

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Petra Jamborová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Príprava a charakterizácia leukemických bunkových
línii rezistentných voči protinádorovým liekom.**

Bakalářská práce

Petra Jamborová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Ing. Soňa Gurská, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Petra JAMBOROVÁ**
Osobní číslo: **R21745**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Příprava a charakterizácia leukemických bunkových linií rezistentných voči protinádorovým liekom.**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce.
2. Práca s bunkovými kultúrami v sterilných podmienkach.
3. Příprava bunkových linií rezistentných na protinádorové liečivá.
4. Charakterizácia pripravených rezistentných klonov.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. Amaral MVS, DE Sousa Portilho AJ, DA Silva EL, DE Oliveira Sales L, DA Silva Maués JH, DE Moraes MEA, Moreira-Nunes CA. Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. *Anticancer Res.* 2019 Dec;39(12):6443-6455. doi: 10.21873/anticancer.13858. PMID: 31810908.
2. Watson MB, Lind MJ, Cawkwell L. Establishment of in-vitro models of chemotherapy resistance. *Anticancer Drugs.* 2007 Aug;18(7):749-54. doi: 10.1097/CAD.0b013e3280a02f43. PMID: 17581296.
3. Uchibori K, Kasamatsu A, Sunaga M, Yokota S, Sakurada T, Kobayashi E, Yoshikawa M, Uzawa K, Ueda S, Tanzawa H, Sato N. Establishment and characterization of two 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 2012 Apr;40(4):1005-10. doi: 10.3892/ijo.2011.1300. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22179686; PMCID: PMC3584526.
4. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020 May 2;21(9):3233. doi: 10.3390/ijms21093233. PMID: 32370233; PMCID: PMC7247559.
5. Noskova V, Dzubak P, Kuzmina G, Ludkova A, Stehlik D, Trojanec R, Janostakova A, Korinkova G, Mihal V, Hajduch M. In vitro chemoresistance profile and expression/function of MDR associated proteins in resistant cell lines derived from CCRF-CEM, K562, A549 and MDA MB 231 parental cells. *Neoplasma.* 2002;49(6):418-25. PMID: 12584592.
6. McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, O'Donovan N, Stordal B. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front Oncol.* 2014 Mar 6;4:40. doi: 10.3389/fonc.2014.00040. PMID: 24639951; PMCID: PMC3944788.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Soňa Gurská, PhD.
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 25. března 2023

Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2023

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora	Petra Jamborová
Názov práce	Príprava a charakterizácia leukemických bunkových línií rezistentných voči protinádorovým liekom.
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra bunčnej biológie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedúci práce	Ing. Soňa Gurská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Bakalárska práca bola zameraná na charakterizáciu a prípravu rezistentných klonov leukemických bunkových línií voči protinádorovým liečivám. Teoretická časť bakalárskej práce sa venovala charakterizácií protinádorových liečiv, ktoré sa využívajú v klinickej praxi. Bolo popísané ich základné delenie a spôsob mechanizmu účinku. Ďalej boli popísané rôzne spôsoby vzniku rezistencií u nádorových buniek a boli charakterizované proteíny podieľajúce sa na vzniku mnohopočetnej liekovej rezistencie.

Experimentálna časť bola zameraná na selekciu rezistentných klonov leukemických bunkových línií vystavením vysokým koncentráciám protinádorových liečiv – paklitaxelu a daunorubicínu. Selekcia prebehla v dvoch cykloch. Miera rezistencie selektovaných klonov bola stanovená prostredníctvom testu cytotoxicity – MTS testu, ktorého vyhodnotením bol určený pokles/nárast rezistencie u selektovaných klonov v porovnaní s parentálnymi bunkami. Na záver bola prevedená analýza expresie P-glykoproteínu, jedného z faktorov zodpovedného za vznik rezistencie, u selektovaných klonov, ktoré v teste cytotoxicity vykazovali najvyššiu mieru rezistencie.

Kľúčové slová	rakovina, protinádorové liečivá, rezistencia na protinádorové liečivá, P-glykoproteín
Počet strán	56
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographic identification

Author's first name and surname	Petra Jamborová
Title	Establishment and characterization of anticancer drug resistant leukemic cell lines.
Type of thesis	Bachelor thesis
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Ing. Soňa Gurská, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

The aim of this bachelor's thesis was the characterization and establishment of resistant clones of leukemic cell lines to anticancer drugs. The theoretical part of the bachelor's thesis was devoted to the characterization of anticancer drugs used in clinical practice. Their basic distribution and mechanism of action were described. Furthermore, various mechanisms of resistance as well as the proteins involved in the development of multiple drug resistance were characterized.

The experimental part was focused on the selection of resistant clones of leukemic cell lines by pulse exposure to high concentrations of anticancer drugs - paclitaxel and daunorubicin. The selection was carried out in two cycles. The degree of resistance of the selected clones was determined through the cytotoxicity test - MTS test, the evaluation of which determined the decrease/increase in resistance in the selected clones compared to the parental cells. Finally, the expression of P-glycoprotein, one of the factors responsible for the emergence of resistance, was analysed in selected clones with the highest level of resistance observed in the cytotoxicity test.

Keywords	cancer, anticancer drugs, anticancer drugs resistance, P-glycoprotein
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že túto bakalársku prácu som napísala samostatne pod vedením Ing. Soni Gurskej, Ph.D. s použitím citovanej odbornej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

Petra Jamborová

Pod'akovanie

Touto cestou by som rada pod'akovala vedúcej mojej bakalárskej práce, pani Ing. Soni Gurskej, Ph.D. za trpezlivosť, ochotu, venovaný čas, cenné rady a pripomienky pri spracovávaní teoretickej aj experimentálnej časti práce. Ďalej by som rada pod'akovala pracovníkom Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny, menovite Mgr. Renate Buriánovej za jej pomoc a cenné rady. V neposlednom rade by som sa rada pod'akovala svojej rodine za ich podporu.

Obsah

1	Úvod	1
2	Ciele práce	2
3	Literárny prehľad.....	3
3.1	Protinádorové liečivá.....	3
3.1.1	Alkylačné činidlá	4
3.1.2	Antimetabolity	4
3.1.3	Antimikrotubulárne činidlá	5
3.1.4	Antibiotiká.....	7
3.1.5	Ostatné činidlá	8
3.2	Rezistencia voči protinádorovým liečivám.....	9
3.2.1	Mnohopočetná lieková rezistencia.....	10
3.2.1.1	ATP-viažuace kazetové proteíny.....	11
4	Materiál a metódy.....	15
4.1	Biologický materiál	15
4.2	Použité chemikálie, roztoky a protilátky	15
4.3	Použité prístroje a zariadenia	17
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	17
5	Výsledky	24
5.1	Stanovenie koncentrácie protinádorových liečiv potrebných na selekciu rezistentných klonov 24	
5.2	Selekcia rezistentných klonov	26
5.3	Stanovenie miery rezistencie selektovaných klonov testom cytotoxicity.....	26
5.3.1	Vyhodnotenie testu cytotoxicity pre bunkovú líniu CCRF-CEM.....	26
5.3.2	Vyhodnotenie testu cytotoxicity pre bunkovú líniu K562.....	29
5.4	Analýza expresie Pgp prietokovou cytometriou.....	31
6	Diskusia	33
7	Záver.....	36

8	Literatúra	37
---	------------------	----

Zoznam symbolov a skratiek

ABC	z angl. ATP-binding cassette
ATCC	z angl. American tissue and cultures collection
ATP	adenozíntrifosfát
BCRP	z angl. Breast cancer resistance protein
BSA	bovinný sérový albumín
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FBS	fetálne bovínne sérum
HEPES	4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétánsulfónová kyselina
IC ₁₀	10% inhibičná koncentrácia
IC ₅₀	polovičná inhibičná koncentrácia
IC ₉₀	90% inhibičná koncentrácia
IMDM	z angl. Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MDR	mnohopočetná lieková rezistencia
MRP1	z angl. Multidrug resistance-associated protein 1
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfenyl)-2H-tetrazólium
NBD	doména viažuca nukleotid
Pgp	P-glykoproteín
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI	z angl. Roswell Park Memorial Institute
TMD	transmembránová doména

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Štruktúrny vzorec vinblastínu (1) a vinkristínu (2).	6
Obrázok 2: Štruktúrny vzorec paklitaxelu.	7
Obrázok 3: Štruktúrny vzorec daunorubicínu (1) a doxorubicínu (2).	8
Obrázok 4: Mechanizmy vzniku rezistencie u rakovinových buniek.	9
Obrázok 5: Štruktúra Pgp.....	12
Obrázok 6: Štruktúra MRP1.....	13
Obrázok 7: Štruktúra BCRP.....	14
Obrázok 8: Schéma priebehu selekcie rezistentných klonov.	20
Obrázok 9: Rozloženie látok na cieľovej 384-jamkovej dosťičke.	22

Zoznam grafov

Graf 1: Parentálne bunky bunkovej línie CCRF-CEM po ošetroení paklitaxelom.	25
Graf 2: Parentálne bunky bunkovej línie K562 po ošetroení daunorubicínom.	25
Graf 3: Graf závislosti percenta inhibície na koncentrácii paklitaxelu u parentálnych buniek bunkovej línie CCRF-CEM.	28
Graf 4: Graf závislosti percenta inhibície na koncentrácii paklitaxelu u selektovaných rezistentných klonov bunkovej línie CCRF-CEM ovplyvňovaných vysokou koncentráciou paklitaxelu..	29

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Základné delenie alkylačných činidiel do skupín, príklady zástupcov týchto tried a ich využitie.....	4
Tabuľka 2: Delenie antibiotík používaných na liečbu nádorových ochorení.	7
Tabuľka 3: Charakterizácia použitých bunkových línií.....	15
Tabuľka 4: Testované protinádorové liečivá, ich koncentrácia na zdrojovej doštičke, objem pipetovaný do cieľovej doštičky prístrojom Echo 550 a výsledná koncentrácia cytostatík v jamkách cieľovej doštičky.	21
Tabuľka 5: Hodnoty IC_{50} parentálnych buniek bunkových línií CCRF-CEM a K562 po ich ovplyvnení príslušným protinádorovým liečivom	24
Tabuľka 6: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie CCRF-CEM a ich klony selektované vysokou koncentráciou paklitaxelu v prvom cykle a následne kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie paklitaxelu v druhom cykle.....	27
Tabuľka 7: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie CCRF-CEM a ich klony selektované vysokou koncentráciou paklitaxelu v dvoch cykloch.	28
Tabuľka 8: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie K562 a ich klony ovplyvňované v prvom cykle vysokou koncentráciou daunorubicínu a následne kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu v druhom cykle.	30
Tabuľka 9: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie K562 a ich klony selektované vysokou koncentráciou daunorubicínu v dvoch cykloch.	31
Tabuľka 10: Nárast expresie Pgp u rezistentných klonov bunkovej línie CCRF-CEM.	32
Tabuľka 11: Nárast expresie Pgp u rezistentných klonov bunkovej línie K562.	32

1 Úvod

Rakovina je ochorenie, pri ktorom dochádza k nekontrolovateľnému rastu a množeniu buniek, ktoré sa môžu šíriť ďalej do tela, t. j. metastázovať. Existuje množstvo spôsobov liečby, okrem klasických prístupov akými sú chirurgická liečba, rádioterapia a chemoterapia, sa často využíva aj hormonálna terapia, imunoterapia, alogénna transplantácia kmeňových buniek a ďalšie. Protinádorové liečivá sa líšia mechanizmom ich účinku, aj keď ich spoločným cieľom je inhibícia proliferácie buniek a množenia nádorov, čím sa zabráni metastázam.

Rezistencia voči protinádorovým liečivám je jedným z hlavných dôvodov zlyhania liečby rakoviny. Zo štatistických dát vyplýva, že až 90 % úmrtí na rakovinu je spojených so stratou citlivosti na liečbu. Rezistenciu voči protinádorovým liečivám spôsobuje množstvo faktorov, ako napríklad inaktivácia liečiva, eflux liečiva, oprava poškodenej DNA alebo inhibícia bunkovej smrti. Môže ísť o primárnu rezistenciu, ktorá je prítomná ešte pred podaním liečiv alebo o sekundárnu, skríženú a mnohopočetnú liekovú rezistenciu. Typická mnohopočetná lieková rezistencia je zapríčinená ATP-dependentnou membránovou efluxnou pumpou, P-glykoproteínom. P-glykoproteín exportuje liečivá von z bunky proti koncentračnému gradientu a spôsobuje zníženú akumuláciu liečiva v bunke. Atypickej mnohopočetnej liekovej rezistencie sa nezúčastňuje P-glykoproteín a môže byť spôsobená zmenou subcelulárnej distribúcie liečiva, poškodením jeho štruktúry, rozdielnou kapacitou opráv DNA či inými proteínmi, ako napríklad MRP1.

Cieľom bakalárskej práce bolo pripraviť leukemické bunkové línie rezistentné na zvolené protinádorové liečivá. Modely bunkových línií rezistentných na protinádorové liečivá sa v klinickej praxi využívajú na objasnenie mechanizmov, ktoré vedú k vzniku rezistencie. Tieto modely sa taktiež využívajú na skríning nových liečiv.

2 Ciele práce

Cieľom teoretickej časti bolo vypracovanej literárnej rešerše na tému bakalárskej práce, a teda charakterizáciu protinádorových liečiv a možné spôsoby vzniku rezistencie voči protinádorovým liečivám.

Experimentálna časť bola zameraná na prípravu rezistentných leukemických bunkových línii v sterilných podmienkach a následné testovanie miery rezistencie u selektovaných klonov prostredníctvom kolorimetrického MTS testu. Na záver bola na rezistentných bunkách prevedená analýza expresie proteínu P-glykoproteínu prietokovou cytometriou.

3 Literárny prehľad

3.1 Protinádorové liečivá

Nádorové ochorenia, označované aj termínom rakovina, sú ochorenia spôsobené abnormálnym delením a rastom buniek, ktoré pochádzajú z jednej bunky (Mittal *et al.*, 2017, Salem *et al.*, 2017). Transformácia normálnej bunky, ktorá vedie k vzniku nádorovej bunky je viacstupňový proces spôsobený akumuláciou mutácií v onkogénoch a tumor supresorových génoch (Soltysova *et al.*, 2005, Tomasetti *et al.*, 2015). V súčasnosti sa na liečbu rakoviny využíva viac stratégií, ktoré zahŕňajú napríklad chirurgické ošetrenie, rádioterapiu, chemoterapiu, prípadne ich kombináciu.

Chemoterapia je systematickým procesom, ktorý pozostáva z podávania jedného alebo viacerých protinádorových liečiv s nízkou molekulovou hmotnosťou na deštrukciu nádorových buniek, respektíve obmedzenie ich proliferácie. Nakoľko cytostatiká nie sú selektívne, a teda pôsobia na nádorové aj zdravé bunky a tkanivá, môžu spôsobiť vážne toxické vedľajšie účinky. Všeobecnými nevýhodami sú napríklad supresia kostnej drene, lézie gastrointestinálneho traktu, vypadávanie vlasov, nevoľnosť, rozvoj liekovej rezistencie, ako aj nestabilita molekúl či ich zlá rozpustnosť vo vode, čo zamedzuje prieniku cez bunkové membrány (Thurston *et Pysz*, 2021, Ioele *et al.*, 2022).

