

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



Diplomová práce

Interakce gilteritinibu s transportéry OCT1 a OCT2; vztah
ke konvenční terapii akutní myeloidní leukémie.

Kateřina Novotná

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

Konzultant: PharmDr. Aleš Šorf, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Prohlášení:

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

V Hradci Králové

Kateřina Novotná

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. a PharmDr. Aleši Šorfovi, Ph.D. za jejich cenné rady a konzultace, odborné vedení a zároveň přátelský přístup při vypracování této diplomové práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým přátelům za jejich podporu.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a toxikologie

Studentka: Kateřina Novotná

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

Název diplomové práce: Interakce gilteritinibu s transportéry OCT1 a OCT2; vztah ke konvenční terapii akutní myeloidní leukémie.

Gilteritinib se řadí mezi relativně nově schválená léčiva ze skupiny FLT3 inhibitorů a je využíván primárně v léčbě relapsu či refrakterní akutní myeloidní leukémie a prokázanou mutací FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) receptoru. V rámci této diplomové práce byla zkoumána jeho schopnost interagovat s SCL membránovými transportními proteiny, konkrétně s transportéry OCT1 a OCT2, které zajišťují přenos endogenních látek a léčiv do buněk orgánů klíčových pro eliminaci (játra, ledviny), ale také do nádorových buněk. Na základě toho jsme chtěli otestovat potenciální interakci gilteritinibu s léčivy standardně využívanými v terapii AML (daunorubicin a mitoxantron).

První jsme provedli akumulční studii na MDCKII buněčné linii transfekované pro expresi OCT1 a OCT2, abychom vyhodnotili, zda je gilteritinib je možným inhibitorem těchto transportérů a bude tak mít vliv na rozdílnou míru akumulace daunorubicinu a mitoxantronu. Následně byla provedena studie transportu gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII-OCT1 a MDCKII-OCT2 buněk v porovnání s MDCKII kontrolními buňkami k otestování gilteritinibu jako možného substrátu OCT transportérů.

Ze získaných dat vyplývá, že gilteritinib má schopnost inhibovat transport daunorubicinu zprostředkovaný skrze OCT1 v MDCKII-OCT1 buněčné linie. Tento efekt nebyl zaznamenán ani u kontrolní buněčné linie, ani u MDCKII-OCT2 buněk. Dále jsme sledovali bazolaterálně-apikální transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII-OCT1 a MDCKII-OCT2 buněk v porovnání s MDCKII kontrolní linií buněk. V přítomnosti inhibitoru došlo obou buněčných linií ke snížení transportu gilteritinibu na úroveň

MDCKII kontrolních buněk, což naznačuje, že gilteritinib je substrátem obou studovaných OCT transportérů.

Výsledky této práce naznačují, že gilteritinib má sklon k interakcím na bázi OCT1 zprostředkovaného transportu, což může zapříčinit farmakokinetické interakce s jinými léčivými. To vede k hypotéze, že by mohlo při kombinované terapii AML pomocí daunorubicinu a gilteritinibu dojít ke snížení dostupnosti léčiv pro leukemické buňky, a tím ke snížení účinku terapie. Tato hypotéza by měla být dále ověřena.

Abstract

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a toxikologie

Student: Kateřina Novotná

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

Title of diploma thesis: Interaction of gilteritinib with OCT1 and OCT2 transporters; relation to conventional therapy of acute myeloid leukemia.

Gilteritinib is one of the recently approved drugs which is primarily used in the treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML) with mutated FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) receptor. In this project, gilteritinib was investigated in terms of its ability to interact with solute carrier (SLC) membrane transporters, namely with OCT1 and OCT2. These membrane proteins play a role in uptake of endogenous compounds and also drugs into the cells of main elimination organs (liver, kidney), but also to cancer cells. In particular, we wanted to examine potential interaction with daunorubicin and mitoxantrone, drugs traditionally used in AML therapy.

First, we performed accumulation study and evaluated, whether gilteritinib is potential inhibitor of OCT1 and OCT2 studying differential uptake of daunorubicin and mitoxantrone into MDCKII-OCT1 and MDCKII-OCT2 cells based on OCT1 and OCT2 inhibition by gilteritinib. Secondly, the study evaluating the transfer of gilteritinib across the monolayers of MDCKII-OCT1 and control MDCKII-VK cell lines was conducted to test gilteritinib as a potential substrate of this transporter.

The obtained data showed that gilteritinib has ability to inhibit the OCT1-mediated transport of daunorubicin into the MDCKII-OCT1 cells. This effect was not observed neither in control cell line, nor MDCKII-OCT2 cells. We further observed enhanced basolateral-to-apical transport of gilteritinib across monolayers of MDCKII-OCT1 and MDCKII-OCT2 cells compared to MDCKII-VK cells. This difference was abolished in the presence of OCT1 inhibitor, suggesting that gilteritinib is a substrate of OCT1.

Results obtained in our study indicate that gilteritinib might be prone to OCT1-mediated pharmacokinetic drug-drug interactions. The hypothesis that combinatory treatment of AML with gilteritinib and daunorubicin could result in decreasing availability of the drugs to the leukemia cells leading to lower efficacy of the treatment should be verified.

Obsah

1. Seznam zkratk	1
2. Úvod	2
3. Teoretická část	5
3.1 Akutní myeloidní leukémie a její léčba	5
3.1.1 Charakteristika onemocnění	5
3.1.2 Standardní terapie - antracykliny a strukturně podobné látky v léčbě AML (daunorubicin, mitoxantron)	7
3.1.3 Nová generace AML-léčiv, gilteritinib a jeho charakteristika a postavení v terapii	11
3.2 Membránové transportéry, jejich rozdělení a fyziologická role	14
3.2.1 Role membránových transportérů ve farmakokinetice léčiv	16
3.2.2 Charakteristika OCT1 a OCT2	19
3.2.3 Membránové transportéry a vznik lékových interakcí	22
4. Hypotéza a cíl práce	24
5. Experimentální část	26
5.1 MATERIÁL	26
5.1.1 Buněčné linie (a jejich kultivace)	26
5.1.2 Roztoky, činidla, média	26
5.1.3 Pomůcky a přístroje	27
5.2 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu v MDCKII-OCT1/OCT2/kontrolních buněčných liniích	27
5.2.1 Princip metody	27
5.2.2 Postup	29
5.3 Transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněčných linií s inhibítoru a bez inhibítoru	30
5.3.1 Princip metody	30
5.3.2 Postup	31
5.4 Statistická analýza	33
6. Výsledky	34

6.1 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu v MDCKII-OCT1/OCT2/kontrolních buněčných liniích	34
6.2 Transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněčných linií s inhibítoem a bez inhibítora	37
7. Diskuze	40
8. Závěr	44
9. Zdroje	45

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-vázající transportéry (z angl. „ATP-binding cassette“)
ABCB1/MDR1	P-glykoprotein
ABCC1/MRP1	multidrug-resistance protein 1
ABCG2/BCRP	breast cancer resistance protein
ALT	alaninaminotransferáza
AML	akutní myeloidní leukémie
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EMA	Evropská léková agentura
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FLT3	tyrozinkinázový receptor (z angl. „Fms-like tyrosine kinase 3“)
FLT3-ITD	interní tandemová duplikace FLT3
FLT3-TKD	bodová mutace FLT3
HL-60	lidská leukemická buněčná linie HL-60
MATE	multidrug and toxin extrusion transportér
MDCKII	buněčná linie Madin-Darby canine kidney II
OAT	organic anion transporter, transportér organických anionů
OCT	organic cation transporter, transportér organických kationů
OCTN	organic cation/carnitine transporter novel
PBS	fosfátový pufr
SLC	solute carrier

2. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou v České republice i globálně druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. V České republice ročně umírá na nádorová onemocnění více než 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti (ÚZIS 2021). Podle Světové zdravotnické organizace je 1 z 6 úmrtí způsobeno nádorovým onemocněním (WHO 2021). I přesto, že akutní leukémie tvoří celkově méně než 3 % diagnostikovaných nádorových onemocnění, jsou tyto maligní novotvary zodpovědné za vysoké číslo úmrtí souvisejících s nádorovými onemocněními. Akutní myeloidní leukémie (AML) se vyskytuje zhruba u čtvrtiny pacientů trpících leukémií a má nejnižší procento míry přežití (Deschler 2008).

Za standard léčby AML je už od 70. let 20. století považován režim indukční terapie ‚7+3‘, který spočívá v kombinaci 7denního užívání cytarabinu a 3denního podávání antracyklinů, nejčastěji daunorubicinu. Tato terapie v dlouhodobém měřítku vede k celkovému přežití zhruba u 30 % pacientů, mnohem horších výsledků terapie je dosahováno u pacientů starších 65 let. Zatímco u pacientů mladších 50 let je dosahováno pětiletého přežití u 40-50 % pacientů, u starších osob je tomu tak pouze u 5 - 10 %. Vzhledem k tomu, že medián věku při diagnostikování AML je 68 let, nejsou tato čísla velmi uspokojivá. Špatnou prognózu onemocnění neovlivňuje pouze věk, ale i celkový tělesný stav pacienta a genetické a molekulární abnormality (Deschler 2008, Abuelgasim et al. 2020, Kantarjian et al. 2021)

Za poslední dekády došlo k velkému pokroku v identifikaci molekulárních a cytogenetických abnormalit, což ukázalo, jak heterogenní AML je a dalo podklad k vývoji cílené protinádorové terapie (Pelcovits et al. 2020, Kantarjian et al. 2021). Zhruba 65 % nově diagnostikovaných pacientů vykazuje abnormální karyotyp s výskytem genetických mutací, s vyšším věkem se toto riziko zvětšuje (Abuelgasim et al. 2020). Tyto cytogenetické abnormality jsou důležitým ukazatelem prognózy onemocnění v krátkodobém i dlouhodobém měřítku. Na jejich základě je AML rozdělena dle ELN stratifikace na tři skupiny s příznivým, intermediálním či nepříznivým prognostickým rizikem (Dohner et al. 2017). Jednou z nejčastějších genetických mutací u AML ovlivňující prognózu onemocnění i celkové přežití je mutace genu Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3), která se vyskytuje zhruba u 30 % pacientů trpících AML

(Deschler 2008, Pemmaraju et al. 2011). Zejména u pacientů s FLT3-ITD mutací je větší riziko relapsu a nižší pravděpodobnost dosažení kompletní remise (Antar et al. 2020).

Na základě zjištění, jak významnou roli hraje výskyt FLT3 mutace v celkové prognóze onemocnění, se stal mutovaný FLT3 receptor atraktivním cílem a předmětem studií pro cílenou protinádorovou terapii (Short et al. 2019, Smith 2019). V posledních letech se objevila léčiva ze skupiny tyrosin kinázových inhibitorů cílící na FLT3. Liší se přitom farmakokinetickými parametry, různou selektivitou k tyrosin kinázám a různým profilem toxicity. První generace FLT3 inhibitorů zahrnuje méně selektivní multikinázové inhibitory, s čím je spojena i větší toxicita terapie (Short et al. 2019, Antar et al. 2020). Midostaurin, léčivo první generace těchto tyrosin kinázových inhibitorů, byl v dubnu 2017 schválen americkou lékovou regulační agenturou U.S. Food and Drug Administration (FDA) jako jedno z léčiv první linie u pacientů trpících AML s FLT3 mutací v kombinaci s indukční chemoterapií (Short et al. 2019). V návaznosti na to schválila FDA v listopadu 2018 zástupce druhé generace, gilteritinib, jako první léčivo pro užití v monoterapii u nově diagnostikovaných pacientů s relabovanou či refrakterní AML s FLT3 mutací (Perl 2019). Gilteritinib prokázal ve studii ADMIRAL delší celkové přežití a vyšší odezvu na léčbu u pacientů s relabovanou či refrakterní AML s FLT3 mutací, než tomu bylo u standardní terapie (Zhao et al. 2019). Díky slibným výsledkům v dosažení kompletní remise a celkového přežití u pacientů s relabovanou/refrakterní AML s FLT3 mutací si FLT3 inhibitory pomalu získávají své místo ve standardní terapii (Perl 2019).

Solute carrier (SLC) transportéry formují velkou skupinu membránových proteinů účastnících se transmembránového přenosu širokého spektra endogenních substrátů a klinicky důležitých léčiv. Některá protinádorová léčiva počínající inhibitory topoisomerázy a interkalačními léčivy až po léčiva cílené protinádorové terapie, jako například inhibitory tyrosin kinázy, jsou přenášeny právě pomocí SLC transportérů. Tyto jsou exprimovány v klíčových tkáních důležitých pro absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci léčiv, ale zároveň také mohou být lokalizovány v nádorových buňkách, kde by jejich ovlivněním mohlo docházet ke změně intracelulární akumulace léčiva potřebné k účinku terapie nebo ke vzniku lékových interakcí (Brecht et al. 2020).

Tato práce je zaměřena na vyhodnocení potenciální interakce gilteritinibu s dalšími protinádorovými látkami, používanými ve standardní indukční terapii AML (daunorubicin a mitoxantron) zprostředkované SLC membránovými přenašeči, primárně transportéry pro organické kationty OCT1 a OCT2. V experimentální části byl gilteritinib otestován jako možný inhibitor i substrát těchto přenašečů. Výsledky této práce nastiňují možné riziko vzniku lékové interakce mezi protinádorovými léčivy využívanými v terapii AML.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Akutní myeloidní leukémie a její léčba

3.1.1 Charakteristika onemocnění

Akutní myeloidní leukémie (AML) je nádorové onemocnění hematopoetických buněk, které vzniká maligní transformací kmenové hematopoetické buňky diferencující se v blasty. Pro buňky AML je typické ukončení diferenciaci na této úrovni. Je to nejčastěji se vyskytující forma akutních leukémií dospělých a zahrnuje různorodé formy maligních onemocnění krvetvorby. Konkrétně jsou příčinou AML velké chromozomální translokace a mutace v genech, podílejících se na hematopoetické proliferaci a diferenciaci buněk, což vede k poruše autoregulačních mechanismů a k akumulaci špatně diferencovaných myeloidních buněk v kostní dřeni. Následkem zvyšování leukemických blastů v kostní dřeni je utlačována fyziologická krvetvorba a dochází ke snížení počtu všech normálních krvinek v periferní krvi. S tím souvisí klinické příznaky onemocnění, které se projeví na základě nedostatku funkčních krvinek v cirkulaci. Mezi charakteristické projevy AML patří malátnost, únava a pocit vyčerpání na základě nedostatku erytrocytů (anémie). Dále se mezi příznaky řadí krvácení, hematomy či epistaxe jako důsledek trombocytopenie a v neposlední řadě také dochází ke zvýšené četnosti infekcí z důvodu insuficience imunitní obrany v důsledku neutropenie (Adam 2008, Šálek 2012).

Etiologie onemocnění není zcela objasněna, ale předpokládá se, že predispozičními faktory ke vzniku AML mohou být vrozená hematologická onemocnění nebo předchozí terapie alkylačními cytostatiky (např. cisplatina) či blokátory topoisomerázy II (etoposid, lenitolid), popřípadě radiačním zářením. Vznik AML mohou indukovat také kancerogenní chemikálie, mezi které řadíme například benzen, herbicidy, pesticidy či tricyklické uhlovodíky. Zvýšené riziko vzniku onemocnění je také spojeno s různými chorobami, například s Fanconiho anémií, Downovým syndromem či Klinefelterovým syndromem. I přes výše zmíněné predispoziční faktory, ve většině případů dojde ke vzniku onemocnění de novo (Adam 2008, De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016).

