

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**MECHANISMY NAVOZENÉ REZISTENCE NÁDOROVÝCH BUNĚK
VŮČI POUŽÍVANÝM CYTOSTATIKŮM**

Bakalářská práce

studijního oboru Zdravotnická bioanalýtika

(kombinovaná forma studia)

Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Martina Gavelová, Ph.D.

P r o h l á š e n í

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne

Kristýna Kmentová (Vášová)

P o d ě k o v á n í

Děkuji mé školitelce Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. a školitelce specialiste Mgr. Martině Gavelové, Ph.D. za odborné vedení při vypracování mé bakalářské práce a za trpělivost při korekturách.

Také velmi děkuji své sestře Veronice Vášové za její ochotu při poskytování cenných rad.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta : Kmentová (Vášová) Kristýna

Titul, jméno, příjmení školitele : Doc. Ing. Barbora Szotáková, PhD.

Titul, jméno, příjmení školitele specialisty : Mgr. Martina Gavelová, PhD.

Název bakalářské práce : Mechanismy navozené rezistence nádorových buněk vůči používaným cytostatikům

Vznik rezistence u nádorových buněk významně ovlivňuje účinnost chemoterapeutické léčby rakoviny. Předkládaná bakalářská práce se zabývá jednotlivými typy lékových rezistencí s důrazem na mnohočetnou lékovou rezistenci. Detailně jsou popsány mechanismy vzniku rezistence v souvislosti se zvýšenou expresí specifických proteinů (Pgp, MRP, LRP) a se změnami v procesech apoptózy či reparačních mechanismech DNA. Práce rovněž charakterizuje a klasifikuje běžně používaná cytostatika, seznamuje s jejich mechanismy účinků a toxickým působením na organismus během aplikace. V neposlední řadě je zde uveden přehled a charakteristika *in vitro* metod používaných pro výběr chemoterapeutik s předpokládaným terapeutickým efektem *in vivo*. Výzkum *in vitro* lékové rezistence může vést k efektivnější chemoterapeutické léčbě konkrétního nádorového onemocnění.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Science

Title, Name, Surname of candidate : Kmentová (Vášová) Kristýna

Title, Name, Surname of tutor : Doc. Ing. Barbora Szotáková, PhD.

Title, Name, Surname of tutor – specialist : Mgr. Martina Gavelová, PhD.

Title of Bachelor thesis : Drug resistance mechanisms of tumor cells towards cytostatics used

The effectivity of cytostatic treatment of malignant tumors is significantly influenced by the development of drug resistance. In this bachelor thesis, the several types of drug resistance, especially multi-drug resistance are presented. Further, the mechanisms of resistance in connection with the increased expression of specific proteins (Pgp, MRP, LRP) and the changes in apoptotic processes or DNA repair mechanisms are mentioned in detail. The thesis also deals with the characteristics and the classification of commonly used cytostatics, their mode of action as well as toxic effect on the organism during cytostatics administration. There is an overview of the in vitro methods used for the selection of substances to the proposed therapeutic effect in vivo not least. The research of in vitro drug resistance could lead to the more effective treatment of specific malignant tumors by cytostatics.

OBSAH

1. Úvod	8
2. Charakteristika a klasifikace cytostatik (základní farmakologie)	10
2.1 Hlavní skupiny cytostatik	10
2.1.1 Alkylující látky	10
2.1.2 Antimetabolity	11
2.1.3 Rostlinné alkaloidy	13
2.1.4 Antibiotika	13
2.1.5 Hormonální látky	14
2.1.6 Ostatní látky	14
3. Primární, získané, zkřížené a mnohočetné lékové rezistence	15
3.1 Vznik rezistence	15
3.2 Mnohočetná léková rezistence	16
4. Mechanismy rezistence nádorových buněk	17
4.1 P–glykoprotein (Pgp)	17
4.2 Multidrug resistance protein (MRP)	19
4.3 Lung resistance–related protein (LRP)	20
4.4 Glutathion–S–transferasy a glutathion	21
4.5 Další proteiny odpovědné za specifickou rezistenci	22
4.6 Rezistence při změnách v procesech apoptózy	23
4.7 Rezistence při zvýšené činnosti reparačních mechanismů DNA	23
5. Testování chemosensitivity / chemorezistence nádorů <i>in vitro</i>	25
5.1 Klonovací metoda	25
5.2 Neklonovací metody	25
5.2.1 Testy membránové integrity	26
5.2.2 MTT test	26
5.2.3 ATP test	27
5.3 Histokultury	27
5.4 Obecné nevýhody <i>in vitro</i> testů	27
6. Závěr	29

7. Seznam použitých zkratek a symbolů	30
8. Seznam použité literatury	31

1 ÚVOD

V posledních desetiletích se stále více hovoří o nádorových onemocněních, která představují závažný problém celé společnosti. Účinná prevence vzniku nádorových onemocnění je v současné době značně nedokonalá a včasná diagnostika je stále spíše výjimkou. A proto léčba zhoubných nádorů nabývá zatím většího významu. Ačkoliv dnes již dovedeme některá nádorová onemocnění s větším či menším úspěchem léčit, nelze považovat výsledky léčby za uspokojivé. Pravděpodobnou příčinou takovýchto výsledků je povaha nádorového onemocnění. Rozmanité formy nádorového onemocnění jsou dány jak rozdílnými etiologickými faktory, tak značně různorodou patogenezí. Z toho tedy vyplývá, že léčba tohoto typu onemocnění je obtížná.

V současné době lze možnosti léčby rozdělit na: léčbu chirurgickou, léčbu zářením a medikamentózní léčbu cytostatiky nebo chemoterapií. Ve většině případů nestačí k úspěšnému léčení pouze jedna z uvedených metod. Nejmladší metodou je protinádorová chemoterapie [1].

První testování farmak s antitumorózním účinkem bylo zahájeno po druhé světové válce, kdy byly podávány látky s alkylujícími vlastnostmi (deriváty dusíkatého yperitu). Prvním úspěchem tohoto experimentu bylo navození remise u pacientů s lymfosarkomem rezistentním na radioterapii. Od té doby se podařilo identifikovat kolem 50 farmak různých farmakologických skupin. Díky kombinované chemoterapii bylo dosaženo dlouhodobé kompletní remise u akutní leukémie, maligních lymfomů a metastazujícího testikulárního karcinomu.

