

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Vendula Klibrová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vývoj a základní charakterizace
buněčných linií rezistentních k CuET**

Bakalářská práce

Vendula Klibrová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Řeháčková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Vendula KLIBROVÁ
Osobní číslo: R170216
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Vývoj a základní charakterizace buněčných linií rezistentních k CuET.
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Teoretická část práce bude zaměřena na problematiku lékové rezistence v onkologické léčbě a aktuální trendy v jejím výzkumu. Pozornost bude věnována zejména disulfiram, který je pod svým obchodním názvem Antabus, prodáván již celou řadu let a v poslední době se u něj prokázaly protirakovinné účinky, za které odpovídá metabolit CuET. Praktická část práce bude zaměřena na selekci rakovinných buněk rezistentních k CuET. Rezistence těchto buněk bude ověřena MTS testem cytotoxicity a následně bude provedena základní charakterizace buněk.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nature Reviews Clinical Oncology. 2018. volume 15, 81-94 Skrott Z., Mistrik M etc. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adapter NPL4. Nature. 2017 Dec 14; 552(7684): 194-199. Gillet JP, Gottesman MM. Mechanism of multidrug resistance in cancer. Methods Mol Biol. 2010; 596:47-76

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Lenka Řeháčková
Ústav molekulární a translační medicíny



Datum zadání bakalářské práce: 12. října 2018
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2020

V Olomouci dne 8. listopadu 2018

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLIE A GENETIKY
Štepaňova 27, 779 00 Olomouc, tel. 585 431 111
www.upol.cz

21-03-2019



L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Vendula Klibrová

Název práce: Vývoj a základní charakterizace buněčných linií rezistentních k CuET

Typ práce: bakalářská práce

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

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Řeháčková

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: disulfiram, mnohočetná léková rezistence

Počet stran: 39

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem a základní charakterizací buněčných linií rezistentních k CuET. V teoretické části je popsána léková rezistence se zaměřením na mnohočetnou lékovou rezistenci a mechanismus jejího vzniku. Dále jsou popsány rakovinné buňky jako model ve výzkumu léků, větší pozornost pak byla věnována myším modelům. Nakonec byla popsána samotná látka zvaná CuET, u které byly prokázány protirakovinné účinky.

Experimentální část se zaměřuje na selekci rakovinných buněk rezistentních k CuET. U rezistentních i nerezistentních linií se stanovovala střední inhibiční koncentrace (IC_{50}) pomocí MTS testu cytotoxicity. Dále byly linie testovány pro stanovení exprese P-glykoproteinu a MRP1 proteinu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Vendula Klibrová

Title: Development and Basic Characterization of Cell Lines Resistant to CuET

Type of thesis: bachelor thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Lenka Řeháčková

The year of presentation: 2020

Keywords: disulfiram, multi-drug resistance

Number of pages: 39

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY

This bachelor thesis deals with the development and basic characterization of cell lines resistant to CuET. The theoretical part describes drug resistance with a focus on multiple drug resistance and the mechanism of its development. Furthermore, cancer cells are described as a model in drug research, and more attention was paid to mouse models. Finally, a substance called CuET itself has been described, which has been shown to have anti-cancer effects.

The experimental part focuses on the selection of CuET-resistant cancer cells. For both resistant and non-resistant lines, the mean inhibitory concentration (IC₅₀) was determined using the MTS cytotoxicity assay. Next, the lines were tested to determine the expression of P-glycoprotein and MRP1 protein.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně a za pomoci vedoucí mé práce Mgr. Lenky Řeháčkové. Dále prohlašuji, že veškerá literatura použita v mé práci je řádně ocitována.

V Olomouci dne

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ:

Prvně bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce Mgr. Lence Řeháčkové za ochotu a rady při vypracovávání bakalářské práce a trpělivost při jejím zpracovávání. Dále bych chtěla poděkovat všem laborantům z Ústavu molekulární a translační medicíny za pomoc s experimentální částí mé práce a grantům IGA LF UP 2019_018 a GAČR 19-08124. Nakonec bych chtěla poděkovat i mé rodině a přátelům, kteří mě vždy podporovali a byli mi oporou při zpracovávání mé bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1	Rakovinné onemocnění.....	3
3.1.1	Obecná charakteristika	3
3.1.2	Buněčný cyklus	5
3.1.3	Regulace buněčného cyklu (cyklin-dependentní kinázy).....	5
3.1.4	Kontrolní body buněčného cyklu	6
3.1.5	Klasifikace rakovinných onemocnění	7
3.1.6	Trendy v onkologické léčbě	8
3.2	Lékové rezistence.....	9
3.2.1	Charakterizace.....	9
3.2.2	Typy lékové rezistence.....	9
3.2.3	Mechanismus vzniku lékové rezistence	9
3.2.4	Překonání lékové rezistence v protirakovinné léčbě.....	10
3.3	Rakovinné buňky jako model ve výzkumu léků	11
3.3.1	Myší modely.....	12
3.4	Disulfiram	12
3.4.1	Mechanismus účinku disulfiramu	13
3.4.2	Aplikace v léčbě.....	13
3.5	Nádorová heterogenita	13
3.5.1	Inter-tumorová heterogenita.....	14
3.5.2	Intra-tumorová heterogenita.....	14
4	MATERIÁL A METODY	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.1.1	Buněčné linie.....	15
4.1.2	Ostatní biologický materiál	15
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	15

4.2.1	Použité chemikálie a roztoky	15
4.2.2	Kultivační média	16
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	16
4.4	Další pomůcky	17
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	17
4.5.1	Kultivace buněčných linií	17
4.5.2	Pasážování buněčných linií	17
4.5.3	Počítání buněk	18
4.5.4	Příprava rezistentních linií	18
4.5.5	MTS test	18
4.5.6	Testování exprese Pgp a MRP1	20
5	VÝSLEDKY	22
5.1	Selekce rezistentních buněk	22
5.2	Stanovení IC50 pomocí MTS testu cytotoxicity	22
5.3	Testování exprese Pgp a MRP1 pomocí průtokového cytometru	25
6	DISKUZE	31
7	ZÁVĚR	33
8	LITERATURA	34

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK:

Zkratka:	Význam:
ABC	Kazeta vázající ATP (z anglického ATP Binding Cassette)
CDK	Cyklin-dependentní kinázy
CKI	CDK-inhibitory
DDTC	Diethyldithiokarbamát (z anglického diethyldithiocarbamate)
LDNP	Nanočástice s nízkou hustotou (z anglického low-density nanoparticle)
MDR	Mnohočetná léková rezistence (z anglického multiple drug resistance)
MRP1	Protein asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí (z anglického multidrug resistance-associated protein)
PDX	Xenografty odvozené od pacienta (z anglického Patient-derived Xenografts)
Pgp	P-glykoprotein (z anglického P-glycoprotein)
PLC	Fosfolipáza C (z anglického Phospholipase C)
RB	Retinoblastom

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek 1: Schéma nanášení vzorků na destičku pro MTS test cytotoxicity.	19
Obrázek 2: Graf výsledků MTS testu cytotoxicity selektovaných buněčných linií U87 v závislosti na použité formě CuET.	24
Obrázek 3: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u parentální buněčné linie U87 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	25
Obrázek 4: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-CuET (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	25
Obrázek 5: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-albumin (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	26
Obrázek 6: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-HPMC (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	26
Obrázek 7: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-kolidon 17 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	27
Obrázek 8: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u parentální buněčné linie U87 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	27
Obrázek 9: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-CuET (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	28
Obrázek 10: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-albumin (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	28
Obrázek 11: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-HPMC (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	29
Obrázek 12: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-kolidon 17 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).	29

SEZNAM TABULEK:

Tabulka 1: Výsledky MTS testu cytotoxicity selektovaných buněčných linií U87 v závislosti na použité formě CuET.....	23
Tabulka 2: Výsledek analýzy Pgp pomocí průtokového cytometru u buněčné linie U87.....	30
Tabulka 3: Výsledek analýzy MRP1 pomocí průtokového cytometru u buněčné linie U87.....	30

1 ÚVOD

Rakovina je různorodá skupina onemocnění, při kterých dochází k nekontrolovatelnému a autonomnímu růstu buněk v organismu. Nádorové buňky mají schopnost neomezeného dělení i bez některých růstových faktorů. Mohou se šířit i do ostatních tkání a vytvářet tak metastáze. Bujení buněk může být neškodné, příkladem jsou bradavice, jiné mohou být život ohrožující, jako například leukémie (Cooper, 2000).

Rakovina je celosvětově druhou hlavní příčinou úmrtí a v roce 2018 způsobila asi 9,6 milionů úmrtí. Nejčastějšími typy je rakovina plic, prsu, prostaty, kůže a kolorektální rakovina (World Health Organisation, 2020).

Hlavním problémem v léčbě rakoviny je snížení účinnosti léčiva, které je známé jako léková rezistence. Pokud jsou buňky rezistentní na strukturně a funkčně odlišná léčiva, jedná se o mnohočetnou lékovou rezistenci (Alfarouk a kol., 2015). V lékové rezistenci hrají klíčovou roli tzv. effluxové pumpy. Jedná se o membránové transportní proteiny vyžadující energii k exportu substrátů. Mohou být selektivní pro specifické léčivo nebo polyspecifické, které mohou exportovat více strukturně odlišných léčiv (Venter a kol., 2017).

Buněčné linie rezistentní na léčivo jsou vyvíjeny tak, aby napodobovaly stavy pacientů s rakovinou během chemoterapie. Laboratorní modely na vysoké úrovni jsou vyvíjeny s cílem pochopit možný mechanismus rezistence vůči chemoterapeutickým látkám (McDermott a kol., 2014).

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část práce byla zaměřena na problematiku lékové rezistence v onkologické léčbě a aktuální trendy v jejím výzkumu. Pozornost byla věnována zejména disulfiramu, který je pod svým obchodním názvem Antabus prodáván od roku 1952, a v poslední době se u něj prokázaly protirakovinné účinky, za které odpovídá metabolit CuET.

Praktická část práce byla zaměřena na selekci rakovinných buněk rezistentních k CuET. Rezistence těchto buněk byla ověřena MTS testem cytotoxicity a následně byla provedena základní charakterizace buněk.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rakovinné onemocnění

3.1.1 Obecná charakteristika

Buňky jsou základní jednotky tvořící lidské tělo, které rostou a dělí se. Poškozené nebo mrtvé buňky jsou nahrazeny novými, čímž se tkáň obnovuje.

Některé buňky rostou samovolně, protože organismus nemůže jejich růst ovlivnit, a vzniká rakovina. Nádorové onemocnění může také způsobit vznik tzv. tumorů, které jsou charakterizované jako jakýkoliv otok tkáně (zduření), jehož příčinou může být kromě nádorového onemocnění i infekce nebo alergická reakce (Alder a Hollar, 2019).

Rakovinná onemocnění jsou způsobena exogenními chemickými (anorganické i organické sloučeniny), fyzikálními (např. UV záření nebo radiace) nebo biologickými karcinogeny (některé druhy virů a bakterií). Jak efektivně exogenní karcinogeny vyvolávají rakovinu u konkrétní osoby, silně závisí na expozici jedince, na konkrétních reakcích a na celkovém zdraví. Z toho vyplývá, že endogenní procesy se také podílejí na vývoji rakoviny prostřednictvím modulace reakce na exogenní karcinogeny (Schulz, 2005).

Rakovinné bujení často závisí na vadné kontrole buněčné smrti, diferenciaci buněk nebo obojím (Alberts, 2002) a je způsobeno změnami v onkogenech, tumor-supresorových genech a genech microRNA, tyto změny jsou obvykle somatické. Jediná genetická změna je málokdy dostatečná pro vývoj maligního nádoru, většinou se jedná o vícestupňový proces sekvenčních změn v několika genech (Croce, 2008).

Jednotlivé geny vykazují bodové mutace, jako jsou inserce a delece, nebo mohou být ovlivněny chromozomálními translokacemi nebo inverzemi. Tyto změny vedou k expresi změněných genových produktů, ke snížení nebo zvýšení genové exprese nebo k novým genovým produktům, jako jsou fúzní proteiny. Navíc jsou rakovinné buňky často aneuploidní a vykazují numerické anebo strukturální změny chromozomů. Patří k nim ztráta nebo získání chromozomů nebo chromozomálních částí, jakož i přeskupení a rekombinace (Schulz, 2005).

Onkogeny kódují proteiny, které řídí proliferaci buněk, apoptózu nebo obojí. Lze je aktivovat strukturálními změnami vznikajícími mutací nebo fúzí genů, juxtapozicí na enhancerové prvky, nebo amplifikací. Iniciačními faktory jsou translokace a mutace, které mohou nastat i během progresu nádoru, zatímco zesílení obvykle nastane až během progresu (Croce, 2008).

Rakovinné buňky vytvářejí nádory, které mohou být maligní, nebo benigní. Rakovinný nádor je maligní, pokud může růst a šířit se do dalších částí těla. Benigní nádor je takový, který sice roste, ale nemůže se šířit. Některé typy rakoviny však netvoří nádory. Patří k nim leukémie, většina typů lymfomů a myelom (Cancer.Net Editorial Board, 2019).

