

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STANOVENIE INHIBIČNÉHO VPLYVU VYBRANÝCH CIELENÝCH
PROTINÁDOROVÝCH LIEČIV NA AKTIVITU ABC LIEKOVÝCH
EXLUXNÝCH TRANSPORTÉROV**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Jakub Hofman, PhD.

Hradec Králové 2021

Júlia Jurčáková

Prehlásenie:

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetky zdroje a literatúra, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

Júlia Jurčáková

Pod'akovanie

First of all, I would like to express my gratitude to my consultant and dear friend Mgr. Dimitrios Vagiannis for his patience, guidance, support, motivation and all of his useful advices. I very much appreciate his help and encouragement.

Ďalej by som chcela poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Jakubovi Hofmanovi PhD. za všetky jeho cenné rady, konzultácie, trpezlivosť a čas pri vypracovaní tejto práce.

V neposlednom rade ďakujem svojej rodine, blízkym a priateľom za ich povzbudivé slová a neustálu podporu.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Júlia Jurčáková

Školiteľ: RNDr. Jakub Hofman PhD.

Názov diplomovej práce: Stanovenie inhibičného vplyvu vybraných cielených protinádorových liečiv na aktivitu ABC liekových efluxných transportérov.

Rakovina pľúc patrí medzi najčastejšiu príčinu smrti v rámci onkologických chorôb. Nemalobunečný karcinóm pľúc (NSCLC) predstavuje asi 85% všetkého karcinómu pľúc a jeho hlavné podtypy zahŕňajú adenokarcinóm a spinocelulárny karcinóm. V liečbe sa okrem chirurgie, rádioterapie a chemoterapie najnovšie uplatňuje použitie cielených nízkomolekulárnych látok, ktoré s vyššou špecifitou cieľia na nádorové bunky. Medzi dva hlavné dôvody úmrtia pacientov s rakovinou patrí tvorba metastáz a vznik mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR). Tá môže byť mimo iné spôsobená nadmernou expresiou efluxných transportérov. ATP-binding cassette (ABC) transportéry predstavujú skupiny transmembránových púmp, ktoré využívajú energiu vo forme ATP na prenos širokej škály substrátov. S MDR sú spojené najmä P-glykoproteín (ABCB1), breast cancer-resistance protein (ABCG2) a multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1). Inhibíciou týchto transportérov sa zvyšuje množstvo cytostatického substrátu vo vnútri bunky a je možné tak MDR modulovať. Naším cieľom bolo preskúmať inhibičnú aktivitu štyroch vybraných nízkomolekulárnych inhibítorov (carfilzomib, encorafenib, enasidenib, sonidegib) voči ABC liekovým transportérom na MDCKII bunkových líniiach. Porovnaním akumuláčnych štúdií s necytostatickými a s cytostatickými modelovými substrátmi sme potvrdili inhibičný efekt sonidegibu a enasidenibu. Flow-cytometrickou analýzou sme dokázali inhibíciu sonidegibu aj v primárnej bunkovej kultúre, ktorá bola získaná z biopsie nádorov pľúcneho nemalobunečného karcinómu. Výsledky tejto práce môžu slúžiť ako dôležitý zdroj informácií pri ďalšom štúdiu farmakokinetických liekových interakcií a modulácii MDR.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Júlia Jurčáková

Supervisor: RNDr. Jakub Hofman PhD.

Title of diploma thesis: The assessment of inhibitory effects of selected targeted anticancer drugs on the activity of ABC drug efflux transporters.

Lung cancer is the leading cause of death within oncological diseases. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) accounts for about 85% of all lung cancer, and its major subtypes include adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. In addition to surgery, radiotherapy and chemotherapy, the use of targeted low-molecular substances, which target tumor cells with higher specificity, has recently been used in treatment. The two main causes of death in cancer patients are the formation of metastases and the development of multidrug resistance (MDR). This may also be caused by overexpression of the efflux transporters. ATP-binding cassette (ABC) transporters are groups of transmembrane pumps that use energy in the form of ATP to transfer a wide range of substrates. In particular, P-glycoprotein (ABCB1), breast cancer-resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) are associated with MDR. Inhibition of these transporters increases the amount of cytostatic substrate within the cell and can thus modulate MDR. Our aim was to investigate the inhibitory activity of four selected low molecular weight inhibitors (carfilzomib, encorafenib, enasidenib, sonidegib) against ABC drug transporters on MDCKII cell lines. By comparing accumulation studies with non-cytostatic and cytostatic model substrates, we confirmed the inhibitory effect of sonidegib and enasidenib. Flow-cytometric analysis also showed the inhibition of sonidegib in primary cell culture, which was obtained from biopsies of non-small cell lung cancer tumors. The results of this work may serve as an important source of information in the further study of pharmacokinetic drug interactions and MDR modulation.

OBSAH

1. ZOZNAM SKRATIEK	8
2. ÚVOD.....	10
3. TEORETICKÁ ČASŤ	11
3.1. ABC efluxné transportéry	11
3.1.1. Štruktúra, lokalizácia a fyziologická funkcia ABC efluxných liekových transportérov.....	11
3.1.2. Funkcia ABC liekových efluxných transportérov v mnohopočetnej liekovej rezistencii.....	14
3.1.2.1. P-glykoprotein	15
3.1.2.2. Multidrug resistance-associated protein 1	17
3.1.2.3. Breast cancer resistance protein	18
3.2. Malé molekuly v cielej protinádorovej liečbe.....	20
3.2.1. Enasidenib.....	24
3.2.2. Sonidegib	25
3.2.3. Carfilzomib	26
3.2.4. Encorafenib.....	27
4. CIEĽ PRÁCE	29
5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
5.1. Materiály a metódy	30
5.1.1. Chemikálie.....	30
5.1.2. Prístroje.....	30
5.1.3. Bunkové línie.....	31
5.1.4. Pasážovanie.....	31
5.1.5. Akumulačné štúdie s necytotoxickými substrátmi ABC transportérov	31
5.1.6. Akumulačné štúdie s cytotoxickými substrátmi ABC transportérov.....	32

5.1.7.	Akumulačné štúdie s cytotoxickými substrátmi ABC transportérov v primárnych kultúrach pľúcneho nemalobunečného karcinómu	33
5.1.8.	Štatistická analýza.....	34
6.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	35
6.1.	Kinetická a flow-cytometrická analýza v MDCK-II bunkách	35
6.1.1.	Carfilzomib	35
6.1.2.	Encorafenib	39
6.1.3.	Enasidenib.....	42
6.1.4.	Sonidegib	45
6.2.	Flow-cytometrická analýza v primárnych kultúrach pľúcneho nemalobunečného karcinómu.....	48
6.	ZÁVER.....	50
7.	ZDROJE	51

1. ZOZNAM SKRATIEK

ABC ATP binding cassette transporter

ABCB1 P-glykoproteín, MDR1

aBCC advanced basal-cell carcinoma

ABCC1 multidrug resistance-associated protein, MRP1

ABCG2 breast cancer resistance protein, BCRP

aKG alfa-ketoglutarát

AML akútna myeloidná leukémia

ATP adenzíntrifosfát

DAU daunorubicín

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO dimethylsulfoxid

DNA deoxyribonukleová kyselina

FBS fetálne bovinné sérum

FDA U.S. Food and Drug Administration

FTC fumitremorgín C

IDH2 izocitrát dehydrogenáza 2

MDCKII Madin-Darby Canine Kidney II (bunková línia)

MDR mnohopočetná lieková rezistencia

MTT methylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid

MTX mitoxantrón

NDB nukleotid viažuca doména

nonRTKs nonreceptorové tyrozínkinázy

NSCLC nemalobunečný pľúcny karcinóm

PBS fosfátový pufer

PI inhibítor proteazómu

R-2-HG R-2-hydroxyglutamát

RTKs receptorové tyrozínkinázy

Smo smoothed receptor

TKIs tyrozínkinázové inhibítory

TMD transmembránová doména

2. ÚVOD

Rakovina patrí celosvetovo medzi druhú najčastejšiu príčinu smrti a jej výskyt sa neustále zvyšuje. Okrem chirurgie a rádioterapie patrí liečba cytostatikami k štandardným terapeutickým možnostiam. V súčasnosti je pri chemoterapeutickej liečbe závažným problémom vznik mnohopočetnej liekovej rezistencie. Existuje niekoľko spôsobov ako sa bunky môžu stať rezistentnými súčasne na viac liečiv, vrátane inaktivácie liečiv, zvýšených mechanizmov opravy DNA, aktivácie antiapoptických dráh a zvýšeného odtoku liečiva z intracelulárneho priestoru bunky (*Lusvarghi et al, 2020*).

Posledné tri desaťročia spôsobili rozmach štúdie dokumentujúce prínos niektorých ABC transportérov, najmä ABCB1, ABCC1 a ABCG2 k MDR. Tieto transportéry pôsobia ako bunkové membránové pumpy, ktoré sú schopné vytlačovať liečivá z rakovinových buniek a v dôsledku toho je nadmerná expresia týchto transportérov široko spojená s nepriaznivými výsledkami u pacientov v mnohých rôznych nádoroch (*Pasello et al., 2020*).

V tejto práci sme skúmali interakčné vzťahy vybraných nových cielených nízkomolekulárnych liečiv s ABC efluxnými transportérmi porovnaním dvoch odlišných metód, kinetickej a flow-cytometrickej detekcie modelových substrátov. Kombinácia inhibítorov ABC transportérov s protinádorovými liečivami zvyšuje akumuláciu cytostatika vo vnútri nádorovej bunky. Po dokázaní inhibície u sonidegibu sme pokračovali vo flow-cytometrickej analýze aj v primárnych kultúrach pľúcneho nemalobunečného karcinómu. Výsledky našej práce naznačujú potenciál testovaných látok ovplyvniť farmakokinetické vlastnosti cytostatických substrátov voči ABC liekovým transportérom a modulovať MDR.

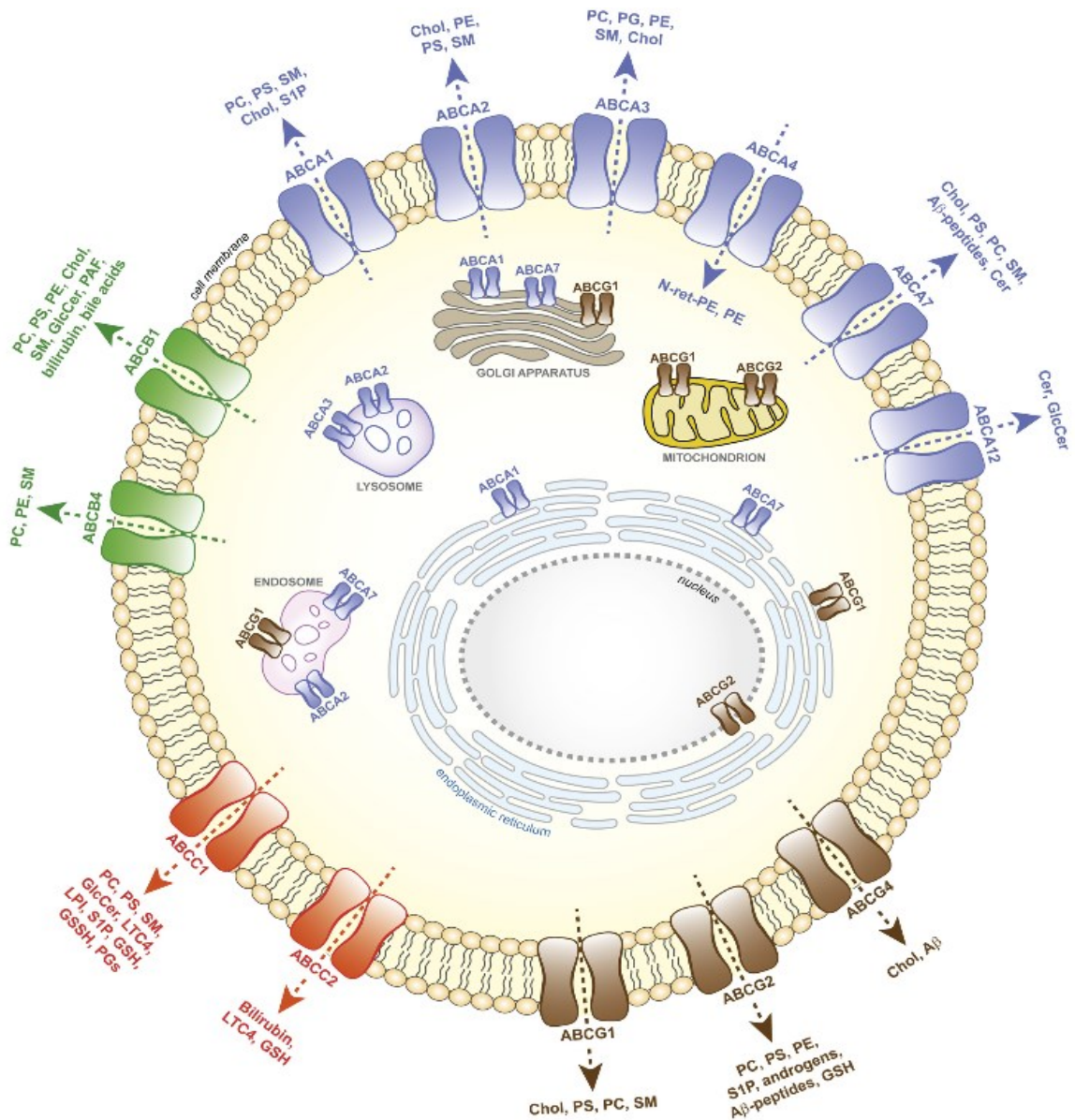
3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. ABC efluxné transportéry

ATP-binding cassette (ABC) transportéry sú veľká nadrodina membránových proteínov s rôznymi funkciami, ktoré existujú takmer vo všetkých organizmoch. Existuje sedem podskupín klasifikovaných ako ABC transportéry (ABCA až ABCG), ktoré sú exprimované v normálnych aj malígnych bunkách. ABC systémy spájajú energiu hydrolýzy ATP s pôsobivo širokou škálou základných biologických javov, ktoré zahŕňajú nielen transmembránový (TM) transport, pre ktorý sú najznámejšie, ale tiež niekoľko procesov primárne súvisiacich s transportom, no sekundárne ovplyvňujúce napríklad predĺženie translácie či opravu DNA. ABC transportéry si zaslúžia veľkú pozornosť, pretože sa mimo iné podieľajú na vzniku závažných dedičných chorôb človeka. Boli prvýkrát objavené a podrobne charakterizované u prokaryotov už v 70. rokoch minulého storočia (*Davidson et al., 2008, Gu et al., 2019, Leonard et al., 2003*).

3.1.1. Štruktúra, lokalizácia a fyziologická funkcia ABC efluxných liekových transportérov

ABC efluxné liekové transportéry majú niekoľko funkcií. Niektoré fungujú ako priame pumpy na import živín alebo na export toxínov a iných molekúl, iné obracajú amfipatické lipidy z jednej membránovej strany na druhú, u niektorých je členom chloridový kanál riadený ATP a ďalšie regulujú draslíkové kanály. Cicavčie ABC transportéry sú zapojené do bunkového exportu niekoľkých skupín molekúl, vrátane cholesterolu a sterolov, lipidov, derivátov kyseliny retinovej, žľazovej kyseliny, železa, nukleozidov a peptidov. Podstatnú povahu týchto funkcií zdôrazňuje skutočnosť, že chyby v príslušných transportéroch boli pozorované u mnohých genetických stavov, vrátane rôznych chorôb. Ďalšia významná skupina ľudských ABC transportérov sa nachádza v pečeni, placentе a hematoencefalickej bariére, kde sa podieľajú na detoxikácii hydrofóbných organických molekúl. Napriek svojej veľkej funkčnej rozmanitosti vo svojom jadre zdieľajú všetky rovnakú doménovú architektúru a predpokladá sa, že zásadne zdieľajú taktiež podobný mechanizmus striedavého prístupu substrátov (*Procko et al., 2009, Wilkens 2015*). Schématické znázornenie lokalizácie subcelulárnych ABC transportérov a exportovaných endogénnych substrátov je znázornené na Obr. 1.