Nyní již můžeme ovlivnit řadu maligních onemocnění v pokročilém stavu, avšak léčba mnohých nádorů zahrnuje pouze paliativní přístup. Faktory, které k tomuto problému přispívají, snižují odpověď na farmakoterapii a zhoršují prognózu. Je to například poškození funkce eliminujícího orgánu (toxicita farmaky), vyšší věk pacienta a nebo okolnosti, které vedou k sekundární rezistenci.

V současnosti se terapie provádí s použitím léčebných protokolů, které předem stanoví výběr léčiva a jejich dávky. Výhodou je, že lze objektivně hodnotit jak antitumorózní, tak toxický účinek použitého farmaka. Cílem je tedy zajistit optimální farmakoterapeutický účinek (dlouhodobou kompletní remisi) při minimální toxicitě aplikovaného farmaka a za současné prevence vývoje rezistence [2]. Tzn. co nejlépe a nejšetrněji vyléčit pacienta či prodloužit a zkvalitnit jeho život.

Buňky maligních nádorů jsou charakterizovány základními vlastnostmi:

1) Sníženou, ale častěji nekontrolovatelnou proliferací a následnou diferenciací takto pozměněné buňky.

2) Tvorbou metastáz do dalších tkání a orgánů v těle.

K výše uvedeným skutečnostem dochází v případech, kdy se nádorové buňky neřídí regulačními signály buněčného dělení. Je to výsledkem mutací, které osvobodí buňky od regulace buněčného dělení a přežití. Buňka proliferuje a dceřinné buňky mutace zdědí – diferencuje se mutantní klon s chromozomovými abnormalitami. Nekontrolovatelné dělení může být podmíněno různými látkami, jakými jsou např. *radiační energie* (UV záření – poškozuje molekulu DNA), *chemické sloučeniny* (polycyklické aromatické uhlovodíky – *benzpyren*, aromatické aminy – *2-acetaminofluoren*, nitrosaminy – *dimethylnitrosamin*, různé léky – *cyklofosfamid*, přirozeně se vyskytující látky – *aflatoxin B*, anorganické sloučeniny – *arsen*, *azbest*, *beryllium*, *kadmium*, *chrom*) a *některé DNA/RNA viry* (papillomavirus, EB virus, virus hepatitidy B, retroviry) a mnoho dalších [3].

2 CHARAKTERISTIKA A KLASIFIKACE CYTOSTATIK (ZÁKLADNÍ FARMAKOLOGIE)

Cytostatika lze charakterizovat jejich *afinitou*, *vnitřní aktivitou* a *standardní dávkou*.

Afinita je definována jako molární koncentrace potřebná k usmrcení 50 % buněk určité řady (IC_{50}). Čím nižší je hodnota IC_{50} , tím vyšší je afinita k danému cytostatiku.

Standardní dávka představuje množství, které zaručuje přijatelnou vratnou toxicitu vůči zdravým buňkám.

Vnitřní aktivita je charakterizována jako antitumorózní účinek standardní dávky [2].

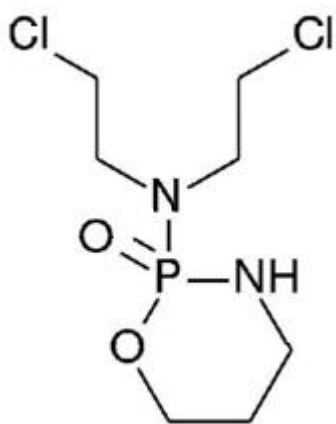
Účinek cytostatik závisí na tom, jakým způsobem ovlivňuje buněčný cyklus. Většinou působí na buňky v proliferativní fázi. Mají buď účinek *fázově nespecifický*, který postihuje celý buněčný cyklus a zabíjí buňky exponenciálně se zvyšující se dávkou. Tato farmaka lze použít u solidních tumorů s nízkou růstovou aktivitou i u rychle proliferujících nádorů. Příkladem mohou být alkylující farmaka či antibiotika. *Fázově specifický* účinek je zaměřený pouze na určitou část cyklu a ve vyšších dávkách dosahuje maximální účinnosti na hematologické malignity. Jako příklad mohou sloužit antimetabolity, antibiotikum bleomycin či rostlinné alkaloidy.

2.1 Hlavní skupiny cytostatik

2.1.1 Alkylující látky

Alkylující látky jsou odvozeny od dusíkatého yperitu a obsahují převážně bis[chlorethyl]amin, ethylenimin nebo nitrosomočovinu. Účastní se přenosu alkylových skupin – nejzásadnější je alkylace jaderné DNA, to má za následek smrt buňky. Působí nejsilněji v pozdní fázi G_1 . Mezi toxické účinky těchto látek řadíme místní poškození tkání (puchýře), přechodný útlum krvetvorby (leukopenie, trombocytopenie, nauzea, zvracení, alopecie a neplodnost).

Do skupiny alkylujících látek patří: *mechloretamin* (nestálý v roztoku, opatrná aplikace i. v., použití v kombinaci k léčbě Hodgkinovy choroby), *chlorambucil*, *mefalan* (vstřebávají se z trávicího traktu a metabolizace probíhá v přítomnosti CYP 450, používají se k léčbě CML, nehodgkinského lymfomu, maligního melanomu, sarkomů, plazmocytomu a při karcinomu prsu a ovarií), *cyklofosfamid* (bioaktivace probíhá za přítomnosti CYP 450, součástí kombinované léčby lymfomů, leukemií a myelomů, zároveň používán i jako imunosupresivum), *karmustin*, *lomustin* (bioaktivovány neenzymatickou cestou, mohou pronikat do CNS, použití k léčbě tumorů mozku, relapsů lymfomů a Hodgkinovy choroby).



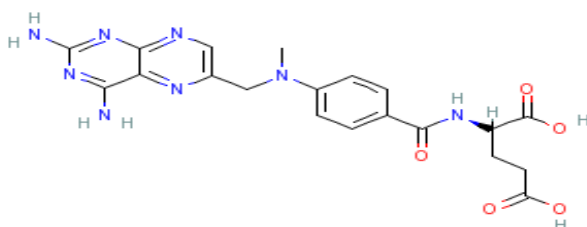
Obr. 1 Cyklofosfamid

2.1.2 Antimetabolity

Antimetabolity jsou odvozeny od endogenních látek nezbytných pro syntézu DNA a RNA. Změnou molekuly dochází ke ztrátě účinku při zachování afinity k cílovým strukturám – uplatňují se jako antagonisté na intracelulární úrovni.

