

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Kolaterální senzitivita a exprese ABCC1 transportéru u nádorových buněk**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Kristýna Líňová</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.</b>
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce doc. RNDr. Petru Mlejnkoovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a čas strávený nad mou diplomovou prací. Dále děkuji RNDr. Petru Doleželovi, CSc. a Mgr. Nikole Pastvové za cenné rady a pomoc při zpracování experimentální části mé diplomové práce. Poděkování patří také celému laboratornímu týmu na Ústavu normální anatomie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za jejich vlídný přístup, ochotu pomoci a vytvoření přátelské atmosféry. Dále bych chtěla poděkovat Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za sekvenaci genu *ABCCI* transportéru u buněčných linií K562 a A549. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině a přátelům za podporu během celého studia. Práce byla realizována za podpory grantu IGA LF 2018 008

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kristýna Líňová
Název práce	Kolaterální senzitivita a exprese ABCC1 transportéru u nádorových buněk
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav normální anatomie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Existence nádorových buněk se zvýšenou expresí ABC transportérů je jednou z příčin výskytu mnohočetné lékové rezistence. V důsledku toho byly hledány způsoby vedoucí k nalezení terapie, která by překonala tento typ mnohočetné lékové rezistence. Mnohé prvotní strategie, které se v *in vitro* experimentech jevíly slibně, v klinických studiích selhaly. Alternativní a jednou ze studovaných strategií v poslední době se stala i kolaterální senzitivita. Kolaterální senzitivita je fenomén, sledovaný u savčích buněk exprimujících ABC transportéry (ABCC1, ABCB1, ABCG2), při kterém buňky jeví hypersenzitivitu vůči léčivu v důsledku genetických změn způsobených rezistencí na jiné léčivo. Protože je tento jev dobře popsán u buněk exprimujících ABCC1 transportér, byly v této práci studovány buněčné linie K562 (nízká exprese ABCC1) a A549 (vysoká exprese ABCC1). Bylo zjištěno, že verapamil a chrysin indukují eflux redukovaného glutathionu (GSH) ven z buněk. U buněčné linie A549 docházelo asi k desetinásobně vyššímu efluxu ve srovnání s buněčnou linií K562. Dále bylo zjištěno, že k poklesu intracelulárního obsahu GSH u buněk K562 a A549 vede eflux GSH. U buněk A549 docházelo po šestihodinové inkubaci s verapamilem či chrysinem ke snížení intracelulární hladiny GSH skoro dvakrát více než v případě buněk K562. Snížená hladina intracelulárního GSH může vést k oxidativnímu stresu. V našem případě však nebyla pozorována aktivace NRF2, který patří mezi hlavní regulátory buněčné smrti. Následně bylo zjištěno, že u buněk K562 a A549 ovlivněných verapamilem a chrysinem nedochází k inhibici buněčné proliferace ani k indukci buněčné smrti. Teprve až po použití kombinace verapamilu

nebo chrysinu s buthionin sulfoximinem, což je inhibitor syntézy GSH, byl indukován signifikantní pokles viability u buněk A549. U buněk K562 byl účinek výrazně nižší. Bylo zjištěno, že verapamil a chrysin pravděpodobně nejsou schopny indukovat kolaterální senzitivitu u nádorových buněk s vysokou expresí ABCC1 transportéru.

Klíčová slova	Kolaterální senzitivita, ABC transportéry, ABCC1, verapamil, chrysin
Počet stran	80
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Kristýna Líňová
Title	Collateral sensitivity and expression of ABCC1 transporter in cancer cells
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Anatomy, Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

The existence of cancer cells with increased expression of ABC transporters is one of the causes of the occurrence of the multidrug resistance. As a result, ways of a therapy, able to overcome this type of multidrug resistance, have been searched. Many initial strategies observed *in vitro* and appeared promising eventually failed in clinical trials. Recently, collateral sensitivity has become an alternative and one of the studied strategies. Collateral sensitivity is a phenomenon observed in mammalian cells expressing ABC transporters (ABCC1, ABCB1, ABCG2), in which the cells show hypersensitivity to the specific drug due to genetic changes caused by resistance to another drug. Since this phenomenon is well described in cells expressing ABCC1 transporter, K562 cell lines (low expression of ABCC1) and A549 (high expression of ABCC1) were studied in this thesis. We found that verapamil and chrysin induce reduced glutathione (GSH) efflux out of the cells. Efflux level of A549 cell line was about tenfold higher compared to the K562 cell line. Furthermore, GSH efflux leads to a decrease in intracellular GSH content in K562 and A549 cells. A549 cells were almost twice as likely to reduce intracellular GSH levels after incubation with verapamil or chrysin for 6 hours than K562 cells. Decreased intracellular GSH levels could lead to oxidative stress. However, NRF2 activation, which is a major regulator of the cell death, has not been observed in our case. Subsequently, it was found that K562 and A549 cells affected by verapamil and chrysin, did not inhibit the cell proliferation or induce the cell death. Only after

the combination of verapamil or chrysin with buthionine sulfoximine (BSO), which is an inhibitor of GSH synthesis, significant decrease in viability was induced in A549 cells. The effect of K562 cells was significantly lower. We found out that verapamil and chrysin probably do not induce CS in tumor cells with high ABCC1 transporter expression.

Keywords	Collateral sensitivity, ABC transporters, ABCC1, verapamil, chrysin
Number of pages	80
Number of appendices	1
Language	Czech

# **OBSAH**

<b>1 ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>2</b>
2.1 Cílená protinádorová léčba	2
2.2 Léková rezistence	3
2.3 ABC transportéry	4
2.3.1 Vlastnosti ABC transportérů	4
2.3.2 Struktura ABC transportérů	5
2.3.3 Mechanismus přenosu substrátu	5
2.3.4 ABC transportéry spojeny s mnohočetnou lékovou rezistencí	7
2.3.4.1 ABCB1	8
2.3.4.2 ABCC1	8
2.3.5 ABCG2	9
2.3.6 Modulátory ABC transportérů	10
2.4 Kolaterální senzitivita	15
2.4.1 ABCB1 a kolaterální senzitivita	16
2.4.2 ABCC1 a kolaterální senzitivita	19
2.4.3 ABCG2 a kolaterální senzitivita	21
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>23</b>
3.1 Materiál a přístroje	23
3.1.1 Biologický materiál	23
3.1.2 Chemikálie	23
3.1.3 Použité roztoky	25
3.1.4 Přístroje	25
3.2 Použité metody	27
3.2.1 Buněčná lýze a izolace celkových proteinů	27
3.2.2 Stanovení celkové koncentrace proteinů Bradfordovou metodou	27
3.2.3 Separace proteinů pomocí gelové elektroforézy	27
3.2.4 Western blotting	28
3.2.5 Izolace DNA	28
3.2.6 Určení počtu živých a mrtvých buněk	29
3.2.7 Stanovení extracelulární a intracelulární hladiny redukováného glutathionu	29
3.2.8 Stanovení buněčné proliferace a viability	30
3.2.9 Stanovení životnosti buněk	32
3.2.10 Analýza buněčného cyklu	33
3.2.11 Analýza morfologie buněčných jader	34
<b>4 VÝSLEDKY</b>	<b>35</b>
4.1 Charakteristika použitých buněk	35
4.1.1 Stanovení exprese ABCC1	35
4.2 Vliv verapamilu a chrysinu na eflux redukováného glutathionu	36
4.3 Vliv verapamilu a chrysinu na intracelulární obsah redukováného glutathionu	39
4.4 Vliv verapamilu a chrysinu na oxidativní stres	42
4.5 Vliv verapamilu a chrysinu na proliferaci a viabilitu	46
4.6 Vliv buthionin sulfoximinu a kombinace verapamilu nebo chrysinu s buthionin sulfoximinem na proliferaci a viabilitu	47
4.7 Vliv verapamilu a chrysinu na životnost buněk	48
4.8 Vliv buthionin sulfoximu a kombinace verapamilu nebo chrysinu s buthionin sulfoximinem na životnost buněk	50
4.9 Vliv verapamilu a chrysinu na buněčný cyklus a apoptózu	53



4.10 Vliv kombinace verapamilu nebo chrysinu a buthionin sulfoximinu na buněčný cyklus a apoptózu	58
4.11 Vliv verapamilu a chrysinu na morfologii buněčných jader	63
<b>5DISKUSE</b>	<b>67</b>
<b>6ZÁVĚR</b>	<b>70</b>
<b>7LITERATURA</b>	<b>71</b>
<b>8SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>78</b>
<b>9PŘÍLOHY</b>	<b>79</b>

## CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši pojednávající o lékové rezistenci, ABC transportérech a kolaterální senzitivě u nádorových buněk.
- Ověřit expresi ABCC1 transportéru u buněčných linií K562 a A549.
- Zjistit, zda verapamil a chrysin indukují eflux glutathionu (GSH) do média u buněčných linií K562 a A549.
- Studovat, zda verapamil a chrysin ovlivňují intracelulární obsah GSH u buněčných linií K562 a A549.
- Zjistit, jestli verapamil a chrysin ovlivňují oxidativní stres u buněčných linií K562 a A549.
- Studovat vliv verapamilu a chrysinu na inhibici proliferace a indukci buněčného cyklu u buněčných linií K562 a A549.

# 1 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou v dnešní době jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Z toho důvodu jsou i nadále hledána protinádorová léčiva, která by se jevila jako účinnější a méně škodlivá při léčbě těchto onemocnění. Tradiční protinádorová léčiva, která měla cytotoxické účinky, indukovala apoptózu u nádorových i normálních buněk. Nové poznatky v biologii nádorů však přinesly cílenou chemoterapii založenou na hlubším pochopení molekulárních mechanismů, které jsou příčinou vzniku nádorových onemocnění (Joo *et al.*, 2013). Ačkoliv tento druh chemoterapie přinesl zkvalitnění léčby pro pacienty s různými druhy nádorových onemocnění, ani tato protinádorová terapie se nevyhnula vzniku mnohočetné lékové rezistence (MDR).

MDR je jednou ze základních příčin selhání chemoterapie. Senzitivní nádorové buňky se v důsledku této lékové rezistence stávají odolné vůči cytotoxickým a cytostatickým účinkům použitých protinádorových léčiv (Lage, 2008). K rozvoji MDR může dojít v důsledku nejrůznějších mechanismů, jedním z nich je zvýšená exprese ATP binding cassette (ABC transportérů), které mohou výrazně snížit intracelulární koncentraci protinádorového léčiva a tím i přispět ke snížení jeho cytotoxického účinku (Gottesman *et al.*, 2002).

Se vznikem MDR jsou nejčastěji spojovány tři ABC transportéry (ABCC1, ABCB1, ABCG2). Vzhledem ke zjištění, že nadměrná exprese těchto transportérů souvisí se snižováním účinnosti podávaných chemoterapeutik, byla vyvíjena snaha nalézt léčiva, která by blokovala tyto transportní proteiny. Jednou ze strategií byla aplikace inhibitorů ABC transportérů. Problémem spojeným s těmito inhibitory byla nespecifita vůči buňkám s MDR a blokace transportérů i v jiných tkáních. Použití inhibitorů ABC transportérů mělo sice velký úspěch v *in vitro* experimentech, nicméně v klinických studiích naprosto selhalo. Z toho důvodu byly hledány další strategie, které by překonaly MDR u nádorových buněk. Jednou z nalezených alternativních strategií se stal jev zvaný kolaterální senzitivita (CS) (Laberge *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2009).

Termín CS byl poprvé použit v mikrobiologii (Szybalski a Bryson, 1952) a stejný jev byl pozorován i u savčích buněk exprimujících ABC transportéry. Mechanismus CS je velmi dobře popsán u buněk exprimujících ABCC1 transportér, kterým se zabýváme i v předložené diplomové práci (Hall *et al.*, 2009; Pluchino *et al.*, 2012).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Cílená protinádorová léčba

Pro léčbu nádorových onemocnění jsou využívány různé terapeutické přístupy jako chirurgické zákroky, radioterapie a chemoterapie. V poslední době se stále častěji setkáváme s novým typem protinádorových léčiv zaměřených na specifické vlastnosti nádorové buňky. Tato léčiva se snaží zmírnit nežádoucí účinky na zdravé tkáně obvykle u použití běžných cytostatik. Výše popsaná léčiva jsou označována jako cílená chemoterapeutika.

Cílená chemoterapie je definována jako typ léčby blokující růst nádorových buněk mechanismem interference se specifickými molekulami buněk, které jsou potřebné pro růsta rozvoj nádorů. Tato chemoterapie se momentálně jeví jako účinnější a méně škodlivá, než je chemoterapie systémová. Systémová chemoterapie byla na rozdíl od cílené chemoterapie zaiměřena hlavně na zvýšenou proliferaci nádorových buněk.

Úlohou cílené chemoterapie je blokovat specifické cesty, které souvisí s rozvojem a růstem nádoru, dále blokování specifických enzymů a receptorů růstových faktorů podílejících se na proliferaci nádorových buněk nebo modifikace funkce proteinů, které regulují expresi genů (Joo *et al.*, 2013).

Mezi dva hlavní typy cílené chemoterapie zahrnujeme „malé molekuly“ a monoklonální protilátky. Pojmeme „malé molekuly“ jsou označovány organické nízkomolekulární látky (do 800 Da), které jsou navrženy tak, aby interferovaly se signálními drahami nádorové buňky. Téměř všechny tyto látky mají inhibiční vlastnosti. Typickým příkladem těchto molekul jsou inhibitory tyrosinových kinas (TKI), mezi které řadíme imatinib a gefitinib (Joo *et al.*, 2013). TKI byly vyvinuty proto, aby zamezily neregulované aktivaci tyrosinových kinas prostřednictvím mechanismů jako jsou bodové mutace nebo nadměrná exprese, které mohou vést k různým formám nádorových onemocnění (Steeghs *et al.*, 2007).

Dalším typem látek řadících se do této skupiny jsou inhibitory BCL-2 proteinů nazývané jako BH3 mimetika. Tyto látky napodobují domény BCL-2 homologie 3 (BH3) proapoptotických členů rodiny BCL-2 a neutralizují antiapoptotické proteiny vazbou na hydrofobní části umístěné na povrchu BCL-2 proteinů (Zhang *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2013).

Druhým typem cílené chemoterapie je použití monoklonálních protilátek. Do této skupiny řadíme protilátky, která se vážou na antigen specifický pro nádorovou buňku. Mezi používané monoklonální protilátky patří např. bevacizumab a cetuximab. Bevacizumab je cílený na vaskulární endoteliální růstový faktor a používá se při léčbě kolorektálního karcinomu, metastatického karcinomu ledvin a multifonního glioblastomu. Cetuximab je cílený na epidermální růstový faktor a používá se také při léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. Další terapeutickou aplikací monoklonálních protilátek je jejich podávání ve formě konjugátu protilátka-léčivo. Tato technologie poskytuje širší terapeutický rozsah zaměřený na nádorové buňky a snížení potenciálního vedlejšího cytotoxického účinku léčiva (Joo *et al.*, 2013).

Chemoterapie je klíčovou složkou k léčbě nádorových onemocnění a zlepšení její terapeutické účinnosti se může přímo promítnout do zvýšení přežití pacientů s nádorovým onemocněním. Přestože cílená chemoterapie přinesla zkvalitnění léčby pro pacienty s různými typy nádorových onemocnění, potýká se i tento typ chemoterapie se vznikem lékové rezistence.

## **2.2 Léková rezistence**

Jednou ze závažných komplikací při použití chemoterapie a příčinou jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat cytotoxickým léčivům. Již při první léčbě mohou být maligní populace buněk rezistentní vůči chemoterapii. V tomto případě se jedná o primární (přirozenou) rezistenci. Druhým typem rezistence je rezistence sekundární (získaná), která vzniká až v průběhu cytostatické léčby. Původní buňky citlivé na léčiva se stávají rezistentními a účinnost léčby se tak snižuje. Pokud při ztrátě citlivosti na jedno léčivo dochází současně ke vzniku rezistence na jiná léčiva s podobnou strukturou a mechanismem účinku, můžeme mluvit o tzv. zkřížené rezistenci (Skovsgaard, 1978).

Ačkoli se použití chemoterapie zdá být slibné pro léčbu nádorových onemocnění, její významnou překážkou zůstává schopnost rakovinových buněk odolávat různým protinádorovým léčivům lišících se ve struktuře i mechanismu účinku. Tento jev je nazýván jako MDR (Thomas *et al.*, 2003; Choi, 2005;). Termín MDR byl poprvé použit v oblasti antibiotické rezistentní infekce a následně byl využit i ve spojení s protinádorovou léčbou (Bolhuis *et al.*, 1997; Baguley, 2010). Po objevení MDR u nádorových buněk je většinou navýšena dávka daného léčiva, avšak pro překonání rezistence je navýšení léčiva neúčinné. Zvýšená dávka léčiva má na pacienta až toxické

účinky a lékovou rezistenci může naopak povzbuzovat. MDR tedy výrazně omezuje účinnost chemoterapie (Choi, 2005; Thomas *et al.*, 2003).

Některé druhy nádorových onemocnění, jako jsou gastrointestinální a renální karcinomy, do značné míry nereagují na chemoterapii a mají vysoký stupeň přirozené MDR. Zatímco leukémie a lymfomy, karcinomy prsu a vaječníku často reagují na počáteční léčbu, avšak v průběhu léčby získávají MDR. MDR na protinádorová léčiva je proto závažným zdravotním problémem, který velmi často ovlivňuje účinnost léčby nádorových onemocnění (Hamed *et al.*, 2019). K vývoji nových terapeutických činidel, která by mohla překonat MDR, bylo potřeba identifikovat různé mechanismy vzniku MDR, mezi které řadíme:

- a) vznik mutací molekulárních cílů, které výrazně snižují citlivost nádorů vůči léčivům,
- b) zvýšená aktivita genů, které ovlivňují detoxikaci léčiv,
- c) pozměněná regulace buněčné smrti (apoptózy),
- d) zvýšená exprese ABC transportérů a s tím spojená změna transportu léčiv ven z buňky,
- e) porucha buněčného cyklu a zvýšená oprava DNA.

Ze jmenovaných mechanismů, které jsou příčinou vzniku MDR, je jedním z nejlépe prostudovaných mechanismů zvýšená exprese ABC transportérů (Gottesman *et al.*, 2002; Gillet a Gottesman 2009).

## **2.3 ABC transportéry**

### **2.3.1 Vlastnosti ABC transportérů**

ABC transportéry představují jednu z největších rodin membránových proteinů přítomných jak v prokaryotech, tak eukaryotech (Kathawala *et al.*, 2015). V současné době bylo izolováno a identifikováno 48 členů rodiny ABC transportérů (Glavinas *et al.*, 2004; Gottesman *et al.*, 2001; Hung, 2007) a rozděleno do sedmi podskupin A-G (Tiwari *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). Za fyziologických podmínek tyto transportéry přepravují endogenní substráty (např. aminokyseliny, sacharidy, lipidy) a exogenní substráty (např. xenobiotika, léčiva) přes biologické membrány za pomoci hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP) (Fromm, 2004).

### 2.3.2 Struktura ABC transportérů

Stavba různých efluxních ABC transportérů umístěných v buněčné membráně je obdobná. Transportéry se skládají z transmembránových domén (TMD), z nichž každá obsahuje celou řadu transmembránových  $\alpha$ -helixů a domén navazujících nukleotidy (NBD). Sekvenční identita NBD mezi bakteriálními a eukaryotickými transportéry je 30-50 % (Wilkens, 2015). Zatímco TMD je místo, kde se na transportér váže substrát, tak NBD vykazuje aktivitu ATPasy, která hydrolyzuje molekuly ATP, aby poskytla energii potřebnou pro proces odtoku substrátu (léčiva) proti koncentračnímu gradientu do extracelulárního prostoru (Avendaño *et al.*, 2015; Gottesman *et al.*, 2006; Yu *et al.* 2016). Dosud objevené ABC transportéry jsou buď úplné nebo poloviční transportéry, které dimerizují za vzniku úplných funkčních transportních jednotek. U bakterií je kromě čtyř hlavních domén přidána podjednotka, která je zodpovědná za zachycení transportního substrátu a za jeho dodání do vazebného místa TMD. V Gram negativních bakteriích jsou pomocné jednotky o velikosti 30-50 kDa nacházející se v periplasmě. V Gram pozitivních bakteriích jsou pomocnými jednotkami lipoproteiny ukotvené na vnější straně plazmatické membrány. U eukaryot je většina ABC transportérů tvořena jediným polypeptidem, který obsahuje čtyři funkční podjednotky (Wilkens, 2015).

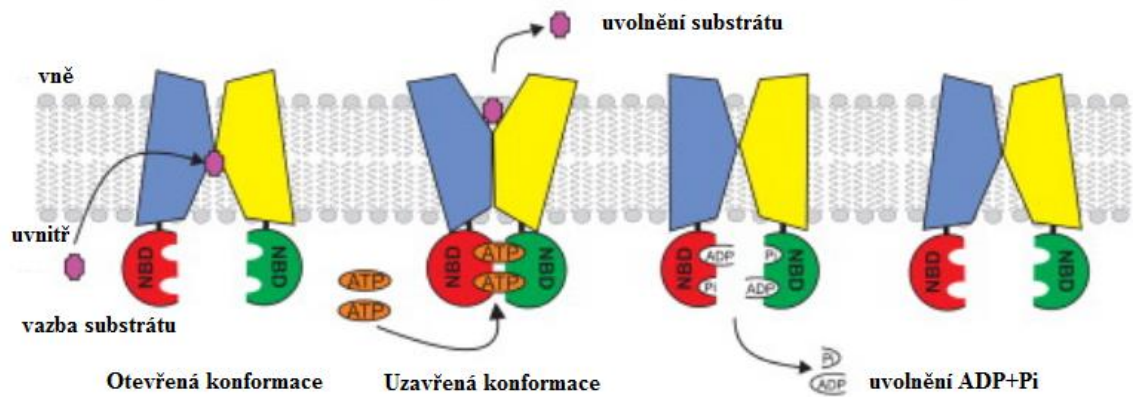
Z hlediska MDR nádorových buněk byly podrobně zkoumány tři efluxní transportéry ABCB1 (P-gp, MDR1), ABCC1 (MRP1) a ABCG2 (BCRP, protein mitoxantronové rezistence MXR).

### 2.3.3 Mechanismus přenosu substrátu

Až na několik výjimek dochází k přenosu substrátů ABC transportéry proti chemickému gradientu. Tento proces vyžaduje hydrolyzu ATP jako „hnací sílu“. Za fyziologických podmínek fungují ABC transportéry v jednom směru. Buď přenášejí látky přes plazmatickou membránu do buňky, nebo z buňky ven (Wilkens, 2015).

Přenos substrátu ABC transportérem je zahájen vazbou substrátu na TMD. TMD má vysokou afinitu k substrátu a nachází se v otevřené konformaci. Následně dochází k vazbě dvou molekul ATP a k dimerizaci NBD. NBD se nachází v uzavřené konformaci. Translokaci substrátu podpoří hydrolyza první molekuly ATP, která vyvolá změnu konformace (Kreimer *et al.*, 2000). Uzavřenou konformaci NBD změní na

konformaci otevřenou hydrolyzá druhé molekuly ATP. Dochází k uvolnění fosfátu a adenosindifosfátu (ADP) (Obr. 1, Rees *et al.*, 2009).



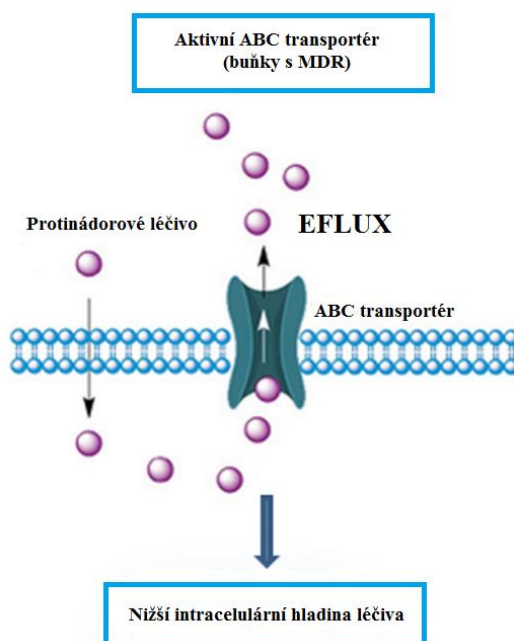
Obr. 1 Schématicky znázorněný mechanismus přenosu substrátu. Substrát se váže na TMD nacházející se v otevřené konformaci. V dalším kroku dochází k vazbě dvou molekul ATP a následně je dimerizována NBD a vytvoří se uzavřená konformace. Konformační změna na TMD je vyvolána hydrolyzou první molekuly ATP. Hydrolyzá ATP podpoří i translokaci substrátu. Při hydrolyzá druhé molekuly ATP se změní uzavřená konformace NBD na otevřenou. V posledním kroku dochází k uvolnění fosfátu a ADP (upraveno dle Aquilino *et al.*, 2019).



### 2.3.4 ABC transportéry spojeny s mnohočetnou lékovou rezistencí

Někteří členové rodiny ABC transportérů jsou zodpovědní za vznik MDR (Obr. 2). Zejména jsou v této souvislosti zmiňovány ABCC1, ABCB1 a ABCG2.

Změny efluxu léčiva v důsledku ABCB1, ABCC1 a ABCG2 byly prokázány *in vitro* (Ambudkar *et al.*, 1999; Gottesman *et al.*, 2002). Tyto proteiny mohou aktivně transportovat léčiva z buněk, a tak snižovat jejich množství, které se může hromadit v nádorové buňce. Bylo zjištěno, že exprese ABC transportních proteinů koreluje s rezistencí vůči chemoterapii *in vitro* a protinádorové léčivo CTP-11 s jeho aktivním metabolitem SN-38 jsou cílem ABC transportérů (Goldman, 2003; Thomas *et al.*, 2003).