Některé geny řídí životní cyklus buňky, tedy růst, funkci, dělení a smrt. Pokud jsou tyto geny poškozeny, ztrácí se rovnováha mezi normálním růstem buněk a smrtí. Rakovinné buňky vznikají poškozením DNA a nekontrolovaným růstem buněk (Otto a Sicinski, 2017). Faktory, které způsobují poškození DNA, a tím pádem zvyšují riziko rakoviny, mohou být různého typu. Jedná se například o mutace, epigenetické změny nebo působení mikrobů (Pinoli a kol., 2019).

Poškození zdravých buněk ale může způsobit i samotná léčba rakoviny, jako je chemoterapie, ozařování nebo imunosupresivní léky. Vědci však vyrábějí léky, které způsobují menší poškození zdravých buněk. Jedná se například o cílenou terapii, kdy se používají léky cílené na konkrétní typ rakovinných buněk (Samnienggam a Phienthrakul, 2016).

Cílená terapie je typem léčby rakoviny, která je specifická pro rakovinné buňky a inhibuje procesy přenosu signálu, jelikož transdukce signálu je příčinou růstu a dělení rakovinných buněk. Tento typ léčby má méně vedlejších účinků než chemoterapie (Samnienggam a Phienthrakul, 2016).

Při cílené terapii se využívají léky, které jsou dostatečně malé, aby snadno vstoupily do buněk. Mnohé z nich jsou inhibitory tyrosin-kinázy, jako jsou například Imatinib, který se používá pro léčbu chronické myeloidní leukémie a gastrointestinálního stromálního tumoru (Claudiani a Apperley, 2018), Bortezomib, což je inhibitor proteazomu indukující apoptózu, který způsobuje, že rakovinné buňky podléhají buněčné smrti interferencí s proteiny a používá se k léčbě mnohočetného myelomu (Djebbari a kol., 2018), nebo Salinomycin, u kterého byla prokázána účinnost při ničení rakovinných kmenových buněk laboratorně vytvořených i přirozeně se vyskytujících nádorů prsu u myši (Dewangan a kol., 2017).

Dále se v cílené terapii používají monoklonální protilátky, také známé jako terapeutické protilátky. Jedná se o proteiny produkované v laboratoři a jsou určeny k navázání na specifická místa rakovinných buněk. Některé monoklonální protilátky označují rakovinné buňky tak, aby je imunitní systém lépe viděl a zničil (National Cancer Institute, 2020). Mezi takové protilátky patří Pembrolizumab, který se používá pro léčbu melanomu nebo Hodgkinova lymfomu (Kwok a kol., 2016). Jiné protilátky přímo zastavují růst rakovinných buněk nebo způsobují jejich destrukci, popřípadě přenášejí toxiny do rakovinných buněk (National Cancer Institute, 2020). Jedná se například o Trastuzumab, což je lék na rakovinu prsu a žaludku, u kterých rakovinné buňky nadměrně exprimují gen HER2 (Sarosiak a Morawski, 2018).

3.1.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je soubor organizovaných a monitorovaných událostí, který je zodpovědný za správnou separaci buňky na dvě dceřiné, přičemž dochází k segregaci chromozomů, a tedy i k rozdělení genetické informace (Diaz-Moralli a kol., 2013).

Jedná se o vysoce energeticky náročný proces, který se skládá z dílčích fází: G1 fáze, kde dochází k růstu buňky, S fáze, ve které se replikují chromozomy a dochází tedy ke zdvojnásobení obsahu DNA, a G2 fáze, kde dochází k dalšímu růstu buňky. Nakonec proběhne M fáze, ve které probíhá mitotické nebo meiotické dělení buňky (Barnum a O'Connell, 2014).

M fáze se skládá ze čtyř etap: profáze, metafáze, anafáze a telofáze. V profázi replikované chromozomy, které se skládají ze dvou sesterských chromatid, kondenzují. Mimo jádro se mitotické vřeténko shromáždí mezi dvěma centrozomy, které se replikovaly a pohybovaly se od sebe. Prometafáze začíná rozpadem jaderné membrány. Na chromozomy se připojují mikrotubuly vřeténka v oblasti zvané kinetochor. V metafázi jsou chromozomy řazeny do ekvatoriální roviny a kinetochorové mikrotubuly začínají přitahovat sesterské chromatidy k opačným pólům buňky. V anafázi jsou sesterské chromatidy rovnoměrně separovány pro vytvoření dvou dceřiných buněk. Během telofáze jsou již chromozomy umístěny v opačných pólech buňky. Je sestavena nová jaderná membrána kolem každé sady chromozomů. Následuje cytokineze, při které je cytoplazma rozdělena do dvou pomocí kontraktálního prstence, čímž vzniknou dvě dceřiné buňky (Alberts a kol., 2002).

3.1.3 Regulace buněčného cyklu (cyklin-dependentní kinázy)

Hlavními mechanismy, které řídí průběh buněčného cyklu, jsou cyklin-dependentní kinázy. CDK obsahují serin/threonin-specifické katalytické jádro a váží se na regulační podjednotky známé jako cykliny, které řídí kinázovou aktivitu a substrátovou specificitu (Lim a Kaldis, 2013). Cykliny jsou regulovány četnými proteiny, včetně p53, p21, p16 a cdc25 (Schafer, 1998). Molekuly CDK jsou aktivovány jejich fosforylací threoninového zbytku blízko místa kinázové aktivity (Morgan, 2007).

Činnosti těchto kináz rostou a klesají, jak buňka postupuje cyklem, což vede k cyklickým změnám ve fosforylaci intracelulárních proteinů, které iniciují nebo regulují hlavní události buněčného cyklu. Například zvýšení aktivity CDK v kontrolním bodě G₂/M zvyšuje fosforylaci proteinů, které kontrolují kondenzaci chromozomů, rozklad jaderných obalů, sestavení vřetena a další události, které se vyskytují na začátku mitózy (Alberts, 2002).

Všechny CDK mají terciární strukturu zahrnující malý lalok na aminovém konci a velký lalok na karboxylovém konci, který brání proteinovým substrátům v navázání se do aktivního místa. ATP se jednoduše vejde do štěrbin mezi laloky tak, že fosfáty jsou orientovány ven, směrem k ústí štěrbin. V neaktivních CDK je několik postranních řetězců aminokyselin v aktivním místě nesprávně umístěno, takže fosfáty ATP nejsou ideálně orientovány pro kinázovou reakci (Morgan, 2007).

CDK fosforylují klíčové substráty pro podporu syntézy DNA a mitózy a vyžadují vazbu regulační cyklinové podjednotky, která aktivuje kinázu tím, že způsobuje konformační změny blízko aktivního místa. Tyto strukturální změny umožňují kináze vazbu ATP a substrátů v orientaci, která podporuje přenos terminálního fosfátu ATP do cílového serinového nebo threoninového zbytku v substrátu (Rhind a Russell, 2012).

Existují čtyři třídy cyklinů, z nichž každá je definována fází buněčného cyklu, ve kterém se váží na CDK a jejich funkcí. Všechny eukaryotické buňky vyžadují tři z těchto tříd: G1/S-cykliny aktivují CDK v pozdní G1 fázi a tím pomáhají spouštět progresi pomocí kontrolního bodu Start, což vede k závazku ke vstupu do buněčného cyklu. Hladina těchto cyklinů spadá do S fáze. S-cykliny vážou CDK brzy po progresi pomocí Start a pomáhají stimulovat duplicitu chromozomů. Hladiny S-cyklinů zůstávají zvýšené až do mitózy a tyto cykliny také přispívají ke kontrole některých časných mitotických událostí. M-cykliny aktivují CDK, které stimulují vstup do mitózy v kontrolním bodě G2 / M (Alberts, 2002).

Cykliny G1 ve spojení s CDK4, CDK6 a CDK2 regulují vstup do buněčného cyklu, zatímco S-fázi a přechod z G2 do M fáze reguluje CDK1 (do S fáze se zapojuje i CDK2) vázanou na jednotku rodiny B-typu cyklinů. Komplex CDK1-cyklin-B je také známý jako faktor podporující M fázi (Rhind a Russell, 2012).

Aktivita CDK může být také negativně regulována vazbou malého proteinového inhibitoru (CDK-inhibitory) nebo inhibiční fosforylací tyrosinu, která blokuje přenos fosfátů na substráty (Barnum a O'Connell, 2014). Byly identifikovány dvě rodiny CDK inhibitorů: INK, které jsou v lidských nádorech inaktivovány delecí genu, bodovou mutací nebo metylací, a KIP/CIP inhibitory, které jen zřídka podléhají mutacím (Schmidt a Fan 2001).

3.1.4 Kontrolní body buněčného cyklu

S cílem zachovat velikost buňky a zajistit, aby každá dceřiná buňka byla vybavená odpovídajícím množstvím genetického a biosyntetického materiálu, musí před rozdělením přesně zdvojnásobit svůj obsah. Existence kontrolních bodů pro velikost buněk jim umožňuje koordinovat jejich velikost během buněčného cyklu. Kontrolní body se nacházejí v G1, G2 fázi a mezi metafází a anafází (Barnum a O'Connell, 2014).

Kontrolní body zastaví buněčný cyklus v reakci na poškození DNA nebo její neúplnou replikaci. Důležitost těchto bodů a jejich kontroly pro správné rozdělení buněk je spojována s vysokou frekvencí mutací nalezených v jejich regulačních proteinech během onkogeneze (Massague, 2004).

Prvním kontrolním bodem je Start (neboli restriční bod) na konci fáze G_1 , kde se buňka zavazuje ke vstupu do buněčného cyklu a duplikování chromozomů. Druhým je kontrolní bod G_2/M , kde řídicí systém spouští včasné mitotické události, které vedou k zarovnání chromozomů na vřetenu v metafázi. Třetí je přechod z metafáze do anafáze, kde kontrolní systém stimuluje separaci sesterských chromatidů, což vede k dokončení mitózy a cytokineze (Alberts, 2002).

Pokud řídicí systém detekuje problémy uvnitř nebo vně buňky, blokuje postup v každém z těchto kontrolních bodů. Pokud kontrolní systém například zjistí problémy při dokončení replikace DNA, bude udržovat buňku v kontrolním bodě G_2/M , dokud tyto problémy nebudou vyřešeny. Podobně, pokud extracelulární podmínky nejsou vhodné pro proliferaci buněk, řídicí systém blokuje progresi skrze Start, čímž brání dělení buněk, dokud se podmínky nestanou příznivými (Morgan, 2007).

Regulační protein, který je často mutovaný během rakovinného onemocnění, je tumor-supresorový protein retinoblastomu. RB je účinný inhibitor transkripce $G_1 - S$, tj. transkripční proces, který se iniciuje během G_1 fáze a je následně inaktivován během S fáze (Bertoli a kol, 2013).

3.1.5 Klasifikace rakovinných onemocnění

Rakovinná onemocnění se dělí podle tkáně, kterou napadají. Sarkomy jsou různorodá skupina malignit pocházejících z pojivové tkáně a dělí se do dvou skupin: sarkom měkkých tkání a primární kostní sarkom (Ceysens a Stroobants, 2011).

Karcinomy jsou nejčastějším typem rakoviny (každý rok je okolo 14 miliónů nových případů) a jedná se o rakovinu epitelové tkáně kůže nebo tkáně, která lemuje vnitřní orgány, jako jsou játra nebo ledviny. Karcinomy se mohou rozšířit do jiných částí těla nebo se mohou omezit na primární místo (Lemoine a kol, 2001). Toto onemocnění má různé formy: karcinom *in situ* (je omezen pouze na primární tkáň a nerozšiřuje se do okolních tkání), invazivní karcinom (šíří se z primární tkáně do okolí) a metastatický karcinom (rozšiřuje se po celém těle do dalších tkání a orgánů) (CancerCenter, 2020).

Leukémie je označení pro rakovinu krve a její druh závisí na typu krevních buněk, které rakovina postihne, a na rychlosti růstu rakovinných buněk. Může se tedy jednat o myeloidní, lymfoblastické či lymfocytární leukémie, které mohou být akutního či chronického charakteru. Leukémie se nejčastěji vyskytuje u dospělých jedinců starších 55 let a u dětí mladších 15 let (dohromady se vyskytuje asi 300 000 nových případů leukémie ročně) (National Cancer Institute, 2020).

3.1.6 Trendy v onkologické léčbě

Rakovina je jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě, ročně zemře kolem 9 miliónů lidí na různá rakovinná onemocnění (Ahmad a kol., 2015). Mezi stávající možnosti léčby patří chirurgické odstranění nádorů, chemoterapie, radiační terapie, transplantace kostní dřeně či imunoterapie. Radiační terapie je sice toxická pro rakovinu, ale také pro zdravé buňky, což způsobuje pacientovi vážné vedlejší účinky (Asna a kol., 2018).

