

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Hodnocení nových FLT3 inhibitorů jako možných léčiv u akutní myeloidní leukémie

**Amálie Koblovská
Moravskoslezský kraj**

Nový Jičín 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**Hodnocení nových FLT3 inhibitorů jako možných
léčiv u akutní myeloidní leukémie**

**Evaluation of new FLT3 inhibitors as new drugs in
acute myeloid leukemia**

Autoři:	Amálie Koblovská
Škola:	Masarykovo gymnázium, Příbor, p. o. Jičínská 528 742 58 Příbor
Kraj:	Moravskoslezský kraj
Konzultant:	Mgr. Jan Rataj doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Novém Jičíně dne 23.3.2025

Amálie Koblůvská

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit své ohromné poděkování **doc. Martině Čečkové** a všem členům její **Výzkumné skupiny buněčné farmakologie a onkologie**, nejen za odborné vedení mé práce, ale hlavně vůbec za umožnění se všemi pracovat. Děkuji za vlídný přístup, věnovaný čas, obětavou pomoc a stejně tak za velké množství veškerého vynaloženého úsilí a podpory.

Jmenovitě bych ráda poděkovala **Mgr. Janu Ratajovi** za odborné konzultace, korekturu mé práce, cenné poznatky a především za veškerý čas a trpělivost. Děkuji **Mgr. Simoně Dudičové, Andree Trávové, DiS.** a **Šárce Štěpánové** za jejich laskavost, obětovaný čas i hodnotné rady.

Dále chci poděkovat celému kolektivu **Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové** za příjemnou atmosféru a poskytnutí zázemí pro zhotovení mé práce.

V neposlední řadě velmi děkuji mé **rodině**, zejména mým skvělým **rodičům**, za neustálou oporu.

Anotace

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní hematologické onemocnění charakterizované klonální proliferací nezralých myeloidních buněk v kostní dřeni, krvi a případně i v jiných tkáních. Tento patologický proces narušuje normální krve tvorbu, což vede k mnoha klinickým komplikacím. I přes všechny nové a pokrokové léčebné postupy je AML stále řazena mezi špatně léčitelné formy nádorových onemocnění. U přibližně třetiny případů pacientů s AML se vyskytují mutace v genu pro FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3). Tyto mutace způsobují konstitutivní aktivaci FLT3 receptoru nezávislou na přítomnosti ligandu, což vede k nekontrolované proliferaci leukemických buněk, narušení jejich diferenciaci a k agresivnímu průběhu onemocnění. Přítomnost FLT3 mutace v leukemických buňkách pacienta je tak spojena s nepříznivou prognózou, vyšším rizikem relapsu a nižší mírou přežití pacientů. Látky se schopností inhibovat mutovaný FLT3 receptor jsou tak novým zásadním přístupem cílené terapie. I přes to, že jsou zmíněné FLT3 inhibitory relativně novými možnostmi léčby, byla už i vůči nim popsána rezistence, která patří mezi stěžejní příčiny selhání terapie. Cílem této práce bylo charakterizovat 3 nově syntetizované sloučeniny s potenciálem inhibovat FLT3 receptor, a to z pohledu jejich efektu na buněčnou proliferaci na AML buněčných liniích, a posoudit jejich specifický účinek právě na buňky s FLT3 mutovaným receptorem. Druhým z cílů bylo určit efekt těchto sloučenin na gilteritinib-rezistentní linii. Aby byl určen reálný potenciál takovýchto látek, byly jejich účinky srovnány s již klinicky používanými léčivy, midostaurinem a quizartinibem. Prostřednictvím *in vitro* kolorimetrické metody zvané MTT test byla ověřena schopnost testovaných látek navodit buněčnou smrt či snížit míru buněčné proliferace u linií MV4-11 a MOLM-13, jež se charakterizují mutací FLT3-ITD, v kontrastu s linií THP-1, která mutaci nevykazuje. Z testovaných látek byla jako nejefektivnější stanovena látka PSU28, a to s hodnotami IC_{50} 0,27 μ M pro MV4-11 wt (CI 95 % = 0,2221- 0,3132 μ M) a 0,25 μ M pro MOLM-13 (CI 95 % = 0,2232- 0,2784 μ M). Ve srovnání s klinicky používanými inhibitory projevila však tato sloučenina několikanásobně nižší účinek, přičemž ten nejvyšší byl vykazován inhibitorem quizartinibem s hodnotami IC_{50} 0,6 nM u MV4-11 wt (CI 95 % = 0,5081-0,8071 nM) a 1,0 nM na MOLM-13 (0,9144-1,186 nM). Na linii MV4-11 g45, jež nese trvalou rezistenci vůči jinému klinicky používanému inhibitoru, gilteritinibu, byl zanalyzován účinek látky PSU28 a LG-2189, v porovnání s gilteritinib-senzitivní linií MV4-11 wt. Ve druhé části experimentů byly zaznamenány opačné výsledky než při první komparaci testovaných látek s terapeuticky používanými inhibitory. Nejnižších hodnot rezistenčního faktoru dosahovaly nově syntetizované látky (RF PSU28 = 1,24; LG-2189 = 0,80), což naznačuje jejich potenciál terapeutického účinku i u AML buněk rezistentních vůči gilteritinibu. Zjištění této práce tak představuje poutavý předmět pro budoucí výzkum. Takovéto znalosti o testovaných sloučeninách by mohly poskytnout základ pro syntézu nových podobných molekul s výhodnějšími vlastnostmi. Ty by pak mohly představovat novou alternativu v léčbě AML, včetně forem rezistentních ke konvenčním FLT3 inhibitorům, jako je gilteritinib.

Klíčová slova

AML; FLT3 inhibitory; rezistence k FLT3i

Annotation

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant hematological disease characterized by clonal proliferation of immature myeloid cells in bone marrow, blood and possibly other tissues. This pathological process disrupts normal hematopoiesis, leading to many clinical complications. Despite all the new and advanced therapies, AML is still classified as a poorly treatable form of cancer. Mutations in the FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) gene occur in approximately one third of AML patients. These mutations cause constitutive ligand-independent activation of the FLT3 receptor, leading to uncontrolled proliferation of leukaemia cells, impaired differentiation and aggressive disease progression, and are thus associated with an unfavourable prognosis, higher risk of relapse and lower survival rates. Thus, agents with the ability to inhibit the mutated FLT3 receptor represent a new fundamental approach to targeted therapy. Despite the fact that these FLT3 inhibitors are relatively new treatment options, resistance to them has already been described and is one of the leading causes of treatment failure. The aim of this study was to characterize 3 newly synthesized compounds with the potential to inhibit the FLT3 receptor, thus to verify their cytotoxicity and effect on cell proliferation in acute myeloid leukemia cell lines, and then to assess their specific effect on the FLT3 mutant receptor. The second objective was to determine the effect of these compounds on the gilteritinib-resistant line. In order to determine the real potential of such compounds, their effects were compared with the already clinically used drugs midostaurin and quizartinib. The ability of the test agents to induce cell death in the MV4-11 and MOLM-13 lines, which are characterised by the FLT3-ITD mutation, was verified by an *in vitro* colorimetric assay called the MTT assay, in contrast to the THP-1 line, which does not show the mutation. PSU28 was determined to be the most effective of the tested agents, with IC_{50} values of 0,27 μ M for MV4-11 wt (CI 95 % = 0,2221-0,3132 μ M) and 0,25 μ M for MOLM-13 (CI 95 % = 0,2232- 0,2784 μ M). However, compared to clinically used inhibitors, this compound showed a several-fold lower effect, with the highest being exhibited by the inhibitor quizartinib with IC_{50} values of 0,6 nM for MV4-11 wt (CI 95 % = 0,5081-0,8071 nM) and 1,0 nM for MOLM-13 (0,9144-1,186 nM). The effect of PSU28 and LG-2189 was analysed in the MV4-11 g45 line, which carries sustained resistance to another clinically used inhibitor, gilteritinib, compared to the gilteritinib-sensitive MV4-11 wt. In the second part of the experiments, opposite results to the first comparison of the test substances with therapeutically used inhibitors were observed. The lowest resistance factor values were achieved by the newly synthesized agents (RF PSU28 = 1,24; LG-2189 = 0,80). Thus, the findings of this paper present an intriguing subject for future research. Such knowledge about the compounds could provide a basis for the synthesis of new similar molecules with more favourable properties. These could then represent a new alternative in the treatment of AML, including forms resistant to conventional FLT3 inhibitors such as gilteritinib.

Keywords

AML; FLT3 inhibitors; FLT3i resistance

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	11
2 Teoretická část	13
2.1 Akutní myeloidní leukémie	13
2.1.1 Historie	13
2.1.2 Prevalence	14
2.1.3 Rizikové skupiny a faktory	14
2.1.4 Vznik a patogeneze	15
2.2 Patogeneze FLT3 mutace	17
2.2.1 Tyrozinkinázový receptor FLT3	17
2.2.2 Signální dráhy aktivované FLT3 kinázou	18
2.2.3 FLT3 mutace	19
2.3 Průběh a charakteristika	20
2.3.1 Extranodální manifestace	20
2.3.2 Akutní komplikace	20
2.4 Diagnostika	21
2.5 Klasifikace	21
2.5.1 Kategorie a prognóza	23
2.6 Léčba AML	25
2.7 Léčba AML s FLT3 mutací	26
2.8 Klasifikace FLT3 inhibitorů	27
2.8.1 Midostaurin	28
2.8.2 Quizartinib	28
2.8.3 Gilteritinib	29
2.9 Problematika rezistence onemocnění vůči léčivům	29
2.9.1 Genetické a epigenetické změny	29
2.9.2 Mikroprostředí kostní dřeně	29
2.9.3 P-glykoprotein a další transportéry	30
2.9.4 Reverzibilní senescence	30
2.9.5 Rezistence onemocnění na FLT3 inhibitory	31
2.9.6 Strategie k překonání rezistence	32
2.10 Budoucí směry cílené terapie vůči FLT3 receptoru	32
3 Cíle práce	34
4 Materiál	35
4.1 Chemikálie	35

4.1.1 Reagencie	35
4.1.2 Inhibitory	35
4.1.3 Testované látky	35
4.2 Laboratorní vybavení	35
4.3 Software	36
5 Metodika	37
5.1 Buněčná kultura	37
5.2 Buněčné linie	38
5.2.1 MV4-11 wt	38
5.2.2 MV4-11 g45	38
5.2.3 MOLM-13	38
5.2.4 THP-1	39
5.3 Pasážování a kultivace buněk	39
5.4 MTT test životaschopnosti buněk	40
5.4.1 Princip	40
5.4.2 Přehled testovaných látek, jež inhibují kinázu mutace FLT3, na buněčných liniích	42
5.4.3 Realizace experimentu	43
5.5 Statistické zpracování dat	46
5.5.1 Hodnoty IC ₅₀ a specifita k mutovanému FLT3 receptoru	46
5.5.2 Rezistenční faktor	47
6 Výsledky	48
6.1 Inhibitory PSU28 a PSU32	48
6.2 Porovnání látky PSU28 s klinicky používanými inhibitory	48
6.3 Porovnání látek na rezistentní linii	51
7 Diskuze	53
8 Závěr	59
9 Bibliografie	60
10 Seznam použitých internetových zdrojů	78
11 Seznam obrázků	79
12 Seznam tabulek	81

Seznam použitých zkratek

AML	akutní myeloidní leukémie (<i>acute myeloid leukemia</i>)
AR	alelický poměr (<i>allelic ratio</i>)
ATP	adenosintrifosfát (<i>adenosine triphosphate</i>)
ATR	ataxie telangiectasie a příbuzný protein Rad3 (<i>ataxia telangiectasia and Rad3- related</i>)
BCL-2	lymfom B buněk 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
CAR-T	chimérní antigenní receptor T-buňky (<i>chimeric antigen receptor T-cell</i>)
CBL	lymfom B-linie Casitas (<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>)
CI 95 %	95% konfidenční interval (<i>95 % confidence interval</i>)
CNS	centrální nervový systém (<i>central nervous system</i>)
CXCL12	chemokinový ligand motivu C-X-C 12 (<i>C-X-C Motif chemokine ligand 12</i>)
CXCR4	chemokinový receptor motivu C-X-C 4 (<i>C-X-C Motif chemokine receptor 4</i>)
CYP	cytochrom P450 (<i>cytochrome P450</i>)
CYP3A4	cytochrom P450 3A4 (<i>cytochrome P450 3A4</i>)
DALY	roky života upravené podle invalidity (<i>disability-adjusted life years</i>)
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace (<i>disseminated intravascular coagulation</i>)
DNMT3A	DNA methyltransferáza 3A (<i>DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3 alpha</i>)
D835	mutace FLT3 na pozici 835 (<i>D835 mutation in FLT3</i>)
EFS	přežití bez příhody (<i>event-free survival</i>)
ELN	Evropská LeukemiaNet klasifikace (<i>European LeukemiaNet classification</i>)
ERK	extracelulárně regulovaná kináza (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FAB	Francouzsko-americko-britská klasifikace (<i>French-american-british classification</i>)
FBS	fetální bovinní sérum (<i>fetal bovine serum</i>)
FLT3	tyrozinkináza podobná Fms (<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>)
FLT3-ITD	interní tandemová duplikace FLT3 (<i>FLT3 internal tandem duplication</i>)

FLT3L	ligand FLT3 (<i>FLT3 ligand</i>)
FLT3-TKD	tyrozinkinázová doména FLT3 (<i>FLT3 tyrosine kinase domain</i>)
F691L	fenylalanin 691 leucin mutace (<i>phenylalanine 691 leucine mutation</i>)
GRB2	protein vázající receptor růstového faktoru 2 (<i>growth factor receptor bound protein 2</i>)
GTP	guanidintrifosfát (<i>guanosine triphosphate</i>)
HCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk (<i>hematopoietic cell transplantation</i>)
ICC	Mezinárodní konsenzuální klasifikace (<i>International consensus classification</i>)
IC₅₀	50% inhibiční koncentrace (<i>50% inhibitory concentration</i>)
IDH1	izocitrát dehydrogenáza 1 (<i>isocitrate dehydrogenase 1</i>)
IDH1/2	izocitrát dehydrogenáza 1/2 (<i>isocitrate dehydrogenase 1/2</i>)
IL-6	interleukin 6 (<i>interleukin 6</i>)
IMDM	Iscoveovo modifikované Dulbeccovo médium (<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>)
JAK/STAT	Janus kináza/signalizační transduktor a aktivátor transkripce (<i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>)
JM	juxtamembránová doména (<i>juxtamembrane domain</i>)
MCL-1	leukémie myeloidních buněk 1 (<i>myeloid cell leukemia 1</i>)
MEK	MAPK/ERK kináza
MRD	minimální reziduální nemoc (<i>minimal residual disease</i>)
mTOR	mechanický cíl rapamycinu (<i>mechanistic target of rapamycin</i>)
MTT	metylthiazolyldifenyl-tetrazoliumbromid (<i>methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i>)
NPM1	nukleofosmin 1 (<i>nucleophosmin 1</i>)
PBS	fosfátový pufovaný solný roztok (<i>phosphate-buffered saline</i>)
P-gp	P-glykoprotein (<i>P-glycoprotein</i>)
PI3K/AKT	fosfoinositid 3-kináza/AKT (<i>phosphoinositide 3-kinase/AKT</i>)
RAF	rychle akcelerovaný fibrosarkom (<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>)
RAS	kryší sarkom (<i>rat sarcoma</i>)
RAS/MAPK	RAS/MAP kináza (<i>RAS/Mitogen-activated protein kinase</i>)
RF	rezistenční faktor
RPMI-1640	kultivační médium Roswell Park Memorial Institute (<i>Roswell Park</i>)

Memorial Institute medium)

RTK	receptorová tyrozinkináza (<i>receptor tyrosine kinase</i>)
RUNX1	runt-příbuzný transkripční faktor 1 (<i>runt-related transcription factor 1</i>)
RUNX1T1	runt-příbuzný transkripční faktor 1 translokovaný na 1 (<i>runt-related transcription factor 1 translocated to 1</i>)
SCF	kmenový buněčný faktor (<i>stem cell factor</i>)
SEER	Epidemiologická databáze Surveillance, Epidemiology, and End Results
SHC	protein obsahující doménu Src homology 2 (<i>Src homology 2 domain-containing protein</i>)
STAT5	signalizační transduktor a aktivátor transkripce 5 (<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>)
TET2	desetinásobná-eleven translokační methylcytosin dioxygenáza 2 (<i>ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2</i>)
TKB	transplantace krvetvorných buněk
UV	ultrafialové záření (<i>ultraviolet</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World health organization</i>)
Wt	divoký typ (<i>wild-type</i>)

1 Úvod

Nádorová onemocnění představují v současné době celosvětově druhou nejčastějších příčinu úmrtí (po kardiovaskulárních onemocněních). Konkrétně v roce 2020 si nádorová onemocnění vyžádala takřka 10 milionů životů, tedy téměř každé šesté úmrtí (Anon. [b.r.]). Počet osob, jež podlely některé z forem zhoubného bujení, se za posledních 40 let u žen zdvojnásobil a u mužů ztrojnásobil. Světová zdravotnická organizace (WHO) potvrdila, že maligní onemocnění jsou v současnosti smrtelnější než kardiovaskulární onemocnění (Bray *et al.* 2018; Mentella *et al.* 2019). Pokroky v technologii, medicíně a nově se objevující vědecké poznatky vedou k lepšímu pochopení mechanismů podílejících se na vzniku nádorových onemocnění, jejich rozvoji, problematice perzistence kmenových nádorových buněk i dalšího šíření maligních buněk v organismu, což umožnilo vývoj moderních léčebných přístupů, které kromě tradičních, mezi které patří chirurgický zásah, chemoterapie či radioterapie, zahrnují i jiné novodobé strategie s cíleným působením přímo na nádorové buňky (Debela *et al.* 2021; Faubert *et al.* 2020; Motofei 2022). I přes fakt, že je mnoho typů maligních onemocnění považováno za dobře léčitelné (například některé typy prsních nádorů, dětská akutní lymfoblastická leukémie či Hodgkinův lymfom) (Anon. [b.r.]; Anon. [b.r.]), je pro více než 30 % pacientů doba přežití stále kratší než 5 let (Anon. [b.r.]).

Akutní myeloidní leukémie (AML) je i přes všechny nové a pokrokové léčebné postupy řazena mezi špatně léčitelné formy nádorových onemocnění (Vakiti *et al.* 2024). To představuje mimořádný podnět pro vytváření mnoha nových a inovativních způsobů terapie AML, které významně přispívají k rozmachu úspěšné léčby pacientů. Standartní chemoterapie, zahrnující kombinaci antracyklinů a cytarabinu, již zdaleka není jedinou možností léčby, přestože pro většinu AML pacientů stále tvoří nedílnou součást indukční terapie.

Mutace genu pro FLT3 receptor jsou nejčastější genetické aberace nalezené u akutní myeloidní leukémie, jež jsou asociované se špatnou prognózou, především pak se zvýšeným rizikem relapsu. Konkrétně jsou přítomny u zhruba 30 % pacientů trpících AML (Daver *et al.* 2021; Zhao *et al.* 2022). U zhruba 25 % těchto pacientů je pak přítomna vnitřní tandemové duplikace (FLT3-ITD), která je zvláště spojena s horšími prognostickými faktory. Dalších 5 % osob trpících AML s mutací FLT3 je postiženo bodovými mutacemi v tyrosin kinázové doméně (FLT3-TKD). U pacientů takovýchto skupin je pak ještě vyšší pravděpodobnost relapsu, a to i po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (Bazarbachi *et al.* 2020; Kiyoi *et al.* 2020a; Schlenk *et al.* 2008). Inhibice FLT3 receptoru tak představuje nemalou výzvu z hlediska cílené farmakoterapie a vývoje nových potenciálních strategií a inhibitorů (Kazi a Rönnstrand 2019). Do terapie byly poměrně nedávno zavedeny již dvě generace FLT3 inhibitorů, které se v posledních letech dostaly do klinické praxe (Zhao *et al.* 2022). Ta první zahrnuje FLT3 inhibitor midostaurin (zaveden roku 2017 (Anon. 2017)). Mezi druhou generaci FLT3 inhibitorů patří gilteritinib (zaveden roku 2019 (Anon. 2019b)) či quizartinib (zaveden roku 2023 (Anon. 2023)). I přes to, že jsou výše zmíněné FLT3 inhibitory relativně ranými možnostmi léčby, byla už i vůči nim popsána rezistence, která patří mezi stěžejní příčiny selhání terapie a již několikrát zmíněného relapsu onemocnění (Capelli *et al.* 2022). Potřeba vytvářet nové potenciální struktury s co nejideálnější schopností inhibovat FLT3 mutaci a současně

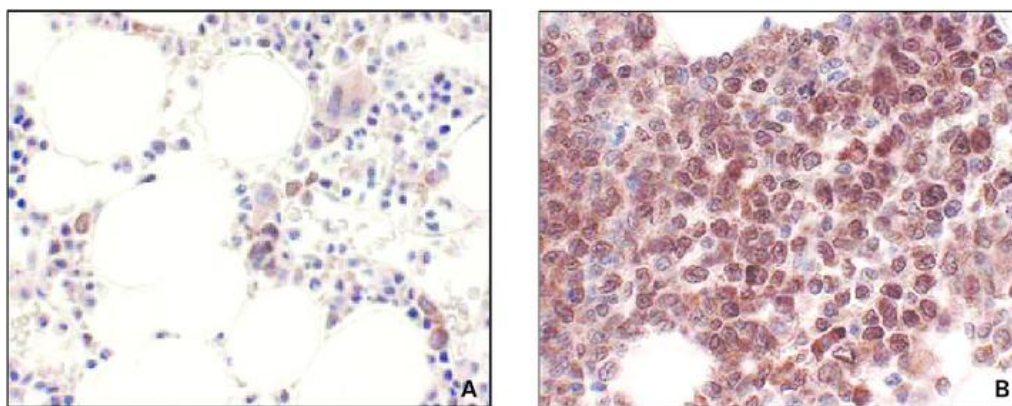
schopností zamezovat vzniku rezistence, popřípadě ji překonat, tak pochopitelně neustále roste (Zhao *et al.* 2022).

Tato práce si klade za cíl otestovat nově syntetizované sloučeniny s potenciálními schopnostmi inhibovat FLT3 receptor pro jejich antiproliferativní působení u AML buněčných linií a vyhodnotit, zda tyto látky potenciálně představují budoucnost pro léčbu pacientů zasažených AML s FLT3 mutací.

2 Teoretická část

2.1 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní hematologické onemocnění charakterizované klonální proliferací nezralých myeloidních buněk v kostní dřeni, krvi a případně i v jiných tkáních. Tento patologický proces narušuje normální krvetvorbu, což vede k pancytopenii a dalším klinickým komplikacím. AML představuje přibližně 80 % akutních leukémií u dospělých, přičemž incidence stoupá s věkem, zejména u jedinců starších 60 let. Onemocnění je heterogenní z hlediska molekulárních mechanismů, klinického průběhu i terapeutické odpovědi. (Jordan *et al.* 2006; Mrózek *et al.* 2007; Yu *et al.* 2020)



Obrázek 1: Porovnání standartních buněk a buněk akutní myeloidní leukémie získané imunohistochemickým barvením kostní dřene. A- buňky zdravé osoby; B- buňky osoby s AML. Převzato od (Wu *et al.* 2005).

2.1.1 Historie

AML byla poprvé popsána v roce 1827 francouzským lékařem Alfredem Velpeauem. V jeho zprávě se věnoval případu 63letého floristy, který trpěl horečkou, slabostí a zvětšením jater a sleziny. Velpeau zaznamenal, že krev pacienta měla konzistenci podobnou kaši, což přičítal přítomnosti bílých krvinek (Hoffman *et al.* 2022). Termín „leukémie“ však byl poprvé použit až o několik let později, v roce 1856, německým patologem Rudolfem Virchowem (Virchow *et al.* 1856). Další důležitý krok v klasifikaci leukémie učinil Wilhelm Ebstein v roce 1889, kdy popsal akutní leukémii jako rychle progresivní a fatální onemocnění, čímž ji odlišil od chronických forem (Ebstein 1889). Na konci 19. století Ernst Neumann potvrdil, že leukemické buňky mají svůj původ v kostní dřeni, což bylo zásadní pro další porozumění myeloidní leukémii (Neumann 1868).

Začátkem 70. let 20. století byla zavedena Francouzsko-americko-britská (FAB) klasifikace, která rozčlenila AML na různé subtypy podle morfologických a cytochemických vlastností blastů v kostní dřeni. Současně byla v tomto období zavedena cytotoxická chemoterapeutika, zejména kombinace antracyklinů a cytarabinu, což se dodnes považuje za standardní indukční terapii. Tyto terapie však měly vysokou toxicitu a účinnost byla omezená u pacientů starších nebo s komorbiditami. (Deschler a Lübbert 2006; Tefferi *et al.* 2024)

Následně byly v 80. letech objeveny specifické genetické abnormality, které zlepšily diagnostiku a prognózu pacientů (Deschler a Lübbert 2006; Tefferi *et al.* 2024). Významným milníkem byl objev molekulárních markerů, jako jsou například mutace genu NPM1 a FLT3-ITD, které umožnily lepší stratifikaci pacientů podle rizika a personalizaci léčby (Ma a Wang 2024).

2.1.2 Prevalence

Incidence akutní myeloidní leukémie globálně narůstá, s významně vyšší prevalencí u mužů a starších osob. Počet nově diagnostikovaných případů nadále roste, a to ze 79 372 v roce 1990 na 144 645 v roce 2021. Rozdíly v incidenci odrážejí socioekonomický rozvoj regionů; vyspělé země vykazují vyšší míru incidence, úmrtnosti i roky života přizpůsobené zdravotnímu postižení (DALY). Rizikové faktory zahrnují kouření, vysoký index tělesné hmotnosti a pracovní expozici benzenu či formaldehydu. Tyto faktory se regionálně liší a přispívají k rozdílné zátěži nemocí. Mortalita spojená s AML se mezi lety 1990 a 2021 celosvětově zvýšila z 74 983 na 130 522 úmrtí ročně. Vyšší míra úmrtnosti je zaznamenána ve vyspělých zemích, což může souviset s jejich přesnější diagnostikou a sledováním. DALY vzrostla z 2,6 na 4,6 milionu. (Zhou *et al.* 2024)

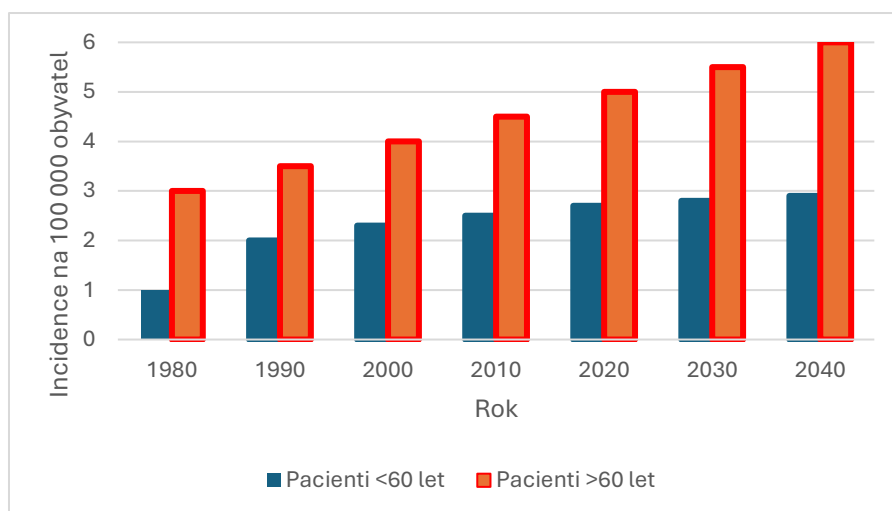
2.1.3 Rizikové skupiny a faktory

Prognóza AML je výrazně ovlivněna souhrou genetických, molekulárních a environmentálních faktorů. Tyto faktory zásadně ovlivňují nejen samotný vznik onemocnění, ale také jeho průběh, odpověď na léčbu a celkové přežití pacienta.

