

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Diplomová práce

**NOVÉ STRUKTURY S POTENCIÁLEM INHIBICE
FLT3 RECEPTORU: *IN VITRO* HODNOCENÍ
S VYUŽITÍM AML BUNĚČNÝCH LINIÍ**

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

Konzultant: Mgr. Jan Rataj

Hradec Králové 2024

Anna Zídková

Prohlášení

„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 nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Anna Zídková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za odborné konzultace a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Mé poděkování též patří Mgr. Janu Ratajovi za pomoc a trpělivost, zejména v průběhu experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji rodičům a všem blízkým, kteří mě celou dobu podporovali.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Anna Zídková

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

Konzultant: Mgr. Jan Rataj

Název diplomové práce: Nové struktury s potenciálem inhibice FLT3 receptoru: *In vitro* hodnocení s využitím AML buněčných linií

Akutní myeloidní leukemie (AML) je rapidně progredující hematoonkologické onemocnění, charakterizované proliferací a akumulací nezralých myeloblastů v kostní dřeni a periferní krvi. Výsledky léčby AML, i přes významné úspěchy, stále zůstávají neuspokojivé. Až u jedné třetiny pacientů s nově diagnostikovanou AML jsou detekovány mutace genu pro FLT-3 (FMS like tyrosin kináza 3), přispívající ke špatné prognóze onemocnění. FLT-3 inhibitory tak představují nový přístup cílené terapie. Přesto, že byly zavedeny do terapie teprve nedávno, už vůči nim leukemické buňky rozvíjí rezistenci, která bývá jedním z důvodů selhání léčby. Cílem této práce bylo otestovat 8 nově syntetizovaných sloučenin jako potenciálních FLT-3 inhibitorů a zhodnotit jejich přínos v překonávání rezistence vůči klinicky používanému FLT-3 inhibitoru gilteritinibu. Pomocí metody MTT byla otestována schopnost těchto látek navodit buněčnou smrt u linie MV4-11 (nesoucí FLT-3 mutaci) v porovnání s linií THP-1 (mutaci nevykazující). Na základě prvního screeningu v 1 μ M a 10 μ M koncentracích byly vybrány 4 nejúčinnější látky, u kterých byla následně stanovena hodnota IC_{50} . Jako nejefektivnější byla identifikována látka DS-28, inhibující proliferaci buněčné linie MV4-11 již s hodnotou $IC_{50}=0,3070 \mu$ M (CI 95 % = 0,2779-0,3386 μ M), v porovnání s linií THP-1, kde byla získána hodnota IC_{50} 55krát vyšší. Pro hodnocení možné antiproliferativní aktivity u rezistentních buněk byl porovnán efekt látek na gilteritinib-rezistentní linii HL-60 g75, oproti *wild-type* variantě HL-60. Látka DS-3 prokázala srovnatelný efekt na buněčnou proliferaci rezistentní i senzitivní linie. U látky LG-1871 byl pozorován neočekávaný efekt, pravděpodobně související s nadměrnou aktivací mitochondriálních enzymů. Výsledky této práce předkládají zajímavé podněty k dalšímu studiu rezistence, zejména ale představují slibnou sloučeninu DS-28, která může sloužit jako předlohová struktura dalších, ještě účinnějších FLT3 inhibitorů.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Anna Zídková

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

Consultant: Mgr. Jan Rataj

Title of diploma thesis: Novel structures with a potential to inhibit the FLT3 receptor: In vitro evaluation using AML cell lines

Acute myeloid leukemia (AML) is a rapidly progressing hematologic malignancy, characterized by the proliferation and accumulation of immature myeloblasts in the bone marrow and peripheral blood. Despite significant achievements, treatment outcomes remain unsatisfactory. Mutations in the FLT-3 (FMS-like tyrosine kinase 3) gene are detected in up to one-third of patients with newly diagnosed AML, contributing to the poor prognosis of the disease. FLT-3 inhibitors thus represent a new approach to targeted therapy. Although they have only recently been introduced into therapy, resistance to them is already being developed by leukemic cells, often resulting in treatment failure. In this study, we aimed to test 8 newly synthesized compounds as potential FLT-3 inhibitors and to evaluate their possible contribution in overcoming resistance to the clinically used FLT-3 inhibitor gilteritinib. Using the MTT method, the ability of these compounds to induce cell death was tested in the MV4-11 line (carrying the FLT-3 mutation) in comparison to the THP-1 line (lacking the mutation). Based on the initial screening at 1 μM and 10 μM concentrations, the 4 most effective substances were selected, followed by determination of their IC₅₀ values. The compound DS-28 was identified as the most effective, inhibiting the proliferation of the MV4-11 cell line with an IC₅₀ value of 0.3070 μM (95 % CI = 0.2779-0.3386 μM), compared to the THP-1 line, in which the IC₅₀ value was 55 times higher. To evaluate the possible antiproliferative activity in resistant cells, the effect of the compounds was compared between the gilteritinib-resistant HL-60 g75 line and the wild-type HL-60 variant. The compound DS-3 showed a similar effect on cellular proliferation in both, the resistant and the sensitive cell line. Surprisingly, an unexpected effect was observed with LG-1871 and can be presumably explained by the excessive activation of mitochondrial enzymes. These results provide interesting motives for further resistance studies and present the promising compound DS-28 as a potential prototype structure for even more effective FLT3 inhibitors.

OBSAH

1	Seznam zkratk	8
2	Úvod.....	9
3	Teoretická část	10
3.1	Akutní myeloidní leukemie	10
3.2	Klinický obraz a diagnostika	11
3.3	Terapie.....	12
3.3.1	Konvenční přístup	12
3.3.2	Cílená terapie.....	12
3.4	FLT-3 receptor.....	13
3.4.1	FLT-3 mutace	14
3.5	FLT-3 inhibitory	15
3.5.1	FLT-3 inhibitory první generace	16
3.5.2	FLT-3 inhibitory druhé generace	16
3.6	Rezistence vůči FLT-3 inhibitorům.....	17
3.6.1	Mechanismy vzniku primární rezistence.....	18
3.6.2	Mechanismy vzniku sekundární rezistence	18
4	Cíle práce	20
5	Experimentální část.....	21
5.1	Chemikálie.....	21
5.2	Přístroje.....	21
5.3	Buněčné linie	22
5.4	Optimalizace nasazovací hustoty buněk.....	23
5.4.1	Princip	23
5.4.2	Postup.....	24
5.5	MTT test	25
5.5.1	Princip	25

5.5.2	Postup.....	26
5.6	Statistické vyhodnocení dat.....	29
6	Výsledky.....	30
6.1	Optimalizace nasazovací hustoty.....	30
6.2	První set MTT.....	31
6.3	Druhý set MTT.....	33
6.4	Efekt na rezistentní buněčnou linii.....	34
7	Diskuze.....	38
8	Závěr.....	40
9	Literatura.....	41

1 SEZNAM ZKRATEK

AML	akutní myeloidní leukemie
A-smyčka	aktivační smyčka
CR	kompletní remise
EMA	Evropská léková agentura
FL	FLT-3 ligand
FLT-3	fms podobná tyrosin kináza 3
HSCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk
IC ₅₀	poloviční maximální inhibiční koncentrace
ITD	interní tandemová duplikace
MRD	měřitelná zbytková nemoc
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
OS	celková doba přežití (overall survival)
PBS	fosfátový pufr
R/R AML	relabující/refrakterní typ AML
TKD	tyrosinkinázová doména
wt	wild type

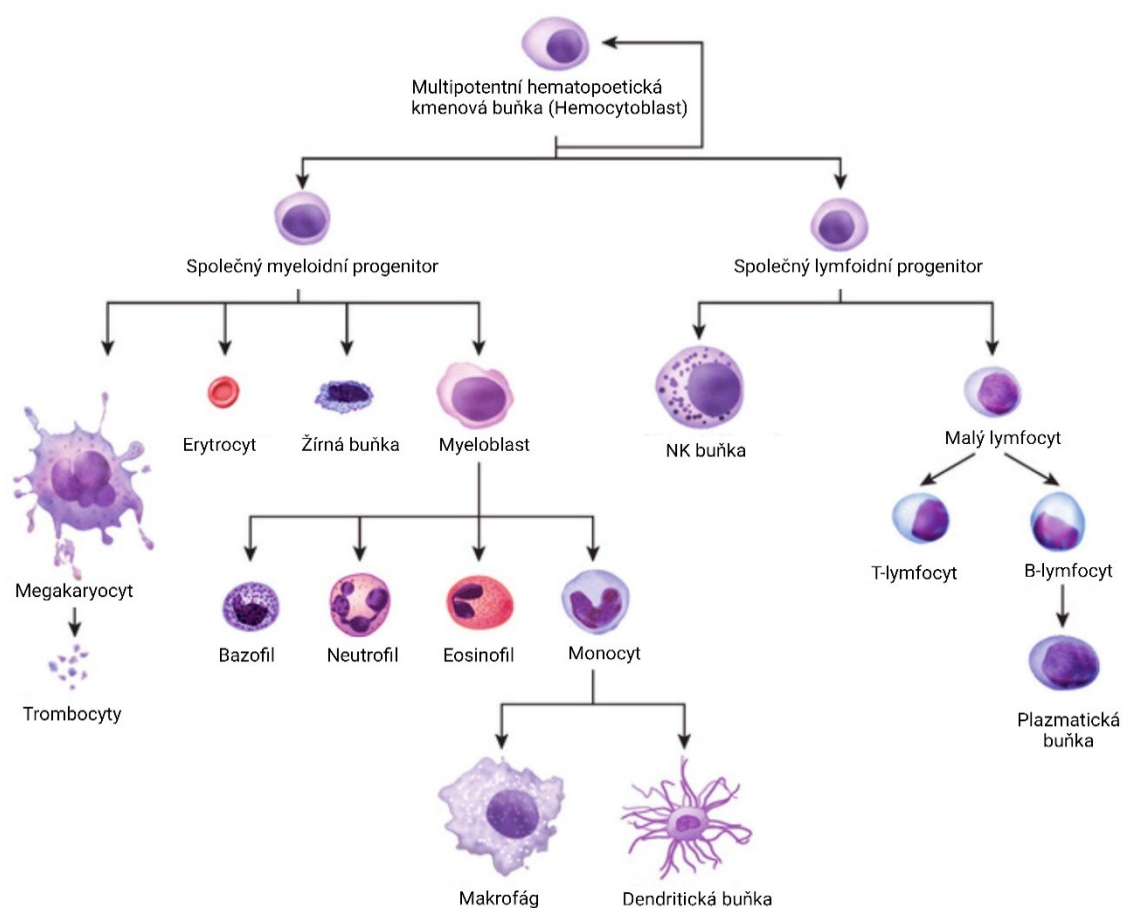
2 ÚVOD

V dnešní době je rakovina jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě (Siegel et al. 2020). Rozvoj technologií a medicíny přispěl k lepšímu porozumění mechanismů, podílejících se na vzniku a šíření maligních buněk, a umožnil tak vývoj moderních léčebných strategií (Motofei 2022). Přesto, že už je mnoho typů maligních onemocnění (například melanom nebo rakovina prostaty) považováno za dobře léčitelné (Eggermont et al. 2018; Lehtonen a Kellokumpu-Lehtinen 2023), je pro velké procento onkologických pacientů doba přežití kratší než 5 let (Siegel et al. 2020). Akutní myeloidní leukemie (AML) se i přes významné pokroky v léčbě stále řadí mezi špatně léčitelné onemocnění (Döhner et al. 2015). Až poslední dekáda přinesla do terapie AML několik inovací, které přispěly k výraznému nárůstu úspěšně léčených pacientů. Ke standardní cytostatické chemoterapii, sestávající se z kombinace antracyklinu a cytarabinu, byla přidána cílená léčba skýtající nové možnosti především starším a křehkým pacientům (Senapati a Kadia 2022). Až u jedné třetiny pacientů s nově diagnostikovanou AML se vyskytují mutace genu pro FLT-3 (FMS-like tyrozin kináza 3) receptor, které jsou spojovány s horší prognózou a vyšším rizikem relapsu (Fedorov et al. 2023). Inhibice FLT-3 receptoru tak představuje atraktivní možnost pro cílenou farmakoterapii pacientů s FLT3-mutovaným typem AML (Kazi a Rönstrand 2019). Do terapie byly zavedeny už dvě generace FLT-3 inhibitorů a další jsou právě testovány v klinických studiích (Zhao et al. 2022). Přes to, že byly do terapie zavedeny teprve nedávno (midostaurin 2017 (CHMP 2017), gilteritinib 2019 (COMP 2019) a quizartinib 2023 (COMP 2023)), byla už i vůči těmto klinicky používaným FLT-3 inhibitorům popsána rezistence, která je jednou z hlavních příčin selhání terapie a relapsu onemocnění (Capelli et al. 2022). Potřeba vývoje nových struktur s potenciálem specificky inhibovat FLT-3 inhibitor a zároveň ideálně předcházet vzniku rezistence stále roste (Zhao et al. 2022). Tato práce má za úkol otestovat nově syntetizované sloučeniny s potenciálem inhibovat FLT-3 receptor a prozkoumat jejich efekt na gilteritinib-rezistentní leukemické linii.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Akutní myeloidní leukemie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je velmi rychle progredující zhoubné onemocnění krvetvorné tkáně. Vzniká maligní transformací hematopoetické kmenové buňky, která se nekontrolovatelně množí v nezralé, abnormálně diferencované myeloidní prekurzory (myeloblasty), které se hromadí v kostní dřeni a postupně se vyplavují do periferní krve. Tato expanze nezralých blastů vede k potlačení tvorby normálních, plně diferencovaných krevních elementů (Obr. 1), tedy erytrocytů, trombocytů, monocytů a granulocytů (Khwaja et al. 2016).



