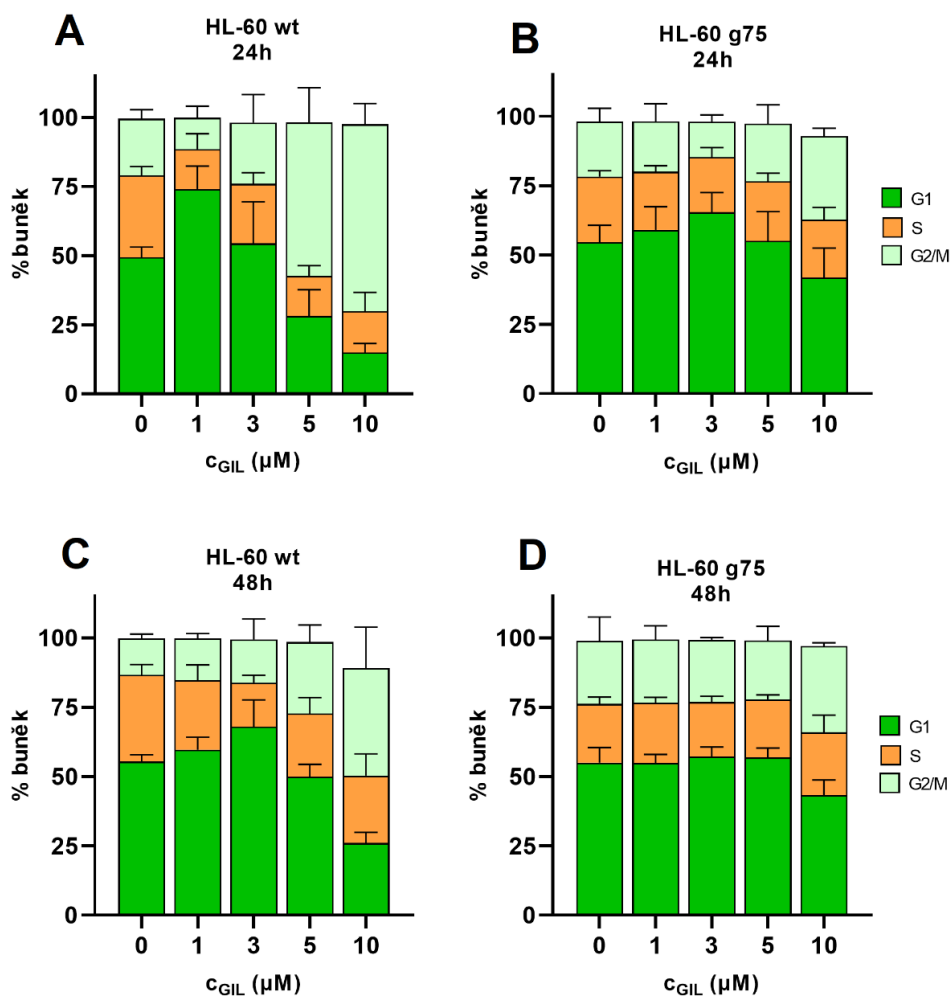


HL-60 wt	$IC_{50} = 0.532 \mu\text{M}$ (95% CI: 0.485 - 0.585 μM)	
HL-60 g75	$IC_{50} = 1.150 \mu\text{M}$ (95% CI: 0.926 - 1.444 μM)	RF = 2.2
HL-60 g75 (1 týden)	$IC_{50} = 0.861 \mu\text{M}$ (95% CI: 0.687 - 1.086 μM)	RF = 1.6
HL-60 g75 (2 týdny)	$IC_{50} = 0.680 \mu\text{M}$ (95% CI: 0.552 - 0.860 μM)	RF = 1.3
HL-60 g75 (3 týdny)	$IC_{50} = 0.691 \mu\text{M}$ (95% CI: 0.556 - 0.879 μM)	RF = 1.3
HL-60 g75 (4 týdny)	$IC_{50} = 0.587 \mu\text{M}$ (95% CI: 0.516 - 0.670 μM)	RF = 1.1

Obr. 9. Proliferační schopnost rezistentních buněk HL-60 g75. U buněk, které byly kultivovány bez léčiva, označeny jako HL-60 g75-, byla sledována stabilita rezistence. V čase můžeme sledovat pokles IC_{50} a RF, kdy po 4 týdnech dochází k poklesu hodnot až na úroveň senzitivních buněk HL-60 wt. Výsledky jsou prezentovaný jako průměry \pm SD alespoň 3 na sobě nezávislých měření. V obrázku jsou uvedeny hodnoty CI a metoda byla hodnocena nelineární regresí.

6.2 Efekt gilteritinibu na buněčný cyklus

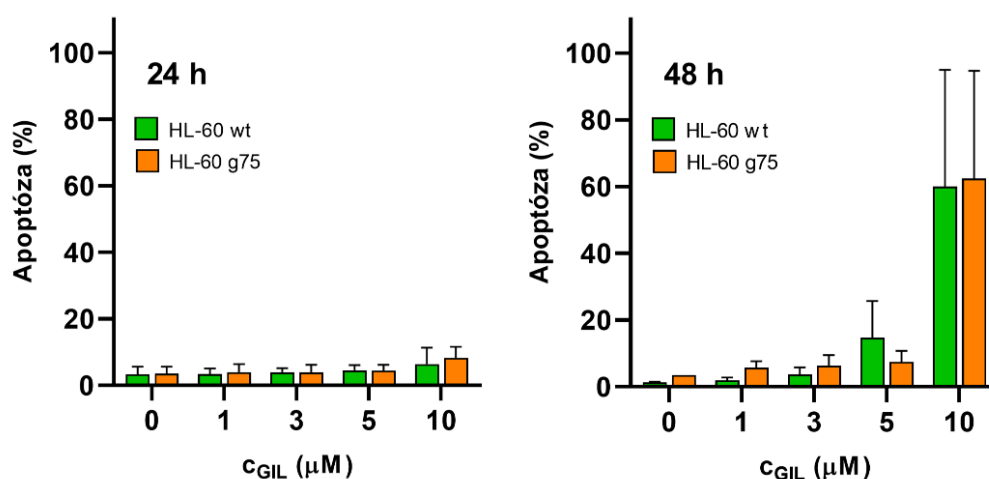
O gilteritinibu je známé, že zastavuje buňky v G1 fáze buněčného cyklu, proto nás zajímalo, jestli buňky dlouhodobě kultivované v jeho přítomnosti budou na něj reagovat jiným rozložením buněčného cyklu než ty, které v gilteritinibu kultivovány nebyly. HL-60 wt i HL-60 g75 byly vystaveny koncentrační řadě gilteritinibu a jejich odpověď byla zaznamenána po 24 h a 48 h. V případě HL-60 wt jsme po 24 h v nižší koncentraci gilteritinibu (1 μM) pozorovali markantní nárůst G1 fáze (Obr. 10 A), na rozdíl od HL-60 g75, kde bylo rozložení fází buněčného cyklu porovnatelné u všech koncentrací gilteritinibu a také s negativní kontrolou (Obr. 10 B). Mnohem výrazněji bylo tohle nezměněné rozložení pozorováno po 48 h inkubaci (Obr. 10 D). Co nás ale zaujalo, byl výrazný nárůst G2/M fáze u HL-60 wt po vystavení vyšším koncentracím gilteritinibu (5, 10 μM ; Obr. 10 A), což bývá mnohdy pozorováno u buněk vstupujících do apoptózy.