Obr. 2 Schématické znázornění mnohočetné lékové rezistence (MDR) v nádorových buňkách s efluxem léčiva zprostředkovaným ABC transportérem (upraveno dle: Avendaño *et al.*, 2015).

#### 2.3.4.1 ABCB1

ABCB1 (Obr. 3) byl prvním efluxním proteinem, který byl identifikován v buňkách vaječníků čínské křečka v roce 1976 (Juliano a Ling, 1976). Jedná se o 170 kDa protein, který je exprimován v játrech, placentě, ledvinách, střevech a mozku, kde má detoxikační a transportní fyziologické funkce. ABCB1 je nejstudovanějším efluxním proteinem, odpovídá za eflux asi poloviny celkového počtu protinádorových léčiv (Avendaño *et al.*, 2015). V nádorových buňkách s nadměrnou expresí ABCB1 uděluje MDR buňkám fenotyp proti tradičním chemoterapeutickým léčivům s nesouvisejícími chemickými strukturami a variabilními mechanismy účinku, mezi tyto léčiva patří doxorubicin, paclitaxel, vinblastin a mnoho dalších (Loo *et al.*, 2005).

Lidský transportní protein ABCB1 obsahuje 1280 aminokyselinových zbytků tvořící dvě podobné části. Každá z těchto dvou částí obsahuje jednu TMD se šesti  $\alpha$ -helixy (TMD1, TMD2) a hydrofilní NBD (NBD1, NBD2) (Obr. 3). Vazba substrátu (léčiva) ABCB1 na TMD způsobuje následnou hydrolýzu molekuly ATP vedoucí ke konformační změně tvaru transportéru, který transportuje léčivo ven z buňky (Hyde *et al.*, 1990; Karthikeyan *et al.*, 2015). Tento jev je překážkou pro intracelulární akumulaci léčiv a pro dosažení účinné chemoterapie. Předpokládá se, že ABCB1 by mohl vázat a exportovat strukturálně odlišná léčiva. Jeho hlavní fyziologickou funkcí by měla být ochrana buněk před lipofilními toxiny (George a Jones, 2012).

#### 2.3.4.2 ABCC1

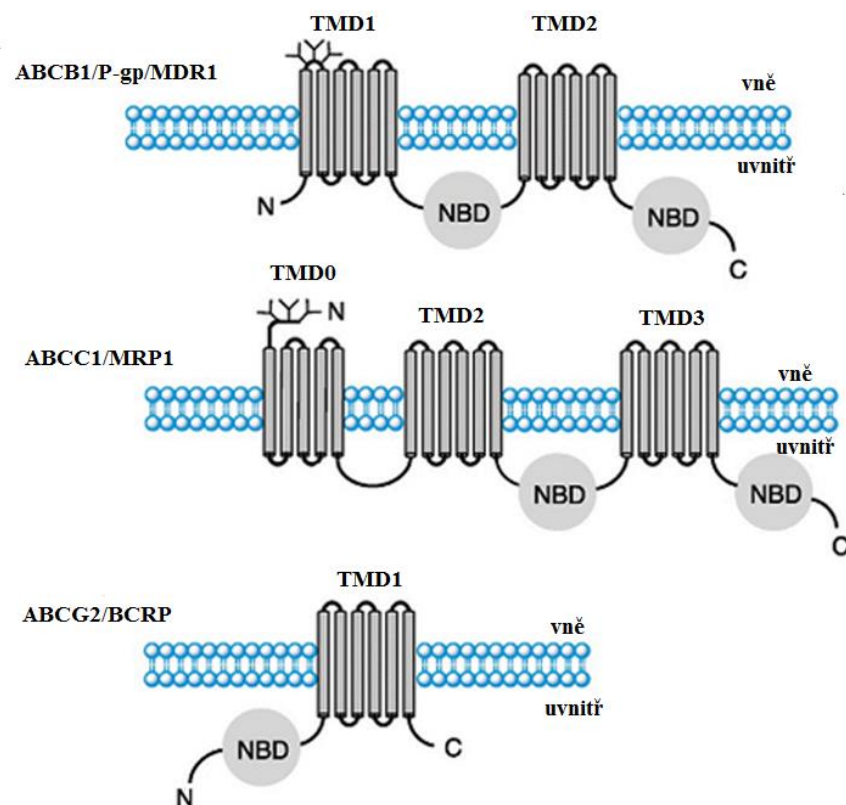
ABCC1 je transportní protein o velikosti 190 kDa, poprvé byl nalezen u antracyklin-rezistentních buněčných linií H69AR a HL60. Tento protein je přítomen na bazolaterálním povrchu epiteliální membrány a vylučuje různé endogenní i exogenní látky (Bakos *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1992; Kruh *et al.*, 2003). Je exprimován téměř ve všech tkáních. Ačkoli podobnost mezi aminokyselinovou sekvencí ABCB1 a ABCC1 je jen 15 %, rezistence u obou proteinů se významně překrývá (Leschziner *et al.*, 2006). Struktura ABCC1 (Obr. 3) obsahuje tři TMD (TMD0, TMD2, TMD3) a dvě cytoplasmatické NBD. Některá chemoterapeutická léčiva jako doxorubicin, topotekan a vinkristin jsou substráty ABCC1 v nádorových buňkách (Kathawala *et al.*, 2015). Na rozdíl od ABCB1 však nevykazuje tento transportér efluxní aktivitu vůči taxanům (Morrow *et al.*, 2006). Mezi substráty ABCC1 řadíme např. konjugáty organických

aniontů, nukleosidové analogy a mnoho dalších (Mao *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

### 2.3.5 ABCG2

ABCG2 je první známý poloviční transportér o velikosti 72 kDa obsahující pouze jednu TMD a jednu NBD (Obr. 3). Tento transportní protein je aktivní pouze po homodimerizaci nebo oligodimerizaci se sebou samým nebo jinými transportéry (Ejendal *et al.*, 2002; Goler-Baron *et al.*, 2011). Poprvé byl identifikován a charakterizován u buněčné linie karcinomu prsu (MCF7) (Doyle *et al.*, 1998; Karthikeyan *et al.*, 2015). ABCG2 je exprimován v buněčných membránách tenkého střeva, placenty, mozku, prostaty, vaječníků a v mnoha typech nádorových buněk. Mezi substráty ABCG2 řadíme široké spektrum protinádorových léčiv (TKI), sulfátové a glukuronidové konjugáty sterolů a xenobiotik, přírodní sloučeniny a toxiny, fluorescenční barviva, fotosenzibilizátory a antibiotika).

Mutace v genu ABCG2 produkují odlišné substrátové preference pro mutantní i wild-type varianty. Nejdůležitější mutací pro stanovení substrátové specifity je mutace v poloze 482 (Chen *et al.*, 2003). Arginin je umístěn na karboxylovém konci třetího transmembránového segmentu membránové domény, kde vazba substrátu je pravděpodobně způsobena tvorbou solných můstků (Mao *et al.*, 2005). Tyto mutace způsobují konformační změny, a mění také schopnost vazby léčiv a efluxní kapacitu transportéru (Dai *et al.*, 2009; Pozza *et al.*, 2006).



Obr. 3 Schematicky znázorněné struktury hlavních ABC transportérů zapojených do mnohočetné lékové rezistence (MDR) (upraveno dle Avendaño *et al.*, 2015).

### 2.3.6 Modulátory ABC transportérů

Vzhledem k tomu, že nadměrná exprese ABCB1, ABCC1 a ABCG2 v nádorových buňkách může být příčinou MDR, existovala neustálá snaha vyvinout terapii, která by MDR v nádorových buňkách zvrátila (Kathawala *et al.*, 2015).

Jedna ze strategií pro překonání MDR v buňkách se zvýšenou expresí ABC transportérů je použití léčiv společně s MDR modulátory. Tyto látky patří mezi inhibitory ABC transportérů, které mohou být použity ke zvýšení biologické dostupnosti nebo např. pro průnik různých léčiv do mozku (Choi, 2005, Liscovitch *et al.*, 2002).

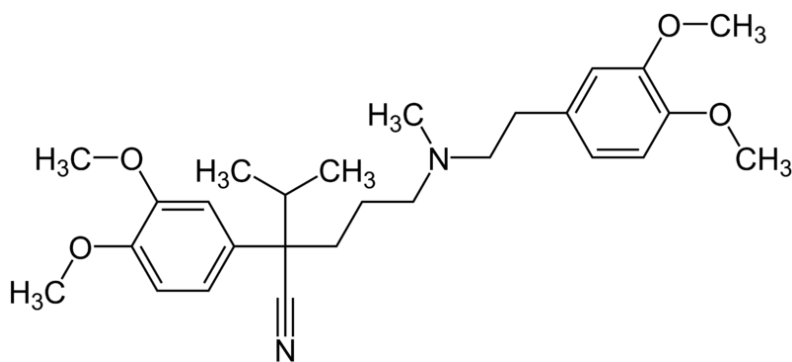
MDR modulátory jsou sloučeniny, které inhibují ABC transportéry, a tím snižují odolnost buněk vůči cytostatikům (Müller *et al.*, 2000). Tyto látky se dělí do několika skupin. Skupina inhibitorů první generace obsahuje antagonisty kalmodulinu, steroidy, inhibitory kinasy C, indolové alkaloidy a detergenty. Mezi nejdříve objevené modulátory ABC transportérů první generace řadíme verapamil a cyklosporin A (Coley,

2010; Tan *et al.*, 2000; Leonardo *et al.*, 2003; Szakacs *et al.*, 2006). I když tyto sloučeniny vykazovaly účinnost v předklinických studiích, v klinických studiích nebyly proti MDR účinné (Coley, 2010). Verapamil v dávkách používaných při léčbě proti MDR produkoval kardiotoxicitu (Dalton *et al.*, 1995).

Verapamil (Obr. 4) je fenylalkylaminový antagonist vápníku typu L. V klinické praxi nejčastěji používaný pro léčbu hypertenze (Prisant, 2001). Verapamil vykazuje komplexní interakci s P-gp, je schopen stimulovat aktivitu ATPasy při nízkých koncentracích (Ambudkar *et al.*, 1999; Laberge *et al.*, 2009). Byl poprvé rozpoznán jako chemosenzibilizační léčivo v roce 1981 (Tsuruo *et al.*, 1981).

Problémem první generace inhibitorů je jejich nízká specifita, poměrně nízká účinnost a toxicita v dávkách potřebných pro inhibici. Látky patřící do této skupiny fungují na principu kompetitivní inhibice (Twentyman et Bleehen, 1991)

K vyřešení problémů spojených s léčivy první generace byly sloučeniny valsopodar (PSC833, analog cyklosporinu A) a další navrženy tak, aby cílily na specifické transportéry způsobující vznik MDR. Látky, řadící se do této skupiny vykazovaly vyšší účinnost, problémem i nadále zůstala jejich nízká specifita. Valsopodar, který se řadí do této skupiny látek, má až desetkrát vyšší účinnost než cyklosporin A.



Obr. 4 Chemická struktura verapamilu (2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-{{2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl}(methyl)amino}-2-(propan-2-yl)pentanenitrile) (převzato z [https://en.wikipedia.org/wiki/Verapamil#/media/File:Verapamil\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Verapamil#/media/File:Verapamil_structure.svg)).

Inhibitory druhé generace fungují stejně jako inhibitory první generace na principu kompetitivní inhibice. Na rozdíl od MDR modulátorů první generace, mají MDR modulátory druhé generace nízkou afinitu k ABC transportérům. MDR modulátory druhé generace byly účinnější než léčiva patřící do první generace, pokud byly použity s konvenčními chemoterapeutickými léčivy (Nobili *et al.*, 2006; Nobili *et al.*, 2012). Kromě toho měly MDR modulátory druhé generace lepší biologickou dostupnost a byly méně toxické ve srovnání s modulátory první generace (Goldman, 2003).

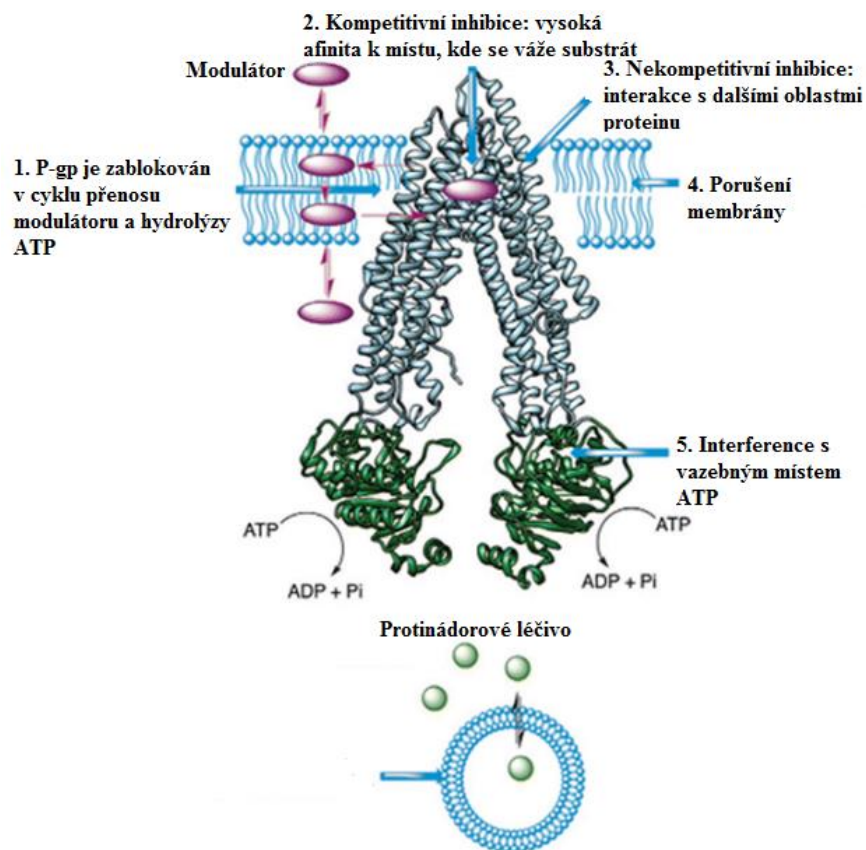
Inhibitory třetí generace byly vyvinuty na základě kvantitativního vztahu mezi strukturou a aktivitou i k překonání problémů spojených s inhibitory první a druhé generace (Nobili *et al.*, 2006; Nobili *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2003).

MDR modulátory třetí generace jako elacridar, laniquidar, zosuquidar a tariquidar, vykazují vysokou specifitu a nízkou toxicitu. Mají také vysokou účinnost na ABCB1 již při nanomolárních koncentracích. Jmenované sloučeniny inhibují i ABCC1 a ABCG2 a fungují na principu nekompetitivní inhibice (Fracasso *et al.*, 2004; Szakacs *et al.*, 2006).

Kromě výše uvedených MDR modulátorů bylo v posledním desetiletí provedeno i několik studií a zjištěno, že ABC transportéry mohou být inhibovány TKI z různých přírodních a mořských sloučenin. Tyto sloučeniny jsou jak strukturně, tak mechanismem účinku odlišné od MDR modulátorů třetí generace. V poslední době bylo objeveno množství léčiv, které modulují ABC transportéry. Studie ukázaly nejen přesvědčivé výsledky *in vitro* a *in vivo*, ale některé z nich i významnou účinnost v klinické praxi (Kelly *et al.*, 2012; Kunz *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Mechanismy působení MDR modulátorů v nádorových buňkách nesoucích MDR byly shrnuty do šesti bodů (Obr. 5). MDR modulátor může být rozpoznán jako transportní substrát, který je přenášen za hydrolýzy ATP. Při tomto jevu dochází ke zvyšování intracelulární hladiny léčiva. Druhým mechanismem působení MDR modulátoru může být kompetitivní inhibice MDR modulátorů první nebo druhé generace. Třetím mechanismem je nekompetitivní inhibice MDR modulátorů jako cis-flupenthixol, které vážou důležité aminokyselinové zbytky na jiné než vazebné místo P-gp (alosterická inhibice). Případně ovlivňují konformaci transportéru odpovědnou za eflux léčiva (Avendaño *et al.*, 2015) (Obr. 5). Některé povrchově aktivní látky (např. anestetika) nespecificky narušují membránové lipidy, a tím zvyšují rychlost absorpce léčiva (Ferte, 2000; Eytan, 2005). Určité druhy MDR modulátorů interferují s vazebným místem ATP. Příkladem tohoto mechanismu je zachycené ADP

vanadičnanem ve vazebném místě ATP (Urbatsch *et al.*, 1995). Jiné druhy MDR modulátorů mohou interferovat s intracelulární sekrecí léčiv zprostředkovanou ABCB1 ve vezikulární membráně, což činí léčivo dostupnější pro jeho buněčné cíle (Yamagishi *et al.*, 2013).



Obr. 5 Možné mechanismy působení MDR modulátorů na ABCB1 transportní protein (P-gp) (upraveno dle: Avendaño *et al.*, 2015).

Zápornou vlastností všech MDR modulátorů může být blokáce ABCB1 i v tkáních, kde je tento transportér potřebný pro vyloučení chemoterapeutik. Chemoterapeutika jsou pacientovi podávána zároveň s MDR modulátory. Důsledkem tohoto jevu může být zvýšená cytotoxicita chemoterapeutika nebo dalších používaných léčiv zároveň s chemoterapeutiky (Ling, 1997).

Mezi MDR modulátory ABCC1 řadíme flavonoidy, biricodar, deriváty glutathionu a další (Boumendjel *et al.*, 2005). Aplikací těchto látek můžeme ovlivnit buňky v celém těle, protože ABCC1 je exprimován téměř ve všech tkáních. Tento fakt může být problémem spojených s použitím inhibitorů ABCC1.

Prvním MDR modulátorem ABCG2 byl fumitremorgin C. Tato látka byla objevena v roce 1995. U tohoto inhibitoru byly bohužel zjištěny neurotoxické účinky (Rabindran *et al.*, 2000). O něco později byly objeveny flavonoidy (resveratrol), pantoprazol a TKI (Cooray *et al.*, 2004; Houghton *et al.*, 2004). MDR modulátory jako jsou tariquidar, bicodar, cyklosporin A a další inhibují jak ABCB1, tak ABCG2 (Germann *et al.*, 1997; Robey *et al.*, 2004; Qadir *et al.*, 2005).

Bylo zjištěno, že některé substráty ABC transportérů se mohou stát při použití vyšší koncentrace i jejich inhibitory. Mezi takové látky patří např. TKI a verapamil (Hegedüs *et al.*, 2002). Určitou výhodou při léčbě pacientů může být fakt, že některé inhibitory působí proti ABCB1, ABCC1 i ABCG2.

Monoklonální protilátky se také využívají jako MDR modulátory. Vazbou na ABCB1 jej inhibují, z toho důvodu nedochází k přenosu substrátu. Další studie se zabývají regulací transkripčních faktorů inhibujících ABCB1 a snižováním exprese *abcb1* genu pomocí malých interferujících RNA (siRNA, ...) (Jin *et al.*, 2000; Widmer *et al.*, 2007). Tyto studie jsou však zatím prováděny jen v *in vitro* podmínkách. Aby mohly být zjištěné poznatky dále využity v terapii, je třeba je ještě podrobit klinickým studiím v prostředí *in vivo*.

Ačkoli mnohé objevené inhibitory první, druhé i třetí generace se při experimentech *in vitro* jeví jako účinná strategie působící proti MDR, při klinických studiích *in vivo* tyto strategie selhaly. Proto byly hledány alternativní strategie pro překonání MDR. Nalezený fenomén byl označen pojmem CS.

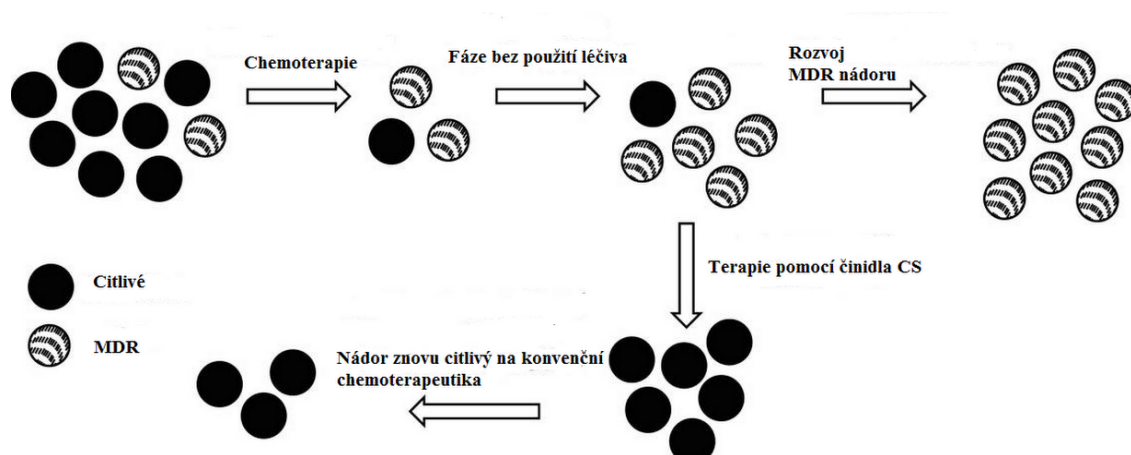


## 2.4 Kolaterální senzitivita

Jednou z alternativních strategií pro překonání MDR způsobené zvýšenou expresí ABC transportérů využitelnou i v klinické praxi by mohla být identifikace látek, které usmrcují rezistentní nádorové buňky se zvýšenou expresí těchto transportérů (Hall *et al.*, 2009). Termín CS byl poprvé popsán Szybalskim a Brysonem v roce 1952 po pozorování bakterie *Escherichia coli* rezistentní na léčivo. Uvedená bakterie vykazovala přecitlivělost na látky nesouvisející s léčivem, vůči kterému byla rezistentní (Szybalski a Bryson, 1952).

CS je typ syntetické letality 1, kde genetické změny vzniklé při rozvoji rezistence vůči jednomu činidlu jsou doprovázeny rozvojem přecitlivělosti na druhé činidlo. CS tak může být využita pro cílené a selektivní zabíjení nádorových buněk, jejichž MDR je způsobena zvýšenou expresí ABC transportérů. Většina činidel, která indukují CS, byla identifikována náhodně.

Identifikací vysoce selektivních a účinných činidel CS zjišťujeme, která činidla jsou velmi účinná při prevenci MDR. Tyto látky mohou být podávány jako adjuvans při standardní chemoterapeutické léčbě nebo při resenzibilizaci nádorů na běžně používaná terapeutika (Obr. 6) (Pluchino *et al.*, 2012).



Obr. 6 Schéma demonstrující, jak chemoterapeutika selektivně usmrcují citlivou (černou) subpopulaci nádorových buněk z heterogenní maligní populace. Během fáze, kdy nejsou použita léčiva vznikají další rezistentní nádorové buňky (pruhované). Opakování chemoterapeutických cyklů vede k rozvoji nádoru rezistentního na více druhů léčiv (MDR). Léčba činidly CS může usmrcovat buňky exprimující P-gp nebo redukovat expresi P-gp, případně aktivovat nádorové buňky pro léčbu chemoterapeutiky (upraveno dle: Pluchino *et al.*, 2012).

### 2.4.1 ABCB1 a kolaterální senzitivita

Několik studií prokázalo, že velké množství činidel, které způsobují CS, můžeme považovat za substráty P-gp, které stimulují aktivitu ATPasy a eflux substrátů z plazmatické membrány do extracelulárního prostoru (Laberge *et al.*, 2009). Po návratu substrátu do extracelulárního prostředí se předpokládá, že celý cyklus se opakuje, protože P-gp působí jako „hydrofobní vysavač“. Tento proces je znám jako cyklování vedoucí ke zvýšené hydrolýze ATP v buňce (Gottesman *et al.*, 2009). Buňky trpí oxidativním stresem, který je buď přímým důsledkem produkce ROS ze zvýšené oxidativní fosforylace, nebo nepřímým důsledkem snížení antioxidační obrany, tím vzniká oxidovaná forma glutathionu (GSSG) (Obr. 7). Jakmile hladina ROS dosahuje určité hranice, buňky s MDR zahájí apoptózu.

