

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Mechanismy mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk
vůči geldanamycinu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Ivana Olivková
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.

Olomouc 2023

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora	Bc. Ivana Olivková
Název práce	Mechanismy mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk vůči geldanamycinu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Klíčová slova	Mnohočetná rezistence, inhibitory HSP90, geldanamycin, ABC transportéry, proteiny tepelného šoku
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	český

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá problematikou mnohočetné lékové rezistence (MDR) nádorových buněk vůči inhibitorům HSP90. Nádorové buňky s MDR fenotypem vykazují sníženou senzitivitu proti lékům, které jsou strukturně a funkčně odlišné. V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty klasické mechanismy mnohočetné lékové rezistence se zaměřením na ABC transportéry a proteiny tepelného šoku. V experimentální části byly získány rezistentní linie buněk vůči geldanamycinu, což je specifický inhibitor HSP90. Tyto rezistentní buňky byly dále charakterizovány a byly analyzovány mechanismy jejich získané rezistence. Zaznamenali jsem, že rezistence buněk A549 vůči geldanamycinu je pravděpodobně spjata se zvýšenou expresí ABCC1, jednoznačné důkazy pro tento závěr ovšem nebyly získány. Lze vyloučit, že by rezistence byla spojena se zvýšenou expresí ABCB1, ABCG2 nebo HSP90, HSP70, HSP27.

Bibliographical identification:

Author s first name and surname	Bc. Ivana Olivková
Title	Mechanisms of multidrug resistance in tumor cells to geldanamycin
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of growth regulators
Supervisor	doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
The year of presentation	2023
Keywords	Multidrug resistance, HSP90 inhibitors, geldanamycin, ABC transporters, heat shock proteins
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

SUMMARY

This thesis deals with the issue of multidrug resistance (MDR) of tumor cells to HSP90 inhibitors. Tumor cells with an MDR phenotype show reduced sensitivity against drugs that are structurally and functionally different. The theoretical part of the thesis summarizes the classic mechanisms of multiple drug resistance with a focus on ABC transporters and heat shock proteins. In the experimental part, cells resistant to geldanamycin, which is a specific inhibitor of HSP90, were obtained. These resistant cells were further characterized, and the mechanisms of their acquired resistance were analyzed. We note that the resistance of A549 cells to geldanamycin is likely to be associated with increased expression of ABCC1, but unequivocal evidence for this conclusion has not been obtained. It can be ruled out that resistance is associated with increased expression of ABCB1, ABCG2 or HSP90, HSP70, HSP27.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně na Univerzitě Palackého v Olomouci pod vedením doc. RNDr. Petra Mlejníka, Ph.D. a všechny použité zdroje jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....

Bc. Ivana Olivková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Petru Mlejnkovi, Ph.D. za možnost vypracování této práce pod jeho vedením a dále za jeho odborné rady a trpělivost. Velké poděkování patří také Mgr. Kateřině Dostálové za pomoc v laboratoři, dále za trpělivost a její cenné rady. Zároveň bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Doleželovi a Bohdaně Machalové za veškerou pomoc při mé praktické části. V neposlední řadě děkuji mé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	2
3	TEORETICKÁ ČÁST	3
3.1	Mnohočetná léková rezistence nádorových buněk	3
3.1.1	Zvýšený eflux léčiva – lékové transportéry	4
3.1.2	Mutace molekulárního cíle léčiva	4
3.1.3	Deregulace buněčné smrti	5
3.1.4	Narušení mechanismů opravy DNA	5
3.1.5	Zvýšená detoxikace léčiva	6
3.1.6	Mikroprostředí nádoru	6
3.1.7	Lysozomální sekvestrace	7
3.1.8	Změny působící zvýšenou odolnost nádorových buněk	8
3.2	ABC transportéry	9
3.2.1	Obecná struktura ABC transportérů	9
3.2.2	Mechanismus přenosu substrátu	10
3.2.3	ABC transportéry spojeny s mnohočetnou lékovou rezistencí	11
3.2.4	Inhibitory ABC transportérů	13
3.3	Zvýšená detoxikace léčiv působením glutathionu	15
3.3.1	Detoxikace léčiv a glutathion S-transferáza	16
3.3.2	Role GSH u nádorového onemocnění	16
3.4	Proteiny tepelného šoku	17
3.4.1	Inhibice HSP90	19
3.5	Úvod experimentální části	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	Materiál	22
4.1.1	Buněčná linie A549	22
4.1.2	Chemikálie a roztoky	22

4.1.3	Přístroje	22
4.2	Použité metody	23
4.2.1	Určení počtu živých a mrtvých buněk	23
4.2.2	Stanovení buněčné proliferace a životaschopnosti	23
4.2.3	Analýza buněčného cyklu	24
4.2.4	Stanovení počtu živých buněk pomocí TMRE	25
4.2.5	Extrakce glutathionu	25
4.2.6	Stanovení redukováného a oxidovaného glutathionu	25
4.2.7	Buněčná extrakce proteinů	26
4.2.8	Stanovení celkové koncentrace proteinů Bradfordovou metodou	26
4.2.9	Separace proteinů, Western blot a vizualizace	27
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Charakterizace buněčné linie A549	29
5.1.1	Analýza buněčného cyklu	31
5.1.2	Vliv geldanamycinu na morfologii buněk	34
5.2	Mechanismy rezistence	36
5.2.1	Exprese ABC transportérů	36
5.2.2	Vliv geldanamycinu na intracelulární koncentraci redukováného a oxidovaného glutathionu	39
5.2.3	Exprese proteinů tepelného šoku	40
5.3	Charakterizace buněčné linie K562	43
6	Diskuse	44
7	Závěr	47

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

17-AAG	17-allylamin-17-demethoxigeldanamycin, tanespimycin
17-DMAG	17-(2-dimethylaminoethyl)amino-17-demethoxigeldanamycin, alvespimycin
ABC	ATP-vazebná kazeta (ATP-binding cassette)
Akt	serin/threonin-proteinová kináza
ATP	adenosin trifosfát
Bcl-2	B-buněčný lymfom
BCRP (ABCG2)	Breast cancer resistance protein
CML	chronická myeloidní leukémie
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	růstové médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	dimethylsulfoxid
EGFR	receptor fibroblastového růstového faktoru
Erb2	receptorová tyrosin-proteinová kináza
FBS	fetální bovinní sérum
GDN	geldanamycin
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GST	glutathiontransferáza
HIF	hypoxií indukovatelný faktor
HSPs	proteiny tepelného šoku (Heat shock proteins)
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MDR	mnohočetná léková rezistence
MDR1 (ABCB1)	Multidrug resistance protein 1
MEK1	tyrosin/threonine proteinkináza
MRP1 (ABCC1)	Multidrug resistance-associated protein 1
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
NBD	nukleotid vazebná doména
NST	N-acetyltransferázy
p53	nádorový supresorový transkripční faktor

P-gp	p-glykoprotein
Raf-1	protoonkogen serin/threonin proteinkináza
RAS	rat sarcoma
RIPA	pufr (Radio Immuno Precipitation Assay buffer)
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPMI	růstové médium (Roswell Park Memorial Institute)
SRC	protoonkogen Sarcoma genu
SULT	sulfotransferázy
TMD	transmembránové domény
TMRE	tetramethylrhodamin ethyl ester
TP53	tumor supresorový gen
UGT	UDP-glukuronyltransferáza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Mechanismus přenosu substrátu znázorněn schématicky.....	10
Obr. 2: Schematický model ABC transportéru ABCB1, ABCC1, ABCG2.....	11
Obr. 3: Glutathion má řadu rolí ve zdravých i nádorových buňkách	15
Obr. 4: Geldanamycin.....	20
Obr. 5: Tanespimycin	20
Obr. 6: Typický graf změny proliferace po ošetření citlivých buněk A549 10 nM a 30 nM geldanamycinem.....	30
Obr. 7: Účinek geldanamycinu na životaschopnost buněk A549, A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN a A549 1000GDN.....	31
Obr. 8: Analýza buněčného cyklu buněk A549.....	34
Obr. 9: Vliv geldanamycinu na morfologii buněk A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN ve srovnání s citlivými buňkami A549.....	36
Obr. 10: Účinek geldanamycinu na expresi ABCB1 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN.....	37
Obr. 11: Účinek geldanamycinu na expresi ABCG2 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN.....	38
Obr. 12: Účinek geldanamycinu na expresi ABCC1 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN.....	39
Obr. 13: Vliv geldanamycinu na intracelulární koncentraci redukovaného (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSG) u buněk A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN.....	40
Obr. 14: Účinek geldanamycinu na expresi HSP90 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN.....	41
Obr. 15: Účinek geldanamycinu na expresi HSP70 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN.....	42
Obr. 16: Účinek geldanamycinu na expresi HSP27 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN.....	42

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Citlivost buněk na geldanamycin.	30
--	----

1 ÚVOD

V posledním desetiletí byl proveden rozsáhlý výzkum zaměřený na vývoj specifických inhibitorů proteinů tepelného šoku (HSPs). Mezi nejslibnější patří inhibitory HSP90, protože mohou inhibovat několik onkogenních proteinů, na kterých závisí přežití nádorových buněk (Lianos a kol., 2015). Specifickým inhibitorem HSP90 je geldanamycinu (GDN), který vykazuje silnou protinádorovou aktivitu u široké škály rakovin (Fukuyo a kol., 2010). V klinické praxi však nemůže být používán z důvodu hepatotoxicity. Proto byly vyvinuty analogy geldanamycinu, jako je například tanespimycin (17-AAG), který vykazuje sníženou jaterní toxicitu bez ztráty účinnosti (Pham a kol., 2009). Již při prvních studiích inhibitorů HSP90 však byla identifikována rezistence, ovlivňující účinnost geldanamycinu a jeho derivátů (Piper a Millson, 2011).

Rezistence existuje proti každému účinnému protinádorovému léku a může se vyvinout řadou mechanismů (Gillet a Gottesman, 2010). Léková rezistence může být přirozená ihned při první chemoterapeutické léčbě, pak mluvíme o rezistenci primární (přirozené). Pokud dojde k rozvoji rezistence u původně citlivých buněk až v průběhu léčby, jedná se o rezistenci sekundární (získanou) (Wang a kol., 2019). Dále mohou nádorové buňky vykazovat zkřížený rezistentní fenotyp proti lékům, které jsou strukturně a funkčně odlišné. V tomto případě se jedná o mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR). I MDR může být přirozená nebo ji mohou nádorové buňky získat během chemoterapie (Saraswathy a Gong, 2013). K rozvoji přirozené a získané rezistence vede mnoho mechanismů. Mezi klasické mechanismy rezistence patří zvýšená exprese ABC (ATP-binding cassette) transportérů, která vede k vyššímu efluxu léčiva z nádorových buněk, mutace molekulárního cíle léčiva, deregulace buněčné smrti, narušení mechanismů opravy DNA atd. Dále existují změny v nádorových buňkách, které jsou spjaté s jejich zvýšenou odolností, ale nejsou popsány jako klasické mechanismy lékové rezistence. Do této skupiny byla zařazena změněná exprese proteinů tepelného šoku a senescence (Gottesman, 2002; Housman a kol., 2014; Karthika a kol., 2022).

Tato diplomová práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma lékové rezistence se zaměřením na ABC transportéry a proteiny tepelného šoku. V experimentální části jsme se získali rezistentní linii buněk A549 vůči geldanamycinu a tyto buňky jsme charakterizovali. V neposlední řadě jsme se pokusili identifikovat mechanismus získané rezistence těchto buněk.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši týkající se mechanismů lékové rezistence se zaměřením na ABC transportéry a proteiny tepelného šoku.
- Získat a charakterizovat rezistentní linii nádorových buněk vůči inhibitorům HSP90.
- Pokusit se identifikovat mechanismus rezistence k inhibitorům HSP90 u nádorových buněk.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Mnohočetná léková rezistence nádorových buněk

V posledních několika desetiletích došlo k obrovskému pokroku v prevenci, detekci a léčbě nádorového onemocnění. Přesto riziko, že nádory získají rezistenci na chemoterapii zůstává hlavní překážkou úspěšné léčby různých typů nádorů (Saraswathy a Gong, 2013; Wang a kol., 2019). Rezistence existuje proti každému účinnému protinádorovému léku a může se vyvinout řadou mechanismů (Gillet a Gottesman, 2010).

Pokud jsou maligní buněčné populace rezistentní vůči chemoterapii již při první léčbě, jedná se o tzv. přirozenou (primární) rezistenci. O získané (sekundární) rezistenci mluvíme poté, co se původně citlivé buňky stávají rezistentními až v průběhu protinádorové léčby (Wang a kol., 2019). Dále mohou nádorové buňky vykazovat zkřížený rezistentní fenotyp proti lékům, které jsou strukturně a/nebo funkčně odlišné. V tomto případě se jedná o mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR). I MDR může být přirozená nebo ji mohou nádorové buňky získat během chemoterapie (Saraswathy a Gong, 2013).

K rozvoji přirozené a získané rezistence vede mnoho mechanismů. Mezi klasické mechanismy rezistence patří:

- zvýšená exprese ABC (ATP-binding cassette) transportérů, která vede k vyššímu efluxu léčiva z nádorových buněk;
- mutace molekulárního cíle léčiva;
- deregulace buněčné smrti;
- narušení mechanismů opravy DNA;
- zvýšená detoxikace léčiva;
- mikroprostředí nádoru;
- lysozomální sekvestrace.

Dále existují změny v nádorových buňkách, které jsou spjaty s jejich zvýšenou odolností, ale nejsou popsány jako klasické mechanismy lékové rezistence. Do této skupiny byla zařazena změněná exprese proteinů tepelného šoku (Heat shock proteins – HSPs) a senescence (Gottesman, 2002; Housman a kol., 2014; Karthika a kol., 2022).

3.1.1 Zvýšený eflux léčiva – lékové transportéry

Několik buněčných membránových transportních proteinů je spojováno s rezistencí vůči běžně používaným chemoterapeutikům (Holohan a kol., 2013). Zvýšená exprese těchto transportérů a s tím spojený zvýšený eflux protinádorových látek vede ke snížení intracelulární akumulace léčiva (Wang a kol., 2019). Výraznou roli zde hraje zejména rodina ATP-dependentních transportérů, která se podílí na transportu živin a dalších molekul přes membránu (Mansoori a kol., 2017).

Transportní proteiny ATP-vazebné kazety (ABC) jsou velkou nadrodinou membránových proteinů obsahující 48 členů (Gillet a Gottesman, 2010). Tři transportéry z této nadrodiny ABC jsou spojeny s mnohočetnou lékovou rezistencí. Konkrétně se jedná o ABCB1 (P-glykoprotein, MDR1), ABCC1 (MRP1) a ABCG2 (BCRP). Fyziologicky tyto transportéry hrají důležitou roli při ochraně tkání před endogenními metabolity a toxickými xenobiotiky (Sharom, 2008). Ačkoliv exprese ABC lékových transportérů v nádorovém onemocnění byla spojena s rezistencí k protinádorovým činidlům a špatnou prognózou, pokusy inhibovat jejich aktivitu v klinických studiích dosud nebylo úspěšné (Amawi a kol., 2019). ABC transportérům je věnována podkapitola 3.2.

3.1.2 Mutace molekulárního cíle léčiva

Tradiční chemoterapie zabijí nádorové buňky narušením rychlé buněčné proliferace a mohou ovlivnit normálně dělící se buňky. Na rozdíl od cílené terapie, která může blokovat růst nádorových buněk inhibicí aktivity specifických cílových proteinů, které se podílejí na vývoji nádoru. Cílené terapie jsou tedy selektivnější a účinnější proti nádorovým buňkám a méně škodlivé pro normální buňky. Může se zde však vyvinout problém vyplývající ze změny molekulárního cíle léků (Wang a kol., 2019). Pokud u něj dojde k mutaci nebo modifikaci na úrovni exprese, mohou tyto změny vést k lékové rezistenci (Housman a kol., 2014; Mansoori a kol., 2017).

Například jednou z lékových rezistencí způsobených sekundárními mutacemi molekulárního cíle je rezistence na imatinib u chronické myeloidní leukemie (CML). CML je charakterizována přítomností Filadelfského chromozomu a vznikem fúzního genu BCR-ABL (Mansoori a kol., 2017). Gen BCR-ABL kóduje tyrozinovou kinázu, která je klíčovou molekulou vedoucí ke vzniku CML (Hehlman a kol., 2007). Imatinib je selektivní inhibitor pro tyrozinovou kinázu. Bodové a posunové mutace v BCR-ABL vedou ke změně struktury tyrozin kináz a zabraňují vazbě imatinibu. Objev mechanismů této

rezistence umožnil vývoj druhé generace (dasatinib nebo nilotinib) a třetí generace (ponatinib, bosutinib) BCR-ABL inhibitorů, které mohou vázat většinu mutovaných forem BCR-ABL (Ramos a Bentires-Alj, 2015).

Mezi další příklady rezistence způsobené mutací molekulárního cíle patří rezistence na inhibitory receptoru fibroblastového růstového faktoru (FGFR), protoonkogen Sarcoma genu (SRC) nebo inhibitorům mitogenem aktivované proteinkinázy 1 (MEK1) (Ramos a Bentires-Alj, 2015).

3.1.3 Deregulace buněčné smrti

Nádorové buňky mají širokou škálu možností, jak omezit nebo obejít jednu z forem regulované buněčné smrti – apoptózu. Apoptóza je jedním z hlavních mechanismů buněčné smrti v reakci na léčbu nádorového onemocnění. Změny náchylnosti k apoptóze přispívají nejen k neoplastickému vývoji, ale mohou také zvýšit odolnost vůči konvenčním protinádorovým látkám. Jedním z možných mechanismů rezistence na cytotoxické anti-neoplastické léky je změna exprese členů rodiny B-buněčného lymfomu-2 (Bcl-2) (Kang a Reynolds., 2009).

Jednou ze strategií, jak obejít apoptózu, je nadměrná exprese antiapoptotických proteinů jako Bcl-2, Mcl-1. Další možností je pak inaktivace proapoptotických genů, jako jsou mutace v genech kódujících kaspázy, v proapoptotických Bcl-2 (např. Bax). Tyto defekty nejen podporují růst nádoru, ale také činí nádorové buňky odolným vůči terapii (Rebucci, 2013). Protože apoptotická signalizace je výsledkem homeostázy Bcl-2 proteinů, jejich modifikace ovlivňuje odpověď nádorových buněk na chemoterapeutickou léčbu (Lage, 2008).

3.1.4 Narušení mechanismů opravy DNA

Oprava DNA je děj, při kterém buňka identifikuje a opravuje poškození molekul DNA (Zheng, 2017). Nejběžnější léčba nádorového onemocnění, včetně chemoterapie nebo radioterapie indukuje buněčnou smrt poškozením DNA (Li a kol., 2021). Buněčné signální dráhy se vyvinuly tak, aby zastavily buněčný cyklus po identifikaci poškození DNA a tím poskytly buňce čas na jeho opravu. Pokud je poškození příliš rozsáhlé a oprava je neúplná, buňky podstoupí apoptózu. Vztah mezi zástavou buněčného cyklu a apoptózou po chemoterapii je však složitý a závisí jak na použité chemoterapii, tak na molekulárním fenotypu nádorové buňky (Longley a Johnston, 2005).

Důležitým proteinem zapojeným do chemorezistence je nádorový supresor p53 (Neophytou a kol., 2021). Jeho signalizace je spouštěna prostřednictvím nesčetných buněčných událostí od poškození DNA až po hypoxii a stres. Po aktivaci p53 působí jako transkripční faktor a řídí transkripci genů zapojených do opravy DNA, metabolismu, zastavení buněčného cyklu, apoptózy a stárnutí (Hientz a kol., 2016; Neophytou a kol., 2021). Mutace nebo delece genu TP53, který kóduje protein p53, je přítomna u téměř 50 % lidských nádorů a primárně vedou k narušení funkce nádorových supresorů (Wang a kol., 2012). Po ztrátě funkčnosti p53 mohou poškozené buňky proliferovat přenosem mutací na další generaci (Hientz a kol., 2016).

3.1.5 Zvýšená detoxikace léčiva

Změněná exprese a aktivita enzymů metabolizujících léky v nádorových buňkách mění metabolické a signální dráhy. To hraje značnou roli v lékové rezistenci. Enzymy metabolizující léky byly široce rozděleny do dvou kategorií – enzymy metabolizující léky fáze I. a fáze II. Mezi enzymy fáze I. patří oxidázy, dehydrogenázy, deaminázy a hydrolázy. Mezi enzymy II. fáze patří glutathiontransferázy (GST), UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT), N-acetyltransferázy (NST). Enzymy fáze II. generují ve vodě rozpustné sloučeniny konjugací produktů reakcí fáze I. popř. mateřské sloučeniny s kyselinu glukuronovou, sulfátem nebo glutathionem (Kaur a kol., 2020). Tyto konjugáty pak mohou být přirozeně eliminovány nebo odstraněny pomocí pumpy závislé na ATP (Balendiar a kol., 2004).

Příkladem zvýšené odolnosti vůči léčivům v nádorových buňkách může být zvýšená exprese GST. Protože zvýšená exprese GST v kombinaci s vysokými hladinami glutathionu (GSH) může zvýšit rychlost a detoxikace chemoterapeutických látek, a tím snížit jejich účinnost (Traverso a kol., 2013). Odolnost mohou enzymy GST zvyšovat přímo detoxikací protinádorového léčiva nebo nepřímo inhibicí dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) v dráze RAS-MAPK (Mansoori a kol., 2017). Zvýšená detoxikace léčiva a role glutathionu v ní je popsáno v kapitole 3.3.