Obr. 10. Vliv gilteritinibu na buněčný cyklus. (A, C) Ovlivnění buněčného cyklu u senzitivní linie buněk (HL-60 wt), vyšší odpověď na gilteritinib dávají buňky po 24 h inkubaci. Můžeme vidět zvýšení G1 fáze už při nízké koncentraci (1 μM) po 24 h, oproti negativní kontrole je to až o $\frac{1}{4}$. Zároveň u senzitivní linie po 24 a 48 h narůstá zastoupení buněk v G2/M fázi při vyšší koncentraci (5 μM , 10 μM). (B, D) Buňky rezistentní ke gilteritinibu HL-60 g75 vykazují v rozložení fází po 24 i 48 h nízkou odpověď, což značí nízkou senzitivitu ke gilteritinibu. Všechny hodnoty jsou prezentovány jako průměry \pm SD alespoň 3 na sobě nezávislých měření.

6.3 Indukce apoptózy vlivem gilteritinibu

Na základě výsledků získaných z analýzy buněčného cyklu nás zajímalo, jestli nárůst G2/M fáze u HL-60 wt nevede k apoptóze buněk. HL-60 wt a HL-60 g75 byly vystaveny stejným koncentracím gilteritinibu a po stejnou dobu jako v případě analýzy buněčného cyklu. Po 24hodinové ani po 48hodinové vystavení obou buněčných linií gilteritinibu nebyli pozorovány žádné rozdíly v množství jejich apoptotických buněk (Obr. 11), proto budou s velkou pravděpodobností do vzniku rezistence HL-60 g75 zapojeny jiné mechanismy než ty spojené s apoptózou.

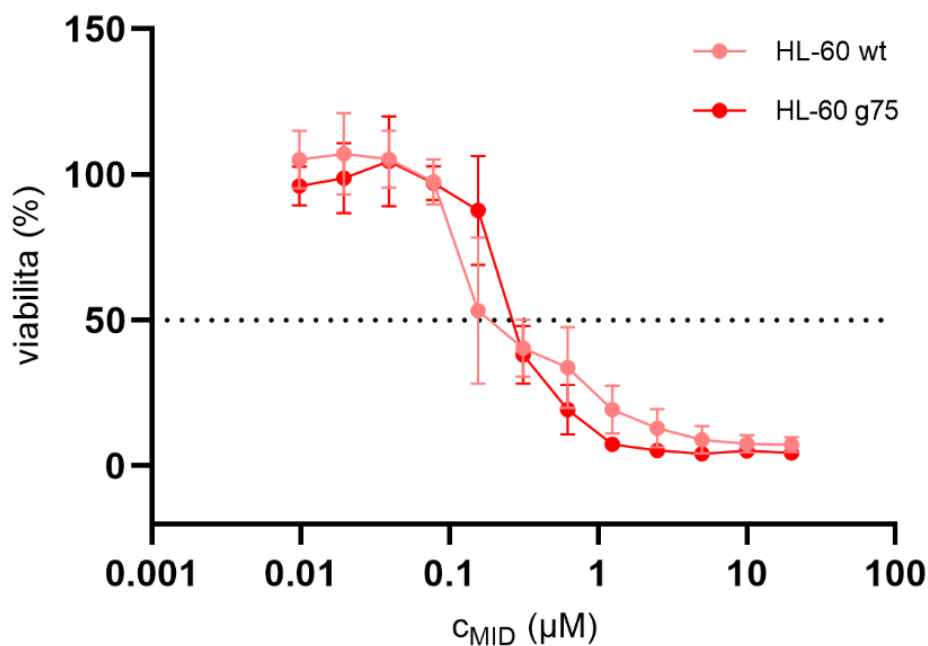


Obr. 11. Vliv gilteritinibu na apoptózu. Senzitivní linie HL-60 wt ani rezistentní linie HL-60 g75 mezi sebou nemají po 24 h inkubaci velké rozdíly a odpovídají na gilteritinib apoptózou podobně. Viditelný rozdíl je po 48 h ve vyšší koncentraci gilteritinibu (5 µM), kdy je indukována apoptóza více u senzitivní linie HL-60 wt než u rezistentní HL-60 g75. V koncentraci 10 µM byla apoptóza zvýšená ale opět u obou linií podobně. Všechny hodnoty jsou prezentovány jako průměry ± SD alespoň ze 3 na sobě nezávislých měření. Statistická analýza byla provedena pomocí nepárového t-testu.

6.4 Zkřížená rezistence HL-60 g75 vůči midostaurinu a sunitinibu

Jelikož jsme předchozími pokusy potvrdili rezistenci HL-60 g75 na gilteritinib, chtěli jsme zjistit, zda tyto buňky nejsou zkříženě rezistentní i na jiné léčiva z kategorie FLT3 inhibitorů, a to konkrétně na midostaurin a sunitinib. Midostaurin jsme zvolili z toho důvodu, že je podobně jako gilteritinib používán v klinické praxi při léčbě novo diagnostikované AML s přítomnou FLT3 mutací. Sunitinib jsme zvolili kvůli jeho fyzikálně-chemické podobnosti s gilteritinibem, jelikož jsme měli podezření, že ke vzniku rezistence na gilteritinib může docházet prostřednictvím lysozomální sekvestrace. Navíc u sunitinibu již byla lysozomální sekvestrace prokázána jako jeden z mechanismů rezistence. A také proto, že vykazuje fluorescenci, která byla využita v dalších pokusech.

