

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**HODNOCENÍ VLIVU ROSKOVITINU A
JEHO DERIVÁTŮ NA EXPRESI
LÉKOVÝCH TRANSPORTÉRŮ *IN VITRO***

Rigorózní práce

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

Hradec Králové 2020

Mgr. Alice Mlčochová

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

V Hradci Králové

Mgr. Alice Mlčochová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce, doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D., za možnost dělat rigorózní práci pod jejím odborným vedením, za čas, který mi věnovala, materiály, konzultace a ochotu, se kterou ke mně přistupovala.

Dále chci poděkovat Mgr. Simoně Suché, která mi vždy ochotně odpověděla na všechny otázky, její pomoc při práci v laboratoři a v neposlední řadě za její trpělivost.

Poděkování patří i mému příteli a rodině, hlavně prarodičům, kteří mě hnali kupředu, podporovali mě za všech okolností a nedovolili mi vzdát se.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Alice Mlčochová

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

Název rigorózní práce: Hodnocení vlivu roskovitinu a jeho derivátů na expresi
lékových transportérů *in vitro*

V této práci jsme se zaměřili na studium interakcí vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDKi) s efluxními transportéry ABCB1 (P-glykoprotein, P-gp, MDR1) a ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) u buněčné linie LS174T – lidského adenokarcinomu tlustého střeva. Mezi námi vybrané látky patří roskovitin a jeho deriváty BA-12 a BP-14. Předchozí studie prokázaly, že tyto látky inhibují oba zmíněné transportéry a zvyšují tak účinek současně podávaných cytotoxických léčiv. Protože lékové interakce na úrovni transportérů mohou vznikat též ve smyslu indukce genů, jež tyto membránové proteiny kódují, bylo cílem této práce rozšířit znalost o uvedených derivátech roskovitinu z pohledu možného ovlivnění exprese *ABCB1* a *ABCG2*. Zvýšená exprese totiž může potencovat rozvoj mnohočetné lékové rezistence (MDR). Výsledky této práce získané s použitím metody qRT-PCR ukazují, že látky BA-12 a BP-14 ani po 24-hodinové, ani po 48-hodinové expozici nezvyšují expresi *ABCB1* ani *ABCG2* mRNA u LS174T buněk. Tato skutečnost nám naznačuje, že v případě uvedení do terapie by

tyto látky mohly plně využívat svou schopnost překonání MDR pomocí modulace efluxních transportérů, aniž by přitom zvyšovaly jejich expresi.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Mgr. Alice Mlčochová

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

Title of rigorous thesis: Study of the effect of roscovitine and its derivatives on the expression of drugs transporters *in vitro*

In this study we aimed to evaluate interactions of selected inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKi) with efflux transporters ABCB1 (P-glycoprotein, P-gp, MDR1) and ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) in cell line LS174T derived from human adenocarcinoma of colon. Among the selected compounds belong roskovitin and its derivates designed as BA-12 and BP-14. Previous studies demonstrated that these substances inhibit both mentioned transporters and therefore increase the effect of simultaneously administrated cytotoxic drugs. Since the drug interactions on the level of transporters can arise from induction of their corresponding genes, the aim of this work was to extend the current knowledge on mentioned derivates of roskovitin in terms of possible affection of *ABCB1* and *ABCG2* expression. Enhanced expression could promote developement of multidrug resistance (MDR). Results of this work obtained with qRT-PCR method show that neither BA-12 nor BP-14 increase expression of *ABCB1* and *ABCG2* mRNA in LS174T cells after 24 or 48 hours-long exposition. This fact

suggests that in the case these novel compounds would be introduced into the therapy, they could fully utilize their ability of overcoming MDR through modulation of efflux transporters, without inducing their expression.

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	6
1. Seznam zkratk	10
2. Úvod.....	12
3. Teoretická část	14
3.1. ABC transportéry	14
3.1.1. Fyziologická role transportérů	16
3.1.2. Lékové interakce	16
3.1.3. Mnohočetná léková rezistence(MDR)v terapii nádorových onemocnění	17
3.1.4. ABCB1 (P-glykoprotein, P-gp, MDR1).....	20
3.1.5. ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP).....	23
3.2. Inhibitory cyklin-dependentních kináz.....	26
3.2.1. Roskovitin	27
3.2.2. BA-12 a BP-14.....	28
4. Cíl práce	29
5. Experimentální část.....	30
5.1. Použitý materiál	30
5.1.1. Buněčné kultury	30
5.1.2. Chemikálie	30
5.1.3. Přístroje	31
5.2. Metody	32

5.2.1.	Kultivace a inkubace buněk	32
5.2.2.	Izolace RNA.....	32
5.2.3.	Ověření integrity izolované RNA pomocí gelové elektroforézy.....	33
5.2.4.	Měření čistoty a koncentrace RNA pomocí spektrofotometru.....	34
5.2.5.	Reverzní transkripce(RT).....	35
5.2.6.	Kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR).....	35
6.	Výsledky	37
6.1.	Exprese <i>ABCB1</i>	37
6.2.	Exprese <i>ABCG2</i>	40
7.	Diskuze.....	43
8.	Závěr	46
9.	Použitá literatura	47

1. Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette, rodina efluxních transportérů
ABCB1	P-glykoprotein, P-gp, MDR1
ABCG2	breast cancer resistance protein, BCRP
API	aqua pro injectione
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKi	inhibitor cyklin-dependentních kináz
cDNA	copy DNA (komplementární DNA)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's medium, médium pro kultivaci buněčných linií Hep G2
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	směs deoxyribonukleotidů
DTT	dithiothreitol
EDTA	sodná sůl ethylendiaminotetraoctové kyseliny
FBS	fetální bovinní sérum
HCC	hepatocelulární karcinom
MDR	mnohočetná léková rezistence
MEM	Minimum Essential Medium Eagle, médium pro kultivaci buněčných linií LS174T

NEAA	non-essential amino acid solution, neesenciální aminokyseliny
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
qRT-PCR	kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
PBS	fosfátový pufr
RT	reverzní transkriptáza

2. Úvod

Nádorová onemocnění představují velkou skupinu nemocí, charakterizovanou abnormálním růstem buněk, které ztratily kontrolu nad svým růstem a diferenciací. Nádorová onemocnění mohou ovlivnit téměř jakoukoli tkáň organismu, v závislosti na typu postižených buněk mají mnoho podtypů této nemoci, z nichž každý pak vyžaduje specifickou formu léčby. Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí na světě, v roce 2018 odpovídalo za odhadované úmrtí 9,6 milionu lidí (WHO, 2020).

Šesté místo v četnosti úmrtí způsobených nádorovým onemocněním zaujímá hepatocelulární karcinom (HCC). Jen velmi malé procento pacientů je schopno podstoupit potenciální léčbu, z důvodu pokročilých stádií nemoci v době diagnózy. Další překážkou u léčby HCC je častý vznik rezistence na léčiva, což vede k selhání klasické protinádorové terapie cytostatiky (Haider et al. 2013).

Mezi buněčné mechanismy, které zprostředkovávají rezistenci, patří inaktivace léčiva, změna cíle působení léčiva, eflux léčiva ven z buňky, snížení akumulace léčiva, oprava poškozené DNA, inhibice buněčné smrti, epigenetické modifikace a snížení apoptické odpovědi (Vadlapatla et al. 2013; Housman et al. 2014). Zvýšený eflux léčiva zajišťují ATP-dependentní (ABC) membránové transportéry, které vykazují v nádorových buňkách zvýšenou expresi, a to zejména po prvním kole chemoterapie.

Novou skupinou látek pro léčbu nádorových onemocnění jsou CDKi (inhibitory cyklin-dependentních kináz). Nedávné studie ukazují jasnou protinádorovou účinnost a sníženou toxicitu u těchto inhibitorů (např. palbociclib). Příznivé výsledky s palbociclibem a dalšími nedávno registrovanými léčivy ze skupiny inhibitorů CDK 4/6 kináz abemaciclibem a

ribociclibem ukazují, že CDKi s úzkým profilem selektivity mají významné využití v protinádorové terapii zejména u solidních tumorů (Hortobagyi 2018; Serra et al. 2019; Martin et al. 2020). U všech těchto CDKi byla potvrzena interakce s ABC transportéry a výhodná schopnost překonávat rezistenci nádorových buněk, a to i u buněk akutní myeloidní leukémie, aniž by tyto látky ovlivňovali genovou expresi transportérů (Sorf et al. 2018).

V návaznosti na tato nová klinicky úspěšná léčiva je nadále rozvíjen výzkum v oblasti hledání nadějných CDKi léčiv. Jedním ze zkoumaných směrů je přitom hledání látek odvozených od roskovitinu, potvrzeného CDKi inhibitoru se širším spektrem působení. Tato látka a dva od ní odvozené deriváty jsou přitom předmětem této práce, a to z pohledu schopnosti ovlivňovat expresi ABCB1 a ABCG2 transportérů.