3.1.6 Mikroprostředí nádoru

Nádorová hmota se skládá nejen z heterogenní populace nádorových buněk, ale také z různých rezidentních a infiltrujících hostitelských buněk, secernovaných faktorů a proteinů extracelulární matrix, souhrnně známých jako nádorové mikroprostředí. Progrese

nádoru je silně ovlivněna interakcemi nádorových buněk s jejich prostředím (Anderson a Simon, 2021).

Vzhledem k tomu, že rychlá a nekontrolovaná proliferace nádorů omezuje dostupnost kyslíku, je hypoxie typickým rysem mikroprostředí téměř u všech solidních nádorů. V reakci na hypoxii je stěžejním charakteristickým znakem zvýšená exprese hypoxií indukovatelného faktoru (HIF) (Jing a kol., 2019). HIF podporují expresi více než 150 genů, jejichž produkty koordinují adaptivní reakce. Hypoxické nádorové buňky je nadměrně exprimují, aby zvýšili přežití, aberantní angiogenezi a extrémní buněčný růst (Nejad a kol., 2021).

Vedle hypoxie patří k běžným charakteristikám solidních nádorů také zvýšená glykolytická aktivita vedoucí ke zvýšené produkci a sekreci laktátu a H^+ do nádorového mikroprostředí. Vrcholem zvýšené glykolýzy spojené se špatnou vaskulární perfuzí je kyselý extracelulární prostor (Wojtkowiak a kol., 2011). To vede k protonaci slabě bazických léčiv, jako je doxorubicin, čímž se snižuje jejich působení intracelulárně (Alfarouk, 2016).

3.1.7 Lysozomální sekvestrace

V literatuře je uvedeno, že lysozomy přispívají k rezistenci chemoterapeutických činidel prostřednictvím mechanismu známého jako lysozomální sekvestrace. Je popsána jako proces, při kterém se hydrofobní slabě bazické sloučeniny vysoce akumulují v kyselých lysozomech. Tyto látky díky své hydrofobní povaze volně prostupují přes lysozomální membrány. Po setkání s kyselým prostředím lumenu lysozomu se hydrofobní sloučeniny protonují kvůli svým slabým bazickým vlastnostem. To vede k tomu, že již nemohou procházet přes lipidovou membránu lysozomu a dochází tak k jejich výrazné lysozomální akumulaci a kompartmentalizaci (Zhitomirsky a Assaraf, 2016).

Existují však důkazy, že koncentrace protinádorového léčiva v cílených místech může být významně snížena lysozomální sekvestrací pouze tehdy, jestliže je v důsledku rovnováhy současně snížena také jeho koncentrace extracelulárně. Nenabitá forma slabě bazického léčiva volně difunduje přes buněčné membrány (Růžičková a kol., 2019). Role lysozomální sekvestrace v rozvoji lékové rezistence je tak stále nejasná.

3.1.8 Změny působící zvýšenou odolnost nádorových buněk

V nádorových buňkách existují změny, které mohou zvyšovat odolnost vůči chemoterapii, ale nejsou zařazeny mezi klasické mechanismy lékové rezistence. K těmto změnám patří změněná exprese proteinů tepelného šoku a senescence.

Změněná exprese proteinů tepelného šoku

Proteiny tepelného šoku, zejména HSP27, HSP70 a HSP90, jsou exprimovány ve zvýšených hladinách u řady nádorů. Exprese HSPs se zdá být zásadní v mnoha charakteristických rysech maligních buněk, včetně nekontrolovatelného růstu, suprese nádoru, zvýšeného přežití buněk, angiogeneze a metastázování (Calderwood, 2016). Jejich nadměrná exprese byla pevně spojena s terapeutickou rezistencí. Konkrétně HSP90 by měl umožňovat dynamické změny v nádorech a napomáhat rychlému vývoji nových fenotypů buněk rezistentních na léčbu. HSPs tak mohou mít terapeutické důsledky a mohou být cíleny specifickými léčivy (Calderwood, 2016; Lianos a kol., 2015). Proteinům tepelného šoku věnuji podkapitolu 3.3.

Senescence

Alternativní buněčná odpověď, senescence, může být zahájena po vystavení buňky endogenním nebo exogenním stresovým signálům a působit tak jako sebeochranný mechanismus (Schmitt, 2007; Gordon a Nelson, 2012). Nádorové buňky mohou podstoupit senescenci také po vystavení chemoterapeutickým činidlům. Kromě suprese tumorigeneze zůstávají senescentní buňky metabolicky aktivní. Senescence může také přispívat k odolnosti vůči cytotoxickým účinkům protinádorových léčiv. Senescentní buňky jsou typicky zvětšené a zploštělé. Kromě charakteristických změn v morfolonii vykazují se senescencí spojenou aktivitu β -galaktosidázy (Gewirtz a kol., 2008). V literatuře byla senescence popsána jako pravděpodobný nežádoucí výsledek léčby nádorového onemocnění. Jedná se zejména o účinky sekretů senescentních buněk, stejně jako jejich schopnost uniknout ze zástavy buněčného cyklu a regenerovat onemocnění (Carpenter a kol., 2021).

3.2 ABC transportéry

ABC transportéry jsou pojmenovány podle jejich charakteristických ATP-vazebných kazetových domén. Jsou to evolučně konzervované proteiny, které typicky transportují rozpustné látky přes buněčnou membránu. Funkční jednotka ABC transportéru obsahuje dvě transmembránové domény (TMD) a dvě nukleotidové ATP-vazebné domény (NBD) (Szakács a kol., 2006). Až na několik výjimek transportéry ABC pumpují transportní substráty proti chemickému gradientu, což je proces, který vyžaduje hydrolýzu ATP, jako hnací sílu (Wilkens, 2015).

Lidský genom obsahuje 48 genů, které kódují transportéry ABC. Byly rozděleny do sedmi podrodin označených A-G (Wilkens, 2015; Liu 2019). Tyto transportéry translokují různé substráty, od chemoterapeutických léků po přirozeně se vyskytující biologické sloučeniny, často proti jejich koncentračnímu gradientu. Ačkoli několik členů této rodiny má specializované funkce zahrnující transport specifických substrátů, ukazuje se, že fyziologická síť ABC transportérů má klíčovou roli v detoxikaci a ochraně před xenobiotiky. Ochranou a detoxikační roli odhaluje tkáňová distribuce transportérů ABC, které jsou vysoce exprimovány v důležitých farmakologických bariérách, jako je membrána kartáčového lemu střevních buněk, membrána žlučových kanálků hepatocytů, luminální membrána v proximálních tubulech ledvin a epitel, který přispívá ke vzniku hematoencefalické bariéry (Szakács a kol., 2006; Fletcher a kol., 2016).

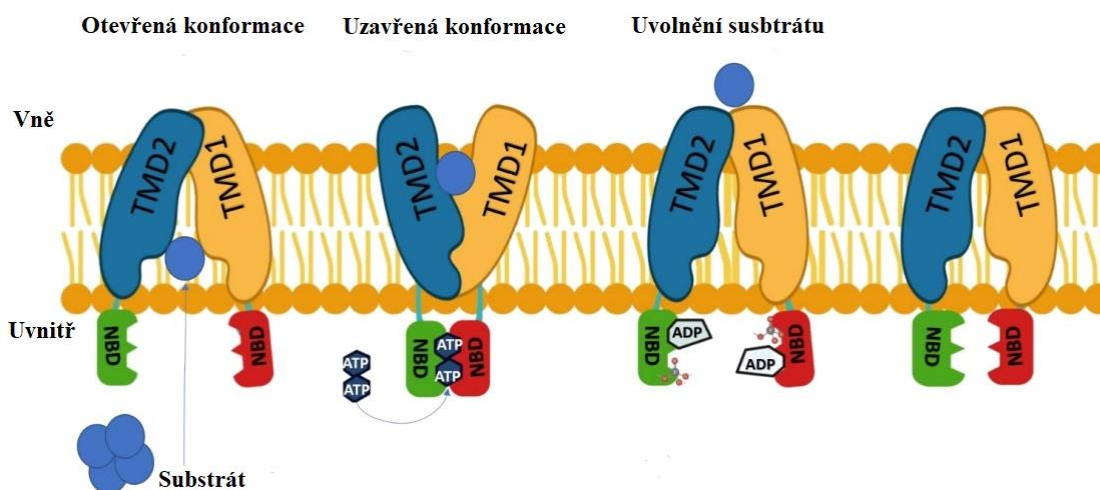
3.2.1 Obecná struktura ABC transportérů

Označení „ABC-transporters“ zavedl Higgins a týká se společných strukturních prvků těchto proteinů (Higgins, 1992). Nejvíce charakteristickým rysem této proteinové rodiny je vysoce konzervovaná, přibližně 215 aminokyselinová konsenzuální sekvence označená jako ATP-vazebná kazeta (ABC) nebo nukleotidová vazebná doména (NBD). Doména ABC obsahuje dva krátké peptidové motivy: Walker A – bohatý na glycin; hydrofobní Walker B – motiv. Oba se podílejí na vazbě ATP a jsou přítomny ve všech proteinech vázajících nukleotidy. Třetí konsenzuální sekvence se nazývá ABC signatura a je jedinečná pouze v ABC doménách. Správného významu termínu ABC-transportér je však dosaženo, když je protein obsahující NBD navíc spojen hydrofobní TMD uloženou v membráně, obvykle složenou z alespoň šesti transmembránových α -helixů (Lage, 2008). Funkční jednotka ABC transportéru obsahuje dvě TMD a dvě NBD (Szakács a kol., 2006).

3.2.2 Mechanismus přenosu substrátu

ABC transportéry umožňují eflux chemických činidel proti jejich koncentračnímu gradientu, což je proces, který vyžaduje hydrolýzu ATP jako hnací sílu (Obr. 1) (Wilkens, 2015).

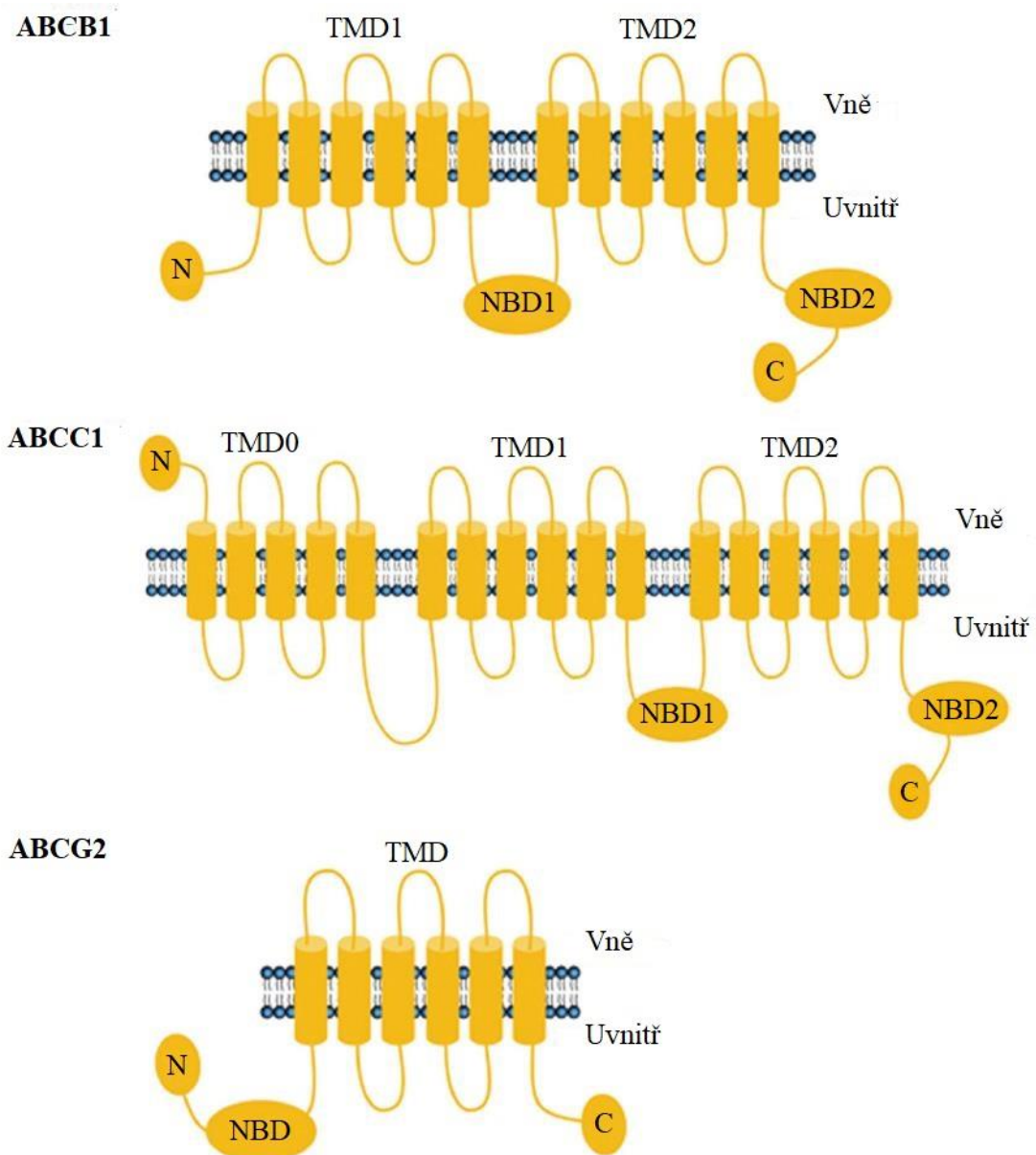
Cyklus aktivního transportu začíná vazbou substrátu na vysoce afinitní strukturu tvořenou dvěma TMD a NBD vázající molekulu ATP. Vazebná místa pro ATP jsou na NBD tvořena strukturálním příspěvkem každého z monomerů NBD. V důsledku toho dochází ke konformační změně TMD buď z venku směrem dovnitř (importér) nebo naopak (exportér), což umožňuje jednotkám NBD tvořit dimer. Dimer NBD indukuje hlavní konformační změnu TMD, což umožňuje translokaci substrátu přes plazmatickou membránu. Hydrolýza ATP umožňuje, aby se dimery NBD disociovaly a znovu vyvolaly konformační změnu TMD, což má za následek uvolnění substrátu. Poté proběhne poslední krok obnovení otevřené konformace NBD-dimeru (Ahmed a kol., 2021).



Obr. 1 Mechanismus přenosu substrátu znázorněn schématicky. Aktivní transport začíná vazbou substrátu na TMD, která se nachází v otevřené konformaci. Následně dochází k navázání dvou molekul ATP, k dimerizaci NBD a konformace přenašeče se uzavře. Dimer NBD indukuje hlavní konformační změnu na TMD, což způsobí translokaci substrátu. Hydrolýza ATP poté umožní disociaci dimerů NBD a znovu indukuje konformační změnu TMD. Posledním krokem je obnovení otevřené konformace přenašeče (převzato a přeloženo od Ahmed a kol., 2021).

3.2.3 ABC transportéry spojeny s mnohočetnou lékovou rezistencí

Tři transportéry z rodiny ABC; P-glykoprotein (ABCB1), MRPI (ABCC1) a BCRP (ABCG2) jsou spojovány s mnohočetnou lékovou rezistencí (Obr. 2). Fyziologicky tyto transportéry hrají důležitou roli při ochraně tkání před toxickými xenobiotiky a endogenními metabolity. Jejich přítomnost je dokázána také v mnoha lidských nádorech, kde se podílejí na rezistenci vůči chemoterapeutické léčbě (Sharom, 2008).



Obr. 2: Schematický model ABC transportéru ABCB1, ABCC1, ABCG2 (převzato a přeloženo od Hu a kol., 2016).

ABCB1

P-glykoprotein (P-gp) byl prvním identifikovaným ABC transportérem. V roce 1976 byl popsán v buněčných liniích rezistentních na kolchicin a popsán jako glykoprotein modulující permeabilitu léčiva (Juliano a Ling, 1976). O deset let později se ukázalo, že P-gp je energeticky závislá efluxní pumpa odpovědná za sníženou akumulaci protinádorových léčiv (Chen a kol., 1986).

Lidský P-gp je kódován genem *ABCB1*. Jedná se o protein plazmatické membrány s molekulovou hmotností 170 kDa. Je považován za nejlépe prostudovaný transportér pro eflux léčiv (Liu, 2019). Je vysoce exprimován ve střevní slizniční membráně, epitelu proximálního tubulu ledvin, v játrech, placentě a luminální hematoencefalické bariéře. Fyziologicky slouží k ochraně proti xenobiotikům (Budge a kol., 2017).

P-gp transportuje nemodifikované neutrální nebo kladně nabitě hydrofobní sloučeniny a bylo prokázáno, že odvádí širokou škálu klinicky nepostradatelných chemoterapeutik proti nádorovému onemocnění, včetně taxolu, vinkristinu, etoposidu, daunorubicinu, irinotekanu a mnoha dalších (Fletcher a kol., 2016).

ABCC1

ABCC1 neboli Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) je kódován genem *ABCC1*. Původně byl identifikován jako mediátor získané lékové rezistence v buněčné linii malobuněčného karcinomu plic, která byla rezistentní vůči doxorubicinu (Cole a kol., 1992). Molekulová hmotnost MRP1 je 190 kDa (Rosenberg a kol., 2001).

Je exprimován téměř ve všech lidských tkáních a transportuje široké spektrum substrátů, toxických látek a konjugátů glutathionu, glukuronidu a sulfátu (Jiye a Jianting, 2011). Vedle toho je MRP1 schopen transportovat nekonjugovaná léčiva (Leslie a kol., 2001). Je zodpovědný i za odčerpávání celé škály protinádorových látek, jako jsou vinka alkaloidy, antracykliny, kamptoteciny a metotrexát (Wang a kol., 2019). I přes relativně nízký stupeň identity aminokyselinové sekvence s ABCB1 (15 %) existuje významný překryv mezi profilem rezistence ABCB1 a ABCC1 (Kathawala, 2015).

ABCG2

Další důležitý ABC transportér, který je zapojen do lékové rezistence se nazývá Breast cancer resistance protein (BCRP; ABCG2). Byl identifikován v roce 1998 jako xenobiotický transportér, který hraje hlavní roli ve fenotypu mnohočetné lékové rezistence lidských buněk nádoru prsu (MCF-7) (Doyle a kol., 1998). Jeho rozmanitá škála substrátů

zahrnuje mnoho běžných chemoterapeutik, jako je imatinib, doxorubicin a mitoxantron. Fyziologicky je ABCG2 vysoce exprimován v oblastech, jako je hematoencefalická bariéra a gastrointestinální trakt, kde se předpokládá, že hraje roli v ochraně proti xenobiotikům (Stacy a kol., 2013).

Jedná se o první známý „poloviční transportér“ s jednou TMD a jednou NBD (Kathawala a kol., 2015). Protože pro hydrolyzu ATP a transport substrátu jsou zapotřebí dvě NBD, funkční jednotkou ABCG je dimer, aby tvořil „plný transportér“ (Szakács, 2006; Dezi a kol., 2010).

3.2.4 Inhibitory ABC transportérů

Objev, že nadměrná exprese ABC transportérů v nádorových buňkách zprostředkovává rezistenci k protinádorovým lékům vedl ke zvýšenému úsilí vyvinout terapie, které by mohly tyto transportéry blokovat nebo inaktivovat (Kathawala a kol., 2015). Mělo by se jednat o netoxickou sloučeninu, která by inhibovala relativní ABC transportér s vysokou účinností a specifitou. Tato sloučenina by však neměla nepříznivě ovlivňovat farmakokinetiku terapeutického léčiva, které by bylo podáno současně s ní k usmrcení samotné nádorové buňky (Falasca a kol., 2012). Několik takovýchto sloučenin bylo testováno jak *in vitro*, tak klinicky a níže jsou uvedeny jako tři různé generace inhibitorů ABCB1.

V 80. letech minulého století bylo identifikováno mnoho látek, které moduluji transportéry P-gp, včetně verapamilu, cyklosporinu A, tamoxifenu a několika antagonistů kalmmodulinu (Coley, 2010). Tyto látky, označované jako inhibitory první generace, již byly používány jako léky pro jiné indikace. I přes jejich účinnost v inhibici ABCB1-dependentního lékového efluxu *in vitro*, tyto inhibitory nedokázaly poskytnout pozitivní účinek v klinických studiích (Falasca a kol., 2012). Jejich nízké vazebné afinity vyžadovaly zvýšení dávek, což mělo za následek vysokou výslednou toxicitu, která byla pro organismus nepřijatelná (Nobili a kol., 2006; Coley, 2010).

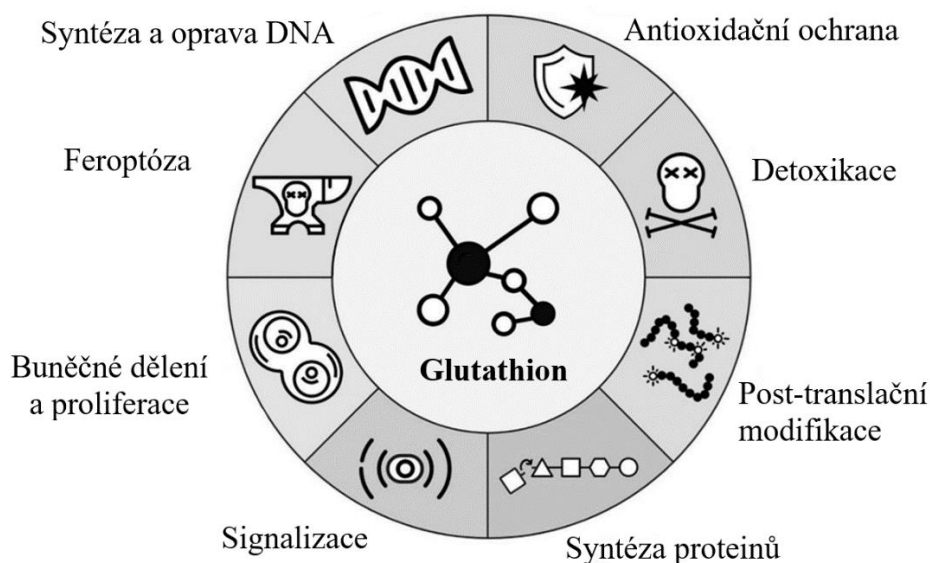
Inhibitory druhé generace včetně valsopodaru, dexniguldipine, elakridaru jsou sloučeniny bez terapeutického využití. Mají vyšší afinitu k P-gp než sloučeniny první generace. Valsopodar je analog cyklosporinu A, ale nemá jeho imunosupresivní účinek a může být pacientů podáván v poměrně vysokých dávkách (Liu, 2019). Klinickou aplikaci valsopodaru však omezují jeho farmakokinetické interakce (Wang a kol., 2010). Prostřednictvím současné inhibice CYP3A4 (cytochrom P450 3A4) valsopodar interferoval s metabolismem a eliminací léčiv, čímž zvyšoval jejich expozici (Tamaki a kol., 2011).