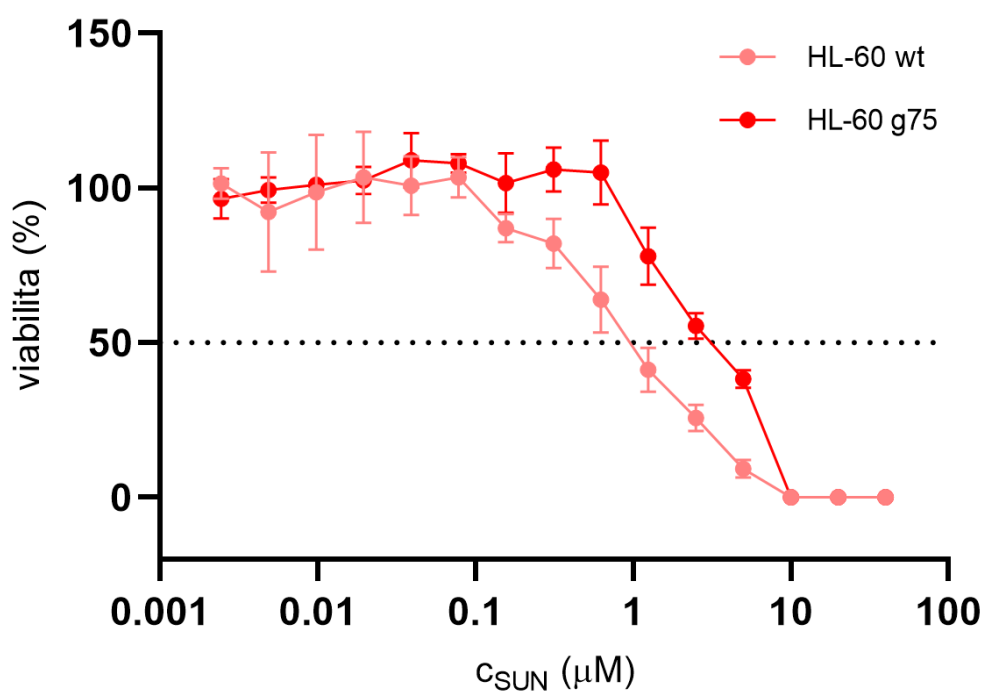
Ke stanovení zkřížené rezistence HL-60 g75 na midostaurin a sunitinib jsme využili MTT test podobně jako při stanovení rezistence těchto buněk na gilteritinib. Na midostaurin reagovaly obě linie HL-60 wt i HL-60 g75 porovnatelně, kdy se IC_{50} u HL-60 wt rovnala $0,300 \mu\text{M}$ a u HL-60 g75 $0,288 \mu\text{M}$. RF byl tedy rovný 1,0, což znamená, že HL-60 g75 nevykazovaly zkříženou rezistenci vůči midostaurinu (Obr. 12).



HL-60 wt $IC_{50} = 0.300 \mu M$ (95% CI: 0.230 - 0.394 μM)
 HL-60 g75 $IC_{50} = 0.288 \mu M$ (95% CI: 0.254 - 0.327 μM) **RF = 1.0**

Obr. 12. Zkřížená rezistence k midostaurinu. Pomocí MTT testu nevykazuje HL-60 g75 zkříženou rezistenci k midostaurinu, s RF 1,0, získaného poměrem z uvedených IC_{50} . Výsledky jsou uvedeny jako průměry \pm SD z minimálně 3 na sobě nezávislých měření, na obrázku je uvedena CI a metoda byla hodnocena pomocí nelineární regrese.

Při vystavení buněk sunitinibu jsme určitý rozdíl v odpovědi HL-60 wt a HL-60 g75 zaznamenali. HL-60 g75 byly očividně více rezistentní vůči sunitinibu než HL-60 wt, jelikož hodnota IC_{50} sunitinibu činila 0,980 μM u HL-60 wt a 3,120 μM u HL-60 g75. RF tedy dosáhl hodnoty 3,2, z čeho je zřejmé, že námi vytvořené HL-60 g75 jsou také rezistentní vůči sunitinibu. Navíc RF dosáhl podobně nízké hodnoty jako v případě gilteritinibu, což je typické právě pro lysozomální sekvestraci. Z těchto výsledků lze tedy předpokládat, že mechanismus spojený s lysozomy může být zapojen i do vzniku rezistence buněk na gilteritinib (Obr. 13).

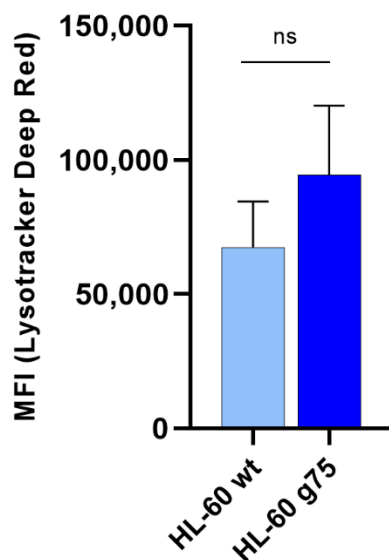


HL-60 wt $IC_{50} = 0.980 \mu M$ (95% CI: 0.828 - 1.159 μM)
 HL-60 g75 $IC_{50} = 3.120 \mu M$ (95% CI: 2.651 - 3.687 μM) **RF = 3.2**

Obr. 13. Zkřížená rezistence k sunitinibu. Pomocí MTT testu buňky HL-60 g75 vykazují zkříženou rezistenci k sunitinibu s RF 3,2. Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm SD z minimálně 3 na sobě nezávislých měření, jsou uvedeny CI a metoda byla hodnocena pomocí nelineární regrese.

