

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



ABC transportéry a léková rezistence.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala:	Bc. Andrea Kocurová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Mlejnek, CSc.
Termín odevzdání práce:	26.4.2011

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 26.4.2011

.....
Vlastnoruční podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Petru Mlejnkovi CSc. za umožnění vypracování experimentální části v laboratoři Ústavu biologie lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a dále za jeho odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Poděkování patří i RNDr. Petru Doleželovi CSc. za provedené analýzy a ochotnou spolupráci a taktéž Mgr. Petru Kosztyu.

V Olomouci dne 26.4.2011

Andrea Kocurová

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Andrea Kocurová
Název práce	ABC transportéry a léková rezistence
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav biologie lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Mlejnek, CSc.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Předložená diplomová práce se zabývá problematikou mnohočetné lékové rezistence (MDR–multidrug resistance) u leukemických buněk. Nádorové buňky s MDR fenotypem mají sníženou citlivost nejen vůči použitému léčivu, ale jsou rovněž rezistentní i vůči léčivům s různou chemickou strukturou, které mají i jiný mechanismus účinku. Mnohočetná léková rezistence je často zapříčiněna zvýšenou expresí lékových transportérů, zejména P-glykoproteinu (P-gp, MDR1, ABCB1). P-gp pracuje jako substrátově nespecifická membránová pumpa, jejíž činnost je poháněná hydrolýzou ATP. P-gp transportuje léčivo ven z buněk, čímž snižuje jeho intracelulární koncentraci a navozuje tak rezistenci. Velkou nadějí na překonání MDR přinesla aplikace inhibitorů lékových transportérů. Bohužel v klinických studiích klasické inhibitory P-gp (inhibitory první i druhé generace) přinesly obrovské zklamání, i když studie <i>in vitro</i> slibovaly pozitivní výsledky.</p> <p>Jsme přesvědčeni, že jedním z důvodů tohoto neúspěchu je fakt, že přístupy používané v <i>in vitro</i> studiích se opírají o nepřímé metody, které neumožňují zjistit kvantitativní vztah mezi funkcí P-gp a rezistencí buňky. Proto jsme vyvinuli jednoduchý test pro přímé stanovení intracelulární hladiny léku, jako je daunorubicin nebo imatinib, v senzitivních a rezistentních leukemických buňkách. Tato metoda nám umožňuje určit kvantitativní vztah mezi intracelulární hladinou léčiva a rezistencí buňky při použití P-gp inhibitoru. Zjistili jsme, že zejména první generace inhibitorů P-gp (cyklosporin A) je pro buňku cytotoxická dříve, než dojde ke změně intracelulární hladiny léčiva u rezistentních buněk. Naopak třetí generace inhibitorů P-gp (zosuquidar) obnoví intracelulární hladinu léku, aniž by byl pozorován výrazný cytotoxický efekt. Naše výsledky ukázaly, že kvantitativní přístup umožňuje posoudit účinnost P-gp inhibitorů <i>in vitro</i>.</p>
Klíčová slova	Chronická myeloidní leukemie, mnohočetná léková rezistence, P-glykoprotein, daunorubicin, imatinib
Počet stran	100
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Andrea Kocurová
Title	Diploma
Type of thesis	ABC transporters and drug resistance
Department	Department of Biology, medical faculty of University Palacký in Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Petr Mlejnek, CSc.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>The diploma thesis deals with the multidrug resistance (MDR) phenotype in leukemia cells. Cancer cells with the MDR phenotype are characterised by the decreased sensitivity not only to the drug used for chemotherapy but they also exhibit a cross-resistance to structurally unrelated drugs that did not share a common target. The MDR phenotype is often associated with overexpression of ABCB1 gene product, P-glycoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), an ATP-dependent membrane transporter. It was demonstrated that P-gp mediated efflux decreases the drug concentration in cancer cells and results in a failure to chemotherapy. Therefore, the application of P-gp inhibitors seemed to be a very attractive idea to combat P-gp mediated drug resistance. Unfortunately, classical P-gp inhibitors of the first and second generation completely failed in clinical trials, although, experiments <i>in vitro</i> suggested promising results.</p> <p>We believe that main reason for this frustration might be the fact that approaches routinely used in <i>in vitro</i> assays relied on indirect methods which principally do not enable to make a quantitative relationship between the P-gp function and cell resistance. Therefore, we have developed straightforward assays for direct determination of intracellular drug levels such as daunorubicin or imatinib in sensitive and resistant leukemia cells. This approach allowed us to determine the quantitative relationship between intracellular drug level and cell resistance upon application of a particular P-gp inhibitor. We observed that especially the first generation of P-gp inhibitors, such as cyclosporine A become cytotoxic prior they reversed the intracellular drug level in resistant cells. In contrast, zosuquidar, a P-gp inhibitor of the third generation, fully restored intracellular drug level while exerting only marginal cytotoxic effect in the same experimental system. Our results revealed that the quantitative approach enable to evaluate efficiency of P-gp inhibitors <i>in vitro</i>.</p>
Keywords	Chronic myelogenous leukemia, multidrug resistance, P-glycoprotein, daunorubicin, imatinib
Number of pages	100
Number of appendices	0
Language	czech

Obsah

1. Cíle práce	- 8 -
2. Úvod	- 9 -
3. Teoretická část.....	- 10 -
3.1 Historie.....	- 10 -
3.2 Leukemie	- 11 -
3.3 Chronická myeloidní leukemie	- 11 -
3.3.1 Obecná charakteristika.....	- 11 -
3.3.2 Epidemiologie	- 12 -
3.3.3 Klinické projevy.....	- 12 -
3.3.4 Philadelphský chromosom	- 13 -
3.3.5 Signální dráha BCR-ABL.....	- 15 -
3.3.6 Léčba CML	- 16 -
3.3.6.1 Hodnocení léčebné odpovědi	- 16 -
3.3.6.2 Historie léčby CML	- 17 -
3.3.6.3 Imatinib	- 18 -
3.3.6.4 Nilotinib, dasatinib	- 20 -
3.4 ABC transportéry	- 22 -
3.4.1 Struktura a mechanismus transportu ABC transportérů.....	- 25 -
3.4.2 Rezistentní nádorové buňky.....	- 26 -
3.4.3 ABCB1 (P-gp).....	- 29 -
3.4.3.1 Substráty P-gp.....	- 31 -
3.4.3.2 Mechanismus transportu.....	- 31 -
3.4.3.3 Inhibitory P-gp	- 32 -
3.4.4 ABCC1 (MRP1)	- 36 -
3.4.5 ABCG2 (BCRP)	- 37 -
4. Experimentální část.....	- 39 -
4.1 Materiál a metody	- 39 -
4.1.1 Buněčné linie	- 39 -
4.1.2 Chemikálie	- 39 -
4.1.3 Roztoky	- 40 -
4.1.4 Stanovení počtu živých a mrtvých buněk.....	- 40 -
4.1.5 Stanovení buněčné proliferace a viability	- 40 -
4.1.6 Analýza buněčného cyklu.....	- 40 -
4.1.7 Analýza exprese P-gp	- 41 -
4.1.8 Měření kaspasové aktivity v buněčných extraktech	- 41 -
4.1.9 Jaderná morfologie.....	- 42 -
4.1.10 Stanovení intracelulární koncentrace léčiva ve tkáňových kulturách	- 42 -
4.2 Výsledky	- 43 -
4.2.1 Stanovení intracelulárního obsahu Drb pomocí HPLC/MS/MS.....	- 43 -
4.2.2 Validace metody	- 44 -
4.2.3 Vliv složení extrakčního roztoku na účinnost extrakce Drb	- 44 -
4.2.4 Časový průběh intracelulární hladiny Drb	- 46 -
4.2.5 Kvantifikace intracelulárního obsahu Drb v senzitivních a rezistentních buňkách	- 47 -
4.2.6 Expese P-gp u citlivé (K562) a rezistentní linie (K562/DOX)	- 48 -
4.2.7 Vlastnosti citlivé (K562) a rezistentní linie (K562/DOX) pod vlivem Drb ..	- 48 -
4.2.7.1 Vliv inhibitorů P-gp na citlivost rezistentní linie (K562/DOX)	- 53 -
4.2.7.2. Vliv inhibitorů P-gp na intracelulární obsah Drb u buněk K562/DOX ..	- 65 -
4.2.8 Porovnání vlastností citlivé (K562) a rezistentní linie (K562/DOX) pod vlivem imatinibu	- 66 -

4.2.8.1 Vliv inhibitorů P-gp na citlivost buněk K562/DOX v přítomnosti imatinibu	- 70 -
4.2.8.2 Vliv inhibitorů P-gp na intracelulární obsah imatinibu u buněk K562/DOX	- 82 -
4.3 Diskuse	- 83 -
5. Závěr	- 85 -
6. Literatura	- 86 -
7. Seznam použitých zkratk	- 98 -

1. Cíle práce

- 1) Dokončit validaci metody pro stanovení intracelulárního obsahu daunorubicinu u nádorových buněk s fenotypem mnohočetné lékové rezistence *in vitro*.
- 2) Změřit citlivost buněk se zvýšenou expresí P-glykoproteinu k daunorubicinu a imatinibu.
- 3) Pomocí inhibitorů P-glykoproteinu obnovit citlivost rezistentních buněk k daunorubicinu a imatinibu.
- 4) Změřit intracelulární obsah daunorubicinu a imatinibu u rezistentních buněk se zvýšenou expresí P-glykoproteinu.
- 5) Zjistit, zda reverze rezistence navozená inhibitory P-glykoproteinu je doprovázená odpovídajícími změnami intracelulárních koncentrací použitých léčiv.

2. Úvod

Chronická myeloidní leukemie (CML) je jednou z nejčastěji se vyskytujících leukemií u dospělých lidí. Toto onemocnění je charakteristické zvýšenou proliferací transformovaných primitivních progenitorových buněk krvetvorby a postihuje zejména pacienty ve věku od 45 do 55 let. Ačkoliv je toto onemocnění heterogenní, patří CML k nejlépe prostudovaným leukemiím, u které bylo v roce 1960 prokázáno, že chromosomální abnormality se podílí na její patogenezi (Nowell & Hungerford, 1960). Diagnóza tohoto onemocnění je obvykle založena na detekci tzv. Philadelphského chromosomu (Ph⁺), který je přítomen u 95 % pacientů. Ph⁺ chromosom vzniká reciprokou translokací mezi chromosomy 9 a 22 (Rowley, 1973) a kóduje fúzní BCR-ABL tyrosin kinasu, jež má onkogenní aktivitu. Léčba CML, která spočívá v zastavení progresu onemocnění do akcelerační a blastické fáze, se od roku 1992, kdy byla objevena vysoce účinná látka imatinib, pohnula směrem kupředu. Imatinib, jakožto inhibitor BCR-ABL proteinu, zásadně změnil prognózu pacientů s CML. Léčba imatinibem bohužel neřeší situaci všech nemocných, a proto se farmakologické studie i nadále zabývají syntézou nových látek, které by vedly k úplnému vyléčení pacientů s CML.

Mnohočetná léková rezistence (MDR – multidrug resistance) je jednou z hlavních příčin selhání léčby nádorových onemocnění a projevuje se sníženou citlivostí nádorových buněk k širokému spektru cytotoxických látek. Vznik mnohočetné lékové rezistence je podmíněn celou řadou buněčných mechanismů. Mezi nejčastější příčiny vzniku rezistence patří zvýšená exprese ABC (ATP-binding cassette) transportérů nebo také tzv. lékových transportérů. Mezi ABC transportéry, které jsou dávány do souvislosti s lékovou rezistencí řadíme ABCB1, ABCC1 a ABCG2. Tyto proteiny transportují chemoterapeutické léčivo ven z buňky za účasti hydrolyzy ATP. Jedním z možných způsobů jak regulovat aktivitu těchto proteinů, je užití inhibitorů, které zablokují jejich funkci a obnoví citlivost rezistentních buněk na cytotoxické léčivo.

Tato diplomová práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části jsem se pokusila shrnout dostupné poznatky týkající se chronické myeloidní leukemie a ABC transportérů. V experimentální části se věnuji otázce, jak protein ABCB1 přispívá ke vzniku MDR. Domníváme se, že velikost tohoto příspěvku je možné odhadnout na základě kvantitativního stanovení intracelulární hladiny léčiva v rezistentních a citlivých nádorových buňkách.

3. Teoretická část

3.1 Historie

Historie zásadních vědeckých výsledků, týkajících se chronické myeloidní leukemie (CML), je důkazem toho, jak pokrok ve vědeckých oborech vedl k dosažení současného stupně poznatků o této nemoci.

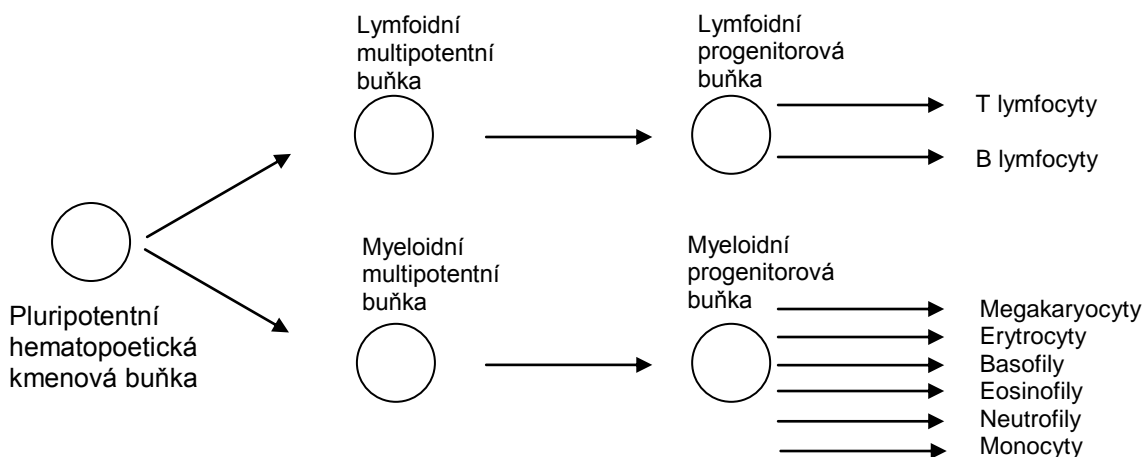
Pojem leukemie, který lze do češtiny přeložit jako bílá krev nebo bělokrevnost, byl do lékařské terminologie zaveden roku 1847 německým lékařem Rudolfem Virchowem. Avšak první zmínka o této nemoci, která byla neúplně popsána v roce 1844 v článku *Cours de microscopie complémentaire des études médicales*, patří Francouzovi, jehož jméno je Alfred Donné. O rok později vyšla v časopise *Medical and Surgical Journal* práce (*Two cases of disease and enlargement of the spleen in which death takes place from the presence of purulent matter in the blood*) popisující chronickou myeloidní leukémii, kterou publikoval Brit John Hughes Bennett (Degos, 2001).

Ve druhé polovině 19. století popsal Friedreich, že leukémie může být buď akutní nebo chronická (Friedreich, 1857), a v roce 1891 po objevení speciálního barvení krevních buněk rozlišil Paul Ehrlich leukémii na myeloidní a lymfoidní (Ehrlich, 1891).

V roce 1960 P. Nowel a D. Hungerford jako první popsali, že v buňkách pacientů s CML se vyskytuje abnormálně malý Philadelphský chromosom (Ph⁺), který byl pojmenován podle místa objevu (Nowel & Hungerford, 1960). Rozvoj cytologických technik měl za následek, že v roce 1973 publikovala J. Rowley článek, ve kterém uvedla, že Ph⁺ chromosom vznikl reciprokou translokací mezi chromosomy 9 a 22 (Rowley, 1973) a následně byly pomocí molekulárních technik identifikovány geny, které byly do této translokace zapojeny. Na chromosomu 9 se jedná o protoonkogen *ABL*, což je lidský homolog onkogenu, který byl původně objeven v Abelsonově viru myší leukemie (Heisterkamp et al., 1982), a na chromosomu 22 se jedná o *BCR* gen, který má serin/threonin kinasovou aktivitu (Groffen et al., 1984). Následně bylo zjištěno, že produktem fúze těchto genů je BCR-ABL kinasa, která má onkogenní účinky a významně se podílí na vzniku CML (Lugo et al., 1990). Tato kinasa se stala terčem nově vyvinutých léčiv, které prokazují slibné výsledky u pacientů s CML (Druker et al., 2001).

3.2 Leukemie

Leukemie je nádorové onemocnění krve, které skrývá řadu nemocí. Je to onemocnění vyznačující se abnormálním množением určitého typu bílých krvinek (v kostní dřeni a v krvi), které nejsou dostatečně vyzrálé, a proto neplní svou fyziologickou funkci. Podle agresivity onemocnění dělíme leukemii na akutní (rychlejší průběh) a chronickou (pomalejší průběh) a podle typu zasažených krvinek rozdělujeme leukemii na myeloidní a lymfatickou „Obr.1“.



Obr.1 Zjednodušené schéma krve tvorby. Krve tvorba je proces, při kterém dochází k formování krevních buněk. Z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky vznikají dvě linie multipotentních buněk (lymfoidní, myeloidní), z nichž dále vznikají příslušné progenitorové buňky, ze kterých vznikají jednotlivé krevní elementy.

3.3 Chronická myeloidní leukemie

3.3.1 Obecná charakteristika

Chronická myeloidní leukemie je myeloproliferativní onemocnění, které je klonálního původu. Je charakteristická zvýšenou proliferací transformovaných primitivních progenitorových buněk krve tvorby, kam zahrnujeme řadu buněčných linií (myelocyty, monocyty, erythrocyty, megakaryocyty, B-lymfocyty a zřídka i T-lymfocyty) (Fialkow et al., 1977).

Normální hematopoetické progenitorové buňky adherují k extracelulární matrix (bílkovinná síť udržující některé typy tkání pohromadě) nebo k imobilizovaným cytokinům regulujících jejich růst. Adheze je zprostředkována receptory na povrchu progenitorových buněk, které se nazývají integriny. V případě CML je u stromálních buněk kostní dřene adheze poškozena. Tím dochází k deregulaci procesu krve tvorby, jehož výsledkem je, že myeloidní progenitorové buňky jsou v různých stádiích zrání předčasně propuštěny do periferní krve (Faderl et al., 1999b).

Je to první onemocnění člověka, u kterého bylo prokázáno, že na jeho patogenezi se podílí chromosomální abnormality, které byly objeveny roku 1960 (Nowell & Hungerford, 1960). Ačkoliv je toto onemocnění heterogenní, patří CML k nejlépe charakterizovaným leukemiím na molekulární úrovni a studie posledních let odhalily, které molekulární děje provází počátek a progresi onemocnění (Faderl et al., 1999b).

3.3.2 *Epidemiologie*

CML se vyskytuje u 1 až 2 případů na 100 000 obyvatel za rok a představuje 15 % všech leukemií. Postihuje zejména pacienty ve věku od 45 do 55 let, ale z 12-30 % se jedná o pacienty ve věku 60 let a výše (Faderl et al., 1999b).

3.3.3 *Klinické projevy*

Jelikož bývá 40 % pacientů asymptomatických, je většina případů diagnostikována náhodně v chronické fázi onemocnění v rámci preventivního vyšetření krevního obrazu. Mezi typické příznaky řadíme únavu, pocení, zvýšenou teplotu, anémii (chudokrevnost je stav, kdy počet červených krvinek a množství hemoglobinu poklesne pod normální hranici), trombocytózu (zvýšené množství krevních destiček v krvi), leukocytózu (zvýšený počet bílých krvinek v krvi), úbytek na váze, atd. (Sawyers, 1999).

Léčbou nekontrolovaná CML má u většiny pacientů tři fáze onemocnění, u nichž se mění jak klinický, tak laboratorní obraz. Od tří do pěti let po nástupu CML nastává progresse onemocnění a dochází k přechodu z fáze chronické na fázi akcelerační, nebo blastickou. Kritéria pro určení fází CML jsou velmi důležitá, a proto v roce 2006 J. E. Cortes a spol. navrhli na základě hodnocení více než 800 nemocných nová kritéria, která jsou uvedena v „Tab.1“ (Cortes et al., 2006).

Tab.1 Kritéria pro stanovení fáze CML (Převzato z Cortes et al., 2006).

Chronická fáze
Vysoké riziko
<ul style="list-style-type: none">- krevní destičky před počátkem léčby > 1000 x 10⁹/l- v době diagnózy není detekována cytogenetická změna
Nízké riziko
<ul style="list-style-type: none">- blasty v periferní krvi či kostní dřeni < 10 %- bazofily v periferní krvi či kostní dřeni < 20 %- v době diagnózy detekovány cytogenetické změny
Akcelerovaná fáze
<ul style="list-style-type: none">- blasty v periferní krvi či v kostní dřeni 10 – 29 %- splenomegalie (zvětšení sleziny), leukocyty > 10 x 10⁹/l, nebo krevní destičky > 1000 x 10⁹/l nereagující na trvalou terapii- krevní destičky < 100 x 10⁹ nesouvisející s léčbou- bazofily v periferní krvi či kostní dřeni ≥ 20 %- blasty a promyelocyty ≥ 30 %
Blastická fáze
<ul style="list-style-type: none">- blasty v periferní krvi či v kostní dřeni ≥ 30 %- extramedulární (probíhající mimo kostní dřeň) blastická infiltrace

Chronická fáze CML je počátečním stádiem onemocnění, které se vyznačuje zmnožením neutrofilů a mírně zvětšenou slezinou. Pacienti diagnostikovaní v této fázi onemocnění mají normální kvalitu života, příznivě reagují na léčbu a délka trvání této fáze je několik měsíců až let (Indrák et al., 2009).

Akcelerovaná fáze je pokročilejším stádiem onemocnění CML, která je charakteristická zhoršeným zdravotním stavem pacienta. V důsledku zmnožení buněk dochází ke zvětšení sleziny. Úspěšnost léčby tohoto stádia onemocnění je horší než u chronické fáze, a proto je prognóza přežití v řádech měsíců (Indrák et al., 2009).

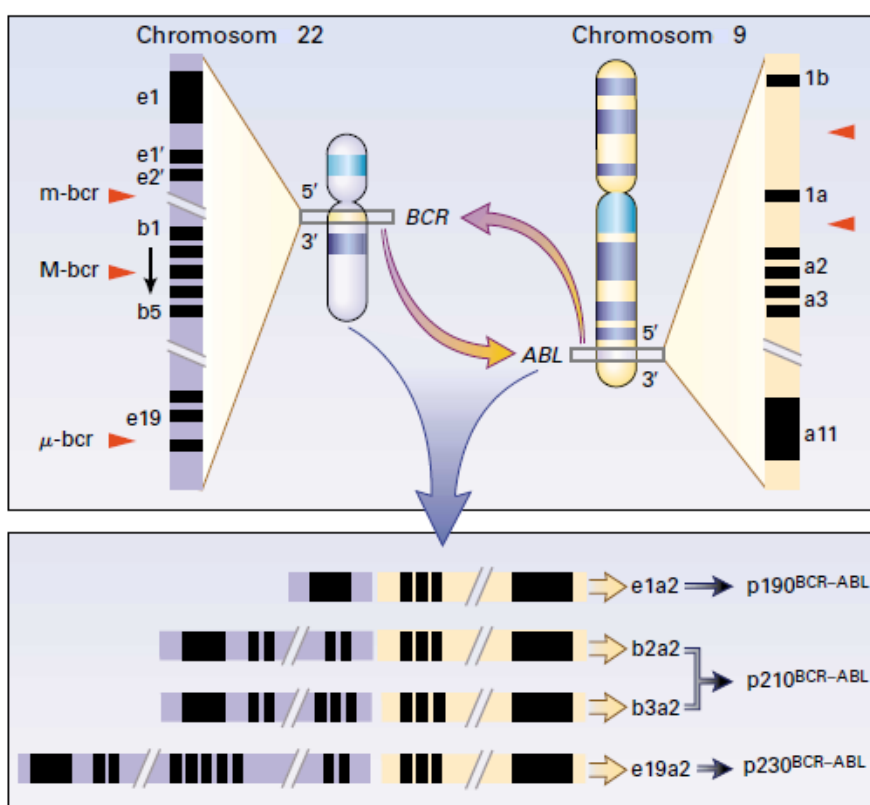
Blastický zvrát je nejkritičtější fází onemocnění. V některých případech se toto stádium onemocnění objevuje bez fáze akcelerace, pak hovoříme o tzv. blastické krizi, která má u 70 % případů myeloblastický a u 30 % B-lymfoblastický původ. Prognóza přežití je v řádech týdnů až měsíců (Westfall et al., 2008).

3.3.4 *Philadelphský chromosom*

Diagnóza CML je obvykle založena na detekci Philadelphského (Ph⁺) chromosomu, který je přítomen u 95 % pacientů. Skutečnost, že Ph⁺ chromosom bývá detekován ve všech hematopoetických buněčných liniích (vyjímečně T-lymfocyty) svědčí o tom, že CML je onemocnění postihující kmenové buňky (Sawyers, 1999).

Za Ph⁺ chromosom považujeme zkrácený chromosom 22, který je výsledkem reciproké translokace t(9;22)-(q34;q11) mezi dlouhými raménky chromosomu 22 a 9. Translokací dochází k přenesení 3'-konce *ABL* genu z chromosomu 9q34 na 5'-konec *BCR* genu chromosomu 22q11 a vzniká tak fúzní *BCR-ABL* gen „Obr.2“, který kóduje chimerickou BCR-ABL mRNA (Kurzrock et al., 1988). Podle místa zlomu na *BCR* genu vznikají tři transkripty, které kódují vznik chimerických proteinů o různých molekulových hmotnostech (190, 210 nebo 230 kDa).

Hematopoetické progenitorové buňky, které exprimují p210^{BCR-ABL}, jsou schopny uniknout závislosti na růstových faktorech a mohou odolat cytotoxickým účinkům léčiv a záření (McGahon et al., 1994). Antiapoptotické vlastnosti p210^{BCR-ABL} jsou důležitou součástí tumorigenního potenciálu hematopoetických buněk (Cortez et al., 1995).