Genetické faktory hrají v patogenezi AML klíčovou roli. Mutace v genech, jako jsou FLT3, NPM1 nebo DNMT3A, jsou považovány za zásadní prognostické markery. Mutace v FLT3-ITD (vnitřní tandemová duplikace) je například spojena s vyšším rizikem relapsu a nižším celkovým přežitím, a to i přes standardní léčbu chemoterapií nebo alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HCT) (Boscaro *et al.* 2023; Pollyea *et al.* 2021). Naopak mutace v genu NPM1 může být asociována s lepší prognózou u pacientů (Boscaro *et al.* 2023).

Významným rizikovým faktorem je věk pacienta. U starších pacientů (>60 let) je AML obvykle spojena s horší prognózou, což je dáno nejen akumulací genetických abnormalit, ale také sníženou tolerancí k intenzivní chemoterapii a vyšším výskytem komorbidit. (Boscaro *et al.* 2023; Pollyea *et al.* 2021)

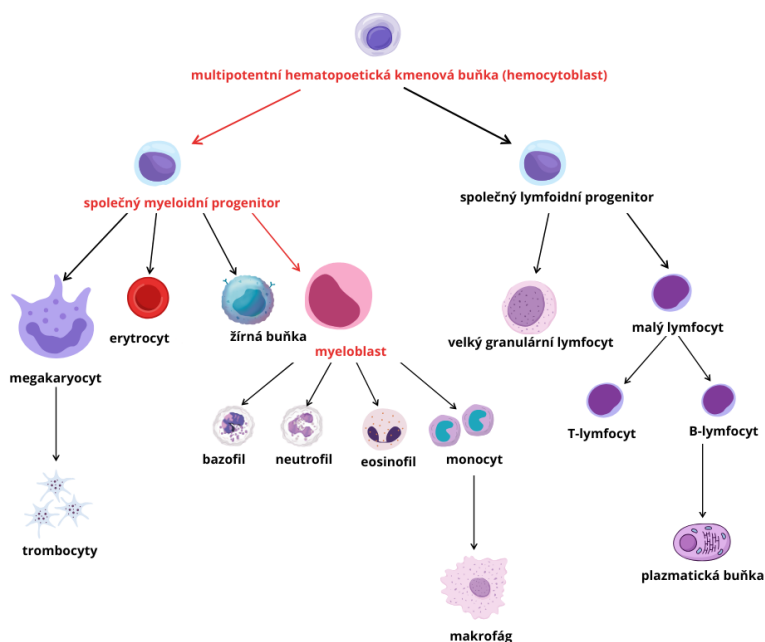
Cytogenetické abnormality rovněž přispívají ke stratifikaci rizika. Pacienti s komplexním karyotypem nebo specifickými chromozomovými přestavbami, jako je t(6;9) nebo inv(3), spadají do vysoce rizikové skupiny s nízkým přežitím (Boscaro *et al.* 2023). Na druhou stranu, translokace t(8;21) nebo inv(16) jsou často spojovány s příznivějším průběhem nemoci a delším přežitím, zvláště pokud jsou dotčení léčeni intenzivní chemoterapií.



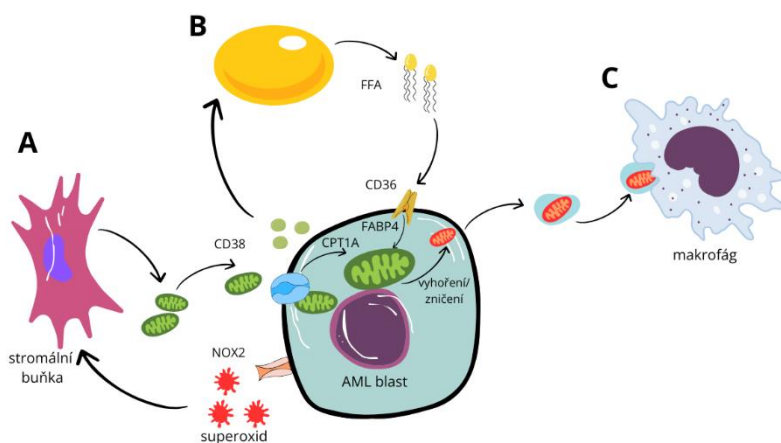
Obrázek 2: Vývoj incidence AML na 100 000 obyvatel v závislosti na věku (mladší vs. starší než 60 let). Na základě dat získaných z amerického registru SEER a mezinárodních studií bylo zjištěno, že incidence AML v posledních dekádách celosvětově stoupá, především u starších pacientů. Tento nárůst je spojen se stárnutím populace a změnami v diagnostických metodách. Zatímco v roce 1980 byla incidence AML v USA přibližně 2,0 případů na 100 000 obyvatel, v roce 2020 se zvýšila na 4,2 případů na 100 000 obyvatel. Mezi lety 2021 a 2040 se očekává globální nárůst případů AML až o 32 %. Vytvořeno autorkou podle (Anon. [b.r.]; Anderson *et al.* 2021).

2.1.4 Vznik a patogeneze

AML vzniká na základě kumulace genetických a epigenetických změn v hematopoetických kmenových buňkách nebo v progenitorech myeloidní linie (obr. 3). Ty se většinou nacházejí v kostní dřeni, která je hlavním místem produkce krevních buněk. To vede k výrazné změně metabolismu jejího mikroprostředí (obr. 4). Mezi nejčastější genetické abnormality patří mutace v genech FLT3, NPM1, DNMT3A a IDH1/2. Tyto mutace vedou k narušení normálních signálních drah, regulace buněčného cyklu, apoptózy a diferenciaci buněk. Kritickým patogenetickým mechanismem AML je konstitutivní aktivace signální dráhy FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3), která způsobuje neomezenou proliferaci leukemických blastů. Mutace NPM1 (nukleofosmin 1) pak ovlivňuje jadernou transportní funkci proteinu a narušuje buněčnou homeostázu. Epigenetické změny, jako je hypermethylace promotorových oblastí tumor-supresorových genů, hrají rovněž zásadní roli v maligní transformaci buněk. (Döhner *et al.* 2010; Mrózek *et al.* 2007; Yu *et al.* 2020)



Obrázek 3: Hematopoéza (zjednodušeně). Červeně znázorněn myeloidní progenitor a jeho vývojová linie. Vytvořeno autorkou podle (Mokobi 2022) a (URL 1).



Obrázek 4: Schéma metabolismu mikroprostředí kostní dřeně při AML. Akutní myeloidní leukémie dokáže manipulovat své okolí v kostní dřeni, aby podpořila vlastní metabolismus: *A- přenos mitochondrií:* AML zvyšuje produkci superoxidu (NOX2), což stimuluje buňky stromatu ke sdílení mitochondrií. Přenos probíhá přes tunelové nanotrubice, které využívají protein CD38; *B- manipulace tukových buněk:* AML aktivuje lipolýzu (rozklad tuků) v adipocytech a zvyšuje příjem volných mastných kyselin (FFA) díky zvýšené expresi CD38 a FABP proteinů; *C- odstraňování poškozených mitochondrií:* AML využívá makrofágy k odstranění svých poškozených mitochondrií, čímž se vyhýbá apoptóze (buněčné smrti). Vytvořeno autorkou podle (Maynard et al. 2022) a (URL 1).

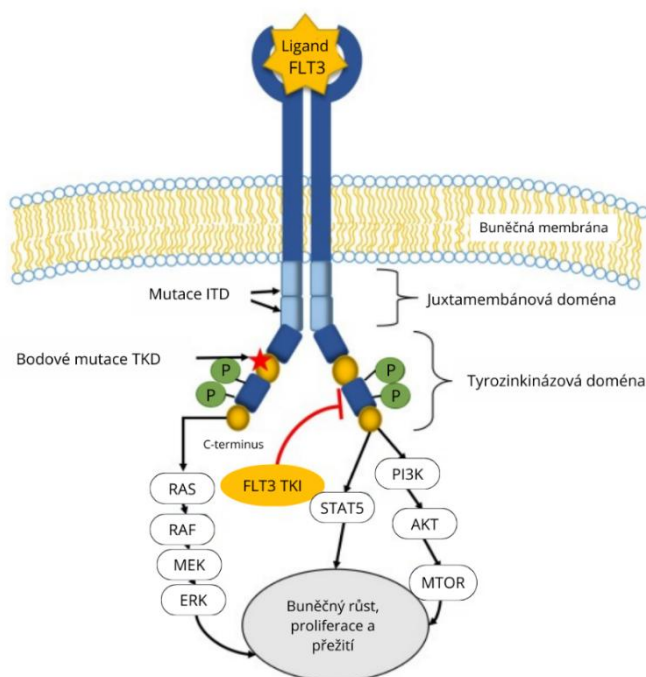
2.2 Patogeneze FLT3 mutace

2.2.1 Tyrozinkinázový receptor FLT3

Receptor FLT3 lokalizovaný v cytoplazmatické membráně, konkrétně pak na chromozomu 13q12, je klíčový pro regulaci růstu a diferenciaci hematopoetických buněk. Je exprimován na povrchu myeloidních a lymfoidních progenitorových buněk, ale na diferencovaných krevních buňkách se nevyskytuje. Fyziologicky interaguje s dalšími růstovými faktory, jako jsou SCF a interleukin 3, a hraje významnou roli v normální krevtvorbě. (Kiyoi *et al.*, 2020)

Strukturálně je receptor tvořen extracelulární ligand-vázací doménou, která se podobá imunoglobulinu, transmembránovou částí, juxtamembránovou podjednotkou a intracelulárními tyrozinkinázovými doménami. V neaktivním stavu existuje jako monomer s konformací, která brání samovolné fosforylaci tyrozinkinázové domény. Aktivace receptoru nastává po vazbě FLT3 ligandu, což způsobí dimerizaci receptoru a spuštění tyrozinkinázové aktivity. Tato aktivace vede k fosforylaci adaptérů, jako jsou SHC, GRB2 a CBL, které následně spouštějí signální dráhy PI3K/Akt, RAS/MAPK a JAK/STAT, jež podporují transkripci genů regulujících přežití a stimulují buněčnou proliferaci a diferenciaci (Kiyoi *et al.*, 2020; Meshinchi & Appelbaum, 2009). Během hematopoetické diferenciaci je exprese tohoto receptoru utlumená (Gilliland a Griffin 2002).

FLT3 ligand (FLT3L) je transmembránový i solubilní protein exprimovaný buňkami kostní dřeně. Mimo jiné se vyskytuje například na buňkách placenty, plic, varlat a ledvin. (Meshinchi a Appelbaum 2009)



Obrázek 5: Struktura a aktivace receptoru FLT3, včetně signálních drah spojených s jeho činností a vlivu mutací (ITD, TKD) a inhibitorů FLT3 na buněčné procesy. P= fosfátová skupina; C-terminus= karboxylový konec proteinu; FLT3 TKI= inhibitor tyrozinkinázy FLT3; RAS, RAF, MEK, ERK (extracelulárně regulovaná kináza)= proteiny, které jsou součástí signální dráhy; PI3K= fosfatidylinositol-3-kináza; AKT= proteinkináza B; MTOR= mechanistický cíl rapamycinu; STAT5= signální transduktor a aktivátor transkripce 5. Ligand FLT3 váže extracelulární část receptoru, což spouští jeho dimerizaci a aktivaci. Mutace ITD v juxtamembránové doméně způsobují konstitutivní aktivaci, zatímco bodové mutace v tyrozinkinázo­vé doméně vedou k hyperaktivaci. Aktivovaný FLT3 receptor fosforyluje intracelulární proteiny a aktivuje dráhy RAS/RAF/MEK/ERK (proliferace), PI3K/AKT/MTOR (přežití) a STAT5 (genová regulace). *Upraveno podle (Weis et al. 2019) a (URL 1).*

2.2.2 Signální dráhy aktivované FLT3 kinázou

Aktivace FLT3 kinázy vede ke stimulaci několika signálních drah prostřednictvím klíčových proteinů, které regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci, metabolismus a apoptózu.

Akt je součástí PI3K/Akt dráhy. Po aktivaci FLT3 kinázy a tvorbě fosfatidylinositol-3,4,5-fosfátu na vnitřní straně membrány je Akt fosforylován fosfoinositid dependentní kinázou. Aktivní Akt následně fosforyluje další proteiny v cytosolu, což ovlivňuje procesy, jako je buněčná proliferace a inhibice apoptózy. Zvýšená exprese Akt v leukemických buňkách přispívá k progresi AML. (Martini *et al.* 2014; Nicholson a Anderson 2002)

Erk patří mezi klíčové prvky Ras-Raf-MEK-ERK dráhy. Tato dráha je aktivována po interakci FLT3 kinázy s ligandem, což vede k uvolnění GTP a aktivaci proteinů Ras, Raf, MEK a Erk. Aktivní Erk fosforyluje širokou škálu proteinů, čímž podporuje buněčný růst, diferenciaci a inhibuje apoptózu. Podobně jako Akt je Erk zvýšeně exprimován v leukemických buňkách a přispívá k jejich nekontrolovatelnému množení. (Ramos 2008; Steelman *et al.* 2011)

Signální dráha JAK/STAT propojuje vazbu extracelulárních ligandů, jako jsou cytokiny, hormony a růstové faktory, na receptory prostřednictvím všudypřítomné intracelulární signální kaskády s transkripčním mechanismem v jádře. Za fyziologických podmínek je přísně regulována a koordinuje celou řadu základních biologických mechanismů, včetně buněčné proliferace, diferenciaci, apoptózy a zánětu. Dysregulace se projevuje za závažných patologických okolností a je běžně spojena s konstitutivně aktivním STAT podporujícím mimo jiné intenzivní zánětlivé stavy nebo tumorigenezi (Villarino *et al.* 2017). Aberantní signalizace dráhy JAK/STAT se podílí na patogenezi akutní myeloidní leukémie (Moser *et al.* 2021).

Mechanistický cíl rapamycinu (mTOR) je kináza, jež je u člověka kódována genem MTOR (Brown *et al.* 1994). mTOR je součástí skupiny proteinových kináz příbuzných fosfatidylinositol-3-kináze (Mitra *et al.* 2015). mTOR koordinuje růst a metabolismus eukaryotických buněk s vlivy prostředí, včetně živin a růstových faktorů. Zastává ústřední roli v regulaci mnoha základních buněčných procesů, od syntézy proteinů po autofagii. Deregulovaná signalizace mTOR se podílí na progresi řady závažných onemocnění, včetně AML, i na procesu stárnutí (Park *et al.* 2010; Saxton a Sabatini 2017).

2.2.3 FLT3 mutace

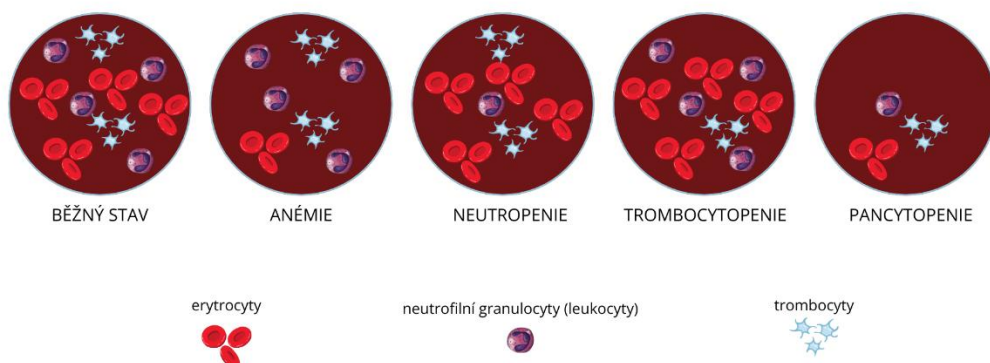
FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) je receptorová tyrosinkináza, která hraje klíčovou roli v regulaci proliferace a diferenciaci hematopoetických buněk. Mutace v genu FLT3 jsou jedním z nejčastějších genetických nálezů u pacientů s AML, vyskytují se u přibližně třetiny případů (Kennedy a Smith 2020; Smith 2019). Nejčastějšími variantami jsou mutace typu vnitřní tandemové duplikace (FLT3-ITD), které postihují zhruba 25 % pacientů s AML, přičemž jde ve většině případů o pacienty starší 55 let, u mladších se vyskytují vzácně. Dále bodové mutace v tyrosin kinázové doméně (FLT3-TKD), jež se objevují přibližně u 5 % nemocných. Na rozdíl od FLT3-ITD je rozšířena obdobně ve všech věkových skupinách (Meshinchi a Appelbaum 2009). Obě tyto mutace způsobují konstitutivní aktivaci FLT3 receptoru nezávislou na přítomnosti ligandu, což vede k nekontrolované proliferaci leukemických buněk, narušení jejich diferenciaci a k agresivnímu průběhu onemocnění. Zvláště mutace FLT3-ITD je spojena s nepříznivou prognózou, vyšším rizikem relapsu a nižší mírou přežití pacientů (Kennedy a Smith 2020; Smith 2019).

Mutace FLT3-ITD se nejčastěji vyskytují v exonu 14 genu FLT3, který kóduje juxtamembránovou (JM) doménu, a způsobují ztrátu inhibičního účinku této domény na tyrosinkinázovou aktivitu receptoru, což vede k jeho trvalé aktivaci; výsledkem je aberantní signalizace prostřednictvím STAT5 a dalších drah (PI3K/Akt, MEK/ERK), potlačení myeloidní diferenciaci a vznik AML s vysokým počtem krevních blastů. (Gilliland a Griffin 2002; Choudhary *et al.* 2005; Schnittger *et al.* 2012)

Naopak FLT3-TKD způsobují změny v aktivační smyčce receptoru, které vedou k jeho trvalé aktivaci prostřednictvím drah PI3K/Akt a MEK/ERK, ale neaktivují STAT5 ani nepotlačují myeloidní diferenciaci, což vysvětluje mírnější dopad těchto mutací na léčebné výsledky, které jsou obecně příznivější než u mutací FLT3-ITD. (Gilliland a Griffin 2002; Choudhary *et al.* 2005; Schnittger *et al.* 2012)

2.3 Průběh a charakteristika

Klinický obraz AML je velmi variabilní a závisí na konkrétních genetických změnách a stupni postižení kostní dřeně. Mezi nejčastější symptomy patří anémie, neutropenie a trombocytopenie (obr. 6), což se projevuje únavou, krvácivými projevy a zvýšenou náchylností k infekcím. Pacienti mohou mít také leukemické infiltráty v různých orgánech, jako jsou slezina, játra nebo kůže, což dále komplikuje klinický obraz. Onemocnění má zpravidla rychlý a agresivní průběh. Bez léčby vede AML k úmrtí během několika týdnů až měsíců v důsledku selhání kostní dřeně nebo závažných infekčních komplikací. (Döhner *et al.* 2010; Inoue *et al.* 2016)



Obrázek 6: Porovnání možných poruch krvetvorby při AML s přirozeným krevním obrazem. Při anémii dochází k poklesu erytrocytů, tudíž i hemoglobinu, pod fyziologickou mez, tj. <110 g hemoglobinu/l krve; při neutropenii dochází k poklesu nejpočetnějších leukocytů v krvi, neutrofilních granulocytů, pod fyziologickou mez, tj. $<0,5 \times 10^9/l$; při trombocytopenii dochází k poklesu trombocytů pod fyziologickou mez, tj. $<100 \times 10^9/l$; při pancytopenii dochází k poklesu všech typů krevních buněk v obvodové krvi pod fyziologickou mez. Vytvořeno autorkou podle (Anon. [b.r.]) a (URL 1).

2.3.1 Extranodální manifestace

Splenomegalie je jednou z nejčastějších extranodálních manifestací, způsobenou infiltrací leukemických buněk do sleziny. Zvětšená slezina může mechanicky destruovat krevní elementy, což dále zhoršuje cytopenie (Estey a Döhner 2006). Podobně je u pacientů běžná i hepatomegalie, která může být spojena se zvýšením jaterních transamináz a cholestázou. U některých pacientů dochází k infiltraci centrálního nervového systému (CNS), což se klinicky projevuje příznaky jako bolest hlavy, ztuhlost šíje, poruchy vědomí nebo parézy hlavových nervů. Leukemická infiltrace CNS je častější u dětských pacientů nebo u dospělých s některými cytogenetickými abnormalitami (Arber *et al.* 2016).

2.3.2 Akutní komplikace

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) je závažnou komplikací, která se často vyskytuje u specifických podtypů AML. DIC je charakterizována nekoordinovanou aktivací koagulační kaskády, což vede k současné trombóze a krvácení. Výsledkem je vznik mikrotrombů v malých cévách, což způsobuje ischemii tkání, zatímco koagulační faktory a destičky jsou vyčerpány, což vede ke spontánnímu krvácení. (Choudhry a DeLoughery 2012)

Klinicky se DIC projevuje krvácením z nosu, sliznic, kůže nebo gastrointestinálního traktu. Další častou a život ohrožující komplikací je febrilní neutropenie, která vzniká jako důsledek myelosuprese po intenzivní chemoterapii (Freifeld *et al.* 2011). Pacienti s febrilní neutropenií bývají často imunokompromitováni, mohou tudíž rychle progredovat do sepse nebo septického šoku, pokud není okamžitě zahájena léčba širokospektrými antibiotiky, v případech virové infekce a mykózy pak antivirotiky či antimykotiky. Vysoké riziko infekce u těchto pacientů je způsobeno nejen deficitem neutrofilů, ale také narušením fyzických bariér, jako je střevní epitel, poškozených chemoterapií.

2.4 Diagnostika

Diagnostika AML je založena na kombinaci morfologického, imunofenotypového, cytogenetického a molekulárního vyšetření. Standardním diagnostickým postupem je aspirace kostní dřeně a následná cytologická analýza. Přítomnost více než 20 % blastů v kostní dřeni nebo periferní krvi je klíčovým diagnostickým kritériem dle Světové zdravotnické organizace, viz “Klasifikace“. Důležitou součástí diagnostiky je imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie, která umožňuje odlišení AML od jiných typů leukémií a hematologických malignit. Cytogenetické vyšetření slouží k detekci chromozomálních aberací, jako je inv(16), t(8;21) nebo t(15;17), které mají prognostický význam. Molekulární analýza mutací, například v genech FLT3-ITD, NPM1 nebo IDH1, pomáhá stratifikovat pacienty do různých rizikových skupin a přizpůsobit léčebný postup (Vardiman a Hyjek 2011; Wang a Bailey 2015). Další důležitou roli hraje stav minimální zbytkové nemoci (MRD), který poskytuje informace o přetrvávajících leukemických buňkách po léčbě. MRD pozitivita, zjištěná například pomocí průtokové cytometrie nebo molekulární analýzy, je spojena s vyšším rizikem relapsu a kratší dobou bez nemoci (Boscaro *et al.* 2023; Pollyea *et al.* 2021).

Moderní diagnostika pochopitelně existuje i v rámci onemocnění s přítomností FLT3 mutace. Nejčastěji používanými metodami jsou PCR (polymerázová řetězová reakce), která umožňuje rychlou a citlivou detekci mutací, a sekvenování nové generace, které nabízí vyšší přesnost a možnost detekce i méně častých variant. Diagnostika se provádí při stanovení diagnózy AML i při relapsu, protože dynamika FLT3 mutací může být odlišná mezi primárním a relabujícím onemocněním. (Maziarz *et al.* 2021)

2.5 Klasifikace

Nejjednodušší, ale klinicky významné, je rozdělení na dva základní typy: AML *de novo* a sekundární AML s myelodysplastickými rysy. Klasifikační systém používaný k rozdělení AML vytvořila WHO a zohledňuje kromě morfologie blastů zásadní v dříve používaných klasifikačních systémech také imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárně genetické diagnostické aspekty. Tento systém se používá v kombinaci s Mezinárodní konsenzuální klasifikací (ICC). (Chang a Kuzu 2023)

Historicky byla AML klasifikována podle morfologie a cytochemických vlastností, jak to stanovila Francouzsko-americko-britská (FAB) kooperativní skupina. Tento přístup rozlišoval osm subtypů na základě linie a stupně diferenciací leukemických buněk. (Arber 2001)

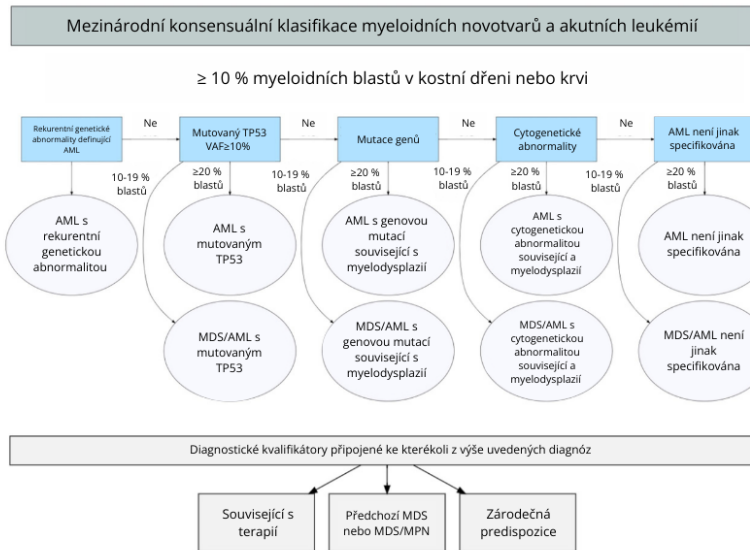
Současné klasifikační systémy zohledňují molekulárně genetické charakteristiky a cytogenetické abnormality. WHO klasifikace v aktuální páté edici rozděluje AML podle genetických markerů, které mají klíčovou prognostickou hodnotu. (Chen *et al.* 2023)

Mezinárodní konsensuální klasifikace (ICC) se zaměřuje na integraci cytogenetických a molekulárních dat. Tento přístup umožňuje přesnější stratifikaci pacientů a lepší pochopení biologických mechanismů onemocnění. Kromě již známých mutací, jako jsou DNMT3A, TET2 nebo IDH1/2, ICC zahrnuje nové kategorie založené na genových fúzích nebo aberacích regulujících epigenetiku a transkripční kontrolu. (Arber 2001; Chen *et al.* 2023)

Cytogenetické analýzy ukazují, že AML je heterogenní i na úrovni genomové nestálosti. Rozlišují se tři hlavní typy: AML s rovnovážnými genovými přestavbami (např. fúze genů RUNX1-RUNX1T1), AML s chromozomálními aneuploidii (např. trisomie 8) a AML s normálním karyotypem, dominovaná mutacemi jednotlivých genů. Tyto skupiny mají zásadní prognostické implikace a často odlišnou odpověď na terapii. (Chen *et al.* 2023)

Mutace FLT3 jsou heterogenní, pokud jde o jejich zatížení, velikost a umístění (Schnittger *et al.* 2012). AML s mutací a FLT3 jsou klasifikovány jako střední riziko dle 2022 ELN klasifikace (Oya *et al.* 2023).

A

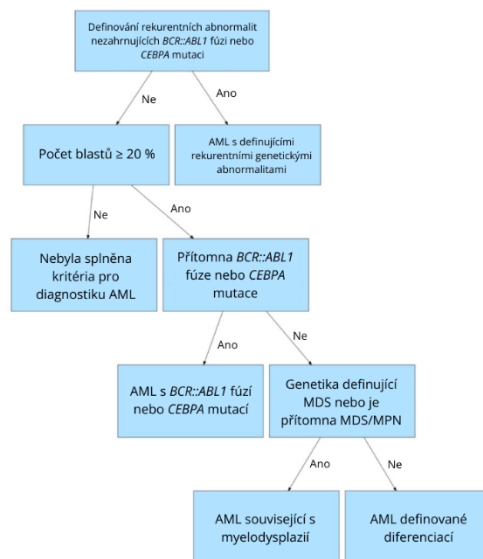


Obrázek 7: Klasifikace AML dle ICC. Upraveno podle (Chang a Kuzu 2023) a (URL 1).