Jelikož je akutní myeloidní leukémie vysoce heterogenní onemocnění, případy mohou být rozděleny do skupin s příznivým, středně pokročilým a nepříznivým

prognostickým rizikem na základě jejich cytogenetického profilu. Prognóza v těchto jednotlivých kategoriích se značně liší (Adam 2008, De Kouchkovsky et al. 2016).

Přítomnost genetických mutací je pro odhad prognózy klíčová, důležitou roli dále hrají klinické a demografické faktory (komorbidity, věk, předchozí protinádorová léčba), které zhoršují toleranci chemoterapie, respektive zvyšují pravděpodobnost rezistence k chemoterapii a mají zásadní význam pro predikci rizika relapsu a celkového přežití (Doubek 2020). V současné době je ke klasifikaci AML využívána ELN stratifikace založená na cytogenetických a molekulárně biologických nálezech (Obrázek 1) (Dohner et al. 2017).

Riziková skupina	Genetické abnormality
Příznivá	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	mutovaný <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> nebo s <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (mutované <i>FLT3-ITD</i> /wildtype < 0,5)
	bialelická mutace <i>CEBPA</i>
Střední	mutovaný <i>NPM1</i> s <i>FLT3-ITD</i> ^{high} (mutované <i>FLT3-ITD</i> /wildtype > 0,5)
	nemutovaný <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> nebo s <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (mutované <i>FLT3-ITD</i> /wildtype < 0,5); bez negativních cytogenetických abnormalit
	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i>
Nepříznivá	cytogenetické abnormality neklasifikované jako příznivé nebo nepříznivé
	inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); <i>KMT2A</i> přestavba
	t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL1</i>
	-5 nebo del(5q); -7; -17/abn(17p)
	komplexní karyotyp, monozomální karyotyp
	nemutovaný <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> ^{high} (mutované <i>FLT3-ITD</i> /wildtype > 0,5)
	mutovaný <i>RUNX1</i> ; bez příznivých genetických abnormalit
	mutovaný <i>ASXL1</i> ; bez příznivých genetických abnormalit
mutovaný <i>TP53</i>	

Obrázek 1: ELN stratifikace AML. Zpracováno dle: (Dohner et al. 2017)

Jak bylo výše zmíněno, AML lze na základě diagnostiky cytogenetického profilu rozdělit do tří skupin podle příznivých, středních či nepříznivých cytogenetických nálezů, z čehož je možné určit prognostické riziko onemocnění a zároveň stanovit strategii léčby. Skupina pacientů s intermediálním cytogenetickým rizikem je poměrně heterogenní. Zahrnuje pacienty s normálním karyotypem, ale i pacienty se změnami karyotypu, které nelze zařadit do zbylých dvou skupin. Pomocí molekulárně genetických vyšetření je možné u těchto pacientů identifikovat mutace, zejména mutace genů *FLT3*, *NPM1* a *CEBPA*, které mají dopad na prognózu onemocnění. Dalšími faktory ovlivňujícími prognózu a které je třeba při plánování léčebné strategie u AML brát v úvahu, jsou věk

pacienta, jeho tělesná kondice, další komorbidity, případně předchozí onkologická léčba. U pacientů s vyšším věkem se vyskytují často i další závažná onemocnění a ve vyšším procentu jsou v době diagnózy AML ve špatném celkovém stavu, což vede k horší toleranci intenzivní chemoterapie a následně pak i vyšší mortalitě (Karas 2011, De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Janeckova et al. 2016).

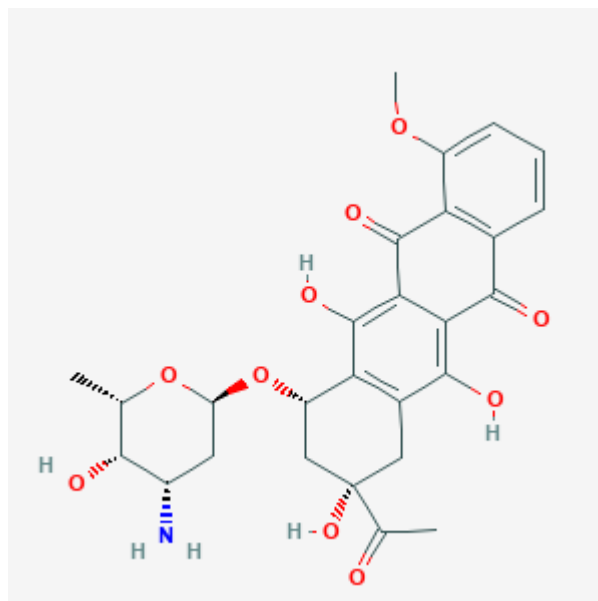
Terapie akutní myeloidní leukémie je typicky rozložena do dvou fází. První fáze zahrnuje indukční léčbu, jejíž cílem je navodit kompletní remisi onemocnění. Kompletní remisí je míněn výrazný úbytek počtu nádorových buněk a obnova normální hematopoézy. Aby se po dosažení kompletní remise docílilo dlouhotrvající remise choroby, následuje po indukční fázi léčba konsolidační, která má za cíl eradikovat residuální leukemické buňky. Ta sestává z 3-4 cyklů konsolidační terapie, popřípadě z 1-2 cyklů terapie následované alogenní transplantací kostní dřeně nebo transplantací kmenových krvetvorných buněk získaných z periferní krve. Volba terapie po dosažení kompletní remise závisí na cytogenetickém a molekulárním profilu onemocnění (Adam 2008, De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Doubek 2020).

3.1.2 Standardní terapie - antracykliny a strukturně podobné látky v léčbě AML (daunorubicin, mitoxantron)

Standardní léčbou první volby v indukční fázi terapie už od 70. let minulého století zůstává kombinace cytarabinu a antracyklinů, většinou daunorubicinu. Průběh indukční terapie se typicky sestává z režimu '7+3', který zahrnuje 7 dní kontinuálního podávání cytarabinu a následují 3 dny, kdy se podávají antracykliny. Tento režim je většinou volen u pacientů s intermediální či příznivou prognózou onemocnění a většinou je to také terapie volby u mladších pacientů (do 60 let věku), jelikož se jedná o poměrně intenzivní formu chemoterapie. U pacientů starších 60 let je často dosahováno horších výsledků už z důvodu přidružených komorbidit a celkového horšího stavu pacienta. Dalším faktorem a důvodem vyšší mortality je také celková toxicita intenzivní chemoterapie a dále pak léčbou navozená myelosuprese, která je spojena s riziky rozvoje závažných infekčních komplikací (Karas 2011, De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Kantarjian et al. 2021).

Výběr správného antracyklinového chemoterapeutika a jeho dávky pro dosažení optimálních výsledků terapie, tedy pro dosažení co nejlepších výsledků kompletní remise

je předmětem mnoha studií. Nejčastěji využívaný antracyklin v rámci indukční terapie je daunorubicin (Obrázek 2), místo něho je eventuelně volen idaurubicin. Oba vykazují zhruba stejné výsledky v rámci dosažené kompletní remise po indukční léčbě a celkového přežití. Pacienti mladší 50 let s normálním karyotypem mohou benefitovat z užívání vyšších dávek daunorubicinu v terapii (tj. 90 mg/m²). Daunorubicin je v indukční léčbě kombinován v dávkách mezi 30-60 mg/m² se 7denní kontinuální infuzí cytarabinu v dávce 100-200 mg/m² (De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016, Kantarjian et al. 2021).



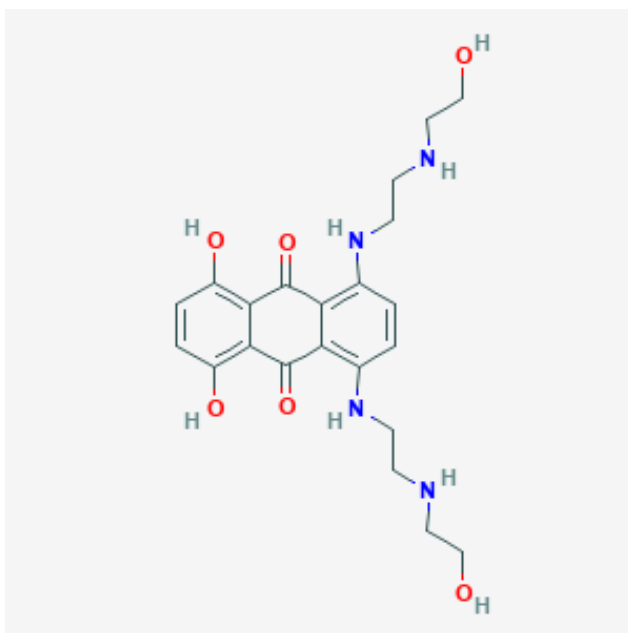
Obrázek 2: Chemická struktura daunorubicinu. Převzato z: (National Library of Medicine, 2021)

Předpokládá se, že mechanismus účinku antracyklinů je multifaktoriální. Spočívá v interkalaci léčiva mezi báze DNA a inhibici topoisomerázy II, což způsobí zlomy v DNA a následně tím zamezí replikaci DNA i syntéze RNA, což vede k buněčné smrti. Dalším mechanismem působení antracyklinů je tvorba volných radikálů, které zapříčiní lipidovou peroxidací membrány zničení jak zdravých, tak maligních buněk (Bardal 2011, Andreev et al. 2016).

U pacientů s nepříznivým prognostickým rizikem je velká šance, že nedojde k úspěšnému navození kompletní remise po absolvování indukční terapie kombinací daunorubicinu a cytarabinu. Okolo 40-60 % pacientů ve věku nad 60 let s AML nedosáhne kompletní remise indukční chemoterapií v klasickém režimu podávání ,7+3', nebo se jedná pouze o krátkodobé dosáhnutí remise z důvodu lékové rezistence. U těchto pacientů stojí často za nepříznivou prognózou pokročilý věk, předchozí

myelodysplastický syndrom, relabovaná/refrakterní forma AML, nepříznivý molekulární či cytogenetický profil a další komorbidity (Dohner et al. 2015).

Ve snaze dosáhnout lepších výsledků kompletní remise po indukční terapii začal být užíván mitoxantron (v dávce 12 mg/m²), buď samostatně v kontinuálních infuzích či v kombinaci s cytarabinem v klasickém režimu indukční terapie ,7+3', popřípadě v kombinaci s etoposidem. Mitoxantron (Obrázek 3) je syntetický antracendion, který byl vyvíjen primárně se snahou eliminovat vysokou kardiotoxicitu, která se u antracyklinů vyskytuje. V roce 1987 byl schválen FDA k léčbě AML. Neprokázala se menší toxicita terapie mitoxantronem než tomu je u ostatních antracyklinů, avšak i tak je mitoxantron v současné době považován za jedno z účinných léčiv využívaných v první linii zejména u starších osob pro terapii relapsů či refrakterní AML. Dále je mitoxantron využíván v indukční terapii tam, kde daunorubicin z důvodu rezistence leukemických buněk v terapii selhal, v rámci záchranné terapie u relabující a refrakterní AML. Zároveň při použití mitoxantronu u pacientů, kteří nepodstoupí allogenní transplantaci kostní dřeně, dochází k delšímu přežití a vyššímu účinku chemoterapie, než tomu je u použití daunorubicinu (Thomas et al. 1997, Mandelli et al. 2009, Larson et al. 2012, Doubek 2020).



Obrázek 3: Chemická struktura mitoxantronu. Převzato z: (National Library of Medicine, 2021)

Nejzávažnější komplikací při léčbě antracykliny je jimi způsobená kardiotoxicita. Může se projevit časně po terapii antracykliny jako pokles systolické funkce a abnormální změny na EKG, ale i chronicky v řádu několika let. Časná kardiotoxicita se častěji vyskytuje u starších osob léčených daunorubicinem. Jakmile se objeví kardiotoxické účinky při terapii, je třeba terapii antracykliny přerušit. Chronická kardiotoxicita je kumulativní a závislá na dávce. Může se manifestovat jako městnavé srdeční selhání a následkem toho dochází k vysoké mortalitě. Snahou eliminovat tyto nežádoucí účinky je omezení dávky antracyklinů na 450-500 mg/m², použití dexrazoxanu, který zabraňuje vzniku volných radikálů způsobujících myopatii, popřípadě aplikování liposomální formy cytarabinu a daunorubicinu (5:1), která vykazuje menší kardiotoxické účinky. Mitoxantron vzhledem ke své chemické struktuře nezpůsobuje vznik volných radikálů, tím pádem se u jeho použití neprojevují takové kardiotoxické účinky. Mezi další nežádoucí účinky antracyklinů se řadí alopecie, myelosuprese, mukositida, stomatitida a jiné (Bardal 2011, Rayner 2014).

Postremisní léčba AML zahrnuje konsolidační terapii, jejímž účelem je zničení minimální reziduální choroby a dosažení dlouhotrvající remise. Minimální reziduální chorobu lze stanovit buď časně po léčbě (indukční, konsolidační) k posouzení stupně remise a kinetiky léčebné odpovědi nebo po ukončení léčby k případnému časnému zachytu relapsu AML. K jejímu sledování je nejčastěji využívána multiparametrická průtoková cytometrie a RT-qPCR k sledování přítomných molekulárních markerů (Doubek 2020).

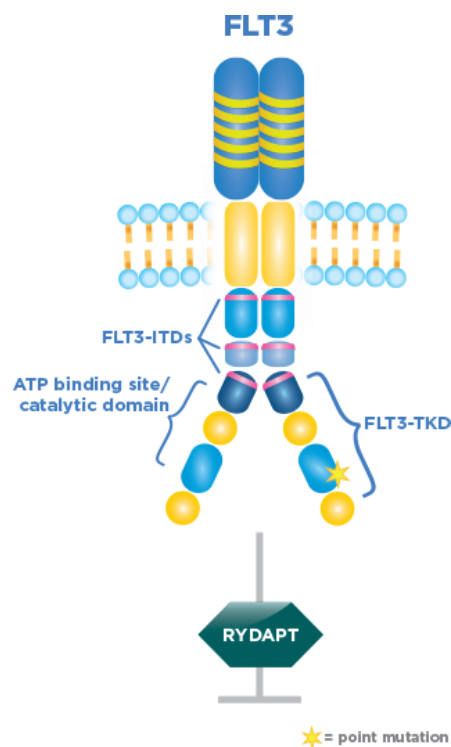
Za standard v konsolidační terapii je považováno podávání vysokých či středních dávek cytarabinu (1000-3000 mg/m²) v monoterapii, popřípadě terapie kombinací cytarabinu a daunorubicinu, eventuálně v kombinaci s gentuzumabem či midostaurinem, pokud byly využity už v indukční terapii. Konsolidační terapie v sobě zahrnuje 3-4 cykly podávání chemoterapeutik, případně pouze 2 cykly terapie u starších nemocných z důvodu snášenlivosti intenzity chemoterapie. V určitých případech zahrnuje postremisní léčba alogenní transplantaci. Ta se volí zejména tehdy, pokud riziko relapsu bez provedení alogenní transplantace je vyšší jak 35-40 % a nemocní jsou ve vysokém molekulárně-cytogenetickém riziku. V těchto případech je alogenní transplantace prakticky jedinou kurativní možností pro nemocné s primárně refrakterní chorobou (Doubek 2020).

3.1.3 Nová generace AML-léčiv, gilteritinib a jeho charakteristika a postavení v terapii

Objasnění heterogenity AML na molekulární, cytogenetické a klinické úrovni umožnilo nejenom lepší odhad prognózy onemocnění u jednotlivých pacientů, ale také dalo základ pro vývoj nových selektivnějších léčiv pro terapii AML, zaměřených na konkrétní molekulární abnormality (Kantarjian et al. 2021). Jenom od roku 2017 bylo schváleno 9 nových léčiv pro využití v terapii AML. Došlo ke schválení midostaurinu a následně gilteritinibu, obou cílených na FLT3, enzymového inhibitoru glasdegibu a znovuschválení monoklonální protilátky gemtuzumab ozogomycin cílené na CD33. FDA dále nedávno schválila ivosidenib a enasidenib zaměřené na inhibici IDH1 a IDH2 (varianty isocitrát dehydrogenázy), venetoclaxu cíleného na BCL-2 (DiNardo et al. 2020).