Inhibitory třetí generace, jako elacridar, zosuquidar, tariquidar byly speciálně vyvinuty pro interakci s P-gp a ABCG2. Mezi těmito inhibitory byl nejrozsáhleji studován duální inhibitor elacridar. V klinických studiích vykazoval pozoruhodný reverzní účinek MDR s pouze minimálními vedlejšími účinky (Wang a kol., 2010). Zvrácení lékové rezistence elacridaru byla pozorována již při nano molární koncentraci a byla spojena se zvýšenou akumulací protinádorového léčiva v buňkách (Coley, 2010). Zosuquidar, jako inhibitor P-gp obnovuje citlivost na léčiva a může zvýšit cytotoxicitu antracyklinům (daunorubicinu, mitoxantronu) u akutní myeloidní leukémie (Tang a kol., 2008).

3.3 Zvýšená detoxikace léčiv působením glutathionu

Glutathion je tripeptid, vychytává volné radikály a působí jako detoxikační činidlo v buňkách. Jedná se o nejčastěji zvýšený metabolit detekovaný v buňkách během oxidačního stresu. Za fyziologických podmínek je redukovaný glutathion (GSH) hlavní přítomnou formou glutathionu s koncentrací 10 až 100krát vyšší než oxidované druhy (GSH disulfid [GSSG]). Při oxidačním stresu je GSH po reakci s reaktivními formami kyslíku (ROS) konvertován na GSSG peroxidázami závislými na GSH (Bansal a Simon, 2018). GSH je v buňce široce distribuován, ale většina (90 %) je uložena v cytosolu. Zbývající frakce GSH je přítomna v mitochondriích, jádře a endoplazmatickém retikulu. V extracelulárním prostoru lze nalézt pouze nízké koncentrace GSH (Desideri a kol., 2019). V subcelulárních kompartmentech (v cytosolu, jádře, mitochondriích a peroxizomu) je udržováno vysoce redukční prostředí, aby bylo usnadněno správné skládání proteinů. Naproti tomu endoplazmatické retikulum udržuje vysoce oxidované prostředí a zvýšené hladiny GSSG. To podporuje funkční konformaci peptidů, zejména pro přidání disulfidových vazeb do vznikajících sekrečních a membránových proteinů (Bansal a Simon, 2018).

GSH zprostředkovává buňce několik životně důležitých rolí, vedle již zmiňované antioxidantace se jedná například o udržování redoxního potenciálu, modulace imunitní odpovědi, detoxikace xenobiotik, buněčná proliferace, buněčné dělení a diferenciace (Obr. 3) (Balendiran a kol., 2004; Bansal a Simon, 2018).



Obr. 3: Glutathion má řadu rolí ve zdravých i nádorových buňkách (převzato a přeloženo od Kennedy a kol., 2020).

3.3.1 Detoxikace léčiv a glutathion S-transferáza

V lékové rezistenci hraje značnou roli změněná exprese a aktivita enzymů metabolizujících léky v nádorových buňkách. Dochází u nich ke změně metabolické a signální dráhy (Kaur a kol., 2020). Enzymy metabolizující léky jsou klasifikovány jako enzymy I. a II. fáze. Enzymy I. fáze často katalyzují oxidační, redukční a hydrolyzační reakce. Většina enzymů II. fáze katalyzuje konjugační reakce: glutathion S-transferázy (GST), UDP-glukuronosyltransferázy (UGT) nebo sulfotransferázy (SULT) (Iyanagi, 2007). Tyto enzymy katalyzují konjugační reakce xenobiotika s glutathionem, glukuronidem nebo sulfátem (Joyce a kol., 2015).

Nadrodina enzymů známých jako glutathion transferázy (GST) využívá glutathion k obraně proti nejrozličnějším xenobiotikům. Existuje široká škála funkcí spojená s těmito enzymy, ale nejrelevantnější z nich jsou právě xenobiotické reakce. GST v nich fungují jako detoxikační enzymy II. fáze a eliminují různé hydrofobní a elektrofilní sloučeniny prostřednictvím GSH (Kennedy a kol., 2020). Konkrétně GST katalyzuje nukleofilní substituci za vzniku GSH konjugátu (Balendiar a kol., 2004). Vytvořený konjugát GSH–léčivo je efluxován z buňky prostřednictvím transportních membránových proteinů asociovaných s rezistencí (ABCC1). Exprese MRP1 je často zvýšena v nádorových buňkách rezistentních na léky spolu s GST (Bansal a Simon, 2018). Zvýšená exprese GST v kombinaci s vysokými hladinami GSH může zvýšit rychlost a detoxikaci chemoterapeutických látek, a tak snížit jejich účinnost (Traverso a kol., 2013). Odolnost vůči léčivům v nádorových buňkách mohou enzymy GST zvyšovat přímo detoxikací protinádorového léčiva nebo nepřímo inhibicí dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) v dráze RAS-MAPK (Mansoori a kol., 2017).

3.3.2 Role GSH u nádorového onemocnění

Bylo prokázáno, že hladiny GSH jsou zvýšené v řadě různých lidských nádorových tkání včetně kostní dřeně, prsu, tlustého střeva, hrtanu a plic. Role GSH u nádorového onemocnění je velmi komplexní a vyskytuje se zde určitý dualismus (Kalinina, 2020). Je zdůrazňován význam GSH při eliminaci karcinogenů a ochranu před jejich toxickými vlivy. Na druhou stranu zvýšené hladiny GSH jsou schopny chránit nádorové buňky tím, že interferují s cytotoxickým účinkem mnoha protinádorových léků (Balendiran a kol., 2004).

3.4 Proteiny tepelného šoku

Proteiny tepelného šoku (Heat shock proteins – HSPs) byly nejprve popsány v roce 1962 v buňkách *Drosophily hydei* jako genové produkty, jejichž exprese je indukována teplem (Ritossa, 1962). V dnešní době byl výzkum přesunut k pochopení role HSPs jako molekulárních chaperonů. Interagují s jinými proteiny a tím minimalizují pravděpodobnost, že dojde k jejich nevhodným interakcím. Rozpoznávají proteiny, které jsou v nepřirozených konformacích, ať už kvůli stresu nebo v případě, že peptidy, které obsahují ještě nebyly plně syntetizovány, složeny nebo lokalizovány do vhodného buněčného kompartmentu (Feder a Hofman, 1999). Navíc HSPs pravděpodobně mají antiapoptotické vlastnosti a jsou aktivně zapojeny do různých procesů, jako je proliferace nádorových buněk, invaze, metastázování a buněčná smrt. Bylo popsáno, že tyto proteiny jsou významně zvýšeny u mnoha lidských nádorů. Jejich nadměrná exprese byla pevně spojena s terapeutickou rezistencí a špatným přežitím buněk. HSPs tak mohou mít důležité terapeutické důsledky a mohou být cíleny specifickými léčivy (Lianos a kol., 2015). Také je diskutováno jejich potenciální klinické využití jako biomarkery pro diagnostiku nádoru nebo na hodnocení progresu onemocnění (Wu a kol., 2017).

Podle velikosti byly proteiny tepelného šoku zařazeny do následujících rodin: malé HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 a rodina velkých HSP (Wu a kol., 2017).

HSP27 je členem rodiny malých HSP a působí jako ATP-závislý chaperon. Uvádí se, že tento protein byl poprvé charakterizován jako proteinový chaperon, který usnadňuje opětovné skládání proteinů poškozených tepelným šokem (Kim a kol., 1998). Pokračující výzkum HSP27 odhalil, že protein reaguje také například na oxidační a chemický stres. Během oxidačního stresu funguje HSP27 jako antioxidant, který snižuje hladiny reaktivních forem kyslíku zvýšením hladin intracelulárního glutathionu a snížením hladin intracelulárního železa. Za podmínek chemického stresu funguje jako antiapoptotické činidlo interakcí s mitochondriálně závislými i nezávislými cestami apoptózy (Vidyasagar a kol., 2012). Tento protein se nachází zejména v cytosolu a účastní se migrace buněk, architektury cytoskeletu, buněčného růstu, diferenciaci a progresu nádoru (Lianos a kol., 2015). Vedle antiapoptotické aktivity byla u HSP27 popsána také aktivita antisenescenční (Sherman a Multhoff, 2007).

HSP40 (DNAJ) je rodina ko-chaperonů. Lidský genom kóduje více než 41 členů rodiny HSP40, kteří sídlí intracelulárně na různých místech. Navzdory jejich velkému počtu, je o jejich fyziologických rolích je známo pouze málo. Bylo popsáno zapojení

některých členů této rodiny do různých typů nádorů (Mitra a kol., 2009). Studie odhalily paralelně vysokou expresi HSP40, HSP70 a HSP90 v nádorech mozku. Zdá se, že HSP90 a komplex HSP40-HSP70 působí společně na posílení Akt dráhy, která představuje známou a zásadní dráhu přežití buněk. Kromě toho byla pozorována zvýšená exprese HSP40 také u nádoru plic (Lianos, 2015).

HSP60, původně nazýván chaperonin, se nachází hlavně v mitochondriích eukaryot, kde interaguje s HSP10 a HSP70 (Wu a kol., 2017). Ale byl detekován i extramitochondriálně. HSP60 napomáhá skládání mitochondriálních proteinů a usnadňuje proteolytickou degradaci chybně složených nebo denaturovaných proteinů způsobem závislým na ATP (Li a kol., 2014). HSP60 je aktivně vylučován nádorovými buňkami a hraje roli v transformaci, podpoře angiogeneze a metastázování (Wu a kol., 2017). Zdá se, že má potenciál v oblastech diagnostiky, prognózy, prevence a léčby různých lidských nádorů, včetně karcinomu jícnu, kolorektálního karcinomu nebo glioblastomu (Li a kol., 2014).

HSP70 je zakládajícím členem vysoce konzervované rodiny molekulárních chaperonů HSP70, které se nacházejí v každé membránové organelle buňky (Sherman a kol., 2015). Za normálních podmínek fungují HSP70 jako molekulární chaperony závislé na ATP, které napomáhají skládání nově syntetizovaných polypeptidů, sestavování multiproteinových komplexů a transportu proteinů přes buněčné membrány (Jego a kol., 2013). HSP70 se váže na úseky exponovaných hydrofobních zbytků nesložených, chybně složených proteinů a brání jejich agregaci (Murphy, 2013). HSP70 je nadměrně exprimován u všech lidských nádorů. Bylo popsáno, že HSP70 kromě své molekulární chaperonové funkce má také speciální roli v apoptotické signální transdukcii (Sherman a kol., 2015).

Rodina HSP90 je pojmenována podle nejlépe prostudovaného člena této rodiny – HSP90. Jedná se o evolučně konzervovaný molekulární chaperon. Je závislý na ATP, který je nezbytný pro udržení, aktivaci nebo zrání široké škály proteinů (známé jako klientské). Zprostředkovává různé základní buněčné procesy a funkce včetně řízení buněčného cyklu, přežití buněk, hormonální signalizace a reakce na buněčný stres (Miyata a kol., 2013). Klientské proteiny HSP90 zahrnují mnoho onkogenních proteinů, které se podílejí na proliferaci nádorových buněk, přežití a angiogenezi, např. p53, Bcr-Abl, Raf-1, Akt, Erb2 a hypoxií indukovatelný faktor 1 α (HIF-1 α). HSP90 z těchto důvodů patří k protinádorovým chemoterapeutickým cílům (Neckers a Percy, 2003; Miyata a kol., 2013).

Rodina velkých HSP zahrnuje dva hlavní členy: HSP110 (také známý jako HSP105), který je indukován tepelným šokem a GRP170, který se nachází

v endoplazmatickém retikulu a je indukován hlavně glukózovou deprivací (Wu a kol., 2017). Zvýšená exprese HSP110 propůjčuje buňkám tepelnou toleranci a že může zabránit agregaci denaturovaných proteinů *in vitro*. GRP170 se váže na proteiny v endoplazmatickém retikulu a zajišťuje jejich správné skládání (Easton a kol., 2000). Tyto proteiny jsou nyní studovány zejména v souvislosti s jejich funkcí chránit nádorové buňky před lékovým a hypoxickým stresem (Chakafana a Shonhai, 2021).

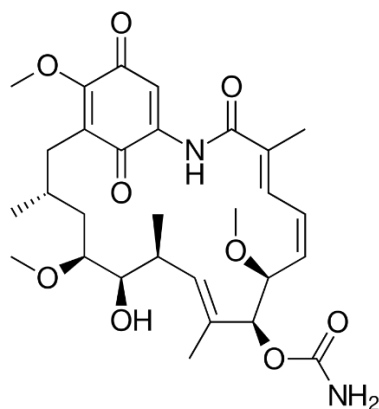
3.4.1 Inhibice HSP90

Zájem o inhibici HSP90 pramení z jeho jedinečné role při regulaci funkce a stability rostoucího počtu proteinů, na kterých závisí přežití nádorových buněk. Mezi klientské proteiny HSP90 patří také mnoho mutovaných nebo nadměrně exprimovaných proteinů, které řídí proliferaci nádorových buněk nebo umožňují jejich únik z apoptózy (Neckers a Percy, 2003). To vysvětluje, proč inhibice HSP90 specifickými inhibitory potlačuje proliferaci a růst nádorových buněk (Miyata a kol., 2013).

Třída antibiotik známých jako benzochinonové ansamyciny a zejména geldanamycin se specificky vázala na HSP90, inhibovala asociaci chaperonu s proteinem v-Src a vedla k případné destabilizaci proteinu (Whitesell a kol., 1994).

Geldanamycin

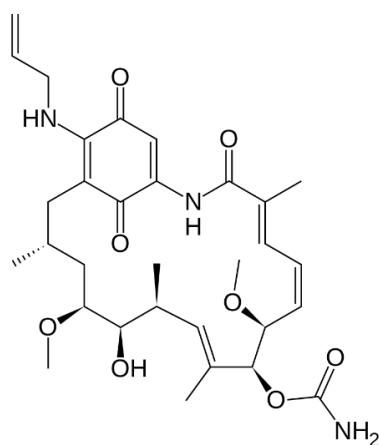
Geldanamycin byl první benzochinonové ansamycinové antibiotikum identifikované ze *Streptomyces hygroscopicus* v roce 1970 (Obr. 4) (DeBoer a kol., 1970). Původně bylo popsáno, že působí jako inhibitor tyrozin kinázy, protože blokoval aktivitu několika signálních kináz. Ale důležitější je, že geldanamycin vykazuje silnou protinádorovou aktivitu u široké škály nádorů (Fukuyo a kol., 2010). Geldanamycin je specifický inhibitor HSP90 (Schnaider a kol., 2000). Váže se na N-koncové vazebné místo ATP, to vede k inhibici aktivity ATPázy závislé na HSP90, což bylo prokázáno na rentgenové krystalové struktuře komplexu HSP90/GDN (Grenert a kol., 1997). Geldanamycin vykazuje závažnou hepatotoxicitu v terapeutických dávkách na zvířecích modelech a je také metabolicky nestabilní a špatně rozpustný ve vodě (Fukuyo a kol., 2010). Problém cytotoxicity byl vyřešen přípravou semisyntetických derivátů geldanamycinu 17-AAG (tanespimycin) a 17-DMAG (alvespimycin) vytěsněním 17-methoxy skupiny vhodným aminem (Chackalamannil a kol., 2017).



Obr. 4: Geldanamycin ((4E,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-8,14,19-Trimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]dokosa-1(21),4,10,18-tetraene-9,13-diyl dikarbamat).

Tanespimycin (17-AAG)

Syntetický analog geldanamycinu (17-allylamin-17-demethoxigeldanamycin, 17-AAG) se stejně jako jeho mateřská sloučenina váže na HSP90 a destabilizuje jeho klientské proteiny v nádorových buňkách (Obr. 5) (Dimopoulos, 2011). Bylo zjištěno, že tento derivát má výrazně zlepšený profil toxicity (Erlichman, 2009). Vykazoval dobrou aktivitu a selektivitu v preklinických myších modelech a postoupil do první fáze studie na lidech (Singh a kol., 2010). Byl testován pro stanovení dávky a ve farmakokinetických studiích u pacientů se solidním nádorem. Stejně jako ostatní analogy geldanamycinu se tanespimycin špatně rozpouští ve vodných roztocích, což vyžaduje užití rozpouštědel jako je dimethylsulfoxid (DMSO). Právě použití DMSO byly připisovány některé nežádoucí účinky tanespimycinu (Dimopoulos, 2011). V posledních letech pokrok v nosičích na bázi nanomateriálů vedl k překonání těchto překážek (Talaie, 2018).



Obr. 5: Tanespimycin ([[(3S, 5S, 6R, 7S, 8E, 10R, 11S, 12E, 14E)-21-(allylamino)-6-hydroxy-5,11-dimethoxy-3,7,9,15-tetramethyl-16,20,22-trioxo-17-azabicyclo[16.3.1]docosa-8,12,14,18,21-pentaen-10-yl]karbamát)

3.5 Úvod experimentální části

V posledním desetiletí byl proveden rozsáhlý výzkum zaměřený na vývoj specifických inhibitorů HSP. Mezi nejslibnější patří inhibitory HSP90, protože mohou inhibovat několik onkogenních proteinů, na kterých závisí přežití nádorových buněk (Lianos a kol., 2015). Cílení na HSP90 by mohlo vést k současnému narušení mnoha drah onkogenního přenosu signálu (Jego a kol., 2013). Specifickým inhibitorem HSP90 je geldanamycin, který vykazuje silnou protinádorovou aktivitu u široké škály rakovin (Fukuyo a kol., 2010). V klinické praxi však nemůže být používán z důvodu hepatotoxicity a špatné rozpustnosti ve vodě. Proto byly vyvinuty dva analogy geldanamycinu: 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) a 17-(2-dimethylaminoethyl)amino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG). Tyto deriváty vykazují sníženou jaterní toxicitu bez ztráty účinnosti, ale špatná rozpustnost ve vodě u nich zůstává (Pham a kol., 2009).

Již při prvních studiích inhibitorů HSP90 byla identifikována rezistence, ovlivňující účinnost geldanamycinu a jeho derivátů (Piper a Millson, 2011). S rezistencí vůči geldanamycinu a jeho derivátům jsou spojovány membránové ABC transportéry. Nezbytným předpokladem pro účinek jakéhokoli protinádorového léku je jeho dostatečná intracelulární akumulace (Huang a kol., 2007). Zvýšená exprese ABC transportérů vede k vyššímu efluxu léčiva z nádorových buněk a ke snížení jeho akumulace intracelulárně (Gottesman a kol., 2002).

Obecně jsou s rozvojem rezistence vůči geldanamycinu a jeho derivátům jsou spojovány zejména ABC transportéry ABCB1 (P-gp) a ABCC1 (MRP1). Pérez-Tomás (2006) uvádí geldanamycin jako substrát ABCB1 transportéru. Huang a kol. (2007) potvrzují, že geldanamycin patří k lékům, jejichž účinek může být ovlivněn mechanismem mnohočetné lékové rezistence zprostředkované ABCB1. Naopak Pham a kol. (2009) potvrzují, že ABCC1 může fungovat jako efluxní pumpa pro GDN a jeho analogy. Stejný autor také poskytuje důkaz, že rezistence vůči GDN byla spojena s funkcí ABCC1. Z důvodu rozporuplnosti v těchto výsledcích jsme se pokusili ověřit zapojení ABC transportérů ve vývoji rezistenci vůči geldanamycinu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčná linie A549

Buněčná linie A549 byla získána z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), Velká Británie. Jedná se o adenokarcinomové lidské alveolární bazální epiteliální buňky a jsou adherentní. Poprvé byly získány v roce 1972 odstraněním a kultivací rakovinné plicní tkáně z nádoru 58letého kavkazského muže (Giard a kol., 1973).

Tato buněčná linie byla kultivována ve standardním růstovém médiu RPMI-1640 a DMEM (v poměru 1:1), které bylo doplněno o 10 % fetální bovinní sérum (FBS), penicilin a streptomycin (0,1 mg/ml). Buňky byly pasážovány dvakrát týdně ve sterilních podmínkách laminárního boxu a inkubovány v malých kultivačních nádobách při 37 °C a 5 % obsahu CO₂.