Chemoterapeutické činidlá môžu spôsobiť inhibíciu rastu nádoru na viacerých úrovniach v bunke a jej prostredí. Ovpľyňujú predovšetkým buď makromolekulárnu syntézu a funkciu nádorových buniek interferenciou s DNA, RNA alebo so syntézou proteínov, alebo ovpľyňujú zodpovedajúce fungovanie vopred vytvorenej molekuly. V prípade, že je táto interferencia dostatočne veľká, chemoterapeutické činidlá spôsobujú bunkovú smrť buď priamo alebo spustením apoptózy. Bunková smrť môže nastať aj oneskorene, kedy pôsobením daného liečiva odumrie iba časť buniek, čo znamená, že liek musí byť podávaný opakovane, aby sa dosiahla efektívnejšia odpoveď. Toxicita protinádorových liečiv je zvyčajne najvýraznejšia behom S-fázy bunkového cyklu. U liečiv, akými sú alkaloidy z rodu Vinca a taxány, sú prejavy toxicity najvyššie v M-fáze bunkového cyklu, pretože blokujú tvorbu mitotického vretienka (Amjad *et al.*, 2023).

Protinádorové liečivá možno deliť podľa rôznych kritérií. V závislosti od ich pôvodu možno tieto liečivá rozdeliť do dvoch skupín – môžu byť rastlinného alebo syntetického pôvodu (Bukowski *et al.*, 2020). Protinádorové liečivá možno ďalej rozdeliť na základe mechanizmu ich účinku na alkylačné činidlá, antimetabolity, antimikrotubulárne činidlá, antibiotiká a ostatné činidlá (Amjad *et al.*, 2023).

3.1.1 Alkylačné činidlá

Alkylačné činidlá, trieda protinádorových liečiv, sú nízko molekulárnymi a vysoko reaktívnymi zlúčeninami, ktoré sú schopné tvoriť kovalentné väzby s nukleofilnými skupinami prítomnými v DNA a proteínoch/peptidoch. Reakcia vedie k pridávaniu alkylovej skupiny na kyslík, dusík, fosfor alebo síru, čo vedie k zmene biologickej funkcie DNA, proteínov a narušeniu funkcie bunky buď jej usmrtením alebo zabránením jej rastu. Najčastejšie alkylovanou deoxyribonukleotidovou bázou je guanín (v polohe N7). Protirakovinové pôsobenie je možné dvoma spôsobmi – zosieťovaním dvoch rôznych reťazcov DNA reakciou s guanínovými bázami prítomnými na opačných reťazcoch DNA alebo ovplyvnením aktivity kritických DNA procesných enzýmov a tým stimuláciou apoptózy reakciou s guanínovými bázami na jednom reťazci DNA. Tým sa vytvára zosieťovanie DNA, ktoré nie je možné rozvinúť počas bunkového delenia, čím sa zabráni rastu bunky (Damia et D'Incalci, 1998, Sreerama, 2014).

Vďaka chemickej reaktivite majú alkylačné činidlá tendenciu zacieliť sa na rýchlo a nekontrolovateľne sa množiace nádorové bunky. Avšak, negatívne pôsobia aj na normálne bunky, ktoré sa fyziologicky často delia (napríklad krvotvorné či gastrointestinálne bunky), čo vedie k vzniku vedľajších účinkov (Gate et Tew, 2011).

Alkylačné činidlá používané na liečbu rôznych typov nádorových ochorení sa rozdeľujú do piatich základných skupín, ktoré sú uvedené v Tabuľke č. 1 (Sreerama, 2014).

Tabuľka 1: Základné delenie alkylačných činidiel do skupín, príklady zástupcov týchto tried a ich využitie (upravené podľa Sreerama, 2014).

Skupina alkylačných činidiel	Liečivá	Klinické uplatnenie
dusíkaté yperity	cyklofosamid	lymfómy, detské leukémie
	chlorambucil	B-bunková chronická lymfocytárna leukémia
aziridíny a epoxidy	tiotepa	rakovina prsníka
alkylsulfonáty	busulfán	deštrukcia pôvodných buniek kostnej drene pred transplantáciou pri chronickej myeloidnej leukémii
nitrozomočoviny	karmustín	lymfómy, nádory mozgu
hydrazín a triazín deriváty	prokarbazín	Hodgkinov lymfóm, rakovina kože
	dekarbazín	

3.1.2 Antimetabolity

Antimetabolity patria k najbežnejším typom protinádorových liečiv používaných na liečbu rôznych malignít, vrátane leukémie (Gmeiner, 2002, Agren *et al.*, 2014). Na liečbu nádorových ochorení sa začali používať približne od polovice 20. storočia, kedy v roku 1948 boli prvýkrát objavené ich protinádorové účinky. Prvým použitým antimetabolitom bol folátový analóg aminopterín, ktorý

indukoval remisiu pri akútnych leukémiách u detí. Prvými antimetabolitmi zavedenými do klinickej praxe boli spoločne s aminopterínom aj metotraxát, 6-merkaptopurín a 5-fluorouracil (Farber *et al.*, 1948, Scagliotti *et al.*, 2006).

Antimetabolity sú analógy prirodzených metabolitov, ktoré hrajú úlohu v bunkovom metabolizme. V užšom zmysle slova sa jedná o analógy prirodzených purínových a pyrimidínových báz, nukleozidov alebo nukleotidov. Medzi antimetabolity sa takisto zaraďujú aj analógy folátov, pretože foláty hrajú významnú úlohu pri syntéze DNA a RNA (Peters, 2014). Väčšina antimetabolitov pôsobí v S-fáze bunkového cyklu, v dôsledku čoho blokujú produkciu nukleových kyselín (Scagliotti *et al.*, 2006).

Pyrimidínové analógy potrebujú na vstup do buniek špeciálne membránové transportéry. Intracelulárne enzýmy, akými sú napríklad deoxycytidínkináza, premieňajú fosforyláciou pyrimidínové analógy na aktívne formy. Následne účinok pyrimidínových analógov spočíva v inkorporácii do molekuly DNA, ukončení reťazca a inhibícií syntézy DNA. Taktiež môžu interferovať s enzýmami zapojenými do syntézy nukleových kyselín (Sampath *et al.*, 2003). Purínové nukleozidové analógy majú podobný mechanizmus účinku ako majú pyrimidínové analógy, a síce inhibíciu syntézy DNA, inhibíciu kľúčových bunkových enzýmov, inhibíciu opráv DNA, akumuláciu zlomov reťazcov DNA a konečným výsledkom ich pôsobenia je indukcia apoptózy (Parker, 2009). Najznámejšími predstaviteľmi týchto skupín protinádorových liečiv sú cytarabín, gemcitabín, 5-fluorouracil, 6-merkaptopurín či fludarabín (Sigmond *et al.*, 2005).

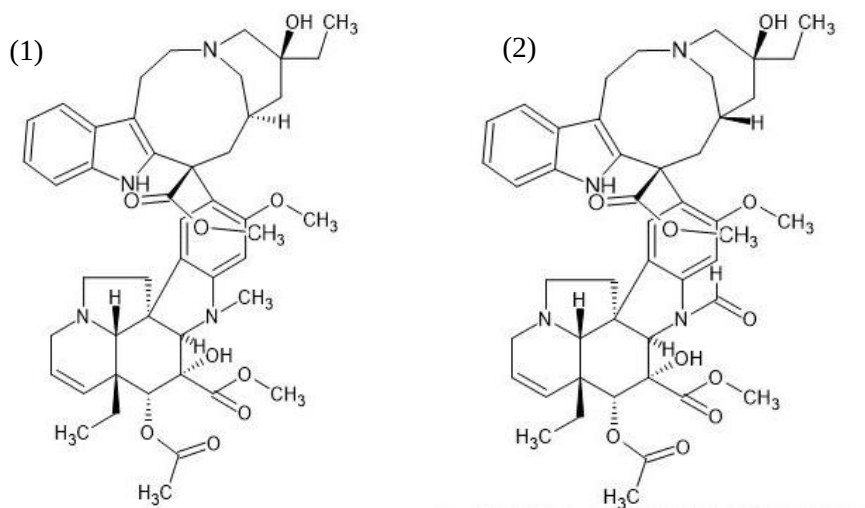
3.1.3 Antimikrotubulárne činidlá

Antimikrotubulárne činidlá sú užitočnými nástrojmi na inhibíciu mitotickej progresie, a teda pôsobia ako chemoterapeutické lieky pre liečbu rôznych typov nádorových ochorení. Tieto liečivá sa viažu na tubulín – zložku mikrotubulov. Narušením dynamiky mikrotubulov v mitotickom vretienku vyvolávajú antimikrotubulárne činidlá mitotický kontrolný bod, zastavujú bunky v M-fáze bunkového cyklu a spúšťajú apoptózu (Checchi *et al.*, 2003, Khwaja *et al.*, 2021, Wordeman *et al.*, 2021). Bolo identifikovaných sedem väzobných domén antimikrotubulárnych činidiel: (1) kolchicínové miesto v blízkosti rozhrania diméru α/β -tubulínu, (2) taxán-viažuce miesto, (3) doména, kde sa viažu vinca alkaloidy (vinkristín, vinblastín, vindezín a vinorelbín), (4) maytanzínová doména, (5) pironetínové miesto, (6) miesto laulimalidu/peloruzidu a (7) gatorbulínové miesto (Hadfield *et al.*, 2003, Wordeman *et al.*, 2021).

Existujú dva odlišné typy antimikrotubulárnych činidiel, ktoré sa využívajú na liečbu nádorových ochorení – činidlá destabilizujúce mikrotubuly a činidlá stabilizujúce mikrotubuly proti depolymerizácii. Tieto dve skupiny činidiel vykazujú pri vysokých koncentráciách opačné účinky na

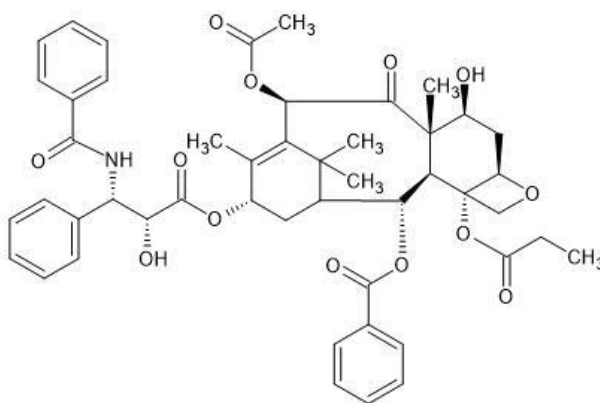
mikrotubuly. Vyvolávajú polymerizáciu alebo depolymerizáciu mikrotubulov, čím menia pomer monomérnych podjednotiek a polymérov. Pri nízkych koncentráciách ovplyvňujú dynamiku mikrotubulov, a tým spôsobujú zmeny bunkových funkcií bez zmien v množstve polyméru mikrotubulov (Khwaja *et al.*, 2021, Wordeman *et Vicente*, 2021).

Destabilizátory mikrotubulov interagujú s tubulínom a inhibujú polymerizáciu tubulínu na mikrotubuly. Liekmi patriacimi do tejto skupiny a viažucimi sa na kolchicínové väzobné miesto sú napríklad kolchicín, indanocín, ktorý narúša mitotické vretienko a tak zastavuje bunky v skorej profáze alebo skupina liečiv ako sú 2-aroylindoly, ktoré sú účinné pri zabíjaní rakovinových buniek rezistentných na iné chemoterapeutiká. Ďalšími látkami, ktoré destabilizujú mikrotubuly sú vinblastín, vinkristín (Obrázok č. 1), nokodazol a dolastatín (Checchi *et al.*, 2003, Khwaja *et al.*, 2021, Wordeman *et Vicente*, 2021).



Obrázok 1: Štruktúrny vzorec vinblastínu (1) a vinkristínu (2).

Činidlá stabilizujúce mikrotubuly zvyšujú polymerizáciu tubulínu na mikrotubuly. Medzi takéto liečivá patria napríklad paklitaxel (Obrázok č. 2), epotilóny A a B, protopín a laulimalid. Paklitaxel podporuje predlžovanie polymérov, stabilizuje mriežku mikrotubulov, zastavuje bunky v prometáfáze a spája mikrotubuly. Epotilóny A a B indukujú bunkovú smrť väzbou na tubulín (Checchi *et al.*, 2003, Khwaja *et al.*, 2021).



Obrázok 2: Štruktúrny vzorec paklitaxelu.

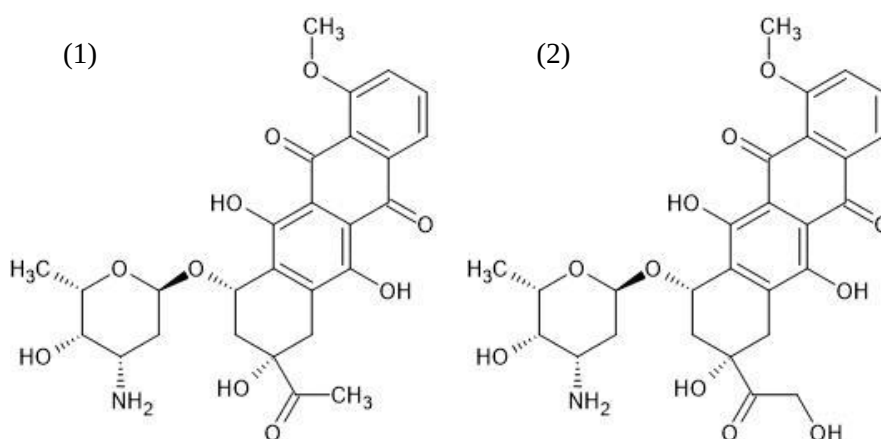
3.1.4 Antibiotiká

Antibiotiká sú chemické látky produkované prevažne rôznymi druhmi mikroorganizmov, ktoré majú antipatogénne vlastnosti. Od seba nezávislými výskumami bolo dokázané, že niektoré antibiotiká majú protirakovinovú aktivitu. Antibiotiká používané na liečbu rakoviny majú rôzne mechanizmy účinku. Môžu spôsobiť poškodenie DNA, podporovať apoptózu nádorových buniek či inhibovať rast nádorov a predchádzať ich metastázam. Medzi ďalšie účinky patrí stimulácia a posilnenie už existujúcich obranných mechanizmov hostiteľa a niektoré antibiotiká sú taktiež silnými interkalačnými činidlami (Bhattacharya *et Mukherjee*, 2015, Gao *et al.*, 2020). Protirakovinové antibiotiká sa delia do ôsmich kategórii, ktoré sú zobrazené v Tabuľke č. 2 (Saeidnia, 2015). Prvým objaveným protinádorovým antibiotikom izolovaným z bakteriálneho druhu *Streptomyces* bol v roku 1940 aktinomycín D (Brunton *et al.*, 2006).

Tabuľka 2: Delenie antibiotík používaných na liečbu nádorových ochorení (upravené podľa Saeidnia, 2015, Gao *et al.*, 2020).