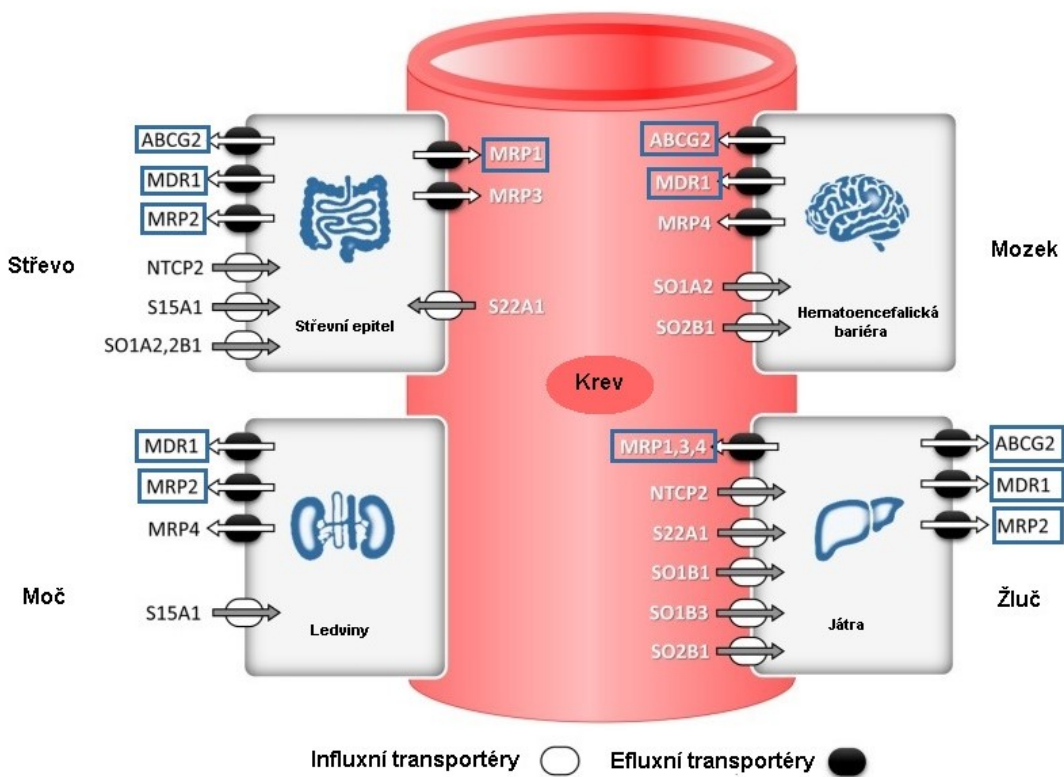
3. Teoretická část

3.1. ABC transportéry

ABC transportéry (ATP-binding cassette) jsou integrální membránové proteiny, které aktivně přenášejí látky s odlišnou strukturou a účinkem přes biologické membrány. Zajišťují zejména přísun živin, odstraňování odpadních produktů, generování energie a signalizaci buněk (Linton 2007).

Obecně jsou ABC transportéry exprimovány v játrech, ledvinách a tenkém střevě, kde ovlivňují absorpci, distribuci a exkreci látek (Obr. 1), což může vézt ke vzniku mnoha lékových interakcí (Konig et al. 2013). Dále se nacházejí v hematoencefalické bariéře, hematotestikulární bariéře a taky v placentě, kde chrání tyto citlivé tkáně před toxiny (Szakács et al. 2008). Dalším místem výskytu ABC transportérů jsou nádorové buňky, kde hrají zásadní roli při odstraňování cytotoxických látek, což může vézt k neúspěšné protinádorové terapii (Gottesman 2002).

Membránové transportéry mohou být tedy hlavními determinanty farmakokinetiky, bezpečnosti a účinnosti léků. Lidský genom kóduje 48 ABC proteinů, které dělíme na 7 podskupin (ABCA-ABCG). V lékové rezistenci hrají nejdůležitější roli tyto zástupci: ABCB1 (P-glykoprotein, P-gp, MDR1), ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) a částečně též ABCC1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) a ABCC2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2) (Szakács et al. 2008).



Obr. 1: Lokalizace vybraných transportérů ve střevním epitelu, endotelu mozkových kapilár, proximálních tubulech, a hepatocytech. Transportéry s vysokým významem pro farmakokinetiku léčiv jsou vyznačeny modře.

Převzato a upraveno dle Shaikh et al. 2017.

3.1.1. Fyziologická role transportérů

Fyziologickou funkcí ABC transportérů je chránit organismus a zejména jeho citlivé tkáně (jako je mozek, varlata a plod) před xenobiotiky, toxickými látkami a zajišťovat detoxifikaci hostitele. Mají významný dopad na farmakokinetické chování většiny používaných léčivých přípravků, a to zejména při ovlivňování perorální biologické dostupnosti, hepatobiliární a močové exkrece. Například při inhibici ABC transportérů ve střevě dojde ke zvýšení biologické dostupnosti, inhibice těchto transportérů v hematoencefalické bariéře způsobí zvýšený průchod toxických látek do mozku a při inhibici v exkretčních orgánech (játra a ledviny) dojde ke snížení exkrece, a tím k hromadění toxických látek v těle. Tyto interakce látek s transportéry nám do značné míry určují klinické využití, vedlejší účinky a rizika toxicity (Schinkel and Jonker 2003; Szakács et al. 2008).

3.1.2. Lékové interakce

ABC transportéry mohou ovlivnit farmakokinetiku léčiv. Farmakokinetické parametry vychází z absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování léčiv, tedy poskytují informace ohledně systémové koncentraci léčiva a jeho vylučování. Aktivita a hladina transportéru stanoví množství léčiva transportovaného do/z konkrétních tkání. Interakce mezi léčivy na úrovni transportérů se tedy projeví tak, že pokud podáme současně dvě látky, které jsou substrátem/induktorem/inhibitorem téhož transportéru, dojde ke změně jejich koncentrace (ve srovnání se samostatným podáním). Například pokud léčivo A inhibuje membránový transportér, který zajišťuje eflux léčiva B z buňky, zvýší se koncentrace léčiva B v buňce a pokud je tímto např. enterocyt, povede to ke zvýšení koncentrace léčiva B v systémovém oběhu (The International Transporter Consortium 2010).

Induktory stimulují genovou expresi, čímž dochází ke zvyšování množství transportérů. Indukce těchto transportérů je klinicky významná v lékových interakcích vedoucí ke změně absorpce a biologické dostupnosti léčiva, navíc i v rozvoji MDR rakovinných buněk vůči chemoterapeutikům (Zhou 2008).

Řada farmakokinetických studií již potvrdila interakci léčiv na úrovni ABCB1 a ABCG2 transportérů a tím i ovlivnění lékových plazmatických hladin a následně účinnosti terapie. Studium interakce zejména nových léčiv s ABC transportéry je dnes proto vyžadováno dle doporučení regulačních lékových agentur FDA a EMA již ve fázi registrace léčiv (Huang et al. 2007).

3.1.3. Mnohočetná léková rezistence (MDR) v terapii nádorových onemocnění

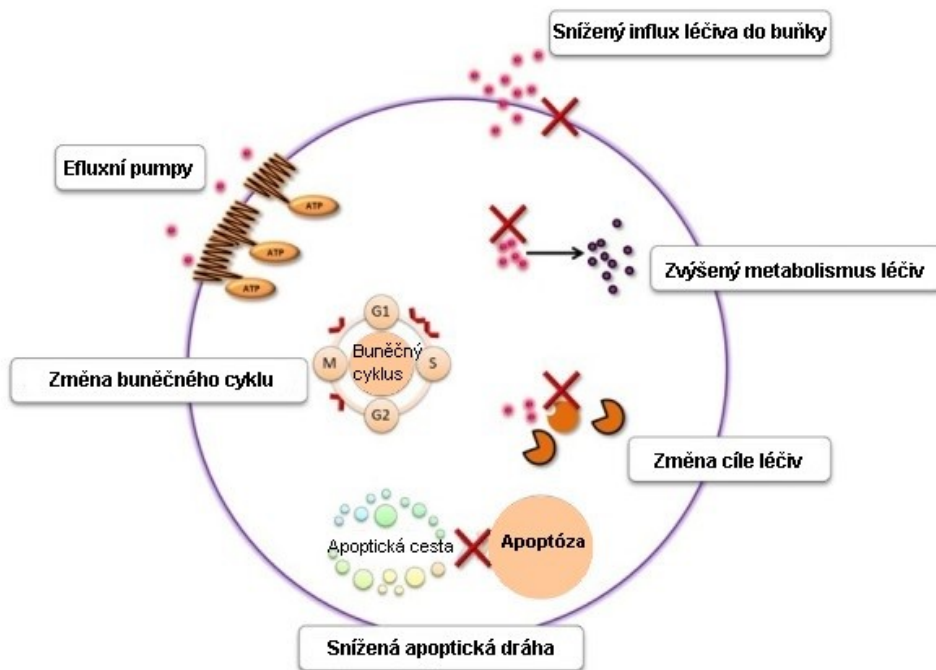
Mnohočetná léková rezistence je problémem v oblasti protinádorové terapie u léčiv různých struktur a účinku (Gottesman et al. 2002).

Mezi základní mechanismy rezistence léčiv v buňkách řadíme (1) snížený influx léčiv do buňky, (2) zvýšený eflux léčiv z buňky, (3) metabolismus léčiva a (4) různé změny v buňkách, které ovlivňují schopnost cytotoxických látek zabít buňku, jako např. změna buněčného cyklu, zvýšená oprava poškozené DNA nebo snížená schopnost buněčné apoptózy (Obr. 2).