6.5 Akumulace lysozomální sondy

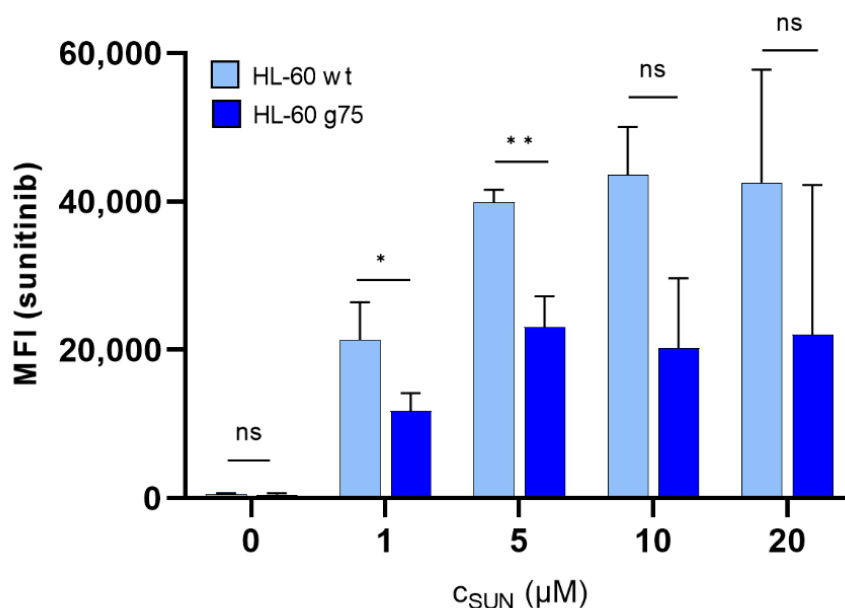
Zjištěním, že HL-60 g75 buňky jsou zkříženě rezistentní také na sunitinib byla podpořena teorie, že do vzniku rezistence na gilteritinib můžou být zapojeny lysozomy. Proto jsme buňky inkubovali s LysoTrackerem, selektivní lysozomální sondou, a porovnali míru jeho akumulace v HL-60 wt a HL-60 g75. Výsledky ukázaly, že buňky HL-60 g75 dosahovaly vyšší akumulace LysoTrackeru, která je na Obr. 14 níže vyobrazena jako střední míra fluorescence (MFI). To naznačuje, že HL-60 g75 měly nejen vyšší signál LysoTrackeru, ale dost možná obsahovaly i větší množství lysozomů nebo byly tyto lysozomy zvětšeny.



Obr. 14. Akumulace buněčných linií s lysozomální sondou. Rezistentní buňky HL-60 g75 vykazovaly vyšší signál fluorescenčního záření LysoTrackeru než buňky senzitivní HL-60 wt. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm SD alespoň 3 měření. Statistická analýza byla provedena nepárovým t-testem ale statistická významnost zde nebyla prokázána.

6.6 Akumulace sunitinibu

Po zjištění, že gilteritinib-rezistentní buňky HL-60 g75 vykazovaly vyšší signál Lysotrackeru než buňky parentní HL-60 wt, jsme obě linie vystavili sunitinibu a změřili intenzitu jeho fluorescenčního záření pomocí průtokového cytometru. Výsledky jsou na Obr. 15 vyjádřeny jako MFI. Vzhledem k tomu, že sunitinib je léčivo, které je známe svým sekvestrováním v lysozomech jsme očekávali, že jeho MFI bude vyšší v HL-60 g75 buňkách. Avšak naše výsledky ukázaly přesný opak, kdy buňky parentní HL-60 wt vykazovaly vyšší akumulaci sunitinibu než buňky HL-60 g75. Tyto výsledky mohou naznačovat několik buněčných jevů, které se v HL-60 g75 buňkách mohou odehrávat paralelně s lysozomální sekvestrací, např. zvýšený eflux či snížený influx sunitinibu.



Obr. 15. Akumulace buněčných linií se sunitinibem. Buňky HL-60 wt vykazovaly vyšší fluorescenční signál oproti buňkám HL-60 g75, a to ve všech zkoušených koncentracích (1, 5, 10, 20 μM). Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm SD alespoň 3 měření. Statistická analýza byla provedena nepárovým *t*-testem, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

7 DISKUSE

AML je závažné nádorové onemocnění s relativně špatnou prognózou a vysokým výskytem relapsů, což je do značné míry způsobeno nízkou odezvou leukemických buněk na chemoterapii a zároveň jejich vysokou mírou rezistence. Pacienti, kteří jsou v relapsu onemocnění nebo v refrakterní fázi AML a zároveň je u nich prokázána mutace ve *FLT3* genu, jsou od roku 2018 na území USA a od roku 2019 v EU léčeni inhibitory FLT3 gilteritinibem [31, 32]. Přestože je toto léčivo na trhu necelé čtyři roky, už i za tak krátkou dobu byly popsány případy rezistence u gilteritinibem léčených AML pacientů [54, 55, 56]. Nejčastěji popisovanými změnami u pacientů, kteří si vyvinuli rezistenci vůči gilteritinibu jsou bodové mutace ve *FLT3* jako je např. *FLT3-F691L*. V nedávné studii, která se zabírala mechanismy vzniklé rezistence u leukemických buněčných linií byly identifikovány dva typy rezistence, a to časná a pozdní. Časná rezistence byla dána do souvislosti s mikroprostředím kostní dřeně, pozdní pak především s výskytem nových mutací jako je *NRAS* [57]. Jelikož dat k rezistenci není mnoho a většina studií pozoruje rezistenci vůči gilteritinibu v závislosti na nově vytvořených mutacích, probíhá aktuálně intenzivní snaha o pochopení adaptačních mechanismů, které buňky využívají právě k vývoji této rezistence.

