

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Rigorózní práce**

**2023**

**Mgr. Lenka Hrubá**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Rezistentní nádorové buněčné linie jako model  
pro výzkum onkologické terapie**

**Rigorózní práce**

**Mgr. Lenka Hrubá**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

**2023**

**Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.**

## **Bibliografické údaje**

**Jméno a příjmení autora:** Mgr. Lenka Hrubá

**Název práce:** Rezistentní nádorové buněčné linie jako model pro výzkum onkologické terapie

**Typ práce:** Rigorózní

**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

**Vedoucí práce:** MUDr. Petr Džubák Ph.D.

**Rok obhajoby práce:** 2023

**Klíčová slova:** nádorová onemocnění, onkologie, leukémie, léková rezistence, nukleosidy, buněčné modely

**Počet stran:** 72

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** český

## **Souhrn**

Lékové rezistence jsou jedním z významných faktorů, které komplikují léčbu onkologických pacientů. V rámci této práce byla provedena příprava nádorových linií rezistentních vůči známým léčivům (cytarabin, fludarabin, 6-thioguanin, 6-merkaptopurin, cisplatina, karboplatina), ale také vůči experimentálním látkám (roskovitin, PNH173, PNH192, AB-61, CuEt). V případě látek s nukleosidovou strukturou byla příprava úspěšná a byly získány linie s výrazně rezistentním fenotypem. U těchto linií byl pozorován nejen rozvoj na látku, která byla využita k samotné selekci, také zkřížená rezistence s dalšími látkami. V případě selekce cisplatinou a karboplatinou nebyl rozvoj rezistence tak výrazný a v případě látky CuEt k nárůstu rezistence prakticky nedošlo. V rámci základní charakterizace těchto linií byla ověřena exprese dvou proteinů spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí, P-glykoproteinu a Multidrug resistance-associated proteinu 1 (MRP1). Dále pak byla ověřena míra exprese nukleosidových membránových transportérů (ENT, CNT) a vybrané linie byly použity pro screening nových látek, které by mohly sloužit jako potenciální protinádorová léčiva.

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Mgr. Lenka Hrubá

**Title:** Resistant cancer cell lines as a model for cancer therapy research

**Type of thesis:** Rigorous

**Department:** Department of cell biology and genetics

**Supervisor:** MUDr. Petr Džubák Ph.D.

**The year of presentation:** 2023

**Keywords:** cancer, oncology, leukaemia, drug resistance, nucleosides, cellular models

**Number of pages:** 72

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

## **Summary**

Drug resistance is one of the key problems in cancer therapy. In this thesis, we were mainly focused on the development of cell lines resistant to known drugs (cytarabine, fludarabine, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, cisplatin, carboplatin) and also to experimental compounds (roscovitine, PNH713, PNH192, AB-61, CuEt). Selection done by nucleoside-based compounds was successful for all compounds and we detected secondary and also cross resistant phenotype. Selection by cisplatin and carboplatin did not lead to development of such a huge increase in resistant phenotype compared to nucleosides and in the case of CuEt selection, there was almost no change in the sensitivity after the selection. Basic characterization was done for all selected cell lines, including expression of MDR proteins, such as P-glycoprotein a Multidrug resistance-associated protein and expression of nucleoside membrane transporters (ENTs, CNTs). Some of the resistant cell lines were used for the screening of new compounds with promising anticancer activity.

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů, pod vedením MUDr. Petra Džubáka Ph.D.

V Olomouci dne

Podpis studenta

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své práce, MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, pomoc při řešení nejrůznějších problémů, které se v průběhu trvání projektu vyskytly a zejména pak jeho za cenné rady, které byly pro mé studium velkým přínosem. Rovněž bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Ječmeňové, která se v začátcích podílela na přípravě rezistentních linií pro nukleosidová cytostatika, za její pomoc nejen v rámci laboratorní práce, ale také za její podporu během studia. Stejně tak bych chtěla poděkovat všem kolegům z Ústavu molekulární a translační medicíny za vytvoření příjemného pracovního prostředí. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (CZ-OPENSUREEN – LM2018130 and EATRIS-CZ – LM2018133), Grantové agentury České republiky (19-08124S), interních grantů Univerzity Palackého (IGA\_LF\_2020\_019, IGA\_LF\_2021\_038), projektu ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/ 0000868) a technologické agentury České republiky: Národního centra kompetence a projektu “PerMed” (No. TN01000013).

V Olomouci dne

Podpis studenta

# Obsah

<b>SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>VII</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>IX</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>X</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>XII</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>2</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>3</b>
3.1 KARCINOGENEZE.....	3
3.2 ONKOLOGICKÁ TERAPIE.....	4
3.3 LÉKOVÉ REZISTENCE V ONKOLOGII .....	6
3.3.1 <i>Inter a intratumorová heterogenita.....</i>	<i>6</i>
3.3.2 <i>Mnohočetná léková rezistence .....</i>	<i>7</i>
3.3.3 <i>Rezistence na nukleosidová cytostatika .....</i>	<i>9</i>
3.3.4 <i>Rezistence na cytostatika obsahující ve struktuře kov .....</i>	<i>13</i>
3.4 BUNĚČNÉ MODEL Y .....	15
3.4.1 <i>Rezistentní nádorové linie.....</i>	<i>16</i>
<b>4. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>18</b>
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	18
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY.....	18
4.3 MATERIÁL: .....	20
4.4 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	20
4.5 POUŽITÉ METODY .....	21
4.5.1 <i>Selekce rezistentních klonů .....</i>	<i>21</i>
4.5.2 <i>MTS test cytotoxicity.....</i>	<i>23</i>
4.5.3 <i>Expresa MDR transportních proteinů.....</i>	<i>24</i>
4.5.4 <i>Testování nukleosidových transportérů .....</i>	<i>25</i>
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>29</b>
5.1 SELEKCE REZIDENTNÍCH KLONŮ.....	29
5.2 TESTOVÁNÍ SELEKTOVANÝCH LINÍÍ .....	29
5.3 ZÁKLADNÍ CHARAKTERIZACE REZIDENTNÍCH LINÍÍ .....	35
5.3.1 <i>Expresa Pgp a MRP1 .....</i>	<i>35</i>
5.3.2 <i>Expresa nukleosidových transportérů.....</i>	<i>37</i>
5.3.3 <i>Funkční test nukleosidových transportérů .....</i>	<i>39</i>
5.4 TESTOVÁNÍ NOVÝCH POTENCIÁLNÍCH LÉČIV .....	43
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>47</b>
6.1 <i>IN VITRO</i> MODEL Y LÉKOVÉ REZISTENCE NA NUKLEOSIDOVÁ CYTOSTATIKA .....	47
6.1.1 <i>Selekce cytarabinem (Ara-C).....</i>	<i>47</i>
6.1.2 <i>Selekce fludarabinem.....</i>	<i>48</i>
6.1.3 <i>Selekce 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem.....</i>	<i>49</i>
6.1.4 <i>Selekce AB-61 .....</i>	<i>51</i>
6.1.5 <i>Selekce PNH192.....</i>	<i>51</i>
6.1.6 <i>Selekce PNH173.....</i>	<i>52</i>
6.1.7 <i>Souhrn pro selekci nukleosidy.....</i>	<i>53</i>

6.1.8 Aplikace rezistentních buněčných modelů ve screeningu potenciálních léčiv .....	53
6.2 REZISTENCE NA CYTOSTATIKA OBSAHUJÍCÍ VE STRUKTUŘE KOV .....	54
6.2.1 Selektce cisplatinou .....	55
6.2.2 Selektce karboplatinou .....	56
6.2.3 Selektce CuEt .....	56
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>59</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>60</b>



## Seznam symbolů a zkratek

3D-CRT	Trojrozměrná konformní radioterapie
5-FU	5-fluorouracil
6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-thioguanin
6-TIMP	6-thioinosin-5-monofosfát
ABC	z angl. ATP-binding cassette
ALDH	Aldehyd dehydrogenáza
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
AMP	Adenosinmonofosfát
ANLL	Akutní nelymfoblastická leukémie
AraC	Cytarabin
ATP	Adenosintrifosfát
Aza	Azacytidin
BCRP	z angl. breast cancer resistance protein
BRT	Brachyradioterapie
BSA	Hovězí sérový albumin, z angl. bovine serum albumine
CD	Cytidin deamináza
CDK	Cyklin-dependentní kináza
CLL	Chronická lymfoidní leukémie
Clo	Klofarabin
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMP	Cytidin monofosfát kináza
CNS	Centrální nervová soustava
CNT	Koncentrativní nukleosidové transportéry, z angl. concentrative nucleoside transporters
CT	Počítačová tomografie, z angl. computer tomography
CuEt	<u>[(bis (diethyldithiocarbamate)-copper)]</u>
dCK	Deoxycytidin kináza
DCTD	Deoxycytidin deaminasa
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTC	Diethyldithiokarbamat
dUTPáza	Deoxyuridin trifosfatáza
ENT	Ekvilibrativní nukleosidové transportéry
ERT	Externí radioterapie
Eto	Etoposid
FDR	Fludarabin
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GEM	gemcitabin
GSC	Glukosylceramid syntáza
HGPRT	Hypoxantin-guanin fosforybosyltransferáza
HIF	z angl. hypoxia-induced factor
HPMC	Hydroxypropylmethylcelulóza
IC <sub>50</sub>	Polovina maximální inhibiční koncentrace
JNK	c-JUN terminální kináza

LRP	z angl. lung resistance related protein
MAPK	z angl. mitogen-activated protein kinase
MDR	Mnohočetná léková rezistence, z angl. multidrug resistance
MGMT	O(6)-methylguanin-DNA-methyltransferáza
MRD	Minimální reziduální choroba, z angl. minimal residual disease
MRI	Magnetická rezonance, z angl. magnetic resonance imaging
MRP	Protein asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí, z angl. multidrug resistance associated protein
mTOR	z angl. mammalian target of rapamycin
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2h-tetrazolium
NBTI	S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosin
NDPK	Nukleosid-difosfát kináza
NK-κB	Nukleární faktor kappa B
NOR	Národní onkologický registr
NPL4	z angl. nuclear protein localization protein 4
NT5C	5' nukleotidáza
PCR	Polymerázová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
PDX	z angl. patient derived xenograft
PET	Pozitronová emisní tomografie
Pgp	P-glykoprotein
PKM2	Pyruvát kináza M2
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	roskovitin
RTG	Rentgen
TPMT	Thiopurin S-methyltransferáza
TS	Thymidylát syntáza
UMP	Uridin-5-monofosfát kináza
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny v Olomouci
UOCHB	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v Praze

## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Chemická struktura látek využívaných k selekcím rezistentních buněk. Vzorce byly zpracovány v programu MarvinSketch 21.8. ....	23
<b>Obrázek č. 2:</b> Rozložení 384jamkového panelu pro MTS test .....	24
<b>Obrázek č. 3:</b> Schéma rozložení 384jamkového panelu pro funkční test nukleosidových transportérů. ....	28

## Seznam tabulek

- Tabulka č. 1:** Schéma selekce buněčné linie CCRF-CEM nukleosidovými deriváty, CuEt, cisplatinou a karboplatinou. .... 21
- Tabulka č. 2:** Schéma selekce buněčné linie K562 nukleosidovými deriváty, CuEt, cisplatinou a karboplatinou..... 22
- Tabulka č. 3:** Schéma selekce buněčné linie U-87 MG CuEt, cisplatinou a karboplatinou. 22
- Tabulka č. 4:** Hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] parentálních buněk CCRF-CEM, K562, U-87 MG a směrodatné odchyly (sd; z angl. standard deviation). .... 29
- Tabulka č. 5:** Citlivost parentálních a selektovaných linií **CCRF-CEM** (selekce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 30
- Tabulka č. 6:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **CCRF-CEM** (selekce PNH173, PNH192, AB-61) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 30
- Tabulka č. 7:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selekce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 31
- Tabulka č. 8:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selekce PNH173, PNH192, AB-61) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 31
- Tabulka č. 9:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **U-87 MG** (selekce cisplatinou, karboplatinou) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 32
- Tabulka č. 10:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **U-87 MG** (selekce CuEt v DMSO a CuEt nanočásticemi) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 32
- Tabulka č. 11:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **CCRF-CEM** (selekce cisplatinou a karboplatinou) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 33
- Tabulka č. 12:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií CCRF-CEM (selekce CuEt v DMSO a CuEt nanočásticemi) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchyly (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. .... 33

<b>Tabulka č. 13:</b> Citlivosti parentálních a selektovaných linií <b>K562</b> (selekce cisplatinou a karboplatinou) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. ....	34
<b>Tabulka č. 14:</b> Citlivosti parentálních a selektovaných linií <b>K562</b> (selekce CuEt v DMSO a CuEt nanočásticemi) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. ....	34
<b>Tabulka č. 15:</b> Expresse ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) u linie CCRF-CEM a jejích odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii CCRF-CEM a směrodatná odchylka (sd).....	38
<b>Tabulka č. 16:</b> Expresse koncentrativních nukleosidových transportérů (CNT) u linie CCRF-CEM a jejích odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii CCRF-CEM a směrodatná odchylka (sd).....	38
<b>Tabulka č. 17:</b> Expresse ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) u linie K562 a jejích odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii K562 a směrodatná odchylka (sd). ....	39
<b>Tabulka č. 18:</b> Expresse koncentrativních nukleosidových transportérů (CNT) u linie K562 a jejích odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii K562 a směrodatná odchylka (sd). ....	39
<b>Tabulka č. 19:</b> Toxicita nukleosidových inhibitorů.....	40
<b>Tabulka č. 20:</b> Toxicita vybraných nukleosidových látek na parentální linii CCRF-CEM bez a po přidání inhibitoru S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosinu (NBTI).....	42
<b>Tabulka č. 21:</b> Citlivosti parentálních a selektovaných linií <b>CCRF-CEM</b> (selekce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. ....	43
<b>Tabulka č. 22:</b> Citlivosti parentálních a selektovaných linií <b>CCRF-CEM</b> (selekce PNH173, PNH192 a AB61) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.....	44
<b>Tabulka č. 23:</b> Citlivosti parentálních a selektovaných linií <b>K562</b> (selekce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.....	45
<b>Tabulka č. 24:</b> Citlivosti parentálních a selektovaných linií <b>K562</b> (selekce PNH173, PNH192 a AB61) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku. ....	46

## Seznam grafů

- Graf č. 1:** Expres Pgp a MRP1 u parentálních linií CCRF-CEM, K562 a U-87 MG. .... 35
- Graf č. 2:** Expres Pgp a MRP1 u linie CCRF-CEM a jejích odvozených linií selektovaných nukleosidy: cytarabinem (Ara-C), fludarabinem (FDR), 6-merkaptopurinem (6-MP), 6-thioguaninem (6-TG), PNH173, PNH192 a AB61. .... 35
- Graf č. 3:** Expres Pgp a MRP1 u linie CCRF-CEM a jejích odvozených linií selektovaných čtyřmi variantami CuEt, cisplatinou a karboplatinou. .... 36
- Graf č. 4:** Expres Pgp a MRP1 u linie K562 a jejích odvozených linií selektovaných nukleosidy: cytarabinem (Ara-C), fludarabinem (FDR), 6-merkaptopurinem (6-MP), 6-thioguaninem (6-TG), PNH173, PNH192 a AB61. .... 36
- Graf č. 5:** Expres Pgp a MRP1 u linie K562 a jejích odvozených linií selektovaných čtyřmi variantami CuEt, cisplatinou a karboplatinou. .... 37
- Graf č. 6:** Expres Pgp a MRP1 u linie U-87 MG a jejích odvozených linií selektovaných čtyřmi variantami CuEt, cisplatinou a karboplatinou. .... 37
- Graf č. 7:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro **cytarabin** (Ara-C) u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyridamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem a (E) CCRF-CEM selektované PNH192. .... 40
- Graf č. 8:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro **AB61** u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyridamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem, (E) CCRF-CEM selektované PNH173 a (F) CCRF-CEM selektované PNH192. .... 41
- Graf č. 9:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro **PNH173** u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyridamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem, (E) CCRF-CEM selektované PNH173 a (F) CCRF-CEM selektované PNH192. .... 41
- Graf č. 10:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro **PNH192** u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyridamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem, (E) CCRF-CEM selektované PNH173 a (F) CCRF-CEM selektované PNH192. .... 42

## 1. Úvod

Lékové rezistence jsou jedním z významných problémů, s nimiž se musí onkologická terapie potýkat. Každoročně postihne nádorové onemocnění miliony lidí po celém světě, přičemž statistiky uvádějí, že v roce 2020 bylo celosvětově diagnostikováno více než 19 milionů nových případů.<sup>1</sup> Dle informací uvedených v Národním onkologickém registru (NOR) se v České republice jednalo o 67 000 nových případů a bylo zde evidováno 27 468 úmrtí spojených s onkologickou diagnózou.<sup>2</sup> Celosvětově pak zemřelo více než 10 milionů pacientů.<sup>1</sup> Za neúspěšností léčby lze hledat celou řadu příčin, od pozdní diagnostiky onemocnění, přes omezené možnosti chirurgické léčby či radioterapie, až po lékové rezistence, které značně redukuje možnosti výběru vhodných chemoterapeutik.

Aby bylo možné simulovat situaci, která se odehrává v těle pacienta léčeného látkami s cytostatickým, případně cytotoxickým účinkem, je nutné zvolit správný biologický model. Jednou z vhodných variant se zdají být nádorové buněčné linie, u nichž je možné cílenou selekcí vybrat klony s rezistentním fenotypem a ty dále testovat *in vitro* i *in vivo* podmínkách.<sup>3-5</sup> U rezistentních buněčných linií je možné popsat mechanismus vzniku rezistence vůči danému léčivu, a tím otevřít cestu nové potenciální terapii, ověřit senzitivitu rezistentního nádoru na nově vytvořená cytostatika, případně predikovat, jak snadno a zda vůbec bude vznikat na konkrétní léčivo rezistence.<sup>6</sup>

Tato práce je zaměřena jak na selekci rezistentních nádorových buněčných linií, tak na jejich základní charakterizaci, možnosti překonání lékové rezistence a testování nových potenciálních léčiv, která by mohla mít přínos v onkologické terapii.

## **2. Cíle práce**

- Selekcce rezistentních nádorových buněk
- Základní charakterizace rezistentních linií
- Screening nových potenciálních léčiv



### 3. Literární přehled

Onkologická onemocnění tvoří heterogenní skupinu, kterou spojuje nekoordinovaný růst buněk.<sup>7</sup> Dle biologické povahy můžeme tato onemocnění dělit na maligní (zhoubné) či benigní (nezhoubné) nádory. Další dělení může být například dle typu tkáně, které onemocnění postihuje. V případě epitelové tkáně hovoříme o karcinomech, v případě pojivových tkání o sarkomech, u krve o leukémiích, u lymfatické tkáně o lymfomech a při postižení zárodečných buněk o germinálních nádorech.<sup>8</sup>

Každá tkáň je svým způsobem unikátní a je tvořena buňkami, které se diferencovaly a nyní plní svou specifickou funkci. Přestože je jejich genetický základ stejný, jejich expresní profil a s ním spojené vlastnosti mohou být odlišné, což odráží také odlišné biologické chování různých typů nádorů a variabilitu jejich citlivosti na léčbu.<sup>9</sup>

#### 3.1 Karcinogeneze

Vývoj onkologického onemocnění, neboli karcinogeneze, je vícestupňový proces zahrnující mutace v několika klíčových genech. Jedná se zejména o geny regulující apoptózu, tumor supresorové geny a onkogeny, resp. protoonkogeny.<sup>7,10</sup>

Během života je lidské tělo vystaveno působení celé řady mutagenů, přes chemické mutageny obsažené například v jídle (např. akrylamid v tepelně upravovaných potravinách obsahujících škrob), nebo v životním prostředí (např. benzo(a)pyren ve vzduchu v průmyslových oblastech), fyzikální mutageny, jakým je například ultrafialové záření, až po biologické mutageny, kterými mohou být například viry.<sup>11–14</sup> Přesto ne každý člověk onemocní během svého života rakovinou.

Svou zásluhu na tom mají bezesporu reparační mechanismy, které jsou schopny opravit chyby ve struktuře i sekvenci DNA.<sup>15</sup> Tyto chyby mohou vznikat jak působením vnějších vlivů, tak během fyziologických procesů, jakým je například replikace DNA. Udává se, že DNA dependentní DNA polymeráza, zodpovídající za proces replikace DNA, pracuje s chybovostí  $1 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-9}$  na 1 buněčné dělení.<sup>16</sup> Z čehož lze soudit, že intenzivně se dělící buňky (jako jsou například krevní buňky) budou mít vyšší frekvenci výskytu chyb, a tím pádem mohou být náchylnější na rychlejší rozvoj nádorového bujení. Naštěstí jsou za běžných podmínek reparační mechanismy schopny tyto chyby rozpoznat a opravit. Trochu rozvést a doplnit. (replikační stres a jeho vliv na vznik mutací, chybovost při replikaci DNA)? Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6331), 1330–1334.

Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347(6217), 78–81.

Uplatňují se zde například nukleosidové excizní reparace, básová excizní reparace, fotoreaktivaci, tzv. mismatch repair nebo SOS reparace.<sup>15</sup> V případě, že tyto reparační mechanismy nefungují správně, může docházet k rozvoji celé řady patologických stavů, jako je například Xeroderma pigmentosum, Cockaynův syndrom, Wernerův syndrom, Hutchinson-Gilfordův syndrom a jiné.<sup>17-20</sup>

Riziko vzniku onkologického onemocnění je u každého člověka odlišné. Ovlivňuje ho prostředí, v němž daný člověk žije a pracuje, životní styl a také jeho genetické predispozice. Z hlediska dědičnosti lze rozlišovat dvě skupiny onkologických onemocnění **a) monogenně dědičné** (týkající se jednoho alelového páru) a **b) polygenně dědičné** (zahrnující změny ve více alelových párech).<sup>7,8</sup>

Monogenní dědičnost se týká zejména **hereditárních nádorových syndromů**, které tvoří přibližně 5-10 % nádorů.<sup>7</sup> Gen je obvykle vyřazen z funkce až mutací obou alel, přičemž mutace může být děděna od jednoho, ale i od obou z rodičů. V případě, že je děděna pouze jedna defektní alela, může být gen stále plně funkční, ovšem je zde vysoká pravděpodobnost, že během života dojde k mutaci i druhé alely. Vzhledem k vysoké genetické zátěži se tyto hereditární syndromy projevují obvykle již v raném věku, a jsou tedy častější u dětí (tvoří přibližně 15-29 % nádorů dětského věku).<sup>21</sup>

Nejčastějším hereditárním nádorovým syndromem dětského věku je neurofibromatóza typu I s prevalencí 1: 3 000.<sup>21,22</sup> Tento syndrom je podmíněn mutací v tumor-supresorovém genu *NF1* na lokusu 17q11.2.<sup>23</sup> Mezi jeho klinické projevy patří například neurofibromy, café au lait skvrny a Lischovy noduly. Pacienti nesoucí tuto mutaci mají také zvýšené riziko výskytu dalších onemocnění, jako jsou sarkomy, leukémie, nádory centrální nervové soustavy (CNS) nebo gliomy.<sup>24</sup>

Mezi hereditární syndromy vyskytující se v dospělosti patří například hereditární syndrom nádoru prsu a/ nebo ovaria, který je nejčastěji způsoben zárodečnou mutací v genech *BRCA1* a/ nebo *BRCA2*.<sup>25</sup> Ve většině případů je výskyt nádoru prsu sporadický, ale v přibližně 10-20 % má familiární výskyt a v 80-90 % za něj zodpovídají právě mutace genů *BRCA1* nebo *BRCA2*, méně častý je pak výskyt mutace genu *TP53* a *CHEK2*.<sup>26-28</sup>

### 3.2 Onkologická terapie

V klinické praxi se obecně využívají tři přístupy k onkologické terapii. Léčba může být **a) kurativní**, **b) paliativní** a **c) symptomatická**. Kurativní léčba má za cíl kompletní remisi, tj. vyléčení pacienta, paliativní léčba si klade za cíl zlepšení kvality života pacienta, případně zabránit zhoršení průběhu nemoci a symptomatická léčba pouze mírní aktuální průběh nemoci.<sup>8</sup>

**Kurativní léčba** má obvykle charakter chirurgického zákroku a může na ni navazovat léčba adjuvantní, v podobě chemoterapie, radioterapie, imunoterapie, hormonální léčby

apod.<sup>29-31</sup> Chirurgickému zákroku může předcházet také neoadjuvantní léčba sloužící k redukci velikost nádorového ložiska a zničení případných mikrometastáz, což může usnadnit provedení chirurgického zákroku a pomoci zachovat funkčnost postiženého orgánu.<sup>32</sup> Cílem chirurgické léčby je fyzické odstranění populace nádorových buněk z těla pacienta, přičemž se odstraňuje jak primární nádorové ložisko, tak případné uzlinové metastázy. Tento úkol je ovšem mnohdy nesnadný, a to jak díky lokalizaci nádoru, tak díky jeho velikosti. Přestože je raný záchyt rakovinného bujení žádoucí, v případě nehmotného nádoru může být pro chirurga komplikované přesně lokalizovat nádorovou lézi a její hranice.<sup>33</sup> V takových případech je nutná spolupráce s radiologem, který by měl být schopen oblast nádoru spolehlivě označit. K tomuto účelu se využívá například metoda Magseed využívají magnetické zrno nebo například barvení 4% roztokem Carbo adsorbens.<sup>34,35</sup>

Mezi další kurativní postupy můžeme řadit také radioterapii, která se využívá jako samostatná terapie například v léčbě epidermálních karcinomů, nebo karcinomu děložního čípku ve 2. a 3. stádiu.<sup>36-38</sup> Ve většině dalších případů je radioterapie využívána spíše jako doplňková, adjuvantní léčba. Pro radioterapii se využívají umělé radionuklidy <sup>60</sup>Co, <sup>137</sup>Cs nebo <sup>192</sup>Ir a dle umístění zdroje záření rozlišujeme: a) externí radioterapii (ERT) a b) brachyradioterapii (BRT). Při externí radioterapii je zdroj záření umístěn nejčastěji ve vzdálenosti 80 až 100 cm od těla pacienta, zatímco u brachyradioterapie je zdroj zaveden přímo do nádorové tkáně, případně do postiženého orgánu, což umožňuje lépe koncentrovat záření izolovaně, pouze do konkrétní oblasti.<sup>33,39</sup>

Standardní metodou externí radioterapie je trojrozměrná konformní radioterapie (3D-CRT), při níž je dávka záření přizpůsobována nepravidelnému tvaru nádorové léze. Mezi novější metody pak patří stereotaktické ozařování či radioterapie s modulovanou intenzitou svazku.<sup>33</sup> Zajímavé možnosti nabízí také metabolická radioterapie, při které je radionuklid vychytáván konkrétní tkání, díky čemuž se kumuluje pouze v místě nádoru. Takto je využíváno například <sup>153</sup>Sm, které se kumuluje v kostní tkáni, a to zejména v oblastech kostních metastáz.<sup>40</sup>

Chirurgický zákrok, případně radioterapie mohou být doplněny o další adjuvantní léčbu v podobě chemoterapie, při níž jsou podávány látky s cytotoxickým nebo cytostatickým účinkem. Dle mechanismu účinku můžeme tyto látky dělit do sedmi základních skupin: **a) antimetabolity, b) inhibitory mitózy, c) interkalační látky, d) inhibitory topoizomeráz, e) alkylační látky, f) inhibitory reparačních mechanismů a g) induktory apoptózy.**<sup>33,41</sup> Přestože je jejich mechanismus účinku odlišný, obecně se dá říci, že všechny skupiny cílí na buněčnou proliferaci. Proto bývají proliferující buňky chemosenzitivnější, než buňky v klidové fázi. Díky tomu mohou některé nádory reagovat na léčbu až ve chvíli, kdy se jejich buňky přesunou do fáze replikace.<sup>7</sup>

Přestože je chemoterapie obvykle indikována ve formě adjuvantní léčby, v některých případech je využívána jako samostatná terapie. A to zejména u akutní lymfoblastické leukémie (ALL), nádorů varlat, malobuněčného karcinomu plic, Wilmsova tumoru, Hodgkinova lymfomu a některých maligních Nehodgkinských lymfomů.<sup>8,33</sup>

Systémové podávání cytostatik může pomoci zredukovat velikost nádorového ložiska, čehož se využívá v rámci neoadjuvantní léčby a stejně tak může odstranit metastázy v rámci léčby adjuvantní. Přítomnost metastáz je standardně vyšetřována pomocí makroskopických zobrazovacích metod s rozlišovací schopností okolo 5 až 10 mm. Patří sem například ultrasonografie, RTG, CT a MRI vyšetření, scintigrafie nebo PET-CT vyšetření parenchymových orgánů a dutin.<sup>42</sup> Tato vyšetření jsou v některých případech doplňována také o testování pomocí imunohistochemických a molekulárně-biologických metod, jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR), která má vyšší citlivost a je schopna detekovat i mikrometastázy.<sup>43</sup>

### 3.3 Lékové rezistence v onkologii

#### 3.3.1 Inter a intratumorová heterogenita

Nádory jsou velmi variabilní tkáně a můžeme u nich rozlišovat jak intra, tak intertumorovou variabilitu.