Zvýšený eflux léčiva je zprostředkován zejména expresí ABC transportérů, které aktivně odčerpávají cytostatika ven z buňky a tím snižují cytotoxický účinek cytostatik (Gottesman et al. 2002). Vysoká exprese ABC transportérů tak může představovat překážku v úspěšné protinádorové terapii (Leonard 2003; Cascorbi 2006).

Klinický dopad MDR zprostředkované transportéry byl pozorován zejména u hematologických malignit, kde zvýšená exprese a aktivita ABCB1 a ABCG2 transportérů vedla ke špatné odpovědi na léčbu, a tím zhoršenou prognózu u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Liu et al. 2018). Ke zvýšené expresi transportérů dochází i u řady solidních nádorů (zejména např. u hepatocelulárního karcinomu) což má za následek selhávání terapie.

Dále je i zřejmé, že v jednom typu nádoru může být exprimováno více ABC transportérů. Studie, která zkoumala expresi všech 48 lidských ABC transportérů ve 281 vzorcích akutní myeloidní leukémie spojené s celkovým přežitím ukazuje, že celková doba přežití klesala se zvyšujícím se počtem a mírou exprese současně přítomných transportních proteinů (Robey et al. 2018). Takovéto výsledky naznačují, že samotný ABCB1 nemusí být převládajícím transportním mechanismem rezistence u nádorů, a že koexprese transportérů může vyžadovat inhibici více transportérů, aby se dosáhlo klinického prospěchu (inhibice jednoho z ABC transportérů pravděpodobně nepovede k překonání MDR) (Robey et al. 2018; Gottesman and Pastan 2015).



Obr. 2: Mechanismy mnohočetné lékové rezistence proti rakovinným chemoterapeutickým lékům. Rakovinové buňky mohou vyvinout rezistenci k více lékům různými mechanismy, jak je znázorněno. Mechanismy zahrnují snížený influx léčiva do buňky, sníženou intracelulární koncentraci léčiva efluxními pumpami, změněnými kontrolními body buněčného cyklu, změněnými cíli léčiv, zvýšeným metabolismem léčiva a snížením apoptické dráhy.

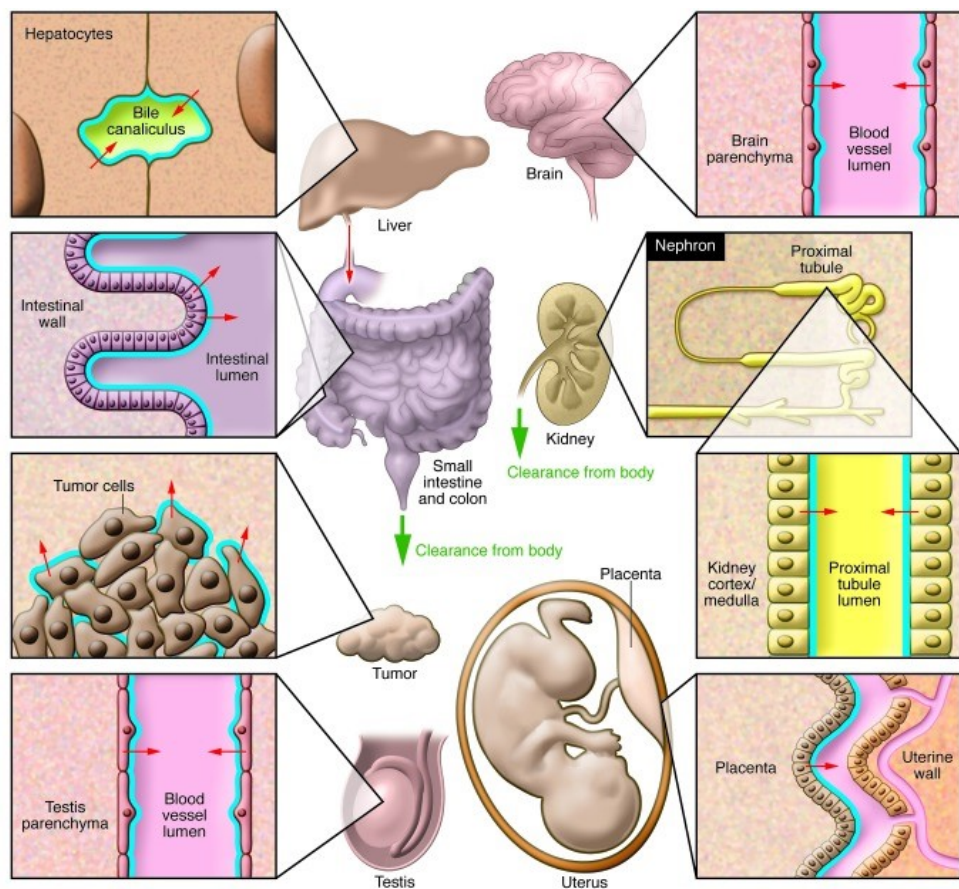
Převzato a upraveno dle Chai et al. 2010.

3.1.4. ABCB1 (P-glykoprotein, P-gp, MDR1)

Lokalizace a fyziologická funkce ABCB1

ABCB1 se nachází na apikální straně buněčných membrán různých tkání, které se podílejí na absorpci, distribuci a eliminaci látek (Obr. 3). Slouží jako permeační bariéra v gastrointestinálním traktu (endotel tenkého a tlustého střeva). Zde chrání organismus před absorpcí toxických látek, snižuje biodostupnost perorálně podávaných léčiv a omezuje transport svých substrátů do systémového oběhu (Szakács et al. 2008). Dále se vyskytuje v hematoencefalické bariéře, kde snižuje distribuci látek do citlivé mozkové tkáně a tím jí chrání. Ochrannou funkci má i v hematotestikulární bariéře, kde taktéž snižuje distribuci látek (Lee et al. 2010). ABCB1 v placentě má velmi významnou fyziologickou funkci, kdy svým aktivním transportem snižuje expozici plodu potenciálně škodlivými látkami a přispívá tak k ochraně plodu (Ceckova-Novotna et al. 2006). Další místo výskytu ABCB1 jsou játra (hlavní místo metabolismu a exkrece v těle), kde hraje důležitou roli v eliminaci léčiv, toxinů a jejich metabolitů přes hepatocytární membránu do žluči. V ledvinách se ABCB1 nachází na epiteliálních buňkách proximálních tubulů, kde zajišťují transport metabolitů do moči a jejich následnou exkreci (Leslie et al. 2005).

ABCB1 je exprimován v buňkách různých nádorů (u většiny hematologických malignit, ze solidních nádorů pak hlavně u karcinomů prsu, vaječníků, tlustého střeva, ledvin a jater). Jeho vysoká exprese je zpravidla spojena s vyšší agresivitou onemocnění, nižší klinickou odpovědí na léčbu a horší prognózou onemocnění (Penson et al. 2004; Thomas and Coley 2003).



Obr. 3Přehled exprese ABCB1v lidském těle. Modrá linie znázorňuje místa výskytu ABCB1 v tkáních. Červené šipky ukazují směr efluxu. Zelené šipky označují exkreci ABCB1 substrátů. ABCB1 je součástí hematoencefalické bariéry, hematotestikulární bariéry a placenty – ochrana před akumulací substrátů. ABCB1 v tenkém a tlustém střevě snižuje střevní absorpci a zajišťuje přímé vyloučení substrátu. V játrech a ledvinách zprostředkovává hepatobiliární a renální exkreci substrátů. Výskyt v nádorových buňkách přispívá k mnohočetné lékové rezistenci.

Převzato a upraveno dle Borst and Schinkel 2013.

Substráty, inhibitory a induktory ABCB1

ABCB1 přenáší neutrální nebo kladně nabitě hydrofobní sloučeniny, které mají většinou aromatickou doménu a terciální aminoskupinu. Byl prokázán eflux širokého rozsahu klinicky nepostradatelných chemoterapeutik (taxolu, vinkristinu, vinblastinu, etoposidu, daunorubicinu, doxorubicinu, topotekanu a irinotekanu) (Szakács et al. 2008; Fletcher et al. 2016). Mezi další substráty patří látky ze skupiny antiarytmik (digoxin, verapamil), antibiotik (erytromycin, tetracyklin, fluorochinolony), inhibitorů HIV-proteáz, analgetik (morfin), antiepileptik, antiemetik (domperidon, ondasetron), imunosupresiva (cyklosporin A, takrolimus, sirolimus) a další (Zhou 2008; The International Transporter Consortium 2010).

Interakce léčiv s ABCB1 je řešena jak z pohledu farmakokinetických interakcí ovlivňujících plazmatické hladiny léčiv, tak i z pohledu potenciálního zvratu rezistence v rakovinných buňkách. Použití těchto inhibitorů ABCB1 souběžně s existující chemoterapií by při vhodné distribuci cílené na nádorové buňky, mělo umožnit zvrátit MDR u rakovinných buněk s vysokou expresí *ABCB1* (Wang et al. 2020). Mezi známé inhibitory ABCB1 patří například verapamil, cyklosporin A, elakridar, chinidin, tariquidar (The International Transporter Consortium 2010).

Kromě ovlivnění funkce ABCB1 může řada léčiv vést i k indukci exprese *ABCB1*. Mezi induktory ABCB1 patří fenytoin, ritonavir, nelfinavir, probenecid, rifampicin, nebo například třezalka tečkovaná. *ABCB1* je indukován nejen určitými chemickými látkami, ale také fyzikálním stresem (ozařování X, ozařování ultrafialovým světlem a tepelný šok) (Zhou 2008). V případě indukce *ABCB1* a následné zvýšené exprese odpovídajícího transportéru dochází k změně farmakokinetiky ABCB1 substrátů a v případě nádorových buněk pak zvýšení efluxu řady protinádorových léčiv.