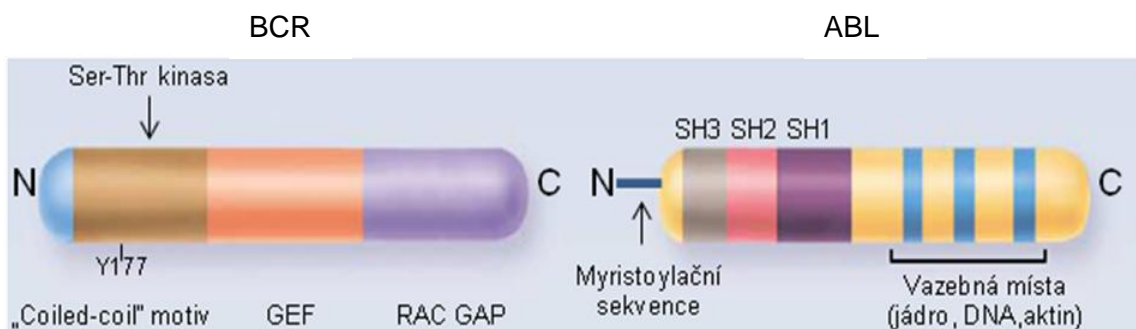
Obr.2 Vznik Ph⁺ chromosomu. Translokací dochází k přenesení 3'-konce *ABL* genu z chromosomu 9q34 na 5'-konec *BCR* genu chromosomu 22q11 a vzniká tak fúzní *BCR-ABL* gen. Bod zlomu v *ABL* genu se nachází na 5'-konci exonu 2. *ABL* exony 2 až 11(a2 až a11), jsou přemístěny do M-bcr (major breakpoint cluster region) *BCR* genu na chromosomu 22 mezi dvanáctý (b1) a šestnáctý (b5) exon. Tento úsek má přes 5,8 kb. Bod zlomu v *BCR* genu se buďto nachází na 5'-konci mezi exony b2 a b3, nebo na 3'-konci (směrem k telomeře) mezi exony b3 a b4. Takto vzniklý fúzní gen s b2a2 nebo s b3a2 spojením je transkribován do 8,5 kb mRNA, která kóduje vznik chimerického proteinu p210^{BCR-ABL} o velikosti 210 kDa (Kurzrock et al., 1988). Ve většině případů obsahují CML buňky buď b2a2, nebo b3a2 transkripty, ale u 5 % případů dochází k alternativnímu sestřihu, jehož výsledkem je exprese obou produktů (Melo, 1996). Na *BCR* genu existují tři možná místa sestřihu. Kromě výše uvedeného sestřihu dochází i ve vzácných případech ke zlomu na 22 chromosomu v místě m-bcr (minor breakpoint cluster region) a vzniku transkriptu, který kóduje vznik menšího chimerického proteinu p190^{BCR-ABL} (Melo et al., 1994). Třetí bod zlomu se nachází v místě μ -bcr (micro breakpoint cluster region) mezi exony e19 a e20, jejichž výsledkem je fúzní protein p230^{BCR-ABL} o velikosti 230 kDa (Pane et al., 1996) (Upraveno podle Faderl et al., 1999b).

3.3.5 Signální dráha BCR-ABL

Nereceptorové tyrosinové kinasy se nacházejí ve všech mnohobuněčných organismech. Většina z nich má velmi důležitou roli v přenosu vnějších signálů a v regulaci buněčné smrti. Vyšší eukaryota obsahují kromě SRC rodiny (Rous sarcoma virus), což jsou nereceptorové tyrosin-proteinové kinasy regulující buněčnou diferenciaci, proliferaci a přežití, i další vnitrobuněčné tyrosinové kinasy (např. ABL rodina). Savčí ABL protein je schopen se vázat na aktinová filamenta v cytoplazmě a na specifické sekvence DNA v jádře. Schopnost vázat se na DNA je v průběhu metafáze inhibována hyperfosforylací příslušné domény ABL (Wang, 1993).

ABL gen kóduje nereceptorovou tyrosin kinasu s molekulární hmotností 145 kDa, která má 11 exonů (exon 1 existuje ve dvou formách 1a a 1b) a velikost přes 230 kb. Je lokalizován jak v cytoplazmě, tak v jádře. ABL proteiny hrají důležitou roli v signální transdukci a v regulaci buněčného růstu. N-terminální konec proteinu obsahuje dvě SRC homologní domény (SH2 a SH3), které regulují tyrosin kinasovou funkci ABL. Dále tento protein obsahuje katalytickou doménu a myristoylační sekvenci, které jsou zodpovědné za vazbu ABL k proteinům plazmatické membrány. C-terminální konec obsahuje DNA vazebnou doménu, jaderné lokalizační signály a vazebné místo pro aktin „Obr.3“ (Faderl et al., 1999b).

BCR gen, který je exprimován v mozku a krvevorné tkáni, kóduje protein o molekulové hmotnosti 160 kDa. Protein p160^{BCR}, který se nachází na chromosomu 22 a je lokalizován v cytoplazmě, obsahuje několik funkčních domén. Na N-terminálním konci se nachází katalytická doména (serin/threoninová kinasa), která obsahuje minimálně tři vazebná místa pro SH2 domény a umožňuje tak jejich vzájemnou interakci. Tato vazebná místa obsahují tyrosin 177 nezbytný pro vazbu GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) a aktivaci dráhy RAS (Rat sarcoma). Dále se zde nachází „coiled coil“ motiv, který je důležitý pro interakci s ostatními proteiny a také je zodpovědný za homotetramerizaci BCR-ABL molekuly, která je nezbytná pro její transformační potenciál. Další významnou doménou je faktor vyměňující GTP za GDP tzv. GEF. Na C-terminálním konci se nachází doména, která funguje jako GTPasa aktivující protein „Obr.3“ (Faderl et al., 1999b).



Obr.3 Funkční domény proteinu BCR a ABL. BCR protein obsahuje „Coiled-coil“ motiv (interakce s ostatními proteiny), katalytickou doménu, GEF (faktor vyměňující GTP za GDP) a RAC (GTPasa podobná RAS) GAP (GTPasa aktivující protein). ABL protein obsahuje myristoylační sekvenci a domény SH3 (negativní regulační efekt na tyrosin kinasovou funkci), SH2 (interakce s proteiny fosforylovanými na tyrosinu) a SH1 (tyrosin-kinasová doména) a vazebná místa pro jaderné proteiny, DNA a aktin (Upraveno podle Faderl et al., 1999b).

Struktura chimérického proteinu p210^{BCR-ABL} umožňuje více protein-proteinových interakcí a dovoluje tak, aby se zapojil do různých intracelulárních signálních drah, což vede ke změně buněčné adheze, k přenosu mitogenních signálů (signály indukující proliferaci) a k inhibici apoptozy. Konečným výsledkem je transformace hematopoetických kmenových buněk a rozvoj CML (Sawyers, 1997). Fúzí N-terminálního konce BCR k ABL dojde k přidání velké aminokyselinové sekvence k SH2 segmentu ABL proteinu (Pendergast et al., 1991). BCR interaguje s přilehlým SH3 segmentem, který reguluje kinasovou doménu, což zapříčiní, že ABL se přemění v konstitutivně aktivní tyrosin fosfokinazu. Aktivita této kinasy je mnohem vyšší u chimérických proteinů p210^{BCR-ABL} a p190^{BCR-ABL} než u proteinu původního (Kurzrock et al., 1988). „Coiled coil“ motiv na N-konci chimerického proteinu zvyšuje tyrosin kinasovou aktivitu a umožňuje interakci s F-aktinem (McWhirter et al., 1993). Několik domén BCR proteinu slouží jako vazebná místa pro adaptorové proteiny např. GRB2 (growth factor receptor-bound), CRKL (CRK-oncogene-like protein) a SHC (SRC homology 2-protein) (Puil et al., 1994).

3.3.6 Léčba CML

3.3.6.1 Hodnocení léčebné odpovědi

Základní podmínkou správné léčby, která bude mít co nejoptimálnější výsledek, je dostupnost laboratorních vyšetření, které zhodnotí stav nemocného. V průběhu léčby je nutné kontrolovat stav pacienta na základě léčebné odpovědi, která se hodnotí ve třech úrovních (hematologická, cytogenetická a molekulární odpověď) „Tab.2“.

Tab.2 Hodnocení léčebné odpovědi (Převzato z Indrák et al., 2009).

1. Kompletní hematologická odpověď
- normalizace hodnot krevního obrazu (počet leukocytů < $10 \times 10^9/l$) - normální diferenciální rozpočet leukocytů bez vyplavování nezralých forem - počet trombocytů < $450 \times 10^9/l$
2. Cytogenetické odpovědi
a. minimální cytogenetická odpověď: množství Ph ⁺ buněk 66-95 % b. parciální cytogenetická odpověď: množství Ph ⁺ buněk 35-65 % c. velká cytogenetická odpověď: množství Ph ⁺ buněk > 0 % a < 35 % d. kompletní cytogenetická odpověď: množství Ph ⁺ buněk 0 %
3. Molekulární odpověď
a. velká molekulární odpověď: redukce BCR-ABL mRNA o $\geq 3-4$ řády b. kompletní molekulární odpověď: nedetekovatelná BCR-ABL mRNA pomocí RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptasy)

3.3.6.2 Historie léčby CML

V současnosti je cílem každé léčby zabránit progresi onemocnění do akcelerační a následně blastické fáze.

Léčba CML byla do 60. let minulého století pouze paliativní. Paliativní péče se nezaměřuje na odstranění příčin onemocnění. Jejím cílem je zmírnit bolest pacienta a udržet jeho kvalitu života po stránce fyzické, psychické a duševní. Pacientům byl podáván arsenik (oxid arsenitý), busulfan, nebo docházelo k ozáření sleziny. Střední doba celkového přežití nemocných se pohyboval v řádech měsíců (27-47). Látky busulfan a hydroxyurea, které koncem 70. let minulého století mírně prodloužily střední dobu celkového přežití (48-69 měsíců), řadíme ke komerčním cytotoxickým lékům, které dosahovaly pouze hematologické kontroly, ale přirozený průběh nemoci končící smrtí ovlivnit nemohly (Indrák et al., 2009).

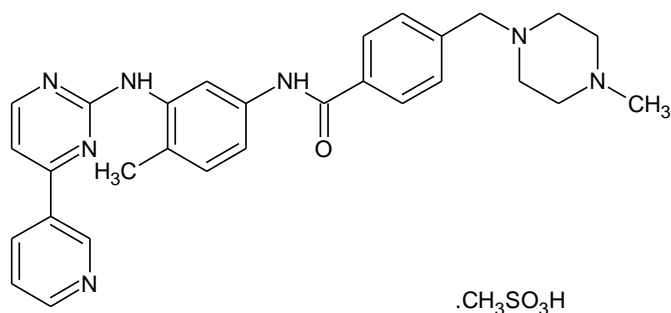
Naději na vyléčení přinesla v polovině 70. let minulého století alogenní transplantace krvevorných buněk. Nicméně je pro tuto léčbu způsobilých málo pacientů, protože většina z nich nesplňovala základní indikační kritéria (věk $\leq 45-55$), popřípadě nenašla vhodného dárce krvevorných buněk (Faderl et al., 1999a).

Zavedení rekombinantního interferonu alfa (rIFN), který řadíme k imunomodulačním cytokinům, prodloužilo celkovou střední dobu přežití na 66-89 měsíců (Indrák et al., 2009). Většina pacientů užívajících rIFN dosáhla hematologické remise, ale pouze menšina pacientů dosáhla kompletní cytogenetické odpovědi (13-27 %). Navíc většina pacientů nebyla schopna rIFN kvůli jeho vedlejším účinkům tolerovat (An et al., 2010).

Objev *BCR-ABL* genu vedl vědce k navržení látky, která by inhibovala tuto konstitutivně aktivní kinasu a v roce 1992 byl ve firmě Ciba-Geigy syntetizován ABL kinasový inhibitor imatinib (u nás komerčně dostupný pod názvem Glivec). Rychlost s jakou byl imatinib po svém objevení převeden z *in vitro* testů do klinických studií a dále do klinické praxe ukazuje, že se jedná o vysoce účinnou látku, která počátkem 21. století odstartovala novou etapu léčby CML zvanou „Éra imatinibu“. Pro krátkou dobu sledování není stanovena celková doba přežití, ale jsou zde odhady, že to bude okolo 15-ti let. Léčba imatinibem bohužel neřeší situaci všech pacientů s CML. V současnosti se nové metody a koncepty terapie velmi rychle vyvíjí a výzkum směřuje především k rozvoji sloučenin, které selektivně inhibují BCR-ABL tyrosinové kinasy. Mezi další cíle v léčbě CML patří syntéza nových účinných léčiv pro pacienty, u kterých selhala léčba imatinibem, a nalezení terapie, která by vedla k úplné eradikaci nádorového klonu, a tedy k úplnému vyléčení pacientů s CML (Indrák et al., 2009).

3.3.6.3 Imatinib

Tato látka, která je také známa jako STI 571 nebo CGP 57148B, se vyrábí ve formě soli methansulfonát. Z chemického hlediska se jedná o derivát fenyloaminopyrimidinu, jehož chemický název je 4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-fenyl]-benzamidmethansulfonát „Obr.4“.



Obr.4 Strukturní vzorec imatinibu methansulfonátu.

Imatinib je standardní léčivo používané v první linii léčby u pacientů v chronické fázi CML. Účinkuje jako silný selektivní nekompetitivní inhibitor tyrosinových kinas BCR-ABL, ABL, ARG (*ABL* related gene), KIT (tyrosin kinasový receptor), PDGFR α , PDGFR β (platelet-derived growth factor receptor α a β , nebo-li receptor pro destičkový růstový faktor), který byl cíleně navržen (Kantarjian et al., 2010). Téměř u všech pacientů s CML v chronické fázi včetně těch, kteří vykazovali známky fáze

akcelerované, bylo studiem prokázáno, že imatinib při každodenních dávkách (300 mg a výše) indukuje trvalou odpověď s minimálními toxickými účinky (Druker et al., 2001).

Mechanismus působení této látky je velmi dobře prozkoumán na *BCR-ABL* pozitivních buňkách. Bylo zjištěno, že se imatinib v proteinu BCR-ABL váže na nukleotid vazebné místo takovým způsobem, že zabraňuje vazbě ATP a hodnota inhibiční konstanty je 85 nM (Cowan-Jacob et al., 2004). Detailní analýza ukázala, že dochází k nekompetitivní inhibici fosforylace tyrosinových zbytků a k následné stabilizaci enzymu v inaktivní formě, což má za následek zastavení signálních drah podílejících se na vzniku leukemického fenotypu buňky (Graham et al., 2002). Pomocí krystalové struktury katalytického regionu lidské a myší ABL kinasy, bylo zjištěno, že se imatinib váže na kinasovou doménu minimálně přes 21 aminokyselinových residuí (Nagar et al., 2002). Imatinib není lék, který by byl schopen potlačit vznik genu zodpovědného za CML, pouze u leukemických buněk indukuje apoptosu a inhibuje jejich růst. Nedochozí tedy k úplnému vyléčení pacienta, ale pouze k potlačení leukemického klonu na nízkou úroveň. Proto se doporučuje trvalé užívání imatinibu (Graham et al., 2002).

Rezistence na imatinib

Největším problémem doprovázející léčbu CML je vznik rezistence na podávané léčivo. Tato neschopnost léku navodit léčebnou odpověď je v současnosti považována za jednu z hlavních příčin, která brání úspěšnému vyléčení nádorových onemocnění. Délka léčebné odpovědi na imatinib závisí zejména na stádiu CML, kdy je léčba zahájena a také na délce trvání onemocnění. V akcelerované fázi CML je pravděpodobnost vzniku rezistence na imatinib téměř 70 % (Talpač et al., 2002) a v blastickém zvratu dokonce přes 90 % (Sawyers et al., 2002). Nejnižší riziko vzniku rezistence je pozorováno u pacientů, u nichž je léčba zahájena v časně chronické fázi (O'Brien et al., 2003).

Ačkoliv většina pacientů s chronickou fází CML odpovídá na léčbu dobře, existují i případy, kdy u pacientů nastává zvrát onemocnění nebo progresse do akcelerované a blastické krize (Druker et al., 2006). V roce 1994 bylo zjištěno, že adaptorový protein CRKL o velikosti 39 kDa, je jeden z hlavních proteinů fosforylovaných v místě tyrosinu (Druker, 2008). CRKL je tedy nejvýznamnější substrát BCR-ABL onkoproteinu, který se podílí na vzniku CML. Tento adaptorový protein je u CML neutrofilů výrazně fosforylován na tyrosinu, kdežto u normálních neutrofilů fosforylován není. V souvislosti s těmito poznatky byla vyvinuta metoda hodnotící míru fosforylace CRKL u všech pacientů zapsaných do klinických studií imatinibu, pomocí které bylo

v laboratoři Charlese Sawyera zjištěno, že relaps u pacientů se sekundární rezistencí byl způsoben reaktivací BCR-ABL tyrosinové kinasy (Gorre et al., 2001). Reaktivace kinasy může být způsobena několika mechanismy:

a) Mutace *BCR-ABL* kinasové domény.

Je známo, že minimálně 50 % pacientů, kterým se při léčbě imatinibem nemoc navrátí, má bodovou mutaci *BCR-ABL* minimálně ve 40 různých aminokyselinách nacházejících se na ABL kinasové doméně. Tyto mutace lze rozdělit do 4 skupin: mutace v ATP vazebné smyčce (P-smyčka), na T315, na M351 a v A-smyčce (Druker, 2008).

b) Amplifikace a zvýšená exprese genu *BCR-ABL*.

Pomocí fluorescenční hybridizace *in situ* byla prokázána amplifikace *BCR-ABL* na genomové úrovni u 3 z 9 rezistentních pacientů (Gorre et al., 2001). Zvýšená hladina BCR-ABL mRNA byla zaznamenána u 4 ze 37 pacientů (Hochhaus et al., 2002).

c) Zvýšená koncentrace α -1-kyselého glykoproteinu.

Jelikož se imatinib ve velké míře váže na plazmatické bílkoviny, vede tak zvýšená koncentrace tohoto proteinu ke snížení koncentrace volné frakce imatinibu v plazmě. Podáním erytromycinu, který se váže na α -1-kyselý glykoprotein, je možné tuto rezistenci překonat (Gambacorti-Passerini et al., 2000).

d) Nízká exprese proteinu hOCT1 (human organic cationic transporter).

Předmětem mnoha diskuzí je úvaha, že snížená exprese tohoto transportéru, který je zodpovědný za přenos imatinibu do intracelulárního prostředí buněk, by mohla vést k nedostatečné inhibici tyrosinové kinasy BCR-ABL (White et al., 2006).

e) Zvýšená exprese P-glykoproteinu (P-gp).

P-glykoprotein, kódovaný *ABCB1* genem, je jedním z prvních ABC transportérů, u něhož byla identifikována jeho zvýšená exprese u rezistentních nádorových buněčných linií (Riordan et al., 1985). P-gp je nejlépe ocharakterizovaný ABC transportér pomocí biochemických a mutačních analýz. Kromě tohoto proteinu se na vzniku rezistence způsobené zvýšenou expresí lékových transportérů podílí i další nadměrně exprimované proteiny a to zejména ABCC1 a ABCG2.

3.3.6.4 Nilotinib, dasatinib

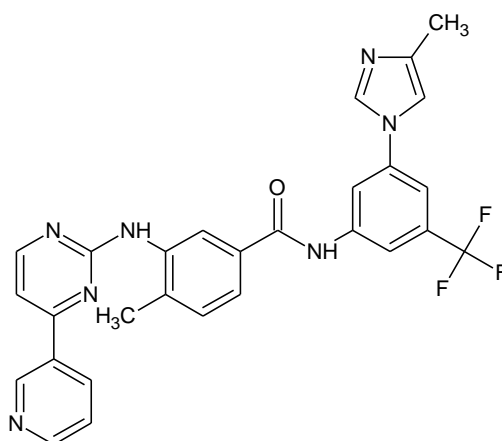
Stejně jako porozumění molekulární podstaty CML vedlo k vývoji imatinibu, tak objasnění některých mechanismů rezistence na imatinib mělo za příčinu rozvoj druhé generace BCR-ABL inhibitorů. Díky znalosti krystalové struktury BCR-ABL proteinu

byly navrženy dva přístupy. Jeden z těchto přístupů zahrnoval modifikaci imatinibu, která by vedla k pevnější vazbě na ABL kinasu. Výsledkem je látka zvaná nilotinib, která byla navržena chemiky ve firmě Novartis (Weisberg et al., 2005). Druhý přístup vedl k vyvinutí látky na základě srovnání struktury aktivních a neaktivních forem ABL a SRC. Když vědci ze společnosti Bristol-Myers-Squibb vyzkoušeli látku dasatinib, která byla původně vyvinuta jako inhibitor rodiny SRC, zjistili, že dasatinib je schopen inhibovat všechny imatinib rezistentní mutanty s výjimkou T315I (substituce threoninu isoleucinem) (Lombardo et al., 2004).

Dasatinib a nilotinib jsou látky, které byly poměrně rychle schváleny jako léčiva vhodná pro pacienty rezistentní nebo netolerující imatinib. Obě tyto látky vykazují dlouhodobou odpověď u recidivujících pacientů v chronické fázi onemocnění a mohou způsobovat vedlejší účinky (Druker, 2008).

Nilotinib

Nilotinib „Obr.5“ je derivát imatinibu, který je vysoce selektivním inhibitorem vůči ABL a je 30krát účinnější než imatinib. Chemický název této látky je 4-methyl-N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl(phenyl)-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-benzamidhydrochloridu a sumární vzorec je $C_{28}H_{22}N_7OF_3 \cdot HCl$. Nilotinib také inhibuje ARG, KIT, PDGFR α , PDGFR β , ale nepůsobí na SRC, na receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor a na receptor pro epidermální růstový faktor. Tato látka byla vyvinuta na základě studia krystalické struktury komplexu imatinib-ABL (Kantarjian et al., 2010).

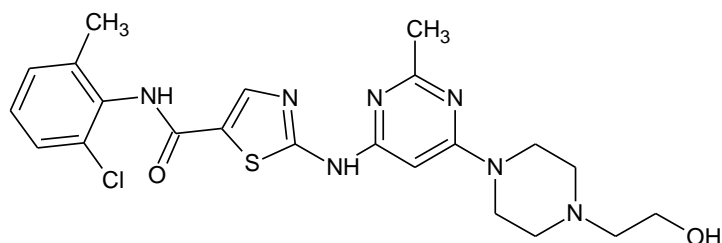


Obr.5 Strukturní vzorec nilotinibu.

Dasatinib

Jedná se o derivát thiazolkarboxamidu, jehož sumární vzorec je $C_{22}H_{26}C_1N_7O_2S$ a z chemické stránky se jedná o N-(2-chlor-6-methyl-fenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolkarboxamidu. Dasatinib „Obr.6“ je

selektivní kompetitivní inhibitor, který má za cíl větší počet tyrosinových kinas (ABL, BCR-ABL, KIT, PDGFR α , kinasy rodiny SRC). U kinasy BCR-ABL se váže na vazebné místo určené pro ATP, jak v neaktivní, tak v aktivní konformaci enzymu. Jelikož dasatinib při interakci s kinasou vytváří méně kontaktních míst, jsou jeho požadavky na tvar vazebného místa menší než u imatinibu, což tuto látku činí účinnější. Při srovnání účinnosti, u leukemické linie buněk obsahující nemutovanou BCR-ABL kinasu, bylo zjištěno, že dasatinib je 325krát účinnější než imatinib (Tokarski, 2006).



Obr.6 Strukturní vzorec dasatinibu.

3.4 ABC transportéry

Lidské ABC (ATP-binding cassette) transportéry tvoří největší rodinu transmembránových proteinů, které hrají velmi důležitou roli v mnoha buněčných procesech. Tyto proteiny se vyskytují v normální zdravé tkáni „Tab.3“, kde mohou fungovat jako transportéry peptidů, cholesterolu, sterolů, žlučových kyselin, retinoidů, léčiv, atd. Jejich zvýšená exprese na membránách nádorových buněk je jedním z faktorů přispívajících k MDR fenotypu. Na vzniku lékové rezistenci se podílí zejména proteiny ABCB1, ABCC1 a ABCG2 (Dean & Allikmets, 2001).

ABC proteiny fungují jako jednosměrné transportéry látek. Většinou se jedná o transport molekul z intracelulárního do extracelulárního prostředí buňky, ale existují i výjimky, kdy dochází např. k přenosu látek z jedné organely do druhé. Energii potřebnou k tomuto transportu získávají hydrolýzou páru molekul ATP. Přestože mezi nejčastější substráty patří hydrofóbní sloučeniny, jsou ABC transportéry schopné přenášet i ionty, peptidy a cukry. Funkční protein je složen z hydrofilních nukleotid vazebných domén (NBD), které jsou zodpovědné za vazbu molekul ATP a dále z hydrofóbních transmembránových domén (TMD), které obsahují vazebné místo pro substrát. Plně funkční transportérový protein obsahuje dvě transmembránové domény s 6 až 11 α -helixy procházející membránou a dvě nukleotid vazebné domény. Tyto čtyři domény mohou být kódovány pomocí jedné mRNA, ze které vzniká protein nazývaný kompletní transportér. V případě, že je protein kódován pomocí dvou mRNA, z nichž

každá kóduje pouze polovinu domén (2) jedná se o tzv. poloviční transportér. (Dean, 2009).

Analýza aminokyselinové sekvence nám umožňuje klasifikovat ABC geny do několika podrodin. V současné době je v lidském genomu známo 48 ABC transportérů, které se na základě aminokyselinové sekvence dělí do sedmi podrodin označovaných A-G, z nichž každá má několik zástupců, výjimkou je podrodina E. Většina těchto podrodin obsahuje geny, které jsou identické v oblasti transmembránových domén, mají stejné uspořádání genů a podobné umístění intronů. Skutečnost, že pět těchto podrodin bylo nalezeno v genomu kvasinek, naznačuje, že tyto geny vznikly na počátku evoluce eukaryot a byly zachovány. Typy substrátů, které ABC transportéry přenášejí, si mohou být v rámci různých podrodin bližší než ve stejné podrodině (Dean & Allikmets, 2001).