**Intertumorová heterogenita** se týká proměnlivosti stejného druhu nádoru u různých pacientů. Zde se projevují odchylky v rámci genetických predispozic pacienta, jeho věku, pohlaví, vystavení rizikovým faktorům apod.<sup>44</sup>

**Intratumorová heterogenita** pak odráží variabilitu v rámci jedné nádorové masy. Ta není obvykle tvořena naprosto identickými buňkami, ale vyskytují se zde buněčné subpopulace, které se mohou vzájemně lišit svou genetickou výbavou. Přítomnost těchto subpopulací může být dána jak chybovostí během replikace DNA (zejména u rychle proliferujících nádorů), tak vlivem exogenních mutagenů. Rakovinné buňky mívají navíc velmi často poškozené DNA reparační mechanismy, což přispívá ke kumulaci genetických chyb. Typické solidní nádory obsahují okolo 30 až 70 mutací, které se akumulovaly během procesu karcinogeneze, ovšem většina z nich nemá vliv na rychlost růstu nádoru a jeho případné metastazování. Předpokládá se, že pouze přibližně 5 až 10 % procent těchto mutací dává nádorovým buňkám růstovou výhodu.<sup>45</sup>

Díky těmto odlišnostem mohou být jednotlivé nádorové subpopulace rovněž různou měrou senzitivní na onkologickou léčbu. Přestože tedy může dojít u pacienta během léčby k dočasné remisi, přetrvávající nádorová ložiska, která byla schopna dané léčbě odolávat, mohou dát vzniknout novým, rezistentním nádorům, vedoucím ke klinickému relapsu.

Z tohoto důvodu je nutná správná volba léčebného postupu a odstranění celé nádorové masy včetně případných metastáz.<sup>44,46</sup>

Stav, kdy dochází k remisi, přestože se v těle nacházejí (mikro)metastázy, se označuje jako minimální reziduální choroba (MRD) a její detekce je klíčovým faktorem pro stanovení prognózy pacienta. S rozvojem molekulárně-biologických metod došlo k značnému pokroku v možnostech detekce a zejména pak kvantifikace nádorových buněk ve vzorku tkáně/krve pacienta. Cytologické vyšetření je možné nahradit například detekcí pomocí real-time PCR, která nabízí vyšší citlivost než dříve využívané mikroskopické metody a díky tomu spolehlivější diagnostiku přítomnosti/ nepřítomnosti metastáz nebo cirkulujících nádorových buněk.<sup>43,47</sup>

### 3.3.2 Mnohočetná léková rezistence

Lékové rezistence je možné rozdělit do několika skupin. Přírozená rezistence vyskytující se již při prvním podání léčiva se označuje jako primární rezistence. Dojde-li ke vzniku rezistentního fenotypu během léčby, případně při opakovaném podání stejného léčiva, hovoříme o sekundární rezistenci. V takovém případě pravděpodobně došlo k selekci rezistentní subpopulace nádorových buněk.<sup>48</sup>

Lékové rezistence mohou vznikat mezi látkami s podobnou chemickou strukturou, případně s podobným mechanismem účinku, tento stav se označuje jako zkřížená rezistence. Existují ovšem také případy, kdy vzniká rezistence na látky s naprosto odlišnou strukturou a zcela jiným mechanismem účinku, v takovém případě se jedná o mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR, multidrug resistance). Tu můžeme dále dělit na typickou (spojenou se změnami v expresi P-glykoproteinu) a atypickou (spojenou se změnami v expresi jiných proteinů).<sup>49</sup>

P-glykoprotein (Pgp) je nejdéle známý protein spojovaný s MDR fenotypem. Poprvé byl popsán v roce 1976 u ovariálních buněk křečka rezistentních ke kolchicinu, které rovněž vykazovaly silnou rezistenci k celé řadě amfifilních léčiv.<sup>50</sup> Pgp je transmembránový protein o velikosti 170 Da, který je produktem genu *mdr1* nacházejícím se na lokusu 7q21.<sup>51</sup> Jedná se o ATP-dependenční efluxní pumpu, která je běžně exprimována v tkáních, v nichž zajišťuje ochranu před případným toxickým účinkem látek endogenního i exogenního původu. Pgp je exprimován například v hepatocytech, enterocytech nebo nefrocytech, ale nachází se také u buněk důležitých tělních bariér, jako je například hematoencefalická bariéra, placenta nebo hematotestikulární bariéra, u nichž limituje transport mezi tkání a krví.<sup>52</sup>

Zvýšení exprese P-glykoproteinu bylo pozorováno u celé řady onkologických onemocnění, přičemž zvýšené množství tohoto proteinu v membráně způsobuje snížení efektivity léčiv, které jsou jeho substráty, což vede k rozvoji MDR fenotypu.<sup>53</sup> Substráty Pgp jsou strukturně velmi rozmanitou skupinou. Patří mezi ně například steroidní hormony, ale

také celá řada léčiv, jako je cyklosporin, dexametazon, etoposid, paklitaxel, tetracyklin, vinblastin a jiné.<sup>54</sup> Identifikace léčiva jako Pgp substrátu může mít významnou roli v predikci jeho farmakodynamických parametrů a s nimi související účinnosti.<sup>55</sup>

P-glykoprotein patří do proteinové rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů.<sup>54</sup> Do stejné rodiny patří také další skupiny proteinů, jejichž změněná exprese je spojována se vznikem MDR fenotypu, jedná se o MRP (multidrug resistance associated protein) a BCRP (breast cancer resistance protein).<sup>56-58</sup>

Ve skupině MRP proteinů bylo identifikováno 9 členů nesoucí označení MRP1-9. Stejně jako Pgp, také MRP proteiny jsou exprimovány v normálních tkáních, najdeme je zejména v buňkách tělních bariér (např. hematoencefalické bariéry), kde ovlivňují transport endogenních substrátů i xenobiotik.<sup>59</sup> Mezi substráty MRP transportérů patří například kyselina listová, žlučové kyseliny, vinca alkaloidy, antracykliny, cisplatina, 5-fluorouracil, cytarabin, fludarabin, 6-merkaptopurin, 6-thioguanin nebo gemcitabin.<sup>57-63</sup> Zvýšená exprese MRP proteinů byla zjištěna u celé řady onkologických onemocnění, například u pacientů s rakovinou prsu (zejména MRP1 a 8)<sup>64</sup>, rakovinou plic (MRP1 – 3)<sup>65</sup>, kolorektálním karcinomem (MRP1 a 2)<sup>66</sup> nebo rakovinou prostaty (MRP1)<sup>67</sup>.

Také protein BCRP je exprimován v normálních tkáních a jeho fyziologickou funkcí je ochrana před toxickými účinky xenobiotik a ochrana buněk před hypoxií prostřednictvím udržování homeostázy hemu a folátů.<sup>68,69</sup> Najdeme ho například v buňkách hematoencefalické bariéry, hematotestikulární bariéry, střev, placenty, kmenových buňkách nebo buněk ledvin.<sup>56</sup> Jeho zvýšená exprese mění farmakokinetické parametry látek, které jsou jeho substráty (intestinální absorpci, eliminaci skrz játra a ledviny a plazmatickou clearance), což může snižovat jejich účinnost. V klinické praxi bývá vyšší exprese BCRP proteinu pozorována například u pacientek s rakovinou prsu, ale také u hematologických malignit, jako je například ALL.<sup>69-71</sup> Přírodními substráty BCRP proteinu jsou například kyselina listová, steroidní molekuly nebo protoporfyrin. Mezi léčiva transportovaná pomocí BCRP patří například flavopyridol, mitoxantron, fludarabin, 6-merkaptopurin, 5-fluorouracil nebo metotrexát, který je analogem kyseliny listové.<sup>68,69</sup>

Dalším proteinem spojovaným s MDR je LRP (lung resistance related protein), který byl popsán v roce 1993.<sup>72</sup> Jedná se o tzv. „vault protein“ přirozeně exprimovaný například u makrofágů nebo v buňkách epitelů. Vaults jsou multi-podjednotkové struktury zapojené zejména do transportu léčiva z jádra do cytoplazmy. Zvýšená exprese LRP proteinu je spojována s horší odpovědí na léčbu, a to zejména v případě chronické myeloidní leukémie (CML) a ovariálního karcinomu.<sup>73</sup> Mezi substráty LRP patří například rapamycin, 5-fluorouracil nebo mitoxantron.<sup>74</sup>

### 3.3.3 Rezistence na nukleosidová cytostatika

Nukleosidy jsou skupinou biologicky aktivních látek, které se svou strukturou podobají základním stavebním kamenům DNA. Léčiva s nukleosidovou strukturou jsou využívána například jako antivirotika nebo cytostatika. V obou případech tyto látky cílí na replikaci nukleových kyselin.<sup>75</sup> V této práci byla použita následující cytostatika s nukleosidovým strukturním základem: cytarabin (Ara-C), fludarabin (FDR), 6-merkaptopurin (6-MP) a 6-thioguanin (6-TG), pomocí nichž byly selektovány rezistentní nádorové linie. Pro testování zkřížené rezistence byla využita také další nukleosidová cytostatika a to: roskovitin (ROS), gemcitabin (GEM) a 5-fluorouracil (5-FU). Tato léčiva jsou v klinické praxi schválena k léčbě leukémií, lymfomů a v některých případech i solidních nádorů.<sup>76,77</sup>

Jedním ze základních mechanismů vzniku rezistence na nukleosidová cytostatika je změna míry exprese membránových transportérů sloužících k přenosu nukleosidů z/ do buňky. Tyto změny se mohou týkat jak proteinů spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí (Pgp, MRP, BCRP, LRP), tak proteinů specializovaných na transport nukleosidů. Zde rozlišujeme ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) a koncentrativní nukleosidové transportéry (CNT), přičemž ENT mohou fungovat jako influxní i efluxní pumpy, zatímco CNT umožňují pouze influx.<sup>78-80</sup>

Ekvilibrativní nukleosidové transportéry patří do proteinové rodiny SLC29 a v současnosti jsou popsáni čtyři její členové s označením ENT1-4.<sup>78</sup>

ENT1 transportér je exprimován napříč celým tělem. Najdeme ho například u erytrocytů, hepatocytů, kardiomyocytů, ale také u neuronů či gliových buněk. Kromě cytoplazmatické membrány bývá exprimován také v membráně mitochondrií.<sup>81-83</sup> ENT1 slouží k transportu purinů i pyrimidinů a mezi jeho substráty patří také celá řada xenobiotik, například ribavirin, gemcitabin, cytarabin, 6-merkaptopurin a fludarabin.<sup>84-88</sup>

ENT2 transportér je stejně jako ENT1 široce exprimován napříč nejrůznějšími tkáněmi. Najdeme ho u mimo jiné u buněk placenty, prostaty, brzlíku, pankreatu, ledvin, gliových buněk, neuronů nebo kardiomyocytů, přičemž nejvyšší zastoupení je v buňkách kosterních svalů (rhabdomyocytech). Opět se jedná o transportér zajišťující přenos jak purinů, tak pyrimidinů a nachází se zejména v cytoplazmatické membráně.<sup>78,89,90</sup> Mezi substráty ENT2 patří například fludarabin, gemcitabin, 6-merkaptopurin, 6-thioguanin a 5-fluorouracil.<sup>81,91-93</sup>

ENT3 transportér je exprimován zejména v membráně lysozomů a své maximální aktivity dosahuje při hodnotě pH 5,0.<sup>94</sup> Nachází se také v cytoplazmatické membráně a membráně mitochondrií. Z hlediska tkání jej najdeme například v placentě. Substrátem ENT3 transportéru je například azacytidin.<sup>89,94</sup>

ENT4 transportér je silně exprimován zejména v mozkové tkáni a svou substrátovou specifitou odpovídá spíše SCL22 proteinové rodině, která transportuje malé endogenní molekuly mezi tkáněmi a tělními tekutinami (najdeme je například v oblasti choroidního plexu, hepatocytech nebo proximálních tubulech ledvin), než ostatním členům SLC29 proteinové rodiny.<sup>89,95</sup> Typickým endogenním substrátem ENT4 transportéru jsou například neurotransmitery serotonin a dopamin. Kromě lokalizace v mozkové tkáni (choroidní plexus, hippocampus, cortex atd.) je ENT4 exprimován (stejně jako SLC22) v játrech a ledvinách, kde hraje významnou roli při transportu látek skrz membránové bariéry, přičemž jeho afinita k nukleosidům je poměrně slabá.<sup>96</sup>

CNT1 transportér je exprimován zejména v játrech, ledvinách, tenkém střevě, makrofázích kostní dřeně, ale také v některých oblastech mozku. Tento transportér přenáší zejména látky s pyrimidinovou strukturou a mezi jeho substráty patří celá řada léčiv, například zidovudin, zalcitabin, cytarabin a gemcitabin.<sup>97,98</sup>

CNT2 je stejně jako jiné nukleosidové transportéry exprimován napříč širokým spektrem tkání. Najdeme ho v ledvinách, srdci, kosterním svalstvu, tenkém střevě, pankreatu, ale například také v placentě.<sup>99</sup> Jeho přirozenou funkcí je transport látek s purinovou strukturou a mezi tyto patří také některá léčiva, například ribaviridin, kladribin, klofarabin a fluoropyrimidiny (5-fluorouracil).<sup>90,100</sup>

CNT3 transportér se nachází v cytoplazmatické membráně buněk pankreatu, průdušnice, prsních žláz, kostní dřeně a střeva. V nižší míře je exprimován také v plicích, játrech, placentě, varlatech, předstojné žláze a také v některých oblastech mozkové tkáně, srdce a nosní sliznice.<sup>101</sup> Substráty CNT3 jsou jak puriny, tak pyrimidiny a kromě endogenních látek (adenosin, guanosin, thymidin apod.) jsou jím transportována i léčiva, jako jsou například gemcitabin, cytarabin, fludarabin, kladribin a další.<sup>102–104</sup>

#### Cytarabin (Ara-C, cytosin arabinosid)

Cytarabin je analog pyrimidinu využívající se k léčbě různých forem leukémie (ALL, ANLL, AML, CML) a Nehodgkinského lymfomu.<sup>105,106</sup> Cytarabin je v klinické praxi využíván pro léčbu rakoviny od roku 1969 a od 90.let 20.století je využíván v kombinované terapii s jinými cytostatiky, přičemž kombinace léčiv zvyšuje efektivitu léčby.<sup>107</sup> V léčbě akutní myeloidní leukémie (AML) se využívá kombinace cytarabinu například s azacitidinem (Aza), etoposidem (Eto), klofarabinem (Clo) nebo fludarabinem.<sup>108–110</sup> V roce 2018 bylo popsáno proléčivo s označením BST-236, které je konjugátem cytarabinu a asparaginu a na cytarabin se metabolizuje až po vstupu do rakovinné buňky.<sup>111</sup> Volný cytarabin je pak fosforylován do své aktivní formy, cytarabinu trifosfátu (Ara-CTP).<sup>112</sup> Tento metabolit se následně váže do struktury DNA během S fáze buněčného cyklu a v místě jeho začlenění končí syntéza nového řetězce, čímž dochází k inhibici procesu replikace DNA.<sup>113</sup> Rezistence na cytarabin je obvykle



spojována se sníženou expresí ENT1 transportéru, který je hlavní cestou průchodu cytarabinu do buňky, se snížením aktivity deoxycytidin kinázy (dCK), která jej fosforyluje na aktivní formu Ara-CTP, nebo zvýšením exprese enzymů, které jej degradují (cytidin deamináza, 5'-nukleotidáza).<sup>114</sup>

#### Fludarabin (FDR, 2-F-Ara-A)

Fludarabin je analog adeninu využívající se zejména v léčbě chronické lymfoidní leukémie (CLL).<sup>115</sup> Fludarabin je podáván ve formě monofosfátu (2-F-Ara-AMP; FAMP) jako proléčivo, které se následně defosforyluje na 2-F-Ara-A. V této formě prochází fludarabin do buněk, kde je fosforylován deoxycytidin kinázou na aktivní formu 2-F-Ara-ATP. Tento metabolit se následně váže na DNA primázu, DNA polymerázu  $\alpha$  a ribonukleotid reduktázu, čímž inhibuje proces syntézy DNA.<sup>116,117</sup> Snížená aktivita deoxycytidin kinázy, stejně jako zvýšená exprese P-glykoproteinu způsobují snížení koncentrace aktivní formy fludarabinu v intracelulárním prostředí buněk. S tím souvisí snížená citlivost leukemických buněk na léčbu fludarabinem, která byla popisována v *in vitro* i *in vivo* testech.<sup>118,119</sup> Analýzou vzorků pacientů trpících CLL byla prokázána rovněž spojitost mezi zvýšenou expresí glukosylceramid syntázy (GSC) a rezistencí na fludarabin. Tento enzym převádí ceramid na glukosylceramid inhibující apoptózu, usnadňující přežívání buněk a podporující jejich proliferaci a díky tomu vznik rezistentního fenotypu.<sup>118</sup>

#### 6-merkaptopurin (6-MP)

6-merkaptopurin je analogem hypoxantinu a využívá se v léčbě akutní lymfoblastické leukémie (ALL), chronické myeloidní leukémie (CML) a autoimunitních onemocnění.<sup>120,121</sup> 6-merkaptopurin je podáván ve formě proléčiva, které je transportováno v inaktivní formě do buňky, tam je následně metabolizováno hypoxantin-guanin fosforybosyltransferázou (HGPRT) na 6-thioinosin-5-monofosfát (6-TIMP). 6-TIMP je následně metabolizován dvojitým způsobem: a) thiopurin S-methyltransferázou (TPMT) na 6-methyl-merkaptopurin ribonukleotidy, které inhibují syntézu purinů a b) inosin-5-monofosfát dehydrogenázou na 6-thioguanin nukleotidy, které se blokují syntézu DNA i RNA.<sup>122-124</sup> Mechanismus rezistence na 6-MP byl spojován se sníženou aktivitou enzymů metabolizujících ho na jeho aktivní formu, nicméně v posledních letech se objevují práce poukazující na vliv inhibice mTOR komplexu 1 (mTOR-C1) na rozvoj tohoto rezistentního fenotypu.<sup>125-127</sup>

#### 6-thioguanin (6-TG)

6-thioguanin je metabolitem 6-merkaptopurinu. Jedná se analog guanosinu a jako cytostatikum se využívá v léčbě akutní myeloidní leukémie (AML) a akutní lymfoblastické leukémie (ALL). Stejně jako jiná léčiva ze skupiny antimetabolitů je také 6-thioguanin fosforylován na svou aktivní formu. Tuto fosforylaci zajišťuje hypoxantin-guanin-fosforybosyltransferáza (HGPRT), fosforyluje 6-TG nejprve na difosfát (6-TGDP) a následně

na trifosfát (6-TGTP), který se inkorporuje do struktury DNA i RNA, což vede k inhibici procesu syntézy DNA i RNA a následně až k buněčné smrti.<sup>121,128</sup> Snížená citlivost leukemických buněk na 6-thioguanin je obvykle spojována se sníženou expresí HGPRT, která jej fosforyluje na aktivní formu, přičemž bylo zjištěno, že počet rezistentních klonů nesoucích mutaci pro HGPRT roste u pacientů exponenciálně s věkem.<sup>129,130</sup> Studie provedené na buňkách lidského melanomu ukazují, že rezistence na 6-TG může souviset také s vyšší expresí O(6)-methylguanin-DNA-methyltransferázy (MGMT), což je enzym zajišťující opravné mechanismy DNA a rozpoznávající báze analogy začleněné do DNA, konkrétně O(6)-alkylovaný guanin.<sup>131</sup>

### 5-fluorouracil (5-FU)

5-fluorouracil je analogem pyrimidinu, který je využíván u širokého spektra onkologických onemocnění, a to jak v mono, tak v kombinované terapii. Ze studií vyplývá, že většina molekul 5-fluorouracilu je po podání katabolizována na inaktivní metabolity a na cytotoxickém efektu se podílí jen 1– 3 % z původního množství léčiva.<sup>132</sup> Aktivními metabolity 5-FU jsou fluorouridin trifosfát (FUTP), který se inkorporuje do RNA, fluorodeoxyuridin trifosfát (FdUTP) inkorporující se do struktury DNA a fluorodeoxyuridin monofosfát (FdUMP) inhibující enzym thymidylát syntázu (TS), který je významný pro syntézu thymidinu a jeho inhibice způsobuje poškození struktury DNA během replikace a reparačních mechanismů.<sup>133</sup> Pro 5-FU byla popsána celá řada mechanismů vzniku lékových rezistencí. Souvisely jak s vysokou expresí TS, tak se zvýšenou aktivitou deoxyuridin trifosfátázy (dUTPáza), která fosforyluje 5-FU na jeho aktivní metabolity, případně s methylací genu *MLH1* kódujícího MLH1 protein podílející se na reparačních mechanismech DNA nebo se zvýšenou expresí proteinů Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 nebo Pgp.<sup>134–140</sup>

### Gemcitabin (GEM)

Gemcitabin je analogem cytidinu s vysokou aktivitou vůči širokému spektru nádorových onemocnění. V klinické praxi se využívá například k léčbě nemalobuněčného karcinomu plic, rakoviny pankreatu a ovaria, metastazující rakoviny prsu, karcinomu močového měchýře, ale také hematologických malignit.<sup>141,142</sup> Gemcitabin je transportován do buněk zejména pomocí nukleosidových transportérů, přičemž hlavní roli zde hraje ENT1 transportér. V menší míře je gemcitabin transportován také ENT2 a 3 a CNT1 a 3.<sup>79,89,142</sup> Gemcitabin je po vstupu do buňky fosforylován dCK na gemcitabin-monofosfát. Další dvě fosforylace zajišťují UMP/CMP kináza (CMPK1) a nukleosid-difosfát kináza (NDPK).<sup>143</sup> Ve formě trifosfátu je následně gemcitabin začleněn do struktury DNA i RNA. Hlavní cestou deaktivace gemcitabinu je jeho deaminace cytidin deaminázou (CD) na 2'2'-difluorodeoxyuridin (dFdU). Další inaktivační kroky jsou například deaminace gemcitabin-monofosfátu deoxycytidin deaminasou (DCTD) nebo jeho defosforylace pomocí

5'nukleotidázy (NT5C).<sup>144</sup> Mechanismus rezistence na gemcitabin obvykle souvisí se změnami v dráze jeho metabolismu – rychlejší degradací, nebo inaktivací enzymů zajišťujících jeho fosforylaci. Stejně tak bývá u buněk rezistentních na gemcitabin popisována zvýšená exprese ABC transportérů, přičemž gemcitabin je substrátem Pgp i MRP proteinu.<sup>60</sup> Studie ukazují, že do gemcitabinové rezistence mohou být zapojeny také AKT, MAPK, HIF-1 $\alpha$  a NF- $\kappa$ B dráhy.<sup>145–148</sup>

#### Roskovitin (seliciclib, CYC-202)

Roskovitin je derivátem purinu inhibujícím cyklin-dependentní kinázy (CDK) skrz kompetici v ATP-vazebném místě. Velmi dobře inhibuje CDK1, 2, 5, 7 a 9, ale je poměrně slabým inhibitorem CDK4, 6 a 8.<sup>149</sup> Díky inhibici CDK zastavuje buněčný cyklus, čímž brání proliferaci nádorových buněk. Roskovitin je experimentálním léčivem, jehož aktivita byla sledována v rámci fáze I a II klinických testů. Fáze I zahrnovala testování aktivity u celé řady solidních nádorů, například u adenokarcinomu, hepatocelulárního karcinomu, nasofaryngeálního karcinomu nebo nemalobuněčného karcinomu plic, přičemž roskovitin byl podáván ve formě mono i kombinované terapie.<sup>150</sup> V druhé fázi klinických testů byl roskovitin podáván pacientům s diagnózou nemalobuněčného karcinomu plic, avšak tyto testy neprokázaly vliv léčby na delší dobu přežívání pacientů v porovnání s placebem.<sup>151</sup> Vzhledem k tomu, že roskovitin prozatím není standardně využíván v klinické praxi, nebyl u něj zatím popsán *in vivo* vznik lékové rezistence.<sup>149</sup> *In vitro* studie nicméně rozvoj rezistentního fenotypu popisují. Například na buňkách lidského kolorektálního karcinomu (HCT116) rezistentního na flavopyridol byla pozorována zkřížená rezistence právě s roskovitinem, přičemž tento fenotyp nesouvisel s mírou exprese transportérů Pgp ani MRP.<sup>152</sup>

### **3.3.4 Rezistence na cytostatika obsahující ve struktuře kov**

#### Cisplatina

Cisplatina je nejstarším z platinových cytostatik a vyznačuje se poměrně širokým spektrem možné klinické aplikace. V onkologii se využívá například k léčbě ovariálního karcinomu, germinálních nádorů, lymfomů nebo sarkomů. Mechanismus účinku spočívá v interkalaci do struktury DNA, narušení reparačních mechanismů DNA a indukování apoptózy.<sup>153,154</sup> Pacienti léčení cisplatinou mívají obvykle velmi dobrou primární odpověď na léčbu, ovšem není zde výjimkou klinický relaps způsobený vznikem lékové rezistence.<sup>155</sup> Za rozvojem rezistentního fenotypu může stát v případě cisplatinu více faktorů: a) zvýšená exprese efluxních pump snižující koncentraci léčiva uvnitř buňky (cisplatina je substrátem pro MRP protein), b) zvýšená exprese metalothioneinů, které se váží na cisplatinu a inaktivují ji, c) zvýšená exprese glutathion-S-transferázy inhibující signální dráhu c-Jun terminální kinázy (JNK), a tím blokující apoptózu nebo d) snížená exprese proteinu p21, který je inhibitorem cyklin-dependentních kináz a je tedy schopen zastavit proliferaci poškozené buňky.<sup>155–159</sup>

## Karboplatina

Karboplatina patří do druhé generace platinových cytostatik. Je metabolizována intracelulárně na svou aktivní formu, přičemž se vytvářejí platinové komplexy, které se váží na nukleofilní části ve struktuře DNA (zejména na guanin a cytosin). Její začlenění do DNA vede k narušení buněčného růstu a indukci apoptózy.<sup>153,160</sup> V klinické praxi je karboplatina využívána například k léčbě ovariálního karcinomu a malobuněčného karcinomu plic, přičemž oproti cisplatině vykazuje nižší orgánovou toxicitu. Výhodou karboplatiny je také vyšší stabilita v krevní plazmě oproti cisplatině (6x delší biologický poločas) a menší výskyt nežádoucích účinků.<sup>153,161</sup> Mechanismus vzniku rezistence na karboplatinu je podobný rezistenci na cisplatinu a mezi těmito dvěma léčivy vzniká poměrně často zkřížená rezistence.<sup>162</sup>

## CuEt [(bis (diethyldithiocarbamate)–copper)]

CuEt je experimentální látkou, která doposud nebyla zařazena do běžné klinické praxe. Jedná se o metabolit disulfiramu, u nějž byly již dříve pozorovány protinádorové účinky, ovšem mechanismus účinku nebyl zcela znám.<sup>163–165</sup> V roce 2017 byla publikována práce popisující blíže metabolismus disulfiramu v lidském organismu, přičemž bylo zjištěno, že je metabolizován na diethyldithiokarbamát (DTC) a následně formuje komplex s mědí (CuEt), který stojí za protinádorovými účinky disulfiramu.<sup>166</sup>

Pro testování mechanismu účinku CuEt byly použity buňky MDA-MB-231 (karcinom prsu), které byly následně aplikovány do myši. Bylo zjištěno, že právě tyto měďnaté komplexy jsou hlavní aktivní molekulou, která zodpovídá za protinádorové účinky disulfiramu. Mechanismus účinku CuEt spočívá ve vazbě na NPL4 protein (nuclear protein localization protein 4), který je zapojen do ubiquitinace proteinů, přičemž vazba CuEt způsobí jeho agregaci.<sup>166,167</sup> Tím je narušena dráha zahrnující formování komplexu p97-NPL4-UFD1, což vede k buněčné smrti.<sup>166</sup>

V roce 2021 byla následně publikována další práce zkoumající vliv CuEt na progresi kolorektálního karcinomu. V této práci bylo zjištěno, že CuEt nejen potlačuje množení nádorových buněk, ale rovněž redukuje metabolismus glukózy. Pomocí RNA-seq analýzy byl identifikován cílový gen působení CuEt, a to ALDH1A3, což je isoforma aldehyd dehydrogenázy (ALDH). V rámci *in vitro* a následně také *in vivo* experimentů byla popsána interakce ALDH1A3 s PKM2, což je isoenzym glykolytický působící pyruvát kinázy, což vede k redukcí aerobní glykolýzy.<sup>168</sup>

### 3.4 Buněčné modely

Biologické modely jsou významným nástrojem pro pochopení mechanismů patogeneze dosud popsaných onemocnění, což dává prostor identifikaci biologických markerů, cílené terapii a napomáhá vývoji nových léčiv. Neustálý vývoj molekulárně-biologických metod nám umožňuje stále přesněji identifikovat terapeutické cíle, na něž je možné zaměřit léčbu a ta se tak stává mnohem efektivnější. V minulosti se využívaly zejména zvířecí modely, které mají své nesporné výhody i nevýhody. Mezi nevýhody zvířecích modelů můžeme řadit například nemožnost testování obsáhlých knihoven chemických látek v krátkém čase, finanční náročnost, velké nároky na prostory, v nichž jsou zvířata chována a složitou legislativu související s povolením testů na zvířatech, nemluvě o etické stránce věci. Výhodou je zde pak vyšší úroveň organizace biologického systému, než je tomu například u *in vitro* buněčných kultur, možnost testování metabolismu jednotlivých léčiv, sledování akutní i chronické toxicity, vlivu na graviditu apod.<sup>169</sup>

Práce s *in vitro* modely, jako jsou nádorové buněčné linie, je v porovnání se zvířecími modely mnohem snadnější. Buňky jsou kultivovány v kultivačních lahvích, přičemž jedna lahev jich může obsahovat miliony. Navíc je možné je poměrně snadno namnožit, čímž získáváme prakticky neomezený zdroj biologického materiálu pro experimenty. Buněčné modely jsou ideální pro primární selekci biologicky aktivních látek – je možné otestovat aktivitu stovek/tisíců látek v poměrně krátkém čase, jejich případnou toxicitu, buněčný metabolismus apod. Díky informacím získaným z primárních testů je možné testovat v *in vivo* podmínkách pouze nejzajímavější kandidáty, čímž se ušetří nejen čas, ale také se značně zredukuje množství laboratorních zvířat potřebné pro experimenty.<sup>169–171</sup>

Bohužel ne všechny buněčné typy lze kultivovat *in vitro* a vytvořit tak buněčný model (problematická je zejména *in vitro* kultivace neuronů).<sup>172</sup> Nicméně pro celou řadu onkologických onemocnění, jako je například leukémie, adenokarcinom, osteosarkom nebo glioblastom, tyto buněčné modely existují a pomáhají ve výzkumu jejich léčby. Stejně tak je možné kultivovat *in vitro* například kmenové buňky, a to jak indukované pluripotentní kmenové buňky, tak ty embryonální.<sup>173–175</sup>

Nádorové buněčné modely lze buďto komerčně zakoupit, nebo vytvořit z nádorové tkáně pacienta. V případě komerčních linií je práce mnohem snadnější a rychlejší. Navíc lze velmi dobře popsat původ a „stáří“ buněk a experimenty provedené s využitím těchto modelů jsou velmi dobře reprodukovatelné, protože se vždy vychází ze stejného biologického materiálu.