Chemoterapie je typ léčby rakoviny využívající jedno nebo více protirakovinových léčiv (chemoterapeutická činidla), které primárně poškozují prolifерující buňky. Je u nich pozorována selektivita vůči rakovinným buňkám, protože některé nádory jsou vysoce prolifерativní ve srovnání s normálními buňkami nebo jsou defektní ve své schopnosti opravit poškození DNA (Corrie, 2008).

V imunoterapii rakoviny se používají činidla k aktivaci nebo posílení aktivace imunitního systému k napadení rakovinných buněk prostřednictvím přirozených mechanismů. Prvním prodáváním imunoterapeutikem byla rekombinantní verze cytokinového interferonu- α (IFN α), který byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) v roce 1986 pro vlasatobuněčnou leukémii (Riley a kol., 2019).

Při radiační terapii se využívá ionizující záření ukládající energii do buněk tkání, kterými prochází. Tato uložená energie může zabít rakovinné buňky nebo způsobit genetické změny vedoucí k smrti rakovinných buněk. Vysokoenergetické záření poškozují genetický materiál buněk a blokuje tak jejich schopnost se dále dělit a množit. Protože záření poškozují jak normální buňky, tak i ty rakovinné, cílem radiační terapie je maximalizovat dávku záření pro abnormální rakovinné buňky a zároveň minimalizovat expozici normálním buňkám, které sousedí s rakovinnými buňkami nebo jsou v cestě záření (Baskar a kol., 2012).

Nejčastější onkologická onemocnění, která postihují děti, jsou leukémie, tedy rakovina buněk kostní dřeně, lymfom, rakovina imunitního systému, a rakoviny mozku, popřípadě další rakoviny postihující centrální nervový systém (The Lancet Haematology, 2019). Dospělí jedinci naproti tomu trpí častěji rakovinou prsu nebo plic, popřípadě melanomy nebo sarkomy (Bleyer, 2008).

Protože je genetická skladba každého jedince odlišná, jsou odlišné i genetické změny u stejného typu rakoviny. To vyžaduje konkrétní a individuální léčbu pro každého jednotlivce. Studium genetického a klinického profilu pacienta je tedy základem precizní medicíny. Pro identifikaci vhodného léku pro léčbu se na nádoru pacienta provádí řada testů DNA, aby se identifikovaly genetické změny nebo mutace odpovědné za nádor. Poté následuje výběr nejlepší dostupné léčby, která by se zaměřila na mutovanou nádorovou DNA (Badwaik, 2019).

3.2 Lékové rezistence

3.2.1 Charakterizace

Jedná se o vrozenou nebo získanou schopnost rakovinných buněk vyhýbat se účinkům léčiv, a proto je to jedno z nejnáléhavějších témat ve výzkumu léčby rakoviny. Léková rezistence může vzniknout v důsledku několika faktorů souvisejících s hostitelem nebo se samotným nádorem. Spousta současných výzkumů je zaměřena na tumor-specifické faktory a konkrétně na geny, které akumulují léčiva uvnitř maligně transformovaných typů buněk, tedy zpracovávají expresi pump (Alfarouk a kol., 2015).

3.2.2 Typy lékové rezistence

Léková rezistence může být různého typu. Primární (vrozená) rezistence je založena na přítomnosti počátečních obranných reakcí proti působení léčiva. Nastává tedy již při prvním kontaktu s danou látkou, aniž by jí byl předtím vystaven (Hamilton a Rath, 2014). K sekundární (získané) rezistenci dochází v důsledku předchozí specifické léčby způsobené nevhodným užíváním léčiva (neadekvátní léčba nebo nedodržování léčby) (Lippert a kol., 2011).

Mnohočetná léková rezistence je charakterizována jako odolnost vůči strukturně a funkčně odlišným léčivům (Magiorakos a kol., 2012). Křížová rezistence je typ rezistence vůči látce, která je strukturně a funkčně podobná té, které byly buňky vystaveny. (Sanders, 2001).

3.2.3 Mechanismus vzniku lékové rezistence

Existují tři základní mechanismy vzniku lékové rezistence: farmakokinetické, cytokinetické a funkční změny buňky. Při farmakokinetických změnách dochází ke změnám v metabolismu léčiva, a to zrychlením biotransformace nebo snižováním resorpce léčiva (Nosková, 2000). Při cytokinetických změnách dochází ke změně buněčného cyklu, kdy většina buněk přejde do G₀ fáze, kde je jejich citlivost k léčbě omezená (Beaumont et al., 2016). Funkční změny buňky jsou pak nejčastější příčinou vzniku rezistence, kterou doprovází snížená koncentrace nebo aktivita enzymů, které jsou potřebné pro přeměnu daného léčiva na účinnou látku (Longley, 2005).

Možné mechanismy MDR zahrnují ABC transportéry, u člověka jich je známo 48 a 12 z nich bylo rozpoznáno jako lékové transportéry, zahrnující známý P-glykoprotein (kódovaný ABCB1 genem), protein asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí (kódovaný ABCC1 genem) a protein rezistence k rakovině prsu (BCRP, kódovaný ABCG2 genem). Pacienti s rakovinou, kteří nereagují na chemoterapii, mají obvykle vysokou expresi různých ABC transportních pump, které jsou umístěny na cytoplazmatické straně rezistentní buněčné membrány, což vede ke zvýšenému effluxu léčiva (Wu a kol., 2014).

3.2.4 Překonání lékové rezistence v protirakovinné léčbě

Identifikace mechanismů vedoucích k vlastní nebo získané mnohočetné lékové rezistenci je důležitá pro další rozvoj účinné terapie. Léková rezistence v rakovinových buňkách je často výsledkem zvýšené exprese konkrétních proteinů, jako jsou transportéry buněčné membrány, což může vést ke zvýšení vylučování cytotoxických léčiv z rakovinných buněk, čímž se snižuje jejich intracelulární koncentrace (Ambudkar, 1999). Jedná se například o ABC transportéry, které patří do skupiny transportních proteinů. Přispívají k rezistenci vůči lékům prostřednictvím ATP-dependentní lékové effluxové pumpy (Gottesman, 2002).

Existuje mnoho studií, které popisují překonání lékové rezistence s využitím inhibice MDR transportérů pro potlačení nebo obcházení MDR mechanismů. Řešením pro eliminaci lékové rezistence je použití protirakovinných léků, které nebudou interagovat s ABC transportéry (Choi, 2005). Překonání rezistence na protirakovinná léčiva může být docíleno podáváním sloučenin, které by samy o sobě nebyly toxické, ale inhibovaly by ABC transportéry. Sloučeniny, které mohou zvrátit lékovou rezistenci, se nazývají inhibitory MDR, MDR modulátory, MDR reverzní látky nebo chemosenzibilizátory (Liscovitch, 2002).

Klinické studie pomohly odhalit problémy spojené s kombinací chemoterapie protirakovinných léčiv společně s inhibitory MDR. Prvním faktorem, který musí být stanoven před zahájením klinické léčby, je identifikace ABC transportního proteinu, který je zapojený do lékové rezistence, a použití protinádorového léčiva, který bude mít prospěch z inhibice tohoto transportního proteinu. Druhým faktorem je sledování plazmatické koncentrace a účinnosti testovaného inhibitoru MDR v živém organismu, aby se ověřilo, že účinnost koncentrace inhibice byla dosažena *in vivo* (Ozben, 2006).

Obecně lze inhibitory MDR rozdělit do tří skupin: inhibitory transportu MDR první generace, druhé generace a třetí generace (Kathawala a kol, 2015). Inhibitory transportu MDR první generace mají nízkou terapeutickou odpověď a vysokou buněčnou toxicitu, proto byly rychle nahrazeny druhou generací inhibitorů. Mezi tyto inhibitory patří verapamil, cyklosporin A, trifluoperazin, quinidin a progesteron (Bechtel a kol, 2008).

Inhibitory transportu MDR druhé generace jsou modifikací inhibitorů první generace a byly navrženy za účelem získání vyšší účinnosti, specificity a nízké buněčné toxicity. Patří zde dexverapamil, valspodar a biricodar citrát. Valspodar je nejčastěji používaný inhibitor se silou 5–10krát vyšší než u cyklosporinu A. Nicméně jsou tyto transportní inhibitory také často inhibitory cytochromu P450, a proto mohou způsobovat lékové interakce se současnými protirakovinovými léky (Gottesman a kol, 2006).

Inhibitory transportu MDR třetí generace mohou být při nanomolárních koncentracích více než 200x účinnější při reverzi MDR než u inhibitorů první a druhé generace, zatímco nevykazují téměř žádnou farmakokinetickou interakci s ostatními chemoterapeutiky. Patří zde tariquidar, zosuquidar, laniquidar, elacridar, mitotane a annamycin (Li a kol 2016).

V praxi se využívají inhibitory P-glykoproteinu, který je klíčovým proteinem v mnohočetné lékové rezistenci rakovinných buněk. Inhibice funkce Pgp může být použita jako účinná strategie pro zvýšení účinnosti protinádorových léčiv (Liu a kol., 2018). Látkami, které se v praxi využívají jako léky pro inhibici P-glykoproteinu, jsou například quinidine, verapamil nebo erytromycin (Eberl, 2007).

3.3 Rakovinné buňky jako model ve výzkumu léků

Pokud chceme překonat problém s vývojem protirakovinných léčiv, musíme být schopni vytvořit dostatečně přesné modely, které nám umožňují pozorovat účinky různých terapií. Základem je obecný výpočetní model se schopností předpovídat samotné a vedlejší účinky různých léků a jejich kombinací, které jsou individualizovány na základě podrobné charakterizace pacienta pomocí molekulárních, sensorových a jiných technik. Například v onkologii bychom měli ideálně odrážet heterogenitu nádoru pomocí modelování jednotlivých nádorových buněk, včetně stromy, pro stanovení buněčné odpovědi (Ogilvie, 2017).

Rakovinné buňky, jakožto buněčné onemocnění, jsou vhodné jako modely ve výzkumu léků. Jejich užitečnost je primárně spojena se schopností poskytovat neurčitý zdroj biologického materiálu pro experimentální účely. Za správných podmínek a s vhodnou kontrolou si autentizované rakovinné buněčné linie zachovávají většinu genetických vlastností původního organismu, ze které byly tyto buňky získány (Mirabelli a kol., 2019).

Vysoká úroveň financování výzkumu rakoviny v posledních desetiletích navíc přinesla mnoho znalostí potřebných ke stanovení obecných výpočetních modelů, jako jsou informace o základních mechanizmech rakoviny a efektech léčiv, včetně molekulárních cílů (Santos, 2016).

Napadené tkáně lze také získat jako chirurgický nebo biopsický materiál. To znamená, že můžeme skutečně pozorovat změny vyskytující se v genomu a transkriptu nádoru, což usnadňuje pochopení pravděpodobných funkčních důsledků (Ogilvie, 2017).

3.3.1 Myší modely

PDX modely, tedy odvozené xenoimplantáty pacientů, jsou pokročilé onkologické modely pro vývoj protinádorových léčiv. Zavedení těchto modelů ke studiu biologie a farmakologie je v dnešní době běžnou praxí a byly úspěšně použity u mnoha typů rakoviny (Jo, 2019). PDX modely se vytvářejí tak, že se do imunodeficitních myší implantují rakovinné buňky nebo tkáně z primárních nádorů pacientů pro simulování lidských nádorů *in vivo*. Tyto modely jsou biologicky stabilní a přesně napodobují nádory pacientů s ohledem na histopatologii, genovou expresi, genetické mutace, zánět a terapeutickou odpověď (Kuracha, 2016).

Současné myší modely často neshrnují základní charakteristiky lidských onemocnění, což omezuje klinickou převoditelnost a bezpečnost v klinických studiích na lidech. Hlavní slabiny stávajících preklinických studií lze překonat navržením inteligentních humanizovaných myší, které jsou ověřeny standardizovaným způsobem na základě klinických dat lidí. Navrhovaný přístup humanizovaného myšího modelu slučuje techniky tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny za účelem vytvoření humanizovaného mikroprostředí v myši. Tento model může sloužit jako slibný nástroj pro základní výzkum a vývoj léků (Landgraf, 2018).

Vytváření transgenních myší zahrnuje pět základních kroků: purifikace transgenní směsi, odebrání dárcovských zygot, mikroinjekce transgenní směsi, implantace mikroinjektovaných zygot do pseudopregnantních recipientních myší a genotypizace a analýza transgenní exprese u myší (Cho, 2009).

3.4 Disulfiram

Disulfiram je schválený lék pro léčbu závislosti na alkoholu. V těle se redukuje na terapeuticky aktivní diethyldithiokarbamát. Tím byl vyvinut DDTC-polymerní konjugát citlivý k redukci pro cílenou léčbu rakoviny (Liu, 2012).

Bylo zjištěno, že DDTC-polymerní konjugát modifikovaný ligandem zaměřeným na β -d-galaktózový receptor se může sám sestavit do LDNP nanočástic a účinně tak vstoupit do rakovinných buněk pomocí receptorem zprostředkované endocytózy (He, 2018). Po absorpci buněk, nanočástice LDNP degradují a uvolňují DDTC v důsledku štěpení disulfidových vazeb a následně tvoří komplex DDTC s mědí (známý jako CuET) pro zničení širokého spektra rakovinných buněk (Gupte, 2009).