ABC geny jsou přítomny jak u prokaryot, tak u eukaryot. Například se nacházejí v genomech bakterií a archaebakterií, kde slouží k přísunu esenciálních molekul. V genomu kvasinek bylo nalezeno 29 ABC genů a většina z nich zde funguje jako transportér umožňující pohyb sloučenin buď z buňky nebo do intracelulárních organel (Dean & Allikmets, 2001).

Jedním z možných způsobů jak chránit buňku před vlivem toxinů (exogenní, endogenní), je exprese ABC transportérů. Proto se tyto proteiny vyskytují ve zdravé tkáni ve třech případech:

- a) Ve tkáních, kde probíhá sekrece a resorpce (střeva, ledviny, nadledviny, atd.). Vzhledem k tomu, že mnoho ABC transportérů se podílí na exkreci různých látek, není překvapující, že řada těchto proteinů se nachází v prsu a to zejména během laktace. Protein ABCG2 je vysoce exprimován v prsní žláze během těhotenství a kojení. Bylo prokázáno, že je zodpovědný za obohacení mléka o důležitou živinu riboflavin (vitamín B2) a jedná se tedy o první riboflavinový transportér zjištěný u savců. I další ABC proteiny, které se podílejí na transportu lipidů a cholesterolu, jsou exprimovány během laktace (van Herwaarden et al., 2007).
- b) Tam, kde je nutná ochrana orgánů (plod, pohlavní orgány, mozek, atd.). ABC transportéry se podílí na ochraně centrálního nervového systému před toxiny z krve. Mozek se pomocí hematoencefalické bariéry chrání před vlivem nebezpečných látek. Tato bariéra je tvořena endoteliálními buňkami malých cév, na jejichž membránách se nachází P-gp, který zabraňuje průchodu škodlivých látek skrz endothelium. P-gp se také podílí na ochraně plodu před vlivem toxinů (Gottesman et al., 2002).

c) V kmenových buňkách. Vývoj biologie kmenových buněk vedl k objevu takových kmenových buněk, které exprimují vysokou hladinu ABC transportérů. U hematopoetických kmenových buněk byla detekována vysoká hladina ABCG2 nebo ABCB1 transportérů, přičemž s postupující diferenciací je exprese těchto proteinů utlumena (Dean, 2009). U myši, u kterých byly vypnuty výše zmíněné geny, se neprojevily žádné negativní dopady na funkci kmenových buněk. Proto žádný z těchto genů není potřeba pro růst a zachování kmenových buněk. Nicméně se u těchto myši projevila vyšší citlivost na některé sloučeniny, jako je topotekan, vinblastin a mitoxantron, což dokazuje, že úkolem ABCG2 a ABCB1 genů je ochrana organismu a kmenových buněk před toxiny (Schinkel et al., 1994).

Tab.3 Tkáňová lokalizace a substráty ABC transportérů (Upraveno podle Gottesman et al., 2002).

Gen	Protein	Tkáň	Substrát
ABCA2	ABCA2	Mozek, monocyty	Estramustin
ABCB1	P-gp/MDR1	Střeva, játra, ledviny, placenta, hematoencefalická bariéra	Kolchicin, daunorubicin, doxorubicin, etoposid, vinblastin, paklitaxel
ABCB4	MDR2	Játra	Paklitaxel, vinblastin
ABCB11	BSEP/SPGP	Játra	Paklitaxel
ABCC1	MRP1	Všechny tkáně	Doxorubicin, daunorubicin, vinkristin, etoposid, kolchicin, metotrexát
ABCC2	MRP2/cMOAT	Játra, ledviny, střevo	Vinblastin, cisplatina, doxorubicin, metotrexát, ...
ABCC3	MRP3	Slinivka břišní, ledviny, střeva, játra, nadledvinky	Metotrexát, etoposid, teniposid, cisplatina
ABCC4	MRP4	Prostata, varlata, vaječníky, plíce, slinivka břišní, střeva	6-merkaptopurin a 6-thioguanin a metabolity, metotrexát
ABCC5	MRP5	Většina tkání	6-merkaptopurin a 6-thioguanin a metabolity
ABCC6	MRP6	Ledviny, játra	Etoposid
ABCG2	MXR/BCRP	Placenta, sřeva, prsa, játra	Mitoxantron, topotekan, doxorubicin, daunorubicin, imatinib, metotrexát

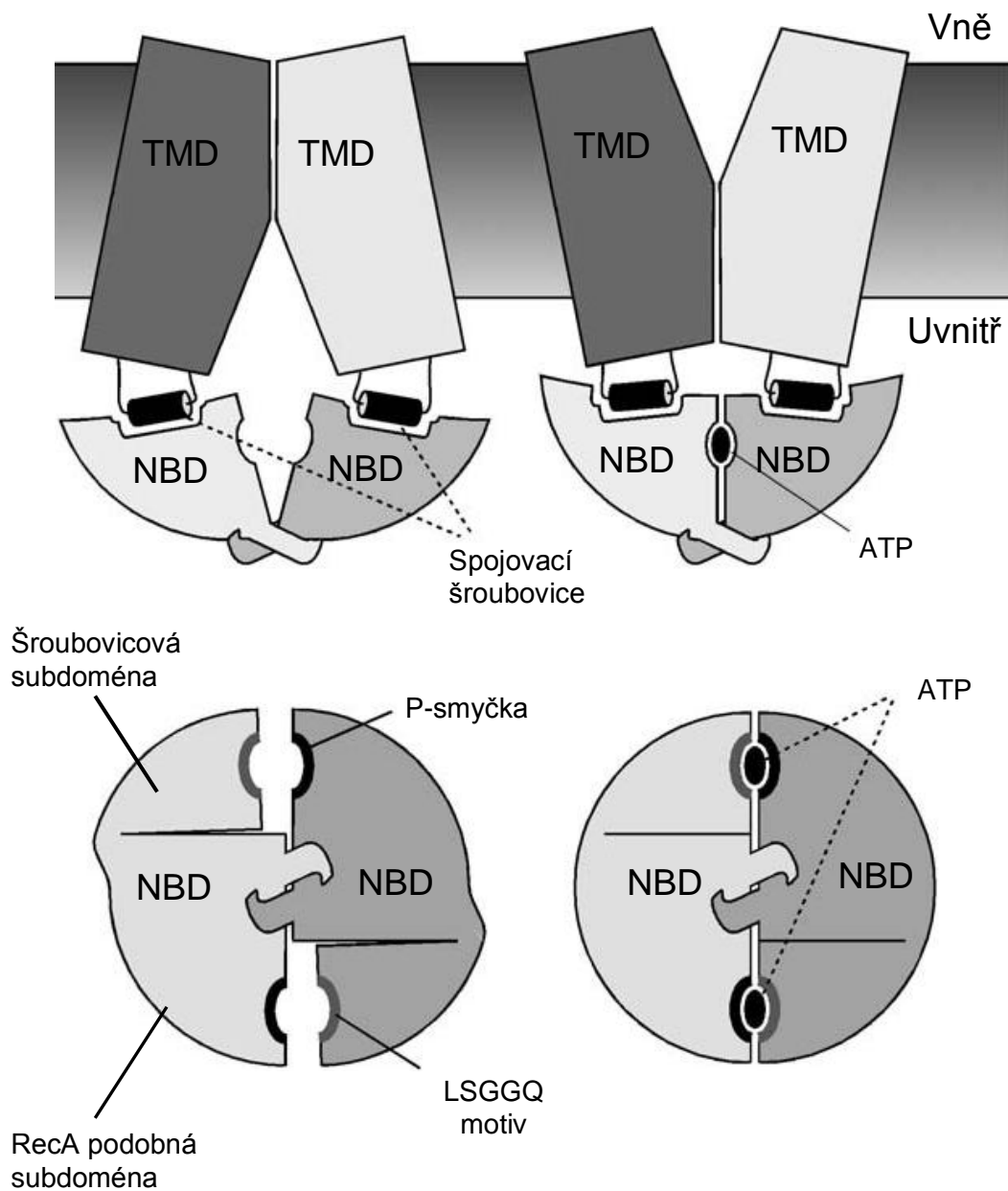
3.4.1 *Struktura a mechanismus transportu ABC transportérů*

V uplynulých letech byla pomocí rentgenové krystalografie odhalena kompletní struktura několika ABC transportérů. Tyto struktury naznačují mechanismus, jak vazba nebo hydrolýza molekul ATP pomocí cytoplazmatické NBD, může ovládat změnu konformace transmembránových domén a také, která strana membrány je translokaci vystavena. Existuje základní dvoufázový mechanismus „Obr.7“, kterým lze vysvětlit aktivní transport ABC importérů (pouze prokaryota) i exportérů (ve všech organismech) (Locher, 2009).

Nukleotid vazebná doména je konzervativní doména této proteinové rodiny, která může být považována za motor připojený k různým TMD. Nukleotid vazebné domény obsahují dvě subdomény. Jedna se funkčně podobá RecA (rekombinasa A) proteinům a druhá subdoména je šroubovicová. V nukleotid vazebných doménách existuje několik konzervativních sekvenčních motivů, z nichž všechny mají specifické funkce. Nejvýznamnější jsou P-smyčky (Walker A motiv) lokalizované v RecA podobných subdoménách a LSGGQ motiv (aminokyselinová sekvence), který se nachází ve šroubovicové subdoméně. V kompletním transportéru jsou dvě nukleotid vazebné domény sestaveny tak, že jejich motivy sdílí společné rozhraní v „head to tail“ uspořádání. Toto uspořádání generuje ATP vazebná a hydrolyzační místa mezi P-smyčkou jedné nukleotid vazebné domény a LSGGQ motivem druhé nukleotid vazebné domény. V nepřítomnosti nukleotidů je mezi doménami mezera a vazebná místa pro ATP jsou vyplněna vodou. V přítomnosti ATP se mezera uzavře a molekula je sevřena mezi dvěma NBD (Chen et al., 2003).

Krystalové struktury celé délky ABC transportérů nám poskytly informace o souvislosti ATP hydrolýzy s transportem. K efektivnímu propojení těchto dvou procesů je zapotřebí, aby došlo k přenosu molekulárního pohybu z nukleotid vazebných domén na domény transmembránové. Na rozhraní mezi těmito dvěma doménami se nachází konzervativní α -šroubovice, která je součástí TMD. Tato spojovací α -šroubovice zapadá do žlábků, který se nachází na hranici dvou subdomén. V přítomnosti ATP dochází k pohybu této šroubovice, který má za následek překlopení konformace transmembránových domén směrem ven. Ačkoliv je spojovací α -šroubovice architektonicky konzervativní motiv, k zachování její aminokyselinové sekvence nedochází (Locher, 2009).

Je všeobecně známo, že během jednoho cyklu transportu dochází ke spotřebě dvou molekul ATP. Samozřejmě existují i výjimky, kdy může být vlivem mutace zabráněno hydrolýze jedné z molekul ATP, jako je tomu u cystické fibrózy (Locher, 2009).



Obr.7 Konzervativní mechanismus spojování ABC transportérů. Molekulární pohyb vyvolaný vazbou ATP spouští uzavírání mezery mezi nukleotid vazebnými doménami. Přiblížením spojovacích šroubovic, které mají architektonicky zachované funkce, dochází k překlopení konformace transmembránových domén směrem ven. Hydrolýzou ATP dochází k uvolnění produktu hydrolýzy a převrácení konformace do původního stavu (otevřena směrem dovnitř) (Upraveno podle Locher, 2009).

3.4.2 Rezistentní nádorové buňky

Rezistence nádorových buněk je jednou z hlavních příčin, která brání úspěšnému vyléčení řady nádorových onemocnění. Rezistence může být pozorována ihned při prvním podání cytotoxické látky. V tomto případě se jedná o vrozenou nebo-li primární rezistenci. Pokud se nádorové buňky stanou k léčivu rezistentní až v průběhu léčby, mluvíme o tzv. získané nebo-li sekundární rezistenci (Simon & Schindler, 1994). To, že

nádor přestane odpovídat na specifickou léčbu, může být výsledkem několika mechanismů, které lze rozdělit do dvou obecných skupin (Gottesman, 2002).

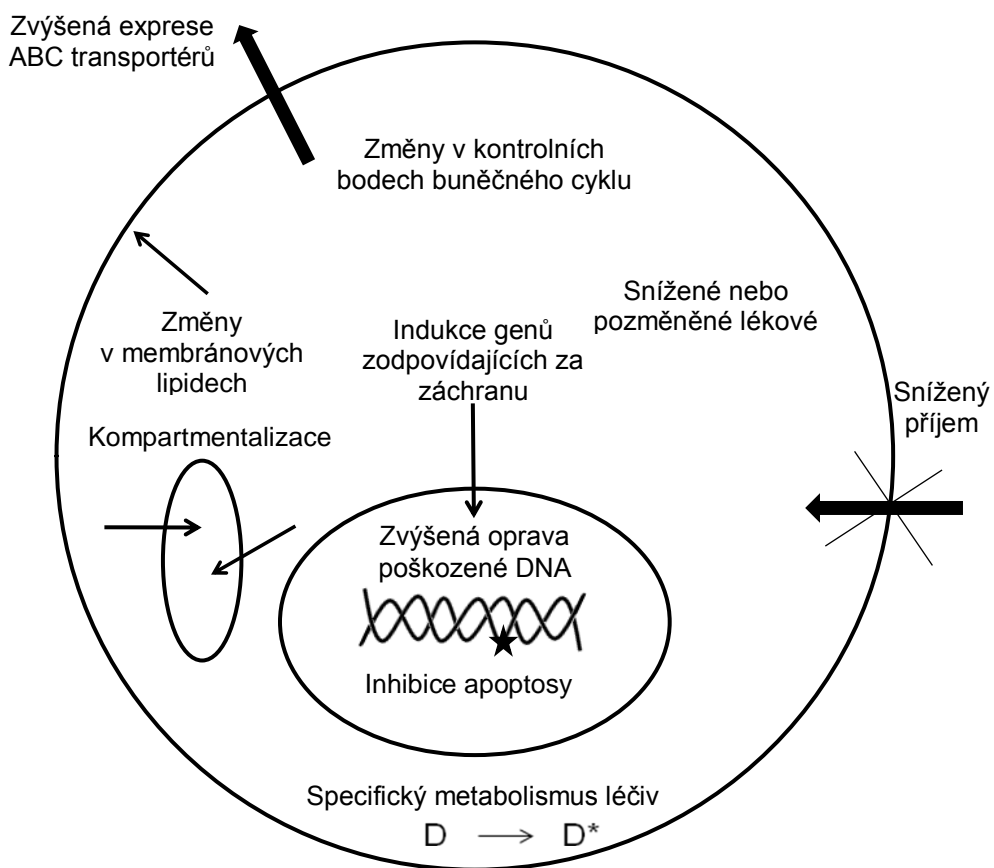
- a) Hostitelské faktory - špatná absorpce, rychlý metabolismus nebo vylučování léčiva, vedoucí ke snížené sérové hladině látky.
- špatná tolerance vedlejších účinků léčiva, zejména u starších pacientů, která má za následek snížení dávky pod optimální hladinu.
 - neschopnost dodat lék k požadovanému místu, což může nastat u objemných nádorů nebo u látek s vysokou molekulovou hmotností a sníženou penetrací do tkáně.
 - různé změny v hostitelském prostředí nádoru, které ovlivňují jeho samotnou reakci na léčbu, včetně metabolismu léků nenádorovými buňkami (Gottesman, 2002).
- b) Specifické genetické nebo epigenetické změny v nádorových buňkách (Gottesman, 2002).

Všechny zdravé buňky odpovídají na léčivo podobně, kdežto každá nádorová buňka reaguje na léčbu specifickým způsobem, který je zejména podmíněn vysokou frekvencí náhodných mutací. Výsledkem je, že každý nádor exprimuje celou řadu různých genů rezistence a ačkoliv jsou nádorové buňky klonálního původu vykazují značnou heterogenitu (Gottesman, 2002).

V uplynulých letech bylo vědci stanoveno několik různých mechanismů, kterými se nádorová buňka může stát rezistentní vůči cytotoxickým léčivům. Některé z těchto mechanismů, jako je zvýšená exprese lékového transportéru nebo mutace, vedou ke vzniku rezistence k několika málo podobným léčivům. Aby byla chemoterapie úspěšná, je v takovýchto případech dobré použít více léčiv s různými mechanismy účinku. Bohužel některé typy nádorů nejsou rezistentní pouze na jedno konkrétní léčivo, ale ztrácejí citlivost k celé řadě cytotoxických látek, které se mohou lišit ve struktuře, v mechanismu působení či v cíli, který mají zasáhnout. Taková rezistence se nazývá mnohočetná a je jednou z hlavních příčin, která brání úspěšnému vyléčení nádorových onemocnění (Simon & Schindler, 1994). MDR je výsledkem změn, které vedou ke snížené akumulaci léčiva uvnitř buňky vlivem omezeného příjmu, zvýšeného odtoku nebo ovlivnění membránových lipidů, „Obr.8“.

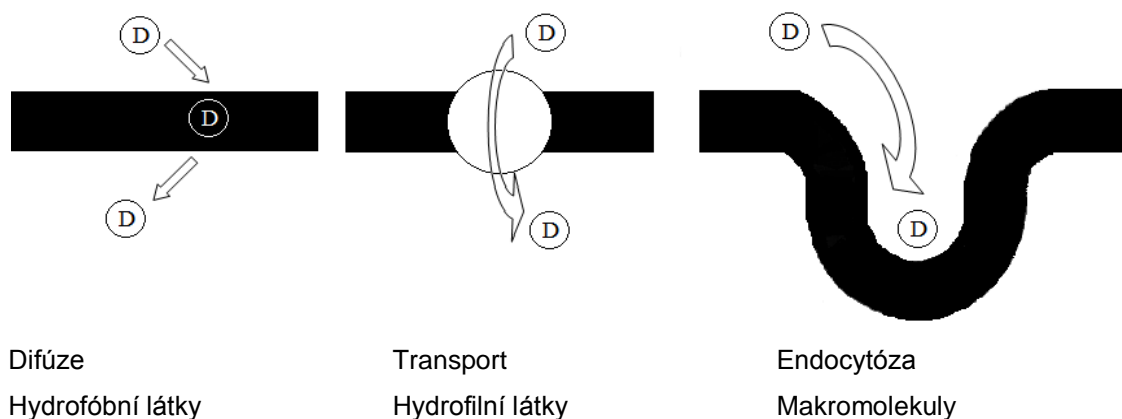
Tyto zvraty způsobují:

- a) Blokaci apoptosy, která je aktivovaná mnoha protinádorovými léčivy.
- b) Blokaci aktivace obecných mechanismů, které detoxikují léčiva nebo opravují poškozenou DNA.
- c) Změny v buněčném cyklu a kontrolních bodech, které způsobí, že nádorové buňky jsou relativně odolné vůči cytotoxickým účinkům léčiv (Gottesman, 2002).



Obr.8 Možné způsoby vzniku rezistentní nádorové buňky (Upraveno podle Gottesman, 2002).

Léčiva vstupují do buňky různými způsoby „Obr.9“ a každý z těchto mechanismů má svůj vlastní fyziologický význam, který byl podrobně prostudován na rezistentních mutantech vykazujících defekty v těchto drahách (Gottesman, 2002).

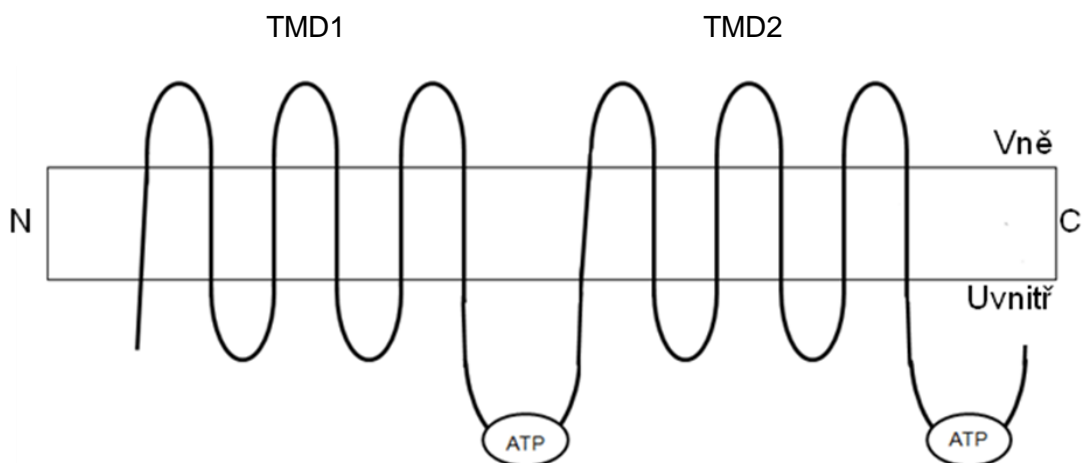


Obr.9 Možné mechanismy vstupu léčiv (D) do buňky (Upraveno podle Gottesman, 2002).

3.4.3 ABCB1 (P-gp)

Schopnost nádorových buněk získat primární či sekundární rezistenci k širokému spektru strukturně a funkčně odlišných chemoterapeutik je definována jako mnohočetná léková rezistence, která je přisuzována mnoha mechanismům. Jedním z nejlépe prostudovaných mechanismů je zvýšená přítomnost P-gp na povrchu membrán rezistentních buněk, který má za následek sníženou akumulaci léčiva uvnitř buňky. Tento protein byl objeven v roce 1976 Juliano a Lingem (Juliano & Ling, 1976).

P-gp je ATP dependentní transmembránová pumpa, která má typické vlastnosti charakteristické pro tzv. ABC transportní proteiny. P-gp je členem ABCB podskupiny, která má 11 členů. Jedná se o 170 kDa fosfoglykoprotein kódován *MDR1* genem, který se nachází na chromosomu 7q21. Tato bílkovina obsahuje 1280 aminokyselin a je složena ze dvou vzájemně propojených homologních polovin. Protein obsahuje N a C konce, které jsou důležité pro správnou funkci molekuly. Každá polovina obsahuje 6 transmembránových šroubovic a jedno vazebné místo pro ATP „Obr.10“. Vzájemná interakce mezi homologními polovinami je zprostředkována pomocí pružného spojovacího regionu (75 aminokyselin), který je potřebný pro správnou funkci molekuly (Ambudkar et al., 2003). Obrázky z kryoelektronové mikroskopie naznačují, že transmembránové domény vytvářejí na plazmatické membráně komory nálevkovitého tvaru, které jsou vyplněny vodou. Nukleotid vazebné domény jsou lokalizované v intracelulárním prostředí buňky a jsou dostatečně blízko u sebe, aby mohlo docházet ke vzájemným interakcím mezi těmito katalytickými místy (Rosenberg et al., 2005).



Obr.10 Struktura P-gp. Tento transportér je složen ze dvou transmembránových domén (TMD1 a TMD2), z nichž každá obsahuje 6 transmembránových šroubovic a jednu nukleotid vazebnou doménu.

P-gp se nachází i ve zdravé tkáni (epitelové buňky trávicího traktu, játra, ledviny, mozkové kapiláry, varlata, vaječníky, atd.), kde funguje jako bariéra pro vychytávání cizorodých látek a podporuje jejich vylučování. Data získána ze studií transgenních myší, u kterých byl vypnut *MDR1* gen, potvrzují, že P-gp se podílí na absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv (Schinkel, 1997). Nádory v těchto tkáních jsou primárně rezistentní, což má za následek, že pacient neodpovídá na léčbu již od počátku.

Chceme-li porozumět, jak může být dosaženo snížené akumulace léčiva uvnitř nádorové buňky, je potřeba zjistit, jak se látka do nitra buňky dostává. Existují dva mechanismy, které souvisí s povahou léčiva. Látky hydrofilní, čili ve vodě rozpustné (cisplatin, nukleosidové analogy a antifoláty), nemohou procházet samovolně skrz plazmatickou membránu. K jejich přenosu přes membránu dochází pomocí nosičů nebo transportérů. Látky hydrofóbní (vinblastin, vinkristin, doxorubicin, daunorubicin, etoposid, atd.) mohou prostupovat do buněk skrz membránu pomocí difúze. Pouze aktivace ATP dependentních transportérů může vést ke snížené intracelulární koncentraci léčiva (Ambudkar et al., 2003).

V lidském *MDR1* genu, který má přes 120 kb a obsahuje 28 exonů, se vyskytuje výrazné množství bodových polymorfismů, tzn. na specifickém místě genu dochází k záměně jedné báze (single nucleotide polymorphisms–SNPs). První zmínka o polymorfismech se objevuje v roce 1989 (Kioka et al., 1989), avšak první systematický screening byl uskutečněn až v roce 2000, který odhalil 15 různých SNP (Hoffmeyer et al., 2000). V současné době je známo více než 50 různých polymorfismů, které byly nalezeny v lidském *MDR1* genu. Největší význam mají ty polymorfismy, které ovlivňují substrátovou specifitu P-gp (Ambudkar et al., 2003).

3.4.3.1 Substráty P-gp

P-gp transportuje široké spektrum látek hydrofóbní či amfifilní povahy (přítomnost hydrofilní i hydrofóbní části), které jsou buď neutrální, nebo kladně nabitě. Záporně nabitě sloučeniny P-gp netransportuje. Molekulová hmotnost těchto látek se pohybuje v rozmezí od 250 Da do 1900 Da. Mutace, které ovlivňují substrátovou specifitu jsou převážně sdružené na 5, 6 a 11, 12 transmembránové doméně, ale také se vyskytují na jiných částech molekuly (Ambudkar et al., 1999). P-gp vykazuje rezistenci vůči velkému množství klinicky a toxikologicky významných sloučenin, které jsou uvedeny v „Tab.4“.