Naproti tomu buněčné modely odvozené od tkáně pacienta jsou specifické pouze pro jeden konkrétní případ a replikování výsledku je prakticky nemožné, pokud nedojde k odebrání nádorové tkáně stejného pacienta, a i tak je zde pravděpodobnost určité variability

díky intratumorové heterogenitě.<sup>176,177</sup> Nespornou výhodou je zde fakt, že získáme relevantnější informace pro daného pacienta, ovšem převést odebranou nádorovou tkáň na *in vitro* model není úplně snadný úkol, který je navíc časově poměrně náročný.

Proto se častěji volí *in vivo* model, označovaný jako PDX (z angl. patient derived xenograft) umožňující testovat pacientův nádor v živém organismu. Tímto organismem bývají imuno-deficientní myši s cíleně potlačenou imunitou, což zredukuje riziko případného odmítnutí lidských buněk jejich imunitním systémem.<sup>178</sup> PDX modely pak umožňují sledovat růst nádorů v živém organismu a testovat jejich odpověď na cytostatika, případně jiné druhy léčby, například radioterapii, přičemž výsledky mají relevantní klinický význam pro daného pacienta a mohou pomoci s plánováním jeho terapie.<sup>179</sup>

### 3.4.1 Rezistentní nádorové linie

Rezistentní nádorové linie mohou být vytvořeny jak v *in vitro* podmínkách (například cílenou selekcí s eskalačním zvyšováním koncentrace cytostatika, což je metodika, která byla využita v praktické části této práce) tak v *in vivo* podmínkách v těle pacienta léčeného danou látkou. V tomto případě ovšem narážíme na stejný problém jako při vytváření *in vitro* buněčných modelů z tkáně pacienta. Opět se jedná o poměrně složitý a časově náročný proces, který si žádá pokročilé zkušenosti s prací s tkáňovými kulturami. Naproti tomu selekce v *in vitro* podmínkách může začít prakticky okamžitě po nasazení buněk do kultivační lahve.

Obecně se popisují dva základní postupy selekce rezistentních klonů: a) eskalační přístup, při němž jsou látky nejprve selektovány nízkou koncentrací cytostatika a při optimálních podmínkách životnosti a koncentrace buněk je tato navyšována a b) selekce vysokou dávkou, odpovídající například 5-ti až 10-ti násobku hodnoty  $IC_{50}$  (poloviny maximální inhibiční koncentrace).<sup>180,181</sup>

Výsledkem by měla být selekce buněčných klonů se změněnou expresí genů, případně klonů nesoucích mutaci v sekvencích DNA zodpovědných za rozvoj rezistentního fenotypu. Velmi často se jedná se o změny v expresi membránách transportérů, inhibici aktivačních enzymů, resp. zvýšenou expresi enzymů zajišťujících biodegradaci dané látky.<sup>182</sup> Na těchto buňkách je možné sledovat změny vedoucí k vzniku daného rezistentního fenotypu, přičemž získané informace nám mohou pomoci lépe pochopit, k čemu může docházet v těle pacienta, jakými mechanismy se nádorové buňky brání chemoterapii, a jak zacílit novou terapii, aby se vzniku rezistence předešlo, případně abychom byli schopni tento rezistentní fenotyp překonat.

Rezistentní nádorové linie jsou vhodný model pro primární screening nových potenciálních léčiv. Díky velkokapacitním screeningovým laboratorům je možné poměrně snadno otestovat velké množství látek a vybrat ty, které jsou vysoce aktivní na rezistentních nádorových liniích a zároveň netoxické pro fyziologické tkáně. Samozřejmě cesta od pozitivních výsledků v primárním screeningu až po nové léčivo, je dlouhá a komplikovaná,

ale tyto prvotní informace jsou podstatným krokem pro selekci zajímavých struktur, kterými má smysl se dále zabývat.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

V práci byly použity buněčné linie CCRF-CEM, K562 a U-87MG ATCC, které byly kultivovány při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Kultivační médium obsahovalo antibiotika (směs penicilín/streptomycin, Gibco, kat. číslo: DH150) a 10 % hovězího fetálního séra (Gibco, kat. číslo: 10270106).

- a) **CCRF-CEM** (ATCC, kat. číslo: CCL-119): akutní lymfoblastická leukémie (ALL)
  - Kultivační médium: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, kat. číslo: FG1215)
- b) **K562** (ATCC, kat. číslo: CCL-243): chronická myeloidní leukémie (CML)
  - IMDM (Isove's Modified Dulbecco's Medium; Sigma-Aldrich, kat. číslo: I7633)
- c) **U-87MG ATCC** (ATCC, kat. číslo: HTB-14): glioblastom
  - MEM (Minimum Essential Medium Eagle; Sigma-Aldrich, kat. číslo: M2279)

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Cytostatika:

- Nukleosidová cytostatika syntetizovaná na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB) v Praze
- Experimentální léčiva z chemické knihovny Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM) v Olomouci
- Fludarabin (Sigma-Aldrich, kat. číslo: F9813)
- Cytarabin (Sigma-Aldrich, kat. číslo: C3350000)
- 6-merkaptopurin (Sigma-Aldrich, kat. číslo: PHR1611)
- 6-thioguanin (Sigma-Aldrich, kat. číslo: A4882)
- Fluorouracil (Sigma-Aldrich, kat. číslo: F6627)
- Gemcitabin (Sigma-Aldrich, kat. číslo: G6423)
- Roskovitin (Sigma-Aldrich, kat. číslo: R7772)

#### Protilátky, enzymy a chemikálie:

- Dimethyl sulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, kat. číslo: D8418)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2h-tetrazolium (MTS; Promega, kat. číslo: G1111)
- Cell wash (BD, kat. číslo: 349524)
- 10x permeabilizační roztok (BD, kat. číslo: 340973)



- BSA (Sigma-Aldrich, kat. číslo: A6793)
- FC receptor saturation reagent (BD, kat. číslo: 732802)
- Pgp primární protilátka (Sigma-Aldrich, kat. číslo: P7965)
- MRP1 primární protilátka (MRPm5; Alexis, kat. číslo: 57M)
- Pgp isotypová kontrola (Sigma-Aldrich, kat. číslo: M5284)
- MRP isotypová kontrola (Sigma-Aldrich, kat. číslo: M5409)
- Sekundární protilátka, anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, kat. číslo: F2883)
- RevertAid™ H Minus M-MuLV, Reverse Transkriptase (5 x 10 000 U) (UAB Fermentas, kat. číslo: EP0452)
- TaqMan Assay kity pro geny SLC29A1 – SLC29A4 a SLC28A1-A3 (Thermo Fisher, kat. čísla: 4331182, 4351372)
- TRI reagent (Molecular Research Center, kat. číslo: TR 118/500)
- RNAsin ribonuclease inhibitor (Promega, kat. číslo: N2111)
- RiboPure Kit (Ambion, kat. číslo: AM1924)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, kat. číslo: I9516)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, kat. číslo: C2432)
- Ethanol (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 493511)
- DEPC Treated Water (Ambion, Austin, TX, USA)
- Tris-hydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 10812846001)
- Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, kat. číslo: H1758)
- Kyselina ethylendiamin (EDTA, Serva, kat. číslo 11280)
- Proteináza K (BioLabs, kat. číslo P8102S)

#### **Použité roztoky:**

##### **a) Testování exprese Pgp:**

- Blokovací roztok: 500 mg BSA + 100 ml cell wash
- Rinse buffer (RB) pro testování Pgp: 100 mg BSA + 20 ml cell wash
- FC receptor saturation reagent: 10 µl FC receptor saturation reagent + 30 µl blokovacího roztoku/ 1 vzorek
- Pgp primární protilátka: 4 µl primární protilátky + 996 µl blokovacího roztoku
- Isotypová kontrola pro testování Pgp: 7,1 µl isotypové kontroly + 992,9 µl blokovacího roztoku
- Sekundární protilátka pro testování Pgp: 4 µl sekundární protilátky + 996 µl blokovacího roztoku

##### **b) Testování exprese MRP:**

- Rinse buffer (RB) pro testování MRP: 0,5 % BSA, 0,1 % NaN<sub>3</sub>, 1xPBS
- MRP1 primární protilátka: 5 µl + 1000 µl RB pufru pro testování MRP

- Isotypová kontrola pro testování MRP1: 5  $\mu$ l isotypové kontroly + 995  $\mu$ l RB pufru
- Sekundární protilátka pro testování MRP: 4  $\mu$ l sekundární protilátky + 996  $\mu$ l RB pufru pro MRP

**c) Izolace RNA**

- Tris-HCl, pH 8,1
- 75 % Ethanol ředěný v RNA vodě (30 ml 96% ethanolu + 10 ml vody)

### 4.3 Materiál:

- Kultivační lahve (TPP, kat. čísla: N900250, N900750, N901500)
- 384-jamkové desky pro MTS test: clear, flat bottom, with lid, tissue culture treated (Corning, kat. číslo: CLS3701)
- Echo 550 source plate: 384well polypropylene PP-plate (Labcyte, kat. číslo: PP-0200-BC)
- PCR mikrozkušavky (Eppendorf, kat. číslo: Z316121)
- LoBind zkumavky (Eppendorf, kat. číslo: Z666505)
- EpDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, kat. číslo: 0030078500)

### 4.4 Přístroje a zařízení

- Herasafe KS (Thermo)
- Multidrop combi (Thermo)
- Echo 550 (Labcyte)
- Envision (Perkin Elmer)
- Laminární box (BioAir)
- Kombinovaná chladnička (Gorenje)
- Vortex (Scientific Industries)
- Minicentrifuga (Eppendorf)
- Thermal Cycler PTC 100 (MJC)
- Chlazená centrifuga (Hermle)
- Termoblok (Eppendorf)
- Váhy (Scaltec)
- Homogenizátor Mixer Mill 300 (Retsch)
- SpeedVac Eppendorf 5031 (Eppendorf)

## 4.5 Použité metody

### 4.5.1 Selektce rezistentních klonů

Selektce rezistentních klonů probíhala eskalačním způsobem v kultivačních lahvích o růstové ploše 150 cm<sup>2</sup>, přičemž koncentrace látek se zvyšovala při dostatečné viabilitě buněk (80 % a vyšší) v případě suspenzních buněk a při konfluenci minimálně 70 % v případě buněk adherentních.

Buňky **CCRF-CEM** a **K562** byly selektovány fludarabinem, cytarabinem, 6-merkaptopurinem, 6-thioguaninem, třemi experimentálními látkami z ÚOCHB (PNH173, PNH192, AB-61), experimentální látkou z ÚMTM [CuEt; bis (diethyldithiocarbamate)–copper], cisplatinou a karboplatinou. CuEt bylo připraveno ve čtyřech variantách: rozpuštěné v dimethylsulfoxidu (DMSO) a ve variantách nanočástic, které se vytvářely v roztoku Kolidonu 17, hovězího sérového albuminu (BSA) a hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC). Schéma selekcí viz tabulka č. 1 a 2.

Buňky **U-87MG ATCC** byly selektovány CuEt (v DMSO a variantami nanočástic), cisplatinou a karboplatinou. Schéma selektce viz tabulka č. 3. Chemické struktury všech látek využívaných k selekcím rezistentních klonů jsou zobrazeny na obrázku č. 1.

**Tabulka č. 1:** Schéma selektce buněčné linie CCRF-CEM nukleosidovými deriváty, CuEt, cisplatinou a karboplatinou.

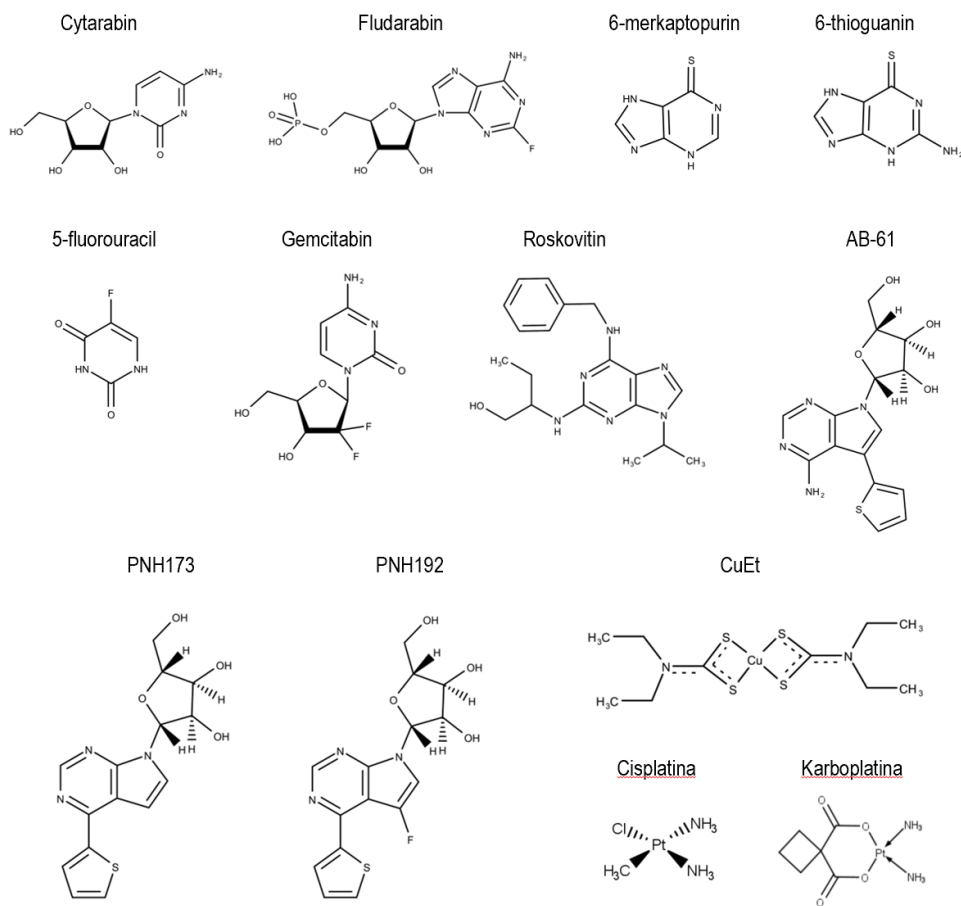
CCRF-CEM	Koncentrace látek [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Fludarabin	0,05	0,25	1,00	5,00	10,00	15,00
Cytarabin	0,05	0,25	1,00	3,00	4,00	5,00
6-merkaptopurin	0,05	0,25	1,00	5,00	10,00	20,0
6-thioguanin	0,05	0,25	1,00	5,00	10,00	15,0
PNH173	0,50	1,00	1,25	1,75	2,25	2,75
PNH192	0,50	0,75	1,25	1,75	2,25	3,50
AB-61	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	2,25
CuEt (DMSO)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
CuEt (Kolidon 17)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
CuEt (BSA)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
CuEt (HPMC)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
Cisplatina	4,125	14,85	21,45	37,95	50,50	82,50
Karboplatina	9,29	10,76	13,45	-	-	-

**Tabulka č. 2:** Schéma selekce buněčné linie K562 nukleosidovými deriváty, CuEt, cisplatinou a karboplatinou

K562	Koncentrace látek [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Fludarabin	0,08	0,41	1,00	5,00	10,00	-
Cytarabin	0,05	0,25	1,00	3,00	5,00	-
6-merkaptopurin	0,05	0,25	1,00	5,00	10,00	15,00
6-thioguanin	0,05	0,25	1,00	5,00	10,00	15,00
PNH173	0,50	1,00	1,25	1,75	2,25	2,75
PNH192	0,50	0,75	1,25	1,75	2,25	3,50
AB-61	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	2,25
CuEt (DMSO)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
CuEt (Kolidon 17)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
CuEt (BSA)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
CuEt (HPMC)	0,05	0,10	0,28	0,49	0,75	0,86
Cisplatina	4,13	14,85	21,45	37,95	50,50	82,5
Karboplatina	9,29	10,76	13,45	20,18	47,07	53,8

**Tabulka č. 3:** Schéma selekce buněčné linie U-87MG ATCC CuEt, cisplatinou a karboplatinou.

U-87MG ATCC	Koncentrace látky [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
CuEt (DMSO)	0,21	0,50	1,00	2,10	-	-
CuEt (Kolidon 17)	0,21	0,50	1,00	2,10	2,50	2,80
CuEt (BSA)	0,21	0,50	1,00	2,10	-	-
CuEt (HPMC)	0,21	0,50	1,00	2,10	2,50	2,80
Cisplatina	4,13	6,60	13,30	24,75	37,95	-
Karboplatina	30,50	53,80	65,60	80,70	-	-



**Obrázek č. 1:** Chemická struktura látek využívaných k selekcím rezistentních buněk a testování zkřížené rezistence. Vzorce byly zpracovány v programu MarvinSketch 21.8.

#### 4.5.2 MTS test cytotoxicity

Pro ověření míry rezistence námi selektovaných klonů jsme využívali MTS test cytotoxicity optimalizovaný na 384 kultivační destičky. Pracovní objem v každé jamce byl 30  $\mu$ l kapaliny. První a poslední sloupec sloužily jako kontrola pozadí testu a obsahovaly 30  $\mu$ l média, všechny ostatní sloupce obsahovaly suspenzi média a buněk, přičemž koncentrace buněk byla  $1,2 \cdot 10^3$  buněk/30  $\mu$ l v případě linií CCRF-CEM a U-87MG ATCC a  $8 \cdot 10^2$  buněk/30  $\mu$ l v případě linie K562.

Buňky byly přeneseny do číré 384jamkové destičky (AssayPlate, Corning) pomocí multidropu a inkubovány po dobu 24 hodin ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ). Po uplynutí doby inkubace byly k buňkám přidány testované látky (Echo 550). Jejich cytotoxicita byla testována v 9 koncentračních bodech (čtyřkové ředění), přičemž maximální testovaná koncentrace CuEt byla  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , cisplatiny  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , karboplatiny  $180 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a nukleosidů 50  $\mu\text{M}$ . Pozice označené na destičce jako kontrola 100% viability buněk byly bez aplikace látek, kontrola 0%

viability obsahovala DMSO ve finální koncentraci 10 %. Schéma rozložení 384jamkové desky pro MTS test viz obrázek č. 1.

Buňky byly s látkami inkubovány po dobu 72 hodin a následně obarveny roztokem MTS. Panely byly umístěny zpět do inkubátoru, přičemž živé buňky mění díky aktivním mitochondriálním dehydrogenázám žlutý roztok MTS na modro-fialový formazan. Intenzita barevné změny je pak přímo úměrná množství živých buněk. Kvantifikace množství formazanu byla provedena spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm (Envision).

**Obrázek č. 2:** Rozložení 384jamkového panelu pro MTS test

Výsledky MTS testu byly vyhodnoceny pomocí programu Dotmatics a ze získaných dat byla určena hodnota poloviční inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ). Tato hodnota byla vypočítána jak pro selektované linie, tak pro parentální buňky, které nebyly vystaveny selekčním tlaku. Z výsledného poměru hodnot  $IC_{50}$  parentálních a selektovaných buněk byla určena míra nárůstu/ poklesu rezistence.

### 4.5.3 Exprese MDR transportních proteinů

V rámci základní charakterizace selektovaných buněk proběhlo testování exprese dvou proteinů spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí: Pgp a MRP1.

#### a) Exprese Pgp

Pro testování exprese Pgp využíváme 3 miliony buněk zafixovaných do methanolu vychlazeného na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Takto zafixované buňky můžeme uchovávat při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu přibližně 10-ti týdnů, případně zpracovat následující den.

Odstraníme methanol a buňky promyjeme 2 ml roztoku cell wash a následně centrifugujeme na 500 g po dobu 5 minut při pokojové teplotě (stejně parametry centrifugace jsou využívány v celém protokolu). Odstraníme cell wash a přidáme k peletě buněk 0,5 ml 1x permeabilizačního roztoku (zásobní roztok má koncentraci 10x, ředíme deionizovanou vodou) a inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí doby inkubace přidáme 2 ml roztoku

RB pufru (rinse buffer) a centrifugujeme. Odstraníme supernatant, přidáme 40 µl roztoku FC saturation reagent a inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě. Centrifugujeme, odstraníme supernatant, přidáme 2 ml RB pufru a vzorek rozdělíme do dvou zkumavek po 1 ml. Obě zkumavky centrifugujeme, následně odstraníme supernatant a přidáme do první zkumavky 40 µl primární Pgp protilátky (ředění 1: 250 v blokovacím roztoku) a do druhé zkumavky 40 µl isotypové kontroly (ředění 1: 140 v blokovacím roztoku). Obě zkumavky inkubujeme ve tmě při pokojové teplotě 30 minut.

Přidáme 2 ml RB pufru, centrifugujeme, odstraníme supernatant, přidáme 40 µl sekundární protilátky (ředění 1: 250 v blokovacím roztoku) do obou zkumavek a inkubujeme ve tmě při pokojové teplotě 30 minut. Přidáme 2 ml RB pufru, centrifugujeme, odstraníme supernatant a vzorek resuspendujeme v 500 µl blokovacího roztoku. Takto zpracovaný vzorek je možné uchovávat ve tmě při 4 °C až po dobu tří hodin.

Expresi Pgp měříme pomocí průtokového cytometru. Sekundární protilátku detekujeme při vlnové délce 488 nm. Zpracování výsledků probíhá v programu Cell Quest.

#### **b) Exprese MRP1**

Stejně jako v případě testování exprese Pgp fixujeme 3 miliony buněk do methanolu vychlazeného na -20 °C. Buňky centrifugujeme na 500 g, 5 minut při pokojové teplotě (stejně podmínky centrifugace opět využíváme během celého protokolu). Odstraníme supernatant, resuspendujeme v 0,5 ml 1x permeabilizačního roztoku a inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí doby inkubace přidáme 2 ml RB pufru pro testování MRP a vzorek rozdělíme na 2 části po 1 ml. Následně centrifugujeme, odstraníme supernatant a přidáme 100 µl primární protilátky. Inkubujeme 60 minut ve tmě při pokojové teplotě.

Po uplynutí inkubace přidáme 2 ml RB pufru, centrifugujeme, odstraníme supernatant a přidáme 100 µl sekundární protilátky. Inkubujeme 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubace přidáme 2 ml RB pufru, centrifugujeme, odstraníme supernatant a resuspendujeme v 0,5 ml RB pufru. Vzorek následně analyzujeme pomocí průtokového cytometru. Sekundární protilátka je detekována při vlnové délce 488 nm. Zpracování výsledků probíhá v programu Cell Quest.

#### **4.5.4 Testování nukleosidových transportérů**

Pro linie CCRF-CEM a K562 selektované nukleosidovými cytostatiky byl proveden test míry exprese nukleosidových transportérů (ENT1-4 a CNT1-3). Následně byly provedeny funkční testy, při nichž byl hodnocen vliv inhibice nukleosidových transportérů na senzitivitu buněk.

## **Expresse nukleosidových transportérů:**

### **a) Izolace RNA**

Izolace RNA byla provedena z buněk v koncentraci 5-11 milionů/ 1 ml TRI reagentu. Vzorky buněk v TRI reagentu byly ponechány při pokojové teplotě po dobu 15-ti minut, aby mohla proběhnout kompletní disociace nukleoproteinů. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200  $\mu$ l chloroformu a vzorky byly silně protřepávány na vortexu po dobu alespoň 30 sekund. Poté se nechaly vzorky stát po dobu 10-ti minut při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány 15 minut při 12 000 g a 4°C. Do nové zkumavky bylo odebráno 500  $\mu$ l svrchní čiré fáze obsahující RNA. Ke vzorku bylo přidáno 500  $\mu$ l isopropanolu a krátkým opakovaným protřepáním (4 -5x) byly promíchány obě vrstvy tak, aby nezůstal bílý prstenec. Vzorky byly poté 5 minut inkubovány při pokojové teplotě a následně centrifugovány 10 minut při 12 000 g a 4°C. Supernatant byl opatrně odstraněn a RNA peleta byla promyta 1,5 ml chlazeného 75% ethanolu (peletka byla odstraněna jemným převrácením zkumavky). Vzorek byl opět centrifugován (5 minut, 12 000 g, 4 °C), byl odstraněn supernatant a peletka byla usušena na vzduchu ve flow boxu (10-20 minut). K usušené RNA peletě bylo přidáno 25-60  $\mu$ l vody (DEPC treated) v závislosti na velikosti pelety. Koncentrace a čistota izolované RNA byly měřeny pomocí Nanodropu ND 1000. Vzorky RNA byly následně použity pro reverzní transkripci. Pokud by nebyly hned zpracovány, je možné je krátkodobě uložit při -20 °C, případně je dlouhodobě skladovat při -80 °C.