Dělíme je na:

- 1) Antagonisté kyseliny listové – *metotrexát* – má imunosupresivní a protizánětlivé účinky, jako derivát kyseliny listové a endogenních tetrahydrofolátů má schopnost inhibice dějů, pro které jsou nezbytné. Ve srovnání s ostatními je málo toxický. Nízké dávky se používají k léčbě revmatoidní polyartritidy, Crohnovy nemoci a při udržovací fázi dětské ALL. Střední a vysoké dávky se používají při léčbě invazivní fáze dětské ALL, nehodgkinského lymfomu a osteosarkomu [2]. Mezi toxické účinky metotrexátu se řadí nefrotoxicita, poškození plicní tkáně a degenerativní vliv na zárodečnou tkáň.



Obr. 2 Metotrexát

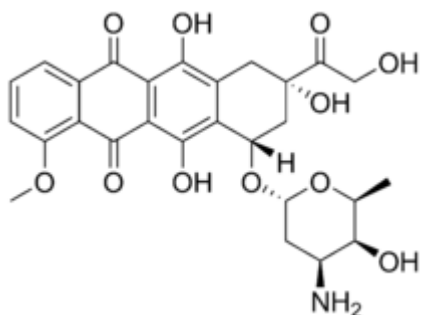
- 2) Antagonisté purinů – *6-merkaptopurin* – inhibuje tvorbu DNA a RNA. Toxicita postihuje především kostní dřeň (neutropenie a trombocytopenie). Použití při léčbě ALL.
- 3) Antagonisté pyrimidinů – *cytosin-arabinosid* je konvertován na cytosin-arabinosid trifosfát – kompetitivně inhibuje DNA polymerasu. Působí především v S-fázi buněčného cyklu. Použití při léčbě akutní lymfoblastické leukémie. Toxické účinky se projevují útlumem krvetvorby, alopecií a stomatitidou.

2.1.3 Rostlinné alkaloidy

Rostlinné alkaloidy byly izolovány z barvínku (*Vinca rosea*). Navazují se na tubulin – bílkovinu, která tvoří dělicí vřeténko. Způsobují krystalizaci, a tím rozpuštění vřeténka a zastavení buněčného cyklu. Do této skupiny patří *vin kristin* (léčba karcinomu prsu, lymfomů), *vinblastin* (léčba testikulárního karcinomu, Hodgkinova choroba). K toxickým účinkům patří útlum krvetvorby, alopecie a zvracení. *Podofylotoxin* je extrahovaný z kořene mandragory. Nyní se používají polysyntetické deriváty *etoposid* (léčba plicního karcinomu, testikulárního karcinomu a Hodgkinovy choroby) a *teniposid* (léčba malignit v dětském věku, ALL a mozkových tumorů).

2.1.4 Antibiotika

Antibiotika se interkalují mezi báze deoxyribonukleové kyseliny a blokují tak syntézu RNA, resp. DNA. Mohou také štěpit vlákna DNA a interferovat s dělením buněk. Antibiotika jsou převážně produkty houby rodu *Streptomyces*. Patří sem – antracykliny – *doxorubicin*, *daunorubicin* (mají široké uplatnění v léčbě např. – karcinomy prsu, dělohy, endometria, štítné žlázy, plic, AL). Mezi toxické účinky patří útlum krvetvorby. A dále bleomyciny – *A2 a B2* (mají uplatnění u různých karcinomů). K toxickým účinkům patří anafylaktické reakce a horečky.



Obr. 3 Doxorubicin

2.1.5 Hormonální látky

Z hormonálních látek se používají steroidní hormony, které se vážou na receptorové proteiny v nádorových buňkách. Míra reakce závisí na počtu receptorů v organismu. Pro konkrétní hormony existují v buňkách specifické receptory. Používají se např. při stimulaci karcinomu prsu, endometria a prostaty. Tato skupina látek obsahuje – *antiestrogeny* (tamoxifen), *antagonisty androgenů* (flutamid), *antagonisty gonadoliberinů* (leuprolid acetát) a *inhibitory aromatázy* (anastrozol).

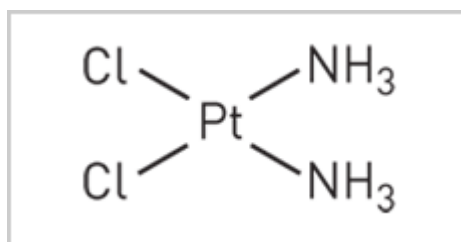
2.1.6 Ostatní látky

Mezi ostatní látky můžeme zařadit:

A) Sloučeniny platiny – *cisplatina* – předpokládá se stejný účinek jako u alkylačních látek, ničí buňky ve všech fázích buněčného cyklu. Používá se při léčbě karcinomů urogenitálního systému. K toxickým projevům patří hlavně zvracení. Mezi méně toxické patří *karboplatina* a *oxaliplatina*.

B) Inhibitory topoizomerázy I – tlumí syntézu DNA. Patří sem – *irinotekan* (léčba kolorektálního karcinomu a karcinomu plic), *topotekan* – (léčba žaludečního a kolorektálního karcinomu, nádorů hlavy a krku, karcinomu plic a karcinomu ovaria rezistentního na cisplatinu).

C) Interferon alfa je účinný při léčbě hematologických malignit – ALL, HCL, CML a Kaposiho sarkomu u nemocných s AIDS [2].



Obr. 4 Cisplatin

3 PRIMÁRNÍ, ZÍSKANÉ, ZKŘÍŽENÉ A MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE

K nezávažnějším komplikacím nádorové léčby patří vznik *rezistence* na použitý lék. Jedná se o selhání nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Tyto nádorové buňky mohou být rezistentní už na začátku první léčby, tomuto případu se říká *přirozená (primární) rezistence*.

V průběhu cytostatické léčby (například během několika měsíců) se mohou původně citlivé buňky k určitému léčivu stávat rezistentní a léčba je tím neúčinná. Tento jev se označuje jako *získaná (sekundární) rezistence*.