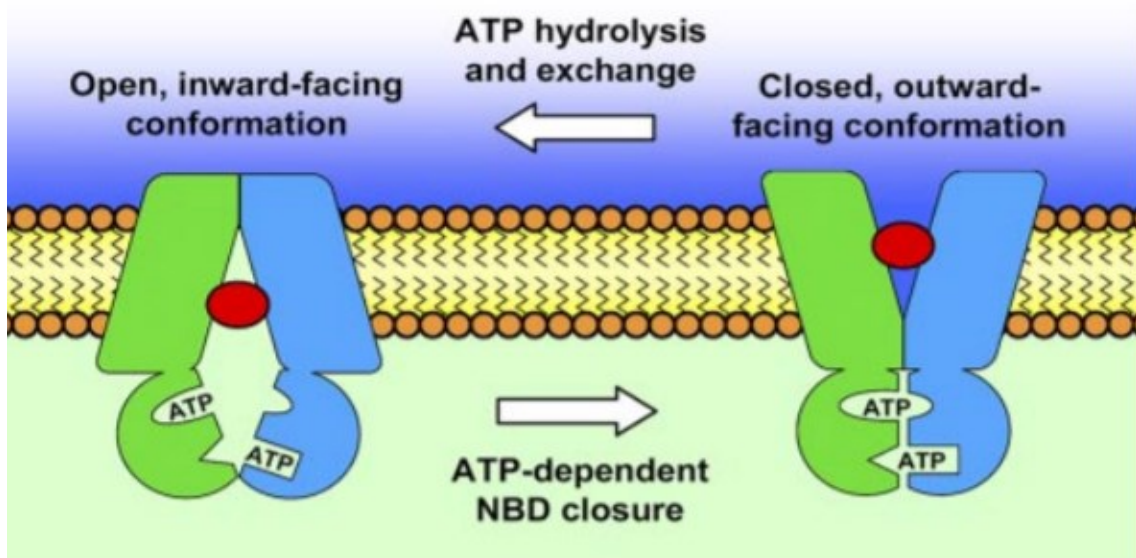
Obr. 1 Lokalizácia subcelulárnych ABC transportérov a endogénne substráty nimi exportované. Šípky predstavujú smer transportu na plazmatickej membráne. Aβ: β-amyloid; Cer: ceramid; Chol: cholesterol; GlcCer: glucosyl ceramid; GSH: glutathion; GSSH: glutathion disulfid; LTC4: leukotrién C4; LPI: lysofosfatidylinositol; N-ret-PE: N-retinylid fosfatidylethanolamín; PAF: doštičky aktivujúci faktor, PC: fosfatidylcholín; PE: fosfatidylethanolamín; PG: fosfatidylglycerol; PGs: prostaglandíny; PS: fosfatidylserín; SM: sfingomyelín; S1P: sfingosín-1-fosfát

Prevzaté z: Pasello et al., 2020

Vo väčšine prípadov fungujú ABC transportéry ako pumpy poháňané ATP a pozostávajú z dvoch hydrofóbných transmembránových domén (TMD), ktoré tvoria

póry preklenujúce membránu, a dvoch cytosolických domén, ktoré sa označujú ako domény viažuce nukleotidy (NDB) (*Kang et al., 2011*). Tieto NDB domény obsahujú tri vysoko konzervované motívy potrebné na väzbu a hydrolýzu nukleotidov: Walkerovo miesto A a Walkerovo miesto B, ktoré sa nachádzajú v jadre kazety a podpisovú sekvenciu LSGGQ, ktorá leží viac smerom k periférii kazety v helikálnej subdoméne (*Moody et al., 2002*). Základná jednotka ABC transportéra sa skladá zo štyroch domén, dvoch NDB a dvoch TMD. Dve NDB sa viažu a hydrolyzujú ATP (čím poskytujú hnaciu silu pre transport), zatiaľ čo TMD sa podieľajú na rozpoznávaní a translokácii substrátu cez lipidovú membránu (*Vasiliou et al., 2009*). Prokaryotické ABC transportéry sa skladajú zo samostatnej proteínovej podjednotky (dve TMD a dve NDB). Dve TMD a NDB môžu byť identické (homodimérne) alebo rôzne proteíny (heterodimérne). Eukaryotické exportéry sú obvykle zložené buď z jedného polypeptidového reťazca obsahujúceho všetky domény alebo z diméru dvoch polypeptidov, z ktorých každý obsahuje TMD a NDB (*Ter Beek et al., 2014*).

Až na niekoľko výnimiek musia ABC transportéry pumpovať substráty proti chemickému gradientu, čo je proces, ktorý si ako hybnú silu vyžaduje hydrolýzu ATP. Za fyziologických podmienok pracujú ABC transportéry jedným smerom (buď importom alebo exportom) (*Wilkins, 2015*). Transport je sprostredkovaný striedavým mechanizmom (Obr. 2), pohybom TMD uzatvárajúcim substrát-viažucu dutinu na jednej strane membrány a jej otvorením na druhej strane membrány. Tento pohyb TMD je spojený s asociáciou a disociáciou NDB. Bez nukleotidu sú NDB oddelené alebo otvorené, ale keď sa ATP naviaže na obidve NDB, uzavru sa a vytvoria pevný dimér s dvoma aktívnymi miestami ATPázy na rozhraní. Spojovací helix z TMD zapadá do drážky na NDB a priväzuje každú TMD k jednému z NDB, takže otváranie/disociácia a zatváranie/združovanie NDB vedie k súčasnému pohybu transmembránových helixov. Keď sú NDB otvorené, dutina viažuca substrát tvorená TMD smeruje dovnútra k cytosolickým NDB. Keď sú NDB viazané na ATP a uzavreté, dutina viažuca substrát smeruje von. Cyklus väzby, hydrolýzy a uvoľňovania produktu hydrolýzy ATP môže preto spôsobiť veľké konformačné zmeny (*Procko et al., 2009*).



Obr. 2 Mechanizmus typického ABC transportéra. ATP závislé uzavretie/dimerizácia cytosolických NBD poskytuje silový zdvih, ktorý transformuje TMD z konformácie smerom dovnútra smerom von.

Prevzaté z: Procko et al., 2009

3.1.2. Funkcia ABC liekových efluxných transportérov v mnohopočetnej liekovej rezistencii

Rezistencia na chemoterapeutické liečivá je hlavným problémom v liečbe rakoviny. Po vystavení cytotoxickým látkam používaným pri liečbe rakoviny sa v rakovinových bunkách cicavcov môže vytvoriť fenotyp MDR (rezistencia voči viacerým liekom). Vytvorená rezistencia chráni bunky nielen pred liečivom používaným pri chemoterapii, ale aj pred celým radom štrukturálne a funkčne nesúvisiacich toxických látok. Je zrejmé, že to vážne podkopáva úspech ďalších liekových terapií (Lubelski et al., 2007).

Chemoterapeutické lieky bežne vstupujú do bunky cez plazmatickú membránu pasívnou difúziou a štruktúra tejto membrány je pravdepodobne príčinou zníženej akumulácie liečiva v MDR. U pacientov s rakovinou, ktorí nereagujú na chemoterapiu, je MDR zvyčajne sprostredkovaná nadmernou expresiou rôznych ATP-dependných efluxných púmp umiestnených na cytoplazmatickej strane membrány, čo spôsobuje zvýšený eflux liečiva z rezistentnej bunky. V niekoľkých štúdiách využívajúcich širokú škálu nádorových bunkových línií a liečiv bolo zistené, že bunecný transport prostredníctvom ABC proteínových transportérov je zahrnutý v penetrácii liečiv cez bunecnú membránu a intracelulárnej akumulácii. Je známe, že transportovať

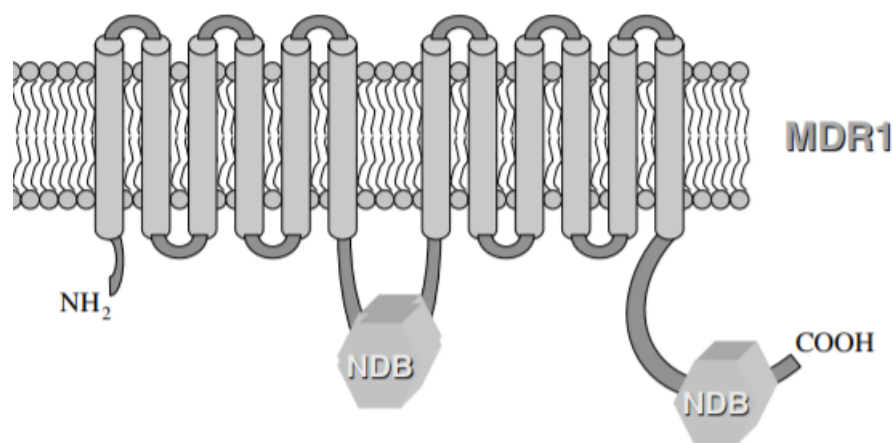
protinádorové liečivá je schopné 19 členov ABC transportérov, pričom transport vedúci k MDR aj za *in vivo* podmienok prebieha len u ABCB1, ABCC1 a ABCG2 (Li et al., 2012).

K preukázaniu účasti ABC transportéra na rezistencii na protirakovinové lieky a jej prekonaniu musia byť splnené nasledujúce kritériá: (1) Rakovinové bunky musia exprimovať transportér na hladinách, ktoré *in vitro* preukázali rezistenciu na dané lieky alebo liečivá. (2) Úroveň expresie transportéra by mala predpovedať stupeň liekovej rezistencie. (3) V priebehu klinickej liečby by mal vývoj rezistencie na lieky byť paralelný so zvýšenou expresiou transportéra. (4) Látky, ktoré inhibujú funkciu transportérov, v prípadoch, keď je transportér exprimovaný a je známe, že pôsobia iné mechanizmy rezistencie, by mali rezistenciu zvrátiť. (5) Použitie transportérových inhibítorov ako súčasť chemoterapie by malo priniesť výhodu prežitia (Wu & Fu, 2018).

Rodina membránových transportných ABC proteínov zahŕňa najznámejšie mediátory rezistencie na protirakovinové lieky. Fenotyp MDR je spojený so zvýšeným odtokom liečiva z buniek sprostredkovaným energeticky závislým mechanizmom. Najmä MDR pumpy ABCB1, ABCC1 a ABCG2 aktívne vytláčajú mnoho druhov liečiv z rakovinových buniek, čo týmto bunkám dáva odolnosť. Všeobecnejšie povedané, ABC transportéry sa vyvinuli ako významný detoxikačný mechanizmus a sú schopné svojou aktivitou poskytovať ochranu citlivým tkanivám organizmu voči pôsobeniu xenobiotík (Szakács et al., 2004, Tsuruo et al., 2003). Vo fyziologických tkanivách je toto výhodou, v nádorových bunkách naopak tento jav spôsobuje komplikácie.

3.1.2.1. P-glykoproteín

P-glykoproteín (ABCB1; Obr. 3), kódovaný génom MDR1, je membránový ABC transportér pôsobiaci ako efluxná pumpa liečiv. Tento membránový proteín bol spočiatku charakterizovaný ako nadmerne exprimovaný v nádorových bunkách, ktoré vykazovali viacnásobne vyššiu úroveň rezistencie na širokú škálu štruktúrne nesúvisiacich protirakovinových liekov (Jouan et al., 2016). Transportér P-glykoproteín je exprimovaný v črevách, pečeni, obličkách a hematoencefalickej bariére a ovplyvňuje biologickú dostupnosť, farmakokinetiku a nepriamo aj účinnosť liekov. Zabraňuje hromadeniu toxických látok a vystaveniu ich pôsobeniu tkanivám (Leonard et al., 2003, Szewczyk et al., 2015).



Obr. 3 Štruktúra ABCB1 (MDR1) transportéra. ABCB1 obsahuje 12 transmembránových helixov a dve NDB domény.

Prevzaté z: Scotto, 2003

ABCB1 je schopný viazať a vytlačovať z buniek množstvo chemicky, štruktúrne a farmaceuticky odlišných zlúčenín (Tab. 1), vrátane liečiv používaných ako protirakovinové chemoterapeutiká, imunosupresíva, pri liečbe infekcie, alergie, hypertenzie a arytmie; viac ako tisíc zlúčenín bolo opísaných ako substráty ABCB1 (Genovese et al., 2017).

Expresia P-glykoproteínu je významne zvýšená v nádoroch rezistentných na lieky a odčerpáva rôzne protirakovinové lieky, ako sú antracyklíny, alkaloidy z rodu *Vinca*, epipodofylotoxíny a taxány a ďalšie lieky vrátane digoxínu, inhibítorov HIV proteáz, statínov a xenobiotík. Expresia P-glykoproteínu v rakovinových bunkách teda udeľuje MDR k týmto protirakovinovým liekom (Katayama et al., 2014). Mnoho štúdií preukázalo vysokú expresiu ABCB1 v nádoroch hrubého čreva, obličiek, vaječníkov, nadobličiek a v hepatocelulárnych nádoroch. Taktiež pri akútnej myeloidnej leukémii, rakovine prsníka, alebo osteosarkóme sa zistila priama súvislosť medzi hladinami expresie ABCB1, rezistenciou na lieky a zlou prognózou (Genovese et al., 2017, Leonard et al., 2003).

Protirakovinové liečivá	Inhibítory HIV proteázy
Doxorubicín	Amprenavir
Daunorubicín	Indinavir
Vinblastín	Nelfinavir
Vinkristín	Ritonavir
Aktinomycín D	Saquinavir
Paklitaxel	Kardiálne liečivá
Teniposid	Digoxín
Etoposid	Quinidín
Imunosupresívne liečivá	Antiemetické liečivá
Cyklosporín A	Ondasetron
FK506	Antidiaroidné liečivá
Liečivá znižujúce hladinu lipidov	Loperamid
Lovastatín	Liečivá proti záchvate dny
Antihistamínové liečivá	Kolchicín
Terfenadín	Antibiotiká
Steroidy	Erytromycín
Aldosterón	Antituberkulotické liečivá
Hydrokortizón	Rifampín
Kortizol	Fluorescenčné látky
Kortikosteron	Rhodamín-123
Dexametazón	

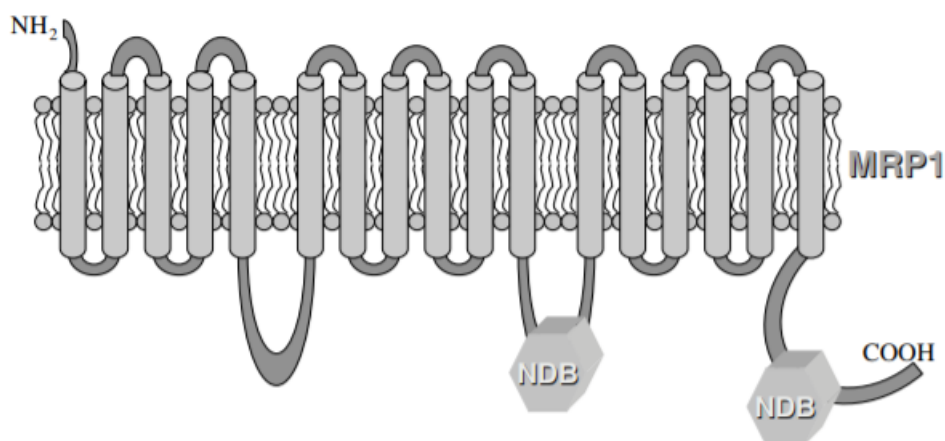
Tab. 1 Vybraný zoznam liečiv a látok, ktoré sú extrudované ABCB1.

Prevzaté z: Luqmani, 2005

Inhibícia transportu ABCB1 je jednou z najštudovanejších klinických stratégií pôsobiacich proti MDR s cieľom interferovať s chemoterapeutickým efluxom liečiv, čím sa zvyšuje ich akumulácia a tým aj cytotoxický účinok na rakovinové bunky (Genovese et al., 2017).

3.1.2.2. Multidrug resistance-associated protein 1

Multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) (Obr. 4) bol klonovaný z bunkovej línie ľudského pľúcneho karcinómu v roku 1992. Na amino konci má umiestených ďalších päť transmembránových segmentov, ktoré sú pripojené k jadru podobnému ABCB1 linkerovou oblasťou (Leonard et al., 2003).