### **b) Reverzní transkripce**

Reverzní transkripce byla provedena ze 3  $\mu$ g izolované RNA (viz předchozí krok izolace RNA), ke které bylo přidáno 0,3  $\mu$ g hexamerů a vzorky byly doplněny vodou do 19,5  $\mu$ l). Vzorky byly krátce promíchány pomocí vortexu a centrifugovány (1400 rpmi, 30 sekund). Následně byly inkubovány v termocykléru s vyhříváním víčkem při 70 °C po dobu 5 minut. Poté byly vzorky zchlazeny v chladícím stojánku minimálně 1 minutu. Mezitím byl připraven master mix: 6  $\mu$ l 5x RT pufr, 3  $\mu$ l 10mM dNTP a 0,75  $\mu$ l RNAsinu/ 1 vzorek. K vychlazenému vzorku bylo přidáno 9,75  $\mu$ l master mixu, vzorky byly promíchány propipetováním a byly 5 minut inkubovány při pokojové teplotě ve flowboxu. Následně bylo ke vzorku přidáno 0,75  $\mu$ l reverzní transkriptázy, vzorky byly krátce promíchány na vortexu, centrifugovány a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě ve flowboxu. Po uplynutí doby inkubace byly vzorky přeneseny do termocykléru s vyhříváním víkem, kde byly inkubovány při 42°C po dobu 60 minut, poté 10 minut při 70 °C a následně zchlazeny na 4 °C. cDNA byla následně skladována při -80 °C.



### c) Real-time PCR

Master mix pro PCR byl připraven smícháním 4  $\mu\text{l}$  vody, 5  $\mu\text{l}$  2x LC 480 Probes Master, 0,5  $\mu\text{l}$  20x TaqMan Gene Expression Assay/ 1 vzorek. Následně bylo smícháno 9  $\mu\text{l}$  master mixu s 1  $\mu\text{l}$  cDNA z předchozího kroku. Celkový reakční objem byl tedy 10  $\mu\text{l}$  a PCR byla provedena v 96ti jamkové desce. Podmínky PCR byly nastaveny na 10 minut při 95 °C, následně bylo provedeno 50 cyklů zahrnujících 15 sekund při 95 °C a 1 minutu při 60 °C a poté byla reakce chlazená na 37 °C. Pro real-time PCR byl využit Cobas cycler. Jako vnitřní kontrola byla využita sonda pro GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) a jako negativní kontrola byla použita voda. Testování bylo provedeno v duplikátu.

Pro výpočet míry exprese jednotlivých transportérů byla využita relativní kvantifikace, která byla vztažena ku vnitřní kontrole (GAPDH).

### Funkční test nukleosidových transportérů:

Vliv aktivity nukleosidových transportérů byl testován pomocí MTS testu cytotoxicity. Byla sledována senzitivita rezistentních linií k vybraným cytostatikům (cytostatika byla testována v 9-ti koncentračních bodech, čtyřkovém ředění a maximální koncentraci 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) při současné aplikaci inhibitoru nukleosidových transportérů (dipyridamol, S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin).

V případě testování vlivu S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosinu (NBTI) byla použita jedna koncentrace inhibitoru (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a buňky byly s inhibitorem inkubovány 60 minut. Následně byla přidána cytostatika ve výše popsaném ředění. Následný postup odpovídal klasickému schématu provedení MTS testu (72 hodin inkubace, barvení MTS, měření absorbance při 490 nm).

V případě testování vlivu dipyridamolu na senzitivitu buněk byly provedeny dva způsoby aplikace látek: a) nejprve byly přidány testované látky, buňky byly 60 minut inkubovány a následně byl přidán dipyridamol a b) nejprve byla provedena inhibice dipyridamolem (60 minut inkubace) a až poté byly přidány látky.

Dipyridamol byl aplikován v koncentracích 5 až 0,083  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , přičemž byl sledován pokles, případně nárůst hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Jako kontrola sloužily buňky bez aplikace tohoto inhibitoru. Schéma rozložení 384jamkové desky pro testování je zobrazeno na obrázku č. 2. Příprava buněk, intervaly inkubace, aplikace látek i vyhodnocení probíhaly shodně jako v případě MTS testu v bodě 4.6.2.

Samotnému funkčnímu testu předcházelo ověření toxicity dipyridamolu na buněčných liniích vybraných pro tento experiment. Toxicita byla ověřena MTS testem dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24									
				Kontrola: viabilita 100 %																													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9		1	2	3	4	5	6	7	8	9											
				(9 koncentrací látek ve čtyřkovém ředění)													(9 koncentrací látek ve čtyřkovém ředění)																
Kontrola (bez dipyridamolu)																																	
Dipyridamol 0,083 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$																																	
Dipyridamol 0,17 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$																																	
Dipyridamol 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$																																	
Dipyridamol 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$																																	
Dipyridamol 2,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$																																	
Dipyridamol 5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$																																	
				Kontrola: viabilita 100 %																													

**Obrázek č. 3:** Schéma rozložení 384jamkového panelu pro funkční test nukleosidových transportérů.

## 5. Výsledky

### 5.1 Selektce rezistentních klonů

Selektce rezistentních klonů probíhala dle postupu uvedeném v metodické části práce. V případě rezistence na nukleosidové deriváty (linie CCRF-CEM a K562) probíhala selektce po dobu 12-ti týdnů, během kterých došlo k šesti cyklům navýšení koncentrace látek. Selektce klonů rezistentních na CuEt, cisplatinu a karboplatinu probíhala na leukemických buňkách (CCRF-CEM a K562) po dobu 20-ti týdnů a na buňkách glioblastomu (U-87 MG) po dobu 15-ti týdnů. Po ukončení selektce byla ověřena míra rezistence pomocí MTS testu cytotoxicity, přičemž byla porovnávána hodnota  $IC_{50}$  parentálních linií bez selektce s hodnotou selektovaných buněk. V tabulce č. 4 jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  parentálních buněk bez provedené selektce.

**Tabulka č. 4:** Hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] parentálních buněk CCRF-CEM, K562, U-87 MG a směrodatné odchylky (sd; z angl. standard deviation).

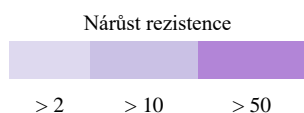
Látka	CCRF-CEM		K562		U-87 MG	
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd
Cytarabin	0,0086	0,0016	0,017	0,0001	-	-
Fludarabin	1,04	0,21	48,65	1,90	-	-
6-merkaptopurin	0,47	0,03	0,57	0,13	-	-
6-thioguanin	0,17	0,02	0,42	0,0252	-	-
5-fluorouracil	4,65	1,29	2,70	0,73	-	-
Gemcitabin	< 0,0008	0	0,02	0,0069	-	-
Roskovitin	17,88	2,8	12,74	4,00	-	-
AB-61	0,11	0,0008	0,019	0,0026	-	-
PNH173	0,09	0,007	0,071	0,0042	-	-
PNH192	0,10	0,02	0,036	0,0061	-	-
CuEt (DMSO)	0,033	0,004	0,19	0,027	0,20	0,044
CuEt (Kolidon 17)	0,034	0,004	0,23	0,004	0,18	0,039
CuEt (HPMC)	0,031	0,005	0,17	0,043	0,17	0,045
CuEt (BSA)	0,031	0,002	0,11	0,01	0,11	0,032
Cisplatina	1,92	0,05	123,52	14,65	16,75	1,08
Karboplatina	9,29	2,12	84,01	14,23	60,10	1,16

### 5.2 Testování selektovaných linií

Po ukončení selektce, bylo provedeno ověření míry nárustu/ poklesu rezistence pomocí MTS testu cytotoxicity. Testovala se nejen rezistence vůči látce, jíž byly buňky selektovány, ale také případná zkřížená rezistence a MDR. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5 až 14.

**Tabulka č. 5:** Citlivost parentálních a selektovaných linií CCRF-CEM (selektce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty IC<sub>50</sub> [μmol·l<sup>-1</sup>], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Látky	CCRF-CEM		CCRF-CEM: selektce cytarabinem			CCRF-CEM: selektce fludarabinem			CCRF-CEM: selektce 6-merkaptopurinem			CCRF-CEM: selektce 6-thioguaninem		
	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
Cytarabin	0,0086	0,0016	41,59	5,39	4 836,54	0,41	0,06	47,66	0,01	0,001	1,56	0,05	0,006	5,63
Fludarabin	1,04	0,21	> 50,00	0	> 48,08	> 50	0	> 48,08	22,79	4,05	21,92	23,45	1,17	22,55
6-merkaptopurin	0,47	0,03	9,47	0,61	20,15	> 50	0	> 106,38	> 50	0	> 106,38	> 50	0	> 106,38
6-thioguanin	0,17	0,02	1,64	0,62	9,64	> 50	0	> 294,12	> 50	0	> 294,12	> 50	0	> 294,12
5-fluorouracil	4,65	1,29	21,15	4,24	4,55	19,53	2,13	4,20	12,14	1,76	2,61	2,47	0,44	0,53
Gemcitabin	< 0,0008	0	23,53	2,04	> 29 418,12	0,030	0,004	> 37,25	< 0,0008	0	≤ 1	0,001	0,0002	> 1,5
Roskovitin	17,88	2,8	17,64	1,96	0,99	12,14	1,26	0,68	14,09	0,85	0,79	16,56	2,92	0,93
AB-61	0,11	0,0008	0,10	0,03	0,95	3,09	0,70	28,07	8,69	0,20	79,04	0,026	0,004	0,24
PNH173	0,09	0,007	0,20	0,003	2,18	0,10	0,016	1,12	0,11	0,03	1,20	0,058	0,003	0,65
PNH192	0,10	0,02	0,21	0,04	2,12	0,07	0,009	0,70	0,09	0,002	0,87	0,053	0,002	0,53



**Tabulka č. 6:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií CCRF-CEM (selektce PNH173, PNH192, AB-61) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty IC<sub>50</sub> [μmol·l<sup>-1</sup>], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

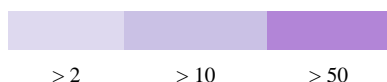
Látky	CCRF-CEM		CCRF-CEM: selektce PNH173			CCRF-CEM: selektce PNH192			CCRF-CEM: selektce AB-61		
	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
Cytarabin	0,0086	0,002	0,006	0,002	0,70	0,21	0,03	24,42	0,40	0,06	46,05
Fludarabin	1,04	0,21	3,53	0,3	3,39	35,76	1,99	34,38	> 50	0	> 7,39
6-merkaptopurin	0,47	0,03	48,88	2,24	104,00	0,17	0,03	0,36	10,74	1,87	22,85
6-thioguanin	0,17	0,02	2,18	0,47	12,82	0,05	0,003	0,29	0,18	0,02	1,06
5-fluorouracil	4,65	1,29	11,53	2,95	2,48	0,47	0,02	0,10	0,69	0,08	0,15
Gemcitabin	< 0,0008	0	0,002	0,0005	> 2,5	0,02	0,003	> 25	0,03	0,003	> 37,5
Roskovitin	17,88	2,8	22,04	4,18	1,23	15,48	1,34	0,87	32,38	8,67	1,81
AB-61	0,11	0,0008	15,34	4,36	139,45	0,05	0,008	0,45	3,98	1,53	36,18
PNH173	0,09	0,007	> 50	0	> 555,56	0,29	0,02	3,22	3,83	0,81	42,56
PNH192	0,10	0,02	> 50	0	> 500,00	0,32	0,02	3,20	1,66	0,10	16,60



**Tabulka č. 7:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selektce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selektivnímu tlaku.

Látky	K562		K562: selektce cytarabinem			K562: selektce fludarabinem			K562: selektce 6-merkaptopurinem			K562: selektce 6-thioguaninem		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
Cytarabin	0,017	0,0001	> 50	0	> 2 941,18	0,20	0,006	11,92	0,22	0,027	13,22	0,15	0,02	8,96
Fludarabin	48,65	1,90	> 50	0	> 1,03	>50	0	> 1,03	> 50	0	> 1,03	> 50	0	> 1,03
6-merkaptopurin	0,57	0,13	0,37	0,02	0,65	0,46	0,035	0,81	> 50	0	> 87,72	> 50	0	> 87,72
6-thioguanin	0,417	0,0252	0,46	0,06	1,10	0,42	0,08	1,01	> 50	0	> 119,90	> 50	0	> 119,9
5-fluorouracil	2,70	0,73	9,25	1,33	3,43	8,50	2,18	3,15	10,07	1,88	3,73	8,53	1,69	3,16
Gemcitabin	0,02	0,0069	> 50	0	> 2500	0,011	0,003	0,54	0,026	0,009	1,28	0,006	0,001	0,28
Roskovitin	12,74	4,00	47,9	0,69	0,41	44,00	3,64	3,45	45,47	3,92	3,57	28,50	0,84	2,24
AB-61	0,019	0,0026	0,02	0,001	1,05	0,020	0,003	1,04	0,020	0,0004	1,05	0,16	0,04	8,33
PNH173	0,071	0,0042	0,04	0,01	0,56	0,048	0,008	0,68	0,055	0,007	0,77	0,16	0,04	2,31
PNH192	0,036	0,0061	0,03	0,008	0,83	0,024	0,002	0,67	0,028	0,001	0,77	0,10	0,04	2,70

Nárůst rezistence



**Tabulka č. 8:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selektce PNH173, PNH192, AB-61) vůči 10 testovaným látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selektivnímu tlaku.

Látky	K562		K562: selektce PNH173			K562: selektce PNH192			K562: selektce AB-61		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
Cytarabin	0,017	0,0001	0,19	0,003	11,18	0,21	0,02	12,35	0,22	0,03	12,94
Fludarabin	48,65	1,9	> 50	0	> 1,03	> 50	0	> 1,03	> 50	0	> 1,03
6-merkaptopurin	0,57	0,13	29,02	0,83	50,91	> 50	0	> 87,72	> 50	0	> 87,72
6-thioguanin	0,417	0,0252	8,8	2,47	21,10	2,21	0,51	5,30	5,45	0,88	13,07
5-fluorouracil	2,70	0,73	43,75	9,83	16,20	> 50	0	> 18,52	40,05	10,13	14,83
Gemcitabin	0,02	0,0069	< 0,0008	0	< 0,04	< 0,0008	0	< 0,04	0,009	0,0037	0,45
Roskovitin	12,74	4	33,69	7,27	2,64	46,55	4,19	3,65	39,45	1,23	< 0,79
AB-61	0,019	0,0026	18,74	5,91	986,32	20,20	1,31	1063,16	19,42	3,3	1022,11
PNH173	0,071	0,0042	> 50	0	> 704,23	7,96	0,78	112,11	12,75	2,05	179,58
PNH192	0,036	0,0061	16,19	3,69	449,72	3,98	0,56	110,56	0,40	0,28	11,11

Nárůst rezistence



**Tabulka č. 9:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **U-87MG ATCC** (selektce cisplatinou, karboplatinou) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Látky	U-87MG ATCC		U-87MG ATCC: selektce cisplatinou			U-87MG ATCC: selektce karboplatinou		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
CuEt (DMSO)	0,20	0,044	0,17	0,03	0,85	0,30	0,07	1,51
CuEt (Kolidon17)	0,18	0,039	0,15	0,04	0,84	0,45	0,08	2,49
CuEt (HPMC)	0,17	0,045	0,29	0,16	1,70	0,22	0,02	1,28
CuEt (BSA)	0,11	0,032	0,11	0,02	1,00	0,23	0,01	2,05
Cisplatina	16,75	1,08	131,74	10,28	7,87	102,80	18,15	6,14
Karboplatina	60,10	1,16	> 180	0	> 3	> 180	0	> 3

Nárůst rezistence



> 2      > 10      > 50

**Tabulka č. 10:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **U-87MG ATCC** (selektce CuEt v DMSO a CuEt nanočásticemi) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Látky	U-87 MG		U-8 MG ATCC: selektce CuEt (DMSO)			U-87MG ATCC: selektce CuEt (Kolidon 17)			U-87MG ATCC: selektce CuEt (HPMC)			U-87MG ATCC: selektce CuEt (BSA)		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
CuEt (DMSO)	0,20	0,044	0,25	0,012	1,23	0,43	0,12	2,14	0,24	0,006	1,21	0,24	0,00	1,18
CuEt (kolidon17)	0,18	0,039	0,24	0,004	1,31	0,45	0,13	2,51	0,24	0,016	1,33	0,37	0,14	2,06
CuEt (HPMC)	0,17	0,045	0,29	0,057	1,68	0,33	0,11	1,91	0,33	0,098	1,94	0,20	0,04	1,19
CuEt (BSA)	0,11	0,032	0,22	0,011	1,98	0,24	0,007	2,21	0,22	0,006	1,97	0,25	0,00	2,27
Cisplatina	16,75	1,08	143,61	17,810	8,57	128,96	27,02	7,70	77,18	5,32	4,61	71,63	5,60	4,28
Karboplatina	60,10	1,16	> 180	0	> 3	> 180	0	> 3	> 180	0	> 3	> 180	0	> 3

Nárůst rezistence



> 2      > 10      > 50

**Tabulka č. 11:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií CCRF-CEM (selektce cisplatinou a karboplatinou) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty IC<sub>50</sub> [μmol·l<sup>-1</sup>], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Látky	CCRF-CEM		CCRF-CEM: selektce cisplatinou			CCRF-CEM: selektce karboplatinou		
	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
CuEt (DMSO)	0,033	0,004	0,04	0,010	1,20	0,064	0,005	1,94
CuEt (Kolidon17)	0,034	0,004	0,07	0,006	1,94	0,054	0,013	1,60
CuEt (HPMC)	0,031	0,005	0,03	0,003	1,00	0,062	0,002	2,01
CuEt (BSA)	0,031	0,002	0,03	0,002	0,83	0,056	0,001	1,80
Cisplatina	1,92	0,05	104,04	19,09	54,19	3,23	0,31	1,68
Karboplatina	9,29	2,12	> 180	0,00	> 19,38	12,11	0,67	1,30

Nárůst rezistence



> 2      > 10      > 50

**Tabulka č. 12:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií CCRF-CEM (selektce CuEt v DMSO a CuEt nanočásticemi) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty IC<sub>50</sub> [μmol·l<sup>-1</sup>], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Látky	CCRF-CEM		CCRF-CEM: selektce CuEt (DMSO)			CCRF-CEM: selektce CuEt (Kolidon 17)			CCRF-CEM: selektce CuEt (HPMC)			CCRF-CEM: selektce CuEt (BSA)		
	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	IC <sub>50</sub> [μmol·l <sup>-1</sup> ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
CuEt (DMSO)	0,033	0,004	0,075	0,003	2,28	0,074	0,008	2,24	0,059	0,004	1,78	0,044	0,002	1,34
CuEt (kolidon17)	0,034	0,004	0,033	0,014	0,96	0,032	0,008	0,95	0,033	0,004	0,96	0,062	0,007	1,84
CuEt (HPMC)	0,031	0,005	0,036	0,011	1,18	0,042	0,013	1,36	0,046	0,010	1,49	0,046	0,014	1,47
CuEt (BSA)	0,031	0,002	0,050	0,008	1,60	0,045	0,009	1,44	0,035	0,010	1,12	0,048	0,007	1,54
Cisplatina	1,92	0,05	36,89	6,77	19,22	33,26	2,86	17,32	23,50	1,40	12,24	23,61	2,08	12,30
Karboplatina	9,29	2,12	19,63	1,60	2,11	18,84	0,48	2,03	12,41	1,03	1,34	13,44	0,67	1,45

Nárůst rezistence

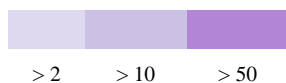


> 2      > 10      > 50

**Tabulka č. 13:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selektce cisplatinou a karboplatinou) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Látky	K562		K562: selektce cisplatinou			K562: selektce karboplatinou		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
CuEt (DMSO)	0,082	0,003	0,06	0,00	0,79	0,068	0,003	0,82
CuEt (Kolidon17)	0,041	0,008	0,04	0,01	0,99	0,028	0,005	0,69
CuEt (HPMC)	0,066	0,006	0,04	0,01	0,64	0,042	0,010	0,64
CuEt (BSA)	0,051	0,008	0,04	0,01	0,78	0,049	0,009	0,97
Cisplatina	123,52	14,65	> 180	0	> 1,46	13,81	1,05	0,11
Karboplatina	89,20	5,02	> 180	0	> 2,02	78,12	5,35	0,88

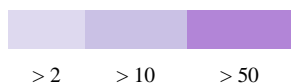
Nárůst rezistence



**Tabulka č. 14:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selektce CuEt v DMSO a CuEt nanočásticemi) vůči vybraným variantám CuEt, cisplatině a karboplatině. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Látky	K562		K562: selektce CuEt (DMSO)			K562: selektce CuEt (Kolidon 17)			K562: selektce CuEt (HPMC)			K562: selektce CuEt (BSA)		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
CuEt (DMSO)	0,082	0,003	0,072	0,007	0,88	0,090	0,012	1,10	0,070	0,010	0,85	0,099	0,015	1,20
CuEt (Kolidon17)	0,041	0,008	0,050	0,005	1,22	0,051	0,019	1,26	0,036	0,006	0,88	0,078	0,022	1,91
CuEt (HPMC)	0,066	0,006	0,063	0,006	0,96	0,139	0,040	2,10	0,101	0,023	1,52	0,048	0,008	0,72
CuEt (BSA)	0,051	0,008	0,039	0,004	0,77	0,052	0,003	1,03	0,041	0,010	0,81	0,042	0,004	0,83
Cisplatina	123,52	14,65	132,44	29,98	1,07	47,21	3,13	0,38	106,23	7,44	0,86	97,09	10,84	0,79
Karboplatina	89,20	5,02	61,62	9,95	0,69	61,82	4,35	0,69	> 180	0,00	> 2,02	> 180	0,00	> 2,02

Nárůst rezistence

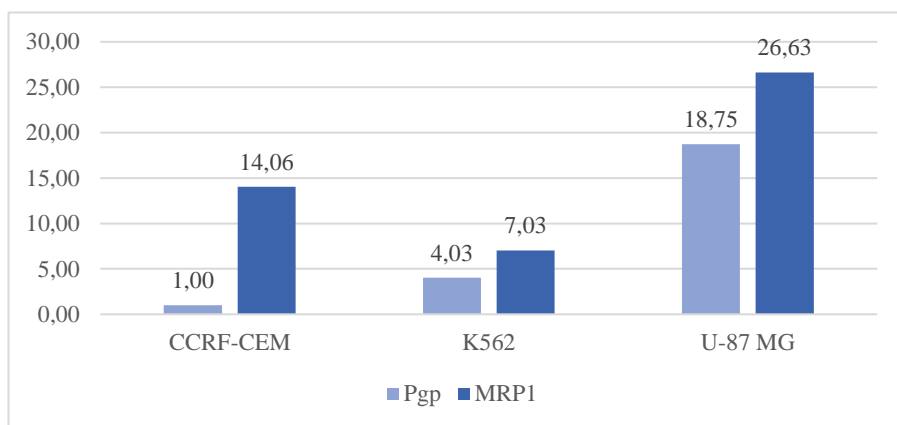




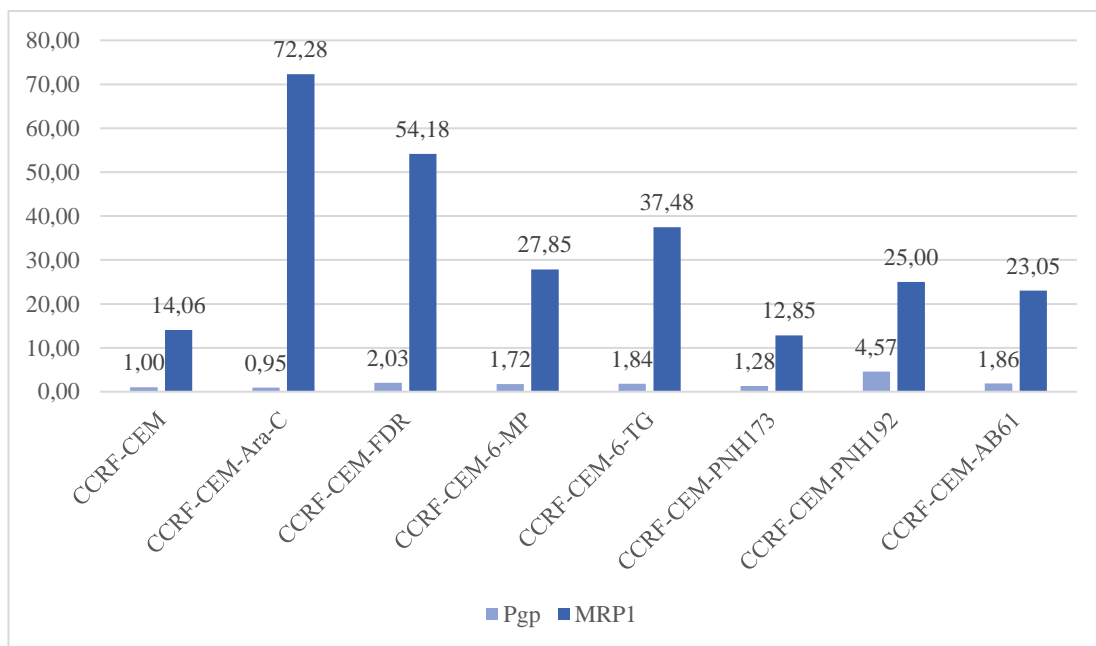
## 5.3 Základní charakterizace rezistentních linií

### 5.3.1 Exprese Pgp a MRP1

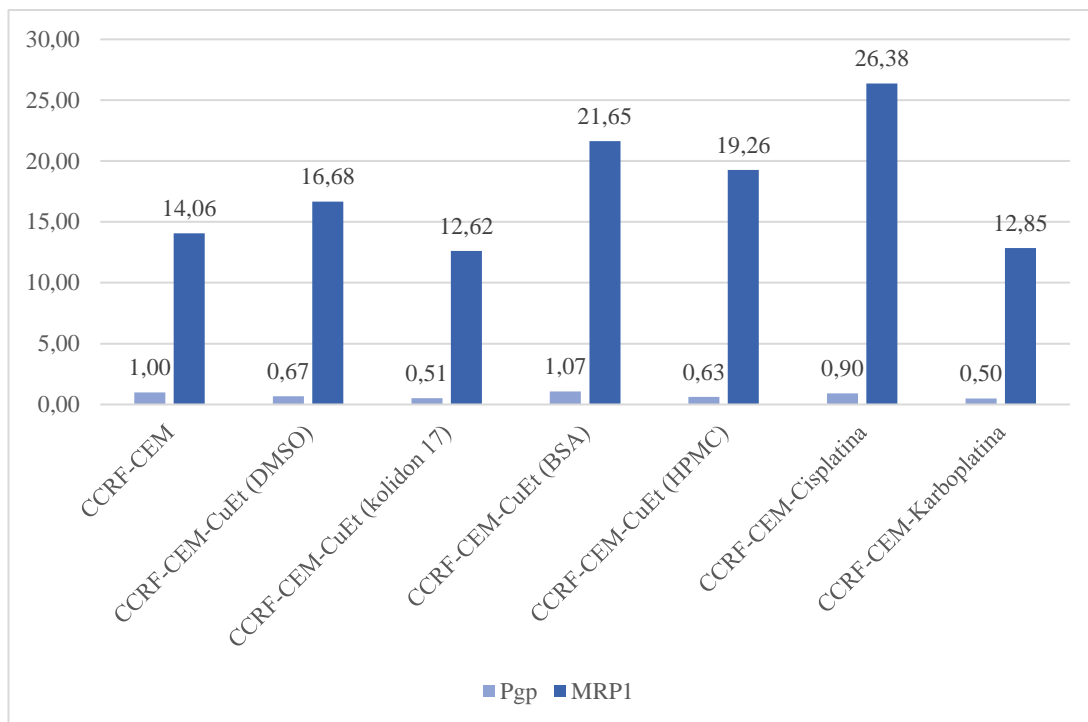
V rámci základní charakterizace rezistentních linií byla testována exprese transportérů asociovaných se vznikem mnohočetné lékové rezistence, P-glykoproteinu (Pgp) a proteinu spojeného s mnohočetnou lékovou rezistencí (MRP1, z angl. multidrug resistance related protein 1). Exprese obou proteinů byla ověřována jak na parentálních (graf č. 1), tak na selektovaných liniích (grafy č. 2 -6) s využitím specifických protilátek a detekce fluorescence průtokovým cytometrem. Vzorky byly normalizovány k izotopové kontrole.