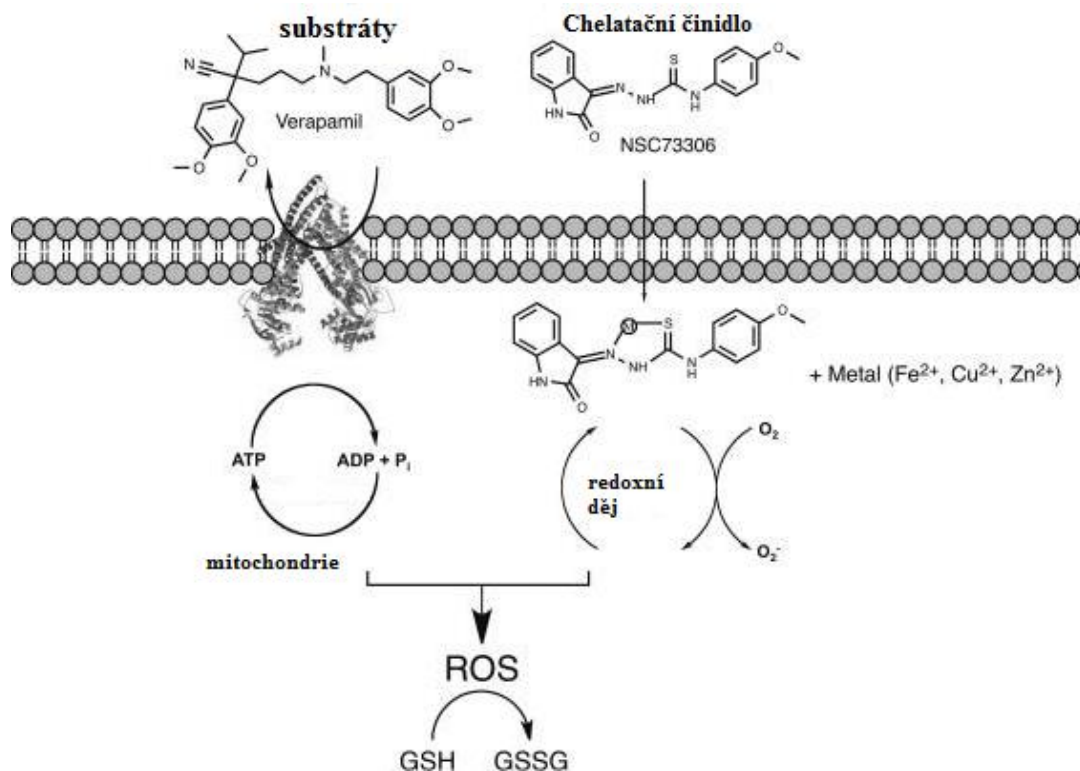
Studie podporující tento mechanismus ukazují, že ATP je spotřebována dvojnásobnou rychlostí v buňkách s MDR, které jsou vystaveny silnému stimulatoru ATPasy (verapamilu) ve srovnání s buňkami původními (Broxterman *et al.*, 1988). CS při použití verapamilu může být utlumena inhibitory P-gp, což naznačuje, že stimulace ATPasy je nezbytná pro usmrcení buněk. Buňky s MDR vystaveny verapamilu vykazovaly zvýšenou hladinu superoxidu ( $O_2^-$ ) a sníženou hladinu glutathionu. Oba tyto jevy byly následně potlačeny inhibitorem P-gp PSC883 (Kathawala *et al.*, 2003).

Velké množství činidel CS vykazuje účinnost úměrnou množství exprimovaného ABCB1. Buňky s nízkou hladinou exprimovaného P-gp jsou relativně tolerantní vůči činidlům CS, naopak buňky s vysokou hladinou exprimovaného P-gp tolerantní vůči činidlům CS nejsou. Tento fakt naznačuje, že pokud je hladina P-gp nízká, buňka se dokáže vyrovnat s malým zvýšením produkce ROS. Hladina ROS totiž musí překročit určitou prahovou hodnotu, aby indukovala apoptózu (Pluchino *et al.*, 2012).

Podrobné zkoumání změn metabolického stavu buněk po stimulaci P-gp nebylo nikdy provedeno a dosud neexistuje žádný konkrétní důkaz, že činidla CS zvyšují oxidativní fosforylaci. Existují pouze omezené důkazy o tom, že tyto látky významně zvyšují tvorbu ROS. Navíc se předpokládá, že nádorové buňky jsou z hlediska energie závislé především na glykolýze a mají sníženou míru oxidativní fosforylace (Cairns *et al.*, 2011; Koppenol *et al.*, 2011). Vliv zvýšené oxidativní fosforylace na indukci ROS, tak zůstává nejasný.

Další skupina činidel indukujících CS způsobuje alternativní mechanismus tvorby ROS, který není spojen s interakcí s P-gp. Do této skupiny patří chelátory (NSC73306 a Dp44mt), které tvoří komplexy s intracelulárními kovy, které mohou cyklovat mezi dvěma redoxními stavy (železo, měď), což vede k tvorbě ROS (Obr. 7) (Kappus *et al.*, 1981). Screening 42 000 sloučenin odhalil další činidla CS, která jsou schopna chelatovat kovy, což naznačuje, že redoxní děje v buňce jsou schopny zvýšit hladinu ROS, a tak buněčnou smrt (Türk *et al.*, 2009).

Zatímco hypotéza o tvorbě ROS navrhuje, že CS je zprostředkována nepřímo, celkovou výší hladiny oxidativního stresu v důsledku cyklování P-gp, bylo identifikováno několik sloučenin jako MDR-selektivních. Tyto sloučeniny neinteragují s P-gp, ale spíše interferují s buněčnými metabolickými cestami. Toto zjištění vedlo k obecnější hypotéze, že buňky exprimující P-gp jsou citlivější na změny ve využití energie. Činidla CS, která naruší metabolické dráhy jako glykolýzu nebo oxidativní fosforylaci, mohou přednostně usmrcovat buňky s MDR. Antimetabolit glykolýzy, 2-deoxy-D-glukosa, a inhibitory elektronového transportního řetězce, rotenon a antimycin A, přednostně usmrcují buňky exprimující P-gp (Pluchino *et al.*, 2012). Nicméně, schopnost takovýchto sloučenin je potřeba podrobit dalšímu zkoumání.



Obr. 7 Schéma ukazující, jak mohou substráty (vlevo), které stimulují aktivitu P-gp a chelatační činidla (vpravo), přispět k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách. Přidání netoxického substrátu a následné bezvýsledné cyklování transportéru spotřebovává ATP a dochází k tvorbě ROS. Mateřské linie, které neobsahují P-gp nejsou vystaveny ROS. Vznik ROS vede k preferenčnímu usmrcování buněk s MDR. Je známo, že malé molekuly chelátorů, které tvoří komplexy s endogenním železem nebo mědí, se účastní redoxních dějů za vzniku ROS. ROS jsou důsledkem převodu redukované formy glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu (GSSG). Zvýšená hladina GSSG je považována za indikátor buněčného stresu (upraveno dle Pluchino *et al.*, 2012).

P-gp je považován za transportér exogenních xenobiotik, důležité je ale i zvážit, schopnost P-gp transportovat endogenní substráty. Jedna z hypotéz tvrdí, že činidla CS nepřispívají přímo k cytotoxicitě, ale spíše nepřímou stimulují nebo usnadňují eflux endogenní esenciální molekuly. U buněk exprimujících P-gp nebyl zatím tento jev objeven (Cole *et al.*, 2006).

Řada činidel CS jako je detergent Triton-X, nemá žádnou přímou interakci s P-gp, ale spíše mění biofyzikální vlastnosti membrány (Bech-Hansen *et al.*, 1976). Ve studiích bylo dokázáno, že některá činidla CS indikují perturbaci membrány ve větším rozsahu u buněk exprimujících P-gp, což vede k hypotéze, že změny ve struktuře a tekutosti membrány přispívají ke CS (Callaghan *et al.*, 1995). Bylo prokázáno, že verapamil a pentazocin významně snižují fluiditu membrány. Pentazocil, verpamil,

petidin a nalaxon byly schopny indukovat únik polárního fluorescenčního barviva 6-CF přes buněčnou membránu. Tento jev mohl být způsoben v důsledku hydrofobní povahy sloučenin a jejich schopnosti interkalovat se do lipidové dvouvrstvy (Aleman *et al.*, 2003; Callaghan *et al.*, 1995). P-gp sám o sobě nemusí být zodpovědný za změnu fluidity membrány, ačkoli může nějakým způsobem učinit buňky citlivější ke změnám tekutosti membrány po poruše membrány činidly CS.

Pro mnoho činidel CS jako je tiopronin a austocystin D, které usmrccují buňky P-gp, není P-gp dostačující pro usmrcení buněk, což naznačuje existenci všeobecnějších mechanismů CS (Goldsborough *et al.*, 2011; Marks *et al.*, 2011).

Výše uvedené studie byly prováděny v buňkách vaječníků křečka čínského. CS verapamilu vůči lidským nádorovým buňkám exprimujícím P-gp nebyla zkoumána. Dalším problémem je použití verapamilu v klinické praxi, protože je již nyní používán jako blokátor vápenatých kanálů. Koncentrace verapamilu nezbytné k indukci CS by mohly indukovat vedlejší účinky jako hypotenzi a srdeční aritmii. Přecitlivělost buněk exprimujících P-gp na verapamil však ukazuje využitelnost slabosti buněk vůči tomuto typu činidla CS a zahájila tak širší studium CS (Pluchino *et al.*, 2012).

## 2.4.2 ABCC1 a kolaterální senzitivita

Jedna z hypotéz CS tvrdí, že činidla CS nepříspěvají přímo k cytotoxicitě, ale spíše nepřímo stimulují nebo usnadňují eflux endogenní esenciální molekuly. Tento fenomén by mohl být uplatněn v případě CS u MRP1 (Cole *et al.*, 2006).

MRP1 se podílí na metabolismu xenobiotik. Transportuje glutathion a jeho konjugáty, což je proces nezbytný pro detoxikaci škodlivých sloučenin (Cole *et al.*, 2006). Jak již bylo popsáno, činidla CS jako je verapamil, indukují apoptózu prostřednictvím stimulace efluxu glutathionu pomocí MRP1.

MRP1 hraje důležitou roli při metabolismu xenobiotik aktivním vylučováním organických aniontů konjugátů glutathionu (Cole *et al.*, 2006). Studie s buňkami BHK-21, které byly transfekovány lidským MRP1, vykazují selektivní apoptózu buněk exprimujících MRP1 v důsledku aktivního efluxu GSH v přítomnosti verapamilu. Bylo prokázáno, že verapamil a jodovaný analog verapamilu zvyšují buněčný eflux GSH trojnásobně až devítinásobně (Trompier *et al.*, 2004). Proto je eflux GSH indukován verapamilem. Samotný verapamil může indukovat apoptózu zprostředkovanou GSH. Tato studie je podporována hypotézou efluxu endogenního substrátu, GSH v tomto

případě může způsobit CS. Otázkou však zůstává přesná role efluxu GSH a její působení na apoptózu (He *et al.*, 2003).

Ve zmíněných studiích byly prováděny experimenty s racemickou směsí verapamilu, jak je používána v klinické praxi. Další výzkum odhalil diferenciální aktivitu (S) a (R) enantiomerů verapamilu, proti buňkám exprimujícím MRP1 (Perrotton *et al.*, 2007). Zajímavostí je, že S-izomer inicioval CS proti buňkám transfekovaným MRP1 a vykazoval zvýšený eflux GSH a následnou apoptózu. Naproti tomu R-isomer verapamilu neinicioval eflux GSH ani buněčnou smrt, ale spíše stimuloval MRP1. Dále bylo prokázáno, že (R) a (S) verapamil se s vysokou afinitou váže na MRP1, přičemž každý isomer indukuje odlišnou konformační změnu MRP1. Toto zjištění naznačuje, že jde o konformační změnu vzniklou v důsledku vazby verapamilu na MRP1, která ovlivňuje diferenciální aktivitu obou enantiomerů (Perrotton *et al.*, 2007). V důsledku kardiovaskulárních vedlejších účinků B fenylového kruhu verapamilu a potřeby vysokých koncentrací verapamilu nutných k indukci CS MRP1, byl syntetizován jodovaný analog verapamilu. Tento analog vykazuje sníženou kardiotoxicitu a cca desetkrát zvýšenou účinnost (Barattin *et al.*, 2010).

Při snaze o nalezení činidla CS selektivního k MRP1, které by nemělo nežádoucí kardiotoxické účinky jako má verapamil, bylo zjištěno, že xantony mají podobnou účinnost jako verapamil (Genoux-Bestide *et al.*, 2011). Výsledkem screeningu 23 xantonů bylo objevení 5 xantonů, které vykazovaly větší než 50% eflux glutathionu. Pro srovnání, u racemické směsi verapamilu docházelo k 75 % efluxu glutathionu (Pluchino *et al.*, 2012).

MRP1 je zapojen do MDR nádorových buněk a zprostředkovává eflux léčiva z buněk. Eflux GSH z buněk může být stimulován verapamilem. V buňkách nadměrně exprimujících MRP1 bylo již dříve prokázáno, že verapamil indukuje obrovský intracelulární eflux GSH, který vyvolá buněčnou smrt. Momentálně jsou hledány alternativní sloučeniny k verapamilu. Byla prozkoumána knihovna přírodních flavonoidů a jejich syntetických derivátů. Velké množství těchto sloučenin stimulovalo eflux GSH u buněk exprimujících MRP1. Zajímavým faktem je, že některé tyto sloučeniny jsou vysoce selektivně cytotoxické pro buňky exprimující MRP1, což vede k jejich buněčné smrti. Některé další však nevykazují žádnou cytotoxicitu, ale přesto podporují silný eflux GSH. Vztahy mezi strukturou a účinností flavonoidu naznačují, že nepřítomnost hydroxylové skupiny v poloze třetího uhlíku flavonoidového kruhu je

absolutním požadavkem pro indukci buněčné smrti buněk exprimujících MRP1. Chrysin a jeho deriváty vykazují vysokou selektivitu vůči buňkám exprimujícím MRP1 (Lorendeau *et al.*, 2012).

Hlavní známou nevýhodou verapamilu je jeho kardiotoxicita. Abychom našli nová činidla CS, méně toxická a více účinná, než je verapamil, byly zkoumány analogy flavonoidů, u kterých bylo prokázáno, že se váží na ABC transportéry. Byla hodnocena stimulace efluxu GSH a apoptóza.

Flavonoidy jsou přírodní sloučeniny, které jsou rozsáhle studovány z hlediska jejich antioxidačních a prooxidačních vlastností. Mají širokou škálu biologicky aktivních interakcí s různými proteiny a jejich použití při prevenci proti rakovině i chemoterapii může hrát velmi významnou roli. Bylo prokázáno, že flavonoidy a jejich deriváty inhibují transport léčiva zprostředkovaný P-gp, MRP1 a BCRP. Nový typ aktivity byl pozorován u některých flavonoidů, které jsou účinné při snižování obsahu GSH v nádorových buňkách exprimujících MRP1 (Brechbuhl *et al.*, 2012).

Při studiích bylo zjištěno, že flavonoid chrysin, 3-methoxychrysin a 5,7-dihydroxy-4'-fluoroflavon jsou účinnější, než verapamil a vykazují přibližně třikrát nižší IC50 ve srovnání s verapamilem. Chrysin a 5,7-dihydroxy-4'-fluoroflavon spouštějí apoptózu v buňkách exprimující MRP1 (Grott *et al.*, 2007). Očekává se, že tyto sloučeniny jsou méně toxické než verapamil, protože polyfenolické sloučeniny se nachází běžně v potravě. Bylo zjištěno, že tyto sloučeniny mají řadu příznivých účinků. Působí jako prevence proti nádorovým onemocněním, kardiovaskulárním onemocněním a diabetu (Lorendeau *et al.*, 2012).

### **2.4.3 ABCG2 a kolaterální senzitivita**

Studie dokazují sníženou hladinu GSH v buňkách exprimujících ABCG2. Snížená hladina GSH v buňkách s nadměrnou expresí ABCG2 by měla být připsána dlouhodobé modulaci hladiny buněčného GSH. Je známo, že ABCG2 je regulováno různými signálními drahami včetně NRF2, což je transkripční faktor regulující detoxikační enzymy, transportéry a nepřímo reguluje také obsah glutathionu v reakci na oxidační stres. Tento fakt může ukázat vzájemné souvislosti mezi expresí ABCG2 a homeostázou GSH (Gauthier *et al.*, 2013).

Dále byly zkoumány interakce mezi NSC73306 a ABCG2 a bylo zjištěno, že tato látka nevyvolává CS u ABCG2. NSC73306 je pravděpodobně substrátem schopným

zvrátit rezistenci vůči cytotoxickým substrátům, mitoxantronu a topotekanu prostřednictvím kompetitivní inhibice (Pluchino *et al.*, 2012).

I když bylo provedeno mnoho studií. Dosud nebyly objeveny činidla CS pro ABCG2 a prokázány žádné přímé mechanismy působení látek na tento transportér.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a přístroje

#### 3.1.1 Biologický materiál

Buněčná linie K562 (byla získána z NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen, Velká Británie).

Buňky K562 byly první buněčnou linií z humorální imortalizované myelogenní leukémie. Jsou charakteristické výskytem tzv. Filadelfského chromosomu, který je příčinou vzniku chronické myeloidní leukémie (CML). Studie identifikovaly Filadelfský chromosom jako konečnou delecii dlouhého ramena chromosomu 22 (Lozzio C. B. *et al.*, 1975).

Buněčná linie A549 (byla získána z NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen, Velká Británie).

Buněčná linie A549 obsahuje adenokarcinomické lidské alveolární bazální epiteliální buňky. A549 jsou adherentní buňky, původně se nacházející v plicní tkáni, odpovědné za difúzi některých látek jako jsou voda a elektrolyty, přes aveoly. Buňky jsou schopny syntetizovat lecitin a obsahují vysoké množství nenasycených mastných kyselin, které jsou důležité pro udržení membránových fosfolipidů. Buněčná linie je hypotriploidní s modálním chromosomem 66, který se vyskytuje ve 24 % buněk. (Balis *et al.*, 1984; Giard *et al.*, 1973; Yuanguang *et al.*, 1998).

Uvedené buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Manipulace s buňkami byla prováděna za sterilních podmínek. Ke kultivaci buněčných linií bylo použito standardní růstové médium RPMI-1640, obohaceno antibiotiky (penicilinem, streptomycinem) a 10% fetálním bovinním sérem (FBS).

#### 3.1.2 Chemikálie

Akrylamid (Biomedicals, USA),

Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Německo),

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Německo),

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyl tetrazolium bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, Německo),  
Dodecylsírán sodný (SDS) (Fluka, Švýcarsko),  
Dithiotreitol (Bio-Rad, USA)  
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Duchefa, Nizozemsko),  
DL-buthionin-(S,R)-sulfoximin (Sigma-Aldrich, Německo)  
ECL kit (GE HealthCare, Velká Británie),  
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma-Aldrich, Německo),  
Ethanol 96% (Duchefa, Nizozemsko),  
Fetální hovězí sérum (Sigma-Aldrich, Německo),  
Chrysin (Sigma-Aldrich, Německo),  
Inhibitory fosfatas (Roche, Německo),  
Isopropanol (Duchefa, Nizozemsko),  
N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED) (Fluka, Švýcarsko),  
Penicilin (Sigma-Aldrich, USA),  
Proteinasa K (Roche, Německo),  
Peroxodisírán amonný (APS) (Fluka, Švýcarsko),  
Propidium jodid (PI) (Fluka, Švýcarsko),  
RNasa A (Roche, Německo),  
RPMI 1640 médium (Sigma-Aldrich, Německo),  
Silikonový olej AP100 (Sigma-Aldrich, Německo),  
Silikonový olej AR20 (Sigma-Aldrich, Německo),  
Standard molekulových hmotností Spectra Multicolor (Thermo Scientific),  
Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA),  
Tetramethylrhodamin ethyl ester (TMRE) (Sigma-Aldrich, USA)  
Tris (hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Duchefa, Nizozemsko),  
Triton-X (Serva, Německo),  
Trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA),  
Trypsin (Sigma-Aldrich, USA),  
Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA),  
Ustalovač G150 (AGFA)  
Verapamil-hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA),  
Vývojka G354 (AGFA)

### 3.1.3 Použité roztoky

5% blokovací mléko (100 ml): 5 g sušeného mléka (bez tuku); 100 ml 1x PBS + 0,1% TWEEN20

Bradfordovo činidlo: 50 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml methanolu; 100 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 850 ml deionizované vody

Elektrodový pufr (1 l): 100 ml Running pufr 10x; 100 ml 10% SDS; 900 ml dH<sub>2</sub>O

Extrakční roztok pro stanovení intracelulární koncentrace: 5% roztok kyseliny mravenčí (w/v)

Laemmliho pufr (6x): 12% SDS; 0,3M TRIS (pH 8,9); 0,3% bromfenolová modř; 60% glycerol; 0,75M dithiotreitol (DTT)

Lyzační roztok pro izolaci DNA: 400 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 40 µg/ml RNasa A, 500 µg/ml Proteinasa K

MTT roztok: 5 mg/ml 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid 96% (v/v), 96% etanol s 0,04M HCl

1x fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS): 130 mmol/l NaCl; 10 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 mmol/l KCl; 1,8 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

10x Running pufr (1 l): 30 g TRIS; 145 g glycinu; 1 l dH<sub>2</sub>O

RIPA pufr: 150 mM NaCl; 1% NP-40 pufr; 50mM TRIS; 50mM NaF; 5mM EDTA; 5mM dekahydrátpyrofosfátu sodného (NAPP); dH<sub>2</sub>O + inhibitory fosfatas ; pH 8

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

### 3.1.4 Přístroje

Analytické váhy ABS-2204N (KERN, Velká Británie),

Analyzátor počtu buněk a buněčné viability Vi-CELL TMXR (Beckman Coulter, USA),

Aparatura pro western blotting TransBlot SD (BioRad, USA),

Centrifuga BOEco M-240 (BioTech, Německo),

Centrifuga HERMLE Z 326 K (LaborTechnik, Německo),

Elektroforetický systém MiniProtean-3 cell (BioRad, USA),

Fluorescenční mikroskop s kamerou XDS-3FL (OPTIKA, USA),

Hmotnostní detektor s trojitým kvadrupólem API 3200 (MDS SCIEX, Kanada),

Inkubátor CelCulture (ESCO, USA),

Kapalinový chromatograf U3000 DGP (Exa, Francie)  
Laminární box MSC-Advantage (ThermoScientific, USA),  
Průtokový cytometr Cytomics fc 500 (Beckman Coulter, USA),  
Spektrofotometr GENios Plus (Tecan, Rakousko),  
Termoblok Bio-TDB 100 (BioSan, Lotyšsko),  
Třepačka OS-10 (BioSan, Lotyšsko),  
Vortex BioVortex V1 (BioSan, Lotyšsko),  
Zdroj elektrické napětí PowerPac HC (BioRad, USA),

## **3.2 Použité metody**

### **3.2.1 Buněčná lýze a izolace celkových proteinů**

Pro následný western blott byla provedena izolaci celkových proteinů z buněk A549 a K562. Při laboratorní teplotě bylo centrifugováno  $5 \times 10^6$  buněk (5 min, 1500 rpm). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k buňkám bylo přidáno 5 ml chlazeného 1x PBS. Buňky byly rozsuspendovány a centrifugovány při teplotě 4 °C (5 min, 1500 rpm). K promytým buňkám bylo přidáno 180  $\mu$ l lyzačního RIPA pufru s inhibitory fosfatas, buňky byly rozsuspendovány a inkubovány na ledu po dobu 30 min za občasného promíchání. Buněčný lyzát byl přečištěn centrifugací při 4 °C (10 min, 15000 rpm). V buněčném extraktu bylo následně stanoveno celkové množství proteinů Bradfordovou metodou.

### **3.2.2 Stanovení celkové koncentrace proteinů Bradfordovou metodou**

Bradfordova metoda je založena na interakci proteinů s barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) v kyselém prostředí. Při navázání CBB na protein dochází ke změně zbarvení roztoku z červenohnědé na modrou. Modré zbarvení tedy odpovídá množství proteinů ve vzorku. Detekce se provádí spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm.

K 1 ml Bradfordova činidla byl přidán 1  $\mu$ l buněčného extraktu a směs byla promíchána. Následně byla směs inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Na mikrotitrační destičku bylo nanášeno 200  $\mu$ l vzorku i blanku. Jako blank bylo použito Bradfordovo činidlo. Celková koncentrace proteinů ve vzorku byla vyhodnocena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm.

### **3.2.3 Separace proteinů pomocí gelové elektroforézy**

Před separací proteinů gelovou elektroforézou SDS-PAGE byly vzorky naředěny pro výslednou koncentraci 7  $\mu$ g/ $\mu$ l a v přítomnosti Laemmliho pufru byly denaturovány při 95 °C po dobu 5 min.

Separace proteinů byla provedena pomocí dělicího gelu s 7,5% obsahem akrylamidu a zaostřovacího gelu s 3,5% obsahem akrylamidu o tloušťce 0,75 mm. V případě vzorků bylo dávkováno 7  $\mu$ l na jamku, v případě markeru 2,5  $\mu$ l na jamku. Separace probíhala nejprve 30 min při napětí 80 V a následně 60 min při napětí 120 V.

### 3.2.4 Western blotting

Po separaci proteinů pomocí SDS-PAGE se oddělené proteiny přenášely z gelu na polyvinyliden fluoridovou (PVDF) membránu pomocí metody western blotting. V našem případě byla použita metoda wet blotting, která se používá pro proteiny s molekulovou hmotností vyšší než 100 kDa. Přenos proteinů pomocí wet blottingu probíhal po dobu 30 min, při proudu 0,15 A. Po ukončení byla PVDF membrána promývána v 5% blokovacím mléce za mírného třepání. Následně byla nanесena primární protilátka, které byla naředěna v mléce v poměru 1:1000, inkubovalo se přes noc při 4°C. Následující den byla membrána za stálého třepání promyta 3x 10 min v roztoku obsahujícím 1x PBS a 0,1% TWEEN20. Poté byla nanесena sekundární protilátka, které byla naředěna stejně jako protilátka primární, sekundární protilátka byla inkubována na membráně 60 min při laboratorní teplotě. Opět byla membrána promyta 3x 10 min v roztoku 1x PBS a 0,1% TWEEN20.

Při vyvolávání se k promyté membráně přidal ECL kit obsahující substrát pro enzym, který je navázaný na sekundární protilátce. Vyvolávání probíhalo 3 min. Poté byl film promyt ve vývojce a ustalovači. V důsledku vzniku chemiluminiscence byly na fotografickém filmu pozorovány černě zbarvené pásy, které odpovídají danému proteinu. Následně se film naskenoval a intenzita jednotlivých pásů se vyhodnotila programem Image J.

### 3.2.5 Izolace DNA

Z důvodu sekvenace genu *ABCC1* transportéru, která byla provedena na Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, byla izolována DNA u buněčných linií K562 a A549.