B

Klasifikace hematolymfoidních nádorů Světové zdravotnické organizace: myeloidní novotvary

V případě přítomnosti klinického a patologického podezření na AML, jako je např. zvýšené množství blastů v kostní dřeni/periferní krvi

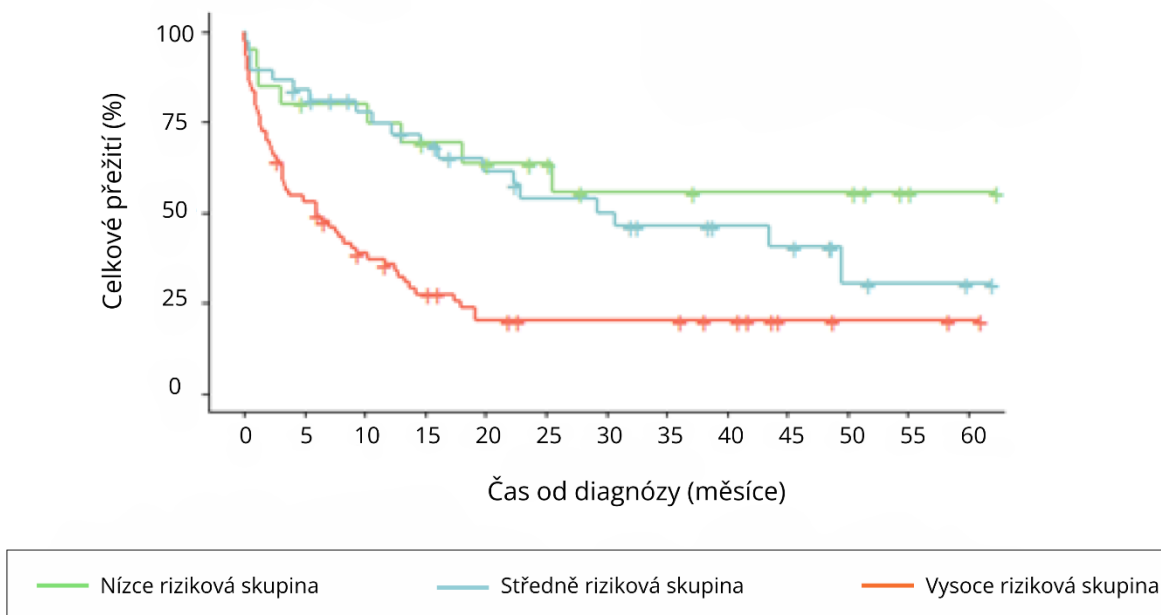


Obrázek 8: Klasifikace AML dle WHO. Upraveno podle (Chang a Kuzu 2023) a (URL 1).

2.5.1 Kategorie a prognóza

AML se normálně nedělí na klinická stádia jako solidní nádory, ale je klasifikována podle rizikových skupin na základě cytogenetických a molekulárních markerů. Mezi pacienty s příznivou prognózou patří ti, kteří mají mutace v genech NPM1 bez přítomnosti FLT3-ITD. Pacienti s mutací FLT3-ITD spadají do středně rizikové kategorie. Osoby s komplexními karyotypovými změnami jsou pak řazeni do skupiny s vysokým rizikem relapsu. Celková prognóza AML je nepříznivá, zejména u starších pacientů. Pětileté přežití se pohybuje kolem

30-40 % u pacientů mladších 60 let, zatímco u dospělých starších 60 let klesá tento faktor pod 20 %. Hlavní příčinou úmrtí je relaps onemocnění nebo komplikace související s léčbou. Celkové pětileté přežití pacientů s AML činilo mezi lety 2014-2020 31,9 %. (Anon. [b.r.]; Nannya *et al.* 2022; Wang a Bailey 2015)



Obrázek 9: Celkové přežití pacientů s AML v % v závislosti na čase od postižení diagnózou. Graf reprezentuje přežití pacientů s AML v souvislosti s jejich cytogenetickým rizikovým profilem. Zobrazuje celkové přežití (OS - Overall Survival) u pacientů zařazených do tří hlavních kategorií dle ELN (European LeukemiaNet) 2022 klasifikace. *Upraveno podle (Aparicio-Pérez et al. 2023) a (URL 1).*

Tabulka 1: Rozdělení rizikových kategorií AML dle ELN 2022. Příznivé riziko zahrnuje pacienty s mediánem celkového přežití přesahujícím 5 let; střední riziko zahrnuje pacienty s mediánem přežití přibližně 2-3 roky; nepříznivé riziko zahrnuje pacienty s mediánem přežití často pod 1 rokem. *Upraveno podle (Stubbins et al. 2022).*

Kategorie rizika	Genetická abnormalita
Příznivé riziko	t (8;21) (q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv (16) (p13.1q22) nebo t (16;16) (p13.1;q22); CBFB-MYH11 Mutovaný NPM1 bez FLT3-ITD bZIP v rámci mutace CEBPA
Střední riziko	Mutovaný NPM1 s FLT3-ITD “Wild-type“ (nemutovaný) NPM1 s FLT3-ITD t (9;11) (p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Cytogenetické abnormality, které nejsou klasifikovány jako příznivé nebo nepříznivé
Nepříznivé riziko	t (6;9) (p23;q34.1); DEK-NUP214 t (v;11q23.3); KMT2A přeuspořádáno t (9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3) (q21.3q26.2) nebo t (3;3) (q21.3;q26.2); GATA2, MECOM (EVI1) t (3q26.2;v); MECOM (EVI1)-přeuspořádáno -5 nebo del (5q); -7; -17/abn (17p) Komplexní karyotyp, monosomální karyotyp Mutace ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 nebo ZRSR2 Mutace TP53

2.6 Léčba AML

Standardní léčba AML, existující již od 70. let, zahrnuje indukční chemoterapii založenou na kombinaci cytarabinu a antracyklinů, která má za cíl dosáhnout kompletní remise. Po indukční léčbě následuje konsolidační terapie, která může zahrnovat vysokodávkovaný cytarabin nebo alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HCT) u pacientů s vysokým rizikem relapsu. Nově se do léčby AML začleňují cílené terapie zaměřené na specifické mutace, jako jsou inhibitory FLT3 (například midostaurin a gilteritinib) nebo inhibitory IDH1/2. Imunoterapie, včetně monoklonálních protilátek a CAR-T buněk, představují další nadějný směr vývoje léčby. Výhled pacientů se postupně zlepšuje díky pokrokům v molekulární diagnostice a personalizované medicíně. Nicméně AML stále zůstává onemocněním s vysokou mortalitou, a proto je důležitý další výzkum zaměřený na identifikaci nových terapeutických

cílů a zlepšení celkového přežití pacientů. (IV. interní hematologická klinika FN HK 2023; Lowenberg 2004; Nannya *et al.* 2022)

Relaps AML představuje návrat onemocnění po dosažení kompletní remise a je spojen s nepříznivou prognózou. Léčebné strategie zahrnují podání záchranné chemoterapie, často s využitím odlišných cytostatik než v indukční fázi, s cílem dosáhnout další remise. Následně je u vhodných pacientů indikována alogenní transplantace krvetvorných buněk (TKB), která nabízí potenciál kurativního účinku. Úspěšnost transplantace však závisí na citlivosti onemocnění k záchranné chemoterapii a celkovém stavu pacienta. (Buliková *et al.* 2013)

Po alogenní TKB je klíčové sledování minimální reziduální nemoci (MRD) a pravidelné monitorování chimerismu k posouzení rizika relapsu. U pacientů s detekovatelnou MRD nebo známkami relapsu lze zvážit podání dávek donorových lymfocytů nebo nasazení hypometylačních agens, jako je azacytidin, s cílem eradikovat reziduální leukemické buňky. Důležitá je také prevence a léčba komplikací spojených s transplantací, včetně reakce štěpu proti hostiteli a infekcí. (Heuser *et al.* 2021)

Konsolidační léčba následuje po dosažení kompletní remise a jejím cílem je eradikace minimální reziduální nemoci a prevence relapsu. Strategie zahrnují podání několika cyklů intenzivní chemoterapie nebo provedení alogenní TKB, zejména u pacientů s nepříznivými prognostickými faktory. Udržovací terapie, například s použitím hypometylačních agens, může být zvážena u vybraných pacientů s cílem snížit riziko relapsu. (Döhner *et al.* 2022)

U starších pacientů nebo pacientů s komorbiditami, kteří nejsou kandidáty na intenzivní chemoterapii, je vhodné zvážit méně toxické léčebné přístupy. Hypometylační agens, jako je azacytidin, mohou být použity k indukci remise s nižší toxicitou. V případech, kdy je cílem zlepšení kvality života a kontrola symptomů, je indikována paliativní péče, která zahrnuje podpůrnou léčbu, transfuzní terapii a symptomatickou léčbu s důrazem na komfort pacienta. (Buliková *et al.* 2013)

2.7 Léčba AML s FLT3 mutací

Léčba AML s FLT3 mutacemi obvykle zahrnuje standardní chemoterapii, následovanou alogenní transplantací hematopoetických kmenových buněk. Standardní chemoterapie, zejména indukční chemoterapie, se však ukázala jako nedostatečná pro dosažení dlouhodobé kontroly onemocnění u pacientů s FLT3-ITD, což vedlo k hledání specifických cílených terapií. V posledních letech došlo k významnému pokroku v léčbě těchto pacientů díky vývoji tyrosinkinázových inhibitorů, které cílí na mutovaný FLT3 receptor. Pacienti s FLT3-ITD, kteří podstoupili alogenní transplantaci kmenových buněk, mohou vykazovat zlepšené dlouhodobé výsledky, zejména pokud jsou léčeni inhibitory FLT3 v rámci indukce nebo konsolidace. Nicméně, riziko relapsu je stále vysoké, což vyžaduje další vývoj a personalizované přístupy v léčbě těchto pacientů. Další možnou cestou je rozdělení pacientů s FLT3-ITD na podskupiny na základě alelického poměru (AR). Pacienti s nízkým AR ($<0,5$) mohou mít lepší prognózu než ti s vysokým AR ($\geq 0,5$), což naznačuje potřebu stratifikace léčby na základě této charakteristiky. (Daver *et al.* 2021; IV. interní hematologická klinika FN HK 2023)

Inhibitory FLT3 mohou být podávány s chemoterapií nebo po ní v kombinovaných režimech. Podávání před chemoterapií může snížit chemosenzitivitu zpomalením nebo zastavením buněčného cyklu. Další úvahou je, že současné podávání inhibitorů FLT3 s chemoterapií může zvýšit toxicitu v důsledku farmakokinetických interakcí. To může být zvláště důležité pro antracykliny, a to následkem interakcí těchto látek a inhibitorů FLT3 s plazmatickými proteiny, zejména s transportními proteiny léčiv z kazety vázající ATP. (Levis *et al.* 2004; Sen *et al.* 2012)

2.8 Klasifikace FLT3 inhibitorů

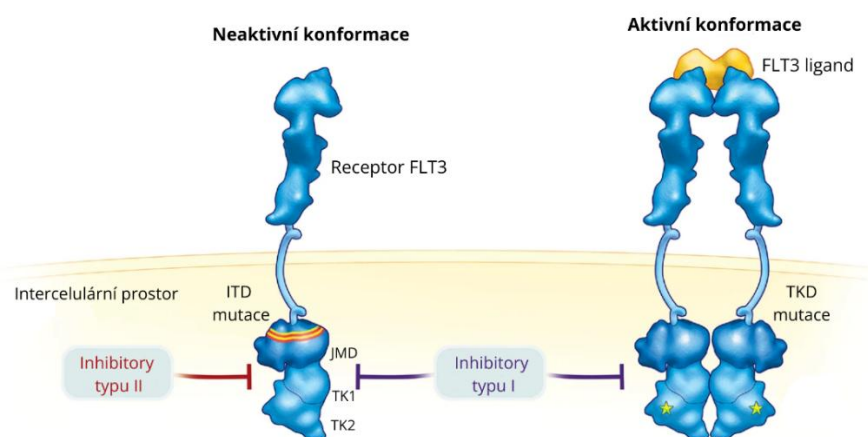
Podle svého mechanismu účinku se dělí na inhibitory první a druhé generace a také na inhibitory typu I a typu II, což ovlivňuje jejich účinnost a klinické využití.

Inhibitory první generace zahrnují látky jako sunitinib, sorafenib, midostaurin, lestaurtinib a tandutinib. Tyto inhibitory nebyly původně vyvinuty s primárním cílem inhibovat FLT3, a proto jejich mechanismus účinku zasahuje široké spektrum receptorových tyrosinkináz (RTK). Inhibice více RTK může mít pozitivní efekt na AML tím, že zasahuje nejen FLT3, ale i paralelní signální dráhy a další cíle důležité pro přežití leukemických buněk. Na druhé straně je však široké spektrum účinku spojeno s vyšší mírou toxicity, což omezuje jejich použití (Maziarz *et al.* 2021). Midostaurin byl schválen pro léčbu dospělých pacientů s nově diagnostikovanou s AML s mutací FLT3 v kombinaci se standardní chemoterapií (Office of the Commissioner 2020). Sorafenib je používán off-label u pacientů s relabující nebo refrakterní AML s mutací FLT3-ITD, zejména v případech, kdy nejsou dostupné jiné možnosti léčby (Metzelder *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2008b). Sunitinib, lestaurtinib a tandutinib neprokázaly dostatečnou účinnost nebo bezpečnost v klinických studiích a nejsou schváleny pro léčbu AML (Ilyas *et al.* 2016; Knapper *et al.* 2017).

Druhá generace FLT3 inhibitorů zahrnuje quizartinib, crenolanib a gilteritinib. Tyto látky byly vyvinuty cíleně a jejich účinek je výrazně specifitější, což vede k nižší míře vedlejších účinků spojených s inhibicí jiných RTK. Na rozdíl od první generace však inhibitory druhé generace postrádají širší spektrum aktivity mimo FLT3. To může být výhodou z hlediska snížené toxicity, avšak zároveň omezující v případech, kdy paralelní signální dráhy hrají důležitou roli v rezistenci leukemických buněk na léčbu. Klinické studie potvrdily vysokou účinnost těchto inhibitorů nejen u pacientů s relabující či refrakterní AML, ale také naznačily jejich potenciál v kombinaci se standardní terapií pro zlepšení dlouhodobého přežití u nově diagnostikovaných pacientů (Maziarz *et al.* 2021). Gilteritinib je využíván pro léčbu dospělých pacientů s relabující nebo refrakterní AML s mutací FLT3 jako monoterapie (Center for Drug Evaluation and Research 2024a). Rovněž quizartinib byl schválen v kombinaci s chemoterapií jako součást úvodní léčby u pacientů s AML s mutací FLT3-ITD (Center for Drug Evaluation and Research 2024b). Přestože crenolanib vykazuje slibné výsledky v klinických studiích, nebyl dosud ratifikován pro klinické použití v léčbě AML (Zhang *et al.* 2019a).

Inhibitory FLT3 lze dále rozdělit na dva hlavní typy podle způsobu jejich interakce s receptorovou tyrosinkinázou FLT3. Tyto typy zahrnují inhibitory typu I, které se vážou na ATP vazebné místo receptoru v jeho aktivní (DFG-in) konformaci, a inhibitory typu II, které se

vážou na hydrofobní oblast přístupnou pouze v neaktivní (DFG-out) konformaci. Oba typy inhibitorů zabraňují autofosforylaci receptoru a jeho signalizaci. Inhibitory typu I, jako například sunitinib, lestaurtinib, midostaurin, crenolanib a gilteritinib, jsou účinné proti mutacím FLT3-ITD i FLT3-TKD (např. mutaci D835). Naopak inhibitory typu II, kam patří sorafenib, quizartinib a ponatinib, jsou cílené na FLT3-ITD, ale nejsou účinné proti většině mutací TKD. Mutace D835 často přispívá k rozvoji sekundární rezistence vůči inhibitorům typu II. (Ke *et al.* 2015; Smith *et al.* 2012; 2015)



Obrázek 10: Mechanismus aktivace FLT3 receptoru, jeho patologické mutace a principy účinku různých inhibitorů. FLT3 inhibitory typu I se vážou na receptor FLT3 v aktivní konformaci, buď v blízkosti aktivační smyčky, nebo kapsy pro vazbu ATP, a jsou aktivní proti mutacím ITD a TKD. FLT3 inhibitory typu II vážou receptor FLT3 v neaktivní konformaci v oblasti sousedící s ATP-vazebnou doménou. V důsledku této vazebné afinity inhibitory FLT3 typu II zabraňují aktivitě mutací ITD, ale necílí na mutace TKD. JMD= juxtamembránová doména; TK= tyrosinkináza. *Upraveno podle (Daver et al. 2019) a (URL 1).*

2.8.1 Midostaurin

Midostaurin byl první inhibitor FLT3 schválený pro léčbu AML. Jeho účinnost byla prokázána v klinické studii RATIFY, kde kombinace midostaurinu s chemoterapií signifikantně zlepšila event-free survival (EFS) oproti standardní chemoterapii, skládající se z cytarabinu a daunorubicinu, u pacientů s mutací FLT3-ITD i FLT3-TKD. Midostaurin působí jako inhibitor typu I. Jeho hlavním přínosem je prodloužení přežití, avšak je spojen s nežádoucími účinky, jako je nevolnost, průjem nebo myelosuprese. Studie navíc ukazují, že jeho účinnost je limitována rozvojem rezistence, zejména sekundárních mutací FLT3. (Milnerowicz *et al.* 2023; Voso *et al.* 2020)

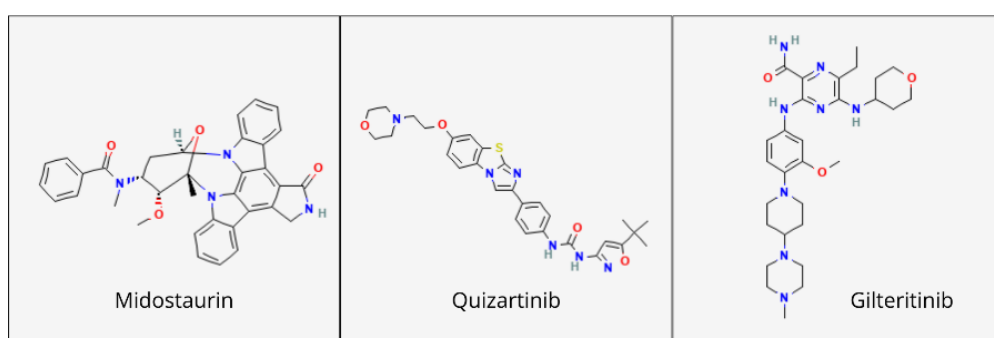
2.8.2 Quizartinib

Quizartinib je selektivní inhibitor typu II, který se váže na neaktivní konformaci FLT3. Byl schválen pro léčbu FLT3-ITD pozitivní AML v kombinaci s chemoterapií a jako udržovací terapie po konsolidační léčbě. Kromě toho byl v Japonsku uznán také jako monoterapie pro dospělá pacienty s relabující nebo refrakterní FLT3-ITD pozitivní AML. Klinické studie ukázaly, že pacienti léčení quizartinibem měli významně delší přežití než ti na placebo. Jeho

použití však doprovází riziko závažných nežádoucích účinků, včetně kardiálních komplikací, jako je prodloužení QT intervalu. Proto je quizartinib dostupný v rámci programu REMS (Risk Evaluation and Mitigation Strategy). (Center for Drug Evaluation and Research 2024b; Cortes 2024; Milnerowicz *et al.* 2023)

2.8.3 Gilteritinib

Gilteritinib je inhibitor typu I ratifikovaný pro léčbu relabující nebo refrakterní AML s mutací FLT3. Studie ukazují, že gilteritinib zlepšuje celkové přežití pacientů, kteří nereagovali na předchozí léčbu. Jeho výhodou je účinnost proti mutacím ITD i TKD, což jej činí univerzálnějším ve srovnání s quizartinibem. Gilteritinib se obvykle podává v monoterapii, což snižuje riziko farmakokinetických interakcí. Stejně jako jiné inhibitory však čelí problému rezistence, zejména v důsledku mutace F691L. (Milnerowicz *et al.* 2023; Voso *et al.* 2020)



Obrázek 11: Souhrn strukturních vzorců klinicky využívaných FLT3 inhibitorů. Upraveno podle (Zhi *et al.* 2019) a (URL 1).

2.9 Problematika rezistence onemocnění vůči léčivům

Rezistence na léčbu AML představuje významnou výzvu, jelikož je hlavním faktorem přispívajícím k relapsu onemocnění a nízké pravděpodobnosti přežití pacientů. Mechanismy rezistence jsou komplexní a zahrnují jak buněčné, tak molekulární procesy ovlivňující účinnost standardní chemoterapie i nových cílených terapií.

2.9.1 Genetické a epigenetické změny

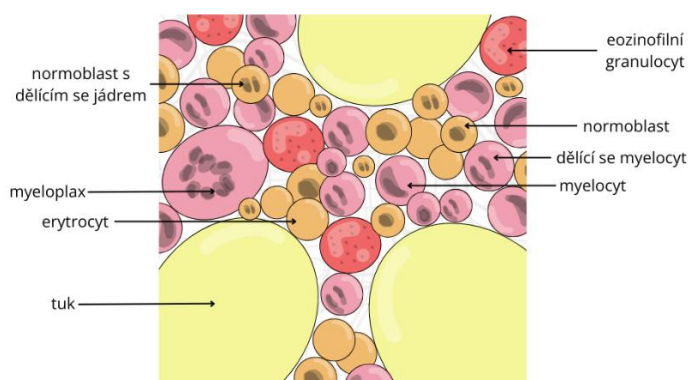
Epigenetické změny, jako je hypermetylace promotorů tumor supresorových genů nebo změny v acetylaci histonů, mohou ovlivnit expresi genů souvisejících s odpovědí na léčbu. Takové změny mohou vést ke ztrátě funkce klíčových proteinů, které jsou cílem chemoterapie nebo imunoterapie. (Zhang *et al.* 2019b)

2.9.2 Mikroprostředí kostní dřeně

Mikroprostředí kostní dřeně hraje klíčovou roli v přežití leukemických buněk a jejich rezistenci vůči léčbě. Buňky stromatu v kostní dřeni poskytují podpůrný prostor pro leukemické buňky, zajišťují jim výživu a chrání je před toxickými účinky chemoterapie. Interakce mezi leukemickými buňkami a stromálními buňkami prostřednictvím adhezivních molekul a

cytokinů, jako je IL-6 nebo CXCL12, může zvýšit odolnost buněk vůči léčbě a přispět k jejich přežití v dormantním stavu. (Duy *et al.* 2016)

Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) je hlavní lidský enzym zodpovědný za I. fázi metabolismu složek potravy, předepsaných léčiv a xenobiotik, steroidních hormonů a žlučových kyselin. Inhibice aktivity CYP3A4 může narušit fyziologické mechanismy, včetně endokrinního systému a odpovědi na příjem léků (Guttman a Kerem 2022). Mechanismus exprese enzymů cytochromu P450 (CYP) byl identifikován jako proces, kterým může mikroprostředí kostní dřeně přispívat k rezistenci na léčiva. Byla zkoumána potenciální role CYP3A4 z hlediska rezistence k FLT3 inhibitorům zprostředkované mikroprostředím kostní dřeně. Bylo zjištěno, že CYP3A4 hraje hlavní roli v potlačení aktivity různých FLT3 inhibitorů (sorafenib, quizartinib a gilteritinib) (Chang *et al.* 2019).



Obrázek 12: Složení kostní dřeně z hlediska buněk. Vytvořeno autorkou podle (Anon. [b.r.] a (URL 1).

2.9.3 P-glykoprotein a další transportéry

Významným faktorem rezistence je rovněž zvýšená exprese transportních proteinů, jako je P-glykoprotein (P-gp). Tento protein funguje jako pumpa, která aktivně transportuje chemoterapeutické látky ven z leukemických buněk, čímž snižuje jejich intracelulární koncentraci a účinnost. Zvýšená exprese P-gp byla spojena s rezistencí na doxorubicin, vincristin a další cytotoxické látky. (Zhang *et al.* 2019b)

Dalším podstatným proteinem je glutathion-S-transferáza, která katalyzuje detoxikaci reaktivních látek a snižuje účinnost chemoterapie. Tato detoxikační schopnost je často zvýšena v rezistentních buňkách, což snižuje účinnost léků, jako jsou platinové sloučeniny a alkylující činidla. (Zhang *et al.* 2019b)

2.9.4 Reverzibilní senescence

Rezistentní AML buňky mohou vstoupit do stavu reverzibilní senescence, což je proces, při kterém buňky zůstávají metabolicky aktivní, ale přestávají proliferovat. Tento stav je indukován genotoxickým stresem vyvolaným chemoterapií a je zprostředkován aktivací kináz, jako je ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein). Buňky ve stavu senescence mohou

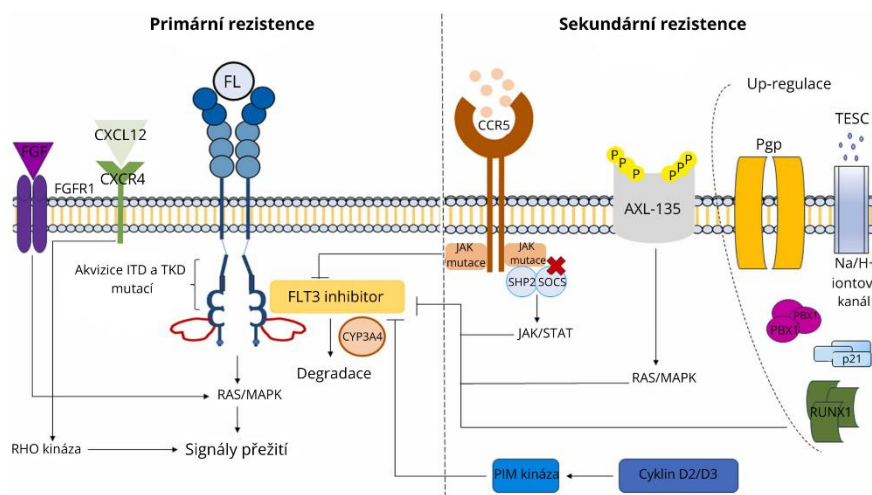
přežít léčbu a po určité době se reaktivovat, což vede k relapsu. (Duy *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2019b)

2.9.5 Rezistence onemocnění na FLT3 inhibitory

Rezistence vůči FLT3 inhibitorům může být primární (vrozená) nebo sekundární (získaná) (Eguchi *et al.* 2020).

Primární rezistence se vyskytuje u přibližně třetiny pacientů a souvisí s existujícími vlastnostmi rakovinných buněk, které snižují citlivost na inhibitory FLT3. Patří sem například upregulace enzymu CYP3A4, zvýšená sekrece fibroblastového růstového faktoru 2, aktivace FLT3 ligandu (FLT3L) nebo zvýšená exprese receptoru CXCR4. Tyto faktory brání účinnosti léčby již při jejím zahájení. (Chang *et al.* 2019; Jacobi *et al.* 2010; Sato *et al.* 2011; Traer *et al.* 2016)

Sekundární rezistence se vyvíjí v průběhu léčby pod selektivním tlakem inhibitorů FLT3. Mechanismy zahrnují aktivaci alternativních signálních drah (např. JAK/STAT, PI3K/AKT) nebo selekci subpopulací rakovinných buněk s odolnými vlastnostmi. Dále může dojít k získání nových mutací (např. TET2, RAS, IDH1/2) nebo adaptivním změnám v mikroprostředí nádoru, což umožňuje přežití a proliferaci buněk navzdory léčbě. (Daver *et al.* 2015; Lindblad *et al.* 2016; Natarajan *et al.* 2013; Park *et al.* 2015; Piloto *et al.* 2006)



Obrázek 13: Schematické mechanismy primární (on-target) a sekundární (off-target) rezistence vůči inhibitorům FLT3. FL= FLT3 ligand; FGF= fibroblastový růstový faktor; FGFR1= receptor pro fibroblastový růstový faktor; CXCL12= chemokin 12; CXCR4= chemokinový receptor typu 4; RHO= rod proteinů; RAS/MAPK= signální dráha zahrnující RAS a MAP kinázy; CYP3A4= enzym cytochromu P450; CCR5= chemokinový receptor typu 5; JAK (Janus kináza)/STAT (signální přenašeč a aktivátor transkripce)= buněčná signalizační cesta; SHP2= fosfatáza 2 obsahující doménu homologie src 2; SOCS= supresor cytokinové signalizace; PIM= provirové integrační místo pro virus Moloneyho myší leukemie; AXL= tyrozinkinázový receptor; P= fosfátová skupina; Pgp= P-glykoprotein; TESC= tescalcin; PBX1= transkripční faktor 1 pre-B-buněčné leukémie; p21= protein p21(Cip1/Waf1); RUNX1= transkripční faktor zapojený do vývoje hematopoetických buněk. *Upraveno podle (Ruglioni et al. 2024) a (URL 1).*

2.9.6 Strategie k překonání rezistence

Současný výzkum se zaměřuje na vývoj nových inhibitorů, které cíleně blokuji klíčové dráhy rezistence, ale také monoklonálních protilátek či jiných možností léčby. Například inhibitory FLT3 jsou používány k cílení na mutované leukemické buňky, zatímco inhibitory ATR se zkoumají jako prostředky k narušení senescentního stavu leukemických buněk. Rovněž se zkoumá kombinace chemoterapie s imunoterapií, která by mohla překonat ochranné účinky mikroprostředí kostní dřeně. (Duy et al. 2016; Zhang et al. 2019b)

2.10 Budoucí směry cílené terapie vůči FLT3 receptoru

Díky narůstajícímu porozumění molekulárním mechanismům AML a jejím rezistencím či možnostem v léčbě se cílená terapie nejen FLT3 mutace neustále vyvíjí. Avšak navzdory úspěchům inhibitorů společnost stále čelí výzvám, které souvisejí s relapsy či již zmíněnými rezistencemi na běžnou léčbu. Takovéto komplikace tak představují motivaci pro vývoj nových strategií, jež se týkají nejen zdokonalených inhibitorů, ale také kombinací s dalšími možnými léčebnými způsoby, a to za účelem zlepšení dlouhodobé účinnosti terapie.