4.1.2 Chemikálie a roztoky

- 1x fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS): 130 mmol/l NaCl; 10 mmol/l NaH₂PO₄; 2,7 mmol/l KCl; 18 mmol/l K₂PO₄; pH 7,4
- DMEM růstové médium (VWR International, USA)
- DMSO (dimethylsulfoxid) (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- Geldanamycin ((4E,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R) -8,14,19-Trimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3,20,22-trioxo-2-azabicyclo[16.3.1]dokosa-1(21),4,10,18-tetraene-9,13-diyl dikarmabát) (MedChemExpress, USA)
- RPMI-1640 růstové médium (VWR International, USA)
- Tanespimycin ([[(3S,5S, 6R,7S,8E,10R,11S,12E,14E) -21- (allylamino) -6-hydroxy - 5,11-dimethoxy-3,7, 9,15-tetramethyl-16,20,22-trioxo-17-azabicyclo[16.3.1]docosa-8,12,14,18,21-pentaen-10-yl]karbamát) (MedChemExpress, USA)
- Trypsin (Sigma-Aldrich, USA)

4.1.3 Přístroje

Analytické váhy	ABS 120-4N (KERN, Německo)
Analyzátor počtu buněk a viability	Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA)
Centrifuga	BOEco M-240 (BioTech, Německo)

Centrifuga	HERMLE Z 326 K (LaborTechnik, Německo)
Digitální váhy	DENVER MXX 612 (Merci, Česká republika)
Inkubátor buněčných kultur	CelCulture (ESCO, USA)
Kvadrupólový hmotnostní spektrometr	API 3200 (MDS SCIEX, Kanada)
Laminární box	MSC-Advantage (ThermoScientific, USA)
Magnetická míchačka	RCT basic IKAMAG (Vekron, Česká republika)
Minicentrifuga	myFuge™ (Benchmark Scientific, USA)
Minirotátor	Bio RS-24 (BioSan, Lotyšsko)
Průtokový cytometr	Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA)
Spektrofotometr	Epoch (BioTek, Nizozemsko)
Termoblok	Bio-TDB 100 (BioSan, Lotyšsko)
Vertikální elektroforetická komora	MiniProtean-3 cell (BioRad, USA)
Vortex	BioVortex V1 (BioSan, Lotyšsko)
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	Ultimate 3000 (Germering, Německo)
Wester blot systém	Trans-Blot® Turbo™ (BioRad, USA)
Zdroj napětí	PowePac HC (BioRad, USA)

4.2 Použité metody

4.2.1 Určení počtu živých a mrtvých buněk

K určení počtu živých a mrtvých buněk byl použit přístroj Vi-CELL™XR. Ten je schopen určit životaschopnost buněk, jejich počet, velikost a koncentraci. Využívá k tomu trypanovou modř, která pronikne pouze do mrtvých buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou, naopak do buněk živých se nedostane. Pro měření je potřeba 600 µl buněčné suspenze.

Použité roztoky a chemikálie:

- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA)

4.2.2 Stanovení buněčné proliferace a životaschopnosti

Pro stanovení buněčné proliferace a životaschopnosti byl použit standardní MTT test. Tento test je založen na použití tetrazoliového barviva 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT). Metabolicky aktivní buňky mohou pomocí svých produktů dehydrogenáz redukovat žluté tetrazoliové barvivo MTT na nerozpustný formazán fialové barvy. Formazán je z buněk extrahován pomocí extrakčního činidla (96% ethanol

okyselený HCl). Vzniklé množství formazánu je přímo úměrné počtu živých buněk. Nevýhodou MTT testu je, že nerozlišuje mezi buňkami mrtvými a těmi, které přestaly proliferovat.

Při práci s adherentní buněčnou linií A549 byl ponechán 1 ml růstového média v jamkové desce s narostlými buňkami. K buňkám bylo přidáno 100 μ l MTT a byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 45 minut. Poté bylo růstové médium odstraněno a centrifugováno (5 min, 3000 rpm, laboratorní teplota). K buňkám v jamkové desce bylo přidáno 500 μ l extrakčního činidla pro extrakci formazánu. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno extrakční činidlo z jamkové desky. Vše bylo protřepáno a opět vloženo do centrifugy (5 min, 14 000 rpm, laboratorní teplota). Do připravené 96 jamkové desky bylo vloženo 200 μ l blanku (extrakční činidlo) a stejné množství supernatantu. Vytvořený formazán byl detekován spektrofotometricky při 570 nm. Viabilita testovaných vzorků byla porovnávána se vzorkem kontrolním (100 %). Jako kontrolní vzorek byly použity buňky, které nebyly ovlivněny testovanou látkou.

Použité roztoky a chemikálie:

- Extrakční činidlo: 96 % (v/v) ethanol; 0,04 M HCl
- MTT roztok: 5mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid 96 % (v/v), (Sigma-Aldrich, USA)

4.2.3 Analýza buněčného cyklu

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje analyzovat vlastnosti jednotlivých buněk. Při analýze buněčného cyklu byla tato metoda využívána na odhad obsahu buněčné DNA. Odhad je umožněn fluorescenčním barvením (obvykle propidium jodid nebo DAPI), které se interkaluje do buněčné DNA a tvoří stechiometrické komplexy. Před replikací (v G1 fázi) mají buňky diploidní počet chromozomů (2n). Při replikaci (v S fázi) se počet chromozomů zdvojnásobí. G2 fáze pak obsahuje 4n chromozomů, stejně je tomu i na počátku mitózy (M fáze). Při barvení Vindelovým roztokem dochází ke štěpení DNA endonukleázami k extrakci DNA fragmentů.

Jeden mililitr buněčné suspenze byl centrifugován (5 min, 2 500 rpm, laboratorní teplota) a vzniklý supernatant byl odstraněn. Vytvořený pelet byl rozpuštěn v 400 μ l Vindelova roztoku a inkubován ve tmě po dobu 30 minut. Následně byl vzorek hodnocen průtokovou cytometrií při 488/608 nm. Výsledný histogram představuje podíl buněk v každé fázi buněčného cyklu.

Použité roztoky a chemikálie:

- Vindelův roztok: 0,1 % (v/v) Triton X-100, 200 µl/ml RNáza A; 20 µg/ml propidium jodid; 1x PBS

4.2.4 Stanovení počtu živých buněk pomocí TMRE

Fluorescenční barvivo TMRE (tetramethylrhodamin ethyl ester) se snadno dostává do buněk a barví aktivní mitochondrie na základě membránového potenciálu. Vyšší míra fluorescence je detekována u živých buněk s polarizovanými mitochondriemi. Naopak snížená fluorescence bude u buněk apoptotických a u buněk s nízkým membránovým potenciálem mitochondrií.

Od buněk v jamkové desce bylo odstraněno médium, buňky byly promyty v 1 ml 1xPBS a sklizeny pomocí 500 µl trypsinu. K buňkám bylo zpět přidáno médium a 1 ml suspenze s buňkami byl přenesen do cytometrické zkumavky. K 1 ml suspenze byl přidán 1 µl 500 µM TMRE a inkubace probíhala 15 minut při 37°C. Následně byl vzorek hodnocen průtokovou cytometrií při 488/575 nm.

4.2.5 Extrakce glutathionu

Extrakci glutathionu z adherentní buněčné linie je důležité provádět při konfluenci 70-80 %. Při vyšší konfluenci buňky zpomalují svůj metabolismus, což by mohlo zkreslovat výsledky.

Petriho misky s narostlými buňkami byly umístěny na led. Bylo odstraněno růstové médium a miska byla 2x promyta studeným 1x PBS (skladováno při teplotě 4 °C). K buňkám byl přidán 1 ml 5 % formiátu a byly tak ponechány na ledu po dobu 20 minut. Poté byly všechny buňky sklizeny škrabkou a centrifugovány (5 min, 15 000 rpm, 4 °C). Přechištěný supernatant byl skladován při -20 °C. Následné kvantitativní stanovení redukovaného a oxidovaného glutathionu za použití HPLC-MS/MS bylo prováděno na Ústavu biologie Univerzity Palackého v Olomouci RNDr. Petrem Doleželem.

Použité roztoky a chemikálie:

- Extrakční činidlo: 5 % formiát v dH₂O

4.2.6 Stanovení redukovaného a oxidovaného glutathionu

Kvantitativní stanovení redukovaného (GSH) a oxidovaného (GSSG) glutathionu bylo provedeno pomocí analytického systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie

s hmotnostní detekcí. Analyty byly separovány na chromatografické koloně a následně detekovány vysoce selektivním hmotnostním detektorem na principu rozdílných molekulových hmotností, pro GSH = 307,1 g/mol a GSSG = 612,1 g/mol . Koncentrace byly počítány na základě lineární závislosti kalibrační křivky vyjádřené poměrem velikosti signálu detektoru vzhledem ke koncentraci analytu.

4.2.7 Buněčná extrakce proteinů

Z Petriho misek s narostlými adherentními buňkami bylo odstraněno růstové médium. K buňkám bylo přidáno 2 ml 1xPBS a buňky byly sklizeny škrabkou. Růstové médium s rozsuspendovanými buňkami v 1xPBS bylo centrifugováno (5 minut, 1500 rpm, 4 °C). Po centrifugaci již bylo pracováno s buňkami na ledu. Po odstranění supernatantu byly ke vzniklému peletu přidány 4 ml studeného 1x PBS (skladováno při 4 °C). Buňky v něm byly rozsuspendovány a znovu centrifugovány (5 minut, 1 500 rpm, 4 °C). V dalším kroku byl opět odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru RIPA, který obsahoval také inhibitory fosfatáz a proteáz. Takto připravený vzorek byl inkubován po dobu 30 minut na ledu, během inkubace byl promíchán. Extrakt byl v konečném kroku přečištěn centrifugací (10 min, 16 000 rpm, 4 °C). Přečištěný extrakt byl skladován při -20 °C.

Použité roztoky a chemikálie:

- RIPA pufr: 150 mM NaCl; 1 % NP-40 pufr; 50 mM TRIS; 50 mM NaF; 5mM EDTA; 5mM dekahydrátpyrofosfátu sodného (NAPP); dH₂O; pH 8 + inhibitory fosfatáz a proteáz (Roche), které byly přidány k RIPA pufru těsně před jeho přidáním do vzorku

4.2.8 Stanovení celkové koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Principem metody Bradfordové je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) na molekulu proteinu. Do 1 ml roztoku Bradfordové byl přidán 1 µl přečištěného buněčného lyzátu. Poté byl vzorek promíchán a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Dojde ke změně barvy z hnědé do modré, a to po navázání proteinu na CBB. Následně bylo nanášeno 200 µl vzorku do 96 jamkové desky spolu s 200 µl činidla Bradfordové jako blank. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 595 nm.

Použité roztoky a chemikálie:

- Bradfordovo činidlo: 50 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml methanolu; 100 ml 85 % H₃PO₄; 850 ml dH₂O
- Fetální bovinní sérum bylo použito jako interní standard pro kalibraci

4.2.9 Separace proteinů, Western blot a vizualizace

Buněčné lyzáty byly naředěny vodou do výsledné koncentrace a byl přidán 4x koncentrovaný vzorkový pufr (Laemmliho). Takto připravené vzorky byly denaturovány 5 minut při teplotě 95 °C, následně protřepány a krátce stočeny na stolní centrifuze.

Samotná separace elektroforézou SDS-PAGE probíhala v 5 % SDS – polyakrylamidovém zaostřovacím gelu a 10 % SDS-polyakrylamidovém gelu separačním. Jejich tloušťka byla 1 mm. Do jedné jamky bylo nanášeno 35 µg proteinů. Elektroforéza probíhala vždy 30 minut při 80 V a následně vždy 66 minut při 120 V.

Separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulózu membránu pomocí metody semi-dry Western blot. Na kazetu přístroje byl umístěn blotovací papír, na něj membrána, která byla předem namočená do blotovacího pufru, stejně jako blotovací papír. Následně byl na membránu umístěn gel se separovanými proteiny. Poté byl na gel umístěn znovu blotovací papír a z takto připraveného vzorku byl válečkem vytlačen zbytek blotovacího pufru. Kazeta byla uzamčena a vložena do přístroje. Na semi-dry blotu byl nastaven program buď pro proteiny s vysokou nebo smíšenou molekulovou hmotností.

Následně byla membrána promývána v 5 % blokovacím mléce na třepačce. Poté byla nanášena primární monoklonální protilátka, která byla naředěna v blokovacím mléce v následujících poměrech:

- ABCB1 (P7965-2ML), myši: ředění 1:1000 (Sigma-Aldrich)
- ABCC1 (D708N), králíci: ředění 1:1000 (Cell Signaling Technology)
- ABCG2 (D5V2K), králíci: ředění 1:1000 (Cell Signaling Technology)
- HSP90, králíci: ředění 1:1000 (Cell Signaling Technology)
- HSP70, králíci: ředění 1:1000 (Cell Signaling Technology)
- HSP27 (D6W5V) králíci: ředění 1:1000 (Cell Signaling Technology)
- GADPH (D16H11) XP(R), králíci: ředění 1:2000 (Cell Signaling Technology)

Membrány s primární protilátkou byly inkubovány přes noc při 4°C. Následující den byla membrána na třepačce promyta 3x 10 min v roztoku 1x PBS + 0,1 % Tween 20. Poté byla naředěna sekundární protilátka v blokovacím mléce v poměru 1:5000 (králíci),

1:10 000 (myší) a nanese na membrány. Takto byla sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou inkubována 1 hod při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly membrány opět promyty 3x 10 min v 1x PBS + 0,1 % Tween 20.

Chemiluminiscenční detekce proteinů byla prováděna ve fotokomoře. Na nitrocelulózovou membránu, na které byly přeneseny proteiny, byl nanesen ECL (Enhanced chemiluminescence) kit. Ten obsahuje substrát pro křenovou peroxidázu, který se váže na sekundární protilátku. Membrána byla takto inkubována po dobu 5 minut. Následně byl na membránu umístěn fotografický film, který je citlivý na světlo a uzavřen ve vyvolávací komůrce. Ihned po expozici byl film vyjmut z komůrky, vložen do vývojky, poté do ustalovače, a nakonec omyt vodou. Takto vyvolaný film byl naskenován a byla odečtena relativní optická hustota jednotlivých bandů, která byla vyhodnocena pomocí programu Image J.

Použité roztoky a chemikálie:

- 10 % APS: 1 g persíranu amonného bylo rozpuštěno v 10 ml dH₂O
- 10 x Running pufr: 30 g TRIS; 145 g glycinu doplněno do 1 l dH₂O
- 1x PBS + 0,1 % Tween 20 (1 l): 100 ml 10x PBS; 1 ml Tween 20; 900 ml dH₂O
- 4x koncentrovaný vzorkový pufr (Laemmliho pufr): 8 % SDS; 0,250 mol/l TRIS (pH 6,8); 0,2 % bromfenolová modř, 40 % glycerol; 0,75 mol/l dithiotreitol (DTT); 8 % β-merkptoethanol
- 5 % blokovací mléko: 5 g sušeného odtučněného mléka bylo rozpuštěno v 100 ml 1x PBS + 0,1 % Tween 20
- Akrylamid (Biomedicals, USA)
- Blotovací pufr: 100 ml Running pufru; 200 ml methanolu; 700 ml dH₂O
- ECL (Enhanced chemiluminescence) kit: (GE HealthCare, UK)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Fluka, Švýcarsko)
- Peroxidázou (HRP) značená prasečí sekundární polyklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům (Dako, Německo)
- Peroxidázou značená králičí polyklonální sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům (Invitrogen, USA)
- Standard molekulových hmotností: Spectra Multicolor (Thermo Scientific, USA)
- TANK pufr: 100 ml Running pufru; 10 ml 10 % SDS; 900 ml dH₂O
- Ustalovač: G150 (AGFA, Belgie)
- Vývojka: G354 (AGFA, Belgie)

5 VÝSLEDKY

5.1 Charakterizace buněčné linie A549

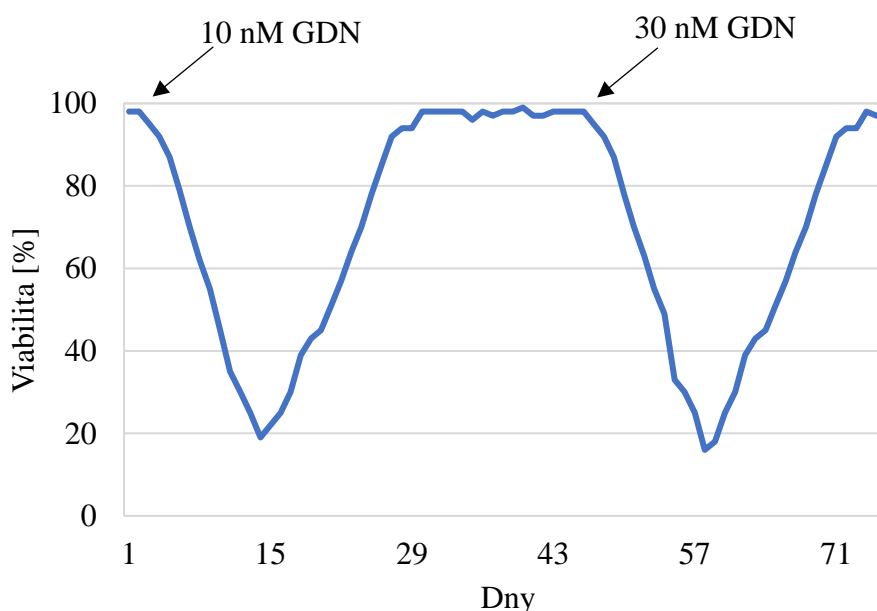
Prvním cílem mé diplomové práce bylo získat rezistentní linii nádorových buněk k inhibitorům HSP90. Byla získána rezistentní linie buněk A549 vůči geldanamycinu, což je specifický inhibitor HSP90. Buňky linie A549 byly dlouhodobě inkubovány s postupně se zvyšujícími koncentracemi geldanamycinu. Nejprve byla stanovena poloviční inhibiční koncentrace buněk A549 pomocí MTT testu. Hodnota IC_{50} těchto buněk byla $16,1 \pm 7,4$ nM (Tab.1). Poté jsme citlivé parentální buňky A549 ošetřili 10 nM geldanamycinem. Tato koncentrace byla zvolena, protože se blíží poloviční inhibiční koncentraci citlivých buněk A549. Proliferace takto ošetřených buněk stagnovala po dobu dvou týdnů a část populace buněk zemřela (Obr. 6). Proliferace se opět plně obnovila po jednom měsíci. Protože MTT test není schopen rozlišit mezi živými buňkami, které přestaly proliferovat a mrtvými buňkami, byla jejich životaschopnost měřena barvením TMRE a průtokovou cytometrií. U buněk s 10 nM, 30 nM a ani s 60 nM koncentrací geldanamycinu jsme nezaznamenali zvýšení rezistence buněk, proto jsme koncentraci GDN zvýšili až na 120 nM. Buňky ošetřené 120 nM koncentrací GDN již vykazovaly významné zvýšení rezistence oproti původní citlivé parentální buněčné linii A549 (Obr. 7). Protože prodloužená kultivace s geldanamycinem zvýšila hodnotu IC_{50} a rezistenci těchto buněk, byly považovány za rezistentní, označeny jako A549 120GDN a použity pro další analýzy. Poté, co buňky A549 120GDN dál stabilně rostly po dobu 14 dnů, byly ošetřeny 250 nM geldanamycinem. Znovu se opakoval trend zpomalení proliferace a následně její opětovné stabilizace po jednom měsíci (Obr. 6). Došlo ke zvýšení hodnoty IC_{50} a rezistence, tyto buňky byly označeny jako rezistentní A549 250GDN. Stejným způsobem byly selektovány buňky A549 500GDN. Po přidání 1000nM koncentrace geldanamycinu buňkám A549 500GDN došlo opět po jednom měsíci k plnému obnovení proliferace, ale následně po dalších 14 dnech tyto buňky spontánně umíraly. I přes to byly další analýzy mechanismů rezistence prováděny na liniích A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN a A549 1000 GDN. IC_{50} byla hodnocena s rostoucí koncentrací geldanamycinu, konkrétně 1000 nM, 2000 nM, 3000 nM, 4000 nM a to po 72 hodinách.

Stejným způsobem jsme se pokoušeli selektovat také rezistentní linii buněk A549 vůči tanespimycinu. Nejprve byla stanovena poloviční inhibiční koncentrace citlivých parentálních buněk A549 pomocí MTT testu. Poté jsme vystavily buňky A549 10 nM koncentraci tanespimycinu, což jsou koncentrace, které se blíží poloviční inhibiční

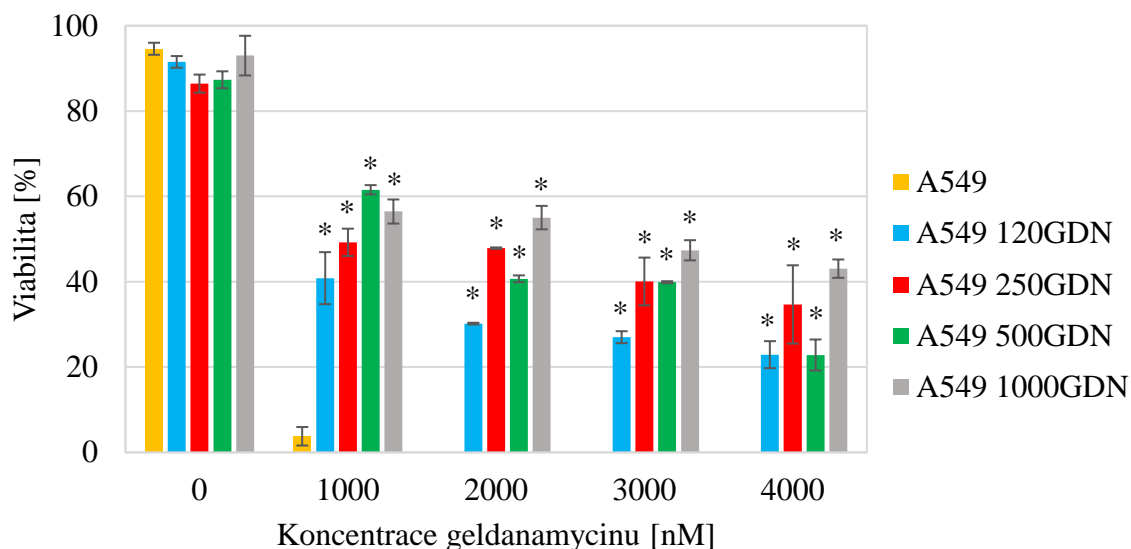
koncentraci citlivých buněk A549. Proliferace takto ošetřených buněk stagnovala po dobu dvou týdnů a část populace buněk zemřela. Proliferace se opět plně obnovila po jednom měsíci. U buněk A549 s 10 nM, 20 nM a ani s 40 nM koncentrací tanesprimycinu jsme nezaznamenali zvýšení rezistence, proto jsme jeho koncentraci zvýšili až na 80 nM. Tato koncentrace však byla pro buňky opakovaně letální. Pokus o selekci rezistentní linie A549 vůči tanesprimycinu byl označen jako neúspěšný.