3.1.5. ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP)

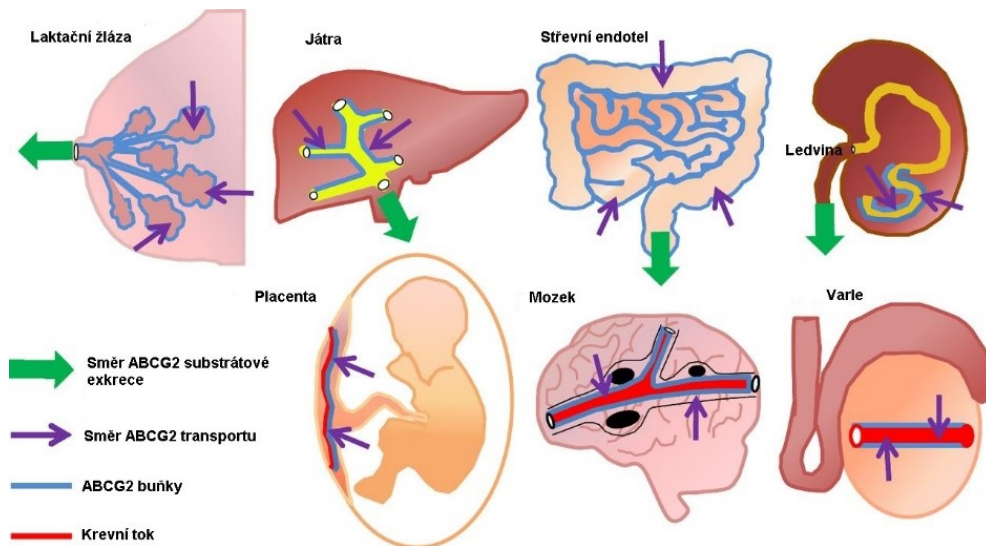
Lokalizace a fyziologická funkce ABCG2

Podobně jako ABCB1 je ABCG2 transportér fyziologicky exprimován na apikální straně epitelálních buněk v gastrointestinálním traktu, kde maximum exprese bylo nalezeno v duodenu s postupným poklesem podél traktu až ke konečníku (Obr.4) (Gutmann et al. 2005). ABCG2 je též exprimován v jaterních kanalikulárních membránách, což podporuje ochrannou úlohu transportéru nejen proti absorpci xenobiotik, ale i exkreci takových látek a jejich toxických metabolitů (Mo and Zhang 2011).

ABCG2 je stejně jako ABCB1 exprimován na hematoencefalické bariéře (Zhang et al. 2003). Oba transportéry jsou odpovědné za omezení vstupu mnoha xenobiotik do mozku, což můžeme vidět jako pozitivní dopad. Negativem této funkce může být bránění terapeutickým látkám dosáhnout jejich intracerebrálních cílů při léčbě rakoviny mozku (Cooray et al. 2002; Zhang et al. 2003).

V placentě má exprese ABCG2 důležitou roli při ochraně plodu před toxiny. Potvrzuje to mimo jiné studie ve které bylo dokázáno, že u myši s odebraným ABCG2 transportérem se výrazně zvýšila expozice plodu topotekanem a jinými látkami (Jonker et al. 2000).

ABCG2 se dále nachází v membráně kmenových buněk, které chrání před potenciálně toxickými látkami (An and Ongkeko 2009). Nadměrná exprese ABCG2 se často vyskytuje u různých nádorových onemocnění, zejména u hematopoetických malignit, ale též u nádorů prsu (Mo and Zhang 2011; Noguchi et al. 2009).



Obr. 4 Přehled exprese ABCG2 v lidském těle. Zelené šipky znázorňují směr exkrece, fialové šipky směr transportu do tkání. Modré linie představují místa exprese ABCG2 a červené krevní tok.

Převzato a upraveno dle Stacy et al. 2013.

Substráty, inhibitory a induktory ABCG2

ABCG2 působí jako efluxní pumpa pro široké spektrum chemoterapeutik (např. mitoxantron, methotrexát, imatinib, irinotekan, topotekan, ortataxel, vinblastin, vinkristin, daunorubicin), antivirotik (lopinavir, nelfinavir, abakavir, lamivudin) či antibiotik (ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin). Mezi jeho substráty navíc patří i kyselina listová, cyklosporin A a aflatoxin B1 (Szakács et al. 2008; Fletcher et al. 2016).

Protože ABCG2 hraje důležitou roli v MDR, byla i pro něj hledána a nalezena celá řada inhibitorů s cílem překonání rezistence nádorových buněk. Jako silný a specifický inhibitor ABCG2 působí fumitremorgin C (diketopiperazin, fungální toxin). Fumitremorgin C je schopen zvrátit rezistenci na mitoxantron, doxorubicin a topotekan, ale už ne na paklitaxel (Hasanabady and Kalalinia 2016). Další silný ABCG2 inhibitor je Ko143, derivát fumitremorginu, cca 10x vyšší inhibiční účinnější vůči ABCG2. GF120918, silný inhibitor ABCG2 a současně též ABCB1, může zvyšovat biologickou dostupnost cytotoxických protinádorových léčiv, dále zvyšuje hladiny antiretrovirotik v mozku a CNS. Z klinické studie je patrné, že současné podání GF120918 s topotekanem (substrátem ABCG2) zvyšuje jeho biologickou dostupnost o 30-90% (Kruijtzter et al. 2002). Mezi další inhibitory patří imunosupresiva (cyklosporin A, takrolimus), blokátory vápníkových kanálků (nitrendipin, nimodipin), inhibitor protonové pumpy omeprazol a také antagonist estrogenu tamoxifen (Hasanabady and Kalalinia 2016). Použití výše uvedených ABCG2 inhibitorů pro překonání MDR je nicméně komplikováno faktem, že inhibice ABCG2 v nádorových buňkách je spojena s inhibicí ABCG2 ve fyziologických tkáních a tím vyšší toxicitou takové léčby. Proto se dnes o použití inhibitorů ABCG2 uvažuje zejména jen v kombinaci s cílenou distribucí přímo k nádorovým buňkám.

Látky, které fungují jako induktory ABCG2, stimulují genovou expresi (zvyšují počet transportérů). Mezi induktory ABCG2 patří například maraviroc, elvitegravir (Zembruski et al. 2011). Exprese ABCG2 je spojena s horšími výsledky při léčbě akutní myeloidní leukémií, akutní lymfoblastické leukémií, rakovině plic i prsu (Mao and Unadkat 2015; Fletcher et al. 2016).

3.2. Inhibitory cyklin-dependentních kináz

V dnešní době je velká snaha hledat cílená léčiva v protinádorové terapii, neboť tato terapie, která je zaměřena na odlišnosti mezi nádorovou a zdravou buňkou, nepoškozuje DNA (na rozdíl od většiny cytostatik). Mezi cílenou protinádorovou terapií patří i inhibitory proteinkináz.

Cyklin-dependentní kinázy jsou velkou podskupinou proteinových kináz, které hrají zásadní roli při regulaci progresu buněčného cyklu a transkripce RNA. Je známo že aktivní cyklin-dependentní kinázy jsou důležité k uvolnění transkripčních faktorů nutných pro průběh buněčného cyklu.

Různé genetické a epigenetické události způsobují nadměrnou aktivitu CDKs buněčného cyklu, což vede ke ztrátě kontroly buňky nad proliferací a rozvoji nádorového onemocnění. Inhibice CDK může vést k zastavení buněčného cyklu nebo k apoptóze buňky (Canavese et al. 2012; Law et al. 2015).

Aktivita a exprese CDK je v nádorových buňkách zvýšená, její inhibice tak vede k terapeuticky významné apoptóze buňky a představuje tak jeden z nových přístupů v léčbě nádorových onemocnění (Law et al. 2015).

Prvním registrovaným léčivem z této skupiny byl v listopadu roku 2016 palbociklib (Public Health – Union Register of medicinal products, 2020), následovaly v srpnu 2017 ribociklib (Public Health – Union Register of medicinal products, 2020) a v říjnu 2018 abemaciklib (Public Health – Union Register of medicinal products, 2020).

V průběhu vývoje nových CDKi byl testován i roskovitin, nicméně byl v klinických studiích neúspěšný. Následovala řada testování jeho derivátů, mezi něž patří i v této práci hodnocené látky BA-12 a BP-14.

3.2.1. Roskovitin

Roskovitin (CYC-202, seleciclib) je široce používán jako biologický nástroj při studiích buněčného cyklu, nádorových buněk, apoptózy a neurobiologie. Kromě toho byl hodnocen jako potenciální léčivo pro léčbu nádorových onemocnění, neurodegenerativních onemocnění, zánětů, virových infekcí, polycystických onemocnění ledvin a glomerulonefritidy.

Účinky roskovitinu byly hodnoceny na široké úrovni různých nádorových buněčných linií. Byly pozorovány dva základní procesy – zastavení buněčného cyklu a zahájení apoptózy. Navíc byl prokázán synergický účinek s dalšími protinádorovými látkami (doxorubicin, taxol, vinblastin, paclitaxel, cisplatina, etoposid, tamoxifen) (Cicenas et al. 2015). V pokusech s xenografy jaterních nádorů byly pozorovány nadějně výsledky, roskovitin významně snižoval velikost nádorů a nenavozoval chemorezistenci (Haider et al. 2013). Následně byl zařazen do klinických studií, kde byl testovaný pro léčbu karcinomu plic a nosohltanu, ty však byly po II. fázi ukončeny (Clinical Trials, 2020).