Jedním z klíčových směrů je optimalizace kombinací FLT3 inhibitorů s dalšími cílenými látkami nebo chemoterapií. Preklinické i klinické studie ukazují, že kombinace s venetoklaxem,

inhibitorem BCL-2, mohou překonat mechanismy rezistence, jako je zvýšená exprese MCL-1, a posílit apoptotické účinky léčby. Tyto kombinace již prokazují významné synergické účinky a zlepšují míru remise u pacientů, kteří nereagují na standardní terapii. (Fedorov *et al.* 2023; Lachowiez *et al.* 2023)

Imunoterapie je dalším slibným směrem. Výzkum bispecifických protilátek a CAR-T buněk zaměřených na FLT3 je v rané fázi vývoje, ale již nyní vykazuje potenciál překonat limity současné cílené léčby. Tyto metody využívají imunitní systém k přesnému zacílení leukemických buněk, což by mohlo zásadně změnit přístup k terapii relabujících nebo refrakterních pacientů. (Lachowiez *et al.* 2023)

V neposlední řadě je kladen důraz na minimalizaci toxicity a individualizaci terapie. Vývoj třetí generace FLT3 inhibitorů se zaměřuje na zlepšení selektivity vůči mutovaným formám receptoru, což by mělo snížit nežádoucí účinky na zdravé buňky. Genomické analýzy a biomarkery se také stávají standardem pro výběr optimální léčby, což umožňuje přizpůsobit terapii specifickým potřebám jednotlivých pacientů. (Fedorov *et al.* 2023; Lachowiez *et al.* 2023)

Závěrem lze tedy říci, že budoucnost cílené terapie FLT3 představuje kombinace pokročilých inhibitorů, pokrokové imunoterapeutické přístupy či medicínu přizpůsobenou a upravenou konkrétním pacientům. Takovéto koncepce by tak mohly významně vést ke zdokonalení dlouhodobého přežití a kvality života osob trpících AML.

3 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl charakterizovat tři nově syntetizované sloučeniny s potenciálem inhibovat FLT3 mutovaný receptor a následně je porovnat s výsledky dosaženými klinicky používanými inhibitory, tj. midostaurinu a quizartinibu.

K objasnění této problematiky byly stanoveny dva hlavní cíle:

- 1) Ověřit vliv testovaných potenciálních léčiv efekt na buněčnou proliferaci prostřednictvím metody MTT na buněčných liniích akutní myeloidní leukémie MV4-11 a MOLM-13 (exprimující mutovaný FLT3 receptor) a kontrolní THP-1 (exprimující wt FLT3 receptor) a posoudit, zda je jejich efekt specifický pro FLT3 mutovaný receptor.
- 2) Určit efekt těchto sloučenin u gilteritinib-rezistentní linie MV4-11 g45, porovnat jej s účinkem u MV4-11 wt linie a tím zjistit, zdali by látky mohly být schopny překonat rezistenci vůči gilteritinibu.

4 Materiál

Praktická část práce byla uskutečněna ve Výzkumné skupině buněčné farmakologie a onkologie doc. Čechové, na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

4.1 Chemikálie

4.1.1 Reagencie

- Fetal Bovine Serum (FBS) - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- kyselina chlorovodíková (HCl) - Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- isopropylalkohol (C₃H₈O) - Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- L-glutamin - Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) - Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- RPMI-1640 Medium - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- trypanová modř (C₃₄H₂₄N₆Na₄O₁₄S₄) - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

4.1.2 Inhibitory

- gilteritinib - MedChemExpress (Monmouth Junction, USA)
- midostaurin - MedChemExpress (Monmouth Junction, USA)
- quizartinib - MedChemExpress (Monmouth Junction, USA)

4.1.3 Testované látky

- LG-2189 - Centrum biomedicínského výzkumu FN HK (Hradec Králové, Česká republika)
- PSU28 - Centrum biomedicínského výzkumu FN HK (Hradec Králové, Česká republika)
- PSU32 - Centrum biomedicínského výzkumu FN HK (Hradec Králové, Česká republika)

4.2 Laboratorní vybavení

- centrifuga C-28A - Boeco Germany (Hamburk, Německo)
- sterilní inkubátor MCO-18AIC(UV) CO₂ Incubator - Sanyo (Ósaka, Japonsko)
- laminární box HR1200-IIA2-S - Haier Biomedical (Londýn, Spojené království)
- lázeň vodní nemíchaná - PolyScience (Niles, USA)
- mikroskop - Optika Microscopes Italy (Ponteranica, Itálie)
- multidetekční destičkový systém (spektrometr) Hidex Sense Beta Plus - Hidex Oy (Turku, Finsko)
- počítačka buněk Bio-Rad TC20TM - Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

- třepačka Thermomixer comfort - Eppendorf (Hamburk, Německo)
- vortex V1 plus - Biosan (Riga, Lotyšsko)

4.3 Software

- GraphPad Prism 10

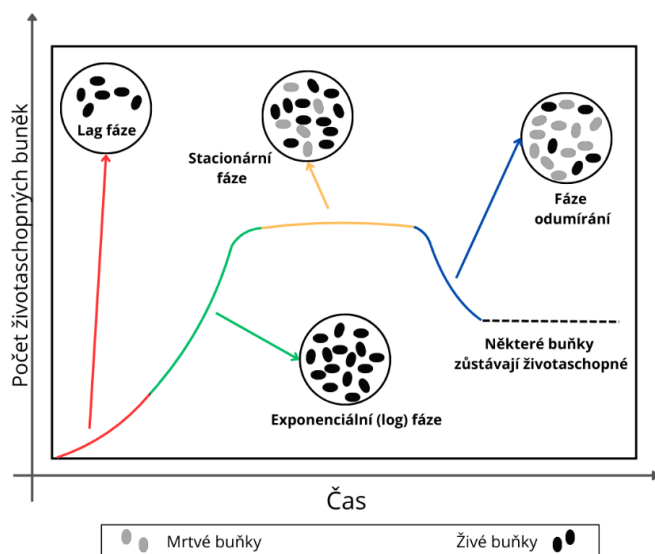
5 Metodika

5.1 Buněčná kultura

Buněčná kultura je pojem označující proces růstu a udržování buněk ve vyhovujícím uměle vytvořeném prostředí, tj. *in vitro* (ve skle), za přesně stanovených podmínek, jež věrně napodobují jejich fyziologické podmínky (Kočárek *et al.* 2010). Kultivace (pěstování) buněk se odehrává ve sterilní kultivační nádobě obsahující růstové médium. Toto médium se svým chemickým složením a fyzikálními vlastnostmi snaží co nejvíce přiblížit přirozenému prostředí v těle (*in vivo*), tedy tělním tekutinám (lymfě, krevní plazmě, mozkomíšnímu moku atd.) (Kočárek *et al.* 2010). Nezbytnou součástí živného média je sérum (fetální bovinní sérum), které iniciuje buňky k dělení a podporuje tedy i růst celé kultury. Další součástí tohoto média mohou být i antibiotika, z důvodu předcházení infekci a tím i zániku celé kultury (Kočárek *et al.* 2010).

Kultivační lahev je vložena do inkubátoru, který reguluje vhodnou teplotu, vlhkost a úroveň CO_2 a O_2 v prostředí, ve kterém se vzorek množí. Velký důraz se musí klást na sterilitu používaných nástrojů, aby nedošlo k infikaci dané kultury. (Kočárek *et al.* 2010)

Růst buněk probíhá charakteristicky a lze jej popsat růstovou křivkou, která vyjadřuje změny četnosti buněk v závislosti na čase (obr. 14) (Anon. 2015). Tato křivka je složena ze čtyř částí. Jakmile stoupne počet buněk na neúnosnou míru, je potřeba buňky pasážovat (subkultivovat) do nové kultivační nádoby.



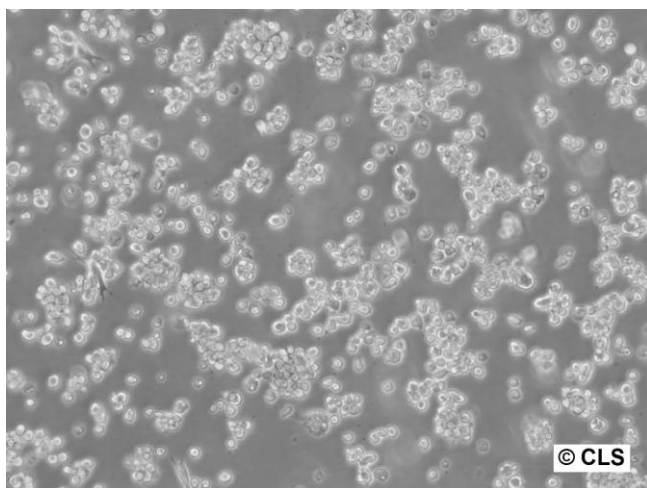
Obrázek 14: Růstová křivka buněčné kultury. *Lag fáze* – počáteční fáze, počet buněk nejprve mírně klesne a poté začíná narůstat. *Log fáze* – počet buněk exponenciálně roste; pasážování buněk. *Stacionární fáze* – růst buněk se postupně zastavuje, dochází ke kontaktní inhibici; pasážování buněk. *Fáze odumírání* – konečná fáze, udržení kultury již není možné. Vytvořeno autorkou podle (Kočárek *et al.* 2010) a (URL 1).

5.2 Buněčné linie

V našem experimentu byly použity tři nádorové buněčné linie, jež byly odvozeny z krve pacientů s akutní myeloidní leukémií. Ve všech typech linií se jedná o suspenzní buňky.

5.2.1 MV4-11 wt

Buněčná linie MV4-11 wt (obr. 15), izolovaná z blastických buněk desetiletého chlapce s bifenotypickou B-myelomonocytární leukémií, slouží jako důležitý zdroj zejména při studiu akutní myeloidní leukémie. MV4-11 má homozygotní mutaci FLT3-ITD a jasně exprimuje aktivovaný receptor FLT3 (Ko *et al.* 2019). Pro naše experimenty jsme ji označovali též MV4-11 wt jako „wild type“, tedy základní MV4-11 buněčnou linii, od které byla v naší laboratoři odvozena též linie rezistentní k FLT3 inhibitoru gilteritinibu. Tato je označována MV4-11 g45, a je popsána dále.



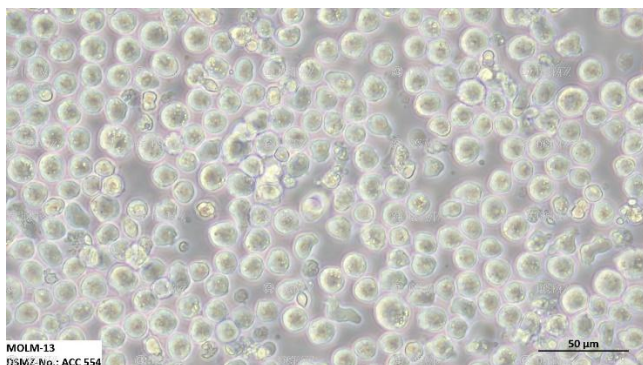
Obrázek 15: Buněčná linie MV4-11. Převzato z (Anon. [b.r.]).

5.2.2 MV4-11 g45

Rezistentní linie MV4-11 g45 byla vytvořena z linie MV4-11 wt dlouhodobou kultivací s postupně narůstající koncentrací gilteritinibu. Rezistence se zdá být trvalá, z důvodu, že i po ukončení přidávání gilteritinibu ke kultivaci, v buňkách přetrvává.

5.2.3 MOLM-13

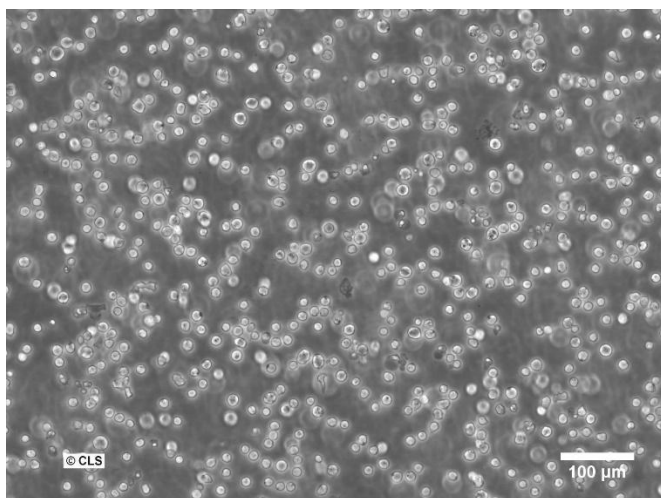
MOLM-13 je buněčná linie lidské leukémie (obr. 16) odvozená z periferní krve pacienta s akutní myeloidní leukémií při relapsu. MOLM-13 nese heterozygotní mutaci FLT3-ITD. Tato mutace způsobuje konstitutivní aktivaci FLT3 receptoru, což vede k neřízené proliferaci hematopoetických buněk. (Zhang *et al.* 2008a)



Obrázek 16: Buněčná linie MOLM-13. Převzato z (Anon. [b.r.]).

5.2.4 THP-1

THP-1 je monocytární lidská buněčná linie (obr. 17) získaná z krve pacienta trpícího akutní leukemií. Narozdíl od předešlé buněčné linie MV4-11, která nese mutaci FLT3-ITD, linie THP-1 tuto specifickou mutaci nemá (Tsuchiya *et al.* 1980). Absence mutace FLT3-ITD nebo jiných aktivačních mutací ve FLT3 receptoru odlišuje THP-1 od buněčných linií, které jsou výrazně závislé na aberantní FLT3 signalizaci. Buněčná linie THP-1 neprochází neřízenou proliferací prostřednictvím konstitutivně aktivované FLT3 tyrosinkinázy, tudíž signalizace přes FLT3 receptor u THP-1 funguje normálně a je regulována běžnými fyziologickými podněty (Liu *et al.*, 2015).



Obrázek 17: Buněčná linie THP-1. Převzato z (Anon. [b.r.]).

5.3 Pasážování a kultivace buněk

Všechny buňky byly uchovávány v kultivačních lahvích ve vhodném médiu. Pro buněčné linie MV4-11 wt a MV4-11 g45 to bylo médium IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) s 10% FBS (Fetal Bovine Serum) a 4 mM L-glutaminu. Liniím MOLM-13 a THP-1 bylo poskytnuto médium RPMI-1640 rovněž s 10% FBS. Buněčné linie byly kultivovány ve sterilním inkubátoru udržujícím stálou teplotu 37 °C a 5 % CO₂ v atmosféře.

Dle rychlosti růstu buněk probíhala pasáž standartně každé 3-4 dny. Před začátkem experimentu je nutné vysterilizovat laminární box, včetně předmětů uvnitř, UV zářením a následně povrchy 70% ethanolem, stejně jako všechny pomůcky přenášené dovnitř lamináru. Po celou dobu práce v laminárním boxu je nutností používat nitrilové rukavice, které byly stejně, jako všechny ostatní předměty vložené do laminárního boxu, dezinfikovány ethanolem. V laminárním boxu byl mimo jiné umístěn i plynový kahan, jenž byl použit k důslednější sterilizaci hrdel kultivačních lahví s buňkami či hrdel lahví s médiem. Tento krok byl využíván především z důvodu manipulace předmětů v nesterilním prostředí, v jehož důsledku dochází ke kumulaci nežádoucích bakterií i v oblasti hrdel lahví. Zejména z těchto míst mohou bakterie s velkou pravděpodobností proniknout do sterilního obsahu nádoby.

Nejdříve byla určena životaschopnost buněk. Za účelem označení buněk s porušenou buněčnou stěnou byla použita 0,4% trypanová modř. Pro jejich následné spočítání byl vzorek na počítačím čipu vložen do počítačky buněk Bio-Rad TC20™.

V době pasáže se hustota buněk pohybovala vždy v rozmezí 0,9 – 3,4 milionů buněk na 1 ml. Buňky byly zpravidla nasazeny k další kultivaci v hustotě 150 000 – 200 000 buněk na mililitr.

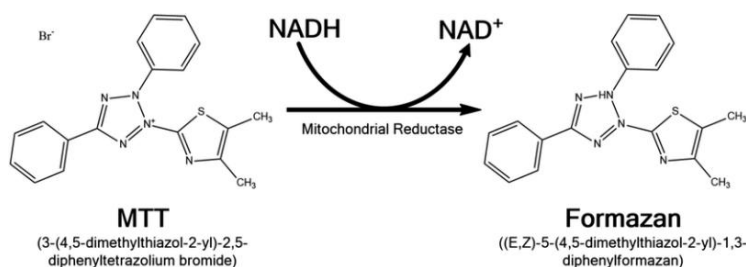
V případě linie MV4-11 g45 byl pro udržení rezistence této linie vůči již v praxi užívaným léčivům dodán gilteritinib o výsledné koncentraci 0,492 nM. Inhibitor byl přidán na konci celého procesu pasážování. Experimenty na buněčné linii MV4-11 wt i MV4-11 g45 byly prováděny v době, kdy byla linie v rozmezí 9-13 pasáže, u linií MOLM-13 a THP-1 to byla pasáž 3-7.

5.4 MTT test životaschopnosti buněk

5.4.1 Princip

MTT test představuje první kolorimetrickou metodu, která byla poprvé představena v roce 1986 (Houghton *et al.* 2007). Test je využíván k hodnocení počtu živých buněk na základě měření aktivity mitochondrií. Žlutý solubilní roztok tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) je redukován v živých a metabolicky aktivních buňkách mitochondriálními dehydrogenázami a redukčními činidly na purpurově zbarvenou sraženinu formazanu (Mahto *et al.* 2010; Stockert *et al.* 2012). Redukce MTT na formazan je omezena v případě cytotoxického poškození či zničení buňky (Mahto *et al.* 2010). K rozpuštění formazanu a následně i vzniku heterogenní směsi je potřeba silného detergentu. Za tímto účelem byl použit acidifikovaný isopropylalkohol. Stupeň zabarvení je dále hodnocen spektrofotometricky* při vlnové délce 570 nm a 720 nm. Hodnota 570 nm představuje totiž absorpční maximum formazanu, vlnová délka 720 nm pak slouží jako referenční (porovnávací) hodnota. Míra absorbance je přímo úměrná množství živých buněk, to znamená, že čím tmavší je zbarvení roztoku, tím vyšší je počet živých buněk (Van Meerloo *et al.* 2011).

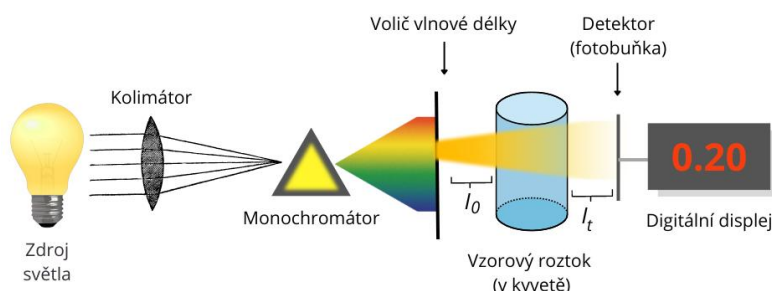
V práci představoval tento test základní metodu, jelikož byla jeho prostřednictvím zjišťována účinnost inhibitorů na standartní i rezistentní leukemické buněčné linie.



Obrázek 18: Chemicky znázorněný průběh redukce MTT na formazan prostřednictvím kenzymu nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NAD(P)H) a dehydrogenázy obsažených v metabolicky aktivních buňkách. Převzato od (Kamiloglu et al. 2020).

*Spektrofotometrická analýza

Spektrofotometrie představuje metodu měření detekující, jak moc chemická látka absorbuje světlo, a to měřením intenzity světla při průchodu jeho paprsku roztokem vzorku. Základním principem je fakt, že každá sloučenina absorbuje nebo propouští světlo v určitém rozsahu vlnových délek. Spektrofotometrie je jednou z nejužitečnějších metod kvantitativní analýzy v různých oborech, jako je chemie, fyzika, biochemie, materiálové a chemické inženýrství a klinické aplikace. Tato metoda byla využita i v naší studii ke změření cytotoxicity/antiproliferativní aktivity každého testovaného FLT3 inhibitoru. (Vo 2013)



Obrázek 19: Základní struktura spektrofotometru složeného ze spektrometru a fotometru. Spektrometr vytváří požadovaný rozsah vlnových délek světla. Nejprve kolimátor (čočka) přenáší přímý paprsek světla (fotonů), který prochází monochromátorem (hranolem), aby jej rozdělil na několik vlnových délek (spektrum). Poté volič vlnové délky (štěrba) přenáší pouze požadované vlnové délky, přičemž I_t je intenzita světla po průchodu paprsku světla kyvetou a I_0 je intenzita světla před průchodem paprsku světla kyvetou. Fotometr detekuje množství fotonů, které je absorbováno poté, co požadovaný rozsah vlnových délek světla projde roztokem vzorku v kyvetě, které je absorbováno. Dále odešle signál do galvanometru nebo digitálního displeje. Vytvořeno autorkou podle (Vo 2013) a (URL 1).

5.4.2 Přehled testovaných látek, jež inhibují kinázu mutace FLT3, na buněčných liniích

V případě sloučenin PSU28, PSU32 a LG-2189 se jednalo o látky 4. generace, vzniklé postupnou chemickou úpravou struktury na základě předchozího testování antiproliferativního účinku a selektivity k FLT3 receptoru. Látky byly syntetizovány v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové a následně testovány Výzkumnou skupinou buněčné farmakologie a toxikologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Uvedená spolupráce probíhá na základě financovaného projektu Grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR č. NU-23-08-00439.

V experimentu bylo testováno celkem 5 inhibitorů na 4 AML buněčných liniích. Z důvodu validity výsledků bylo testování každého inhibitoru na dané linii provedeno minimálně 3x.

Za účelem otestování potenciálních inhibitorů PSU28 a PSU32 byl s těmito látkami realizován experiment na každé z linií, s výjimkou rezistentní buněčné linie MV4-11 g45, kde nebyl experiment proveden s látkou PSU32, a to z důvodu její již dříve zjištěné nedostatečné účinnosti na senzitivní linii. Na každé z linií byly rovněž testovány inhibitory, jež jsou aktuálně využívány v klinické praxi – midostaurin a quizartinib. Tyto látky byly využity k porovnání účinnosti nově vyvíjejících se FLT3 inhibitorů, tudíž k otestování, zda se nové potenciální inhibitory v různých kritériích jeví lépe než ty již existující. Testování látky LG-2189 na liniích MV4-11 wt, MOLM-13 a THP-1 bylo v minulosti již provedeno. Tato látka vykazovala jedny z nejlepších výsledků z šedesáti testovaných inhibitorů. Výzkum však nezahrnoval testy látky LG-2189 na rezistentní linii MV4-11 g45, z tohoto důvodu byly experimenty na této látce zařazeny i do této práce. Tyto údaje byly shrnuty i schematicky, viz tabulka 2.

Při testování inhibitorů na rezistentní linii bylo den před provedením experimentu buňkám vyměněno médium za účelem oddělení buněk od přidaného gilteritinibu. Tento krok byl zvolen z důvodu možného ovlivnění výsledku nežádoucí přítomností inhibitoru a odstranění vlivu této látky na buňky bezprostředně před provedením experimentu.

Tabulka 2: Shrnutí testovaných inhibitorů na jednotlivých liniích v experimentech

Buněčná linie	Testovaný inhibitor
MV4-11 wt	midostaurin
	quizartinib
	PSU28
	PSU32
	LG-2189
MV4-11 g45	midostaurin
	quizartinib
	PSU28
	LG-2189
MOLM-13	midostaurin
	quizartinib
	PSU28
	PSU32
THP-1	midostaurin
	quizartinib
	PSU28
	PSU32

5.4.3 Realizace experimentu

Po celou dobu trvání experimentu probíhá práce za sterilních podmínek v laminárním boxu. Nejprve byly buňky spočítány, viz kapitola “Pasážování a kultivace buněk“. Z údajů bylo definováno množství buněk a média potřebného k nasazení do jamek. V případě linií MV4-11 wt, MV4-11 g45 a THP-1 byl počet buněk 35 000/jamku, u linie MOLM-13 to bylo 50 000 buněk/jamku. Pro uskutečnění experimentu byla připravena sterilní 96-jamková destička, jež byla vizuálně rozdělena na jamky, ve kterých probíhal experiment, na kontrolní jamky a na jamky indikační, viz tabulka 3. Výsledný objem každé jamky dosahoval 150 μ l.

Tabulka 3: Demonstrativní schéma 96 jamkové destičky. x znázorňuje postranní jamky obsahující PBS (z důvodu zamezení vypařování testovaných vzorků); -/- představuje jamky s médiem, buňkami i inhibitory v různých koncentracích, přičemž každá koncentrace byla pro validitu výsledků nasazena v triplicátu (viz barevné znázornění; nejméně koncentrovaný roztok byl nasazen do pravé spodní řady, nejkoncentrovanější pak do levé horní řady); K znázorňuje kontrolní jamky s médiem a buňkami; P představuje indikační jamky pouze s médiem.

x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
x	-	-	-	x	P	P	x	-	-	-	x
x	-	-	-	x	P	P	x	-	-	-	x
x	-	-	-	x	K	K	x	-	-	-	x
x	-	-	-	x	K	K	x	-	-	-	x
x	-	-	-	x	K	K	x	-	-	-	x
x	-	-	-	x	K	K	x	-	-	-	x
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Za účelem zamezení odpařování testovaných látek v inkubátoru bylo přidáno 150 μ l PBS do každé z postranních jamek a jamek ležících v pátém a osmém sloupci destičky.

Ředění testovaných látek, a tudíž i jejich množství v každém triplicátu, se odvíjelo od typu buněčné linie a aplikovaného inhibitoru, viz tabulka 4. Koncentrace látek midostaurin a quizartinib se při testování na liniích MV4-11 wt, MV4-11 g45 a MOLM-13 pohybovala v rozmezí 0,061 nM - 0,125 μ M. Na těchto liniích, nesoucích mutaci FLT3 receptoru, byla zkoumána i látka PSU28, a to v koncentrační řadě od 97,719 nM - 2,0 μ M. Koncentrační řada inhibitorů PSU32 a LG-2189 byla pro zmíněné linie shodně 0,11561 - 10,0 μ M. Výjimku představuje pouze látka PSU32 v rámci linie MV4-11 g45 a látka LG-2189 u MOLM-13, jelikož zde testování nebylo provedeno. V případě buněčné linie THP-1 bylo nutno použít vyšší koncentrace látek, jelikož nenese mutaci FLT3 receptoru. Konkrétně byly tyto hodnoty 9,766 nM - 20,0 μ M pro inhibitory midostaurin a quizartinib a 1,136868 - 200,0 μ M pro PSU28 a PSU32. Testování látky LG-2189 nebylo v rámci této práce v případě nemutované linie provedeno. Všechny koncentrační křivky byly dvanáctibodové.

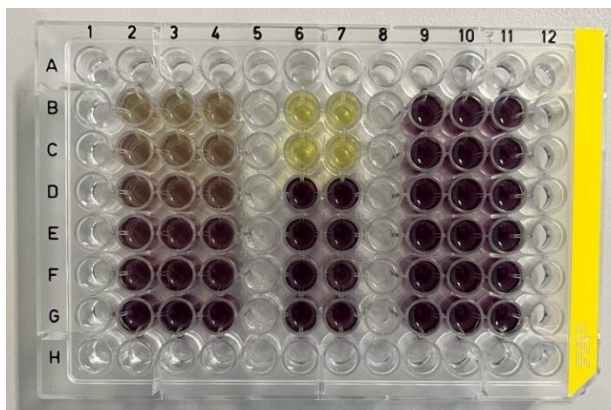
Tabulka 4: Souhrn výsledných koncentrací použitých inhibitorů, které byly testovány na jednotlivých buněčných liniích při experimentech. Hodnoty značí rozmezí koncentrace určitého inhibitoru (v μM / nM) na příslušné linii.