Obr. 4 Štruktúra ABCB1 (MRP1) transportéra. ABCB1 je podobný ABCB1, ale obsahuje ďalších päť transmembránových helixov na N-konci.

Prevzaté z: Scotto, 2003

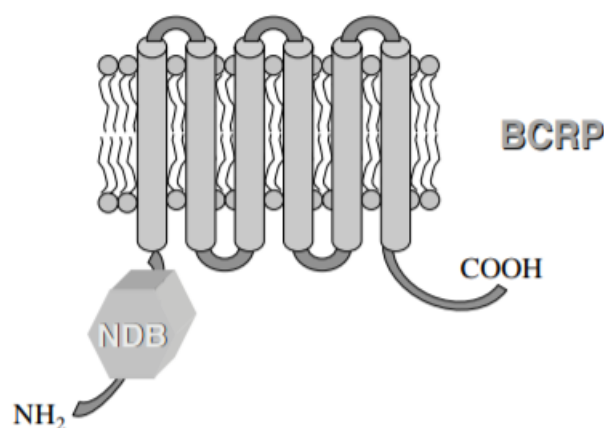
ABCB1 je exprimovaný vo väčšine tkanív v tele s relatívne vysokými hladinami v pľúcach, semenníkoch, obličkách, kostrovom svalstve a periférnych krvných mononukleárných bunkách, zatiaľ čo relatívne nízke hladiny sa nachádzajú v pečeni. Vo väčšine tkanív (s možnou výnimkou mozgových endotelových buniek) je ABCB1 lokalizovaný na bazolaterálny bunkový povrch, čo v určitých tkanivách vedie k odtoku jeho substrátov do krvi (Leslie et al., 2005).

Tento transportér môže transportovať veľké spektrum substrátov od protirakovinových liekov po fluorescenčné farbivá. Široká škála protirakovinových liekov vrátane antracyklínov, epipodofylotoxínov, Vinca alkaloidov, kamptotecínov, metotrexátu a mitoxantrónu sú známymi substrátmi ABCB1, a preto nadmerná expresia ABCB1 vedie pri chemoterapii k rezistencii (Yin & Zhang, 2011).

ABCB1 tiež nepriamo ovplyvňuje účinnosť (a toxicitu) liekov používaných na liečbu nezhubných chorôb a na transport antibiotík, opiátov, antivírusových látok, citalopramu či statínov (Cole, 2014).

3.1.2.3. Breast cancer resistance protein

Pred dvoma desaťročiami bol transportér breast cancer resistance protein (ABCG2) (Obr. 5) objavený v rakovinových bunkách rezistentných na lieky a v ľudskej placente. ABCG2 je atypický, takzvaný polovičný transportér. Biochemické dôkazy naznačujú, že tento polovičný transportér vytvára homodimér alebo prípadne homotetramér, aby zabezpečil eflux liečiv a iných látok z bunky (Leslie et al., 2005, Toyoda et al., 2019).



Obr. 5 Štruktúra ABCG2 (BCRP) transportéra. ABCG2 je „polotransportér“ s jednou NDB umiestnenou na N-konci.

Prevzaté z: Scotto, 2003

Nadmerná expresia ABCG2 môže spôsobiť, že rakovinové bunky sú rezistentné voči chemoterapeutickým látkam, ako substrátom ABCG2, medzi ktoré patrí mitoxantrón, doxorubicín, daunorubicín, SN-38 a niekoľko TKIs (Toyoda *et al.*, 2019). Táto overexpresia bola zaznamenaná najmä pri akútnej a chronickej forme myeloidnej leukémie, ale aj v mnohých solídnych nádoroch. Korelácia medzi expresiou ABCG2 a klinickými výsledkami sa primárne hodnotila u rakoviny prsníka a nemalobunečného karcinómu pľúc (Mao & Unadkat, 2015).

Substráty ABCG2 zahŕňajú širokú škálu chemoterapeutík, ako je mitoxantrón, deriváty kamptotecínu, flavopiridol a metotrexát. Je pozoruhodné, že niekoľko TKIs, ako napríklad imatinib, gefitinib a nilotinib, sú substrátmi ABCG2. Substráty ABCG2 sú tiež rôzne fotosenzibilizátory vrátane feoforbidu A, protoporfyrínu IX a príbuzných zlúčenín, čo naznačuje, že ABCG2 je možnou príčinou bunkovej rezistencie na fotodynamickú terapiu (Mao & Unadkat, 2015).

Bolo identifikované veľké množstvo inhibítorov ABCG2 s rôznymi chemickými štruktúrami. Mnohé ABCB1 inhibítory sú taktiež potentnými inhibítormi ABCG2. TKIs, ako je imatinib, nilotinib a apatinib, a inhibítory iných kináz, ako je inhibítor serín/treonínovej Polo-like kinázy 1 BI2536, sú tiež silnými duálnymi inhibítormi ABCB1/ABCG2. Prvým uvedeným inhibítorom špecifickým pre ABCG2 bol fumitremorgín C (FTC), mykotoxín produkovaný *Aspergillus fumigatus*. Ko143 bol identifikovaný ako vysoko účinný inhibítor ABCG2 *in vivo*, pretože bol menej

neurotoxický ako natívny FTC a nebol zjavne toxický pre myši. FTC a Ko143 sa považujú za ATP-kompetitívne inhibítory, pretože inhibujú ATPázovú aktivitu ABCG2. Ďalšími inhibítormi sú ABCG2 substráty, ktoré môžu pôsobiť ako kompetitívne inhibítory (*Mao & Unadkat, 2015; Toyoda et al., 2019*).

3.2. Malé molekuly v cielej protinádorovej liečbe

Napriek významnému pokroku v medicíne zostáva väčšina nádorov nevyliciteľných a rakovina je druhou hlavnou príčinou smrti na celom svete. Súčasná chemoterapeutická stratégia má významné obmedzenia a existuje veľký záujem o hľadanie nových terapií, ktoré sú schopné špecifického zamerania na rakovinové bunky (*Dalle Vedove et al., 2018*). Koncom 19. storočia bakteriológ Paul Ehrlich vytvoril koncept „magickej guľky“, konkrétne syntetizovaného lieku, ktorý by sa zameril na konkrétny mikroorganizmus bez poškodenia iných buniek v organizme. V súčasnej dobe tento koncept vyústil do vývoja celej škály výkonných molekulárnych terapeutík. Klinický úspech podávania cielej liekov závisí najmä na konkrétnom ciele a ceste podania. Pri liečbe rakoviny bolo objavených množstvo cieľových funkcií, ako napríklad protilátky rozpoznávajúce nádorový antigén, ligandy pre receptory, atď. (*Tan et al., 2017*). Cílené látky, ktoré inhibujú špecifické molekuly zapojené do rastu nádorových buniek, sú z farmakologického pohľadu klasifikované podľa miesta účinku a mechanizmu účinku (*Sekine & Takiguchi, 2013*). Vzhľadom na to, že cílené nízkomolekulárne látky majú tendenciu mať cytostatický mechanizmus pôsobenia a vykazujú skôr anti-rastové a anti-metastatické účinky, našli široké použitie ako paliatívna liečba pri pokročilých chorobách (*McFarlane et al., 2020*).

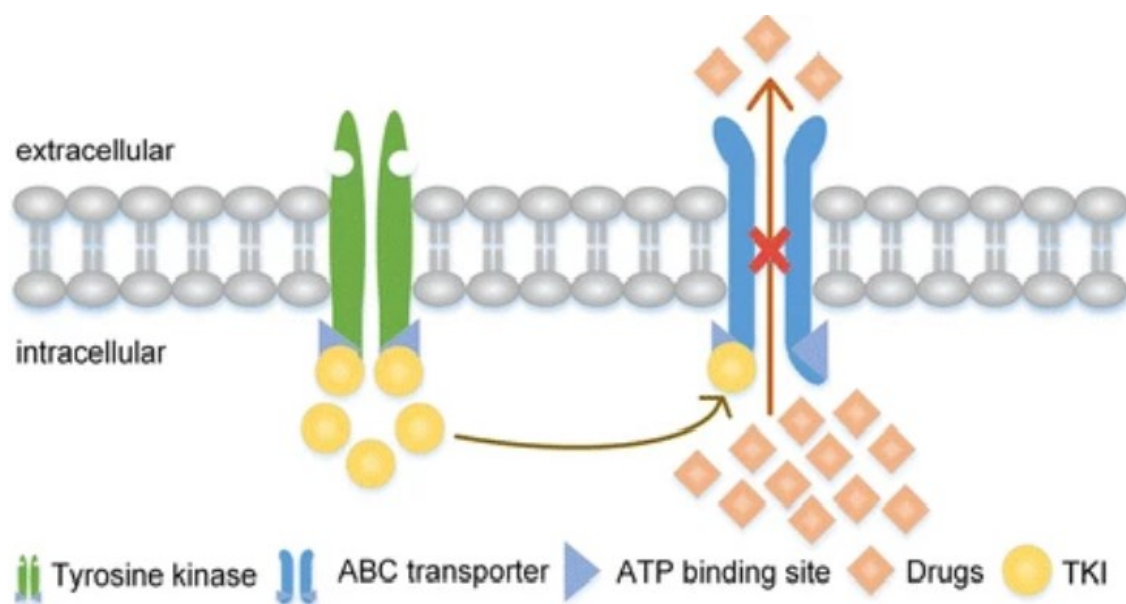
Hlavným cieľom nízkomolekulárnych cielej protinádorových liečiv sú receptorové tyrozínkinázy. Tyrozínkinázy sú rodinou enzýmov, ktoré pomocou ATP katalyzujú fosforyláciu vybraných tyrozínových zvyškov v cieľových proteínoch. Táto kovalentná posttranslačná modifikácia je kľúčovou súčasťou normálnej bunkovej komunikácie a udržiavania homeostázy. Sú dôležitými mediátormi signálnej kaskády a určujú kľúčové úlohy v rôznych biologických procesoch, ako je rast, diferenciácia, metabolizmus a apoptóza v reakcii na vonkajšie a vnútorné podnety (*Paul & Mukhopadhyay, 2012*). Rozlišujeme dva druhy tyrozínkináz, kde prvú skupinu tvoria receptorové tyrozínkinázy (RTKs), ktoré prenášajú reakciu po naviazaní ligandu. Sú to transmembránové proteíny (napr. EGFR, PDGFR..), ktoré prechádzajú biologickou membránou a majú extracelulárnu doménu (ektodomény), na ktorú sa môžu viazať ligandy. Druhou

skupinou sú nereceptorové tyrozínkinázy (napr. SRC, ABL, FAK..), ktoré sú umiestnené v cytosole (*Metibemu et al., 2019*).

Proteíny obsahujúce tyrozínkinázovú aktivitu hrajú dôležitú úlohu v rakovinej signalizácii (*Lipsick, 2019*). V normálnych bunkách je aktivita RTKs prísne regulovaná, ale dysregulácia alebo konštitutívna aktivácia RTKs boli zistené u širokého spektra druhov rakoviny (*Takeuchi et al., 2011*). Konštitutívna onkogénna aktivácia v rakovinových bunkách môže byť blokovaná selektívnymi inhibítormi tyrozínkináz. (*Paul & Mukhopadhyay, 2012*), kde zaraďujeme syntetické nízkomolekulárne látky a monoklonálne protilátky.

Z hľadiska vzťahu medzi TKIs a ABC transportérmi je známe to, že mnoho TKIs má vlastnosti substrátu pri nízkej koncentrácii, zatiaľ čo pri vysokej koncentrácii pôsobia ako inhibítory ABC transportérov. Aj keď majú TKIs vyššiu selektivitu a miernejšiu toxicitu v porovnaní s konvenčnými chemoterapeutikami, výskyt rezistencie na TKIs bol rozsiahlo zaznamenaný. Imatinib bol prvým TKI, u ktorého bola popísaná rezistencia sprostredkovaná ABC transportérom v roku 2000 (*Wu & Fu, 2018*).

Vieme, že tyrozínkinázový inhibítor vykonáva svoju protirakovinovú funkciu blokovaním ATP-väzbového miesta RTK a následnou inhibíciou signálnej dráhy po smere bunkovej proliferácie a diferenciácie. Zhodou okolností majú ABC transportéry dve NDB domény, ktoré môžu slúžiť ako vrecká viažuce ATP. Vzrušujúcim a náročným predpokladom je, že by TKIs fungovali ako chemosenzibilizátory v multirezistentných bunkách konjugáciou s ATP väzbovým miestom a inhibíciou funkcie ABC transportéra pri efluxe protirakovinového liečiva z multirezistentných buniek (Obr. 6). V súčasnosti prebieha veľké množstvo štúdií zameraných na interakciu TKIs a ABC transportéra, vrátane experimentov *in vitro*, *in vivo* a *ex-vivo* (*Wu & Fu 2018*).



Obr. 6 TKIs inhibujú ABC transportér. Oba, aj TKIs aj ABC transportér, obsahujú ATP väzbové miesto. TKIs sa pripájajú k ATP väzbovému miestu ABC transportéra a inhibujú jeho funkciu efluxu protirakovinových liečiv z multirezistentných rakovinových buniek.

Prevzaté z: Wu & Lu, 2018

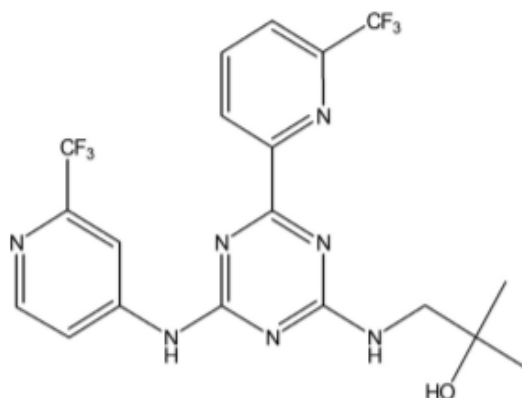
V súčasnosti sa liečba nádorových ochorení stále posúva na vyššiu úroveň a počet nových terapeutík s rôznym mechanizmom účinku sa zvyšuje. Nové klinicky využívané farmakoterapeutické postupy sú zhrnuté v Tab. 2.

SKUPINA	MECHANIZMUS ÚČINKU	PRVÝ ZÁSTUPCA V PRAXI
monoklonálne protilátky (Mahmuda et al., 2017)	1) blokáda extracelulárneho onkogenného receptora (napr. VEGF) → inhibícia proliferácie, neovaskulogenézi, metastázovania a iných dejov riadených receptorem + komplementom alebo leukocytmi sprostredkovaná cytotoxická reakcia 2) väzba na špecifický CD znak leukemických/lymfómových/myelómových buniek (CD3, CD19, CD20, CD30, CD38, CD52, CD319...) → indukcia apoptózy, komplementom alebo leukocytmi sprostredkovaná cytotoxická	rituximab

reakcia		
inhibítory imunitných kontrolných bodov (<i>Ai et al., 2020</i>)	blokáda imunitných kontrolných bodov CTLA-4, PD-1, PD-L1 → obnova „zviditeľnenia“ nádorových buniek pre T-bunky	ipilimumab
inhibítory proteínkináz (<i>Fabbro et al., 2015</i>)	inhibícia onkogénnych proteínkináz (napr. VEGF, MET, BRAF, ALK, CDK...) → inhibícia proliferácie, neovaskulogenézi, metastázovania, podpora diferenciácie a apoptózy	imatinib
PARP inhibítory (<i>Patel et al., 2020</i>)	akumulácia dvojláknových zlomov behom replikácie → selektívny replikačný stres v bunkách s mutáciou DNA reparačných génov <i>BRCA1, BRCA2, PALB2</i>	olaparib
modulátory apoptotických dráh (<i>Cang et al., 2015</i>)	inhibícia antiapoptotických proteínov (BCL-2, v klinickom skúšaní sú látky cieľiace na proteín IAP) alebo agonizmus „death receptorov“ (v klinickom skúšaní cieľ TRAIL) → indukcia apoptózy	venetoclax
inhibítory dráh Hedgehog, Wnt a Notch (<i>Rahman et al., 2018</i>)	inhibícia Smo a GLI1/2 (druhý menovaný cieľ v klinickom skúšaní) → eliminácia prirodzenej chemorezistentnej populácie nádorových kmeňových buniek	vismodegib
inhibítory izocitrátdehydrogenáz (<i>Waitkus et al., 2018</i>)	inhibície mutovanej formy IDH1 alebo IDH2 → inhibícia tvorby R-enantioméru 2-hydroxyglutarátu → obnovenie aktivity DNA demetyláz a histón demetyláz → obnovenie expresie nádorových supresorových génov a diferenciácie	enasidenib
selektívne inhibítory nukleárneho exportu (<i>Green et al., 2015</i>)	inhibícia exportínu 1 (XPO1) → blokáda nukleárneho exportu tumor supresorových proteínov, rastových faktorov a mRNA onkogénov → zástava bunecného cyklu a indukcia apoptózy	selinexor

Tab. 2 Súhrn nových klinicky využívaných farmakoterapeutických postupov v liečbe rakoviny.