Může se stát, že daný lék nebyl nikdy účinný pro cílové nádorové buňky, pak se jedná o *vnitřní rezistenci* (buňky mohou postrádat cílové místo pro účinek léku). Někdy může dojít ke ztrátě citlivosti buněk k určitému cytostatiku, ale k jiným druhům cytostatik zůstane zachována. Ale pokud dojde k rezistenci na látky strukturálně příbuzné, jedná se o *zkříženou rezistenci*. Avšak je-li zkřížená rezistence komplexnější povahy, kdy léky se liší nejen strukturálně, ale například i mechanismem účinku, jde o tzv. *mnohočetnou lékovou rezistenci (multidrug resistance, MDR)*. Je to častá příčina selhání nádorové chemoterapie. Například při vzniku rezistence na methotrexát může vzniknout rezistence na protinádorová antibiotika (doxorubicin) nebo k rostlinným látkám (vinkristin) [3,4].

3.1 Vznik rezistence

Rezistence může vzniknout z několika příčin:

1) Prvními jsou změny ve farmakokinetice: Dochází ke snížení resorpce cytostatika, urychlení biotransformace, zrychlení vylučování či inaktivaci.

2) Druhou příčinou jsou změny cytotkinetiky: Nádorové buňky mohou přecházet do klidového stavu *G0*, kde je jejich citlivost k chemoterapii omezená. Vznikají spontánní mutace s přibývajícím narůstáním počtu nádorových buněk, zvyšuje se jejich heterogenita a vznikají klony s odlišnou citlivostí k farmaku. Tím jsou nově vytvořené buňky rezistentnější a léčba je zaměřena pouze na původní citlivé buňky.

3) Třetí příčinou jsou změny ve struktuře a funkcích buňky: Jedná se o nejčastější způsob vzniku rezistence, kdy dochází ke snížení nebo zvýšení exprese či aktivaci některých enzymů, porušení intracelulární distribuce farmaka, ovlivnění transmembránového přenosu či zvýšené opravy DNA.

3.2 Mnohočetná léková rezistence

Mnohočetnou lékovou rezistenci lze rozdělit do dvou skupin: Na *typickou (klasickou) MDR*, která je způsobená membránovým P-glykoproteinem (Pgp), což je produkt *mdr1* genu. Z léčebného hlediska je důležitou vlastností typické MDR možnost jejího obejití pomocí chemosenzitorů, což jsou látky obnovující vnímavost MDR buněk k chemoterapii [4].

Tab.1 Přehled některých chemosenzitorů [4].

Blokátory kalciového kanálu Verapamil, Nifedipin, Nikardapin, Niguldipin, Beprudil, PAK-200	Imunosupresivní látky Cyklosporin A, SDZ PSC 833, Rapamycin
Antagonisté kalmodulinu Trifluoperazin, Prochlorperazin, Fluphenazin	Antibiotika Cefoperazon, Erythromycin, Tetracyklin
Necytotoxické antracykliny Vinca alkaloidy, Vindolin	Různé hydrofobní a kationické sloučeniny Dipyridamol
Steroidy a hormonální antagonisté Progesteron, Tamoxifen	Quanidin Chloroquin, Terfenadin, Reserpin, Solutol HS 14

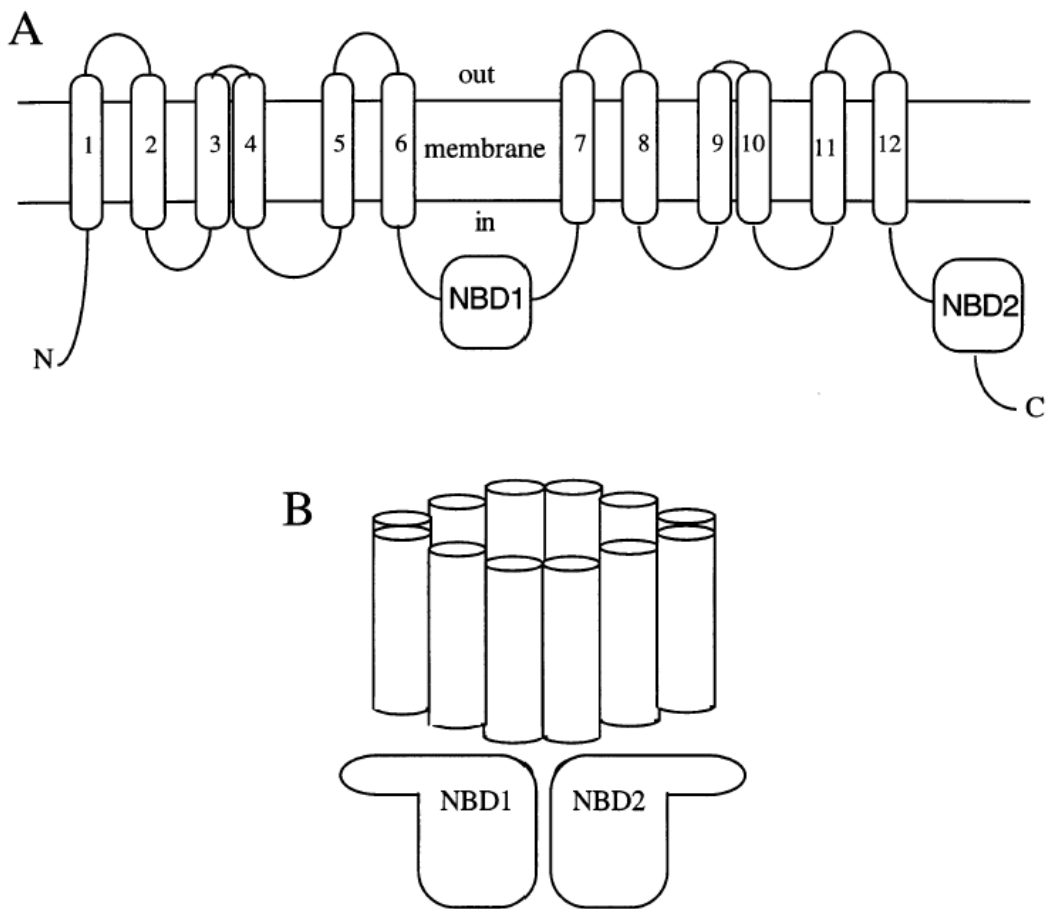
Atypickou MDR jsou souhrnně nazývány mechanismy MDR, kterých se neúčastní Pgp. Může být způsobena změnou subcelulární distribuce farmaka, změnou struktury léčiva nebo změnou oprav DNA. Odlišení od typické MDR je dáno tím, že zde není rezistence na *Vinca* alkaloidy. Z terapeutického hlediska se bohužel nepodařilo najít spolehlivé chemosenzitory [4].