3.2.2. BA-12 a BP-14

BA-12 a BP-14 jsou deriváty roskovitinu, které byly hodnoceny jako potenciální léčiva v terapii nádoru jater. Ve studii na zvířatech bylo prokázáno, že BP-14 vykazovala nízkou biologickou dostupnost po intraduodenálním podání, dále že distribuce byla pozorována ve všech analyzovaných tkáních (mozek, játra, plíce, ledviny, slezina, tuková tkáň, sval). Dále bylo prokázáno, že BP-14 vykazuje silné antiproliferační účinky v buněčných liniích lidské rakoviny. BP-14 je tedy hodnoceno jako experimentální léčivo pro léčbu hepatoceulárních karcinomů (Šíroká et al. 2018; Allegri et al. 2016).

Ve studii Novel Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases Combat Hepatocellular je patrné, že tyto látky způsobily zástavu růstu buněčné linie hepatocelulárního karcinomu a navodily apoptózu. Naproti tomu nevykázaly žádnou cytotoxicitu a apoptózu u primárních lidských hepatocytů. Navíc v buňkách hepatocelulárního karcinomu nebyla pozorována žádná ztráta chemosenzitivity i po dlouhém vystavení inhibitorů. Data ukazují, že BA-12 nebo BP-14 vykazují silné protinádorové účinky zejména u karcinomu jater (Haider et al. 2013).

4. Cíl práce

Studium vlivu látek ze skupiny CDKi (roskovitin, BA-12 a BP-14) na expresi lékových transportérů ABCB1, ABCG2 na úrovni mRNA *in vitro*.

5. Experimentální část

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Buněčné kultury

- LS174T – buněčná linie lidského adenokarcinomu tlustého střeva (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

5.1.2. Chemikálie

- Roskovitin a jeho testované deriváty BA-12 a BP-14 byly připraveny a poskytnuty Laboratoří růstových regulátorů (Univerzita Palackého, Olomouc) na základě spolupráce s prof. Miroslavem Strnadem.
- Rifampicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- DMSO – dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagles's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- MEM – Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- FBS – fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- NEAA – roztok neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- PBS – fosfátový pufr (Lonza)
- Trypsin 0,25 % + 0,2 % EDTA (sodná sůl ethylendiaminotetraoctové kyseliny) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA)

- Následující chemikálie byly získané v analytické čistotě od firmy Penta: Chloroform, 2-propanol, soli pro přípravu TEA pufru

5.1.3. Přístroje

- Centrifuga
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000
- PCR cycler pro reverzní transkripci (Bio-Rad)
- PCR cycler pro qRT-PCR: Quant Studio 6 (Applied Biosystems)
- Inkubátor, SANYO MCO-18AC(UV), (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Laminár Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- Optický mikroskop, Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Italie)
- UV-transluminátor Chemidoc MP (Bio-Rad)

5.2. Metody

5.2.1. Kultivace a inkubace buněk

Kultivace buněčných linií probíhala při 37°C v atmosféře 5% CO₂. Pro buněčnou linii LS 174T byla kultivována v MEM s přidavkem NEAA a 10% FBS.

Po dosažení 70 – 80% konfluency byly buňky nasazeny v počtu 160 tisíc buněk na jamku 24-jamkové destičky. Po 24-hodinové kultivaci v destičkách bylo médium odsáto a jednotlivé jamky byly opláchnuty předeřhřátým PBS. Do příslušných jamek k buňkám byly přidány inhibitory rozpuštěné v DMSO a následně naředěné do media o koncentracích: BA-12 (445 nM), BP-14 (70 nM), roskovitin (8,85 μM), rifampicin (10 μM). Jako kontrola bylo použito čisté médium s přidavkem DMSO. Buňky byly s látkami inkubovány při 37°C, v atmosféře 5% CO₂ po dobu 24 a 48 hodin.

5.2.2. Izolace RNA

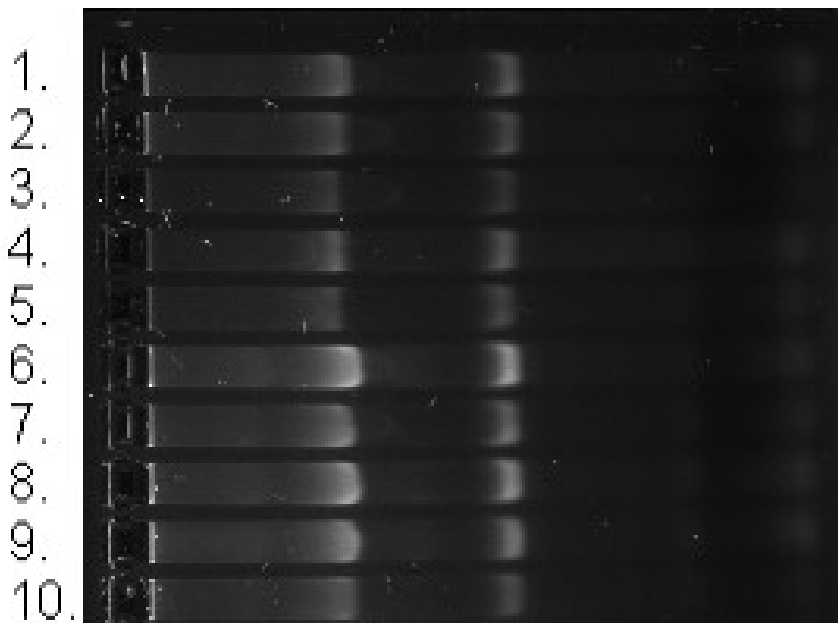
Po ukončení inkubace (24 nebo 48 hodin) bylo z jamek odsáto médium, byly propláchnuty studeným PBS a přidáno 400 μl TRI Reagentu na jamku. Lyzáty z jednotlivých jamek byly v triplicátech dle jednotlivých inhibitorů a délky inkubace přeneseny do mikrozkušavek. Následně proběhla izolace RNA dle protokolu výrobce TRI Reagentu na principu fenol-chloroformové extrakce. Ke každému vzorku byl přidán chloroform (200 μl /1 ml TRI Reagentu). Vzorky byly řádně třepány po dobu 15 sekund a poté se nechaly 10 minut odstát do rozdělení fází. Následně byly zcentrifugovány (4°C, 12 000 g, 15 min). Po centrifugaci byla s vysokou opatrností odsáta vrchní vodná fáze obsahující RNA a přenesena do zkumavek. Na 1 ml vzorku v TRI

Reagentu bylo přidáno 0,5 ml 2-propanolu, promícháno a 10 minut ponecháno při pokojové teplotě, následně zcentrifugováno (4°C, 12000 g, 12 min). RNA precipituje tvorbou bílých pelet na stěně zkumavky. Po odsátí supernatantu byl precipitát propláchnut 75% ethanolem (1 ml ethanolu na 1 ml TRI Reagentu) a zcentrifugován (4°C, 12000 g, 5 min). Tento poslední krok byl proveden 2x. Po odsátí ethanolu a vysušení pelety v druhém kroku byl vzorek rozpuštěn v API (aqua pro injectione) (20 µl API na původní 1 ml TRI Reagentu).

5.2.3. Ověření integrity izolované RNA pomocí gelové elektroforézy

Pro ověření kvality a integrity izolované RNA byla použita elektroforéza na agarózovém gelu. Ta slouží k oddělení nukleových kyselin na základě pohybu v elektronovém poli, kdy DNA s větší molekulovou hmotností zůstane na začátku v místě aplikace vzorku na gel a RNA, která má menší molekulovou hmotnost, putuje dál. V případě zachovalé integrity RNA pak tato tvoří na gelu dva zřetelné proužky (odpovídající ribozomální RNA), které jsou indikátorem toho, že v izolované RNA nedošlo k rozkladu a mRNA je možné použít dál do reverzní transkripce (Obr. 5).

Vzorky byly připraveny z 1 µl izolovaného RNA, 4 µl API, 1 µl Gel Loading Dye Blue. Gel (1,5 %) byl připraven rozpuštěním 0,6 g agarózy ve 40 ml TEA pufru (48,4 g Tris-base; 10,9 g ledová kyselina octová; 2,92 g EDTA; doplněno do 1 litru destilovanou vodou). Poté byla směs opakovaně zahřáta v mikrovlné troubě a dobře rozmíchána. Gel byl nalitý do vaničky, vložil se hřeben a nechalo se vše ztuhnout. Po ztuhnutí se hřeben vyndal a na gel se nalil TEA pufr. Poté se postupně zaváděly vzorky. Separace probíhala při napětí 100 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do UV-transluminátoru Chemidoc MP za účelem vizualizace.



Obr. 5: Gelová elektroforéza vybraných vzorků. (1) LS174T + kontrola po 24 hod., (2) LS174T + BA-12 po 24 hod., (3) LS174T + BP-14 po 24 hod., (4) LS174T + roskovitín po 24 hod., (5) LS174T + rifampicin po 24 hod., (6) LS174T + kontrola po 48 hod., (7) LS174T + BA-12 po 48 hod., (8) LS174T + BP-14 po 48 hod., (9) LS174T + roskovitín po 48 hod., (10) LS174T + rifampicin po 48 hod.