Kategória	Liečivá	Mechanizmus účinku	Klinické uplatnenie
antracyklíny	daunorubicín	interkalácia do DNA, inhibícia topoizomerázy II	rakovina prsníka, sarkómy, Hodgkinov lymfóm
	doxorubicín		
	epirubicín	interferencia s procesom transkripcie	leukémia, myelómy
glykopeptidy	bleomycín	dvojvláknové zlomy DNA	rakovina krčka maternice
neribozomálne peptidy	aktinomycín D	inhibícia funkcie RNA polymerázy a syntézy mRNA	rakovina kože, sarkómy
mitozány	mitomycín C	zastavenie mitózy a syntézy proteínov	adenokarcinóm pankreasu
endiyny	kalicheamycín	interkalácia do DNA	akútna myeloidná leukémia
indolokarbazoly	rebekamycín	inhibícia topoizomerázy I	lymfómy
epotilóny	ixabepilon	stabilizácia mikrotubulov	rakovina prsníka
ostatné činidlá	mitramycín	inhibícia syntézy DNA a RNA	rakovina kože

Antracyklíny patria v súčasnosti medzi najúčinnnejšie antineoplastické činidlá používané na liečbu mnohých typov nádorových ochorení. Pôsobia prostredníctvom viacerých mechanizmov, ktorými sú indukcia oxidačného stresu, interkalácia do DNA spôsobujúca odvíjanie dvojzávitnice DNA a najdôležitejším mechanizmom je inhibícia enzýmu topoizomerázy II. Prvými antracyklínmi uvedenými do klinickej praxe boli daunorubicín a jeho hydroxylový derivát doxorubicín (Obrázok č. 3) získané z baktérie *Streptomyces peucetius* (Bhattacharya *et al.* Mukherjee, 2015, McGowan *et al.*, 2017). Oba tieto antracyklíny dokážu v nádorových bunkách spôsobiť rezistenciu (Bhattacharya *et al.* Mukherjee, 2015). Daunorubicín v súčasnosti patrí medzi najdôležitejšie antracyklínové antibiotiká používané v klinickej praxi (Martins-Teixeira *et al.* Carvalho, 2020, Saleem *et al.* Kasi, 2023).



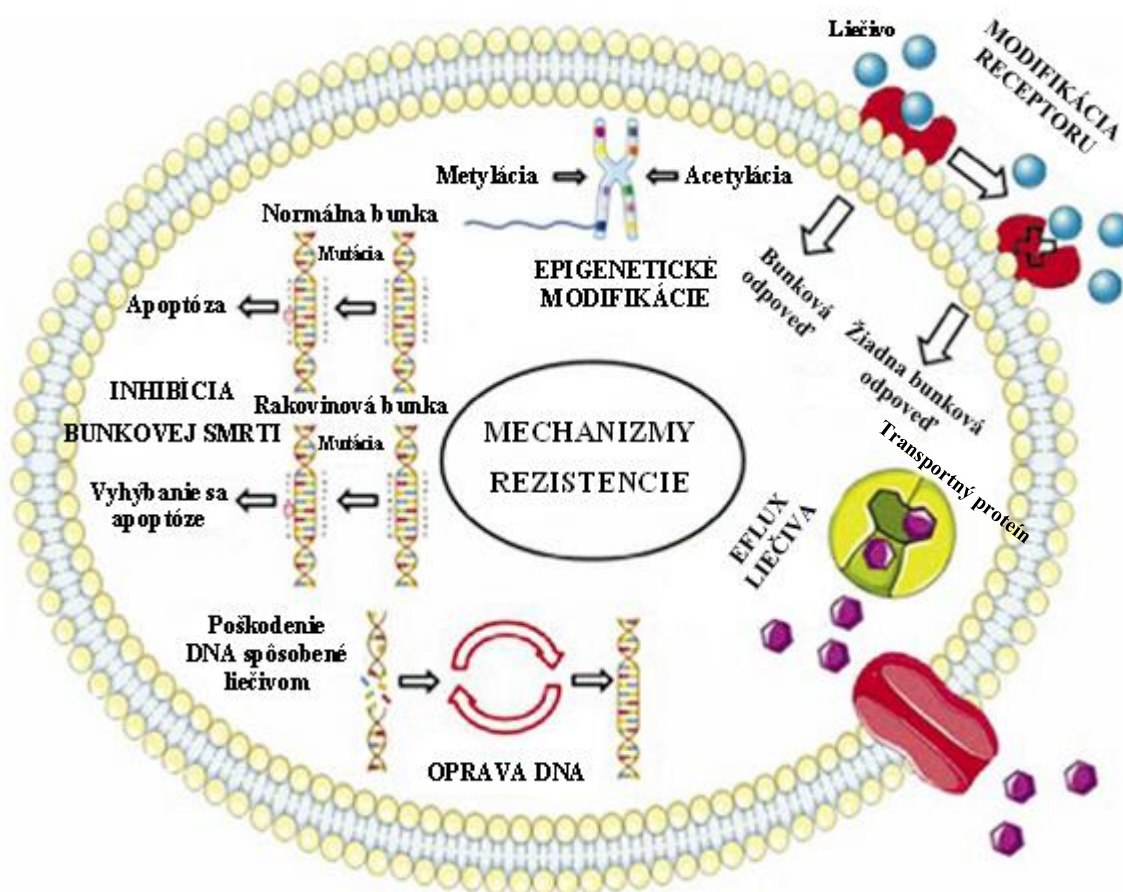
Obrázok 3: Štruktúrny vzorec daunorubicínu (1) a doxorubicínu (2).

3.1.5 Ostatné činidlá

Do tejto skupiny protirakovinových liečiv možno zaradiť napríklad hydroxymočovinu, tretionín, oxid arzenitý a inhibítory proteazómov (Amjad *et al.*, 2023). Hydroxymočovina, nealkylačné antineoplastické činidlo, je aktívna hlavne v S-fáze bunkového cyklu a spôsobuje inhibíciu syntézy DNA (Timson, 1975). Inhibítory proteazómu sa využívajú pri liečbe nádorových ochorení, pretože blokujú ubikvitín-proteázovú dráhu, ktorá sa podieľa na progresii bunkového cyklu, bránia tak proliferácii malígnych buniek a spôsobujú apoptózu selektívnu pre transformované bunky (Kisselev *et al.*, 2012).

3.2 Rezistencia voči protinádorovým liečivám

Protinádorové liečivá, primárne sa zameriavajúce na proliferujúce bunky a rôznymi mechanizmami inhibujúce replikáciu DNA, sú jedným z pilierov klinickej liečby rakoviny. V dôsledku niekoľkých intracelulárnych zmien, vrátane genetických a epigenetických zmien v signálnych dráhach, v rastových faktoroch, zmien v enzýmoch podieľajúcich sa na metabolizme liečiv a zmien v mechanizmoch efluxnej pumpy liečiva môže dôjsť k rozvoju terapeutickú rezistencie na chemoterapeutiká, aj napriek faktu, že spoiatku bola liečba účinná (Mellor *et al.*, 2008, Amaral *et al.*, 2019). Ďalšími z mechanizmov vzniku rezistencie u nádorových buniek je zmena farmakokinetiky a zmena cytokinetiky. Zmena farmakokinetiky sa prejavuje ako znížená resorpcia cytostatika, urýchlenie jeho transformácie a jeho rýchlejšia aktivácia. Pri zmene cytokinetiky dochádza k prechodu nádorových buniek do G₀ fázy bunkového cyklu, kedy je znížená citlivosť k chemoterapii (Nosková *et al.*, 2000, Rebucci *et al.*, 2013). Na Obrázku č. 4 sú zobrazené niektoré z mechanizmov vzniku rezistencie u nádorových buniek. V súčasnosti sa viac ako 90 % zlyhaní v chemoterapeutickej liečbe pripisuje liekovej rezistencii (Mansoori *et al.*, 2017).



Obrázok 4: Mechanizmy vzniku rezistencie u rakovinových buniek (upravené podľa Amaral *et al.*, 2019).

V niektorých prípadoch môže byť príčinou zlyhania liečby prítomnosť endogénnych faktorov v nádorových bunkách, ktoré existovali už pred začiatkom liečby a poskytujú rakovinovým bunkám výhodu na prežitie. V takomto prípade sa jedná o vnútornú, inak nazývanú primárnu rezistenciu. Sekundárna (získaná) rezistencia vzniká pri opakovanom vystavení protinádorovým liečivám, kedy sa aj pôvodne citlivé bunky stávajú rezistentnými. Pri liečbe môže nastať skrížená rezistencia, pri ktorej dochádza k strate citlivosti nie len k určitému cytostatiku, ale aj k väčšinou štruktúrne príbuzným cytostatikám. V prípade, že sa pri skríženej rezistencii vyskytuje rezistencia voči štruktúrne odlišným cytostatikám alebo protinádorovým liečivám, ktoré sa navzájom líšia ich mechanizmom účinku, ide o mnohopočetnú liekovú rezistenciu (multidrug resistance, MDR) (Nosková *et al.*, 2000, Rebutti *et Michiels*, 2013, Lei *et al.*, 2023).

3.2.1 Mnohopočetná lieková rezistencia

MDR voči protinádorovým liečivám je považovaná za multifaktoriálny jav a je jedným z hlavných problémov pri chemoterapii (Ozben, 2006, Amaral *et al.*, 2019). Prvýkrát bola popísaná v roku 1970, kedy bola pozorovaná skrížená rezistencia (aktinomycín D rezistentných buniek s vinblastínom a daunomycínom) na pľúcnej bunkovej línii izolovanej z čínskeho škrečka a na bunkovej línii myšej leukémie P388 (Biedler *et Riehm*, 1970).

MDR možno rozdeliť do dvoch skupín. Prvou skupinou je typická (klasická) MDR, ktorá je vyvolaná zvýšenou expresiou ATP-dependentnej membránovej pumpy – P-glykoproteínom (Pgp). Druhou skupinou je atypická MDR (at-MDR), ktorá zahŕňa rezistenciu, na ktorej sa nezúčastňuje Pgp, ale je spojená s inými proteínmi, akým je napríklad multidrug resistance associated protein (MRP) alebo izoformou enzýmu glutatión-S-transferázy (GST-p). Takisto môže byť zapríčinená poškodením štruktúry liečiva, zmenou jeho distribúcie či zmenami metabolických dráh. Dôležitým rozdielom medzi týmito dvoma skupinami MDR je, že atypická MDR sa netýka rezistencie na vinca alkaloidy (Nosková *et al.*, 2000).

Na prekonanie rezistencie, ktorá je asociovaná s ABC transportérmi boli popísané tri konvenčné stratégie: (1) vývoj inhibítorov ABC transportérov, vrátane monoklonálnych protilátok, (2) modifikácia chemoterapie na dosiahnutie vyššej dávky protinádorových liečiv a (3) inaktivácia MDR génov zacielením špecifických mRNA na posttranskripčnú modifikáciu alebo degradáciu. Štúdie však ukazujú, že inhibítory ABC transportérov vykazujú len minimálnu účinnosť pri zvrátení MDR a musia byť starostlivo preskúmané v ďalších klinických štúdiách. Boli preskúmané aj nové stratégie, ktoré zahŕňajú napríklad nanonosiče (napríklad polymérne a pevné lipidové nosiče, lipozómy, micely) či terapiu RNAi. Kombinovaná terapia nanonosičov s protinádorovými liečivami alebo RNAi je v súčasnosti jednou z najľubnejších metód na zníženie MDR (Majidinia *et al.*, 2020).

3.2.1.1 ATP-viažuce kazetové proteíny

MDR vzniká najmä v dôsledku zvýšenej expresie transportérov z nadrodiny ATP-viažucích kazetových transportérov (ABC transportérov). ABC transportné proteíny sú zodpovedné za reguláciu distribúcie, absorpcie a vylučovania rôznych chemických zlúčenín. Fyziologicky je ich funkciou odstraňovať z buniek xenobiotiká a toxické endogénne látky a udržiavať homeostázu. ABC transportéry chránia bunky pred smrťou spôsobenou vysokou koncentráciou liečiva tým, že energiu získanú hydrolýzou adenosíntrifosfátu (ATP) využívajú na eflux liečiva z buniek (Amaral *et al.*, 2019, Bukowski *et al.*, 2020, Vaidya *et al.*, 2022). U ľudí bolo identifikovaných 48 ABC transportérových génov kódujúcich 44 membránových proteínov, z ktorých sa 13 typov ABC transportérov priamo alebo nepriamo podieľa na rezistencií voči protinádorovým liečivám (Vaidya *et al.*, 2022, Alam *et al.*, 2023).

ABC transportéry sú tvorené dvoma transmembránovými doménami (TMD) a dvoma cytosolovými doménami (doménami viažucimi nukleotidy, NBD). Primárna sekvencia TMD je v porovnaní s NBD vysoko variabilná. TMD obsahujú hydrofóbne segmenty, ktoré preklenujú membránu a tvoria transmembránový kanál a predpokladá sa, že obsahujú miesta viažuce substrát. NBD pozostávajú z jadra typu RecA viažuceho ATP, doplneného o ABC-špecifický trojvláknový antiparalelný β -list a α -helikálnu subdoménu. Úlohou NBD je transformovať chemickú energiu ATP do proteínových konformačných zmien (Jones *et al.*, 2004, Thomas *et al.*, 2020). Rodina ABC transportérov je na základe génovej štruktúry, aminokyselinovej sekvencie a organizácie domén rozdelená do siedmich skupín (ABCA – ABCG) (Catalano *et al.*, 2022). ABCE a ABCF nie sú transportéry, ale existujú ako twin-NBD bez TMD a podieľajú sa na kontrole translácie mRNA (Thomas *et al.*, 2020).

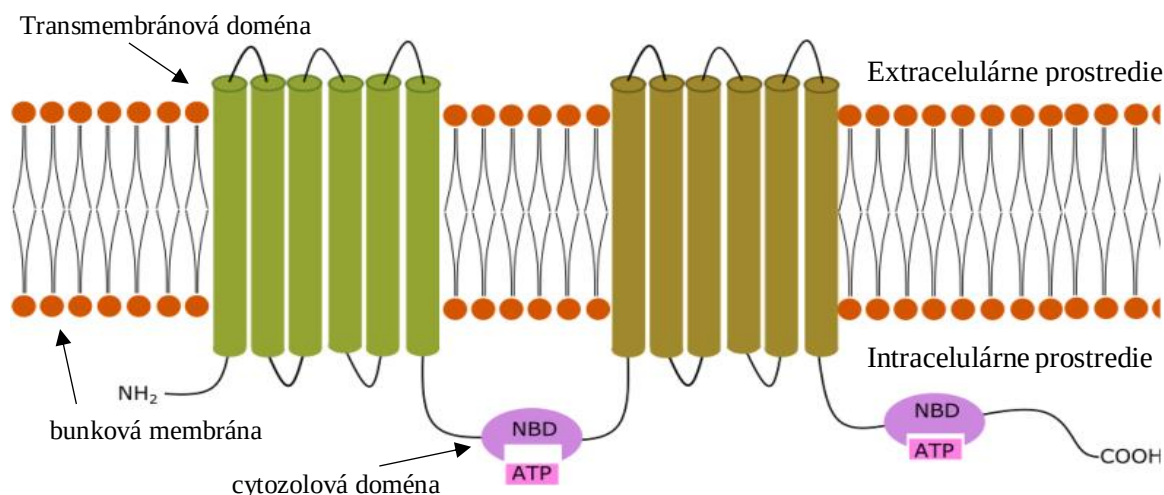
P-glykoproteín

Bolo popísaných viacero proteínov lokalizovaných v bunkách podieľajúcich sa na MDR. Prvým objaveným, klinicky najvýznamnejším a najtypickejším je P-glykoproteín (Pgp, ABCB1) – produkt *mdr1* génu s molekulovou hmotnosťou 170 kDa, ktorý bol objavený v roku 1976 Julianom a Lingom (Juliano *et al.*, 1976, Nosková *et al.*, 2000, Luqmani, 2005).