Buněčná linie	Testovaný inhibitor				
	midostaurin	quizartinib	PSU28	PSU32	LG-2189
MV4-11 wt	0,061 nM–0,125 μM	0,061 nM–0,125 μM	97,719 nM–2,0 μM	0,11561–10,0 μM	0,11561–10,0 μM
MV4-11 g45	0,061 nM–0,125 μM	0,061 nM–0,125 μM	97,719 nM–2,0 μM	-	0,11561–10,0 μM
MOLM-13	0,061 nM–0,125 μM	0,061 nM–0,125 μM	97,719 nM–2,0 μM	0,11561–10,0 μM	-
THP-1	9,766 nM–20,0 μM	9,766 nM–20,0 μM	1,136868–200,0 μM	1,136868–200,0 μM	-

Roztok buněk a příslušného média byl aplikován do experimentálních a kontrolních jamek. Destička byla vzápětí umístěna do sterilního inkubátoru, udržujícím stálou teplotu 37 °C a 5 % CO_2 v atmosféře, na 48 hodin.

Z důvodu citlivosti tetrazoliové soli MTT na světlo byl od tohoto momentu celý experiment prováděn za podmínek minimalizující přítomnost světla. Bylo přidáno 15 μl MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) do každé z jamek, kromě těch, jež obsahovaly PBS. Destička byla poté protřepána v třepačce na 300 otáček/ minutu, při 37 °C a po dobu 5 minut a následně vložena do sterilního inkubátoru, při podmínkách 37 °C a 5 % CO_2 v atmosféře, na 4 hodiny.

Pro dokončení experimentu bylo do všech jamek (kromě jamek s PBS) přidáno 150 μl roztoku isopropylalkoholu s 2M HCl. Všechny jamky byly vícekanálovou pipetou důkladně promíchány a po dobu 8-12 minut byla destička ponechána bez jakéhokoli dalšího zásahu (obr. 20).



Obrázek 20: Ukázka destičky připravené ke změření absorbance. *Vytvořeno autorkou.*

Měření absorbance při 570 nm a 720 nm bylo provedeno pomocí multidetekčního destičkového systému Hidex.

5.5 Statistické zpracování dat

Pro analýzu dat a jejich vizualizaci byl použit software GraphPad Prism 10. Hodnoty IC_{50} a 95 % konfidenční intervaly byly stanoveny pomocí modelu variable slope. Nepárový t-test byl aplikován ke srovnání účinku látek na buňky s rezistencí i bez ní. Výsledky s hodnotou $p \leq 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Všechna prezentovaná data odpovídají průměru tří nezávislých biologických experimentů, provedených v triplicátu.

5.5.1 Hodnoty IC_{50} a specifita k mutovanému FLT3 receptoru

V rámci první části experimentů bylo cílem porovnání klíčových faktorů mezi nově testovanými potenciálními inhibitory PSU28 a PSU32. Jednou z těchto proměnných byla 50% inhibiční koncentrace (IC_{50}), která definuje koncentraci způsobující 50% inhibici růstu buněčné kultury vyvoláním antiproliferativního, respektive cytotoxického efektu. Výsledná hodnota IC_{50} již představuje konkrétní číselný údaj, jež je rozšiřován 95% konfidenčním intervalem. Již zmíněný konfidenční interval, rovněž také interval spolehlivosti, označuje rozsah odhadů pro neznámý parametr. Spolehlivost tedy vyjadřuje, s jakou pravděpodobností daný interval pokrývá skutečnou (neznámou) hodnotu parametru. Za tímto účelem byl v práci využit nejběžnější konfidenční interval, jenž pracuje s 95% úrovní spolehlivosti (zkráceně CI 95 %). Tento interval tak obsahuje reálnou hodnotu parametru s pravděpodobností 0,95. Další stanovovanou hodnotou byla specifita léčiva k mutovanému FLT3 receptoru. Ta označuje jeho vlastnost působit jen na buněčné linie nesoucí FLT3 mutaci, a to s minimálními nežádoucími účinky spojenými s ovlivněním i jiných mechanismů. Pro určení tohoto údaje je podmínkou provedení experimentu na buňkách nesoucí homozygotní či heterozygotní mutaci a dále pak na těch bez mutace. Výsledná hodnota je pak rovna podílu hodnot IC_{50} nemutované linie a té plně či částečně mutované, viz obr. 21. Výsledky jsou pak hodnoceny dle jednoduchého principu: s rostoucím číselným údajem roste i specifita léčiva k FLT3 mutaci.

$$\text{Specifita léčiva}_{MOLM-13} = \frac{IC_{50} \text{ THP-1}}{IC_{50} \text{ MOLM-13}} \quad \text{A} \qquad \text{Specifita léčiva}_{MV4-11} = \frac{IC_{50} \text{ THP-1}}{IC_{50} \text{ MV4-11}} \quad \text{B}$$

Obrázek 21: Vzorec pro výpočet specifity léčiva k buňkám s heterozygotní (A) i homozygotní (B) FLT3 mutací. Vytvořeno autorkou podle (URL 1).

5.5.2 Rezistenční faktor

Cílem navazující řady experimentů bylo testování schopnosti inhibitorů překonat rezistenci buněčné kultury na gilteritinib, klinicky používaný inhibitor. Za tímto účelem byl u testovaných látek stanoven rezistenční faktor. Je-li výsledek rezistenčního faktoru látky roven právě číslu 1, je látka stejně účinná na rezistentní i nerezistentní linii. Tato hodnota představuje podíl hodnot IC_{50} rezistentní buněčné linie a linie nerezistentní, viz obr. 22.

$$RF = \frac{IC_{50} \text{ rezistentní linie}}{IC_{50} \text{ senzitivní linie}}$$

Obrázek 22: Vzorec pro výpočet rezistenčního faktoru (RF). Vytvořeno autorkou podle (URL 1).

6 Výsledky

6.1 Inhibitory PSU28 a PSU32

Při vyhodnocení výsledků experimentů s látkami PSU28 a PSU32, provedených na buněčných liniích MV4-11, MOLM-13 a THP-1, se jako výrazně efektivnější prokázal inhibitor PSU28. V rámci linie MV4-11 wt činila výsledná hodnota IC_{50} látky PSU28 0,27 μ M. U inhibitoru PSU32 byl tento údaj právě 4,56 μ M. Látka PSU28 tedy vykazovala až bezmála 17,2x nižší hodnoty IC_{50} při porovnání těchto údajů s látkou PSU32 naměřených na totožné buněčné linii. Specifita zkoumané látky PSU28 k mutaci FLT3 byla při srovnání výsledků v rámci plně mutované linie zjištěna takřka trojnásobně vyšší, než v případě látky, s níž byla srovnávána. Konkrétně 38,94 v případě PSU28 a 13,77 pro látku PSU32. Výsledky a porovnání všech hodnot testovaných inhibitorů jsou znázorněny a rozebrány níže, viz tabulka 5.

Tabulka 5: Srovnání naměřených výsledků hodnot 50% inhibičních koncentrací v rámci testovaných látek PSU28 a PSU32 a jejich specifit k heterozygotní i homozygotní mutaci FLT3, přičemž experiment každé z látek na jednotlivé linii byl proveden právě 3x. Výjimku představovalo měření sloučeniny PSU28 na MV4-11 wt, kdy činil počet experimentů právě 5.

Inhibitor	Buněčná linie	IC_{50} (μ M)	CI 95 % (μ M)	Specifita k FLT3 mutaci (THP-1/MOLM-13)	Specifita k FLT3 mutaci (THP-1/MV4-11)
PSU28	MV4-11 wt	0,27	0,22- 0,31	41,29	38,94
	MOLM-13	0,25	0,22- 0,28		
	THP-1	10,33	9,21-11,54		
PSU32	MV4-11 wt	4,56	4,20-4,98	9,15	13,77
	MOLM-13	6,87	6,13-7,83		
	THP-1	62,81	47,43-82,38		

6.2 Porovnání látky PSU28 s klinicky používanými inhibitory

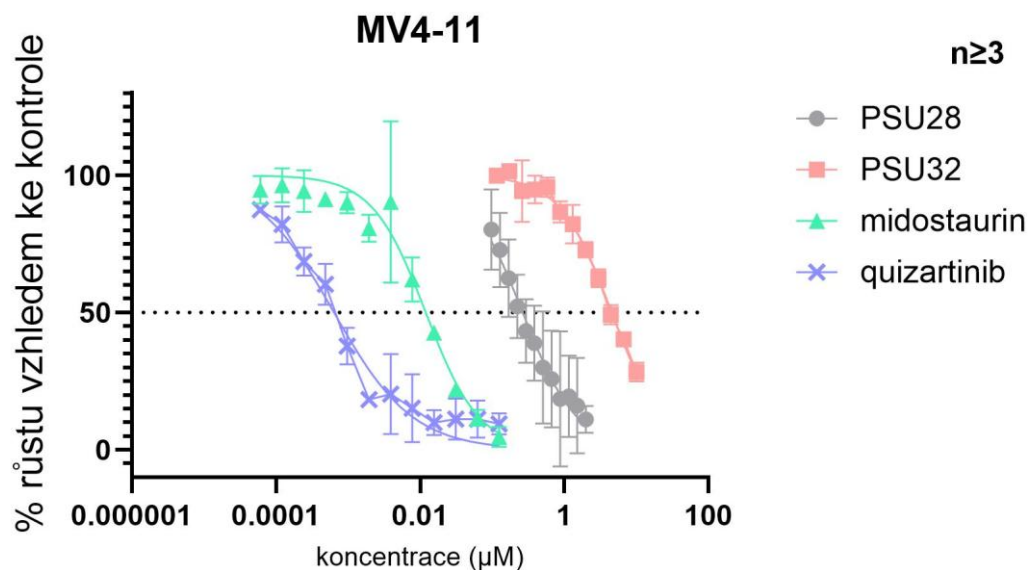
Jelikož se látka PSU28 prokázala na základě první série experimentů jako účinnější z hlediska hodnot IC_{50} i specifity vůči FLT3 mutaci, byly výsledky tohoto testování porovnány s účinností klinicky využívaných FLT3 inhibitorů midostaurinem a quizartinibem.

Při srovnání číselných údajů dosažených látkou PSU28 vůči inhibitorům, jež jsou využívány běžně při léčbě AML pacientů s mutací FLT3-ITD, bylo zjištěno, že nový potenciální inhibitor se z hlediska hodnot IC_{50} či specifity vůči FLT3 mutaci svými výsledky neblíží hodnotám dosažených midostaurinem a quizartinibem. Linie MV4-11 wt vykazovala hodnoty IC_{50} u látky PSU28 více než 22x vyšší v porovnání s midostaurinem a takřka 422x vyšší v porovnání s quizartinibem, a to konkrétně 0,27 μ M pro PSU28, 0,012 μ M pro midostaurin a 0,00064 μ M

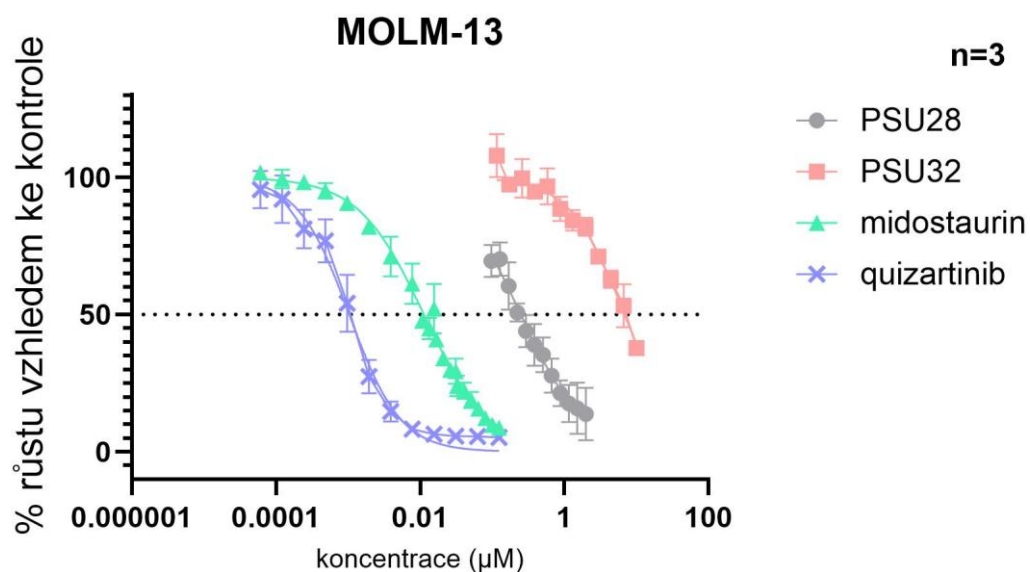
pro quizartinib. Komparace inhibičních schopností látek na každé z buněčných liniích byly rovněž shrnuty v podobě grafů, viz obrázky 23, 24, 25. Z pohledu specifity jednotlivých léčiv k mutaci bylo opět vykazováno absolutně nejnižších hodnot látkou PSU28, přičemž rozdíly mezi zjištěnými údaji každé z testovaných látek byly ještě výraznější, tedy 38,94 pro PSU28, 123,25 pro midostaurin a 11993,80 pro quizartinib z hlediska homozygotní mutace FLT3-ITD, viz tabulka 6.

Tabulka 6: Srovnání naměřených výsledků hodnot 50% inhibičních koncentrací v rámci testovaných látek PSU28, midostaurin a quizartinib a jejich specifit k homozygotní i heterozygotní mutaci FLT3, přičemž experiment každé z látek na jednotlivé linii byl proveden právě 3x. Výjimku představovalo měření sloučeniny PSU28 na MV4-11 wt, kdy činil počet experimentů právě 5.

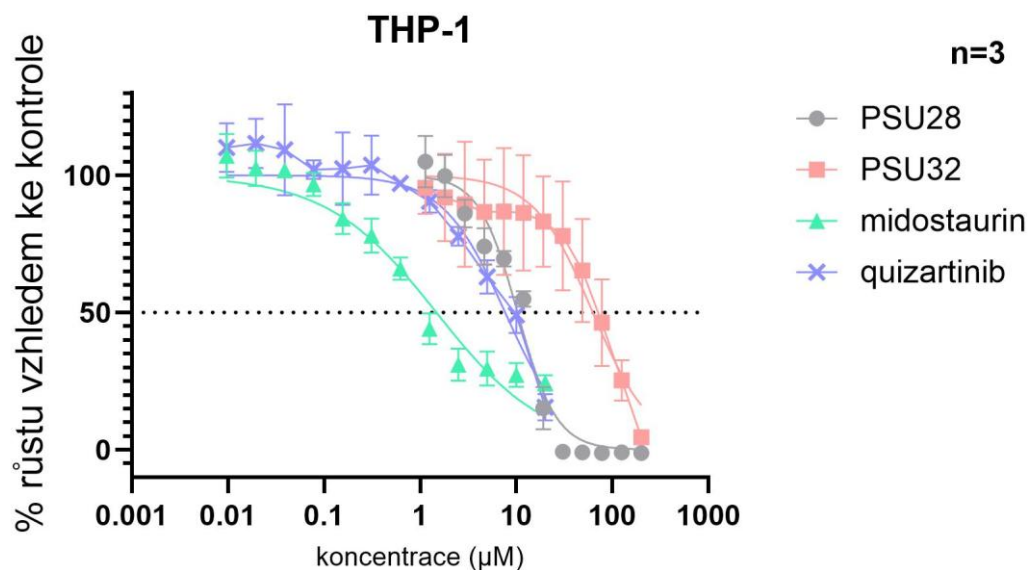
Inhibitor	Buněčná linie	IC ₅₀ (μM)	CI 95 % (μM)	Specifita k FLT3 mutaci (THP-1/MOLM-13)	Specifita k FLT3 mutaci (THP-1/MV4-11)
PSU28	MV4-11 wt	0,27	0,22- 0,31	41,29	38,94
	MOLM-13	0,25	0,22- 0,28		
	THP-1	10,33	9,21-11,54		
midostaurin	MV4-11 wt	0,012	0,0097-0,015	140,99	123,25
	MOLM-13	0,011	0,0097-0,011		
	THP-1	1,48	1,16-1,91		
quizartinib	MV4-11 wt	0,00064	0,00051-0,00081	7372,36	11993,80
	MOLM-13	0,0010	0,00091-0,0012		
	THP-1	7,68	6,25-9,51		



Obrázek 23: Závislost růstu buněčné linie MV4-11 na koncentraci čtyř testovaných látek (PSU28, PSU32, midostaurin, quizartinib), přičemž růst je vyjádřen relativně vůči kontrolní skupině (100% růstu). Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.



Obrázek 24: Závislost růstu buněčné linie MOLM-13 na koncentraci čtyř testovaných látek (PSU28, PSU32, midostaurin, quizartinib), přičemž růst je vyjádřen relativně vůči kontrolní skupině (100% růstu). Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.



Obrázek 25: Závislost růstu buněčné linie THP-1 na koncentraci čtyř testovaných látek (PSU28, PSU32, midostaurin, quizartinib), přičemž růst je vyjádřen relativně vůči kontrolní skupině (100% růstu). Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.

6.3 Porovnání látek na rezistentní linii

Látka PSU32 nebyla testována na rezistentní buněčné kultuře kvůli nízké účinnosti v předchozích experimentech. Naopak látka LG-2189, vykazovala v *in vitro* testování na liniích MV4-11 wt, MOLM-13 a THP-1 jedny z nejlepších výsledků z 60 testovaných, ale její schopnost překonat rezistenci dosud nebyla ověřena.

Hodnoty nejbližší číslu 1 byly zjištěny v případě látek PSU28 a LG-2189. Údaj nejbližší číslu 1 byl pak konkrétně naměřen u inhibitoru LG-2189, což vypovídá o jeho potenciální schopnosti překonat rezistenci buněk na běžnou léčbu. Tato hodnota byla přesně 0,80. Následovala látka PSU28, jejíž údaj RF byl roven 1,24, a tak přesahoval hodnotu 1, což znamená, že látka více inhibuje růst senzitivní buněčné linie. U inhibitorů midostaurin a quizartinib byly RF přesně 1,42 a 1,99, viz tabulka 7.

Tabulka 7: Srovnání výsledků hodnot 50% inhibičních koncentrací v rámci testovaných látek PSU28, LG-2189, midostaurin a quizartinib pouze na buněčných liniích nesoucích homozygotní mutaci FLT3-ITD a současně jejich výsledných rezistenčních faktorů, přičemž experiment každé z látek na jednotlivé linii byl proveden právě 3x. Výjimku představovalo měření sloučeniny PSU28 na MV4-11 wt, kdy činil počet experimentů právě 5.

Inhibitor	Buněčná linie	IC ₅₀ (μM)	CI 95 % (μM)	Rezistenční faktor
PSU28	MV4-11 wt	0,27	0,22- 0,31	1,24
	MV4-11 g45	0,33	0,28-0,38	
LG-2189	MV4-11 wt	0,36	0,29-0,44	0,80
	MV4-11 g45	0,29	0,26-0,33	
midostaurin	MV4-11 wt	0,012	0,0097-0,015	1,42
	MV4-11 g45	0,017	0,012-0,025	
quizartinib	MV4-11 wt	0,00064	0,00051-0,00081	1,99
	MV4-11 g45	0,0013	0,0011-0,0016	

7 Diskuze

Hlavním cílem této práce bylo prověřit účinnost nově syntetizovaných potenciálních léčiv, zejména vyhodnotit jejich cytotoxický efekt a schopnost potlačit růst AML buněčných linií prostřednictvím inhibice FLT3 receptoru. Studie zahrnovala též hodnocení, s jakou specifitou působí vůči buňkám exprimujícím mutovaný FLT3 receptor oproti buňkám bez mutace, a zda jsou tyto nové sloučeniny účinné i u linie s navozenou rezistencí vůči již registrovanému a v klinické praxi používanému FLT3 inhibitoru gilteritinibu. Výsledky 48h MTT testu viability prokázaly výrazně nižší hodnoty IC_{50} u obou nových testovaných látek PSU28 a PSU32 v rámci linií s mutací než bez ní. Celkově lepší specifitu k FLT3 mutaci či schopnost překonat rezistenci buněk na gilteritinib prokázala sloučenina PSU28. V současnosti existuje mnoho dalších experimentálních sloučenin, jež jsou prozatím ve fázi *in vitro* testování, studium nových potenciálních látek se schopností inhibovat FLT3 mutaci je tak předmětem řady aktuálních studií (Augustin *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021). S dosaženými hodnotami IC_{50} 0,27 μ M pro MV4-11 wt, 0,25 μ M pro MOLM-13 a 10,33 μ M pro THP-1 by látka PSU28 některým z nich prozatím konkurovat nemohla, jiné by však svými výsledky předčila. Ve většině případů však nelze naprosto optimálně porovnat sloučeninu PSU28 s látkami testovanými jinými studiemi z důvodu mnoha odlišných faktorů, které mezi pracemi činí zásadní rozdíly. Může jít o testování na odlišné buněčné linie, která se svými vlastnostmi odlišuje od linií, na kterých proběhlo testování v rámci této práce. Dále o rozdílnou inkubační dobu. Délka expozice testovaných látek v buněčné kultuře může výrazně ovlivnit výsledky testu – zejména pokud látka působí pomalu, nebo naopak rychle degraduje. Při srovnání takových výsledků tak lze očekávat rozdíly v míře metabolické aktivity buněk, což může mít dopad na interpretaci cytotoxicity. Kratší inkubační doba poukazuje více na cytotoxický efekt, delší naopak na antiproliferativní účinek. V neposlední řadě vytváří rozdíl mezi výsledky studií testování schopností látek prostřednictvím odlišných testů metabolické aktivity buněk. Jejich životaschopnost byla v této práci hodnocena pomocí MTT testu, v případech zmíněných studií byl ale využit i MTS test či hodnocení životaschopnosti buněk na základě hladiny ATP. Zhang *et al.* zaznamenali během testování sloučenin na bázi imidazo[1,2-*a*]pyridin-thiofenových derivátů hodnoty IC_{50} 0,053 μ M, ale i 0,31 μ M. Tato práce se však zabývala pouze inhibicí FLT3 kinázy. Látka C14 (4-(4-aminofenyl)-6-methylisoxazolo[3,4-*b*]pyridin-3-amin), ověřovaná Kang *et al.*, se prokázala hodnotami IC_{50} v rámci linie MV4-11 0,325 μ M a pro MOLM-13 0,507 μ M. Sloučenina C-1305 zaznamenala po 48h inkubaci s buňkami MV4-11 IC_{50} 0,19 μ M a u buněčné linie RS4-11, jež exprimuje wt FLT3 receptor, to bylo 0,38 μ M. Lee *et al.* ve své studii naznačují, že PLX51107, nový potenciální inhibitor bromodomén a extra-terminálních domén proteinů s nízkonanomolární afinitou, účinně inhibuje růst FLT3-ITD AML buněčných linií MV4-11 a MOLM-14 s hodnotami IC_{50} pouze 0,062 a 0,079 μ M. Yu *et al.* provedli výzkum sloučeniny LT-171-861. Ta se v rámci studie prokázala nižšími hodnotami IC_{50} , než klinicky používaný inhibitor sorafenib. Konkrétně dosáhla hodnot 0,0018 μ M pro linii MV4-11 a 0,0013 μ M pro MOLM-13. Mnoho látek, včetně výše zmíněných, se prokázalo účinně při počáteční části preklinického testování, tedy *in vitro*, a jsou tak v další fázi výzkumu (*in vivo* testování), který probíhá zejména na myších (Lee *et al.* 2021; Lin *et al.* 2014; Ma *et al.* 2014; Xiao *et al.* 2023; Yu *et al.* 2021). Testování na myších je důležité kvůli jejich genetické a fyziologické podobnosti s člověkem, což umožňuje studovat účinnost a bezpečnost

nových léčiv. Poskytuje cenné informace o farmakokinetice, farmakodynamice a toxicitě, které by *in vitro* testy samy o sobě neodhalily. Myši mají krátký reprodukční cyklus, což umožňuje rychlé sledování dlouhodobých účinků léčiva, a lze je geneticky upravit tak, aby nesly mutace odpovídající onemocnění u člověka. Díky tomu lze detailně zkoumat mechanismy působení léčiva ještě před zahájením klinických studií. Pokud i v těchto testech prokáží potenciál inhibovat kinázu mutace FLT3, pokročí jejich výzkum do klinické fáze testování. Obecně všechny zmíněné látky, včetně PSU28, preferenčně potlačují růst buněk AML s mutací FLT3-ITD. Naopak u buněk s FLT3 *wt* v nízkých koncentracích nevyvolávají prakticky žádný výrazný toxický efekt. Xiao *et al.* takovéto výsledky podpořil ve své studii i z hlediska *in vivo* testování, přičemž šlo o myší modely s transformovanými Ba/F3 buňkami. Po osmidenní léčbě došlo k výraznému snížení počtu leukemických buněk v periferní krvi. Zatímco ve skupině s kontrolním roztokem (vehikulem) zůstalo 51,9 % leukemických buněk, ve skupině léčené gilteritinibem jejich podíl klesl na 26,4 %. Největší efekt byl zaznamenán u GNF-7, kde se počet leukemických buněk snížil až na 9,6 %. V současnosti již probíhají i klinické studie nových sloučenin s potenciálem inhibovat FLT3 mutaci, a to buďto samostatně, či v kombinaci s jinými terapeuticky používanými inhibitory. Látka HYML-122 je momentálně ve druhé fázi testování (Anon. 2021a), MAX-40279 v první fázi (Anon. 2019a), TL-895 a KRT-232 rovněž ve fázi druhé (Anon. 2021b). Ve fázi *in vitro* hodnocení však nelze na základě samotných parametrů, jako jsou hodnoty IC₅₀ a specifita k FLT3 mutaci, jednoznačně určit superioritu testovaných látek. Tyto údaje sice poskytují důležité informace o jejich efektivitě a selektivitě na buněčné úrovni, avšak neodrážejí jejich biologickou dostupnost, farmakokinetické vlastnosti ani potenciální toxicitu a účinnost v organismu. Skutečná terapeutická hodnota se projeví až v rámci klinických hodnocení, kde dochází k posouzení komplexního účinku látky v celém organismu. Cílem vývoje léčiva je jeho úspěšné uvedení na trh, přičemž mírně nižší účinnost v buněčných modelech nemusí být limitujícím faktorem, pokud látka vykazuje lepší farmakodynamický a farmakokinetický profil.

Látky PSU28 a midostaurin více inhibovaly růst buněčné kultury MOLM-13 než MV4-11, což je poměrně nezvyklý trend. Linie MV4-11 totiž nese vysoký alelický poměr FLT3-ITD, vykazuje výraznou aktivitu v signálních drahách RAS/MAPK a PI3K/AKT, což z ní činí citlivější model pro testování FLT3 inhibitorů, jako jsou midostaurin a gilteritinib. Naopak MOLM-13, která může mít kromě FLT3-ITD i mutaci NPM1, vykazuje vyšší rezistenci vůči těmto inhibitorům, pravděpodobně díky aktivaci alternativních signálních drah a mechanismům rezistence (Annageldiyev *et al.* 2020; Seipel *et al.* 2018; Yang a Friedman 2023). Z pohledu charakteristiky těchto studií by tak měly látky jednoznačně více inhibovat linii MV4-11 (Garitano-Trojaola *et al.* 2021; Guo *et al.* 2019). Hlavním důvodem je, že se reálně dle statistiky o rozdíl v hodnotách nejedná, což potvrzuje Seipel *et al.*. Dále tento rozdíl může být způsoben kombinací genetických, molekulárních a farmakodynamických faktorů. Obě linie nesou FLT3-ITD mutaci, avšak MV4-11 vykazuje intenzivnější aktivaci signálních drah, což může v určitém bodě snižovat citlivost na inhibitory zaměřené výhradně na FLT3 receptor. MOLM-13 naopak spoléhá méně na redundantní dráhy a vykazuje nižší expresi antiapoptotických proteinů, jako je MCL-1, což usnadňuje indukci buněčné smrti. Dále se mohou lišit intracelulární koncentrace léčiv, což je ovlivněno membránovými transportéry nebo metabolickými procesy v jednotlivých liniích. Kasper *et al.* a Seipel *et al.* shodně zjistili, že genetické rozdíly mohou také

zvyšovat citlivost linie MOLM-13 na testované látky. V nuancích mohou rovněž hrát roli experimentální podmínky, například buněčná hustota nebo růstové faktory v médiu. Potvrzení těchto hypotéz by však vyžadovalo další analýzu signalizačních drah a proteomických profilů obou linií. Tento jev se zcela běžně nevyskytuje, Bregante *et al.* jej však již zaznamenal při výzkumu nových sloučenin s potenciálem inhibovat buněčné kultury AML s FLT3 mutací. Výsledky podobné zjištění této práce byly vykazovány látkami WS6, ispinesibem a cabozantinibem, který je mimo to již schválen pro léčbu různých typů maligních onemocnění, jako je karcinom ledvin, jater či medulární karcinom štítné žlázy, a tak je v současné době testován v klinických studiích pro léčbu AML.