4 MECHANISMY REZISTENCE NÁDOROVÝCH BUNĚK

4.1 *P-glykoprotein – Pgp*

P-glykoprotein je efluxní transmembránová pumpa, která má zásadní roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv. Strukturně se jedná o fosforylovaný glykoprotein o $M_r \sim 170$ kDa přítomný v plasmatické membráně. Má 1280 AMK zbytků, 12 transmembránových oblastí, 2 ATP-vázací místa. Zvýšené množství *in vivo* koreluje se špatnou prognosou. K jeho indukci může dojít například i tepelným šokem [3]. Pgp hraje významnou roli v ochraně organismu před vstupem xenobiotik do organismu a zároveň pomáhá při jejich eliminaci. Jeho umístění je v částech, kde dochází k absorpci a distribuci látek, jako jsou enterocyty, buňky hematoencefalitické a testikulární bariéry, apikální části epitelu buněk žlučových kanálků a renálního proximálního tubulu. Pgp se účastní procesu distribuce a transportu některých látek, jako jsou např. cholesterol nebo kortison. Rovněž se podílí na syntéze steroidních hormonů a napomáhá transportu některých cytokinů (IL-2, IL-4, INF- λ) z T-lymfocytů[5].

Nadměrná exprese genu, který tento protein kóduje, často vede ke vzniku rezistence na podávaná farmaka [3] a způsobuje fenotyp MDR. Pro Pgp je typické, že s ním reaguje velké množství látek, chemicky i funkčně často odlišných. Patří mezi ně především alkaloidy rodu *Vinca*, antracykliny, taxany a epipodofylotoxiny. MDR genotyp s expresí Pgp nacházíme u některých malignit (např. u AML nebo T-buněčného lymfomu se projevuje primárně). U ALL, nehodgkinova lymfomu a mnohočetného myelomu se MDR genotyp s expresí Pgp objevuje po indukci léčbou. Jeho funkci lze blokovat chemosenzitory, což může vést ke zvrácení fenotypu MDR[6].



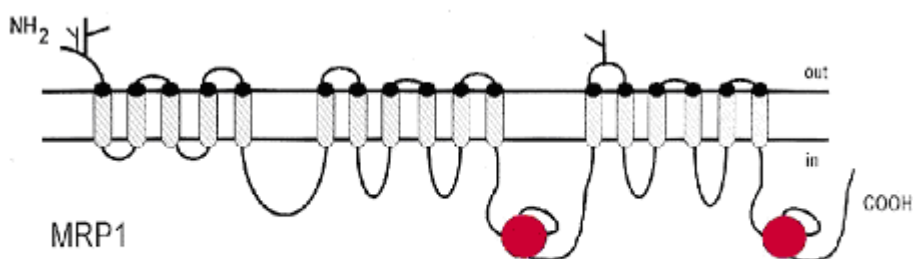
. Obr. 5 Struktura P-glykoproteinu [9].

Většina ABC transportérů obsahuje 4 domény: 2 hydrofobní membránové oblouky, které formují transmembránový kanál a 2 hydrofilní nukleotidicky vázané domény NBDs. Ty jsou umístěné na cytosolovém povrchu plasmatické membrány. V eukaryotech představují ABC transportéry jednoduchý polypeptid složený ze 2 homologních polovin, kde každá obsahuje jednu transmembránovou doménu a druhou nukleotidicky vázanou doménu NBD[9].

4.2 Multidrug resistance protein – MRP

MRP je membránový transportní protein, nacházející se na cytoplazmatické membráně a na membránách endoplazmatického retikula. Jeho hlavní funkcí v buňce je jednosměrný ATP-dependentní membránový přenos pro glutathion-S-konjugáty. Známo je 6 MRP, ale jen MRP1 má význam pro vznik lékové rezistence. Je to glykosylovaný protein s $M_r \sim 190$ kDa. Transportuje široké spektrum hydrofobních, záporně nabitých substrátů. Nejvyšší afinitu má k cysteinyl leukotrienu (LTC₄), což je konjugát glutathioninu. Z tohoto důvodu se můžeme domnívat, že inhibitory MRP by mohly hrát roli v regulaci zánětlivých procesů.

K inhibici rezistence podněcované MRP bylo použito stejných chemosenzitorů jako pro Pgp, ale s minimálním účinkem. Došlo se k návrhu, že sloučeniny ovlivňující množství glutathioninu v buňce, by mohly modulovat tzv. MRP asociovanou rezistenci. Výsledkem bylo zjištění, že při fyziologických koncentracích GSH se zvyšuje schopnost *vinca* alkaloidů inhibovat transport LTC₄ do buněk nadměrně exprimujících MRP. U MDR, které nadměrně expimovaly MRP, vedlo snížení GSH ke zvýšení vnímavosti na některá léčiva. MRP se přirozeně vyskytuje například v epiteliálních buňkách bronchů, plic, trávicím ústrojí, v močovém měchýři, ve varlatech, v srdečním svalu, ale i u mikrořágů. Hraje tedy důležitou úlohu v ochraně buňky před xenobiotiky. Mezi malignity, které ho exprimují patří AML, ALL, CLL, B- CLL, CML, nehodgkinský lymfom, neuroblastom, různé sarkomy měkkých tkání, Ca prsu, ovaria, ledvin, prostaty, varlat a u melanomů [4].



Obr. 6 Struktura MRP 1 [9].

4.3 Lung resistance-related protein – LRP

LRP je cytosolový protein patřící do skupiny lidských MVP (major vaults proteins) o molekulové hmotnosti 110 kDa. Vaults jsou dutá oválná ribonukleoproteinová tělíska, jejichž funkce není zcela známá. Nejčastěji se LRP a vaults vyskytují v epiteliálních buňkách a u mikrofágů. Je přirozeně exprimován tkáněmi, které jsou vystaveny toxickým vlivům (trávicí soustava, bronchy) a v metabolicky aktivních tkáních (kůra nadledvinek). Nádory vznikající z tkání, které přirozeně exprimují LRP jsou také pozitivní na LRP. Vyskytuje se například u AML, u karcinomu ovaria, karcinomu střeva, ledvin a pankreatu. Bylo zjištěno, že negativní exprese LRP není v nádorech uniformní, odráží vnímavost nádorových buněk na léčbu. Chemosenzitivní nádory (např. testikulární nádory, neuroblastomy a AML) téměř neexprimují LRP. LRP lze inhibovat obdobně jako MRP.