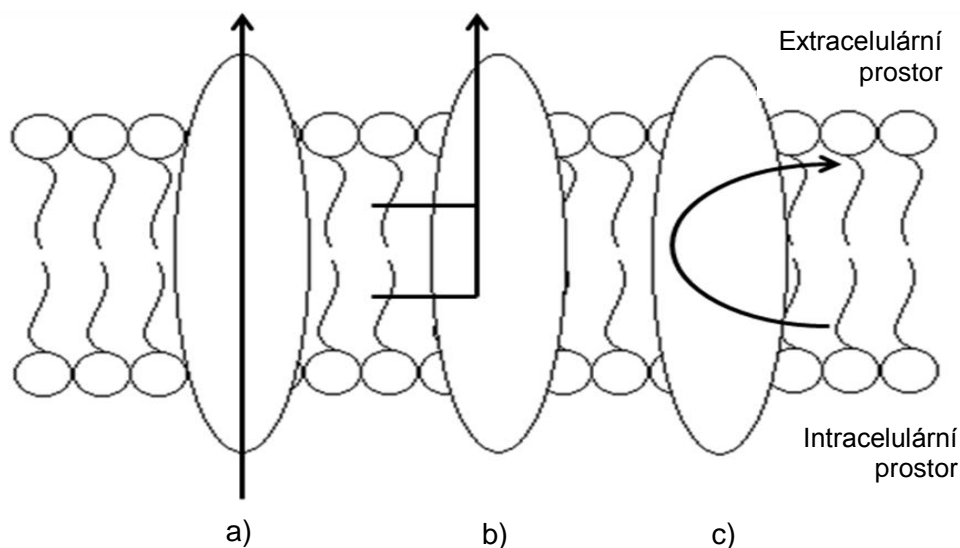
Tab.4 Substráty P-gp (Upraveno podle Ambudkar et al., 2003).

Substráty P-gp		Modulátory P-gp	
Vinca alkaloidy	Vinblastin Vinkristin	Antihypertenziva	Reserpin
Antracykliny	Daunorubicin Doxorubicin Epirubicin	Blokátory vápenatého kanálu	Verapamil Dihydropyridin
Antibiotika	Aktinomycin D Daktinomycin	Imunosupresanty	Cyklosporin A
Taxany	Paklitaxel	Steroidní hormony	Progesteron
Další cytotoxické látky	Mitomycin Kolchicin Puromicin Digoxin		

3.4.3.2 Mechanismus transportu

P-gp, jakožto plazmatický membránový protein, je ATPasa, která aktivně transportuje cytotoxická léčiva přes membránu. V historii byly navrženy tři hypotézy, které vysvětlují možné mechanismy transportu „Obr.11“. První hypotéza je tzv. hypotéza konvenčního transportu, která předpokládá, že transport substrátu z cytoplasmy do vnějšího prostředí probíhá skrz „vodní porus“, který má širokou substrátovou specifitu (Altenberg et al., 1994). Jelikož má většina substrátů P-gp schopnost interkalovat se mezi fosfolipidy membrán, byly navrženy další dvě hypotézy, které předpokládají, že léčivo je transportérem rozpoznáno už v membráně (jedná se o hypotézu hydrofóbního vakuového čističe a o tzv. flipázu). Hypotéza hydrofóbního

vakuového čističe předpokládá, že léčiva jsou transportována do vnějšího prostředí přímo z lipidové dvojvrstvy a nikoliv z cytoplasmy (Raviv et al., 1990). A u třetí hypotézy, která předpokládá, že P-gp pracuje jako tzv. flipáza, dochází k transportu substrátu z vnitřní strany lipidové dvojvrstvy na vnější (Higgins & Gottesman, 1992).



Obr.11 Možné mechanismy transportu P-gp. a) Hypotéza konvenčního transportu. b) Hydrofóbní vakuový čistič. c) Flipáza.

Hydrolyza ATP a transport látek je zprostředkován různými částmi proteinu a spolupráce těchto segmentů zajišťuje: 1) Hydrolyzu ATP v přítomnosti substrátu určeného k přepravě. 2) Transport substátu v případě uvolnění energie z ATP. 3) Dvě ABC jednotky jsou ve vzájemné shodě. Mnoho biochemických experimentů spolu se studii mutagenity objasnilo některé klíčové prvky týkající se mechanismu přenosu konformačního signálu uvnitř proteinu, jehož výsledkem je propojení ATPas a transportní cyklus (Sarkadi et al., 2006).

3.4.3.3 Inhibitory P-gp

Klasickým přístupem jak regulovat aktivitu P-gp je užití malých molekul, které zablokují P-gp a výsledkem jejich působení je efektivní akumulace cytotoxické látky uvnitř buňky. Látky, které jsou schopné u buněk s fenotypem mnohočetné lékové rezistence obnovit citlivost na cytotoxická léčiva jsou tzv. P-gp inhibitory či MDR modulátory. Vývoji inhibitorů, které jsou přírodní nebo syntetické povahy, je v posledních dvou desetiletích věnována značná pozornost, ale bohužel jen některé z nich dosáhly fáze klinických studií. Žádný však nedosáhl terapeutického využití. Hlavní příčinou neúspěchu je skutečnost, že většina těchto látek má nežádoucí vedlejší účinky dříve, než dosáhnou inhibičního účinku (Gottesman et al., 2002).

Doposud známe inhibitory lze z klinického hlediska rozdělit do tří generací, které mohou být podle inhibičního mechanismu posouzeny buď jako kompetitivní, nebo nekompetitivní. Kompetitivní inhibitory (první a druhá generace inhibitorů), jakožto substráty P-gp, soutěží s cytotoxickými léčivy o vazbu na P-gp. Pokud má inhibitor a cytotoxická látka podobnou afinitu k tomuto transportéru, pak je při vyšší koncentraci inhibitoru menší pravděpodobnost vazby léčiva na P-gp. Naopak čím vyšší je koncentrace cytotoxické látky, tím méně je inhibice účinnější. V případě, že má inhibitor nízkou afinitu k P-gp, je vysoká koncentrace této látky nezbytná pro dosažení inhibičního účinku. Nekompetitivní inhibitory nejsou substrátem P-gp. Tyto látky se ve srovnání se substráty vážou na jinou část bílkoviny, přičemž indukují její konformační změnu. Změna ve struktuře bílkoviny má za následek, že aktivní místo není substrátem rozpoznáno, což zabraňuje hydrolýze ATP a transportu léčiva skrz P-gp (Yang et al., 2008).

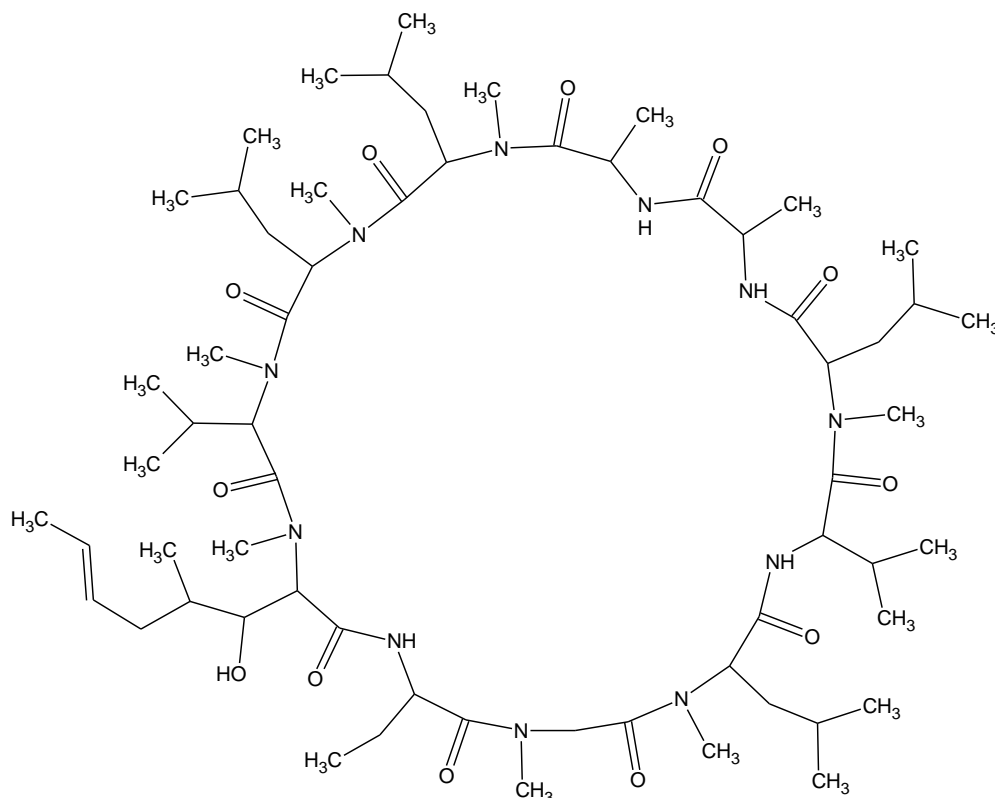
Inhibitory první generace

Do inhibitorů první generace spadají látky, které byly v klinické praxi využívány pro jiné farmakologické vlastnosti a nebyly vyvinuty speciálně pro obnovení citlivosti buněk exprimujících P-gp. Řadíme sem verapamil (blokátor Ca^{2+} kanálu), cyklosporin A (imunosupresivum), tamoxifen (antagonista estrogenových receptorů), atd. Tyto látky byly objeveny počátkem 80. let. Účinnost inhibitorů této generace byla prokázána na *in vitro* studiích, ale bohužel byly tyto látky málo efektivní, nespecifické a příliš toxické pro organismus. Vzhledem k tomu, že se většinou jedná o kompetitivní inhibitory s nízkou afinitou k transportéru, byla v *in vivo* podmínkách zapotřebí vysoká sérová koncentrace této látky, která navodila dostatečnou intracelulární koncentraci léčiva. Vysoké koncentrace jsou však kvůli toxickým vlastnostem pro nemocného pacienta neúnosné. Tyto látky poskytují při *in vivo* klinických studiích neuspokojivé výsledky a to zejména v důsledku jejich závažných vedlejších účinků a toxicitě. Kromě toho jsou tyto látky substráty jiných transportérů a enzymových systémů, což má za následek nepředvídatelné farmakokinetické interakce v přítomnosti chemoterapeutik (Krishna & Mayer, 2000).

Cyklosporin A

Cyklosporin A (CsA) „Obr.12“ je cyklický peptid složený z 11 aminokyselin s vysoce imunosupresivními účinky. Jelikož tato látka interaguje s běžnými vazebnými místy P-gp, na které se vážou Vinca alkaloidy a verapamil, brání tak vazbě protinádorových léčiv a stává se inhibitorem tohoto transportéru. Nevýhodou je, že

dávky potřebné pro zvrácení MDR jsou toxické a mají postranní vedlejší účinky (Saeki et al., 1993).



Obr.12 Strukturální vzorec cyklosporinu A.

Inhibitory druhé generace

Inhibitory této generace překonávají omezení inhibitorů první generace a lze je rozdělit do dvou skupin: a) Analoga inhibitorů první generace – např. valspodar (analog CsA). b) Látky s novými chemickými strukturami – biricodar. Tyto látky jsou od předchozí generace více účinnější, specifitější a méně toxické, ale přesto mají stále vlastnosti, které limitují jejich klinické využití (zejména zpomalují metabolismus a vylučování cytotoxických látek). Některé inhibitory druhé generace jsou zároveň substrátem cytochromu P450 3A4 (isoenzym). Jelikož se tento enzym podílí na metabolismu léků, je obtížné určit bezpečnou, ale účinnou dávku inhibitoru souběžně s cytotoxickým léčivem tak, aby nedocházelo k nepředvídatelným farmakokinetickým interakcím, které by ohrožovaly zdraví pacienta. Inhibitory této generace regulují aktivitu i jiných členů ABC transportérů, které se u zdravých buněk a tkání mohou podílet na ochraně organismu před cytotoxickými látkami (Thomas & Coley, 2003).

Valspodar

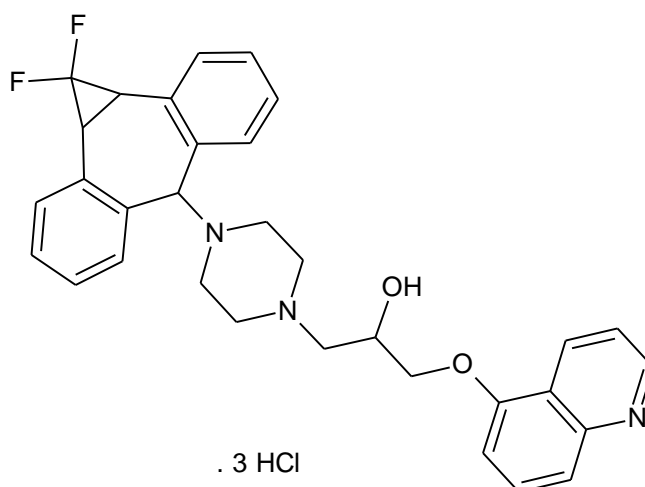
Valspodar (PSC 833) je velmi účinný inhibitor P-gp, který je asi 10krát účinnější než cyklosporin A, od kterého je odvozen. Jelikož tato látka není nefrotoxická a nemá imunosupresivní účinky, je pro pacienty bezpečnější, ale i přesto vyžaduje valspodar redukci dávek chemoterapeutik (Fischer et al., 1998).

Inhibitory třetí generace

Vzhledem k tomu, že užívání inhibitorů předchozích generací je kvůli jejich vedlejším účinkům nevýhodné, byly vyvinuty inhibitory třetí generace, které jsou ve fázi testování a jsou nadějí pro budoucí léčbu. Patří sem zosuquidar, laniquidar, tariquidar, atd. Látky spadající do třetí generace fungují jako nekompetitivní inhibitory, které mají minimální vliv na ostatní členy rodiny ABC transportérů a neovlivňují cytochrom P450 3A4. (Thomas & Coley, 2003)

Zosuquidar

Zosuquidar.3HCl (ZSQ) „Obr.13” je vysoce účinný a vysoce selektivní modulátor P-gp, který obnovuje citlivost buněk, jejichž rezistence je založena na zvýšené expresi P-gp. Předklinické studie prokázaly, že má tato látka minimální efekt na farmakokinetický profil současně podávaných substrátů P-gp (doxorubicin, paklitaxel, etoposid), a že neinhibuje další členy rodiny ABC transportérů (Cripe et al., 2010).



Obr.13 Strukturní vzorec zosuquidaru.3 HCl

3.4.4 ABCC1 (MRP1)

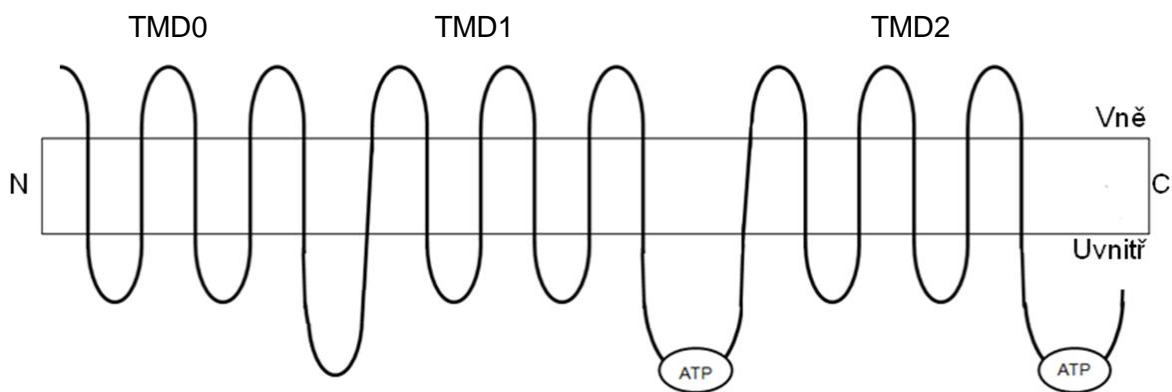
ABCC1 nebo-li MRP1 (multidrug resistance protein) spadá do ABCC podskupiny transportních proteinů, která má 13 členů, přičemž 9 z nich se řadí mezi tzv. multidrug resistance protein (MRP1-MRP9). Tento protein byl poprvé identifikován u buněk, které nevykazovaly zvýšenou expresi P-gp, ale byly rezistentní na doxorubicin (Cole et al., 1992). Později byl MRP1 nalezen v mnoha rezistentních buněčných liniích a nádorových tkáních. Jedná se o 190 kDa fosfoglykoprotein, který je kódován *MRP1* genem na chromosomu 16p13.1 (Bakos & Homolya, 2007).

MRP1 má stejně jako P-gp širokou substrátovou specifitu a může se podílet na vzniku mnohočetné lékové rezistence. Na rozdíl od P-gp zprostředkovává MRP1 transport látek, které jsou konjugovány s glutathionem, kyselinou glukuronovou nebo sulfátem (Bakos & Homolya, 2007).

Tento protein obsahuje 1531 aminokyselin a jejich sekvence napovídá, že MRP1 má strukturu podobnou ostatním ABC transportérům a stejně jako P-gp obsahuje dvě cytoplazmatické nukleotid vazebné domény. Na rozdíl od P-gp obsahuje MRP1 17 hydrofóbních transmembránových šroubovic. Funkce nadbývajících pěti transmembránových šroubovic není zatím jasná, ale předpokládá se, že tato část není důležitá pro katalytickou funkci, neboť její delecí nedošlo k narušení aktivity proteinu. MRP1 protein se odlišuje od P-gp tím, že kromě dvou tandemově řazených transmembránových domén (TMD1 a TMD2) a dvou nukleotid vazebných domén obsahuje třetí N-terminální TMD0, která je napojena na TMD1 pomocí intracelulárního linkeru „Obr.14“ (Bakos et al., 1998).

MRP1 je protein přítomný ve všech tkáních, který se podílí na jejich ochraně před toxickými účinky xenobiotik a oxidativním stresem. Nejvyšší exprese tohoto proteinu je detekována v plicích, varlatech, ledvinách, v srdci a placentě. V mozku a v tenkém a tlustém střevě je exprese mírnější (Bakos & Homolya, 2007). Jelikož se většina těchto tkání podílí na ochraně organismu, je překvapující, že v játrech, která jsou pokládána za hlavní orgán zodpovědný za metabolismus xenobiotik a detoxikaci, je hladina tohoto proteinu velmi nízká. Je však zajímavé, že v místech, kde dochází k regeneraci poškozené tkáně jater, je exprese zvýšena (Ros et al., 2003).

Bylo prokázáno, že MRP1 je zodpovědný za MDR u několika lidských maligních onemocnění (např. různé formy leukemie, nádory prsu, plic, prostaty atd.) (Bakos & Homolya, 2007).



Obr.14 Struktura MRP1. Tento protein obsahuje 17 transmembránových šroubovic a 2 nukleotid vazebné domény.

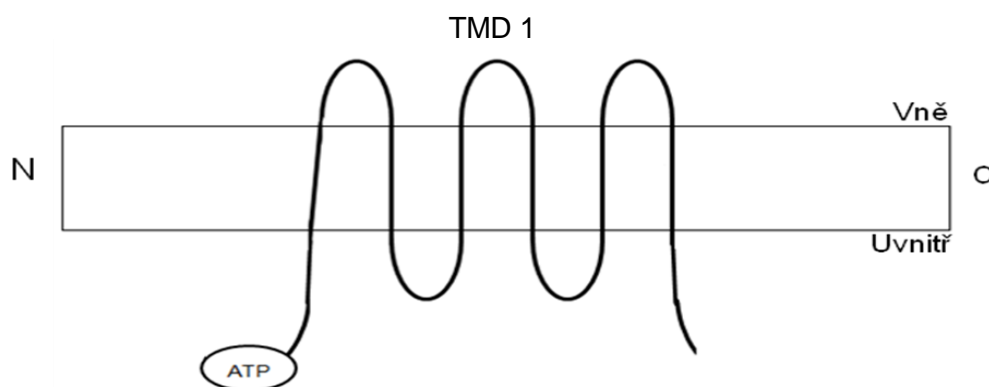
3.4.5 ABCG2 (BCRP)

ABCG2 protein spadá do ABCG podskupiny, která má několik zástupců (ABCG1-ABCG8). Protein ABCG1 se podílí na regulaci homeostázy buněčných lipidů, včetně cholesterolu a fosfolipidů. O ABCG5 a ABCG8 proteinech je známo, že pracují jako heterodimery a transportují různé deriváty cholesterolu. Unikátní vlastností podskupiny G je, že nukleotid vazebná doména se na rozdíl od ostatních skupin nachází před transmembránovou doménou, což naznačuje, že i transportní mechanismy této podskupiny by mohly být jiné než u ostatních ABC transportérů (Mao & Unadkat, 2005).

Při léčbě pokročilého karcinomu prsu dochází často ke vzniku rezistence k většímu počtu chemoterapeutik. Bylo zjištěno, že ABCG2 protein má na této rezistenci významný podíl. Tento glykoprotein „Obr.15“, který obsahuje 655 aminokyselin, obsahuje jednu ATP vazebnou doménu a 6 transmembránových šroubovic (tzv. poloviční transportér). Bylo zjištěno, že se jedná o 72 kDa membránový protein, který byl nezávisle na sobě naklonován ve třech laboratořích a dostal tak různé názvy (Mao & Unadkat, 2005). ABCG2 protein získaný selekčním působením na buňky získané z rakoviny prsu se nazývá BCRP (breast cancer resistance protein) (Doyle et al., 1998). cDNA získaná z buněk, které byly pod selekčním tlakem látky mitoxantrone v přítomnosti verapamilu (kvůli blokaci funkce P-gp), kóduje mitoxantrone rezistentní protein (MXR) (Miyake et al., 1999). ABCP (placenta specific ABC protein) je třetí možný název tohoto proteinu, ze kterého je možné odvodit, že BCRP funguje jako ochrana plodu před cytotoxickými látkami (Allikmets et al., 1998). Studie naznačují, že BCRP by mohl fungovat jako homodimer či homotetramer, jehož zvýšená exprese je spojena s rezistencí vůči protinádorovým lékům (antracykliny, mitoxantrone, topotecan) a vede k jejich snížené intracelulární koncentraci (Mao & Unadkat, 2005).

Zvýšené množství BCRP je zaznamenáno ve velké míře jak u hematologických malignit (leukemie), tak u solidních nádorů (karcinom jícnu, velkobuněčný karcinom plic) (Nooter et al., 1995).

Studie v posledních letech prokázaly, že BCRP transportuje širokou škálu látek od chemoterapeutik až po záporně nabitě organické konjugáty. Substrátová selektivita tohoto transportéru souvisí s aminokyselinou na pozici 482, tzn. že mutace v tomto místě může vést ke změně substrátové specifity (Robey et al., 2003).



Obr.15 Struktura BCRP. Tento protein je tzv. poloviční transportér, který obsahuje 6 transmembránových šroubovic a jednu nukleotid vazebnou doménu. Aby tento poloviční transportér mohl poskytnout plně funkční molekulu musí vytvářet homo či heterodimery.

4. Experimentální část

4.1 *Materiál a metody*

4.1.1 *Buněčné linie*

Buněčná linie K562

Buněčná linie K562 byla odvozena od lidských buněk, které vykazovaly CML. Tato linie je charakteristická tzv. philadelphským chromosomem, který kóduje fúzní BCR-ABL tyrosin kinasu, jež má onkogenní aktivitu (Sawyers, 1999). Tato linie byla získána z ECACC (European Collection of Cell Cultures, Velká Británie).

Buněčná linie K562/DOX

Buněčná linie K562/DOX má fenotyp mnohočetné lékové rezistence, díky zvýšené expresi P-gp. Tato linie byla získána ze senzitivních buněk K562 dlouhodobou selekcí na postupně se zvyšující koncentraci doxorubicinu. Profesor J. P. Marie (University of Paris 6, France) poskytl tuto linii naší laboratoři.

Buněčná linie K562/HHT

Buněčná linie K562/HHT má fenotyp mnohočetné lékové rezistence, díky zvýšené expresi P-gp. Tato linie byla získána ze senzitivních buněk K562 dlouhodobou selekcí na postupně se zvyšující koncentraci homoharringtoninu. Profesor J. P. Marie (University of Paris 6, France) poskytl tuto linii naší laboratoři.

Všechny výše zmíněné buněčné linie byly kultivovány ve standardním růstovém RPMI-1640 médiu, které je obohacené o antibiotika (penicilin, streptomycin) a 10% FBS (fetální bovinní sérum). Kultivace probíhá v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a veškerá manipulace je prováděna za sterilních podmínek.

4.1.2 *Chemikálie*

Cyklosporin A:	(Axxora, USA)
Daunorubicin:	(Sigma-Aldrich, USA)
Imatinib:	Dar (Novartis Pharmaceuticals corporation, Švýcarsko)
Valspodar:	Dar (Novartis Pharmaceuticals corporation, Švýcarsko)
Zosuquidar:	Dar (NKI-AVL, Holandsko)

4.1.3 Roztoky

1x PBS:	130 mM NaCl
	10 mM NaH ₂ PO ₄ · 7H ₂ O
	2,7 mM KCl
	1,8 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4

4.1.4 Stanovení počtu živých a mrtvých buněk

Zastoupení živých a mrtvých buněk je monitorováno pomocí přístroje Vi-CELL™XR, což je analyzátor, který hodnotí viabilitu buněk na základě propustnosti cytoplasmatické membrány a jako indikátor využívá trypanovou modř. Trypanová modř je barvivo, které má v roztoku náboj, proto není schopno projít skrz intaktní membránu živých buněk a ty zůstávají bezbarvé. Mrtvé buňky mají porušenou integritu membrány, což vede k jejich rychlému obarvení na modro. Výsledkem této analýzy je počet buněk na mililitr a jejich viabilita v procentech.

4.1.5 Stanovení buněčné proliferace a viability

Ke stanovení buněčné proliferace a viability *in vitro* je využíván standardní MTT test. (Mosman, 1983) Živé buňky jsou schopné pomocí produktů dehydrogenas redukovat žlutou rozpustnou tetrazoliovou sůl MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na nerozpustný formazán, jehož vzniklé množství je přímo úměrné počtu živých buněk. Obsah formazánu se stanovuje spektrofotometricky.