Obr. 1 Hematopoéza a diferenciac buněk myeloidní a lymfoidní řady. Při AML dochází k maligní transformaci hematopoetické kmenové buňky a nekontrolovatelné tvorbě nezralých myeloidních prekurzorů. Modifikováno dle Betts et al. (2013)

Tento subtyp leukemie je označován jako akutní pro náhlý nástup symptomů a pokud není léčen, bývá fatální během týdnů až měsíců (Khwaja et al. 2016). AML je nejčastějším typem leukemie u dospělých (Nitika et al. 2022). V České republice je každý rok diagnostikováno několik stovek nových případů (Zatloukalová et al. 2021). I přesto, že incidence AML s věkem výrazně stoupá a průměrný věk, kdy je AML poprvé diagnostikována, je kolem 70 let (Juliusson et al. 2021), diagnóza AML není výjimkou ani u mladších pacientů (Döhner et al. 2015). Věk je jedním z významných faktorů, ovlivňujících nejen celkovou prognózu nemoci, ale také volbu léčebné strategie (Šálek 2012). I přes významné pokroky v léčebných přístupech, zůstává AML obtížně léčitelnou, s pouze asi 30 % pacientů přežívajících déle než 5 let (Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts).

3.2 Klinický obraz a diagnostika

Klinický obraz je pestrý a značně nespecifický. První příznaky nemoci mohou být souhrnně označeny jako „chřipkové příznaky“. Mezi tyto celkové nespecifické symptomy může být zahrnuta zvýšená únava, nevysvětlitelné hubnutí, subfebrilní teploty a noční pocení (Klener 2002). Specifické klinické příznaky se pak odvíjejí od nedostatečnosti myeloidních buněk kostní dřeně, a můžou tedy zahrnovat anémii z nedostatku erytrocytů, nebo zvýšenou krvácivost, způsobenou trombocytopenií. Nejzávažnějším příznakem bývají často se opakující infekce a nízká obranyschopnost, obojí způsobené nedostatečností granulocytů (Khwaja et al. 2016).

Většinu pacientů je AML diagnostikována vyšetřením krevního obrazu z plné krve s diferenciálním rozpočtem leukocytů a následně potvrzena vyšetřením vzorku kostní dřeně, při přítomnosti více než 20 % nezralých myeloblastů (Bulíková et al. 2013). Další vyšetření, určující typ a prognózu leukémie, dnes už běžně zahrnují imunofenotypizaci průtokovou cytometrií a cytogenetické molekulární vyšetření, které může odhalit mutace, a umožnit tak individualizovanou léčbu (Döhner et al. 2022). Některé z molekulárních markerů jsou pak využívány ke stanovení progresu léčby sledováním měřitelné reziduální nemoci (MRD) (Doubek a Mayer 2022).

3.3 Terapie

Cílem terapie je dostat nemoc pod kontrolu a pokud možno ji zcela eradikovat. Pomocí terapie, rozdělené do několika fází, je snaha dosáhnout co nejdělsí fáze remise a maximalizovat trvání odpovědi na léčbu (Döhner et al. 2022). V první fázi indukce je cílem dosáhnout kompletní remise (CR), po které následuje konsolidační fáze s cílem eradikovat zbytky nádorových buněk (Jimenez-Chillon et al. 2024). I když pacient dosáhne remise a testy neprokazují MRD, stále mu hrozí vysoké riziko relapsu, a je tedy vhodným kandidátem pro alogenní transplantaci kmenových hematopoetických buněk (HSCT). Pokud je tento zákrok pro pacienta příliš riskantní, je nemoc udržována pod kontrolou pomocí udržovací terapie (Doubek a Mayer 2022; Senapati et al. 2023).

3.3.1 Konvenční přístup

Hlavním léčebným přístupem stále zůstává chemoterapie. Pacientům, zvládajícím intenzivní terapii, je v indukční fázi podáván antracyklin (daunorubicin, idrubicin) a cytarabin v režimu „7+3“ (3 dny antracyklinu, následované 7 dny cytarabinu) (Tallman et al. 2005). Po dosažení CR je podáván cytarabin ve vysoké dávce (3 g/m²), nebo střední dávce (1-1,5 g/m²), následovaný HSCT, nebo udržovací terapií podle pacientova stavu a odpovědi na léčbu (Löwenberg 2013; Senapati et al. 2023).

Avšak pro značný počet pacientů je intenzivní terapie z různých důvodů nevhodná (věk ≥ 75 let, další komorbidita). Těm je podávána méně agresivní léčba zahrnující nízkodávkový cytarabin nebo hypometylující látky (azacytidin), v kombinaci s inhibítozem proteinu BCL-2 venetoklaxem (Döhner et al. 2022).

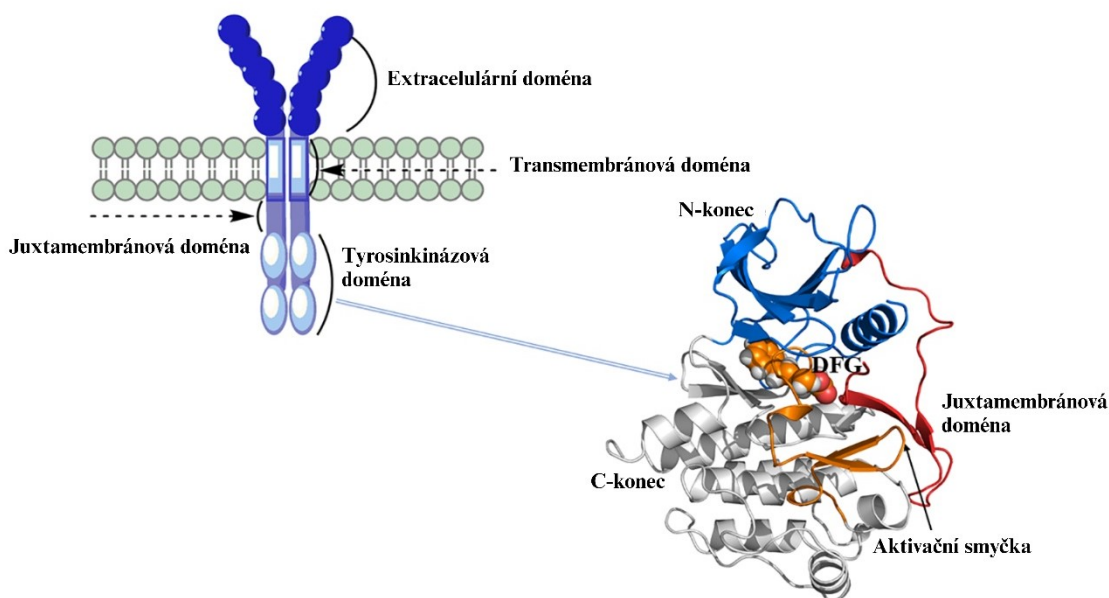
3.3.2 Cílená terapie

Především díky značnému posunu v oblasti diagnostických metod a možnosti detekovat genetické abnormality, se léčba AML za poslední desetiletí významně posunula směrem k cílené terapii, ze které profitují především pacienti, kteří jsou pro konvenční vysokodávkovou chemoterapii příliš křehcí (Andreozzi et al. 2022). Na rozdíl od klasické chemoterapie, jsou nové látky zacíleny na specifické cíle nádorových buněk, a díky čemuž je do jisté míry možno předcházet nežádoucím účinkům na buňky zdravé (Grafone et al. 2012). Předpokladem pro použití cílené léčby je analýza pacientova genomu a identifikace farmakologicky ovlivnitelných struktur (Shimony et al. 2023).

V poslední době bylo vyvinuto a uvedeno do praxe mnoho velmi slibných látek a další jsou v konečné fázi klinického testování. Mezi látky cílené léčby můžeme řadit, kromě již zmíněného venetoklaxu, IDH1/2 inhibitory (ivosidenib, enasidenib), nebo humanizovanou anti-CD33 protilátku s cytotoxickým činidlem gemtuzumab ozogamicin (Andreozzi et al. 2022). Dalším z velmi nadějných cílů se stal FLT-3 receptor, jehož mutace, asociované s horší prognózou, se objevují až u 30 % pacientů s AML a jsou významné pro proliferaci a diferenciaci leukemických buněk (Kiyoi et al. 2020).

3.4 FLT-3 receptor

FLT-3 (FMS-like tyrosin kináza 3) receptor je typ tyrosin kinázy, fyziologicky se nacházející primárně u hematopoetických kmenových buněk, ale také u časných myeloidních a lymfoidních progenitorů (Negotei et al. 2023). Skládá se ze čtyř částí (viz Obr. 2): Extracelulární domény, obsahující vazebné místo pro FLT-3 ligand (FL), transmembránové části, juxtamembránové domény a intracelulární tyrosinkinázové domény, zahrnující N-konec a C-konec a aktivační smyčku (A-smyčku), podílející se na fosforylaci receptoru (Grafone et al. 2012).



Obr. 2 Struktura FLT-3 receptoru. Modifikováno dle Wang et al. (2021)

Za normálních fyziologických podmínek je FLT-3 receptor udržován v inaktivní konformaci autoinhibiční doménou (A-smyčkou) a je aktivovaný pomocí FL, růstového faktoru, uvolňovaného z fibroblastů a dalších hematopoetických buněk v mikroprostředí kostní dřeně (Gilliland a Griffin 2002; Bystrom a Levis 2023). Po navázání FL na FLT-3 receptor dochází k jeho dimerizaci a aktivaci intracelulárních signalizačních kaskád PI3K, STAT5, a RAS, které pak ovlivňují proliferaci, diferenciaci a přežití krvetvorných buněk (Fedorov et al. 2023). Exprese FLT-3 receptoru je redukována, nebo potlačena v průběhu dozrávání buněk, avšak při AML je FLT-3 receptor na leukemických buňkách exprimován ještě v daleko vyšších množstvích (Gilliland a Griffin 2002; Negotei et al. 2023).