V tuto chvíli se přesuneme ke komparaci zjištěných *in vitro* údajů mezi již zmiňovanými terapeuticky používanými inhibitory. Při srovnání hodnot IC_{50} inhibitorů midostaurinu a quizartinibu bylo zjištěno, že nejnižší údaje byly vykazovány konstantně inhibitorem quizartinibem, což se shoduje i s dřívějšími *in vitro* studiemi provedenými Seipel *et al.* a Weisberg *et al.*, a to i přes určité odlišnosti v metodice. Konkrétně dosahoval quizartinib v naší práci hodnot IC_{50} 0,64 nM pro linii MV4-11 wt a 1,04 nM pro MOLM-13. Oproti tomu midostaurin vykazoval na shodných liniích tyto hodnoty 12,0 nM a 10,49 nM. Quizartinib se tedy vyznačuje vysokou účinností proti FLT3-ITD, a jeho inhibiční schopnosti jsou tak vůči buněčným liniím s wt FLT3 receptorem často zanedbatelné (Nepomuceno *et al.* 2014). To tedy naznačuje vysokou specifitu quizartinibu k FLT3 mutaci (Aikawa *et al.* 2020). Oproti tomu midostaurin vykazoval výsledky, jež podporují zjištění, které učinili i Galanis & Levis, tedy, že je účinný jak vůči *wild type* FLT3 mutaci, tak vůči FLT3-ITD a FLT3-TKD. Dle očekávání byly tedy z hlediska specifity látek vůči FLT3 mutaci absolutně nejvyšší hodnoty i v naší práci zaznamenány u inhibitoru quizartinibu, konkrétně 7372,36 vůči buněčné linii MOLM-13 a 11993,80 vůči modelové linii MV4-11. Tyto číselné údaje jsou ve srovnání s hodnotami, jež zjistili Carranza-Aranda *et al.*, markantně vyšší, kde specifita vůči linii MV4-11 činila necelých 8,2. Tento rozdíl mohl být velmi pravděpodobně způsoben testováním na rozdílné buněčné linii. Linie HL60, použitá ve zmíněné studii, sice exprimuje wt FLT3 receptor, avšak určitými vlastnostmi se odlišuje od linie THP-1, na níž bylo provedeno testování v této práci. Buňky HL60 jsou diferenciované neutrofily a u THP-1 se jedná o monocyty. V obou případech jde o bílé krvinky, které se však liší funkcemi, morfologií či životností.

Předchozí část pojednává o porovnání midostaurinu a quizartinibu *in vitro*, nyní se zaměříme na jejich účinnost v klinickém prostředí. Inhibitory první generace, mezi které spadá i midostaurin, se vyznačují nižší selektivitou vůči řadě receptorových tyrosinkináz, včetně FLT3, KIT, PDGFR a VEGFR2. To může vést k závažným nežádoucím účinkům, které omezují jejich klinické využití. Nejčastěji jsou hlášeny nežádoucí účinky hematologické a konstituční povahy. U pacientů se může vyskytnout pancytopenie, diferenciační syndrom, srdeční ischemie, břišní diskomfort, průjem, periferní neuropatie, bolest hlavy a příznaky podobné chřipce. Tyto nežádoucí účinky se mohou vyskytovat u přibližně u 5-6 % pacientů (Kennedy a Smith 2020; Swaminathan *et al.* 2023). FLT3 receptor je primárně exprimován na hematopoetických progenitorových buňkách, ale i na těch imunitních, endotelových či v CNS. Jeho exprese je omezena převážně na hematopoetický systém, což naznačuje, že nežádoucí účinky spojené s inhibicí FLT3 by měly být specifické pro tento systém (Drexler 1996). Nicméně inhibitory

první generace, svou nižší selektivitou inhibují i další kinázy, což může vysvětlovat širší spektrum nežádoucích účinků. Inhibitory druhé generace, zahrnující quizartinib, se již vyznačují vyšší specifitou vůči FLT3 receptoru, což by se hypoteticky mohlo projevovat v menší toxicitě a nežádoucích účincích spojených s léčbou (Nitika *et al.* 2022). Avšak klinické použití inhibitorů druhé generace je také spojováno s nežádoucími účinky, což naznačuje, že samotná specifita k onemocnění nemusí být dostatečná pro eliminaci těchto komplikací (Erba *et al.* 2021). Kupříkladu i přes to, že se zdá, že quizartinib je lépe tolerován než midostaurin, je spojen s prodloužením QT intervalu (Anon. 2024). Quizartinib byl navíc teprve nedávno schválen pro klinické použití, prozatím tedy neexistuje mnoho dat o jeho dlouhodobých nežádoucích účincích jako u midostaurinu. S dalším klinickým používáním se může ukázat odlišný profil toxicity nebo se mohou objevit dosud nehlášené nežádoucí účinky. Obecně lze říci, že inhibitory druhé generace mají tendenci mít specifitější účinky a mohou mít odlišný profil nežádoucích účinků ve srovnání s inhibitory první generace. Nicméně závažnost a četnost těchto nežádoucích účinků se mohou lišit v závislosti na konkrétním léku a pacientovi (Erba *et al.*, 202; Zhao *et al.*, 2022). *In vitro* data naznačují, že quizartinib vykazuje nižší IC₅₀ pro FLT3-ITD mutaci oproti midostaurinu, což může znamenat vyšší účinnost při stejných koncentracích. Používané dávkování se však mezi těmito léky liší, což může mít vliv jak na terapeutický efekt, tak na výskyt nežádoucích účinků. U quizartinibu se například při indukční i konsolidační léčbě podává za přesně stanovených okolností dávka 35,4 mg denně (Anon. [b.r.]), zatímco midostaurin se užívá v dávce 50 mg dvakrát denně (Anon. [b.r.]). Quizartinib se tedy podává v násobně nižší dávce, tudíž je možné pozorovat stejný trend, jako v případech *in vitro* testování, a to vyšší účinnost quizartinibu. Tyto rozdíly mohou ovlivnit nejen přímou účinnost léčby, ale i její snášenlivost u jednotlivých pacientů. Tato zjištění tak podtrhují potřebu dalšího výzkumu zaměřeného na pochopení mechanismů nežádoucích účinků a vývoj nových terapeutických strategií, které by minimalizovaly toxicitu při zachování účinnosti léčby AML s FLT3 mutací. M. H. Lee *et al.* porovnávali účinnost zmíněných inhibitorů u nově diagnostikovaných pacientů s akutní myeloidní leukémií. Studie ukazuje, že quizartinib dosahuje vyšší míry kompletní remise u pacientů s AML než midostaurin, s nižší potřebou reindukce či úprav dávkování. Výskyt nežádoucích účinků obou léčiv byl srovnatelný, i když pacienti v obou skupinách zažívali podobné míry febrilní neutropenie a infekcí. Quizartinib se jeví jako efektivnější volba, avšak dlouhodobé výsledky vyžadují další sledování. Efekt na pacientech se však skládá z daleko více mechanismů, a nižší IC₅₀ tak nemusí znamenat lepší efekt na pacientech. Porovnání quizartinibu s jinými inhibitory u pacientů však prozatím existuje jen vzácně, jelikož, jak bylo již dříve zmíněno, je quizartinib pro léčbu registrován necelé dva roky, což je důvodem nedostatku důkazů přímého porovnání. V současnosti však takovéto studie probíhají a jejich výsledky by měly brzy poskytnout relevantnější údaje (Lee *et al.* 2024; Shaik *et al.* 2024).

Při srovnání výsledků hodnot IC₅₀ a specifity vůči FLT3 mutaci mezi dvojicí klinicky používaných inhibitorů a dvojicí nových syntetizovaných sloučenin, a to pouze z hlediska dat naměřených touto prací, byly zaznamenány výsledky, že se experimentální látky z tohoto hlediska nepřibližují naměřenými hodnotami midostaurinu s quizartinibem, a terapeuticky využívané inhibitory je tak v testovaných parametrech výrazně předčívají. Je však důležité zdůraznit, že hodnoty IC₅₀ a specifita k FLT3 mutaci v rámci *in vitro* experimentů nejsou

jedinými faktory určujícími klinickou úspěšnost léčiva, a proto nelze na základě těchto výsledků předjímat jejich skutečný terapeutický potenciál.

Buněčná linie MV4-11 g45, nesoucí trvalou rezistenci vůči gilteritinibu, byla využita v druhé části této práce, za účelem otestování, zda nové zkoumané látky nedisponují schopností tuto rezistenci překonat. Výsledky získané testováním na rezistentní linii byly porovnány s původní *wild type* linií MV4-11. Látky PSU28 a LG-2189 prokázaly srovnatelný inhibiční efekt na rezistentní i nerezistentní linii. Tyto molekuly se tak jeví nadějně z hlediska schopnosti překonání sekundární rezistence. Tohoto efektu bylo podobně dosaženo i midostaurinem. Největší rozdíl mezi inhibicemi jednotlivých buněčných kultur byl zaznamenán u quizartinibu, jenž větší měrou potlačoval růst *wt* linie MV4-11. S dosaženou hodnotou RF 1,99 je možné pozorovat tuto tendenci i z pohledu statistiky. Z hlediska schopnosti všech testovaných látek překonat rezistenci buněčné kultury na gilteritinib, tudíž i získaného rezistenčního faktoru, tak přináší nově zjištěné skutečnosti opačné výsledky, než tomu bylo v první části práce. V současnosti existují i výzkumy zabývající se schopnostmi nově syntetizovaných sloučenin z hlediska překonání rezistence buněčných linií. Například již zmiňovaná potenciální sloučenina, inhibující mutaci FLT3, GNF-7, kterou testovali Xiao *et al.*, vykazovala rezistenční faktor přibližně 2,9. Mezi naší prací a porovnávanou studií existuje několik podobností, ale i mnoho rozdílů, jejichž přičiněním nelze naprosto objektivně vzájemně porovnat získaná data. Kupříkladu k testování sloučeniny GNF-7 byla využita buněčná linie Ba/F3 FLT3-ITD/F691L, jež vykazuje rezistenci vůči quizartinibu i gilteritinibu a pravděpodobně se vyznačuje odlišným typem mutace. Shodným výsledkem však je, že v rámci obou prací měly vyšší inhibiční účinek experimentální látky ve srovnání s klinicky používanými inhibitory.

Ne zcela obvyklým zjištěním byla také skutečnost, že nejhorších výsledků rezistenčního faktoru, konkrétně 1,99, bylo dosaženo quizartinibem, inhibitorem, jenž z hlediska hodnot IC₅₀, tudíž i specifity vůči FLT3 mutaci, v první části práce poměrně dominoval. To potvrzuje a objasňuje i Yang *et al.*, kteří se zabývali vznikem rezistence buněčných linií, které jsou podobné liniím použitých v této práci. Buňky AML si totiž poměrně rychle vyvíjejí rezistenci právě vůči zmíněnému inhibitoru. Tato studie naznačuje, že zatímco quizartinib je účinný FLT3 inhibitor, mechanismus, kterým se buňky stávají vůči němu rezistentní, je stejný s mechanismy vzniku rezistence ke gilteritinibu, a rezistence je tak tzv. zkřížená. Schopnost quizartinibu překonávat rezistenci vůči gilteritinibu může být omezená kupříkladu i kvůli klonální heterogenitě AML, což znamená, že nádorové buňky nejsou geneticky identické, ale tvoří různé subklony s odlišnými mutacemi. Tyto subklony mohou mít různé biologické vlastnosti, jako je rezistence na léčbu nebo odlišná schopnost proliferace. Heterogenita se vyvíjí v čase, což ztěžuje léčbu, jelikož některé subklony mohou přežít terapii a způsobit relaps onemocnění (Stiehl *et al.* 2014). I přes to, že přesnou příčinu nejsme schopni znát, poznamenávají Yang *et al.*, že růst buněčné kultury mohou ovlivnit i jiné mechanismy než mutace rezistence. Kombinace quizartinibu s jinými inhibitory nebo terapeutickými přístupy však může zlepšit jeho účinnost při překonávání rezistence, jak naznačují i Patel *et al.* a Smith *et al.*. Jak již bylo zmíněno, quizartinib se vyznačuje náchylností ke vzniku rezistencí. Oproti tomu midostaurin je méně účinný, avšak působí i na mutaci FLT3-D835Y a další kinázy, což může pomoci zpomalit vznik rezistence (Voso *et al.* 2020). Weisberg *et al.* testovali účinnost vybraných inhibitorů dále na myších

modelech s implantovanými buňkami exprimujícími mutované formy FLT3 nebo KIT, kde byly potvrzeny *in vitro* data.

Další neobvyklá tendence, kterou bylo možné z výsledků zpozorovat, byla zaznamenána v rámci testované látky LG-2189. Hodnota IC_{50} byla ve všech případech experimentálních látek a inhibitorů vyšší pro rezistentní linii, než pro buněčnou linii charakteru *wild type*. V tomto případě tomu však bylo právě naopak. Tento neočekávaný jev mohl být způsoben více možnými faktory. V první řadě je možné, že reálná hodnota RF není nižší než jedna, protože statistika nepotvrdila rozdíl mezi testovanými liniemi. Až větší počet měření by ukázal, zda se jednalo pouze o náhodu nebo zda je efekt látky LG-2189 opravdu vyšší u rezistentní linie. Pokud by tomu tak skutečně bylo, zde je možné vysvětlení tohoto jevu. Dále mohou mít rezistentní buňky zcela jiný profil odpovědi na určité molekuly v důsledku mutací nebo změn ve specifických molekulárních drahách. Například rezistence může být způsobena aktivací kompenzačních drah, které se mohou stát citlivějšími na novou molekulu LG-2189. Pokud rezistentní linie aktivovala alternativní dráhy, které jsou více závislé na mechanismech účinku LG-2189, mohlo by to vysvětlit nižší IC_{50} právě u ní. Rezistentní buňky mohou taktéž mít zvýšenou aktivitu efluxních transportérů (např. P-glykoproteinu), které aktivně vylučují léčivo z buňky. Pokud LG-2189 neinteraguje nebo je méně ovlivněno těmito transportéry, může být efektivní i v rezistentních buňkách, kde jiné látky mohou být rychle vylučovány. Další studie ukazuje, že rezistentní buňky, které jsou vůči jedné terapii necitlivé, mohou být citlivější na jiné molekuly, zejména pokud dochází k epigenetickým změnám. Pokud LG-2189 cílí na odlišný mechanismus než jiné testované inhibitory, může to objasnit, proč rezistentní buňky vykazují nižší IC_{50} pro tuto látku (Larrosa-Garcia a Baer 2017; San José-Enériz *et al.* 2019). Je však důležité zmínit, že všechny tyto studie představují jen podobné, možno říci modelové, situace. Výzkum této práce z hlediska látek či použitých buněčných linií se se studiemi prakticky neshoduje, tudíž jde jen o hypotézu na základě vyvozených spojitostí. Takovýto fakt by mohl do budoucna představovat poutavý předmět navazujícího výzkumu.

Lepší porozumění a poznatky o schopnostech nových sloučenin PSU28, PSU32 a LG-2189 by mohly poskytnout nové terapeutické strategie. Současné studie ukazují, že inhibice FLT3-ITD mutací může účinně zastavit proliferaci leukemických buněk a podpořit apoptózu, což otevírá prostor pro vývoj nových inhibitorů s vyšší selektivitou a účinností (Chen *et al.* 2016). Experimentální látky, jako je PSU28, se jeví jako slibné, s přihlédnutím k faktu, že je jejich výzkum prozatím ve fázi *in vitro* testování. Takovéto poznatky o sloučeninách, jako znalost jejich inhibičních schopností, specifity a schopnosti překonat rezistenci buněčné linie na již používané léčivo, by mohly poskytnout základ pro syntézu nových podobných molekul s výhodnějšími vlastnostmi.

8 Závěr

Terapie akutní myeloidní leukémie s mutací FLT3 se v posledních letech výrazně zlepšila, zejména díky zavedení látek se schopností inhibovat mutovaný FLT3 receptor, které poznatelně prodloužily přežití pacientů. Přesto však AML s touto mutací zůstává obtížně léčitelná, jelikož se často vyznačuje vysokou agresivitou a sklonem k relapsu, přičemž vznik rezistence vůči dostupným FLT3 inhibitorům představuje zásadní komplikaci v terapii. Potřeba vývoje nových, účinnějších látek, které by dokázaly překonat rezistentní mechanismy, tak neustále roste.

V této práci byly charakterizovány 3 nově syntetizované sloučeniny prostřednictvím *in vitro* metody MTT na buněčných liniích odvozených od pacientů s AML. Jejich inhibiční efekt byl následně porovnán se dvěma terapeuticky používanými FLT3 inhibitory, midostaurinem a quizartinibem. Z testovaných potenciálních FLT3 inhibitorů prokázala látka PSU28 nejnižší hodnoty 50% inhibiční koncentrace a specifity na FLT3-ITD mutovaných buňkách. Ve srovnání s klinicky používanými inhibitory projevila však tato sloučenina několikanásobně nižší účinek, přesto obě testované sloučeniny vykazují specifitu k FLT3 mutaci. Konkrétně pro látku PSU28 byly tyto hodnoty rovny 38,9 pro linii MV4-11 wt a 41,3 pro MOLM-13. IC₅₀ a specifita k FLT3 mutaci v rámci *in vitro* experimentů však nejsou jedinými faktory určujícími klinickou úspěšnost léčiva, a proto nelze na základě těchto výsledků předjímat jejich skutečný terapeutický potenciál.

Na linii MV4-11 g45, jež nese trvalou rezistenci vůči jinému klinicky používanému inhibitoru, gilteritinibu, byl zanalyzován účinek látky PSU28 a LG-2189, v porovnání s gilteritinib-senzitivní linií MV4-11 wt. V druhé části experimentů byly zaznamenány opačné výsledky než při první komparaci testovaných látek s terapeuticky používanými inhibitory. Nejnižších hodnot rezistenčního faktoru dosahovaly nově syntetizované látky, přičemž jejich účinek byl takřka srovnatelný na rezistentní i senzitivní linii. Následoval midostaurin a na závěr quizartinib. Takovéto zjištění tak představuje poutavý předmět pro budoucí výzkum.

Tato studie tedy přináší důležité poznatky z hlediska chemické struktury k vlastnosti účinku molekul pro vývoj nových léčiv zaměřených na AML s mutací FLT3-ITD, přičemž její hlavní přínos spočívá v identifikaci inhibitorů, které mohou být perspektivní v boji proti rezistenci na léčbu. Takovéto znalosti o sloučeninách by mohly poskytnout základ pro syntézu nových podobných molekul s výhodnějšími vlastnostmi. Kombinace těchto inhibitorů s dalšími cílenými terapiemi by pak mohla v budoucnu vést k překonání mechanismů rezistence a k poskytnutí nové léčebné možnosti u AML pacientů.

9 Bibliografie

AIKAWA, Tomoya, Noriko TOGASHI, Koichi IWANAGA, Hiroyuki OKADA, Yumi NISHIYA, Shinichi INOUE, Mark J. LEVIS a Takeshi ISOYAMA, 2020. Quizartinib, a selective FLT3 inhibitor, maintains antileukemic activity in preclinical models of RAS-mediated midostaurin-resistant acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* [online]. **11**(11), 943–955. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.27489

ANDERSON, Laura J., Mariam S. GIRGUIS, Ju-Hyeun KIM, Jitesh B. SHEWALE, Megan BRAUNLIN, Winifred WERTHER, Juliana E. HIDALGO-LOPEZ, Faraz ZAMAN a Christopher KIM, 2021. A Temporal and Multinational Assessment of Acute Myeloid Leukemia (AML) Cancer Incidence, Survival, and Disease Burden. *Blood* [online]. **138**(Supplement 1), 4124. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2021-146251

ANNAGELDIYEV, Charyguly, Su-Fern TAN, Shreya THAKUR, Pavan Kumar DHANYAMRAJU, Srinivasa R. RAMISSETTI, Preeti BHADAURIA, Jacob SCHICK, Zheng ZENG, Varun SHARMA, Wendy DUNTON, Sinisa DOVAT, Dhimant DESAI, Hong ZHENG, David J. FEITH, Thomas P. LOUGHRAN, Shantu AMIN, Arun K. SHARMA, David CLAXTON a Arati SHARMA, 2020. The PI3K/AKT Pathway Inhibitor ISC-4 Induces Apoptosis and Inhibits Growth of Leukemia in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology* [online]. **10** [vid. 2025-01-27]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.00393

Anon., 2015. *Buněčné kultury* [online] [vid. 2024-09-08]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A9_kultury

Anon., 2017. *Rydapt | European Medicines Agency (EMA)* [online] [vid. 2025-01-28]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt>

Anon., 2019a. *Study of MAX-40279 in Patients With Relapsed or Refractory Acute Myelogenous Leukemia (AML) | Clinical Research Trial Listing* [online] [vid. 2025-02-18]. Dostupné z: <https://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/NCT04187495/study-of-max-40279-in-patients-with-relapsed-or-refractory-acute-myelogenous-leukemia-aml>

Anon., 2019b. *Xospata | European Medicines Agency (EMA)* [online] [vid. 2025-01-28]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xospata>

Anon., 2021a. A Study of HYML-122 in Patients With FLT3 Positive Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). *ctv.veeva.com* [online] [vid. 2025-02-23]. Dostupné z: <https://ctv.veeva.com/study/a-study-of-hyml-122-in-patients-with-flt3-positive-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-am>

Anon., 2021b. TL-895 and KRT-232 Study in Acute Myeloid Leukemia. *ctv.veeva.com* [online] [vid. 2025-02-18]. Dostupné z: <https://ctv.veeva.com/study/tl-895-and-krt-232-study-in-acute-myeloid-leukemia>

Anon., 2023. *Vanflyta | European Medicines Agency (EMA)* [online] [vid. 2025-01-28]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vanflyta>

Anon., 2024. Dr Fedorov on the Use of Quizartinib vs Midostaurin in FLT3+ AML. *OncLive* [online] [vid. 2025-02-18]. Dostupné z: <https://www.onclive.com/view/dr-fedorov-on-the-use-of-quizartinib-vs-midostaurin-in-flt3-aml>

Anon., [b.r.]. Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts. *SEER* [online] [vid. 2024a-12-05]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aml1.html>

Anon., [b.r.]. *Bone Marrow* | *bartleby* [online] [vid. 2025b-03-19]. Dostupné z: <https://www.bartleby.com/subject/science/biology/concepts/bone-marrow>

Anon., [b.r.]. Cancer of Any Site - Cancer Stat Facts. *SEER* [online] [vid. 2025c-01-28]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>

Anon., [b.r.]. Cancer. *World Health Organization* [online] [vid. 2025d-01-28]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Anon., [b.r.]. *Dosing and Administration* | *VANFLYTA® (quizartinib)* | *HCP* [online] [vid. 2025e-02-18]. Dostupné z: <https://www.vanflytahcp.com/en/dosing>

Anon., [b.r.]. Hodgkin Lymphoma - Cancer Stat Facts. *SEER* [online] [vid. 2025f-01-28]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>

Anon., [b.r.]. Human Acute Monocytic Leukemia cell line THP-1. *Biohippo* [online] [vid. 2025g-03-19]. Dostupné z: <https://www.ebiohippo.com/en/cls-cell-line/human-acute-monocytic-leukemia-cell-line-thp-1.html>

Anon., [b.r.]. Midostaurin Dosage Guide + Max Dose, Adjustments. *Drugs.com* [online] [vid. 2025h-02-18]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/dosage/midostaurin.html>

Anon., [b.r.]. MOLM-13. *DSMZ- German collection of microorganisms and cell cultures GmbH* [online] [vid. 2025i-03-19]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-554>

Anon., [b.r.]. MV4-11 Cells. *Cytion* [online] [vid. 2024j-09-12]. Dostupné z: <https://www.cytion.com/MV4-11-Cells/300295>

Anon., [b.r.]. Pancytopenia: Causes, Symptoms and Treatment. *Cleveland Clinic* [online] [vid. 2025k-03-19]. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/25105-pancytopenia>

Anon., [b.r.]. Survival Rates for Breast Cancer. *American Cancer Society* [online] [vid. 2025l-01-28]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>

APARICIO-PÉREZ, Clara, Esther PRADOS DE LA TORRE, Joaquin SANCHEZ-GARCIA, Carmen MARTÍN-CALVO, Carmen MARTÍNEZ-LOSADA, Javier CASAÑO-SANCHEZ, Juana SERRANO-LÓPEZ a Josefina SERRANO, 2023. Evolving Risk Classifications in AML in a Real-Life Scenario: After Changes upon Changes, Is It More and More Adverse? *Cancers* [online]. 15(5), 1425. ISSN 2072-6694. Dostupné z: [doi:10.3390/cancers15051425](https://doi.org/10.3390/cancers15051425)

ARBER, Daniel A., 2001. Realistic Pathologic Classification of Acute Myeloid Leukemias. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 115(4), 552–560. ISSN 0002-9173. Dostupné z: [doi:10.1309/K2PH-L2U7-722B-B1YR](https://doi.org/10.1309/K2PH-L2U7-722B-B1YR)

ARBER, Daniel A., Attilio ORAZI, Robert HASSERJIAN, Jürgen THIELE, Michael J. BOROWITZ, Michelle M. LE BEAU, Clara D. BLOOMFIELD, Mario CAZZOLA a James

W. VARDIMAN, 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [online]. **127**(20), 2391–2405. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-03-643544

AUGUSTIN, Ewa, Anna SKWARSKA, Anna WERYSZKO, Iwona PELIKANT, Ewa SANKOWSKA a Barbara BOROWA-MAZGAJ, 2015. The antitumor compound triazoloacridinone C-1305 inhibits FLT3 kinase activity and potentiates apoptosis in mutant FLT3-ITD leukemia cells. *Acta Pharmacologica Sinica* [online]. **36**(3), 385–399. ISSN 1671-4083. Dostupné z: doi:10.1038/aps.2014.142

BAZARBACHI, Ali, Gesine BUG, Frederic BARON, Eolia BRISSOT, Fabio CICERI, Iman Abou DALLE, Hartmut DÖHNER, Jordi ESTEVE, Yngvar FLOISAND, Sebastian GIEBEL, Maria GILLECE, Norbert-Claude GORIN, Elias JABBOUR, Mahmoud ALJURF, Hagop KANTARJIAN, Mohamed KHARFAN-DABAJA, Myriam LABOPIN, Francesco LANZA, Florent MALARD, Zinaida PERIC, Thomas PREBET, Farhad RAVANDI, Annalisa RUGGERI, Jaime SANZ, Christoph SCHMID, Roni SHOUVAL, Alexandros SPYRIDONIDIS, Jurjen VERSLUIS, Norbert VEY, Bipin N. SAVANI, Arnon NAGLER a Mohamad MOHTY, 2020. Clinical practice recommendation on hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with FLT3-internal tandem duplication: a position statement from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* [online]. **105**(6), 1507–1516. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2019.243410

BOSCARO, Eleonora, Irene URBINO, Federica Maria CATANIA, Giulia ARRIGO, Carolina SECRETO, Matteo OLIVI, Stefano D'ARDIA, Chiara FRAIRIA, Valentina GIAI, Roberto FREILONE, Dario FERRERO, Ernesta AUDISIO a Marco CERRANO, 2023. Modern Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia in 2023: Integrating Established and Emerging Prognostic Factors. *Cancers* [online]. **15**(13), 3512. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers15133512