K buněčné suspenzi (1,5 ml) přidáme 150 µl MTT (5 mg/ml MTT, Duchefa, Holandsko). Po inkubaci (1 h, 37 °C) je buněčná suspenze zcentrifugována (3000 ot./min, 5 min, laboratorní teplota) a ze vzniklého sedimentu buněk je pomocí okyseleného ethanolu (96% (v/v) EtOH, 0,04 M HCl) extrahován formazán. Po centrifugaci (18000 ot./min, 5 min, laboratorní teplota) se ve vzniklém supernatantu stanovuje spektrofotometricky při 570 nm množství vzniklého formazánu.

4.1.6 Analýza buněčného cyklu

Tato metoda nám u buněk umožňuje stanovit relativní zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu na základě množství DNA. K analýze byla použita průtoková cytometrie, která je schopna pomocí fluorescenčního barviva (nejčastěji propidium jodid), stanovit obsah jaderné DNA. Po navázání barviva na DNA dochází ke zvýšení fluorescence, která je ve výsledku přímo úměrná množství DNA. Rovněž lze touto

metodou odhadnout počet apoptotických buněk, které jsou charakteristické výrazně sníženým obsahem jaderné DNA (tzv. hypoploidní DNA).

Buněčnou suspenzi fixujeme roztokem 70% EtOH/30% 1x PBS (v/v). Fixované buňky (1 h, -20 °C) jsou zcentrifugovány (2400 ot./min, 5 min, laboratorní teplota) a vzniklý sediment je rozsuspendován v 0,5 ml Vindalova roztoku (1x PBS obsahující 200 µg/ml Rnasy A, 20 µg/ml propidium jodidu, 0,1% (v/v) tritonX-100) a inkubován 30 min při laboratorní teplotě. Následně je vzorek změřen na průtokovém cytometru, jehož výsledkem je histogram ukazující relativní zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

4.1.7 Analýza exprese P-gp

Buňky byly sedimentovány a lyzovány v pufru [50 mM Tris/HCl pufr pH 8,1, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM pyrofosfát sodný, 1% (w/v) Nonidet P40, doplněno směsí inhibitorů proteas (Roche Applied Science, Německo) a fosfatas (Sigma-Aldrich, USA)] po dobu 30 min na ledě. Buněčné extrakty byly zcentrifugovány (18000 ot./min, 10 min, 4 °C) a následně smíchány s 4x Laemmli puftrem (0,31 M Tris/HCl, 50% glycerol, 4% SDS, 5% 2-merkptoethanol, 0,05% bromfenolová modř). Vzorky byly zahřáty na 96 °C (5 min) a metodou Bradfordové byl spektrofotometricky stanoven obsah proteinů.

Vzorky obsahující stejné množství proteinů (30 µg) byly separovány elektroforézou, která byla prováděna v 10% SDS-polyakrylamidovém separačním gelu a 5% zaostřovacím gelu. Poté byly proteiny transportovány na nitrocelulosovou membránu. Membrány byly blokovány v 5% mléku v 1x PBS s 0,1% Tween. Proteiny byly detekovány pomocí myší monoklonální protilátky rozlišující P-gp (ředění 1:1500) (Sigma-Aldrich, USA) a následně pomocí sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou (ředění 1:10000) (Dako, Dánsko). Vizualizace byla provedena pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL (Amersham, Velká Británie). Jako referenční gen byl použit β-aktin, který byl detekován pomocí králičí monoklonální protilátky (ředění 1:1000) (Cell Signaling Technology, USA) a následně pomocí sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou (ředění 1:1000) (Dako, Dánsko).

4.1.8 Měření kaspasové aktivity v buněčných extraktech

Kaspasa-3 je enzym, který se účastní procesu apoptosy, a jeho aktivitu lze detekovat pomocí fluorescenčně značeného substrátu Ac-DEVD-AMC.

Buňky byly promyty v 1x PBS a lyzovány lyzačním roztokem [50 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,2% Chaps a koktejl inhibitorů proteas, (Roche Applied Science, Německo)] po dobu 20 min při 4 °C. Lyzáty byly

zcentrifugovány (15 min, 30000 g). Samotný test byl proveden v 96-ti jamkových destičkách. Část lyzátu obsahující 25-50 µg proteinu se promíchá s 200 µl pufru (25 mM PIPES/KOH, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,3). Reakce je zahájena přidáním 50 µl substrátu Ac-DEVD-AMC (50 µM). Vzorky byly inkubovány (30 min, 30 °C) a následně byla stanovena fluorescence při 360/465 (excitační/emisní) nm. V přítomnosti 1 µM inhibitoru kaspasy-3 (Ac-DEVD-CHO) docházelo k nespecifickým štěpením substrátu, a proto byla tato hodnota odečtena od každé naměřené aktivity.

4.1.9 *Jaderná morfologie*

Jádra intaktních a apoptotických buněk se liší. U apoptotických buněk dochází ke kondenzaci chromatinu a k tvorbě apoptotických tělísek, kdežto u buněk živých je chromatin homogenní. Jádra buněk je možné obarvit pomocí fluorescenční látky propidium jodid, která se váže na nukleové kyseliny.

Fixované buňky obarvíme pomocí barvicího roztoku, který obsahuje 1 µg/ml propidium jodidu, 20 % (v/v) glycerinu, 80 % (v/v) 1x PBS. Jádra takto obarvených buněk mohou být po nanesení na podložní sklíčko (15 µl) pozorována pomocí fluorescenčního mikroskopu.

4.1.10 *Stanovení intracelulární koncentrace léčiva ve tkáňových kulturách*

a) Stanovení intracelulární koncentrace daunorubicinu.

Buněčná suspenze o hustotě 0,4x10⁶ buněk/ml (10 ml), která byla 4 h inkubována v růstovém médiu s Drb, se nanese na 1,5 ml vychlazeného silikonového oleje (hustota: 1,035 g/ml, Sigma-Aldrich, USA). Tento vzorek se zcentrifuguje (5000 ot./min, 10 min, 22 °C). Buňky na rozdíl od média projdou při centrifugaci silikonovým olejem, což nám umožní extrahovat léčivo pouze z buněk a nikoliv z média. Po odstranění supernatantu je Drb ze sedimentu buněk extrahován různými objemy (200-1200 µl) extrakčních roztoků: a) 1% (w/v) kyselina mravenčí + 50% (v/v) methanol ve vodě, b) 1% (w/v) kyselina mravenčí + 50% (v/v) ethanol ve vodě, c) 0,1 M hydroxid sodný, který byl neutralizován stejným objemem 3% (w/v) kyseliny mravenčí v methanolu, d) 10% dodecylsulfát sodný (při pokojové teplotě). Zlyzované buňky jsou odstraněny centrifugací (18000 ot./min, 10 min, 4 °C) a čistý buněčný extrakt je následně analyzován pomocí HPLC/MS/MS na koloně s C₁₈ reverzní fází. Detailní popis analýzy je uveden v publikaci (Krumphochova et al., v tisku).

b) Stanovení intracelulární koncentrace imatinibu.

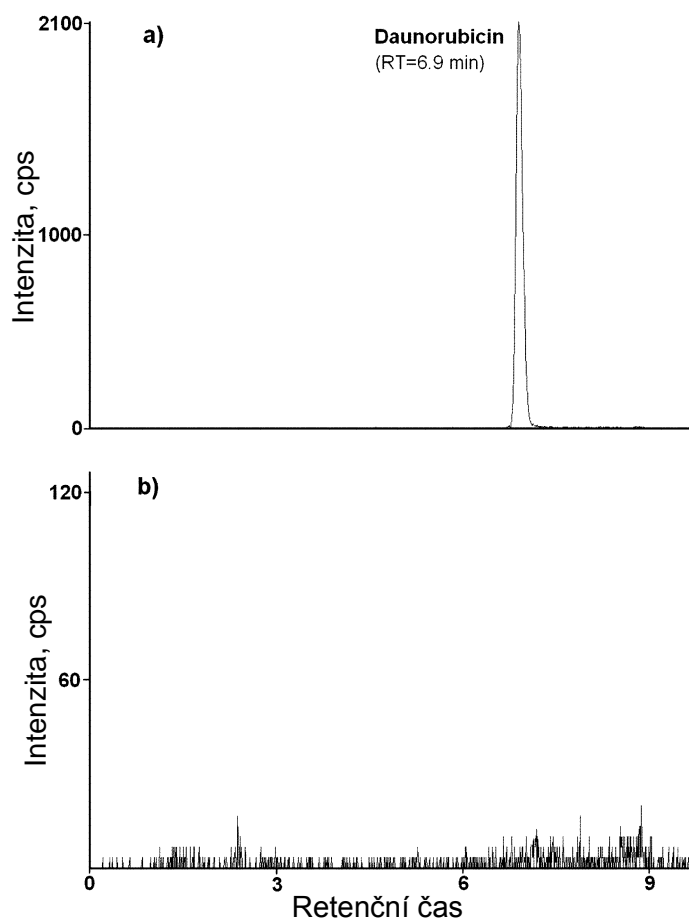
Buněčná suspenze o hustotě $0,4 \times 10^6$ buněk/ml (10 ml), která byla 4 h inkubována s imatinibem, se nanese na vrstvu silikonového oleje (hustota: 1,035 g/ml). Tento vzorek se zcentrifuguje (5000 ot./min, 10 min, 24 °C). Po odstranění supernatantu je imatinib ze sedimentu buněk extrahován pomocí 400 µl vychlazené 4% (w/v) kyseliny mravenčí. Zlyzované buňky jsou odstraněny centrifugací (18000 ot./min, 10 min, 4 °C) a čistý buněčný extrakt je analyzován pomocí HPLC/MS/MS. Detailní popis analýzy je uveden v publikaci (Mlejnek et al., 2011).

4.2 Výsledky

4.2.1 Stanovení intracelulárního obsahu Drb pomocí HPLC/MS/MS

Kombinace vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) a tandemové hmotnostní spektrometrie představuje výkonnou analytickou metodu, která je vysoce specifická a citlivá. HPLC/MS/MS se stala standardní metodou pro monitorování protinádorových léčiv v tělních tekutinách. Proto jsme se rozhodli aplikovat tuto metodu pro stanovení intracelulárních hladin Drb v senzitivních a rezistentních leukemických buňkách.

Hladina Drb byla stanovována v extraktech K562 buněk, které byly inkubovány (4 h, 37 °C) v přítomnosti této látky „Obr.16a“. Extrakty, které byly inkubovány v nepřítomnosti Drb byly považovány za kontrolní „Obr.16b“. Následnou analýzou bylo zjištěno že retenční čas Drb je $6,9 \pm 0,06$ min. V případě analýzy buněčného extraktu bez Drb nebyly v blízkosti retenčního času Drb pozorovány žádné významné interference endogenních látek.



Obr.16 HPLC/MS/MS chromatogramy buněčných extraktů v MRM (multiple reaction monitoring) módu. a) Extrakt získaný z K562 buněk inkubovaných (4h) ve standardním růstovém médiu s přidavkem 0,1 μ M Drb. b) Extrakt získaný z buněk K562 inkubovaných (4h) ve standardním růstovém médiu bez přidavku Drb.

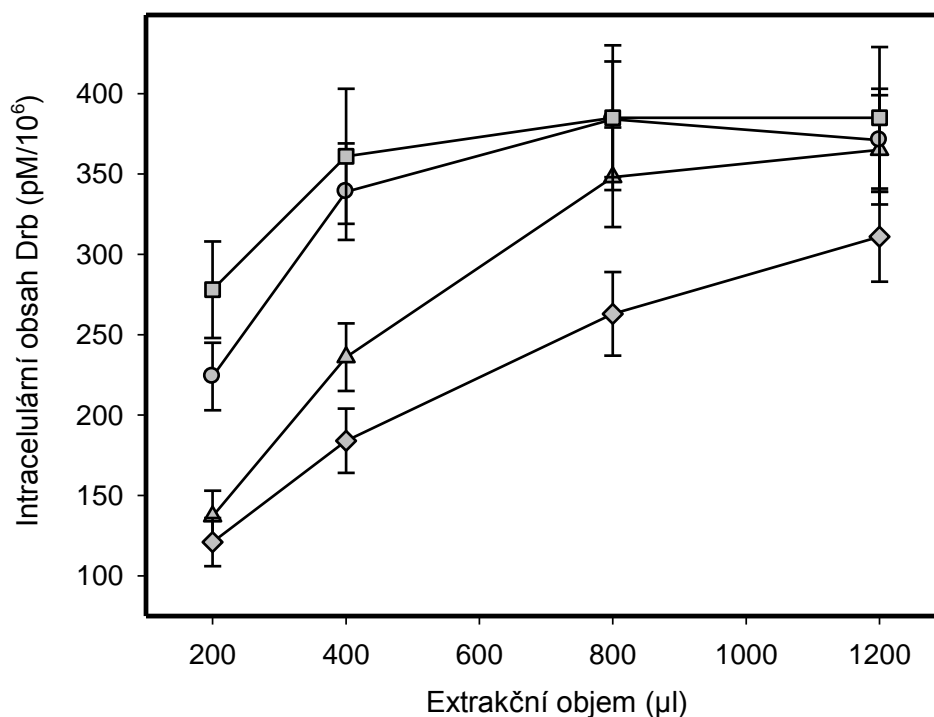
4.2.2 Validace metody

Validace metody je podrobně uvedena v naší publikaci (Krumpochova et al., v tisku).

4.2.3 Vliv složení extrakčního roztoku na účinnost extrakce Drb

Účinnost jednotlivých extrakčních roztoků byla studována na K562 buňkách. Buňky byly inkubovány v růstovém médiu v přítomnosti 1 μ M Drb (4 h, 37 °C). Po inkubaci byly buňky odděleny od média pomocí silikonového oleje a následně byl sediment buněk extrahován různými objemy extrakčních činidel: a) 1% (w/v) FA + 50% (v/v) MeOH/voda, b) 1% (w/v) FA + 50% (v/v) EtOH/voda, c) 0,1 M NaOH, které bylo neutralizováno stejným objemem 3% (w/v) FA v MeOH, d) 10% SDS (při pokojové teplotě). Z „Obr.17“ je patrné, že k účinné extrakci dochází až při použití relativně velkého objemu extrakčního roztoku. Při malých objemech zůstává Drb vázán na DNA,

což potvrdila i analýza jader extrahovaných buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu (není ukázáno). Nejúčinnějšími extrakčními roztoky jsou 10% SDS a 1% (w/v) FA v 50% (v/v) EtOH/voda, méně účinný je 1% (w/v) FA v 50% (v/v) MeOH/voda a nejméně účinný je 0,1 M NaOH.



Obr.17 Vliv složení a objemu extrakčního roztoku na účinnost extrakce Drb. Drb byl extrahován různými objemy (200, 400, 800 a 1200 μl) a různými roztoky: a) 1% (w/v) FA + 50% (v/v) MeOH/voda (trojúhelníky); b) 1% (w/v) FA + 50% (v/v) EtOH/voda (kroužky); c) 0,1 M NaOH + neutralizován stejným objemem 3% (w/v) FA v MeOH (kosočtverce); d) 10% SDS, při pokojové teplotě (čtverce). Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

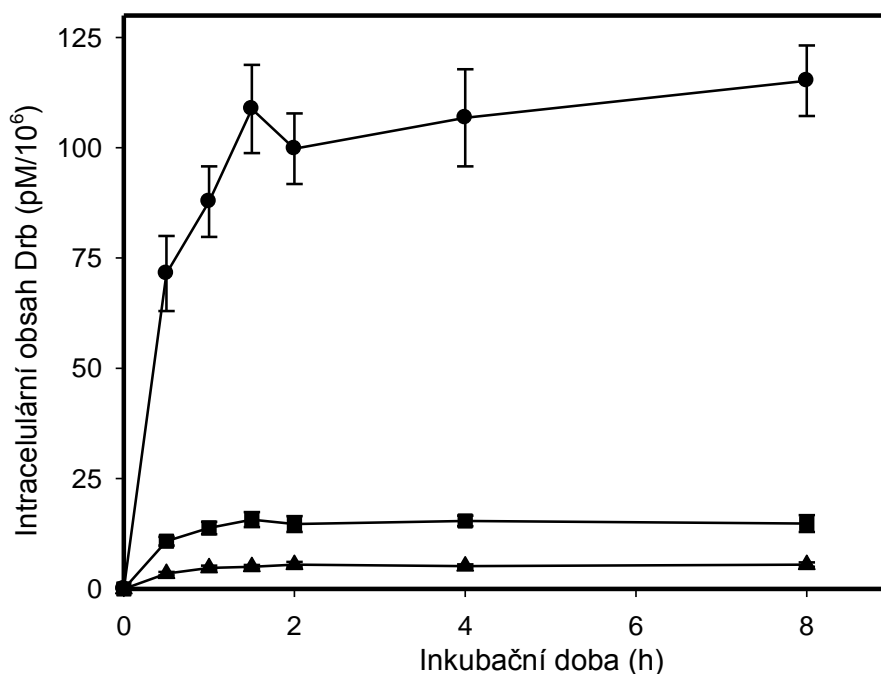
Nicméně, extrakční roztok může ovlivnit intenzitu výstupního signálu, a tedy i hodnoty meze stanovitelnosti. Proto jsme ověřili, do jaké míry ovlivňují výše zmíněné roztoky citlivost metody. Zjistili jsme, že nejnižší hodnoty meze stanovitelnosti byly naměřeny u 1% (w/v) FA v 50% (v/v) MeOH (EtOH)/voda. Vyšší hodnoty byly zaznamenány u 0,1 M NaOH (neutralizováno FA na pH 3,5) a nejvyšší u 10% SDS „Tab.5“. Na základě našich analýz jsme jako nejvhodnější extrakční činidlo zvolili 1% (w/v) FA v 50% (v/v) EtOH/voda o objemu 800 μl.

Tab.5 Vliv složení extrakčního roztoku na hodnoty meze stanovitelnosti při HPLC/MS/MS analýze Drb.

Extrakční roztok	Mez stanovitelnosti
1% FA v 50% MeOH/voda	0,5 nM
1% FA v 50% EtOH/voda	0,4 nM
10% SDS	21,5 nM
0,1 M NaOH (neutralizováno FA na pH 3,5)	0,6 nM

4.2.4 Časový průběh intracelulární hladiny Drb

Stanovení intracelulárního obsahu Drb je potřeba provádět v čase, kdy dosáhne tzv. stacionární hladiny. Jinými slovy v čase, kdy transport Drb dovnitř a ven z buněk a jeho eventuální metabolismus jsou v rovnováze. Rezistentní i citlivé buňky byly inkubovány s Drb v daných časových intervalech a následně byla stanovena intracelulární hladina této látky. Zjistili jsme, že hladina Drb se po 1-1,5 h dostává do ustáleného stavu a ani po 8 h nedochází k výrazným změnám „Obr.18“.

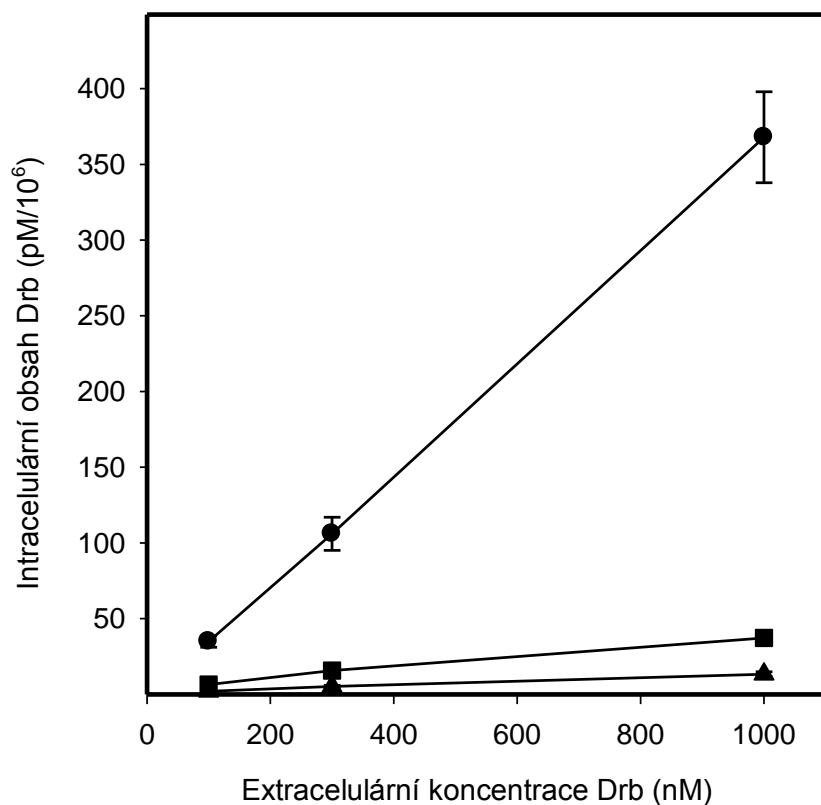


Obr.18 Časová křivka intracelulární hladiny Drb v závislosti na době inkubace. Buňky K562 (kroužky). Buňky K562/DOX (čtverce). Buňky K562/HHT300 (trojúhelníky). Buňky byly inkubovány při 37 °C ve standardním růstovém médiu s přidávkem 0,3 μM Drb. Po inkubaci byl Drb extrahován 800 μl extrakčního roztoku 1% (w/v) FA + 50% (v/v) EtOH/voda. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

4.2.5 Kvantifikace intracelulárního obsahu Drb v senzitivních a rezistentních buňkách

Metodu HPLC/MS/MS jsme využili pro stanovení intracelulárního obsahu Drb v citlivých (K562) a v rezistentních (K562/DOX, K562/HHT300) nádorových buňkách. Zjistili jsme, že mezi extracelulární a intracelulární hladinou Drb je lineární vztah a koncentrace pozorované v rezistentních buňkách byly výrazně nižší než v buňkách citlivých „Obr.19“.

Tyto výsledky ukazují, že naše metoda je vhodná pro stanovení intracelulárních hladin Drb v rezistentních i senzitivních leukemických buňkách.



Obr.19 Obsah Drb v citlivých a rezistentních buňkách. Buňky byly inkubovány (4 h) v přítomnosti Drb (100, 300, 1000 nM). Po inkubaci byl Drb extrahován 800 μ l extrakčního roztoku 1% (w/v) FA + 50% (v/v) EtOH/voda. Buňky K562 (kružky). Buňky K562/DOX (čtverce). Buňky K562/HHT300 (trojúhelníky). Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

4.2.6 Exprese P-gp u citlivé (K562) a rezistentní linie (K562/DOX)

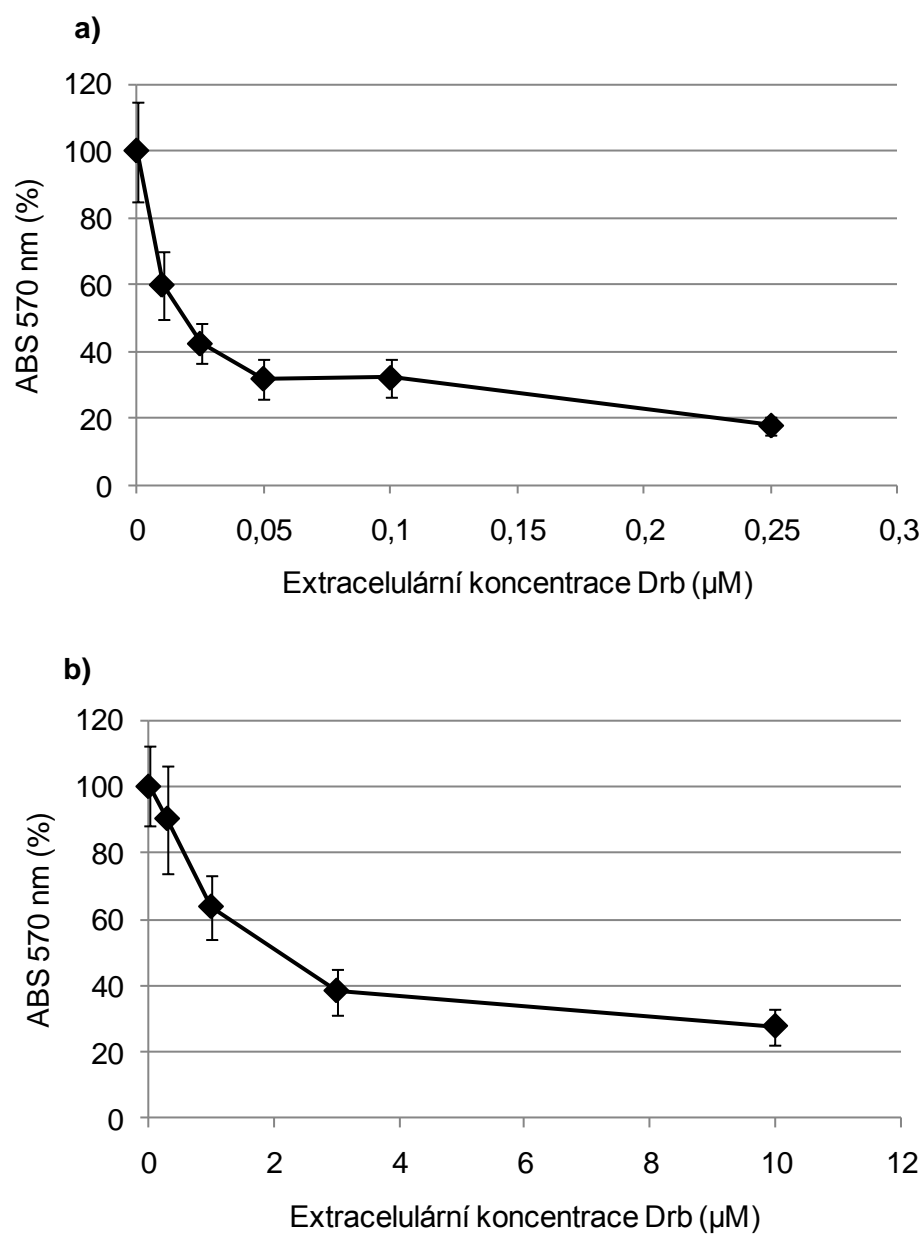
Nejdříve jsme pomocí Western blotu ověřili expresi P-gp u buněk K562/DOX. Obrázek „Obr.20“ jasně ukazuje, že buňky K562/DOX exprimují P-gp. Exprese P-gp u linie K562 byla pod mezí detekce „Obr.20“. Analýza efluxu rhodaminu 123 (Ludescher et al., 1992) průtokovou cytometrií potvrdila schopnost P-gp transportovat substrát přes cytoplazmatickou membránu (není ukázáno).