3.2.1. Enasidenib



Obr. 7 Štruktúra enasidenibu

Prevzaté z: Li et al., 2018

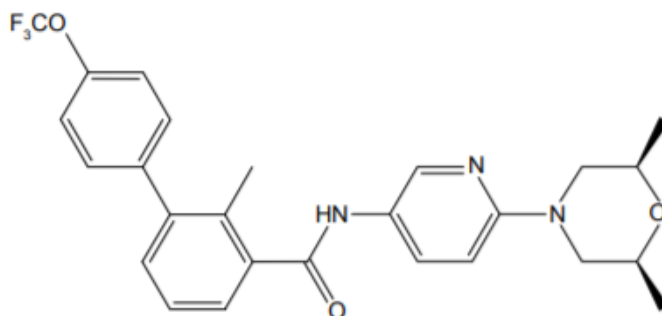
Enasidenib mesylát (AG-221, Idhifa[®]) (Obr. 7) je prvým orálnym selektívnym inhibítorom proteínov mutantnej izocitrát dehydrogenázy-2 (IDH2). USA Food and Drug Administration (FDA) ho schválila v roku 2017 na liečbu dospelých pacientov s mutantnou IDH2 refraktérnou/relapsujúcov akútnou myeloidnou leukémiou (*Fathi et al., 2018*).

AML je spojená s opakujúcimi sa chromozomálnymi abnormalitami a somatickými mutáciami. Mutácie v génoch izocitrát dehydrogenázy 2 (IDH2) na aktívnych miestach arginínových zvyškov v kodónoch R140 a R172 patria medzi najčastejšie mutácie v AML. Mutácie IDH2 sa vyskytujú u ~ 12–15 % pacientov s AML, s vyššou frekvenciou u starších pacientov (*Pollyea et al., 2019*). Enzýmy IDH2 katalyzujú v mitochondriách premenu izocitrátu na α -ketoglutarát (aKG). Mutácie v konzervovaných enzymatických aktívnych miestach, R140 a R172, produkujú neomorfnú aktivitu znižujúcu premenu aKG na R-2-hydroxyglutarát (R-2-HG). V predklinických modeloch zvýšené hladiny R-2-HG kompetitívne inhibujú aKG dependentné enzýmy, čo vedie k hypermetylácii histónu a DNA, modifikáciám chromatinu a zmeneným hypoxickým reakciám. Vysoké koncentrácie R-2-HG sú spojené so zastavením diferenciácie hematopoetických buniek *in vivo*, hladiny R-2-HG sú podstatne zvýšené v sére pacientov s malignitami mutantného IDH2 (*Golub et al., 2019, Stein et al., 2017*).

V predklinických a klinických štúdiách sa preukázalo, že enasidenib znižuje intracelulárny 2-HG na normálne hladiny a indukuje diferenciáciu nezrelých myeloidných prekursorov a progenitorových buniek mutantného IDH2 u odpovedajúcich pacientov (*Pollyea et al., 2019*).

3.2.2. Sonidegib

Sonidegib (Obr. 8), predávaný ako Odomzo® spoločnosťou Novartis, bol schválený FDA v júli 2015 ako 200 mg perorálna tableta na liečbu rekurentného pokročilého bazolaterálneho karcinómu (aBCC) alebo aBCC u pacientov, ktorí nie sú vhodní na chirurgický zákrok alebo rádioterapiu (*Jain et al., 2017*). V auguste 2015 ho pre rovnaké indikácie schválila aj Európska lieková agentúra (*Villani et al., 2020*).



Obr. 8 Štruktúra sonidegibu

Prevzaté z: Jain et al., 2017

Hedgehog signálna dráha hrá dôležitú úlohu v embryonálnom vývoji a homeostáze mnohých orgánov. Zmeny v zložkách tejto dráhy boli spojené s vývojom ľudských malignít, najmä bazocelulárneho karcinómu, kde sú na liečbu schválené inhibítory Hedgehog dráhy, ako sú Smo (Smoothened receptor) antagonisti sonidegib (LDE-225) a vismodegib (*Ross et al., 2017*).

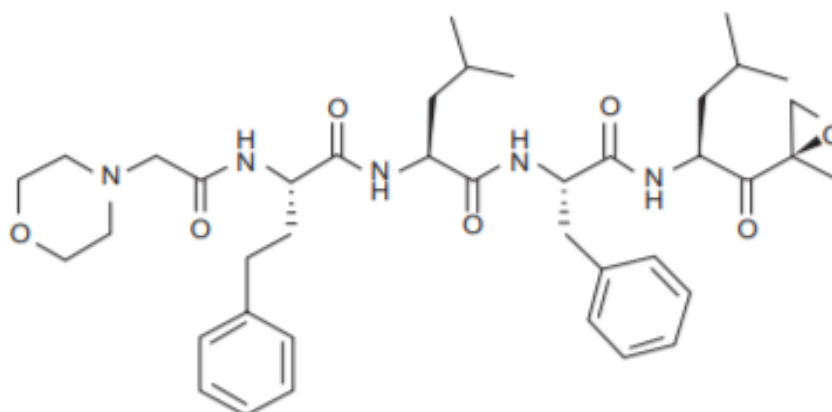
Účinkujú tak, že sa viažu na transmembránový proteín Smo a inhibujú jeho aktivitu, čo vedie k úplnej supresii GLI (onkogén spojený s gliómom) a regresii nádoru (*Villani et al., 2020*).

Sonidegib bol schválený na liečbu aBCC po preukázaní jeho účinnosti v klinických skúškach BOLT fázy II (výsledky BCC s liečbou LDE225). Štúdia BOLT zahŕňala údaje o dlhodobom sledovaní pacientov liečených sonidegibom. Išlo o multicentrickú, randomizovanú, dvojito zaslepenú štúdiu, v ktorej pacienti užívali buď 200 alebo 800

mg sonidegibu denne. Viac ako 50 % pacientov zaznamenalo objektívne odpovede s dávkou 200 mg, zatiaľ čo odpoveď s dávkou 800 mg bola nižšia. 200 mg dávka sonidegibu sa môže použiť na dosiahnutie klinickej účinnosti a zabránenie možným nežiaducim udalostiam spojeným s toxicitou lieku (Jain et al., 2017).

V súčasnosti je značný záujem posunúť sonidegib smerom k aplikácii pri liečbe iných druhov rakoviny, karcinómu obličiek, rakoviny pľúc, myeloidnej leukémie, rakoviny pankreasu, meduloblastómu, rakoviny vaječníkov a lymfómu.

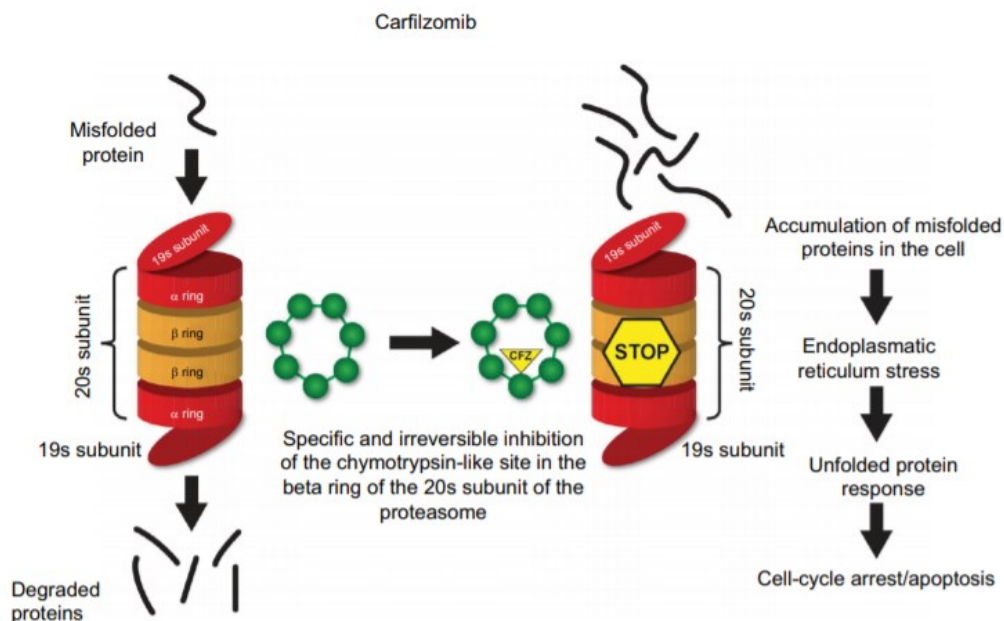
3.2.3. Carfilzomib



Obr. 9 Štruktúra carfilzomibu

Prevzaté z: Jain et al., 2011

Carfilzomib inhibuje pôsobenie bunkového proteazómu (Obr. 10), veľkého multikatalytického enzymatického komplexu, ktorý je zodpovedný za správnu funkciu bunčných proteínov. Blokáda tohto bunkového strojového zariadenia narúša homeostázu bunčných bielkovín, čo môže viesť k apoptóze (Muchtar et al., 2016). Inhibícia proteazómu je v liečbe mnohopočetného myelómu vysoko účinná. Pred takmer 15 rokmi schválila FDA prvý PI, bortezomib. Carfilzomib (Obr. 9) je PI novej generácie, ktorý sa na rozdiel od reverzibilnej väzby bortezomibu viaže ireverzibilne a selektívne na svoj cieľ, proteazóm 20S podobný chymotrypsínu. V roku 2012 FDA schválila carfilzomib na liečbu pacientov, ktorí podstúpili najmenej dve predchádzajúce liečby vrátane bortezomibu a imunomodulačného činidla a u ktorých sa preukázala progresia ochorenia do 60 dní od ukončenia poslednej liečby (Groen et al., 2019).



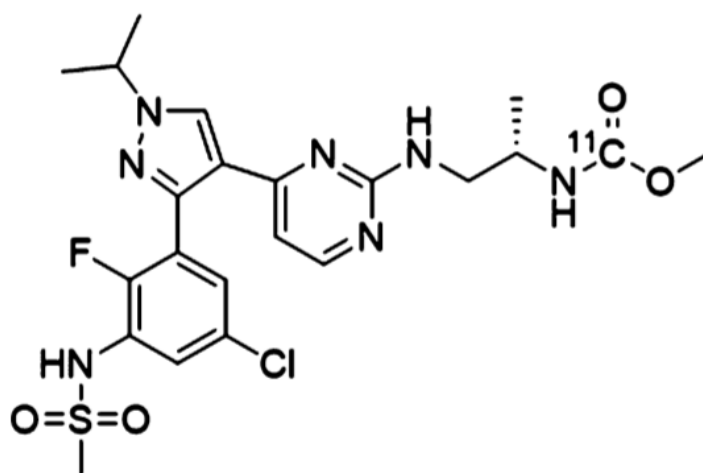
Obr. 10 Mechanizmus inhibície proteazómu carfilzomibom. Carfilzomib selektívne inhibuje $\beta 5$ podjednotku proteazómu (c20S) a LMP7 imunoproteazómu (i20S). Inhibícia všetkých podjednotiek proteazómu vedie k cytotoxickým účinkom v hematologických nádorových bunkách. Pri selektívnej inhibícii $\beta 5$ a LMP7 je viditeľný protinádorový účinok, aj keď s minimálnou toxicitou v netransformovaných bunkách.

Prevzaté z: Groen et al., 2019

Na základe výsledkov z fázy II štúdie PX171-003-A1 bol carfilzomib pôvodne schválený ako monoterapia pre pacientov s relabujúcim alebo refraktérnym myelómom, ktorí dostávali najmenej dve predchádzajúce línie liečby (vrátane bortezomibu a imunomodulačného činidla) a mali progresívne ochorenie ≤ 60 dní od poslednej terapie. V roku 2015 sa indikácia používania carfilzomibu rozšírila o kombináciu s lenalidomidom a dexametazónom u pacientov s relabujúcim myelómom, ktorí dostávali 1–3 predchádzajúce liečebné línie. Toto rozšírené schválenie bolo založené na výsledkoch štúdie fázy III ASPIRE, ktorá porovnávala režim liečby carfilzomibom, lenalidomidom a dexametazónom (skupina s carfilzomibom) s lenalidomidom a dexametazónom (kontrolná skupina) (Dimopoulos et al., 2017).

3.2.4. Encorafenib

Encorafenib (Obr. 11) je selektívny ATP-kompetitívny inhibítor BRAF kinázy cieliaci na mutáciu BRAFV600. Patrí medzi druhú najnovšiu generáciu BRAF inhibítorov a nedávno bol schválený pre liečbu pokročilého melanómu (Sun et al., 2018).



Obr. 11 Štruktúra encorafenibu

Prevzaté z: Dornan et al., 2020

Za posledných pár rokov sa liečba pacientov s pokročilým melanómom s mutáciami BRAF radikálne zmenila, a to nielen z hľadiska nových terapeutických možností, ale aj z hľadiska počtu dostupných liekov (*Kozak & Rutkowski, 2019*).

Encorafenib je vyvinutý s farmakologickými vlastnosťami zameranými na zlepšenie účinnosti a znášanlivosti oproti iným schváleným inhibítorm BRAF. Predklinické štúdie preukázali zvýšenú účinnosť proti mutáciám a kratší polčas v sére, čo môže oddialiť rezistenciu a prejaviť sa zvýšenou toleranciou. Najvýznamnejším rozdielom medzi encorafenibom a ostatnými inhibítormi BRAF druhej generácie je jeho zvýšený polčas disociácie 30 hodín v porovnaní s dabrafenibom (2 hodiny) a vemurafenibom (0,5 hodiny). To znamená, že encorafenib si udrží svoj inhibičný účinok dlhšie ako iné inhibítory BRAF s kratšou rýchlosťou eliminácie, čo povedie k zníženiu nežiaducich účinkov a predĺženej inhibícii (*Sun et al., 2018, van Geel et al., 2017*).

Na základe zlepšeného celkového prežívania a profilu tolerancie v porovnaní s monoterapiou inhibítorm BRAF je v súčasnosti štandardnou liečbou kombinovaná liečba inhibítorm BRAF/MEK v prípade BRAFV600 mutácie (*Ascierto et al., 2020*). Využívaná je kombinácia encorafenib a binimetinib. Binimetinib je selektívny inhibítor kináz MEK1 a MEK2, ktoré sú zložkami signálnej dráhy MAPK. Aktivita kombinácie encorafenibu s binimetinibom u pacientov s metastatickým BRAF-mutantným melanómom bola hodnotená po prvýkrát v štúdiu fázy Ib/II (*Kozak & Rutkowski, 2019*).

4. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto práce bolo preskúmať inhibičný potenciál štyroch vybraných nízkomolekulárnych látok (carfilzomib, encorafenib, enasidenib, sonidegib) vo vzťahu k ABC efluxným transportérom (ABCB1, ABCG2 a ABCC1) v MDCKII bunkách a v primárnych kultúrach pľúcneho nemalobunečného karcinómu pomocou akumuláčnych štúdií s kinetickou a flow-cytometrickou detekciou.