Pgp je transmembránová jednosmerná efluxná pumpa využívajúca ATP na aktívny transport látok do extracelulárneho prostredia proti koncentračnému gradientu. Molekula Pgp je tvorená 1280 aminokyselinami. ABCB1 pozostáva z dvoch homologických TMD prepojených prostredníctvom flexibilného 75-aminokyselinového proteínu, ktorý obsahuje fosforylačné miesta (fosforylácia proteínkinázou C) a dvoch NBD. Každá z TMD obsahuje šesť α -helixov preklenujúcich membránu (viď Obrázok č. 5). Transmembránové segmenty (α -helixy) formujú väzobné miesta pre substráty

a allosterické regulátory.

Terciárna štruktúra Pgp poskytuje zvýšenú flexibilitu so schopnosťou trojrozmernej reorientácie, čo umožňuje interakciu a väzbu so širokou škálou substrátov, akými sú polárne, nepochárne, hydrofóbne a aromatické zlúčeniny s rôznymi molekulovými hmotnosťami (Nosková *et al.*, 2000, Juvale *et al.*, 2022). Pgp je primárne lokalizovaný v plazmatickej membráne rezistentných buniek, avšak bol detegovaný aj v membráne jadra, v Golgiho aparáte, mitochondriách a v endoplazmatickom retikule (Molinari *et al.*, 2002, Munteanu *et al.*, 2006). Pgp je prítomný u rakovín odvodených z epitelových tkanív, ktoré fyziologicky exprimujú tento proteín. Vyskytuje sa aj napríklad pri leukémii, lymfóme či mnohopočetnom myelóme, kedy pri diagnóze vykazuje nízke hladiny, avšak po liečbe protinádorovými liečivami ho bunky exprimujú nadmerne (Pilotto Heming *et al.*, 2022). Protinádorovými liečivami, ktoré Pgp transportuje z buniek sú napríklad kolchicín, taxány (paklitaxel), antracyklíny (daunorubicín, doxorubicín) či vinca alkaloidy (vinblastín, vinkristín) (Chorawala *et al.*, 2012).



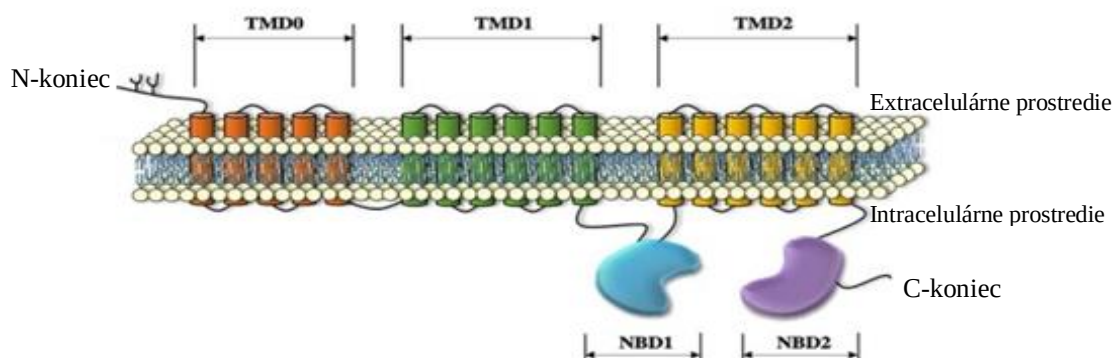
Obrázok 5: Štruktúra Pgp (upravené podľa Pilotto Heming *et al.*, 2022).

Ďalšie ABC transportéry

Ďalšími významnými zástupcami z rodiny ABC transportérov sú transportér ABCC1 (Multidrug resistance-associated protein 1, MRP1) a transportér ABCG2 (Breast cancer resistance protein, BCRP) (Mansoori *et al.*, 2017).

Podrodina ABCC transportérov je tvorená trinástimi proteínmi, z ktorých minimálne deväť sprostredkúva transmembránový eflux protinádorových liečiv, metabolitov či signálnych molekúl. Prvým identifikovaným transportným proteínom z tejto podrodiny je **MRP1** s molekulovou hmotnosťou 190 kDa kódovaný génom *ABCC1* lokalizovaný na chromozóme 16p13.1 (Cole, 2014, Wang *et al.*, 2021). V roku 1992 bola prvýkrát izolovaná cDNA MRP1, a to z buniek malobunkového

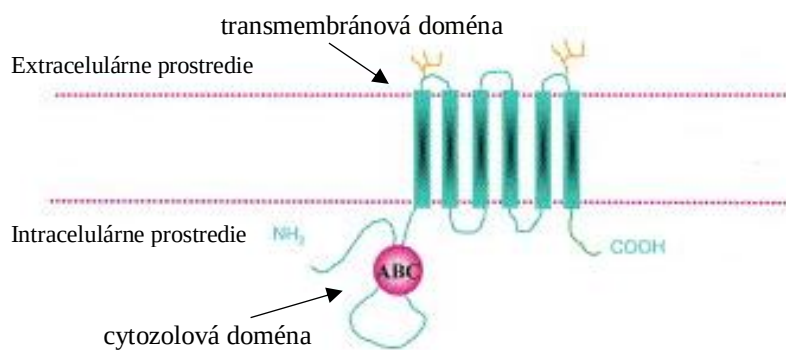
karcinómu pľúc H69AR rezistentných na doxorubicín (Cole *et al.*, 1992). MRP1 je tvorený tromi TMD (TMD0, TMD1 a TMD2) a dvoma NBD. TMD1 a TMD2 pozostávajú zo šiestich transmembránových α -helixov a TMD0 je tvorená piatimi transmembránovými α -helixami (viď Obrázok č. 6). MRP1 slúži v normálnych bunkách ako efluxná pumpa, ktorej úlohou je odčerpávať endogénne látky a xenobiotiká – vykonáva fyziologické a ochranné funkcie. Je exprimovaný v rôznych tkanivách, akými sú napríklad hematoencefalická bariéra, pľúca, obličky, črevný epitel, placenta či srdcový sval. Úroveň expresie MRP1 sa líši v závislosti od orgánu a bunkovej línie. Hematoencefalická bariéra a astrocyty vykazujú relatívne vysoké hladiny expresie MRP1, čo súvisí s ich úlohou ako chemoprotektantu. Takisto bola preukázaná aj jeho kardioprotektívna úloha, kedy v priebehu chemoterapie chráni srdce efluxom toxických produktov z buniek. Jeho nadmerná expresia je často detegovaná v nádorových bunkách, ktoré neexprimujú Pgp (He *et al.*, 2011, Lu *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2021). MRP1 transportuje z buniek protinádorové liečivá, akými sú napríklad antracyklíny (doxorubicín, daunorubicín, epirubicín), metotrexát či v malej miere aj vinblastín a paklitaxel (Cole, 2014).



Obrázok 6: Štruktúra MRP1 (upravené podľa Wang *et al.*, 2021)

BCRP je klasifikovaný ako druhý člen podrodiny G ATP-viažucich kazetových proteínov (ABCG2). Bol objavený v roku 1998, kedy bol izolovaný z bunkovej línie rakoviny prsníka MCF-7/AdrVp, po ktorej nesie svoj názov (Doyle *et al.*, 1998, Nakanishi *et al.*, 2012). BCRP je kódovaný *ABCG2* génom lokalizovaným na chromozóme 4q22, je tvorený 655 aminokyselinami a jeho molekulová hmotnosť je 72 kDa. Pozostáva z jednej TMD a jednej NBD (Natarajan *et al.*, 2012, Mao *et al.*, 2015). TMD pozostáva zo šiestich transmembránových α -helixov prepojených prostredníctvom dvoch intracelulárnych a troch extracelulárnych slučiek (viď Obrázok č. 7) (An *et al.*, 2020). *ABCG2* je fyziologicky exprimovaný v placentárnych syncytiotrofoblastoch, v obličkách, v cerebrálnom endoteli, v pečeni a v apikálnej membráne polárnych epitelových buniek (Mao *et al.*, 2015). BCRP môže transportovať veľké, hydrofóbne, kladne alebo záporne nabité molekuly, akými sú napríklad cytotoxické zlúčeniny, fluorescenčné farbivá či rôzne toxické zlúčeniny

prítomné v bežných potravinách (Sarkadi *et al.*, 2004). Medzi protinádorové liečivá transportované prostredníctvom BCRP patria napríklad irinotekan, topotekan, metotrexát či imatinib (Ni *et al.*, 2010).



Obrázok 7: Štruktúra BCRP (upravené podľa Sarkadi *et al.*, 2004).

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Na prípravu rezistentných klonov boli použité dve bunkové línie: CCRF-CEM (ATCC, USA) a K562 (ATCC, USA) – stručná charakteristika týchto bunkových línií je uvedená v Tabuľke č. 3. Bunky boli kultivované pri teplote 37 °C, 95% vlhkosti a 5% CO₂.

Tabuľka 3: Charakterizácia použitých bunkových línií.

Názov bunkovej línie	Druh usporiadania	Pôvod	Typ buniek	Kultivačné médium
CCRF-CEM	suspenzné	akútna lymfoblastická leukémia	T lymfoblasty	RPMI-1640
K562	suspenzné	chronická myeloidná leukémia	lymfoblasty	IMDM

4.2 Použité chemikálie, roztoky a protilátky

Použité chemikálie

- 10x Permeabilizačný roztok (BD, kat. č.: 340973)
- Aktinomycín D (APExBIO, kat. č.: A4448)
- Bovinný sérový albumín (BSA; Sigma-Aldrich, kat. č.: A7906)
- Cell wash (BD, kat. č.: 349524)
- Daunorubicín hydrochlorid (Pfizer, kat. č.: 44/0321/91-C/S)
- Dimetylsulfoxid (DMSO; Serva, kat. č.: 20385.01)
- Doxorubicín (Pharmagen, kat. č.: 44/ 315/15-C)
- Fenazín methosulfát (PMS; Sigma-Aldrich, kat. č.: P9625)
- Fetálne bovinne sérum (FBS; Thermo Fisher Scientific, kat. č.: 10270)
- Gemcitabín hydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. č.: G6423)
- Irinotekan hydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. č.: I1406)
- Kolchicín (Sigma-Aldrich, kat. č.: C9754)
- Metanol (Penta Chemicals, kat. č.: 21210-11000)
- Mitomycín C (APExBIO, kat. č.: A4452)
- MTS reakčný prášok (Promega, kat. č.: G1111)
- Nokodazol (Sigma-Aldrich, kat. č.: M1404)
- Oktylfenoxypolyetoxyetanol (NP-40; Sigma-Aldrich, kat. č.: 74385)
- Paklitaxel (Sigma-Aldrich, kat. č.: T7191)

- Proteináza K (Sigma-Aldrich, kat. č.: P6556)
- Saturačný reagent pre FC receptor (SouthernBiotech, kat. č.: 5200-01)
- Sterilná deionizovaná voda
- Vinblastín sulfát (Ontario chemicals, kat. č.: A68406)
- Vinkristín (Teva Pharmaceuticals, kat. č.: 44/089/99-C)

Použité roztoky

- Blokovací roztok (100 ml roztoku Cell wash, 500 mg BSA)
- 1x Fosfátový pufr (PBS; 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 1 l sterilnej deionizovanej vody)
- 1x Permeabilizačný roztok (10x Permeabilizačný roztok bol nariedený 10-krát sterilnou deionizovanou vodou pre tkanivové kultúry)
- Lyzačný pufr (1 ml 1 mol/l TRIS-HCl, 1 ml 5 mol/l KCl, 1 ml TRITON X-100, 97 ml sterilnej deionizovanej vody pre tkanivové kultúry)
- Lyzačný pufr s proteinázou K (1045 µl lyzačného pufru, 55 µl proteinázy K)
- Premývací pufr (20 ml roztoku Cell wash, 100 mg BSA, 20 µl NP-40)
- Roztok MTS (2 g reakčného prášku MTS boli rozpustené v 1 litri 1x PBS za vzniku roztoku s koncentráciou 2 mg/ml, pH roztoku bolo upravené na hodnotu 6 – 6,5 pomocou 1 mol/l HCl. Roztok bol prefiltrovaný cez filter a rozdelený po 100 ml do sklenených fliaš obalených alobalom a zamrazený pri teplote – 80 °C. Pred použitím bol do 100 ml roztoku MTS pridaný 1 ml PMS.)
- Saturačný roztok pre FC receptory (10 µl saturačného reagentu pre FC receptor, 30 µl blokovacieho roztoku/1 vzorka)

Použité protilátky

- Primárna protilátka – Monoclonal Anti-P-glycoprotein (MDR) antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich, kat. č.: P7965)
 - Sekundárna protilátka – Anti-Mouse IgG (whole molecule) F(ab')₂ fragment – FITC antibody produced in sheep (Sigma-Aldrich, kat. č.: F2883)
- Obe protilátky boli nariedené v pomere 1:250 v blokovacom roztoku.
- Izotypová kontrola – IgG2b Isotype Control from murine myeloma (Sigma-Aldrich, kat. č.: M5534)
- Izotypová kontrola bola nariedená v pomere 1:140,8 v blokovacom roztoku.

Použité kultivačné média

- RPMI-1640 – RPMI-1640 s L-glutamínom (Lonza, kat. č.: 12-702F), 10% FBS
- IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium s HEPES a L-glutamínom (Lonza, kat. č.: 12-722F), 10% FBS

4.3 Použité prístroje a zariadenia

- Analytické váhy (Scaltech)
- Automatické mikropipety (Eppendorf)
- Centrifúga 5810R (Eppendorf)
- CO₂ inkubátor HeraCell 150 (Thermo Fisher Scientific)
- Echo 550 (LabCyte)
- EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)
- Laminárny box FlowBox HeraSafe (Thermo Fisher Scientific)
- Mikrocentrifúga Multi-spin PCV-6000 (Grant Instruments Ltd)
- Multidrop Combi pipetor (Thermo Fisher Scientific)
- SteriStore Incubator (HighResBiosolutions)
- Svetelný mikroskop (Olympus)
- Temperovaný vodný kúpeľ (Mettler WNB)
- Tundra Store chladiaci inkubátor (HighResBiosolutions)
- Vi-Cell XR (Beckman Coulter)
- Vortex IKA Genius 3 (P-LAB)
- PlateLoc Thermal Microplate Sealer (Agilent Technologies)
- Prietokový cytometer FACSCalibur (BD Biosciences)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

Pasážovanie bunkových línii

Bunkové línie boli kultivované v 6-jamkových doskách, respektíve v plastových kultivačných fľašiach s rastovou plochou 25 cm², v rastovom médiu bez prítomnosti antibiotík a boli uchovávané v CO₂ inkubátore pri teplote 37 °C. Bunky boli pasážované trikrát do týždňa, aby nedošlo k spotrebovaniu živín z média a odumieraniu buniek.

Pred samotným pasážovaním boli bunky prehliadnuté pod mikroskopom pri 10-násobnom zväčšení, kde bol zistený ich tvar a konfluencia. Následne bola bunková suspenzia prenesená do 50 ml

kónickej skúmavky. V priebehu selekcie rezistentných klonov sa bunky postupne stávali semi-adherentnými. Z toho dôvodu boli bunky pred zliatím do 50 ml skúmavky opatrne zoškriabané sterilnou plastovou stierkou z povrchu kultivačnej nádoby.

Z bunkovej suspenzie bolo odobraných 500 µl do kyvety a využitím prístroja Vi-CELL bola zistená viabilita buniek a koncentrácia buniek na mililiter. Skúmavky s bunkovými suspenziami boli umiestnené do centrifúgy a stočené pri 1500 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol supernatant zliaty do odpadu a bunky boli resuspendované v 5 ml čerstvého média. Na základe koncentrácie buniek zistenej pomocou prístroja Vi-CELL bolo do kultivačnej nádoby pridané vypočítané množstvo bunkovej suspenzie z centrifugačnej skúmavky a objem bol doplnený do 5 ml čerstvým kultivačným médiom. Na záver boli bunky skontrolované pod mikroskopom a kultivačná nádoba bola umiestnená naspäť do inkubátora.