K 11 ml buněčné suspenze byly přidány 2 ml lyzačního roztoku (400 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 40 µg/ml RNasa A, 500 µg/ml Proteinasa K) a směs byla inkubována přes noc v inkubátoru při 37 °C. Následující den byly přidány 2 ml isopropanolu (celkový poměr isopropanolu a lyzačního roztoku musí být 1:1), výsledná směs byla opatrně promíchána a 5 min probíhalo srážení na ledu. Poté byla provedena centrifugace při 4 °C (5 min, 2500 rpm), supernatant byl odstraněn a k peletu byly přidány 2 ml 70% ethanolu. Směs byla opatrně promíchána a inkubována při 4 °C přes noc. Následující den byl odstraněn 1 ml ethanolu a směs byla centrifugována při

4 °C (10 min, 3000 rpm). Supernatant byl odstraněn. Pro odpaření zbytku ethanolu, byla mikrozkuhavka se vzorkem přikryta perforovaným parafilmem a vložena na termoblok (1 hod, 55 °C). Po odpaření ethanolu byla vysrážená DNA rozpuštěna v 800 µl 1x TE pufru na termobloku při 50 °C přes noc (Wu *et al.*, 1995).

Následně byla hodnocena čistota získané DNA, spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm a 280 nm byla měřena absorbance. Z naměřených hodnot absorbancí byl stanoven poměr ( $A_{260}/A_{280}$ ), který značí čistotu DNA. Absorbance při vlnové délce 260 nm odráží koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při vlnové délce 280 nm odráží míru přítomnosti proteinů. Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu poměru kolem 1,8.

### **3.2.6 Určení počtu živých a mrtvých buněk**

K určení počtu živých a mrtvých buněk byl použit přístroj Vi-CELL™XR. Tento přístroj využívá ke stanovení trypanovou modř. Trypanová modř (Obr. 8) proniká do mrtvých buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou. Do živých buněk přes cytoplazmatickou membránu neprochází. Je možné určit nejen životaschopnost buněk, ale také počet, velikosti a koncentraci buněk. Analyzátor lze nastavit na různé typy buněk a bere v úvahu parametry jako průměr buněk, shlukování nebo cirkulaci buněk a jas. Ke stanovení bylo vždy použito 600 µl buněčné suspenze, přístroj je schopen určit počet buněk v 1 ml média a viabilitu vyhodnotí v procentech.

### **3.2.7 Stanovení extracelulární a intracelulární hladiny redukovaného glutathionu**

Glutathion se v buňkách může vyskytovat jako volný nebo vázaný, nejčastěji na proteiny. Volný glutathion se pak vyskytuje v redukované a oxidované formě. Za fyziologických podmínek převládá redukovaná forma (GSH). Během oxidačního stresu se hodnota GSH snižuje v důsledku přeměny na oxidovaný glutathion (GSSG). Pokles GSH je známkou působení volných radikálů. Glutathion, který je přítomen prakticky ve všech savčích tkáních, hraje důležitou roli při detoxikaci peroxidu vodíků, jiných peroxidů i volných radikálů. Tato látka má velký význam jako intracelulární antioxidant (Sies *et al.*, 1999).

Buněčná suspenze byla 3, 6, 24 hod inkubována s verapamilem, nebo chrysinem (o koncentracích 1, 3, 10, 30  $\mu\text{M}$ ). Následně byla nanesena na vrstvu silikonového oleje a centrifugována při laboratorní teplotě (15 min, 5000 rpm). Při centrifugaci došlo k oddělení buněk od růstového média. Pro stanovení extracelulární koncentrace GSH bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  média a přidáno ke 450  $\mu\text{l}$  extrakčního činidla (5% kyseliny mravenčí). Následně bylo odstraněno z původní zkumavky zbylé médium i olej a bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  extrakčního činidla a inkubováno 10 min na ledu. Poté byly vzorky centrifugovány při 4  $^{\circ}\text{C}$  (10 min, 15000 rpm). Byl odebrán čistý buněčný extrakt obsahující studovanou látku a následně měřen na LC MS/MS.

### **3.2.8 Stanovení buněčné proliferace a viability**

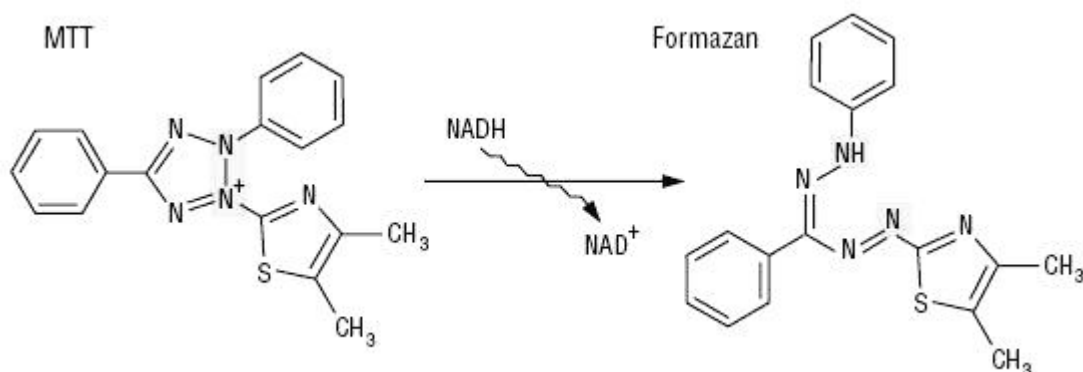
Ke stanovení buněčné proliferace a viability byl použit MTT test (Obr. 8). Tento test využívá redukce rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenylformazan (formazán) (Obr. 10). Formazán se z buněk extrahuje okyseleným etanolem. Množství vzniklého formazánu odpovídá počtu živých buněk. Vyhodnocení se provádí spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm (Mosmann, 1983).

Ke 2 ml buněčné suspenze bylo přidáno 180  $\mu\text{l}$  MTT a inkubováno 45 min při 37  $^{\circ}\text{C}$  a 5% obsahu  $\text{CO}_2$ . V případě suspenzní buněčné linie K562 byly buňky centrifugovány 5 min, 3000 rpm, laboratorní teplota. Supernatant byl odstraněn a vzniklý formazán extrahován 1 ml extrakčního činidla (96% etanol okyselený HCl). Směs byla centrifugována po dobu 5 min při 14 000 rpm a laboratorní teplotě. Do připravené mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  supernatantu. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm.

V případě adherentní buněčné linie A549 bylo po inkubaci s MTT odstraněno růstové médium a centrifugováno 5 min, 3000 rpm, laboratorní teplota. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, pelet byl ponechán. Vzniklý formazán byl extrahován z kultivační nádoby 1 ml extrakčního činidla (96% etanol okyselený HCl). K peletu byl přidán extrahovaný formazán. Směs byla centrifugována po dobu 5 min při 14 000 rpm a laboratorní teplotě. Do připravené mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  supernatantu a stejné množství blanku. Jako blank bylo použito extrakční činidlo.



Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm stejně jako u buněčné linie K562.



Obr 8 Schéma principu MTT testu. MTT test je založen na oxidačně-redukčním procesu. Redukce MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- difenyl tetrazolium bromidu) na nerozpustný 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenylformazan (formazán) , oxidace NADH na NAD<sup>+</sup> (převzato z <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/ucinek-reovirusu-na-nadorove-bunky/> 1. 3. 2019).

### 3.2.9 Stanovení životnosti buněk

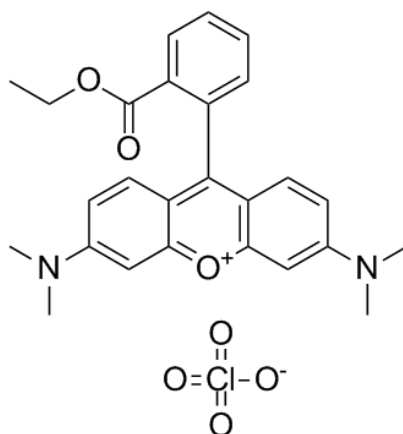
V buňkách, které podstupují apoptózu, oxidační stres, nekrózu a jiné buněčné procesy, může docházet k depolarizaci membránového potenciálu. V buňkách vstupujících do apoptózy dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu *c* a následné aktivaci apoptotické kaskády. Permeabilizace vnější mitochondriální membrány často koreluje se ztrátou mitochondriálního membránového potenciálu, který lze detekovat pomocí barviv citlivých na tento potenciál (Loew *et al.*, 1993; O'Reilly *et al.*, 2004).

Tato fluorescenční kationtová lipofilní barviva se hromadí v mitochondriích zdravých buněk, na rozdíl od buněk, kde došlo ke ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu např. v důsledku indukce apoptózy (Ehrenberg *et al.*, 1988; Loew *et al.*, 1993; O'Reilly *et al.*, 2004).

Tetramethylrhodamin ethylester perchlorate (TMRE, Obr. 9) je fluorescenční barvivo, které slouží k odlišení apoptotických a neapoptotických buněk. Neapoptotické buňky nebo buňky s polarizovanými mitochondriemi fluoreskují červeně, zatímco apoptotické buňky nebo buňky s depolarizovanými mitochondriemi mají sníženou intenzitu červené fluorescence (Ehrenberg *et al.*, 1988; Loew *et al.*, 1993).

K 1 ml buněčné suspenze byl přidán 1  $\mu$ l TMRE a směs byla inkubována po dobu 30 min v inkubátoru při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byl vzorek měřen na průtokovém cytometru. Tento postup byl použit v případě buněčné linie K562.

U buněčné linie A549, která je adherentní, bylo nejprve odstraněno růstové médium. Následně byly buňky promyty 1 ml 1x PBS. Bylo přidáno 400  $\mu$ l trypsinu, se kterým byly buňky inkubovány 3 min v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>, aby došlo k jejich odpoutání od povrchu kultivační nádoby. Poté byly buňky promyty na začátku odstraněným médiem a přidány ke zbylému médiu. Směs byla centrifugována 5 min, při 1600 rpm, 20 °C. Byly ponechány 2 ml supernatantu, ve kterých byl pelet rozsuspendován a 1 ml buněčné suspenze byl použit k měření. K 1 ml buněčné suspenze byl přidán 1  $\mu$ l TMRE a směs byla inkubována po dobu 30 min v inkubátoru při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>, stejně jako v případě suspenzní buněčné linie K562.



Obr 9 Chemická struktura tetramethylrhodamin ethylester perchlorate (TMRE) (převzato z <https://www.medchemexpress.com/TMRE.html>).

### 3.2.10 Analýza buněčného cyklu

Metoda průtokové cytometrie umožňuje rozlišit buněčnou populaci na skupiny podle fáze buněčného cyklu. Tato metoda je založena na kvantifikaci buněčné DNA, jejíž množství se mění během jednotlivých fází buněčného cyklu. Pro analýzu buněčného cyklu se využívají fluorescenční barviva (ethydium bromid, propidium jodid, ...). Před replikací (v G1 fázi) mají buňky diploidní počet chromozomů (2n). Při replikaci (S fáze) dochází ke zdvojení počtu chromosomů. G2 fáze pak obsahuje 4n chromosomů, stejně je tomu i na počátku mitózy (M fáze). Při barvení Vindalovým roztokem dochází k extrakci DNA fragmentů, které vznikly štěpením DNA endonukleasami. Množství DNA v buňkách se snižuje.

Pro analýzu buněčného cyklu byl použit 1 ml buněčné suspenze. Připravená buněčná suspenze byla centrifugována po dobu 5 min při 2500 rpm a laboratorní teplotě. Supernatant byl odebrán. Pro fixaci buněk bylo k peletu přidáno 500  $\mu$ l 96% etanolu. Pelet byl v ethanolu rozsuspendován. Buňky byly fixovány 30 min v mrazáku (-20 °C). Po fixaci byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 2500 rpm, laboratorní teplotě. Poté byl odebrán supernatant. K peletu bylo přidáno 450  $\mu$ l Vindalova roztoku, pelet byl rozsuspendován ve Vindalově roztoku a směs byla inkubována ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 min a následně měřena na průtokovém cytometru.

### **3.2.11 Analýza morfologie buněčných jader**

Pro fixaci buněk pro analýzu morfologie buněčných jader bylo k buněčnému peletu přidáno 500  $\mu$ l 96% etanolu. Pelet byl v ethanolu rozsuspendován. Buňky byly fixovány po dobu 30 min v mrazáku (-20 °C). Po fixaci byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 2500 rpm při laboratorní teplotě. Poté byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 30  $\mu$ l propidium jodidu, se kterým byly buňky inkubovány po dobu 15 min. Následně byly pozorovány morfologické změny jader pod fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 1000x.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Charakteristika použitých buněk

Předmětem našich experimentů byl jev nazvaný CS. Tento jev byl studován pomocí látek, verapamilu a chrysinu. Jmenované látky byly již v literatuře dobře popsány ve vztahu s CS, a to i v souvislosti s buňkami, které mají zvýšenou expresi ABCC1 transportéru (Pluchino *et al.*, 2012; Lorendeau *et al.*, 2012). V našich experimentech byly použity buněčné linie K562 a A549. Buněčná linie A549 má jednu z nejvyšších expresí ABCC1 v rámci panelu buněčných linií (NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen), ze kterého byly buňky použity. Oproti A549 mají buňky K562 nízkou expresi ABCC1.

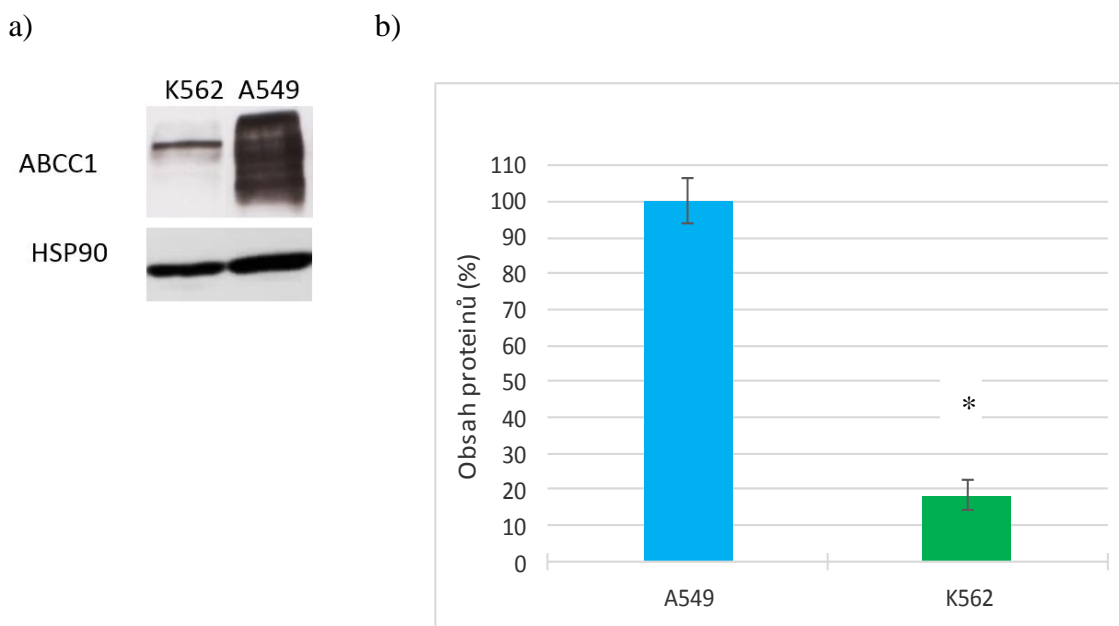
V literatuře je uvedeno, že CS závisí na expresi ABCC1 (Pluchino *et al.*, 2012). ABCC1 je exprimován téměř ve všech tkáních po celém těle, na rozdíl od ABCB1 a ABCG2, které jsou exprimovány v tkáňově krevních bariérách (placenta, hematoencefalická bariéra) a v eliminačních orgánech, kde mají ochranou a vylučovací funkci (Evers *et al.*, 1996; Hodges *et al.*, 2011).

V experimentech uvedených v publikacích byly použity léčivy selektované buňky (Hall *et al.*, 2009). V našich experimentech byly však buněčné linie A549 (vysoká exprese) a K562 (nízká exprese), u kterých byla ověřena exprese ABCC1 transportéru na úrovni proteinů.

Následně byla provedena izolace DNA u obou použitých buněčných linií a sekvenace genu *ABCC1*. Buňky A549 neobsahovaly žádnou mutaci v genu *ABCC1*.

#### 4.1.1 Stanovení exprese ABCC1

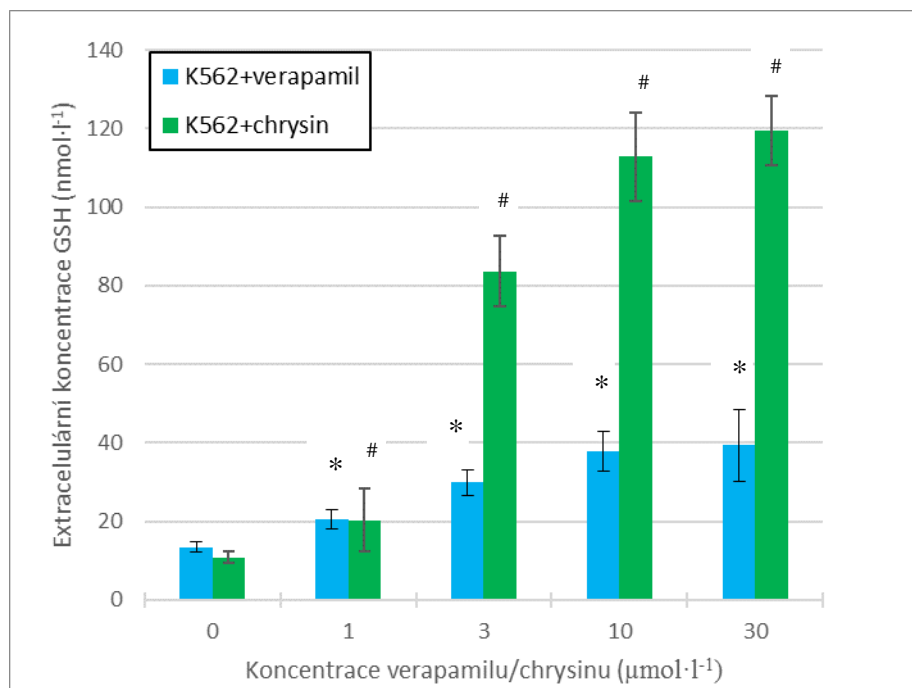
U nádorových buněk se zvýšenou expresí ABCC1 byla již CS popsána (Hall *et al.*, 2009; Lorendeau *et al.*, 2014). Z tohoto důvodu byla zkoumána exprese ABCC1 u buněčných linií K562 a A549, které nemají velmi vysokou expresi ABCC1 jako buňky použité v experimentech uvedených v publikacích. Výsledky z western blottu ukazují, že exprese ABCC1 u buněk A549 je asi pětinašobně vyšší než u buněk K562 (Obr. 10). Vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky pomocí programu ImageJ.



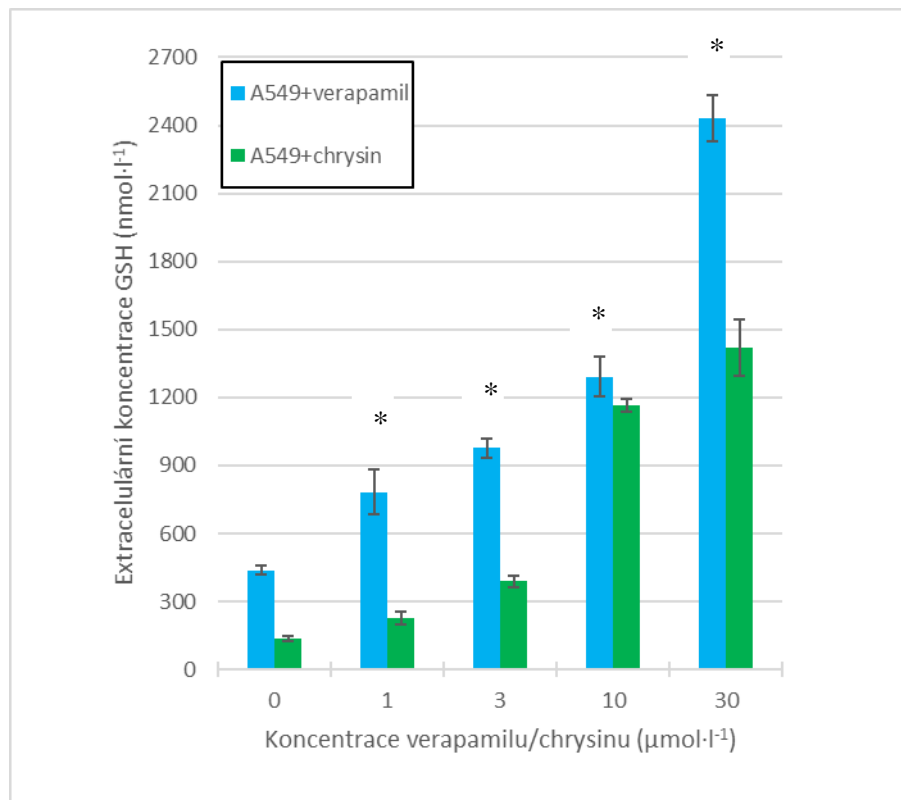
Obr. 10 Porovnání exprese ABCC1 transportního proteinu v buněčných liniích K562 a A549. a) Typické obrázky western blottu: znázorněna exprese ABCC1 o velikosti 190 kDa u buněčných linií K562 a A549. Jako normalizační protein byl použit Heat shot protein (HSP90) o velikosti 90 kDa. b) Kvantitativní denzitometrické hodnocení exprese proteinu ABCC1 provedeno pomocí ImageJ. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. \* je označen statisticky významný rozdíl v expresi ABCC1 u buněčné linie K562 a A549.

## 4.2 Vliv verapamilu a chrysinu na eflux redukováného glutathionu

Ve shodě s literaturou bylo zjištěno, že verapamil i chrysin indukují eflux GSH do růstového média (Obr. 11, 12). U obou buněčných linií v případě použití verapamilu nebo chrysinu docházelo ke zvýšené akumulaci GSH v růstovém médiu. U buněk K562 byla extracelulární hladina GSH více než desetkrát nižší v porovnání s buňkami A549. Buňky K562 ovlivněny chrysinem indukovaly více než dvakrát větší eflux GSH než buňky ovlivněny verapamilem. V případě buněk A549 byl tento efekt opačný než u buněk K562. Buňky, které byly ovlivněny verapamilem po dobu 24 hod, indukovaly eflux GSH v přibližně stejné míře jako buňky ovlivněny chrysinem. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí LC-MS/MS.



Obr. 11 Vliv verapamilu nebo chrysinu na extracelulární koncentraci GSH u buněčné linie K562. Buňky K562 byly inkubovány s verapamilem/chrysinem po dobu 24 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk ovlivněných verapamilem oproti buňkám neovlivněným. # je označen statisticky významný rozdíl u buněk ovlivněných chrysinem oproti buňkám neovlivněným.



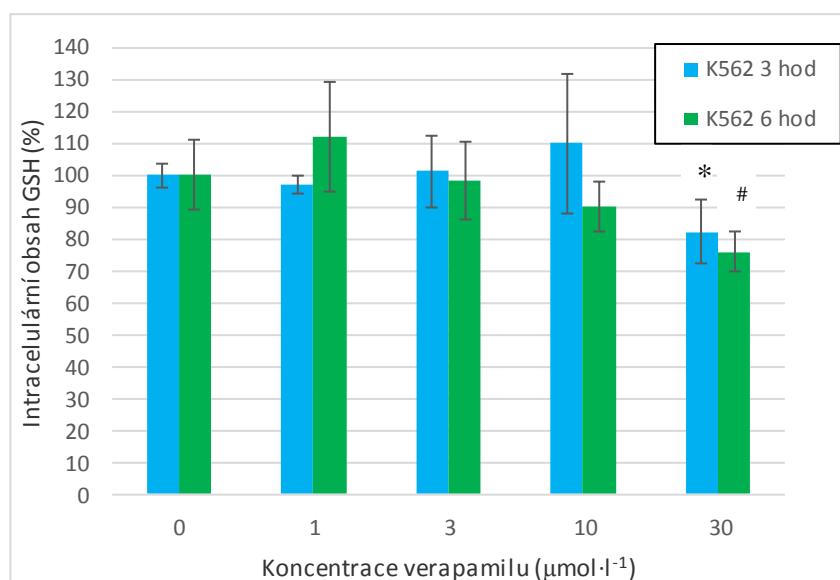
Obr. 12 Vliv verapamilu nebo chrysinu na extracelulární koncentraci GSH u buněčné linie A549. Buňky A549 byly inkubovány s verapamilem/chrysinem po dobu 24 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk ovlivněných verapamilem oproti buňkám neovlivněným (P<0,05). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk ovlivněných chrysinem oproti buňkám neovlivněným (P<0, 05).