5.2.4. Měření čistoty a koncentrace RNA pomocí spektrofotometru

Z izolované RNA bylo odebráno 2 μl do nové zkumavky. Z toho 1 μl byl přidán na spektrofotometr Nanodrop. Byl použit program Nucleotic acid – RNA 40. Přístroj změří koncentraci RNA v $\text{ng}/\mu\text{l}$ a dva absorpční poměry, které poukazují na čistotu vzorku. Hodnoty absorbance 260/280 by se měly pohybovat mezi 1,8-2,2 (nižší hodnoty poukazují na kontaminaci proteiny a DNA). Hodnoty absorbance 260/230 by měly být vyšší než 1,7 (nižší hodnoty poukazují na kontaminaci organickými rozpouštědly). Vzorky byly na základě naměřených koncentrací naředěny na jednotnou koncentraci RNA (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a dále použity pro reverzní transkripci.

5.2.5. Reverzní transkripce (RT)

Reverzní transkripce se skládá ze dvou základních kroků. V prvním kroku k vyizolované mRNA v takovém množství, které koreluje s 1000 ng mRNA v reakci, bylo přidáno oligo (dT) primer (1 µl). Doplněno do objemu 12,5 ml API. Takto připravené a zvortexované vzorky byly vloženy do přístroje iCycler (Bio-Rad). Program "RT-STEP1" probíhal 5 minut při teplotě 65°C. V druhém kroku bylo ke každému vzorku přidáno 7,5 µl v čas potřeby připraveného Master Mixu (Protoscript II RT reakční pufr 4 µl, DTT (dithiothreitol) 2 µl, 10 mM dNTP (směs deoxyribonukleotidů) mix 1 µl, Protoscript II RT 0,5 µl). Zvortexované vzorky byly vloženy zpět do cykleru a byl zvolen teplotní program 42°C, 50 minut, poté 65°C 20 minut). V druhém kroku reakce tedy bude objem jednoho vzorku 20 µl. Nakonec vzorky schladíme a uchováváme při teplotě -20°C.

5.2.6. Kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)

Po izolaci RNA a následné reverzní transkripci, kdy máme k dispozici cDNA (copyDNA), se mohlo začít s vlastní kvantitativní PCR (polymerase chain reaction). Jde o metodu rychlého a snadného zmožení úseku DNA na principu replikace nukleových kyselin. Podmínkou replikace je denaturace (oddělení vláken DNA), ke které je potřeba vysoké teploty. Proto se používá nejčastěji termostabilní DNA Taq polymeráza.

V PCR bylo nutné zředit cDNA na koncentraci 12,5 ng/µl. Jelikož po RT jsme měli k dispozici koncentraci 50 ng/µl cDNA, zředili jsme tak, že jsme k 20 µl cDNA přidali 60 µl API. Dále jsme připravili směs pro každý gen

odděleně. Geny bude třeba amplifikovat u každého vzorku exponovanému léčivu v triplicátu (tzn. 3 jamky pro každý den a vzorek). Dopočítalo se množství objemu komponent na daný počet jamek pro určitý gen. V našem případě na každou jamku 2,5 μ l Master mixu; 1,25 μ l API; 0,25 μ l roztoku genu. Postupně na 96-jamkové PCR plato pipetujeme do každé jamky 1 μ l cDNA a poté 4 μ l připravené směsi daného genu. Po napipetování bylo plato přikryto transparentní fólií a vloženo do přístroje Quant, kde následně proběhla qPCR amplifikace v odpovídajícím teplotním profilu a počtu cyklů 40.

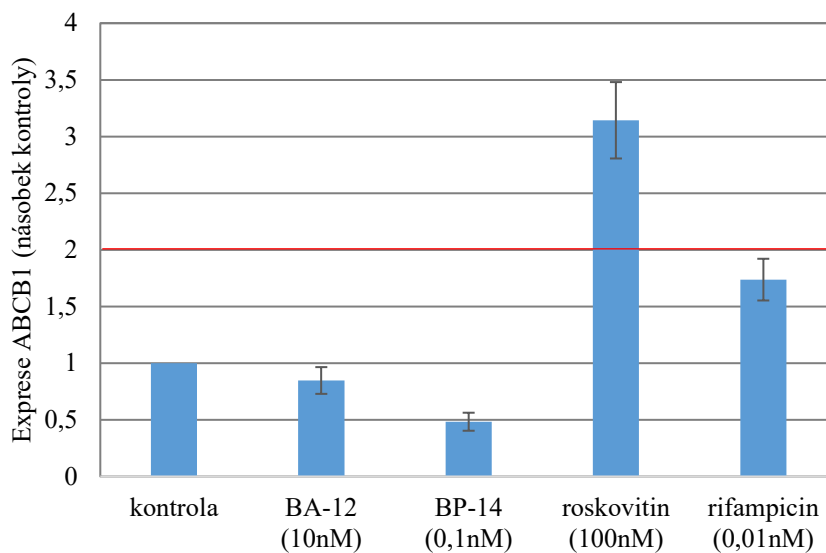
6. Výsledky

6.1. Exprese *ABCB1*

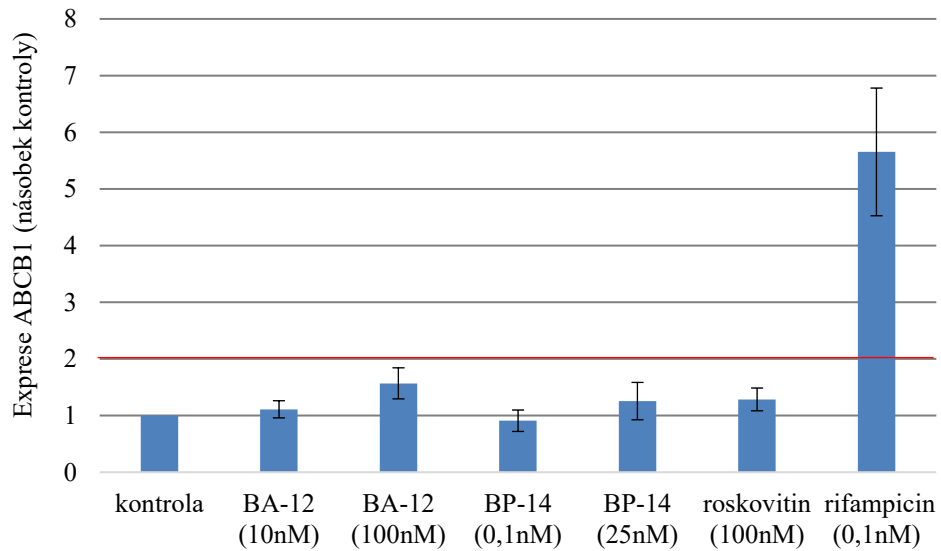
Hodnotili jsme expresi *ABCB1* na buněčné linii LS174T po 24-hodinové expozici látkám BA-12 v koncentraci 10 nM a BP-14 v koncentraci 0,1 nM. Hodnoty byly normalizovány k průměru housekeeping genu B2M a HPRT1. Vybrané koncentrace vychází z dříve naměřených hodnot cytotoxicity IC₅₀. Roskovitin v koncentraci 100 nM byl použit jako parentní látka od níž jsou obě testovaná potenciální léčiva BA-12 a BP-14 odvozena. Kontrolním induktorem byl rifampicin (0,01 nM). Pro zhodnocení, jestli jde o indukci nebo ne je hranice dvojnásobku exprese. Roskovitin schopnost indukce *ABCB1* prokázal (3,14násobek kontroly), zatímco oba jeho deriváty neprokázaly výrazné zvýšení exprese, naopak hodnoty exprese *ABCB1* po expozici oběma látkám klesly. U BA-12 se naměřena hodnota rovnala 0,85 a u BP-14 to bylo 0,48. Jako kontrolu jsme použili 0,01 % DMSO (Obr. 6).

Po pilotním experimentu se schopností indukce transportérů po 24-hodinové expozici látkám, jsme provedli hodnocení indukce *ABCB1* po 48 hodinách. Obě testované látky již byly použity ve dvou koncentracích, BA-12 (koncentrace 10 nM a 100 nM), BP-14 (koncentrace 0,1 nM a 25 nM), roskovitin pak v koncentraci 100 nM, kontrolní induktor rifampicin opět v koncentraci 0,01 nM. Mohli jsme vidět pouze lehkou zvýšenou expresi u BA-12, a to zvýšení o 1,11x v koncentraci 10 nM. V desetinásobně větší koncentraci BA-12 došlo k zvýšení exprese pouze o 1,57. Obdobných výsledků jsme dosáhli u BP-14, kdy u koncentrace 0,1 nM se exprese změnila na 0,91násobek. Stejný pokus u BP-14 jsme udělali i s koncentrací 25 nM, kde k zvýšení došlo na 1,26násobek. U roskovitinu vyšla exprese na 1,29násobek (Obr. 7).

Z těchto výsledků je patrné, že BA-12 i BP-14 výrazně nezvyšují expresi transportérů.



Obr.6: Expresa ABCB1 v LS174T buňkách po 24-hodinové kultivaci. Hodnoty byly normalizovány k průměru housekeeping genu B2M a HPRT1 + vztáhnuté ke kontrole (DMSO). V grafu vynesené hodnoty relativní exprese se směrodatnou odchylkou (triplikát každého vzorku).