Disulfiram je také schopen inhibovat enzym dopamin β -hydroxylázu (DBH), který přeměňuje dopamin na norepinefrin. Tento mechanismus byl zdokonalen jako možné vysvětlení výskytu psychózy během léčby disulfiramem, a to buď v monoterapii, nebo v kombinované terapii, kdy by mohla nastat psychóza vyvolaná interakcemi (Guerzoni a kol., 2018).

3.4.1 Mechanismus účinku disulfiramu

Disulfiram ireverzibilně inhibuje acetaldehyddehydrogenázu a způsobuje akumulaci acetaldehydu po požití alkoholu. Zvýšený krevní acetaldehyd způsobuje zčervenání obličeje, silné bolesti hlavy, bušení srdce, tachykardii, hypertenzi, respirační potíže, nevolnost a zvracení. Tyto příznaky začínají během 15–30 minut po požití alkoholu a přetrvávají několik hodin. Mezi nepříznivé účinky disulfiramu v nepřítomnosti alkoholu patří nauzea, zvracení, ospalost, halitóza, kovová chuť a snížené libido. Vzácně se může objevit také dermatitida, hepatitida, periferní neuritida a encefalopatie. Disulfiram inhibuje dopaminovou beta-hydroxylázu a zvyšuje koncentraci dopaminu v mozku. To může zhoršit schizofrenii a u jinak zdravých jedinců může zřídka způsobit psychózu (Wright, 2012).

3.4.2 Aplikace v léčbě

Epidemiologické studie odhalily, že pacienti, kteří trvale užívají disulfiram, mají nižší riziko úmrtí na rakovinu ve srovnání s těmi, kteří přestali tento lék užívat. Kromě toho byl identifikován komplex dietyldithiokarbamátu s mědí známý jako CuET jakožto metabolit disulfiramu, který je zodpovědný za jeho protirakovinné účinky a poskytuje metody pro detekci akumulace komplexu v nádorech a biomarkerech k analýze jeho účinku na buňky a tkáně (Skrott, 2017).

Vzhledem k nízké rozpustnosti CuET ve vodě bylo nutné navrhnout takový postup, který by zvyšoval jeho rozpustnost, a tím by byl CuET vhodný pro klinické použití. Byly proto vyvinuty postupy založené na nanotechnologiích (Chen a kol, 2018).

3.5 Nádorová heterogenita

Různé nádorové buňky mohou vykazovat odlišné morfologické a fenotypové profily, včetně buněčné morfologie, genové exprese, metabolismu, pohyblivosti, proliferace a metastatického potenciálu. Tento jev se vyskytuje jak mezi nádory (inter-tumorová heterogenita), tak uvnitř nádorů (intra-tumorová heterogenita) (Marusyk, 2010). Nádorová heterogenita může být způsobena genetickými, transkriptomickými, epigenetickými nebo fenotypovými změnami (Dagogo-Jack a Shaw, 2017).

3.5.1 Inter-tumorová heterogenita

Inter-tumorální heterogenita, která se týká heterogenity mezi pacienty nesoucími nádory stejného histologického typu, byla dlouho rozpoznávána a předpokládá se, že je výsledkem faktorů specifických pro pacienta, včetně zárodečných genetických variací, rozdílů v profilu somatických mutací a faktorů prostředí (Dagogo-Jack a Shaw, 2017).

Změněný genotyp a fenotyp pacientů je indukován různými etiologickými a environmentálními faktory (Llovet, 2016). Léze PLC se vyvíjí z jediné maligní buňky na funkčně heterogenní nádorovou hmotu s hierarchicky uspořádanou komunitou nádorových buněk, která podporuje její přežití a vhodnost v reakci na různá mikroprostředí (Nowell, 1976).

3.5.2 Intra-tumorová heterogenita

Intra-tumorální heterogenita se může projevit jako prostorová heterogenita, která popisuje nerovnoměrné rozložení geneticky rozmanitých nádorových subpopulací na různých místech onemocnění nebo v rámci jednoho místa nebo tumoru a jako časová heterogenita je termín aplikovaný na dynamické změny v genetické rozmanitosti jednotlivých nádorů v průběhu času (Dagogo-Jack a Shaw, 2017).

Označuje genomické a biologické variace v nádorové lézi získané evolucí nádorových buněk v různých mikroprostředích spojených s různými etiologiemi. Není jasné, zda je stupeň intra-tumorové heterogenity spojen se specifickými typy nádorů a výsledky pacientů. Porozumění vazbě mezi heterogenitou inter-tumorů a intra-tumorů tedy může pomoci zlepšit subklasifikaci PLC a stratifikaci léčby (Jinping, 2018).

Mezi příčiny intratumorální heterogenity patří genomická nestabilita, která se může pohybovat v rozsahu od substituce na jedné bázi až po zdvojení celého genomu a je rozhodující pro vývoj a progresi mnoha rakovin (Carter a kol., 2006). Taková nestabilita může být důsledkem expozice exogenními mutageny (jako je UV záření nebo tabákový kouř) a aberací v endogenních procesech (jako jsou replikace DNA anebo chyby v opravách nebo oxidační stres) (Cleaver a Crowley, 2002).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Buněčné linie

- HCT 116 – lidský karcinom tlustého střeva (katalogové číslo: CCL-247, ATCC)
- U87 – lidský glioblastom (katalogové číslo: HTB-14, ATCC)
- U118 – lidský glioblastom (katalogové číslo: HTB-15, ATCC)
- C6 – myší gliom mozku (katalogové číslo: CCL-107, ATCC)
- RPE 1 – lidské epitelové buňky (katalogové číslo: CRL-4000, ATCC)

4.1.2 Ostatní biologický materiál

- 10% FBS (fetální bovinní sérum) (katalogové číslo: 16000036, Gibco)
- 0,5% BSA (bovinní sérový albumin) (katalogové číslo: A6793, Sigma)
- Myší primární protilátka Pgp v blokovacím roztoku v poměru 1:250 (katalogové číslo: P7965, Sigma)
- Primární MRPm5 protilátka IgG2a v promývacím pufru v poměru 1:200 (katalogové číslo: MAB4147, Sigma)
- Myší FITC sekundární protilátka pro analýzu Pgp v blokovacím roztoku v poměru 1:250 (katalogové číslo: F2883, Sigma)
- Sekundární protilátka IgG FITC pro analýzu MRP1 v promývacím pufru v poměru 1:250 (katalogové číslo: F2883, Sigma)
- Izotypová kontrola IgG2b pro analýzu Pgp v blokovacím roztoku v poměru 1:140,8 (katalogové číslo: M5281, Sigma)
- Izotypová kontrola IgG2a pro analýzu MRP1 v promývacím pufru v poměru 1:200 (katalogové číslo: M5409, Sigma)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie a roztoky

- Kolidon 17 (katalogové číslo: 9003-39-8, Sigma)
- HPMC (katalogové číslo: 9004-65-3, Sigma)
- 1% PBS (10% PBS v tkáňové vodě) (katalogové číslo: P5493, Sigma)
- 10% Penicilin/streptomycin (ředění na 1%) (katalogové číslo: P4333, Sigma)
- TrypLE (katalogové číslo: 12604013, Gibco)
- 70% Ethanol (katalogové číslo: 64-17-5, Sigma)

- Tkáňová voda (katalogové číslo: 7732-18-5, Sigma)
- CuCl₂ (katalogové číslo: 7447-39-4, Sigma)
- DMSO (katalogové číslo: 67-68-5, Sigma)
- EDTA (katalogové číslo: 60-00-4, Sigma)
- 0,1% NP-40 (katalogové číslo: 9016-45-9, Sigma)
- 0,1% NaN₃ (katalogové číslo: 26628-22-8, Sigma)
- Methanol (katalogové číslo: 67-56-1, Sigma)
- Cell wash (katalogové číslo: 349524, BD Biosciences)
- 1x Permeabilizační roztok (10x permeabilizační roztok v tkáňové vodě) (katalogové číslo: 340973, BD Biosciences)
- Promývací pufr pro analýzu Pgp (pro 20 ml roztoku Cell wash 100 mg BSA a 20 µl NP-40)
- Promývací pufr pro analýzu MRP1 (0,5% BSA, 0,1% NaN₃, 1x PBS a 0,1% NP-40)
- Saturační činidlo FC receptoru připravený v blokovacím roztoku (v poměru 1:3) (katalogové číslo: 732802, BD Biosciences)
- Blokovací roztok (pro 100 ml roztoku cell wash 500 mg BSA)
- MTS činidlo (katalogové číslo: 2808, BioVision)

4.2.2 Kultivační média

- McCoy 5A (katalogové číslo: M9309, Sigma)
- DMEM (katalogové číslo: D5546, Sigma)
- EMEM (katalogové číslo: 30-2003, ATCC)
- F12 (katalogové číslo: 30-2004, ATCC)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Laminární box MSC Advantage (ThermoScientific)
- Inkubátor CO₂ CO-170P-230 (New Brunswick Scientific)
- Fluorescenční inverzní mikroskop IX51 (Olympus)
- Počítadlo buněk Vi-Cell XR (Beckman Coulter)
- Průtokový cytometr FACS Calibur (BD Biosciences)
- Centrifuga 420R Rotina (Schoeller)
- Analytické váhy (Scaltech)
- Vodní lázeň Sub aqua 12 plus (Grant Instruments)
- Vortex Genie 2T (Scientific Industries)
- Vakuová odsávačka (ThermoScientific)
- EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)

4.4 Další pomůcky

- Plastové kultivační láhve (ThermoFisher)
- Automatické pipety, Research Plus (0,5–5 000 µl, Eppendorf)
- Buněčné škrabky (ThermoFisher)
- Špičky na pipety (ThermoFisher)
- Jednorázové jehly (ThermoFisher)
- Injekční stříkačky (ThermoFisher)
- Falkony (ThermoFisher)
- Zkumavky pro Vi-cell (Beckman Coulter)
- Centrifugační zkumavky (ThermoFisher)
- Eppendorf Safe-Lock zkumavky (Eppendorf)
- Filtr Filtermax (TPP)
- Serologické pipety (TPP)
- 384jamková destička (Sigma)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 Kultivace buněčných linií

Během experimentu byly kultivovány buněčné linie HCT 116, U87, U118, C6 a RPE1. Linie HCT 116 byla kultivována v médiu McCoy, U87 v EMEM, U118 v DMEM, C6 v F12 a linie RPE1 v médiu DMEM. Všechna média obsahují 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin. Linie byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO₂.

4.5.2 Pasážování buněčných linií

Nejprve se kultivační láhve s buňkami zkontrolovaly pod světelným mikroskopem, a pokud byly adherentní buňky výrazně přerostlé, provedla se pasáž buněk. Pasážování buněk probíhá tak, že se nejprve vylije staré médium z láhve. Poté se přidá 1% PBS a láhev se jím promyje. PBS se vylije a do láhve se přidá několik ml roztoku TrypLE, který slouží k uvolnění buněk ze dna kultivační láhve. Láhev se dá do inkubátoru do té doby, než dojde k uvolnění buněk. Poté se do láhve přidá několik ml kultivačního média a láhev se tak promyje. Slije se asi polovina média s buňkami a zbytek se doplní čerstvým kultivačním médiem (množství média se volí podle velikosti kultivační láhve).

4.5.3 Počítání buněk

Během experimentu bylo nutné zjišťovat množství buněk v suspenzi. Z ní bylo odebráno 500 μl a napipetováno do zkumavek určených pro počítadlo buněk Vi-Cell. Zkumavka byla následně vložena do přístroje, který vypočítal množství živých buněk na 1 ml suspenze.

4.5.4 Příprava rezistentních linií

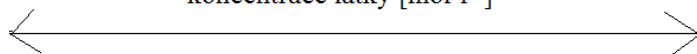
Každá buněčná linie byla selektována ve čtyřech variantách CuET: komerční CuET, CuET ve vodném roztoku albuminu, kolidonu 17 a HPMC. Při 70% konfluenci buněk byla zvyšována koncentrace cytostatika. Koncentrace byla navyšována postupně a po malých koncentracích, aby nedošlo k usmrcení buněk. Počáteční koncentrace byla $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po dvou týdnech byla koncentrace zvýšena na $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Konečná koncentrace byla $2,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.5.5 MTS test

Buňky byly testovány pomocí MTS testu cytotoxicity. Tento test je založen na redukcí tetrazoliové sloučeniny MTS, která má žlutou barvu, na barevný produkt formazanu, který má fialovou barvu a který je rozpustný v buněčných kultivačních médiích. Protože životaschopné buňky mají díky mitochondriálním dehydrogenázám schopnost převést tetrazoliovou sloučeninu MTS na rozpustný a barevný produkt formazanu, dojde k významnému zvýšení intenzity barev, což lze snadno kvantifikovat měřením absorbance při 490 nm.