Test na detekciu mykoplazmy

Kontaminácia mykoplazmou môže mať za následok výrazné kvantitatívne a kvalitatívne zmeny v metabolizme bunkových línií a rovnako ovplyvňuje aj fenotypové charakteristiky buniek. Z toho dôvodu boli kultivované bunkové línie pravidelne testované na mykoplazmu.

Bunkové línie boli prenesené do 50 ml kónických skúmaviek rovnakým postupom ako pri ich pasážovaní. Do kyvety bolo odobraných 500 µl bunkovej suspenzie na zistenie koncentrácie buniek pomocou prístroja Vi-Cell. Na základe zmeranej koncentrácie buniek bol do 15 ml skúmavky prenesený objem bunkovej suspenzie tak, aby obsahoval 250 000 buniek. Nasledovalo stočenie skúmavky v centrifúge pri 2 000 RPM po dobu 5 minút pri izbovej teplote. Po zliatí supernatantu boli bunky resuspendované v 100 µl lyzačného pufru s proteínázou K. Obsah skúmavky bol prenesený do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky. Mikrocentrifugačná skúmavka bola inkubovaná pri 37 °C počas noci a posledných 10 minút inkubácie prebehlo pri teplote 95 °C. Na záver bola prevedená polymerázová reťazová reakcia (PCR).

Stanovenie koncentrácie použitých protinádorových liečiv na selekciu rezistentných klonov

Koncentrácie protinádorových liečiv – paklitaxelu použitého na prípravu rezistentných klonov bunkovej línie CCRF-CEM a daunorubicínu použitého na prípravu rezistentných klonov bunkovej línie K562 boli zistené prostredníctvom MTS testu. MTS test je kolorimetrický test, ktorý je založený na redukcii 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfenyl)-2H-tetrazólia (MTS) metabolicky aktívnymi bunkami na purpurový formazan rozpustný v kultivačnom médiu. Premenu MTS na formazan zabezpečujú enzýmy NADPH-dependentné dehydrogenázy prítomné v metabolicky

aktívnych bunkách. Absorbancia purpurového formazanu je meraná pri vlnovej dĺžke 490 nm a jeho množstvo je priamo úmerné počtu živých buniek v kultúre.

Na MTS test boli použité 384-jamkové doštičky. Koncentrácia buniek v suspenziách bola v prípade bunkovej línie CCRF-CEM 4×10^4 buniek/ml a koncentrácia $2,7 \times 10^4$ buniek/ml v prípade bunkovej línie K562. Pomocou pipetovacieho prístroja Multidrop Combi bol do prvého a posledného stĺpca každej dosky napipetovaný blank – čisté kultivačné médium a do ostatných stĺpcov boli rozpipetované pripravené bunkové suspenzie v požadovaných koncentráciách. Doštičky boli následne na 24 hodín umiestnené do inkubátora (37 °C, 5% CO₂).

Po 24 hodinovej inkubácii boli k bunkovým suspenziám v 384-jamkových doštičkách využitím prístroja Echo 550 pridané protinádorové liečivá. K bunkám z bunkovej línie CCRF-CEM bol pridaný paklitaxel v koncentračnom rozsahu od $1,22 \times 10^{-6}$ μmol/l do 5×10^{-3} μmol/l a k bunkám z bunkovej línie K562 daunorubicín v koncentračnom rozsahu od $0,12 \times 10^{-3}$ μmol/l do 0,5 μmol/l. Cytostatiká boli testované v tetraplikátoch. Po ošetrení buniek liečivami boli doštičky umiestnené naspäť do inkubátora (37 °C, 5% CO₂) na 72 hodín. Po uplynutí inkubačnej doby bol do 384-jamkových doštičiek napipetovaný pomocou pipetovacieho prístroja Multidrop Combi roztok MTS (4 μl na jamku). Doštičky boli stočené (1500 RPM, 1 minúta) a vložené naspäť do inkubátora. Na prístroji EnVision Multimode Plate Reader bola následne stanovená absorbancia pri vlnovej dĺžke 490 nm v jednotlivých jamkách.

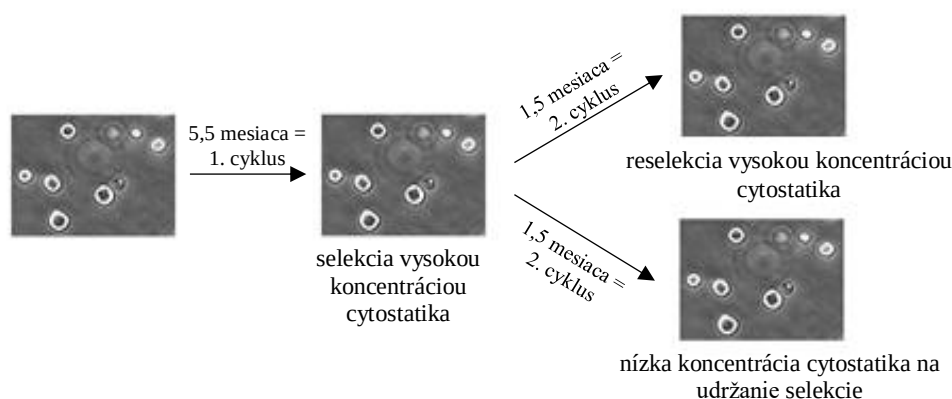
Vyhodnotením MTS testu v programe Dotmatics bola zistená hodnota polovičnej inhibičnej koncentrácie IC₅₀. Táto hodnota udáva pri akej koncentrácii liečiva dôjde u buniek k 50% inhibícii biologických procesov v bunke, prípadne k apoptóze.

Selekcia rezistentných klonov

Na prípravu rezistentných klonov bol zvolený rýchlejší postup, a to kultivácia buniek v prítomnosti vysokých koncentrácií (vysoká koncentrácia = IC₉₀) testovaných protinádorových liečiv. V predchádzajúcom kroku boli pre obe protinádorové liečivá použité na selekciu rezistentných klonov stanovené koncentrácie zodpovedajúce koncentrácii IC₉₀. Pre paklitaxel to bola koncentrácia 0,0045 μmol/l (IC₉₀, ďalej len: „vysoká koncentrácia paklitaxelu“) a pre daunorubicín to bola koncentrácia 0,09 μmol/l (IC₉₀, ďalej len: „vysoká koncentrácia daunorubicínu“). V prvom cykle selekcie boli bunky stanovenými koncentráciami protinádorových liečiv ovplyvňované 24 hodín, a to vždy, keď ich vitalita dosiahla aspoň 90 % počas 5,5 mesiaca. V priebehu prvého cyklu boli bunky bunkovej línie K562 ovplyvnené vysokou koncentráciou daunorubicínu šesťkrát a bunky bunkovej línie CCRF-CEM boli ovplyvnené vysokou koncentráciou paklitaxelu sedemkrát. Takto pripravené klony boli zamrazené.

Po rozmrazení pripravených klonov – v druhom cykle selekcie sa selektivita počas 1,5 mesiaca

udržiavala pridávaním nízkej koncentrácie protinádorových liečiv. Pre paklitaxel to bola koncentrácia $0,75 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$ (IC_{10} , ďalej len: „nízka koncentrácia paklitaxelu“) a pre daunorubicín to bola koncentrácia $0,01 \mu\text{mol/l}$ (IC_{10} , ďalej len: „nízka koncentrácia daunorubicínu“). Danými koncentráciami boli bunky ovplyvňované kontinuálne, každú pasáž. Počas 1,5 mesačnej kultivácie došlo ešte k ďalšej reselekcii vysokou koncentráciou cytostatík. Schéma priebehu selekcie rezistentných klonov je zobrazená na Obrázku č. 8.



Obrázok 8: Schéma priebehu selekcie rezistentných klonov.

Stanovenie miery rezistencie selektovaných klonov prostredníctvom MTS testu

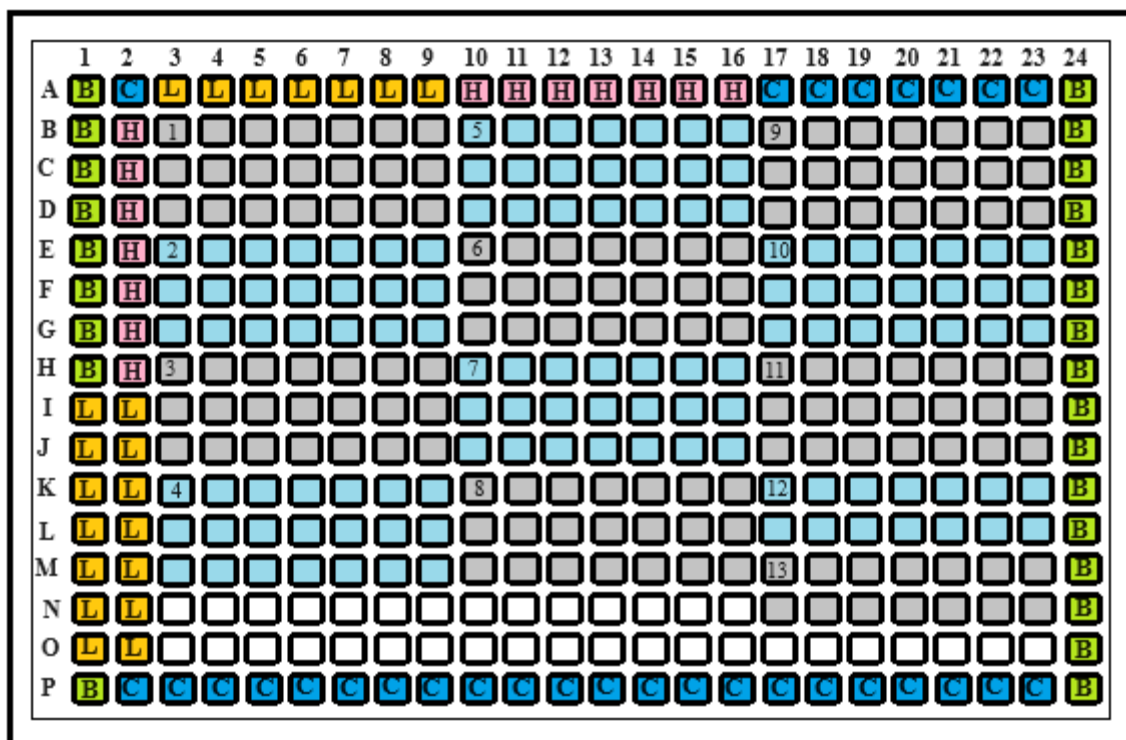
Miera rezistencie selektovaných klonov bola stanovená využitím MTS testu v 384-jamkovom formáte. Pomocou pipetovacieho prístroja Multidrop Combi bol do prvého a posledného stĺpca každej dosky napipetovaný blank – čisté kultivačné médium a do ostatných stĺpcov boli rozpipetované pripravené bunkové suspenzie v požadovaných koncentráciách. V prípade bunkovej línie CCRF-CEM bola koncentrácia bunkovej suspenzie 4×10^4 buniek/ml a koncentrácia $2,7 \times 10^4$ buniek/ml v prípade bunkovej línie K562. Doštičky boli následne na 24 hodín umiestnené do inkubátora (37°C , $5\% \text{CO}_2$).

Po uplynutí 24 hodín boli pomocou prístroja Echo 550 k bunkám pridané testované látky zo zdrojovej doštičky. Protinádorové liečivá použité na test boli uchovávané v zdrojovej 384-jamkovej doštičke zalepenej hliníkovou fóliou. Zdrojová doštička bola uchovávaná v chladiacom inkubátore TundraStore pri teplote 16°C . Testované látky – kolchicín, gemcitabín, paklitaxel, vinblastín, mitomycín C, aktinomycín D, nokodazol, daunorubicín, vinkristín a doxorubicín boli na zdrojovej doštičke prítomné v 3 rozdielnych koncentráciách (viď Tabuľka č. 4). Pred použitím bola doštička stočená pri 1500 RPM po dobu 1 minúty. Objemy jednotlivých testovaných protinádorových liečiv transferových prístrojom Echo 550 spoločne s výslednými koncentráciami protinádorových liečiv v jamkách cieľových doštičiek sú uvedené v Tabuľke č. 4.

Tabuľka 4: Testované protinádorové liečivá, ich koncentrácia na zdrojovej doštičke, objem pipetovaný do cieľovej doštičky prístrojom Echo 550 a výsledná koncentrácia cytostatík v jamkách cieľovej doštičky (DNR – daunorubicín, DOXO – doxorubicín, COL – kolchicín, GEM – gemcitabín, PTX – paklitaxel, VBL – vinblastín, MMC – mitomycín C, AMD – aktinomycín D, NOC – nokodazol, VNC – vinkristín, IRT - irinotekan).

protinádorové liečivá	koncentrácia protinádorového liečiva na zdrojovej doštičke [$\mu\text{mol/l}$]			objem transferovaný prístrojom Echo 550 [nl]	výsledná koncentrácia v jamke [$\mu\text{mol/l}$]		
DNR, DOXO	0,1	1	10	150	0,5	5	50
COL, GEM	0,1	1	10	37,5	0,125	1,25	12,5
PTX, VBL	0,1	1	10	10	0,03125	0,3125	3,125
MMC, AMD	0,01	0,1	1	22,5	0,00781	0,0781	0,781
NOC, VNC	0,01	0,1	1	5	0,00195	0,0195	0,195
DNR, DOXO	0,001	0,001	0,1	15	0,00049	0,0049	0,049
IRT	0,001	0,001	0,1	5	0,00012	0,0012	0,012

Daunorubicín a doxorubicín boli testované v triplikátoch (vyššia koncentrácia na zdrojovej doštičke), tak ako aj ostatné testované látky, ale aj v duplikátoch (nižšia koncentrácia na zdrojovej doštičke). Ako negatívna kontrola bolo použité rozpúšťadlo DMSO a ako pozitívna kontrola boli použité látky aktinomycín D a mitomycín C. Doštičky boli vložené naspäť do inkubátora (37 °C, 5% CO₂) na 72 hodín. Schéma rozmiestnenia použitých kontrol a testovaných protinádorových liečiv na cieľovej 384-jamkovej doštičke je znázornená na Obrázku č. 9.



Obrázok 9: Rozloženie látok na cieľovej 384-jamkovej doštičke (B – blank, C – kontrola = bunková suspenzia bez pridaných látok, L – pozitívna kontrola, H – negatívna kontrola, 1 – kolchicín, 2 – gemcitabín, 3 – paklitaxel, 4 – vinblastín, 5 – mitomycín C, 6 – aktinomycín D, 7 – nokodazol, 8 – irinotekan, 9 – daunorubicín, 10 – vinkristín, 11 – doxorubicín, 12 – daunorubicín, 13 – doxorubicín).

Po 72 hodinách bol do 384-jamkových doštičiek s bunkovými suspenziami ošetrovanými cytostatikami napipetovaný roztok MTS (4 μ l/jamku) pomocou pipetovacieho prístroja Multidrop Combi. Doštičky boli stočené (1500 RPM, 1 minúta) a vložené naspäť do inkubátora. Na záver, približne po 2 až 6 hodinách inkubácie, bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 490 nm v jednotlivých jamkách na prístroji EnVision Multimode Plate Reader a test bol vyhodnotený využitím programu Dotmatics, kde bola stanovená hodnota polovičnej inhibičnej koncentrácie IC₅₀.