Proto byly i v naší laboratoři vytvořeny buňky HL-60 g75, které si v důsledku dlouhodobé kultivace s gilteritinibem vyvinuly rezistenci vůči tomuto léčivu. V proliferační eseji se ukázalo, že po vysazení léčiva rezistence mizí a už po čtyřech týdnech kultivace bez přítomnosti gilteritinibu buňky nevykazovaly žádné známky rezistence a evokovali svým chováním parentní linii HL-60 wt. Tato dočasná rezistence naznačuje, že v našich buňkách nevznikla jejich vyšší odolnost vůči gilteritinibu vlivem nově vytvořených mutací, jak je popisováno v dosavadních vědeckých studiích. Jednou z takových studií je i ta od McMahon a kol. [58], kde jsou u buněk rezistentních na gilteritinib popsány mutace genů v dráze RAS/MAPK (např.: *NRAS*, *CBL*) nebo přímo ve *FLT3* (např.: *F691L*, *D835*). Námi vytvořené buňky budou proto s velkou pravděpodobností využívat jiné buněčné mechanismy k tomu, aby rezistence ke gilteritinibu dosáhly.

Jelikož gilteritinib pozastavuje buňky v G1 fázi buněčného cyklu, ovlivnění jeho kontrolních bodů nebo genů zapojených do procesu buněčného dělení se jeví jako první možnost [59]. U AML dochází k expanzi nezralých myeloidních buněk důsledkem transformace HSC, kterým je umožněno neustále dokola procházet buněčným cyklem a být odolnými k buněčné smrti [60]. V této práci jsme rezistentní buňky HL-60 g75 vystavili gilteritinibu a sledovali, zdali dojde k odlišnému rozložení těchto buněk do buněčných fází oproti buňkám citlivé parentní linie, která předtím do kontaktu s gilteritinibem nepřišla. Z našich výsledků lze vidět, že rozložení HL-60 g75 buněk do fází buněčného cyklu se vlivem gilteritinibu výrazně neměnilo. Oproti tomu HL-60 wt buňky odpovídaly na nižší koncentrace gilteritinibu výrazným nárůstem G1 fáze a na ty vyšší koncentrace gilteritinibu zase nárůstem G2/M fáze. Zvýšení této fáze bylo popsáno i ve studii Vávrová a kol. [61], kde pozorovaly nahromadění buněk v G2/M fázi poté, co byly buňky ozářeny gamma zářením. Značná část těchto buněk poté přecházela přímo do apoptózy, co by znamenalo, že k podobnému jevu může docházet i v naší HL60 wt linii. Jednoznačně je tedy zřejmé, že zatímco HL60 wt buňky reagují na gilteritinib zvýšením počtu buněk v G1 fázi a postupným přechodem buněk do G2/M fáze s pravděpodobným směřováním do apoptózy, rezistentní HL60 G75 buňky jsou vůči gilteritinibu výrazně odolnější a uvedené změny rozložení buněk v jednotlivých fázích cyklu u nich nepozorujeme.

Navíc u gilteritinibu bylo popsáno, že svým působením ovlivňuje i apoptotické dráhy buněk a vede tak k zvýšené apoptóze [62]. Tenhle fakt spolu s pozorovaným zvýšením G2/M fáze u HL-60 wt linie naznačoval, že by dlouhodobá kultivace HL-60 g75 v gilteritinibu mohla ovlivnit jejich apoptotické dráhy. To jsme v našich pokusech ale nepotvrdili, jelikož buňky citlivé ke gilteritinibu a rezistentní buňky odpovídaly na apoptotický stimul v podobě gilteritinibu podobně. K indukci apoptózy navíc docházelo až při vystavení buněk vysokým koncentracím gilteritinibu, z čeho vyplývá, že u HL-60 g75 byly pozměněny spíše jiné buněčné mechanismy než právě apoptotické dráhy.

Co bývá u nádorových onemocnění často pozorováno, je zkřížená rezistence buněk vůči více léčivům, tj. že i když jsou nádorové buňky původně

rezistentní k jednomu léčivu, bývají zpravidla rezistentní i k léčivům jiným, zejména pokud si jsou strukturálně podobná. Proto jsme otestovali chování naší gilteritinib-rezistentní linie i v přítomnosti dvou dalších FLT3 inhibitorů, a to midostaurinu a sunitinibu. Midostaurin je léčivo, které je indikováno u AML pacientů s prokázanou *FLT3* mutací, ale narozdíl od gilteritinibu se nepoužívá v monoterapii, nýbrž společně s běžnou chemoterapií [63]. Pokud léčba midostaurinem není dostatečně účinná anebo u pacientů dojde k relapsu onemocnění, může se v léčbě těchto relabovaných a refraktérních pacientů použít gilteritinib. Studie Perl A. et al. [64] dokonce ukazuje, že pacienti, kteří v první fázi léčby podstoupili léčbu midostaurinem měli lepší odpověď na léčbu gilteritinibem a lepší vliv na celkové přežití než ti, kterým midostaurin podáván nebyl. To plyne i z našich pokusů, kdy jsme proliferačním MTT testem dokázali, že gilteritinib nevykazuje žádnou zkříženou rezistenci k midostaurinu.

Stejný proliferační MTT test byl proveden i se sunitinibem, u kterého se zkřížená rezistence ke gilteritinibu prokázala, a to dokonce o něco vyšší, než byla rezistence ke gilteritinibu. Toto zjištění a velká fyzikálně-chemická podobnost sunitinibu s gilteritinibem nás vedli k hypotéze možného vzniku rezistence prostřednictvím lysozomů. Jelikož obě tyto léčiva splňují podmínky pro lysozomální sekvestraci, a navíc u sunitinibu byl tenhle mechanismus i popsán jako příčina vzniklé rezistence, rozhodly jsme se blíže otestovat možné zapojení lysozomů [37]. Pro tyto experimenty jsme využili právě sunitinib a to také díky jeho fluorescenčním schopnostem, které gilteritinib postrádá, a proto nebylo možné provést tyto pokusy přímo s ním. Inkubace s lysozomální sondou zvanou LysoTracker nejprve ukázala vyšší fluorescenční signál u rezistentních HL-60 g75 buněk než u buněk parentních, což naznačuje zvýšené množství lysozomů nebo i zvětšení jejich kapacity v HL-60 g75. Výsledky prezentované v této práci vykazují tendenci k vyššímu signálu LysoTrackeru, avšak bez statisticky významného rozdílu. Další, dosud nepublikovaná data nicméně toto zvýšení jednoznačně potvrzují s použitím stejné metody a většího počtu opakování, a zejména pomocí fluorescenční mikroskopie.