Tato protinádorová léčiva nové generace cílí na konkrétní genetické či molekulární abnormality. Jednou z nejčastějších genetických mutací objevujících se u pacientů s AML je mutace FLT3 receptoru, která je spojována se špatnou prognózou onemocnění a vyskytuje se zhruba u 30 % pacientů diagnostikovaných pro AML. Vyskytují se dva typy FLT3-aktivující mutace (obrázek 4): interní tandemová duplikace (FLT3-ITD), která tvoří 25-30 % mutací u AML a méně časté bodové mutace nebo delece v tyrosinkinázové doméně (FLT3-TKD), vyskytující se zhruba v 7 % potvrzených mutací (Pemmaraju et al. 2011, Wang 2019, Kiyoi et al. 2020). Interní tandemová duplikace vede k aktivaci FLT3-receptoru, což způsobí proliferaci a přežití leukemických blastů. U nositelů této FLT3-ITD mutace se častěji vyskytuje relaps onemocnění, mají horší léčebnou odpověď na záchrannou terapii a také kratší celkové přežití (Juliusson et al. 2020).

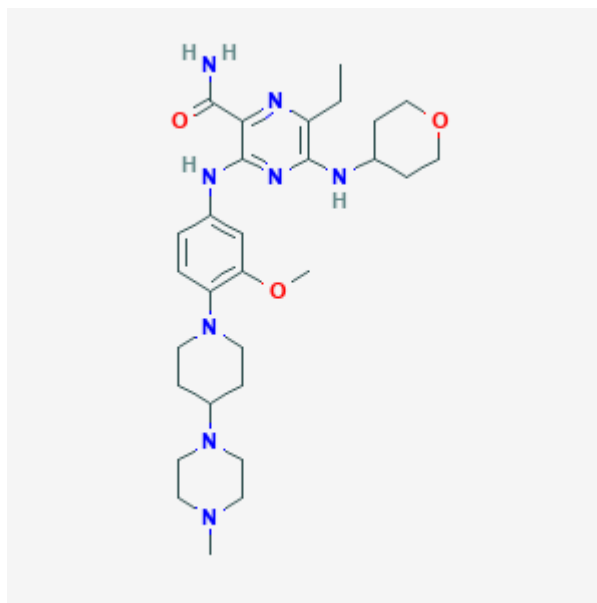
První generace FLT3 inhibitorů zahrnuje sunitinib, midostaurin, lestaurtinib a tandutinib, což jsou multikinázové inhibitory s nižší afinitou k FLT3. Jsou relativně nespecifické, což zapříčiňuje vyšší toxicitu terapie. V ČR se přitom rutinně používá u FLT3 pozitivních pacientů zejména midostaurin (Obrázek 4).



Obrázek 4: FLT3 mutace. Na obrázku je znázorněna lokalizace interní tandemové mutace (FLT3-ITD) a bodové mutace (FLT3-TKD) v tyrosinkinázové doméně. Zároveň je znázorněn cílený targeting FLT3 inhibitoru první generace, midostaurinu (registrován v r. 2017 pod názvem RYDAPT®). Převzato z: (Novartis Pharmaceuticals Corp, 2020)

Druhá generace FLT3 inhibitorů vykazuje vyšší specifitu k FLT3 a zároveň lepší toleranci léčby. Do druhé generace FLT3 inhibitorů spadají léčiva sorafenib, crenolanib, quizartinib a gilteritinib. Inkorporací FLT3 inhibitorů nové generace do první linie intenzivní chemoterapie je dosahováno vysoké odpovědi na léčbu. Navíc je účinnost FLT3 inhibitorů dále zkoumána i v kombinaci s dalšími cílenými léčivy za účelem optimalizace jeho použití a terapeutických režimů (Hassanein et al. 2016, Wang 2019, Chew et al. 2020). V ČR je aktuálně z druhé generace FLT3 inhibitorů dostupný pro AML terapii pouze gilteritinib (Obrázek 5), který byl schválen Evropskou lékovou agenturou (EMA) v říjnu 2019 pro léčbu relabované/refrakterní AML s FLT3 mutací, i pro samostatné použití u pacientů relabovanou či refrakterní AML, u kterých se vyskytuje mutace FLT3 (James et al. 2020). Jedná se o vysoce selektivní léčivo z druhé generace tyrosin kinázových inhibitorů, aktivní vůči oběma formám FLT3 mutace, která se u AML vyskytuje, a to jak vůči FLT3-ITD mutaci, tak vůči FLT3-TDK. Zároveň byla u gilteritinibu prokázána schopnost inhibovat AXL *in vitro*, což je tyrosin kinázový receptor hrající roli při přežití buněk, apoptóze a chemorezistenci. Předpokládá se, že tento receptor, který je ve velké míře exprimován u různých typů nádorových onemocnění, včetně AML, je potenciálním důvodem rezistence na terapii FLT3

inhibitory, hlavně u midostaurinu a quizartinibu (McMahon et al. 2019, James et al. 2020).



Obrázek 5: Chemická struktura gilteritinibu. Převzato z: (National Library of Medicine, 2021)

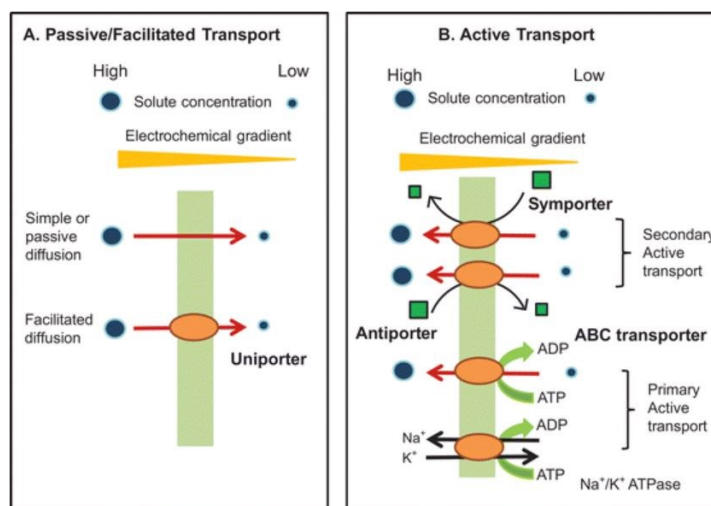
Léčba nemocných s primárně rezistentní a relabující AML není standardizovaná, vždy je třeba zvážit, zda bude nemocný profitovat z další intenzivní léčby oproti riziku komplikací, které tato léčba přináší. Gilteritinib prokázal schopnost dosáhnout lepších výsledků z hlediska přežití u pacientů trpících relabující či refrakterní AML s FLT3 mutací oproti klasickému režimu chemoterapie. Vzhledem k jeho příznivému profilu toxicity se gilteritinib stává standardem léčby v záchranné monoterapii primárně rezistentní či relabované AML s FLT3 mutací. V této indikaci je gilteritinib podáván perorálně v dávce 120 mg/den, při nedostatečné odpovědi na léčbu je možné dávku po 4 týdnech navýšit na 200 mg/den. V současné době probíhají klinické studie s použitím gilteritinibu v kombinaci klasickou chemoterapií a v kombinaci s ostatními léčivy, jako jsou například venetoclax a azacitidin u pacientů, u kterých není možné použít standardní formu indukční terapie (McMahon and Perl 2019, Doubek 2020).

Nejčastějšími nežádoucími projevy při použití gilteritinibu v terapii jsou zvýšení kreatinfosfokinázy v krvi, zvýšení alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) a zvýšení alkalické fosfatázy v krvi. Mezi nežádoucí účinky terapie dále patří průjem, únava, nauzea, zácpa, kašel, periferní otok, dyspnoe, závrať, hypotenze, bolest v končetině, astenie, artralgie a myalgie (McMahon and Perl 2019).

Limitem terapie inhibitory FLT3 je rezistence na jejich léčbu. Tato rezistence je způsobena více mechanismy (bodové mutace, protektivní efekt pojivových buněk kostní dřeně, aj.). Oproti ostatním FLT3 inhibitorům byl gilteritinib vyvinut s cílem inhibovat jak FLT3, tak AXL ve snaze překonat rezistenci na FLT3 inhibitory. I tak ale zůstává otázka výběru nejvhodnějšího inhibitory FLT3 z hlediska snížení rizika vzniku rezistence výzvou budoucnosti (Chew et al. 2020).

3.2 Membránové transportéry, jejich rozdělení a fyziologická role

Lipidová membrána buněk je pro většinu látek kromě vody a nepolárních sloučenin nepropustná. Hydrofilní molekuly se mohou skrze lipidovou membránu dostat dvěma způsoby, aktivně a pasivně. Tento přenos může být zprostředkován pomocí tří mechanismů (Obrázek 6): buď bez transportního proteinu (prostou difúzí) nebo facilitovanou difúzí skrze přenašečový protein, anebo pomocí dodání energie, tj. primárním či sekundárním aktivním transportem za účasti transportéru (Sahoo et al., 2014). Pasivní transport umožňuje difúzi rozpuštěných látek (glukóza, aminokyseliny, močovina) skrze membránu dle elektrochemického gradientu. Aktivní transport vyžaduje pro přenos látek proti elektrochemickému či koncentračnímu gradientu dodatečnou energii (Alberts 2001, Hediger et al. 2013, Pollard et al. 2017).



Obrázek 6: Transport látek přes buněčnou membránu. Na obrázku je znázorněn v levé části A transport látek přes membránu pomocí pasivní difúze a facilitované difúze zprostředkované přenašečem, obojí probíhající dle elektrochemického a koncentračního gradientu. V části je znázorněn primárně a sekundárně aktivní transport látek skrze membránu za účasti transportéru. Sekundárně aktivní transportéry lze rozdělit na antiportery a symportery, podle toho, zda jsou látky přenášeny přes membránu ve stejném směru, popřípadě ve směru opačném. Převzato z: (Nicholls et al. 2016)

Primárně aktivní transport přímo využívá chemickou energii ve formě ATP k přenosu substrátu skrze membránu proti jeho elektrochemickému gradientu. Tyto ATP-vázající (ABC; z anglického ATP-binding cassette) přenašeče představují skupinu ABC transportérů a iontové pumpy (ATPázy). Oproti tomu sekundárně aktivní transport páruje volnou energii získanou díky elektrochemickému gradientu jedné látky k přesunu druhé látky přes membránu proti jejímu elektrochemickému či koncentračnímu gradientu (Alberts 2001, Forrest et al. 2011, Hediger et al. 2013).

Membránové transportéry jsou zodpovědné za udržování homeostázy na obou stranách lipidové membrány a jsou důležité pro přenos substrátů esenciálních pro fyziologické fungování buňky. Jejich funkce tedy zahrnuje import živin pro buňku a eliminaci odpadních produktů a škodlivých látek ven z buňky (Linton 2007). Tyto membránové přenašeče na sebe naváží specifický substrát a změní svou konformaci tak, aby mohly přenést substrát na opačnou stranu membrány (Hediger et al. 2013, Pollard et al. 2017).

Z hlediska transportu léčiv skrze lipidovou membránu dovnitř a ven z buňky je důležité zmínit dvě nadrodiny transportérů: ABC transportéry a SLC transportéry (solute carriers). Tyto dvě nadrodiny zahrnují přes 500 transportérů, jejichž kódující geny byly identifikovány v lidském genomu (Nicholls et al. 2016). ABC transportéry fungují převážně jako effluxní transportéry, zatímco SLC transportéry jsou primárně zapojeny ve vstřebání malých molekul do buňky (Lin et al. 2015).

Nadrodina ABC transportérů v sobě zahrnuje 7 rodin (ABCA-ABCG). ABC transportéry jsou zodpovědné za přenos široké skupiny endogenních substrátů mezi které se řadí například konjugované žlučové soli, steroidní hormony, cholesterol a jiné. Mezi klinicky relevantní ABC transportéry patří zejména P-glykoprotein (ABCB1, MDR1), ABCC rodina s multidrug resistance-associated proteiny (MRPs, ABCC1-ABCC6) a ABCG rodina zahrnující breast cancer resistant protein (BCRP, ABCG2) (Nicholls et al. 2016).

Solute carriers (SLC) transportéry jsou klasifikovány do 52 různých rodin. Současně je známo více než 300 SLC transportérů v lidském genomu. Zajišťují například vstřebání živin a metabolitů včetně cukrů, aminokyselin, peptidů, anorganických iontů, organických aniontů a kationtů do buňky. Dále jsou zodpovědné za uvolnění neurotransmiterů a absorpci, distribuci a exkreci léčiv a jiných xenobiotik. Rodiny

důležité pro transport léčiv jsou především SLCO, SLC22 a SLC47 (Lin et al. 2015, Nicholls et al. 2016).

3.2.1 Role membránových transportérů ve farmakokinetice léčiv

Typická funkce některých humánních ABC transportérů spočívá v detoxifikaci a ochraně buněk před xenobiotiky vypuzováním těchto látek ven z buňky. Substráty ABC transportérů z řad léčiv tvoří široká skupina strukturně odlišných molekul zahrnující i některé protinádorové látky. Přesto, že je identifikováno více ABC transportérů, které mohou potenciálně ovlivnit transport léčiv, tak největší roli v klinickém použití hrají tři nejdůležitější (Tabulka 1): P-glykoprotein (ABCB1/MDR1), multidrug-resistance protein 1 (ABCC1/ MRP1) a breast cancer resistance protein (ABCG2/ BCRP) (Tamaki et al. 2011). Tyto transportéry (P-glykoprotein, BCRP a MRP1) jsou vysoce exprimovány ve střevě, játrech a ledvinách, kde mohou limitovat biodostupnost, případně zvyšovat eliminaci podávaných léčiv. Zejména P-glykoprotein a BCRP jsou také exprimovány v citlivých tkáních, například v mozku, placentě a kmenových buňkách, kde vykonávají funkci bariéry pro vstup nežádoucích látek (Linton 2007). Následkem těchto protektivních mechanismů mohou ABC transportéry ovlivňovat absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci léčiv (ADME), ale zároveň i jejich toxicitu (Szakacs et al. 2008). Inhibice ABC transportérů často vede k farmakokinetickým změnám kvůli interakci léčiv, což může ovlivňovat účinnost i bezpečnost terapie (Chen et al. 2013, Robey et al. 2018).

K interakcím na membránových přenašečích může docházet dvěma způsoby, což zejména u pacientů s komplexní terapií může představovat riziko při podávání více léčiv současně. Jedním z mechanismů vzniku lékové interakce je, když léčivo A inhibuje transportér přenášející léčivo B, je tedy inhibitorem transportéru, což ovlivní distribuci léčiva B, které je substrátem tohoto transportéru. Nebo naopak léčivo A indukuje expresi určitého transportéru, což ovlivní distribuci všech jeho substrátů (Montanari et al. 2015).