Na stanovenie signifikantného rozdielu hodnôt IC₅₀ parentálnych buniek a selektovaných klonov bol použitý štatistický t-test. Výsledkom porovnania dvoch výberov je p-hodnota. V prípade, že je p-hodnota menšia ako 0,05, považuje sa za štatisticky významnú. Pri uvádzaní p-hodnôt sa používa systém hodnotenia pomocou hviezdíčiek, ak je $p < 0,05$ je označenie *, $p < 0,01$ je označenie ** a ak je $p < 0,001$ používa sa označenie ***.

Analýza Pgp prietokovou cytometriou

Na analýzu expresie Pgp prítomného v membránach buniek bola využitá prietoková cytometria. Na analýzu boli použité 2 milióny buniek selektovaných protinádorovými liečivami. Ako kontrola

slúžili parentálne bunky oboch bunkových línií.

Bunky boli stočené (pri 500 g po dobu 5 minút) v chladenej centrifúge a bolo odstránené kultivačné médium. Následne boli premyté 1x PBS, opäť stočené (5 minút pri 500 g) a zafixované v metanole. Zafixované bunky boli premyté 2 ml roztoku Cell wash a stočené v centrifúge (5 minút pri 500 g) – rovnaké podmienky centrifugácie boli dodržané pri celom experimente. K peletu bolo pridaných 500 μ l permeabilizačného roztoku a zmes bola inkubovaná 10 minút v tme. Následne boli skúmavky zcentrifugované a premyté 2 ml premývacieho roztoku. Zmes bola zcentrigugovaná a bolo pridaných 40 μ l saturačného reagentu pre FC receptor. Skúmavky boli uložené do tmy, kde boli inkubované po dobu 10 minút. Bunky boli premyté 2 ml premývacieho roztoku a rozdelené do duplikátov po 1 ml – do prvej sady bolo pridaných po 40 μ l izotypovej kontroly a do druhej sady skúmaviek bolo pridaných po 40 μ l roztoku primárnej protilátky pre Pgp. Zmes bola inkubovaná 30 minút v tme.

Bunky boli opäť premyté 2 ml premývacieho roztoku, stočené a do oboch sád skúmaviek bolo pridaných po 40 μ l sekundárnej protilátky. Zmes bola inkubovaná 30 minút v tme. Po uplynutí inkubačnej doby boli bunky premyté, stočené a resuspendované v 500 μ l blokovacieho roztoku. Bunky boli približne na hodinu umiestnené do chladničky a následne bola prevedená analýza na prietokovom cytometri.

5 Výsledky

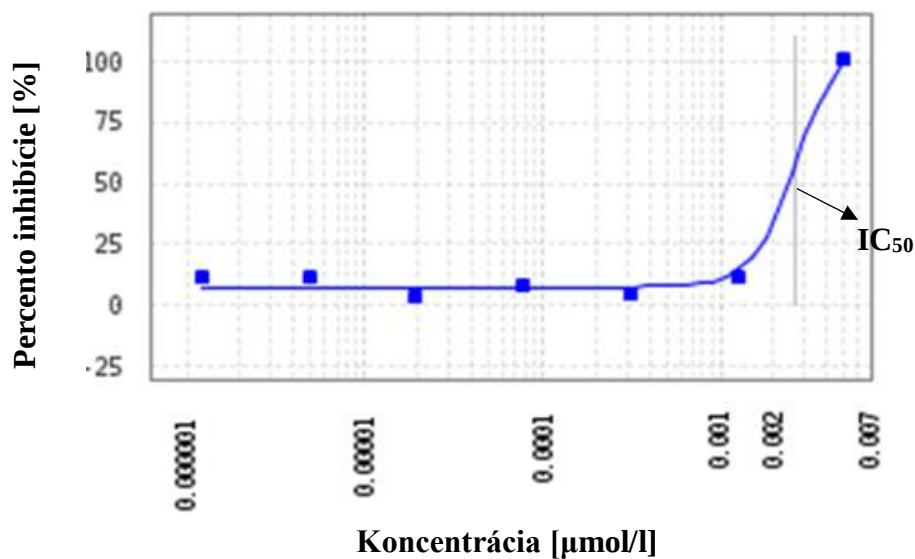
5.1 Stanovenie koncentrácie protinádorových liečiv potrebných na selekciu rezistentných klonov

Koncentrácie protinádorových liečiv potrebné na selekciu rezistentných klonov boli zistené prostredníctvom MTS testu prevedeného na parentálnych bunkách bunkových línií CCRF-CEM a K562. Vyhodnotením MTS testu v programe Dotmatics boli zistené hodnoty polovičnej inhibičnej koncentrácie IC_{50} . Hodnoty IC_{50} predstavujú mieru cytotoxicity protinádorových liečiv na parentálne bunky. Ich spriemerovaním (viď Tabuľka č. 5) bola stanovená hodnota IC_{50} pre paklitaxel a daunorubicín.

Tabuľka 5: Hodnoty IC_{50} parentálnych buniek bunkových línií CCRF-CEM a K562 po ich ovplyvnení príslušným protinádorovým liečivom (IC_{50} – polovičná inhibičná koncentrácia, sd – smerodajná odchýlka).

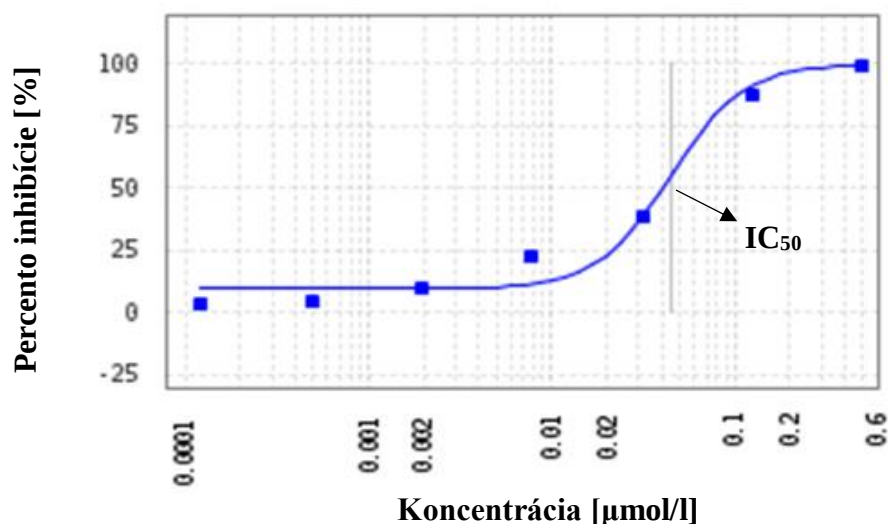
bunková línia CCRF-CEM			bunková línia K562		
hodnoty IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	priemerná hodnota IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	sd	hodnoty IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	priemerná hodnota IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	sd
0,0027	0,0027	0,0002	0,0408	0,0432	0,0024
0,0024			0,0416		
0,0027			0,0444		
0,0028			0,0459		

V prípade bunkovej línie CCRF-CEM bola zistená hodnota IC_{50} rovná $0,0027 \pm 0,0002 \mu\text{mol/l}$. Z grafu koncentračnej závislosti (viď Graf č. 1) bola odčítaná koncentrácia liečiva – paklitaxelu, ktorá odpovedá 10% a 90% inhibičnej koncentrácii – jednalo sa o koncentrácie: $0,75 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$ (IC_{10} , nízka koncentrácia paklitaxelu) a $0,0045 \mu\text{mol/l}$ (IC_{90} , vysoká koncentrácia paklitaxelu). Tieto koncentrácie boli použité na prípravu rezistentných klonov.



Graf 1: Parentálne bunky bunkovej línie CCRF-CEM po ošetroaní paklitaxelom.

V prípade bunkovej línie K562 bola zistená hodnota IC_{50} rovná $0,0432 \pm 0,0024$ µmol/l. Z grafu koncentračnej závislosti (viď Graf č. 2) bola odčítaná koncentrácia liečiva – daunorubicínu zodpovedajúca 10% a 90% inhibičnej koncentrácii – jednalo sa o koncentrácie: 0,01 µmol/l (IC_{10} , nízka koncentrácia daunorubicínu) a 0,09 µmol/l (IC_{90} , vysoká koncentrácia daunorubicínu). Uvedené koncentrácie daunorubicínu boli použité na prípravu rezistentných klonov.



Graf 2: Parentálne bunky bunkovej línie K562 po ošetroaní daunorubicínom.

5.2 Selekcia rezistentných klonov

Rezistentné klony boli pripravené opakovaným vystavením bunkovej kultúry vysokým koncentráciám protinádorového liečiva. V prípade bunkovej línie CCRF-CEM išlo o paklitaxel (0,0045 $\mu\text{mol/l}$) a bunková línia K562 bola ovplyvňovaná daunorubicínom (0,09 $\mu\text{mol/l}$). Rezistentné bunky boli selektované v priebehu približne siedmich mesiacov v dvoch cykloch.

5.3 Stanovenie miery rezistencie selektovaných klonov testom cytotoxicity

Miera rezistencie selektovaných klonov bola stanovená prostredníctvom MTS testu. Bunkové línie boli vystavené nie len protinádorovým liečivám, ktorými boli selektované rezistentné klony, ale aj ďalším cytostatikám (kolchicínu, gemcitabínu, vinblastínu, mitomycínu C, aktinomycínu D, nokodazolu, irinotekanu, vinkristínu a doxorubicínu), aby sa overila prípadná skrížená rezistencia či MDR.

MTS test bol vyhodnotený využitím programu Dotmatics, kde bola stanovená hodnota polovičnej inhibičnej koncentrácie IC_{50} . Pomocou hodnoty IC_{50} bola porovnaná citlivosť selektovaných rezistentných klonov s citlivosťou ich parentálnych línií voči testovaným protinádorovým liečivám. Porovnaním týchto hodnôt bol stanovený pokles/nárast rezistencie u selektovaných klonov. Na vyhodnotenie signifikantného rozdielu hodnôt IC_{50} parentálnych buniek a selektovaných klonov bol použitý štatistický t-test, ktorého výsledkom je p-hodnota. Pri uvádzaní p-hodnôt sa používa systém hodnotenia pomocou hviezdíčiek, ak je $p < 0,05$ je označenie *, $p < 0,01$ je označenie ** a ak je $p < 0,001$ používa sa označenie ***.

5.3.1 Vyhodnotenie testu cytotoxicity pre bunkovú líniu CCRF-CEM

V prípade bunkovej línie CCRF-CEM ovplyvňovanej v priebehu selekcie rezistentných klonov vysokou koncentráciou paklitaxelu v prvom cykle a následne kultivovanej v prítomnosti nízkej koncentrácie paklitaxelu v druhom cykle nedošlo k žiadnemu, prípadne len minimálnemu nárastu rezistencie voči testovaným protinádorovým liečivám v porovnaní s bunkami parentálnej línie (viď Tabuľku č. 6).

Tabuľka 6: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie CCRF-CEM a ich klony selektované vysokou koncentráciou paklitaxelu v prvom cykle a následne kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie paklitaxelu v druhom cykle (IC_{50} – polovičná inhibičná koncentrácia, sd – smerodajná odchýlka, p-hodnota: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

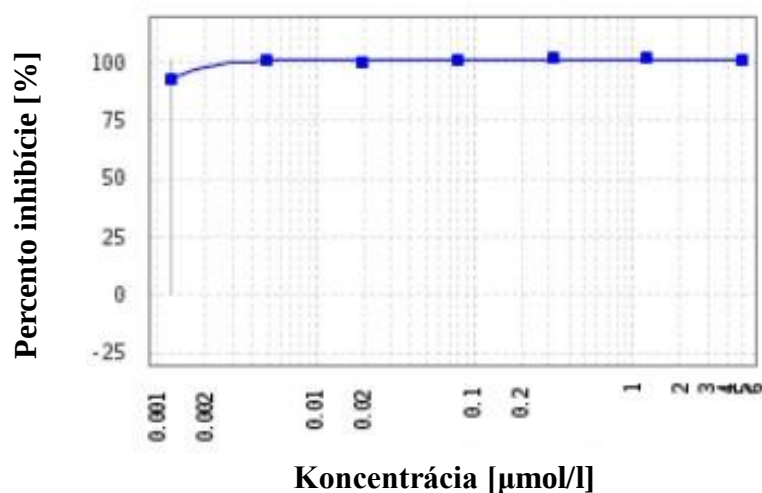
bunková línia CCRF-CEM						
	parentálne bunky		bunky selektované paklitaxelom			
Testované látky	IC_{50} [μ mol/l]	sd	IC_{50} [μ mol/l]	sd	Nárast rezistencie	P-hodnota
Paklitaxel	< 0,0012	-	< 0,0012	-	-	-
Vinblastín	< 0,0012	-	0,0013	0,0002	1,0833	0,3739
Vinkristín	< 0,0012	-	< 0,0012	-	-	-
Nokodazol	0,0367	0,0042	0,0402	0,0049	1,0954	0,3977
Kolchicín	0,0089	0,0013	0,0089	0,0004	1,0000	0,9441
Irinotekan	0,3153	0,0292	0,3080	0,0407	0,9768	0,8128
Gemcitabín	0,0092	0,0035	0,0047	0,0005	0,5109	0,0962
Daunorubicín	0,0060	0,0005	0,0053	0,0006	0,8833	0,3349
Doxorubicín	0,0004	0,0001	< 0,0001	-	< 0,2500	0,0189 *
Mitomycín C	0,0048	0,0004	< 0,0012	-	< 0,2500	0,0001 ***
Aktinomycín D	< 0,0012	-	< 0,0012	-	-	-

Mierne vyššia rezistencia (vid' Tabuľka č. 7) bola pozorovaná u buniek, ktoré boli selektované vysokou koncentráciou paklitaxelu v dvoch cykloch. Najvyššia rezistencia bola dosiahnutá voči vinca alkaloidom (vinblastínu a vinkristínu), ktoré patria do rovnakej skupiny protinádorových liečiv a majú podobný mechanizmus účinku ako paklitaxel, ktorý bol použitý na selekciu týchto rezistentných klonov. Taktiež bol pozorovaný aj jemný nárast rezistencie na daunorubicín, kolchicín a irinotekan.