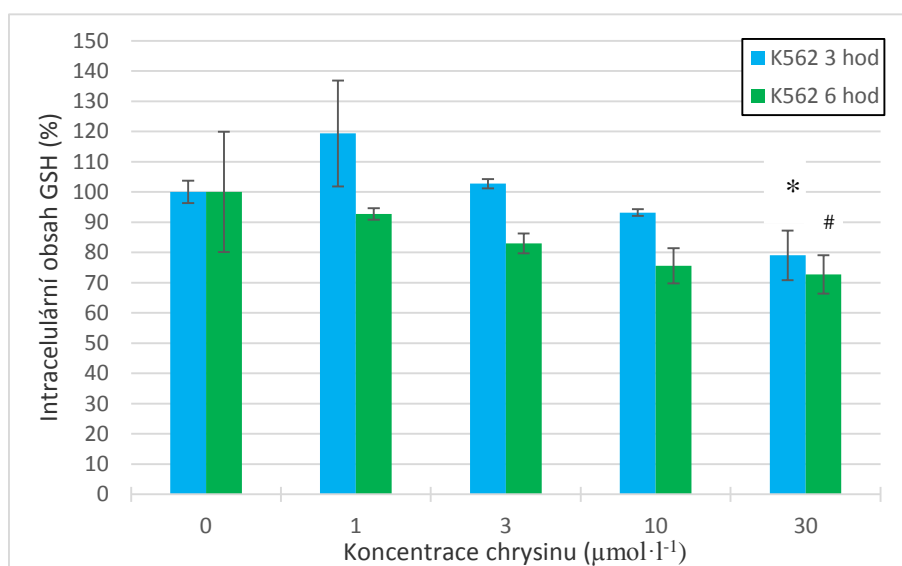
### 4.3 Vliv verapamilu a chrysinu na intracelulární obsah redukovaného glutathionu

Dále jsme ověřovali, jestli eflux GSH ven z buňky vede k intracelulárnímu poklesu GSH. Použité buněčné linie K562 a A549 byly inkubovány po dobu 3 a 6 hod s verapamilem nebo chrysinem. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí LC-MS/MS. Bylo zjištěno, že u buněk K562 dochází po 6 hod inkubace s verapamilem či chrysinem k asi 20% poklesu intracelulární hladiny GSH. U buněk A549 byl pozorován až 50% pokles intracelulární hladiny GSH v případě šestihodinové inkubace s verapamilem nebo chrysinem.

a)

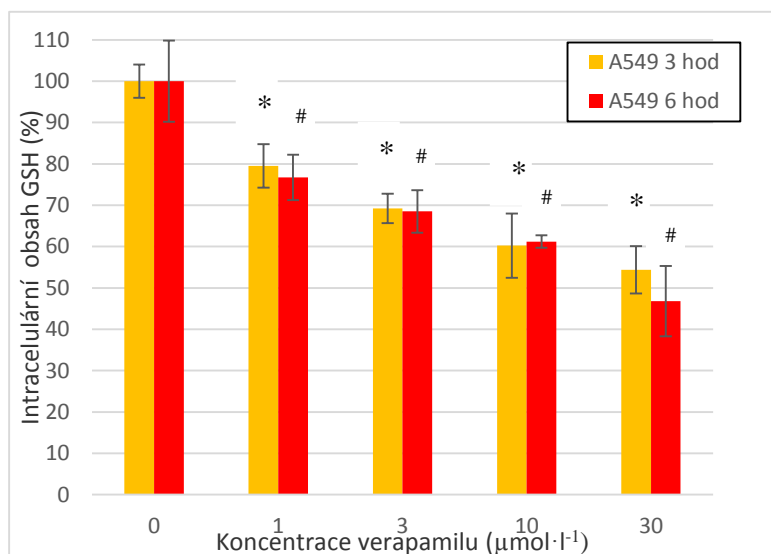


b)

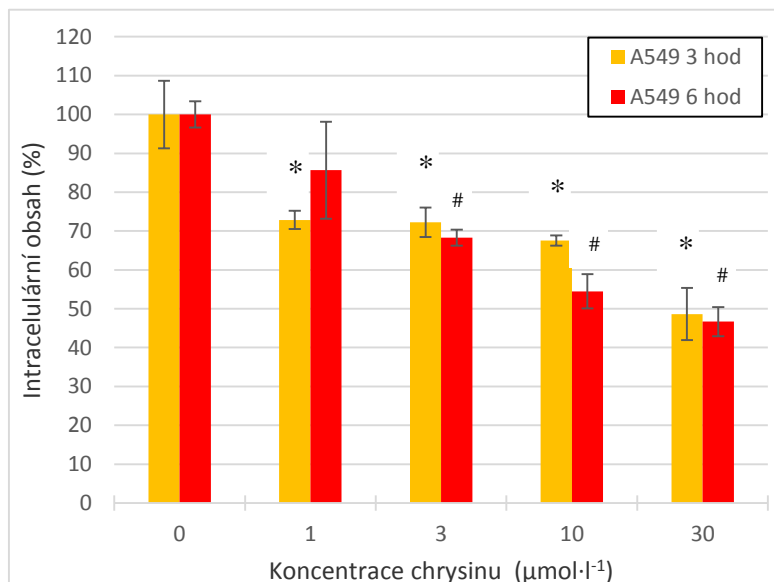


Obr. 13 Vliv verapamilu a chrysinu na intracelulární hladinu GSH u buněčné linie K562. Buňky byly inkubovány s verapamilem nebo chrysinem o daných koncentracích po dobu 3 a 6 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. a) Vliv verapamilu na intracelulární obsah GSH po 3 a 6 hod inkubace u buněk K562. b) Vliv chrysinu na intracelulární obsah GSH po 3 a 6 hod inkubace u buněk K562. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný výsledek ovlivněných buněk K562 oproti neovlivněným buňkám po inkubaci 3 hod ( $P < 0,05$ ). # je označen statisticky významný výsledek ovlivněných buněk K562 oproti neovlivněným buňkám po inkubaci 6 hod ( $P < 0,05$ ).

a)



b)

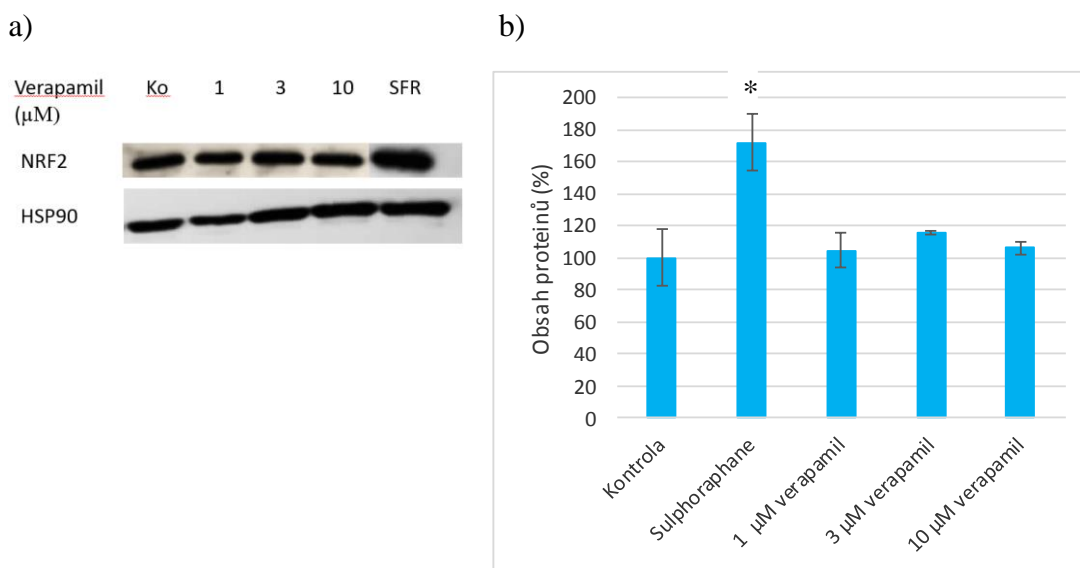


Obr. 14 Vliv verapamilu/chrysinu na intracelulární hladinu GSH u buněčné linie A549. Buňky byly inkubovány s verapamilem/chrysinem o daných koncentracích po dobu 3 a 6 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. a) Vliv verapamilu na intracelulární obsah GSH po 3 a 6 hod inkubace. b) Vliv chrysinu na intracelulární obsah GSH po 3 a 6 hod inkubace. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný výsledek ovlivněných buněk A549 oproti neovlivněným buňkám po inkubaci 3 hod (P<0,05). # je označen statisticky významný výsledek ovlivněných buněk A549 oproti neovlivněným buňkám po inkubaci 6 hod (P<0,05).

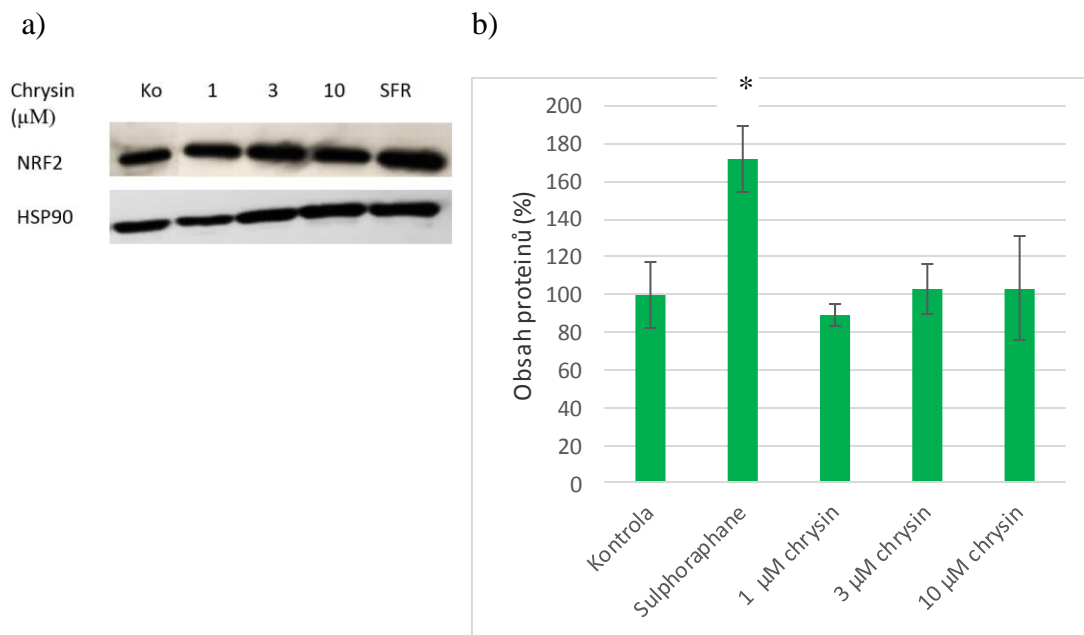
#### 4.4 Vliv verapamilu a chrysinu na oxidativní stres

Jelikož snížení intracelulární hladiny GSH může vést k oxidativnímu stresu byla zkoumána exprese transkripčního faktoru nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2), který je hlavním regulátorem buněčné antioxidační odezvy (Li *et al.*, 2014). NRF2 hraje důležitou roli při adaptaci na oxidační stres způsobený prooxidanty a elektrofilů prostřednictvím detoxikačních enzymů (Li *et al.*, 2014). Mnohé látky mohou inhibovat signalizaci NRF2. Některé látky indukují buněčnou smrt prostřednictvím blokování antioxidační reakce NRF2. Aktivace signalizace NRF2 je spuštěna po chemoterapeutické léčbě, aby se snížila apoptóza nádorových buněk. Genetická nebo farmakologická inhibice NRF2 zvyšuje citlivost nádorových buněk k chemoterapii (Li *et al.*, 2019).

V našich experimentech byly použity buňky K562 a A549, které byly inkubovány s léčivou podobu 6 hod. Z výsledků vyplývá, že ani v jednom případě nedošlo k aktivaci NRF2 (Obr. 15, 16, 17, 18).



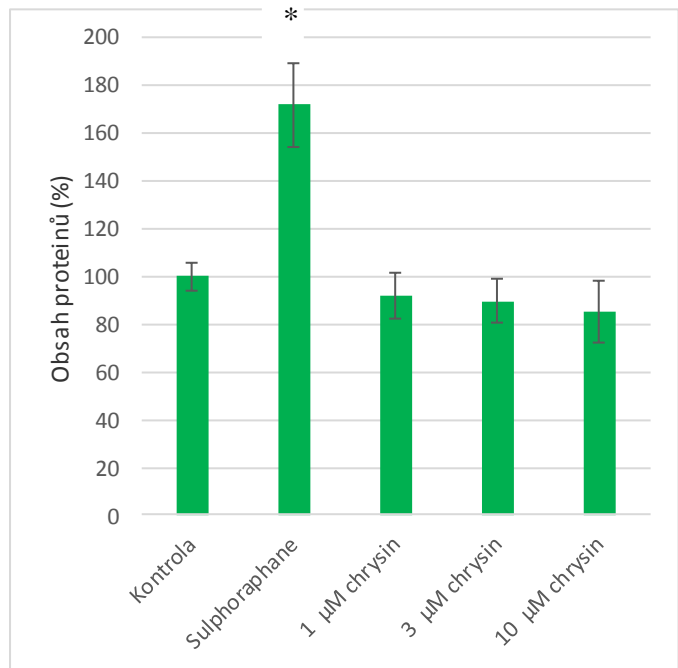
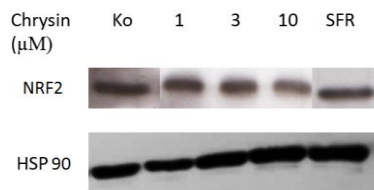
Obr. 15 Vliv verapamilu na expresi NRF2 u buněčné linie K562. a) Typické obrázky western blottu: NRF2-kontrola (Ko), 1  $\mu\text{M}$  verapamil, 3  $\mu\text{M}$  verapamil, 10  $\mu\text{M}$  verapamil; HSP90-kontrola (Ko), 1  $\mu\text{M}$  verapamil, 3  $\mu\text{M}$  verapamil, 10  $\mu\text{M}$  verapamil. Jako pozitivní kontrola byl použit sulphoraphane (SFR). b) Kvantitativní denzitometrické vyhodnocení exprese NRF2. Kontrolní hodnota byla dána 100 %. Jako normalizační protein byl použit Heat shot protein 90 (HSP 90). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Image J. Výsledky jsou průměrnou hodnotou ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl exprese SFR oproti kontrolní hodnotě ( $P < 0,05$ ).



Obr. 16 Vliv chrysinu na expresi NRF2 u buněčné linie K562. a) Typické obrázky western blottu: NRF2-kontrola (Ko), 1 μM chrysin, 3 μM chrysin, 10 μM chrysin; HSP90-kontrola (Ko), 1 μM chrysin, 3 μM chrysin, 10 μM chrysin. Jako pozitivní kontrola byl použit sulphoraphane (SFR). b) Kvantitativní denzitometrické vyhodnocení exprese NRF2. Kontrolní hodnota byla dána 100 %. Jako normalizační protein byl použit Heat shock protein 90 (HSP 90). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Image J. Výsledky jsou průměrnou hodnotou ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl exprese SFR oproti kontrolní hodnotě (P<0,05).



a) b)



Obr. 18 Vliv chrysinu na expresi NRF2 u buněčné linie A549. a) Typické obrázky western blottu: NRF2-kontrola (Ko), 1 µM chrysin, 3 µM chrysin, 10 µM chrysin; HSP90-kontrola (Ko), 1 µM chrysin, 3 µM chrysin, 10 µM chrysin. Jako pozitivní kontrola byl použit sulphoraphane (SFR). b) Kvantitativní denzitometrické vyhodnocení exprese NRF2. Kontrolní hodnota byla dána 100 %. Jako normalizační protein byl použit Heat shock protein 90 (HSP 90). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Image J. Výsledky jsou průměrnou hodnotou ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl exprese SFR oproti kontrolní hodnotě.

#### 4.5 Vliv verapamilu a chrysinu na proliferaci a viabilitu

Dále byl sledován vliv verapamilu a chrysinu na viabilitu a proliferaci. Látky v buňkách s vysokou expresí ABCC1 indukují buněčnou smrt, proto jsme se chtěli přesvědčit, zda v našem případě bude tento fakt platit také. Buňky K562 a A549 byly vystaveny působení verapamilu či chrysinu po dobu 48 hod. Výsledky MTT testu jsou vyjádřeny jako hodnoty IC<sub>50</sub> (Tab 1). MTT test ukázal, že ani v jednom případě u buněk K562 a A549 nebyl pokles životnosti buněk významný. Z výsledků toho testu, ale nejsme schopni říct, zda dochází ke snižování životnosti buněk z důvodu snížené proliferace nebo viability.

Tab 1 Vliv cytotoxických účinků verapamilu a chrysinu na buněčné linie K562 a A549 vyjádřeny jako IC<sub>50</sub>. Vyhodnoceno z MTT testu.

Použitá látka	K562, IC <sub>50</sub> (μmol·l <sup>-1</sup> )	A549, IC <sub>50</sub> (μmol·l <sup>-1</sup> )
Verapamil	>30	>30
Chrysin	>30	>30



#### 4.6 Vliv buthionin sulfoximinu a kombinace verapamilu nebo chrysinu s buthionin sulfoximinem na proliferaci a viabilitu

V literatuře je popisováno, že buňky s vysokou expresí ABCC1 mimo jiné jeví zvýšenou senzitivitu k buthionin sulfoximinu (BSO), což je inhibitor syntézy GSH (Marengo *et al.*, 2008). Jmenovanou látku jsme v experimentech použili samostatně a dále pak kombinace látek verapamilu či chrysinu s BSO. Buňky K562 a A549 byly vystaveny působení BSO a následně kombinaci verapamilu nebo chrysinu s BSO po dobu 48 hod. Výsledky MTT testu ukázaly, že pokud použijeme pouze BSO, nejeví buňky hypersenzitivitu ve zvýšené míře (Tab. 2). Až teprve použití kombinace verapamilu nebo chrysinu s BSO indukovalo významný pokles viabilitu u buněk A549. u K562 byl tento jev nižší (Tab 3).

Tab 2 Vliv cytotoxických účinků buthionin sulfoximinu (BSO) buněčné linie K562 a A549, vyjádřeny jako  $IC_{50}$ . Vyhodnoceno z MTT testu.

Použité látky	K562, $IC_{50}(\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1})$	A549, $IC_{50}(\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1})$
BSO	0,96	0,96

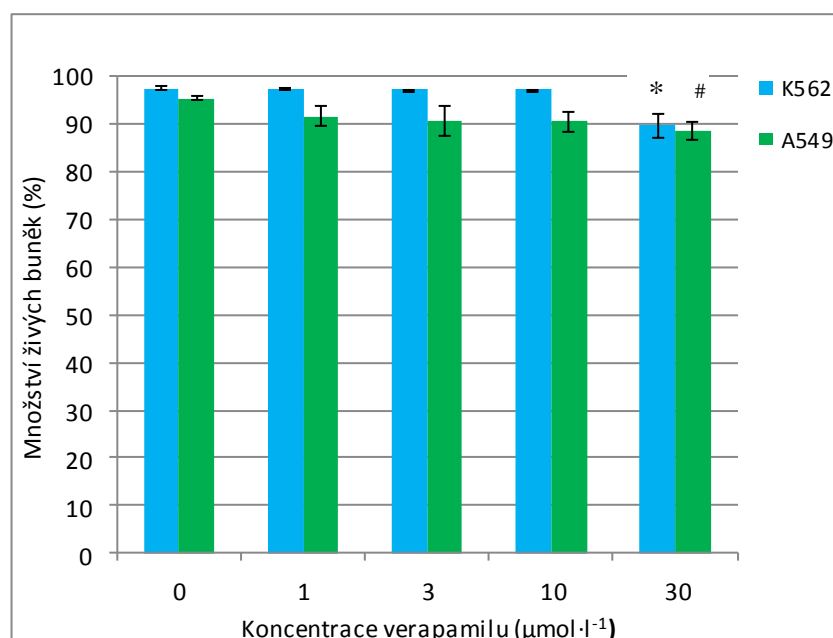
Tab 3 Vliv cytotoxických účinků kombinace verapamilu (V) nebo chrysinu (CH) s buthionin sulfoximínem (BSO) na buněčné linie K562 a A549, vyjádřeny jako  $IC_{50}$ . Vyhodnoceno z MTT testu.

Použité látky	K562, $IC_{50}(\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1})$	A549, $IC_{50}(\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1})$
Verapamil+ $125 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSO	20, 5	2,1
Chrysin+ $125 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BSO	17,7	3,7

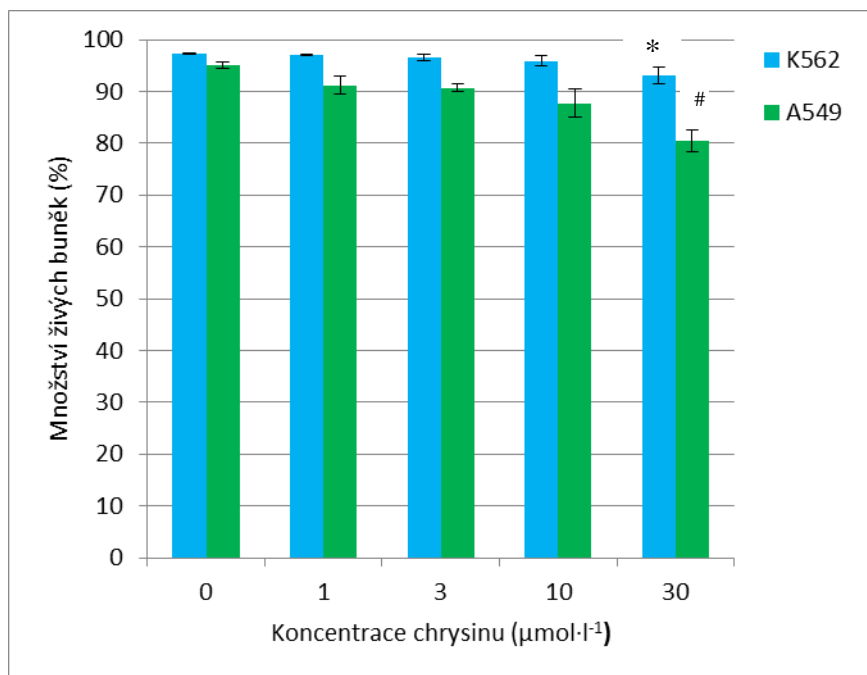
## 4.7 Vliv verapamilu a chrysinu na životnost buněk

Protože MTT test není dostačující proto, abychom zjistili, zda dochází u buněk ke snížení jejich proliferace nebo viability, rozhodli jsme se buňky dále testovat.

Pro odlišení živých a mrtvých buněk v důsledku působení verapamilu a chrysinu bylo použito fluorescenční kationtové lipofilní barvivo TMRE, které se akumuluje do normálně fungujících mitochondrií. Analýza byla provedena u buněčných linií K562 a A549. Pomocí průtokové cytometrie byla detekována fluorescence TMRE, která odráží přítomnost buněk s vysokým transmembránovým potenciálem. Výsledky naznačují, že pokud použijeme verapamil (Obr. 19) nebo chrysin (Obr. 20) nedochází k výraznému ovlivnění viability nádorových buněk.



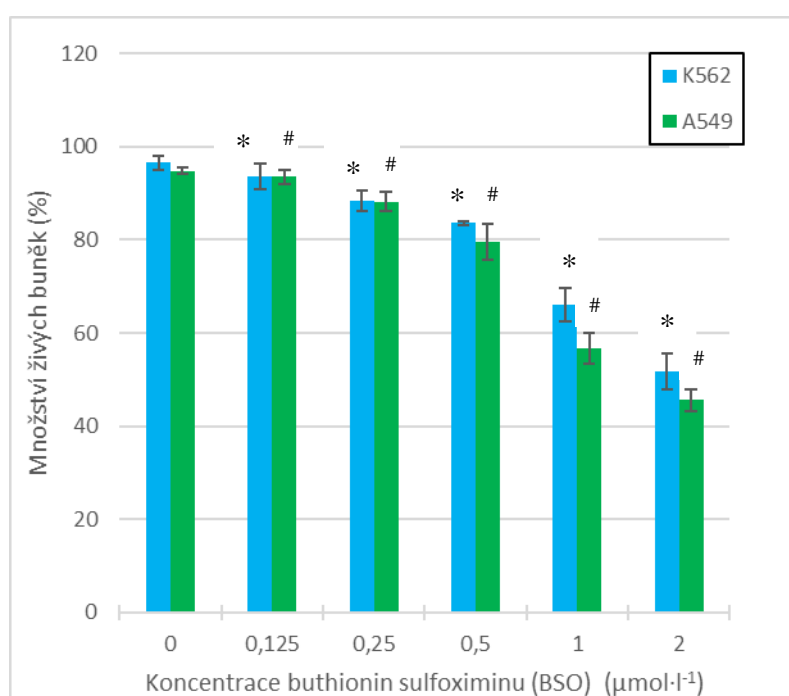
Obr. 19 Efekt verapamilu na viabilitu u buněčných linií K562 a A549. Buňky byly inkubovány s verapamilem po dobu 48 hod při 37 °C ve standardním růstovém médiu, při 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směřodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými ( $P < 0,05$ ). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými ( $P < 0,05$ ).



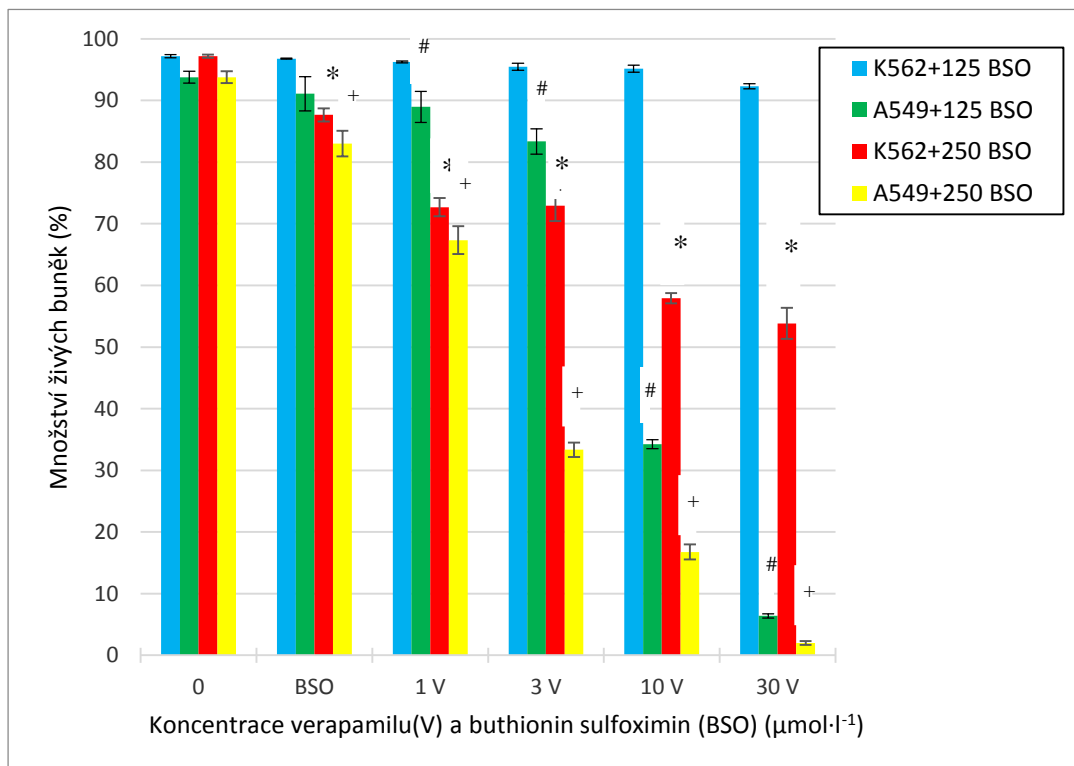
Obr. 20 Efekt chrysinu na viabilitu u buněčných linií K562 a A549. Buňky byly inkubovány s chrysinem po dobu 48 hod při 37 °C ve standardním růstovém médiu, při 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562, které byly ovlivněny chrysinem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549, které byly ovlivněny chrysinem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05).