Transportér	Lokalizace	Substráty	Inhibitory
ABCB1 (P-glykoprotein, MDR1)	střevo, játra, ledviny, HEB, placenta	digoxin, fexofenadin, morfin, loperamid, kortikoidy, cyklosporin, verapamil, doxorubicin, daunorubicin, kolchicin, etoposid, metotrexát, paklitaxel, mitoxantron	cyklosporin, verapamil, chinidin, ritonavir, ketokonazol, itraconazol
ABCC1 (MRP1)	HEB, plíce, srdce, ledviny, krevní buňky, játra, střevo, placenta	doxorubicin, daunorubicin, kolchicin, topotekan, metotrexát etoposid, vinkristin, vinblastin, imatinib, indinavir, ritonavir, saquinavir ciprofloxacin	probenecid, sulfipyrazon, cyklosporin
ABCG2 (BCRP)	Střevo, HEB, játra, placenta	mitoxantron, doxorubicin, daunorubicin, metotrexát, topotecan, etoposid, imatinib, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, rosuvastatin, lamivudin	cyklosporin, gefitinib, imatinib, ritonavir

Tabulka 1: Charakteristika klinicky nejvýznamnějších ABC transportérů. Adaptováno z: (Ni et al. 2010, Choi et al. 2014)

Když uvažujeme absorpci léčiv, je potřeba brát zřetel na schopnost ABC transportérů snížit biodostupnost léčiv tím, že vypudí léčivo z intestinální mukózy do lumen střeva. Například P-glykoprotein (ABCB1) může limitovat biodostupnost perorálně podávaných léčiv snížením absorpci léčiv v gastrointestinálního traktu. Stejně tak mohou působit i ABCC2 a ABCG2. Vzhledem k mnohočetným rolím P-glykoproteinu a ostatních transportérů a předpokladu léčiva být substrátem či inhibítorem ABC transportérů FDA a EMA doporučuje na základě návrhu International Transporter Consortium testovat a posoudit pravděpodobnost interakce léčiva s P-glykoproteinem a BCRP (ABCG2) (International Transporter Consortium et al. 2010, EMA 2012, FDA 2020). To je důležité zejména v predikci vzniku lékových interakcí, jelikož bylo zaznamenáno více případů podávání inhibítora P-glykoproteinu současně s jeho substrátem, což vedlo ke zvýšení hladin léčiva v krevním oběhu a následnému projevení vážných nežádoucích účinků léčiva (Calcagno et al. 2007, Montanari and Ecker 2015).

ABC transportéry mohou být také ve zvýšené míře exprimovány v nádorových buňkách, což vede ke vzniku mnohočetné lékové rezistence a snížení účinku protinádorové terapie. Obzvláště P-glykoprotein (ABCB1), MRP1 (ABCC1) a BCRP

(ABCG2) jsou limitují terapii nádorů vypuzováním léčiv ven z buňky (Choi and Yu 2014).

Kromě ABC transportérů ovlivňující farmakokinetiku léčiv je důležité zmínit i SLC transportéry, které vzhledem k tomu, že jsou exprimovány ve tkáních klíčových orgánů pro absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci léčiv mohou do ovlivnění farmakokinetických parametrů léčiva z velké míry zasáhnout. Kromě toho byla exprese SLC transportérů zjištěna taktéž i u různých typů nádorových buněk (Samodelov et al. 2020).

Do podrodiny transportérů kódovaných geny *SLC22A* spadají organic cation transporters (OCT), konkrétně OCT1, OCT2 a OCT3 a dále organic cation/carnitine transporter novel 1 a 2 (OCTN1, OCTN2). OCT1 a OCT2 transportéry (Tabulka 2) jsou vzhledem k jejich primárnímu umístění důležité z hlediska hepatální a renální eliminace mnoha léčiv využívaných v terapii (Samodelov et al. 2020). Zatímco OCT1 je exprimován v největší míře v játrech, kde zprostředkovává vylučování endogenních organických kationů a kationických léčiv, tak OCT2 je specifický pro ledviny, kde zajišťuje renální exkreci kladně nabitých endogenních molekul i léčiv (Sutherland et al. 2020). Zároveň může být pomocí OCT transportérů ovlivněn vstup endogenních látek či léčiv dovnitř buňky, což je důležité zmínit z důvodu jejich exprese v nádorových buňkách, kde tak vytváří determinanty pro akumulaci léčiv uvnitř těchto buněk ovlivňujících koncentraci protinádorových léčiv potřebnou k účinku terapie (Koepsell 2015, Brecht et al. 2020).

Transportér	Lokalizace	Substráty	Inhibitory
OCT1 (SLC22A1)	Játra (ledviny, střevo, plíce, mozek, kosterní svaly, placenta)	Metformin, cimetidin, imatinib, sorafenib, cytarabin, lamivudin, acyklovir, ganciklovir, verapamil, oxaliplatin	chinidin, chinin, verapamil, cimetidin, mitoxantron, tamoxifen, ketokonazol, itakonazol, paklitaxel
OCT2 (SLC22A2)	Ledviny (mozek, plíce, tenké střevo, placenta)	metformin, amantadin, memantin, vareniklin, pindolol, dofetilid, cisplatin	Cimetidin, chinidin, verapamil

Tabulka 2: Přehled lokalizace, substrátů a inhibitorů OCT transportérů. Adaptováno z: (Lozano et al. 2013, Feng et al. 2016)

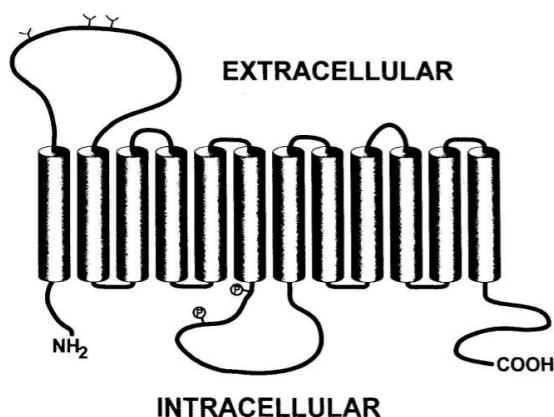
Výskyt OCT1 transportéru byl zaznamenán v různých typech nádorových tkání, například u lymfomů či chronické myeloidní leukémie, kde se předpokládá, že by to mohlo zvýšit citlivost těchto tkání vůči protinádorovým léčivům. Mezi substráty OCT1 patří například imatinib a oxaliplatin. Především vstup imatinibu do buněk chronické myeloidní leukémie je asociován s expresí OCT1 transportéru ve tkáni (Sutherland et al. 2020). Snížená exprese tohoto transportéru nebo ztráta jeho funkčnosti je spojována se sníženou odpovědí na léčbu imatinibem a nižším procentem celkového přežití u pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií. Oproti tomu u pacientů, kteří vykazovali dobrou odpověď na léčbu byla prokázána zvýšená exprese OCT1 na úrovni mRNA. Vliv OCT1 v terapii chronické myeloidní leukémie imatinibem je nicméně stále předmětem diskuze (Brosseau et al. 2019).

3.2.2 Charakteristika OCT1 a OCT2

Hlavní funkcí OCT transportérů je přenos malých hydrofilních látek, které nesou za fyziologického pH kladný náboj, přes buněčnou membránu. Tento přenos široké škály kladně nabitých látek je zprostředkován pomocí pasivní facilitované difúze podle jejich elektrochemických gradientů, je nezávislý na pH a sodných iontech a vždy je elektrogenní. Hlavní hnací silou, která určuje směr transportu je elektrochemický gradient transportovaného kationu, typicky je to negativní membránový potenciál uvnitř buňky (Klaassen et al. 2010). V ledvinách spolupracují s MATE (multidrug and toxin extrusion) transportéry k zajištění transepiteliálního transportu organických kationů. V lidském těle

rozeznáváme OCT1, OCT2 a OCT3 transportéry. OCT1 a OCT2 jsou si strukturně velmi podobné, jelikož sdílí ze 70 % shodnou sekvenci proteinů (aminokyselin) (Nies et al. 2011, Roth et al. 2012, Veiga-Matos et al. 2020).

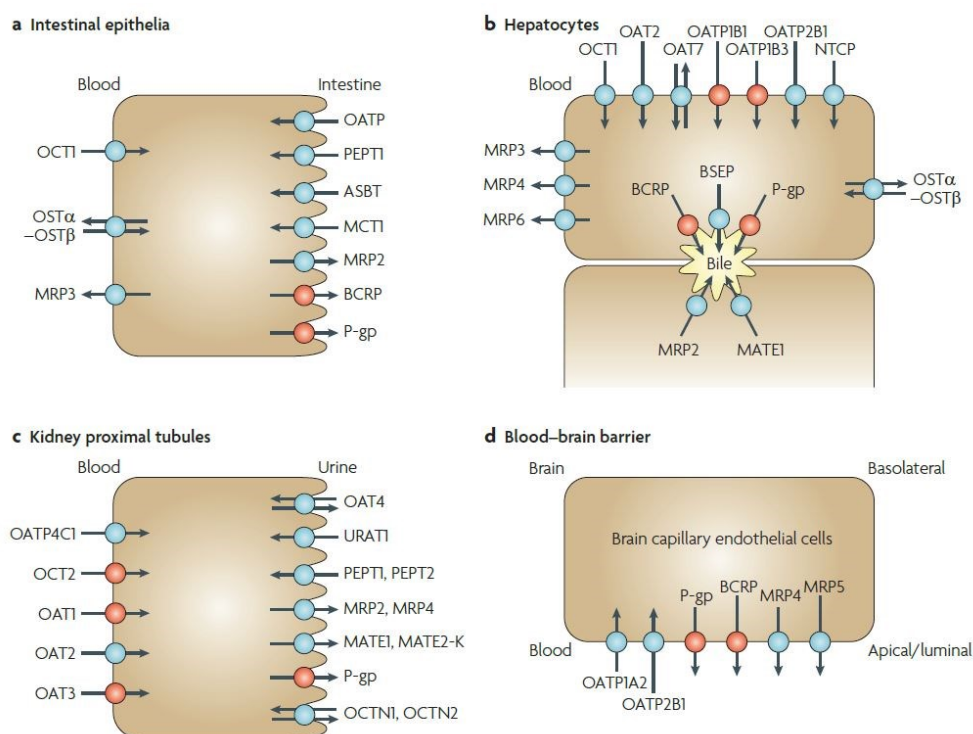
Struktura OCT transportérů sestává z 543 až 557 aminokyselin. Předpokládá se, že obsahují 12 transmembránových domén složených z aminokyselinového počátku v buňce a zakončených karboxylovým koncem (Obrázek 7). Velká extracelulární smyčka mezi první a druhou transmembránovou doménou obsahuje N-glykosylační místa a velká intracelulární smyčka mezi šestou a sedmou transmembránovou doménou obsahuje několik zdánlivých fosforylačních míst (Roth et al. 2012).



Obrázek 7: Struktura OCT transportéru. Převzato z: (Dresser, M. et al., 1999)

SLC22A1 gen kóduje expresi OCT1 transportéru, který se v největší míře vyskytuje v hepatocytech. Tam je lokalizován v bazolaterální membráně jaterních buněk (Obrázek 8). OCT1 nezajišťuje pouze transport kationických léčiv a endogenních látek z jaterních sinusoid do hepatocytů, ale také uvolňuje organické kationty v opačném směru, z hepatocytů ven (Zhou et al. 2021). Zároveň je v menší míře exprimován i v ledvinách, tenkém a tlustém střevu, plicích, mozku, srdci, kosterním svalstvu a placentě (Nies et al. 2011). OCT1 například z části reguluje sekreci a absorpci organických kationtů v tenkém střevu, v apikální membráně proximálních a distálních tubulů ledvin napomáhá tubulární reabsorpci látek (např. metforminu), a dále zajišťuje absorpci určitých léčiv v plicích. Kromě toho se také předpokládá, že je zodpovědný za zprostředkování transportu organických kationtů přes hematoencefalickou bariéru a přenos antivirotik do buněk imunitního systému (Roth et al. 2012, Zhou et al. 2021).

OCT2 se vyskytuje převážně v bazolaterální membráně ledvinných buněk proximálních kanálků (Obrázek 8), kde sehraává první krok v ledvinné sekreci organických kationtů díky přesunu těchto látek přes bazolaterální membránu. Expresse OCT2 je kódována genem *SLC22A2*. V menší míře je lokalizován i v mozku, plicích, tenkém střevu, brzlíku, placentě a vnitřním uchu (Nies et al. 2011, Roth et al. 2012).



Obrázek 8: Přehled výskytu transportérů v jednotlivých tkáních. Převzato z: (International Transporter Consortium et al. 2010).

Mezi substráty OCT transportérů se řadí velká skupina strukturně odlišných organických kationtů, jak endogenních, tak exogenních. Z endogenních sloučenin transportují OCT transportéry například katecholaminy, neurotransmitery, kreatinin a cholin. Okolo 40 % předepisovaných léčiv tvoří organické kationty, mnohé z nich jsou také substráty či inhibitory OCT transportérů (Koepsell 2020). Z léčiv se mezi substráty řadí například sloučeniny platiny, H₂-blokátor cimetidin, antivirotika aciklovir, ganciklovir a lamivudin, z antidiabetik metformin, antiarytmikum chinidin, a jiné (Nies et al. 2011, Roth et al. 2012).

3.2.3 Membránové transportéry a vznik lékových interakcí

Se stárnutím populace a narůstajícím trendem polyfarmakoterapie se zvyšuje i riziko vzniku lékových interakcí, které mohou vést ke zvýšení nežádoucích účinků nebo v některých případech ke ztrátě účinku terapie. Inhibice metabolismu léčiva nebo inhibice transportéru zajišťujícího jeho eliminaci zapříčiní zvýšení koncentrací léčiva, které je substrátem daných mechanismů, zatímco indukce zvýší metabolismus či eliminaci léčiva vedoucí ke snížení koncentrací léčiva jako substrátu. Současné studie ukazují, že transportéry jako například P-glykoprotein, BCRP, OAT či OCT transportéry stojí za vznikem klinicky relevantních lékových interakcí (Tornio et al. 2019).

Interakce ABC transportérů v popředí s P-glykoproteinem (ABCB1) jsou extenzivně sledovány za cílem objasnit, u kterých léčiv může docházet ke klinicky relevantním lékovým interakcím zprostředkovaným pomocí membránových transportérů (International Transporter Consortium et al. 2010). V poslední době se prokazuje důležitost i OCT1 a OATP2B1 při vzniku lékových interakcí na úrovni jaterního a střevního vychytávání léčiv, ukazující, že by tyto transportéry také měly být zvažovány (Tornio et al. 2019). U OCT transportérů se jedná hlavně o interakce na úrovni jaterní exkrece zprostředkované OCT1 transportéry a na úrovni ledvinné exkrece u OCT2 (Samodelov et al. 2020).

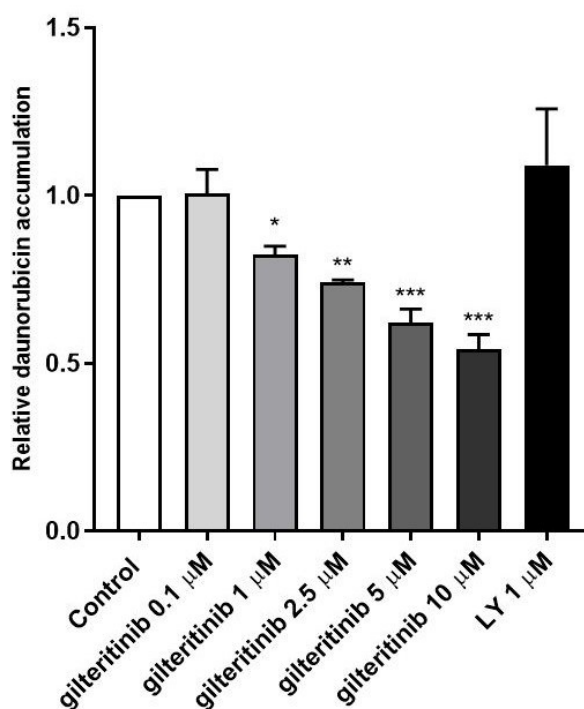
Mezi klinicky relevantní interakce na OCT1 se řadí například ovlivnění jaterní exkrece metforminu verapamilem, který daný transportér inhibuje. Mezi substráty OCT1 se dále řadí například fenoterol, sumatriptan, tramadol, tropisetron, ondansetron a morfin. Na úrovni ledvinné exkrece jsou zaznamenány interakce mezi cimetidinem, vystupujícím jako inhibitor OCT2, a metforminem, ranitidinem, vareniklinem, dofetilidem a pindololem, které jsou substráty. Bylo také pozorováno ovlivnění ledvinné exkrece metforminu trimetoprimem. Dále mezi substráty OCT2 patří protinádorová léčiva cisplatina a oxaliplatina (International Transporter Consortium et al. 2010, Muller et al. 2011, Zamek-Gliszczyński et al. 2018, Gessner et al. 2019).