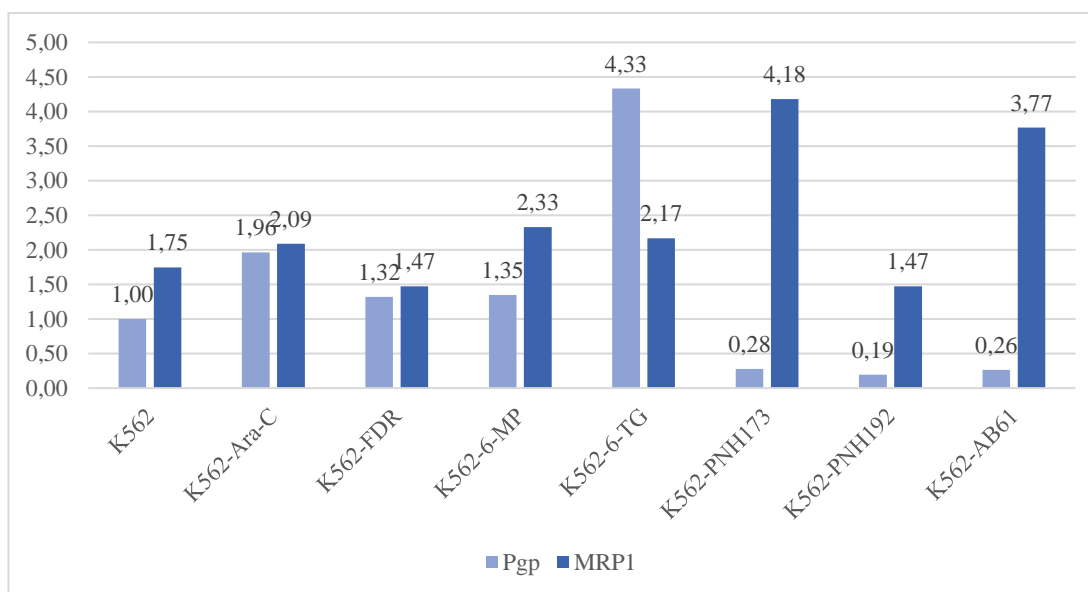
**Graf č. 1:** Exprese Pgp a MRP1 u parentálních linií CCRF-CEM, K562 a U-87MG ATCC.



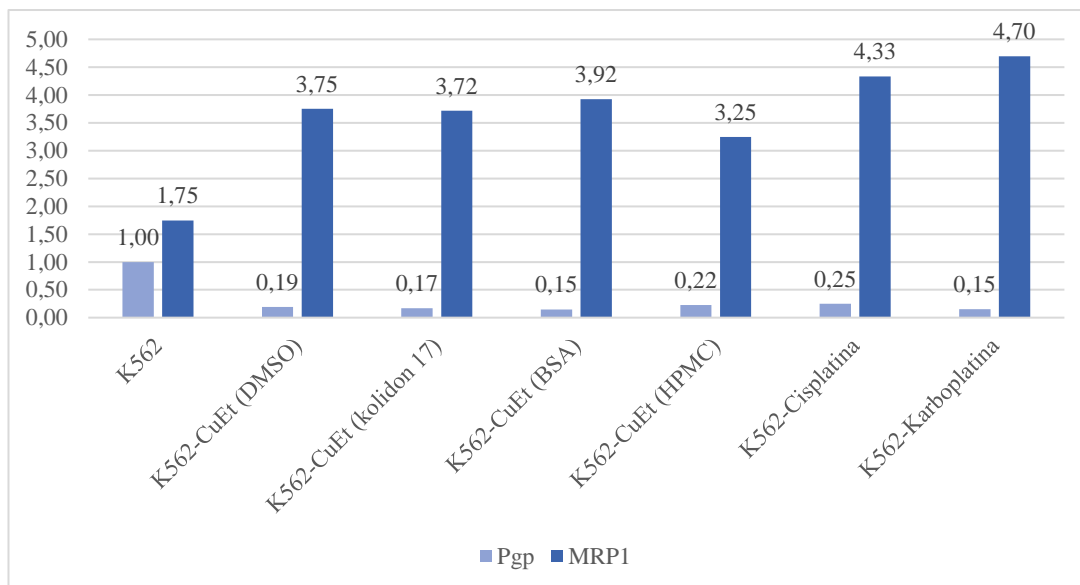
**Graf č. 2:** Exprese Pgp a MRP1 u linie CCRF-CEM a jejich odvozených linií selektovaných nukleosidy: cytarabinem (Ara-C), fludarabinem (FDR), 6-merkaptopurinem (6-MP), 6-thioguaninem (6-TG), PNH173, PNH192 a AB61.



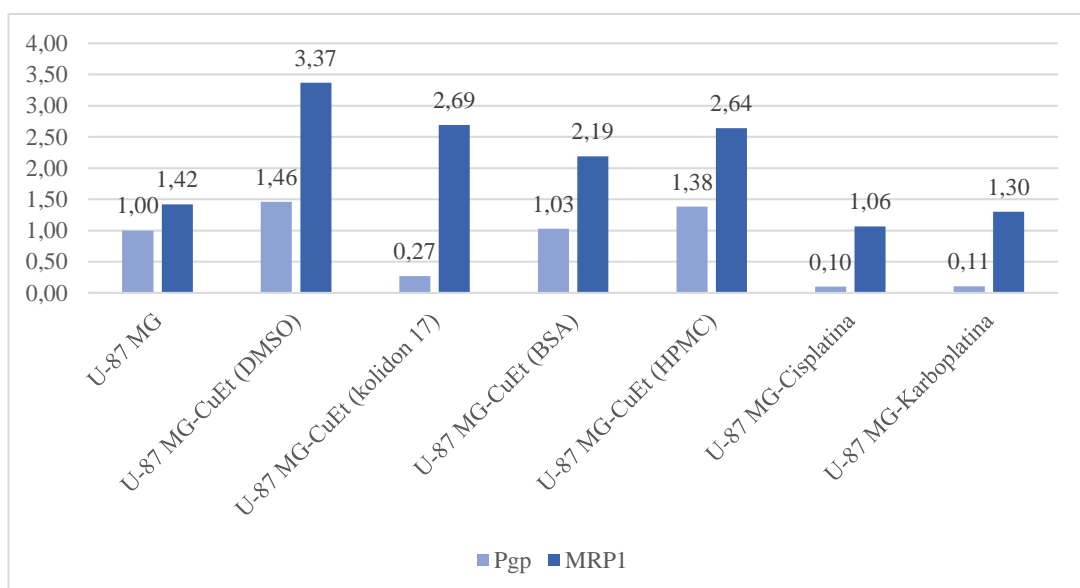
**Graf č. 3:** Expres Pgp a MRP1 u linie CCRF-CEM a jejích odvozených linií selektovaných čtyřmi variantami CuEt, cisplatinou a karboplatinou.



**Graf č. 4:** Expres Pgp a MRP1 u linie K562 a jejích odvozených linií selektovaných nukleosidy: cytarabinem (Ara-C), fludarabinem (FDR), 6-merkaptopurinem (6-MP), 6-thioguaninem (6-TG), PNH173, PNH192 a AB61.



**Graf č. 5:** Expres Pgp a MRP1 u linie K562 a jejích odvozených linií selektovaných čtyřmi variantami CuEt, cisplatinou a karboplatinou.



**Graf č. 6:** Expres Pgp a MRP1 u linie U-87MG ATCC a jejích odvozených linií selektovaných čtyřmi variantami CuEt, cisplatinou a karboplatinou.

### 5.3.2 Expres nukleosidových transportérů

U linií selektovaných nukleosidovými deriváty (cytarabinem, 6-merkaptopurinem, 6-thioguaninem, fludarabinem, PNH173, PNH192 a AB-61) byla pomocí real-time PCR ověřena exprese nukleosidových transportérů ENT1-4 a CNT 1-3. Expres byla ověřena na úrovni mRNA a výsledky (tabulka č.15 – 18) byly normalizovány k vnitřní kontrole (GAPDH).

**Tabulka č. 15:** Expresse ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) u linie CCRF-CEM a jejich odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii CCRF-CEM a směrodatná odchylka (sd).

Buněčná linie	ENT1			ENT2			ENT3			ENT4		
	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese
CCRF-CEM	4,29E-03	1,02E-03	1,00	5,40E-04	1,79E-04	1,00	1,20E-04	3,49E-05	1,00	3,46E-05	1,12E-05	1,00
CCRF-CEM-Ara-C	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00
CCRF-CEM-FDR	1,83E-07	2,60E-08	4,28E-05	0	0	0,00	1,75E-07	1,11E-07	0,0015	0	0	0,00
CCRF-CEM-6-MP	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00	4,96E-07	6,52E-07	0,02
CCRF-CEM-6-TG	5,00E-07	5,14E-08	1,17E-04	0	0	0,00	0	0	0,00	3,61E-07	3,50E-07	0,01
CCRF-CEM-PNH173	1,34E-07	1,57E-08	3,11E-05	0	0	0,00	0	0	0,00	0	0	0,00
CCRF-CEM-PNH192	0	0	0,00	0	0	0,00	2,17E-07	3,50E-08	0,0018	0	0	0,00
CCRF-CEM-AB61	3,73E-07	8,51E-08	8,68E-05	0	0	0,00	2,67E-07	1,06E-07	0,0022	0	0	0,00



**Tabulka č. 16:** Expresse koncentrativních nukleosidových transportérů (CNT) u linie CCRF-CEM a jejich odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii CCRF-CEM a směrodatná odchylka (sd).

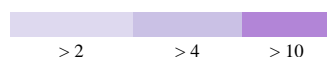
Buněčná linie	CNT1			CNT2			CNT3		
	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese
CCRF-CEM	1,05E-05	2,69E-06	1,00	0	0	0,00	0	0	0,00
CCRF-CEM-Ara-C	1,60E-04	1,80E-05	15,27	1,51E-04	2,73E-05	> 10	0	0	0,00
CCRF-CEM-FDR	4,70E-05	1,60E-05	4,48	2,66E-04	2,61E-06	> 10	0	0	0,00
CCRF-CEM-6-MP	1,23E-05	3,80E-06	1,17	2,50E-04	2,32E-05	> 10	0	0	0,00
CCRF-CEM-6-TG	1,15E-04	2,56E-05	10,93	3,74E-04	1,65E-05	> 10	0	0	0,00
CCRF-CEM-PNH173	6,12E-05	2,10E-06	5,83	5,40E-05	3,44E-06	> 10	0	0	0,00
CCRF-CEM-PNH192	1,49E-05	2,48E-06	1,43	3,39E-04	2,32E-05	> 10	0	0	0,00
CCRF-CEM-AB61	2,78E-05	5,14E-06	2,65	3,06E-04	1,95E-05	> 10	0	0	0,00



**Tabulka č. 17:** Expresse ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) u linie K562 a jejich odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii K562 a směrodatná odchylka (sd).

Buněčná linie	ENT1			ENT2			ENT3			ENT4		
	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese
K562	4,90E-03	7,18E-04	1,00	9,07E-03	2,16E-03	1,00	6,46E-03	2,85E-04	1,00	2,64E-05	5,89E-06	1,00
K562-Ara-C	1,11E-02	3,42E-03	2,26	1,42E-02	7,67E-04	1,56	3,58E-03	5,06E-04	0,55	6,31E-05	4,07E-05	2,10
K562-FDR	7,43E-03	6,91E-04	1,52	7,94E-03	1,47E-03	0,87	2,33E-03	5,87E-04	0,36	1,40E-04	2,72E-05	4,65
K562-6-MP	3,83E-02	1,88E-04	7,82	8,46E-03	9,10E-04	0,93	1,34E-02	1,96E-03	2,06	1,46E-04	2,14E-06	4,86
K562-6-TG	1,47E-02	1,36E-03	2,99	1,03E-02	2,85E-03	1,14	5,32E-03	2,61E-05	0,82	1,49E-04	5,10E-06	4,96
K562-PNH173	8,35E-03	2,04E-04	1,70	1,07E-02	5,78E-04	1,18	5,05E-03	6,13E-18	0,78	2,16E-05	2,30E-05	0,72
K562-PNH192	1,54E-02	3,76E-04	3,13	4,97E-03	5,11E-04	0,55	1,22E-02	1,13E-03	1,87	2,07E-04	1,62E-05	6,90
K562-AB61	1,56E-02	3,34E-03	3,18	8,49E-03	2,18E-03	0,93	5,69E-03	8,62E-04	0,88	2,98E-05	1,06E-05	0,99

Nárůst míry exprese



> 2                      > 4                      > 10

**Tabulka č. 18:** Expresse koncentrativních nukleosidových transportérů (CNT) u linie K562 a jejich odvozených selektovaných linií. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření, míra nárůstu/poklesu exprese vůči parentální linii K562 a směrodatná odchylka (sd).

Buněčná linie	CNT1			CNT2			CNT3		
	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese	Relativní exprese	sd	Nárůst/pokles exprese
K562	3,21E-05	4,73E-07	1,00	8,41E-07	6,92E-07	1,00	1,14E-06	4,09E-07	1,00
K562-Ara-C	2,73E-05	1,56E-05	0,85	2,00E-06	3,60E-07	2,38	1,72E-04	1,51E-05	151,13
K562-FDR	3,57E-05	2,52E-05	1,12	0	0	0,00	1,39E-05	2,10E-06	12,21
K562-6-MP	1,62E-04	9,54E-06	5,07	8,86E-05	7,30E-05	105,42	3,57E-04	3,67E-05	314,22
K562-6-TG	7,73E-05	3,09E-05	2,41	0	0	0,00	1,16E-05	3,78E-06	10,17
K562-PNH173	2,85E-05	1,03E-05	0,89	0	0	0,00	1,18E-05	2,41E-06	10,35
K562-PNH192	1,48E-04	4,01E-05	4,62	0	0	0,00	5,56E-05	2,72E-07	48,90
K562-AB61	3,68E-05	1,44E-06	1,15	8,27E-07	4,01E-07	0,98	3,95E-05	6,93E-06	34,73

Nárůst míry exprese

Gen nebyl exprimován



> 2                      > 4                      > 10



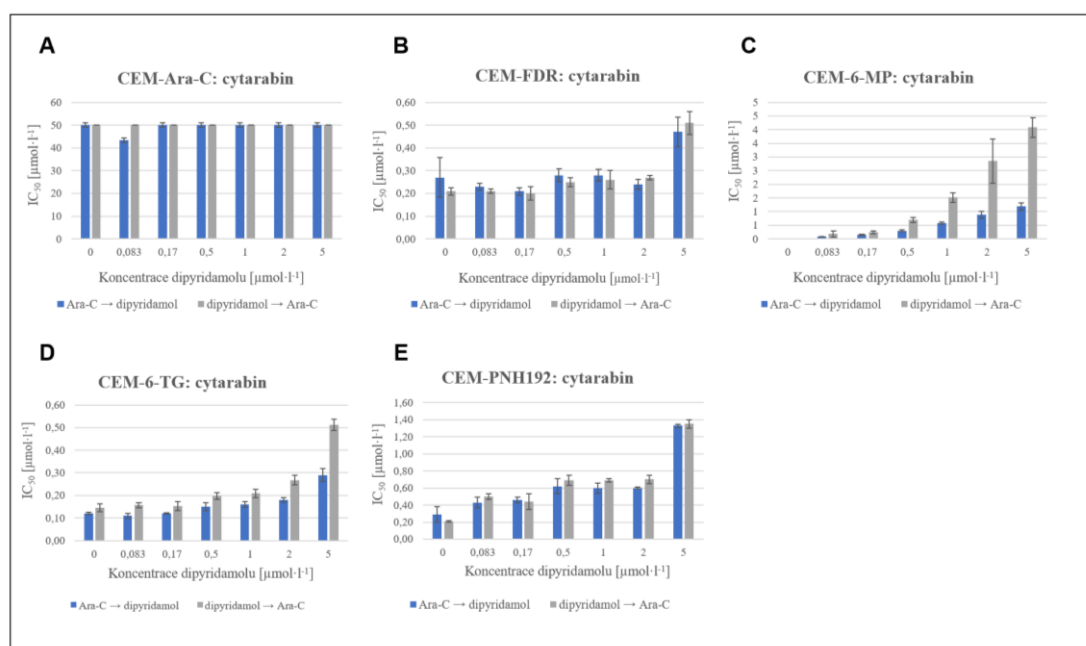
### 5.3.3 Funkční test nukleosidových transportérů

Pro linie selektované látkami s nukleosidovou strukturou byly provedeny funkční testy s využitím dipyridamolu a S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosinu (NBTI). Těmto testům předcházelo ověření toxicity samotných inhibitorů, přičemž výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 19.

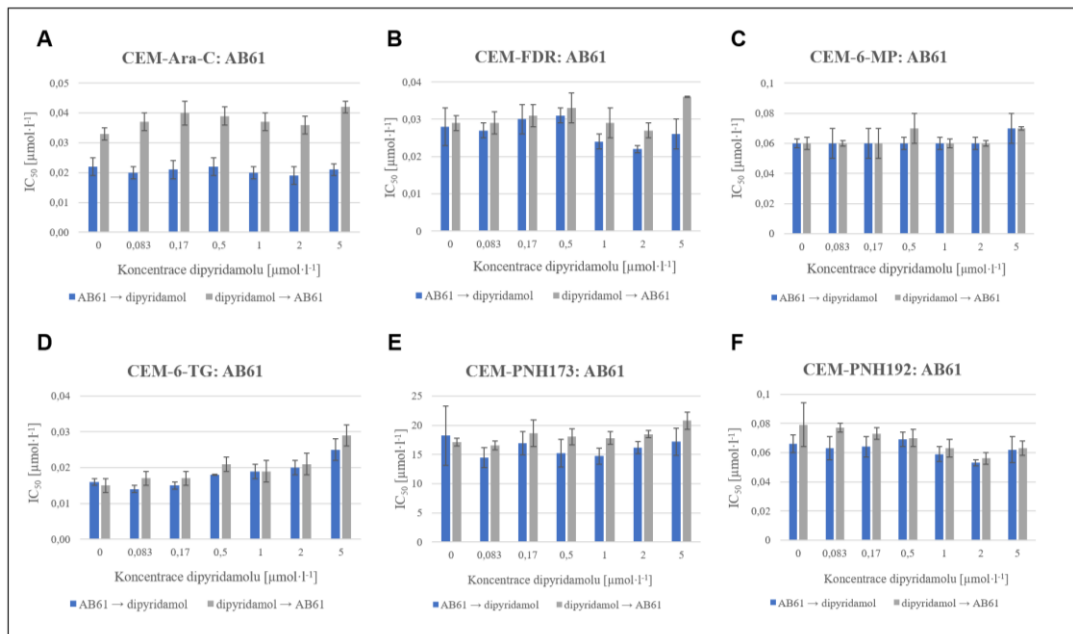
Během funkčních testů byl sledován vliv přítomnosti inhibitorů na senzitivitu buněk k vybraným látkám. Dipyridamol byl přidáván do reakce v 7 různých koncentracích: 0,2 až 5,0  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  před/ po přidání testovaných látek (obě varianty jsou ve výsledcích barevně vyznačeny). Senzitivita buněk byla hodnocena pomocí MTS testu cytotoxicity a vyjádřena pomocí hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Výsledky jsou uvedeny v grafech č. 7 až 10. NTBI byl testován při jedné koncentraci 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 20.

**Tabulka č. 19:** Toxicita nukleosidových inhibitorů

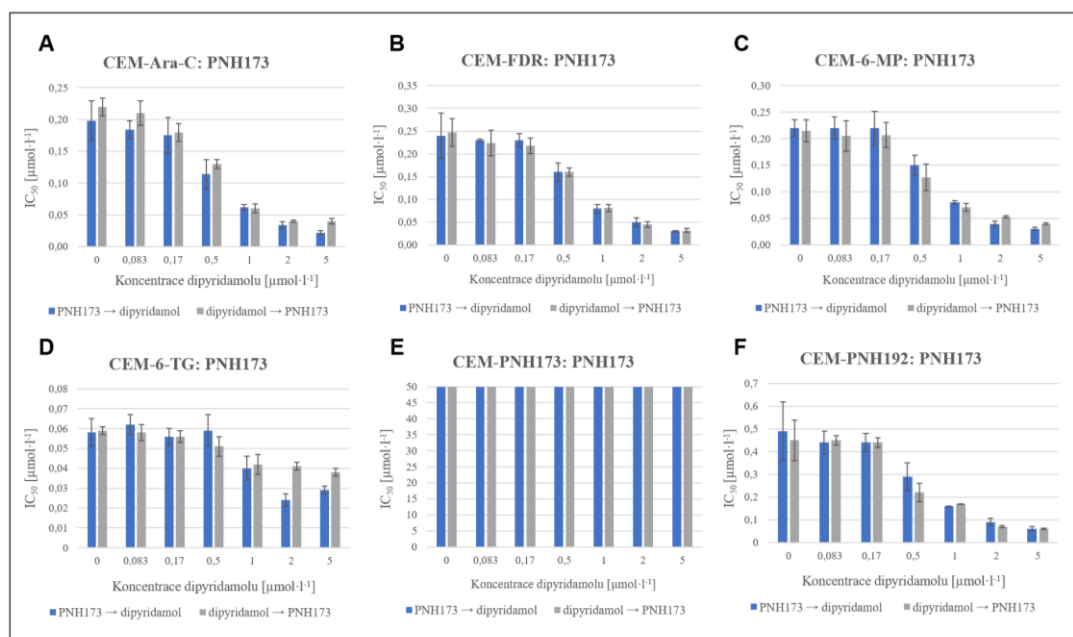
Buněčná linie	Dipyridamol		S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin	
	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd
CCRF-CEM	18,73	0,14	> 50	0
CCRF-CEM-AraC	16,83	4,69	> 50	0
CCRF-CEM-FDR	27,40	1,44	49,47	0,82
CCRF-CEM-6-MP	16,94	0,53	> 50	0
CCRF-CEM-6-TG	20,46	0,75	> 50	0
CCRF-CEM-PNH173	29,30	3,90	> 50	0
CCRF-CEM-PNH192	27,59	1,97	42,62	7,06
CCRF-CEM-AB61	26,64	3,40	42,22	6,79



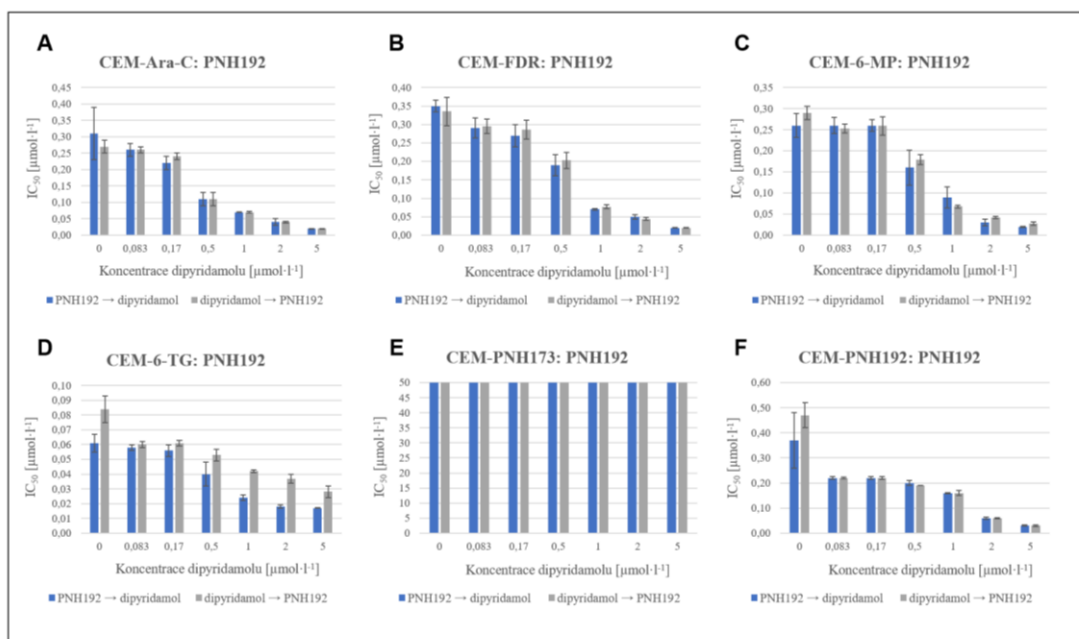
**Graf č. 7:** Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro **cytarabin** (Ara-C) u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyridamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem a (E) CCRF-CEM selektované PNH192.



**Graf č. 8:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro **AB61** u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyrindamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem, (E) CCRF-CEM selektované PNH173 a (F) CCRF-CEM selektované PNH192.



**Graf č. 9:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro **PNH173** u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyrindamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem, (E) CCRF-CEM selektované PNH173 a (F) CCRF-CEM selektované PNH192.



**Graf č. 10:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro PNH192 u vybraných rezistentních linií v přítomnosti dipyrindamolu. (A) CCRF-CEM selektované cytarabinem, (B) CCRF-CEM selektované fludarabinem, (C) CCRF-CEM selektované 6-merkaptopurinem, (D) CCRF-CEM selektované 6-thioguaninem, (E) CCRF-CEM selektované PNH173 a (F) CCRF-CEM selektované PNH192.

**Tabulka č. 20:** Toxicita vybraných nukleosidových látek na parentální linii CCRF-CEM bez a po přidání inhibitoru S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosinu (NBTI).

Látky	CCRF-CEM		CCRF-CEM + 10 $\mu\text{M}$ NBTI		Nárůst rezistence (x-krát)
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	
Cytarabin	0,01	0,0016	3,38	0,017	244,20
Fludarabin	11,40	1,06	43,82	8,74	3,84
6-merkaptopurin	2,12	0,35	1,26	0,010	0,60
6-thioguanin	0,20	0,011	0,23	0,01	1,15
5-fluorouracil	19,22	4,29	15,79	1,76	0,82
Gemcitabin	0,0033	0,0003	2,17	0,20	658,08
Roskovitin	20,92	2,26	19,73	2,80	0,94
AB-61	0,04	0,001	0,09	0,004	2,47
PNH173	0,12	0,010	0,10	0,001	0,87
PNH192	0,11	0,003	0,13	0,03	1,16





## 5.4 Testování nových potenciálních léčiv

Selektované buněčné linie s rezistentním fenotypem byly použity pro testování nových látek vykazujících vysokou aktivitu na parentální linii CCRF-CEM ( $IC_{50} < 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a zároveň nízkou toxicitu pro nenádorové linie MRC-5 (buňky plicní tkáně) a BJ (buňky kůže předkožky). Celkem bylo vybráno 22 látek, přičemž byla hodnocena jejich cytotoxicita vůči buňkám selektovaným cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem, 6-thioguaninem, PNH173, PNH192 a AB-61 a to jak u linie CCRF-CEM, tak u K562. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 21 až 24.

**Tabulka č. 21:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **CCRF-CEM** (selektce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selektivnímu tlaku.