Pro MTS test byly použity buňky o koncentraci 40 000 buněk/ml. 30 μl buněčné suspenze bylo nanášeno do jamek na 384 jamkové destičce, do prvního a posledního sloupce bylo dáno pouze médium bez buněk, které slouží jako blank. V prvním řádku kromě první a poslední jamky byly pouze buňky. Následovala 24hodinová inkubace. Poté byla od 4. sloupce přidávána látka o různých koncentracích podle schématu (obrázek 1). Pořadí nanášených vzorků pod sebe bylo následující: komerční CuET, kolidon 17, HPMC a albumin, všechny nanášeny ve dvou opakováních pod sebe. Do 2. a předposledního sloupce se látka nepřidávala, bylo zde tedy 100 % živých buněk. Ve 3. sloupci bylo 100 % mrtvých buněk. Následovala 48hodinová inkubace. Poté byly přidány 4 μl MTS, směs byla v jamce promíchána a destička byla inkubována 4–5 hodin. Nakonec byla změřena absorbance v jednotlivých jamkách při vlnové délce 490 nm.

koncentrace látky [mol·l⁻¹]



BLANK	100% živých buněk	100% mrtvých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	100% živých buněk	BLANK	
BLANK	100% živých buněk	100% mrtvých buněk	28·10 ⁻⁶	15,67·10 ⁻⁶	7,83·10 ⁻⁶	3,92·10 ⁻⁶	1,92·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁶	0,25·10 ⁻⁶	0,058·10 ⁻⁶	0,0167·10 ⁻⁶	0,0083·10 ⁻⁶										100% živých buněk	BLANK
BLANK	100% živých buněk	100% mrtvých buněk	28·10 ⁻⁶	15,67·10 ⁻⁶	7,83·10 ⁻⁶	3,92·10 ⁻⁶	1,92·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁶	0,25·10 ⁻⁶	0,058·10 ⁻⁶	0,0167·10 ⁻⁶	0,0083·10 ⁻⁶	Komerční CuET								100% živých buněk	BLANK	
BLANK	100% živých buněk	100% mrtvých buněk	28·10 ⁻⁶	15,67·10 ⁻⁶	7,83·10 ⁻⁶	3,92·10 ⁻⁶	1,92·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁶	0,25·10 ⁻⁶	0,058·10 ⁻⁶	0,0167·10 ⁻⁶	0,0083·10 ⁻⁶	Kolidon 17								100% živých buněk	BLANK	
BLANK	100% živých buněk	100% mrtvých buněk	28·10 ⁻⁶	15,67·10 ⁻⁶	7,83·10 ⁻⁶	3,92·10 ⁻⁶	1,92·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁶	0,25·10 ⁻⁶	0,058·10 ⁻⁶	0,0167·10 ⁻⁶	0,0083·10 ⁻⁶	HPMC								100% živých buněk	BLANK	
BLANK	100% živých buněk	100% mrtvých buněk	28·10 ⁻⁶	15,67·10 ⁻⁶	7,83·10 ⁻⁶	3,92·10 ⁻⁶	1,92·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁶	0,25·10 ⁻⁶	0,058·10 ⁻⁶	0,0167·10 ⁻⁶	0,0083·10 ⁻⁶	Albumin								100% živých buněk	BLANK	
BLANK	100% živých buněk	100% mrtvých buněk	28·10 ⁻⁶	15,67·10 ⁻⁶	7,83·10 ⁻⁶	3,92·10 ⁻⁶	1,92·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁶	0,25·10 ⁻⁶	0,058·10 ⁻⁶	0,0167·10 ⁻⁶	0,0083·10 ⁻⁶										100% živých buněk	BLANK

Obrázek 1: Schéma nanášení vzorků na destičku pro MTS test cytotoxicity.

4.5.6 Testování exprese Pgp a MRP1

Buněčná linie U87 byla testována na průtokovém cytometru pro zjištění exprese membránových proteinů Pgp a MRP1. Průtoková cytometrie je běžně používána nedestruktivní metoda, která se používá pro analýzu nukleových kyselin, rozsahu apoptózy nebo ke stanovení exprese membránových proteinů. Tato metoda je založena na inkorporaci fluorescenčního barviva do buněk, které prostupují kapilárou a jsou vstříkovány do proudu kapaliny. Nakonec buňky procházejí laserovým paprskem, který detekuje fluorescenční signál.

Pro analýzu Pgp Byly použity 3 miliony buněk, které byly dány do zkumavek pro průtokový cytometr a zcentrifugovány po dobu 5 minut při zrychlení 500 g a při teplotě 4° C. Po centrifugaci bylo odstraněno médium a po kapkách byly přidány 2 ml vychlazeného metanolu (-20 °C). Zkumavky byly uloženy do -20 °C. Poté byl metanol odsán. Byly přidány 2 ml roztoku Cell wash a zkumavky byly centrifugovány po dobu 5 minut při zrychlení 500 g v pokojové teplotě. Po centrifugaci byl odsán supernatant. Bylo přidáno 0,5 ml 1x permeabilizačního roztoku k peletě ve zkumavce a inkubováno 10 minut při pokojové teplotě. Zkumavky byly zcentrifugovány a supernatant byl odsán. Byly přidány 2 ml promývacího pufru a zcentrifugovány. Bylo přidáno 40 µl saturačního činidla FC receptoru připraveného v blokovacím roztoku a inkubováno 10 minut při pokojové teplotě. Zkumavky byly zcentrifugovány a poté byl z nich odsán supernatant. Byly přidány 2 ml promývacího pufru a obsah všech zkumavek byl rozdělen do dvou sad po 1 ml (jedna sada slouží jako vzorky a druhá jako izotypová kontrola). Všechny zkumavky byly zcentrifugovány a poté byl odsán supernatant. Bylo přidáno 40 µl primární Pgp myší protilátky do sady zkumavek, které slouží jako vzorky, a 40 µl izotypové kontroly do sady zkumavek sloužící pro kontrolu. Zkumavky byly inkubovány 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Byly přidány 2 ml promývacího pufru, zkumavky byly zcentrifugovány a poté byl odsán supernatant. Do všech zkumavek bylo přidáno 40 µl myší FITC sekundární protilátky a inkubováno 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Byly přidány 2 ml promývacího pufru a zkumavky byly zcentrifugovány. Poté byl odsán supernatant. Nakonec bylo přidáno 500 µl blokovacího roztoku a všechny zkumavky byly uloženy ve tmě při teplotě 4 °C.

Pro analýzu MRP1 byly použity 3 miliony buněk, které byly dány do zkumavek pro průtokový cytometr a zcentrifugovány po dobu 5 minut při zrychlení 500 g a při teplotě 4° C. Po centrifugaci bylo odstraněno médium a po kapkách byly přidány 2 ml vychlazeného metanolu (-20 °C). Zkumavky byly uloženy do -20 °C. Buňky zafixované v metanolu byly centrifugovány po dobu 5 minut při zrychlení 500 g. Poté byly buňky promyty 1x PBS a supernatant byl odsán. Bylo přidáno 0,5 ml 1x permeabilizačního roztoku, zkumavky byly zvortexovány a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Byly přidány 2 ml promývacího

pufu a obsah všech zkumavek byl rozdělen do dvou sad po 1 ml (jedna sada slouží jako vzorky, druhá jako izotypová kontrola). Všechny zkumavky byly zcentrifugovány a poté byl odsán supernatant. Bylo přidáno 100 μ l primární MRPm5 protilátky do zkumavek sloužících jako vzorky a 100 μ l izotypové kontroly do zkumavek sloužících jako kontrola. Všechny zkumavky byly inkubovány 60 minut ve tmě při pokojové teplotě. Byly přidány 2 ml promývacího pufu a zkumavky byly zcentrifugovány. Poté byl odsán supernatant. Do všech zkumavek bylo přidáno 100 μ l sekundární protilátky a ty byly inkubovány 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Byly přidány 2 ml promývacího pufu a zkumavky byly centrifugovány (stejně podmínky jako v kroku 3). Poté byl odstraněn supernatant. Nakonec bylo přidáno 0,5 ml promývacího pufu a zkumavky byly uloženy do lednice.

5 VÝSLEDKY

5.1 Selekcce rezistentních buněk

Byly selektovány buněčné linie rezistentní k CuET. Linie byly selektovány ve čtyřech variantách CuET: s komerčním CuET, s nanočásticemi tvořenými ve vodném roztoku kolidonu 17, HPMC a albuminu. Při 70% konfluenci buněk byla zvyšována koncentrace. Počáteční koncentrace byla $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po dvou týdnech byla koncentrace zvýšena na $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Konečná koncentrace byla $2,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pouze v případě buněčné linie U87 se podařilo vyselektovat buňky, které se dále množily i při nejvyšší použité koncentraci, proto byla tato linie použita k testování cytotoxicity pomocí MTS testu.

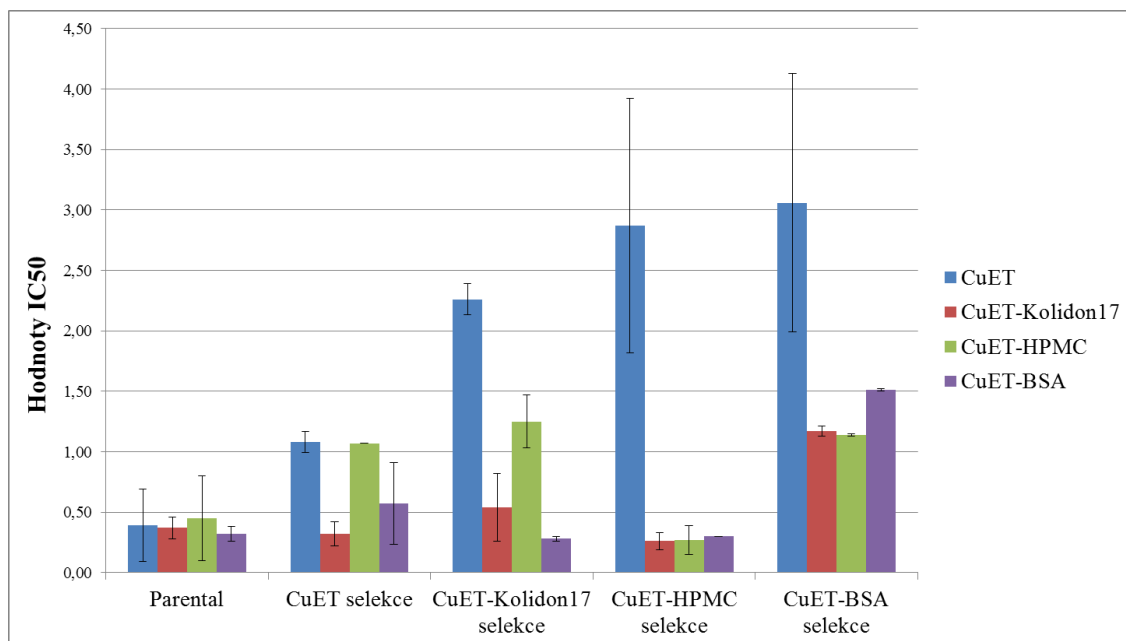
5.2 Stanovení IC50 pomocí MTS testu cytotoxicity

Pro určení nárůstu rezistence byl proveden MTS test, kterým se stanovila IC50 pro jednotlivé selektované linie U87. Jak je vidět v tabulce 1, největší nárůst rezistence nastal u selekce CuET-albumin s CuET (7,85x) a selekce CuET-HPMC s CuET (7,36x). Nejmenší nárůst rezistence byl u selekce CuET-kolidon 17 s CuET ve vodném roztoku kolidonu 17 (1,46x) a u selekce CuET s CuET ve vodném roztoku albuminu (1,78x). Nárůst rezistence se porovnával u jednotlivých selektovaných linií s parentální linií. U některých selektovaných linií byl nárůst rezistence menší než 1x, jelikož byly buňky vystaveny selekčnímu tlaku, proto se odlišují od parentální linie. V grafu 1 jsou znázorněny nárůsty rezistence u selektovaných linií v závislosti na použité formě CuET.

Tabulka 1: Výsledky MTS testu cytotoxicity selektovaných buněčných linií U87 v závislosti na použité formě CuET.

U87	Parentální linie		CuET selekce			CuET-Kolidon17 selekce			CuET-HPMC selekce			CuET-albumin selekce		
	IC 50 [μ M]	sd	IC 50 [μ M]	sd	nárůst rezistence x-rát	IC 50 [μ M]	sd	nárůst rezistence x-krát	IC 50 [μ M]	sd	nárůst rezistence x-krát	IC 50 [μ M]	sd	nárůst rezistence x-krát
CuET	0,39	0,30	1,08	0,09	2,77	2,26	0,13	5,79	2,87	1,05	7,36	3,06	1,07	7,85
CuET-Kolidon17	0,37	0,09	0,32	0,10	0,86	0,54	0,28	1,46	0,26	0,07	0,70	1,17	0,04	3,16
CuET-HPMC	0,45	0,35	1,07	0,00	2,38	1,25	0,22	2,78	0,27	0,12	0,60	1,14	0,01	2,53
CuET-albumin	0,32	0,06	0,57	0,34	1,78	0,28	0,02	0,88	0,30	0,00	0,94	1,51	0,01	4,72

Legenda: Fialovými odstíny jsou zvýrazněny nárůsty rezistence větší než 1x. Nejsvětlejšími odstíny jsou označeny nejmenší nárůsty, nejtmašími odstíny jsou označeny největší nárůsty rezistence.