Za poslední roky bylo prokázáno, že transportéry mohou ovlivnit dispozici léčiv a vést ke vzniku lékových interakcí vyskytujících se u mnoha nově schválených molekul. Na základě toho publikovalo International Transporter Consortium doporučení (White paper), ve kterých zdůrazňuje důležitost zhodnocení klinicky nejvýznamnějších transportérů *in vitro* a *in vivo*, jako je například P-glykoprotein, BCRP, organic anion transporter 1 (OAT1), organic anion transporter 3 (OAT3), organic cation transporter 2

(OCT2) a organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1), kvůli klinicky relevantním důsledkům a vzniku lékových interakcí. Následně FDA a Evropská léková agentura publikovali doporučení zahrnout interakce zprostředkované transportéry jako část evaluace lékových interakcí *in vitro* pro farmaceutický průmysl, tyto doporučení poté periodicky reviduje v závislosti na pokroku ve výzkumu (EMA 2012, FDA 2020). Na tomto podkladě je ovlivnění lékových transportérů testováno už v preklinickém vývoji léčiv, což poskytuje cenné informace o substrátech a inhibitech různých membránových transportérů (Tornio et al. 2019). Průběžné upřesňování potenciálních lékových interakcí vznikajících na bázi membránových přenašečů je stále velmi aktuální a nabývá na relevanci.

4. HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Během předchozího testování gilteritinibu jako možného inhibitoru efluxních transportérů byl zaznamenán pokles akumulace daunorubicinu u leukemické buněčné linie HL-60 po inkubaci s gilteritinibem (Obrázek 9). Mechanismus tohoto neočekávaného jevu nebyl objasněn, avšak výsledná data naznačují možnou interakci mezi oběma léčivy. Na základě literární rešerše jsme se rozhodli ověřit možnost vzniku zmiňované interakce na úrovni OCT transportérů. Ověření této potenciální interakce mezi gilteritinibem a daunorubicinem je důležité nejenom na úrovni celotělové farmakokinetiky, ale také na úrovni nádorových buněk, vzhledem k indikaci a použití obou léčiv v terapii AML.



Obrázek 9: Akumulace daunorubicinu u HL-60 leukemické buněčné linie. V grafu na obrázku si lze všimnout klesající akumulace daunorubicinu v HL-60 buněčné linii při použití koncentrační řady gilteritinibu.

Konkrétním cílem této práce bylo vyhodnotit interakční potenciál gilteritinibu s OCT1 a OCT2 membránovými transportéry za využití modelových buněčných linií. Zaměřili jsme se na dva dílčí cíle:

A) Otestovat možný vliv gilteritinibu na akumulaci daunorubicinu a mitoxantrou prostřednictvím inhibice OCT1 a OCT2 transportérů pomocí akumulační studie na MDCKII buněčných liniích.

B) Zjistit, zda gilteritinib je substrátem OCT1 a OCT2 transportérů pomocí transportní studie vyhodnocující bazolaterálně-apikální transportu gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII-OCT1 a MDCKII-OCT2 buněk v porovnání v MDCKII kontrolní buněčnou linií.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

5.1.1 Buněčné linie (a jejich kultivace)

V experimentech byly využity Madin-Darby canine kidney II (MDCKII) buněčné linie, jak kontrolní, které byly transfekovány prázdným vektorem, tak buněčné linie transfekované s OCT1, OCT2 transportéry. Buňky byly získány od prof. Martina Fromma z Institute of Clinical and Experimental Pharmacology and Toxicology v Erlangenu (Německo).

Ke kultivaci všech MDCKII buněčných linií bylo použito kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) s vysokým obsahem glukózy a L-glutaminu s přidavkem 10 % FBS. Kultivace probíhala při 37°C v atmosféře 5% CO₂. Při dosažení konfluencie 80 - 90% byly buněčné linie pravidelně pasážovány.

Standardní postup pasážování zahrnoval odsátí média z kultivační láhve, poté opláchnutí buněčných linií pomocí fosfátového pufru (PBS) přehřátého na teplotu 37°C a následnou inkubaci s trypsinem při 37°C/5% CO₂ do uvolnění buněk ode dna kultivační láhve. Po uvolnění byly buňky rozsuspendovány v čerstvém médiu (taktéž předem přehřátém na 37 °C) a přeneseny v poměru 1:20 do nové kultivační láhve s předpřipraveným čistým médiem v potřebném objemu.

5.1.2 Roztoky, činidla, média

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- FBS, Diagonum (Ebsdorfergrund, Germany)
- Opti-MEM® médium, Gibco BRL Life Technologies (Rokville, MD, USA)
- Trypsin, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Gilteritinib, MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)
- Mitoxantron, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Daunorubicin, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Fosfátový pufr (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Verapamil, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

- FITC-dextran, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.1.3 Pomůcky a přístroje

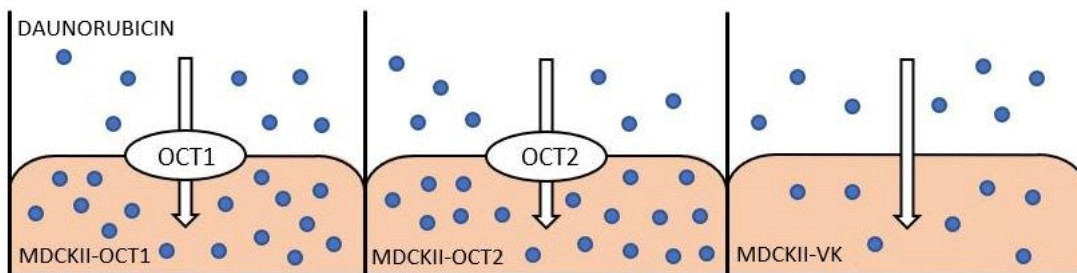
- Inkubátor SANYO MCO-18AC (UV), (Honmachi, Coriguchi City, Osaka)
- Inverzní optický mikroskop Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Itálie)
- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- Spektrální analyzátor SONY SA3800 (SONY Biotechnnology, San Jose, CA, USA)

5.2 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu v MDCKII-OCT1/OCT2/kontrolních buněčných liniích

5.2.1 Princip metody

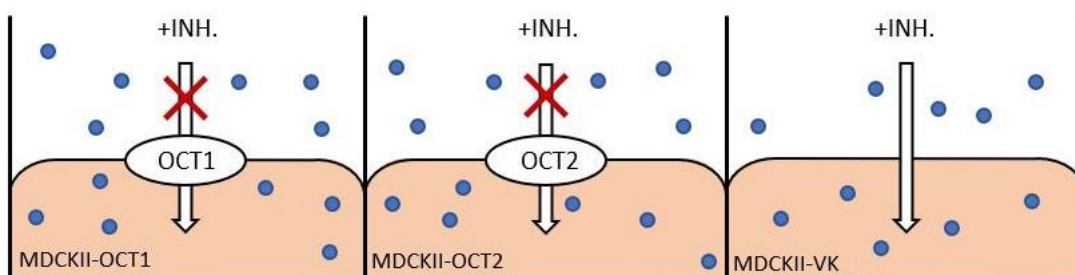
Pro tento experiment byla použita metoda porovnávající míru akumulace daunorubicinu nebo mitoxantronu uvnitř MDCKII-OCT1 a MDCKII-OCT2 buněk, jednotlivě transfekovaných OCT1 nebo OCT2 transportéry, oproti MDCKII kontrolní buněčné linii, která dané transportéry neexprimuje. Tato metoda zároveň umožňuje sledovat změny v transportu daných léčiv do buňky a jejich následné akumulaci přidáním inhibitorů OCT1 a OCT2 transportérů.

Substráty OCT1 a OCT2 přechází přes transportér dovnitř buňky, kde se akumulují (Obrázek 10). Daunorubicin a mitoxantron jsou fluorescenčními látkami, takže je následně možné při určité vlnové délce charakteristické pro dané léčivo pomocí průtokového cytometru změřit pomocí vyzařované fluorescence množství prošlého léčiva do buňky. Míra akumulace daunorubicinu je měřena pomocí excitace modrým laserem o vlnové délce 488 nm, pro mitoxantron byl použit červený laser o vlnové délce 638 nm.



Obrázek 10: Transport léčiv daunorubicinu/mitoxantronu přes OCT1 a OCT2 uptake transportéry do buňky a jejich následná akumulace v MDCKII buňkách. U kontrolní linie MDCKII buněk dochází k transportu pouze pomocí pasivní difúze.

Gilteritinib jako potenciální inhibitor OCT1 a OCT2 influxních transportérů je v experimentu používán v různých koncentracích (0,1 μM – 10 μM). Se vzrůstající koncentrací gilteritinibu by se měla zvyšovat jeho schopnost inhibovat OCT1 a OCT2 transportéry, tudíž by mělo dojít ke snižování množství daunorubicinu či mitoxantronu procházejícího do buňky. Při maximální inhibici daných transportérů by mělo dojít ke snížení množství daunorubicinu či mitoxantronu v buňce (ideálně) až na úroveň srovnatelnou s kontrolními buňkami (Obrázek 11). Pro mechanismus účinku obou léčiv je přestup léčiv do vnitř buňky esenciální. Z tohoto hlediska by případná schopnost gilteritinibu inhibovat vstup daunorubicinu či mitoxantronu do buněk zprostředkovaný OCT1 případně OCT2 transportéry mohla ovlivnit jejich účinky. Jako vzorový inhibitor OCT1 případně OCT2 transportérů je zde pro porovnání využíván verapamil.



Obrázek 11: Inhibovaný uptake léčiva do buněk mediovaný přes MDCKII-OCT1 a MDCKII-OCT2 transportér. U kontrolní linie MDCKII buněk k přestupu léčiva do buňky dochází pouze pasivní difúzí. Při inhibici MDCKII-OCT1 a MDCKII-OCT2 transportérů pomocí inhibitoru dochází ke snižování prostupu daunorubicinu/mitoxantronu do buňky. Se zvyšující se koncentrací inhibitoru úměrně klesá množství prostoupeného léčiva.

5.2.2 Postup

Buňky byly počítány v suspenzi o objemu 10 μl pomocí Bürkerovy komůrky a následně nasazeny na 12 ti jamkovou kultivační destičku v počtu 150 000 buněk na jamku v 1,5 ml DMEM kultivačního média obohaceného o 10% FBS. Poté byly 24 hodin kultivovány při 37 °C/ 5 % CO₂ do 90 % konfluence. Před začátkem experimentu byl nárůst buněk zkontrolován pod světelným mikroskopem. Poté jsem pomocí postupného ředění připravila koncentrační řadu námi testovaného léčiva gilteritinibu v Opti-MEM. Konečné koncentrace gilteritinibu v Opti-MEM byly 0,1 μM , 1 μM , 5 μM a 10 μM . Následně byly připraveny roztoky daunorubicinu a mitoxantronu, oba o koncentraci 250 μM , zde jako potenciální substráty daných transportérů. Dále byl naředěn roztok modelového inhibitoru verapamilu na konečnou koncentraci 50 μM .

Po připravení veškerých roztoků potřebných pro experiment bylo z jamek opatrně odsáto médium, aby nedošlo k porušení vrstvy buněk, a následně byly buňky opláchnuty pomocí předehřátého PBS (500 μl). Po odsátí PBS byly do jednotlivých jamek napipetovány příslušné roztoky. První jamka sloužila pro kontrolu pozadí (background) a bylo do ní napipetováno pouze 500 μl čistého roztoku Opti-MEM. Do jamek pro negativní kontrolu v duplikátu byl napipetován taktéž čistý Opti-MEM v objemu 500 μl . Do jamky pro modelový inhibitor byl napipetován 50 μM roztok verapamilu v Opti-MEM a do zbylých 8 jamek byla napipetována koncentrační řada gilteritinibu v Opti-MEM od nejnižší koncentrace po nejvyšší, v duplikátech v jamkách pod sebou (viz. Tabulka 1). Buňky se následně nechaly po dobu 15 minut inkubovat při 37°C/5% CO₂.

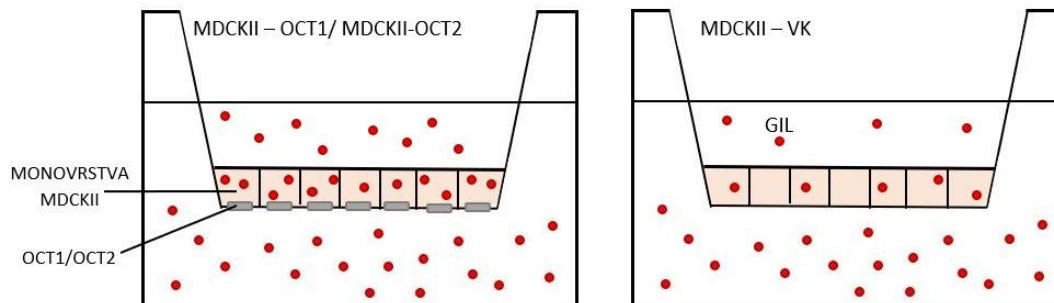
Poté jsem do každé jamky kromě jamky určené pro kontrolu pozadí (background) přidala 2 μl roztoku daunorubicinu nebo mitoxantronu a následně nechala 1 hodinu inkubovat při 37°C/5% CO₂. Finální koncentrace daunorubicinu i mitoxantronu byly 1 μM .

Po 60 minutách inkubace byla kultivační destička přesunuta na led, aby se zabránilo nežádoucímu aktivnímu transportu po uplynutí inkubační doby. Buňky byly dvakrát opláchnuty 500 μl studeného PBS. Po odsátí PBS jsem do každé jamky přidala 50 μl ledového trypsinu pro uvolnění buněk od dna jamky. Následně jsem buňky rozsuspendovala ve 450 μl PBS s 2 % FBS a přenesla do zkumavek pro měření průtokovým cytometrem. Jako první byla proměřena kontrola pozadí (background) a její hodnota byla v závěru odečtena od ostatních, aby nezkreslovala naměřené výsledky.