Tab. 1: Citlivost buněk na geldanamycin. Data představují průměrnou hodnotu \pm SD získanou ve dvou nezávislých experimentech. Hodnota IC_{50} byla stanovena pomocí MTT testu. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA).

Buněčná linie	IC_{50} (nmol·l ⁻¹)
A549	16,1 \pm 7,4
A549 120GDN	422,7 \pm 28,5
A549 250GDN	492,6 \pm 27,5
A549 500GDN	793,7 \pm 96,5
A549 1000GDN	2640,9 \pm 179,5



Obr. 6: Typický graf změny proliferace po ošetření citlivých buněk A549 10 nM a 30 nM geldanamycinem. Došlo ke stagnaci buněčné proliferace v prvních 14 dnech. Po měsíci byla proliferace plně obnovena. Tento trend se opakoval u všech selektovaných rezistentních linií.

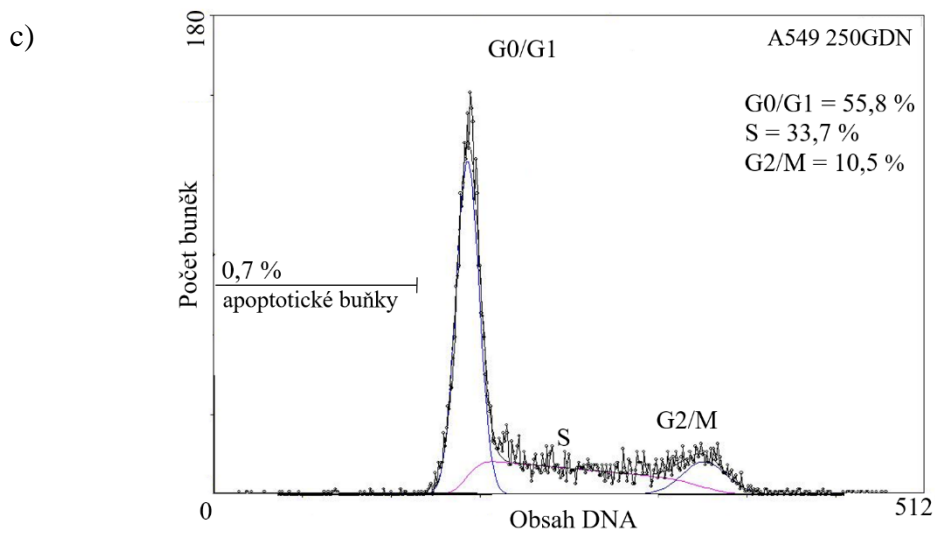
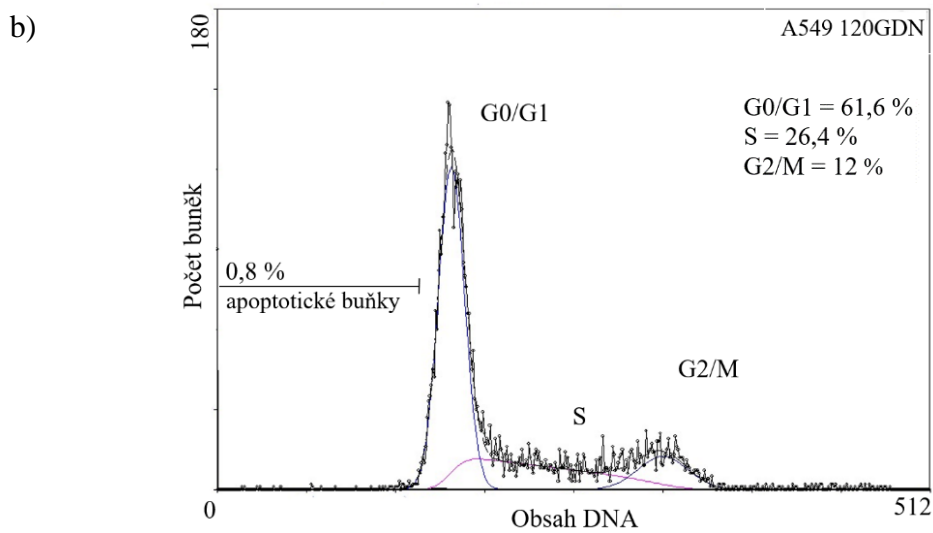
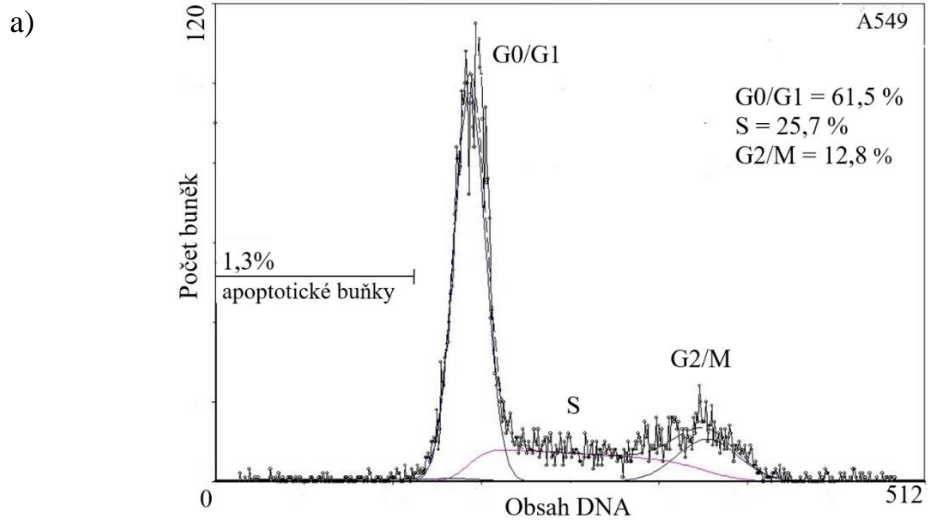


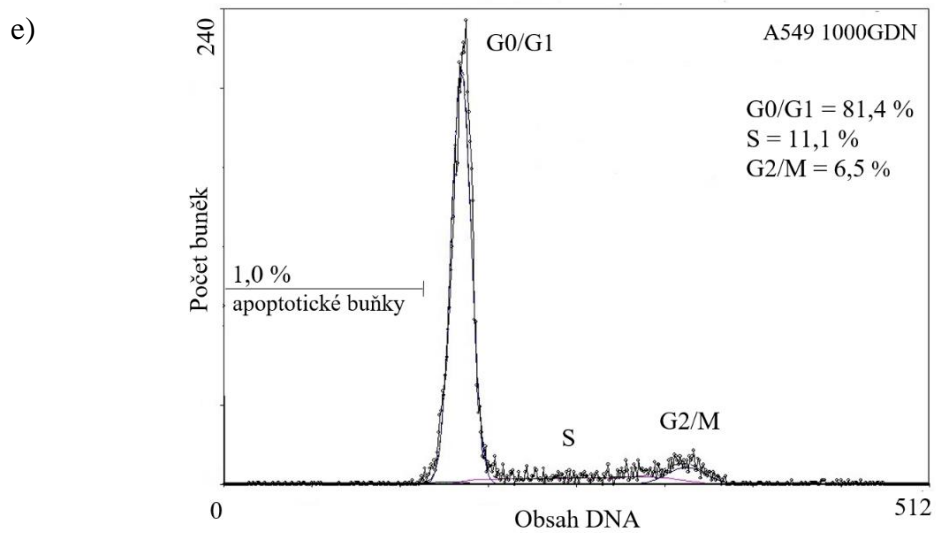
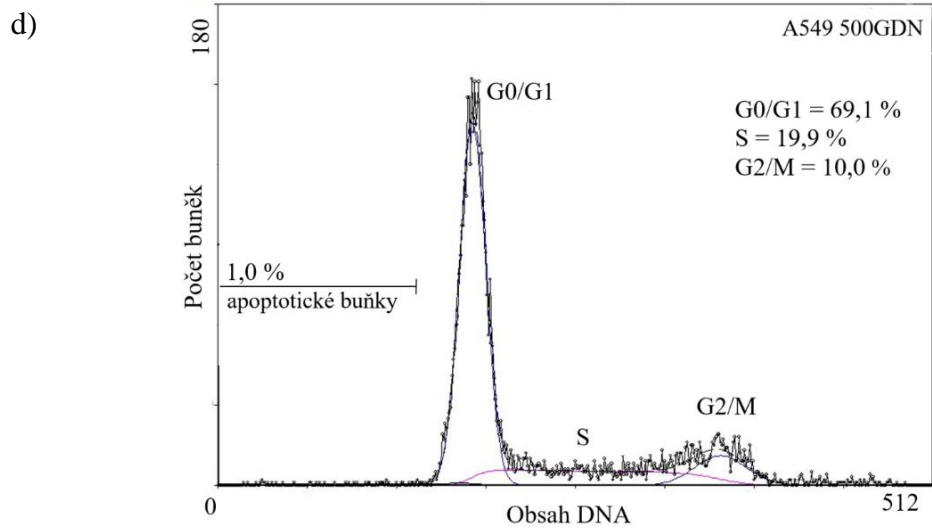
Obr. 7: Účinek geldanamycinu na životaschopnost buněk A549, A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN a A549 1000GDN. Buňky byly inkubovány s geldanamycinem po dobu 72 hodin. Životaschopnost buněk byla stanovena barvením buněk pomocí TMRE a analyzována průtokovou cytometrií. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA). Statistická významnost byla stanovena Studentovým t-testem. Byla použita * pro významný rozdíl v životaschopnosti buněk A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN a A549 1000GDN po ošetření geldanamycinem, v porovnání s parentální linií A549 ($p < 0,05$).

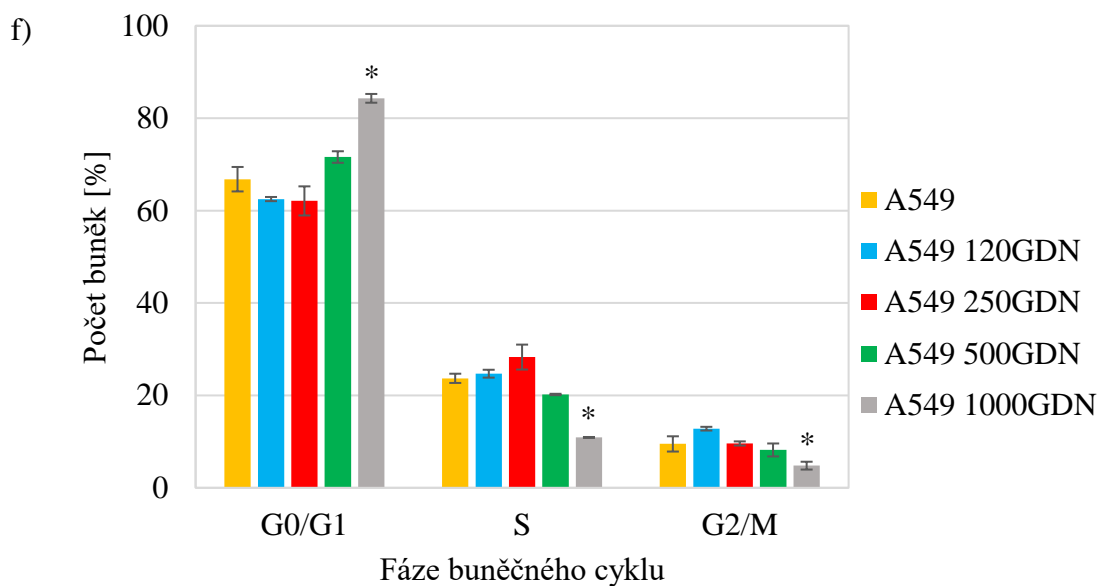
5.1.1 Analýza buněčného cyklu

K prokázání vlivu geldanamycinu na buněčných cyklus parentální citlivých buněk A549 a rezistentních linií A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN, A549 1000GDN byly buňky barveny Vindelovým roztokem a analyzovány na průtokovém cytometru. Pomocí těchto výsledků jsme provedli analýzu buněčných cyklů, abychom získali distribuci živých buněk v každé fázi buněčného cyklu

Došlo ke snížení populace buněk v G2/M a S fázi a zvýšení počtu buněk v G0/G1 fázi u buněk A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN ve srovnání s citlivými buňkami A549 (Obr. 8). Signifikantní rozdíl vůči kontrole byl pozorován u buněk nejvíce rezistentních, tedy A549 1000GDN.







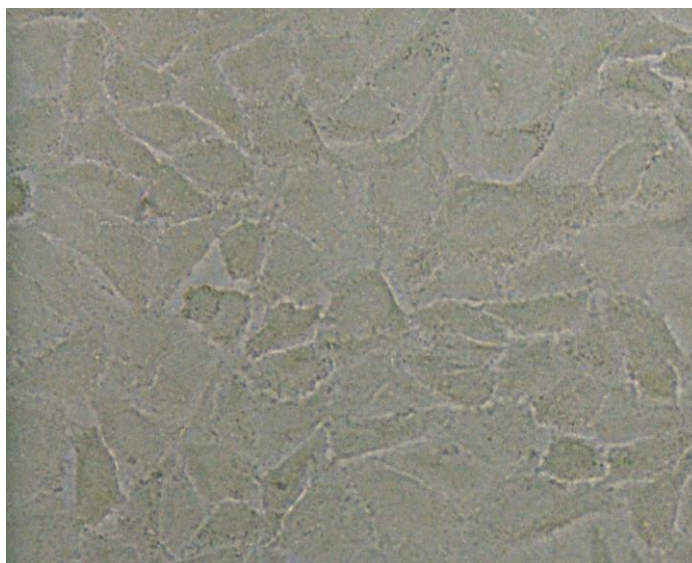
Obr. 8: Analýza buněčného cyklu buněk A549. Typické histogramy a) citlivých buněk A549, b) buněk A549 120GDN, c) buněk A549 250GDN, d) buněk A549 500GDN, e) buněk A549 1000GDN, f) kvantitativní analýzy živých buněk ve fázích buněčného cyklu. Buňky byly barveny Vindelovým roztokem a analyzovány průtokovou cytometrií. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA). Statistická významnost byla stanovena Studentovým t-testem. Byla použita * pro významný rozdíl v distribuci živých buněk A549 1000GDN ve fázích buněčného cyklu, v porovnání s parentální linií A549 ($p < 0,05$).

5.1.2 Vliv geldanamycinu na morfologii buněk

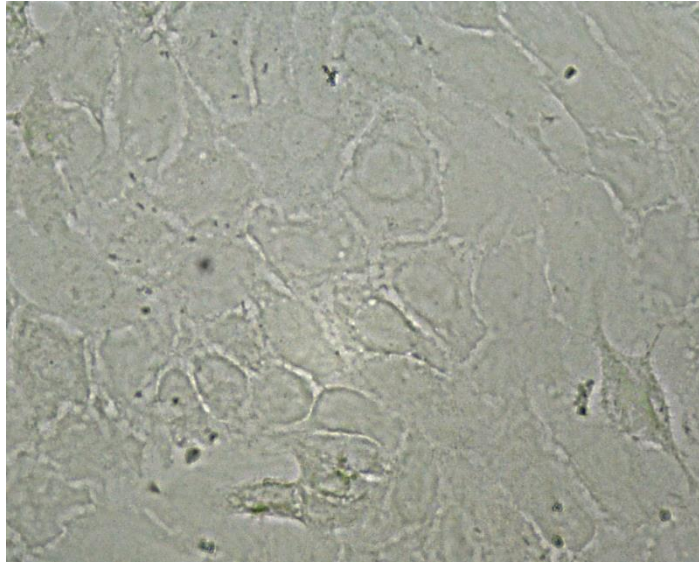
Byl analyzován vliv geldanamycinu na morfologii buněk A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN i A549 1000GDN ve srovnání s citlivými buňkami A549 pod světelným mikroskopem.

Zejména u nejvíce rezistentních buněk A549 1000GDN došlo k zvětšení a zploštění buněk (Obr. 9e).

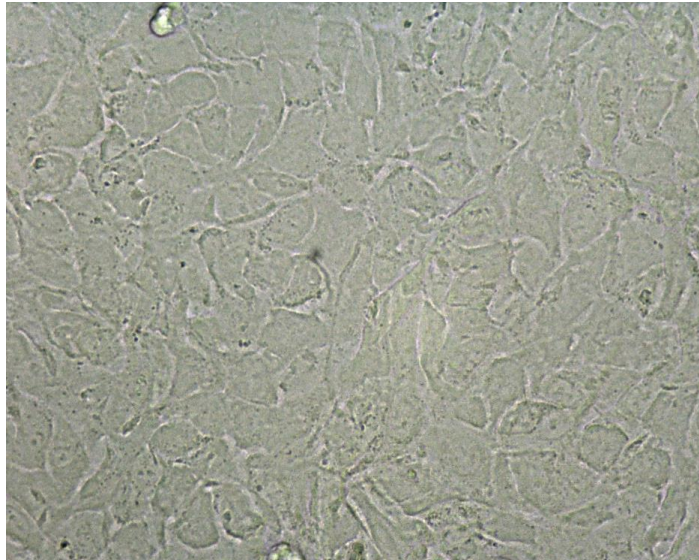
a)



b)



c)



d)



e)



Obr. 9: Vliv geldanamycinu na morfologii buněk A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN ve srovnání s citlivými buňkami A549. Fotografie a) buněk A549. b) buněk A549 120GDN. c) buněk A549 250GDN. d) buněk A549 500GDN. e) buněk A549 1000GDN. Morfologie buněk byla hodnocena ve světelném mikroskopu s kamerou ve zvětšení 400x.

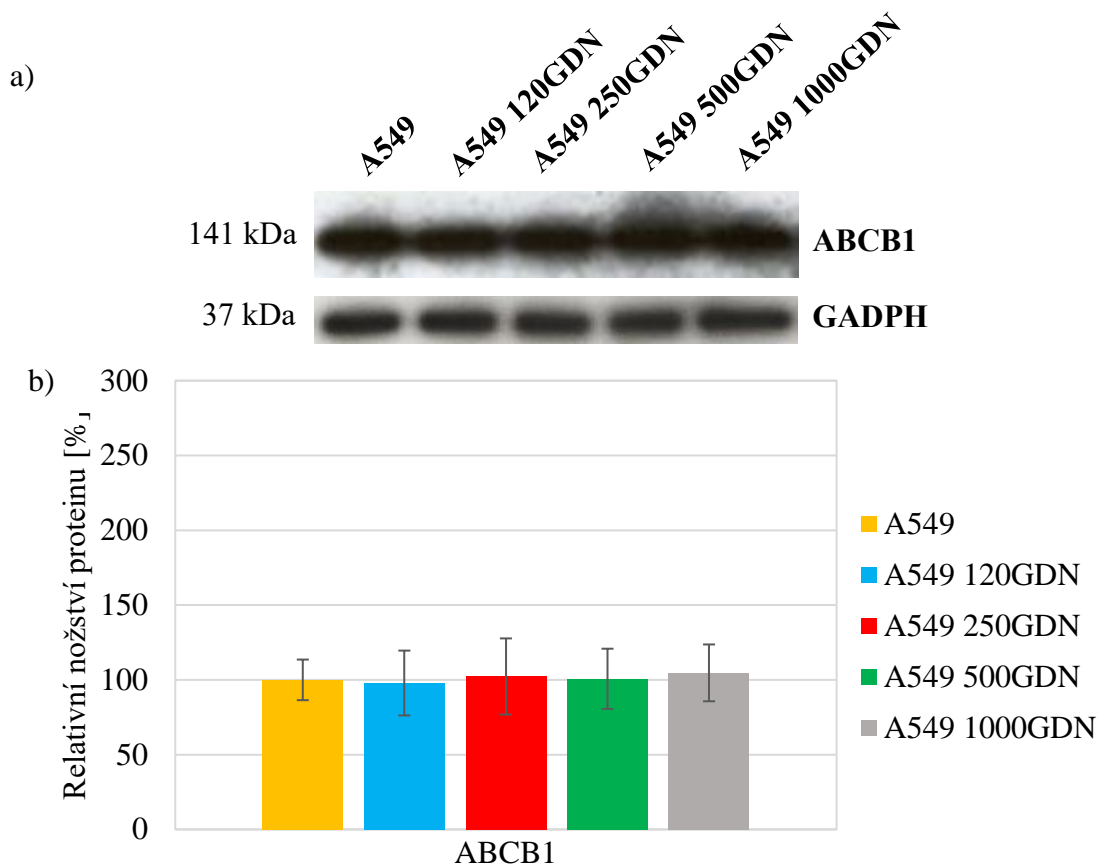
5.2 Mechanismy rezistence

Dalším cílem mé diplomové práce bylo pokusit se identifikovat mechanismy rezistence k inhibitorům HSP90 u nádorových buněk. Konkrétně jsem se věnovala mechanismům zvýšené exprese ABC transportérů a změněné expresi proteinů tepelného šoku. Exprese proteinů byla analyzována metodou Western blot.