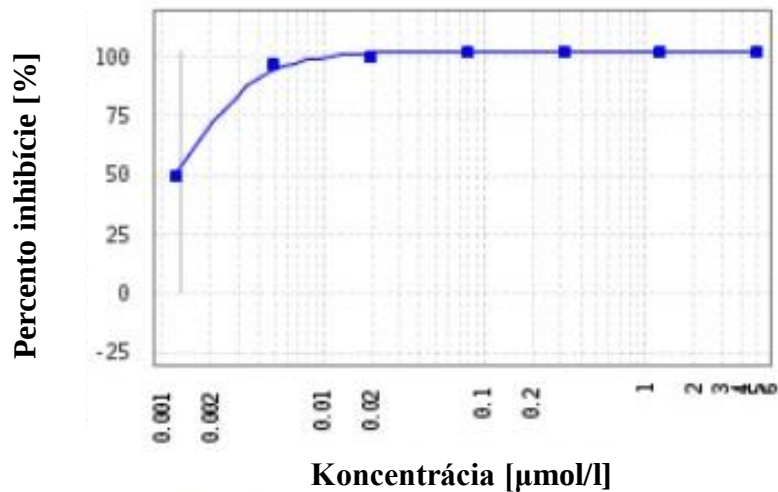
Tabuľka 7: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie CCRF-CEM a ich klony selektované vysokou koncentráciou paklitaxelu v dvoch cykloch (IC_{50} – polovičná inhibičná koncentrácia, sd – smerodajná odchýlka, p -hodnota: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

bunková línia CCRF-CEM						
	parentálne bunky		bunky selektované paklitaxelom			
Testované látky	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	sd	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	sd	Nárast rezistencie (x-krát)	P-hodnota
Paklitaxel	$< 0,0012$	-	0,0012	0,0001	$> 1,0000$	0,3739
Vinblastín	$< 0,0012$	-	0,0066	0,0002	$> 5,5000$	$8,62 \cdot 10^{-7} ***$
Vinkristín	$< 0,0012$	-	0,0085	0,0011	$> 7,0833$	0,0003 ***
Nokodazol	0,0367	0,0042	0,0359	0,0066	0,9782	0,8676
Kolchicín	0,0089	0,0013	0,0151	0,0014	1,6966	0,0049 **
Irinotekan	0,3153	0,0292	0,4902	0,0940	1,5547	0,0369 *
Gemcitabín	0,0092	0,0035	0,0081	0,0009	0,8804	0,6240
Daunorubicín	0,0060	0,0005	0,0118	0,0014	1,9667	0,0325 *
Doxorubicín	0,0004	0,0001	$< 0,0001$	-	$< 0,2500$	0,0189 *
Mitomycín C	0,0048	0,0004	0,0056	0,0009	1,1667	0,5736
Aktinomycín D	$< 0,0012$	-	$< 0,0012$	-	-	-

Malý posun v rezistencii na paklitaxel bolo možné pozorovať porovnaním Grafu č. 3 a Grafu č. 4, kde je viditeľný posun v rezistencii na základe zmeny sklonu krivky. Parentálne bunky boli viac citlivejšie na nižšie koncentrácie paklitaxelu ako selektované rezistentné klony.



Graf 3: Graf závislosti percenta inhibície na koncentrácii paklitaxelu u parentálnych buniek bunkovej línie CCRF-CEM.



Graf 4: Graf závislosti percenta inhibície na koncentrácii paklitaxelu u selektovaných rezistentných klonov bunkovej línie CCRF-CEM ovplyvňovaných vysokou koncentráciou paklitaxelu v dvoch cykloch.

5.3.2 Vyhodnotenie testu cytotoxicity pre bunkovú líniu K562

Výsledky MTS testu ukazujú, že bunková línia K562 si vytvorila rezistenciu na protinádorové liečivo daunorubicín aj v prípade, keď boli bunky v druhom cykle selekcie kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu. Takto selektované klony si vybudovali rezistenciu na daunorubicín, aktinomycín D, paklitaxel, vinkristín a kolchicín (viď Tabuľku č. 8).

Tabuľka 8: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie K562 a ich klony ovplyvňované v prvom cykle vysokou koncentráciou daunorubicínu a následne kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu v druhom cykle (IC_{50} – polovičná inhibičná koncentrácia, sd – smerodajná odchýlka, p-hodnota: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

bunková línia K562						
	parentálne bunky		bunky selektované daunorubicínom			
Testované látky	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	sd	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	sd	Nárast rezistencie (x-krát)	P-hodnota
Daunorubicín	0,0430	0,0058	0,0890	0,0127	2,0698	0,0047 **
Doxorubicín	0,0650	0,0005	0,0684	0,0020	1,0523	0,0453 *
Mitomycín C	0,0503	0,001	0,0626	0,0090	1,2445	0,0779
Aktinomycín D	< 0,0012	-	0,0035	0,0012	> 2,9167	0,0303 *
Paklitaxel	< 0,0012	-	0,0282	0,0038	> 23,5000	0,0002 ***
Vinblastín	< 0,0012	-	< 0,0012	-	-	-
Vinkristín	< 0,0012	-	0,0018	0,0005	> 1,5000	0,1180
Nokodazol	0,0419	0,0003	0,0190	0,0022	0,4535	$6,01 \cdot 10^{-5}$ ***
Kolchicín	0,0116	0,0005	0,0219	0,0051	1,8879	0,0256 *
Gemcitabín	0,0791	0,0056	0,0741	0,0029	0,9368	0,2378
Irinotekan	3,2457	0,2699	2,9960	0,3763	0,9231	0,4033

Väčšiu rezistenciu vykazovali, tak ako aj v prípade bunkovej línie CCRF-CEM, selektované klony, ktoré boli ovplyvňované vysokou koncentráciou daunorubicínu v dvoch cykloch. Tieto bunky boli rezistentné na daunorubicín, doxorubicín, aktinomycín D, paklitaxel, vinblastín, vinkristín a kolchicín (viď Tabuľku č. 9).

Tabuľka 9: Hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky bunkovej línie K562 a ich klony selektované vysokou koncentráciou daunorubicínu v dvoch cykloch (IC_{50} – polovičná inhibičná koncentrácia, sd – smerodajná odchýlka, p -hodnota: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

bunková línia K562						
	parentálne bunky		bunky selektované daunorubicínom			
Testované látky	IC_{50} [μ mol/l]	sd	IC_{50} [μ mol/l]	sd	Nárast rezistencie (x-krát)	P-hodnota
Daunorubicín	0,0310	0,0012	0,1475	0,0422	4,7581	0,0598
Doxorubicín	0,0650	0,0005	0,1620	0,0633	2,4923	0,0567
Mitomycín C	0,0503	0,0010	0,0694	0,0159	1,3797	0,1067
Aktinomycín D	< 0,0012	-	0,0040	0,0013	> 3,3333	0,0229 *
Paklitaxel	< 0,0012	-	0,0380	0,0021	> 31,6667	$7,23 \cdot 10^{-6} ***$
Vinblastín	< 0,0012	-	0,0030	0,0009	> 2,500	0,0295 *
Vinkristín	< 0,0012	-	0,0116	0,0004	> 9,6667	$1,60 \cdot 10^{-6} ***$
Nokodazol	0,0419	0,0003	0,0213	0,0007	0,5084	$1,33 \cdot 10^{-6} ***$
Kolchicín	0,0116	0,0005	0,0248	0,0053	> 2,1379	0,0129 *
Gemcitabín	0,0791	0,0056	0,0686	0,0146	0,8673	0,3095
Irinotekan	3,2457	0,2699	4,3383	0,1319	1,3367	0,0032 **

5.4 Analýza expresie Pgp prietokovou cytometriou

Analýza expresie Pgp bola založená na väzbe špecifických protilátok – primárnej a fluorescenčne značenej sekundárnej protilátke na Pgp a následnej analýze prietokovou cytometriou.

Na analýzu expresie Pgp boli vybrané bunky, ktoré vykazovali najvyššiu mieru rezistencie pri MTS teste. V prípade bunkovej línie CCRF-CEM to boli bunky selektované vysokou koncentráciou paklitaxelu v dvoch cykloch a v prípade bunkovej línie K562 to boli bunky selektované vysokou koncentráciou daunorubicínu v dvoch cykloch a klony selektované v prvom cykle vysokou koncentráciou daunorubicínu a následne kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu v druhom cykle. Ako kontrola boli použité parentálne bunky oboch bunkových línií. Výsledky nárastu expresie Pgp u selektovaných rezistentných klonov bunkovej línie CCRF-CEM sú uvedené v Tabuľke č. 10 a bunkovej línie K562 sú zobrazené v Tabuľke č. 11. U všetkých selektovaných rezistentných klonov je možné vidieť nízky nárast expresie Pgp, ktorý je jedným z dôvodov vzniku rezistencie na protinádorové liečivá. Najvyššie zvýšenie expresie Pgp bolo zaznamenané u selektovaných klonov bunkovej línie K562. Konkrétne sa jednalo o bunky, ktoré boli selektované vysokou koncentráciou daunorubicínu v prvom cykle selekcie a následne kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu v druhom cykle.

Tabuľka 10: Nárast expresie Pgp u rezistentných klonov bunkovej línie CCRF-CEM (IK – izotypová kontrola).

Bunková línia CCRF-CEM	IK	Vzorka	Vzorka/IK	Nárast expresie (x-krát)
Parentálne bunky	17,15	18,02	1,05	1
Bunky selektované vysokou koncentráciou paklitaxelu v dvoch cykloch	15,26	33,68	2,21	2,10

Tabuľka 11: Nárast expresie Pgp u rezistentných klonov bunkovej línie K562 (IK - izotypová kontrola).

Bunková línia K562	IK	Vzorka	Vzorka/IK	Nárast expresie (x-krát)
Parentálne bunky	10,55	13,70	1,30	1
Bunky selektované vysokou koncentráciou daunorubicínu v dvoch cykloch	10,27	28,13	2,74	2,11
Bunky selektované vysokou koncentráciou daunorubicínu v prvom cykle a následne kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu	9,39	44,51	4,74	3,65

6 Diskusia

Aj napriek faktu, že sa v posledných desaťročiach vyvíja čoraz viac liečiv na presné zacielenie a blokovanie zmien, ktoré poháňajú progresiu rakoviny, u mnohých pacientov v priebehu liečby často dochádza k vzniku rezistencie. Rezistencia na protinádorové liečivá, či už konvenčné alebo nové ciele liečivá, a výsledná neúčinnosť liečby sú hlavnými problémami pri liečbe rakoviny a sú zodpovedné za viac ako 90 % úmrtí. Vo všeobecnosti je príčina vytvorenia rezistencie na liečivá zložitá. Pochopenie mechanizmov vedúcich k jej vzniku umožní vývoj nových terapeutických stratégií a získanie lepších klinických výsledkov (Wang *et al.*, 2019). Doposiaľ boli identifikované viaceré kategórie mechanizmov liekovej rezistencie. No aj napriek tomu, že sa poznatky o niektorých jednotlivých mechanizmoch rezistencie na liečivá výrazne rozšírili, komplexné pochopenie a riešenie multifaktoriálnych mechanizmov rezistencie na lieky stále chýba.

V experimentálnej onkológii sú pre štúdium mechanizmov cytotoxicity a rezistencie kľúčovým nástrojom bunkové modely. Príprava a analýza rezistentných nádorových bunkových línií je časovo náročná. Najčastejšie sa pripravujú opakovaným vystavovaním rakovinových buniek protinádorovým liečivám, ktoré sa bežne používajú v klinickej praxi. Využívajú sa dve metódy prípravy rezistentných klonov. Prvou metódou a najčastejšie používanou je ovplyvňovanie buniek postupne sa zvyšujúcou koncentráciou protinádorového liečiva počas dlhšieho obdobia (6 až 24 mesiacov). Druhou je pulzná metóda, a to ovplyvňovanie buniek vyššou koncentráciou liečiva na kratšiu dobu expozície (3 – 24 hodín) a následne poskytnutím času na zotavenie buniek. Táto schéma sa viac približuje klinickému nastaveniu chemoterapie (Scripture *et al.*, 2005, Watson *et al.*, 2007, Breen *et al.*, 2008, McDermott *et al.*, 2014).

V tejto bakalárskej práci bol zvolený pulzný spôsob selekcie rezistentných klonov dvoch leukemických bunkových línií – bunkovej línie odvodenej od akútnej lymfoblastickej leukémie CCRF-CEM a bunkovej línie odvodenej od chronickej myeloidnej leukémie K562. Bunky boli ovplyvňované vysokou koncentráciou protinádorových liečiv (IC_{90}) na 24 hodín, čo prežilo len malé percento buniek, ktoré sa po určitej dobe opäť začali normálne deliť a dosiahli vitalitu nad 90 %. Tento proces trval spravidla 3 – 4 týždne. Selekcia prebehla v dvoch cykloch, kedy v prvom cykle boli bunky selektované vysokými koncentraciami protinádorových liečiv (paklitaxelu a daunorubicínu), a to v priebehu 5,5 mesiaca. V druhom cykle, počas 1,5 mesiaca, sa udržiavala selekcia kontinuálnym pôsobením nízkej koncentrácie protinádorových liečiv a došlo aj k ďalšej reSelekcii vysokými koncentraciami liečiv.

Na vyhodnotenie miery rezistencie bol použitý kolorimetrický MTS test. Nárast rezistencie u selektovaných klonov bol stanovený porovnaním hodnôt IC_{50} parentálnych buniek s ich rezistentnými klonmi. Najvyššiu mieru rezistencie vykazovali selektované klony, ktoré boli v oboch cykloch

ovplyvňované vysokými koncentráciami protinádorových liečiv. Takto pripravené klony bunkovej línie CCRF-CEM vykazovali miernu rezistenciu na cytostatiká s podobným mechanizmom účinku ako paklitaxel, a to vinkristín, vinblastín, a kolchicín, ale aj na štruktúrne a mechanizmom účinku odlišný daunorubicín a irinotekan. Avšak rezistencia na paklitaxel bola len nepatrná. Vyšší nárast rezistencie bol pozorovaný u rovnakým spôsobom selektovaných klonov bunkovej línie K562. Selektované klony vykazovali prekvapivo najvyššiu rezistenciu voči paklitaxelu ($> 31,6667$ -krát vyšší nárast rezistencie v porovnaní s parentálnymi bunkami). Rezistentné klony ďalej vykazovali rezistenciu na daunorubicín, ktorým boli selektované, na doxorubicín, ale aj na aktinomycín D, vinblastín, vinkristín a kolchicín.

Mierne zvýšenie rezistencie bolo pozorované aj u klonov bunkovej línie K562, ktoré boli v prvom cykle selekcie ošetrované vysokou koncentráciou daunorubicínu a v druhom cykle boli kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu. Okrem daunorubicínu vykazovali tieto klony rezistenciu aj na aktinomycín D, vinkristín a kolchicín. Najvyšší nárast rezistencie ($> 23,5$ -krát) bol zaznamenaný na protinádorové liečivo paklitaxel. U rovnakým postupom pripravených rezistentných klonov bunkovej línie CCRF-CEM nedošlo k žiadnemu, prípadne len k minimálnemu nárastu rezistencie.

Podľa vyššie uvedených výsledkov je zrejmé, že u selektovaných rezistentných klonov došlo ku skríženej rezistencii. Skrížená rezistencia na protinádorové liečivá nastáva v momente, keď sa rakovinové bunky stanú rezistentné nielen voči liečivu, ktorým bola rakovina liečená, ale stratia citlivosť aj na ďalšie protinádorové liečivá, väčšinou s podobným mechanizmom účinku (Nosková *et al.*, 2000). Ku skríženej rezistencii došlo v prípade oboch bunkových línii. Selektované klony bunkovej línie CCRF-CEM vystavované v priebehu selekcie antimikrotubulárnemu činidlu paklitaxelu si vytvorili skríženú rezistenciu na mechanizmom účinku podobný vinkristín, vinblastín a kolchicín. Klony bunkovej línie K562 počas selekcie vystavované antracyklínovému antibiotiku daunorubicínu získali rezistenciu voči mechanizmom účinku podobnému doxorubicínu.

Pri skríženej rezistencii môže dôjsť aj k vzniku rezistencie na štruktúrne a mechanizmom účinku líšiace sa protinádorové liečivá. Vtedy hovoríme o mnohopočetnej liekovej rezistencii (Nosková *et al.*, 2000, Catalano *et al.*, 2022). V prípade bunkovej línie CCRF-CEM došlo v priebehu selekcie k vytvoreniu rezistencie na cytostatiká s odlišným mechanizmom účinku, a to na daunorubicín a irinotekan. Rezistentné klony bunkovej línie K562 sa takisto stali odolné voči protinádorovým liečivám s odlišným mechanizmom účinku ako má daunorubicín, ktorým boli ovplyvňované. Boli to predovšetkým antimikrotubulárne činidlá paklitaxel, vinblastín, vinkristín a v menšej miere aj kolchicín a protinádorové antibiotikum aktinomycín D.