#### 4.8 Vliv buthionin sulfoximu a kombinace verapamilu nebo chrysinu s buthionin sulfoximinem na životnost buněk

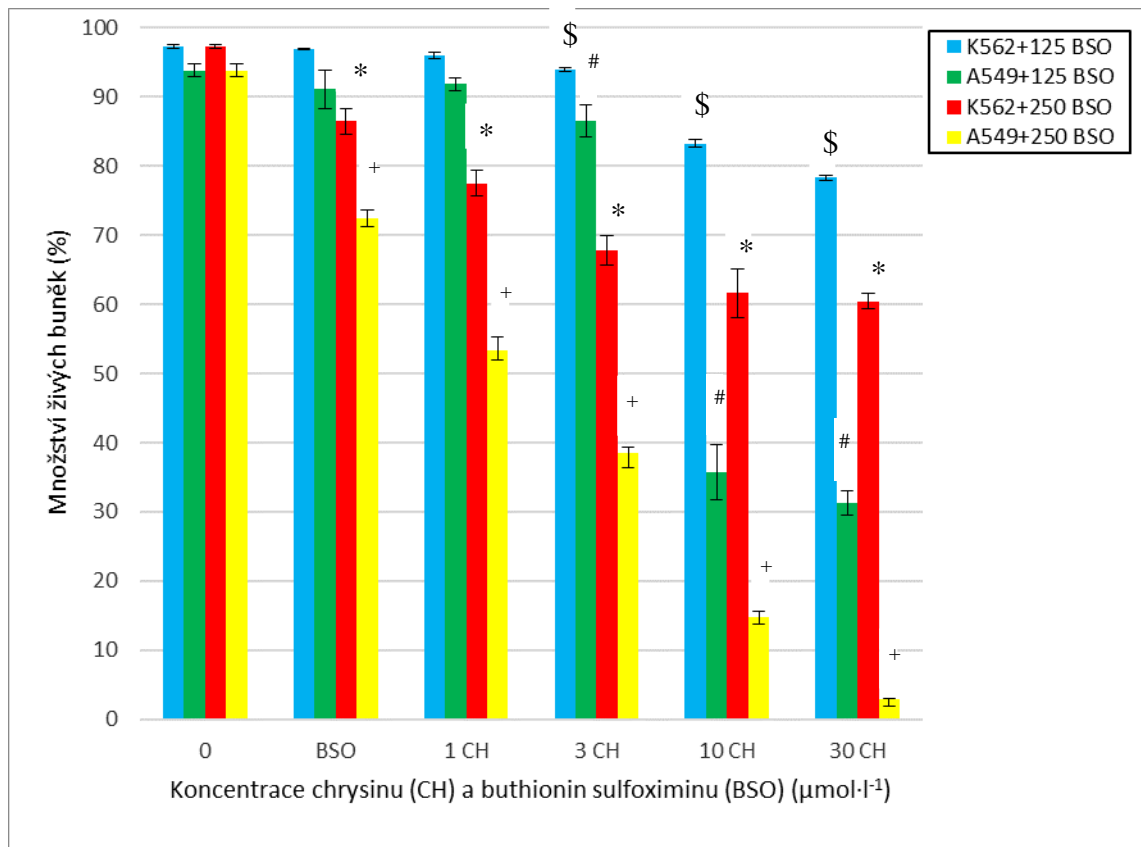
Podobně jako u sledování vlivu BSO a kombinace verapamilu nebo chrysinu s BSO na proliferaci a viabilitu, byl studován efekt životnosti buněk na tyto látky. Výsledky testu životnosti buněk korelují s MTT testem. V případě použití samostatného BSO nedocházelo k výraznému ovlivnění buněk, výjimkou byla vyšší koncentrace BSO ( $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), u které se ale domníváme, že vyvolává spíše cytotoxický efekt. BSO tedy způsoboval buněčnou smrt jen ve vyšších koncentracích. Proto byly buňky dále testovány s kombinací verapamilu či chrysinu a BSO. U buněk K562, které byly testovány kombinací verapamilu s BSO byl signifikantní pokles zaznamenán pouze u vyšší koncentrace BSO (Obr. 22), na rozdíl od buněk A549, kde byl signifikantní rozdíl viditelný při obou koncentracích BSO. Vyšší hladina BSO výrazněji ovlivnila životnost buněk než hladina nižší (Obr. 22, 23).



Obr. 21 Efekt buthionin sulfoximunu (BSO) na viabilitu u buněčných linií K562 a A549. Buňky byly inkubovány s BSO po dobu 48 hod při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  ve standardním růstovém médiu, při 5% obsahu  $\text{CO}_2$ . Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562, které byly ovlivněny BSO v porovnání s buňkami neovlivněnými ( $P < 0,05$ ). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549, které byly ovlivněny BSO v porovnání s buňkami neovlivněnými ( $P < 0,05$ ).



Obr. 22 Efekt verapamilu v kombinaci buthionin sulfoximinu (BSO) na viabilitu u buněčných linií K562 a A549. Buňky byly inkubovány s BSO a verapamilem po dobu 48 hod při 37 °C ve standardním růstovém médiu, při 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562+250 BSO, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549+125 BSO, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05). + je označen statisticky významný rozdíl buněk A549+125 BSO, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05).

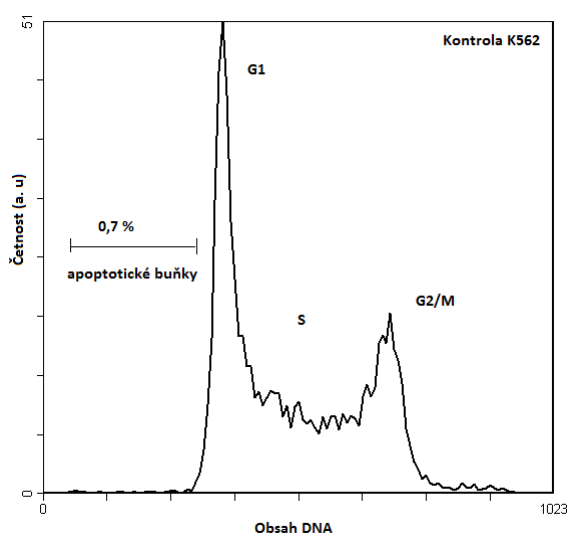


Obr. 23 Efekt chrysinu v kombinaci buthionin sulfoximinu (BSO) na viabilitu u buněčných linií K562 a A549. Buňky byly inkubovány s BSO a chrysinem po dobu 48 hod při 37 °C ve standardním růstovém médiu, při 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562+250 BSO, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05). \$ je statisticky významný rozdíl u buněk K562+125 BSO, které byly ovlivněny chrysinem v porovnání s buňkami neovlivněnými. # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549+125 BSO, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05). + je označen statisticky významný rozdíl buněk A549+125 BSO, které byly ovlivněny verapamilem v porovnání s buňkami neovlivněnými (P<0,05).

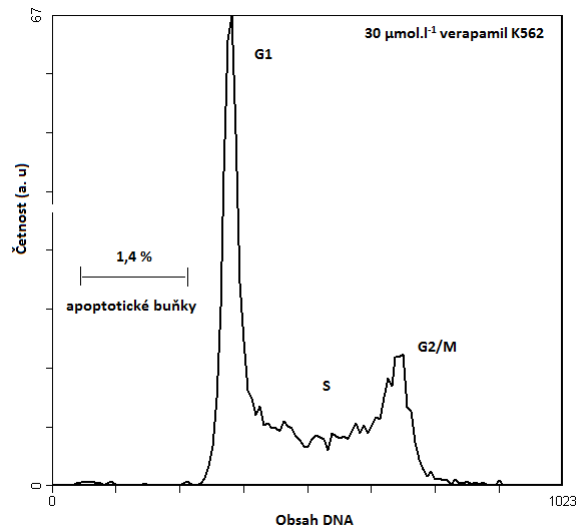
## 4.9 Vliv verapamilu a chrysinu na buněčný cyklus a apoptózu

Pomocí barviva TMRE jsme byli schopni odlišit množství živých a mrtvých buněk, ale nejsme schopni odlišit mechanismus buněčné smrti. Proto byla provedena analýza buněčného cyklu a apoptózy. Tímto typem analýzy jsme schopni pozorovat buňky v jednotlivých fázích buněčného cyklu a zastoupení apoptotických buněk (Obr. 24, 25). Výsledky naznačují podobný trend jako u analýzy životnosti buněk s použitím TMRE. U buněčných linií K562 a A549 ovlivněných verapamilem nebo chrysinem opět nedocházelo k významnému nárůstu apoptotických buněk (Obr. 26). Proto byly v následujícím kroku použity kombinace verapamilu nebo chrysinu s BSO.

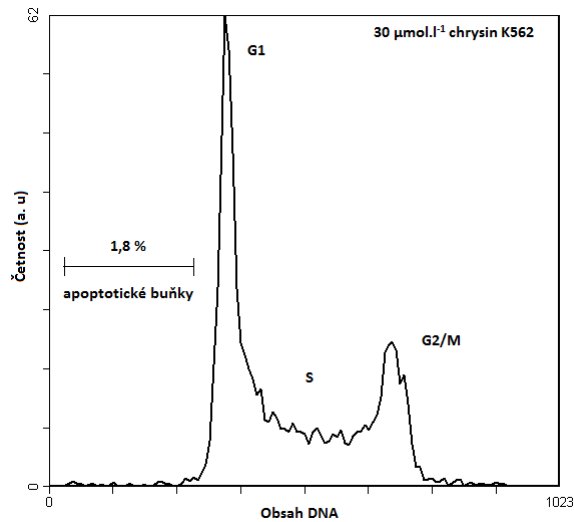
a)



b)



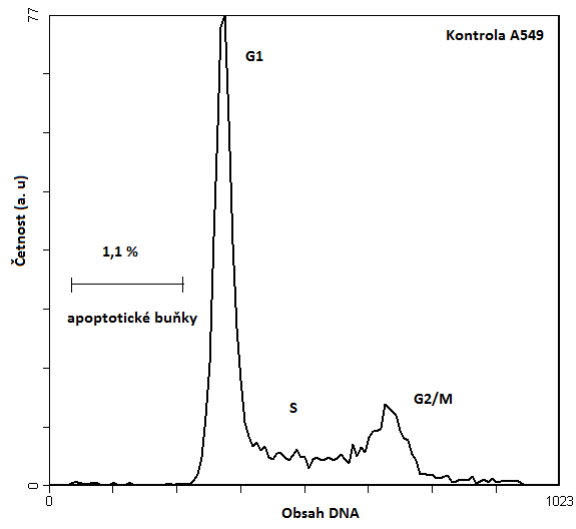
c)



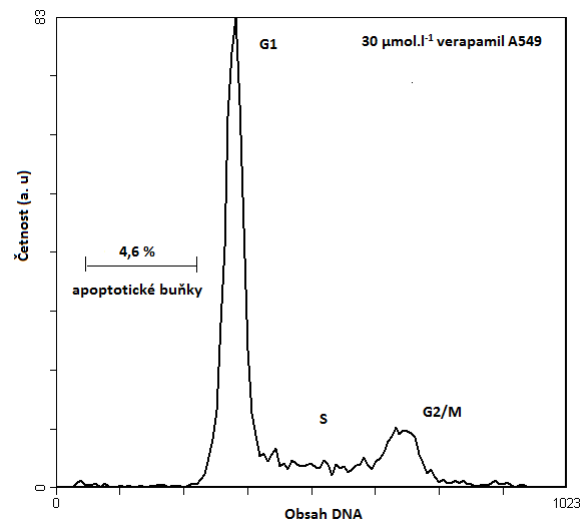
Obr 24 Typické obrázky histogramů, které znázorňují buňky K562 neovlivněné a ovlivněné verapamilem v jednotlivých fázích buněčného. Buněčná linie K562 byla inkubována s verapamilem či chrysinem po dobu 48 h ve standardních růstových podmínkách při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. a) Neovlivněné buňky, b) buňky ovlivněné verapamilem, c) buňky ovlivněny chrysinem.



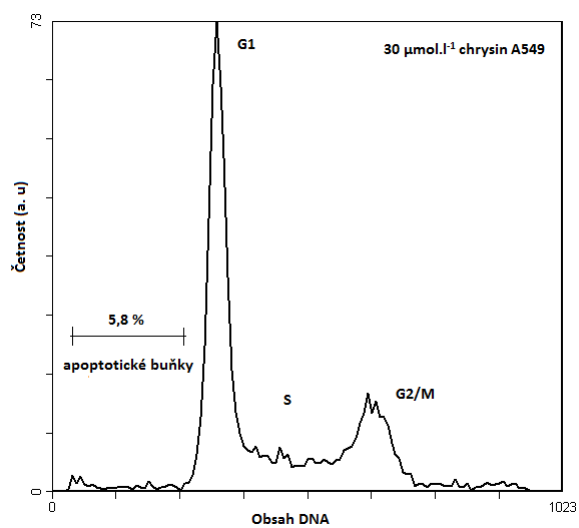
a)



b)

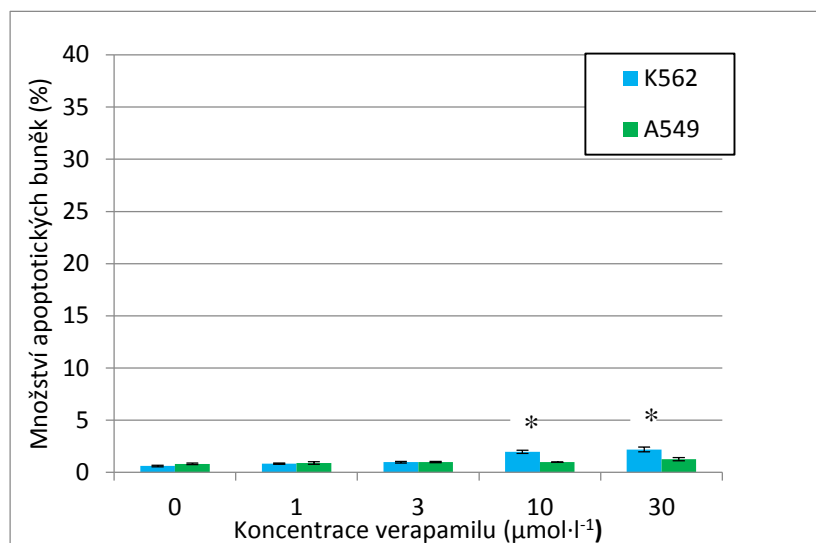


c)

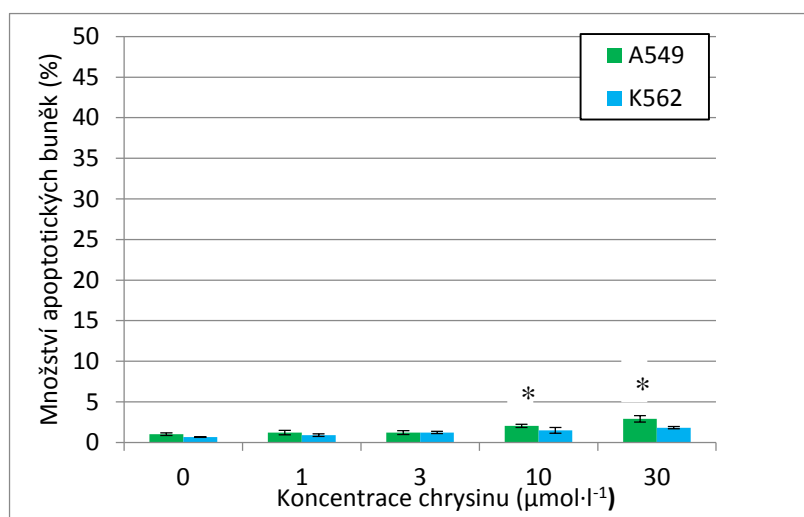


Obr. 25 Typické obrázky histogramů, které znázorňují buňky A549 neovlivněné a ovlivněné verapamilem v jednotlivých fázích buněčného. Buněčná linie A549 byla inkubována s verapamilem či chrysinem po dobu 48 h ve standardních růstových podmínkách při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. a) Neovlivněné buňky, b) buňky ovlivněné verapamilem, c) buňky ovlivněny chrysinem.

a)



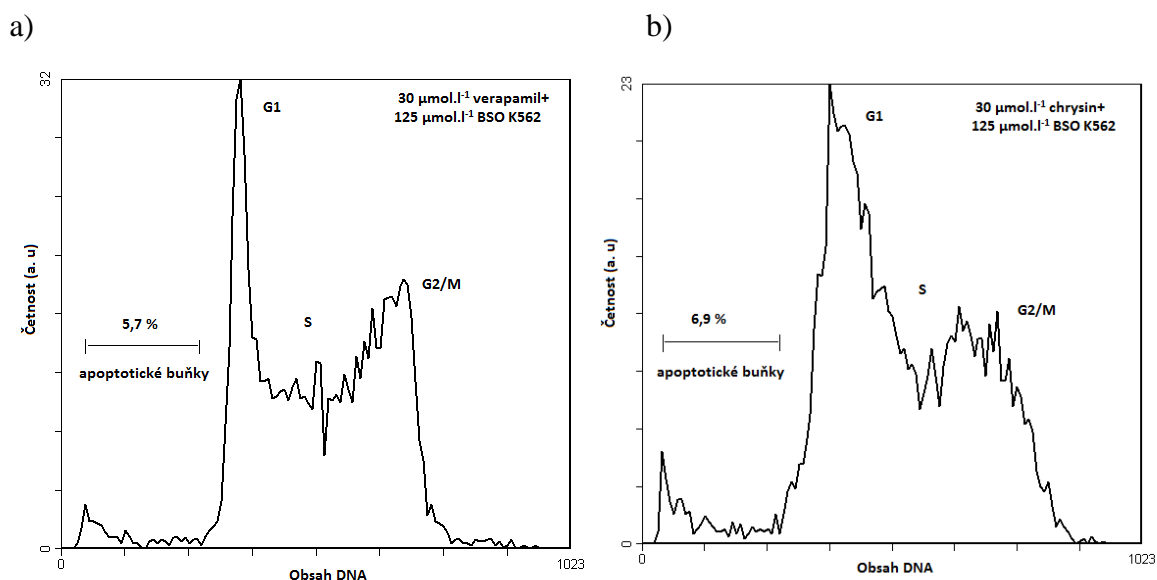
b)



Obr. 26 Vliv verapamilu a chrysinu na buněčnou smrt a indukci apoptózy. Buněčné linie K562 a A549 byly inkubovány s a) verapamilem nebo b) chrysinem nebo po dobu 48 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. V případě inkubace s verapamilem je \* označen statisticky významný rozdíl u buněk K562 ovlivněných verapamilem oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ). V případě inkubace s chrysinem je \* označen statisticky významný rozdíl u buněk A549 ovlivněných chrysinem oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ).

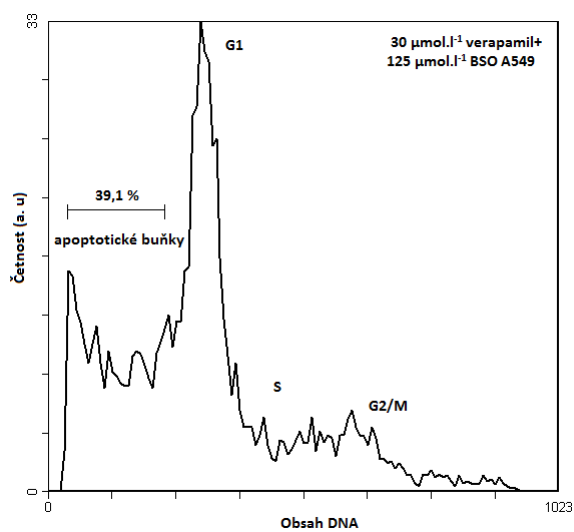
#### 4.10 Vliv kombinace verapamilu nebo chrysinu a buthionin sulfoximinu na buněčný cyklus a apoptózu

Stejně jako při předcházejících analýzách i zde byla použita kombinace verapamilu či chrysinu s BSO. Po použití kombinace verapamilu nebo chrysinu s BSO byl zjištěn signifikantní rozdíl množství apoptotických buněk především v případě buněčné linie A549 ovlivněné verapamilem v kombinaci s BSO (Obr. 29, 30). V případě buněk, které byly ovlivněny chrysinem v kombinaci s BSO, vykazovaly tyto látky na buňky A549 stejný efekt. Stejně jako při použití chrysinu nebo verapamilu byl sledován účinek léčiv na jednotlivé fáze buněčného cyklu (Obr. 27, 28). V případě buněčné linie K562 dochází pravděpodobně k menšímu bloku v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> u buněk ovlivněných verapamilem a chrysinem. V případě buněk A549 není pozorována žádná blokace (Obr. 31).

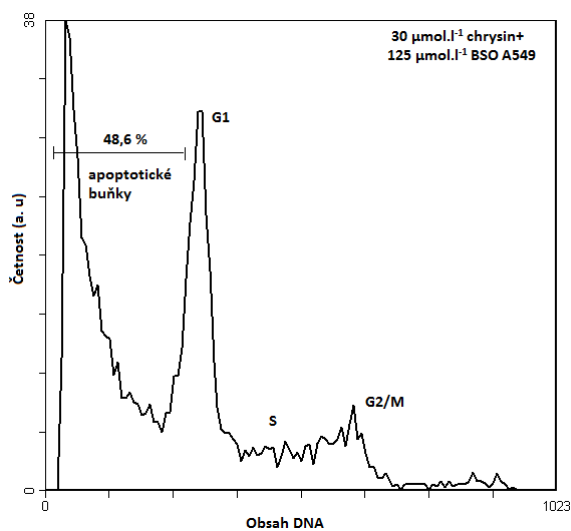


Obr. 27 Typické obrázky histogramů, které znázorňují buňky K562 ovlivněné verapamilem či chrysinem v kombinaci s buthionin sulfoximinem (BSO) v jednotlivých fázích buněčného. Buněčná linie K562 byla inkubována s kombinací verapamilu či chrysinu s BSO po dobu 48 h ve standardních růstových podmínkách při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. a) Buňky ovlivněné kombinací verapamilu s BSO, b) buňky ovlivněné kombinací chrysinu s BSO.