Při vystavení buněk sunitinibu jsme očekávali, že pro jeho schopnosti sekvestrovat se v lysozomech budeme pozorovat vyšší akumulaci sunitinibu

právě v gilteritinib-rezistentních HL-60 g75. Naše výsledky však ukázaly přesný opak, kdy u rezistentních buněk došlo ke snížení signálu, a tedy i akumulaci sunitinibu. Nižší signál, a tím i nižší koncentrace sunitinibu v HL-60 g75 buňkách, může být dána zvýšeným výskytem efluxních transportérů, co jsou membránové přenašeče schopny transportovat určité látky z buňky do vnějšího prostředí. Sunitinib byl popsán jako substrát jednoho z efluxních transportérů, a to P-glykoproteinu [65]. Existují ale i tzv. influxní transportéry, které fungují přesně opačným směrem než ty efluxní. Jejich vlivem dochází k transportu látek z vnějšího prostředí dovnitř buňky. Pokud by tedy tyto transportéry vykazovaly vyšší expresi a/nebo aktivitu v parentních HL-60 wt buňkách, mohlo by to vysvětlovat, proč pozorujeme vyšší akumulaci sunitinibu právě u nich. Dalším důvodem pozorované snížené akumulace sunitinibu u HL-60 g75 může být změna pH lysozomů, které se u HL-60 buněk musí pohybovat v rozmezí 5-6, aby byla zajištěna správná funkce lysozomů. To znamená, že když dojde k posunu tohoto pH, nemusí docházet k lysozomální sekvestraci, která je založena právě na pH a tím se zabrání prostupu léčiva do lysozomů.

8 ZÁVĚR

V předkládané práci byla charakterizována nově generovaná gilteritinib-rezistentní linie HL-60 g75. Rezistence u ní byla potvrzena stanovením rezistenčního faktoru, a dále byla prokázána jako transientní, tj. dočasně rezistentní, kdy buňky přišly o svou zvýšenou odolnost vůči gilteritinibu během měsíce kultivace v čistém médiu bez tohoto léčiva. V důsledku tohoto zjištění předpokládáme, že v buňkách nedocházelo k rezistenci ze strany genových mutací, ale spíše ovlivněním funkčních mechanismů. Z pohledu rozložení buněk do jednotlivých fází buněčného cyklu, rezistentní linie reagovala oproti citlivé parentní linii na gilteritinib pouze minimálně. V indukci apoptózy nebyly shledány žádné výrazné změny mezi liniemi, z tohoto důvodu se můžeme domnívat, že k buněčné rezistenci dochází ovlivněním jiných drah než těch apoptotických. Zkříženou rezistenci vykazovala HL-60 g75 linie pouze ve vztahu k sunitinibu, nikoli k midostaurinu. Zkřížená rezistence k sunitinibu nás vedla k hypotéze, zda podstatou rezistence není lysozomální sekvestrace gilteritinibu, jako je tomu právě u sunitinibu. U akumulace lysozomální sondy bylo pozorováno zvýšení signálu u gilteritinib-rezistentní linie. Při akumulaci se sunitinibem byl signál nižší u rezistentních linie než u linie senzitivní. Toto zjištění může poukazovat na převahu jiných mechanismů, zejména na odlišný výskyt efluxních či influxních transportérů mezi oběma liniemi, ovlivnění pH lysozomů či metabolizaci sunitinibu v buňkách a inaktivaci jeho účinků.

9 CITOVANÁ LITERATURA

1. Cancer.Net. Leukemia - Acute Myeloid - AML: Statistics. (2023, leden). Dostupné z: <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-myeloid-aml/statistics>
2. Cancer.Net. Leukemia – Acute myeloid – AML: Types treatment (2023, Leden). Dostupné z: <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-myeloid-aml/types-treatment>
3. Čerňan, M., Szotkowski, T. (2021). Současné trendy v léčbě akutní myeloidní leukémie – od indukční chemoterapie „7+3“ po cílenou léčbu. *Klin Farmakol Farm* (2021), 35(3), 61–69
4. Pelcovits, A., Niroula, R. (2020). Acute Myeloid Leukemia: A Review. *Rhode Island medical journal* (2013), 103(3), 38–40.
5. Acute myeloid leukaemia AML | Macmillan cancer support (2023, duben) Dostupné z: <https://www.macmillan.org.uk/cancer-information-and-support/leukaemia/acute-myeloid-leukaemia-aml>
6. Shimony, S., Stahl, M., & Stone, R. M. (2023). Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology*, 98(3), 502–526. <https://doi.org/10.1002/ajh.26822>
7. National Cancer Institut. Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®)–Health Professional Version (2023, leden) Dostupné z: https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/adult-aml-treatment-pdq#_393_toc
8. SEER*Explorer | National Cancer Institut (2023, květen) Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html>
9. Juliusson, G., Antunovic, P., Derolf, A., Lehmann, S., Möllgård, L., Stockelberg, D., Tidefelt, U., Wahlin, A., & Höglund, M. (2009). Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 113(18), 4179–4187. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-172007>

10. Babushok, D. V., & Bessler, M. (2015). Genetic predisposition syndromes: when should they be considered in the work-up of MDS? *Best practice & research. Clinical haematology*, 28(1), 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.11.004>
11. Caughey, R. W., & Michels, K. B. (2009). Birth weight and childhood leukemia: a meta-analysis and review of the current evidence. *International journal of cancer*, 124(11), 2658–2670. <https://doi.org/10.1002/ijc.24225>
12. Bailey, H. D., Fritschi, L., Infante-Rivard, C., Glass, D. C., Miligi, L., Dockerty, J. D., Lightfoot, T., Clavel, J., Roman, E., Spector, L. G., Kaatsch, P., Metayer, C., Magnani, C., Milne, E., Polychronopoulou, S., Simpson, J., Rudant, J., Sidi, V., Rondelli, R., Orsi, L., ... Schüz, J. (2014). Parental occupational pesticide exposure and the risk of childhood leukemia in the offspring: findings from the childhood leukemia international consortium. *International journal of cancer*, 135(9), 2157–2172. <https://doi.org/10.1002/ijc.28854>
13. Karalexi, M. A., Dessypris, N., Thomopoulos, T. P., Ntouvelis, E., Kantzanou, M., Diamantaras, A. A., Moschovi, M., Baka, M., Hatzipantelis, E., Kourti, M., Polychronopoulou, S., Stiakaki, E., Mora, A. M., Wunsch-Filho, V., Infante-Rivard, C., Loutradis, D., & Petridou, E. T. (2017). Parental alcohol consumption and risk of leukemia in the offspring: a systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 26(5), 433–441. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000350>
14. Little, M. P., Wakeford, R., Borrego, D., French, B., Zablotska, L. B., Adams, M. J., Allodji, R., de Vathaire, F., Lee, C., Brenner, A. V., Miller, J. S., Campbell, D., Pearce, M. S., Doody, M. M., Holmberg, E., Lundell, M., Sadetzki, S., Linet, M. S., & Berrington de González, A. (2018). Leukaemia and myeloid malignancy among people exposed to low doses (<100 mSv) of ionising radiation during childhood: a pooled analysis of nine historical cohort studies. *The Lancet. Haematology*, 5(8), e346–e358. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(18\)30092-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(18)30092-9)
15. Heuser M. (2016). Therapy-related myeloid neoplasms: does knowing the origin help to guide treatment?. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2016(1), 24–32. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.24>