5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1. Materiály a metódy

5.1.1. Chemikálie

- Calcein AM, Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
- Carfilzomib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Daunorubicín (DAU), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Enasidenib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Encorafenib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Fetálne bovinné sérum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakúsko)
- Fosfátový pufer (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Hoechst 33342, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ko143, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- LY335979, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Methylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid (MTT) Cell Growth Assay Kit, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Mitoxantrón (MTX), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- MK571, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Opti-MEM®, Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Sonidegib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Trypsín, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.1.2. Prístroje

- Optický mikroskop, Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Taliansko)
- Laboratorné váhy Kern 770 (Ziegelei, Balingen, Nemecko)
- Prietokový cytometer SONY Spectral cell analyzer SA3800 (San Chose, CA, USA)
- Inkubátor, SANYO MCO 18-AC (UV) (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Tecan microplate reader, Tecan Infinite M200 Pro (Salzburg, Rakúsko)

5.1.3. Bunkové línie

V roku 1958 páni S.H. Madin a N.B. Darby prvýkrát izolovali bunkovú líniu MDCK (Madin-Darby canine kidney) z obličkových buniek samičky kokršpaniela. Tieto bunky boli využívané pre štúdium infekcií a neskôr pre štúdium vývoja a funkcií epitelu. Bunková línia MDCK totižto poskytuje neoceniteľný nástroj pre pochopenie polarity, vývoja a organizácie epiteliálnych buniek (*Dukes et al., 2011*).

My sme pre našu prácu využívali subtyp MDCKII získaný z vyšších parentných pasáží. Okrem parentných buniek boli využité aj bunky transdukované ľudskými efluxnými liekovými transportérmi (MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2, MDCKII-ABCC1).

5.1.4. Pasážovanie

Pasážovanie buniek je bežný postup, pri ktorom sa časť buniek z danej kultúry oddelí, preniesie do novej kultivačnej fľaše za súčasného prídania nového média, čím sa zabezpečí ich následný rast. Pasážovanie prebiehalo vždy v pondelok a štvrtok za sterilných podmienok v laminárnom boxe, ktorý zabezpečoval úspešný priebeh celého procesu. Bunkové línie MDCKII boli kultivované v médiu DMEM s prídavkom 10 % FBS za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂). Pred pasážovaním sa vo vodnej lázni zohriali PBS, trypsín a médium na teplotu 37 °C. Medzitým sa mikroskopicky skontrolovalo či bunky na dne kultivačnej fľaše dosiahli požadovanú konfluenciu 70-90 %. Najprv sa z fľaše odstránilo staré médium a bunky sa premyli pridaním 5 ml PBS pufru. Ďalej sa pridal 1 ml trypsínu a bunky sa umiestnili späť do inkubátora na čas dostatočný k oddeleniu buniek od dna kultivačnej fľaše. Účinok trypsínu sa deaktivoval pridaním 4 ml nového média a bunky sa následne prudko resuspendovali. Podľa východiskovej konfluencie sa potrebné množstvo takto získanej suspenzie pridalo k 7 ml média do novej kultivačnej fľaše a nechali sa inkubovať.

5.1.5. Akumulačné štúdie s necytotoxickými substrátmi ABC transportérov

Hlavným princípom akumulčných štúdií je sledovanie intenzity fluorescencie špecifických substrátov, v našom prípade Hoechst 33342 a Calcein AM. Pri použití fluorescenčného substrátu odráža intenzita fluorescencie aktivitu ABC transportéru. Znížená akumulácia liečiva v bunkách s overexpresiou ATP transportérov je výsledkom zvýšenej rýchlosti odtoku liečiva. Pridaním inhibítorov ABC liekových efluxných transportérov dochádza k zablokovaniu efluxu substrátov z intracelulárneho prostredia

bunky, čím sa zvyšuje nielen koncentrácia substrátu v bunke ale aj jeho fluorescencia, ktorú je následne možné zmerať. Hoechst 33342 je fluorescenčné farbivo, ktoré je široko využívané pre svoju vlastnosť vykazovať zvýšenú fluorescenciu po naviazaní na DNA. Vykazuje nízku toxicitu a mutagenitu pri použití v koncentrácii 10 μM , čo z neho robí ideálnu fluorescenčnú sondu na meranie bunkovej akumulácie (*Richmond et al., 2013*). Použili sme ho k detekcii inhibície efluxného transportéra ABCB1 a ABCG2. Calcein AM (calcein-acetoxymethyl ester) je taktiež fluorescenčným farbivom používaným najmä k stanoveniu životaschopnosti eukaryotických buniek. My sme ho využili k detekcii inhibície efluxného transportéra ABCC1.

MDCKII-par, MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC1 bunky v DMEM médiu boli nasadené na 96-jamkovú doštičku v počte 100 000/jamka/100 μl . Následne boli inkubované v inkubátore za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO_2) minimálne 24 hod do plnej konfluencie (100 %). Kontrola prebiehala mikroskopicky. Z takto pripravených buniek sa odsalo staré médium a bunky sa dvakrát opláchli 100 μl PBS (37 °C) použitím multikanálovej pipety. Ďalej sa do určitých jamiek pridalo 90 μl Opti-MEM a to buď s pridanými modelovými inhibítormi 1 μM LY335979 (pre ABCB1), 1 μM Ko143 (pre ABCG2), 25 μM MK571 (pre ABCC1) alebo so skúšanými potencionálnymi inhibítormi (carfilzomib, enasidenib, encorafenib a sonidegib), ktoré boli pridávané v päťstupňovom koncentračnom rozmädzi 1, 5, 10, 25, 50 μM . Okrem toho bolo do určitých jamiek pridávané len samotné Opti-MEM (90 μl) ako kontrola alebo (100 μl) ako background. Po následnej 15 minútovej inkubácii (37 °C) boli pridané modelové substráty, teda 5 μM Hoechst 33342 pre ABCB1 a ABCG2 bunky alebo 2 μM Calcein AM pre ABCC1 bunky. Tieto substráty boli pridávané tesne pred meraním v množstve 10 μl a to čo najrýchlejšie za pomoci automatickej opakovacej pipety. Substráty sa pridávali do všetkých jamiek s výnimkou backgrounda. Ihneď bola meraná fluorescencia (Hoechst 33342 - ex: 350 nm, em: 465 nm; Calcein AM - ex: 485 nm, em: 535 nm) v jednominútových intervaloch po dobu 60 min. Pre vyhodnotenie boli využité hodnoty fluorescencie z intervalu 30 min.

5.1.6. Akumulačné štúdie s cytotoxickými substrátmi ABC transportérov

Pri tejto metóde boli použité iné cytotoxické substráty, a to daunorubicín (špecifický substrát pre MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCC1) a mitoxantrón (špecifický substrát pre MDCKII-ABCG2). Akumuláciu týchto substrátov sme detekovali prostredníctvom prietokovej cytometrie, čo je proces ktorý spočíva vo vložení vzorky - v našom prípade

suspenzie buniek do cytometra, kde vzorka veľmi úzkym a rýchlym prietokom preteká cez laserový lúč. Rozptýlené svetlo určuje charakteristiky buniek a ich komponentov. Zozbierané dáta sú následne analyzované v počítači pomocou softvéru.

MDCKII-par, MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC1 bunky boli nasadené v DMEM médiu na 12-jamkovú doštičku v počte 250 000/jamka/1,5 ml a následne inkubované (37 °C, 5 % CO₂) dokiaľ konfluencia buniek nedosiahla 70-80 %. Po premytí predhriatym PBS (37 °C, 500 µl) boli do jednotlivých jamiek pridané znova buď modelové inhibítory 1 µM LY335979 (pre ABCB1), 1 µM Ko143 (pre ABCG2), 25 µM MK571 (pre ABCC1) alebo skúšané potencionálne inhibítory (carfilzomib, enasidenib, encorafenib a sonidegib) v päťstupňovej koncentračnej škále 1, 5, 10, 25, 50 µM pre enasidenib a encorafenib a 1; 2,5; 5; 10; 20 µM pre carfilzomib a sonidegib. Nižšie koncentrácie carfilzomibu a sonidegibu boli používané kvôli ich obtiažnej rozpustnosti. Taktiež bolo pridané 500 µl Opti-MEM bez inhibítorov ako kontrola a background. Nasledovala 10 minútová preinkubácia. Po nej bolo do jednotlivých jamiek (okrem background) pridané 4 µl daunorubicínu DAU (substrát pre ABCB1 a ABCC1/finálna koncentrácia 2 µM) alebo 5 µl mitoxantrónu MTX (substrát pre ABCG2/finálna koncentrácia 1 µM). Bunky sa nechali inkubovať 45 min (37 °C, 5 % CO₂).

Po inkubácii boli bunky umiestené na ľadovú dosku, kde museli zotrvať až do chvíle kedy boli prenesené do skúmaviek. Z jamiek bolo odstránené médium s pridanými látkami, bunky boli premyté ľadovým PBS (2 x 500 µl) a následne bolo pridané 50 µl ľadového trypsínu bez fenolovej červene. Po úplnej trypsinizácii boli bunky prudko resuspendované pridaním 450 µl PBS s prídavkom 2 % FBS. Takto pripravené vzorky boli prenesené do skúmaviek a okamžite bola zmeraná fluorescencia pomocou prietokového cytometra (DAU - ex: 488 nm, em: 585 nm; MTX - ex: 640 nm, em: 675 nm).

5.1.7. Akumulačné štúdie s cytotoxickými substrátmi ABC transportérov v primárnych kultúrach pľúcneho nemalobunečného karcinómu

Biopsie nádorov boli darované Kardiochirurgickou klinikou Fakultnej nemocnice v Hradci Králové. Primárne nádorové bunky izoloval a vyseletoval Ph.D. študent Mgr. Dimitrios Vagiannis na základe vopred stanovenej metódy. Pomocou Western blotting metódy boli nájdené bunky s rôznou úrovňou expsie ABCB1 a ABCG2 transportérov.

Na experiment boli použité primárne bunky do 4. pasáže. Štúdie prebiehali podľa postupu popísaného v sekcii 5.1.6.

5.1.8. Štatistická analýza

Štatistická analýza a grafické vyjadrenie výsledkov bolo spracované pomocou programu GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA). Štatistická významnosť bola analyzovaná pomocou testu one-way ANOVA nasledovaným Dunnetovým post-testom. Porovnávané boli vzorky vystavené testovaným látkám so vzorkami kontrolnými. Štatisticky signifikantné hodnoty boli označené nasledovne: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

6. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas liečby rakoviny chemoterapeutickými látkami často vzniká rezistencia na viac štruktúrne nesúvisiacich zlúčenín – MDR. Existuje niekoľko spôsobov, ako sa bunky môžu stať rezistentnými voči viacerým liekom a jedným z nich je aj zvýšený eflux liečiva z intracelulárneho priestoru bunky, na ktorý sme sa v našej práci zamerali. K zvýšenému odtoku chemoterapeutických liečiv obvykle dochádza prostredníctvom zvýšenej expresie ABC transportérov. Tri hlavné transportéry (ABCB1, ABCG2, ABCC1) hrajú dôležitú úlohu vo farmakokinetike a biologickej dostupnosti mnohých liekov a ich úloha v rezistencii na rôzne lieky v rakovinových bunkách a na hematoencefalickej bariére je predmetom štúdií už celé desaťročia (*Lusvarghi et al., 2020*).

My sme si v tejto práci vybrali štyri ciele nízkomolekulárne liečivá a dvoma odlišnými metódami sme skúmali ich potenciálny inhibičný vzťah k jednotlivým efluxným transportérom. Experimenty boli prevedené na parentných líniiach MDCKII a na bunkových líniiach MDCKII exprimujúcich ľudské efluxné transportéry ABCB1, ABCG2, ABCC1. Po zistení, že jedna z vybraných látok skutočne inhibuje ABCB1 a ABCG2 transportér (sonidegib), sme previedli akumuláčn é štúdie aj u primárnej bunkovej línie pľúcného nemalobunečného karcinómu. Vo všetkých prípadoch sa výsledné hodnoty vzťahovali na kontrolné inhibítory efluxných transportérov (Ko143, LY335979, MK571).

6.1. Kinetická a flow-cytometrická analýza v MDCKII bunkách

6.1.1. Carfilzomib

Carfilzomib patrí medzi substráty ABCB1 transportéru (Besse et al., 2018). Zatiaľ nie sú dostupné žiadne podrobné informácie o inhibícii ABC transportérov.

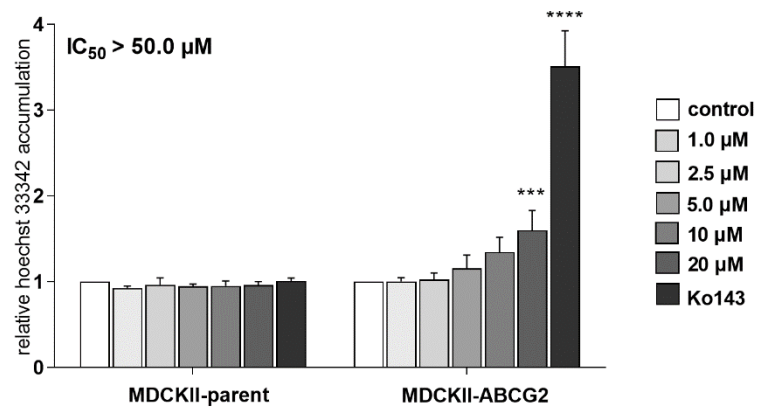
K vzostupu akumulácie prostredníctvom carfilzomibu došlo v prípade MDCKII-ABCG2 línie a Hoechst 33342 ako modelového substrátu (Obr. 12 A). Túto štatisticky významnú inhibíciu sme ale zaznamenali len pri najvyššej koncentrácii (20 μ M). K tejto inhibícii ale nedošlo pri použití MTX ako modelového substrátu (Obr. 13 A).

Podobne tomu bolo aj v prípade bunkovej línie MDCKII-ABCB1, kedy bol mierny vzostup akumulácie zistený pri použití DAU ako substrátu (Obr. 13 C). Avšak pri

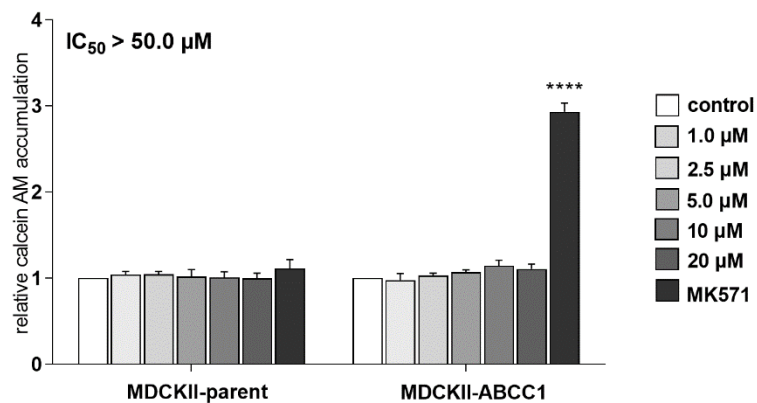
použití Hoechst 33342 u tejto bunkovej línie k žiadnej inhibícii nedošlo (Obr. 12 C). Na základe Obr. 12 B a 13 B je isté, že v prípade ABCC1 transportéru k žiadnej inhibícii nedochádza.

Podľa zistených údajov môžeme povedať, že carfilzomib je látka s veľmi nízkym inhibičným potenciálom vo vzťahu k transportérom ABCB1, ABCG2 a ABCC1.