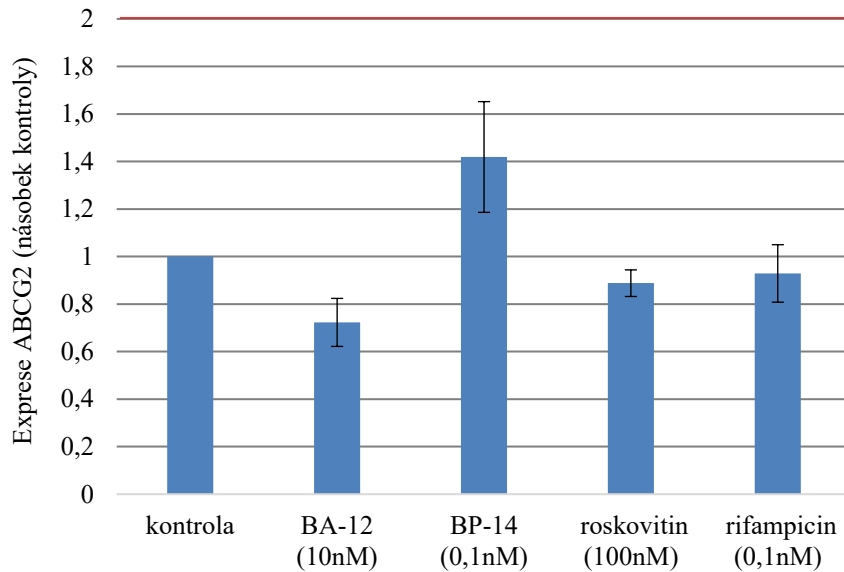
Obr.7: Expresa ABCB1 v LS174T buňkách po 48-hodinové kultivaci. Hodnoty byly normalizovány k průměru housekeeping genu B2M a HPRT1 + vztáhnuté ke kontrole (DMSO). V grafu vynesené hodnoty relativní exprese se směrodatnou odchylkou (dva biologické replikáty v triplikátě pro každý vzorek).

6.2. Expresa *ABCG2*

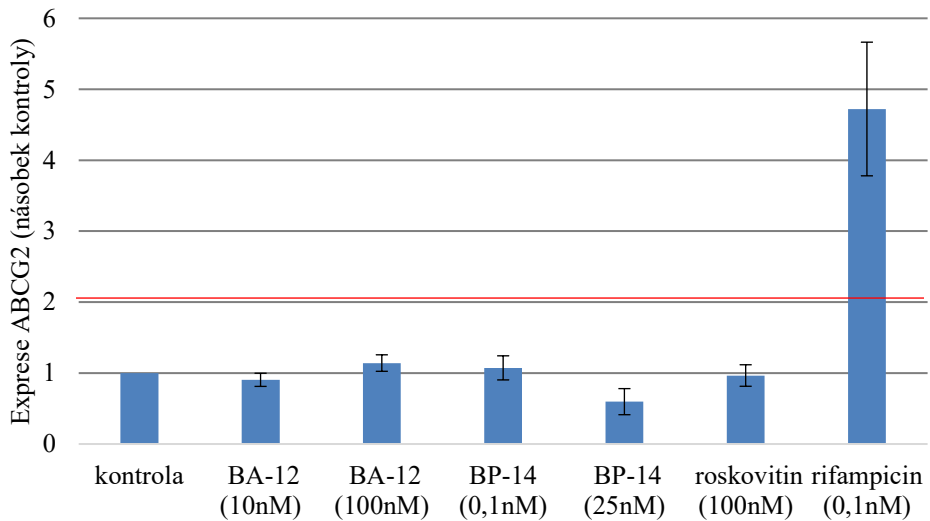
Expresi *ABCG2* jsme hodnotili, stejně jako *ABCB1*, na buněčné linii LS174T po 24-hodinové a 48-hodinové expresi látkami BA-12, BP-14, roskovitinem a rifampicinem. U 24-hodinové expresi roskovitin, stejně jako oba jeho deriváty, neprokázaly výrazné zvýšení exprese. Hodnoty exprese *ABCG2* po expozici BA-12 i roskovitinu klesly, kdežto u BA-14 byly lehce zvýšené. U BA-12 se naměřena hodnota rovnala 0,72, u BP-14 to bylo 1,42. Jako kontrolu jsme použili 0,01% DMSO (Obr. 8).

Po experimentu se schopností indukce transportérů po 24-hodinové expozici látkám, jsme provedli hodnocení indukce *ABCG2* po 48 hodinách. Obě testované látky již byly použity ve dvou koncentracích: BA-12 (koncentrace 10 nM a 100 nM), BP-14 (koncentrace 0,1 nM a 25 nM), roskovitin pak v koncentraci 100 nM, kontrolní induktor rifampicin opět v koncentraci 0,01 nM. Mohli jsme vidět snížení exprese u BA-12, a to na 0,91násobek v koncentraci 10 nM. V 100 nM koncentraci BA-12 došlo k zvýšení exprese pouze o 1,14. Obdobných výsledků jsme dosáhli u BP-14, kdy u koncentrace 0,1 nM se exprese zvýšila 1,07násobně. Stejný pokus u BP-14 jsme udělali i s koncentrací 25 nM, kde se naopak exprese snížila na 0,60násobek. U roskovitinu vyšla exprese na 0,97násobek (Obr. 9).

Z těchto výsledků je patrné, že BA-12 i BP-14 výrazně nezvyšují expresi transportérů.



Obr. 8: Expresa ABCG2 v LS174T buňkách po 24-hodinové kultivaci. Hodnoty byly normalizovány k průměru housekeeping genu B2M a HPRT1 + vztáhnuté ke kontrole (DMSO). V grafu vynesené hodnoty relativní exprese se směrodatnou odchylkou (triplikát každého vzorku).



Obr. 9: Expresa ABCG2 v LS174T buňkách po 48-hodinové kultivaci. Hodnoty byly normalizovány k průměru housekeeping genu B2M a HPRT1 + vztáhnuté ke kontrole (DMSO). V grafu vynesené hodnoty relativní exprese se směrodatnou odchylkou (dva biologické replikáty v triplikátě pro každý vzorek).

7. Diskuze

V této práci jsme hodnotili nová potencionální protinádorová léčiva ze skupiny derivátů roskovitinu, BA-12 a BP-14, z pohledu schopnosti indukce genové exprese *ABCB1* a *ABCG2*, genů kódujících efluxní membránové transportéry, jež jsou často zodpovědné za vznik rezistence nádorových buněk. Na základě předchozích studií víme, že BA-12 i BP-14 jsou látky s potenciálem inhibice ABC transportérů a překonávání lékové rezistence zprostředkované právě ABC transportními proteiny (Allegri et al. 2016; Šíroká et al. 2018).

Pilotní *in vivo* studie s použitím xenograftů prokázala snížení velikosti jaterního nádoru po aplikaci BP-14. Jaterní tumory představují nádory s častou rezistencí (velmi často právě na podkladě exprese ABC transportérů), proto by použití BP-14 v kombinaci s dalším cytostatikem (jež je substrátem *ABCB1*) mohlo vést k synergickému účinku (Haider et al. 2013). Neovlivnění exprese ABC transportérů při expozici léčiva je v tomto případě žádoucí a je příznivým faktorem v charakteristice těchto nových potenciálních léčiv.

Interakce léčiv s lékovými transportéry je aktuální téma, které je diskutováno nejen na úrovni akademických a výzkumných pracovišť, ale též farmaceutického průmyslu a regulačních lékových agentur (Brum 2020; Zamek-Gliszczyński et al. 2012). Léčiva mohou interagovat na několika úrovních, samy být substráty transportérů a/nebo jejich funkci ovlivňovat. Ovlivnění může spočívat v genové indukci transportérů či v inhibici funkce vzniklého transportního proteinu. Obě situace vedou ke změně farmakokinetiky léčiva, které je současně podáno a je substrátem daného transportéru. Dochází ke změně koncentrace v místě účinku, což může vést ke snížení účinku léčiva, nebo k vystupňování nežádoucích účinků. U obou

našich testovaných látek víme, že jsou inhibitory ABCB1 i ABCG2, tedy mají potenciál využití jako modulátorů rezistence v nádorových buňkách. V případě, že by expresi transportérů ještě stimulovaly, tak by to znamenalo rozvoj MDR a selhání terapie.

Pro vlastní qRT-PCR analýzu jsme použili jsme tři housekeepingové geny, vůči kterým jsme expresi vztahovali. Jeden housekeepingový gen (GAPDH) jsme vyřadili na základě jednoduché analýzy po spočítání hodnot průměru Ct a směrodatné odchylky. Následně jsme vyřadili gen s nejvyšší variabilitou, ze dvou ostatních s prokázanou stabilitou exprese jsme pak kalkulovali geometrický průměr, vůči kterému byla exprese cílových genů *ABCB1* i *ABCG2* vztahována.