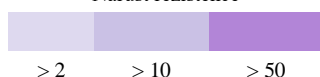
LEM code	CCRF-CEM		CCRF-CEM: selektce cytarabinem			CCRF-CEM: selektce fludarabinem			CCRF-CEM: selektce 6-merkaptopurinem			CCRF-CEM: selektce 6-thioguaninem		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
LEM00001208	0,057	0,023	0,31	0,02	5,45	0,18	0,03	3,15	0,017	0,01	0,31	0,010	0,0001	0,17
LEM00001300	0,047	0,028	0,012	0,004	0,26	0,012	0,002	0,25	0,009	0,00	0,20	0,005	0,0007	0,11
LEM00001302	0,11	0,026	0,019	0,001	0,17	0,019	0,001	0,18	0,010	0,00	0,09	0,007	0,0009	0,06
LEM00001305	0,44	0,054	37,09	25,77	84,30	2,45	0,49	5,57	0,009	0,00	0,02	0,004	0,0011	0,01
LEM00001306	0,036	0,015	0,25	0,09	6,81	0,21	0,07	5,94	0,082	0,02	2,28	0,020	0,0021	0,56
LEM00001307	0,563	0,089	0,075	0,02	0,13	0,067	0,01	0,12	0,016	0,01	0,03	0,012	0,0014	0,02
LEM00001309	0,674	0,034	0,150	0,01	0,22	0,082	0,01	0,12	0,039	0,01	0,06	0,031	0,0075	0,05
LEM00001313	0,172	0,133	0,046	0,01	0,27	0,049	0,01	0,28	0,007	0,00	0,04	0,006	0,0003	0,03
LEM00001315	0,431	0,259	0,16	0,04	0,37	0,13	0,01	0,30	0,032	0,01	0,08	0,016	0,0028	0,04
LEM00001316	0,11	0,003	0,021	0,003	0,19	0,024	0,01	0,21	0,030	0,01	0,27	0,011	0,0008	0,10
LEM00001319	0,143	0,009	0,031	0,01	0,22	0,078	0,002	0,55	0,018	0,00	0,13	0,009	0,0001	0,07
LEM00001320	0,206	0,043	> 50	0,00	> 242,72	0,046	0,02	0,22	0,008	0,00	0,04	0,005	0,0004	0,03
LEM00001324	0,064	0,004	0,86	0,53	13,36	1,07	0,57	16,65	0,029	0,00	0,46	0,013	0,0014	0,21
LEM00001326	0,162	0,09	0,094	0,02	0,58	0,39	0,13	2,40	0,021	0,00	0,13	0,011	0,0013	0,07
LEM00001546	0,089	0,002	0,018	0,002	0,21	0,014	0,002	0,16	0,007	0,00	0,08	0,001	0,0000	0,01
LEM00001548	0,05	0,006	4,40	1,27	88,00	24,48	4,20	489,60	0,021	0,00	0,43	0,012	0,0007	0,25
LEM00001549	0,035	0,014	19,64	1,22	561,14	2,60	0,42	74,29	0,007	0,00	0,19	0,003	0,0007	0,09
LEM00001551	0,423	0,082	0,81	0,20	1,92	> 50	0,00	> 118,2	0,061	0,05	0,14	0,052	0,0078	0,12
LEM00001552	0,578	0,569	43,11	42,13	74,58	0,006	0,001	0,01	0,008	0,00	0,01	0,008	0,0005	0,01
LEM00001555	0,012	0,001	0,001	0,001	0,05	0,001	0,00	0,08	0,000	0,00	0,01	0,001	0,0000	0,08
LEM00011473	0,403	0,076	0,020	0,002	0,05	0,025	0,001	0,06	0,017	0,00	0,04	0,019	0,0016	0,05



**Tabulka č. 22:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **CCRF-CEM** (selektce PNH173, PNH192 a AB61) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Testované látky	CCRF-CEM		CCRF-CEM: selektce PNH173			CCRF-CEM: selektce PNH192			CCRF-CEM: selektce AB61		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
LEM00001208	0,057	0,023	7,42	1,81	130,18	19,68	2,83	345,19	0,83	0,092	14,61
LEM00001300	0,047	0,028	0,39	0,018	8,36	0,67	0,18	14,16	0,19	0,012	4,11
LEM00001302	0,11	0,026	0,99	0,058	8,97	1,27	0,16	11,53	0,21	0,034	1,93
LEM00001305	0,44	0,054	2,57	0,17	5,84	2,54	0,27	5,77	0,55	0,13	1,25
LEM00001306	0,036	0,015	30,81	6,40	855,71	23,95	2,36	665,23	0,40	0,050	11,12
LEM00001307	0,563	0,089	0,50	0,037	0,89	0,50	0,033	0,89	0,11	0,018	0,20
LEM00001309	0,674	0,034	0,95	0,059	1,40	0,79	0,040	1,17	0,13	0,020	0,19
LEM00001313	0,172	0,133	0,40	0,038	2,31	0,58	0,017	3,36	0,21	0,009	1,20
LEM00001315	0,431	0,259	2,66	0,36	6,16	3,22	0,46	7,48	0,35	0,045	0,80
LEM00001316	0,11	0,003	1,05	0,19	9,53	1,21	0,16	11,01	0,31	0,016	2,80
LEM00001319	0,143	0,009	1,50	0,042	10,52	1,87	0,19	13,08	0,38	0,030	2,67
LEM00001320	0,206	0,043	0,44	0,031	2,12	0,43	0,021	2,07	0,11	0,018	0,52
LEM00001324	0,064	0,004	0,58	0,042	9,01	1,58	0,056	24,76	0,43	0,019	6,73
LEM00001326	0,162	0,09	1,83	0,11	11,32	1,74	0,092	10,71	0,65	0,082	4,04
LEM00001546	0,089	0,002	0,61	0,27	6,82	8,52	0,25	95,71	0,066	0,004	0,74
LEM00001548	0,05	0,006	0,31	0,020	6,25	0,55	0,014	10,99	0,062	0,002	1,24
LEM00001549	0,035	0,014	0,24	0,021	6,74	0,31	0,030	8,94	0,043	0,007	1,22
LEM00001551	0,423	0,082	1,49	0,20	3,52	1,35	0,068	3,19	0,12	0,011	0,28
LEM00001552	0,578	0,569	0,030	0,001	0,05	0,024	0,001	0,04	0,010	0,002	0,02
LEM00001555	0,012	0,001	0,024	0,003	2,00	0,026	0,007	2,16	0,016	0,002	1,31
LEM00001473	0,403	0,076	0,088	0,010	0,22	0,106	0,014	0,26	0,059	0,004	0,15

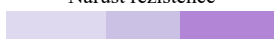
Nárůst rezistence



**Tabulka č. 23:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selektce cytarabinem, fludarabinem, 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Testované látky	K562		K562: selektce cytarabinem			K562: selektce fludarabinem			K562: selektce 6-merkaptopurinem			K562: selektce 6-thioguaninem		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
LEM00001208	0,09	0,1	0,038	0,005	0,42	0,079	0,016	0,88	0,11	0,018	1,20	0,59	0,129	6,53
LEM00001300	0,15	0,02	0,081	0,005	0,54	0,12	0,033	0,83	0,12	0,010	0,78	0,16	0,043	1,09
LEM00001302	0,24	0,02	0,074	0,009	0,31	0,13	0,009	0,55	0,16	0,021	0,68	0,22	0,020	0,93
LEM00001305	0,35	0,05	0,21	0,028	0,61	0,24	0,028	0,69	0,43	0,023	1,23	0,63	0,024	1,81
LEM00001306	0,26	0,01	0,094	0,010	0,36	0,16	0,028	0,61	0,17	0,019	0,66	0,69	0,115	2,65
LEM00001307	0,33	0,03	0,107	0,010	0,33	0,23	0,018	0,70	0,32	0,007	0,96	0,29	0,015	0,87
LEM00001309	3,23	0,33	0,519	0,029	0,16	1,25	0,121	0,39	1,66	0,139	0,51	0,73	0,17	0,23
LEM00001313	0,09	0,01	0,039	0,003	0,43	0,054	0,013	0,60	0,10	0,001	1,14	0,15	0,026	1,72
LEM00001315	0,34	0,05	0,137	0,012	0,40	0,18	0,032	0,52	0,26	0,008	0,77	0,31	0,031	0,91
LEM00001316	0,25	0,03	0,079	0,007	0,32	0,11	0,012	0,42	0,17	0,013	0,70	0,22	0,029	0,90
LEM00001319	0,09	0,01	0,038	0,009	0,42	0,045	0,005	0,50	0,085	0,005	0,94	0,14	0,018	1,61
LEM00001320	0,25	0,03	0,087	0,005	0,35	0,14	0,005	0,56	0,20	0,015	0,79	0,32	0,031	1,29
LEM00001324	0,06	0,0009	0,019	0,001	0,31	0,025	0,003	0,42	0,060	0,013	0,99	0,14	0,010	2,33
LEM00001326	0,12	0,03	0,022	0,004	0,18	0,038	0,017	0,32	0,11	0,014	0,92	0,17	0,033	1,42
LEM00001546	0,11	0,01	0,044	0,010	0,40	0,099	0,030	0,90	0,092	0,013	0,84	0,14	0,009	1,27
LEM00001548	0,08	0,003	0,031	0,002	0,39	0,062	0,007	0,78	0,057	0,007	0,71	0,32	0,18	4,02
LEM00001549	0,05	0,004	0,025	0,001	0,50	0,036	0,006	0,73	0,037	0,005	0,74	0,19	0,001	3,83
LEM00001551	0,88	0,15	0,299	0,038	0,34	0,57	0,040	0,65	0,537	0,039	0,61	0,74	0,083	0,84
LEM00001552	0,13	0,01	0,039	0,006	0,30	0,073	0,007	0,56	0,077	0,007	0,59	0,19	0,002	1,47
LEM00001555	0,05	0,01	0,023	0,003	0,47	0,035	0,006	0,69	0,042	0,005	0,84	0,016	0,000	0,32
LEM00011473	0,04	0,002	0,032	0,007	0,79	0,052	0,002	1,30	0,052	0,006	1,29	0,044	0,005	1,09

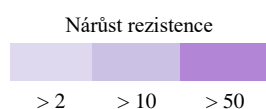
Nárůst rezistence



> 2      > 10      > 50

**Tabulka č. 24:** Citlivosti parentálních a selektovaných linií **K562** (selektce PNH173, PNH192 a AB61) vůči vybraným aktivním látkám. V tabulce jsou uvedeny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], směrodatné odchylky (sd) a také nárůst rezistence oproti parentální linii, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku.

Testované látky	K562		K562: selektce PNH173			K562: selektce PNH192			K562: selektce AB61		
	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	sd	Nárůst rezistence (x-krát)
LEM00001208	0,09	0,1	> 50	0,00	>555,56	11,73	1,69	130,33	> 50	0,00	> 555,56
LEM00001300	0,15	0,02	7,65	0,88	51,00	0,60	0,16	4,00	4,56	0,44	30,40
LEM00001302	0,24	0,02	7,46	1,06	31,08	1,07	0,34	4,46	6,83	0,62	28,46
LEM00001305	0,35	0,05	16,55	1,15	47,29	10,38	1,44	29,66	46,87	6,26	133,91
LEM00001306	0,26	0,01	> 50	0,00	> 192,31	> 50	0,00	> 192,31	> 50	0,00	> 192,31
LEM00001307	0,33	0,03	9,72	0,76	29,45	1,31	0,14	3,97	8,46	0,34	25,64
LEM00001309	3,23	0,33	0,47	0,04	0,15	0,49	0,15	0,15	1,62	0,22	0,50
LEM00001313	0,09	0,01	46,43	5,86	515,89	8,68	0,58	96,44	17,86	2,86	198,44
LEM00001315	0,34	0,05	10,72	0,68	31,53	4,47	1,60	13,15	9,78	0,17	28,76
LEM00001316	0,25	0,03	7,41	1,36	29,64	3,34	0,44	13,36	7,15	0,04	28,60
LEM00001319	0,09	0,01	5,46	1,63	60,67	1,40	0,24	15,56	4,89	1,02	54,33
LEM00001320	0,25	0,03	37,27	7,02	149,08	9,81	1,35	39,24	16,25	1,92	65,00
LEM00001324	0,06	0,0009	10,62	2,24	177,00	1,81	0,19	30,17	0,19	0,00	3,17
LEM00001326	0,12	0,03	> 50	0,00	> 416,67	0,41	0,24	3,42	9,57	0,44	79,75
LEM00001546	0,11	0,01	23,79	2,68	216,27	0,41	0,11	3,73	14,40	4,54	130,91
LEM00001548	0,08	0,003	21,02	4,69	262,75	9,10	0,75	113,75	10,90	0,63	136,25
LEM00001549	0,05	0,004	9,95	0,41	199,00	2,38	0,46	47,60	8,10	1,29	162,00
LEM00001551	0,88	0,15	6,12	1,15	6,95	3,29	1,39	3,74	7,91	2,00	8,99
LEM00001552	0,13	0,01	32,78	3,81	252,15	0,19	0,00	1,46	22,82	3,22	175,54
LEM00001555	0,05	0,01	0,02	0,01	0,40	0,01	0,00	0,22	0,02	0,00	0,40
LEM00001473	0,04	0,002	0,04	0,02	1,00	0,06	0,01	1,50	0,03	0,00	0,75



## 6. Diskuse

### 6.1 *In vitro* modely lékové rezistence na nukleosidová cytostatika

V experimentální části práce byly úspěšně vytvořeny buněčné modely rezistence vůči nukleosidovým cytostatikům (cytarabinu, fludarabinu, 6-merkaptopurinu, 6-thioguaninu, PNH173, PNH192 a AB61), a to jak pro akutní lymfoblastickou leukémii (CCRF-CEM), tak pro chronickou myeloidní leukémii (K562).

Selekce buněk s rezistentním fenotypem probíhala postupným zvyšováním koncentrace látky v kultivačním médiu a po přibližně osmi týdnech a šesti cyklech navýšení koncentrací byla ověřena citlivost buněk vůči vybraným cytostatikům. Testovala se jak senzitivita vůči látce využívané v selekci, tak vůči dalším látkám s nukleosidovou strukturou, pro ověření případné zkřížené rezistence. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5 až 8.

#### 6.1.1 Selekcce cytarabinem (Ara-C)

V případě linií selektovaných cytarabinem (K562 i CCRF-CEM) došlo k výraznému nárůstu rezistence na samotný cytarabin (2 941- 4 836x vyšší hodnota  $IC_{50}$ ), ale také na gemcitabin (> 2 500 - 29 418x vyšší  $IC_{50}$ ) a fludarabin (> 1-48x vyšší  $IC_{50}$ ). Stejný profil zkřížené rezistence je popisován také v literatuře.<sup>183-185</sup> Například u buněk Ne-Hodkingského lymfomu (linie MCL) rezistentního na fludarabin, byla popsána vysoká rezistence na cytarabin i gemcitabin a současně také na kladribin.<sup>186</sup> Mechanismus zkřížené rezistence mezi cytarabinem a těmito léčivy je v literatuře často spojován se sníženou expresí deoxycytidin kinázy (dCK), která fosforyluje cytarabin na jeho aktivní formu, případně s mutacemi v genu pro tento enzym mající za následek jeho inaktivaci<sup>119,186</sup> a s aktivitou membránových transportérů.<sup>185</sup>

V našem případě byla u buněk selektovaných cytarabinem ověřena míra exprese proteinů spojovaných s MDR (Pgp, MRP1). U linie CCRF-CEM nebyla detekována žádná výrazná změna v expresi Pgp, ovšem byla více než pětinašobně zvýšena exprese proteinu MRP1, přičemž gemcitabin je substrátem tohoto transportéru. Zvýšená exprese MRP1 pak může napomáhat snížení jeho účinnosti a podporovat tak rozvoj pozorované zkřížené rezistence.

U linie CCRF-CEM selektované cytarabinem byla ověřena také exprese nukleosidových transportérů, přičemž nebyla detekována žádná mRNA pro ENT transportéry, pouze mRNA pro CNT1 a 2. V případě CNT1 transportéru došlo k 15-ti násobnému zvýšení exprese oproti parentální linii. V podobné míře byl exprimován také CNT2 transportér, jehož exprese nebyla detekována u parentální linie CCRF-CEM.

Dle literatury je dominantní transportérem pro influx cytarabinu, fludarabinu a gemcitabinu právě ENT1 (gemcitabin je transportován také ENT2) a jeho redukováná exprese pak může napomáhat sníženému influxu všech tří látek do buňky a tím rozvíjet jejich rezistenci. Tato hypotéza byla ověřena pomocí inhibitoru S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosinu (NBTI), který je inhibitorem ENT1 a 2 transportérů. Senzitivní buňky (CCRF-CEM) byly 60 minut inkubovány v přítomnosti inhibitoru v koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a poté vystaveny působení cytostatik na 72 hodin. Výsledky byly srovnány s citlivostí buněk bez působení inhibitoru (tabulka č. 20). Buňky vystavené NBTI vykazovaly 244x vyšší odolnost vůči cytarabinu, 3,84x oproti fludarabinu a 658x vyšší vůči gemcitabinu. Tyto výsledky spolu s pozorovaným profilem exprese nukleosidových transportérů naznačují, že snížená exprese/aktivita ENT transportérů napomáhá vzniku zkřížené rezistence na cytarabin, gemcitabin a fludarabin u akutní lymfoblastické leukémie.

Abychom ověřili vliv dalších membránových transportérů na pozorovaný rezistentní fenotyp, využili jsme dipyridamol, který je inhibitorem ENT transportérů, ale inhibuje také Pgp a MRP proteiny, jedná se tedy o nespecifický inhibitor membránových transportérů. V tomto experimentu jsme sledovali citlivost různých rezistentních linií (CCRF-CEM: Ara-C, FDR, 6-MP, 6-TG, PNH192) na cytarabin v přítomnosti dipyridamolu. Ve všech případech (s výjimkou linie CCRF-CEM-Ara-C, která má hodnoty  $\text{IC}_{50}$  nad maximální koncentrací našeho testování) došlo působením dipyridamolu k nárůstu rezistence na cytarabin (graf č. 7). Vyšší nárůst byl pozorován v případě, že byl nejprve aplikován inhibitor a až následně cytarabin. Toto pozorování je v souladu s předchozími výsledky naznačujícím význam ENT transportérů jako cest pro influx cytarabinu do buněk.

V případě linie K562 selektované cytarabinem došlo rovněž k výraznému nárůstu rezistence jak na cytarabin, tak na fludarabin i gemcitabin. Na úrovni exprese ABC transportérů došlo k dvojnásobnému nárůstu exprese jak Pgp, tak MRP1, ovšem míra exprese ENT transportérů byla srovnatelná s expresí parentální linie K562. Došlo pouze k výraznému zvýšení exprese CNT3 transportéru (151x), který zajišťuje influx cytarabinu, fludarabinu i gemcitabinu, což spíše podporuje vyšší aktivitu těchto látek vůči dané buněčné linii. V tomto případě se tedy na vzniku rezistentního fenotypu pravděpodobně podílí spíše zvýšený exflux látek zajištěný proteiny Pgp a MRP. V následné práci by bylo vhodné ověřit například expresi dalších MRP isoform a aktivitu deoxycytidin kinázy, která je klíčová pro metabolismus cytarabinu a gemcitabinu do jejich aktivních forem, případně cytidin deaminázy, která zajišťuje jejich eliminaci.<sup>187,188</sup>

### 6.1.2 Selektace fludarabinem

Buňky selektované fludarabinem vykazovaly v případě linie CCRF-CEM opět zkříženou rezistenci mezi fludarabinem ( $> 48x$  vyšší hodnota  $\text{IC}_{50}$ ), cytarabinem ( $48x$  vyšší

IC<sub>50</sub>) a gemcitabinem (> 37x vyšší IC<sub>50</sub>), ale navíc zde vzrostla odolnost také vůči 6-thioguaninu (> 294x), 6-merkaptopurinu (> 106x), látce AB61 (28x) a 5-fluorouracilu (4x). U této linie došlo k více než trojnásobnému nárůstu exprese proteinu MRP1 a dvojnásobné expresi proteinu Pgp, přičemž FDR, Ara-C, GEM, 6-MP i 6-TG jsou substráty MRP1 a FDR i GEM jsou také substrátem Pgp. U těchto buněk byla zároveň více než 10 000x snížená exprese transportéru ENT1 a více než 600x snížená také exprese ENT3 (influx fludarabinu je řízen transportéry ENT1-3). Zvýšený eflux pomocí vyšší exprese MRP1 a Pgp, spolu se sníženým efluxem prostřednictvím ENT1 transportéru mohou společně napomáhat rozvoji pozorované zkřížené rezistence.

Zajímavé je, že u linie K562 selektované rovněž fludarabinem byl profil rezistence odlišný. Oproti linii CCRF-CEM byl nárůst rezistence mnohem méně výrazný. Vznikla zde rezistence pouze na fludarabin (> 1x vyšší IC<sub>50</sub>) a cytarabin (12x vyšší IC<sub>50</sub>) a došlo k mírnému nárůstu rezistence na 5-fluorouracil (3x vyšší IC<sub>50</sub>) a roskovitin (3x vyšší IC<sub>50</sub>). Také expresní profil MDR proteinů byl odlišný od linie CCRF-CEM. Došlo zde pouze k mírnému nárůstu exprese proteinu Pgp a v případě MRP1 proteinu exprese dokonce poklesla. Co se týče exprese nukleosidových transportérů v případě ENT1-3 nedošlo k žádné výrazné změně. Ovšem exprese transportéru ENT4 byla více než čtyřnásobně zvýšená. Změny byly detekovány také na úrovni exprese CNT transportérů, hladiny CNT1 byly srovnatelné s hladinami parentální linie K562, ovšem CNT2 transportér nebyl exprimován vůbec a exprese CNT2 transportéru byla 12x zvýšená. Tyto zvýšené hladiny exprese zmíněných transportérů by měly spíše podporovat vyšší senzitivitu těchto buněk vůči fludarabinu. Zde se tedy pravděpodobně uplatňují jiné mechanismy zodpovědné za sníženou aktivitu těchto látek. V následujících experimentech by bylo vhodné ověřit aktivitu enzymů metabolizujících fludarabin na jeho aktivní formu.

### **6.1.3 Selektce 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem**

Linie selektované 6-merkaptopurinem a 6-thioguaninem vykazovaly zkříženou rezistenci mezi těmito dvěma látkami a to jak v případě buněk CCRF-CEM, tak K562. Vzhledem ke strukturálním podobnostem těchto látek a skutečnosti, že je 6-TG metabolitem 6-MP, není tato zkřížená rezistence příliš překvapivá. V případě selektce 6-MP došlo kromě nárůstu rezistence na 6-MP a 6-TG, také ke zvýšení odolnosti vůči fludarabinu a AB-61 (u selektce na linii CCRF-CEM) a cytarabinu a 5-fluorouracilu (u selektce na K562).

U linie CCRF-CEM selektované 6-MP došlo k přibližně dvojnásobnému zvýšení exprese jak Pgp, tak MRP1, přičemž 6-TG a 6-MP jsou substráty MRP1 a jeho zvýšená exprese pak může způsobit zvýšený eflux těchto látek a snížení jejich účinnosti. Při ověření exprese nukleosidových transportérů byla u linie CCRF-CEM selektované 6-MP zjištěna nepřítomnost RNA pro transportéry ENT1-3 a exprese ENT4 byla 50x snížená. 6-MP i 6-TG

jsou substráty transportéru ENT2, přičemž 6-MP je transportován také ENT1, snížení míry jejich exprese mohlo tedy opět napomoci rozvoji rezistentního fenotypu. Oproti parentální linii byl přítomen transportér CNT2, ovšem pro 6-MP ani 6-TG nebyla popsána interakce s tímto proteinem.

Zajímavý je zde fakt, že přestože nejsou přítomny ENT transportéry (s výjimkou ENT4, jehož exprese je navíc oproti parentální linii silně snižená), stejně jako u selekce cytarabinem na linii CCRF-CEM, profil rezistence je odlišný a nevzniká zde rezistence na cytarabin a gemcitabin (obě tyto látky si zde zachovaly svou aktivitu). Jediný shodný bod je zvýšení rezistence na fludarabin. Pravděpodobně zde tedy dochází k dalším změnám, které umožňují cytarabinu a gemcitabinu zachovat si svou aktivitu, přičemž jejich transport do buňky bude pravděpodobně řízen CNT1 transportérem, vzhledem k absenci ENT1-3.

U linie K562 selektované 6-MP došlo pouze k mírnému nárůstu exprese Pgp a MRP1, přičemž nebyl tak výrazný jako u linie CCRF-CEM. Na úrovni exprese nukleosidových transportérů došlo skoro osminásobnému nárůstu exprese ENT1 a pětinasobnému nárůstu exprese ENT4. Zvýšené byly také hladiny mRNA pro CNT1 (5x vyšší), CNT2 (105x vyšší) i CNT3 (314x vyšší). Tyto buňky si, stejně jako CCRF-CEM selektované 6-MP, zachovaly zkříženou rezistenci mezi 6-MP a 6-TG, ale objevila se zde také nižší citlivost na cytarabin (13x vyšší hodnota  $IC_{50}$ ) a naopak zůstala zachována senzitivita na látku AB-61. V tomto případě tedy pravděpodobně rozvoj pozorovaných rezistencí spíše spojený s ovlivněním metabolických drah jednotlivých látek.

V případě selekce 6-thioguaninem vzrostla u linie CCRF-CEM rezistence nejen vůči 6-TG (> 294x) a 6-MP (> 106x), ale také vůči gemcitabinu (> 1,5 x), fludarabinu (23x) a cytarabinu (6x). U této linie bylo detekováno přibližně 30% snížení exprese ENT1 transportéru, přičemž transportéry ENT2 a 3 nebyly exprimovány vůbec. Právě absence ENT2 transportéru, který je významný pro transport 6-TG a 6-MP může značnou měrou přispívat k rozvoji rezistentního fenotypu na tato léčiva. Podobný pokles v expresi ENT2 transportéru byl popsán také v roce 2011, kdy MUDr. H. Karim Ph.D. provedl selekci buněk akutní lymfoblastické leukémie (MOLT-4) pomocí 6-thioguaninu a 6-merkaptopurinu a obě linie vykazovaly sníženou expresi jak ENT2, tak CNT3.<sup>189</sup> V našem případě nebyl CNT3 transportér exprimován v selektované ani parentální linii, na rozvoj rezistentního fenotypu tedy neměl vliv. Zároveň došlo u našich buněk k přibližně dvojnásobnému nárůstu exprese Pgp a skoro trojnásobnému nárůstu exprese proteinu MRP1, což může vysvětlit zkříženou rezistenci na GEM, FDR a Ara-C. Vliv

V případě selekce 6-thioguaninem na linii K562 došlo opět k vzniku zkřížené rezistence mezi 6-TG a 6-MP, vzrostla také odolnost vůči fludarabinu (>1x), cytarabinu (9x), AB-61 (8x) a 5-fluorouracilu (3x). U těchto buněk byla více než čtyřnásobně zvýšená exprese Pgp a došlo k mírnému nárůstu exprese MRP1, díky čemuž mohou být všechny zmíněné látky



efektivněji transportovány z vnitřního prostředí buňky a jejich cytotoxicita je díky tomu redukována.

#### **6.1.4 Selekcce AB-61**

Selekcce rezistentních buněk probíhala také pomocí tří experimentálních látek, přičemž první nich nese označení AB-61. Také v případě této látky vykazovaly buňky rezistenci nejen na látku využívanou k selekci, tj. na samotnou AB-61, ale také vůči dalším látkám. Linie CCRF-CEM selektovaná AB-61 vykazovala zkříženou rezistenci mezi látkami AB-61 (36x vyšší hodnota IC<sub>50</sub>), PNH173 (55x), cytarabinem (46x), gemcitabinem (> 39x), fludarabinem (> 33x), 6-merkaptopurinem (23x) a PNH192 (21x). U této linie byla více než 10 000x snížená exprese transportéru ENT1 a 450x snížená exprese ENT3, přičemž transportéry ENT2 a 4 nebyly exprimovány vůbec. Oproti parentální linii byl ale exprimován transportér CNT2. Expresse proteinů asociovaných s MDR (Pgp a MRP1) byla oproti parentální linii přibližně dvojnásobná. Profil exprese membránových transportérů, zejména snížení exprese ENT transportérů by mohl vysvětlit snížení aktivity cytarabinu, gemcitabinu, fludarabinu i 6-merkaptopurinu.

V případě linie K562 byl nejvýraznější nárůst rezistence u látek PNH173 (180x) a 6-merkaptopurinu (> 88x). Zvýšila se také odolnost vůči 5-fluorouacilu (15x), 6-thioguaninu (13x), cytarabinu (13x), látce PNH192 (11x) a roskovitinu (3x). Expresse nukleosidových transportérů byla srovnatelná s expresí u parentální linie se dvěma výjimkami – došlo k pětinasobnému zvýšení exprese ENT1 a 35ti násobnému zvýšení exprese CNT3 transportéru. Zároveň došlo k více než dvojnásobnému zvýšení exprese proteinu MRP1, ovšem zároveň pětinasobnému snížení exprese P-glykoproteinu. Zvýšená exprese MRP1 může přispívat k rozvoji zkřížené rezistence na léčiva, která jsou jeho substráty (CTR, 6-MP, 6-TG, 5-FU).