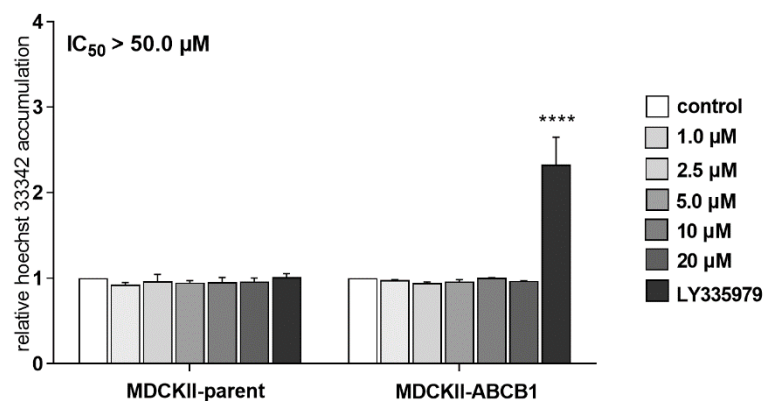
A)



B)

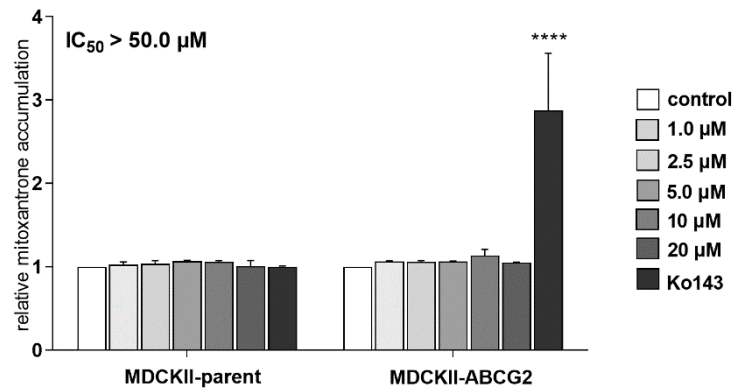


C)

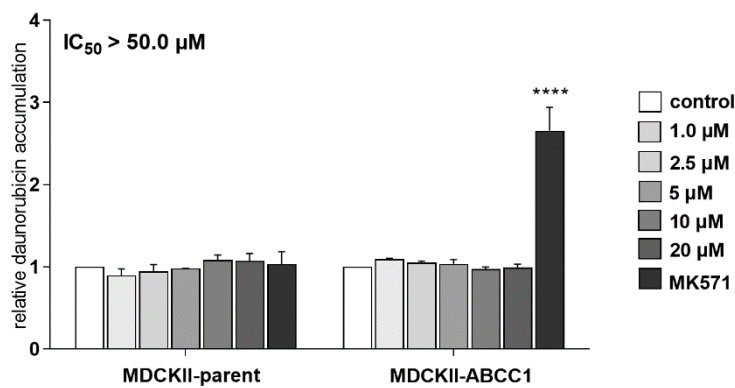


Obr. 12 Grafické znázornenie akumulácie substrátov Hoechst 33342 a Calcein AM v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií carfilzomibu a vybranej koncentrácie modelových inhibitorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom \pm SD troch meraní.

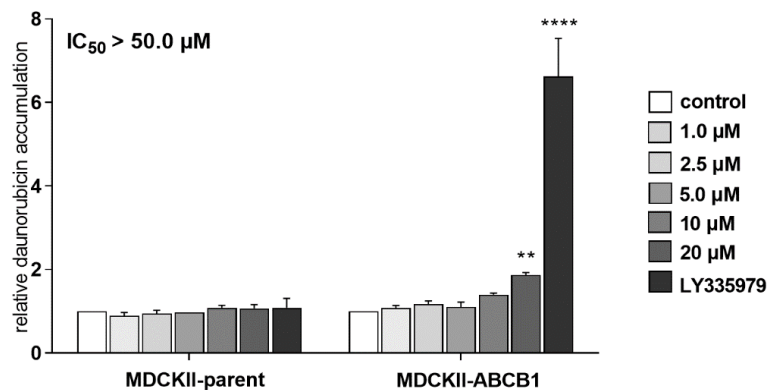
A)



B)



C)



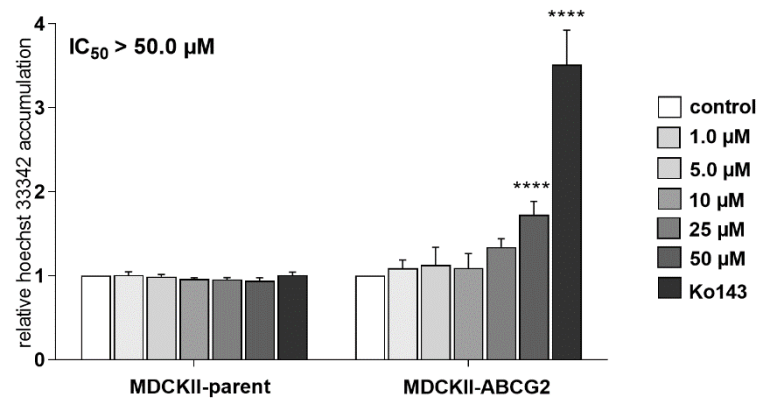
Obr. 13 Grafické znázornenie akumulácie substrátov DAU a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií carfilzomibu a vybranej koncentrácie modelových inhibítorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom \pm SD troch meraní.

6.1.2. Encorafenib

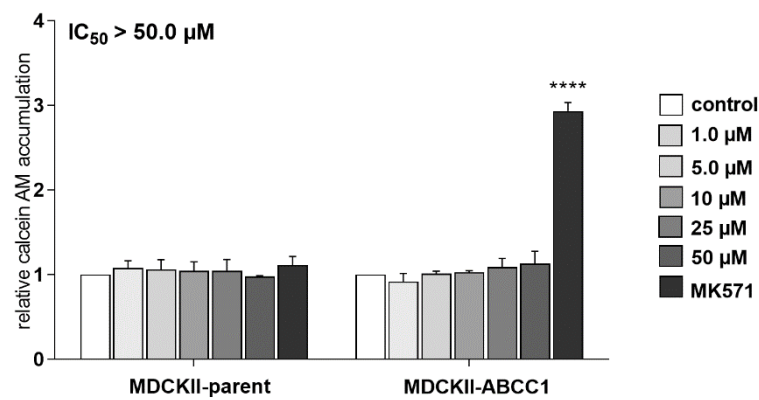
Pre lepšie porozumenie farmakokinetiky encorafenibu Wang et al. (2018) študovali jeho interakcie s efluxnými transportérmi ABCB1 a ABCG2 a metabolizujúcim enzýmom CYP3A. V polarizovaných bunkách MDCKII bol encorafenib úspešne transportovaný psím a ľudským ABCB1 a ABCG2. Encorafenib teda môžeme považovať za substrát týchto efluxných transportérov.

Na Obr. 14 B a C vidíme, že akumulácia všetkých skúšaných koncentrácií u MDCKII-ABCC1 a MDCKII-ABCB1 bunkovej línie bola podobná kontrole a encorafenib neinhiboval ani jeden z transportérov. Je však zaujímavé, že pri použití DAU ako modelového substrátu u MDCKII-ABCC1 a MDCKII-ABCB1 bunkovej línie je zrejмый trend vzostupu akumulácie DAU, ale len pri najvyšších koncentráciách encorafenibu 25 a 50 μM (Obr. 15 B a C). U bunkovej línie MDCKII-ABCG2 došlo k miernemu vzostupu akumulácie len u substrátu Hoechst 33342 (Obr. 14 A). K štatisticky významnej inhibícii došlo ale len pri najvyššej použitej koncentrácii (50 μM). Graf na Obr. 15 A nenaznačuje žiaden inhibičný vplyv encorafenibu smerom k ABCG2. Podľa získaných výsledkov môžeme konštatovať, že encorafenib nevykazuje interakčný potenciál vo vzťahu k transportérom ABCB1, ABCC1 a ABCG2.

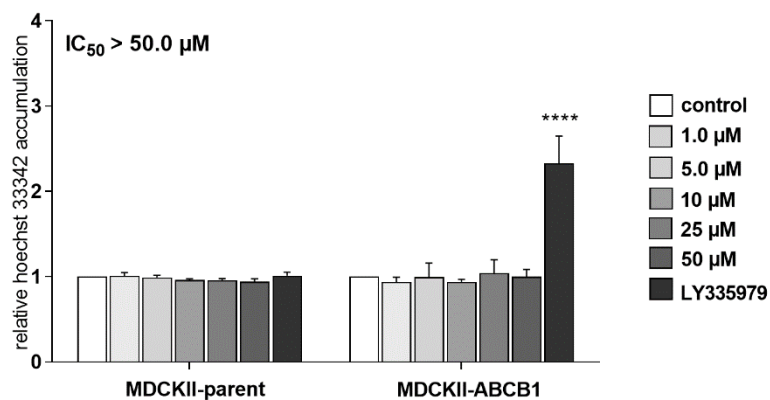
A)



B)

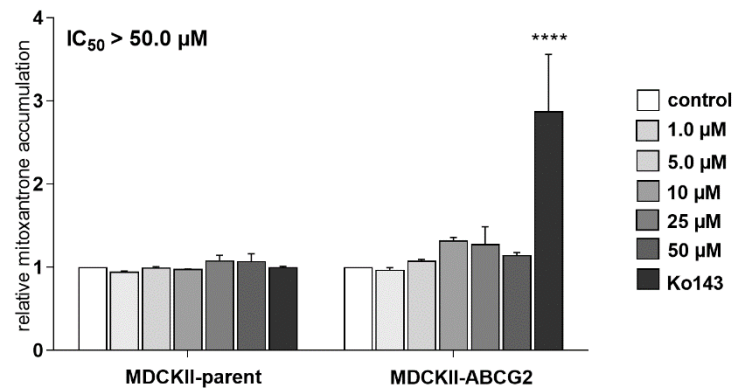


C)

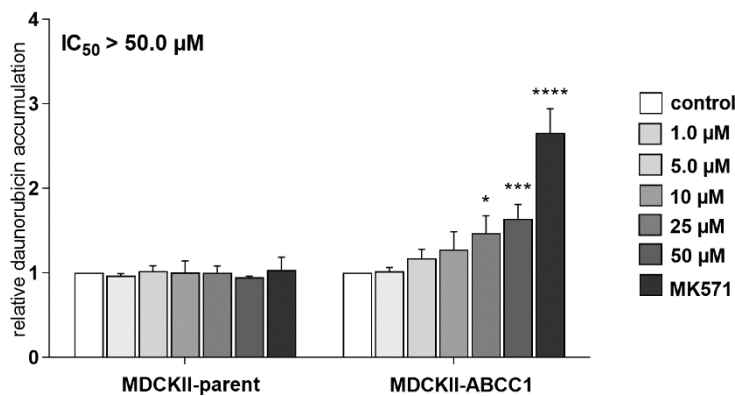


Obr. 14 Grafické znázornenie akumulácie substrátov Hoechst 33342 a Calcein AM v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií encorafenibu a vybranej koncentrácie modelových inhibítorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom ± SD troch meraní.

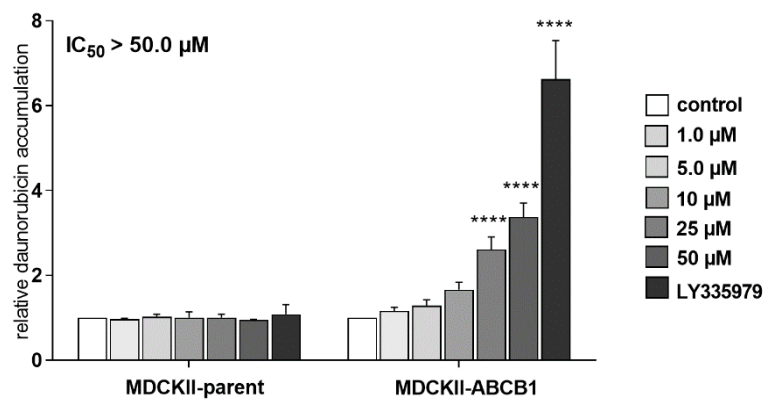
A)



B)



C)



Obr. 15 Grafické znázornenie akumulácie substrátov DAU a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniah s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií encorafenibu a vybranej koncentrácie modelových inhibítorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom \pm SD troch meraní.

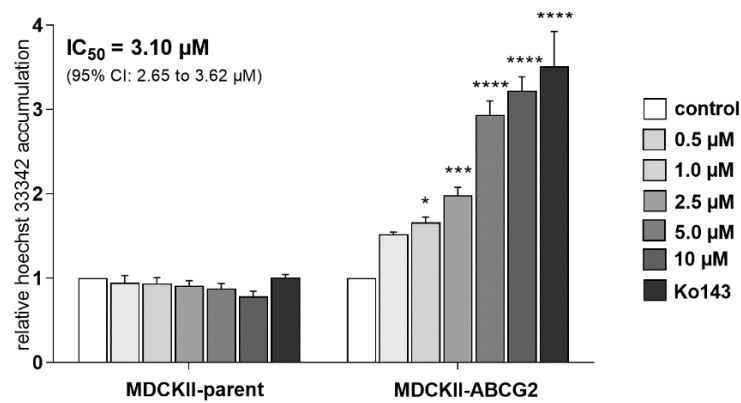
6.1.3. Enasidenib

Dutta et al. (2019) vo svojej práci zistili, že enasidenib inhibuje ABCG2 transportér, ktorý spôsoboval eflux protoporfyrínu IX, priameho prekursora hemu z mitochondrií a cytosolu. Rovnako ako aj my, používali Ko143 ako modelový inhibítor. Inhibícia ABCG2 viedla k zvýšenej akumulácii PPIX v bunke a to k zvýšenej syntéze hemu.

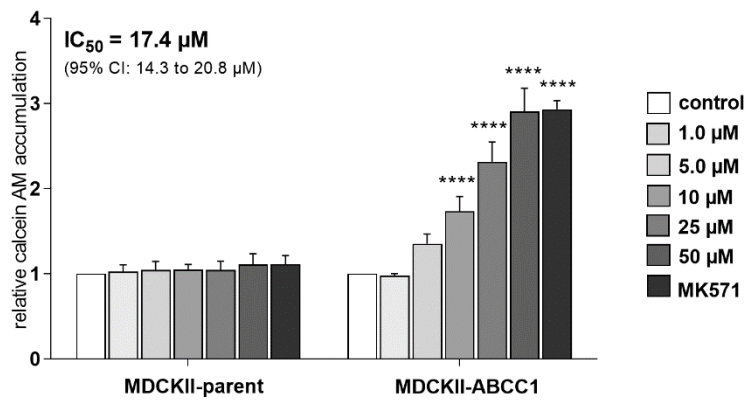
V našich pokusoch sa enasidenib ukázal byť silným inhibítorom najmä ABCG2 (Obr. 16 A, 17 A) transportéru s hodnotami IC_{50} 3,10 μ M (pri pokusoch s Hoechst 33342) a IC_{50} 0,419 μ M (pri pokusoch s MTX). S nižšou aktivitou inhiboval ABCC1 (Obr. 16 B, 17 B) a ABCB1 (Obr. 16 C, 17 C) transportér. U bunkovej línie ABCB1 pri použití Hoechst 33342 ako modelového substrátu došlo k štatisticky významnému zvýšeniu akumulácie až pri vyšších koncentráciách, čo sa odrazilo aj v hodnotách IC_{50} 45,4 μ M. Inhibíciu ABCB1 popísali taktiež Reed et al. (2019), kde *in-vitro* štúdie potvrdili nielen inhibíciu ABCB1 ale aj mnohých hepatálnych a gastrointestinálnych enzýmov a transportných proteínov. Nie je ale známe, že by bol enasidenib substrátom týchto enzýmov alebo proteínov.

Pri dávke 100 mg denne, bola zistená C_{max} enasidenibu približne 27 μ M. Klinickú relevanciu inhibičného efektu teda môžeme očakávať u všetkých študovaných transportérov. Enasidenib by mohol byť využitý s cytostatickými substrátmi ABC transportérov k prekonaniu mnohopočetnej liekovej rezistencie.