Obr.20 Analýza exprese P-gp Western blotem u linie K562 a K562/DOX. V lyzátech z K562 a K562/DOX buněk byla stanovena exprese P-gp pomocí myší monoklonální protilátky. Jako referenční protein byl použit β -aktin. Obrázek představuje typický výsledek.

4.2.7 Vlastnosti citlivé (K562) a rezistentní linie (K562/DOX) pod vlivem Drb

Pro zjištění rozdílů v citlivosti K562/DOX a K562 buněk k testovaným léčivům byl použit standardní MTT test. Cytotoxické účinky Drb byly hodnoceny až po 72 h inkubaci, kdy dochází k indukci buněčné smrti. V kratších inkubačních intervalech (24 nebo 48 h) Drb inhibuje pouze buněčnou proliferaci (není ukázáno). Podle očekávání, naše výsledky ukázaly výrazně vyšší rezistenci K562/DOX buněk k Drb ve srovnání s K562 buňkami „Obr.21; Tab.6“.

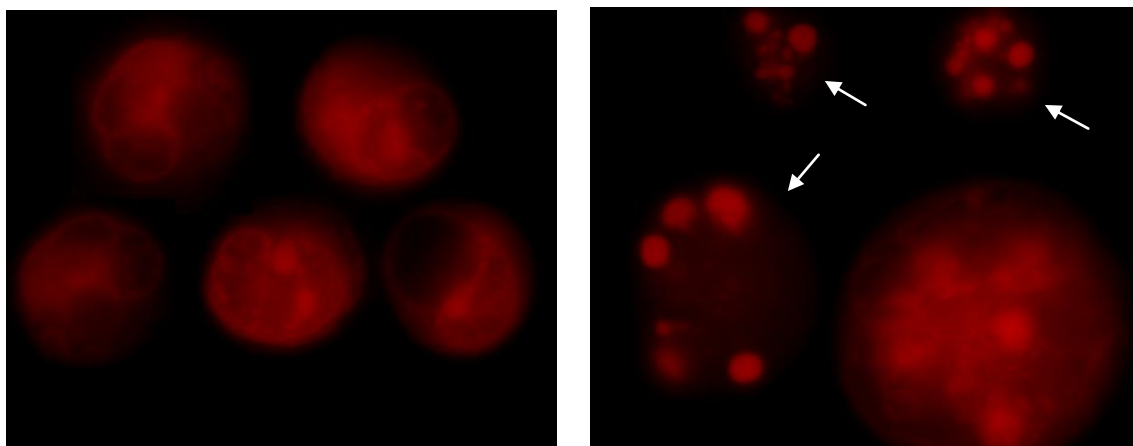


Obr.21 Vliv Drb na viabilitu a proliferaci buněk. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti Drb a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku Drb byly považovány za kontrolní. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

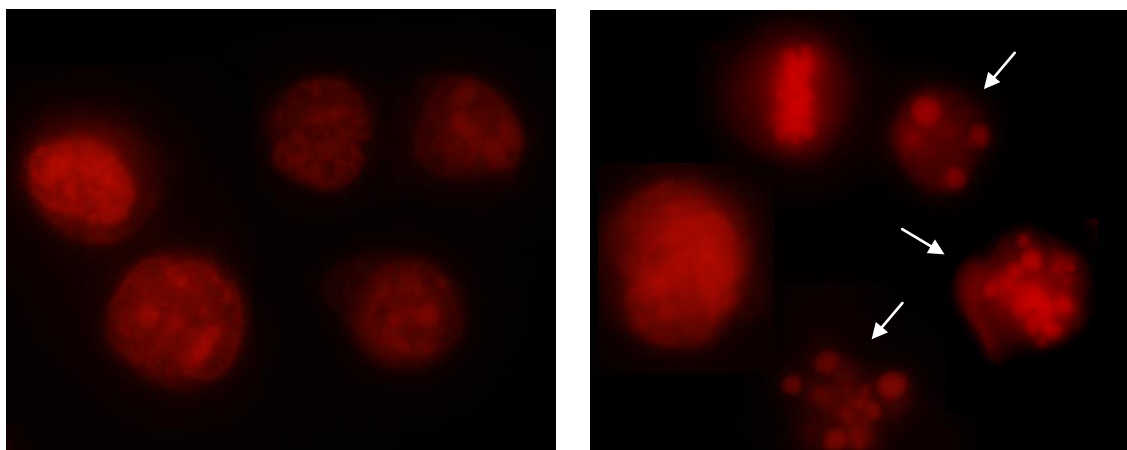
Tab.6 Cytotoxické účinky Drb vyjádřené jako hodnoty IC_{50} vypočtené z MTT testu.

Buňky	Daunorubicin IC_{50} (nM)
K562	21,5
K562/DOX	1853,5

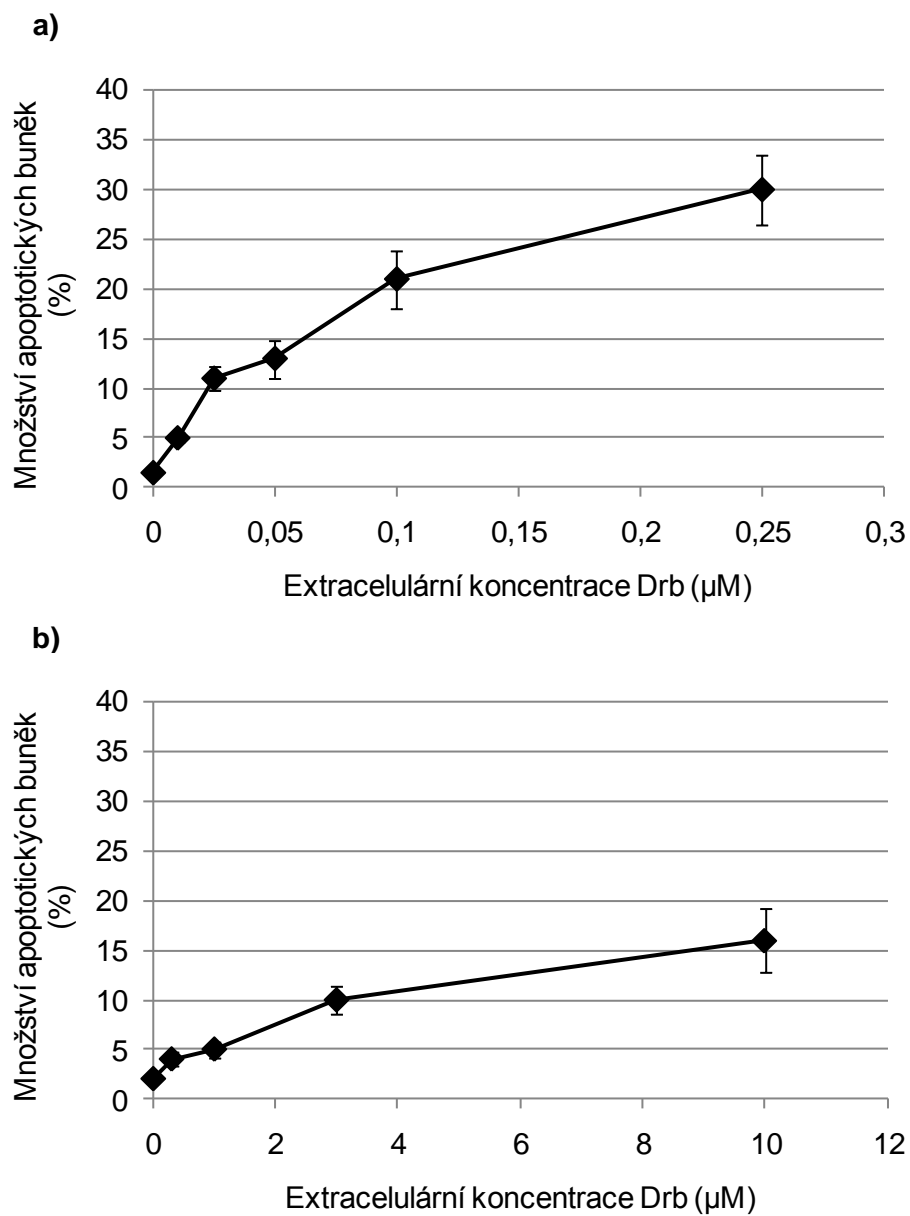
Detailní analýza ukázala, že Drb indukuje buněčnou smrt morfologickými „Obr.22-23“ a biochemickými „Obr.25“ znaky apoptosy u obou buněčných linií. Z výsledků je dále zřejmé, že k indukci apoptosy dochází u rezistentní linie po přidavku 50-100 násobné koncentrace Drb ve srovnání s buňkami K562 „Obr. 24“.



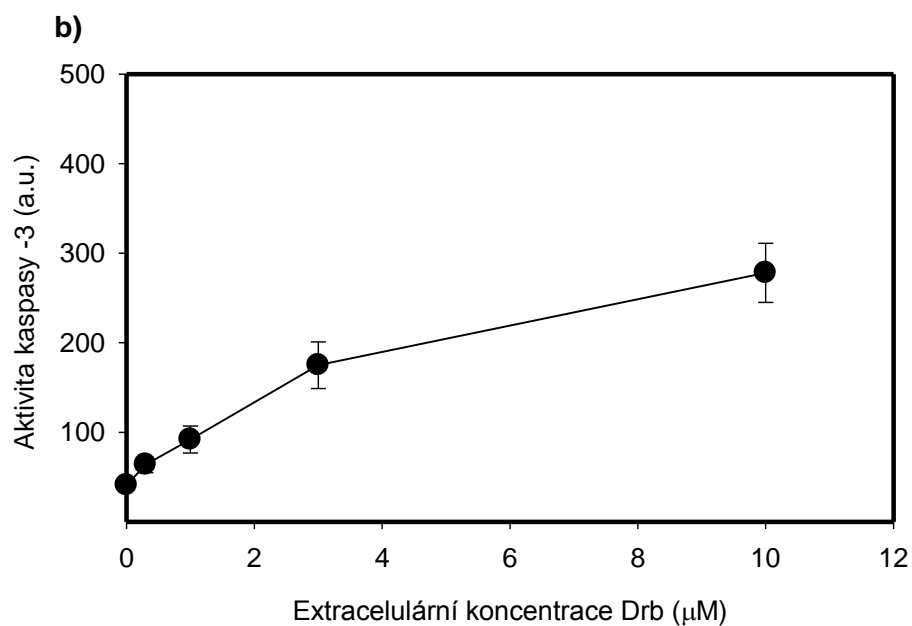
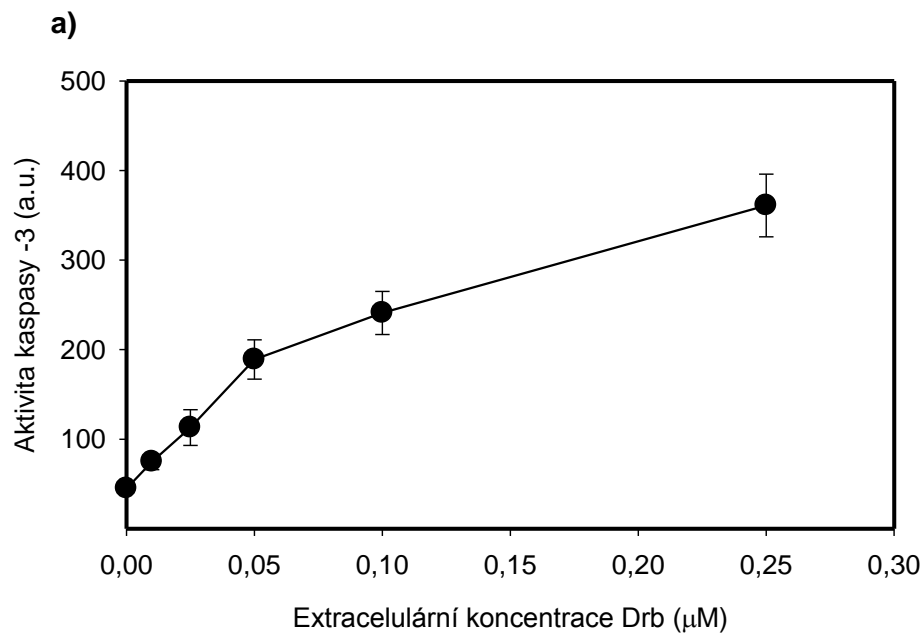
Obr.22 Morfologie jader linie K562 barvených propidium jodidem. Vlevo neovlivněné buňky K562. Vpravo buněčná linie K562 po 72 h inkubaci s Drb. Šipky ukazují na apoptotické buňky. Fotografie ukazují typický výsledek.



Obr.23 Morfologie jader linie K562/DOX barvených propidium jodidem. Vlevo neovlivněné buňky K562/DOX. Vpravo buněčná linie K562/DOX po 72 h inkubaci s Drb. Šipky ukazují na apoptotické buňky. Fotografie ukazují typický výsledek.



Obr.24 Vliv Drb na indukci apoptozy. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti Drb a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku Drb byly považovány za kontrolní. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

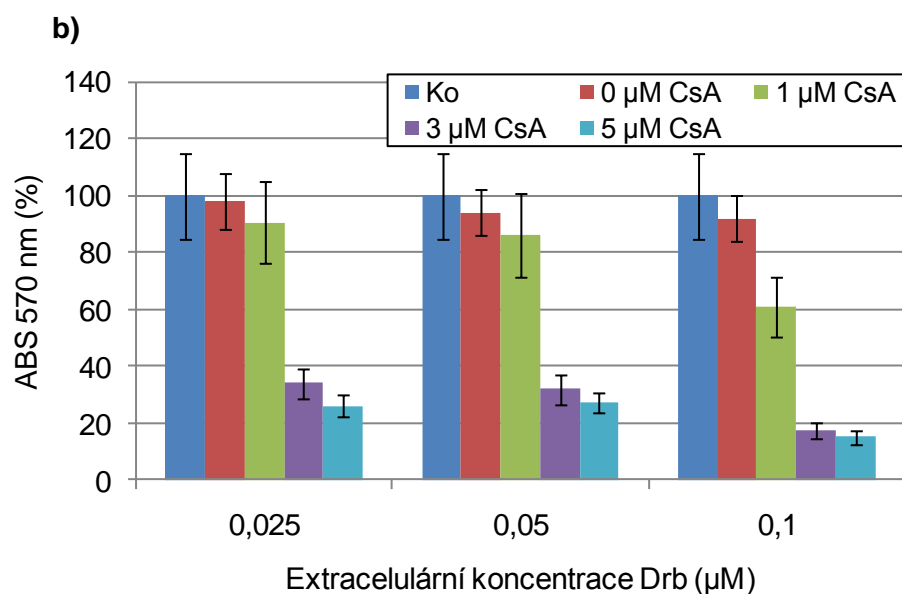
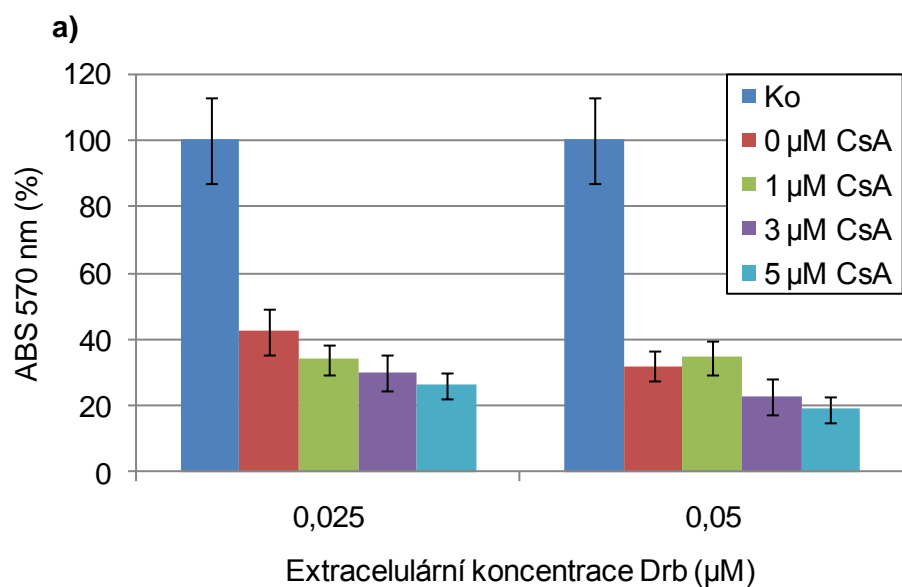


Obr.25 Vliv Drb na aktivaci kaspasy-3. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti Drb a následně byla měřena aktivita kaspasy-3 pomocí fluorescenčního substrátu Ac-DEVD-AMC. Buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku Drb byly považovány za kontrolní. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

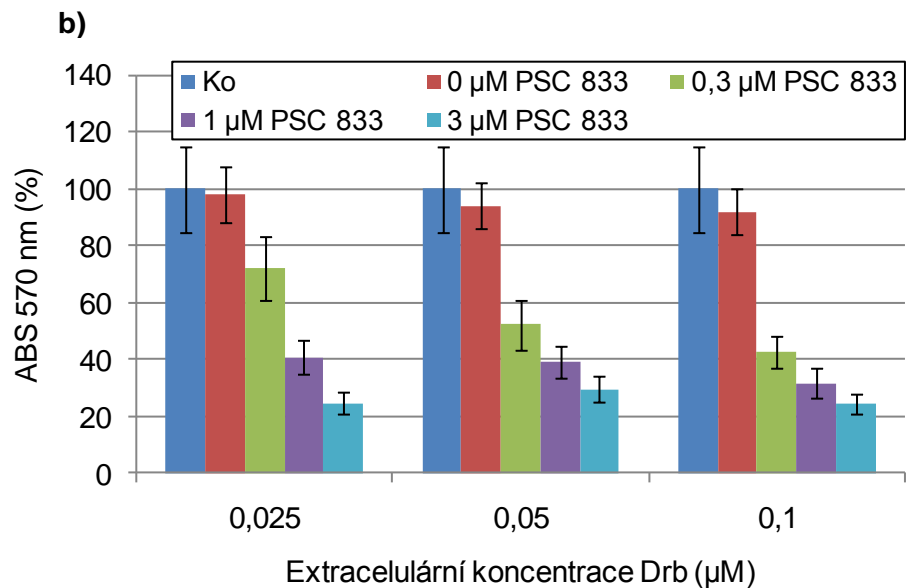
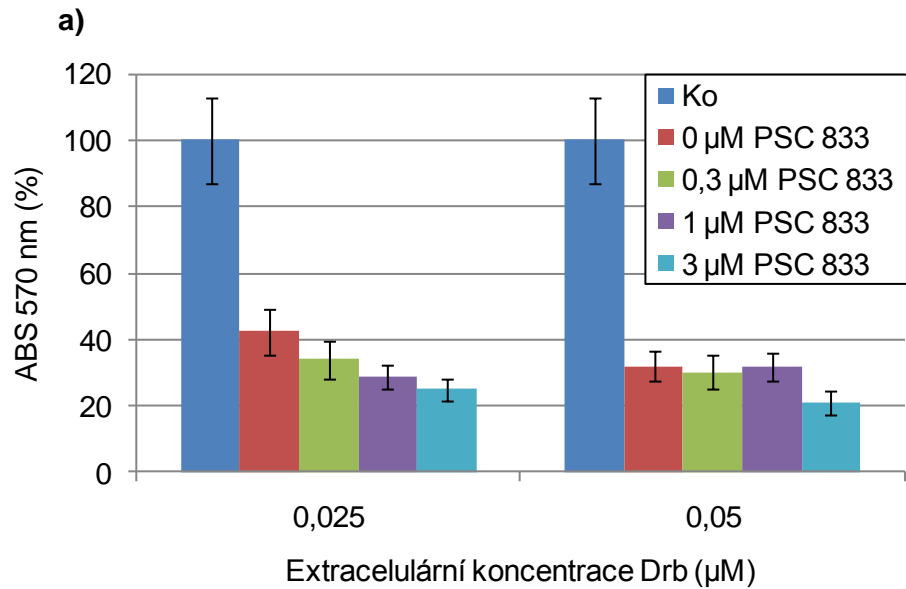
4.2.7.1 Vliv inhibitorů P-gp na citlivost rezistentní linie (K562/DOX)

Rezistenci buněk K562/DOX jsme se pokusili zvrátit inhibitory P-gp. V naší studii jsme použili inhibitory první (CsA), druhé (PSC 833) a třetí (ZSQ) generace. Buňky byly inkubovány 72 h ve standardním růstovém médiu v přítomnosti Drb v kombinaci s inhibitory P-gp. Po inkubaci byla buněčná suspenze podrobena MTT testu. Naše výsledky ukázaly, že všechny použité inhibitory jsou schopny od určité koncentrace obnovit citlivost rezistentní linie K562/DOX. CsA v koncentraci 3 μM a vyšší „Obr.26“, PSC 8333 v koncentracích nad 1 μM „Obr.27“ a ZSQ v koncentracích nad 0,1 μM „Obr.28“. Účinky inhibitorů na modulaci cytotoxického účinku Drb u buněk K562/DOX a K562 jsou shrnuty v „Tab.7“. Naše výsledky potvrdily, že inhibitor třetí generace ZSQ je nejúčinnější „Obr.26-28, Tab.7“.

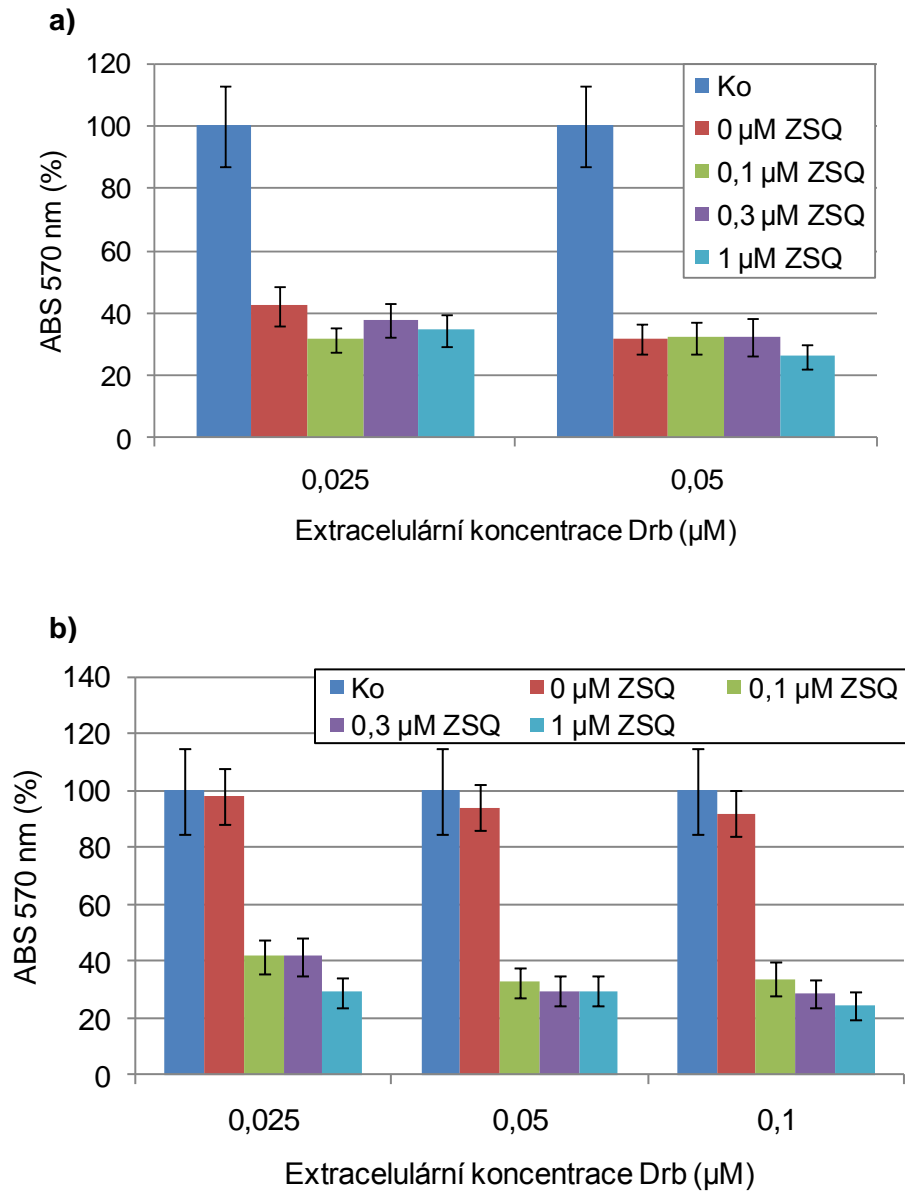
Reverze rezistence K562/DOX buněk indukovaná CsA, PSC833 nebo ZSQ k Drb byla doprovázena výrazným nárůstem počtu apoptotických buněk, jak plyne z analýzy morfologie jader „Obr.29b-31b“. Podobný efekt nebyl pozorován u buněk K562 „Obr.29a-31a“. Výrazné zvýšení počtu apoptotických buněk u senzitivní linie bylo pozorováno v případě CsA (3 a 5 μM) a PSC 833 (3 μM). Rovněž průtoková cytometrie potvrdila výrazný nárůst počtu apoptotických buněk po působení Drb v kombinaci se všemi inhibitory u rezistentní linie „Obr.32-34“.