Na základě našich výsledků však můžeme považovat tyto deriváty roskovitinu za výhodná léčiva, která významně nezvyšují expresi těchto transportérů a nenavozují tak MDR. Indukce *ABCB1* roskovitinem byla po 24-hodinové expozici viditelná, ale v případě 48-hodinové expozice se nepotvrdila. Tato situace mohla nastat z toho důvodu, že roskovitin vyvolává pouze krátkodobou změnu exprese, která po dvou dnech vymizí. Naopak, zvýšená exprese *ABCB1* i *ABCG2* byla potvrzena též pro kontrolní induktor rifampicin, až po 48 hodinách kultivace s LSC buňkami, zatímco po 24 hod nebyla pozorovatelná. Vysvětlení může být v jiném mechanismu a ovlivnění rozdílného stupně regulace genové exprese u dané buněčné linie. Pro ověření těchto výsledků by bylo nutné celý pilotní pokus rozšířit a především ověřit, jestli bude mít vliv na následnou expresi translatovaného proteinu a mohli bychom předpokládat i následnou změnu funkce transportérů (Hershey et al. 2012). Pokud by se tato skutečnost potvrdila, docházelo by ke zvýšenému efluxu ABCB1 substrátů (např. metotrexát, paklitaxel, topotekan, etoposid, doxorubicin, daunorubicin, atd.) ven z buněk a tím k rozvoji rezistence

nádorů. Pro potvrzení/vyloučení možného místa nových testovaných derivátů roskovitinu v terapii nádorů bude nutné získat více informací o těchto látkách i prostřednictvím dalších experimentálních modelů.

8. Závěr

Cílem práce bylo studium vlivu látek ze skupiny CDKi (roskovitin, BA-12 a BP-14) na expresi vybraných lékových transportérů na buněčné linii lidského adenokarcinomu tlustého střeva. Z našich výsledků je patrné, že látky BA-12 a BP-14 nezvyšují expresi *ABCB1*, ani *ABCG2*, a to ani po 24-hodinové, ani po 48-hodinové expozici. Tato vlastnost by byla v terapii výhodná a žádoucí, neboť by nedocházelo ke změně farmakokinetiky, ani ke snížení akumulace cytotoxických léků v nádorových buňkách.

9. Použitá literatura

Allegri L, Baldan F, Mio C, et al (2016) Effects of BP-14, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, on anaplastic thyroid cancer cells. *Oncology Reports* 35:2413–2418. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4614>

An Y, Ongkeko WM (2009) ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:1529–1542. <https://doi.org/10.1517/17425250903228834>

Borst P, Schinkel AH (2013) P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals. *Journal of Clinical Investigation* 123:4131–4133. <https://doi.org/10.1172/JCI70430>

Brum L (2020) Guidance for Industry. *Interaction Studies* 46

Canavese M, Santo L, Raje N (2012) Cyclin dependent kinases in cancer: Potential for therapeutic intervention. *Cancer Biology & Therapy* 13:451–457. <https://doi.org/10.4161/cbt.19589>

Cascorbi I (2006) Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 112:457–473. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.009>

Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F (2006) P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. *Reproductive Toxicology* 22:400–410. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.01.007>

Chai S, To KK, Lin G (2010) Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines. *Chinese Medicine* 5:26. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-5-26>

Cicenas J, Kalyan K, Sorokinas A, et al (2015) Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann Transl Med* 3:. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.61>

Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, Barrand MA (2002) Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* 13:2059–2063

Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, et al (2016) ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates* 26:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.03.001>

Gottesman MM (2002) Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine* 53:615–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929>

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2:48–58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>

Gottesman MM, Pastan IH (2015) The Role of Multidrug Resistance Efflux Pumps in Cancer: Revisiting a JNCI Publication Exploring Expression of the MDR1 (P-glycoprotein) Gene. *JNCIJ* 107:djv222. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv222>

Gutmann H, Hruz P, Zimmermann C, et al (2005) Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochemical Pharmacology* 70:695–699. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.031>

Haider C, Grubinger M, Reznickova E, et al (2013) Novel Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases Combat Hepatocellular Carcinoma without

Inducing Chemoresistance. *Molecular Cancer Therapeutics* 12:1947–1957.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0263>

Hasanabady MH, Kalalinia F (2016) ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *J Biosci* 41:313–324.
<https://doi.org/10.1007/s12038-016-9601-5>

Hershey JWB, Sonenberg N, Mathews MB (2012) Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4:a011528–a011528. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>

Hortobagyi GN (2018) Ribociclib for the first-line treatment of advanced hormone receptor-positive breast cancer: a review of subgroup analyses from the MONALEESA-2 trial. *Breast Cancer Res* 20:123.
<https://doi.org/10.1186/s13058-018-1050-7>

Housman G, Byler S, Heerboth S, et al (2014) Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers* 6:1769–1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>

Huang S-M, Temple R, Throckmorton DC, Lesko LJ (2007) Drug Interaction Studies: Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. *Clin Pharmacol Ther* 81:298–304.
<https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100054>

Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, et al (2000) Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 92:1651–1656

Konig J, Muller F, Fromm MF (2013) Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects. *Pharmacological Reviews* 65:944–966.
<https://doi.org/10.1124/pr.113.007518>

Kruijtzter CMF, Beijnen JH, Rosing H, et al (2002) Increased Oral Bioavailability of Topotecan in Combination With the Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Inhibitor GF120918. *JCO* 20:2943–2950. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.12.116>

Law ME, Corsino PE, Narayan S, Law BK (2015) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Therapeutics. *Mol Pharmacol* 88:846–852. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099325>

Lee CA, Cook JA, Reyner EL, Smith DA (2010) P-glycoprotein related drug interactions: clinical importance and a consideration of disease states. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 6:603–619. <https://doi.org/10.1517/17425251003610640>

Leonard GD (2003) The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *The Oncologist* 8:411–424. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-5-411>

Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204:216–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>

Linton KJ (2007) Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* 22:122–130. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2006>

Liu B, Li L-J, Gong X, et al (2018) Co-expression of ATP binding cassette transporters is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8095>

Mao Q, Unadkat JD (2015) Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J* 17:65–82. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>

Martin M, Garcia-Saenz JA, Manso L, et al (2020) Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor for the treatment of metastatic breast cancer. *Future Oncology* fon-2020-0604. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0604>

Mo W, Zhang J-T (2011) Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol* 3:1–27

Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y (2009) Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:26–33. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.07.003>

Penson RT, Oliva E, Skates SJ, et al (2004) Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecologic Oncology* 93:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.11.053>

Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, et al (2018) Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 18:452–464. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>

Schinkel AH, Jonker JW (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:3–29. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00169-2)

Serra F, Lapidari P, Quaquarelli E, et al (2019) Palbociclib in metastatic breast cancer: current evidence and real-life data. *DIC* 8:1–16. <https://doi.org/10.7573/dic.212579>

Shaikh N, Sharma M, Garg P (2017) Selective Fusion of Heterogeneous Classifiers for Predicting Substrates of Membrane Transporters. *Journal of Chemical Information and Modeling* 57:594–607. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00508>

Široká J, Čečková M, Urbánek L, et al (2018) LC-MS/MS method for determination of cyclin-dependent kinase inhibitors, BP-14 and BP-20, and its application in pharmacokinetic study in rat. *Journal of Chromatography B* 1089:24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.049>

Sorf A, Hofman J, Kučera R, et al (2018) Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms in vitro. *Biochemical Pharmacology* 154:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.013>

Stacy AE, Jansson PJ, Richardson DR (2013) Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in Chemoresistance. *Molecular Pharmacology* 84:655–669. <https://doi.org/10.1124/mol.113.088609>

Szakács G, Váradi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox). *Drug Discovery Today* 13:379–393. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010>

The International Transporter Consortium (2010) Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* 9:215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>

Thomas H, Coley HM (2003) Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control* 10:159–165. <https://doi.org/10.1177/107327480301000207>

Vadlapatla R, Vadlapudi A, Pal D, Mitra A (2013) Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy: Coordinated Role and Regulation of

Efflux Transporters and Metabolizing Enzymes. CPD 19:7126–7140.
<https://doi.org/10.2174/13816128113199990493>

Wang J, Yang D-H, Yang Y, et al (2020) Overexpression of ABCB1 Transporter Confers Resistance to mTOR Inhibitor WYE-354 in Cancer Cells. IJMS 21:1387. <https://doi.org/10.3390/ijms21041387>

Zamek-Gliszczyński MJ, Hoffmaster KA, Tweedie DJ, et al (2012) Highlights from the International Transporter Consortium Second Workshop. Clin Pharmacol Ther 92:553–556. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.126>

Zembruski NCL, Büchel G, Jödicke L, et al (2011) Potential of novel antiretrovirals to modulate expression and function of drug transporters in vitro. J Antimicrob Chemother 66:802–812.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq501>

Zhang W, Petrovic J-M, Andrade MF, et al (2003) The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. The FASEB Journal 17:2085–2087. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1131fje>

Zhou S-F (2008) Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. Xenobiotica 38:802–832.
<https://doi.org/10.1080/00498250701867889>

Cancer WHO. In: World Health Organization. 2020. Dostupné na URL: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Přístup: 3.8.2020

European medicines agency. In: Guideline on the investigation of drug interactions. 2012. Dostupné na URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf. Přístup 7.8.2020

Úřední věstník Evropské Unie .In: Vydání registrace. 2017. Dostupné na URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2017:328:FULL&from=EN>. Přístup 7.8.2020

European Union Register of medicinal products. In: European Commission. 2020. Dostupné na URL: <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1307.htm>. Přístup 7.8.2020

European Union Register of medicinal products. In: European Comission. 2020. Dostupné na URL: <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1147.htm>. Přístup: 20.6. 2020

National library of medicine. In: Clinical trials. 2020. Dostupné na URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=roscovitine&cntry=&state=&city=&dist=_. Přístup: 9.8.2020