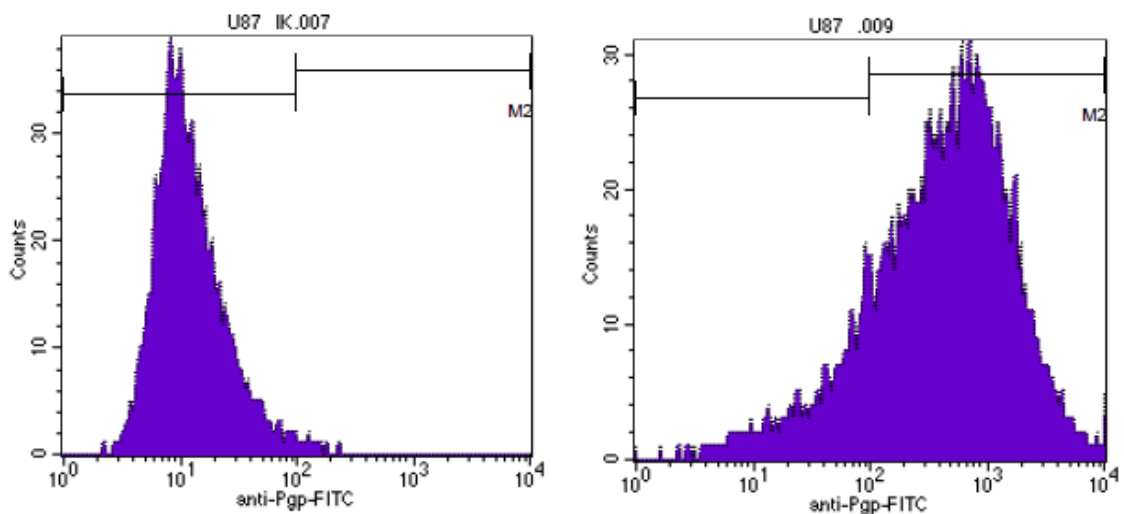


Obrázek 2: Graf výsledků MTS testu cytotoxicity selektovaných buněčných linií U87 v závislosti na použité formě CuET.

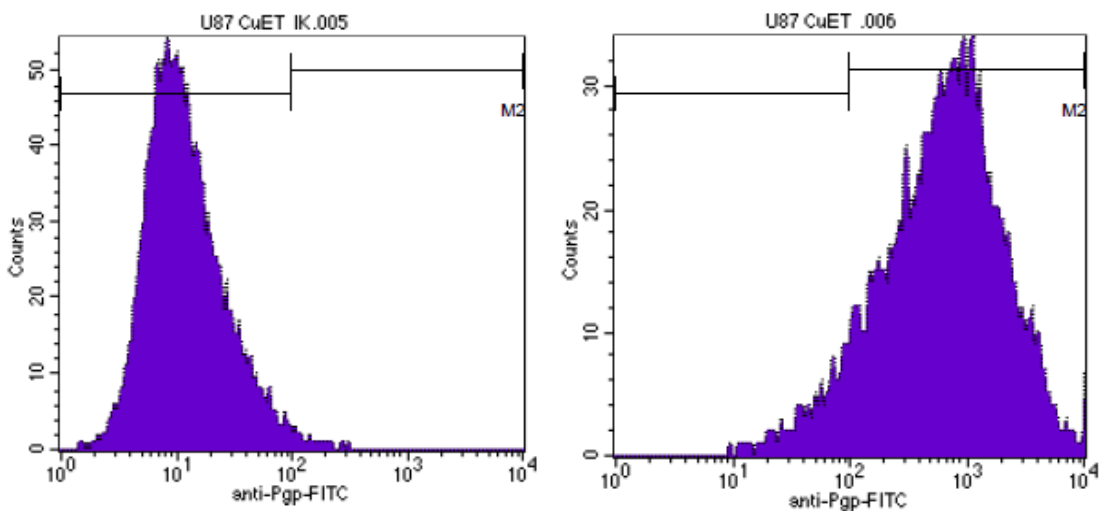
5.3 Testování exprese Pgp a MRP1 pomocí průtokového cytometru

Pro stanovení exprese proteinů Pgp a MRP1 byly buňky testovány v průtokovém cytometru. U analýzy Pgp došlo k nárůstu exprese (až 1,46x) ve srovnání s parentální linií u všech buněčných linií kromě linie selektované nanočásticemi tvořenými v roztoku kolidon 17 (viz Tabulka 2). U analýzy MRP1 nedošlo k nárůstu exprese u žádné z buněčných linií, jak lze vidět v Tabulce 3. Na následujících obrázcích je graficky znázorněna exprese obou membránových proteinů u jednotlivých buněčných linií.

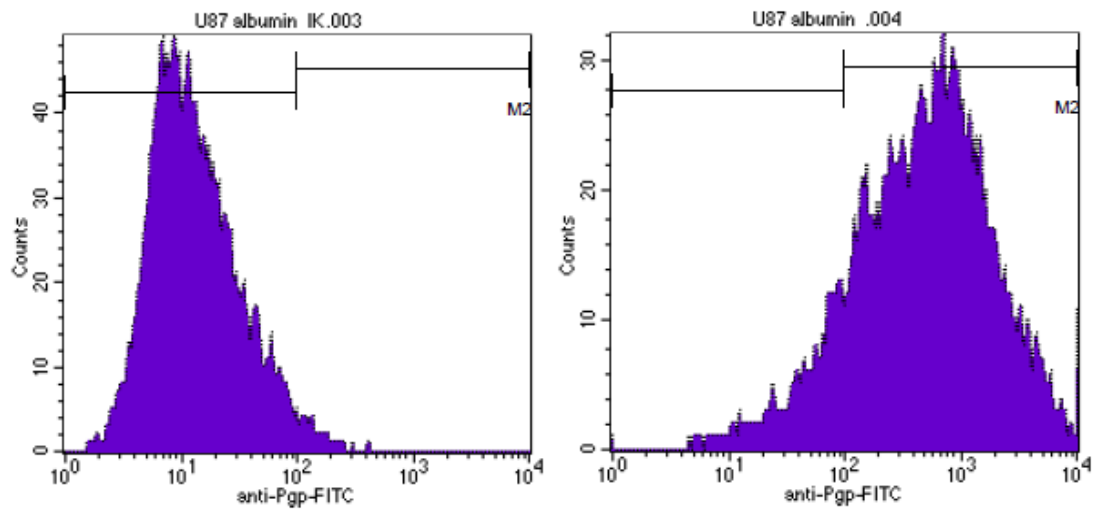
- exprese Pgp:



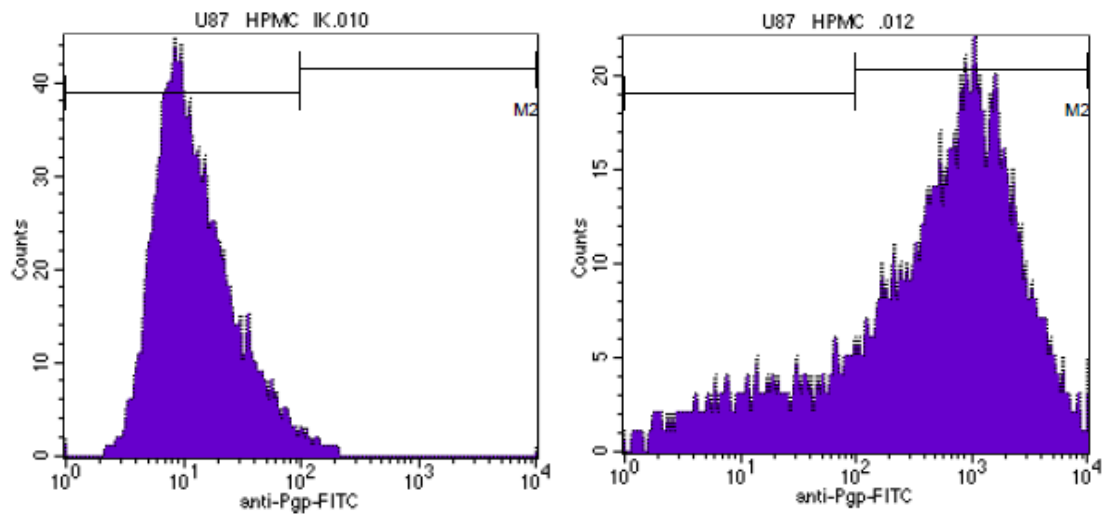
Obrázek 3: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u parentální buněčné linie U87 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).



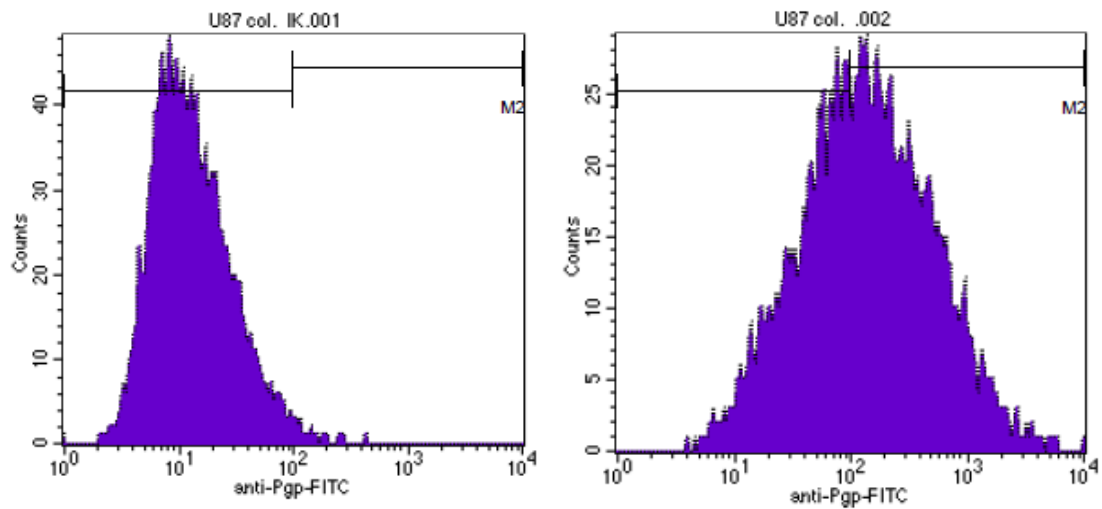
Obrázek 4: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-CuET (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).



Obrázek 5: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-albumin (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).

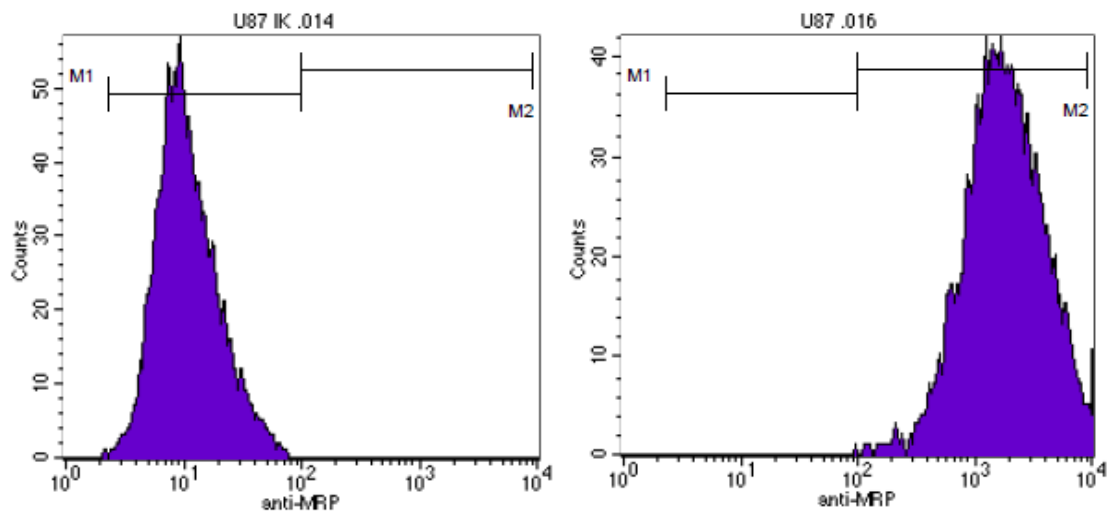


Obrázek 6: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-HPMC (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).