Obr.26 Vliv CsA na viabilitu a proliferaci buněk kultivovaných v přítomnosti Drb. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti CsA a Drb a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku CsA a Drb. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



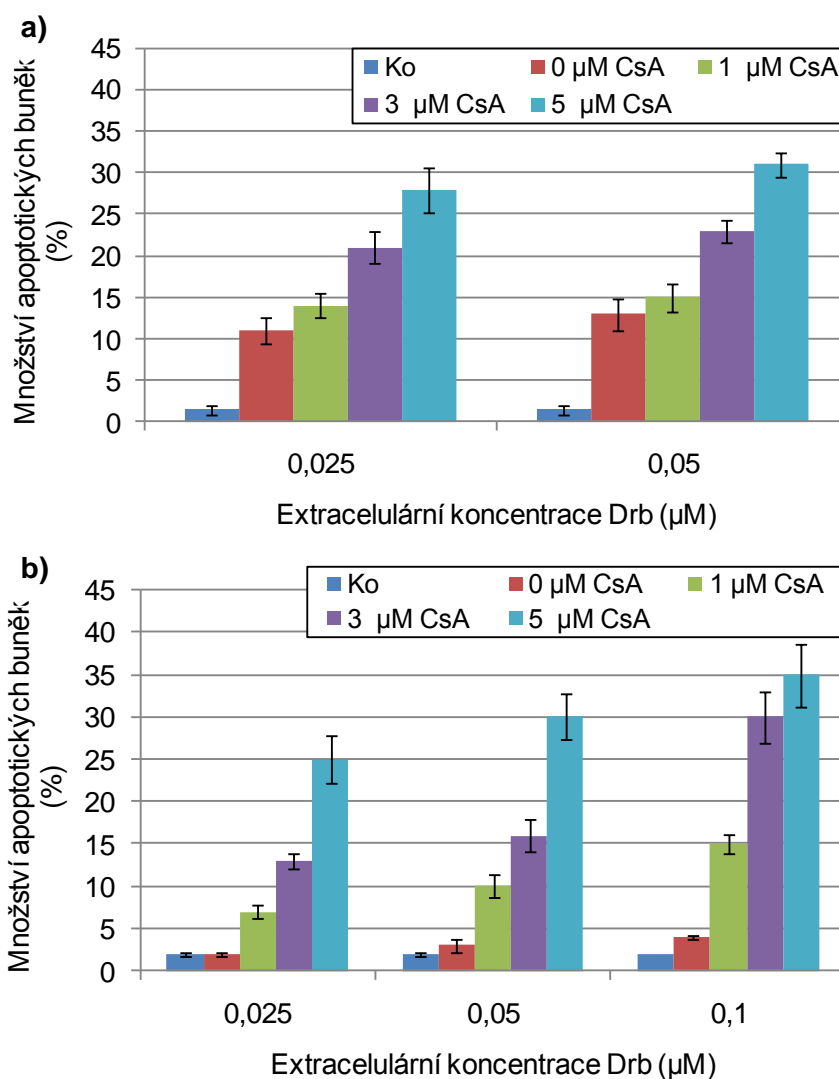
Obr.27 Vliv PSC 833 na viabilitu a proliferaci buněk kultivovaných v přítomnosti Drb. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti PSC 833 a Drb a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přidavku PSC 833 a Drb. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



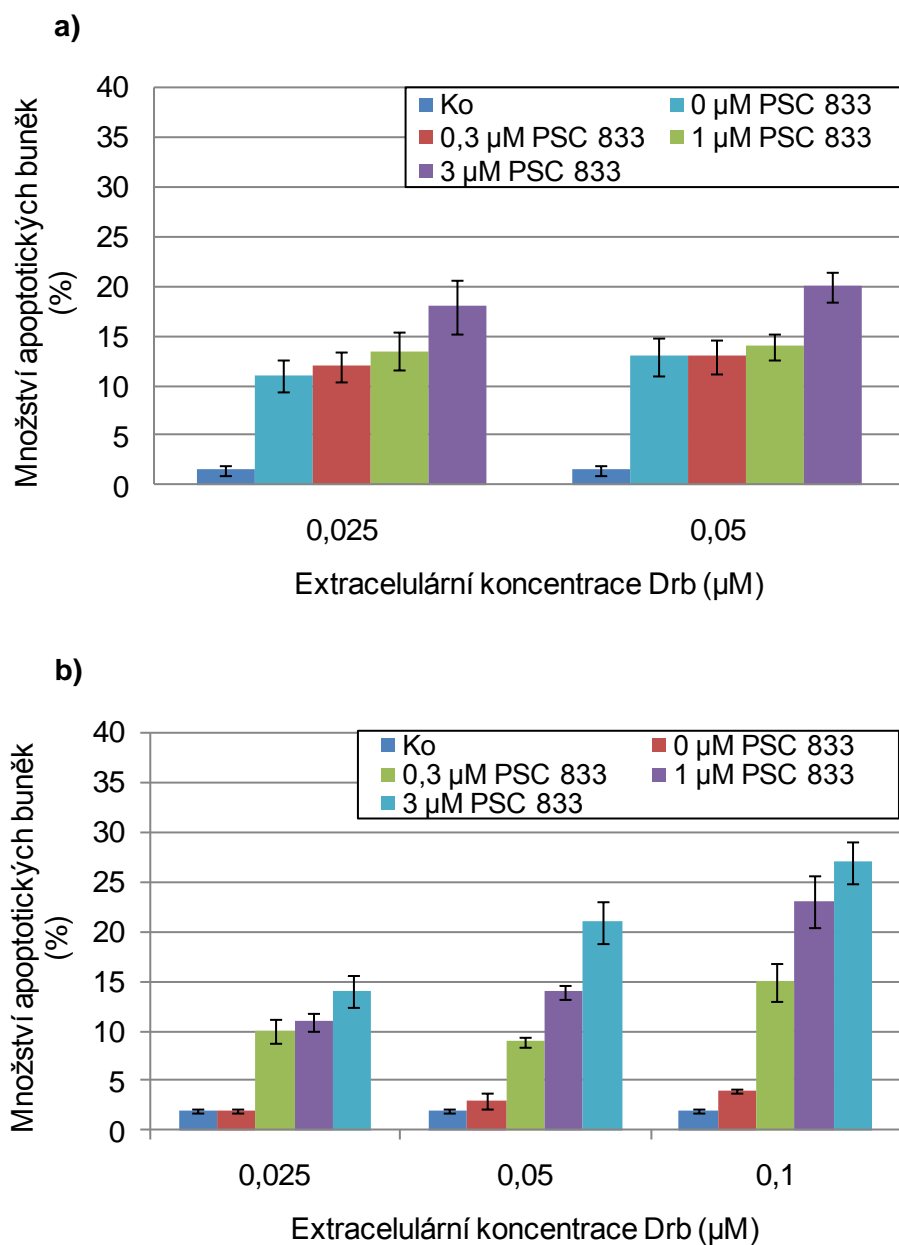
Obr.28 Vliv ZSQ na viabilitu a proliferaci buněk kultivovaných v přítomnosti Drb. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti ZSQ a Drb a následně byla stanovena viabilita pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku ZSQ a Drb. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

Tab.7 Vlivy inhibitorů P-gp na cytotoxicitu Drb vyjádřené jako hodnoty IC₅₀ vypočtené z MTT testu.

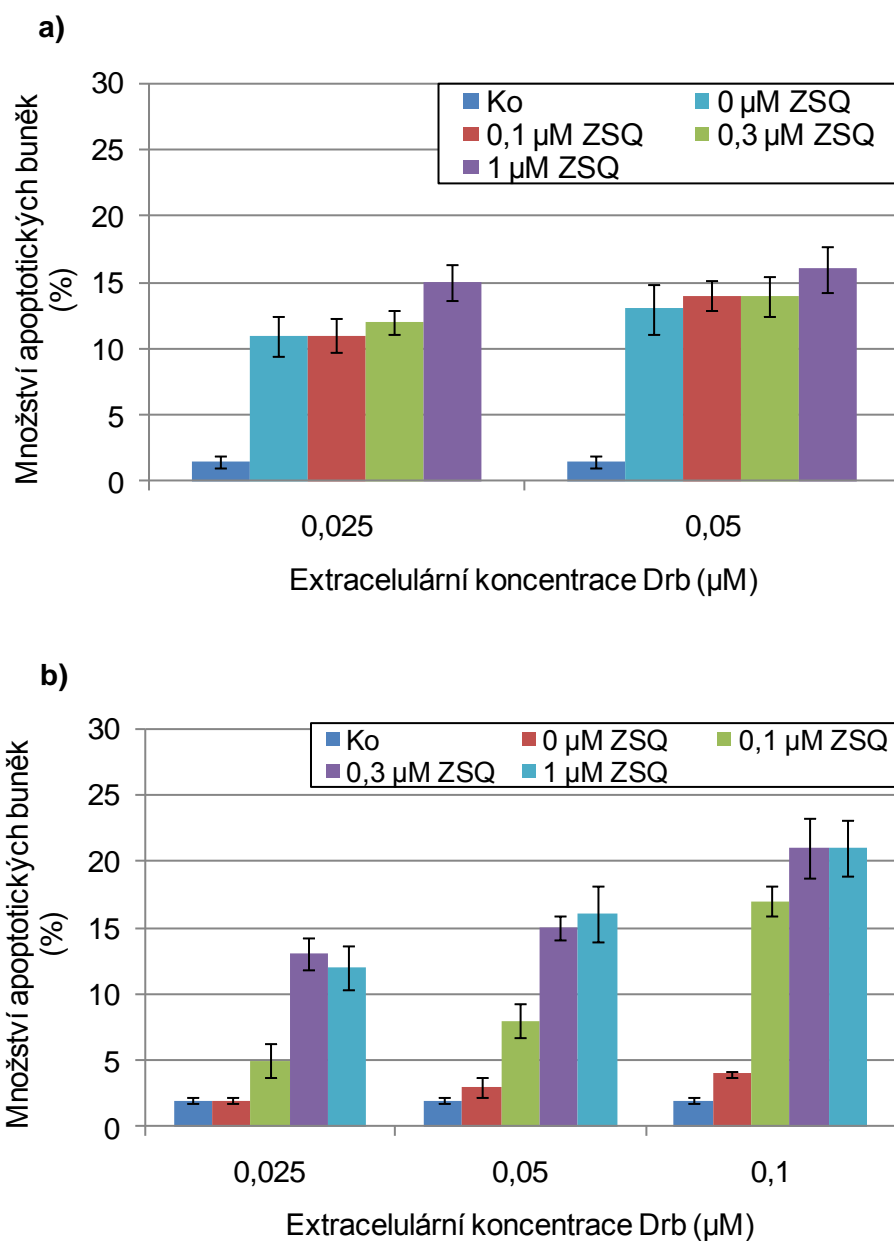
	K562/DOX IC ₅₀ (nM)	K562 IC ₅₀ (nM)
Drb	1853,5	21,5
Drb+1 μM CsA	305,2	22,9
Drb+3 μM CsA	19,3	20,8
Drb+5 μM CsA	15,6	18,3
Drb+0,3 μM PSC833	214	21,8
Drb+1 μM PSC833	31,4	22,1
Drb+3 μM PSC833	19,5	19,2
Drb+0,1 μM ZSQ	25,2	21,1
Drb+0,3 μM ZSQ	21,6	21,5
Drb+1 μM ZSQ	20,9	20,4



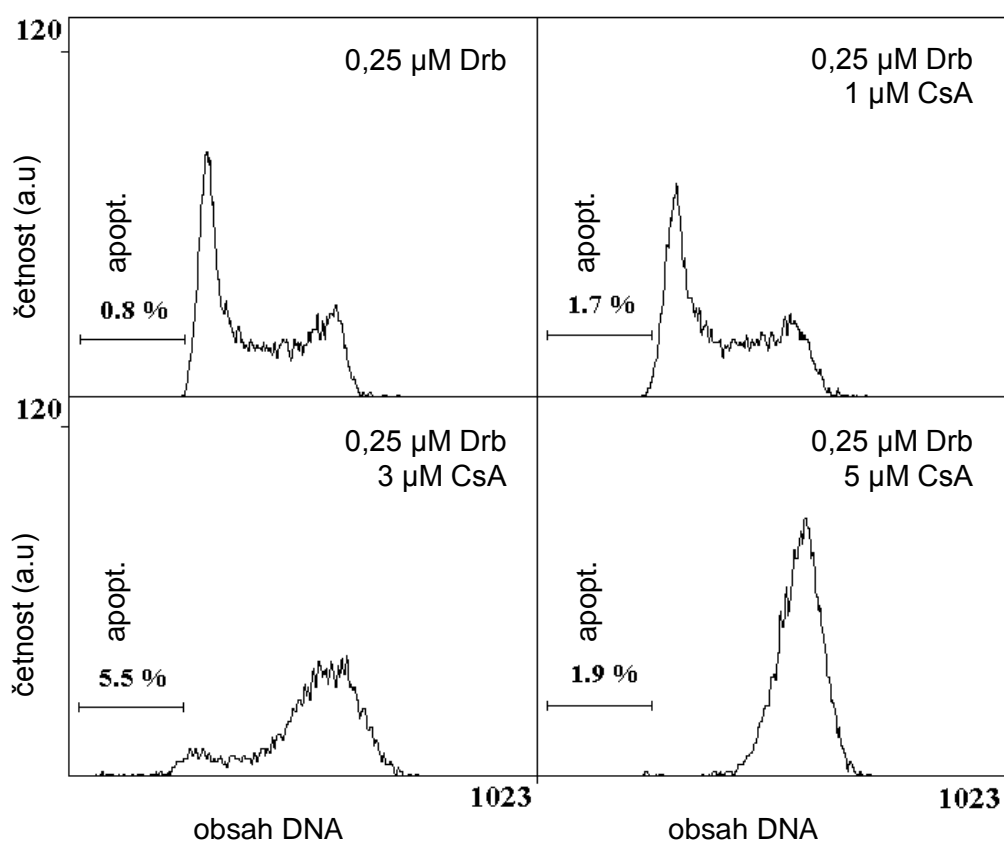
Obr.29 Vliv CsA na indukcii apoptozy u buněk kultivovaných v přítomnosti Drb. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti CsA a Drb a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku CsA a Drb. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



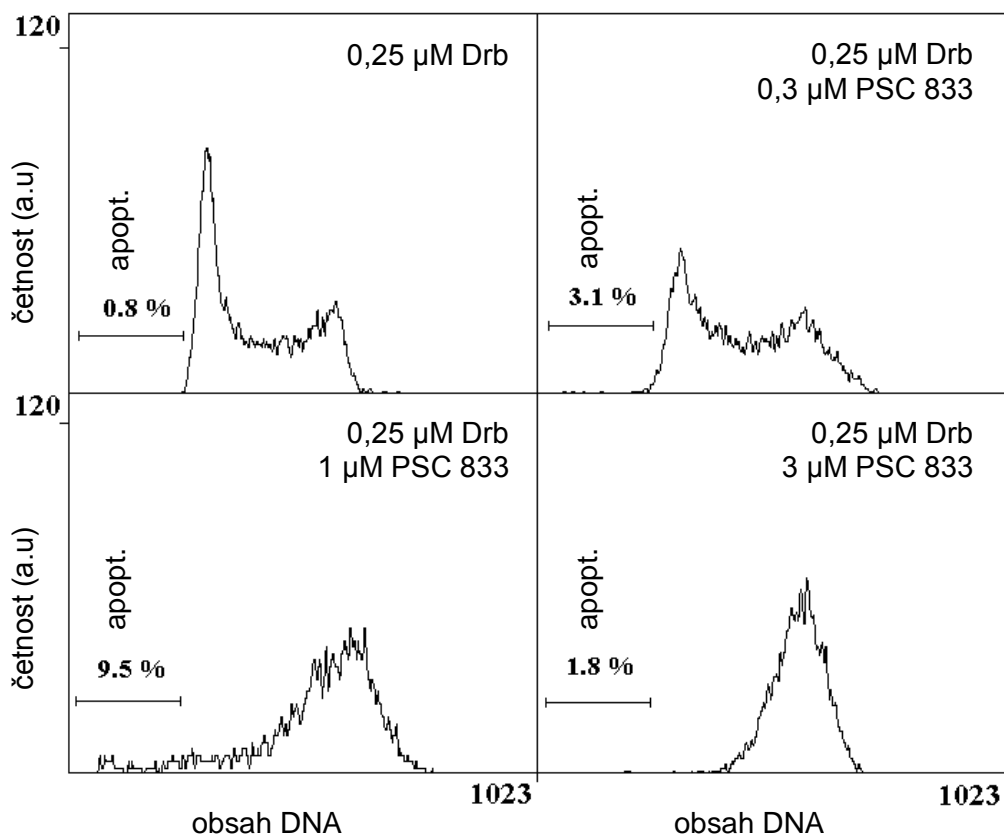
Obr.30 Vliv PSC 833 na indukci apoptosy u buněk kultivovaných v přítomnosti Drb. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti PSC 833 a Drb a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přísady PSC 833 a Drb. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



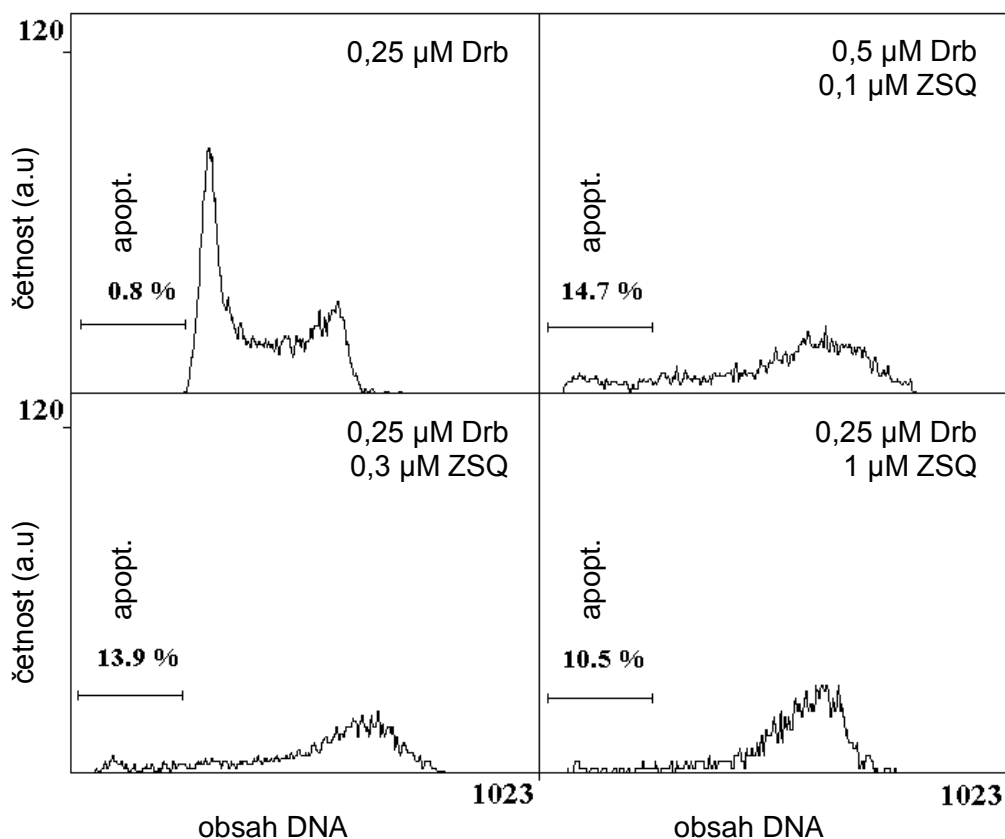
Obr.31 Vliv ZSQ na indukci apoptosy u buněk kultivovaných v přítomnosti Drb. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti ZSQ a Drb a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku ZSQ a Drb. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



Obr.32 Vliv CsA na indukci apoptosy buněk K562/DOX inkubovaných v přítomnosti Drb. Buněčná linie byla inkubována ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti CsA v kombinaci s Drb, následně fixována EtOH a obarvena propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických buněk (hypoploidních). Histogramy představují typický výsledek.

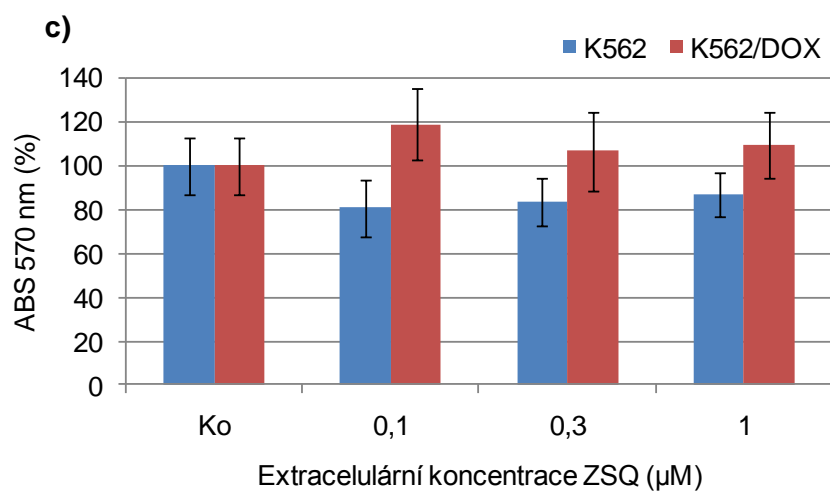
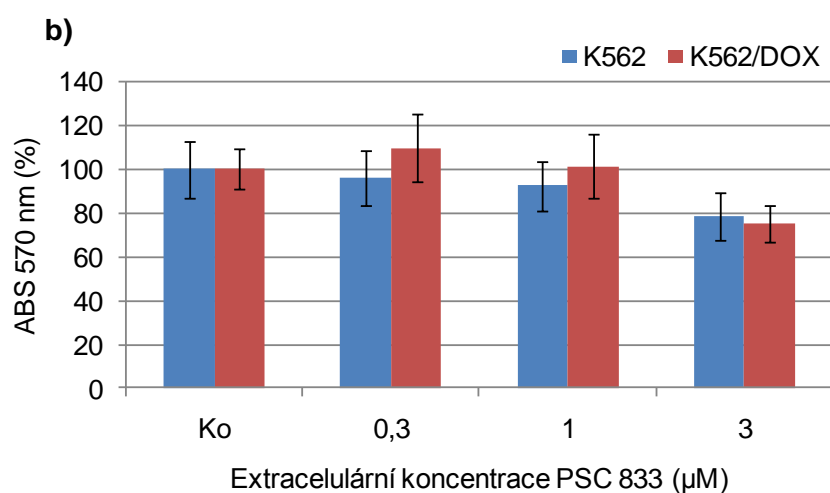
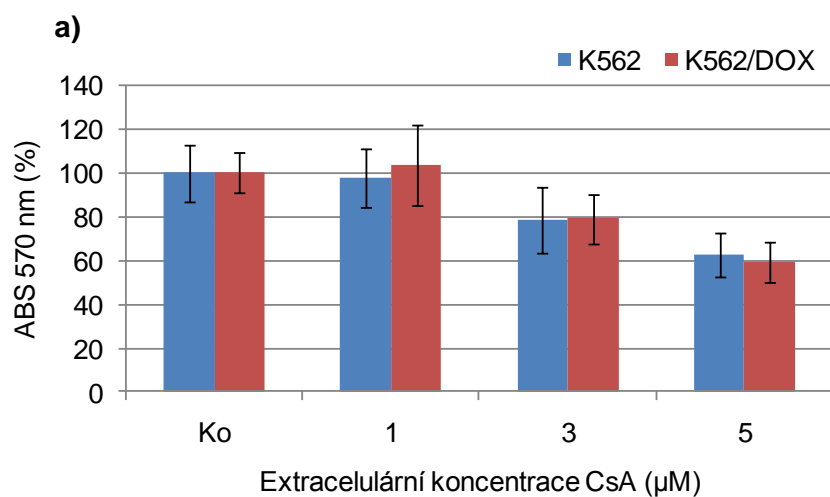


Obr.33 Vliv PSC 833 na indukci apoptosy u buněk K562/DOX inkubovaných v přítomnosti Drb. Buněčná linie byla inkubována ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti PSC 833 v kombinaci s Drb, následně fixována EtOH a obarvena propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických buněk (hypoploidních). Histogramy představují typický výsledek.