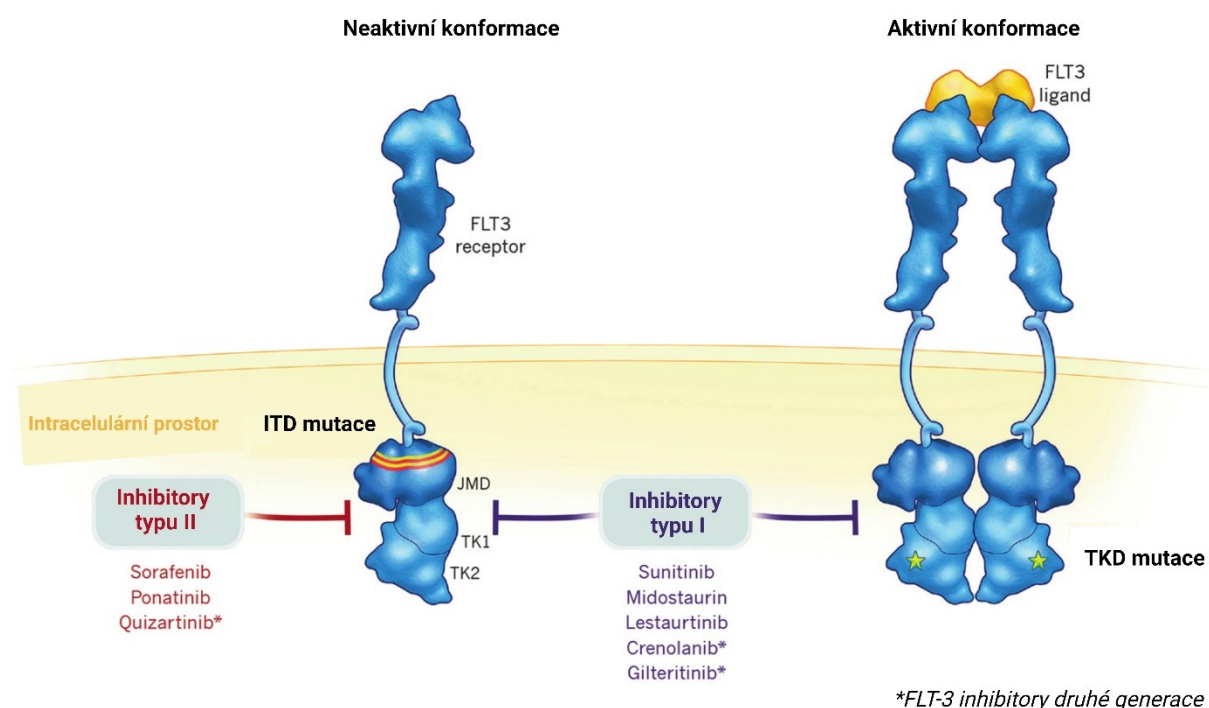
3.4.1 FLT-3 mutace

Až u 30 % nově diagnostikovaných pacientů s AML se vyskytují mutace genu pro FLT-3 receptor, které způsobují nepřetržitou aktivaci receptoru, nezávislou na přítomnosti FL, vedoucí ke zvýšené proliferaci, snížené apoptóze a diferenciaci buněk (Knight et al. 2022). Přítomnost FLT-3 mutací je spojována s horší prognózou, vyšším rizikem relapsu a kratší dobou celkového přežití (OS z angl. „overall survival“) (Fedorov et al. 2023). Nejčastěji se objevujícími typy jsou mutace ITD (interní tandemová duplikace) v autoinhibiční části juxtamembránové domény, vyskytující se asi u 20-25 % dospělých pacientů, a méně zastoupená (5-10 %) bodová mutace v A-smyčce tyrosinkinázové domény (TKD), které obě vedou k autofosforylaci receptoru, a tím k proliferaci a snížené diferenciaci maligních buněk (Kazi a Rönstrand 2019; Reikvam 2023).

3.5 FLT-3 inhibitory

FLT-3 inhibitory jsou malé molekuly schopné inhibovat mutovaný FLT-3 receptor interakcí v tyrosinkinázové doméně, a tím zastavit buněčnou proliferaci a navodit apoptózu (Wang et al. 2021). Podle specifity k FLT3 mohou být rozděleny do dvou generací: první generace zahrnuje multikinázové inhibitory midostaurin a sorafenib, které jsou značně nespecifické a interagují s dalšími cíli. Druhá generace, zahrnující například gilteritinib nebo quizartinib, vykazuje vyšší specifitu vůči FLT3, díky které je u ní očekávána nižší toxicita a menší riziko nežádoucích účinků (Nitika et al. 2022).

Dále můžeme rozdělit FLT-3 inhibitory podle mechanismu, jakým interagují s receptorem, do dvou typů (viz Obr. 3). Typ 1 se váže do místa vázajícího ATP, nezávisle na konformaci receptoru, zatímco typ 2 se váže do hydrofobního místa, které je přístupné pouze v jeho inaktivní konformaci (Nitika et al. 2022). Tím pádem FLT3 inhibitory typu 1 mohou být použity jak u FLT3-ITD, tak i FLT3-TKD mutace, avšak inhibitory typu 2 jsou účinné pouze u FLT3-ITD mutace (Daver et al. 2021).



Obr. 3 FLT-3 inhibitory typu 1 a 2. Inhibitory typu 1 se váží do vazebného místa pro ATP na receptor v aktivní i inaktivní konformaci. Inhibitory typu 2 se pak váží do hydrofobního místa receptoru v jeho neaktivní formě. ITD-interní tandemová duplikace, TKD-tyrosinkinázová doména

Modifikováno dle Daver et al. (2019)

3.5.1 FLT-3 inhibitory první generace

FLT-3 inhibitory první generace jsou multikinázové inhibitory. Jejich chybějící specifita k FLT-3 a schopnost ovlivňovat další tyrosinkinázové receptory (např. IT, PDGFR, VEGFR, RAS/RAF/MEK a JAK) vedou k nižší klinické účinnosti a vyššímu výskytu nežádoucích účinků (Daver et al. 2021).

Midostaurin je FLT-3 inhibitor 1. generace, používaný v terapii pacientů s nově diagnostikovanou AML s FLT3 mutací v kombinaci se standardní indukční a konsolidační chemoterapií, a následně jako udržovací monoterapie. Jeho účinnost byla potvrzena ve studii RATIFY, kde přidání midostaurinu k standardní indukční a konsolidační léčbě vedlo u pacientů s FLT-3 pozitivní AML k významnému prodloužení mediánu OS (Stone et al. 2017). Na základě výsledků této studie byl registrován v roce 2017 Evropskou lékovou agenturou (EMA) v indikacích AML s FLT-3 mutací a mastocytózou (CHMP 2017).

3.5.2 FLT-3 inhibitory druhé generace

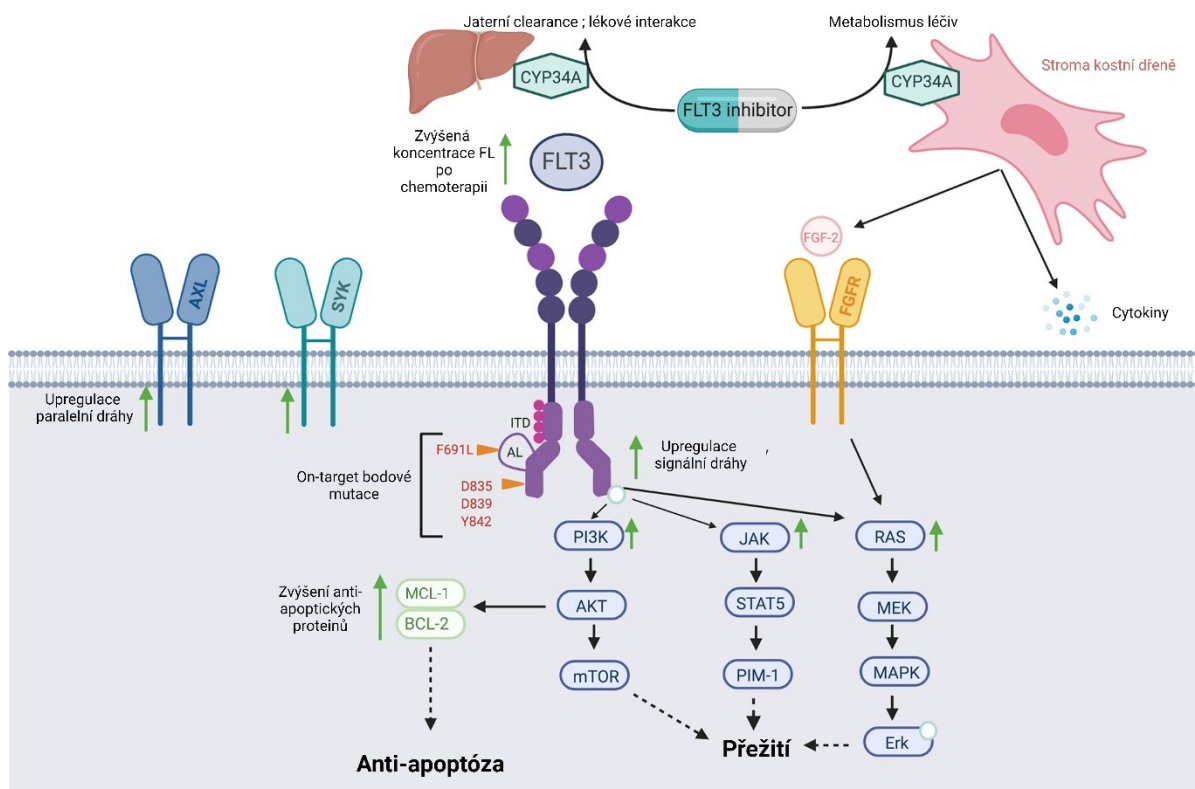
FLT-3 inhibitory druhé generace byly vyvinuty s důrazem na jejich vyšší specifitu vůči FLT3, delší poločas a vyšší účinnost (Daver et al. 2019). Mezi FLT-3 inhibitory 2. generace je řazen gilteritinib, quizartinib, crenolanib a mnoho dalších struktur, jejichž účinnost je právě hodnocena v klinických studiích různých fází (Kennedy a Smith 2020; Capelli et al. 2022).

Gilteritinib je selektivní FLT-3 inhibitor 2. generace, indikovaný jako monoterapie pro léčbu pacientů s relabujícím nebo refrakterním typem AML (R/R AML). Ve studii ADMIRAL prokázal signifikantní prodloužení OS těchto pacientů oproti záchranné terapii a na základě výsledků této studie byl v roce 2019 zaregistrován v EU (COMP 2019; Perl et al. 2019).

Nejnovější FLT-3 inhibitor **quizartinib**, který byl zaregistrován EMA teprve v roce 2023, byl uveden do terapie AML na základě výsledků klinické studie 3. fáze QuANTUM-First (Erba et al. 2022; COMP 2023). Je indikován v kombinaci se standardní indukční terapií „7+3“ s následnou konsolidační terapií cytarabinem a také jako udržovací monoterapie nově diagnostikovaných pacientů s FLT3+ AML (Research Center for Drug Evaluation 2023).

3.6 Rezistence vůči FLT-3 inhibitorům

Díky zavedení cílených FLT-3 inhibitorů do terapie AML bylo dosaženo významného prodloužení fáze bez relapsu a celkového přežití u pacientů, kteří měli v minulosti omezené možnosti terapie. I přes velký úspěch FLT-3 inhibitorů stále bývá odpověď na léčbu krátká a terapie neúspěšná, často z důvodu vznikající rezistence. Rezistence je často způsobena komplexními mechanismy, které mohou být rozděleny na primární, vyskytující se ještě před zahájením terapie, a sekundární, získané po expozici FLT3-inhibitory (Fedorov et al. 2023). Na Obr. 4 můžeme vidět shrnutí mechanismů vzniku jak primární, tak sekundární rezistence.



Obr. 4 Mechanismy primární a sekundární rezistence. Na primární rezistenci se může podílet mikroprostředí kostní dřeně, zvýšená hladina FL, aktivace anti-apoptických proteinů nebo zvýšená degradace léčiva pomocí CYP3A4. Mechanismy vzniku sekundární rezistence zahrnují druhotné mutace FLT-3 receptoru a také aktivující mutace v proteinech signálních drah. AXL – AXL tyrosin kináza, SYK – slezinová (spleen) tyrosin kináza, CYP3A4 – cytochrom P450 3A4, FLT-3 – FMS like tyrosin kináza, FL – FLT3 ligand, FGFR - receptor pro fibroblastový růstový faktor, FGF2 - fibroblastový růstový faktor 2, MCL-1 – protein buněk myeloidní leukemie 1, BCL-2 – protein lymfomu B-buněk 2, ITD – interní tandemová duplikace, AL – aktivační smyčka, PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza, AKT – protein kináza B, mTOR – savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin), JAK – Janusova kináza, STAT – přenašeč signálu a aktivátor transkripce, PIM-1 – protein kináza pim-1, RAS – protein viru krysího sarkomu (rat sarcoma virus), MEK – kináza aktivující MAPK, MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza, Erk – extracelulárně regulovaná kináza

Modifikováno dle Kennedy a Smith (2020)

3.6.1 Mechanismy vzniku primární rezistence

Na vzniku primární (vrozené) rezistence může mít podíl cytostatiky navozené zvýšení plazmatické hladiny FL, který aktivuje FLT-3 *wt* (*wild-type*) receptor, vyskytující se ve zvýšené míře u leukemických buněk, anebo aktivace anti-apoptotických proteinů BCL-2 a MCL-1 (Kennedy a Smith 2020). Také mikroprostředí kostní dřeně může chránit leukemické buňky a přispívat k rozvoji rezistence. Buňky kostní dřeně mohou, nezávisle na receptoru FLT-3, aktivovat signální dráhu RAS/MAPK zvýšenou sekrecí FGF2 (fibroblast growth factor 2) (Traer et al. 2016). Mezi mechanismy rezistence může být dále zahrnuta zvýšená degradace léčiva pomocí CYP3A4, který bývá ve vyšší míře exprimován také buňkami kostní dřeně (Chang et al. 2017).