4.4 *Glutathion- S-transferasy a glutathion*

Tyto látky patří mezi izoenzymy, které mohou detoxifikovat cytostatika. Mohou tedy při metabolických změnách v některých maligních buňkách inaktivovat cytostatika. Bylo popsáno několik izoform, které jsou zodpovědné za konjugaci glutathionu (GSH) s velkým spektrem elektrofilních částic. Glutathion je klíčovým redukčním činidlem. Účastní se detoxifikace volných radikálů a syntézy leukotrienů. GSH je tripeptid obsahující g-amidovou vazbu, má ochrannou funkci a patří mezi nejvíce zastoupené trioly nebílkovinné povahy v buňce. Některé radikálové formy, jako hydroxylový radikál, mohou reagovat s GSH a další jsou pomocí GST s ním konjugovány. Výsledkem jsou sloučeniny, které jsou méně toxické a více hydrofilní, takže se snadněji vylučují z buňky. Volné radikálové formy vznikají při podávání alkylujících látek nebo při radioterapii.

U některých cytostatik z této skupiny bylo prokázáno, že jsou substráty pro GST (chlorambucil, cyklofosfamid, melfalan). Ne všechny formy GST se podílejí na vzniku rezistence, bylo prokázáno, že hlavním je GST-p (placentární typ). Regulace genů GST je multifaktoriální. Mezi hlavní faktory patří věk nemocného, pohlaví, typ postižené tkáně, přítomnost induktorů či metylace genů kódujících GST-asy. Schopnost ovlivňovat hladinu GSH nebo aktivitu GST-p v buňce má BSO. Ten v kombinaci s melfalenem snižuje koncentraci GSH. Množství GSH konjugátu a několik nemodifikovaných léčiv (vinblastin) vykazuje afinitu k MRP proteinu. Zvýšená hladina GSH nebo zvýšená aktivita GST-p má za následek konjugaci GSH s vybranými cytostatiky a tím se snižuje jejich biologická účinnost a dostupnost. Změny GST aktivity mohou být pro každou buňku specifické. Nadměrná exprese GST-p byla popsána u mnoha nádorových onemocnění (karcinom ovaria, prsu, CLL, kolorektální karcinom) a dále u buněk neuroblastomu po léčbě [4].

4.5 Další proteiny odpovědné za specifickou rezistenci

Kromě mnohočetné lékové rezistence existuje rezistence zkřížená (na skupinu strukturálně příbuzných farmak nebo na skupinu farmak se stejným mechanismem účinku) a také specifická rezistence k jednomu cytostatiku. Mezi hlavní enzymy této skupiny patří **topoizomerasa I a topoizomerasa II**.

Výše uvedené enzymy dočasně štěpí fosfodiesterovou vazbu DNA, způsobují zlomy v DNA vláknech a vedou k vytvoření dočasněho štěpného komplexu. K látkám, které postihují funkci topoizomeras, patří epipodofylotoxiny, akridiny, aktinomyciny, antracenediony, antracykliny, elipticiny, benzidochinolindiony a deriváty camptothecinu. Mechanismus těchto látek spočívá ve stabilizaci štěpného komplexu, a tím dochází k inhibici opětovného spojení DNA. Tyto látky interferují s buněčnými pochody (*replikace a transkripce*), což vede ke smrti buněk apoptózou.

Snížené množství topoizomeras nebo jejich mutace v primární struktuře neumožňuje interakci s inhibitory. Takže cytotoxicita většiny inhibitorů topoizomeras je přímo úměrná množství aktivních molekul enzymů. Snížení jejich počtu se projeví vznikem lékové rezistence. Často je rezistence, která je způsobena kvantitativními nebo kvalitativními změnami topoizomeras, nazývána atypickou MDR (at-MDR).

Dále do této skupiny můžeme zařadit následující mechanismy:

- 1) Rezistence na inhibitory dihydrofolátreduktasy (*DHFR*), (např. Metotrexát). Rezistence je způsobena poruchou transportních mechanismů pro foláty a antifolika.
- 2) Zvýšená koncentrace cytidindeaminasy vyúsťující v rezistenci na AraC (*cytarabin*).
- 3) Thymidylátsyntetasa a rezistence na 5-fluoruracil (*5-FU*).

- 4) Amplifikace ribonukleotidreduktasy a rezistence na hydroxyureu.

4.6 Rezistence při změnách v procesech apoptózy

Apoptóza je konečný sled buněčných pochodů. Je to složitý mechanismus regulovaný sítí vztahů, na kterém se podílí řada enzymů, proteinů a dalších molekul. V procesu apoptózy hraje významnou roli řada genů kódujících proapoptotické a protiapoptotické proteiny. Většina nádorových buněk získala rezistenci vůči apoptóze, což přispívá k jejich existenci a vzniku nádorového onemocnění.

Příkladem může být protiapoptoticky působící protein Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Gen, který tento protein kóduje, byl původně objeven na imunoglobulinovém lokusu v průběhu chromosomové translokace u folikulárního lymfomu. Zjistilo se, že nadměrná exprese má rušící vliv na apoptózu. Buňky u této inhibice získávají selekční výhodu. Mohou setrvávat v ložiskách v hostitelské tkáni, ukryté před cytokiny a kyslíkem. Defekt apoptózy usnadňuje metastázování. Pravděpodobná úloha Bcl-2 a jeho homologů (Bcl- x_L a Bcl-w) v inhibici apoptózy spočívá v ochranném účinku na integritu mitochondrií. Bcl-2 brání vstupu cytochromu c do cytoplazmy, což znemožní aktivaci Apaf-1 a následně aktivaci kaspasové kaskády [7].