5.3 Transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněčných linií s inhibítorem a bez inhibítora

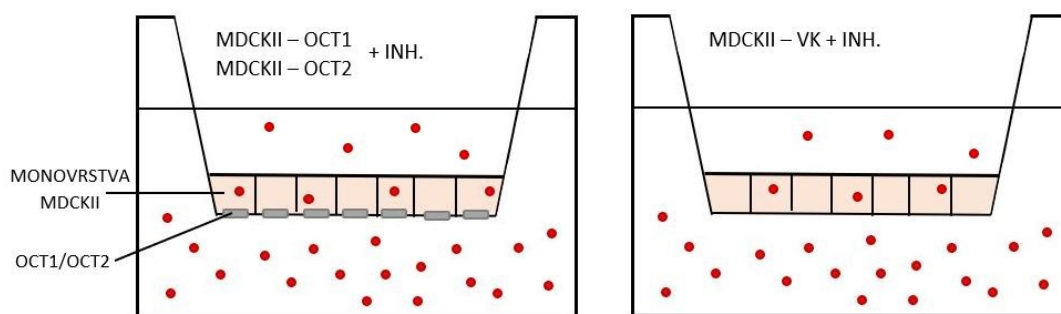
5.3.1 Princip metody

V tomto experimentu je gilteritinib zkoumán jako léčivo s možnou substrátovou afinitou k transportérům OCT1 a OCT2. Princip metody spočívá ve schopnosti transportérů umožňovat přestup gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk a zároveň ve sledování, jak tento transport je ovlivněn přidáním inhibítora jednotlivých transportérů (Obrázek 12). Nasazená monovrstva MDCKII buněk od sebe odděluje apikální a bazální kompartment. V tomto experimentu je sledován přestup z bazolaterálního (zde donorového) kompartmentu do apikálního (akceptorového). Pokud by gilteritinib vykazoval substrátovou afinitu k některému z uvedených transportérů, tak by po jeho aplikaci do bazolaterálního kompartmentu mělo začít docházet k většímu přestupu léčiva v bazolaterálně-apikálním směru (B-A) oproti kontrolním buňkám. I tam lze však očekávat částečný přestup, neboť gilteritinib přechází přes buněčné membrány i pomocí pasivní difuze.



Obrázek 12: Bazolaterálně-apikální transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk. Vpravo na obrázku je znázorněn B-A transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII kontrolních buněk. Transport probíhá pouze pasivní difúzí. Vlevo na obrázku je vykreslen transport gilteritinibu se substrátovou afinitou k transportéru (OCT, OCT2), který umožňuje jeho mohutnější přenos z bazolaterálního do apikálního kompartmentu. Určitou část přenosu tvoří taktéž pasivní difúze.

Po přidání inhibítora (verapamil) by mělo dojít ke snížení schopnosti transportéru mediovat přenos léčiva přes monovrstvu buněk (ve směru B-A). Transport gilteritinibu přes monovrstvu buněk by tak měl klesnout na úroveň, rovnou transportu léčiva přes monovrstvu kontrolních buněk (Obrázek 13). Množství transportovaného léčiva bez použití inhibítora a s jeho použitím bude následně změřeno pomocí HPLC.



Obrázek 13: Inhibice transportu gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk. V B-A směru dochází pouze k minimálnímu transportu testovaného léčiva, a to pouze pasivní difúzí, jelikož aktivita transportérů je utlumena inhibitory (ritonavir/verapamil).

5.3.2 Postup

Buňky jsem spočítala pomocí Bürkerovy komůrky a poté byly nasazeny na inserty Transwell 3402 v počtu 500 000 buněk na insert s přidáním 500 μ l kultivačního média. Pod každý insert bylo následně přidáno 1,5 ml kultivačního média. V tomto experimentu byly využity jak kontrolní MDCKII buňky, tak MDCKII buněčné linie exprimující OCT1, OCT2 transportéry. Po dvou dnech bylo vyměněno kultivační médium ve stejných objemech pro oba kompartmenty (0,5 ml pro apikální a 1,5 ml pro bazální kompartment) a následně se buňky nechaly dalších 24 hodin kultivovat v inkubátoru při 37°C/5% CO₂ pro nárůst do plné konfluence.

Po dosažení plné konfluence buněk na insertech jsem si čtvrtý den experimentu připravila preinkubační a inkubační roztoky. Preinkubační roztoky byly připraveny naředěním roztoků modelového inhibitoru verapamilu v Opti-MEM. Konečná koncentrace preinkubačního roztoku verapamilu byla 50 μ M. Jako preinkubační roztok bez inhibitorů byl použit čistý Opti-MEM. Inkubační roztoky s inhibitorem byly o stejné konečné koncentraci (na přípravu jsem použila poloviční množství uvedené výše, jelikož inkubační roztoky budou přidány pouze do apikálního kompartmentu). Do preinkubačních i inkubačních roztoků byl přidán roztok gilteritinibu na konečnou koncentraci 500 nM, což koresponduje s maximální dosažitelnou plazmatickou koncentrací gilteritinibu.

Po přípravě roztoků bylo z obou kompartmentů opatrně odsáto médium a buňky byly z obou stran opláchnuty 750 μ l PBS předehřátého na 37 °C. Po odsátí PBS bylo do

obou kompartmentů jednotlivě napipetováno 750 μ l preinkubačních roztoků. Na inserty určené pouze pro sledování transportu léčiva přes membránu bez inhibitoru byl napipetován jako preinkubační roztok čistý Opti-MEM. Na jednotlivé inserty určené pro inhibovaný transport byly napipetovány preinkubační roztoky s verapamilem, taktéž vždy v objemu 750 μ l do obou kompartmentů. Následně jsem nechala buňky s preinkubačními roztoky inkubovat při 37°C/ 5% CO₂ po dobu 10 minut. Po uplynutí inkubační doby byly z bazálního (donorového) kompartmentu jednotlivě odsáty preinkubační roztoky a vyměněny za roztoky inkubační o objemu 750 μ l. V apikálním kompartmentu (akceptorovém) byly ponechány preinkubační roztoky.

Takto se nechaly buňky inkubovat při 37°C/5% CO₂ a v intervalech 30, 60 a 120 minut bylo z apikálního kompartmentu odebíráno 50 μ l roztoku. K tomu bylo následně přidáno 50 μ l vnitřního standardu (látka FLX-925) a připravené roztoky byly následně proměřeny pomocí HPLC.

Pro otestování neporušenosti monovrstvy byla na závěr provedena zkouška pomocí fluorescenčního dextranu, kdy byl dextran po naředění napipetován do apikálního kompartmentu v objemu 750 μ l do příslušných jamek a destička byla ponechána 1 hodinu (v -80°C) inkubovat. Po uplynutí jedné hodiny byly fluorescence vzorků z bazálního kompartmentu proměřeny pomocí spektrofotometru s použitím excitační vlnové délky 485 nm a emisní vlnové délky 535 nm.

5.4 Statistická analýza

Výsledky jednotlivých měření obou experimentů byly vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism Verze 9.0.1. K určení statistické významnosti výsledných hodnot byla použita metoda one-way ANOVA s hladinami významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

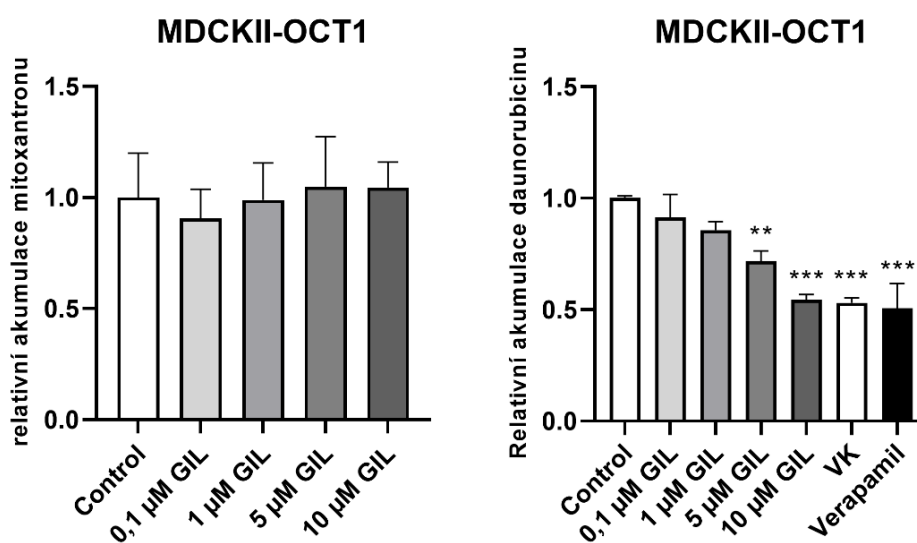
6. VÝSLEDKY

6.1 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu v MDCKII-OCT1/OCT2/kontrolních buněčných liniích

Cílem této metody bylo potvrdit či vyvrátit, zda je měřitelný rozdíl v akumulaci daunorubicinu a mitoxantronu mezi MDCKII-kontrolními buňkami neexprimujícími žádné transportéry a MDCKII buňkami exprimujícími OCT1 nebo OCT2 transportéry a zda gilteritinib, jako testované léčivo, má schopnost tyto transportéry inhibovat. Jako léčiva se substrátovou afinitou k daným transportérům byly využity výše zmíněná léčiva daunorubicin a mitoxantron. K vyhodnocení experimentu byly použity výsledky měření z průtokového cytometru, které umožnily sledovat množství substrátů (daunorubicin, mitoxantron), akumulujících se v buňkách v závislosti na zvyšující se koncentraci gilteritinibu, zde považovaného jako možný inhibitor. Pro možné porovnání byly rovněž použity výsledky experimentu na kontrolních buňkách, které žádné z daných transportérů neexprimují.

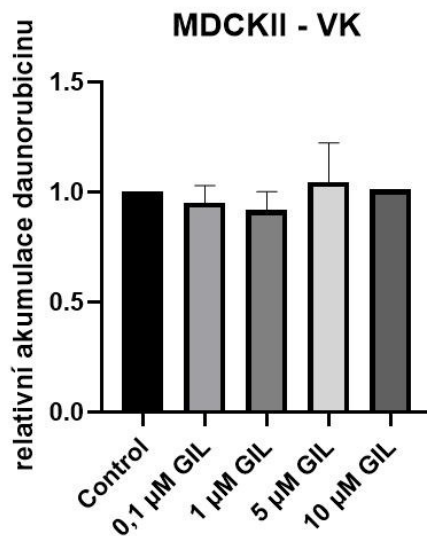
Nejprve byla měření provedena na MDCKII-OCT1 buněčné linii a gilteritinib byl otestován jako možný inhibitor transportéru OCT1. V grafu na obrázku 14 lze vidět, že u mitoxantronu, jakožto substrátu OCT1 transportéru, nedošlo ke snížení akumulace v buňkách vlivem zvyšující se koncentrace gilteritinibu. V tomto případě tedy nebylo potvrzeno, že by gilteritinib měl schopnost ovlivnit transport mitoxantronu zprostředkovaný pomocí OCT1 transportéru. Oproti tomu z výsledků měření (Obrázek 14) při použití daunorubicinu jako substrátu vyplývá, že nejenom, že lze vidět výrazný rozdíl mezi akumulací léčiva v MDCKII-kontrolních buňkách a MDCKII-OCT1 buněčné linii, ale zároveň je z obrázku patrné, že gilteritinib má schopnost inhibovat transport daunorubicinu mediovaný skrz OCT1 transportér a se zvyšováním jeho koncentrace dochází k úbytku množství daunorubicinu, které se akumuluje uvnitř buňky. Na obrázku 14 je vidět, že při použití 10 μM roztoku gilteritinibu došlo k poklesu akumulace daunorubicinu v buňce téměř na úroveň akumulace daunorubicinu v kontrolních buňkách, které OCT1 transportéry neexprimují (relativní akumulace daunorubicinu u MDCKII-OCT1 byla 54,5%, zatímco u MDCKII-VK dosahovala 53,0%). Z toho vyplývá, že při použití gilteritinibu a daunorubicinu by mohlo docházet k interakci daných dvou léčiv, která by vedla ke snížení množství daunorubicinu prostupujícího do buňky. Vzhledem k tomu, že mechanismus účinku daunorubicinu se odehrává uvnitř

jádra buňky interkalací do DNA, znepřístupnění prostupu léčiva dovnitř by znamenalo jeho neúčinnost.



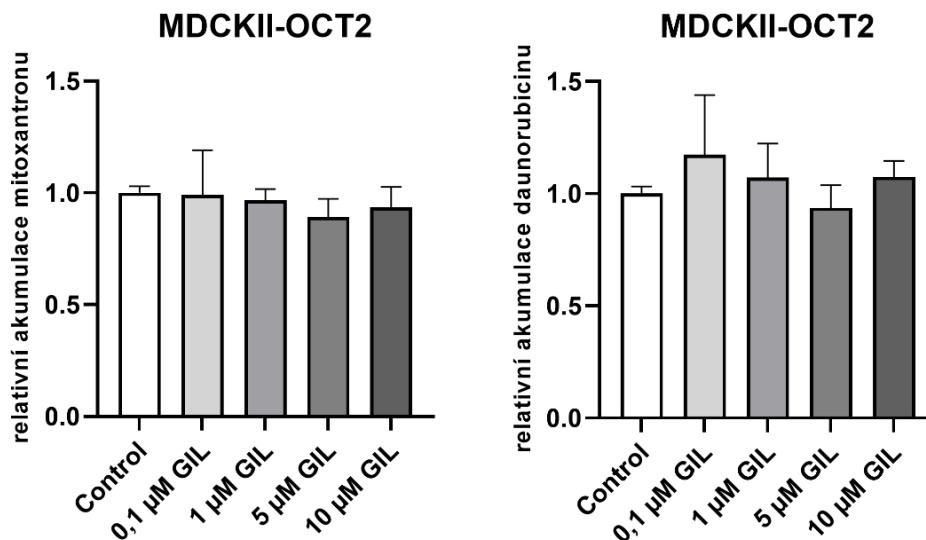
Obrázek 14: Inhibice OCT1 transportéru gilteritinibem u MDCKII buněčných linií. Na obrázku jsou vyobrazeny grafy relativní akumulace substrátů OCT1 transportéru (nalevo mitoxantron, napravo daunorubicin) v závislosti na zvyšující se koncentraci gilteritinibu (GIL). V grafu znázorňující množství akumulovaného mitoxantronu lze vidět, že nedochází ke změnám akumulace léčiva uvnitř buňky v závislosti na stoupající koncentraci gilteritinibu. Oproti tomu v grafu napravo je vidět, že dochází ke úměrnému snižování množství daunorubicinu akumulovaného v buňce v závislosti na koncentraci gilteritinibu. Pro porovnání je v grafu vyobrazena i akumulace daunorubicinu v MDCKII kontrolních buňkách (VK) bez daného transportéru. Z výsledků měření vyplývá, že akumulace daunorubicinu v MDCKII-OCT1 buňkách je téměř srovnatelná s akumulací v kontrolních buňkách. Data vychází ze 3 na sobě nezávislých pokusů, statistická analýza proběhla pomocí one-way ANOVA, $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Dále jsme otestovali pomocí kontrolní linie MDCKII buněk, zda u ní ke snížení akumulace daunorubicinu v přítomnosti gilteritinibu nedochází. Pokud by ke změně akumulace docházelo i zde, museli bychom předpokládat zapojení jiných endogenních transportérů než OCT1. Z obrázku 15 vyplývá, že nedochází k signifikantním změnám akumulace daunorubicinu v kontrolních buňkách bez ohledu na použitou koncentraci gilteritinibu, a tedy výsledky pozorované u MDCKII-OCT1 linie lze přičítat právě inhibici OCT1.



Obrázek 15: Akumulace daunorubicinu u MDCKII kontrolní buněčné linie (VK).

Dále bylo měření provedeno na MDCKII buněčných liniích exprimujících OCT2 transportéry. Z výsledků měření znázorněných v grafech na obrázku 16 je zřejmé, že ani v jednom z případů, jak při použití mitoxantronu, tak při použití daunorubicinu nedošlo k poklesu akumulace léčiva v buňkách v závislosti na zvyšující se koncentraci gilteritinibu. V tomto případě gilteritinib neprokázal schopnost inhibovat transport mitoxantronu či daunorubicinu prostřednictvím OCT2 transportéru.