Jedným z najbežnejších mechanizmov rezistencie je eflux liečiv z bunky, zvyčajne prostredníctvom púmp prítomných v bunkovej membráne. Na pripravených rezistentných klonoch bola prevedená analýza expresie Pgp, transmembránovej jednosmernej efluxnej pumpy, ktorý je asociovaný

s MDR. Na analýzu Pgp prietokovou cytometriou boli vybrané klony, ktoré vykazovali pri MTS teste signifikantnú mieru rezistencie. U všetkých testovaných selektovaných klonov bol zaznamenaný len mierny nárast expresie Pgp v porovnaní s parentálnymi bunkami. Najväčší nárast expresie Pgp bol pozorovaný u rezistentných klonov bunkovej línie K562, ktoré boli v prvom cykle ovplyvňované vysokými koncentráciami daunorubicínu a druhom cykle selekcie kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie daunorubicínu.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že pulznou selekčnou metódou vyselektované klony bunkových línií CCRF-CEM a K562 nezískali stabilnú zvýšenú rezistenciu na protinádorové liečivá paklitaxel, respektíve daunorubicín. Hlavnými dôvodmi neúspešnej prípravy rezistentných klonov bunkových línií môže byť buď krátky čas selekcie alebo nevhodne zvolená koncentrácia liečiva použitého na selekciu. Podobne Gu *et al.* uvádza, že pulzná selekčná metóda je menej úspešná v príprave rezistentných klonov ako použitie postupne sa zvyšujúcej koncentrácie selekčnej látky a často dochádza len k 2- až 80-násobnému nárastu rezistencie voči parentálnym líniam (Gu *et al.*, 2019).

7 Záver

Hlavným cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bola príprava rezistentných klonov leukemických bunkových línii – CCRF-CEM a K562. Rezistentné klony boli pripravené v priebehu približne siedmich mesiacov v dvoch cykloch. Prvý cyklus trval 5,5 mesiaca a počas tejto doby boli bunky vystavované vysokým koncentráciám protinádorových liečiv. Bunková línia CCRF-CEM bola ovplyvňovaná protinádorovým liečivom paklitaxelom a bunková línia K562 daunorubicínom. Takto pripravené klony boli zamrazené. Po rozmrazení selektovaných klonov sa pokračovalo druhým cyklom selekcie v trvaní 1,5 mesiaca. U selektovaných klonov bola rezistencia udržiavaná kultiváciou buniek v prítomnosti nízkej koncentrácie protinádorového liečiva a takisto došlo aj k ďalšej reselekcii rezistentných klonov vysokými koncentraciami protinádorových liečiv.

Miera rezistencie bola stanovená prostredníctvom testu cytotoxicity – MTS testu. Jeho vyhodnotením v programe Dotmatics boli stanovené hodnoty IC_{50} pre parentálne bunky a ich selektované rezistentné klony. Ich porovnaním bol stanovený pokles/nárast rezistencie na testované protinádorové liečivá u selektovaných klonov. Najvyššiu rezistenciu v prípade oboch bunkových línii vykazovali klony, ktoré boli v dvoch cykloch selektované vysokými koncentraciami protinádorových liečiv. Mierny nárast rezistencie vykazovali aj selektované klony bunkovej línie K562, ktoré boli v prvom cykle ovplyvňované vysokou koncentráciou cytostatika a v druhom cykle boli kultivované v prítomnosti nízkej koncentrácie protinádorového liečiva. Selektované rezistentné klony vykazovali aj skríženú rezistenciu. U selektovaných klonov, ktoré vykazovali signifikantnú mieru rezistencie bola následne prevedená analýza exprese Pgp prietokovou cytometriou. U všetkých klonov bol detegovaný jemný nárast exprese Pgp.

Výsledky naznačujú, že testované bunkové línie zatiaľ nevykazujú stabilnú zvýšenú rezistenciu voči zvoleným protinádorovým liečivám.

8 Literatúra

Agren R., Mardinoglu A., Asplund A., Kampf C., Uhlen M., Nielsen J. (2014): Identification of anticancer drugs for hepatocellular carcinoma through personalized genome-scale metabolic modeling. *Molecular Systems Biology*, 10(3).

Alam A., Locher K. P. (2023): Structure and Mechanism of Human ABC Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 52(1), 275–300.

Amaral M. V. S., De Sousa Portilho A. J., Da Silva E. L., De Oliveira Sales L., Da Silva Maués J. H., De Moraes M. E. A., Moreira-Nunes C. A. (2019): Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. *Anticancer Research*, 39(12), 6443–6455.

Amjad M. T., Chidharla A., Kasi A. (2023): *Cancer Chemotherapy*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

An G., Morris M. E. (2020): Efflux transporters in cancer resistance: Molecular and functional characterization of breast cancer resistance protein. *Drug Efflux Pumps in Cancer Resistance Pathways: From Molecular Recognition and Characterization to Possible Inhibition Strategies in Chemotherapy*, 67–96.

Bhattacharya B., Mukherjee S. (2015): Cancer Therapy Using Antibiotics. *Journal of Cancer Therapy*, 06(10), 849–858.

Biedler J. L., Riehm H. (1970): Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res*, 30(4), 1174–1184.

Breen L., Murphy L., Keenan J., Clynes M. (2008): Development of taxane resistance in a panel of human lung cancer cell lines. *Toxicol In Vitro*, 22(5), 1234–1241.

Brunton L. L., Lazo J. S., Parker K. L. (2006): *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. New York, N.Y.: McGraw-Hill.

Bukowski K., Kciuk M., Kontek R. (2020): Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9).

Catalano A., Iacopetta D., Ceramella J., Scumaci D., Giuzio F., Saturnino C., Aquaro S., Rosano C., Sinicropi M. S. (2022): Multidrug Resistance (MDR): A Widespread Phenomenon in Pharmacological Therapies. *Molecules*, 27(3).

Cole S. P. C. (2014): Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 30880–30888.

Cole S. P. C. (2014): Targeting Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1): Past, Present, and Future. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 95–117.

Cole S. P. C., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E., Grant C. E., Almquist K. C., Stewart A. J., Kurz E. U., Duncan A. M. V., Deeley R. G. (1992): Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science*, 258(5088), 1650–1654.

Damia G., D'Incalci M. (1998): *Cytotechnology*. 27(1/3), 165–173.

Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. (1998): A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15665–15670.

Farber S., Diamond L. K., Mercer R. D., Sylvester R. F., Wolff J. A. (1948): Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *New England Journal of Medicine*, 238(23), 787–793.

Gao Y., Shang Q., Li W., Guo W., Stojadinovic A., Mannion C., Man Y. G., Chen T. (2020): Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword. *Journal of Cancer*, 11(17), 5135–5149.

Gate L., Tew K. D. (2011): Alkylating Agents. Minev B. R., ed. *Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures*, 13, 61–85, Dordrecht: Springer Netherlands.

Gmeiner W. H. (2002): Antimetabolite incorporation into DNA: Structural and thermodynamic basis for anticancer activity. *Biopolymers*. 65(3), 180–189.

Gu L., Zhang G., Zhang Y. (2019): A novel method to establish glucocorticoid resistant acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1).

Hadfield J. A., Ducki S., Hirst N., McGown A. T. (2003): Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res*. 5, 309–325.

He S.-M., Li R., Kanwar J. R., Zhou S.-F. (2011): Structural and Functional Properties of Human Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1). *Current Medicinal Chemistry*, 18(3), 439–481.

Checchi P. M., Nettles J. H., Zhou J., Snyder J. P., Joshi H. C. (2003): Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(7), 361–365.

Chorawala M. R., Oza P. M., Shah G. B. (2012): Mechanism of anticancer drug resistance: An overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 4(1).

Ioele G., Chieffallo M., Occhiuzzi M. A., De Luca M., Garofalo A., Ragno G., Grande F. (2022): Anticancer Drugs: Recent Strategies to Improve Stability Profile, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties. *Molecules*, 27(17).

Jones P. M., George A. M. (2004): The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61(6), 682–699.

Juliano R. L., Ling V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 455(1), 152–162.

Juvala A. I. I., Hamid A. A. A., Halim K. B. A., Che Has A. T. (2022): P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*, 8(6).

Khwaja S., Kumar K., Das R., Negi A. S. (2021): Microtubule associated proteins as targets for anticancer drug development. *Bioorganic Chemistry*, 116.

Kisselev A. F., Van Der Linden W. A., Overkleeft H. S. (2012): Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chemistry & Biology*, 19(1), 99–115.

Lei Z.-N., Tian Q., Teng Q.-X., Wurlpel J. N. D., Zeng L., Pan Y., Chen Z.-S. (2023): Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm*, 4(3).

Lu J. F., Pokharel D., Bebawy M. (2015): MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug Metabolism Reviews*, 47(4), 406–419.

Luqmani Y. A. (2005): Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, 14(Suppl. 1), 35–48.

Majidinia M., Mirza-Aghazadeh-Attari M., Rahimi M., Mihanfar A., Karimian A., Safa A., Yousefi B. (2020): Overcoming multidrug resistance in cancer: Recent progress in nanotechnology and new horizons. *IUBMB Life*, 72(5), 855–871.

Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S. a Baradaran B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), 339–348.

Mao Q., Unadkat J. D. (2015): Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport – an Update. *The AAPS Journal*, 17(1), 65–82.

Martins-Teixeira M. B., Carvalho I. (2020): Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem*, 15(11), 933–948.

McDermott M., Eustace A. J., Busschots S., Breen L., Crown J., Clynes M., O'Donovan N., Stordal B. (2014): In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in Oncology*, 4.

McGowan J. V., Chung R., Maulik A., Piotrowska I., Walker J. M., Yellon D. M. (2017): Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(1), 63–75.

Mellor H. R., Callaghan R. (2008): Resistance to Chemotherapy in Cancer: A Complex and Integrated Cellular Response. *Pharmacology*, 81(4), 275–300.

- Mittal A., Dixit S., Rana S. (2017): Anticancer Effects of Chemotherapy and Nature Products. *Journal of Medical Discovery*, 2(2).
- Molinari A., Calcabrini A., Meschini S., Stringaro A., Crateri P., Toccaceli L., Marra M., Colone M., Cianfriglia M., Arancia G. (2002): Subcellular Detection and Localization of the Drug Transporter P-Glycoprotein in Cultured Tumor Cells. *Current Protein & Peptide Science*, 3(6), 653–670.
- Munteanu E., Verdier M., Grandjean-Forestier F., Stenger Ch., Jayat-Vignoles Ch., Huet S., Robert J., Ratinaud M. H. (2006): Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochemical Pharmacology*, 71(8), 1162–1174.
- Nakanishi T., Ross D. D. (2012): Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), 73–99.
- Natarajan K., Xie Y., Baer M. R., Ross D. D. (2012): Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 83(8), 1084–1103.
- Ni Z., Bikadi Z., Rosenberg M. F., Mao Q. (2010): Structure and Function of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Current Drug Metabolism*, 11(7), 603–617.
- Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K. (2000): Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi: I. Typická MDR. *Klinická onkologie*, 2.
- Ozben T. (2006): Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letter*, 580(12), 2903–2909.
- Parker W. B. (2009): Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. *Chemical Reviews*, 109(7), 2880–2893.
- Peters G. J. (2014): Novel Developments in the Use of Antimetabolites. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 33(4-6), 358–374.
- Pilotto Heming C., Muriithi W., Wanjiku Macharia L., Niemeyer Filho P., Moura-Neto V., Aran V. (2022): P-glycoprotein and cancer: what do we currently know? *Heliyon*, 8(10).
- Rebucci M., Michiels C. (2013): Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 85(9), 1219–1226.
- Saeidnia S. (2015): *New Approaches to Natural Anticancer Drugs*. Cham: Springer International Publishing.
- Saleem T., Kasi A. (2023): *Daunorubicin*. StatPearl. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Salem H., Attiya G., El-Fishawy N. (2017): Classification of human cancer diseases by gene expression profiles. *Applied Soft Computing*, 50, 124–134.

- Sampath D., Rao V. A., Plunkett W. (2003): Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene*, 22(56), 9063–9074.
- Sarkadi B., Özvegy-Laczka C., Német K., Váradi A. (2004): ABCG2 – a transporter for all seasons. *FEBS Letters*, 567(1), 116–120.
- Scagliotti G. V., Selvaggi G. (2006): Antimetabolites and cancer: emerging data with a focus on antifolates. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(2), 189–200.
- Scripture Ch., Szebeni J., Loos W. J., Figg II W., Sparreboom A. (2005): Comparative in vitro properties and clinical pharmacokinetics of paclitaxel following the administration of Taxol® and Paxene®. *Cancer Biology & Therapy*, 4(5), 555–560.
- Sigmond J., Peters G. J. (2005): Pyrimidine and Purine Analogues, Effects on Cell Cycle Regulation and the Role of Cell Cycle Inhibitors to Enhance Their Cytotoxicity. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 24(10-12), 1997–2022.
- Soltysova A., Altanerova V., Altaner C. (2005): Cancer stem cells. *Neoplasma*, 52(6), 435–440.
- Sreerama L. (2014): Alkylating Agents. SCHWAB, Manfred, ed. *Encyclopedia of Cancer*, 1–6, Springer Berlin Heidelberg.
- Thomas Ch., Tampé R. (2020): Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1), 605–636.
- Thomas Ch., Aller S. G., Beis K., Carpenter E. P., Chang G., Chen L., Dassa E., Dean M., Duong Van Hoa F., Ekiert D., Ford R., Gaudet R., Gong X., Holland I. B., Huang Y., Kahne D. K., Kato H., Koronakis V., Koth Ch. M., Lee Y., Lewinson O., Lill R., Martinoia E., Murakami S., Pinkett H. W., Poolman B., Rosenbaum D., Sarkadi B., Schmitt L., Schneider E., Shi Y., Shyng S.-L., Slotboom D. J., Tajkhorshid E., Tieleman D. P., Ueda K., Váradi A., Wen P.-Ch., Yan N., Zhang P., Zheng H., Zimmer J., Tampé R. (2020): Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters. *FEBS Letters*, 594(23), 3767–3775.
- Thurston D. E., Pysz I. (2021): *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. Second edition. Boca Raton: CRC Press: CRC Press.
- Timson J. (1975): Hydroxyurea. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 32(2), 115–131.
- Tomasetti C., Marchionni L., Nowak M. A., Parmigiani G., Vogelstein B. (2015): Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), 118–123.
- Vaidya F. U., Sufiyan Chhipa A., Mishra V., Gupta V. K., Rawat S. G., Kumar A., Pathak Ch. (2022): Molecular and cellular paradigms of multidrug resistance in cancer. *Cancer Reports*, 5(12).

Wang J.-Q., Yang Y., Cai Ch.-Y., Teng Q.-X., Cui Q., Lin J., Assaraf Y. G., Chen Z.-S. (2021): Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. *Drug Resistance Updates*, 54.

Wang X., Zhang H., Chen X. (2019): Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141–160.

Watson M. B., Lind M. J., Cawkwell L. (2007): Establishment of in-vitro models of chemotherapy resistance. *Anti-Cancer drugs*, 18, 749–754.

Wordeman L., Vicente J. J. (2021): Microtubule Targeting Agents in Disease: Classic Drugs, Novel Roles. *Cancers*, 13(22).