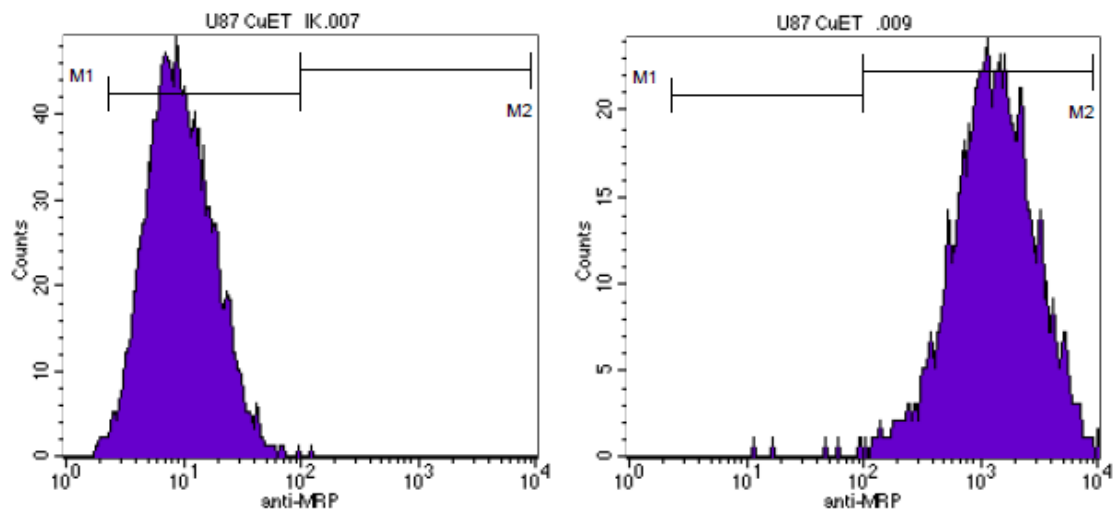


Obrázek 7: Histogramy znázorňující expresi P-glykoproteinu u buněčné linie U87-kolidon 17 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).

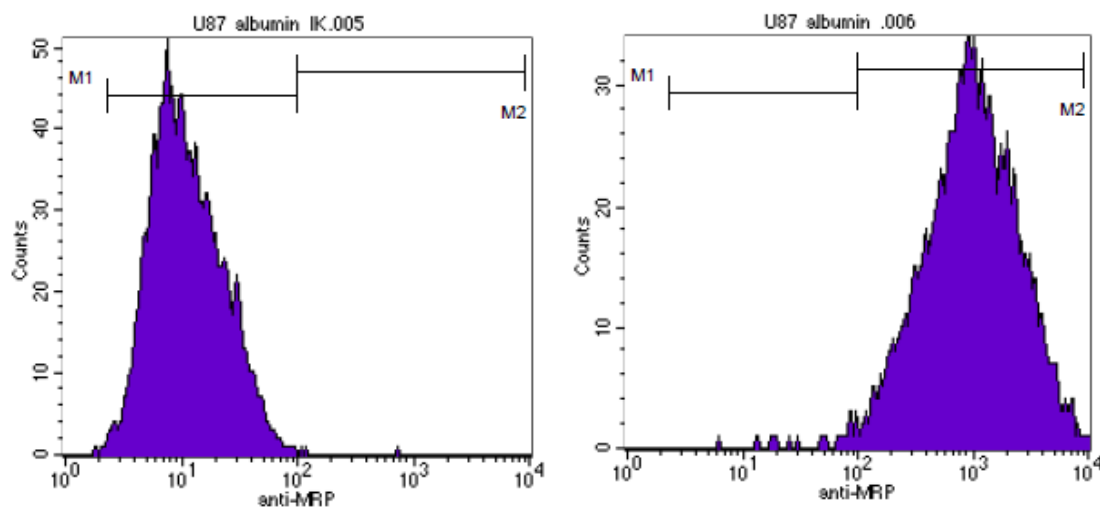
- exprese MRP1:



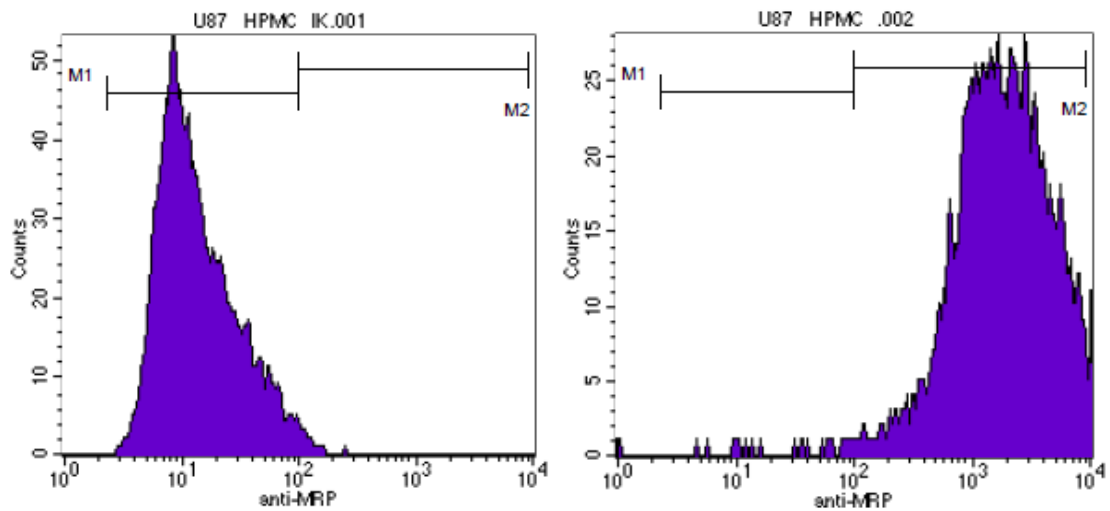
Obrázek 8: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u parentální buněčné linie U87 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).



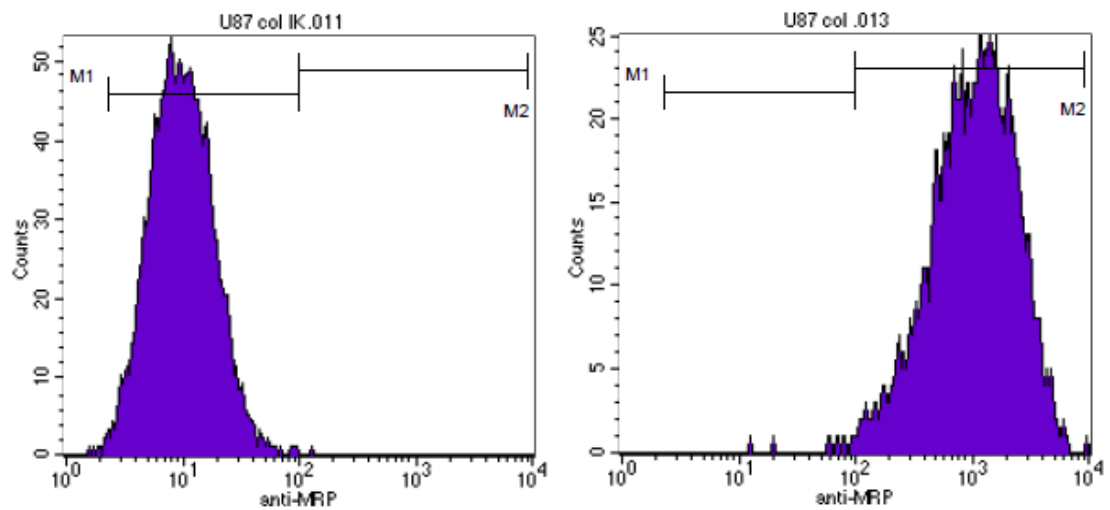
Obrázek 9: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-CuET (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).



Obrázek 10: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-albumin (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).



Obrázek 11: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-HPMC (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).



Obrázek 12: Histogramy znázorňující expresi MRP1 u buněčné linie U87-kolidon 17 (vlevo izotypová kontrola, vpravo vzorek).

Tabulka 2: Výsledek analýzy Pgp pomocí průtokového cytometru u buněčné linie U87.

U87 - Pgp	IK	vzorek	vzorek/IK	hodnota x-krát
parentální linie	11,04	449,1	40,68	1
komerční CuET	10,75	637,8	59,33	1,46
albumin	11,76	491,37	41,78	1,03
HPMC	11,14	637,8	57,25	1,41
kolidon 17	11,76	129,8	11,04	0,27

Tabulka 3: Výsledek analýzy MRP1 pomocí průtokového cytometru u buněčné linie U87.

U87 - MRP1	IK	vzorek	vzorek/IK	hodnota x-krát
parentální linie	9,82	1669,77	170,04	1
komerční CuET	8,98	1218,81	135,73	0,8
albumin	10,18	905,8	88,98	0,52
HPMC	11,65	1700,08	145,93	0,86
kolidon 17	9,47	1009,04	106,55	0,63

6 DISKUZE

Byla provedena selekce buněčných linií HCT 116, U87, U118, C6 a RPE1 rezistentních na látku zvanou CuET. Rezistence buněčné linie U87 byla ověřena pomocí testu cytotoxicity, při které se stanovovala střední inhibiční koncentrace (IC50). Nárůst rezistence u jednotlivých CuET selekcí buněčné linie U87 nepřesahoval hodnoty 10x, to znamená, že na použitou látku CuET nevzniká tak vysoká rezistence v porovnání s parentální linií. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u CuET-albumin selekce s použitím komerčního CuET, u níž byl nárůst 7,85x, a u CuET-HPMC selekce s použitím komerčního CuET (nárůst 7,36x). Na Ústavu molekulární a translační medicíny se standardně selektují buňky rezistentní na nukleosidy, u kterých je nárůst rezistence mnohem větší a snadnější než u testovaného CuET.

Nízkého nárůstu rezistence však může být využito v léčbě rakoviny. Ačkoli je mnoho druhů rakoviny zpočátku citlivých na danou léčbu, postupem času se u nich může vyvinout rezistence a léčba tak nemusí být dále účinná. Proto je při léčbě rakoviny důležité, aby na protinádorové léčivo nevznikala rezistence (Housman a kol., 2014).

Disulfiram se pod obchodním názvem antabus používá u lidí k léčbě alkoholismu více než 60 let. V posledním desetiletí však stále více důkazů naznačuje, že má disulfiram velký potenciál pro léčbu lidských rakovin. Jeho protinádorová aktivita byla prokázána v modelových systémech *in vitro* i *in vivo* a byla testována v klinických studiích na různých typech rakoviny. Je také zřejmé, že může senzitivizovat nádorové buňky na radioterapii a zvýšit cytotoxicitu protinádorových léčiv (Jiao a kol., 2016).

Léková rezistence je hlavním problémem v léčbě rakoviny, proto se na ni zaměřuje velké množství studií (Alfarouk a kol., 2015). V tomto experimentu byla testována rezistence na CuET, u které byly prokázány protirakovinné účinky. Jedná se o komplex DDTC s mědí, jakožto metabolit disulfiramu. Během selekce buněčných linií byl nárůst rezistence menší než 8x, což znamená, že u této látky nedochází k výraznému nárůstu rezistence. Nicméně jeho protinádorové účinky ještě nejsou dostatečně prozkoumány a jsou předmětem dalších výzkumů.

V České republice se v minulém desetiletí zabýval výzkumem účinku CuET Mgr. Boris Cvek, Ph.D., který se snažil prosazovat neziskové léky v onkologii, převážně antabus. V dnešní době se v Česku výzkumem CuET zabývá například skupina Prof. MUDr. Jiřího Bártka Ph.D. a Mgr. Martina Mistríka, Ph.D (Skrott a kol., 2017).

Uvedení nových léků na trh trvá dlouho a vyžaduje vysoké náklady, proto se často prověřují účinky existujících léčiv a hledají se pro ně nová použití. Protože stávající léky mají známé farmakokinetické a bezpečnostní profily a jsou často schváleny regulačními agenturami pro humánní použití, lze každé nově identifikované použití rychle vyhodnotit ve II. fázi klinických studiích. Tímto způsobem mohou vývojáři léčiv obejít téměř 40 % celkových nákladů na uvedení léku na trh odstraněním většiny toxikologických a farmakokinetických hodnocení (Chong a Sullivan, 2007).

Tato práce se zaměřuje především na buněčnou linii U87, která je odvozená od lidského glioblastomu. Byla provedena analýza exprese membránových proteinů Pgp a MRP1 u této linie pomocí průtokového cytometru. Oba tyto proteiny patří do skupiny ABC transportérů a při jejich zvýšené expresi zajišťují transport protinádorového léčiva do extracelulárního prostoru (Mollazadeh a kol., 2018). Nárůst exprese byl zaznamenán v případě analýzy Pgp u všech linií kromě linie selektované nanočásticemi tvořenými v roztoku kolidonu 17, to znamená, že léková rezistence této linie je pravděpodobně způsobena zvýšenou expresí P-glykoproteinu. Naopak v případě analýzy MRP1 nedošlo ani u jedné z linie k nárůstu exprese, což znamená, že léková rezistence není způsobena zvýšenou expresí tohoto konkrétního membránového proteinu.