3.6.2 Mechanismy vzniku sekundární rezistence

Mechanismy sekundární rezistence můžou být rozděleny na „on-target“, související s druhotnými mutacemi FLT-3 receptoru a „off-target“, kdy se leukemická buňka stává závislá na jiných signálních drahách (Kiyoi et al. 2020).

- **On-target**

U pacientů, léčených FLT-3 inhibitory, bylo objeveno mnoho sekundárních mutací genu pro FLT3 v místě aktivační smyčky (především F691, D835, Y842 a E608), které ovlivňují konformaci receptoru a znemožňují vazbu inhibitoru v TKD (Daver et al. 2015). Byly popsány u inhibitorů typu 2 (quizartinib, sorafenib), které inhibují pouze FLT3-ITD, avšak mutace F691L byla objevena také u gilteritinibu a crenolanibu (Gebru a Wang 2020). Nově vzniklé mutace se objevují právě v místě tyrosinkinázové domény, a aktivují tak receptor i přes inhibici v ITD (Eguchi et al. 2020).

- **Off-target**

Tyto mechanismy byly popsány u pacientů léčených inhibitory typu 1 (gilteritinib, crenolanib), které dokáží inhibovat bodové mutace v TKD. Zahrnují mutace v proteinech signálních drah (např. RAS/MAPK), které vedou k její zvýšené aktivaci, dále v epigenetických regulátorech, nebo myeloidních transkripčních faktorech (Kiyoi et al. 2020). I při použití inhibitorů typu 1 se projevuje „on-target“ rezistence vznikem bodových mutací genu pro FLT3, které jsou však umlčeny působením inhibitoru, a nemají tak transformační účinky (McMahon et al. 2019).

Způsoby, kterými se odborníci snaží proti vznikající rezistenci bojovat, mohou zahrnovat zkvalitnění genetické diagnostiky a nastavení léčby zohledňující výskyt mutantních klonů nebo kombinační terapii látkami působícími různými mechanismy na inhibici proliferace maligních buněk (Daver et al. 2019). K potlačení „on-target“ rezistence je zapotřebí vyvíjet nové látky s obměněnou strukturou, schopné selektivně inhibovat FLT-3 receptor a bojovat tak především proti sekundární rezistenci (Ge et al. 2022).

4 CÍLE PRÁCE

Tato práce měla dva dílčí cíle. Prvním bylo otestovat cytotoxicitu 8 nově syntetizovaných sloučenin (DS-2, DS-3, DS-13, DS-14, DS-28, LG-1871, LG-1872, LG-2022) pomocí metody MTT na leukemických buněčných liniích MV4-11 (exprimující mutovaný FLT-3 receptor) a kontrolní THP-1 (exprimující *wt* FLT-3 receptor) a zhodnotit jejich cytostatický potenciál jako FLT-3 inhibitorů. Tyto nové potenciální FLT-3 inhibitory byly syntetizovány v rámci vědecké spolupráce v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Za druhý dílčí cíl měla tato práce prozkoumat efekt těchto sloučenin u linie rezistentní vůči gilteritinibu. Byla využita gilteritinib-rezistentní linie HL-60 g75 a gilteritinib-senzitivní linie HL-60 *wt* sloužila jako její kontrola.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemikálie

- Trypanová modř, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- FBS (Fetal Bovine Serum), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Gilteritinib, MedChemExpress (Monmouth Junction, USA)
- Sloučeniny DS-2, DS-3, DS-13, DS-14, DS-28, LG-1871, LG-1872 a LG-2022, Centrum biomedicínského výzkumu FN HK (Hradec Králové, Česká republika)
- RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- Isopropyl alcohol, Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková, Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika)

5.2 Přístroje

- Laminární box Jouan MSC 12, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Centrifuga Boeco C-28-Boeckel (Německo)
- Čtečka mikrodestiček Hidex Sense, Hidex Oy (Turku, Finsko)
- Inkubátor, Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Německo)
- Automatizovaná počítačka buněk Bio-Rad TC20TM, Bio-Rad Laboratoies (Hercules, USA)
- Vortex V1 plus, Biosan (Riga, Lotyšsko)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer Comfort (Hamburk, Německo)
- Lázeň, PolyScience (Niles, USA)

5.3 Buněčné linie

Pro tuto práci byly využívány komerčně dostupné leukemické buněčné linie různého charakteru. Buněčná linie nazvaná THP-1 byla získána z buněčné banky DSMZ v Německu. Původně byla izolovaná z periferní krve pacienta s AML s podtypem M5, je charakterizovaná jako fenotyp $CD34^+ CD38^-$, a nevykazuje FLT-3 mutaci. Kultivovaná byla v médiu RPMI-1640 s přídavkem 10 % FBS.

Buněčná linie MV4-11 byla získána z buněčné banky ATCC v USA. Taktéž se jedná o leukemickou linii vzniklou z periferní krve pacienta trpícího AML s podtypem M5, na rozdíl od THP-1 však vykazuje mutaci FLT-3 ITD. Kultivovaná byla v médiu IMDM s přídavkem 10 % FBS a 4mM L-glutaminu.

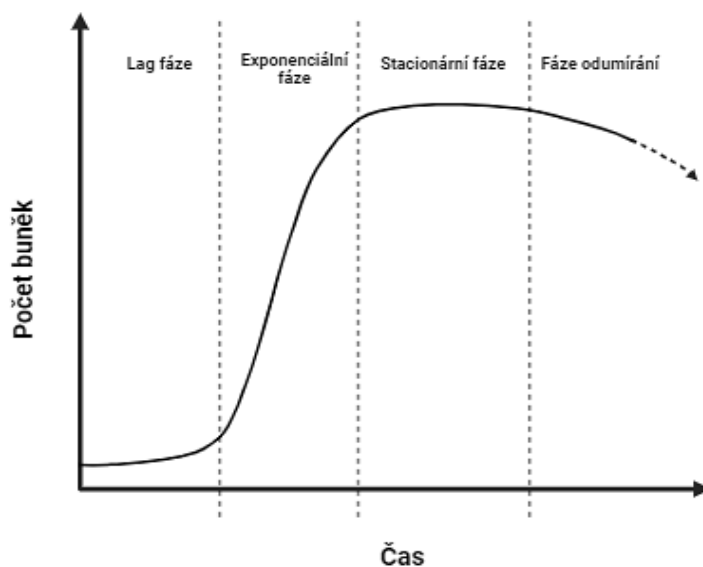
Další buněčnou linií, použitou v následujících experimentech, byla HL-60 *wt*. Jedná se o linii leukemických buněk izolovaných z periferní krve pacienta s APL s podtypem M3. Buňky byly poskytnuty dr. Balaszem Sakardim z Maďarské akademie věd v Budapešti. Tyto byly kultivované v médiu RPMI-1640 s přídavkem 10 % FBS. Linie HL-60 *g75*, rezistentní vůči gilteritinibu, byla generována v naší laboratoři dlouhodobou kultivací buněk HL-60 *wt* v médiu RPMI-1640 s 10 % FBS a postupným zvyšováním přídavku gilteritinibu až na cílovou koncentraci 1,8 μM , při které buňky dosahovaly statisticky významné rezistence (rezistenční faktor $R > 3$).

Všechny buněčné linie byly pasážovány při denzitě $1 \cdot 10^6$ - $2,5 \cdot 10^6$ buněk/ml, viabilitě alespoň 90 % a kultivovány za standartních kultivačních podmínek (37 °C, 5 % CO_2). Pro pokus byly použity buňky v pasáži 8-22.

5.4 Optimalizace nasazovací hustoty buněk

5.4.1 Princip

Jedním z důležitých faktorů, ovlivňujících správnost a reprodukovatelnost výsledků *in vitro* experimentů, je buněčná koncentrace. Proto musela být nejprve stanovena optimální nasazovací hustota suspenze každé z buněčných linií pomocí série MTT testů, tzv. seeding density tests (Moradi 2018). Díky těmto testům může být stanoven počet buněk, který má být nasazen do jamek na počátku experimentu, aby se buňky v čase experimentu (48 hodin po výsevu) stále nacházely v tzv. log (exponenciální) fázi růstové křivky (viz Obr. 5). Exponenciální část této křivky udává rozmezí nejbujnějšího růstu kolonie, který je pro provedení experimentu ideální (Kočárek et al. 2010).



Obr. 5 Růstová křivka buněčné kultury, popisující charakteristický průběh růstu buněčné kultury. Pro provedení experimentu je nejvhodnější exponenciální fáze růstu, kdy počet buněk exponenciálně roste a jejich metabolismus je nejefektivnější. Vytvořeno pomocí BioRender.com

Pro tento test byly nasazeny buňky na 96jamkovou destičku v koncentrační řadě (25 000 buněk/jamku až 150 000 buněk/jamku) a po 48hodinové inkubaci podrobeny MTT testu za stejných podmínek, jako u následujících testů s potenciálními FLT-3 inhibitory. Po vyhodnocení výsledků byla sestrojena křivka růstu, podle které byl pro všechny buněčné linie určen optimální počet buněk k počátečnímu nasazení.

5.4.2 Postup

Nejprve byl zjištěn aktuální počet buněk v kultuře pomocí automatizované počítačky buněk Bio-Rad TC20TM-Bio-Rad Laboratories za použití trypanové modři, zároveň byla zjištěna i viabilita buněčné kultury. Požadovaný objem buněčné suspenze byl stočen na centrifuze Boeco C-28 Boeckel (150 g, 5 min, 25 °C), supernatant byl odsát a buněčná peleta resuspendována v čerstvém médiu.

Na 96jamkovou destičku byly nasazeny buňky v požadovaném počtu a jamky byly doplněny médiem tak, aby výsledná koncentrace buněk rostla v koncentrační řadě od 25 000 buněk/jamku až po 80 000 buněk/jamku (ve druhé sérii 70 000 buněk/jamku až 150 000 buněk/jamku) a konečný celkový objem suspenze v každé jamce činil 150 μ l. Čtyři jamky, obsahující 150 μ l média bez buněk, sloužily jako negativní kontrola, dokazující čistotu použitého média. Ostatní jamky po obvodu byly naplněny 150 μ l PBS k zajištění konstantních podmínek inkubace. Takto připravené destičky byly inkubovány po dobu 48 hodin za standardních kultivačních podmínek (37 °C/ 5 % CO₂) a dále podrobeny MTT testu podle protokolu popsaného níže.

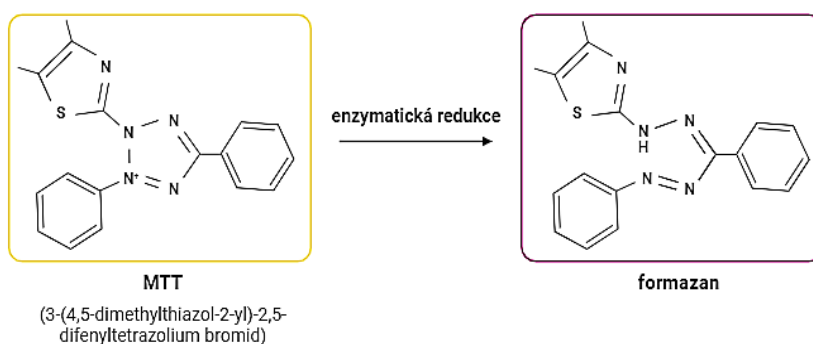
Po vyhodnocení výsledků měření byla pro každou linii sestrojena křivka růstu. Optimální iniciální nasazovací hustota byla stanovena tak, aby se v čase experimentu (48 hodin po nasazení) buňky nacházely právě v exponenciální fázi růstu, kdy počet buněk rapidně roste a jejich metabolismus je nejefektivnější. Podle výsledků testu nasazovací hustoty byla koncentrace buněk linií MV4-11 a THP-1 stanovena na 35 000 buněk na jamku, pro HL-60 *wt* byla dána optimální koncentrace 50 000 buněk na jamku a pro HL-60 *g75* pak 70 000 buněk na jamku.