BRAY, Freddie, Jacques FERLAY, Isabelle SOERJOMATARAM, Rebecca L. SIEGEL, Lindsey A. TORRE a Ahmedin JEMAL, 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. **68**(6), 394–424. ISSN 0007-9235, 1542-4863. Dostupné z: doi:10.3322/caac.21492

BREGANTE, Javier, Anna SCHÖNBICHLER, Daniel PÖLÖSKE, Lina DEGENFELD-SCHONBURG, Garazi MONZÓ CONTRERAS, Emir HADZIJUSUFOVIC, Elvin D. DE ARAUJO, Peter VALENT, Richard MORIGGL a Anna ORLOVA, 2021. Efficacy and Synergy of Small Molecule Inhibitors Targeting FLT3-ITD+ Acute Myeloid Leukemia. *Cancers* [online]. **13**(24), 6181. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13246181

BROWN, Eric J., Mark W. ALBERS, Tae BUM SHIN, Kazuo ICHIKAWA, Curtis T. KEITH, William S. LANE a Stuart L. SCHREIBER, 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature* [online]. **369**(6483), 756–758. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/369756a0

BULIKOVÁ, A., M. CERMANOVÁ, P. CETKOVSKÝ, M. LÁNSKÁ, J. NOVÁK, J. MAYER, M. PALACKOVÁ, J. PROCHÁZKOVÁ, Z. RÁČIL, L. SEMERÁD, C. ŠÁLEK, L. ŠMARDOVÁ, S. VOKURKA, J. VYDRA, Daniela ŽÁČKOVÁ a P. ŽÁK, 2013. *Akutní myeloidní leukémie : informace pro pacienty a jejich blízké* [online]. B.m.: Česká leukemická

skupina - pro život (CELL) [vid. 2024-12-29]. ISBN 978-80-260-4154-2. Dostupné z: <https://www.muni.cz/en/research/publications/1681545>

CAPELLI, Debora, Diego MENOTTI, Alessandro FIORENTINI, Francesco SARACENI a Attilio OLIVIERI, 2022. Overcoming Resistance: FLT3 Inhibitors Past, Present, Future and the Challenge of Cure. *Cancers* [online]. **14**(17), 4315. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14174315

CARRANZA-ARANDA, Ahtziri S., Luis Felipe JAVE-SUÁREZ, Flor Y. FLORES-HERNÁNDEZ, María Del Rosario HUIZAR-LÓPEZ, Sara E. HERRERA-RODRÍGUEZ a Anne SANTERRE, 2024. In silico and in vitro study of FLT3 inhibitors and their application in acute myeloid leukemia. *Molecular Medicine Reports* [online]. **30**(6), 229. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2024.13353

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH, 2024a. FDA approves gilteritinib for relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) with a FLT3 mutation. *FDA* [online]. [vid. 2024-12-30]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-gilteritinib-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-aml-flt3-mutation>

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH, 2024b. FDA approves quizartinib for newly diagnosed acute myeloid leukemia. *FDA* [online]. [vid. 2024-12-08]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-quizartinib-newly-diagnosed-acute-myeloid-leukemia>

CORTES, Jorge, 2024. Quizartinib: a potent and selective FLT3 inhibitor for the treatment of patients with FLT3-ITD-positive AML. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. **17**(1), 111. ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-024-01617-7

DAVER, Naval, Jorge CORTES, Farhad RAVANDI, Keyur P. PATEL, Jan A. BURGER, Marina KONOPLEVA a Hagop KANTARJIAN, 2015. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood* [online]. **125**(21), 3236–3245. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2014-10-605808

DAVER, Naval, Richard F. SCHLENK, Nigel H. RUSSELL a Mark J. LEVIS, 2019. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* [online]. **33**(2), 299–312. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-018-0357-9

DAVER, Naval, Sangeetha VENUGOPAL a Farhad RAVANDI, 2021. FLT3 mutated acute myeloid leukemia: 2021 treatment algorithm. *Blood Cancer Journal* [online]. **11**(5), 1–9. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/s41408-021-00495-3

DEBELA, Dejene Tolossa, Seke GY MUZAZU, Kidist Digamo HERARO, Maureen Tayamika NDALAMA, Betelhiem Woldemedhin MESELE, Dagimawi Chilot HAILE, Sophia Khalayi KITUI a Tsegahun MANYAZEWA, 2021. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine* [online]. **9**, 20503121211034366. ISSN 2050-3121. Dostupné z: doi:10.1177/20503121211034366

DESCHLER, Barbara a Michael LÜBBERT, 2006. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* [online]. **107**(9), 2099–2107. ISSN 0008-543X, 1097-0142. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.22233

DÖHNER, Hartmut, Elihu H. ESTEY, Sergio AMADORI, Frederick R. APPELBAUM, Thomas BÜCHNER, Alan K. BURNETT, Hervé DOMBRET, Pierre FENAUX, David GRIMWADE, Richard A. LARSON, Francesco LO-COCO, Tomoki NAOE, Dietger NIEDERWIESER, Gert J. OSSENKOPPELE, Miguel A. SANZ, Jorge SIERRA, Martin S. TALLMAN, Bob LÖWENBERG a Clara D. BLOOMFIELD, 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* [online]. **115**(3), 453–474. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-07-235358

DÖHNER, Hartmut, Andrew H. WEI, Frederick R. APPELBAUM, Charles CRADDOCK, Courtney D. DINARDO, Hervé DOMBRET, Benjamin L. EBERT, Pierre FENAUX, Lucy A. GODLEY, Robert P. HASSERJIAN, Richard A. LARSON, Ross L. LEVINE, Yasushi MIYAZAKI, Dietger NIEDERWIESER, Gert OSSENKOPPELE, Christoph RÖLLIG, Jorge SIERRA, Eytan M. STEIN, Martin S. TALLMAN, Hwei-Fang TIEN, Jianxiang WANG, Agnieszka WIERZBOWSKA a Bob LÖWENBERG, 2022. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* [online]. **140**(12), 1345–1377. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2022016867

DREXLER, H. G., 1996. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*. **10**(4), 588–599. ISSN 0887-6924.

DUY, Cihangir, Matt TEATER, Francine E. GARRETT-BAKELMAN, Martin CARROLL a Ari MELNICK, 2016. Acute Myeloid Leukemia Cells Resist Chemotherapy through a Reversible Senescence-like State Maintaining Repopulation Potential. *Blood* [online]. **128**(22), 582. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V128.22.582.582

EBSTEIN, Wilhelm, 1889. *Über die acute Leukämie und Pseudoleukämie*.

EGUCHI, Motoki, Yosuke MINAMI, Ayumi KUZUME a SungGi CHI, 2020. Mechanisms Underlying Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines* [online]. **8**(8), 245. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines8080245

ERBA, Harry P., Alexander E. PERL, Eunice WANG, Adam BAGG a Corey S. CUTLER, 2021. Type 1/2 FLT3 Inhibitors in AML. *OncLive* [online] [vid. 2025-02-12]. Dostupné z: <https://www.onclive.com/view/type-1-2-flt3-inhibitors-in-aml>

ESTEY, Elihu a Hartmut DÖHNER, 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet (London, England)* [online]. **368**(9550), 1894–1907. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(06)69780-8

FAUBERT, Brandon, Ashley SOLMONSON a Ralph J. DEBERARDINIS, 2020. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **368**(6487), eaaw5473. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaw5473

FEDOROV, Kateryna, Abhishek MAITI a Marina KONOPLEVA, 2023. Targeting FLT3 Mutation in Acute Myeloid Leukemia: Current Strategies and Future Directions. *Cancers* [online]. **15**(8), 2312. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers15082312

FREIFELD, Alison G., Eric J. BOW, Kent A. SEPKOWITZ, Michael J. BOECKH, James I. ITO, Craig A. MULLEN, Issam I. RAAD, Kenneth V. ROLSTON, Jo-Anne H. YOUNG, John R. WINGARD, a INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2011. Clinical practice

guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* [online]. **52**(4), e56-93. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1093/cid/cir073

GALANIS, A. a M. LEVIS, 2015. Inhibition of c-Kit by tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica* [online]. **100**(3), e77–e79. ISSN 0390-6078, 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2014.117028

GARITANO-TROJAOLA, Andoni, Ana SANCHO, Ralph GÖTZ, Patrick EIRING, Susanne WALZ, Hardikkumar JETANI, Jesus GIL-PULIDO, Matteo Claudio DA VIA, Eva TEUFEL, Nadine RHODES, Larissa HAERTLE, Estibaliz ARELLANO-VIERA, Raoul TIBES, Andreas ROSENWALD, Leo RASCHE, Michael HUDECEK, Markus SAUER, Jürgen GROLL, Hermann EINSELE, Sabrina KRAUS a Martin K. KORTÜM, 2021. Actin cytoskeleton deregulation confers midostaurin resistance in FLT3-mutant acute myeloid leukemia. *Communications Biology* [online]. **4**, 799. ISSN 2399-3642. Dostupné z: doi:10.1038/s42003-021-02215-w

GILLILAND, D. Gary a James D. GRIFFIN, 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* [online]. **100**(5), 1532–1542. ISSN 1528-0020, 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-02-0492

GUO, Naxin, Mitra AZADNIV, Myra COPPAGE, Mary NEMER, Jason MENDLER, Michael BECKER a Jane LIESVELD, 2019. Effects of Neddylation and mTOR Inhibition in Acute Myelogenous Leukemia. *Translational Oncology* [online]. **12**(4), 602–613. ISSN 1936-5233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2019.01.001

GUTTMAN, Yelena a Zohar KEREM, 2022. Dietary Inhibitors of CYP3A4 Are Revealed Using Virtual Screening by Using a New Deep-Learning Classifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **70**(8), 2752–2761. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.2c00237

HEUSER, Michael, Sylvie D. FREEMAN, Gert J. OSSENKOPPELE, Francesco BUCCISANO, Christopher S. HOURIGAN, Lok Lam NGAI, Jesse M. TETTERO, Costa BACHAS, Constance BAER, Marie-Christine BÉNÉ, Veit BÜCKLEIN, Anna CZYZ, Barbara DENYS, Richard DILLON, Michaela FEURING-BUSKE, Monica L. GUZMAN, Torsten HAERLACH, Lina HAN, Julia K. HERZIG, Jeffrey L. JORGENSEN, Wolfgang KERN, Marina Y. KONOPLEVA, Francis LACOMBE, Marta LIBURA, Agata MAJCHRZAK, Luca MAURILLO, Yishai OFRAN, Jan PHILIPPE, Adriana PLESA, Claude PREUDHOMME, Farhad RAVANDI, Christophe ROUMIER, Marion SUBKLEWE, Felicitas THOL, Arjan A. VAN DE LOOSDRECHT, Bert A. VAN DER REIJDEN, Adriano VENDITTI, Agnieszka WIERZBOWSKA, Peter J. M. VALK, Brent L. WOOD, Roland B. WALTER, Christian THIEDE, Konstanze DÖHNER, Gail J. ROBOZ a Jacqueline CLOOS, 2021. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* [online]. **138**(26), 2753–2767. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2021013626

HOFFMAN, Ronald, Edward J. BENZ, Leslie E. SILBERSTEIN, Helen HESLOP, Jeffrey WEITZ a Mohamed E. SALAMA, 2022. *Hematology E-Book: Basic Principles and Practice*. B.m.: Elsevier Health Sciences. ISBN 978-0-323-73389-2.

HOUGHTON, Peter, Rui FANG, Isariya TECHATANAWAT, Glyn STEVENTON, Peter J. HYLANDS a C. C. LEE, 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* [online]. **42**(4), Natural Product Research: The Challenges Facing the Modern Researcher, 377–387. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.003

CHANG, Chung-Che a Amirah KUZU, 2023. What's new in AML Classification (WHO 2022 vs International Consensus.... *College of American Pathologists* [online] [vid. 2024-12-09]. Dostupné z: <https://www.cap.org/member-resources/articles/whats-new-in-aml-classification-who-2022-vs-international-consensus-classification>

CHANG, Yu-Ting, Daniela HERNANDEZ, Salvador ALONSO, Minling GAO, Meng SU, Gabriel GHIAUR, Mark J. LEVIS a Richard J. JONES, 2019. Role of CYP3A4 in bone marrow microenvironment-mediated protection of FLT3/ITD AML from tyrosine kinase inhibitors. *Blood Advances* [online]. **3**(6), 908–916. ISSN 2473-9529. Dostupné z: doi:10.1182/bloodadvances.2018022921

CHEN, Fangli, Yuichi ISHIKAWA, Akimi AKASHI, Tomoki NAOE a Hitoshi KIYOI, 2016. Co-expression of wild-type FLT3 attenuates the inhibitory effect of FLT3 inhibitor on FLT3 mutated leukemia cells. *Oncotarget* [online]. **7**(30), 47018–47032. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.10147

CHEN, Xue, Lili YUAN, Yang ZHANG, Fang WANG, Xiaoli MA, Jiancheng FANG, Panxiang CAO, Yijun LIU, Zhixiu LIU, Ming LIU, Jiaqi CHEN, Xiaosu ZHOU, Mingyue LIU, David JIN, Peihua LU a Hongxing LIU, 2023. Advances in Acute Myeloid Leukemia Classification: A Comparative Analysis of Who-HAEM4R, Who-HAEM5, and International Consensus Classification. *Blood* [online]. **142**(Supplement 1), 1566. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2023-187915

CHOUDHARY, Chunaram, Joachim SCHWÄBLE, Christian BRANDTS, Lara TICKENBROCK, Bülent SARGIN, Thomas KINDLER, Thomas FISCHER, Wolfgang E. BERDEL, Carsten MÜLLER-TIDOW a Hubert SERVE, 2005. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* [online]. **106**(1), 265–273. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2004-07-2942

CHOUDHRY, Aditi a Thomas G. DELOUGHERY, 2012. Bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia. *American Journal of Hematology* [online]. **87**(6), 596–603. ISSN 1096-8652. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.23158

ILYAS, Asad M., Youssri AHMED, Mamdooh GARI, Mohammed H. ALQAHTANI, Taha A. KUMOSANI, Abdulrahman L. AL-MALKI, Khalid O. ABUALNAJA, Saad H. S. ALBOHAIRI, Adeel G. A. CHAUDHARY a Farid AHMED, 2016. Sunitinib Reduces Acute Myeloid Leukemia Clonogenic Cells in Vitro and Has Potent Inhibitory Effect on Sorted AML ALDH+ Cells. *Open Journal of Blood Diseases* [online]. **6**(1), 9–16. Dostupné z: doi:10.4236/ojbd.2016.61003

INOUE, Satoshi, Wanda Y. LI, Alan TSENG, Isabel BEERMAN, Andrew J. ELIA, Sean C. BENDALL, François LEMONNIER, Ken J. KRON, David W. CESCONE, Zhenyue HAO, Evan F. LIND, Naoya TAKAYAMA, Aline C. PLANELLO, Shu Yi SHEN, Alan H. SHIH, Dana M. LARSEN, Qinxin LI, Bryan E. SNOW, Andrew WAKEHAM, Jillian HAIGHT, Chiara

GORRINI, Christian BASSI, Kelsie L. THU, Kiichi MURAKAMI, Alisha R. ELFORD, Takeshi UEDA, Kimberly STRALEY, Katharine E. YEN, Gerry MELINO, Luisa CIMMINO, Iannis AIFANTIS, Ross L. LEVINE, Daniel D. DE CARVALHO, Mathieu LUPIEN, Derrick J. ROSSI, Garry P. NOLAN, Rob A. CAIRNS a Tak W. MAK, 2016. Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. *Cancer Cell* [online]. **30**(2), 337–348. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2016.05.018

IV. INTERNÍ HEMATOLOGICKÁ KLINIKA FN HK, 2023. Akutní myeloidní leukemie – management, léčba.

JACOBI, Angela, Sebastian THIEME, Romy LEHMANN, Fernando UGARTE, Harry L. MALECH, Sina KOCH, Christian THIEDE, Katrin MÜLLER, Martin BORNHÄUSER, Martin RYSER a Sebastian BRENNER, 2010. Impact of CXCR4 inhibition on FLT3-ITD-positive human AML blasts. *Experimental Hematology* [online]. **38**(3), 180–190. ISSN 0301-472X. Dostupné z: doi:10.1016/j.exphem.2009.12.003

JORDAN, Craig T., Monica L. GUZMAN a Mark NOBLE, 2006. Cancer Stem Cells. *New England Journal of Medicine* [online]. **355**(12), 1253–1261. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra061808

KAMILOGLU, Senem, Gulce SARI, Tugba OZDAL a Esra CAPANOGLU, 2020. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* [online]. **1**(3), 332–349. ISSN 2643-8429, 2643-8429. Dostupné z: doi:10.1002/fft2.44

KANG, Ji-Bo, Lu CHEN, Xue-Jiao LENG, Jing-Jing WANG, Yang CHENG, Shi-Han WU, Yi-Yuan MA, Li-Jin YANG, Yu-Hao CAO, Xiao YANG, Zhen-Jiang TONG, Jia-Zhen WU, Yi-Bo WANG, Hai ZHOU, Jia-Chuan LIU, Ning DING, Wei-Chen DAI, Yan-Cheng YU, Xin XUE, Shan-Liang SUN, Xiao-Bin DAI, Liang CHANG, Xiao-Long WANG, Nian-Guang LI a Zhi-Hao SHI, 2022. Synthesis and biological evaluation of 4-(4-aminophenyl)-6-methylisoxazolo[3,4-*b*] pyridin-3-amine covalent inhibitors as potential agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. **70**, 116937. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2022.116937

KASPER, S, F BREITENBUECHER, F HEIDEL, S HOFFARTH, B MARKOVA, M SCHULER a T FISCHER, 2012. Targeting MCL-1 sensitizes FLT3-ITD-positive leukemias to cytotoxic therapies. *Blood Cancer Journal* [online]. **2**(3), e60. ISSN 2044-5385. Dostupné z: doi:10.1038/bcj.2012.5

KAZI, Julhash U. a Lars RÖNNSTRAND, 2019. FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiological Reviews* [online]. **99**(3), 1433–1466. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00029.2018

KE, Yi-Yu, Vivek Kumar SINGH, Mohane Selvaraj COUMAR, Yung Chang HSU, Wen-Chieh WANG, Jen-Shin SONG, Chun-Hwa CHEN, Wen-Hsing LIN, Szu-Huei WU, John T. A. HSU, Chuan SHIH a Hsing-Pang HSIEH, 2015. Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification. *Scientific Reports* [online]. **5**(1), 11702. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep11702

KENNEDY, Vanessa E. a Catherine C. SMITH, 2020. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Frontiers in Oncology* [online]. **10** [vid. 2024-12-08]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2020.612880

KIYOI, Hitoshi, Naomi KAWASHIMA a Yuichi ISHIKAWA, 2020a. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Science* [online]. **111**(2), 312–322. ISSN 1347-9032. Dostupné z: doi:10.1111/cas.14274

KIYOI, Hitoshi, Naomi KAWASHIMA a Yuichi ISHIKAWA, 2020b. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Science* [online]. **111**(2), 312–322. ISSN 1349-7006. Dostupné z: doi:10.1111/cas.14274

KNAPPER, Steven, Nigel RUSSELL, Amanda GILKES, Robert K. HILLS, Rosemary E. GALE, James D. CAVENAGH, Gail JONES, Lars KJELDSEN, Michael R. GRUNWALD, Ian THOMAS, Heiko KONIG, Mark J. LEVIS a Alan K. BURNETT, 2017. A randomized assessment of adding the kinase inhibitor lestaurtinib to first-line chemotherapy for FLT3-mutated AML. *Blood* [online]. **129**(9), 1143–1154. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-07-730648

KO, Ya-Chen, Chung-Yi HU, Zheng-Hau LIU, Hwei-Fang TIEN, Da-Liang OU, Hsiung-Fei CHIEN a Liang-In LIN, 2019. Cytarabine-Resistant FLT3-ITD Leukemia Cells are Associated with TP53 Mutation and Multiple Pathway Alterations—Possible Therapeutic Efficacy of Cabozantinib. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(5), 1230. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20051230

KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ, 2010. *Klinická cytogenetika I. : úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice* [online]. 2. upravené vydání. Praha: Karolinum [vid. 2024-09-09]. ISBN 978-80-246-1880-7. Dostupné z: <https://is.muni.cz/publication/939999/cs/Klinicka-cytogenetika-I-uvod-do-klinicke-cytogenetiky-vysetrovaci-metody-v-klinicke-cytogenetice/Kocarek-Panek-Novotna>

LACHOWIEZ, Curtis A., Courtney D. DINARDO a Sanam LOGHAVI, 2023. Molecularly Targeted Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current Treatment Landscape and Mechanisms of Response and Resistance. *Cancers* [online]. **15**(5), 1617. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers15051617

LARROSA-GARCIA, Maria a Maria R. BAER, 2017. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Current status and future directions. *Molecular cancer therapeutics* [online]. **16**(6), 991–1001. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0876

LEE, Lauren, Yoshiyuki HIZUKURI, Paul SEVERSON, Benjamin POWELL, Chao ZHANG, Yan MA, Maiko NARAHARA, Hiroyuki SUMI, Daniela HERNANDEZ, Trivikram RAJKHOWA, Gideon BOLLAG a Mark LEVIS, 2021. A novel combination regimen of BET and FLT3 inhibition for FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Haematologica* [online]. [vid. 2025-02-14]. ISSN 1592-8721, 0390-6078. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2020.247346

LEE, Michelle Hyunju, Wyatt MCCALL, Joanna CWYKIEL, Chenyu LIN, Ellen MADARANG, Justin M. WATTS, Harry P. ERBA, Yasmin ABAZA, Alexander E. PERL, Andrew H MATTHEWS, Andrew M. BRUNNER a Amir T. FATHI, 2024. Real-World Treatment Patterns and Effectiveness of Midostaurin Versus Quizartinib in FLT3-ITD Mutated

Acute Myeloid Leukemia Undergoing Intensive Induction. *Blood* [online]. **144**, 66th ASH Annual Meeting Abstracts, 4282. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2024-205931

LEVIS, Mark, Rosalyn PHAM, B. Douglas SMITH a Donald SMALL, 2004. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood* [online]. **104**(4), 1145–1150. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2004-01-0388

LIN, Wen-Hsing, Teng-Kuang YEH, Weir-Torn JIAANG, Kuei-Jung YEN, Chun-Hwa CHEN, Chin-Ting HUANG, Shih-Chieh YEN, Shu-Yi HSIEH, Ling-Hui CHOU, Ching-Ping CHEN, Chun-Hsien CHIU, Li-Chun KAO, Yu-Sheng CHAO, Chiung-Tong CHEN a John T.-A. HSU, 2014. Evaluation of the Antitumor Effects of BPR1J-340, a Potent and Selective FLT3 Inhibitor, Alone or in Combination with an HDAC Inhibitor, Vorinostat, in AML Cancer. *PLOS ONE* [online]. **9**(1), e83160. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0083160

LINDBLAD, O., E. CORDERO, A. PUISSANT, L. MACAULAY, A. RAMOS, N. N. KABIR, J. SUN, J. VALLON-CHRISTERSSON, K. HARALDSSON, M. T. HEMANN, Å BORG, F. LEVANDER, K. STEGMAIER, K. PIETRAS, L. RÖNNSTRAND a J. U. KAZI, 2016. Aberrant activation of the PI3K/mTOR pathway promotes resistance to sorafenib in AML. *Oncogene* [online]. **35**(39), 5119–5131. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2016.41

LIU, Han, 2015. Characterization of the signaling pathways activated by FLT3 mutation in acute myeloid leukemia.

LOWENBERG, Böb, 2004. Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. **89**(9), 1029–1032. ISSN 1592-8721.

MA, Hayley, Bao NGUYEN, Li LI, Sarah GREENBLATT, Allen WILLIAMS, Ming ZHAO, Mark LEVIS, Michelle RUDEK, Amy DUFFIELD a Donald SMALL, 2014. TTT-3002 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with activity against FLT3-associated leukemias in vitro and in vivo. *Blood* [online]. **123**(10), 1525–1534. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2013-08-523035

MA, Jing a Yafei WANG, 2024. Myeloid neoplasms post cytotoxic therapy: epidemiology, pathogenesis outcomes, prognostic factors, and treatment options. *Annals of Medicine* [online]. **56**(1), 2329132. ISSN 0785-3890, 1365-2060. Dostupné z: doi:10.1080/07853890.2024.2329132

MAHTO, Sanjeev, Prakash CHANDRA a Seog RHEE, 2010. In vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. *Toxicology and Environmental Health Sciences* [online]. **2**, 87–93. Dostupné z: doi:10.1007/BF03216487

MARTINI, Miriam, Maria Chiara DE SANTIS, Laura BRACCINI, Federico GULLUNI a Emilio HIRSCH, 2014. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. ISSN 0785-3890.

MAYNARD, Rebecca S., Charlotte HELLMICH, Kristian M. BOWLES a Stuart A. RUSHWORTH, 2022. Acute Myeloid Leukaemia Drives Metabolic Changes in the Bone Marrow Niche. *Frontiers in Oncology* [online]. **12**, 924567. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2022.924567

MAZIARZ, Richard T., Mark LEVIS, Mrinal M. PATNAIK, Bart L. SCOTT, Sanjay R. MOHAN, Abhinav DEOL, Scott D. ROWLEY, Dennis D. H. KIM, Daniela HERNANDEZ, Trivikram RAJKHOWA, Kelly HAINES, Gaetano BONIFACIO, Patrice RINE, Das PURKAYASTHA a Hugo F. FERNANDEZ, 2021. Midostaurin after allogeneic stem cell transplant in patients with FLT3-internal tandem duplication-positive acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* [online]. **56**(5), 1180–1189. ISSN 0268-3369, 1476-5365. Dostupné z: doi:10.1038/s41409-020-01153-1

MENTELLA, Maria Chiara, Franco SCALDAFERRI, Caterina RICCI, Antonio GASBARRINI a Giacinto Abele Donato MIGGIANO, 2019. Cancer and Mediterranean Diet: A Review. *Nutrients* [online]. **11**(9), 2059. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11092059

MESHINCHI, Soheil a Frederick R. APPELBAUM, 2009. Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research* [online]. **15**(13), 4263–4269. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123

METZELDER, Stephan, Ying WANG, Ellen WOLLMER, Michael WANZEL, Sabine TEICHLER, Anuhar CHATURVEDI, Martin EILERS, Erich ENGHOFFER, Andreas NEUBAUER a Andreas BURCHERT, 2009. Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* [online]. **113**(26), 6567–6571. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2009-03-208298

MILNEROWICZ, Szymon, Julia MASZEWSKA, Paulina SKOWERA, Magdalena STELMACH a Monika LEJMAN, 2023. AML under the Scope: Current Strategies and Treatment Involving FLT3 Inhibitors and Venetoclax-Based Regimens. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **24**(21), 15849. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms242115849

MITRA, Anupam, Jesus I. LUNA, Alina I. MARUSINA, Alexander MERLEEV, Smriti KUNDU-RAYCHAUDHURI, David FIORENTINO, Siba P. RAYCHAUDHURI a Emanuel MAVERAKIS, 2015. Dual mTOR Inhibition Is Required to Prevent TGF- β -Mediated Fibrosis: Implications for Scleroderma. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **135**(11), 2873–2876. ISSN 0022-202X, 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2015.252

MOKOBI, Faith, 2022. *Hematopoiesis- Definition, Cells, Growth Factors, Regulation* [online] [vid. 2025-03-19]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/hematopoiesis/>

MOSER, Bernhard, Sophie EDTMAYER, Agnieszka WITALISZ-SIEPRACKA a Dagmar STOIBER, 2021. The Ups and Downs of STAT Inhibition in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines* [online]. **9**(8), 1051. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9081051

MOTOFEI, Ion G., 2022. Biology of cancer; from cellular and molecular mechanisms to developmental processes and adaptation. *Seminars in Cancer Biology* [online]. **86**, 600–615. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2021.10.003

MRÓZEK, Krzysztof, Guido MARCUCCI, Peter PASCHKA, Susan P. WHITMAN a Clara D. BLOOMFIELD, 2007. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized

molecular classification? *Blood* [online]. **109**(2), 431–448. ISSN 0006-4971, 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2006-06-001149

NANNYA, Yasuhito, Auro VISWABANDYA a Peihua LU, 2022. Advances in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Leukemia. *BLOOD CELL THERAPY / The official journal of APBMT* [online]. **5**(4) [vid. 2024-12-01]. ISSN 2432-7026. Dostupné z: doi:10.31547/bct-2022-015

NATARAJAN, Karthika, Yingqiu XIE, Mehmet BURCU, Douglas E. LINN, Yun QIU a Maria R. BAER, 2013. Pim-1 Kinase Phosphorylates and Stabilizes 130 kDa FLT3 and Promotes Aberrant STAT5 Signaling in Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Internal Tandem Duplication. *PLOS ONE* [online]. **8**(9), e74653. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0074653

NEPOMUCENO, Ronald, Allison M ROOKS, Michael GARDNER a Robert ARMSTRONG, 2014. Differential Inhibition of FLT3-ITD, FLT3-WT, and KIT By Quizartinib As Assessed By Modified PIA Assay. *Blood* [online]. **124**(21), 951. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V124.21.951.951

NEUMANN, Ernst, 1868. Über die Bedeutung des Knochenmarks für die Blutbildung.