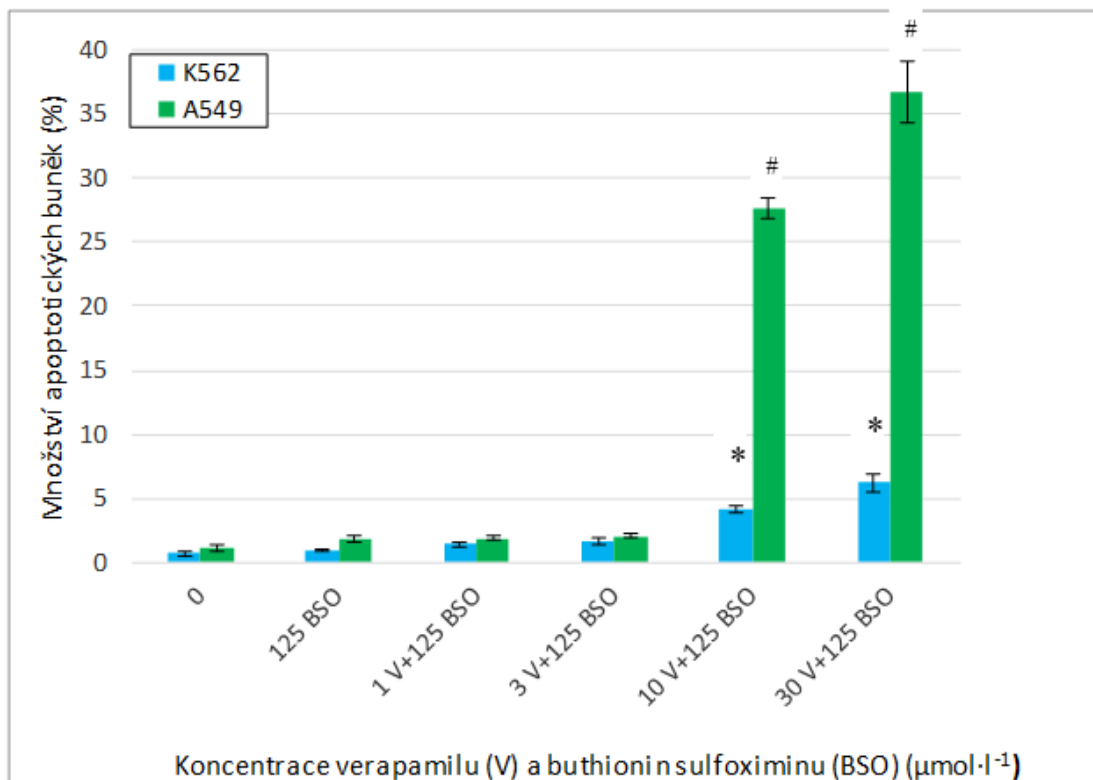
a)



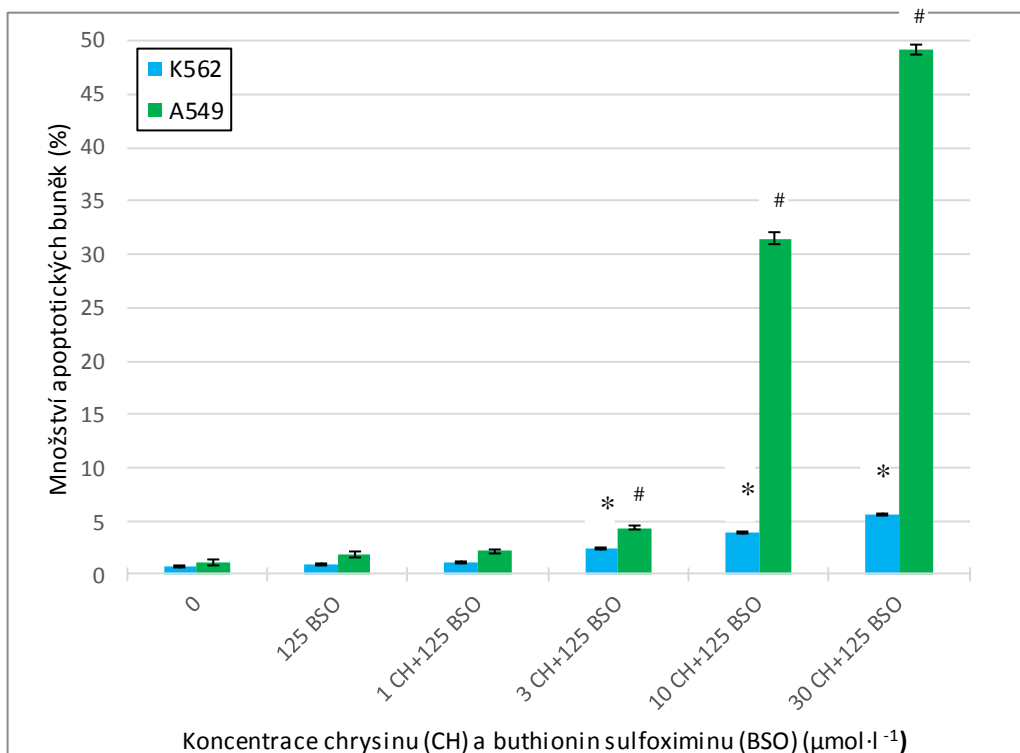
b)



Obr. 28 Typické obrázky histogramů, které znázorňují buňky A549 ovlivněné verapamilem či chrysinem v kombinaci s buthionin sulfoximinem (BSO) v jednotlivých fázích buněčného. Buněčná linie A549 byla inkubována s kombinací verapamilu či chrysinu s BSO po dobu 48 h ve standardních růstových podmínkách při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. a) Buňky ovlivněné kombinací verapamilu s BSO, b) buňky ovlivněné kombinací chrysinu s BSO.

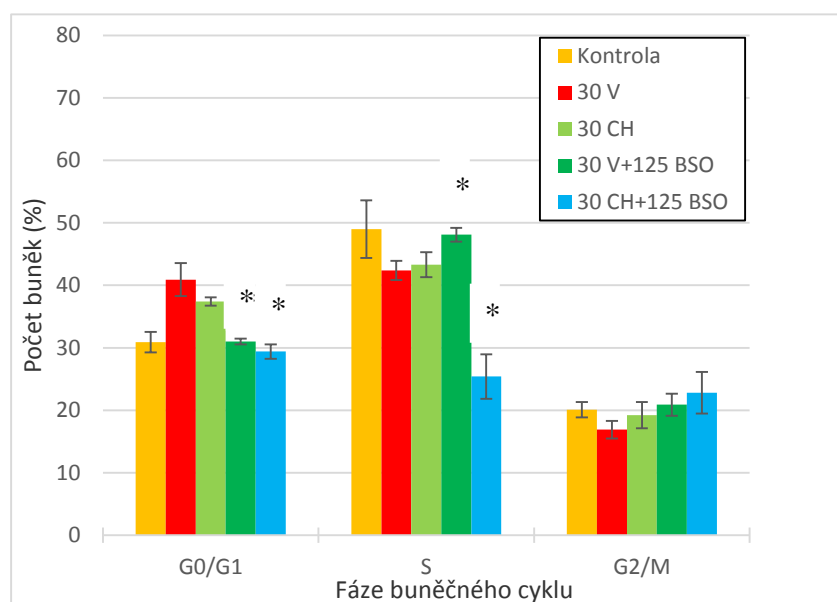


Obr. 29 Vliv kombinace verapamilu a buthionin sulfoximinu (BSO) na buněčnou smrt a indukci apoptózy. Buněčné linie K562 a A549 byly inkubovány s kombinací verapamilu a BSO po dobu 48 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562 ovlivněných verapamilem a BSO oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549 ovlivněných verapamilem v kombinaci s BSO oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ).

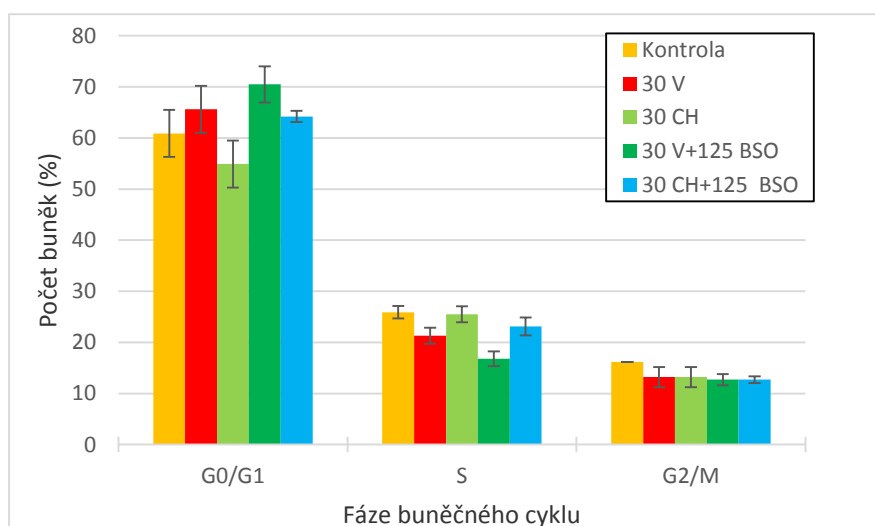


Obr. 30 Vliv kombinace chrysinu a buthionin sulfoximinu (BSO) na buněčnou smrt a indukci apoptózy. Buněčné linie K562 a A549 byly inkubovány s kombinací chrysinem a BSO po dobu 48 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562 ovlivněných chrysinem a BSO oproti buňkám neovlivněným (P<0,05). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549 ovlivněných chrysinem v kombinaci s BSO oproti buňkám neovlivněným (P<0,05).

a)



b)



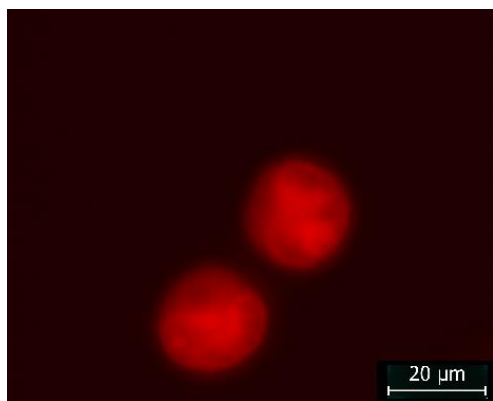
Obr. 31 Vliv verapamilu (V), chrysinu (CH) a kombinace verapamilu či chrysinu s buthionin sulfoximinem (BSO) na počet buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a) u buněk K562, b) u buněk A549. Buněčné linie byly inkubovány s léčivými látkami po dobu 48 hod ve standardním růstovém médiu při 37 °C a 5% obsahu CO<sub>2</sub>. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří měření se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl v jednotlivých fázích buněčného cyklu u buněk K562 ovlivněných léčivými látkami oproti buňkám neovlivněným (P<0,05).



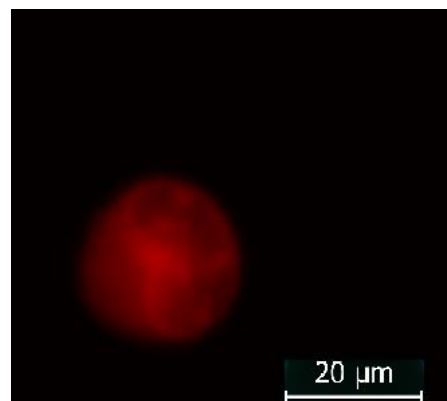
#### 4.11 Vliv verapamilu a chrysinu na morfologii buněčných jader

Abychom potvrdili výsledky, které nám ukázaly předešlé analýzy, zkoumali jsme morfologii jader u buněk K562 a A549 ovlivněných i neovlivněných verapamilem i chrysinem a kombinací verapamilu či chrysinu s BSO. Buňky byly fixovány ethanolem, barveny propidium jodidem a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem (Obr. 32, 33). Byl pozorován vznik apoptotických tělísek převážně u buněk ovlivněných kombinací verapamilu s BSO u buněčné linie A549 podobně se jevila i kombinace chrysinu s BSO u těchto buněk. Dále bylo počítáno množství apoptotických buněk pod mikroskopem vzhledem k buňkám neapoptickým. Největší nárůst apoptotických buněk byl zaznamenán u buněk ovlivněných nejvyšší koncentrací kombinace verapamilu nebo chrysinu s BSO (Obr. 34, 35). Nárůst apoptotických buněk byl asi dvacetkrát vyšší oproti buňkám, které byly ovlivněny pouze verapamilem nebo chrysinem.

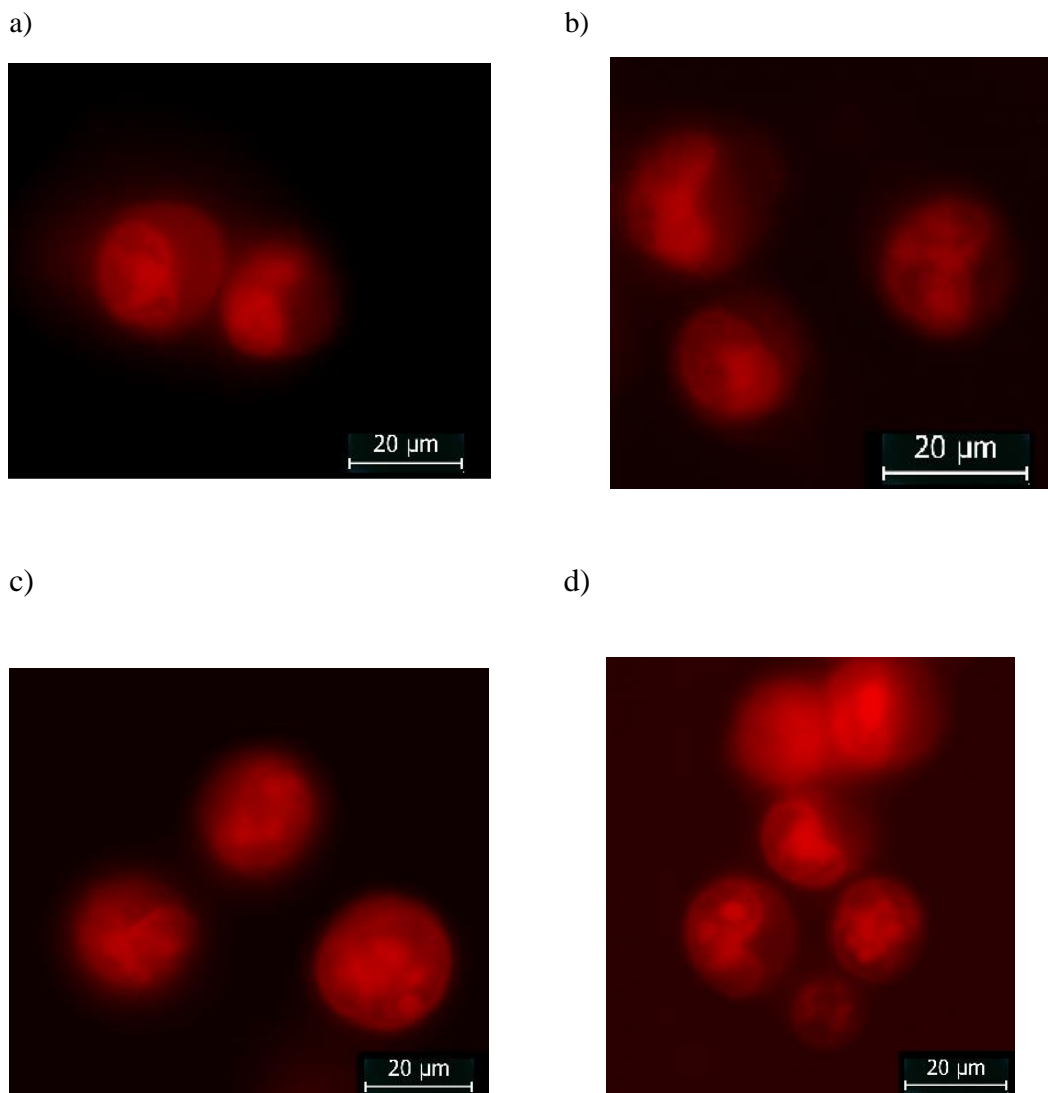
a)



b)

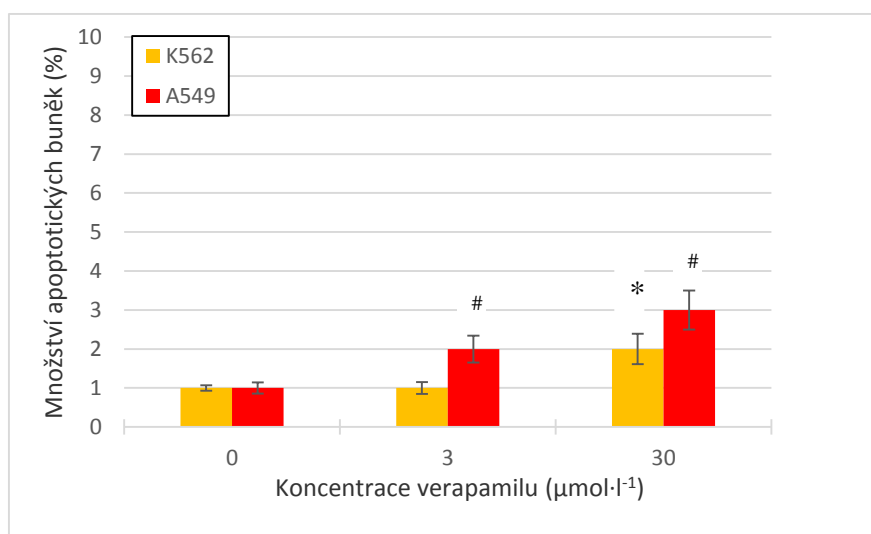


Obr 32 Analýza morfologie jader u buněčných linií K562. a) Typický obrázek neovlivněných buněk K562. b) Typický obrázek buněk K562 ovlivněných verapamilem. Buňky byly barveny propidium jodidem a pozorovány při zvětšení 1000x. Velikost měřítka byla 20 μm.

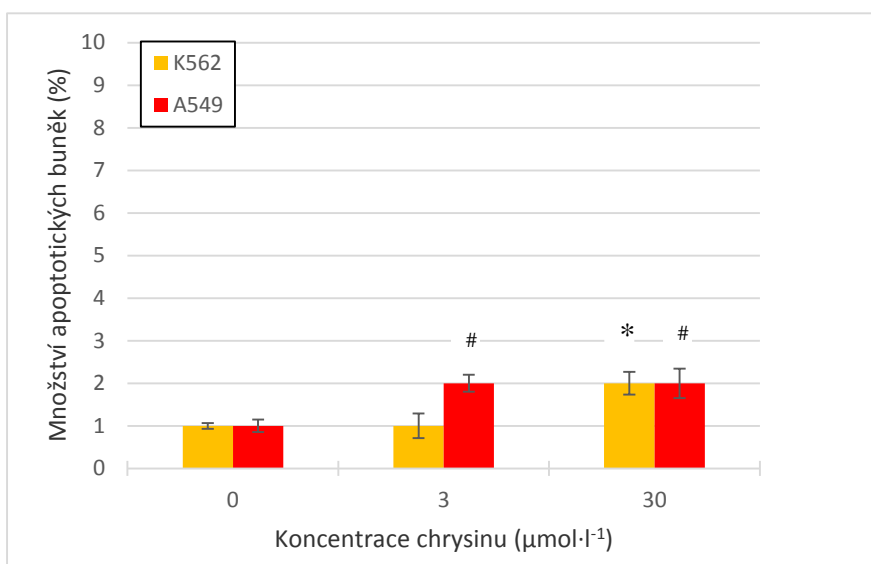


Obr 33 Analýza morfologie jader u buněčných linií K562 a A549. a) Typický obrázek neovlivněných buněk A549. b) Typický obrázek buněk A549 ovlivněných verapamilem. c) Typický obrázek ovlivněných buněk K562 kombinací verapamilu s buthionin sulfoximinem (BSO). d) Typický obrázek ovlivněných buněk A549 kombinací verapamilu s BSO. Buňky byly barveny propidium jodidem a pozorovány při zvětšení 1000x. Velikost měřítka byla 20  $\mu\text{m}$ .

a)

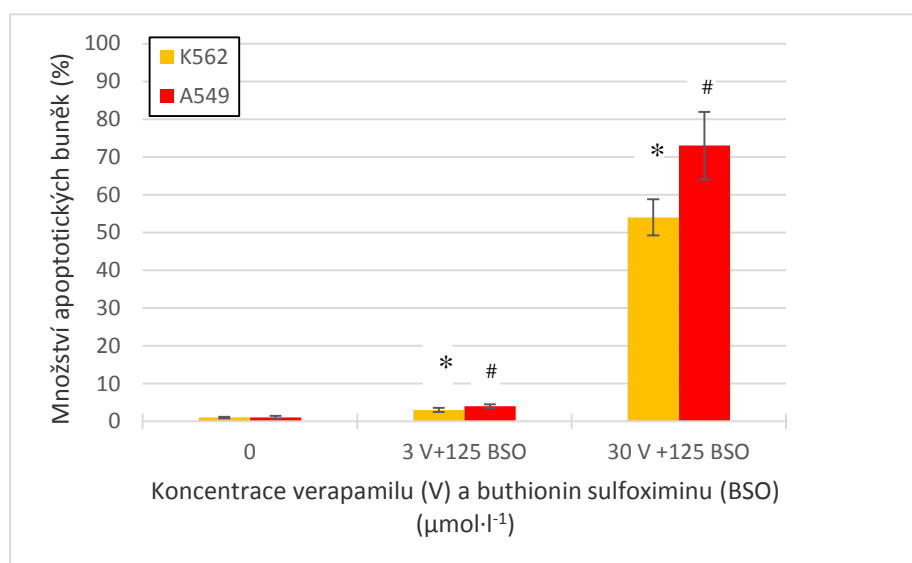


b)

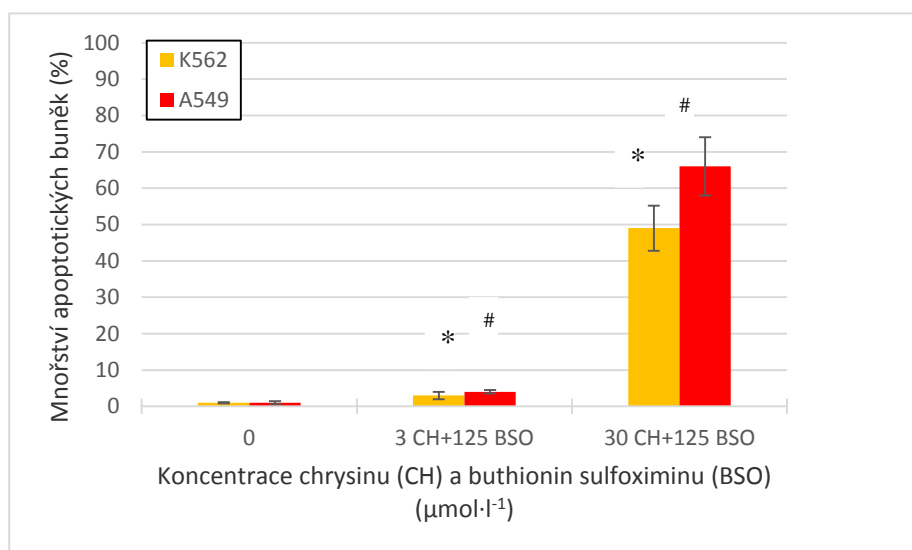


Obr 34. Efekt verapamilu nebo chrysinu na apoptózu u buněčných linií K562 a A549. a) Vliv verapamilu na apoptózu buněk. B) Vliv chrysinu na apoptózu buněk. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří pozorování se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562 ovlivněných oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549 ovlivněných oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ).

a)



b)



Obr 35. Efekt kombinace verapamilu nebo chrysinu s BSO na apoptózu u buněčných linií K562 a A549. a) Vliv verapamilu v kombinaci s BSO na apoptózu buněk. B) Vliv chrysinu v kombinaci s BSO na apoptózu buněk. Výsledky jsou průměrnými hodnotami ze tří pozorování se směrodatnými odchylkami. \* je označen statisticky významný rozdíl u buněk K562 ovlivněných oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ). # je označen statisticky významný rozdíl u buněk A549 ovlivněných oproti buňkám neovlivněným ( $P < 0,05$ ).

## 5 DISKUSE

Velké množství výzkumných skupin se v posledních letech zabývá strategiemi, které by překonaly MDR u různých typů nádorových buněk. Jednou z těchto strategií je i CS, která byla předmětem našeho zkoumání. CS byla popsána u nádorových buněk se zvýšenou expresí některých ABC transportérů, zejména ABCC1 a ABCB1 (Lorendeau *et al.*, 2014). Naše výsledky ukazují asi pětinasobně zvýšenou expresi ABCC1 u buněk A549 oproti buňkám K562. Jelikož bývá u nádorových buněk často pozorována zvýšená mutace v genomu, byl gen *ABCC1* po izolaci DNA podroben sekvenaci na Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, kde bylo zjištěno, že v buňkách A549 nejsou obsaženy žádné mutace v genu a v buňkách K562 byly mutace přítomny v jedné polovině genu.

Použití CS jako náhodně objevené strategie pro překonání MDR přineslo pozitivní výsledky v *in vitro* experimentech. I když některé látky (verapamil, chrysin) fungují mechanismem, který podporuje čtyři hlavní hypotézy mechanismů CS, je možné, že činidla CS pracují na bázi alternativních mechanismů. Bylo zjištěno, že pravděpodobně neexistuje žádný hlavní mechanismus, který by shrnoval mechanismy působení CS potřebné pro překonání MDR (Pluchino *et al.*, 2012).

Ze studií vyplývá, že flavonoidy (chrysin) jsou účinnějšími činidly CS než verapamil (Lorendeau *et al.*, 2014). V případě chrysinu dochází i k indukci apoptózy u buněk exprimujících ABCC1. Flavonoidy byly podrobeny zkoumání z důvodu nižší toxicity oproti verapamilu. Tyto látky se nacházejí běžně ve stravě a mohou příznivě ovlivňovat zdravotní stav pacienta (Lorendeau *et al.*, 2014). V našem případě byly zkoumány účinky verapamilu a chrysinu na buněčné linie K562 a A549. V mnoha předešlých studiích byly použity buňky léčivem selektované s velmi vysokou expresí ABC transportérů, což mohlo ve velkém množství případů ovlivnit výsledky experimentů, protože u nádorových buněk není tak vysoká exprese obvyklá.

Abychom hypotézu ověřili použili jsme buněčné linie exprimující ABCC1 v podobné míře jako lidské nádorové buňky. A549 jsou buňky se zvýšenou expresí ABCC1, K562 mají expresi ABCC1 nízkou v rámci panelu buněčných linií (NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen), ze které byly buňky použity.

Bylo zjištěno, že verapamil a chrysin indukují eflux GSH ven z buněk. V důsledku zvýšené exprese ABCC1 u buněk A549 byl eflux GSH do média u této buněčné linie až

desetinásobně vyšší než v případě buněčné linie K562. U buněk K562 ovlivněných chrysinem došlo k více než dvojnásobnému efluxu GSH do média v porovnání s buňkami K562, které byly ovlivněny verapamile. V případě buněčné linie A549 byl větší eflux GSH ven z buněk pozorován u buněk ovlivněných verapamilem v porovnání s buňkami ovlivněnými chrysinem.

V důsledku pozorování zvýšeného efluxu GSH ven z buněk, byla stanovena intracelulární hladina GSH u buněk K562 a A549. Bylo zjištěno, že eflux GSH vede k poklesu intracelulárního obsahu GSH. U buněk K562 bylo pozorováno snížení intracelulární hladiny GSH asi o 20 % po šestihodinové inkubaci s verapamilem či chrysinem. V případě buněčné linie K562 byl zaznamenán pokles intracelulární hladiny GSH téměř na 50 %. Tento jev byl pozorován ve shodě s literaturou (Pluchino *et al.*, 2012).