Obrázek 16: Gilteritinibem inhibovaný transport mitoxantronu/daunorubicinu přes OCT2 transportér u MDCKII buněčných linií. Na obrázku jsou grafy znázorňující relativní akumulaci léčiv v MDCKII buňkách v závislosti na zvyšující se koncentraci gilteritinibu (GIL). Z obou vyobrazených grafů lze vyčíst, že ani u jednoho z léčiv nedochází k poklesu akumulace mitoxantronu či daunorubicinu v buňkách v závislosti na zvyšování koncentrace gilteritinibu. Z toho vyplývá, že gilteritinib neprokázal schopnost inhibovat transport výše zmíněných léčiv skrze OCT2 transportéry u MDCKII buněčných linií. Data vychází ze 3 na sobě nezávislých pokusů, statistická analýza proběhla pomocí one-way ANOVA.

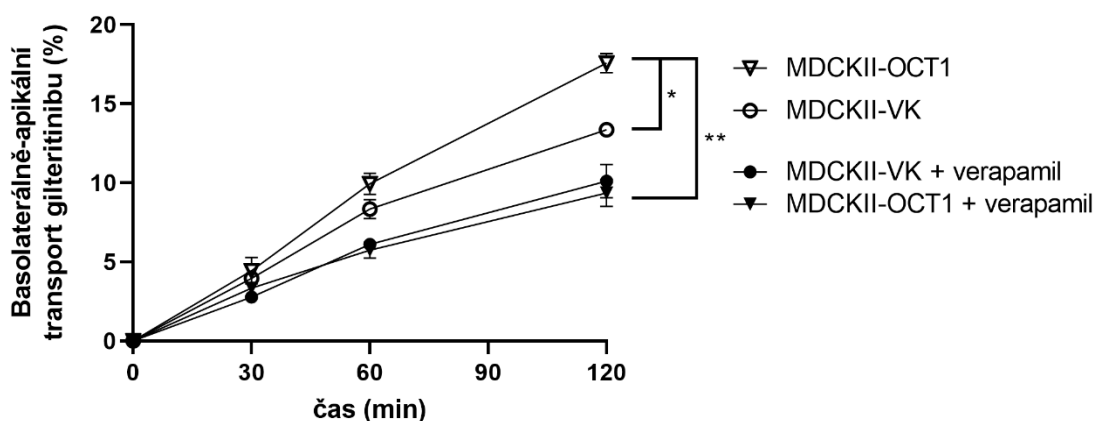
6.2 Transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněčných linií s inhibítorem a bez inhibítora

Cílem této metody bylo zjistit, v jaké míře se liší množství transportovaného gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII kontrolních buněk a MDCKII buněk exprimující OCT1, OCT2 transportéry a zároveň jak je tento přenos ovlivněn použitím inhibítora, který by snížil schopnost transportéru mediovat přenos léčiva. V tomto experimentu byly využity MDCKII buněčné linie exprimující OCT1 nebo OCT2 transportéry a zároveň MDCKII kontrolní buněčná linie, která žádné z daných transportérů neexprimuje. Sledován byl transport gilteritinibu z bazálního do apikálního kompartmentu.

Jako první bylo měření provedeno na MDCKII kontrolní buněčné linii. Ve výsledných hodnotách měření u kontrolní linie MDCKII buněk na obrázku 7 nelze vidět výrazné změny v transportu léčiva, jelikož neexprimují žádné ze zmíněných transportérů. I přesto lze z grafu vyčíst, že při použití inhibítora je množství přeneseného léčiva přes monovrstvu buněk menší než v případě, kde žádný inhibitor aplikován nebyl. To může být způsobeno jinými endogenními transportéry, které kontrolní buňky mohou

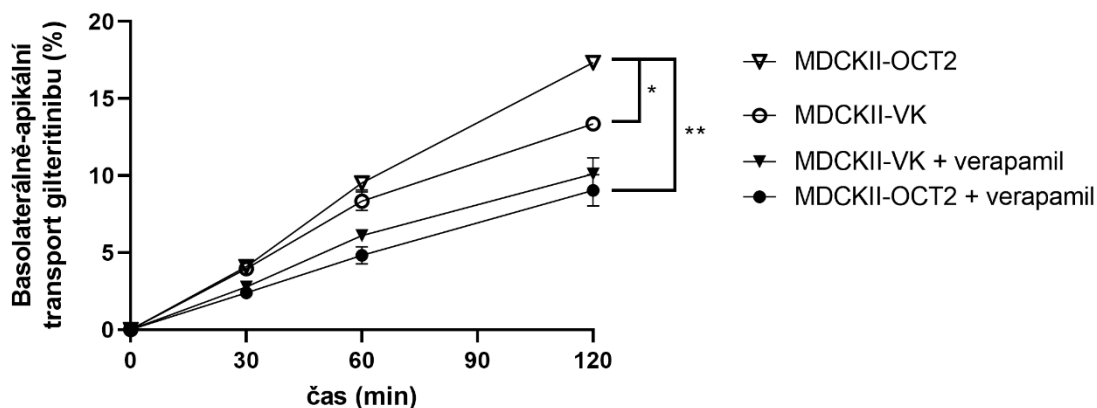
exprimovat. S časem se množství transportovaného gilteritinibu, jak s použitím inhibitoru i bez, zvyšuje.

Následně byla otestována MDCKII buněčná linie exprimující OCT1 transportéry. Na obrázku 17 znázorňujícím graf transportu gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk lze vidět, že s prodlužujícím se časem stoupá množství transportovaného léčiva u neinhibovaných OCT1 transportérů, zatímco přestup léčiva přes OCT1 transportér s použitím inhibitoru je výrazně nižší.



Obrázek 17: Transport (B-A) gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk s OCT1 transportéry. Graf znázorňuje množství transportovaného gilteritinibu (%) v závislosti na čase (30, 60 a 120 minut). Nejméně gilteritinibu (9,4 %) bylo transportováno u MDCKII-OCT1 buněčné linie za použití inhibitoru, transport byl dokonce nižší než u kontrolních MDCKII buněk. V grafu je vidět rozdíl v přestupu gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII-OCT1 ve 120 minutě bez použití inhibitoru a s ním (klesl z 17,6 % na 9,4 %). Tento rozdíl je také patrný u kontrolní linie MDCKII buněk, avšak v mnohem menší míře.

Dále byla otestována MDCKII-OCT2 buněčná linie. Z výsledků naměřených hodnot vyobrazených v grafu na obrázku 18 lze vyčíst, že průběh experimentu byl u MDCKII-OCT2 buněčné linie velmi obdobný jako u MDCKII-OCT1 buněk (viz. Obrázek 17). Při použití inhibitoru došlo ke snížení transportu gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII-OCT2 buněk v bazolaterálně-apikálním směru. Výsledné hodnoty měření byly taktéž porovnány s výsledky naměřenými u MDCKII kontrolní buněčné linie. Z výsledků vyplývá, že transport gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk mediováný přes OCT2 transportér může být inhibován pomocí verapamilu.



Obrázek 18: Transport (B-A) gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk s OCT2 transportéry. Z grafu na obrázku je zřejmé, že při použití inhibitoru došlo ke snížení přenosu gilteritinibu přes OCT2 transportér. Transportované množství gilteritinibu přes monovrstvu MDCKII buněk bylo 17,3 % bez inhibice OCT2 transportéru a výsledné množství při inhibici OCT2 kleslo na 9,0 %, tzn. došlo k poklesu transportu téměř na polovinu.

Na závěr byla pro kontrolu integrity membrány provedena zkouška pomocí fluorescenčního dextranu. Výsledné hodnoty fluorescence prokázaly, že integrita membrány nebyla nijak významně porušena, tudíž tím výsledky transportní studie nebudou zkresleny.

7. DISKUZE

Terapie AML cytotoxickými chemoterapeutiky je považována za standard léčby už více než půl století. I přesto, že došlo k velkému pokroku ve snaze snížit úmrtnost spojenou s terapií v posledních desetiletích, míra dlouhodobého přežití u pacientů stále stagnuje. Až odhalení heterogenity AML v rámci konkrétních genetických a molekulárních odchylek vydláždilo cestu pro vývoj cílené protinádorové terapie, která začíná měnit možnosti terapie AML. Nová léčiva, mezi která se řadí i námi zkoumaný gilteritinib, nabízí více klinických možností pro pacienty a zároveň vykazují slibné výsledky v dosažení kompletní remise a dlouhodobého přežití (Yu et al. 2020).

V současné době probíhají klinické studie s cílem vyhodnotit možnost kombinace gilteritinibu s ostatními léčivy a režimy v rámci standardní terapie (Yu et al. 2020). Jedním z limitů kombinované terapie u protinádorových léčiv je možnost vzájemného ovlivnění jejich farmakokinetiky. Vzhledem k jejich často nízkému terapeutickému indexu a toxicitě, může už malé ovlivnění farmakokinetických parametrů signifikantně pozměnit jejich účinek či nežádoucí účinky (Scripture et al. 2006). První náznaky o důležitosti transportérů v chemoterapii nádorových onemocnění vychází ze studií zaměřených na zkoumání rezistence nádorových buněk vůči protinádorovým léčivům. Tyto studie odhalují, že chemoterapeutika mohou indukovat expresi aktivních transportérů, které zajišťují eflux mnoha léčiv ven z buňky. Mezi tyto efluxní transportéry se řadí například P-glykoprotein (ABCB1) a multidrug resistance protein 1 (MDR1). V dnešní době je akceptováno, že transportéry mohou determinovat rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapii, ale také mohou zajišťovat specifické vychytávání protinádorových léčiv do buněk a tím ovlivňovat účinnost a vedlejší účinky terapie (Hucke et al. 2016).

Pozornost musí být věnována i OCT transportérům, které umožňují přenos endogenních organických kationtů i léčiv. Zejména je jim pak například připisován vliv na toxicitu v protinádorové terapii deriváty platiny a ovlivnění účinnosti terapie u nově vyvinutých inhibitorů tyrozin kinázy. Konkrétně je v této souvislosti diskutován OCT1 transportér a jeho vliv na nitrobuněčnou akumulaci, a tím i efekt imatinibu (Hucke and Ciaramboli 2016).

V návaznosti na výše zmíněné jsme se v této práci zaměřili na možnou interakci mezi léčivými přípravky používanými v rámci konvenční terapie AML (daunorubicin, mitoxantron) a gilteritinibu z řady nově schválených inhibitorů FLT3 tyrozinkinázového receptoru.

Experimenty k vyhodnocení inhibiční aktivity gilteritinibu byla provedena na MDCKII buněčných liniích jednotlivě transfekovaných s OCT1 a OCT2 transportéry a vždy porovnány s MDCKII kontrolní linií. Naměřené výsledky prokázaly inhibiční aktivitu gilteritinibu vůči OCT1 transportéru, kdy tato inhibice zapříčinila pokles akumulace daunorubicinu v MDCKII-OCT1 buňkách. Hodnota IC_{50} u gilteritinibu byla $4,888 \mu\text{M}$. Plazmatické koncentrace gilteritinibu při použití v terapii dosahují $374 (\pm 190) \text{ ng/ml}$, což odpovídá $0,333 \mu\text{M} - 1,02 \mu\text{M}$ (Dhillon 2019). Z toho lze předpokládat, že ke klinicky relevantním interakcím na úrovni OCT1 transportu by mohlo docházet při použití vyšších dávek léčiva a dosažení vyšších hladin plazmatické koncentrace gilteritinibu, případně při kumulaci léčiva ve tkáních. Údaje o možné potenciální inhibici OCT1 v játrech při klinicky relevantních koncentracích gilteritinibu poskytuje i SPC přípravku Xospata (EMA 2021b). Vzhledem k tomu, že obě léčiva (daunorubicin i gilteritinib), jsou ve velké míře metabolizovány v játrech a podléhají jaterní exkreci, je třeba ověřit relevanci těchto *in vivo* zjištění při klinickém použití (Dhillon 2019, James et al. 2020). Zároveň by inhibice OCT1 gilteritinibem mohla ovlivnit hepatální exkreci dalších léčiv, které jsou substráty OCT1. Mezi ně patří například metformin, morfin, fenoterol, sumatriptan, tropisetron, ondansetron, tramadol či imatinib, u kterého je nicméně vliv OCT1 stále předmětem diskuze (Thomas et al. 2004, Nies et al. 2011, Zamek-Gliszczyński et al. 2018).

Daunorubicin se po podání kumuluje v leukemických buňkách, kde jeho koncentrace dosahuje vyšších hladin než v plazmě (Paul et al. 1980). Jeho plazmatický poločas je 45 minut v iniciální fázi a 18,5 hodin v terminální fázi. Po hodině po aplikaci daunorubicinu začne v plazmě převládat jeho metabolit daunorubicinol, jehož terminální plazmatický poločas je 26,7 hodiny. Při použití liposomální formy daunorubicinu v kombinaci s cytarabinem je možné dosáhnout prodloužení plazmatického poločasu daunorubicinu v plazmě na 31,5 hodiny (EMA 2021a). Gilteritinib je podáván v současné době samostatně v rámci záchranné terapie v dávce 120 mg/den (Doubek 2020). Ustálených jeho plazmatických hladin je dosaženo v horizontu 15 dní (EMA 2021b). Při tomto současném léčebném režimu je spíše nepravděpodobné, že by docházelo ke klinicky relevantním farmakokinetickým interakcím gilteritinibu s daunorubicinem na

OCT1 transportéru. Nicméně je třeba na potenciální ovlivnění léčiv brát zřetel v kombinační léčbě AML, u které v současnosti probíhají klinické studie.

V akumulační studii nebyla prokázána inhibiční aktivita gilteritinibu vůči OCT2 transportéru, respektive ovlivnění transportu daunorubicinu u MDCKII-OCT2 nebylo potvrzeno. U mitoxantronu nedošlo k ovlivnění akumulace léčiva gilteritinibem v buňce ani u jedné z MDCKII buněčných linií exprimujících OCT1 či OCT2 transportéry.

Po potvrzení inhibiční aktivity gilteritinibu na OCT1 transportérech jsme se rozhodli provést transportní studii k otestování přestupu gilteritinibu skrze monovrstvu MDCKII buněk za cílem vyhodnotit gilteritinib jako možný substrát OCT1 či OCT2 transportérů. U obou buněčných linií (MDCKII-OCT1 i MDCKII-OCT2) byl pozorován signifikantně vyšší transport gilteritinibu u neinhibovaných OCT1 a OCT2 transportérů oproti MDCKII kontrolní buněčné linii. Z toho jsme vyhodnotili gilteritinib jako substrát OCT1 i OCT2 transportérů, což může vést k ovlivnění farmakokinetických parametrů gilteritinibu převážně na úrovni hepatální a renální exkrece, jelikož je z velké části metabolizován v játrech a částečně exkretován v ledvinách (McMahon and Perl 2019, James et al. 2020).

Na základě substrátové afinity gilteritinibu k OCT transportérům by mohlo docházet k vzájemnému ovlivnění s jinými souběžně podávanými léčivy, které se řadí mezi inhibitory nebo substráty OCT přenašečů. Z inhibitorů se může jednat například o cimetidin či cetirizin, ze substrátů pak již výše zmíněný metformin, dále dofetilid, pindolol, cisplatina a oxaliplatina (Hucke and Ciarimboli 2016, Zamek-Gliszczyński et al. 2018).

U transportní studie jsme zaznamenali pokles přenosu gilteritinibu u MDCKII kontrolní linie při použití inhibitoru oproti tomu, kdy žádný inhibitor přidán nebyl. To může být způsobeno přítomností jiných endogenních transportérů, které se mohou u této buněčné linie vyskytovat, a které mohly jeho přenos ovlivnit. MDCK buněčná linie byla získána v roce 1958 z ledvinných tkání dospělého kokršpaněla. Z této parentní buněčné linie byly izolovány a modifikovány další, např. MDCKI a MDCKII, u kterých se ale mohou vyskytovat stále vlastní endogenní transportéry (Dukes et al. 2011).