4.7 Rezistence při zvýšené činnosti reparačních mechanismů DNA

Oprava DNA je proces, jímž buňka identifikuje a opravuje poškození v molekulách DNA. K poškození molekuly DNA může dojít vlivem normálních metabolických procesů nebo faktorů vnějšího prostředí (např. UV záření). Může vzniknout až 1 milion molekulárních změn v buňce za jeden den. Takovéto změny mají za následek poškození DNA molekuly. Ta může být změněna, a nebo může dojít ke snížení schopnosti buňky přepisovat geny v místě poškození DNA. Rovněž může docházet ke vzniku potenciálně škodlivých mutací v celém genomu. Pokud dojde k replikaci poškozené DNA ještě před buněčným dělením, tak dceřinné buňky zdědí nesprávné báze a nesou mutace v DNA sekvenci bez možnosti opravy. Proces je nevratný s výjimkou zpětné mutace prostřednictvím tzv. genové konverze.

Buňka, která nahromadila příliš mnoho změn nebo není schopná poškození opravit, přechází do některého z níže uvedených stavů: Stav irreverzibilní dormance (známý jako senescence) je latentním stavem a buňka se již dále nedělí. Další možností je buněčná „sebevražda“, nebo-li apoptóza, a nebo konečně může dojít k neregulovatelnému buněčnému dělení a vzniku nádoru.

Poškození buňky mohou způsobit endogenní látky, např. *reaktivní kyslíkové radikály* – ROS. Ty vznikají z normálních produktů metabolismu (např. při oxidativní fosforylaci) a jsou zodpovědné za spontánní mutace.

Na exogenním poškození se podílejí vnější činitelé, např. *UV záření, X- a gama záření, hydrolýza, tepelné poškození, rostlinné toxiny, mutagenní chemikálie, chemoterapie a radioterapie.*

DNA je jediná molekula, která je v buňce opravována. K opravě DNA dochází třemi mechanismy. První je *reverze poškození*, kdy dochází k enzymatickému obnovení normální struktury bez zlomů v páteři. Druhým je *odstranění poškození*, při tomto mechanismu dochází k vyštípnutí poškozeného úseku DNA nebo báze a k jejich nahrazení. Třetí mechanismus představuje tzv. *tolerance poškození*. Zde se jedná o překonání poškození tak, aby život dále pokračoval.

Dědičné mutace postihující geny, které kódují enzymy DNA opravných systémů, jsou u lidí velmi často spojené se vznikem nádorových chorob. Postupy, které se využívají k léčbě rakoviny (např. chemoterapie, ozařování), jsou založeny na přetěžování buněk opravovat DNA, což vede k apoptóze. Nejvíce jsou postiženy rychle se množící rakovinné buňky, současně ale dochází i k poškození některých buněk nerakovinných, např. kmenových buněk kostní dřeně. Postupně se léčba snaží o omezení poškození DNA u zdravých buněk, tím že např. ozařování tumorů se soustřeďuje přímo na něj nebo se při chemoterapii využívají vlastnosti charakteristické pro rakovinové buňky [8].

5 TESTOVÁNÍ CHEMOSENSITIVITY /CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ *IN VITRO*

První testování chemosenzitivity/ chemorezistence *in vitro* bylo provedeno na přelomu 50. a 60. let Blackem a Speerem. V 80. letech vyvinuli Salmon a Hamburger průlomový test – HTCA (Human Tumor Colony Assay). Poté následoval rozvoj dalších metod, které hodnotí krátkodobé poškození buněk. Metody můžeme rozdělit podle principů na dvě. Hodnotí se různé stupně poškození buněk[10].

5.1 Klonovací metoda

Klonovací metoda je založena na možnosti růstu nádorových buněk na agarovém médiu ve formě kolonií. Normální, zdravé buňky na médiu nerostou. Hodnotí se počet kolonií po kontaktu s cytostatikem. Nevýhodou této metody je velké množství izolovaných nádorových buněk. Z nich je jen malý počet schopný růst na agarovém médiu. Nelze hodnotit buňky v G0 fázi, které se v malém množství vyskytují v *in vivo* tkáni. Další nevýhodou je časová náročnost testu a nízké spektrum použitelných cytostatik[10].

5.2 Neklonovací metody

Tyto metody jsou založeny na poměru zastoupení živých a mrtvých buněk. Sledují se změny v metabolismu a membránové integritě. Výhodou těchto testů je časová nenáročnost, vysoké procento hodnotitelných vzorků, menší počet potřebných buněk, posouzení účinnosti více druhů cytostatik a testování i buněk v G0 fázi. Hlavní problém však spočívá v ovlivnění výsledku testu normálními buňkami[10].

5.2.1 Testy membránové integrity

Těmito testy hodnotíme buněčné poškození způsobené změnami membránové integrity buněk. Dělíme je na testy vitální a supravitální. U vitálních testů dochází k přijímání barviva živou buňkou s neporušenou plasmatickou membránou a mrtvé buňky zůstávají neobarvené. Jako barvivo se používá např. neutrální červeň. Supravitální testy jsou založeny na opačném principu. Zde se barvivo dostává do mrtvých buněk přes porušenou plasmatickou membránu a živé buňky jsou neobarvené. Použitým barvivem je např. methylenová zeleň nebo trypanová modř. Hodnotíme mikroskopicky.

5.2.2 MTT test

K nejrozšířenějším metodám *in vitro* diagnostiky chemosenzitivity/chemorezistence patří tetrazoliový test, tzv. MTT test, o který se zasloužil v roce 1983 Mosmann. U tohoto testu rozlišujeme živé a mrtvé buňky na základě schopnosti živých buněk redukovat žlutou, rozpustnou tetrazoliovou sůl MTT (3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) mitochondriálním enzymem sukcinátdehydrogenasou na nerozpustný modrý formazan. Ten je následně rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO). Zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. MTT test tedy umožňuje porovnat metabolickou aktivitu buněk bez kontaktu s cytostatiky a po expozici cytostatiky.

Výhodou tohoto testu je možnost detekce stupně rezistence na zkoušené látky, a tím vyřazení neúčinných farmak. MTT test se řadí k rychlým a jednoduchým metodikám používaným k detekci chemorezistence nádorů v *in vitro* prostředí.

Mezi nevýhody tohoto testu patří nemožnost rozlišení cytostatického účinku od cytotoxického a ovlivnění výsledků přítomností normálních buněk v kulturách.