7 ZÁVĚR

Byla provedena selekce rakovinných buněčných linií U87, U118, HCT 116, C6 a RPE1 rezistentních k CuET, ale pouze U87 byla úspěšně selektována jako rezistentní linie, jelikož ostatní linie byly velmi citlivé na zvyšování koncentrace cytostatika. Rezistence byla zjišťována pomocí MTS testu cytotoxicity. Nárůst rezistence u linie U87 nebyl vyšší než 8x, to znamená, že na látku CuET nevzniká tak vysoká rezistence, což dělá z CuET, v kombinaci se selektivními cytotoxickými vlastnostmi vůči rakovinným buňkám, potenciálně zajímavou látku použitelnou v onkologické léčbě. Nejvyšší nárůst rezistence byl zaznamenán u selekce CuET-albumin s CuET (7,85x) a selekce CuET-HPMC s CuET (7,36x). Nejmenší nárůst rezistence byl u selekce CuET-kolidon 17 s CuET ve vodném roztoku kolidonu 17 (1,46x) a u selekce CuET s CuET ve vodném roztoku albuminu (1,78x).

Následně byla provedena analýza exprese membránových proteinů pomocí průtokové cytometrie. Byla zjištěna lehce zvýšená exprese P-glykoproteinu a to nejvíce u buněčné linie s komerčním CuET (1,46x) a nejméně u linie selektované nanočásticemi tvořenými v roztoku albuminu (1,03x). Pouze u linie selektované nanočásticemi tvořenými v roztoku kolidonu 17 nedošlo ke zvýšení exprese Pgp. Ke zvýšení exprese proteinu MRP1 nedošlo.

8 LITERATURA

- Ahmad A. S., Ormiston-Smith N., Sasieni P. S. (2015): Trends in the lifetime risk of developing cancer in Great Britain: comparison of risk for those born from 1930 to 1960. *Br J Cancer* 112(5): 943-47.10.1038.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Alder, R., Ph.D., Hollar, D.W., Jr., Ph.D. (2019): *Tumors*. Magill's Med. Guide Online Ed.
- Alfarouk K. O., Stock C. M., Taylor S., Walsh M., Muddathir A. K., Verduzco D., Bashir A. H., Mohammed O. Y., Elhassan G. O., Harguindey S., Reshkin S. J., Ibrahim M. E., Rauch C. (2015): Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International*. 15: 71.
- 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(1), 361–398.
- Asna, N., Livoff, A., Batash, R., Debbi, R., Schaffer, P., Rivkind, T., Schaffer, M., 2018. Radiation therapy and immunotherapy—a potential combination in cancer treatment. *Curr. Oncol*. 25.
- Badwaik R. (2019): Precision Medicine: Emerging Trends in Cancer Therapy. *Journal of Clinical & Diagnostic Research* 13, 1–4.
- Barnum K. J., O'Connell M. J. (2014): Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Cell Cycle Control*, 29–40.
- Baskar R., Lee K. A., Yeo R., Yeoh K. W. (2012): Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*. 9(3):193-199.
- Beaumont, K.A., Hill, D.S., Daignault, S.M., Lui, G.Y.L., Sharp, D.M., Gabrielli, B., Weninger, W., Haass, N.K. (2016): Cell Cycle Phase-Specific Drug Resistance as an Escape Mechanism of Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 136, 1479–1489.
- Bechtel L. K., Haverstick D. M., Holstege C. P. (2008): Verapamil toxicity dysregulates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Acad. Emerg. Med*. 15, 368–374.
- Bertoli C., Skotheim J. M., de Bruin R. A. M. (2013): Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528.

- Bleyer A., Barr R., Hayes-Lattin B., Thomas D., Ellis C., Anderson B. (2008): The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. *Nature Reviews Cancer*, 8(4), 288–298.
- CancerCenter. [online] [navštíveno 1. 3. 2020] Dostupné z <https://www.cancercenter.com/carcinoma>.
- Cancer.Net Editorial Board. [online] [navštíveno 13. 9. 2019] Dostupné z <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer>.
- Carter S. L., Eklund A. C., Kohane I. S., Harris L. N., Szallasi Z. (2006): A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat. Genet.* 38, 1043–1048.
- Ceyssens S. a Stroobants S. (2011): Sarcoma. *Positron Emission Tomography*, 191–203.
- Chen W., Yang W., Chen P., Huang Y., Li F. (2018): Disulfiram Copper Nanoparticles Prepared with a Stabilized Metal Ion Ligand Complex Method for Treating Drug-Resistant Prostate Cancers. *ACS Applied Materials & Interfaces*.
- Cho A., Haruyama N., Kulkarni A. B. (2009): Generation of Transgenic Mice. *Current Protocols in Cell Biology*, 42(1), 19.11.1–19.11.22.
- Choi C. H. (2005): ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* 5, 30.
- Chong C. R., Sullivan D. J. (2007): New uses for old drugs. *Nature*, 448(7154), 645–646.
- Claudiani S., Apperley J. F. (2018): The argument for using imatinib in CML. *Hematology*, 2018(1), 161–167.
- Cleaver J. E., Crowley E. (2002): UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front. Biosci.* 7, d1024–d1043.
- Cooper G. M. (2000): *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Corrie P. (2004): Cytotoxic chemotherapy: Clinical aspects. *Medicine*. 32. 25-29.
- Croce C. M. (2008): Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502–511.
- Dagogo-Jack I., Shaw A. T. (2017): Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(2), 81–94.
- Debenham P. G., et al. (1982): *Molecular and Cellular Biology*, 2: 881–889.

Dewangan J., Srivastava S., Rath S. K. (2017): Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumor Biology*, 39(3), 101042831769503.

Diaz-Moralli S., Tarrado-Castellarnau M., Miranda A., Cascante M. (2013): Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(2), 255–271.

Djebbari F., Srinivasan A., Vallance G., Moore S., Kothari J., Ramasamy K. (2018): Clinical outcomes of bortezomib-based therapy in myeloma. *PLOS ONE*, 13(12), e0208920.

Eberl S., Renner B., Neubert A., Reising M., Bachmakov I., König J., Fromm M. F. (2007): Role of P-Glycoprotein Inhibition for Drug Interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, 46(12), 1039–1049.

Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48–58.

Gottesman M. M., Ludwig J., Xia D., Szakacs G. (2006): Defeating drug resistance in cancer. *Discov. Med.* 6, 18–23.

Guerzoni S., Pellesi L., Pini L. A., Caputo F. (2018): Drug-drug interactions in the treatment for alcohol use disorders: A comprehensive review. *Pharmacological Research*, 133, 65–76.

Gupte A., Mumper R. J. (2009): Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 35(1), 32–46.

Hamilton G., Rath B. (2014): A short update on cancer chemoresistance. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164(21-22), 456–460.

He H., Markoutsas E., Li J., Xu P. (2018): Repurposing disulfiram for cancer therapy via targeted nanotechnology through enhanced tumor mass penetration and disassembly. *Acta Biomaterialia* 68, 113–124.

Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., Sarkar S. (2014): Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*, 6(3), 1769–1792.

Jinping L., Hien D., Xin W. W. (2018): The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer. *Experimental & Molecular Medicine* volume 50, 416.

Jo, E. B., Hong, D., Lee, Y. S., Lee, H., Park, J. B., & Kim, S. J. (2019): Establishment of a Novel PDX Mouse Model and Evaluation of the Tumor Suppression Efficacy of Bortezomib Against Liposarcoma. *Translational Oncology*, 12(2), 269–281.

Kathawala R. J., Gupta P., Ashby Jr. C. R., Chen Z.-S. (2015): The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist. Updat.* 18, 1–17.

- Kuracha, M. R., Thomas, P., Loggie, B. W., & Govindarajan, V. (2016): Patient-derived xenograft mouse models of pseudomyxoma peritonei recapitulate the human inflammatory tumor microenvironment. *Cancer Medicine*, 5(4), 711–719.
- Kwok G., Yau T. C. C., Chiu J. W., Tse E., Kwong Y.-L. (2016): Pembrolizumab (Keytruda). *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(11), 2777–2789.
- Landgraf M., McGovern J.A., Friedl P., Huttmacher D.W. (2018): Rational Design of Mouse Models for Cancer Research. *Trends in Biotechnology* 36, 242–251.
- Lemoine N., Kirkham N., Nicholas R. (2001): *Progress in pathology*. London: Greenwich Medical Media. p. 52.
- Leukemia—Patient Version, National Cancer Institute. [online] [navštíveno 16. 2. 2020] Dostupné z <https://www.cancer.gov/types/leukemia>.
- Li W., Zhang H., Assaraf Y. G., Zhao K., Xu X., Xie J., Chen Z.-S. (2016): Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*, 27, 14–29.
- Lim S., Kaldis P. (2013): Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079–3093.
- Lippert T., Ruoff H.-J., Volm M. (2011): Intrinsic and Acquired Drug Resistance in Malignant Tumors. *Arzneimittelforschung* 58, 261–264.
- Liscovitch M., Lavie Y. (2002): Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *IDrugs*. 5, 349–355.
- Liu P., Brown S., Goktug T., Channathodiyil P., Kannappan V., Hugnot J.-P., Wang W. (2012): Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *British Journal of Cancer*, 107(9), 1488–1497.
- Liu, T., Liu, X., Xiong, H., Xu, C., Yao, Jianxu, Zhu, X., Zhou, J., Yao, Jing (2018): Mechanisms of TPGS and its derivatives inhibiting P-glycoprotein efflux pump and application for reversing multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. *Polym. Chem.* 9, 1827–1839.
- Llovet J. M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E., Sangro, B., Schwartz M., Sherman M., Gores G. (2016): Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16018.
- Longley, D., Johnston, P. (2005): Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205, 275–292.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B.,

- Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L. (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.
- Marusyk A., & Polyak K. (2010): Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805(1), 105–117.
- Massague J. (2004): G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298–306.
- McDermott, M., Eustace, A., Busschots, S., Breen, L., Clynes, M., O'Donovan, N., Stordal, B., (2014). *In vitro* Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in Oncology* 4, 40.
- Mirabelli, Coppola, Salvatore (2019): Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers*, 11(8), 1098.
- Morgan D. O. (2007): *The Cell Cycle: Principles of Control*. Oxford University Press, UK.
- Nosková, V., Hajdúch, M. (2000): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klinická onkologie. Speciál* 2, stránky 4-9.
- Nowell P. (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23–28.
- Ogilvie L.A., Kovachev A., Wierling C., Lange B.M.H., Lehrach H. (2017): Models of Models: A Translational Route for Cancer Treatment and Drug Development. *Front Oncol* 7.
- Otto, T., Sicinski, P. (2017): Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 17, 93–115.
- Ozben T. (2006): Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters* 580: 2903–2909.
- Pinoli, P., Stamoulakatou, E., Ceri, S., Piro, R. (2019): Deleterious Impact of Mutational Processes on Transcription Factor Binding Sites in Human Cancer.
- Rhind N., Russell, P. (2012): Signaling Pathways that Regulate Cell Division. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10), a005942–a005942.
- Riley R. S., June C. H., Langer R., Mitchell M. J. (2019): Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Samnienggam, M., Phienthrakul, T. (2016): Centrality searching on signal transduction pathway for drug selection support system in Targeted Cancer Therapy.

- Sanders, C.C. (2001): Mechanisms Responsible for Cross-Resistance and Dichotomous Resistance among the Quinolones. *Clinical Infectious Diseases* 32, S1–S8.
- Santos R., Ursu O., Gaulton A., Bento A. P., Donadi R. S., Bologa C. G., Overington J. P. (2016): A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19–34.
- Sarosiek T, Morawski P. (2018): Trastuzumab and its biosimilars. *Pol Merkur Lekarski*, 44(263):253-257.
- Schulz W. A. (2005): *Molecular Biology of Human Cancers, An Advanced Student's Textbook*. Department of Urology and Center for Biological and Medical Research, Heinrich Heine University, Dusseldorf, Germany.
- Skrott Z., Mistrik M., Andersen K. K., Friis S., Majera D., Gursky J., Ozdian T., Bartkova J., Turi Z., Moudry P., Kraus M., Michalova M., Vaclavkova J., Dzubak P., Vrobel I., Pouckova P., Sedlacek J., Miklovcova A., Kutt A., Li J., Mattova J., Driessen C., Dou Q. P., Olsen J., Hajduch M., Cvek B., Deshaies R. J., Bartek J. (2017): Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature* 552, 194–199.
- Schmidt M., Fan Z. (2001): Protection against chemotherapy-induced cytotoxicity by cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) in CKI-responsive cells compared with CKI-unresponsive cells. *Oncogene*, 20(43), 6164–6171.
- Targeted Therapy to Treat Cancer – National Cancer Institute. [online] [navštíveno 16. 5. 2020] Dostupné z <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>
- The Lancet Haematology. (2019). Childhood cancer on the agenda. *The Lancet Haematology*, 6(6), e285.
- Venter, H., Chitsaz, M., Brown, M.H. (2017): The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays Biochem.* 61, 127–139.
- World Health Organisation. [online] [navštíveno 14. 5. 202] Dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wright P., O'Neill M. F. (2012): 39 – Psychopharmacology, in: Wright P., Stern J., Phelan M. (Eds.), *Core Psychiatry (Third Edition)*. W.B. Saunders, Oxford, pp. 585–615.
- Wu Q., Yang Z., Nie Y., Shi Y., Fan D. (2014): Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters*, 347(2), 159–166.