16. Mooney, C. J., Cunningham, A., Tsapogas, P., Toellner, K. M., & Brown, G. (2017). Selective Expression of Flt3 within the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment. *International journal of molecular sciences*, 18(5), 1037. <https://doi.org/10.3390/ijms18051037>
17. Antar, A. I., Otrrock, Z. K., Jabbour, E., Mohty, M., & Bazarbachi, A. (2020). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. *Leukemia*, 34(3), 682–696. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0694-3>
18. Döhner, H., Wei, A. H., Appelbaum, F. R., Craddock, C., DiNardo, C. D., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Godley, L. A., Hasserjian, R. P., Larson, R. A., Levine, R. L., Miyazaki, Y., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G., Röllig, C., Sierra, J., Stein, E. M., Tallman, M. S., Tien, H. F., ... Löwenberg, B. (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, 140(12), 1345–1377. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>
19. Cortes, J. E., & Mehta, P. (2021). Determination of fitness and therapeutic options in older patients with acute myeloid leukemia. *American journal of hematology*, 96(4), 493–507. <https://doi.org/10.1002/ajh.26079>
20. Typical Treatment of Acute Myeloid Leukemia | American Cancer Society (2022, říjen). Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/types/acute-myeloid-leukemia/treating/typical-treatment-of-aml.html>
21. Burnett, A., Wetzler, M., & Löwenberg, B. (2011). Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(5), 487–494. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1820>
22. Thol, F., & Heuser, M. (2021). Treatment for Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *HemaSphere*, 5(6), e572. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000572>
23. Ambinder, A. J., & Levis, M. (2021). Potential targeting of FLT3 acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 106(3), 671–681. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.240754>

24. Marconi, G., Giannini, M. B., Bagnato, G., Simonetti, G., Cerchione, C., Mosquera Orgueira, A., Musuraca, G., & Martinelli, G. (2021). The safety profile of FLT3 inhibitors in the treatment of newly diagnosed or relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Expert opinion on drug safety*, 20(7), 791–799. <https://doi.org/10.1080/14740338.2021.1913120>
25. Stone, R. M., Mandrekar, S., Sanford, B. L., et al. (2015). The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (muts): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). *Blood*, 126(23), 6–6. <https://doi.org/10.1182/blood.v126.23.6.6>
26. El Fitori, J., Su, Y., Büchler, P., Ludwig, R., Giese, N. A., Büchler, M. W., Quentmeier, H., Hines, O. J., Herr, I., & Friess, H. (2007). PKC 412 small-molecule tyrosine kinase inhibitor: single-compound therapy for pancreatic cancer. *Cancer*, 110(7), 1457–1468. <https://doi.org/10.1002/cncr.22931>
27. FDA. Midostaurin. (2023, duben). Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/midostaurin>
28. EMA. Rydapt. (2023, duben). Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt>
29. Stone, R. M., Manley, P. W., Larson, R. A., & Capdeville, R. (2018). Midostaurin: its odyssey from discovery to approval for treating acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis. *Blood advances*, 2(4), 444–453. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011080>
30. Lee, L. Y., Hernandez, D., Rajkhowa, T., Smith, S. C., Raman, J. R., Nguyen, B., Small, D., & Levis, M. (2017). Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood*, 129(2), 257–260. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-745133>
31. FDA. FDA approves gilteritinib for relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) with a FLT3 mutation. (2023, květen). Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-gilteritinib-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-aml-flt3-mutation>

32. EMA. Xospata. (2023, květen). Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xospata>
33. DrugBank. Gilteritinib. (2023, leden). Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB12141>
34. FDA. FDA Approves First Drug for Fourth-Line Treatment of Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors (2020). (2023, duben). Dostupné z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-fourth-line-treatment-advanced-gastrointestinal-stromal-tumors>
35. EMA. Sutent. (2023, duben). Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/sutent#authorisation-details-section>
36. FDA. FDA approves sunitinib maleate for adjuvant treatment of renal cell carcinoma. (2023, duben). Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-sunitinib-maleate-adjuvant-treatment-renal-cell-carcinoma>
37. Rock, E. P., Goodman, V., Jiang, J. X., Mahjoob, K., Verbois, S. L., Morse, D., Dagher, R., Justice, R., & Pazdur, R. (2007). Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib maleate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *The oncologist*, 12(1), 107–113. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-1-107>
38. Gotink, K. J., Broxterman, H. J., Labots, M., de Haas, R. R., Dekker, H., Honeywell, R. J., Rudek, M. A., Beerepoot, L. V., Musters, R. J., Jansen, G., Griffioen, A. W., Assaraf, Y. G., Pili, R., Peters, G. J., & Verheul, H. M. (2011). Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(23), 7337–7346. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1667>
39. Eguchi, M., Minami, Y., Kuzume, A., & Chi, S. (2020). Mechanisms Underlying Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines*, 8(8), 245. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080245>