Jelikož snížená intracelulární hladina GSH může vést k oxidativnímu stresu, byl následně pozorován vliv verapamilu a chrysinu na NRF2. NRF2, který je regulátorem buněčné antioxidační odezvy a hraje důležitou roli při adaptaci na oxidační stres. V důsledku působení některých látek dochází k aktivaci NRF2, aby došlo ke snížení apoptózy u nádorových buněk (Li *et al.*, 2014). V našem případě nebyla prokázána aktivace NRF2 ani u jedné z použitých buněčných linií.

V literatuře je dále popisováno, že v buňkách s vysokou expresí ABCC1 dochází k indukci buněčné smrti (Pluchino *et al.*, 2012). Z tohoto důvodu byl dále proveden MTT test, kde nebyl pozorován výrazný efekt verapamilu ani chrysinu na proliferaci a viabilitu buněk. Proto jsme se rozhodli použít pro další experimenty BSO. Po použití BSO, což je inhibitor syntézy GSH, docházelo k mírnému poklesu proliferace. Detailní analýza ukázala, že BSO pravděpodobně způsobuje mírnou inhibici. Bylo zjištěno, že buňky K562 a A549 nejsou ve zvýšené míře hypersenzitivní ani k BSO. Až následné použití kombinace verapamilu či chrysinu s BSO vedlo k významnějšímu rozdílu. Výsledek zjištěn v MTT testu byl doložen i dalšími provedenými analýzami, které ukázaly srovnatelné výsledky.

Na rozdíl od naší studie, z mnoha studií vyplývá, že použití samotného verapamilu či chrysinu indukuje apoptózu, stejně tak i použití samotného BSO (Hall *et al.*, 2009; Laberge *et al.*, 2009; Pluchino *et al.*, 2012; Lorandeanu *et al.*, 2014). Tento fakt je pravděpodobně způsoben tím, že v mnoha studiích byly použity buňky s velmi vysokou

expresí ABC transportérů ve srovnání s našimi buněčnými liniemi, které se rozsahem exprese ABC transportérů přibližují lidským nádorovým buňkám.

Na základě zjištěných výsledků se zdá, že verapamil ani chrysin nejsou pravděpodobně schopny indukovat CS u nádorových buněk se zvýšenou expresí ABCC1 transportéru. Zvýšená exprese ABCC1 transportéru není pravděpodobně u buněk dostatečně stimulována, tak aby docházelo k indukci buněčné smrti.

## 6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla vypracována literární rešerše, ve které se zabýváme lékovou rezistencí, ABC transportéry a kolaterální senzitivitou u nádorových buněk.

V experimentální části byla nejdříve ověřena exprese ABCC1 transportéru u buněčných linií K562 a A549. Bylo zjištěno, že buňky A549 exprimují ABCC1 v asi pětinasobně vyšší míře než buňky K562. Po sekvenaci genu *ABCC1* u buněčné linie A549 bylo zjištěno, že se jedná o nemutovanou alelu tohoto genu.

Následně bylo zjištěno, že verapamil a chrysin indukují eflux GSH do média. V důsledku zvýšené exprese buněk A549 docházelo asi k desetinásobně vyššímu efluxu GSH u těchto buněk oproti buňkám K562.

Dále bylo zjištěno, že eflux GSH vede k poklesu intracelulární hladiny GSH u buněk K562 i A549. Bylo zjištěno, že u buněk K562 dochází po 6 hod inkubace s verapamilem či chrysinem k asi 20% poklesu intracelulární hladiny GSH. V případě buněk A549 jsme zaznamenali snížení intracelulární hladiny GSH po 6 hod inkubace téměř na polovinu.

Ačkoliv snížená hladina intracelulárního GSH může vést k oxidativnímu stresu, nebyla pozorována aktivace NRF2, který je jedním z hlavních regulátorů buněčné smrti.

Další analýzy ukázaly, že ani verapamil ani chrysin neinhibují buněčnou proliferaci a neindukují buněčnou smrt u buněk K562 a A549. Rovněž nebyla pozorována zvýšená citlivost obou buněčných linií k inhibitoru syntézy GSH (BSO). Pouze kombinace verapamilu nebo chrysinu s BSO indukovala výrazný pokles viability u buněk A549, u buněk K562 byl tento efekt výrazně nižší.

Výše uvedené výsledky naznačují, že verapamil a chrysin nejsou schopny indukovat CS u nádorových buněk s vysokou expresí ABCC1.



## 7 LITERATURA

- Abdallah H. M., Al-Abd A. M., El-Dine R. S., El-Halawany A. M. (2015): P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers. *Journal of Advanced Research* **6**, 45-62.
- Aleman C., Annereau J. P., Liang X. J., Carderelli C. O., Taylor B., Yin J. J., Aszalos A., Gottesman M. M. (2003): P-glycoprotein, expressed in multidrug resistant cells, is not responsible for alterations in membrane fluidity or membrane potential. *Cancer Research* **15**, 3084-3091.
- Ambudkar S. V., Dey S., Hrycyna C. A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M. M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**, 361-398.
- Avendaño C., Menéndez J. C. (2015): Chapter 14 – Drugs that modulate resistance to antitumor agents. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* **2**, 655-700.
- Bakos E., Evers R., Szakacs G., Tusnady G. E., Welker E., Szabo K., de Haas M., van Deemter L., Borst P., Varadi A., Sarkadi B. (1998): Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 32167-32175.
- Balis J. U., Bumgarner S. D., Paciga J. E., Paterson J. F., Shelley S. A. (1984): Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction. *Experimental lung research* **6**, 197-213.
- Bates S. F.; Chen C., Robey R., Kang M., Figg W. D., Fojo T. (2002): Reversal of multidrug resistance: lessons from clinical oncology. *Novartis Foundation Symposium* **243**, 83-96.
- Bech-Hansen N. T., Till N. E., Ling V. (1976): Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. *Journal of Cellular Physiology* **88**, 23-31.
- Bernardes de Andrade Carli C., Quilles M. B., Carlos I. Z. (2013): Chapter-16: Natural products with activity against multidrug-resistant tumor cells. *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, Academic Press, San Diego, 237-244.
- Broxterman H. J., Pinedo H. M., Kuiper C. M., Kaptein L. C., Schuurhuis G. J., Lankelma J. (1988): Induction by verapamil of a rapid increase in ATP consumption in multidrug-resistant tumor cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology* **2**, 2278-2282.
- Cairns R. A., Harris I. S., Mak T. W. (2011): Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* **11**, 85-95.
- Callaghan R., Riordan J. R. (1995): Collateral sensitivity of multidrug resistant cells to narcotic analgesics is due to effects on the plasma membrane. *Biochimica and Biophysica Acta* **24**, 155-162.
- Caster J. M., Sethi M., Kowalczyk S., Wang E. Tian X., Hyder S. N., Wagner K. T., Zhang Y.-A., Kapadia Ch., Au K. M., Wang A. Z. (2015): Nanoparticle delivery of chemosensitizers improve chemotherapy efficacy without incurring additional toxicity. *HHS Public Access Author manuscript* **7**, 2805-2811.
- Cole S. P., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E., Grant C. E., Almquist K. C., Stewart A. J., Kurz E. U., Duncan A. M., Deeley R. G. (1992): Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell lines. *Science* **258**, 1650-1654.

- Cole S. P., Deeley R. G. (2006): Transport of glutathion and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**, 438-446.
- Coley H. M. (2010): Overcoming multidrug resistance in cancer: clinical studies of p-glycoprotein inhibitors. *Multi-Drug Resistance in Cancer* **596**, 341-358.
- Dai C. L., Liang Y. J., Wang Y. S., Tiwari A. K., Yan Y. Y., Wang F., Chen Z. S., Tong X. Z., Fu L. W. (2009): Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2. *Cancer Letters* **279**, 74-83.
- Dalton W. S., Crowley J. J., Salmon S. S., Grogan T. M., Laufman L. R., Weiss G. R., Bonnet J. D. (1995): A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizers to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study. *Cancer* **75**, 815-820.
- Dean M., Annilo T. (2005): Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **6**, 123-142.
- Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15665-15670.
- Ehrenberg B., Montana V., Wei M. D., Wuskell J. P., Loew L. M. (1988): Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of catioic dyes. *Biophysical Journal* **53**, 785-794.
- Eytan G. D. (2005): Mechanism of multidrug resistance in relation to passive membrane permeation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **59**, 90-97.
- Ferte J. (2000): Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *European Journal of Biochemistry* **267**, 277-294.
- Fracasso P. M., Goldstein J. L., de Alwis D. P., Rader J. S., Arquette M. A., Goodner S. A., Wright L. P., Fears C. L., Gazak R. J., Andre V. A., Burgess M. F., Slapak C. A., Schellens J. H. (2004): Phase I study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar, in resistant malignancies. *Clinical Cancer Research* **10**, 7220-7228.
- Fromm M. F. (2004): Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences* **25**, 423-429.
- Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P. Kersey J. H., Dosik H., Parks W. P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1417-1423.
- Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., Sarkadi B. (2004): The role ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Current Drug Delivery* **1**, 27-42.
- Goldbrough A. S., Handley M. D., Dulcey A. E., Pluchino K. M., Kannan P., Brimacombe K. R., Hall M. D., Griffiths G., Gottesman M. M. (2011): Collateral sensitivity of multidrug-resistant cells to the orphan drug tiopronin. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 4987-4997.
- Gottesman M. M., Ambudkar S. V. (2001): Overview: ABC transporters and human disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **33**, 453-458.
- Gottesman M. M., Fujio T., Bates S. E. (2002): Multidrug resistance i cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* **2**, 48-58.

- Gottesman M. M., Ling V. (2006): The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Letters* **580**, 998-1009.
- Gottesman M. M., Ambudkar S. V., Xia D. (2009): Structure of a multidrug transporter. *Nature Biotechnology* **27**, 546-547.
- Hall M. D., Salam N. K., Hellowell J. L., Fales H. M., Kensler C. B., Ludwig J. A., Szakacs G, Hibbs D. E., Gottesman M. M. (2009): Synthesis, activity, and pharmacophore development for isatin-beta-thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**, 3191-3204.
- Hamed A. R., Abdel-Azim N. S., Shams K. A., Hammouda F. M. (2019): Targeting multidrug resistance in cancer by natural chemosensitizers. *Bulletin of the National Research Centre* **43**.
- Huang Y. (2007): Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Review* **26**, 183-201.
- Hyde S. C, Emsley P., Hartshorn M. J., Mimmack M. M., Gileadi U., Pearce S. R., Gallagher M. P., Gill D. R., Hubbard R. E., Higgins C. F. (1990): Structural model ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362-365.
- Chen Z. S., Robey R. W., Belinsky M. G., Shchaveleva I., Ren X. Q., Sugimoto Y., Ross D. D., Bates S. E., Kruh G. D. (2003): Transport of methotrexate, bate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of aquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Research* **63**, 4048-4054.
- Choi C. H. (2005): ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* **5**, 30-43.
- Joo W. D., Visintin I., Mor G. (2013): Targeted cancer therapy-Are the days of systemic chemotherapy numbered. *HHS Public Access Author manuscript* **76**, 308-314.
- Juliano R. L., Ling V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chines hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* **455**, 152-162.
- Kappus H., Sies S. (1981): Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**, 1233-1241.
- Karthikeyan S., Hoti S. L. (2015): Development of fourth generation ABC inhibitors from natural products: a novel approach to overcome cancer multidrug resistance. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **15**, 605-615.
- Kathawala J., Lincoln M. C., Georges E. (2003): A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry* **42**, 12163-12173.
- Kathawala R. J., Gupta P., Ashyby Ch. R., Chen Z.-S. (2015): The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates* **18**, 1-17.
- Kelly R. J., Robey R. W., Chen C. C.; Draper D., Luchenko V., Barnett D., Oldham R. K., Caluang Z., Frye A. R., Steinber S. M., Fojo T., Bates S. E. (2012): A pharmacodynamic study of the P-glycoprotein antagonist CBT-1(R) in combination with paclitaxel in solid tumors. *Oncologist* **17**, 512.
- Koppenol W. H., Bounds P. L., Dang C. V. (2011): Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer* **11**, 325-337.
- Kruh G. D., Belinsky M. G. (2003): The MRP family drug efflux pumps. *Oncogene* **22**, 7537-7552.

- Kunz P. L., He A. R., Colevas A. D., Pishvaian M. J., Hwang J. J., Clemens P. L., Messina M., Kaleta R., Abrahao F., Sikic B. I., Marshall J. L. (2012): Phase I trial of ixabepilone administered as three oral doses each separated by 6 hours every 3 weeks in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs* **30**, 2364-2370.
- Laberge R. M., Karwatsky J., Lincoln M. C., Leimanis M. L., Georges E. (2007): Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* **73**, 1727-1737.
- Laberge R. M., Ambadipudi R., Georgeze E. (2009): P-glycoprotein (ABCB1) modulates collateral sensitivity of a multidrug resistant cell line to verapamil. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **491**, 53-60.
- Lage H. (2008): An overview of cancer multidrug resistance a still unsolved problem. *Cell and Molecular Life Sciences* **65**, 3145-3167.
- Leonardo G. D. Fojo T., Bates S. E. (2003): The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**, 411-424.
- Leschziner G., Zabaneh D., Pirmohamed M., Owen A., Rogers J., Coffey A. J., Balding D. J., Bentley D. B., Johnson M. R. (2006): Exon sequencing and high resolution haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenetics and Genomics* **16**, 439-450.
- Linkos:  
<https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/ucinok-reovirusu-na-nadorove-bunky/> (1. 3. 2019)
- Liscovitch M., Lavie Y. (2002): Cancer multifrug resistance: a review of recent drug discovery research. *IDrugs: the investigational drugs journal* **5**, 349-355.
- Loew L. M., Tuft R. A., Carrington W., Fay F. S. (1993): Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophysical Journal* **65**, 2396-2407.
- Longley D. B., Allen W. L., Johnston P. G. (2006): Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **2**, 184-196.
- Loo T. W., Clarke D. M. (2005): Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *The Journal of Membrane Biology* **206**, 173-185.
- Lorendau D., Dury L., Genoux-Bastide E., Lecerft-Schmidt F., Simões-Pires C., Carrupt P.-A., Terreux R., Magnard S., Di Pietro A., Bouhmendjel A., Baubichon-Cortay H. (2014): Collateral sensitivity of resistance MRP1-overexpressing cells to flavonoids and derivatives through GSH efflux. *Biochemical Pharmacology* **90**, 235-245.
- Lozzio C. B., Lozzio B.B. (1975): Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321-334.
- Mao Q., Unadkat J. D. (2005): Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *The AAPS Journal* **7**, E118-E133.
- Marengo B., De Cuicis Ch., Verzola D., Pistoia V., Raffaghello L., Patriarca S., Balbis E., Traverso N., Cottalasso D., Pronzato M. A., Marinari U. M., Domenicotti C. (2008): Mechanism of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine) induced cytotoxic effect in neuroblastoma. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 474-482.
- Mark K. M., Park E. S., Arefolov A., Russo K., Ishihara K., Ring J. E., Clardy J. Clarke A. S., Pelish H. E. (2011): The selectivity of austocystin D arises from cell-line-specific drug activation by cytochrome P450 enzymes. *Journal of Natural Products* **74**, 567-573.

- Medchemexpress: <https://www.medchemexpress.com/TMRE.html> (24. 3. 2019)
- Morrow C. S., Peclak-Scott C., Bishwokarma B., Kute T. E., Smitherman P. K., Townsend A. J. (2006): Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mixotrone via glutathione dependent drug efflux. *Molecular Pharmacology* **69**, 1499-1505.
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.
- Müller W. E. G., Koziol C., Wiens M., Schröder H. C. (2000): Chapter 14-Stress Response in Marine Spontages: Genes and Molecules Involved and Their use as Biomarkers. *Cell and Molecular Response to Stress* **1**, 193-208.
- Nobili S., Landini I., Giglioni B., Mini E. (2006): Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Current Drug Targets* **7**, 861-879.
- Nobili S., Landini I., Mazzei T., Mini E (2012): Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Medicinal Research Reviews* **32**, 1220-1262.
- O'Reilly, C.M., Fogarty, K.E., Drummond, R.M., Tuft, R.A., Walsh, J.V. Jr. (2004): Spontaneous mitochondrial depolarizations are independent of SR Ca<sup>2+</sup> release. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **286**, 1139-1151.
- Ozben T. (2006): Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance and cancer. *FEBS Letters* **12**, 2903-2909.
- Quintieri L., Fantin M., Vizler C. (2007): Identification of molecular determinants of tumor sensitivity and resistance to anticancer drugs. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **593**, 95-104.
- Pluchino K. M., Hall M. D., Goldsborough A. S., Callaghan R., Gottesman M. M. (2012): Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *HHS Public Access Author manuscript* **15**, 98-105.
- Pozza A., Perez-Victoria J. M., Sardo A., Ahmed-Belkacem A., Di Pietro A. (2006): Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 1912-1922.
- Roe M., Folkes A., Ashworth P., Brumwell J., Chima L., Hunjan S., Pretswell I., Dangerfield W., Ryder H., Charlton P. (1999): Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**, 595-600.
- Shi Z., Jain S., Kim I. W., Peng X. X., Abraham I., Youssef D. T., Fu L. W., El Sayed K., Ambudkar S. V., Chen Z. S. (2007): Siphonol A, a marine-derived siphonane triterpene, potently reverses P-glycoprotein (ABCB1) - mediated multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Science* **98**, 1373-1380.
- Sies H. (1999): Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, 916-921.
- Sigma-Aldrich:  
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t6146?lang=en&region=CZ&gclid=EAIaIQobChMI7ZzH5LT64AIViuF3Ch2PKwOaEAAYASAAEgK2cPD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t6146?lang=en&region=CZ&gclid=EAIaIQobChMI7ZzH5LT64AIViuF3Ch2PKwOaEAAYASAAEgK2cPD_BwE) (11. 3. 2019).
- Sonneveld P., Schoester M., de Leeuw K. (1994): Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma: effect of cyklosporine on resistant tumor cells. *Journal of Clinical Oncology* **12**, 1584-1591.

- Steeghs N., Nortier J. W. R., Gelderblom H (2007): Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: An update of recent developments. *Annals of Surgical Oncology* **14**, 942-953.
- Sun Y. L., Kathawala R. J. Singh S., Zheng K., Talele T. T., Jiang W. Q., Chen Z. S. (2012): Zafirlukast antagonizes ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated multidrug resistance. *Anticancer Drugs* **23**, 865-873.
- Szakacs G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., Gottesman, M.M. (2006): Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*. **5**, 219-234.
- Szybalski W., Bryson V. (1952): Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance to *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *Journal of Bacteriology* **64**, 489-499.
- Tan B., Piwnica-Worms D., Ratner L. (2000): Multidrug resistance transporters and modulation. *Current Opinion in Oncology* **12**, 450-458.
- Thomas H., Coley H. M. (2003): Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* **10**, 159-165.
- Tiwari A. K., Sodani K., Dai C. L., Ashby C. R., Chen Z. S. (2011): Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **12**, 570-594.
- Türk D., Hall M. D., Chu B. F., Ludwig J. A., Fales H. M., Gottesman M. M., Szakács G. (2009): Identification of compounds selectively killing multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Research* **69**, 8293-8301.
- Urbatsch I. L., Sankaran B., Weber J., Senior A. E. (1995): P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 19383-19390.
- Wang D.-S., Patel A., Sim H.-M., Zhang Y.-K., Wang Y.-J., Kathawala R. J., Zhang H., Talele T. T., Ambudkar S. V., Xu R.-H., Chen Z.-S. (2014): ARRY-334543 Reverses multidrug resistance by antagonizing the activity of ATP-binding cassette subfamily G member 2. *Journal of Cellular Biochemistry* **115**, 1381-1391.
- Wu C. P., Hsieh C. H., Wu Y. S. (2011): The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics* **8**, 1996-2011.
- Wu Q., Chen M., Buchwald M. Phillips R. A. (1995): A simple, rapid method for isolation of high quality genomic DNA from animal tissues. *Nucleic Acids Research* **23**, 5087-5088.
- Yamagishi T., Sahni S., Sharp D. M., Arvind A., Jansson P. J., Richardson D. R. (2013): P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 31761-31771.
- Yu J., Zhou P., Asenson J., Yang X.-D., Wang Ch., Wei W. (2015): Advances in plant-based inhibitors of P-glycoprotein. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **31**, 867-881.
- Yuanguang L., Ming Z., Peter F. B. (1998): Chemokine Production by a Human Alveolar Epithelial Cell Line in Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* **66**, 1121-1126.
- Zhang H., Nimmer P. M., Tahir S. K., Chen J., Ryer R. M., Hahn K. R., Iciek L. A., Morgan S. J., Masarre M. C., Nelson R., Preusser L. C., Reinhart G. A., Smith M. L., Rosenberg S. H., Elmore S. W., Tse C. (2007): Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell death and differentiation* **14**, 943-951.

- Zhang H., Patel A., Ma S. L., Li X. J., Zhang Y. K., Yang P. Q., Kathawala R. J., Wang Y. J., Andreddy N., Fu L. W., Chen Z. S. (2014): In vitro, in vivo and ex-vivo characterization of inbrutinib: a potent inhibitor of MRP1 efflux function. *British Journal of Pharmacology* **171**, 5845-5857.
- Zhou S. F., Wang L. L., Di Y. M., Xue C. C., Duan W., Li C. G., Li Y. (2008): Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Current Medicinal Chemistry* **15**, 1981-2039.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	ATP binding cassette
BSO	buthionin sulfoximin
CBB	Coomassie brilliant blue
CS	kolaterální senzitivita
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FA	mravenčí kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
GSH	redukováná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
LC	kapalinová chromatografie
MDR	mnohočetná léková rezistence
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyl tetrazolium bromid
NBD	doména vázající nukleotidy u ABC transportérů
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PAGE	gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
P-gp	P-glykoprotein
PI	propidium jodid
PVDF	polyvinyliden fluorid
PSC833	valsopodar, analog cyklosporinu A
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsírán sodný
TE	Tris/EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
TKI	inhibitory tyrosinových kinas
TMD	transmembránová doména u ABC transportérů
TMRE	tetramethylrhodamin ethylester perchlorate
TRIS	tris (hydroxymethyl)aminomethan



## 9 Přílohy

Tab. P1: Souhrnný přehled chemických názvů léčiv a inhibitorů podle IUPAC.

Léčivo	IUPAC
<b>Antimycin A</b>	(2R,3S,6S,7R,8R)-3-[(3-Formamido-2-hydroxybenzoyl)amino]-8-hexyl-2,6-dimethyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-7-yl 3-methylbutanoát
<b>Bevacizumab</b>	lithium;4-[2-(diethylamino)ethylcarbamoyl]-2-iodobenzoát
<b>Biricodar</b>	1,7-dipyridin-3-ylheptan-4-yl (2S)-1-[2-oxo-2-(3,4,5-trimethoxyfenyl) acetyl] piperidin-2-karboxylát
<b>Cetuximab</b>	6-(3,3-dimethyl-2-methylidenindol-1-yl) hexanová kyselina
<b>CTP-11</b>	[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methoxy-hydroxyphosphoryl] phosphono hydrogen fosfát
<b>Cyklosporin A</b>	cyklo[((2S)-2-aminobutyryl)-sarkosyl-N-methyl-L-leucyl-L-valyl-N-methyl-L-leucyl-L-alanyl-D-alanyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-valyl-N-methyl-(4R)-4-[(E)-but-2-enyl]-4-methyl-L-threonyl]
<b>Doxorubicin</b>	(7S, 9S)-7-[(2R, 4S, 5S, 6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl] oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracen-5,12-dion
<b>Dp44mtt</b>	2-(Di-2-pyridinylmethylene)-N,N-dimethyl-hydrazinecarbothioamide, Di-2-pyridylketone-4,4,-dimethyl-3-thiosemikarbazon
<b>Elacridar</b>	N-[4-[2-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydro-1H-isochinolin-2-yl)ethyl]fenyl]-5-methoxy-9-oxo-10H-akridin-4-karboxamid

Léčivo	IUPAC
<b>Fumitremorgin C</b>	(1 <i>S</i> , 12 <i>S</i> , 15 <i>S</i> )-7-methoxy-12-(2-methylprop-1-enyl)-10,13,19-triazapentacyklo[11.7.0.0 <sup>3,11</sup> .0 <sup>4,9</sup> .0 <sup>15,19</sup> ]ikosa-3(11),4(9),5,7-tetraen-14,20-dion
<b>Gefitinib</b>	<i>N</i> -(3-chlor-4-fluorfenyl)-7-methoxy-6-(3-morfolin-4-ylpropoxy) chinazolin-4-amin
<b>Chrysin</b>	5,7-dihydroxy-2-phenylchromen-4-one
<b>Imatinib</b>	4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]- <i>N</i> -[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl) amino] enyl] benzamid
<b>Laniquidar</b>	methyl 11-[1-[2-[4-(chinolin-2-ylmethoxy)fenyl]ethyl]piperidin-4-yliden]-5,6-dihydroimidazo[2,1- <i>b</i> ] [3] benzazepin-3-karboxylát
<b>Mitoxantron</b>	(1,4-dihydroxy-5,8-bis[2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino] anthracen-9,10-dion
<b>Nalaxon</b>	(4 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,7 <i>aR</i> ,12 <i>bS</i> )-4 <i>a</i> ,9-dihydroxy-3-prop-2-enyl-2,4,5,6,7 <i>a</i> ,13-hexahydro-1 <i>H</i> -4,12-methanobenzofuro[3,2- <i>e</i> ]isoquinolin-7-one
<b>NSC73306</b>	1-[(2-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)imino]-3-(4-methoxyphenyl)thiourea
<b>Pantoprazol</b>	6-(difluoromethoxy)-2-[(3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methylsulfinyl]-1 <i>H</i> -benzimidazole