Tyto poznatky naznačují, že by mohlo při použití kombinace daunorubicinu a gilteritinibu v rámci indukční, případně i konsolidační terapie AML docházet

k interakcím na OCT1 transportéru, popřípadě i ke snížení akumulace daunorubicinu v buňkách, což by mohlo zapříčinit snížení účinku terapie. Zároveň je důležité brát v úvahu interindividuální rozdíly v expresi OCT1 u pacientů s AML ve vztahu k úspěšnosti terapie.

8. ZÁVĚR

Daunorubicin a mitoxantron jsou antracyklinová chemoterapeutika využívaná v terapii AML již několik desítek let. V poslední době se díky individuální karyotypizaci pacientů s AML a odhalení heterogenity onemocnění dostávají do terapie nová léčiva cílené protinádorové terapie mezi které patří i gilteritinib inhibující FLT3 tyrozinkinázový receptor.

V této práci byl zkoumán gilteritinib jako možný inhibitor a substrát OCT1 a OCT2 transportérů a jeho možná interakce s léčivy standardně využívanými v indukční terapii AML (daunorubicin, mitoxantron). K tomu byly využity *in vitro* metody na MDCKII buněčné linii zahrnující akumulční studii daunorubicinu v MDCKII buňkách při použití koncentrační řady gilteritinibu a studii transportu gilteritinibu skrze monovrstvu MDCKII buněk exprimujících OCT1 a OCT2 transportéry oproti kontrolní MDCKII buněčné linii.

Gilteritinib prokázal inhibiční aktivitu vůči OCT1 transportéru, čímž došlo ke snížení akumulace daunorubicinu v buňce. Zároveň jsme v transportní studii prokázali, že gilteritinib vystupuje i jako substrát OCT transportérů, a to jak OCT1, tak OCT2 transportéru.

Na základě výsledků této práce je možné předpokládat možné interakce gilteritinibu jako inhibitoru u OCT1 transportéru a substrátu u OCT1 i OCT2 transportéru. Pro ověření možných klinických dopadů těchto poznatků je však zapotřebí provést další studie a tyto hypotézy otestovat *in vivo*.

9. ZDROJE

Abuelgasim, K. A., et al. (2020). "Impact of age and induction therapy on outcome of 180 adult patients with acute myeloid leukemia; retrospective analysis and literature review." Leuk Res Rep **14**: 100206. doi:10.1016/j.lrr.2020.100206

Adam, Z. K., Marta; Vorlíček, Jiří; (2008). Hematologie přehled maligních hematologických nemocí. Praha, Grada.

Alberts, B. B., Dennis; Johnson, Alexander (2001). Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem, Espero.

Andreev, E., et al. (2016). "The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin." Sci Rep **6**: 20508. doi:10.1038/srep20508

Antar, A. I., et al. (2020). "FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions." Leukemia **34**(3): 682-696. doi:10.1038/s41375-019-0694-3

Bardal, S. K. W., Jason E.; Martin, Douglas S. (2011). Neoplasia. Applied pharmacology Saunders: 305-324

Brecht, K., et al. (2020). "Uptake Transporters of the SLC21, SLC22A, and SLC15A Families in Anticancer Therapy-Modulators of Cellular Entry or Pharmacokinetics?" Cancers (Basel) **12**(8). doi:10.3390/cancers12082263

Brosseau, N. and D. Ramotar (2019). "The human organic cation transporter OCT1 and its role as a target for drug responses." Drug Metab Rev **51**(4): 389-407. doi:10.1080/03602532.2019.1670204

Calcagno, A. M., et al. (2007). "ABC drug transporters as molecular targets for the prevention of multidrug resistance and drug-drug interactions." Curr Drug Deliv **4**(4): 324-333. doi:10.2174/156720107782151241

De Kouchkovsky, I. and M. Abdul-Hay (2016). "'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'." Blood Cancer J **6**(7): e441. doi:10.1038/bcj.2016.50

Deschler, B. L., Michael (2008). Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. Acute Leukemias Hematologic Malignancies Berlin, Heidelberg, Springer: 47-56.

Dhillon, S. (2019). "Gilteritinib: First Global Approval." Drugs **79**(3): 331-339. doi:10.1007/s40265-019-1062-3

DiNardo, C. D. and A. H. Wei (2020). "How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs." Blood **135**(2): 85-96. doi:10.1182/blood.2019001239

Dohner, H., et al. (2017). "Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel." Blood **129**(4): 424-447. doi:10.1182/blood-2016-08-733196

Dohner, H., et al. (2015). "Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **373**(12): 1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184

Doubek, M. M., Jiří (2020). Léčebné postupy v hematologii 2020: Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně Česká hematologická společnost ČLS JEP.

Dukes, J. D., et al. (2011). "The MDCK variety pack: choosing the right strain." BMC Cell Biol **12**: 43. doi:10.1186/1471-2121-12-43

EMA (2012). "Guideline on the investigation of drug interactions." Retrieved February 28, 2021, from https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf.

EMA (2021a). "VYXEOS: summary of product characteristics." Retrieved 4. 5. , 2021, from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vyxeos-liposomal-epar-product-information_en.pdf.

EMA (2021b). "XOSPATA: summary of product characteristics." Retrieved 4. 5., 2021, from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xospata-epar-product-information_en.pdf.

FDA (2020). In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. C. Pharmacology. Silver Springs, MD, USA.

Feng, B. and M. V. Varma (2016). "Evaluation and Quantitative Prediction of Renal Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions." J Clin Pharmacol **56 Suppl 7**: S110-121. doi:10.1002/jcph.702

Forrest, L. R., et al. (2011). "The structural basis of secondary active transport mechanisms." Biochim Biophys Acta **1807**(2): 167-188. doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.014

Gessner, A., et al. (2019). "Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions." Clin Pharmacol Ther **105**(6): 1386-1394. doi:10.1002/cpt.1360

Hassanein, M., et al. (2016). "FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia." Clin Lymphoma Myeloma Leuk **16**(10): 543-549. doi:10.1016/j.clml.2016.06.002

Hediger, M. A., et al. (2013). "The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction." Mol Aspects Med **34**(2-3): 95-107. doi:10.1016/j.mam.2012.12.009

Hucke, A. and G. Ciarimboli (2016). "The Role of Transporters in the Toxicity of Chemotherapeutic Drugs: Focus on Transporters for Organic Cations." J Clin Pharmacol **56 Suppl 7**: S157-172. doi:10.1002/jcph.706

Chen, Q. X., et al. (2013). "An overview of ABC and SLC drug transporter gene regulation." Curr Drug Metab **14**(2): 253-264.

Chew, S., et al. (2020). "Gilteritinib in the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation." Ther Adv Hematol **11**: 2040620720930614. doi:10.1177/2040620720930614

Choi, Y. H. and A. M. Yu (2014). "ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development." Curr Pharm Des **20**(5): 793-807. doi:10.2174/138161282005140214165212

International Transporter Consortium, et al. (2010). "Membrane transporters in drug development." Nat Rev Drug Discov **9**(3): 215-236. doi:10.1038/nrd3028

James, A. J., et al. (2020). "Pharmacokinetic Profile of Gilteritinib: A Novel FLT-3 Tyrosine Kinase Inhibitor." Clin Pharmacokinet **59**(10): 1273-1290. doi:10.1007/s40262-020-00888-w

Janeckova, V., et al. (2016). "[Molecular Genetic Testing for Acute Myeloid Leukemia]." Klin Onkol **29**(6): 411-418. doi:10.14735/amko2016411

Juliusson, G., et al. (2020). "The prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutation in adult AML is age-dependent in the population-based setting." Blood Adv **4**(6): 1094-1101. doi:10.1182/bloodadvances.2019001335

Kantarjian, H., et al. (2021). "Acute myeloid leukemia: current progress and future directions." Blood Cancer J **11**(2): 41. doi:10.1038/s41408-021-00425-3

Karas, M. (2011). "Akutní myeloidní leukemie u nemocných nad 60 let, možnosti její léčby a potenciální role alogenní transplantace krvetvorných buněk." Onkologie **5**(2): 91-95.

Kiyoi, H., et al. (2020). "FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development." Cancer Sci **111**(2): 312-322. doi:10.1111/cas.14274

Klaassen, C. D. and L. M. Aleksunes (2010). "Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation." Pharmacol Rev **62**(1): 1-96. doi:10.1124/pr.109.002014

Koepsell, H. (2015). "Role of organic cation transporters in drug-drug interaction." Expert Opin Drug Metab Toxicol **11**(10): 1619-1633. doi:10.1517/17425255.2015.1069274

Koepsell, H. (2020). "Organic Cation Transporters in Health and Disease." Pharmacol Rev **72**(1): 253-319. doi:10.1124/pr.118.015578

Larson, S. M., et al. (2012). "High dose cytarabine and mitoxantrone: an effective induction regimen for high-risk acute myeloid leukemia (AML)." Leuk Lymphoma **53**(3): 445-450. doi:10.3109/10428194.2011.621562

Lin, L., et al. (2015). "SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities." Nat Rev Drug Discov **14**(8): 543-560. doi:10.1038/nrd4626

Linton, K. J. (2007). "Structure and function of ABC transporters." Physiology (Bethesda) **22**: 122-130. doi:10.1152/physiol.00046.2006

Lozano, E., et al. (2013). "Role of the plasma membrane transporter of organic cations OCT1 and its genetic variants in modern liver pharmacology." Biomed Res Int **2013**: 692071. doi:10.1155/2013/692071

Mandelli, F., et al. (2009). "Daunorubicin versus mitoxantrone versus idarubicin as induction and consolidation chemotherapy for adults with acute myeloid leukemia: the EORTC and GIMEMA Groups Study AML-10." J Clin Oncol **27**(32): 5397-5403. doi:10.1200/JCO.2008.20.6490

McMahon, C. M. and A. E. Perl (2019). "Gilteritinib for the treatment of relapsed and/or refractory FLT3-mutated acute myeloid leukemia." Expert Rev Clin Pharmacol **12**(9): 841-849. doi:10.1080/17512433.2019.1657009

Montanari, F. and G. F. Ecker (2015). "Prediction of drug-ABC-transporter interaction--Recent advances and future challenges." Adv Drug Deliv Rev **86**: 17-26. doi:10.1016/j.addr.2015.03.001

Muller, F. and M. F. Fromm (2011). "Transporter-mediated drug-drug interactions." Pharmacogenomics **12**(7): 1017-1037. doi:10.2217/pgs.11.44

Ni, Z., et al. (2010). "Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)." Curr Drug Metab **11**(7): 603-617. doi:10.2174/138920010792927325

Nies, A. T., et al. (2011). "Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy." Handb Exp Pharmacol(201): 105-167. doi:10.1007/978-3-642-14541-4_3

Nicholls, G., et al. (2016). Drug transporters. Cambridge, Royal Society Of Chemistry.

Paul, C., et al. (1980). "Determination of daunorubicin and its main metabolites in plasma, urine and leukaemic cells in patients with acute myeloblastic leukaemia." Cancer Lett **9**(4): 263-269. doi:10.1016/0304-3835(80)90016-6

Pelcovits, A. and R. Niroula (2020). "Acute Myeloid Leukemia: A Review." R I Med J (2013) **103**(3): 38-40.

Pemmaraju, N., et al. (2011). "FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: the start of an era?" Cancer **117**(15): 3293-3304. doi:10.1002/cncr.25908

Perl, A. E. (2019). "Availability of FLT3 inhibitors: how do we use them?" Blood **134**(9): 741-745. doi:10.1182/blood.2019876821

Pollard, T. D., et al. (2017). Cell biology. Philadelphia, PA, Elsevier.

Rayner, D. M. C., Suzanne M. (2014). Anthracyclines. Side Effects of Drugs Annual **36**: 683-694

Robey, R. W., et al. (2018). "Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer." Nat Rev Cancer **18**(7): 452-464. doi:10.1038/s41568-018-0005-8

Roth, M., et al. (2012). "OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies." Br J Pharmacol **165**(5): 1260-1287. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x

Samodelov, S. L., et al. (2020). "Organic Cation Transporters in Human Physiology, Pharmacology, and Toxicology." Int J Mol Sci **21**(21). doi:10.3390/ijms21217890

Scripture, C. D. and W. D. Figg (2006). "Drug interactions in cancer therapy." Nat Rev Cancer **6**(7): 546-558. doi:10.1038/nrc1887

Short, N. J., et al. (2019). "Emerging treatment paradigms with FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia." Ther Adv Hematol **10**: 2040620719827310. doi:10.1177/2040620719827310

Smith, C. C. (2019). "The growing landscape of FLT3 inhibition in AML." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2019**(1): 539-547. doi:10.1182/hematology.2019000058

Sutherland, R., et al. (2020). "Solute transporters and malignancy: establishing the role of uptake transporters in breast cancer and breast cancer metastasis." Cancer Metastasis Rev **39**(3): 919-932. doi:10.1007/s10555-020-09879-6

Szakacs, G., et al. (2008). "The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)." Drug Discov Today **13**(9-10): 379-393. doi:10.1016/j.drudis.2007.12.010

Šálek, C. (2012). "Diagnostika a léčba akutních leukémií." Interní medicína pro praxi **14**(10): 366-372.

Tamaki, A., et al. (2011). "The controversial role of ABC transporters in clinical oncology." Essays Biochem **50**(1): 209-232. doi:10.1042/bse0500209

Thomas, J., et al. (2004). "Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance." Blood **104**(12): 3739-3745. doi:10.1182/blood-2003-12-4276

Thomas, X. and E. Archimbaud (1997). "Mitoxantrone in the treatment of acute myelogenous leukemia: a review." Hematol Cell Ther **39**(4): 63-74. doi:10.1007/s00282-997-0163-8

Tornio, A., et al. (2019). "Clinical Studies on Drug-Drug Interactions Involving Metabolism and Transport: Methodology, Pitfalls, and Interpretation." Clin Pharmacol Ther **105**(6): 1345-1361. doi:10.1002/cpt.1435

ÚZIS (2021). "Celková zátěž zhoubnými novotvary v ČR." Retrieved 4. 5. , 2021, from <https://www.uzis.cz/index.php?pg=aktuality&aid=8466>.

Veiga-Matos, J., et al. (2020). "Pharmacokinetics and Toxicokinetics Roles of Membrane Transporters at Kidney Level." J Pharm Pharm Sci **23**: 333-356. doi:10.18433/jpps30865

Wang, E. S. (2019). "Incorporating FLT3 inhibitors in the frontline treatment of FLT3 mutant acute myeloid leukemia." Best Pract Res Clin Haematol **32**(2): 154-162. doi:10.1016/j.beha.2019.05.006

WHO (2021). "Cancer fact sheet." Retrieved 4. 5. , 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Yu, J., et al. (2020). "Advances in targeted therapy for acute myeloid leukemia." Biomark Res **8**: 17. doi:10.1186/s40364-020-00196-2

Zamek-Gliszczyński, M. J., et al. (2018). "Emerging Clinical Importance of Hepatic Organic Cation Transporter 1 (OCT1) in Drug Pharmacokinetics, Dynamics, Pharmacogenetic Variability, and Drug Interactions." Clin Pharmacol Ther **103**(5): 758-760. doi:10.1002/cpt.941

Zhao, J., et al. (2019). "Gilteritinib: a novel FLT3 inhibitor for acute myeloid leukemia." Biomark Res **7**: 19. doi:10.1186/s40364-019-0170-2

Zhou, S., et al. (2021). "Drug-Drug Interactions at Organic Cation Transporter 1." Front Pharmacol **12**: 628705. doi:10.3389/fphar.2021.628705