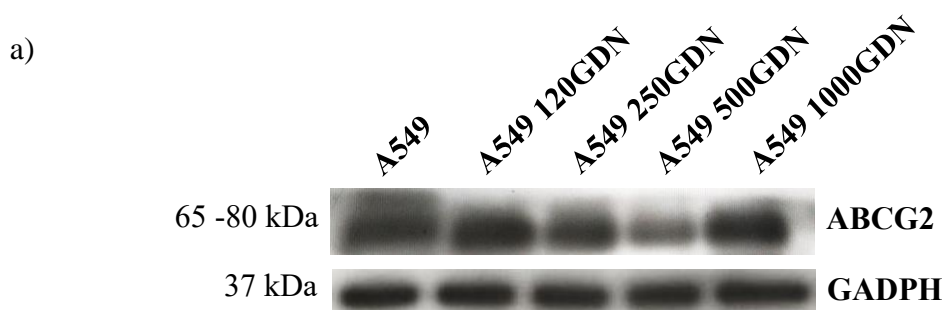
5.2.1 Exprese ABC transportérů

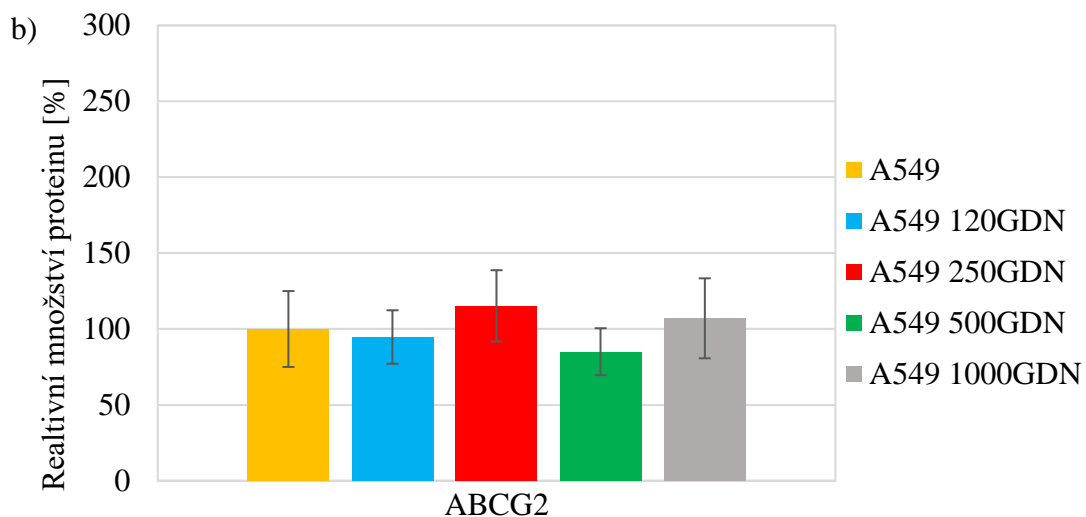
Byly studovány tři transportéry z rodiny ABC, které jsou dle literatury spojeny s mnohočetnou lékovou rezistencí: ABCB1, ABCG2 a ABCC1 (Sharom, 2008). McCollum a kol. (2008) z části připisovali rezistenci buněk A549 vůči geldanamycinu zvýšené expresi ABCB1. U proteinu ABCG2 nezaznamenali změnu exprese a protein ABCC1 zde studován nebyl. My jsme ABCC1 studovali z důvodu jeho zvýšené neindukované exprese u buněk A549 (dle NCI-60).

U prvních dvou zmiňovaných transportérů – ABCB1 a ABCG2 nebyla zaznamenána žádná změna v expresi u buněk A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN, A549 1000GDN ve srovnání s A549 (Obr. 10, Obr. 11). Byla pozorována zvýšená exprese ABCC1 transportéru u buněk A549 120GDN, A549 250GDN, ale u linií A549 500GDN, A549 1000GDN se v porovnání s A549 250GDN exprese opět snižovala (Obr. 12).

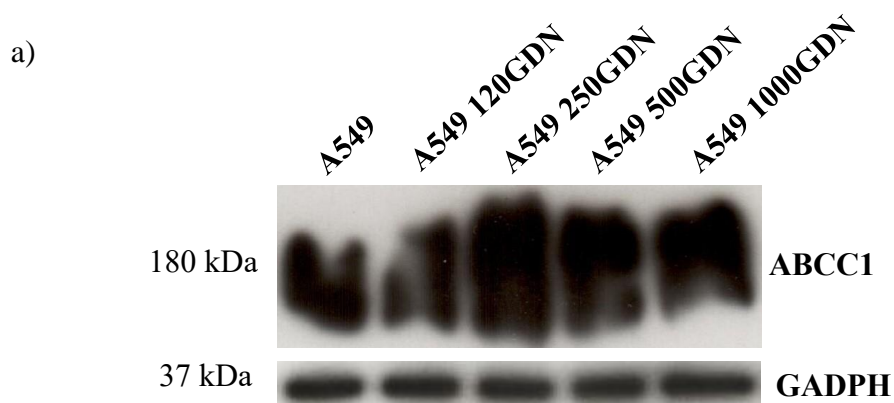


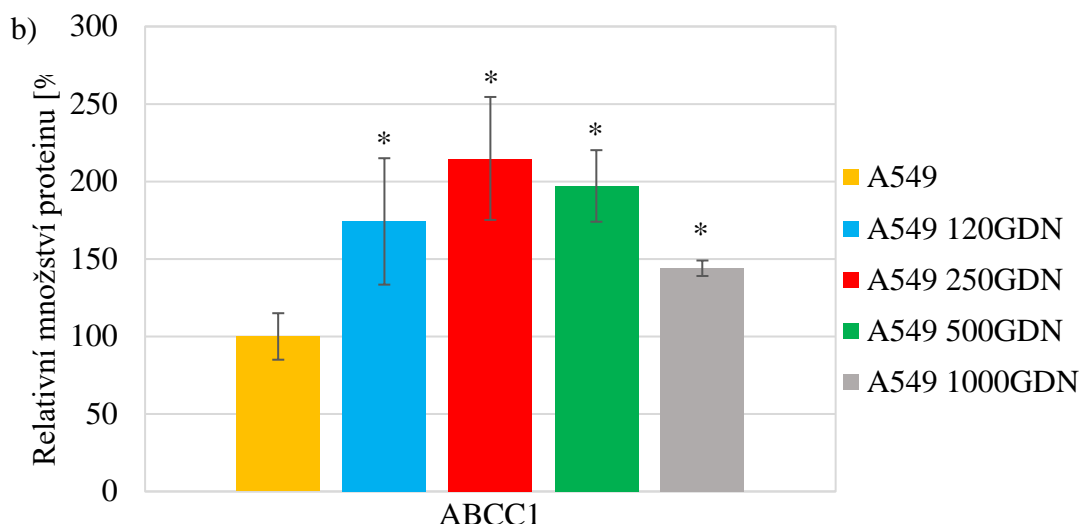
Obr. 10: Účinek geldanamycinu na expresi ABCB1 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN. a) Typické obrázky Western blotu. GADPH byl použit jako kontrola nanášení proteinu. b) Kvantitativní denzitometrické hodnocení exprese ABCB1. Jako kontrolní hodnota bylo použito 100 % v citlivých buňkách A549. Vyhodnocení bylo provedeno v programu ImageJ. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA).





Obr. 11: Účinek geldanamycinu na expresi ABCG2 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN. a) Typické obrázky Western blotu. GADPH byl použit jako kontrola nanášení proteinu. b) Kvantitativní denzitometrické hodnocení exprese ABCG2. Jako kontrolní hodnota bylo použito 100 % v citlivých buňkách A549. Vyhodnocení bylo provedeno v programu ImageJ. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software, USA).



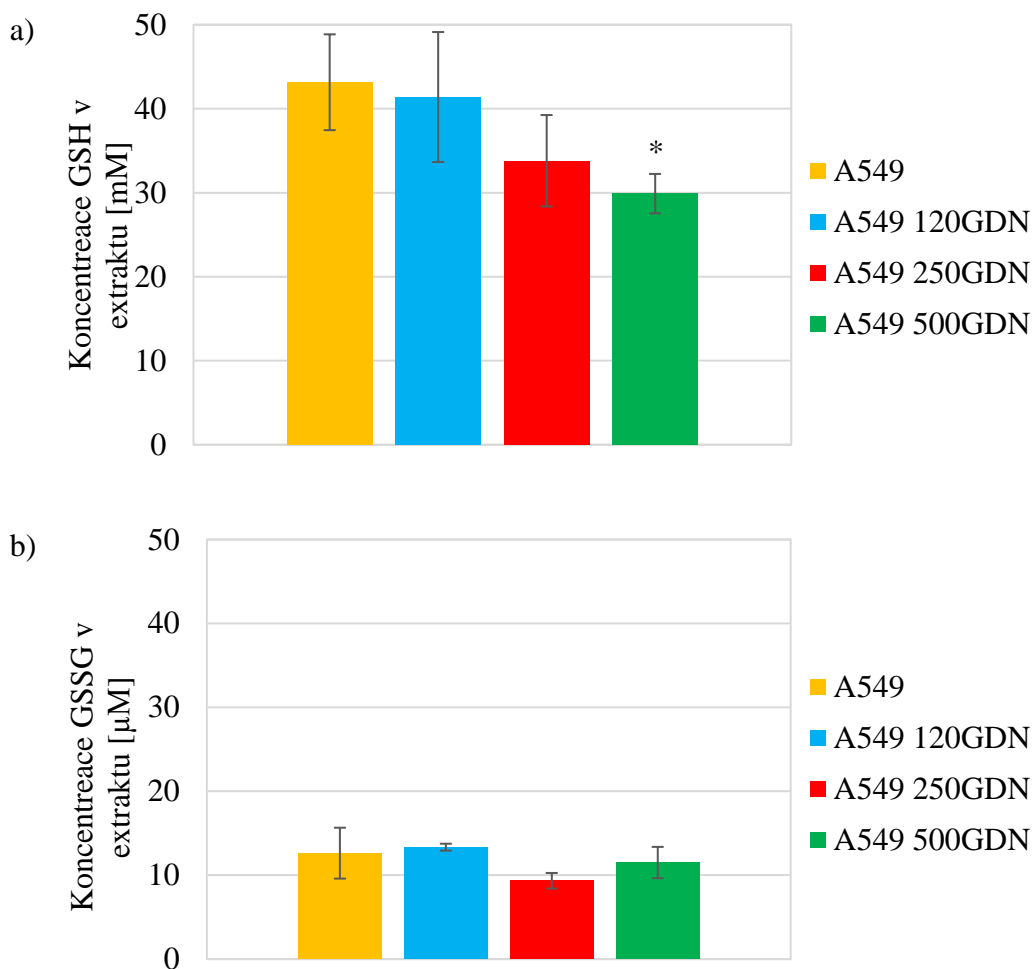


Obr. 12: Účinek geldanamycinu na expresi ABCC1 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN. a) Typické obrázky Western blotu. GAPDH byl použit jako kontrola nanášení proteinu. b) Kvantitativní denzitometrické hodnocení exprese ABCC1. Jako kontrolní hodnota bylo použito 100 % v citlivých buňkách A549. Vyhodnocení bylo provedeno v programu ImageJ. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA). Statistická významnost byla stanovena Studentovým t-testem. Byla použita * pro významný rozdíl v expresi ABCC1 u buněk A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN, v porovnání s A549 ($p < 0,05$).

5.2.2 Vliv geldanamycinu na intracelulární koncentraci redukováného a oxidovaného glutathionu

Dále jsme studovali intracelulární koncentraci redukováného (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSG). Ověřovali jsem, zda zvýšená exprese ABCC1 vede ke změně produkce redukováného glutathionu. A také, zda dochází ke změně intracelulární koncentrace glutathionu oxidovaného. Z buněčné linie A549 a rezistentních sublinií A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN byl glutathion extrahován ze stejného počtu buněk (700 000), které byly inkubovány v růstovém médiu při teplotě 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí HPLC-MS/MS na Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Bylo zjištěno, že u buněk A549 500GDN dochází k signifikantnímu poklesu intracelulární koncentrace GSH oproti buňkám A549 (Obr. 13a). U oxidovaného glutathionu nebyla zaznamenána změna jeho intracelulární koncentrace (Obr. 13b).



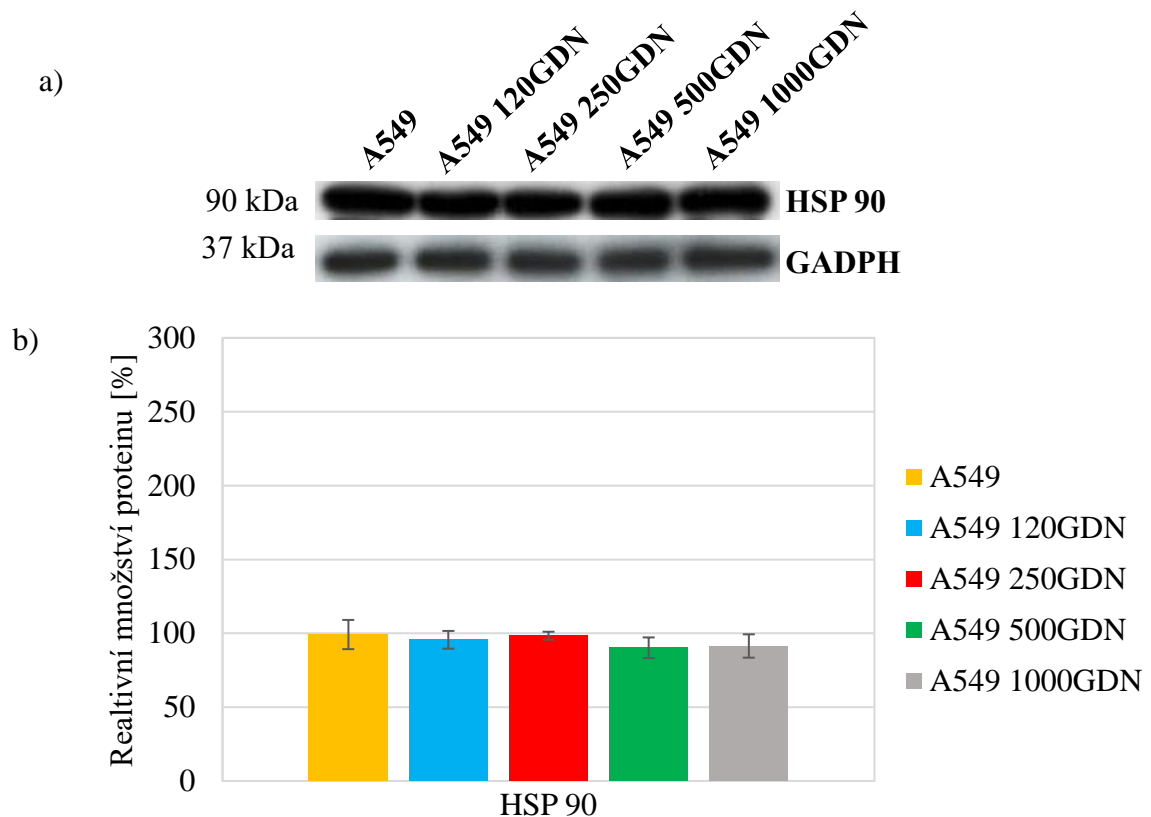
Obr. 13: Vliv geldanamycinu na intracelulární koncentraci redukovaného (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSG) u buněk A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN. a) Vliv geldanamycinu na intracelulární koncentraci GSH. b) Vliv geldanamycinu na intracelulární obsah GSSG. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA). Statistická významnost byla stanovena Studentovým t-testem. Byla použita * pro významný rozdíl v intracelulární koncentraci GSH u buněk A549 500GDN, v porovnání s parentální linií A549 ($p < 0,05$).

5.2.3 Expresse proteinů tepelného šoku

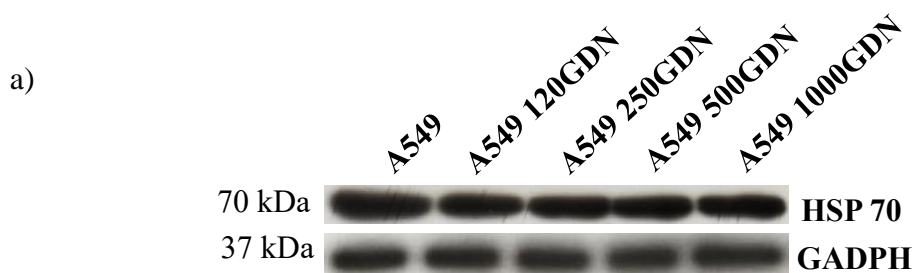
V literatuře byla rezistence buněk vůči geldanamycinu u buněk A549 z části připsána změněné expresi HSP27 spojené se zvýšenou produkcí glutathionu. Expresse HSP90 a HSP70 změněna nebyla (McCollum a kol., 2008). Proto byla dalším studovaným mechanismem rezistence vůči geldanamycinu změněná expresse proteinů tepelného šoku (HSP). A věnovali jsme pozornost zejména proteinům HSP90, HSP70 a HSP27. Expresse těchto proteinů byla studována metodou Western blot.

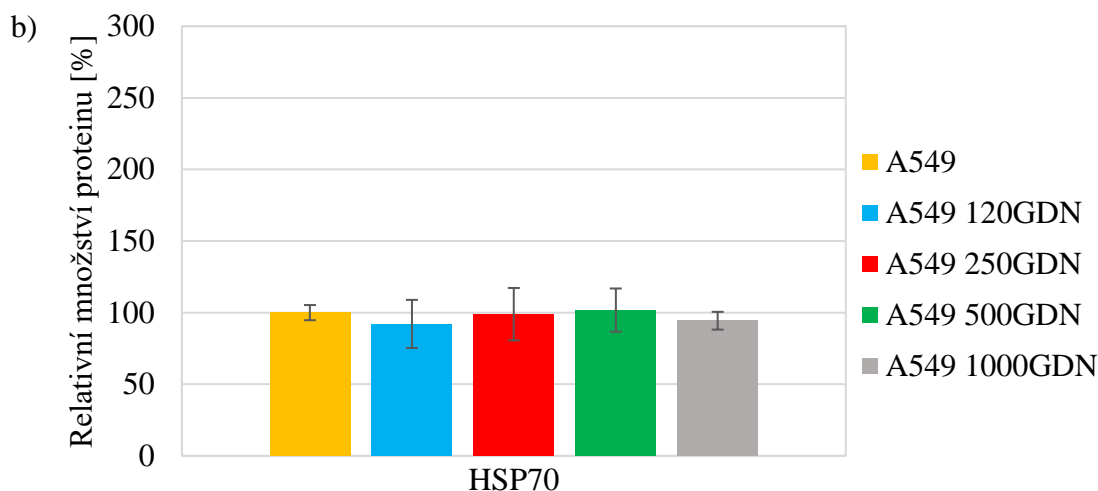
U buněk A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN, A549 1000GDN nedošlo ke změně expresse ani u jednoho ze studovaných proteinů tepelného šoku (HSP90,

HSP70, HSP27) (Obr. 14, Obr. 15, Obr. 16). Nalezená rezistence vůči geldanamycinu nesouvisí se změnou expresí proteinů tepelného šoku.

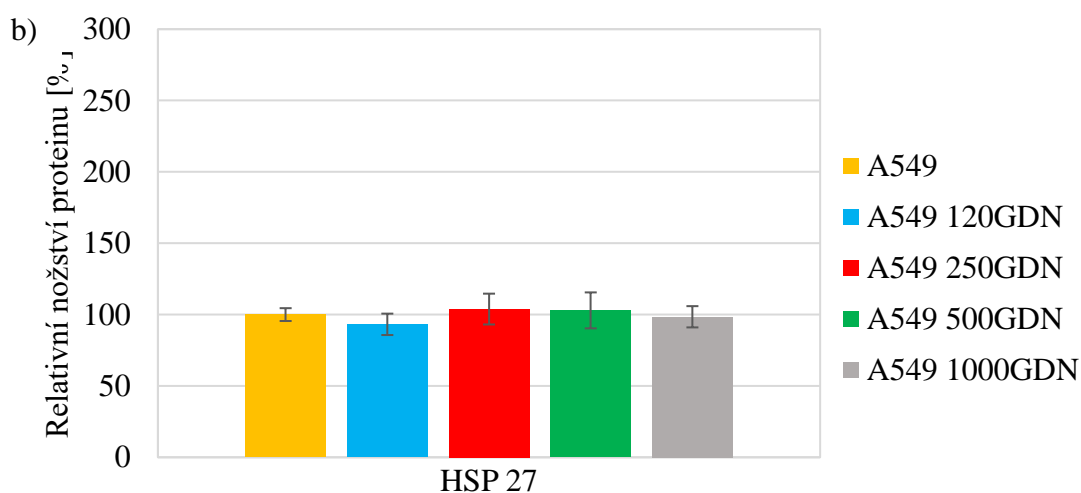
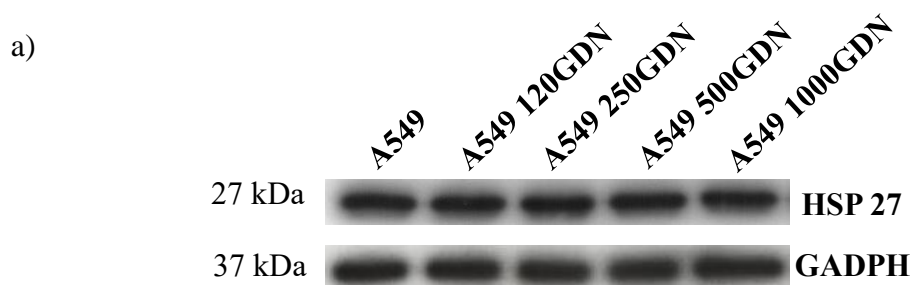


Obr. 14: Účinek geldanamycinu na expresi HSP90 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN. a) Typické obrázky Western blotu. GADPH byl použit jako kontrola nanášení proteinu. b) Kvantitativní denzitometrické hodnocení exprese HSP90. Jako kontrolní hodnota bylo použito 100 % v citlivých buňkách A549. Vyhodnocení bylo provedeno v programu ImageJ. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA).