5.2.3 ATP test

Tento test je založen na kvantitativním měření ATP bioluminiscence s luciferasou – luciferinem. Pro živé buňky je ATP primární energetický zdroj, který je po smrti buňky hydrolyzován. ATP je z buněk extrahováno a po přidání luciferasy-luciferinu je za přítomnosti ATP emitováno záření, jehož intenzita se měří. Touto metodou lze hodnotit cytostatický i cytotoxický efekt různých látek.

5.3 Histokultury

Tato metoda *in vitro* diagnostiky lékové rezistence je zaměřena na trojrozměrné kultury. Jsou využívány různé substráty, které napodobují extracelulární matrix. Výhodou této kultivace a použití podpůrné matrix je utlumení stresových faktorů. Stresové faktory (např. dezintegrace buněk) mohou mít za následek změny buněčné kinetiky (např. změněné parametry generační doby). K dalším výhodám patří možnost histologického zpracování, a tím odhalení jemných morfologických změn buněčného poškození.

Jako matrix se pro trojrozměrné kultury používají želatinové houbičky. Hodnocení účinku cytostatika se provádí většinou MTT testem. U této metodiky je prokázán vyšší stupeň rezistence oproti jednovrstevným kulturám, které předkládají „obnažené“ buňky, díky použité matrix[10].

5.4 Obecné nevýhody *in vitro* testů

Jednou z nevýhod *in vitro* testů oproti reálným situacím *in vivo* je vyšší ovlivnění stresovými faktory, což má za následek změny buněčné kinetiky, metabolismu a poměru mezi cyklujícími a necyklujícími buňkami.

Další nevýhodou je obtížně vypočitatelná koncentrace použitých látek. V *in vitro* diagnostice působí farmaka přímo na buňky a nejsou tak ovlivněny např. vazbou na plasmatické bílkoviny nebo degradačními procesy.

A konečně je to přítomnost normálních diploidních buněk, což může vést k ovlivnění výsledků.

Diagnostika *in vitro* rezistence napomáhá při volbě farmak pro individuálního pacienta. A především cytostatikum, které je testováno *in vitro*, bude lépe účinkovat i *in vivo* než netestované cytostatikum [10].

6. ZÁVĚR

Předkládaná práce podává souhrn o základních skupinách cytostatik, jejich účincích a využití v léčbě nádorových onemocnění. Dále nás seznamuje s jednotlivými typy rezistence, které se mohou vyskytnout při aplikování cytostatik. V práci jsou rovněž popsány mechanismy vzniku rezistence u nádorových buněk a metody používané pro testování *in vitro* lékové rezistence.

Výzkumy lékové rezistence mohou vést k efektivnější léčbě daného typu nádoru optimálně zvolenými farmaky, a tedy ke zkrácení délky terapie a „utrpení“ pacienta. Takto by se snížil výskyt nežádoucích účinků, jako je ztráta vlasů, zvracení, vliv chemoterapie na kůži a nehty, na močové ústrojí, na nervy a svaly. V mnoha případech totiž pociťuje pacient strach a úzkost především z důsledků protinádorové léčby (konkrétně jejích vedlejších účinků) než ze samotného onemocnění.

Vzhledem k závažnosti nádorových onemocnění jsou výzkumy zaměřené na vznik rezistence nádorových buněk velmi důležité, a to nejen pro objasnění mechanismů rezistence, ale především pro efektivnější léčbu pacientů s těmito chorobami.

7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AL – akutní leukémie
ALL – akutní lymfatická leukémie
AML – akutní myeloidní leukémie
AMK - aminokyselina
ATP – adenosintrifosfát
Apaf 1 – apoptosis protease activating factor 1
AIDS – syndrom získané ztráty imunity
BSO – ireverzibilní inhibitor g – GCS enzymu
Ca - karcinom
CLL – chronická lymfatická leukémie
CML – chronická myeloidní leukémie
CNS – centrální nervový systém
CYP 450 – cytochrom P-450
DNA – kyselina deoxyribonukleová
EB virus – virus Epstein - Barrové
GSH – glutathion
GST – glutathion-S-transferasa
G0 – fáze buněčného dělení
G1 – první přípravná fáze buněčného dělení
HCL – vlasatobuněčná leukémie
IC 50 – střední inhibiční koncentrace
INF λ – interferon gama
IL – 2 – interleukin 2
IL - 4 – interleukin 4
i.v. – intra venozní aplikace
kDa – kilodaltony
LTC 4 – cysteiny leukotrienu
Mr – molekulová hmotnost
RNA – kyselina ribonukleová
ROS – reaktivní kyslíkové radikály
S fáze – syntetická fáze buněčného cyklu

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Klener P., článek z časopisu Vesmír 73/205 z roku 1994 – Úspěšnost léčby nádorových onemocnění cytostatiky. Dostupné z URL: <http://www.vesmir.cz/clanekT.php3> [cit.:29.10.2007]
- [2] Lincová D., Hassan F. et al., Základní a aplikovaná farmakologie, Galén 2002
- [3] Murray R.K., Grammer D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., Harperova biochemie, 1993
- [4] Nosková V., Hajduch M., Mihál V., Cwiertka K., Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. – Typická MDR, Klinická onkologie 2, 4-9, 2000
- [5] Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F., Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein, Klinická Biochemie a metabolismus 4/2006
- [6] Kodyková K., Krejsek J., Kopecký O., Rezistence buněk krevních malignit vůči cytostatikům, Alergie č. 3/2000. Dostupné z URL: <http://www.tigis.cz/alergie/ALERG300/06kodyd.htm> [cit.:3.5.2008]
- [7] On-line knihovna – Zdravcentra.sk, Apoptóza a tumorigeneze 10.4.5 Dostupné z URL:http://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_1491.html [cit.: 3.5.2008]
- [8] On-line knihovna – 3. Buněčné jádro a genetická informace – DNA, chromozómy a chromatin Dostupné z URL: <http://ige.cuni.cz/heslo/přiklady/files/dna%20chromozomes%20chromatin-complet%20with%20figures%20cz.htm> [cit.:31.7.2008]
- [9] Mičuda S., Mnohočetná léková rezistence, 2008 Dostupné z URL: <http://www.LFHK.cuni.cz/farmakol/predn/cz/mdr.doc> [cit.: 21.9.2008]
- [10] Chumchalová J., Kovařík J., Metodiky testování chemosensitivity/chemoresistence nádorů *in vitro*, Klinická onkologie – zvláštní číslo – 2/2000