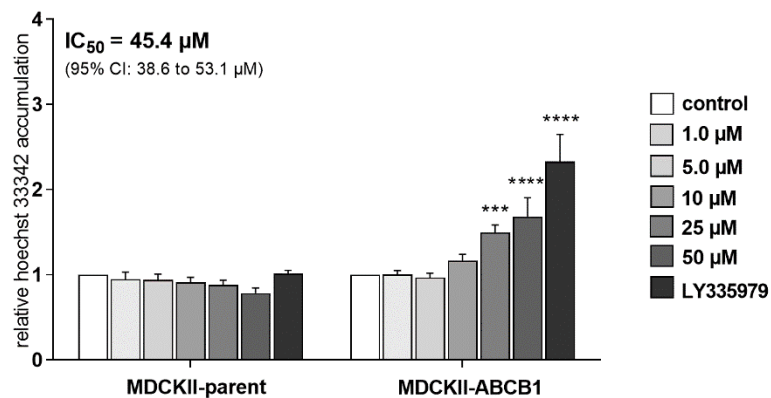
A)



B)

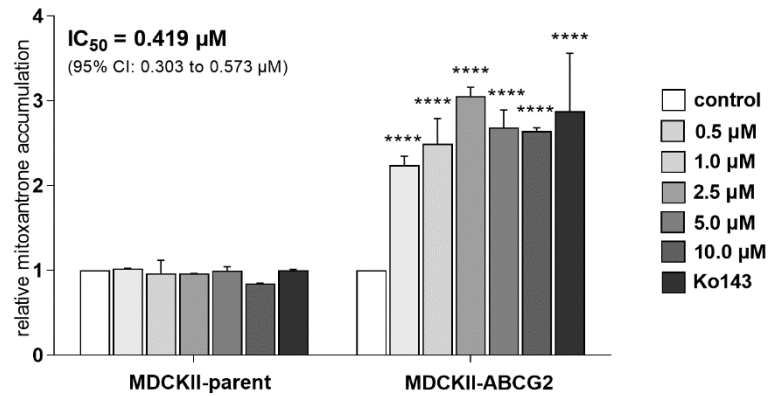


C)

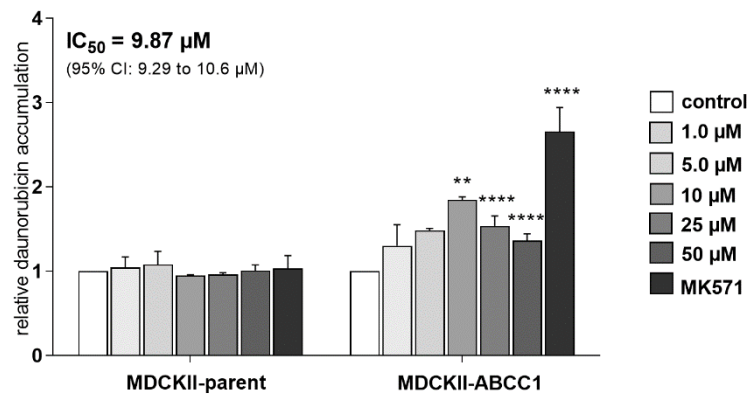


Obr. 16 Grafické znázornenie akumulácie substrátov Hoechst 33342 a Calcein AM v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií enasidenibu a vybranej koncentrácie modelových inhibítorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom ± SD troch meraní.

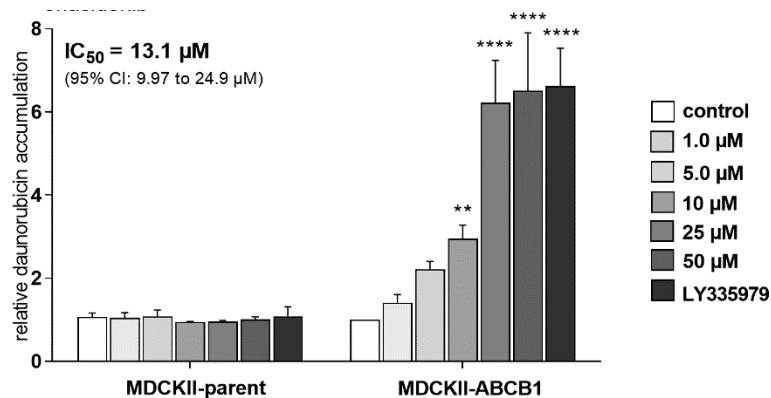
A)



B)



C)



Obr. 17 Grafické znázornenie akumulácie substrátov DAU a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií enasidenibu a vybranej koncentráci modelových inhibítorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom \pm SD troch meraní.

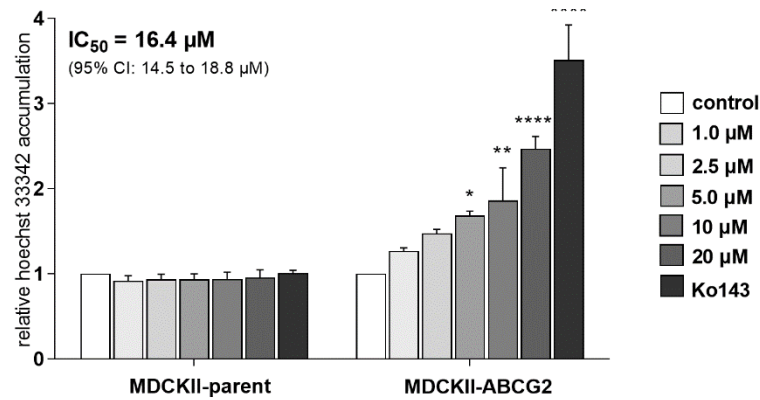
6.1.4. Sonidegib

Poslednou látkou, u ktorej sme skúmali inhibičnú aktivitu cieleňú na efluxné transportéry, bol sonidegib.

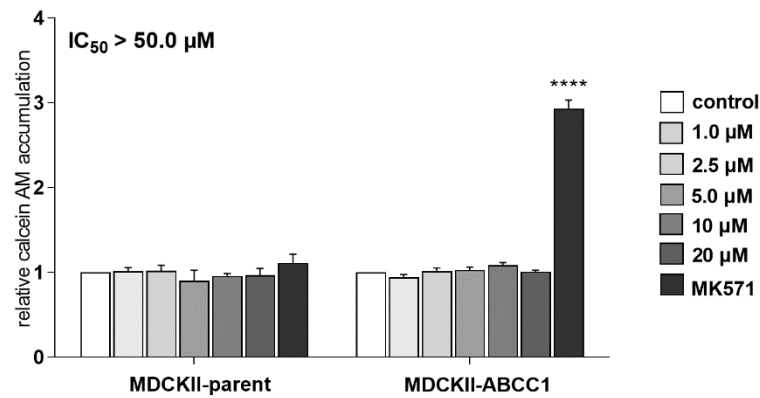
Pri vyhodnocovaní akumuláčnych štúdií so sonidegibom sme pozorovali zvýšenú akumuláciu substrátov hlavne u transportérov ABCG2 (Obr. 18 A, 19 A) a mierne aj u ABCB1 (Obr. 18 C, 19 C). Na inhibíciu ABCG2 transportéra poukázali aj Einolf et al. (2017) vo svojej štúdií, kde sonidegib inhiboval ABCG2 *in vitro*. Poukázali ale aj na skutočnosť, že sonidegib nie je substrátom ABCB1, ABCG2 alebo ABCC2. Nami namerané hodnoty IC_{50} boli o niečo vyššie ako tie nájdené v literatúre ($IC_{50} \sim 2,5 \mu M$), čo mohlo byť spôsobené použitím iných bunkových línií a odlišnou expresiou ABC transportérov.

U bunkovnej línie ABCC1 pri použití oboch modelových substrátov (Calcein AM, DAU) nedošlo k inhibícii v porovnaní s kontrolnými inhibítormi, čo môžeme vidieť na Obr. 18 B a 19 B. Tomu odpovedajú aj vypočítané hodnoty $IC_{50} > 50 \mu M$.

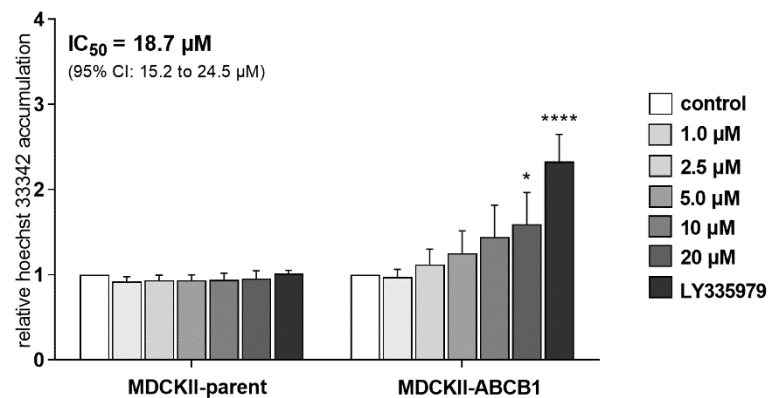
A)



B)

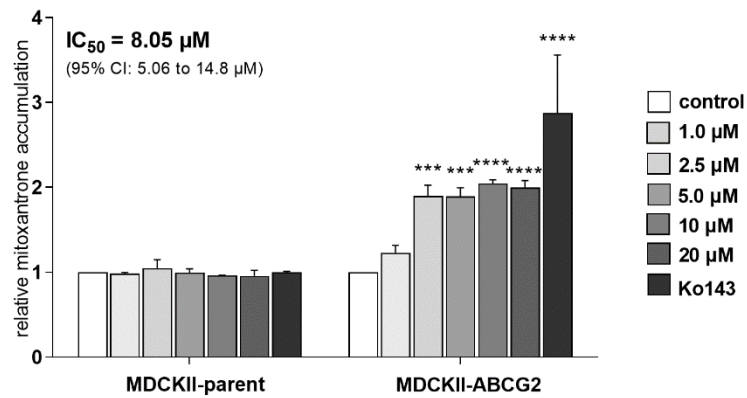


C)

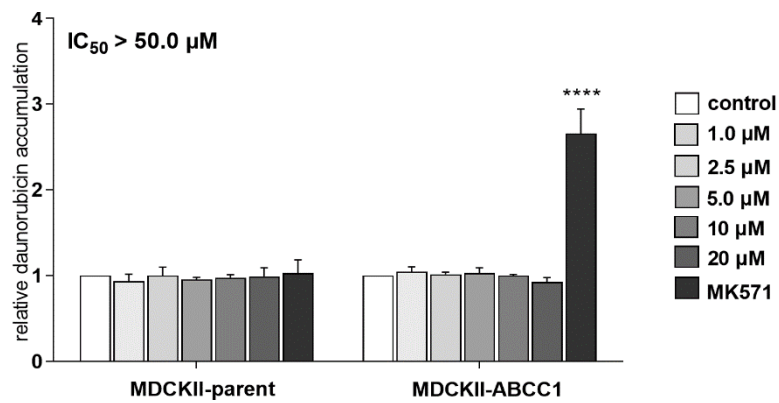


Obr. 18 Grafické znázornenie akumulácie substrátov Hoechst 33342 a Calcein AM v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií sonidegibu a vybranej koncentrácie modelových inhibítorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom ± SD troch meraní.

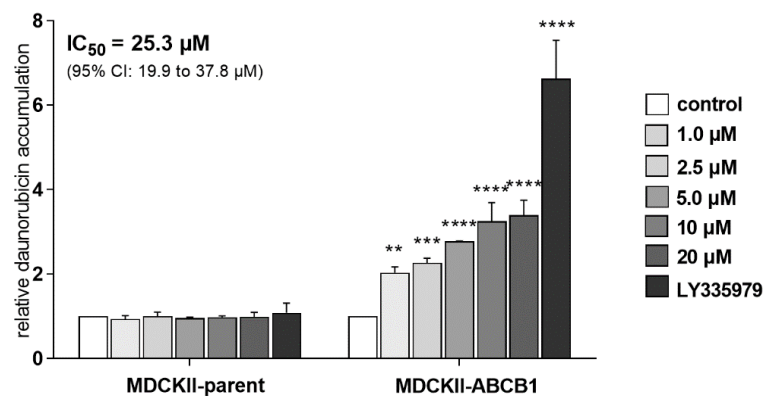
A)



B)



C)



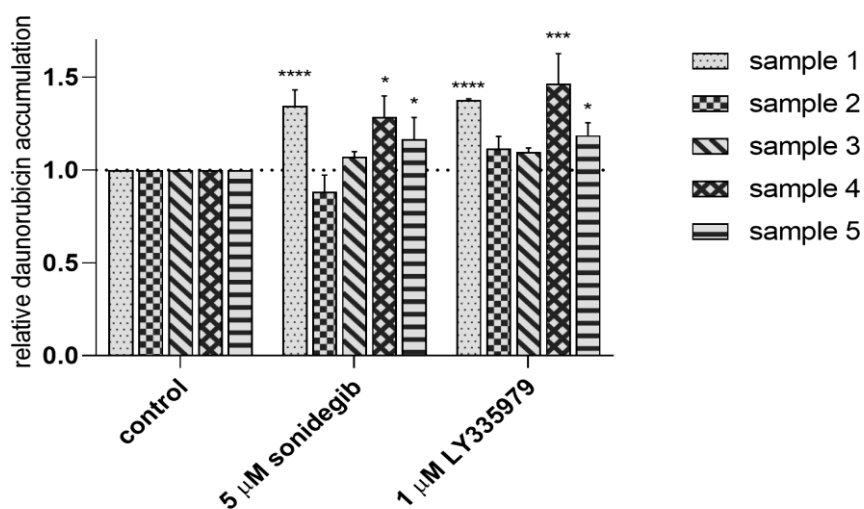
Obr. 19 Grafické znázornenie akumulácie substrátov DAU a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi ABCG2 (A), ABCC1 (B), ABCB1 (C) po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií sonidegibu a vybrané koncentrácie modelových inhibítorov (Ko143, MK571, LY335979). Uvedené hodnoty sú priemerom ± SD troch meraní.

6.2. Flow-cytometrická analýza v primárnych kultúrach pľúcneho nemalobunečného karcinómu

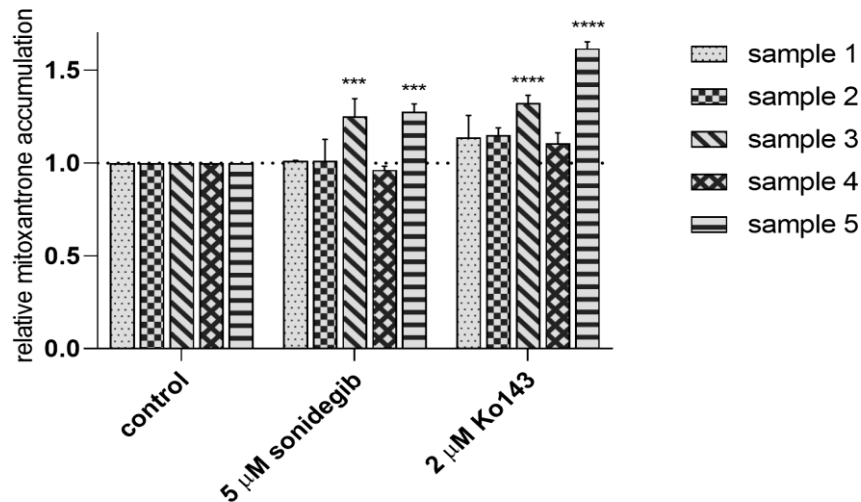
Sonidegib bol látkou, ktorou sme sa zaoberali aj ďalej. Z predchádzajúceho experimentu sme zistili, že sonidegib je inhibítorom ABCG2 a s menšou mierou aj ABCB1 transportéru. Tieto dva transportéry boli exprimované aj v použitých bunkách získaných z biopsií nádorov NSCLC.

Na základe spracovaných údajov v Obr. 20 je zrejmé, že sonidegib sa prejavil ako inhibítor ABCB1 transportéru vo vzorkách 1, 4 a 5, čo boli vzorky s najvyššou expresiou ABCB1 transportéru. V rovnakých vzorkách spôsobil signifikantnú zmenu akumulácie DAU i modelový inhibítor LY335979.

Podobný prípad nastal aj vtedy, keď sme ako modelový substrát použili MTX (Obr. 21). Signifikantnú inhibíciu ABCG2 transportéru sonidegibom sme zaznamenali už pri koncentrácii 5 μM a to najmä vo vzorkách 3 a 5, u ktorých bola v expresných štúdiách zistená najvyššia koncentrácia ABCG2. V rovnakých vzorkách došlo k štatisticky významnému efektu modelového inhibítora Ko143.



Obr.20 Grafické znázornenie akumulácie substrátu DAU v primárnej línii buniek pľúcneho nemalobunečného karcinómu, ktoré exprimujú ABCB1 transportér po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií sonidegibu a vybranej koncentrácie modelového inhibítora (LY335979).