Obr. 15: Účinek geldanamycinu na expresi HSP70 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN. a) Typické obrázky Western blotu. GADPH byl použit jako kontrola nanášení proteinu. b) Kvantitativní denzitometrické hodnocení exprese HSP70. Jako kontrolní hodnota bylo použito 100 % v citlivých buňkách A549. Vyhodnocení bylo provedeno v programu ImageJ. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA).



Obr. 16: Účinek geldanamycinu na expresi HSP27 v buňkách A549, A549 120GDN, A549 250 GDN, A549 500GDN i A549 1000 GDN. a) Typické obrázky Western blotu. GADPH byl použit jako kontrola nanášení proteinu. b) Kvantitativní denzitometrické hodnocení exprese HSP27. Jako kontrolní hodnota bylo použito 100 % v citlivých buňkách A549. Vyhodnocení bylo provedeno v programu ImageJ. Data představují průměrné hodnoty \pm SD získané ve třech nezávislých experimentech. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA).

5.3 Charakterizace buněčné linie K562

Za cílem získat rezistentní linii nádorových buněk vůči inhibitorům HSP90 byla testována také buněčná linie K562 s geldanamycinem (GDN) a jeho derivátem tanespimycinem (17-AAG). Citlivá parentální linie K562 byla inkubována s postupně se zvyšující koncentrací geldanamycinu nebo tanespimycinu. Nejprve byla stanovena poloviční inhibiční koncentrace buněk K562 pomocí MTT testu pro obě zmíněná léčiva. Poté jsme vystavili buňky K562 10 nM geldanamycinu a 10 nM tanespimycinu, což jsou koncentrace, které se blíží poloviční inhibiční koncentraci citlivých buněk K562. Proliferace takto ošetřených buněk stagnovala po dobu dvou týdnů a část populace buněk zemřela. Jejich proliferace se plně obnovila po jednom měsíci. U buněk K562 s 10 nM, 20 nM, 40 nM a ani s 80 nM koncentrací geldanamycinu jsme nezaznamenali zvýšení rezistence, proto jsem koncentraci GDN zvýšili až na 160 nM. Tato koncentrace však byla pro buňky letální. Stejný postup jsme opakovali pro tanespimycin. U buněk K562 s 10 nM, 20 nM, 40 nM a ani s 80 nM koncentrací tanespimycinu jsme nezaznamenali zvýšení rezistence, proto jsem koncentraci 17-AAG zvýšili až na 160 nM. Proliferace takto ošetřených buněk nebyla obnovena a 160 nM koncentrace 17-AAG byla pro tyto buňky letální.

6 Diskuse

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma mnohočetné lékové rezistence. Byly zde uvedeny klasické mechanismy jejího vzniku a stručně charakterizovány. Dále zde byly popsány změny v nádorových buňkách, které ovlivňují jejich citlivost, ale nejsou zařazeny mezi klasické mechanismy rezistence. Podrobněji byly rozepsány mechanismy, které byly dále analyzovány v experimentální části: ABC transportéry, role glutathionu v detoxikaci léčiv a v neposlední řadě proteiny tepelného šoku.

Prvním cílem experimentální části mé diplomové práce bylo získat a charakterizovat rezistentní linii nádorových buněk vůči inhibitorům HSP90. Za tímto účelem byly testovány buňky A549 a K562. Používanými léčivy byly geldanamycin a jeho derivát tanespimycin, což jsou specifické inhibitory HSP90. Buněčné linie A549 a K562 byly kultivovány se zvyšující se koncentrací geldanamycinu nebo tanespimycinu. Nepodařilo se získat rezistentní linii buněk K562 vůči geldanamycinu ani tanespimycinu. A nebyla úspěšná ani selekce rezistentní linie A549 vůči tanespimycinu. Podařilo se získat rezistentní buněčné linie A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN, A549 1000GDN vůči geldanamycinu. Tento výsledek byl překvapivý, protože geldanamycin vykazuje silnou hepatotoxicitu (Fukuyo a kol., 2010). Na rozdíl od jeho derivátu tanespimycinu, který má výrazně zlepšený profil toxicity (Erlichman, 2009). Nebyl objasněn důvod úspěšnosti selekce rezistentní linie pouze u buněk A549, a to jen vůči geldanamycinu.

Získané rezistentní linie A549 120GDN ($IC_{50} = 422,7 \pm 28,5$), A549 250GDN ($IC_{50} = 492,6 \pm 27,5$), A549 500GDN ($IC_{50} = 793,7 \pm 96,5$) a A549 1000GDN ($IC_{50} = 2640,9 \pm 179,5$) vykazovaly zvýšení rezistence přibližně 26krát, 30krát, 50krát a 160krát oproti parentální linii A549 ($IC_{50} = 16,1 \pm 7,4$) (Tab. 1). Linie A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN vykazovaly stabilní růst v období minimálně 6 měsíců. Výjimkou byly buňky A549 1000GDN, které po obnovení proliferace po jednom měsíci následně po dalších 14 dnech spontánně umíraly. U těchto buněk došlo k zastavení buněčného cyklu v G0/G1 fázi (Obr. 8) a byla u nich změněna také morfologie. Vysvětlení zastavení proliferace buněk A549 1000GDN může být, že přecházely do senescence. Dalším prvek pro důkaz senescence je aktivita β -galaktosidázy (Gewirtz a kol., 2008). Aktivita β -galaktosidázy testována nebyla, proto otázka senescence u těchto buněk zůstává otevřená.

Dalším cílem experimentální části bylo pokusit se identifikovat mechanismus mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk vůči inhibitorům HSP90. Mnohočetná léková rezistence (MDR) vůči chemoterapii zůstává hlavní výzvou v léčbě nádorového onemocnění. Rezistence existuje proti každému účinnému protinádorovému léku a může se vyvinout řadou mechanismů, včetně zvýšeného efluxu léku, aktivace detoxikačních systémů, aktivace mechanismů opravy DNA, vyhýbání se apoptóze vyvolané lékem atd. (Gottesman, 2002). Prvním z mechanismů lékové rezistence, který jsme se pokusili identifikovat byla zvýšená exprese ABC transportérů. Konkrétně ABCB1 (P-glykoprotein, MDR1), ABCG2 (BCRP) a ABCC1 (MRP1) které jsou spojovány s mnohočetnou lékovou rezistencí (Sharom, 2008). Nezaznamenali jsme zvýšenou expresi proteinu ABCB1 (Obr. 10). Což je v rozporu s literaturou, protože rezistence buněk A549 vůči geldanamycinu byla z části připisována právě ABCB1 (McCollum, 2008). Huang a kol. (2007) také potvrzují, že geldanamycin patří k lékům, jejichž účinek může být ovlivněn mechanismem mnohočetné lékové rezistence zprostředkované ABCB1. Pérez-Tomás (2006) uvádí geldanamycinu jako substrát ABCB1 transportéru. Dalším studovaným proteinem, který je spojován s mnohočetnou lékovou rezistencí je ABCG2. Jeho exprese nebyla zvýšená u buněk A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN ani u A549 1000GDN (Obr. 11). Také McCollum a kol. (2008) nezaznamenali zvýšenou expresi tohoto transportéru u buněk rezistentních vůči geldanamycinu. Pastvová a kol. (2021) uvedli, že GDN a jeho analog 17-AAG jsou slabým substrátem ABCG2. V neposlední řadě byla analyzována exprese proteinu ABCC1. McCollum a kol. (2008) tento transportér nestudovali. Ale z důvodu zvýšené bazální exprese ABCC1 u buněk A549 (dle NCI-60), jsme se pokusili ověřit, zda ABCC1 nehraje roli také v rezistenci buněk A549 vůči geldanamycinu. Zaznamenali jsme zvýšení exprese ABCC1 zejména u buněk A549 120GDN a A549 250GDN. U buněk A549 500GDN a A549 1000GDN se exprese ABCC1 snižovala (Obr. 12). Pham a kol. (2009) potvrzují, že ABCC1 může fungovat jako efluxní pumpa pro GDN a jeho analogy. Stejný autor také poskytuje důkaz, že rezistence vůči GDN byla spojena s funkcí ABCC1. Roli ABCC1 v rezistenci vůči geldanamycinu nemůžeme definitivně potvrdit, protože nebylo testováno zvrácení rezistence pomocí inhibitoru ABCC1.

Dále jsme ověřovali, zda zvýšená exprese ABCC1 vede ke změně produkce redukovaného glutathionu (GSH). A také, zda dochází ke změně intracelulární koncentrace glutathionu oxidovaného (GSSG). Bylo zjištěno, že u buněk A549 500GDN dochází k signifikantnímu poklesu intracelulární koncentrace redukovaného glutathionu oproti

buněk A549 (Obr. 13a). Snížená intracelulární koncentrace redukováného glutathionu by mohla být spojena se zvýšenou expresí ABCCI a s tím spojenou zvýšenou funkcí tohoto transportéru, která vede k odčerpávání GSH extracelulárně. Toto tvrzení však není podloženo měřením extracelulární hladiny redukováného glutathionu. Dále můžeme konstatovat, že zde nedocházelo k oxidativnímu stresu, protože oxidovaná forma glutathionu nebyla zvýšená (Obr. 13b).

Dalším krokem identifikace mechanismu rezistence buněk A549 rezistentních vůči geldanamycinu byla analýza exprese proteinů tepelného šoku. Nejedná se o klasický mechanismus rezistence, ale zvýšená exprese proteinů tepelného šoku je spojována se zvětšenou odolností nádorových buněk vůči chemoterapii (Lianos a kol., 2015). Konkrétně jsme se zaměřili na HSP90, HSP70 a HSP27. Prvním studovaným proteinem byl HSP90. Používané léčivo geldanamycin je specifický inhibitor HSP90 (Schnaider a kol., 2000). Nebyla pozorována zvýšená exprese HSP90 (Obr. 14). Tento výsledek je ve shodě s McCollum a kol. (2008). V literatuře je popsáno, že inhibice HSP90 způsobuje silnou indukci reakce tepelného šoku, která zvyšuje buněčné hladiny chaperonů HSP27 a HSP70 (Piper a Millson, 2011). Ke změně exprese však nedošlo u proteinu HSP70 (Obr. 15) a ani u HSP27 (Obr. 16). McCollum a kol. (2006) uvádí, že u buněk rezistentních na geldanamycinu nedošlo ke zvýšení exprese HSP70, ale HSP27 byl u těchto buněk upregulován.

Závěrem lze říci, že jsme neodhalili mechanismus, který je zodpovědný za získanou rezistenci u buněk A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN, A549 1000GDN odolných vůči geldanamycinu. Mechanismus zvýšené exprese ABCC1 naznačoval zapojení do rezistence vůči geldanamycinu. Chybí zde však definitivní potvrzení pomocí inhibitoru ABCC1, který by zvrátil rezistenci těchto rezistentních buněk. Dle našich výsledků však můžeme vyloučit, že by rezistence buněk A549 vůči geldanamycinu byla spojena se zvýšenou expresí ABCB1, ABCG2 nebo HSP90, HSP70, HSP27.

7 Závěr

- V teoretické části jsou shrnuty klasické mechanismy mnohočetné lékové rezistence se zaměřením na ABC transportéry a proteiny tepelného šoku.
- Kultivací parentální senzitivní linie A549 v postupně se zvyšující koncentrací geldanamycinu byly získány rezistentní linie A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN, A549 1000GDN. Nepodařilo se získat rezistentní linii buněk A549 vůči tanespimycinu. Nebyla úspěšná ani selekce rezistentních buněk K562 vůči geldanamycinu nebo tanespimycinu.
- S postupně se zvyšující rezistencí buněk A549 vůči geldanamycinu stoupala také poloviční inhibiční koncentrace těchto buněk. Rezistentní linie A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN vykazovaly stabilní růst nejméně po dobu 6 měsíců. Buňky linie A549 1000GDN po 6 týdnech spontánně umíraly.
- Mechanismus rezistence buněk A549 120GDN, A549 250GDN, A549 500GDN, A549 1000GDN vůči geldanamycinu je pravděpodobně spjat se zvýšenou expresí ABCC1, jednoznačné důkazy pro tento závěr ovšem nebyly získány.
- Lze vyloučit, že by rezistence byla spojena se zvýšenou expresí ABCB1, ABCG2 nebo HSP90, HSP70, HSP27.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMED, Mohammed, Maite VERREAULT, Xavier DECLÈVES a Ahmed IDBAIH, 2021. Chapter 9 - Role of multidrug resistance in glioblastoma chemoresistance: Focus on ABC transporters. In: Ramasamy PAULMURUGAN a Tarik F. MASSOUD, ed. *Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies* [online]. B.m.: Academic Press, Cancer Sensitizing Agents for Chemotherapy, s. 243–261 [vid. 2023-01-04]. Dostupné z: doi:[10.1016/B978-0-12-821567-8.00025-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821567-8.00025-7)

ANDERSON, Nicole M. a M. Celeste SIMON, 2020. The tumor microenvironment. *Current biology: CB* [online]. **30**(16), R921–R925. ISSN 1879-0445. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cub.2020.06.081](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081)

AMAWI, Haneen, Hong-May SIM, Amit K. TIWARI, Suresh V. AMBUDKAR a Suneet SHUKLA, 2019. ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. In: Xiaodong LIU a Guoyu PAN, ed. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity* [online]. Singapore: Springer, Pokroky v experimentální medicíně a biologii, s. 549–580 [vid. 2023-05-03]. ISBN 9789811376474. Dostupné z: doi:[10.1007/978-981-13-7647-4_12](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_12)

ALFAROUK, Khalid O., 2016. Tumor metabolism, cancer cell transporters, and microenvironmental resistance. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. **31**(6), 859–866. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:[10.3109/14756366.2016.1140753](https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1140753)

BALENDIRAN, Ganesaratnam K., Rajesh DABUR a Deborah FRASER, 2004. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochemistry and Function* [online]. **22**(6), 343–352. ISSN 0263-6484, 1099-0844. Dostupné z: doi:[10.1002/cbf.1149](https://doi.org/10.1002/cbf.1149)

BANSAL, Ankita a M. Celeste SIMON, 2018. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology* [online]. **217**(7), 2291–2298. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:[10.1083/jcb.201804161](https://doi.org/10.1083/jcb.201804161)

BATES, Susan E., Wyndham H. WILSON, Antonio T. FOJO, Manuel ALVAREZ, Zhirong ZHAN, Joanna REGIS, Rob ROBEY, Curtis HOSE, Anne MONKS, Yoon Koo KANG a Bruce CHABNER, 1996. Clinical Reversal of Multidrug Resistance. *STEM CELLS* [online]. **14**(1), 56–63. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:[10.1002/stem.140056](https://doi.org/10.1002/stem.140056)

BUDGE, Piyush, Riva BISWAS, Fabricie MERIEN, Jun LU, Dong-Xu LIU, Mingwei CHEN, Shufeng ZHOU, Yan LI, 2017. The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance. *Expert Opinion on Therapeutic Target* [online]. **21**(5), 511–530. Dostupné z: doi:[10.1080/14728222.2017.1310841](https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1310841)

CALDERWOOD, Stuart K. a Jianlin GONG, 2016. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **41**(4), 311–323. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:[10.1016/j.tibs.2016.01.003](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.003)

CARPENTER, Valerie, Tareq SALEH, So MIN LEE, Graeme MURRAY, Jason REED, Andrew SOUERS, Anthony C. FABER, Hisashi HARADA a David A.

GEWIRTZ, 2021. Androgen-deprivation induced senescence in prostate cancer cells is permissive for the development of castration-resistance but susceptible to senolytic therapy. *Biochemical Pharmacology* [online]. **193**, 114765. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bcp.2021.114765](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114765)

COLE, S. P. C., G. BHARDWAJ, J. H. GERLACH, J. E. MACKIE, C. E. GRANT, K. C. ALMQUIST, A. J. STEWART, E. U. KURZ, A. M. V. DUNCAN a R. G. DEELEY, 1992. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science* [online]. **258**(5088), 1650–1654. Dostupné z: doi:[10.1126/science.1360704](https://doi.org/10.1126/science.1360704)

COLEY, Helen M., 2010. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Clinical Studies of P-Glycoprotein Inhibitors. In: Jun ZHOU, ed. *Multi-Drug Resistance in Cancer* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 341–358 [vid. 2023-01-30]. ISBN 978-1-60761-415-9. Dostupné z: doi:[10.1007/978-1-60761-416-6_15](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_15)

DEBOER, C., P. A. MEULMAN, R. J. WNUK a D. H. PETERSON, 1970. GELDANAMYCIN, A NEW ANTIBIOTIC. *The Journal of Antibiotics* [online]. **23**(9), 442–447. ISSN 0021-8820, 1881-1469. Dostupné z: doi:[10.7164/antibiotics.23.442](https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.442)

DESIDERI, Enrico, Fabio CICCARONE a Maria Rosa CIRIOLO, 2019. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients* [online]. **11**(8), 1926. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:[10.3390/nu11081926](https://doi.org/10.3390/nu11081926)

DEZI, Manuela, Pierre-Frédéric FRIBOURG, Aurelie DI CICCICO, Ophelie ARNAUD, Sergio MARCO, Pierre FALSON, Attilio DI PIETRO a Daniel LÉVY, 2010. The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. **1798**(11), 2094–2101. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bba-mem.2010.07.034](https://doi.org/10.1016/j.bba-mem.2010.07.034)

DIMOPOULOS, Meletios-Athanassios, Constantine S. MITSIADES, Kenneth C. ANDERSON a Paul G. RICHARDSON, 2011. Tanespimycin as Antitumor Therapy. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* [online]. **11**(1), 17–22. ISSN 2152-2650. Dostupné z: doi:[10.3816/CLML.2011.n.002](https://doi.org/10.3816/CLML.2011.n.002)

DOYLE, L. Austin, Weidong YANG, Lynne V. ABRUZZO, Tammy KROGMANN, Yongming GAO, Arun K. RISHI a Douglas D. ROSS, 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**(26), 15665–15670. ISSN 0027-8424.

EASTON, Douglas P., Yoshiyuki KANEKO a John R. SUBJECK, 2000. The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress & Chaperones*. **5**(4), 276–290. ISSN 1355-8145.