5.5 MTT test

5.5.1 Princip

MTT test je používán mimo jiné ke stanovení metabolické aktivity buněk, a může tak sloužit jako indikátor jejich proliferace a viability (Ghasemi et al. 2021). V našem případě byl využit ke zjištění cytotoxického potenciálu nových sloučenin stanovením hodnoty IC_{50} , tedy poloviční maximální inhibiční koncentrace. Jedná se o hodnotu, která udává koncentraci látky potřebnou k inhibici daného biologického procesu o 50 % (Aykul a Martinez-Hackert 2016).

MTT test je založen na reakci sloučeniny MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) probíhající pomocí enzymů NAD(P)H-dependentních oxidoreduktáz. Princip této kolorimetrické reakce spočívá v redukci žlutě zbarvené tetrazoliové soli na fialově zbarvený produkt formazan (viz Obr. 6). Základem pro tento test je fakt, že formazan, ve formě krystalků, je produkován pouze životaschopnými buňkami, a tak intenzita fialového zbarvení po rozpuštění formazanových krystalků v organickém rozpouštědle koreluje s počtem a metabolickou aktivitou daných buněk, zatímco prostředí, obsahující mrtvé buňky bez enzymatické aktivity, je zbarvené do žluta (Ghasemi et al. 2021). Díky tomu mohou být výsledky této reakce vyhodnoceny pomocí spektrofotometru.

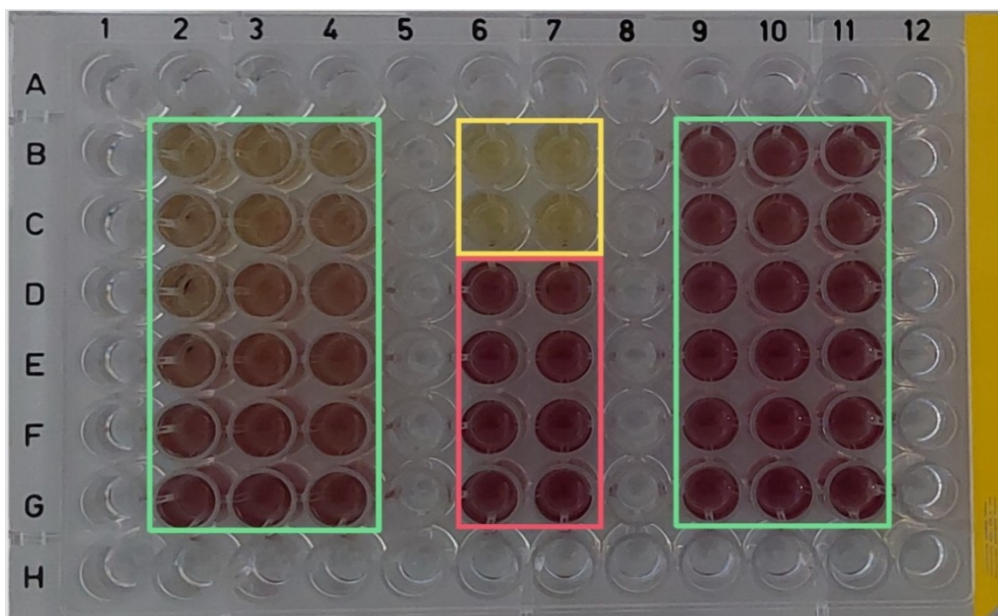


Obr. 6 Schéma enzymatické redukce žlutě zbarveného MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid) na fialově zbarvený formazan. Vytvořeno pomocí BioRender.com

5.5.2 Postup

Den před plánovaným experimentem byly buňky překultivovány do čerstvého média. U gilteritinib-rezistentní linie HL-60 g75 byl přídavek gilteritinibu vynechán, aby jeho vlivem nedošlo ke zkreslení výsledků. V první sérii experimentů bylo na buněčných liniích THP-1 a MV4-11 otestováno všech 8 látek v koncentracích 1 μM a 10 μM . Ve druhé sérii byly testovány 4 látky s největším cytostatickým potenciálem v koncentrační řadě zahrnující 12 koncentrací od 0,116 μM do 10 μM . Tyto čtyři látky byly dále podrobeny dalšímu testování v koncentracích 1 μM , 10 μM a 50 μM , za účelem porovnání jejich cytostatického působení na buňky gilteritinib-rezistentní linie HL-60 g75 a kontrolní *wild-type* (vůči gilteritinibu senzitivní) linie HL-60 *wt*.

96jamková destička byla rozčleněna na 4 jamky, obsahující 150 μl daného média, které sloužily jako negativní kontrola; 8 jamek pozitivní kontroly, obsahující 150 μl buněčné suspenze v požadované koncentraci; a jamky, ve kterých byly buňky vystaveny působení zkoumané sloučeniny (viz Obr. 7). Buňky byly nasazeny v požadovaném počtu (viz výsledky nasazovací hustoty) do testových jamek a byl k nim přidán roztok testované látky v dané finální koncentraci. Jamky byly doplněny médiem, aby konečný objem před kultivací byl 150 μl v každé jamce. Do jamek po obvodu bylo přidáno 150 μl PBS, pro předejití nadměrné evaporace. Takto připravené destičky byly 48 hodin inkubovány za standartních kultivačních podmínek (37 °C/ 5 % CO₂).



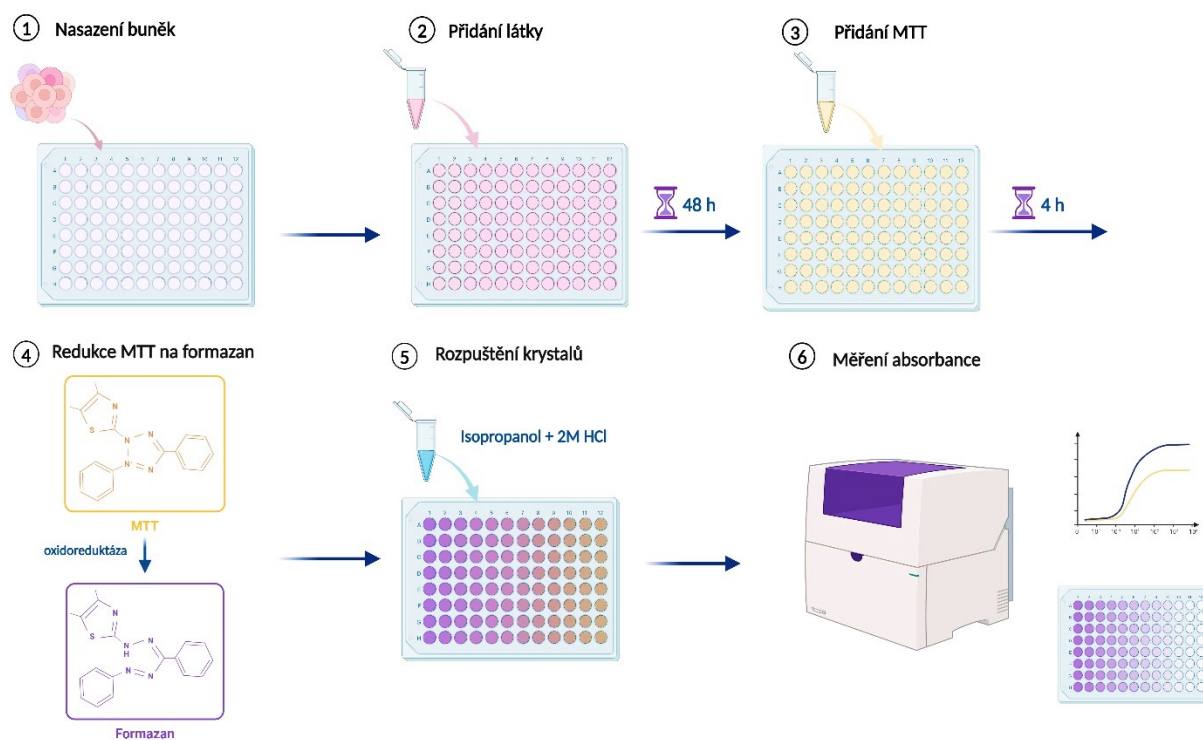
Obr. 7 Vzorový příklad rozdělení destičky použité pro MTT test. Na zobrazené 96jamkové destičce jsou žlutě znázorněny jamky tzv. negativní kontroly obsahující pouze dané médium bez buněk, červená pak označuje jamky s pozitivní kontrolou (buňky suspendované v médiu). Zelená znázorňuje jamky, ve kterých byly buňky vystavené působení testované látky ve dvanácti postupně se snižujících koncentracích. Jamky B2-4 obsahovaly látku v nejvyšší koncentraci, jamky G9-11 pak koncentraci nejnižší. Ostatní jamky byly naplněny PBS.

Po inkubační periodě bylo do všech jamek, kromě těch s PBS, přidáno 15 μ l roztoku MTT (5 mg/ml), který je (stejně jako produkt formazan) fotosenzitivní, a proto celý další postup pokračoval bez přístupu přímého světla (Li a Song 2007). Obsah destiček byl promíchán na třepačce Eppendorf Thermomixer comfort po dobu 5 minut (300 rpm, 37 °C), aby došlo k rovnoměrné distribuci buněk v suspenzi, a bylo tak umožněno jejich interakci s činidlem. Poté byly buňky znovu inkubovány za standardních podmínek (37 °C/ 5 % CO₂) po dobu 4 hodin.

K ukončení reakce bylo přidáno organické rozpouštědlo (isopropanol + 2M HCl), čímž došlo k lýze buněčné membrány a vyplavení krystalů formazanu. Ty jsou ve vodném prostředí nerozpustné, v přítomnosti organického rozpouštědla se však rozpouští velmi snadno. V tomto experimentu bylo použito 150 μ l isopropanolu, předem okyseleného 2M HCl, který se jeví jako vhodný, především díky vysoké stabilitě vzniklého roztoku (Stevens et al. 1991). Úpravou pH pomocí kyseliny chlorovodíkové, a převedením tak červené formy fenolové červeně (obsažené v kultivačních médiích) na žlutou formu, která již nevykazuje absorpenci při inkriminované

vlnové délce, bylo omezeno zkreslení výsledků měření interferencí absorbance fenolové červeně s absorbcí formazanu (Mosmann 1983). Obsah jamek byl důkladně promíchán, aby došlo k dokonalému zhomogenizování roztoku.

Pro zajištění kompletního rozpuštění všech krystalů byl vzorek ponechán 8-12 minut při pokojové teplotě. Poté byla změřena absorbance při vlnových délkách 570 nm (peak absorbance formazanu) a 720 nm (referenční absorbance) na multidetekčním destičkovém systému Hidex Sense Microplate Reader. Jednotlivé kroky MTT schematicky znázorňuje Obr. 8.



Obr. 8 Schéma MTT testu. Po nasazení buněk na 96jankovou destičku je přidána testovaná látka. Po 48 hodinách je přidáno činidlo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-2H-tetrazolium bromid). V inkubační periodě 4 hodin proběhne reakce pomocí redukčních enzymů a vzniká produkt formazan ve formě krystalků. Přidáním okyseleného isopropanolu dochází k ukončení reakce, lýze buněk a vyplavení krystalů, které jsou záhy v isopropanolu rozpuštěny na homogenní roztok, který může být vyhodnocen pomocí spektrofotometru. Vytvořeno pomocí BioRender.com

5.6 Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické zpracování dat a jejich grafické znázornění byl využit program GraphPad Prism 10. Stanovení hodnot IC_{50} a 95 % konfidenčních intervalů bylo provedeno pomocí modelu variable slope. Pro porovnání účinku látek na rezistentní a nerezistentní buňky byl využit nepárový t-test. Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou $p \leq 0,05$. Všechna prezentovaná data vyjadřují průměr 3 nezávislých experimentů, provedených v triplikátu, \pm směrodatná odchylka.

6 VÝSLEDKY

6.1 Optimalizace nasazovací hustoty

Pro každou buněčnou linii byla nejprve stanovena optimální počáteční nasazovací hustota buněk. Z výsledků těchto tzv. seeding density testů byla sestavena křivka růstu pro každou buněčnou linii pomocí kterých bylo možno určit ideální počet buněk k nasazení, aby se v čase experimentu (48 h) nacházely v optimální exponenciální fázi růstu. Finální hodnoty, použité pro další MTT testy, jsou seřazené v Tab. 1.