#### **6.1.5 Selekcce PNH192**

Druhou z testovaných experimentálních látek byla látka PNH192, přičemž také v jejím případě se podařilo vyselektovat buňky s rezistentním fenotypem a byla rovněž detekována přítomnost zkřížené rezistence. Ta vznikla u linie CCRF-CEM konkrétně mezi látkami PNH192 (4x nárůst hodnoty IC<sub>50</sub>), gemcitabinem (> 25x), cytarabinem (24x), fludarabinem (24x) a látkou PNH173 (4x). Expresse proteinu MRP1 byla u těchto buněk přibližně dvojnásobně zvýšená oproti parentální linii a exprese Pgp vzrostla více než 4x. Při ověření exprese nukleosidových transportérů bylo zjištěno, že zcela chybí transportéry ENT1, 2 a 4 a byla snížena exprese transportéru ENT3 (555x). Oproti parentální linii byl navíc exprimován transportér CNT2.

Také zde může snížení exprese ENT transportérů napomáhat snížení aktivity cytarabinu, gemcitabinu a fludarabinu, které jsou jimi transportovány do buněk.

U linie K562 selektované PNH192 vznikla zkřížená rezistence mezi PNH192 (111x), AB-61 (1063x), PNH173 (112x), 6-merkaptopurinem (> 88x), 5-fluorouracilem (> 19x), fludarabinem (> 1x), cytarabinem (12x), 6-thioguaninem (5x) a roskovitinem (4x). U těchto buněk nebyla výrazná změna v expresi MRP1 proteinu, ovšem exprese Pgp byla pětinasobně snížena. Exprese ENT transportérů byla srovnatelná s parentální linií, byla pouze zvýšená exprese ENT4 (7x). V případě CNT transportérů docházelo k vyšším odchylkám oproti parentální linii. Exprese CNT1 byla pětinasobně zvýšená, CNT2 nebyl exprimován vůbec a exprese CNT3 byla 49x zvýšená. Vzhledem k faktu, že CNT transportéry fungují jako influxní pumpy, jejich zvýšená exprese s největší pravděpodobností nebude přispívat k rozvoji pozorovaného rezistentního fenotypu. V tomto případě by bylo opět vhodné ověřit enzymy zajišťující aktivaci/inaktivaci jednotlivých látek.

### 6.1.6 Selekcce PNH173

Poslední testovanou experimentální látkou byla PNH173, která je ze všech tří aktuálně nejjintenzivněji studována díky své protinádorové aktivitě, jak *in vitro*, tak *in vivo* podmínkách. V současné době probíhá na Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci výzkum přesného mechanismu účinku této látky a v rámci této práce byl sledován mechanismus její rezistence. Jako první byla opět provedena selekcce buněk rezistentních na PNH173 a následně byla ověřena míra této rezistence, stejně jako případná zkřížená rezistence vůči dalším nukleosidovým cytostatikům.

Selekcce rezistentních klonů se podařila jak v případě buněčné linie CCRF-CEM, tak v případě linie K562. U linie CCRF-CEM vzrostla po selekci rezistence nejen na samotnou látku PNH-173 (> 714x), ale také na PNH-192 (> 625x), AB-61 (140x), 6-merkaptopurin (104x), 6-thioguanin (13x) a mírně také na fludarabin (2,35x). Tyto buňky vykazovaly expresi Pgp a MRP1 prakticky shodnou s expresí parentální linie bez selekčního tlaku, ale lišil se expresní profil nukleosidových transportérů. Došlo zde k 10 000násobnému snížení exprese ENT1, přičemž ENT2-4 nebyly exprimovány vůbec. Naopak exprese CNT1 se mírně zvýšila (6x) a oproti parentální linii byl exprimován také transportér CNT2. Redukce exprese ENT transportérů může opět přispívat k rozvoji rezistence na fludarabin, 6-merkaptopurin a 6-thioguanin.

Také v případě linie K562 byl pozorován vznik zkřížené rezistence. A to mezi látkou PNH173 (> 704x nárůst hodnoty IC<sub>50</sub>), AB-61 (986x), PNH192 (450x), 6-merkaptopurinem (51x), 6-thioguaninem (21x), 5-fluorouracilem (16x) a cytarabinem (11x). U této linie byla 2,4x zvýšena exprese proteinu MRP1 a zároveň 5x snížena exprese Pgp. Nárůst v expresi MRP1 může souviset s rozvojem rezistence na 6-MP, 6-TG, 5-FU a Ara-C, které jsou jeho substráty a nadměrný eflux může snižovat jejich účinnost. Co se týče exprese nukleosidových

transportérů, ta byla srovnatelná s expresí parentální linie K562, s výjimkou CNT2 transportéru, který nebyl vůbec exprimován a CNT3, jehož exprese byla 10x zvýšená.

### 6.1.7 Souhrn pro selekci nukleosidy

Souhrnně lze říci, že všechny linie selektované pomocí látek s nukleosidovou strukturou vykazovaly kříženou rezistenci napříč spektrem testovaných látek. Pro ověření případné mnohočetné lékové rezistence by bylo zapotřebí zahrnout do testování také cytostatika s odlišnou chemickou strukturou a jiným mechanismem účinku. Rozvoj MDR by mohl být očekávaný zejména u linií, se zvýšenou expresí Pgp a/ nebo MRP1, což jsou linie CCRF-CEM: AraC, FDR, 6-MP, 6-TG, PNH192 a K562: PNH173 a AB61. Pro kompletní popsání exprese proteinů spojených s MDR bude ověřena také exprese LRP a BCRP. Tato data jsou aktuálně v řešení a budou součástí disertační práce. Stejně tak budou ověřeny metabolické dráhy jednotlivých látek, zejména pak látky PNH173, která je potenciálním kandidátem na nové protinádorové léčivo.

### 6.1.8 Aplikace rezistentních buněčných modelů ve screeningu potenciálních léčiv

Pro námi vytvořené *in vitro* buněčné modely nukleosidových rezistencí byla nejen provedena základní charakterizace, ale jednotlivé buněčné linie byly také využity ve screeningu nových látek s cílem vyhledat struktury překonávající jednotlivé lékové rezistence. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 21 až 24.

Všechny testované látky pocházely z chemické knihovny Ústavu molekulární a translační medicíny a byly vybrány na základě svého terapeutického indexu, který je definován jako poměr cytotoxicity u nenádorových buněčných linií (BJ – fibroblasty předkožky a MRC-5 – plicní fibroblasty) ku cytotoxicitě u hematologických malignit (CCRF-CEM – akutní lymfoblastická leukémie a K562 – chronická myeloidní leukémie). Všechny vybrané látky vykazovaly vysokou selektivitu vůči nádorovým buňkám, přičemž jejich hodnoty  $IC_{50}$  byly v případě linie CCRF-CEM menší než  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do screeningu bylo vybráno celkem 21 látek.

V případě linie CCRF-CEM rezistentní na cytarabin bylo 5 látek více než 70x méně aktivních než u parentální linie. U tří látek byla aktivita 5x až 13x snížena, jedna látka vykazovala prakticky shodnou aktivitu na rezistentní i parentální linii a 12 látek bylo 3x až 20x aktivnějších na rezistentních liniích, než na parentálních.

U linie CCRF-CEM rezistentní na fludarabin byl profil aktivity látek velmi podobný předchozí linii rezistentní na cytarabin. Byla zde změna pouze u látek LEM 1320 a 1552, které byly schopné překonávat rezistenci na fludarabin (v případě linie rezistentní na cytarabin aktivní nebyly) a u látek LEM 1551 a 1326, které byly oproti cytarabinové linii méně aktivní.

Celkem se zde vyskytovalo 11 látek, které byly schopny překonávat jak rezistenci na fludarabin, tak na cytarabin.

V případě linií CCRF-CEM rezistentních na 6-merkaptopurin a 6-thioguanin byly aktivní všechny testované látky. Pouze u jedné z nich (LEM 1306) byla dvojnásobně snížena aktivita na linii rezistentní na 6-merkaptopurin. Ostatní látky pak vykazovaly shodnou nebo vyšší aktivitu než v případě parentálních buněk.

U linií rezistentních na experimentální cytostatika z UMTM (PNH173, 192 a AB-61) bylo identifikováno podstatně méně aktivních látek. V případě linie rezistentní na látku PNH173 konkrétně 4 látky (LEM 1307, 1309, 1552 a 11473). Všechny tyto látky byly aktivní také na liniích rezistentních na PNH192 a AB-61 a překonávaly také rezistenci na cytarabin (s výjimkou LEM 1552), fludarabin, 6-merkaptopurin a 6-thioguanin. Tyto čtyři látky se tedy jeví jako zajímaví kandidáti pro následující testování.

V případě linií K562 rezistentních na cytarabin, fludarabin a 6-merkaptopurin byly všechny testované látky stejně nebo více aktivní, než u parentální linie. Všech 21 látek tedy bylo schopno překonávat jejich lékové rezistence. U linie K562 rezistentní na 6-thioguanin byla aktivní většina látek, pouze u 5ti z nich došlo k dvou až šestinásobnému poklesu aktivity oproti parentální linii, ovšem stále se zde hodnota  $IC_{50}$  pohybovala pod  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , takže se stále jedná o látky s dobrou aktivitou.

U linií K562 rezistentních na PNH173, 192 a AB-61 byla, stejně jako v případě CCRF-CEM linie, aktivita látek mnohem nižší a vyselektovalo se zde jen několik aktivních. V tomto případě konkrétně tři: LEM 1309, 1555 a 11473, přičemž všechny tři látky překonávaly rezistenci jak u PNH173, tak u PNH192 i AB-61.

Látky LEM 1309 a 11473 byly aktivní na všech našich testovaných buněčných modelech, a to jak v případě rezistentních buněk akutní lymfoblastické leukémie (CCRF-CEM), tak chronické myeloidní leukémie (K562). Mohou být tedy zajímavými kandidáty pro návazné testování, které by mohlo ukázat jejich aktivitu v *in vivo* modelech, blíže popsat jejich mechanismus účinku a ověřit jejich vhodnost jako potenciálních léčiv. Stejně tak by mohly struktury těchto dvou látek pomoci objasnit mechanismus rezistence na experimentální látky PNH173, 192 a AB-61.

## 6.2 Rezistence na cytostatika obsahující ve struktuře kov

Druhou skupinou látek využívaných k selekci byla dvě klinicky využívaná léčiva, cisplatina a karboplatina a také jedna experimentální látka s označení CuEt, přičemž CuEt je v současné době poměrně intenzivně studovanou molekulou vykazující zajímavé protinádorové účinky.<sup>166</sup>

Cílem této práce bylo pokusit se vytvořit buněčné modely rezistentní na CuEt a zjistit případný mechanismus rezistence, který by mohl pomoci dokreslit, případně potvrdit jeho

mechanismus účinku. Vzhledem k tomu, že CuEt obsahuje ve své struktuře kov (měď), byly pro porovnání mechanismu vzniku rezistence vybrány cisplatina a karboplatina obsahující ve své struktuře rovněž atom kovu, v tomto případě platiny.

### 6.2.1 Selekcce cisplatinou

V případě selekcce cisplatinou byly využívány dvě leukemické linie (akutní lymfoblastická leukémie, CCRF-CEM a chronická myeloidní leukémie, K562) a jedna linie lidského glioblastomu (U-87MG ATCC). Po ukončení selekcce rezistentních klonů byla ověřena míra rezistence nejen vůči samotné cisplatině, ale testovala se také zkřížená rezistence mezi cisplatinou, karboplatinou a CuEt.

V případě linie CCRF-CEM došlo k 54násobnému nárůstu rezistence na cisplatinu a více než 19ti násobnému nárůstu rezistence na karboplatinu. Stejný profil zkřížené rezistence byl pozorován také u linie K562, kde došlo působením cisplatinou nejen k nárůstu rezistence na tuto látku ( $> 1,46x$ ), tak na karboplatinu ( $> 2,02x$ ) a také u linie U-87MG ATCC ( $8x$  zvýšená hodnota  $IC_{50}$  pro cisplatinu a více než  $3x$  zvýšená pro karboplatinu). Zkřížená rezistence mezi těmito dvěma látkami byla popsána také v klinice, například u pacientek s ovariálním karcinomem.<sup>190</sup> Pro obě látky je popisován podobný mechanismus vzniku rezistence, což vysvětluje častý výskyt této zkřížené rezistence. Mechanismů, jimž se buňky brání působení cisplatinou (resp. karboplatinou) je celá řada, od zvýšeného exfluxu (cisplatina i karboplatina jsou substráty MRP transportérů<sup>191,192</sup>), přes zvýšenou expresi metallothioneinů, které inaktivují molekuly cisplatinou, ovlivnění apoptotických drah zahrnující zvýšení exprese glutathion-S-transferázy apod.

V našem případě jsme se zaměřili na ověření míry exprese P-glykoproteinu a proteinu MRP1. Přičemž u linie CCRF-CEM byla skoro dvojnásobně zvýšena exprese MRP1, zatímco exprese Pgp zůstala stejná jako u parentálních buněk nevystavených selekčnímu tlaku cisplatinou. Zvýšení exprese MRP1 bylo zjištěno také u linie K562 selektované cisplatinou. Zde došlo dokonce 2,5ti násobnému zvýšení exprese tohoto proteinu. Zatímco exprese Pgp byla čtyřnásobně snížena. V případě linie U-87 selektované cisplatinou nedošlo ke zvýšení hladiny exprese MRP1 a exprese Pgp byla dokonce skoro 10x snížena.

Zvýšené hladiny MRP1 mohou v tomto případě jistě přispívat k rozvoji pozorovaného rezistentního fenotypu, a to jak v případě linie CCRF-CEM, tak v případě linie K562. Naopak změny v expresi P-glykoproteinu by neměly hrát v účinnosti cisplatinou roli, vzhledem ke skutečnosti, že cisplatina není substrátem tohoto transportéru.<sup>193</sup> Ovšem pro detailnější objasnění mechanismu pozorovaného rezistentního fenotypu by bylo potřeba bližší zkoumání aktivity enzymů metabolizujících jak cisplatinu, tak karboplatinu, případně ověření aktivity proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu a apoptózy.

### 6.2.2 Selekcce karboplatinou

Selekcce karboplatinou nebyla oproti cisplatině úspěšná u linií CCRF-CEM a K562. V případě linie CCRF-CEM došlo pouze k mírnému nárůstu rezistence (1,3x) na karboplatinu a také na cisplatinu (1,68x). Přestože byly buňky kultivovány a selektovány ve stejném časovém rozsahu jako v případě cisplatinu, koncentrace léčiva byla zvyšována mnohem pomaleji vzhledem k aktuální životnosti a koncentraci buněk. V případě těchto dvou linií by tedy byla pravděpodobně potřeba delší doba působení selekčního tlaku. Přestože nebyl na těchto dvou liniích pozorován rozvoj rezistentního fenotypu, byla u nich ověřena exprese Pgp a MRP1 a docházelo zde ke změnám v jejich expresním profilu v porovnání s parentálními liniemi CCRF-CEM a K562.

V případě linie CCRF-CEM selektované karboplatinou došlo ke dvojnásobnému snížení exprese Pgp, přičemž exprese MRP1 zůstala prakticky stejná jako u kontrolní parentální linie. U linie K562 byly změny výraznější, došlo k sedminásobnému poklesu exprese Pgp a přibližně trojnásobnému nárůstu exprese MRP1, přičemž tyto změny ovšem nevedly k rozvoji rezistence na námi testované látky.

V případě selekcce karboplatinou na linii U-87 jsme byli o něco úspěšnější. V tomto případě došlo k rozvoji než trojnásobné rezistence na samotnou karboplatinu (nelze přesně určit, hodnota  $IC_{50}$  se nacházela nad maximální testovanou koncentrací, tj. nad  $180 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ), ale také se více než 6x zvýšila hodnota  $IC_{50}$  pro cisplatinu a došlo také k nárůstu hodnot  $IC_{50}$  pro CuEt ve variantách nanočástic (roztok Kolidon 17 a BSA). U těchto buněk byla desetinásobně snížená exprese Pgp, přičemž exprese MRP1 zůstala prakticky stejná jako u parentální linie. Z výsledků lze tedy usoudit, že mechanismy, jimiž si cisplatinu, karboplatinu a CuEt vytvářejí svou, alespoň částečnou, zkříženou rezistenci, budou velmi pravděpodobně založeny na jiných cílových proteinech než na ABC transportérech.

### 6.2.3 Selekcce CuEt

Pro selekci buněčných linií pomocí CuEt bylo využito několik variant této látky. První z nich bylo samotné CuEt rozpuštěné ve 100% dimethylsulfoxidu (DMSO). DMSO je běžným rozpouštědlem pro jinak špatně rozpustné molekuly a má tedy širokou aplikaci v *in vitro* experimentech. Nevýhodou je zde jeho buněčná toxicita, při koncentracích  $\geq 1 \%$  DMSO. Přestože v *in vivo* podmínkách byla popisována poměrně nízká toxicita DMSO, novější studie ukazují možný negativní vliv této látky (např. indukci apoptózy buněk sítnice).<sup>194,195</sup> Proto byla hledána vhodná alternativa, která by nevykazovala orgánovou toxicitu a pomáhala co nejlépe indukovat vznik mědnatých komplexů CuEt v lidském organismu. Touto alternativou bylo vytvoření nanočástic CuEt formovaných v roztocích Kolidonu 17, hovězího sérového albuminu (BSA) a hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC). Nanočástice byly poprvé

vytvořeny skupinou Dr. Martina Mistríka (Laboratoř integrity genomu, ÚMTM, LF Univerzity Palackého v Olomouci). Myšlenka nanočástic v souvislosti s aplikací CuEt je zkoumána také v dalších laboratořích. V roce 2020 byla publikována práce popisující systém vzniku nanočástic CuEt selektivně v nádorových tkáních, což by mělo vést k indukci jejich apoptózy za současného zachování fyziologických tkání.<sup>196</sup>

Cílem naší práce bylo zjistit, zda dojde při eskalační selekci vybraných buněčných linií k rozvoji rezistentního fenotypu a zda zde bude hrát roli rozdílná forma aplikace CuEt (DMSO a nanočástice v roztoku Kolidonu 17, HPMC a BSA). Výsledky těchto selekcí jsou uvedeny v tabulkách č. 10, 12 a 14.

V případě linie **U-87MG ATCC** nedošlo k výraznému nárůstu rezistence na CuEt (maximální detekovaný nárůst hodnoty  $IC_{50}$  byl 2,5x), přičemž prakticky nulový nárůst byl v případě selekce CuEt v DMSO. Tato varianta indukovala pouze dvojnásobný nárůst rezistence na nanočástice CuEt tvořené v BSA, ovšem všechny další varianty CuEt byly na těchto buňkách aktivní. Velmi podobný profil lze pozorovat také u nanočástic CuEt v roztoku HPMC. Zde došlo k dvojnásobnému snížení aktivity CuEt v BSA, ale i samotné variantě v HPMC. Ostatní dvě varianty (CuEt v Kolidonu 17 a BSA) byly náchylnější na rozvoj rezistence, ovšem opět zde mluvíme o přibližně dvojnásobném poklesu aktivity, což neodpovídá rezistentnímu fenotypu, kde bychom čekali pokles v desítkách jednotek.

Zajímavé ovšem je, že přestože kultivace buněk U-87MG ATCC v přítomnosti CuEt nevedla k výraznému rozvoji rezistence na samotné CuEt, u všech variant došlo k rozvoji rezistence na cisplatinu a karboplatinu. V případě cisplatinu se jednalo o čtyř a devítinásobný nárůst hodnoty  $IC_{50}$  a v případě karboplatiny o více než dvojnásobný (nelze přesně určit, hodnota  $IC_{50}$  se nacházela nad maximální testovanou koncentrací, tj. nad  $180 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Je tedy zřejmé, že přítomnost CuEt ovlivňuje dráhy působení/ metabolismu cisplatinu a karboplatiny. Tyto mechanismy by bylo ovšem nutné podrobněji otestovat, například ověřit expresi metallothioneinů, které zajišťují inaktivaci cisplatinu a mohly by hrát roli ve snížení její aktivity u těchto buněk.

V rámci základní charakterizace byla pro tyto buňky ověřena exprese Pgp a MRP1. Míra exprese P-glykoproteinu byla u všech selektovaných buněk přibližně stejná, jako exprese parentální linie U-87MG ATCC, pouze v případě selekce CuEt v roztoku Kolidonu 17 došlo k pětinasobnému poklesu, přičemž tyto buňky vykazovaly rovněž přibližně dvojnásobný nárůst exprese MRP1 a nejvyšší rozvoj rezistence na CuEt. Také u ostatních selektovaných buněk docházelo ke zvýšení exprese MRP1 v porovnání s parentální linií. Nejvyšší nárůst byl detekován u selekce pomocí CuEt v DMSO (2,4x), ostatní linie dosahovaly nárůstu 1,5 – 1,9x. Dle online modelování SwissADME odpovídá CuEt svou strukturou substrátu Pgp, ovšem u žádné linie nebyla zjištěna zvýšená exprese této efluxní pumpy, která by mohla přispívat

snížení aktivity CuEt a tím k rozvoji rezistentního fenotypu. Afinita CuEt vůči MRP1 dosud nebyla testována.

V případě linie **CCRF-CEM** selektované CuEt došlo opět k maximálnímu nárůstu hodnoty  $IC_{50}$  o přibližně dvojnásobek. Zajímavé je, že v tomto případě docházelo během selekce k poklesu senzitivity vůči variantě v DMSO, ale nanočásticové varianty CuEt si zachovávaly svou aktivitu. Oproti glioblastomovým buňkám (U-87MG ATCC) proliferují leukemické buňky (CCRF-CEM) mnohem rychleji, což může přispívat vyšší citlivosti těchto buněk vůči CuEt.

Také v případě CCRF-CEM buněk došlo k rozvoji rezistence na cisplatinu – zde byl ovšem nárůst mnohem výraznější, než v případě linie U-87MG ATCC. Došlo k 12-ti až 19-ti násobnému nárůstu hodnoty  $IC_{50}$ . Rozdílná byla ovšem aktivita karboplatiny – v tomto případě nedošlo k výraznému poklesu její aktivity a rozvoji rezistence.

Během ověření exprese Pgp a MRP nedošlo k detekci výrazných odchylek. Pouze u buněk selektovaných CuEt v roztoku Kolidonu 17 došlo (stejně jako během selekce karboplatinou) k dvojnásobnému poklesu exprese Pgp. V případě proteinu MRP1 docházelo spíše k nárůstu exprese, nejvyšší nárůst byl detekován u selekce CuEt v roztoku BSA, ovšem i zde to byl necelý dvojnásobek. K velkým rozdílům exprese v porovnání s parentální linií CCRF-CEM, která nebyla vystavena selekčnímu tlaku, tedy nedošlo.

Poslední testovanou linií byla linie **K562**, u níž nedošlo k prakticky žádné změně v aktivitě CuEt, přestože buňky byly po řadu týdnů vystaveny selekčnímu tlaku. Jediný výraznější nárůst (dvojnásobný) hodnoty  $IC_{50}$  byl u buněk selektovaných CuEt v roztoku Kolidonu 17 vůči CuEt v roztoku HPMC. V případě těchto buněk nedošlo ani k rozvoji rezistence na cisplatinu, pouze se více než dvojnásobně zvýšila odolnost vůči karboplatině u buněk selektovaných CuEt v roztoku HPMC a BSA (nelze přesně určit, hodnota  $IC_{50}$  se nacházela nad maximální testovanou koncentrací, tj. nad  $180 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

V případě těchto buněk byla přibližně pětinašobně snížena exprese P-glykoproteinu. Snížení exprese této efluxní pumpy může tedy vést k vyšší kumulaci CuEt uvnitř buněk a jeho vyšší aktivitě. Což by mohlo vysvětlit, proč nedocházelo k poklesu aktivity této látky. Otázkou nicméně zůstává, proč docházelo během kultivace k selekci právě těchto klonů. Pro vysvětlení by bylo potřeba doplnit charakterizaci této linie také o expresi dalších proteinů, které by mohly pomoci těmto buňkám lépe odolávat působení selekčního tlaku.

Expres MRP1 byla v případě všech linií K562 selektovaných CuEt přibližně dvojnásobně zvýšená, což by mohlo vysvětlit nárůst rezistence na karboplatinu, která je jeho substrátem.



## 7. Závěr

*In vitro* modely mají svůj nezastupitelný význam ve vývoji nových léčiv. A to zejména buněčné kultury využívané ve výzkumu onkologických onemocnění pro objasnění změn, k nimž během procesu karcinogeneze dochází. Buněčné kultury nám mohou pomoci najít příčiny daného onemocnění, a tím otevřít cestu novým možnostem terapie.

Stejně tak je možné využít buněčné kultury k modelování potenciálních situací, které mohou nastat – lze například izolovat buňky z nádoru konkrétního pacienta a otestovat jejich senzitivitu na různá cytostatika, a díky tomu zvolit to nejvhodnější. Na buněčných modelech lze také popsat základní metabolismus léčiva na úrovni buňky, stejně jako případné mechanismy vzniku lékové rezistence.

V této práci byla popsána selekce buněk (CCRF-CEM, K562 a U-87MG ATCC) rezistentních na známá cytostatika i experimentální léčiva. U těchto rezistentních buněk byla ověřena exprese proteinů asociovaných se vznikem mnohočetné lékové rezistence (Pgp a MRP1). V případě buněk selektovaných nukleosidovými deriváty (CCRF-CEM a K562) byla ověřena také exprese nukleosidových transportérů (CNT1-3, ENT1-4) a byly provedeny funkční testy. Při nich byla sledována citlivost buněk k nukleosidovým léčivům v přítomnosti dipyridamolu, který je známým inhibitorem nukleosidových transportérů.

V závěru práce bylo provedeno testování nových potenciálních léčiv na panelu všech selektovaných rezistentních linií a bylo identifikováno několik látek s potenciálem překonávat vzniklou lékovou rezistenci.

## 8. Literatura

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* (2021) doi:10.1002/ijc.33588.
2. Úvod - ÚZIS ČR. <https://www.uzis.cz/index.php>.
3. Bashir, I., Sikora, K. & Foster, C. S. Multidrug resistance and behavioural phenotype of cancer cells. *Cell Biol Int* **17**, 907–917 (1993).
4. Saleh, E. M., El-Awady, R. A., Alim, M. A. A. & Wahab, A. H. A. A. Altered expression of proliferation-inducing and proliferation-inhibiting genes might contribute to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Cell Biochem Biophys* **55**, 95–105 (2009).
5. Villeneuve, D. J. *et al.* cDNA microarray analysis of isogenic paclitaxel- and doxorubicin-resistant breast tumor cell lines reveals distinct drug-specific genetic signatures of resistance. *Breast Cancer Res Treat* **96**, 17–39 (2006).
6. Li, Z. kun & Zhou, Q. Cellular models for disease exploring and drug screening. *Protein and Cell* vol. 1 355–362 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0027-9> (2010).
7. Foretová, L., Svoboda, M. & Slabý, O. *Molekulární genetika v onkologii*. (Mladá fronta a.s., 2014).
8. Petruželka, L. & Konopásek, B. *Klinická onkologie*. (Karolinum, 2003).
9. Kushner, I. K. *et al.* Individual Variability of Protein Expression in Human Tissues. *J Proteome Res* **17**, 3914–3922 (2018).
10. Baba, A. I. & Câtoi, C. CARCINOGENESIS. (2007).
11. Reha-Krantz, L. J. Mutagens. in *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* 528–532 (Elsevier Inc., 2013). doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00996-7.
12. Backer, L. C. *et al.* The effects of acrylamide on mouse germ-line and somatic cell chromosomes. *Environ Mol Mutagen* **13**, 218–226 (1989).
13. Butterworth, B. E. *et al.* Tissue-specific genotoxic effects of acrylamide and acrylonitrile. *Environ Mol Mutagen* **20**, 148–155 (1992).
14. Huberman, F., Sachs, L., Yang, S. K. & Gelboin, H. v. Identification of mutagenic metabolites of benzo [a] pyrene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 607–611 (1976).
15. Chatterjee, N. & Walker, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* vol. 58 235–263 Preprint at <https://doi.org/10.1002/em.22087> (2017).
16. Errors in DNA Replication | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-replication-and-causes-of-mutation-409/>.
17. Ullrich, N. J. & Gordon, L. B. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 132 249–264 (Elsevier B.V., 2015).