ERLICHMAN, Charles, 2009. Tanespimycin: the opportunities and challenges of targeting heat shock protein 90. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. **18**(6), 861–868. ISSN 1354-3784, 1744-7658. Dostupné z: doi:[10.1517/13543780902953699](https://doi.org/10.1517/13543780902953699)

- FALASCA, Marco a Kenneth J. LINTON, 2012. Investigational ABC transporter inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. **21**(5), 657–666. ISSN 1354-3784, 1744-7658. Dostupné z: doi:[10.1517/13543784.2012.679339](https://doi.org/10.1517/13543784.2012.679339)
- FEDER, Martin E. a Gretchen E. HOFMANN, 1999. HEAT-SHOCK PROTEINS, MOLECULAR CHAPERONES, AND THE STRESS RESPONSE: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology* [online]. **61**(1), 243–282. Dostupné z: doi:[10.1146/annurev.physiol.61.1.243](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243)
- FLETCHER, Jamie I., Rebekka T. WILLIAMS, Michelle J. HENDERSON, Murray D. NORRIS a Michelle HABER, 2016. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates* [online]. **26**, 1–9. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:[10.1016/j.drug.2016.03.001](https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.001)
- FUKUYO, Yayoi, Clayton R. HUNT a Nobuo HORIKOSHI, 2010. Geldanamycin and its anti-cancer activities. *Cancer Letters* [online]. **290**(1), 24–35. ISSN 0304-3835. Dostupné z: doi:[10.1016/j.canlet.2009.07.010](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.010)
- GEWIRTZ, David A., Shawn E. HOLT a Lynne W. ELMORE, 2008. Accelerated senescence: An emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochemical Pharmacology* [online]. **76**(8), 947–957. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bcp.2008.06.024](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.06.024)
- GIARD, Donald J., Stuart A. AARONSON, George J. TODARO, Paul ARNSTEIN, John H. KERSEY, Harvey DOSIK a Wade P. PARKS, 1973. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. **51**(5), 1417–1423. ISSN 1460-2105, 0027-8874. Dostupné z: doi:[10.1093/jnci/51.5.1417](https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417)
- GILLET, Jean-Pierre a Michael M. GOTTESMAN, 2010. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. In: Jun ZHOU, ed. *Multi-Drug Resistance in Cancer* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 47–76 [vid. 2022-12-31]. ISBN 978-1-60761-415-9. Dostupné z: doi:[10.1007/978-1-60761-416-6_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_4)
- GORDON, Ryan R. a Peter S. NELSON, 2012. Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resistance Updates* [online]. **15**(1), 123–131. ISSN 1368-7646. Dostupné z: doi:[10.1016/j.drug.2012.01.002](https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.002)
- GOTTESMAN, Michael M., 2002. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine* [online]. **53**(1), 615–627. Dostupné z: doi:[10.1146/annurev.med.53.082901.103929](https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929)
- GOTTESMAN, Michael M., Tito FOJO a Susan E. BATES, 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* [online]. **2**(1), 48–58. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:[10.1038/nrc706](https://doi.org/10.1038/nrc706)

GRENER, J. P., W. P. SULLIVAN, P. FADDEN, T. A. HAYSTEAD, J. CLARK, E. MIMNAUGH, H. KRUTZSCH, H. J. OCHEL, T. W. SCHULTE, E. SAUSVILLE, L. M. NECKERS a D. O. TOFT, 1997. The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(38), 23843–23850. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:[10.1074/jbc.272.38.23843](https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23843)

HEHLMANN, Rüdiger, Andreas HOCHHAUS a Michele BACCARANI, 2007. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet* [online]. **370**(9584), 342–350. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:[10.1016/S0140-6736\(07\)61165-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61165-9)

HIENTZ, Karin, André MOHR, Dipita BHAKTA-GUHA a Thomas EFFERTH, 2016. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* [online]. **8**(5), 8921–8946. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:[10.18632/oncotarget.13475](https://doi.org/10.18632/oncotarget.13475)

HIGGINS, Christopher F., 1992. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology* [online]. **8**(1), 67–113. Dostupné z: doi:[10.1146/annurev.cb.08.110192.000435](https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435)

HOLOHAN, Caitriona, Sandra VAN SCHAEYBROECK, Daniel B. LONGLEY a Patrick G. JOHNSTON, 2013. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer* [online]. **13**(10), 714–726. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:[10.1038/nrc3599](https://doi.org/10.1038/nrc3599)

HOUSMAN, Genevieve, Shannon BYLER, Sarah HEERBOTH, Karolina LAPINSKA, Mckenna LONGACRE, Nicole SNYDER a Sibaji SARKAR, 2014. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers* [online]. **6**(3), 1769–1792. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:[10.3390/cancers6031769](https://doi.org/10.3390/cancers6031769)

HRABĚTA, Jan, Marie BELHAJOVÁ, Hana ŠUBRTOVÁ, Miguel Angel MERLOS RODRIGO, Zbyněk HEGER a Tomáš ECKSCHLAGER, 2020. Drug Sequestration in Lysosomes as One of the Mechanisms of Chemoresistance of Cancer Cells and the Possibilities of Its Inhibition. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(12), 4392. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:[10.3390/ijms21124392](https://doi.org/10.3390/ijms21124392)

HU, Yunhui, Kaiyong LI, Muhammad ASADUZZAMAN, Raquel CUELLA, Hui SHI, Selina RAGUZ, Raoul Charles COOMBES, Yuan ZHOU a Ernesto YAGÜE, 2016. miR-106b~25 cluster regulates multidrug resistance in an ABC transporter-independent manner via downregulation of EP300. *Oncology Reports* [online]. **35**(2), 1170–1178. ISSN 1021-335X. Dostupné z: doi:[10.3892/or.2015.4412](https://doi.org/10.3892/or.2015.4412)

HUANG, Ying, Paul E. BLOWER, Ruqing LIU, Zunyan DAI, Anh-Nhan PHAM, Ho-jin MOON, Jialong FANG a Wolfgang SADÉE, 2007. Chemogenomic Analysis Identifies Geldanamycins as Substrates and Inhibitors of ABCB1. *Pharmaceutical Research* [online]. **24**(9), 1702–1712. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi:[10.1007/s11095-007-9300-x](https://doi.org/10.1007/s11095-007-9300-x)

CHACKALAMANNIL Samuel, David ROTELLA a Simin E. WARD, 2017. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-12-803201-5.

CHAKAFANA, Graham a Addmore SHONHAI, 2021. The Role of Non-Canonical Hsp70s (Hsp110/Grp170) in Cancer. *Cells* [online]. **10**(2), 254. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:[10.3390/cells10020254](https://doi.org/10.3390/cells10020254)

CHEN, Chang-jie, Janice E. CHIN, Kazumitsu UEDA, Douglas P. CLARK, Ira PASTAN, Michael M. GOTTESMAN a Igor B. RONINSON, 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* [online]. **47**(3), 381–389. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:[10.1016/0092-8674\(86\)90595-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90595-7)

IYANAGI, Takashi, 2007. Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. In: *International Review of Cytology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 35–112 [vid. 2023-05-03]. Dostupné z: doi:[10.1016/S0074-7696\(06\)60002-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)60002-8)

JEGO, Gaëtan, Adonis HAZOUMÉ, Renaud SEIGNEURIC a Carmen GARRIDO, 2013. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters* [online]. **332**(2), Apoptosis Targeting Drugs in Cancer, 275–285. ISSN 0304-3835. Dostupné z: doi:[10.1016/j.canlet.2010.10.014](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.014)

JING, Xinming, Fengming YANG, Chuchu SHAO, Ke WEI, Mengyan XIE, Hua SHEN a Yongqian SHU, 2019. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer* [online]. **18**(1), 157. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:[10.1186/s12943-019-1089-9](https://doi.org/10.1186/s12943-019-1089-9)

JIYE, YIN a ZHANG JIANTING, 2011. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences* [online]. **36**(10), 927–938. ISSN 1672-7347. Dostupné z: doi:[10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.002](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.002)

JOYCE, Helena, Andrew MCCANN, Martin CLYNES a Annemarie LARKIN, 2015. Influence of multidrug resistance and drug transport proteins on chemotherapy drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. **11**(5), 795–809. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:[10.1517/17425255.2015.1028356](https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1028356)

JULIANO, R. L. a V. LING, 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. **455**(1), 152–162. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi:[10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)

KALININA, E. V. a L. A. GAVRILIUK, 2020. Glutathione Synthesis in Cancer Cells. *Biochemistry (Moscow)* [online]. **85**(8), 895–907. ISSN 1608-3040. Dostupné z: doi:[10.1134/S0006297920080052](https://doi.org/10.1134/S0006297920080052)

KANG, Min H. a C. Patrick REYNOLDS, 2009. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* [online]. **15**(4), 1126–1132. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:[10.1158/1078-0432.CCR-08-0144](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0144)

KARTHIKA, Chenmala, Raman SURESHKUMAR, Mehrukh ZEHRABI, Rokeya AKTER, Faraat ALI, Sarker RAMPROSHAD, Banani MONDAL, Priti TAGDE, Zubair AHMED, Farhat S. KHAN, Md Habibur RAHMAN a Simona CAVALU, 2022. Multidrug Resistance of Cancer Cells and the Vital Role of P-Glycoprotein. *Life (Basel, Switzerland)* [online]. **12**(6), 897. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:[10.3390/life12060897](https://doi.org/10.3390/life12060897)

KATHAWALA, Rishil J., Pranav GUPTA, Charles R. ASHBY a Zhe-Sheng CHEN, 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates* [online]. **18**, 1–17. ISSN 1368-7646. Dostupné z: doi:[10.1016/j.drug.2014.11.002](https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.11.002)

KAUR, G., Sonu GUPTA, Priyanka SINGH, Villayat ALI, Veerandra KUMAR a Malkhey VERMA, 2020. Drug-metabolizing enzymes: role in drug resistance in cancer. *Clinical and Translational Oncology* [online]. **22**. Dostupné z: doi:[10.1007/s12094-020-02325-7](https://doi.org/10.1007/s12094-020-02325-7)

KENNEDY, Luke, Jagdeep K. SANDHU, Mary-Ellen HARPER a Miroslava CUPERLOVIC-CULF, 2020. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules* [online]. **10**(10), 1429. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:[10.3390/biom10101429](https://doi.org/10.3390/biom10101429)

KIM, Kyeong Kyu, Rosalind KIM a Sung-Hou KIM, 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* [online]. **394**(6693), 595–599. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:[10.1038/29106](https://doi.org/10.1038/29106)

LAGE, H., 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **65**(20), 3145–3167. ISSN 1420-682X, 1420-9071. Dostupné z: doi:[10.1007/s00018-008-8111-5](https://doi.org/10.1007/s00018-008-8111-5)

LESLIE, Elaine M, Roger G DEELEY a Susan P. C COLE, 2001. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* [online]. **167**(1), 3–23. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:[10.1016/S0300-483X\(01\)00454-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00454-1)

LI, Lan-ya, Yi-di GUAN, Xi-sha CHEN, Jin-ming YANG a Yan CHENG, 2021. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **11** [vid. 2023-05-05]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.629266>

LIANOS, Georgios D., George A. ALEXIOU, Alberto MANGANO, Alessandro MANGANO, Stefano RAUSEI, Luigi BONI, Gianlorenzo DIONIGI a Dimitrios H. ROUKOS, 2015. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters* [online]. **360**(2), 114–118. ISSN 0304-3835. Dostupné z: doi:[10.1016/j.canlet.2015.02.026](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.026)

LIU, Xiaodong. 2019. Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [online]. 1141. Dostupné z: doi:[10.1007/978-981-13-7647-4_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2)

LONGLEY, Db a Pg JOHNSTON, 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology* [online]. **205**(2), 275–292. ISSN 1096-9896. Dostupné z: doi:[10.1002/path.1706](https://doi.org/10.1002/path.1706)

MANSOORI, Behzad, Ali MOHAMMADI, Sadaf DAVUDIAN, Solmaz SHIRJANG a Behzad BARADARAN, 2017. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. **7**(3), 339–348. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:[10.15171/apb.2017.041](https://doi.org/10.15171/apb.2017.041)

MCCOLLUM, Andrea K., Cynthia J. TENNEYCK, Bridget STENSGARD, Bruce W. MORLAN, Karla V. BALLMAN, Robert B. JENKINS, David O. TOFT a Charles ERLICHMAN, 2008. P-Glycoprotein–Mediated Resistance to Hsp90-Directed Therapy Is Eclipsed by the Heat Shock Response. *Cancer Research* [online]. **68**(18), 7419–7427. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:[10.1158/0008-5472.CAN-07-5175](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5175)

MCCOLLUM, Andrea K., Cynthia J. TENNEYCK, Brian M. SAUER, David O. TOFT a Charles ERLICHMAN, 2006. Up-regulation of Heat Shock Protein 27 Induces Resistance to 17-Allylamino-Demethoxygeldanamycin through a Glutathione-Mediated Mechanism. *Cancer Research* [online]. **66**(22), 10967–10975. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:[10.1158/0008-5472.CAN-06-1629](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1629)

MITRA, Aparna, Lalita A. SHEVDE a Rajeev S. SAMANT, 2009. Multi-faceted role of HSP40 in cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* [online]. **26**(6), 559–567. ISSN 1573-7276. Dostupné z: doi:[10.1007/s10585-009-9255-x](https://doi.org/10.1007/s10585-009-9255-x)

MIYATA, Yoshihiko, NAKAMOTO, Hitoshi, NECKERS, Len, 2013. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Current pharmaceutical design* [online]. **19**(3), 347–365. Dostupné z: doi: [10.2174/138161213804143725](https://doi.org/10.2174/138161213804143725)

MURPHY, Maureen E., 2013. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* [online]. **34**(6), 1181–1188. ISSN 0143-3334. Dostupné z: doi:[10.1093/carcin/bgt111](https://doi.org/10.1093/carcin/bgt111)

NECKERS, Len a S. Percy IVY, 2003. Heat shock protein 90. *Current Opinion in Oncology*. **15**(6), 419. ISSN 1040-8746.

NEJAD EMAMI, Asieh, Simin NAJAFGHOLIAN, Alireza ROSTAMI, Alireza SISTANI, Samaneh SHOJAEIFAR, Mojgan ESPARVARINHA, Reza NEDAEINIA, Shaghayegh HAGHJOY JAVANMARD, Marjan TAHERIAN, Mojtaba AHMADLOU, Rasoul SALEHI, Bahman SADEGHI a Mostafa MANIAN, 2021. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell International* [online]. **21**, 62. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:[10.1186/s12935-020-01719-5](https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5)

NEOPHYTOU, Christiana M., IOANNIS P. Trougakos, NURAV Erin a PANAGIOTIS Papageorgis, 2021. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers* [online]. **13**(17), Dostupné z: doi: [10.3390/cancers13174363](https://doi.org/10.3390/cancers13174363)

NOBILI, Stefania, Ida LANDINI, B. GIGLIONI B., Enrico MINI. 2006 Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Current drug targets*. [online] 7.7: 861-879. Dostupné z: doi: [10.2174/138945006777709593](https://doi.org/10.2174/138945006777709593)

PASTVOVÁ, Nikola, DOLEZEL Petr, MLEJNEK Petr, 2021. Heat Shock Protein Inhibitor 17-Allylaminogeldanamycin, a Potent Inductor of Apoptosis in Human Glioma Tumor Cell Lines, Is a Weak Substrate for ABCB1 and ABCG2 Transporters. *Pharmaceuticals* [online]. **14**(2), 107. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi: [10.3390/ph14020107](https://doi.org/10.3390/ph14020107)

PÉREZ-TOMÁS, Ricardo, 2006. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. *Current Medicinal Chemistry* [online]. **13**(16), 1859–1876. ISSN 09298673. Dostupné z: doi: [10.2174/092986706777585077](https://doi.org/10.2174/092986706777585077)

PHAM, Anh-Nhan, Jeffrey WANG, Jialong FANG, Xin GAO, Yilong ZHANG, Paul E. BLOWER, Wolfgang SADÉE a Ying HUANG, 2009. Pharmacogenomics Approach Reveals MRP1 (ABCC1)-Mediated Resistance to Geldanamycins. *Pharmaceutical Research* [online]. **26**(4), 936–945. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi: [10.1007/s11095-008-9796-8](https://doi.org/10.1007/s11095-008-9796-8)

PIPER, Peter W. a Stefan H. MILLSON, 2011. Mechanisms of Resistance to Hsp90 Inhibitor Drugs: A Complex Mosaic Emerges. *Pharmaceuticals* [online]. **4**(11), 1400–1422. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi: [10.3390/ph4111400](https://doi.org/10.3390/ph4111400)

RAMOS, P. a M. BENTIREZ-ALJ, 2015. Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene* [online]. **34**(28), 3617–3626. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi: [10.1038/onc.2014.314](https://doi.org/10.1038/onc.2014.314)

REBUCCI, Magali a Carine MICHIELS, 2013. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology* [online]. **85**(9), 1219–1226. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi: [10.1016/j.bcp.2013.02.017](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.017)

RITOSSA, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* [online]. **18**(12), 571–573. ISSN 0014-4754. Dostupné z: doi: [10.1007/BF02172188](https://doi.org/10.1007/BF02172188)

ROSENBERG, Mark F., Qingcheng MAO, Andreas HOLZENBURG, Robert C. FORD, Roger G. DEELEY a Susan P. C. COLE, 2001. The Structure of the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1): CRYSTALLIZATION AND SINGLE-PARTICLE ANALYSIS*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(19), 16076–16082. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi: [10.1074/jbc.M100176200](https://doi.org/10.1074/jbc.M100176200)

RŮŽIČKOVÁ, Eliska, Nikola SKOUPA, Petr DOLEZEL, Dennis A. SMITH a Petr MLEJNEK, 2019. The Lysosomal Sequestration of Tyrosine Kinase Inhibitors and Drug Resistance. *Biomolecules* [online]. **9**(11), 675. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi: [10.3390/biom9110675](https://doi.org/10.3390/biom9110675)

- SARASWATHY, Manju a Shaoqin GONG, 2013. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnology Advances* [online]. **31**(8), 1397–1407. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:[10.1016/j.biotechadv.2013.06.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.004)
- SHAROM, Frances J, 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* [online]. **9**(1), 105–127. ISSN 1462-2416, 1744-8042. Dostupné z: doi:[10.2217/14622416.9.1.105](https://doi.org/10.2217/14622416.9.1.105)
- SHERMAN, M. Y. a V. L. GABAI, 2015. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene* [online]. **34**(32), 4153–4161. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:[10.1038/onc.2014.349](https://doi.org/10.1038/onc.2014.349)
- SHERMAN, Michael a Gabriele MULTHOFF, 2007. Heat Shock Proteins in Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **1113**(1), 192–201. ISSN 1749-6632. Dostupné z: doi:[10.1196/annals.1391.030](https://doi.org/10.1196/annals.1391.030)
- SCHMITT, Clemens A., 2007. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. **1775**(1), 5–20. ISSN 0304-419X. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bbcan.2006.08.005](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.08.005)
- SCHNAIDER, Tamás, János SOMOGYI, Péter CSERMELY a Marta SZAMEL, 2000. The Hsp90-specific inhibitor geldanamycin selectively disrupts kinase-mediated signaling events of T-lymphocyte activation. *Cell Stress & Chaperones* [online]. **5**(1), 52–61. ISSN 1355-8145. Dostupné z: doi:[10.1043/13558145\(2000\)005<0052:THSIG>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/13558145(2000)005<0052:THSIG>2.0.CO;2)
- SINGH, Sheo B., Olga GENILLOUD a Fernando PELÁEZ, 2010. Terrestrial Microorganisms – Filamentous Bacteria. In: *Comprehensive Natural Products II* [online]. B.m.: Elsevier, s. 109–140 [vid. 2023-04-19]. ISBN 978-0-08-045382-8. Dostupné z: doi:[10.1016/B978-008045382-8.00036-8](https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00036-8)
- STACY, Alexandra E., Patric J. JANSSON a Des R. RICHARDSON, 2013. Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in Chemoresistance. *Molecular Pharmacology* [online]. **84**(5), 655–669. ISSN 0026-895X, 1521-0111. Dostupné z: doi:[10.1124/mol.113.088609](https://doi.org/10.1124/mol.113.088609)
- SZAKÁCS, Gergely, Jill K. PATERSON, Joseph A. LUDWIG, Catherine BOOTH-GENTHE a Michael M. GOTTESMAN, 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. **5**(3), 219–234. ISSN 1474-1776, 1474-1784. Dostupné z: doi:[10.1038/nrd1984](https://doi.org/10.1038/nrd1984)
- TALAEI, Sona, Hassan MELLATYAR, Asadollah ASADI, Abolfazl AKBARZADEH, Roghayeh SHEERVALILOU a Nosratollah ZARGHAMI, 2019. Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment. *Chemical Biology & Drug Design* [online]. **93**(5), 760–786. ISSN 1747-0285. Dostupné z: doi:[10.1111/cbdd.13486](https://doi.org/10.1111/cbdd.13486)

TANG, Ruoping, Anne-Marie FAUSSAT, Jean-Yves PERROT, Zora MARJANOVIC, Simy COHEN, Thomas STORME, Hamid MORJANI, Ollivier LEGRAND a Jean-Pierre MARIE, 2008. Zosuquidar restores drug sensitivity in P-glycoprotein expressing acute myeloid leukemia (AML). *BMC Cancer* [online]. **8**(1), 51. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:[10.1186/1471-2407-8-51](https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-51)

TAMAKI, Akina, Caterina IERANO, Gergely SZAKACS, Robert W. ROBEY a Susan E. BATES, 2011. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays in Biochemistry* [online]. **50**, 209–232. ISSN 0071-1365, 1744-1358. Dostupné z: doi:[10.1042/bse0500209](https://doi.org/10.1042/bse0500209)

TRAVERSO, Nicola, Roberta RICCIARELLI, Mariapaola NITTI, Barbara MARENCO, Anna Lisa FURFARO, Maria Adelaide PRONZATO, Umberto Maria MARI-NARI a Cinzia DOMENICOTTI, 2013. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. **2013**, e972913. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:[10.1155/2013/972913](https://doi.org/10.1155/2013/972913)

VIDYASAGAR, Aparna, Nancy A. WILSON a Arjang DJAMALI, 2012. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis & Tissue Repair* [online]. **5**(1), 7. ISSN 1755-1536. Dostupné z: doi:[10.1186/1755-1536-5-7](https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-7)

WANG, Shaomeng, Yujun ZHAO, Denzil BERNARD, Angelo AGUILAR a Sanjeev KUMAR, 2012. Targeting the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapeutics. In: Michael D. WENDT, ed. *Protein-Protein Interactions* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, *Témata lékařské chemie*, s. 57–79 [vid. 2023-04-30]. ISBN 978-3-642-28965-1. Dostupné z: doi:[10.1007/978-3-642-28965-1_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28965-1_2)

WANG, Xiao-Kun a Li-Wu FU, 2010. Interaction of Tyrosine Kinase Inhibitors with the MDR-Related ABC Transporter Proteins. *Current Drug Metabolism* [online]. **11**(7), 618–628. ISSN 13892002. Dostupné z: doi:[10.2174/138920010792927316](https://doi.org/10.2174/138920010792927316)

WANG, Xuan, Haiyun ZHANG a Xiaozhuo CHEN, 2019. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance* [online]. **2**(2), 141–160. ISSN 2578-532X. Dostupné z: doi:[10.20517/cdr.2019.10](https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10)

WHITESELL, L, EG MIMNAUGH, B DE COSTA, CE MYERS a LM NECKERS, 1994. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **91**(18), 8324–8328. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.91.18.8324](https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8324)

WILKENS, Stephan, 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports* [online]. **7**. Dostupné z: doi:[10.12703/P7-14](https://doi.org/10.12703/P7-14)

WOJTKOWIAK, Jonathan W., Daniel VERDUZCO, Karla J. SCHRAMM a Robert J. GILLIES, 2011. Drug Resistance and Cellular Adaptation to Tumor Acidic pH Microenvironment. *Molecular Pharmaceutics* [online]. **8**(6), 2032–2038. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:[10.1021/mp200292c](https://doi.org/10.1021/mp200292c)

WU, Jianming, Tuoan LIU, Zechary RIOS, Qibing MEI, Xiukun LIN a Shousong CAO, 2017. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. **38**(3), 226–256. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:[10.1016/j.tips.2016.11.009](https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.009)

ZHENG, Hua-Chuan, 2017. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* [online]. **8**(35), 59950–59964. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:[10.18632/oncotarget.19048](https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048)

ZHITOMIRSKY, Benny a Yehuda G. ASSARAF, 2016. Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates* [online]. **24**, 23–33. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:[10.1016/j.drug.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.11.004)