Tab. 1 Optimální počáteční nasazovací hustota

Buněčná linie	Médium	Počet buněk na jamku
THP-1	RPMI-1640 + 10 % FBS	35 000
MV4-11	IMDM + 10 % FBS a 4mM L-glutamin	35 000
HL-60 wt	RPMI-1640 +10 % FBS	50 000
HL-60 g75	RPMI-1640 +1,8 μ M gilteritinib	75 000

6.2 První set MTT

V první řadě experimentů byly látky testovány na liniích THP-1 a MV4-11 v koncentraci 1 μM a 10 μM . Po provedení MTT testu a změření hodnot absorbance, byla použita rovnice (Rovnice 1) pomocí které byly stanoveny procentuální hodnoty růstu buněčných linií THP-1 (Tab. 2) a MV4-11 (Tab. 3).

Rovnice 1 Výpočet procentuálního růstu buněk

$$x(\%) = 100 \times \frac{A_{570} - A_{720} - A_{Bl}}{A_{Cl}}$$

X je procentuální vyjádření růstu buněk, $A_{570/720}$ jsou hodnoty absorbance při vlnových délkách 570 a 720, A_{Bl} je průměrná hodnota absorbance jamek negativní kontroly (médiu bez buněk) a A_{Cl} je průměrná hodnota absorbance kontrolních jamek (buňky v médiu).

Tab. 2 Výsledky první série MTT experimentů látek v koncentraci 1 μM a 10 μM na linii THP-1

THP-1				
Sloučenina	1 μM		10 μM	
	Růst v %	St. Odchylka (%)	Růst v %	St. Odchylka (%)
DS-2	97,59	2,989	73,61	1,006
DS-3	97,92	8,387	83,93	4,803
DS-13	101,1	4,369	100,2	4,261
DS-14	100,2	9,008	94,10	7,219
LG 1871	89,18	12,47	68,21	7,978
LG 1872	95,78	5,050	93,09	12,93
LG 2022	103,5	2,917	105,5	3,252
DS-28	107,9	3,362	62,38	2,856

Tab. 3 Výsledky první série MTT experimentů látek v koncentraci 1 μM a 10 μM na linii MV4-11

MV4-11				
Sloučenina	1 μM		10 μM	
	Růst v %	St. Odchylka (%)	Růst v %	St. Odchylka (%)
DS-2	50,17	2,833	2,444	0,6704
DS-3	76,81	2,018	15,00	0,8740
DS-13	86,94	2,011	29,68	2,403
DS-14	100,7	7,513	85,13	8,698
LG 1871	49,69	1,998	7,303	0,7012
LG 1872	102,1	1,919	58,77	4,249
LG 2022	101,1	2,887	71,44	5,003
DS-28	16,89	2,030	5,773	0,9706

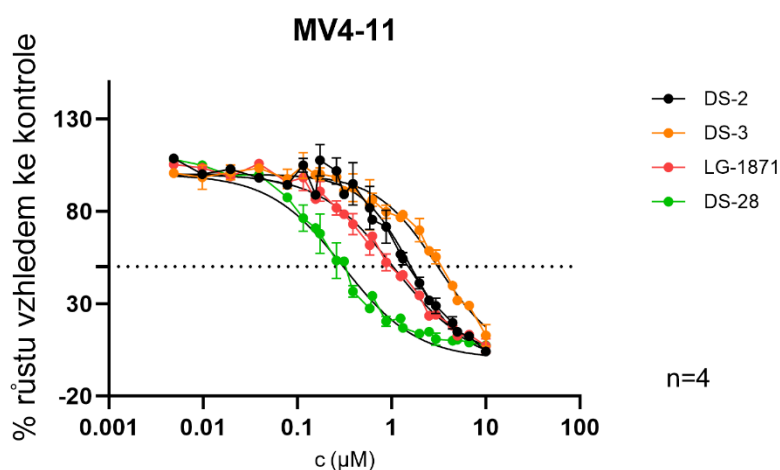
6.3 Druhý set MTT

Pro druhou sérii MTT testů byly vybrány sloučeniny s největším inhibičním efektem na proliferaci buněčné linie MV4-11, tedy DS-2, DS-28 a LG-1871, které v koncentraci 1 μM inhibovaly růst linie MV4-11 o více než 50 %, a také DS-3, která byla sice v koncentraci 1 μM byla méně účinná, ale vykazovala výraznou inhibici v 10 μM koncentraci, a naznačovala tak, že by se její hodnota IC_{50} mohla nacházet kolem 1 μM . Tyto látky byly podrobeny druhé sérii MTT testů v koncentračním gradientu (10 μM až 0,116 μM). Následným sestrojením grafů (Obr. 9, Obr. 10) byla pro jednotlivé látky zjištěna hodnota IC_{50} (viz Tab. 4), udávající poloviční maximální inhibiční koncentraci látky. Dále byla porovnána specifita látek k FLT-3 pomocí indexu specifity (IS), který byl vypočítán pomocí následující rovnice (Rovnice 2).

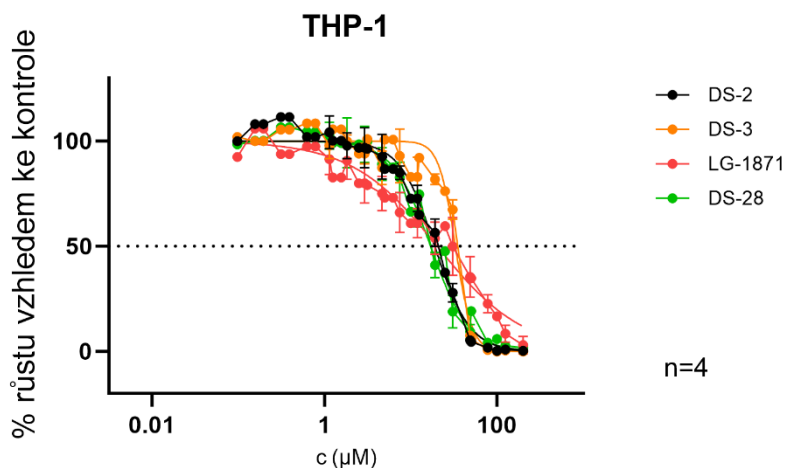
Rovnice 2 Výpočet IS (indexu specifity)

$$\text{IS} = \text{IC}_{50}(\text{THP-1}) / \text{IC}_{50}(\text{MV4-11})$$

Čím vyšší je hodnota IS, tím více látka inhibuje proliferaci buněk nesoucí mutovaný FLT-3 receptor, a je tedy méně cytotoxická pro buňky bez mutace FLT-3 receptoru. Nejvyšší inhibiční potenciál pro linii MV4-11, a zároveň nejvyšší specifitu, vykazuje látka s pracovním názvem DS-28 s $\text{IC}_{50} = 0,307 \mu\text{M}$ (CI 95 % = 0,2779 – 0,3386 μM) a IS = 55,3.



Obr. 9 Graf znázorňující závislost buněčného růstu linie MV4-11 na koncentraci daných látek. Přímkou protínající růstovou křivku v hodnotě 50 % růstu udává hodnoty IC_{50} .



Obr. 10 Graf znázorňující závislost buněčného růstu linie THP-1 na koncentraci daných látek. Přímka protínající růstovou křivku v hodnotě 50 % růstu udává hodnoty IC_{50} .

Tab. 4 Hodnoty IC_{50} vybraných látek s 95 % rozmezí intervalu spolehlivosti (CI) a indexem specifity (IS)

Sloučenina	MV4-11		THP-1		IS
	Hodnota IC_{50} (μM)	CI 95 % (μM)	Hodnota IC_{50} (μM)	CI 95 % (μM)	
DS-2	1,600	1,463-1,752	18,95	17,65-20,33	11,8
DS-3	3,098	2,861-3,355	32,92	30,41-35,36	10,6
DS-28	0,307	0,2779-0,3386	16,97	15,70-18,35	55,3
LG-1871	1,039	0,9717-1,110	20,28	17,30-23,75	19,5

6.4 Efekt na rezistentní buněčnou linii

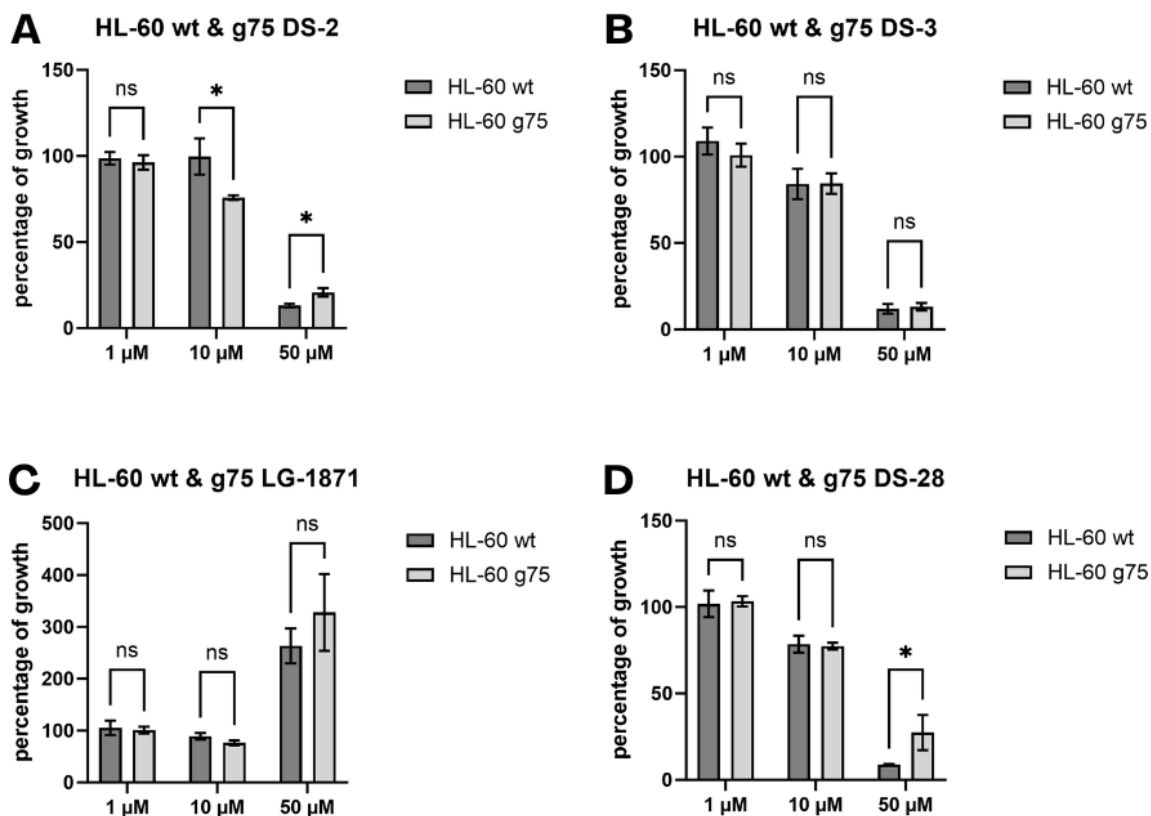
Po zjištění účinnosti na leukemické buněčné linie, exprimující FLT-3 receptor, a stanovení hodnot IC_{50} , byly čtyři nejúčinnější látky dále otestovány na gilteritinib-rezistentní linii HL-60 g75 v koncentracích 1 μM, 10 μM a 50 μM. Jako kontrola sloužila nerezistentní linie HL-60 wt. Hodnoty růstu linií v procentech shrnuje Tab. 5 a Tab. 6 a také grafy A, B, C a D (Obr. 11).

Tab. 5 Procentuální růst linií HL-60 g75 se standartními odchylkami

HL-60 g75						
Sloučenina	1 μ M		10 μ M		50 μ M	
	Růst v %	St. odchylka (%)	Růst v %	St. odchylka (%)	Růst v %	St. odchylka (%)
DS-2	96,23	3,431	75,79	1,147	20,74	1,986
DS-3	106,21	8,270	84,39	4,883	13,08	1,786
DS-28	103,31	2,468	77,44	1,584	27,42	8,326
LG-1871	100,87	5,469	76,38	3,945	327,9	60,36

Tab. 6 Procentuální růst linií HL-60 wt se standartními odchylkami

HL-60 wt						
Sloučenina	1 μ M		10 μ M		50 μ M	
	Růst v %	St. odchylka (%)	Růst v %	St. odchylka (%)	Růst v %	St. odchylka (%)
DS-2	98,64	3,018	99,68	8,535	13,11	0,8988
DS-3	109,0	6,385	84,17	7,124	11,94	2,258
DS-28	101,8	6,282	78,56	3,942	8,820	0,3171
LG-1871	105,5	11,31	89,13	5,251	263,5	27,71



Obr. 11 Grafy znázorňující závislost buněčného růstu linií HL-60 *wt* a HL-60 *g75* na koncentraci testovaných látek. Graf A pro DS-2, graf B pro DS-3, graf C pro LG-1871, graf D pro DS-28.