NICHOLSON, Karleen M a Neil G ANDERSON, 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* [online]. **14**(5), 381–395. ISSN 0898-6568. Dostupné z: doi:10.1016/S0898-6568(01)00271-6

NITIKA, Jiao WEI a Ai-Min HUI, 2022. Role of Biomarkers in FLT3 AML. *Cancers* [online]. **14**(5), 1164. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14051164

OFFICE OF THE COMMISSIONER, 2020. FDA approves new combination treatment for acute myeloid leukemia. *FDA* [online]. B.m.: FDA [vid. 2024-12-30]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-combination-treatment-acute-myeloid-leukemia>

OYA, Shuki, Hidetoshi OZAWA, Yoshimi MAEHIRO, Takayuki NAKAMURA, Yusuke TAKAKI, Toshinobu FUKUYAMA, Yoshitaka YAMASAKI, Maki YAMAGUCHI, Kazutoshi AOYAMA, Fumihiko MOURI a Koji NAGAFUJI, 2023. Alternating venetoclax/azacytidine and FLT3 inhibitor treatment for NPM1- and FLT3-mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* [online]. **130**, 107313. ISSN 01452126. Dostupné z: doi:10.1016/j.leukres.2023.107313

PARK, I.-K., B. MUNDY-BOSSE, S. P. WHITMAN, X. ZHANG, S. L. WARNER, D. J. BEARSS, W. BLUM, G. MARCUCCI a M. A. CALIGIURI, 2015. Receptor tyrosine kinase Axl is required for resistance of leukemic cells to FLT3-targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia* [online]. **29**(12), 2382–2389. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2015.147

PARK, Sophie, Nicolas CHAPUIS, Jérôme TAMBURINI, Valérie BARDET, Pascale CORNILLET-LEFEBVRE, Lise WILLEMS, Alexa GREEN, Patrick MAYEUX, Catherine LACOMBE a Didier BOUSCARY, 2010. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica* [online]. **95**(5), 819–828. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2009.013797

PATEL, Ami B., Anthony D. POMICTER, Dongqing YAN, Anna M. EIRING, Orlando ANTELOPE, Jonathan A. SCHUMACHER, Todd W. KELLEY, Srinivas K. TANTRAVAHU, Tibor J. KOVACSOVICS, Paul J. SHAMI, Thomas O'HARE a Michael W. DEININGER, 2020. Dasatinib overcomes stroma-based resistance to the FLT3 inhibitor quizartinib using multiple mechanisms. *Leukemia* [online]. **34**(11), 2981–2991. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/s41375-020-0858-1

PILOTO, Obdulio, Melissa WRIGHT, Patrick BROWN, Kyu-Tae KIM, Mark LEVIS a Donald SMALL, 2006. Prolonged exposure to FLT3 inhibitors leads to resistance via activation of parallel signaling pathways. *Blood* [online]. **109**(4), 1643–1652. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2006-05-023804

POLLYEA, Daniel A., Dale BIXBY, Alexander PERL, Vijaya Raj BHATT, Jessica K. ALTMAN, Frederick R. APPELBAUM, Marcos de LIMA, Amir T. FATHI, James M. FORAN, Ivana GOJO, Aric C. HALL, Meagan JACOBY, Jeffrey LANCET, Gabriel MANNIS, Guido MARCUCCI, Michael G. MARTIN, Alice MIMS, Jadee NEFF, Reza NEJATI, Rebecca OLIN, Mary-Elizabeth PERCIVAL, Thomas PREBET, Amanda PRZESPOLEWSKI, Dinesh RAO, Farhad RAVANDI-KASHANI, Paul J. SHAMI, Richard M. STONE, Stephen A. STRICKLAND, Kendra SWEET, Pankit VACHHANI, Matthew WIEDUWILT, Kristina M. GREGORY, Ndiya OGBA a Martin S. TALLMAN, 2021. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* [online]. **19**(1), 16–27. ISSN 1540-1405, 1540-1413. Dostupné z: doi:10.6004/jnccn.2021.0002

RAMOS, Joe W., 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. **40**(12), 2707–2719. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2008.04.009

RUGLIONI, Martina, Stefania CRUCITTA, Giovanna Irene LUCULLI, Gaspare TANCREDI, Maria Livia DEL GIUDICE, Sandra MECHELLI, Sara GALIMBERTI, Romano DANESI a Marzia DEL RE, 2024. Understanding mechanisms of resistance to FLT3 inhibitors in adult FLT3-mutated acute myeloid leukemia to guide treatment strategy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. **201**, 104424. ISSN 1040-8428. Dostupné z: doi:10.1016/j.critrevonc.2024.104424

SAN JOSÉ-ENÉRIZ, Edurne, Naroa GIMENEZ-CAMINO, Xabier AGIRRE a Felipe PROSPER, 2019. HDAC Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers* [online]. **11**(11), 1794. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11111794

SATO, Takashi, Xiaochuan YANG, Steven KNAPPER, Paul WHITE, B. Douglas SMITH, Steven GALKIN, Donald SMALL, Alan BURNETT a Mark LEVIS, 2011. FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood* [online]. **117**(12), 3286–3293. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-01-266742

SAXTON, Robert A. a David M. SABATINI, 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* [online]. **168**(6), 960–976. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.02.004

SEIPEL, Katja, Miguel A. T. MARQUES, Corinne SIDLER, Beatrice U. MUELLER a Thomas PABST, 2018. MDM2- and FLT3-inhibitors in the treatment of FLT3-ITD acute myeloid

leukemia, specificity and efficacy of NVP-HDM201 and midostaurin. *Haematologica* [online]. **103**(11), 1862–1872. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2018.191650

SEN, Rupashree, Karthika NATARAJAN, Jasjeet BHULLAR, Suneet SHUKLA, Hong-Bin FANG, Ling CAI, Zhe-Sheng CHEN, Suresh V. AMBUDKAR a Maria R. BAER, 2012. The Novel BCR-ABL and FLT3 Inhibitor Ponatinib Is a Potent Inhibitor of the MDR-Associated ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. **11**(9), 2033–2044. ISSN 1535-7163, 1538-8514. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0302

SHAIK, Nishan, Harry P. ERBA, Sudhir UNNI, Svenja PETERSOHN, Elizabeth WESTERBERG, Boris GORSH, Akash NAHAR, Kristy BURNS a Sonja KROEP, 2024. Anchored Matching Adjusted Indirect Treatment Comparison of Quizartinib Vs Midostaurin in Newly Diagnosed Patients with FLT3-ITD-Positive Acute Myeloid Leukaemia. *Blood* [online]. **144**(Supplement 1), 1509. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2024-209799

SCHLENK, Richard F., Konstanze DÖHNER, Jürgen KRAUTER, Stefan FRÖHLING, Andrea CORBACIOGLU, Lars BULLINGER, Marianne HADBANK, Daniela SPÄTH, Michael MORGAN, Axel BENNER, Brigitte SCHLEGELBERGER, Gerhard HEIL, Arnold GANSER a Hartmut DÖHNER, 2008. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* [online]. **358**(18), 1909–1918. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa074306

SCHNITTGER, Susanne, Ulrike BACHER, Claudia HAFERLACH, Tamara ALPERMANN, Wolfgang KERN a Torsten HAFERLACH, 2012. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (Exons 13–15) in the *FLT3* gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes, Chromosomes and Cancer* [online]. **51**(10), 910–924. ISSN 1045-2257, 1098-2264. Dostupné z: doi:10.1002/gcc.21975

SMITH, C C, K LIN, A STECULA, A SALI a N P SHAH, 2015. FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors. *Leukemia* [online]. **29**(12), 2390–2392. ISSN 0887-6924, 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2015.165

SMITH, Catherine C., 2019. The growing landscape of FLT3 inhibition in AML. *Hematology* [online]. **2019**(1), 539–547. ISSN 1520-4391. Dostupné z: doi:10.1182/hematology.2019000058

SMITH, Catherine C., Amy PAGUIRIGAN, Grace R. JESCHKE, Kimberly C. LIN, Evan MASSI, Theodore TARVER, Chen-Shan CHIN, Saurabh ASTHANA, Adam OLSHEN, Kevin J. TRAVERS, Susana WANG, Mark J. LEVIS, Alexander E. PERL, Jerald P. RADICH a Neil P. SHAH, 2017. Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis. *Blood* [online]. **130**(1), 48–58. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-04-711820

SMITH, Catherine C., Qi WANG, Chen-Shan CHIN, Sara SALERNO, Lauren E. DAMON, Mark J. LEVIS, Alexander E. PERL, Kevin J. TRAVERS, Susana WANG, Jeremy P. HUNT, Patrick P. ZARRINKAR, Eric E. SCHADT, Andrew KASARSKIS, John KURIYAN a Neil P. SHAH, 2012. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature* [online]. **485**(7397), 260–263. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11016

STEELMAN, L S, R A FRANKLIN, S L ABRAMS, W CHAPPELL, C R KEMPF, J BÄSECKE, F STIVALA, M DONIA, P FAGONE, F NICOLETTI, M LIBRA, P RUVOLO, V RUVOLO, C EVANGELISTI, A M MARTELLI a J A MCCUBREY, 2011. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* [online]. **25**(7), 1080–1094. ISSN 0887-6924, 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2011.66

STIEHL, Thomas, Natalia BARAN, Anthony D. HO a Anna MARCINIAK-CZOCHRA, 2014. Clonal selection and therapy resistance in acute leukemias: Mathematical modelling explains different proliferation patterns at diagnosis and relapse. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. **11**(94), 20140079. ISSN 1742-5689, 1742-5662. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2014.0079

STOCKERT, Juan C., Alfonso BLÁZQUEZ-CASTRO, Magdalena CAÑETE, Richard W. HOROBIN a Ángeles VILLANUEVA, 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* [online]. **114**(8), 785–796. ISSN 0065-1281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006

STUBBINS, Ryan J., Annabel FRANCIS, Florian KUCHENBAUER a David SANFORD, 2022. Management of Acute Myeloid Leukemia: A Review for General Practitioners in Oncology. *Current Oncology* [online]. **29**(9), 6245–6259. ISSN 1718-7729. Dostupné z: doi:10.3390/curroncol29090491

SWAMINATHAN, Mahesh, Mai M. ALY, Abdul Moiz KHAN, Bayan Al SHARE, Vikram DHILLON, Enxhi LALO, Harry RAMOS, Katherine G. AKERS, Seongho KIM a Suresh BALASUBRAMANIAN, 2023. Efficacy analysis of different FLT3 inhibitors in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *eJHaem* [online]. **4**(1), 165–173. ISSN 2688-6146, 2688-6146. Dostupné z: doi:10.1002/jha2.616

TEFFERI, Ayalew, Alessandro Maria VANNUCCHI a Tiziano BARBUI, 2024. Essential thrombocythemia: 2024 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology* [online]. **99**(4), 697–718. ISSN 0361-8609, 1096-8652. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.27216

TRAER, Elie, Jacqueline MARTINEZ, Nathalie JAVIDI-SHARIFI, Anupriya AGARWAL, Jennifer DUNLAP, Isabel ENGLISH, Tibor KOVACSOVICS, Jeffrey W. TYNER, Melissa WONG a Brian J. DRUKER, 2016. FGF2 from Marrow Microenvironment Promotes Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Research* [online]. **76**(22), 6471–6482. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3569

TSUCHIYA, Shigeru, Michiko YAMABE, Yoshiko YAMAGUCHI, Yasuko KOBAYASHI, Tasuke KONNO a Keiya TADA, 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* [online]. **26**(2), 171–176. ISSN 0020-7136, 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.2910260208

VAKITI, Anusha, Samuel B. REYNOLDS a Perna MEWAWALLA, 2024. Acute Myeloid Leukemia. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2025-01-30]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>

VAN MEERLOO, Johan, Gertjan J. L. KASPERS a Jacqueline CLOOS, 2011. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Ian A. CREE, ed. *Cancer Cell Culture* [online]. Totowa, NJ:

Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 237–245 [vid. 2025-02-24]. ISBN 978-1-61779-079-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20

VARDIMAN, James a Elizabeth HYJEK, 2011. World Health Organization Classification, Evaluation, and Genetics of the Myeloproliferative Neoplasm Variants. *Hematology* [online]. **2011**(1), 250–256. ISSN 1520-4391, 1520-4383. Dostupné z: doi:10.1182/asheducation-2011.1.250

VILLARINO, Alejandro V., Yuka KANNO a John J. O'SHEA, 2017. Mechanisms and consequences of Jak–STAT signaling in the immune system. *Nature Immunology* [online]. **18**(4), 374–384. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/ni.3691

VIRCHOW, Rudolf (Rudolf Ludwig Karl), UNIVERSITY OF GLASGOW. LIBRARY, a UNIVERSITY OF GLASGOW. LIBRARY, 1856. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin [electronic resource]* [online]. B.m.: Frankfurt A. M. : Meidinger Sohn & Comp. [vid. 2024-12-29]. Dostupné z: <http://archive.org/details/b21462161>

VO, Kevin, 2013. Spectrophotometry. *Chemistry LibreTexts* [online] [vid. 2024-09-08]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry)

VOSO, Maria Teresa, Richard A. LARSON, Dan JONES, Guido MARCUCCI, Thomas PRIOR, Jürgen KRAUTER, Michael HEUSER, Serena LAVORGNA, Josep NOMDEDEU, Susan M. GEYER, Alison WALKER, Andrew H. WEI, Jorge SIERRA, Miguel A. SANZ, Joseph M. BRANDWEIN, Theo M. DE WITTE, Joop H. JANSEN, Dietger NIEDERWIESER, Frederick R. APPELBAUM, Bruno C. MEDEIROS, Martin S. TALLMAN, Richard F. SCHLENK, Arnold GANSER, Sergio AMADORI, Yuan CHENG, YinMiao CHEN, Celine PALLAUD, Ling DU, Alfonso PICIOCCI, Gerhard EHNINGER, John BYRD, Christian THIEDE, Konstanze DÖHNER, Richard M. STONE, Hartmut DÖHNER, Clara D. BLOOMFIELD a Francesco LO-COCO, 2020. Midostaurin in patients with acute myeloid leukemia and FLT3-TKD mutations: a subanalysis from the RATIFY trial. *Blood Advances* [online]. **4**(19), 4945–4954. ISSN 2473-9529. Dostupné z: doi:10.1182/bloodadvances.2020002904

WANG, Michael L. a Nathanael G. BAILEY, 2015. Acute Myeloid Leukemia Genetics: Risk Stratification and Implications for Therapy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [online]. **139**(10), 1215–1223. ISSN 1543-2165, 0003-9985. Dostupné z: doi:10.5858/arpa.2015-0203-RA

WEIS, Taylor M., Bernard L. MARINI, Dale L. BIXBY a Anthony J. PERISSINOTTI, 2019. Clinical considerations for the use of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. **141**, 125–138. ISSN 1040-8428. Dostupné z: doi:10.1016/j.critrevonc.2019.06.011

WEISBERG, Ellen, Chengcheng MENG, Abigail CASE, Martin SATTLER, Hong L. TIV, Prafulla C. GOKHALE, Sara BUHRLAGE, Xiaoxi LIU, Jing YANG, Jinhua WANG, Nathanael GRAY, Richard STONE, Sophia ADAMIA, Patrice DUBREUIL, Sebastien LETARD a James D. GRIFFIN, 2019. Comparison of effects of midostaurin, crenolanib,

quizartinib, gilteritinib, sorafenib and BLU-285 on oncogenic mutants of KIT and FLT3 in hematologic malignancies. *British journal of haematology* [online]. **187**(4), 488–501. ISSN 0007-1048. Dostupné z: doi:10.1111/bjh.16092

WU, Catherine J., Melinda BIERNACKI, Jeffery L. KUTOK, Shelby ROGERS, Linyun CHEN, Xiao-Feng YANG, Robert J. SOIFFER a Jerome RITZ, 2005. Graft-versus-Leukemia Target Antigens in Chronic Myelogenous Leukemia Are Expressed on Myeloid Progenitor Cells. *Clinical Cancer Research* [online]. **11**(12), 4504–4511. ISSN 1078-0432, 1557-3265. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0036

XIAO, Xinhua, Peihong WANG, Weina ZHANG, Jiayi WANG, Mansi CAI, Hua JIANG, Yingli WU a Huizhuang SHAN, 2023. GNF-7, a novel FLT3 inhibitor, overcomes drug resistance for the treatment of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Cancer Cell International* [online]. **23**(1), 302. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-023-03142-y

YANG, Jingmei a Ran FRIEDMAN, 2023. Combination strategies to overcome drug resistance in FLT+ acute myeloid leukaemia. *Cancer Cell International* [online]. **23**(1), 161. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-023-03000-x

YANG, Jingmei, H. Jonathan G. LINDSTRÖM a Ran FRIEDMAN, 2021. Combating drug resistance in acute myeloid leukaemia by drug rotations: the effects of quizartinib and pexidartinib. *Cancer Cell International* [online]. **21**(1), 198. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-021-01856-5

YU, Jifeng, Yingmei LI, Danfeng ZHANG, Dingming WAN a Zhongxing JIANG, 2020. Clinical implications of recurrent gene mutations in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology & Oncology* [online]. **9**(1), 4. ISSN 2162-3619. Dostupné z: doi:10.1186/s40164-020-00161-7

YU, Zhou, Jiaying DU, Hui HUI, Shaoxin KAN, Tongxin HUO, Kai ZHAO, Tao WU, Qinglong GUO a Na LU, 2021. LT-171-861, a novel FLT3 inhibitor, shows excellent preclinical efficacy for the treatment of FLT3 mutant acute myeloid leukemia. *Theranostics* [online]. **11**(1), 93–106. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.46593

ZHANG, Haijiao, Samantha SAVAGE, Anna Reister SCHULTZ, Daniel BOTTOMLY, Libbey WHITE, Erik SEGERDELL, Beth WILMOT, Shannon K. MCWEENEY, Christopher A. EIDE, Tamilla NECHIPORUK, Amy CARLOS, Rachel HENSON, Chenwei LIN, Robert SEARLES, Hoang HO, Yee Ling LAM, Richard SWEAT, Courtney FOLLIT, Vinay JAIN, Evan LIND, Gautam BORTHAKUR, Guillermo GARCIA-MANERO, Farhad RAVANDI, Hagop M. KANTARJIAN, Jorge CORTES, Robert COLLINS, Daelynn R. BUELOW, Sharyn D. BAKER, Brian J. DRUKER a Jeffrey W. TYNER, 2019a. Clinical resistance to crenolanib in acute myeloid leukemia due to diverse molecular mechanisms. *Nature Communications* [online]. **10**(1), 244. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-08263-x

ZHANG, Jing, Yan GU a Baoan CHEN, 2019b. Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *OncoTargets and Therapy* [online]. **12**, 1937–1945. Dostupné z: doi:10.2147/OTT.S191621

ZHANG, Lingtian, Naga Rajiv LAKKANIGA, Jaideep B. BHARATE, Nicholas MCCONNELL, Xiuqi WANG, Anupreet KHARBANDA, Yuet-Kin LEUNG, Brendan FRETTE, Neil P. SHAH a Hong-yu LI, 2021. Discovery of imidazo[1,2-a]pyridine-thiophene

derivatives as FLT3 and FLT3 mutants inhibitors for acute myeloid leukemia through structure-based optimization of an NEK2 inhibitor. *European journal of medicinal chemistry* [online]. **225**, 113776. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2021.113776

ZHANG, Weiguo, Marina KONOPLEVA, Yue Xi SHI, Teresa MCQUEEN, David HARRIS, Xiaoyang LING, Zeev ESTROV, Alfonso QUINTÁS-CARDAMA, Donald SMALL, Jorge CORTES a Michael ANDREEFF, 2008a. Mutant FLT3: A direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *Journal of the National Cancer Institute* [online]. **100**(3), 184–198. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/djm328

ZHANG, Weiguo, Marina KONOPLEVA, Yue-xi SHI, Teresa MCQUEEN, David HARRIS, Xiaoyang LING, Zeev ESTROV, Alfonso QUINTÁS-CARDAMA, Donald SMALL, Jorge CORTES a Michael ANDREEFF, 2008b. Mutant FLT3: A Direct Target of Sorafenib in Acute Myelogenous Leukemia. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. **100**(3), 184–198. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/djm328

ZHAO, Jennifer, Sonal AGARWAL, Hiba AHMAD, Kejal AMIN, Jan Philipp BEWERSDORF a Amer ZEIDAN, 2022. A Review of FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Blood reviews* [online]. **52**, 100905. ISSN 0268-960X. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2021.100905

ZHI, Yanle, Zhijie WANG, Chao YAO, Baoquan LI, Hao HENG, Jiongheng CAI, Li XIANG, Yue WANG, Tao LU a Shuai LU, 2019. Design and Synthesis of 4-(Heterocyclic Substituted Amino)-1H-Pyrazole-3-Carboxamide Derivatives and Their Potent Activity against Acute Myeloid Leukemia (AML). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(22), 5739. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20225739

ZHOU, Yeming, Guiqin HUANG, Xiaoya CAI, Ying LIU, Bingxin QIAN a Dengju LI, 2024. Global, regional, and national burden of acute myeloid leukemia, 1990–2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021. *Biomarker Research* [online]. **12**(1), 101. ISSN 2050-7771. Dostupné z: doi:10.1186/s40364-024-00649-y

10 Seznam použitých internetových zdrojů

(URL 1) **Canva.** [online]; [cit. 21.3.2025]

Dostupné z https://www.canva.com/cs_cz/

11 Seznam obrázků

Obrázek 1: Porovnání standartních buněk a buněk akutní myeloidní leukémie získané imunohistochemickým barvením kostní dřeně	
<i>Převzato od (Wu et al., 2005).</i>	13
Obrázek 2: Vývoj incidence AML na 100 000 obyvatel v závislosti na věku (mladší vs. starší než 60 let)	
<i>Vytvořeno autorkou podle (Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts, b.r.; Anderson et al., 2021).</i>	15
Obrázek 3: Hematopoéza (zjednodušeně)	
<i>Vytvořeno autorkou podle (Mokobi, 2022) a (URL 1).</i>	16
Obrázek 4: Schéma metabolismu mikroprostředí kostní dřeně při AML	
<i>Vytvořeno autorkou podle (Maynard et al., 2022) a (URL 1).</i>	16
Obrázek 5: Struktura a aktivace receptoru FLT3, včetně signálních drah spojených s jeho činností a vlivu mutací (ITD, TKD) a inhibitorů FLT3 na buněčné procesy	
<i>Upraveno podle (Weis et al., 2019) a (URL 1).</i>	18
Obrázek 6: Porovnání možných poruch krvetvorby při AML s přirozeným krevním obrazem	
<i>Vytvořeno autorkou podle (Pancytopenia, b.r.) a (URL 1).</i>	20
Obrázek 7: Klasifikace AML dle ICC	
<i>Upraveno podle (C.-C. Chang & Kuzu, 2023) a (URL 1).</i>	23
Obrázek 8: Klasifikace AML dle WHO	
<i>Upraveno podle (C.-C. Chang & Kuzu, 2023) a (URL 1).</i>	23
Obrázek 9: Celkové přežití pacientů s AML v % v závislosti na čase od postižení diagnózou	
<i>Upraveno podle (Aparicio-Pérez et al., 2023) a (URL 1).</i>	24
Obrázek 10: Mechanismus aktivace FLT3 receptoru, jeho patologické mutace a principy účinku různých inhibitorů	
<i>Upraveno podle (Daver et al., 2019) a (URL 1).</i>	28
Obrázek 11: Souhrn strukturních vzorců klinicky využívaných FLT3 inhibitorů	
<i>Upraveno podle (Zhi et al., 2019) a (URL 1).</i>	29
Obrázek 12: Složení kostní dřeně z hlediska buněk	
<i>Vytvořeno autorkou podle (Bone Marrow Bartleby, b.r.) a (URL 1).</i>	30
Obrázek 13: Schematické mechanismy primární (on-target) a sekundární (off-target) rezistence vůči inhibitorům FLT3	
<i>Upraveno podle (Ruglioni et al., 2024) a (URL 1).</i>	32
Obrázek 14: Růstová křivka buněčné kultury	
<i>Vytvořeno autorkou podle (Kočárek et al., 2010) a (URL 1).</i>	37
Obrázek 15: Buněčná linie MV4-11	
<i>Převzato z (MV4-11 Cells, b.r.).</i>	38
Obrázek 16: Buněčná linie MOLM-13	
<i>Převzato z (MOLM-13, b.r.).</i>	39
Obrázek 17: Buněčná linie THP-1	
<i>Převzato z (Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line THP-1, b.r.).</i>	39

Obrázek 18: Chemicky znázorněný průběh redukce MTT na formazan prostřednictvím kenzymu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NAD(P)H) a dehydrogenázy obsažených v metabolicky aktivních buňkách	
<i>Převzato od (Kamiloglu et al., 2020).</i>	41
Obrázek 19: Základní struktura spektrofotometru složeného ze spektrometru a fotometru	
<i>Vytvořeno autorkou podle (Vo, 2013) a (URL 1).</i>	41
Obrázek 20: Ukázka destičky připravené ke změření absorbance	
<i>Vytvořeno autorkou.</i>	46
Obrázek 21: Vzorec pro výpočet specifity léčiva k buňkám s heterozygotní (A) i homozygotní (B) FLT3 mutací	
<i>Vytvořeno autorkou podle (URL 1).</i>	47
Obrázek 22: Vzorec pro výpočet rezistenčního faktoru (RF)	
<i>Vytvořeno autorkou podle (URL 1).</i>	47
Obrázek 23: Závislost růstu buněčné linie MV4-11 na koncentraci čtyř testovaných látek (PSU28, PSU32, midostaurin, quizartinib), přičemž růst je vyjádřen relativně vůči kontrolní skupině (100% růstu)	
<i>Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.</i>	50
Obrázek 24: Závislost růstu buněčné linie MOLM-13 na koncentraci čtyř testovaných látek (PSU28, PSU32, midostaurin, quizartinib), přičemž růst je vyjádřen relativně vůči kontrolní skupině (100% růstu)	
<i>Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.</i>	50
Obrázek 25: Závislost růstu buněčné linie THP-1 na koncentraci čtyř testovaných látek (PSU28, PSU32, midostaurin, quizartinib), přičemž růst je vyjádřen relativně vůči kontrolní skupině (100% růstu)	
<i>Vytvořeno autorkou v GraphPad Prism 10.</i>	51

12 Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení rizikových kategorií AML dle ELN 2022	
<i>Upraveno podle (Stubbins et al., 2022)</i>	25
Tabulka 2: Shrnutí testovaných inhibitorů na jednotlivých liniích v experimentech	43
Tabulka 3: Demonstrativní schéma 96 jamkové destičky.	44
Tabulka 4: Souhrn výsledných koncentrací použitých inhibitorů, které byly testovány na jednotlivých buněčných liniích při experimentech.	45
Tabulka 5: Srovnání naměřených výsledků hodnot 50% inhibičních koncentrací v rámci testovaných látek PSU28 a PSU32 a jejich specifit k heterozygotní i homozygotní mutaci FLT3	48
Tabulka 6: Srovnání naměřených výsledků hodnot 50% inhibičních koncentrací v rámci testovaných látek PSU28, midostaurin a quizartinib a jejich specifit k homozygotní i heterozygotní mutaci FLT3	49
Tabulka 7: Srovnání výsledků hodnot 50% inhibičních koncentrací v rámci testovaných látek PSU28, LG-2189, midostaurin a quizartinib pouze na buněčných liniích nesoucích homozygotní mutaci FLT3-ITD a současně jejich výsledných rezistenčních faktorů	52