Obr.21 Grafické znázornenie akumulácie substrátu MTX v primárnej línii buniek pľúcneho nemalobunečného karcinómu, ktoré exprimujú ABCG2 transportér po expozícii stupňujúcich sa koncentrácií sonidegibu a vybranej koncentrácie modelového inhibítora (KO143).

Zo získaných dát môžeme odvodiť, že sonidegib má schopnosť inhibovať skúmané ABC transportéry aj za podmienok *ex vivo*, čo potvrdzuje jeho potenciál stať sa cenným modulátorom MDR v klinickej praxi. Pre potvrdenie tohto záveru sú však potrebné rozsiahlejšie *in vivo* štúdie.

6. ZÁVER

V tejto diplomovej práci sme stanovovali inhibičnú schopnosť štyroch vybraných nízkomolekulárnych látok (carfilzomib, enasidenib, encorafenib, sonidegib) vo vzťahu k ABC efluxným transportérom (ABCB1, ABCG2, ABCC1) v bunkovej línii MDCKII a v primárnej línii buniek pľúcneho nemalobunečného karcinómu.

Silnú inhibičnú schopnosť prejavil enasidenib voči ABCG2 a pri vyšších koncentráciách aj voči ABCB1 a ABCC1. Sonidegib pôsobil prevažne na ABCG2 a ABCB1, voči ABCC1 neprejavil žiadnu inhibičnú aktivitu. Nízky inhibičný potenciál sme zaznamenali u carfilzomibu a encorafenibu, u niektorých transportérov sa pri vyšších koncentráciách prejavila mierna inhibícia, ale klinickú relevanciu nemôžeme očakávať. Významným výsledkom tejto práce je aj zistenie inhibičného efektu sonidegibu voči ABCG2 a ABCB1 transportérom v niekoľkých vzorkách v primárnej línii NSCLC.

V závere môžeme konštatovať, že sa podarilo splniť vytýčené ciele a priniesť cenné informácie o potenciáli testovaných liečiv vyvolať farmakokinetické interakcie na ABC efluxných transportéroch. Liečivá s inhibičným potenciálom by mohli nájsť uplatnenie pri modulácii MDR s cieľom zefektívnenia terapie a zlepšenia liečby nádorov.

7. ZDROJE

Ai, L., Chen, J., Yan, H. et al. Research status and outlook of pd-1/pd-11 inhibitors for cancer therapy. *Drug Design, Development and Therapy* 14, 3625–3649 (2020). doi: 10.2147/DDDT.S267433

Ascierto, P.A., Dummer, R., Gogas, H.J., et al. Update on tolerability and overall survival in COLUMBUS: landmark analysis of a randomised phase 3 trial of encorafenib plus binimetinib vs vemurafenib or encorafenib in patients with BRAFV600 mutant melanoma. *European Journal of Cancer* 126, 33–44 (2020). doi: 10.1016/j.ejca.2019.11.016

Besse, A., Stolze, S.C., Rasche, L., et al. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia* 32, 391–401 (2018). DOI: 10.1038/leu.2017.212

Cang, S., Iragavarapu, C., Savooji, J. et al. ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *Journal of Hematology and Oncology* 8, (2015). doi: 10.1186/s13045-015-0224-3

Cole, S.P.C. Multidrug resistance protein 1 (mrp1, abcc1), a “multitasking” atp-binding cassette (abc,) transporter. *Journal of Biological Chemistry* 289, 30880–30888 (2014). doi: 10.1074/jbc.R114.609248

Dalle Vedove, E., Costabile, G., Merkel, O., M. Mannose and Mannose-6-Phosphate Receptor–Targeted Drug Delivery Systems and Their Application in Cancer Therapy. *Advanced Healthcare Materials* 7, (2018). doi: 10.1002/adhm.201701398

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 317–364 (2008). doi: 10.1128/mmbr.00031-07

Dimopoulos, M.A., Stewart, A.K., Masszi, T., et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed multiple myeloma categorised by age: secondary analysis from the phase 3 ASPIRE study. *British Journal of Haematology* 177(3) 404-413 (2017). doi: 10.1111/bjh.14549

- Dornan, M.H., Petrenyov, D., Simard, J.M., et al. Synthesis of a ¹¹C-isotopologue of the B-Raf-selective inhibitor encorafenib using in-loop [¹¹C]CO₂fixation. *ACS Omega* 5, 20960–20966 (2020). doi: 10.1021/acsomega.0c02419
- Dukes, J.D., Whitley, P. & Chalmers, A.D. The MDCK variety pack: Choosing the right strain. *BMC Cell Biology* 12, 43 (2011). doi:10.1186/1471-2121-12-43
- Dutta, R., Zhang, T.Y., Koehnke, T., et al. Enasidenib Drives Maturation of Human Erythroid Precursors Independently of IDH2. *Blood* 134, 540–540 (2019). DOI: 10.1182/blood-2019-124551
- Einolf, H.J., Zhou, J., Won, C., et al. A physiologically-based pharmacokinetic modeling approach to predict drug-drug interactions of sonidegib (LDE225) with perpetrators of CYP3A in cancer patients. *Drug Metabolism and Disposition* 45, 361–374 (2017). doi: 10.1124/dmd.116.073585
- Fabbro, D., Cowan-Jacob, S.W. & Moebitz, H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *British Journal of Pharmacology* 172, 2675–2700 (2015). doi: 10.1111/bph.13096
- Fathi, A.T., DiNardo, C.D., Kline, I., et al. Differentiation Syndrome Associated With Enasidenib, a Selective Inhibitor of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 2: Analysis of a Phase $\frac{1}{2}$ Study. *Jama Onkology* 1;4(8):1106-1110 (2018). doi:10.1001/jamaoncol.2017.4695
- Genovese, I., Ilari, A., Assaraf, Y.G., et al. Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resistance Updates* 32, 23–46 (2017). doi: 10.1016/j.drug.2017.10.003
- Golub, D., Iyengar, N., Dogra, S., et al. Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibitors as Targeted Cancer Therapeutics. *Frontiers in Oncology* 9 (2019). doi: 10.3389/fonc.2019.00417
- Green, A.L., Ramkissoon, S.H., McCauley, D., et al. Preclinical antitumor efficacy of selective exportin 1 inhibitors in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 17, 697–707 (2015). DOI: 10.1093/neuonc/nou303

- Groen, K., van de Donk, N., Stege, C., et al. Carfilzomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Cancer Management and Research* 11, 2663–2675 (2019). doi: 10.2147/CMAR.S150653
- Gu, S., Xiao, S.W., Zheng, J.W., et al. ABC transporters in prorocentrum lima and their expression under different environmental conditions including okadaic acid production. *Marine Drugs* 17, (2019). doi: 10.3390/md17050259
- Jain, S., Diefenbach, C., Zain, J., O'Connor, O.A. Emerging role of carfilzomib in treatment of relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma. *Core Evidenc* 6, 43–57 (2011). doi: 10.2147/CE.S13838
- Jain, S., Song, R., Xie, J. Sonidegib: mechanism of action, pharmacology, and clinical utility for advanced basal cell carcinomas. *Oncotargets and Therapy* 10, 1645–1653 (2017). doi: 10.2147/OTT.S130910
- Jouan, E., Le Vée, M., Mayati, A., et al. Evaluation of P-glycoprotein inhibitory potential using a rhodamine 123 accumulation assay. *Pharmaceutics* 8, (2016). doi: 10.3390/pharmaceutics8020012
- Kang, J., Park, J., Choi, H., et al. Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book* 9, e0153 (2011). doi: 10.1199/tab.0153
- Katayama, K., Noguchi, K., & Sugimoto, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New Journal of Science* 2014, 1–10 (2014). DOI: 10.1155/2014/476974
- Kozak, K. & Rutkowski, P. Why do we need a new BRAF-MEK inhibitor combination in melanoma? *Oncology in clinical practise* 15, 115-119 (2019). doi: 10.5603/OCP.2018.0054
- Leonard, G.D., Fojo, T., Bates, S.E. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *The Oncologist* 8, 411–424 (2003). doi: 10.1634/theoncologist.8-5-411
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., & Cole, S.P.C. Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 216–237 (2005). doi: 10.1016/j.taap.2004.10.012

Li, Q., Sui, H. & Fan, Z.Z. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *Journal of International Medical Research* 40, 426–435 (2012). doi: 10.1177/147323001204000204

Li, Y., Liu, L., Gomez, D., et al. Pharmacokinetics and safety of Enasidenib following single oral doses in Japanese and Caucasian subjects. *Pharmacology Research and Perspectives* 6(6) (2018). doi: 10.1002/prp2.436

Lipsick, J. A history of cancer research: Tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11(2) (2019). doi: 10.1101/cshperspect.a035592

Lubelski, J., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 463–476 (2007). doi: 10.1128/mnbr.00001-07

Luqmani, Y.A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. in *Medical Principles and Practice* 14, 35–48 (S. Karger AG, 2005). doi: 10.1159/000086183

Mahmuda, A., Bande, F., Al-Zihiry, K.J.K. et al. Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 16, 713–722 (2017). doi: 10.4314/tjpr.v16i3.29

Mao, Q. & Unadkat, J.D. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS Journal* 17, 65–82 (2015). doi: 10.1208/s12248-014-9668-6

McFarlane, T., Rehman, N., Wang, K., et al. Cutaneous toxicities of new targeted cancer therapies: Must know for diagnosis, management, and patient-proxy empowerment. *Annals of Palliative Medicine* 9, 1296–1306 (2020). doi: 10.21037/apm.2019.08.05

Metibemu, D.S., Akinloye, O.A., Akamo, A.J., et al. Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in Cancer treatments. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 20, (2019). doi: 10.1186/s43042-019-0035-0

Moody, J.E., Millen, L. & Binns, D. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette

transporters. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21111–21114 (2002). doi: 10.1074/jbc.C200228200

Muchtar, E., Gertz, M.A. & Magen, H. A practical review on carfilzomib in multiple myeloma. *European Journal of Haematology* 96, 564–577 (2016). doi: 10.1111/ejh.12749

Pasello, M., Giudice, A.M., & Scotlandi, K. The ABC subfamily A transporters: Multifaceted players with incipient potentialities in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 60, 57–71 (2020). doi: 10.1016/j.semcancer.2019.10.004

Patel, M., Nowsheen, S., Maraboyina, S. & Xia, F. The role of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in the treatment of cancer and methods to overcome resistance: A review. *Cell and Bioscience* 10, (2020). doi: 10.1186/s13578-020-00390-7

Paul, M. & Mukhopadhyay, A. Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences* 101–115 (2012). doi:10.7150/ijms.1.101

Pollyea, D.A., Tallman, M.S., de Botton, S., et al. Enasidenib, an inhibitor of mutant IDH2 proteins, induces durable remissions in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia* 33:2575–2584 (2019). doi:10.1038/s41375-019-0472-2

Procko, E., O'Mara, M.L., Bennett, W.F.D., et al. The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *The FASEB Journal* 23, 1287–1302 (2009). doi: 10.1096/fj.08-121855

Rahman, M.M., Hazan, A., Selway, J.L. et al. A novel mechanism for activation of GLI1 by nuclear SMO that escapes anti-SMO inhibitors. *Cancer Research* 78, 2577–2588 (2018). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2897

Reed, D.R., Elsarrag, R.Z., Morris, A.L. & Keng, M.K. Enasidenib in acute myeloid leukemia: Clinical development and perspectives on treatment. *Cancer Management and Research* 11, 8073–8080 (2019). doi: 10.2147/CMAR.S162784

Richmond, G.E., Chua, K.L. & Piddock, L.J.V. Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H333342 (bis-benzamide). *Journal of antimicrobial chemotherapy* 68: 1594–1600 (2013). doi:10.1093/jac/dkt052

Ross, A.E., Hughes, R.M., Glavaris, S., et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic neoadjuvant study of hedgehog pathway inhibitor Sonidegib (LDE-225) in men with high-risk localized prostate cancer undergoing prostatectomy. *Oncotarget* 8(61) 104182-104192 (2017). doi: 10.18632/oncotarget.22115

Ross, J.S., Schenkein, D.P., Pietrusko, R., et al. Targeted Therapies for cancer 2004. *American Journal of Clinical Pathology* 122, 598–609 (2004). doi: 10.1309/5cwp-u41a-fr1v-ym3f

Scotto, K.W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22, 7496–7511 (2003). doi: 10.1038/sj.onc.1206950

Sekine, I. & Takiguchi, Y. Clinical classification of targeted agents used for anticancer treatment. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 230(1) 1-5 (2013). doi: 10.1620/tjem.230.1

Stein, E.M., DiNardo, C.D., Pollyea, D.A., et al. Enasidenib in mutant IDH₂ relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 130(6) 722-731 (2017). doi: 10.1182/blood-2017-04-779405

Sun, J., Zager, J. & Eroglu, Z. Encorafenib/binimetinib for the treatment of BRAF-mutant advanced, unresectable, or metastatic melanoma: Design, development, and potential place in therapy. *OncoTargets in Therapy* 11, 9081–9089 (2018). doi: 10.2147/OTT.S171693

Szakács, G., Annereau, J.P., Lababidi, S., et al. Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 129–137 (2004). doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.026

Szewczyk, P., Tao, H., McGrath, A.P., et al. Snapshots of ligand entry, malleable binding and induced helical movement in P-glycoprotein. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 71, 732–741 (2015). doi: 10.1107/S1399004715000978

Takeuchi, K. & Ito, F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34, 1774–1780 (2011). doi: 10.1248/bpb.34.1774

- Tan, L.T.H., Chan, K.G., Pusparajah, P., et al. Targeting membrane lipid a potential cancer cure? *Frontiers in Pharmacology* 8, 1–6 (2017). doi: 10.3389/fphar.2017.00012
- Ter Beek, J., Guskov, A. & Slotboom D.J. Structural diversity of ABC transporters. *Journal of General Physiology* 143, 419–435 (2014). doi: 10.1085/jgp.201411164
- Toyoda, Y., Takada, T., & Suzuki, H. Inhibitors of human ABCG2: From technical background to recent updates with clinical implications. *Frontiers in Pharmacology* 10, (2019). DOI: 10.3389/fphar.2019.00208
- Tsuruo, T., Naito, M., Tomida, A., et al. Molecular targeting therapy of cancer: Drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Science* 94, 15–21 (2003). doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01345.x
- Van Geel, R.M.J.M., Tabernero, J., Elez, E., et al. A Phase Ib Dose-Escalation Study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in Metastatic BRAF-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discovery* 7, 610–619 (2017). doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0795
- Vasiliou, V., Vasiliou, K. & Nebert, D.W. ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics* 3, 281–290 (2009). doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281
- Villani, A., Fabbrocini, G., Costa, C., Scalvenzi, M. Sonidegib: Safety and Efficacy in Treatment of Advanced Basal Cell Carcinoma. *Dermatology and Therapy* 10, 401–412 (2020). doi: 10.1007/s13555-020-00378-8
- Wahid, M., Jawed, A., Dar, S.A., et al. Differential pharmacology and clinical utility of sonidegib in advanced basal cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy* 10 515-520 (2017). doi: 10.2147/OTT.S97713
- Waitkus, M.S., Diplas, B.H. & Yan, H. Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell* 34, 186–195 (2018). doi: 10.1016/j.ccell.2018.04.011
- Wang, J., Gan, C., Sparidans, R.W., et al. P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) affect brain accumulation and intestinal disposition of encorafenib in mice. *Pharmacological Research* 129, 414–423 (2018). doi: 10.1016/j.phrs.2017.11.006

Wilkins, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports* 7 (2015). doi: 10.12703/P7-14

Wu, S. & Fu, L. Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Molecular Cancer* 17, (2018). DOI: 10.1186/s12943-018-0775-3

Yamaoka, T., Kusumoto, S., Ando, K., et al. Receptor tyrosine kinase-targeted cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2018). doi: 10.3390/ijms19113491

Yin, J. & Zhang, J. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: From discovery to clinical application. *Journal of Central South University (Medical Sciences)* 36, 927–938 (2011). doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.002