18. Goto, M., Ishikawa, Y., Sugimoto, M. & Furuichi, Y. Werner syndrome: A changing pattern of clinical manifestations: In Japan (1917~2008). *BioScience Trends* vol. 7 13–22 Preprint at <https://doi.org/10.5582/bst.2013.v7.1.13> (2013).
19. Nance, M. A. & Berry, S. A. Cockayne Syndrome: Review of 140 cases. *Am J Med Genet* **42**, 68–84 (1992).
20. Black, J. O. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol* **10**, 139–144 (2016).
21. Bajčiová, V. *K nádorům predisponující syndromy v dětském věku – role pediatra primárního kontaktu*. [www.pediatricpropraxi.cz](http://www.pediatricpropraxi.cz) (2015).
22. Evans, D. G. *et al.* Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: Estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet A* **152**, 327–332 (2010).
23. Shen, M. H., Harper, P. S. & Upadhyaya, M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *Journal of Medical Genetics* vol. 33 2–17 Preprint at <https://doi.org/10.1136/jmg.33.1.2> (1996).
24. Friedman, J. M. *Epidemiology of Neurofibromatosis Type 1. J. Med. Genet. (Semin. Med. Genet.)* vol. 89 (1999).
25. Peto, J. *et al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients With Early-Onset Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **91**, 943–949 (1999).
26. Nevanlinna, H. & Bartek, J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* vol. 25 5912–5919 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209877> (2006).
27. Easton, D. CHEK2\*1100delC and susceptibility to breast cancer: A collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet* **74**, 1175–1182 (2004).
28. Olivier, M. *et al.* The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research* **12**, 1157–1167 (2006).
29. Cullinane, C. A. *et al.* The Surgical Treatment of Cancer: A Comparison of Resource Utilization following Procedures Performed with Curative and Palliative Intent. *Cancer* **98**, 2266–2273 (2003).
30. Frei, E. Curative Cancer Chemotherapy. *Cancer Res* **45**, (1985).
31. Tseng, Y. D., Mezheritsky, I., Halasz, L. M., Lo, S. S. & Loggers, E. T. Curative Intent Radiotherapy Delivered Within the Last Year of Life. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials* **43**, 168–172 (2020).
32. Selli, C. & Sims, A. H. Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer as a Model for Translational Research. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.1177/1178223419829072> (2019).
33. Adam, Z., Krejčí, M. & Vorlíček, J. *Obečná onkologie*. (Galén, 2011).
34. Harvey, J. R. *et al.* Safety and feasibility of breast lesion localization using magnetic seeds (Magseed): a multi-centre, open-label cohort study. *Breast Cancer Research and Treatment* 2018 169:3 **169**, 531–536 (2018).

35. Dostalek, L., Cerny, A., Saskova, P. & Pavlista, D. Selective Extirpation of Tattooed Lymph Node in Combination with Sentinel Lymph Node Biopsy in the Management of Node-Positive Breast Cancer Patients after Neoadjuvant Systemic Therapy. *Breast Care* 1–7 (2021) doi:10.1159/000514266.
36. Ahn, S.-J. *et al.* Results of Curative Radiation Therapy with or without Chemotherapy for Stage III Unresectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res Treat* **37**, 268 (2005).
37. McAleese, J., Rooney, C. M., Baluch, S., Drinkwater, K. J. & Hanna, G. G. Curative Radiotherapy for Lung Cancer in the UK: International Benchmarking. *Clinical Oncology* vol. 31 731 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.07.023> (2019).
38. Lindegaard, J. C., Thranov, I. R. & Engelholm, S. A. Radiotherapy in the management of cervical cancer in elderly patients. *Radiotherapy and Oncology* **56**, 9–15 (2000).
39. Taggar, A. S., Damato, A. L., Cohen, G. N., Voros, L. & Yamada, Y. Brachytherapy. in *Adult CNS Radiation Oncology: Principles and Practice* 723–744 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-42878-9\_48.
40. Dolezal, J., Vizda, J. & Odrazka, K. Prospective evaluation of samarium-153-EDTMP radionuclide treatment for bone metastases in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Urol Int* **78**, 50–57 (2007).
41. Black, A. T., Zinkovsky, D., Ray, S. & Ray, S. D. Cytostatic agents. in *Side Effects of Drugs Annual* vol. 42 495–506 (Elsevier B.V., 2020).
42. Medicine, N. R. C. (US) and I. of M. (US) C. on S. of the S. of N. Targeted Radionuclide Therapy. (2007).
43. van Dongen, J. J. M. *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* vol. 13 1901–1928 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401592> (1999).
44. Liu, J., Dang, H. & Wang, X. W. The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer. *Experimental and Molecular Medicine* vol. 50 416 Preprint at <https://doi.org/10.1038/emm.2017.165> (2018).
45. Waclaw, B. *et al.* A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. *Nature* **525**, 261–264 (2015).
46. Jamal-Hanjani, M., Quezada, S. A., Larkin, J. & Swanton, C. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clinical Cancer Research* vol. 21 1258–1266 Preprint at <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1429> (2015).
47. Szczepański, T., Orfão, A., van der Velden, V. H. J., San Miguel, J. F. & van Dongen, J. J. M. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncology* vol. 2 409–417 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00418-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00418-6) (2001).
48. Seto, T., Sam, D. & Pan, M. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer. *Medical Sciences 2019, Vol. 7, Page 14* **7**, 14 (2019).
49. Nosková V, Hajdúch M, Mihál V & Cwiertka K. *Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. I typická MDR.* (2000).

50. Juliano, R. L. & Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembranes* **455**, 152–162 (1976).
51. Ambudkar, S. v., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. & Gottesman, M. M. P-glycoprotein: From genomics to mechanism. *Oncogene* vol. 22 7468–7485 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206948> (2003).
52. Cordon-Cardo, C. *et al.* Expression of the multidrug resistance gene product (P-Glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **38**, 1277–1287 (1990).
53. Gottesman, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine* vol. 53 615–627 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929> (2002).
54. Kim, R. B. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metabolism Reviews* vol. 34 47–54 Preprint at <https://doi.org/10.1081/DMR-120001389> (2002).
55. Huang, J., Ma, G., Muhammad, I. & Cheng, Y. Identifying P-glycoprotein substrates using a support vector machine optimized by a particle SWarm. *J Chem Inf Model* **47**, 1638–1647 (2007).
56. Nakanishi, T. & Ross, D. D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese Journal of Cancer* vol. 31 73–99 Preprint at <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10320> (2012).
57. Deeley, R. G. & Cole, S. P. C. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). in *Seminars in Cancer Biology* vol. 8 193–204 (Academic Press, 1997).
58. Leslie, E. M., Deeley, R. G. & Cole, S. P. C. Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 204 216–237 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012> (2005).
59. Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Gupta, P. & Chen, Z. S. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *AAPS Journal* **17**, 802–812 (2015).
60. Jia, Y. & Xie, J. Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes Dis* **2**, 299–306 (2015).
61. Pastor-Anglada, M. *et al.* Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2004 18:3 **18**, 385–393 (2004).
62. Chen, Z. S., Lee, K. & Kruh, G. D. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* **276**, 33747–33754 (2001).
63. Adema, A. D. *et al.* Overexpression of MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5) confer resistance to the nucleoside analogs cytarabine and troxacitabine, but not gemcitabine. *Springerplus* **3**, 1–11 (2014).
64. Yamada, A. *et al.* High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res Treat* **137**, 773–782 (2013).

65. Young LC, Campling BG, Cole SP, Deeley RG & Gerlach JH. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels - PubMed. *Clin Cancer Res* 1798–804 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11410522/> (2001).
66. Hlavata, I. *et al.* The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* **27**, 187–196 (2012).
67. Zalcborg, J. *et al.* MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **3**, 66–75 (2000).
68. Staud, F. & Pavek, P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 720–725 (2005).
69. Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M. R. & Ross, D. D. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* **83**, 1084–1103 (2012).
70. Austin Doyle, L. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15665–15670 (1998).
71. Doyle, L. A. & Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* vol. 22 7340–7358 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206938> (2003).
72. Scheper, R. J. *et al.* Overexpression of a Mr 110,000 Vesicular Protein in Non-P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance1. *CANCER RESEARCH* vol. 53 (1993).
73. Scheffer, G. L. *et al.* The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* **1**, 578–582 (1995).
74. Pawarode, A., Minderman, H., O’loughlin, K. L., Greco, W. R. & Baer, M. R. Rapamycin overcomes multidrug resistance (MDR) mediated by P-glycoprotein (Pgp), Multidrug Resistance Protein-1 (MRP-1), Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) and Lung Resistance Protein (LRP) and synergizes with substrate drugs in MDR cells. *Cancer Res* **66**, (2006).
75. Kaye, S. B. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British Journal of Cancer* 1998 78:3 **78**, 1–7 (1998).
76. Peters, G. J. *et al.* Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther* **87**, 227–253 (2000).
77. CJ, A., JL, G., GC, Y. & BA, C. Antimetabolites. *Cancer Chemother Biol Response Modif* **10**, 1–22 (1988).
78. Baldwin, S. A. *et al.* The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* vol. 447 735–743 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1103-2> (2004).
79. Gray, J. H., Owen, R. P. & Giacomini, K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* vol. 447 728–734 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1107-y> (2004).
80. E. Parkinson, F. *et al.* Molecular Biology of Nucleoside Transporters and their Distributions and Functions in the Brain. *Curr Top Med Chem* **11**, 948–972 (2011).

81. Jennings, L. L. *et al.* Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system. *Neuropharmacology* **40**, 722–731 (2001).
82. Griffith, D. A. & Jarvis, S. M. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* vol. 1286 153–181 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00008-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00008-1) (1996).
83. Griffiths, M. *et al.* Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med* **3**, 89–93 (1997).
84. Vincenzi, B. *et al.* Human equilibrative nucleoside transporter 1 gene expression is associated with gemcitabine efficacy in advanced leiomyosarcoma and angiosarcoma. *Br J Cancer* **117**, 340–346 (2017).
85. Anderson, J. T., Hu, S., Fu, Q., Baker, S. D. & Sparreboom, A. Role of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in the disposition of cytarabine in mice. *Pharmacol Res Perspect* **7**, (2019).
86. Molina-Arcas, M. *et al.* Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **101**, 2328–2334 (2003).
87. Endres, C. J. *et al.* The Role of the Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1) in Transport and Metabolism of Ribavirin by Human and Wild-Type or Ent1(-/-) Mouse Erythrocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **329**, 387–398 (2009).
88. Ruel, N. M., Nguyen, K. H., Vilas, G. & Hammond, J. R. Characterization of 6-Mercaptopurine Transport by the SLC43A3-Encoded Nucleobase Transporter. *Mol Pharmacol* **95**, 584–596 (2019).
89. Boswell-Casteel, R. C. & Hays, F. A. Equilibrative nucleoside transporters—A review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* vol. 36 7–30 Preprint at <https://doi.org/10.1080/15257770.2016.1210805> (2017).
90. Cass, C. E., Baldwin, S. A. & Young, J. CNT2, concentrative nucleoside transporter 2. in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* 1–4 (Elsevier Inc., 2007). doi:10.1016/B978-008055232-3.60462-3.
91. Nagai, K., Nagasawa, K., Kihara, Y., Okuda, H. & Fujimoto, S. Anticancer nucleobase analogues 6-mercaptopurine and 6-thioguanine are novel substrates for equilibrative nucleoside transporter 2. *Int J Pharm* **333**, 56–61 (2007).
92. Noguchi, S. *et al.* Fluorouracil uptake in triple-negative breast cancer cells: Negligible contribution of equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. *Biopharm Drug Dispos* **42**, 85–93 (2021).
93. Hermann, R. *et al.* Review of Transporter Substrate, Inhibitor, and Inducer Characteristics of Cladribine. *Clin Pharmacokinet* **60**, 1509–1535 (2021).
94. Singh, A. & Govindarajan, R. ENT3 utilizes a pH sensing mechanism for transport. *Channels* vol. 12 78–80 Preprint at <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1389581> (2018).
95. Nigam, S. K. The SLC22 Transporter Family: A Paradigm for the Impact of Drug Transporters on Metabolic Pathways, Signaling, and Disease. *Annual Review of*

96. Engel, K., Zhou, M. & Wang, J. Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 50042–50049 (2004).
97. Scherrmann, J. M. Drug Transport Mechanisms and Their Impact on the Disposition and Effects of Drugs. in *The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition* 615–629 (Elsevier Inc., 2008). doi:10.1016/B978-0-12-417205-0.00026-2.
98. Gray, J. H., Owen, R. P. & Giacomini, K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* **447**, 728–734 (2004).
99. Nakamura, K. *et al.* Large-scale multiplex absolute protein quantification of drug-metabolizing enzymes and transporters in human intestine, liver, and kidney microsomes by SWATH-MS: Comparison with MRM/SRM and HR-MRM/PRM. *Proteomics* **16**, 2106–2117 (2016).
100. Ma, Z. *et al.* Multiple SLC and ABC transporters contribute to the placental transfer of entecavir. *Drug Metabolism and Disposition* **45**, 269–278 (2017).
101. Al-Ghabeish, M., Scheetz, T., Assem, M. & Donovan, M. D. Microarray Determination of the Expression of Drug Transporters in Humans and Animal Species Used for the Investigation of Nasal Absorption. *Mol Pharm* **12**, 2742–2754 (2015).
102. Ritzel, M. W. L. *et al.* Recent molecular advances in studies of the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter (CNT) family: Identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). in *Molecular Membrane Biology* vol. 18 65–72 (Taylor and Francis Ltd, 2001).
103. Fotoohi, A. K., Lindqvist, M., Peterson, C. & Albertioni, F. Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 208–215 (2006).
104. Song, J. H. *et al.* Concentrative nucleoside transporter 3 as a prognostic indicator for favorable outcome of t(8;21)-positive acute myeloid leukemia patients after cytarabine-based chemotherapy. *Oncol Rep* **34**, 488–494 (2015).
105. Löwenberg, B. *et al.* Cytarabine Dose for Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **364**, 1027–1036 (2011).
106. Kantarjian, H. M. *et al.* Treatment of chronic myelogenous leukemia in accelerated and blastic phases with daunorubicin, high-dose cytarabine, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Clinical Oncology* **10**, 398–405 (1992).
107. Li, Z. *et al.* Exploring the antitumor mechanism of high-dose cytarabine through the metabolic perturbations of ribonucleotide and deoxyribonucleotide in human promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Molecules* **22**, (2017).
108. B, O. *et al.* Combination therapy with azacitidine, etoposide, and cytarabine in the treatment of elderly acute myeloid leukemia patients: A single center experience. *J Cancer Res Ther* **14**, 1105–1111 (2018).



109. He, F. *et al.* A real-world study of clofarabine and cytarabine combination therapy for patients with acute myeloid leukemia. <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1433297> **59**, 2352–2359 (2018).
110. Gandhi, V., Estey, E., Keating, M. J. & Plunkett, W. Fludarabine potentiates metabolism of cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia during therapy. <https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.1.116> **11**, 116–124 (2016).
111. Tessler, S. *et al.* BST-236, a Novel Cytarabine Prodrug, Is Safer and As Effective As Cytarabine in In Vivo Leukemia Models. *Blood* **132**, 1451–1451 (2018).
112. T, Y. *et al.* Intracellular cytarabine triphosphate production correlates to deoxycytidine kinase/cytosolic 5'-nucleotidase II expression ratio in primary acute myeloid leukemia cells. *Biochem Pharmacol* **77**, 1780–1786 (2009).
113. DW, K. & PP, M. Studies on the mechanism of action of cytosine arabinoside. *Med Pediatr Oncol* **10 Suppl 1**, 49–67 (1982).
114. Galmarini, C. M. *et al.* In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia.
115. Kano, Y. *et al.* In vitro cytotoxic effects of fludarabine (2-F-ara-A) in combination with commonly used antileukemic agents by isobologram analysis. *Leukemia* **14**:3 **14**, 379–388 (2000).
116. Metabolism and action of fludarabine phosphate — MD Anderson Cancer Center. <https://mdanderson.elsevierpure.com/en/publications/metabolism-and-action-of-fludarabine-phosphate>.
117. Gandhi, V. & Plunkett, W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin Pharmacokinet* **41**, 93–103 (2002).
118. Huang, C., Tu, Y. & Freter, C. E. Fludarabine-resistance associates with ceramide metabolism and leukemia stem cell development in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **9**, 33124 (2018).
119. Månsson, E. *et al.* Down-regulation of deoxycytidine kinase in human leukemic cell lines resistant to cladribine and clofarabine and increased ribonucleotide reductase activity contributes to fludarabine resistance. *Biochem Pharmacol* **65**, 237–247 (2003).
120. Schmiegelow, K., Nielsen, S. N., Frandsen, T. L. & Nersting, J. Mercaptopurine/methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: Clinical facts and fiction. *J Pediatr Hematol Oncol* **36**, 503–517 (2014).
121. Erb, N., Harms, D. O. & Janka-Schaub, G. Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**, 266–272 (1998).
122. P, K. & N, A. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 24–36 (2008).
123. AC, A. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* **47**, 63–83 (2000).
124. L, C., C, N., P, B., MA, L. & X, R. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **35**, 15–36 (2012).

125. A mechanism of resistance to 6-mercaptopurine: metabolism of hypoxanthine and 6-mercaptopurine by sensitive and resistant neoplasms - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13804596/>.
126. TT, V. *et al.* mTORC1 Inhibition Induces Resistance to Methotrexate and 6-Mercaptopurine in Ph<sup>+</sup> and Ph-like B-ALL. *Mol Cancer Ther* **16**, 1942–1953 (2017).
127. Hoxhaj, G. *et al.* The mTORC1 Signaling Network Senses Changes in Cellular Purine Nucleotide Levels. *Cell Rep* **21**, 1331–1346 (2017).
128. JR, B., N, L. & MI, S. Transport and metabolism of 6-thioguanine and 6-mercaptopurine in mouse small intestine. *Clin Sci (Lond)* **74**, 629–638 (1988).
129. Morley, A. A., Cox, S. & Holliday, R. Human lymphocytes resistant to 6-thioguanine increase with age. *Mech Ageing Dev* **19**, 21–26 (1982).
130. WE, G. *et al.* Resistance to 6-thioguanine in mismatch repair-deficient human cancer cell lines correlates with an increase in induced mutations at the HPRT locus. *Carcinogenesis* **19**, 1931–1937 (1998).
131. N, G. *et al.* Acquired resistance to 6-thioguanine in melanoma cells involves the repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). *Cancer Biol Ther* **9**, (2010).
132. Miura, K. *et al.* 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers (Basel)* **2**, 1717 (2010).
133. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* 2003 3:5 **3**, 330–338 (2003).
134. Wind, N. S. & Holen, I. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From In Vitro Models to Clinical Studies. *Int J Breast Cancer* **2011**, 1–12 (2011).
135. X, S., S, L., J, K., H, F. & MW, B. Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology* **62**, 354–362 (2002).
136. R, L., C, P., DR, B., MS, W. & G, N. Overexpression of Bcl-x(L) promotes chemotherapy resistance of mammary tumors in a syngeneic mouse model. *Am J Pathol* **155**, 1861–1867 (1999).
137. S, V. *et al.* Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer* **98**, 498–504 (2002).
138. CN, A., A, G. & CR, B. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* **106**, 66–73 (2003).
139. JL, G. Screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Cancer Res* **11**, 5067–5068 (2005).
140. Peters, G. J. *et al.* Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1587**, 194–205 (2002).
141. YF, H. & J, R. Gemcitabine: a cytidine analogue active against solid tumors. *Am J Health Syst Pharm* **54**, 162–170 (1997).

142. E, G. *et al.* Cytotoxic activity of gemcitabine and correlation with expression profile of drug-related genes in human lymphoid cells. *Pharmacol Res* **55**, 343–349 (2007).
143. Alvarez, M. L. *et al.* PharmGKB summary: Gemcitabine Pathway. *Pharmacogenet Genomics* **24**, 564 (2014).
144. E, M., S, N., B, C., I, L. & T, M. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* **17 Suppl 5**, (2006).
145. XL, Y., FJ, L., YJ, G., ZM, S. & ZL, O. Gemcitabine resistance in breast cancer cells regulated by PI3K/AKT-mediated cellular proliferation exerts negative feedback via the MEK/MAPK and mTOR pathways. *Onco Targets Ther* **7**, 1033–1042 (2014).
146. R, W. *et al.* Gemcitabine resistance is associated with epithelial-mesenchymal transition and induction of HIF-1 $\alpha$  in pancreatic cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets* **14**, 407–417 (2014).
147. Simon, P. O. *et al.* Targeting AKT with the Pro-apoptotic Peptide, TAT-CTMP: a Novel Strategy for the Treatment of Human Pancreatic Adenocarcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **125**, 942 (2009).
148. A, A. *et al.* Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* **22**, 3243–3251 (2003).
149. Zhelev, N., Trifonov, D., Wang, S., Hassan, M. & Serafi, I. el. From Roscovitine to CYC202 to Seliciclib – from bench to bedside: discovery and development. *Biodiscovery* **10**, e8956 (2013).
150. Cicen, J. *et al.* Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann Transl Med* **3**, (2015).
151. Khalil, H. S., Mitev, V., Vlaykova, T., Cavicchi, L. & Zhelev, N. Discovery and development of Seliciclib. How systems biology approaches can lead to better drug performance. *J Biotechnol* **202**, 40–49 (2015).
152. V, S., F, R., P, W. & LR, K. Characterization of a human colorectal carcinoma cell line with acquired resistance to flavopiridol. *Mol Pharmacol* **60**, 885–893 (2001).
153. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **740**, 364 (2014).
154. B, D. & C, M. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* **42**, 317–325 (2002).
155. Shen, D.-W., Pouliot, L. M., Hall, M. D. & Gottesman, M. M. Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacol Rev* **64**, 706 (2012).
156. Zhang, Y.-K., Wang, Y.-J., Gupta, P. & Chen, Z.-S. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *AAPS J* **17**, 802 (2015).
157. Borchert, S. *et al.* Impact of metallothionein-knockdown on cisplatin resistance in malignant pleural mesothelioma. *Scientific Reports 2020 10:1* **10**, 1–11 (2020).
158. Luca, A. de *et al.* A structure-based mechanism of cisplatin resistance mediated by glutathione transferase P1-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 13943–13951 (2019).

159. B, S. & M, D. Understanding cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB Life* **59**, 696–699 (2007).
160. The role of carboplatin in the treatment of small-cell lung cancer - PubMed. *Oncology* **12**, 36–43 (1998).
161. Sullivan, J. B. (John B. & Krieger, G. R. Hazardous materials toxicology : clinical principles of environmental health. 1242 (1992).
162. Zhou, J. *et al.* The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol* **0**, 343 (2020).
163. J, Z. *et al.* Disulfiram targeting lymphoid malignant cell lines via ROS-JNK activation as well as Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathway inhibition. *J Transl Med* **12**, (2014).
164. D, C., QC, C., H, Y. & QP, D. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res* **66**, 10425–10433 (2006).
165. K, I. *et al.* High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res* **15**, 6070–6078 (2009).
166. Skrott, Z. *et al.* Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature* 2017 552:7684 **552**, 194–199 (2017).
167. Sato, Y. *et al.* Structural insights into ubiquitin recognition and Ufd1 interaction of Npl4. *Nature Communications* 2019 10:1 **10**, 1–13 (2019).
168. Huang, X. *et al.* Diethyldithiocarbamate-copper complex (CuET) inhibits colorectal cancer progression via miR-16-5p and 15b-5p/ALDH1A3/PKM2 axis-mediated aerobic glycolysis pathway. *Oncogenesis* 2021 10:1 **10**, 1–16 (2021).
169. Li, Z. kun & Zhou, Q. Cellular models for disease exploring and drug screening. *Protein and Cell* vol. 1 355–362 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0027-9> (2010).
170. Jakel, R. J., Schneider, B. L. & Svendsen, C. N. Using human neural stem cells to model neurological disease. *Nature Reviews Genetics* vol. 5 136–144 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg1268> (2004).
171. Sundstrom, L., Morrison, B., Bradley, M. & Pringle, A. Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discovery Today* vol. 10 993–1000 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03502-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03502-6) (2005).
172. Gordon, J., Amini, S. & White, M. K. General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol Biol* **1078**, 1 (2013).
173. Sarmiento, B. *et al.* Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. <http://dx.doi.org/10.1517/17425255.2012.673586> **8**, 607–621 (2012).
174. Deng, W. Induced pluripotent stem cells: Paths to new medicines. *EMBO Rep* **11**, 161–165 (2010).
175. Liu, W., Deng, Y., Liu, Y., Gong, W. & Deng, W. Stem Cell Models for Drug Discovery and Toxicology Studies. *J Biochem Mol Toxicol* **27**, 17–27 (2013).

176. Edwards, A. M. *et al.* Preclinical target validation using patient-derived cells. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015 14:3 **14**, 149–150 (2015).
177. Namekawa, T., Ikeda, K., Horie-Inoue, K. & Inoue, S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 74 **8**, 74 (2019).
178. Tsumura, R. *et al.* Report of the use of patient-derived xenograft models in the development of anticancer drugs in Japan. *Cancer Sci* **111**, 3386–3394 (2020).
179. Willey, C. D., Gilbert, A. N., Anderson, J. C. & Gillespie, G. Y. Patient-Derived Xenografts as a Model System for Radiation Research. *Seminars in Radiation Oncology* vol. 25 273–280 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2015.05.008> (2015).
180. Gullberg, E. *et al.* Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathog* **7**, e1002158 (2011).
181. Pizzorno, G. *et al.* Impaired Polyglutamylation of Methotrexate as a Cause of Resistance in CCRF-CEM Cells after Short-Term, High-Dose Treatment with This Drug. *Cancer Res* **48**, (1988).
182. Reygaert, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* **4**, 482 (2018).
183. C, D. *et al.* Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br J Haematol* **106**, 78–85 (1999).
184. Malani, D. *et al.* Enhanced sensitivity to glucocorticoids in cytarabine-resistant AML. *Leukemia* 2017 31:5 **31**, 1187–1195 (2016).
185. Galmarini, C., Mackey, J. & Dumontet, C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 2001 15:6 **15**, 875–890 (2001).
186. L, L. *et al.* Detailed Functional and Proteomic Characterization of Fludarabine Resistance in Mantle Cell Lymphoma Cells. *PLoS One* **10**, (2015).
187. Fanciullino, R. *et al.* CDA as a predictive marker for life-threatening toxicities in patients with AML treated with cytarabine. *Blood Adv* **2**, 462–469 (2018).
188. Yamauchi, T. *et al.* Intracellular cytarabine triphosphate production correlates to deoxycytidine kinase/cytosolic 5'-nucleotidase II expression ratio in primary acute myeloid leukemia cells. *Biochem Pharmacol* **77**, 1780–1786 (2009).
189. Karim, H. *et al.* The pattern of gene expression and gene dose profiles of 6-Mercaptopurine- and 6-Thioguanine-resistant human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **411**, 156–161 (2011).
190. Gore, M. E. *et al.* Cisplatin/carboplatin cross-resistance in ovarian cancer. *Br J Cancer* **60**, 767 (1989).
191. Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Gupta, P. & Chen, Z. S. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *AAPS J* **17**, 802 (2015).
192. Bagnoli, M. *et al.* Clinicopathological impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in epithelial ovarian carcinoma. *Biomed Res Int* **2013**, (2013).

193. Gibalová, L. *et al.* P-glycoprotein depresses cisplatin sensitivity in L1210 cells by inhibiting cisplatin-induced caspase-3 activation. *Toxicol In Vitro* **26**, 435–444 (2012).
194. Worthley, E. G. & Schott, C. D. The toxicity of four concentrations of DMSO. *Toxicol Appl Pharmacol* **15**, 275–281 (1969).
195. Galvao, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J* **28**, 1317–1330 (2014).
196. Peng, Y. *et al.* Nanoscale Copper(II)-Diethyldithiocarbamate Coordination Polymer as a Drug Self-Delivery System for Highly Robust and Specific Cancer Therapy. *Mol Pharm* **17**, 2864–2873 (2020).