40. Hraběta, J., Belhajová, M., Šubrtová, H., Merlos Rodrigo, M. A., Heger, Z., & Eckschlager, T. (2020). Drug Sequestration in Lysosomes as One of the Mechanisms of Chemoresistance of Cancer Cells and the Possibilities of Its Inhibition. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4392. <https://doi.org/10.3390/ijms21124392>
41. Cuesta-Casanovas, L., Delgado-Martínez, J., Cornet-Masana, J. M., Carbó, J. M., Clément-Demange, L., & Risueño, R. M. (2022). Lysosome-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 5(1), 233–244. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.122>
42. ATCC. CCL-240. (2023, leden). Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/ccl-240>
43. Sorf, A., Sucha, S., Morell, A., Novotna, E., Staud, F., Zavrelouva, A., Visek, B., Wsol, V., & Ceckova, M. (2020). Targeting Pharmacokinetic Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia Cells with CDK4/6 Inhibitors. *Cancers*, 12(6), 1596. <https://doi.org/10.3390/cancers12061596>
44. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
45. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
46. Depraetere, V. (2000). “Eat me” signals of apoptotic bodies. *Nat Cell Biol* 2, E104 <https://doi.org/10.1038/35014098>
47. Lakshmanan, I., & Batra, S. K. (2013). Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio-protocol*, 3(6), e374. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.374>
48. Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (50), 2597. <https://doi.org/10.3791/2597>
49. AATBioquest. Annexin V. (2023, duben). Dostupné z: <https://www.aatbio.com/resources/application-notes/annexin-v>
50. NIH. Cell Cycle. (2023, leden). Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>

51. Cusabio. Cell cycle. (2023, leden). Dostupné z: <https://www.cusabio.com/Cell-Biology/Cell-Cycle.html>
52. Sheerar, D. *Cell Cycle Analysis*. (2023, leden). Dostupné z: <https://cancer.wisc.edu/research/resources/flow/>
53. Zhitomirsky, B., Farber, H., & Assaraf, Y. G. (2018). LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(4), 2131–2141. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13485>
54. Zhou, S., Yang, B., Xu, Y., Gu, A., Peng, J., & Fu, J. (2022). Understanding gilteritinib resistance to FLT3-F691L mutation through an integrated computational strategy. *Journal of molecular modeling*, 28(9), 247. <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05254-0>
55. Joshi, S. K., Sharzehi, S., Pittsenbarger, J., Bottomly, D., Tognon, C. E., McWeeney, S. K., Druker, B. J., & Traer, E. (2021). A noncanonical FLT3 gatekeeper mutation disrupts gilteritinib binding and confers resistance. *American journal of hematology*, 96(7), E226–E229. <https://doi.org/10.1002/ajh.26174>
56. Zavorka Thomas, M. E., Jeon, J. Y., Talebi, Z., Buelow, D. R., Silvaroli, J., Campbell, M. J., Sparreboom, A., Pabla, N., & Baker, S. D. (2021). Gilteritinib-induced upregulation of S100A9 is mediated through BCL6 in acute myeloid leukemia. *Blood advances*, 5(23), 5041–5046. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005614>
57. Joshi, S. K., Nechiporuk, T., Bottomly, D., Piehowski, P. D., Reisz, J. A., Pittsenbarger, J., Kaempf, A., Gosline, S. J. C., Wang, Y. T., Hansen, J. R., Gritsenko, M. A., Hutchinson, C., Weitz, K. K., Moon, J., Cendali, F., Fillmore, T. L., Tsai, C. F., Schepmoes, A. A., Shi, T., Arshad, O. A., ... Traer, E. (2021). The AML microenvironment catalyzes a stepwise evolution to gilteritinib resistance. *Cancer cell*, 39(7), 999–1014.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.06.003>
58. McMahon, C. M., Ferng, T., Canaani, J., Wang, E. S., Morrissette, J. J. D., Eastburn, D. J., Pellegrino, M., Durruthy-Durruthy, R., Watt, C. D., Asthana, S., Lasater, E. A., DeFilippis, R., Peretz, C. A. C., McGary, L. H. F., Deihimi, S., Logan, A. C., Luger, S. M., Shah, N. P., Carroll, M., Smith, C. C., ... Perl, A. E. (2019). Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates

- Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer discovery*, 9(8), 1050–1063. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1453>
59. Ueno, Y., Mori, M., Kamiyama, Y., Saito, R., Kaneko, N., Isshiki, E., Kuromitsu, S., & Takeuchi, M. (2019). Evaluation of gilteritinib in combination with chemotherapy in preclinical models of *FLT3-ITD+* acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 10(26), 2530–2545. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26811>
60. Schnerch, D., Yalcintepe, J., Schmidts, A., Becker, H., Follo, M., Engelhardt, M., & Wäsch, R. (2012). Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *American journal of cancer research*, 2(5), 508–528.
61. Vávrová, J., Rezáčová, M., Vokurková, D., & Psutka, J. (2004). Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiological research*, 53(3), 335–342. [1]
62. Kuravi, S., Cheng, J., Fangman, G., Polireddy, K., McCormick, S., Lin, T. L., Singh, A. K., Abhyankar, S., Ganguly, S., Welch, D. R., Jensen, R. A., McGuirk, J. P., & Balusu, R. (2021). Preclinical Evaluation of Gilteritinib on NPM1-ALK-Driven Anaplastic Large Cell Lymphoma Cells. *Molecular cancer research : MCR*, 19(5), 913–920. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0738>
63. Kim E. S. (2017). Midostaurin: First Global Approval. *Drugs*, 77(11), 1251–1259. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0779-0>
64. Perl, A. E., Hosono, N., Montesinos, P., Podoltsev, N., Martinelli, G., Panoskaltsis, N., Recher, C., Smith, C. C., Levis, M. J., Strickland, S., Röllig, C., Groß-Langenhoff, M., Chou, W. C., Lee, J. H., Yokoyama, H., Hasabou, N., Lu, Q., Tiu, R. V., & Altman, J. K. (2022). Clinical outcomes in patients with relapsed/refractory FLT3-mutated acute myeloid leukemia treated with gilteritinib who received prior midostaurin or sorafenib. *Blood cancer journal*, 12(5), 84. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00677-7>
65. Shukla, S., Robey, R. W., Bates, S. E., & Ambudkar, S. V. (2009). Sunitinib (Sutent, SU11248), a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 37(2), 359–365. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024612>