*-statisticky významný ($p \leq 0,05$), ns-nesignifikantní

V 1 μM a 10 μM koncentraci nebyl pozorován výrazný rozdíl v proliferaci rezistentních a nerezistentních buněk. Určitý efekt u rezistentní linie vykazovala látka DS-2, avšak v 50 μM koncentraci prokázala podobný efekt jako gilteritinib: tedy omezenou inhibici rezistentní linie (viz Obr. 11 graf A). Stejný efekt byl pozorován i u látky DS-28 (viz Obr. 11 graf D). Látka DS-3 (Obr. 11 graf B) v nejvyšší koncentraci však prokázala srovnatelnou inhibici rezistentní i nerezistentní linie, což by mohlo naznačovat její možný potenciál k překonání rezistence.

Z grafu C (Obr. 11) je patrné, že u látky LG-1871 v koncentraci 50 μM byla změřena absorbance, která zdánlivě odpovídá 200–300 % růstu oproti kontrole. Tato situace mohla nastat z důvodu nadměrného dělení buněk, nebo extenzivní stimulace mitochondriálních enzymů. Proto byl před provedením experimentu stanoven počet buněk v jamkách s LG-1871 v 50 μM koncentraci a porovnán s počtem buněk v kontrolních jamkách. Porovnání počtu buněk shrnuje Tab. 7, kde je zřejmé, že látka buněčnou proliferaci inhibovala. Tento neobvyklý efekt tak může být přisuzován stimulaci mitochondriálních enzymů a prozatím je ponechán dalšímu hodnocení.

Tab. 7 Počet buněk po inkubaci s LG-1871 a kontroly

Buněčná linie	Počet buněk v jamce s LG-1871	Počet buněk v kontrolní jamce
HL-60 wt	0,351*10 ⁶ /ml	1,138*10 ⁶ /ml
HL-60 g75	0,427*10 ⁶ /ml	0,709*10 ⁶ /ml

7 DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo otestovat nově syntetizované sloučeniny, jsou-li schopné inhibovat růst AML buněčných linií prostřednictvím inhibice FLT-3 receptor a pokud ano, s jakou specifitou k buňkám exprimujícím mutovaný FLT3 receptor oproti buňkám bez mutace. Jako modelová AML linie, exprimující mutovaný FLT-3 receptor, byla použita linie MV4-11, jako její kontrola pak sloužila linie THP-1 s *wild-type* variantou FLT-3 receptoru. Výsledky 48hodinové viabilitní studie MTT prokázaly u látek DS-2, DS-3, DS-28 a LG-1871 významnější toxicitu u buněk s mutací FLT-3, než bez mutace. Pouze sloučenina DS-28 s hodnotou $IC_{50}=0,307 \mu\text{M}$ (CI 95 %= $0,2779-0,3386 \mu\text{M}$) se přiblížila terapeutickým plazmatickým hladinám v současné době používaných FLT3 inhibitorů, pohybujících se v desítkách až stovkách nanomolů (James et al. 2020; Kang et al. 2021; Wiesen et al. 2024) a zároveň prokázala nejvyšší specifitu (IS=55,3) vůči FLT-3 mutovaným buňkám. Ostatní námi zkoumané látky inhibovaly FLT-3 receptor ve vyšších koncentracích v porovnání s FLT-3 inhibitory, využívanými v klinické praxi (Lee et al. 2017; Aikawa et al. 2020). Sloučenina DS-28 však prokázala vysokou účinnost i v nízké koncentraci, a představuje tak velmi nadějnou molekulu, jejíž struktura může posloužit také jako předloha dalších, ještě účinnějších FLT-3 inhibitorů.

Průměrná doba přežití pacientů s AML se za poslední desetiletí podstatně prodloužila, především díky individualizaci léčby a rozvoji cílené terapie (Andreozzi et al. 2022). Účinné FLT-3 inhibitory dosahují v praxi významných výsledků, avšak trvání léčebné odpovědi je limitováno vznikem především sekundární rezistence, která má za následek selhání terapie a relapsu nemoci (Capelli et al. 2022). Po stanovení inhibičního potenciálu zkoumaných látek na leukemické buněčné linie bylo druhým cílem této práce porovnat jejich efekt u buněčné linie rezistentní vůči gilteritinibu.

Studie prokázaly různé mechanismy vzniku rezistence vůči FLT-3 inhibitorům využívaných v praxi (Eguchi et al. 2020). U midostaurinu a gilteritinibu, tedy inhibitorů typu I, dochází ke vzniku rezistence především zvýšením aktivace RAS/MAPK signální dráhy, výskytem aktivujících mutací v proteinech signálních drah a dále selekcí klonů s *wt* FLT-3 receptorem, jejichž důsledkem dochází ke snížení terapeutické odpovědi a selhání léčby (McMahon et al. 2019; Schmalbrock et al. 2021).

V naší skupině byla vyvinuta rezistentní varianta APL buněčné linie HL-60 dlouhodobou expozicí postupně se zvyšujícím dávkám gilteritinibu, tedy FLT-3 inhibitoru druhé generace, který je podáváný dlouhodobě jako udržovací terapie pacientům s R/R AML (Perl et al. 2019; Senapati et al. 2023). Buněčná linie HL-60 g75, nesoucí transientní rezistenci vůči gilteritinibu, byla využita v druhé části této práce, k ověření, zda námi testované látky tuto rezistenci nepřekonávají. Z předchozí charakterizace je zřejmé, že tato linie nenesou aktivující mutaci, ale rezistence vzniká v souvislosti s obecnějšími mechanismy, tedy změnou (up/down regulací) genů v signálních drahách, nezávislých na FLT3, nebo pomocí efluxních transportérů. Z tohoto pohledu je to experimentální model, který dobře odráží situaci, jež může nastávat v klinické praxi u každého gilteritinibem léčeného pacienta. Výsledky byly porovnány s linií HL-60 *wt*, která je vůči gilteritinibu senzitivní. Ve vysoké koncentraci (50 μM) se látky DS-2 a DS-28 projeví podobně jako gilteritinib (růst senzitivních buněk byl inhibován více). Látka DS-3 však v 50 μM koncentraci prokázala srovnatelný inhibiční efekt na rezistentní i nerezistentní linii, a představuje tak nadějnou molekulu v překonávání sekundární rezistence. Získaná data jsou však výsledkem pilotních testů a pro jejich prokázání je potřeba dalšího testování s využitím modelu, který vykazuje rezistenci vzniklou na podkladě sekundárních změn FLT-3 receptoru.

Při expozici buněk linií HL-60 *wt* a HL-60 g75 látce LG-1871 ve vysoké koncentraci (50 μM) došlo k neočekávanému efektu – extenzivní produkci formazanu několikanásobně vyšší oproti kontrole. Tento jev mohl být způsobený buď nadměrnou proliferací buněk, nebo zvýšením jejich metabolické aktivity. Po porovnání počtu buněk s kontrolou (odpovídající předpokládané inhibici buněčného růstu), jsme výše uvedené první vysvětlení mohli vyloučit, a tento jev tak byl přisouzen nadměrné aktivaci metabolických enzymů. Podobný efekt u MTT eseje zaznamenali Rei et al. (2018) a Kumar et al. (2023) při vystavení buněk vnějším stresorům v podobě radiačního záření a chemoterapeutik, čímž došlo ke zvýšení počtu mitochondrií a zvýšené expresi enzymu sukcinát dehydrogenázy, podílející se na přeměně tetrazoliové soli na formazan (Rai et al. 2018; Kumar et al. 2023). Také u přírodního isoflavonu genisteinu, který má kromě antineoplastické aktivity také protizánětlivé a antioxidační účinky (Sharifi-Rad et al. 2021), byl prokázán efekt stimulující mitochondriální biogenezi a mitochondriální metabolickou aktivitu, která by mohla být s antineoplastickou a antioxidační aktivitou genisteinu spojená (Pagliacci et al. 1993). Podíl mitochondrií na apoptóze byl popsán v mnoha studiích (Gulbins et al. 2003; Jeong a Seol 2008), a proto neočekávaný efekt látky LG-1871 představuje zajímavý podnět k dalšímu studiu.

8 ZÁVĚR

Terapie akutní myeloidní leukemie (AML) zaznamenala významný pokrok, především díky implementaci cílené terapie, zahrnující FLT-3 inhibitory. Přesto však AML stále zůstává obtížně léčitelným onemocněním kostní dřeně, především z důvodu rozvoje rezistence vůči současným klinicky používaným léčivům, a potřeba vyvíjet nové FLT-3 inhibitory tak stále stoupá.

V této diplomové práci byl zhodnocen inhibiční efekt 8 nově syntetizovaných látek pomocí *in vitro* metody MTT na buněčných liniích odvozených od AML. Z testovaných látek sloučenina DS-28 prokázala významný cytotoxický efekt na FLT3 mutovanou linii MV4-11 s vysokou specifitou k FLT3. Látka DS-28 prokázala výhodné vlastnosti, vytvářející podklad pro syntézu ještě účinnějších derivátů s cílem dosáhnout inhibiční aktivity v nanomolární koncentraci, které dosahují klinicky používané FLT-3 inhibitory.

Na linii HL-60 g75, nesoucí transientní rezistenci vůči gilteritinibu, byl prozkoumán účinek těchto látek v porovnání s gilteritinib-senzitivní linií HL-60 *wt*. Určitý účinek i na rezistentní variantu byl pozorován u látky DS-3, ale až ve vysoké koncentraci. U látky LG-1871 ve vysoké koncentraci byl pozorován nepředpokládaný efekt, přisuzovaný nadměrné aktivaci mitochondriálních enzymů. Tyto látky nabízejí zajímavé podněty pro další studium s možností jejich budoucího využití v praxi. Pro potvrzení těchto prvotních dat je třeba návazných studií pomocí dalších metod se zapojením reálných vzorků od pacientů s AML.

9 LITERATURA

- Aikawa T, Togashi N, Iwanaga K, Okada H, Nishiya Y, Inoue S, et al. Quizartinib, a selective FLT3 inhibitor, maintains antileukemic activity in preclinical models of RAS-mediated midostaurin-resistant acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* [Internet]. 17. březen 2020 [citován 6. květen 2024];11(11):943–55. Dostupné z: <https://www.oncotarget.com/article/27489/text/>
- Andreozzi F, Massaro F, Wittnebel S, Spilleboudt C, Lewalle P, Salaroli A. New Perspectives in Treating Acute Myeloid Leukemia: Driving towards a Patient-Tailored Strategy. *Int J Mol Sci* [Internet]. leden 2022 [citován 17. duben 2024];23(7):3887. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3887>
- Aykul S, Martinez-Hackert E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal Biochem*. 1. září 2016;508:97–103.
- Buliková A, Cermanová M, Cetkovský P, Lánská M, Novák J, Mayer J, et al. Akutní myeloidní leukémie : informace pro pacienty a jejich blízké [Internet]. Česká leukemická skupina - pro život (CELL); 2013 [citován 4. květen 2024]. Dostupné z: <https://www.muni.cz/en/research/publications/1681545>
- Bystrom R, Levis MJ. An Update on FLT3 in Acute Myeloid Leukemia: Pathophysiology and Therapeutic Landscape. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 1. duben 2023 [citován 31. březen 2024];25(4):369–78. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11912-023-01389-2>
- Capelli D, Menotti D, Fiorentini A, Saraceni F, Olivieri A. Overcoming Resistance: FLT3 Inhibitors Past, Present, Future and the Challenge of Cure. *Cancers* [Internet]. leden 2022 [citován 18. duben 2024];14(17):4315. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/17/4315>
- Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M, et al. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood* [Internet]. 21. květen 2015 [citován 19. duben 2024];125(21):3236–45. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/125/21/3236/34001/Secondary-mutations-as-mediators-of-resistance-to>
- Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* [Internet]. únor 2019 [citován 17. duben 2024];33(2):299–312. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41375-018-0357-9>
- Daver N, Venugopal S, Ravandi F. FLT3 mutated acute myeloid leukemia: 2021 treatment algorithm. *Blood Cancer J* [Internet]. 27. květen 2021 [citován 15. duben 2024];11(5):1–9. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41408-021-00495-3>

- Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* [Internet]. 22. září 2022 [citován 13. duben 2024];140(12):1345–77. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/140/12/1345/485817/Diagnosis-and-management-of-AML-in-adults-2022>
- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 [citován 11. květen 2024];373(12):1136–52. Dostupné z: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1406184>
- Doubek M, Mayer J. Červená kniha - Léčebné postupy v hematologii | ČHS ČLS JEP [Internet]. 2022 [citován 11. květen 2024]. Dostupné z: <https://www.hematology.cz/cervena-kniha-lecebne-postupy-v-hematologii/>
- Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med*. 10. květen 2018;378(19):1789–801.
- Eguchi M, Minami Y, Kuzume A, Chi S. Mechanisms Underlying Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines* [Internet]. srpen 2020 [citován 14. březen 2024];8(8):245. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/8/245>
- Erba H, Montesinos P, Vrhovac R, Patkowska E, Kim HJ, Zak P, et al. S100: QUIZARTINIB PROLONGED SURVIVAL VS PLACEBO PLUS INTENSIVE INDUCTION AND CONSOLIDATION THERAPY FOLLOWED BY SINGLE-AGENT CONTINUATION IN PATIENTS AGED 18-75 YEARS WITH NEWLY DIAGNOSED FLT3-ITD+ AML. *HemaSphere* [Internet]. 23. červen 2022 [citován 17. duben 2024];6:1–2. Dostupné z: <https://journals.lww.com/10.1097/01.HS9.0000843296.73803.85>
- Fedorov K, Maiti A, Konopleva M. Targeting FLT3 Mutation in Acute Myeloid Leukemia: Current Strategies and Future Directions. *Cancers* [Internet]. leden 2023 [citován 14. březen 2024];15(8):2312. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/8/2312>
- Ge SS, Liu SB, Xue SL. Developments and challenges of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Front Oncol* [Internet]. 14. září 2022 [citován 14. březen 2024];12. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.996438/full>
- Gebru MT, Wang HG. Therapeutic targeting of FLT3 and associated drug resistance in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* [Internet]. 19. listopad 2020 [citován 19. duben 2024];13(1):155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00992-1>

- Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* [Internet]. leden 2021 [citován 15. leden 2024];22(23):12827. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12827>
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* [Internet]. 1. září 2002 [citován 15. duben 2024];100(5):1532–42. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120592318>
- Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev* [Internet]. 17. duben 2012 [citován 16. duben 2024];6(1):e8. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4419636/>
- Gulbins E, Dreschers S, Bock J. Role of Mitochondria in Apoptosis. *Exp Physiol* [Internet]. 2003 [citován 7. květen 2024];88(1):85–90. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/eph8802503>
- Chang YT, Hernandez D, Ghiaur G, Levis MJ, Jones RJ. Bone Marrow Stroma Protects FLT3 Acute Myeloid Leukemia (AML) through CYP3A4-Mediated Drug Metabolization of FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs). *Blood* [Internet]. 8. prosinec 2017 [citován 18. duben 2024];130:2519. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497119830355>
- James AJ, Smith CC, Litzow M, Perl AE, Altman JK, Shepard D, et al. Pharmacokinetic Profile of Gilteritinib: A Novel FLT-3 Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1. říjen 2020 [citován 12. květen 2024];59(10):1273–90. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00888-w>
- Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* [Internet]. 2008 [citován 7. květen 2024];41(1):11–22. Dostupné z: <https://koreascience.kr/article/JAKO200810103488738.page>
- Jimenez-Chillon C, Dillon R, Russell N. Optimal Post-Remission Consolidation Therapy in Patients with AML. *Acta Haematol* [Internet]. březen 2024 [citován 15. duben 2024];147(2):148–59. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10997264/>
- Juliusson G, Lehmann S, Lazarevic V. Epidemiology and Etiology of AML. In: Röllig C, Ossenkoppele GJ, editoři. *Acute Myeloid Leukemia* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citován 14. duben 2024]. s. 1–22. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-030-72676-8_1

- Kang D, Ludwig E, Jaworowicz D, Huang H, Fiedler-Kelly J, Cortes J, et al. Concentration–QTC analysis of quizartinib in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 1. duben 2021 [citován 12. květen 2024];87(4):513–23. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04204-y>
- Kazi JU, Rönstrand L. FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol Rev* [Internet]. červenec 2019 [citován 15. duben 2024];99(3):1433–66. Dostupné z: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00029.2018>
- Kennedy VE, Smith CC. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol* [Internet]. 23. prosinec 2020 [citován 17. duben 2024];10. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.612880/full>
- Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primer* [Internet]. 10. březen 2016 [citován 26. leden 2024];2(1):16010. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nrdp201610>
- Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci* [Internet]. 2020 [citován 10. duben 2024];111(2):312–22. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cas.14274>
- Klener P. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén; 2002.
- Knight TE, Edwards H, Meshinchi S, Taub JW, Ge Y. “FLipping” the Story: FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia and the Evolving Role of FLT3 Inhibitors. *Cancers* [Internet]. leden 2022 [citován 13. duben 2024];14(14):3398. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/14/3398>
- Kočárek E, Pánek M, Novotná D. *Klinická cytogenetika I : úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Praha : Karolinum; 2010. (Učební texty Univerzity Karlovy v Praze).
- Kumar A, Rai Y, Bhatt AN. Anti-cancer drug-induced mitochondrial alteration becomes a limitation of metabolic viability-based MTT assay in analyzing growth inhibition [Internet]. 2023 [citován 3. květen 2024]. Dostupné z: <https://www.researchsquare.com/article/rs-3354673/v1>

- Lee LY, Hernandez D, Rajkhowa T, Smith SC, Raman JR, Nguyen B, et al. Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood* [Internet]. 12. leden 2017 [citován 6. květen 2024];129(2):257–60. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/129/2/257/36083/Preclinical-studies-of-gilteritinib-a>
- Lehtonen M, Kellokumpu-Lehtinen PL. The past and present of prostate cancer and its treatment and diagnostics: A historical review. *SAGE Open Med* [Internet]. 1. prosinec 2023 [citován 11. květen 2024];11:20503121231216837. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10693792/>
- Li J, Song L. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia* [Internet]. 1. září 2007 [citován 16. leden 2024];46(5):593–9. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2216/07-11.1>
- Löwenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood*. 3. leden 2013;121(1):26–8.
- McMahon CM, Ferng T, Canaani J, Wang ES, Morrissette JJD, Eastburn DJ, et al. Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov* [Internet]. 1. srpen 2019 [citován 19. duben 2024];9(8):1050–63. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/9/8/1050/41997/Clonal-Selection-with-RAS-Pathway-Activation>
- Moradi M. Determining Optimal Cell Density and Culture Medium Volume simultaneously in MTT Cell Proliferation Assay for Adherent Cancer Cell Lines. *HELIX* [Internet]. 28. únor 2018 [citován 16. leden 2024];8(2):3274–80. Dostupné z: <http://helix.dnares.in/2018/03/08/determining-optimal-cell-density-and-culture-medium-volume-simultaneously-in-mtt-cell-proliferation-assay-for-adherent-cancer-cell-lines/>
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 16. prosinec 1983 [citován 20. listopad 2023];65(1):55–63. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034>
- Motofei IG. Biology of cancer; from cellular and molecular mechanisms to developmental processes and adaptation. *Semin Cancer Biol* [Internet]. listopad 2022 [citován 11. květen 2024];86:600–15. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X21002534>

- Negotei C, Colita A, Mitu I, Lupu AR, Lapadat ME, Popovici CE, et al. A Review of FLT3 Kinase Inhibitors in AML. *J Clin Med* [Internet]. leden 2023 [citován 14. březen 2024];12(20):6429. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2077-0383/12/20/6429>
- Nitika, Wei J, Hui AM. Role of Biomarkers in FLT3 AML. *Cancers* [Internet]. leden 2022 [citován 17. březen 2024];14(5):1164. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/5/1164>
- Pagliacci MC, Spinozzi F, Migliorati G, Fumi G, Smacchia M, Grignani F, et al. Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: A further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *Eur J Cancer* [Internet]. leden 1993 [citován 3. květen 2024];29(11):1573–7. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/095980499390297S>
- Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory *FLT3* -Mutated AML. *N Engl J Med* [Internet]. 31. říjen 2019 [citován 13. duben 2024];381(18):1728–40. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1902688>
- Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep* [Internet]. 24. leden 2018 [citován 7. květen 2024];8(1):1531. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19930-w>
- Reikvam H. Revisiting the prognostic role of FLT3 mutations in acute myelogenous leukemia. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 4. květen 2023 [citován 5. květen 2024];16(5):317–23. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17474086.2023.2202849>
- Senapati J, Kadia TM. Which FLT3 Inhibitor for Treatment of AML? *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 1. březen 2022 [citován 16. duben 2024];23(3):359–80. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11864-022-00952-6>
- Senapati J, Kadia TM, Ravandi F. Maintenance therapy in acute myeloid leukemia: advances and controversies. *Haematologica* [Internet]. 4. květen 2023 [citován 15. duben 2024];108(9):2289–304. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10483353/>
- Sharifi-Rad J, Quispe C, Imran M, Rauf A, Nadeem M, Gondal TA, et al. Genistein: An Integrative Overview of Its Mode of Action, Pharmacological Properties, and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 19. červenec 2021 [citován 7. květen 2024];2021:3268136. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8315847/>

- Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* [Internet]. 2023 [citován 24. únor 2024];98(3):502–26. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.26822>
- Schmalbrock LK, Dolnik A, Cocciardi S, Sträng E, Theis F, Jahn N, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood* [Internet]. 3. červen 2021 [citován 7. květen 2024];137(22):3093–104. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.1182/blood.2020007626>
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2020 [citován 11. květen 2024];70(1):7–30. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21590>
- Stevens MG, Kehrlí ME, Canning PC. A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 1. březem 1991 [citován 17. leden 2024];28(1):45–56. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016524279190042B>
- Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *N Engl J Med* [Internet]. 3. srpen 2017 [citován 14. duben 2024];377(5):454–64. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1614359>
- Šálek C. Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní Medicína Praxi* [Internet]. 1. listopad 2012 [citován 11. květen 2024];14(10):366–72. Dostupné z: http://solen.cz/artkey/int-201210-0005_Diagnostika_a_lecba_akutnich_leukemii.php
- Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 15. srpen 2005 [citován 14. duben 2024];106(4):1154–63. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120531170>
- Traer E, Martinez J, Javidí-Sharifi N, Agarwal A, Dunlap J, English I, et al. FGF2 from marrow microenvironment promotes resistance to FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* [Internet]. 15. listopad 2016 [citován 18. duben 2024];76(22):6471–82. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5290120/>
- Wang Z, Cai J, Cheng J, Yang W, Zhu Y, Li H, et al. FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Challenges and Recent Developments in Overcoming Resistance. *J Med Chem* [Internet]. 25. březem 2021 [citován 16. duben 2024];64(6):2878–900. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.0c01851>

Wiesen MHJ, Stemler J, Fietz C, Joisten C, Cornely OA, Verougstraete N, et al. Quantification of midostaurin in plasma and serum by stable isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a cohort of patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* [Internet]. 2024 [citován 12. květen 2024];112(6):879–88. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejh.14178>

Zatloukalová S, Azeem K, Čerňan M, Holý O. Epidemiology, risk factors and possibilities for the prevention of acute leukaemia. *Epidemiol Mikrobiol Imunol Cas Spolecnosti Epidemiol Mikrobiol Ceske Lek Spolecnosti JE Purkyne*. 1. červenec 2021;70:208–20.

Zhao J, Agarwal S, Ahmad H, Amin K, Bewersdorf JP, Zeidan A. A Review of FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Blood Rev* [Internet]. březem 2022 [citován 13. duben 2024];52:100905. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9846716/>

10 ELEKTRONICKÉ ZDROJE

Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts. SEER. [citován 13. duben 2024]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>

COMP. Xospata | European Medicines Agency [Internet]. 2019 [citován 4. květen 2024]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xospata>

COMP. Vanflyta | European Medicines Agency [Internet]. 2023 [citován 4. květen 2024]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vanflyta-0>

CHMP. Rydapt | European Medicines Agency [Internet]. 2017 [citován 4. květen 2024]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt#assessment-history>

Research Center for Drug Evaluation. FDA approves quizartinib for newly diagnosed acute myeloid leukemia. FDA [Internet]. 21. červenec 2023 [citován 17. duben 2024]; Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-quizartinib-newly-diagnosed-acute-myeloid-leukemia>