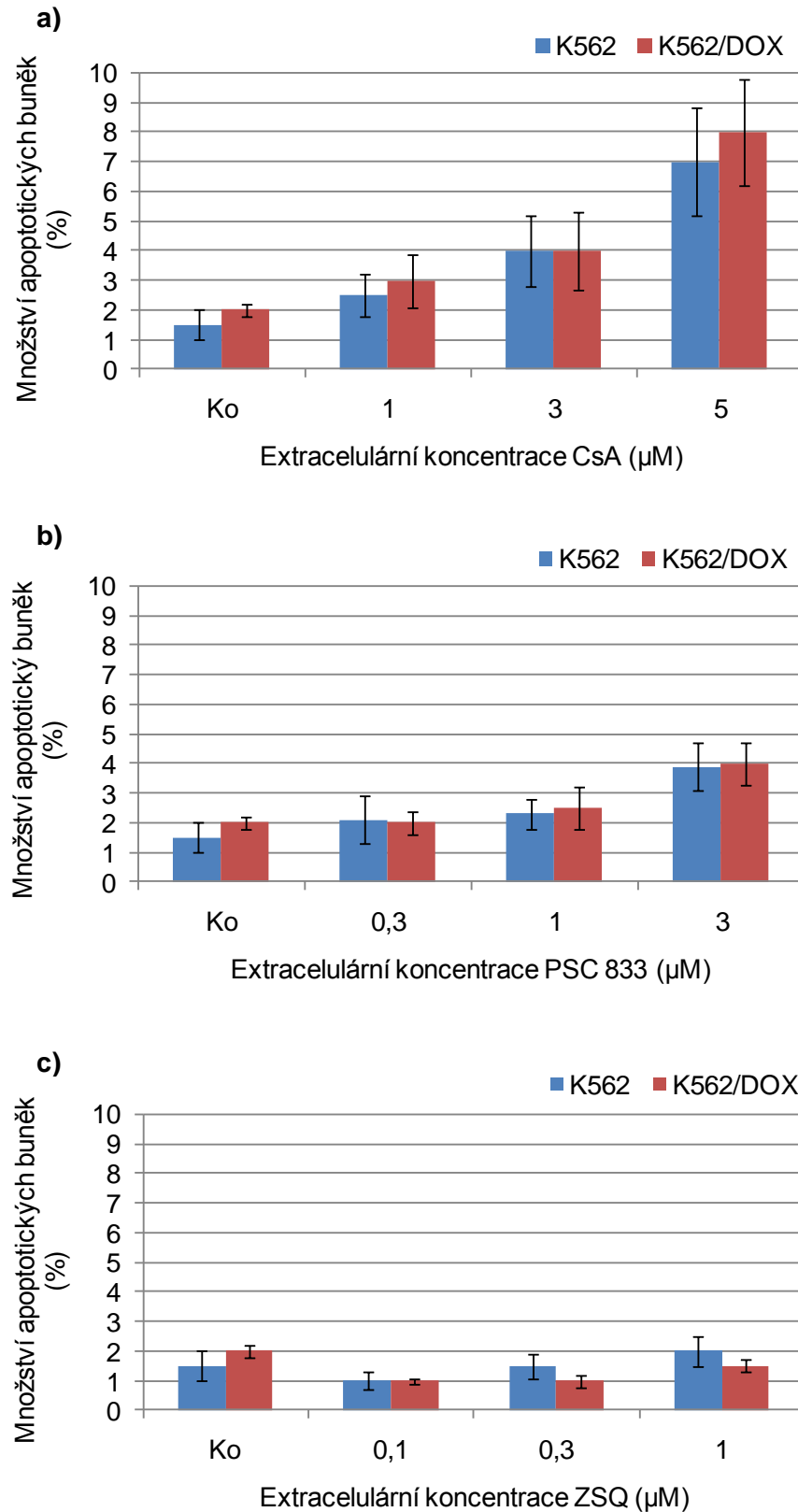


Obr.34 Vliv ZSQ na indukci apoptosy u buněk K562/DOX inkubovaných v přítomnosti Drb. Buněčná linie byla inkubována ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti ZSQ v kombinaci s Drb, následně fixována EtOH a obarvena propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických buněk (hypoploidních). Histogramy představují typický výsledek.

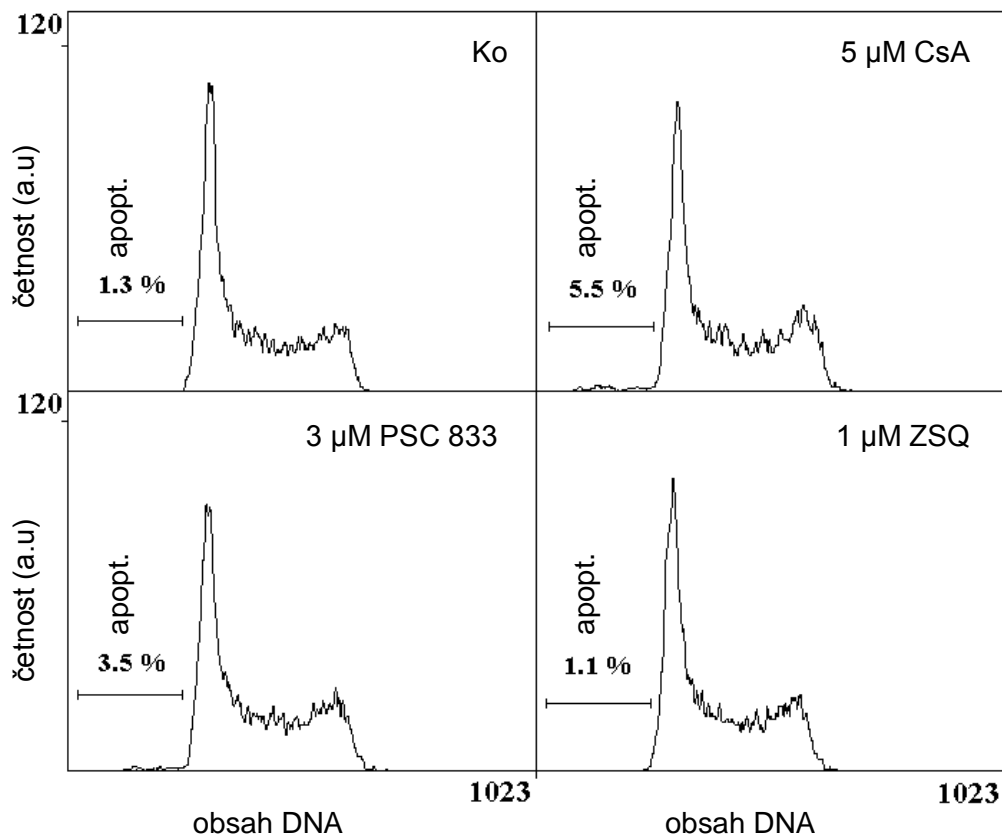
Dále jsme testovali cytotoxický efekt samotných inhibitorů u obou buněčných linií po dobu 72 h pomocí MTT testu. Zjistili jsme, že obě buněčné linie jsou přibližně stejně citlivé k použitým inhibitorům „Obr.35“. ZSQ vykazoval nejmenší cytotoxický efekt v použitých koncentracích „Obr.35c“. Dále bylo zjištěno, že vyšší koncentrace inhibitoru CsA a PSC 833 mají na obě linie mírný proapoptotický efekt, kdežto ZSQ nikoliv „Obr.36“. Stejně výsledky byly pozorovány při analýze buněčného cyklu na průtokovém cytometru „Obr.37“.



Obr.35 Vliv inhibitorů P-gp (CsA, PSC833, ZSQ) na viabilitu a proliferaci buněčné linie K562 a K562/DOX. a) Inhibitor CsA. b) Inhibitor PSC 833 c) Inhibitor ZSQ. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti inhibitorů a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přidavku inhibitoru. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



Obr.36 Vliv inhibitorů P-gp (CsA, PSC833, ZSQ) na indukci apoptozy u buněčné linie K562 a K562/DOX. a) Inhibitor CsA. b) Inhibitor PSC 833 c) Inhibitor ZSQ. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti inhibitorů a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku inhibitoru. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



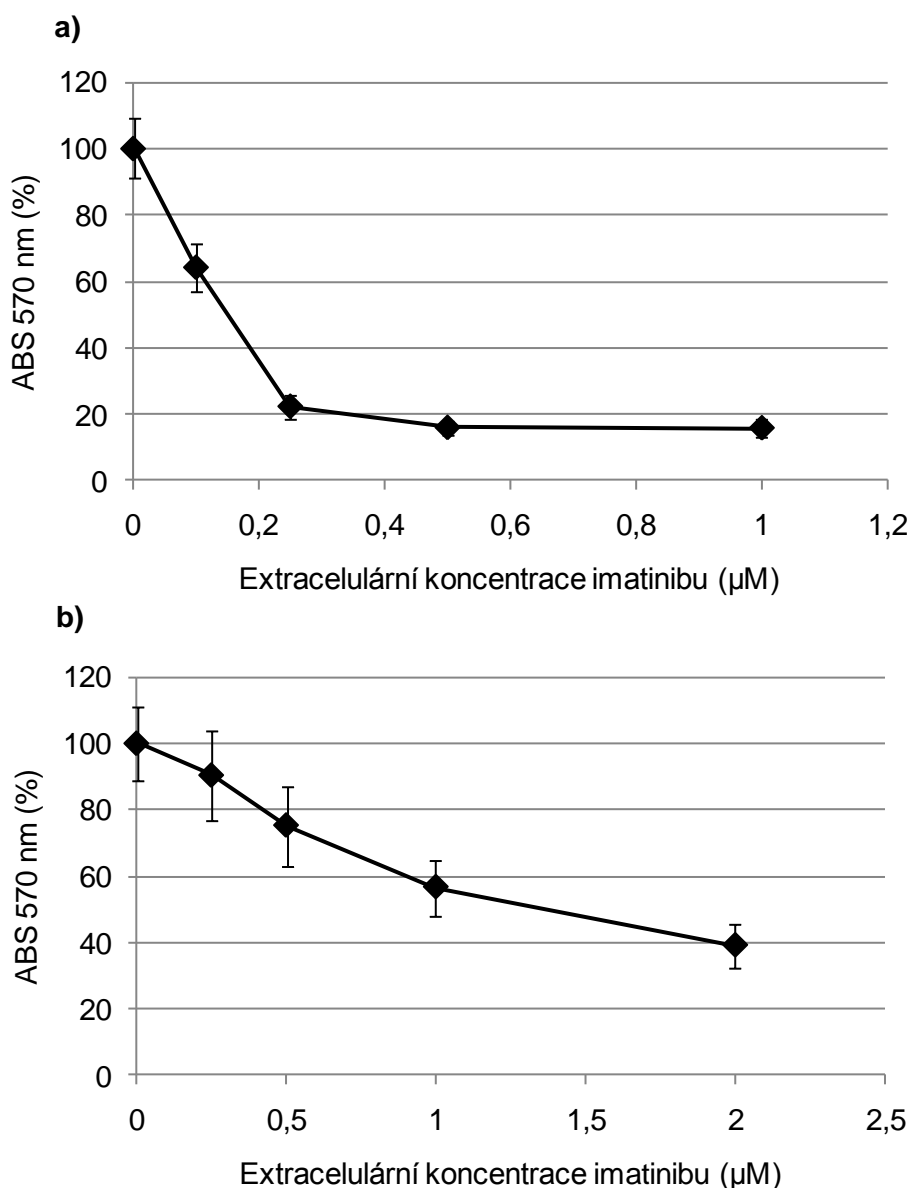
Obr.37 Vliv inhibitorů P-gp na indukci apoptosy u buněk K562/DOX. Buňky byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (72 h, 37 °C) v přítomnosti inhibitorů, následně fixovány EtOH a obarveny propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických buněk (hypoploidních). Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku inhibitorů. Histogramy představují typický výsledek.

4.2.7.2. Vliv inhibitorů P-gp na intracelulární obsah Drb u buněk K562/DOX

Zatím neuvedeno

4.2.8 Porovnání vlastností citlivé (K562) a rezistentní linie (K562/DOX) pod vlivem imatinibu

Pro zjištění rozdílů v citlivosti K562/DOX a K562 buněk k imatinibu byl použit standardní MTT test. Cytotoxické účinky této látky byly hodnoceny po 48 h, kdy dochází nejen k inhibici buněčné proliferace, ale i k indukci buněčné smrti. Podle očekávání, naše výsledky ukázaly výrazně vyšší rezistenci buněk K562/DOX k imatinibu ve srovnání s buňkami K562 „Obr.40, Tab.9“

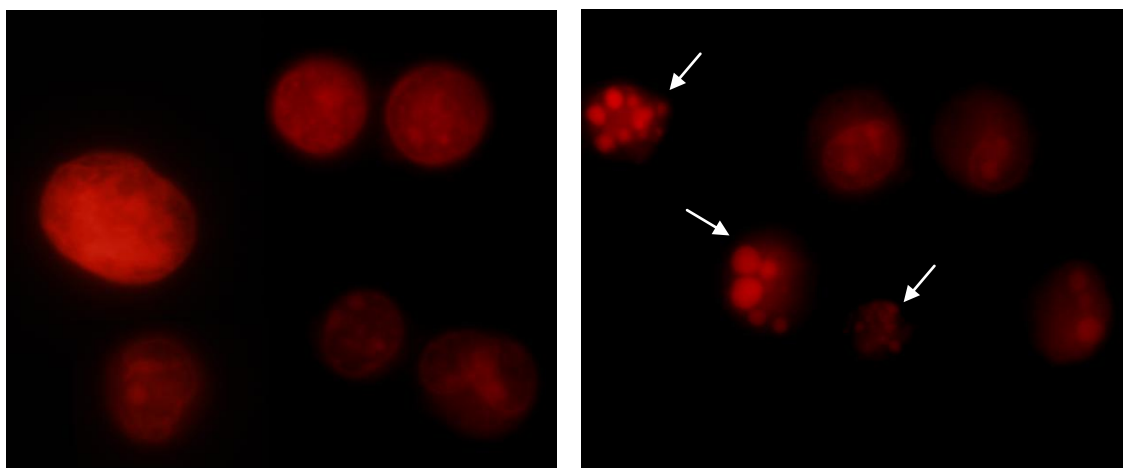


Obr.40 Vliv imatinibu na viabilitu a proliferaci buněk. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti imatinibu a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku imatinibu byly považovány za kontrolní. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

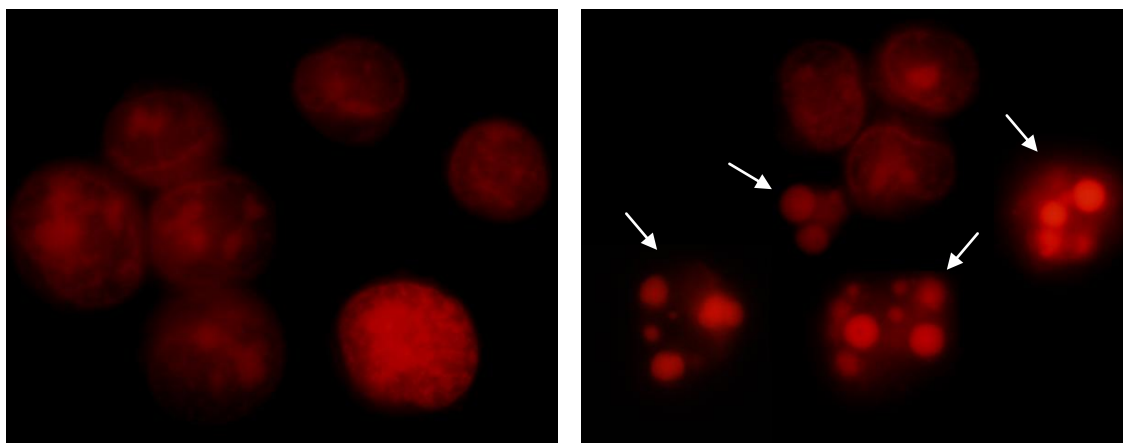
Tab.9 Cytotoxické účinky imatinibu vyjádřené jako hodnoty IC_{50} vypočtené z MTT testu.

Buňky	Imatinib IC_{50} (nM)
K562	145,2
K562/DOX	1597,0

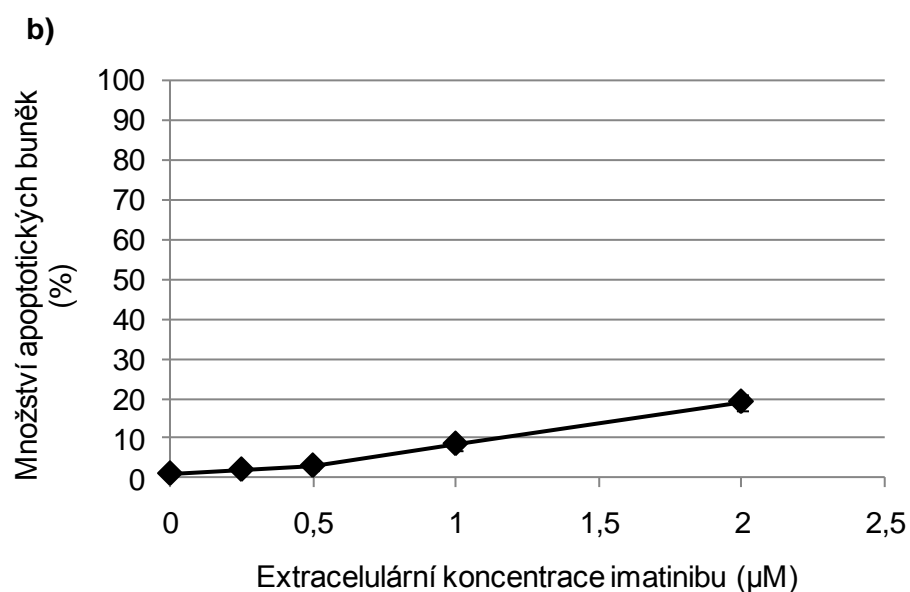
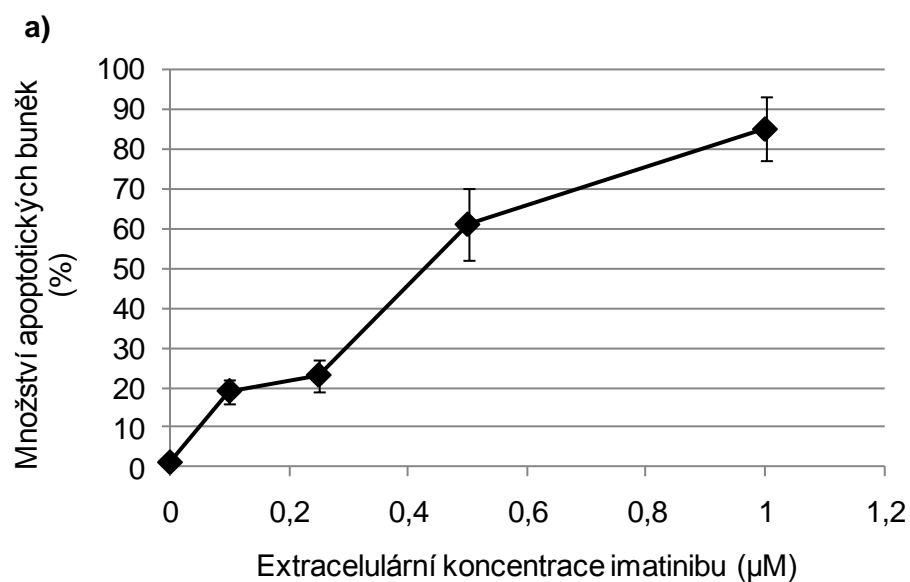
Imatinib rovněž indukuje apoptosu s typickou morfologickou změnou chromatinu „Obr.41-42“ a výraznou aktivací kaspasy-3 „Obr.44“ u obou buněčných linií. Počet apoptotických buněk je signifikantně nižší u rezistentní linie „Obr.43“.



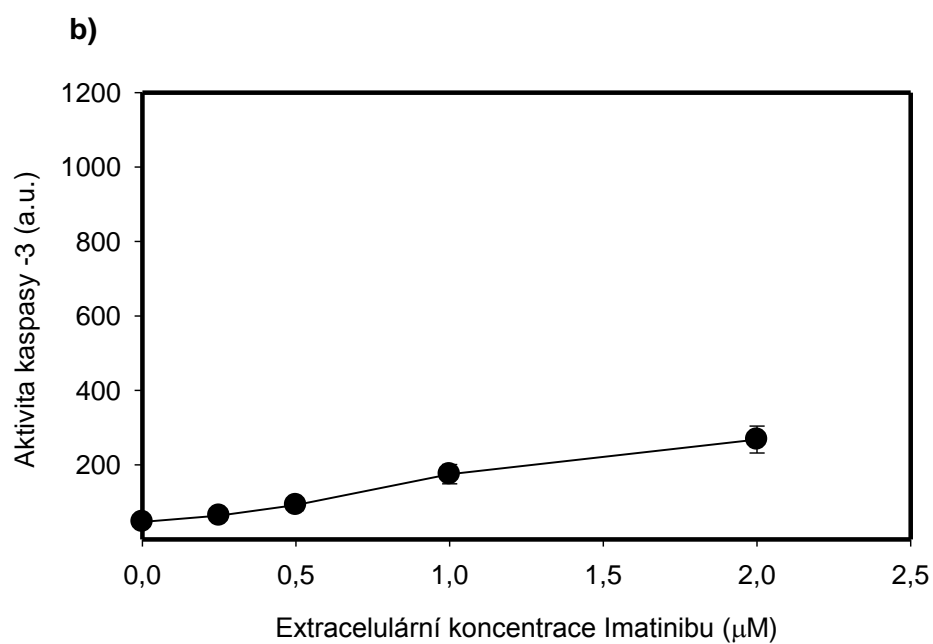
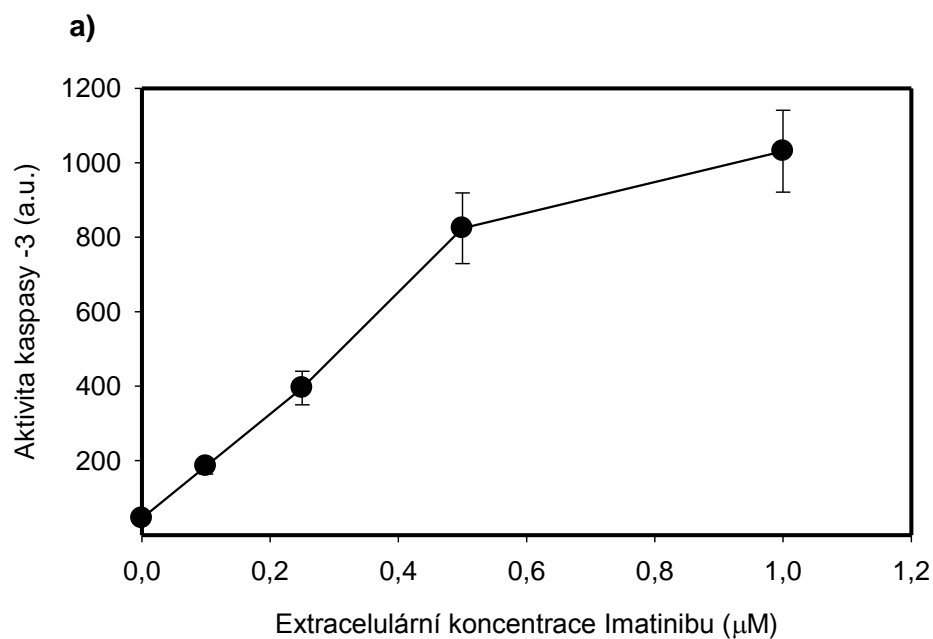
Obr.41 Morfologie jader linie K562 barvených propidium jodidem. Vlevo neovlivněné buňky K562. Vpravo buněčná linie K562 po 48 h inkubaci s imatinibem. Šipky ukazují na apoptotické buňky. Fotografie ukazují typický výsledek.



Obr.42 Morfologie jader linie K562/DOX barvených propidium jodidem. Vlevo neovlivněné buňky K562/DOX. Vpravo buněčná linie K562/DOX po 48 h inkubaci s imatinibem. Šipky ukazují na apoptotické buňky. Fotografie ukazují typický výsledek.



Obr.43 Vliv imatinibu na indukci apoptozy. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti imatinibu a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku imatinibu byly považovány za kontrolní. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

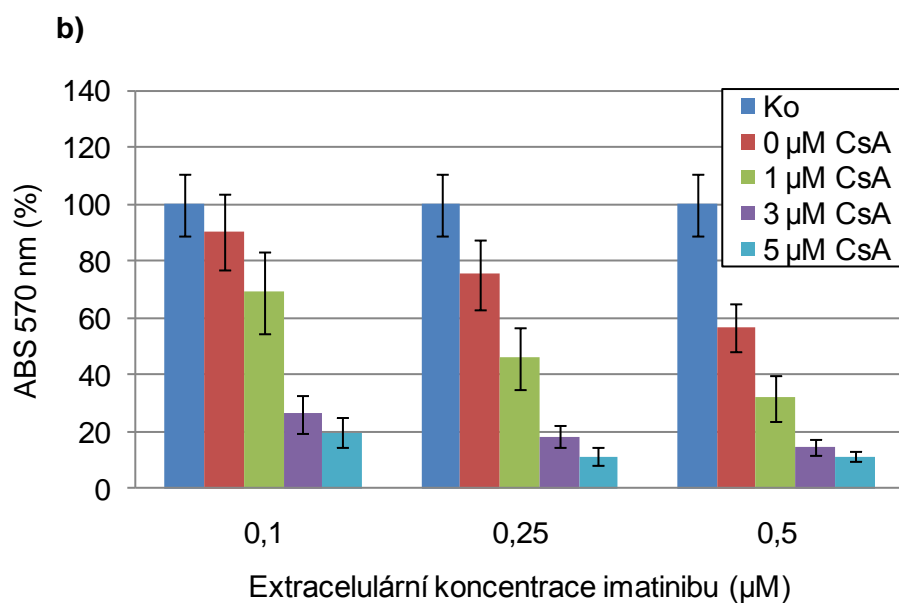
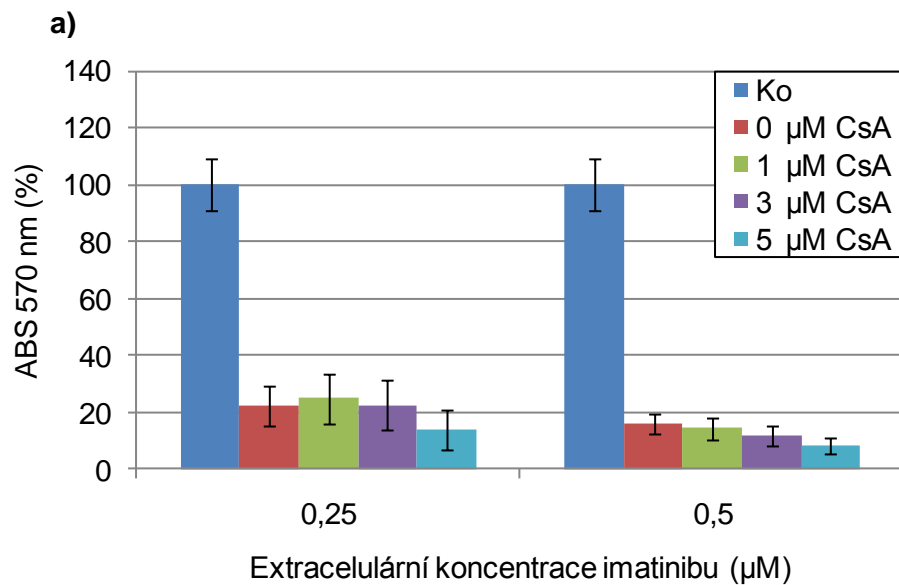


Obr.44 Vliv imatinibu na aktivaci kaspasy-3. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti imatinibu a následně byla měřena aktivita kaspasy-3 pomocí fluorescenčního substrátu Ac-DEVD-AMC. Buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku imatinibu byly považovány za kontrolní. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

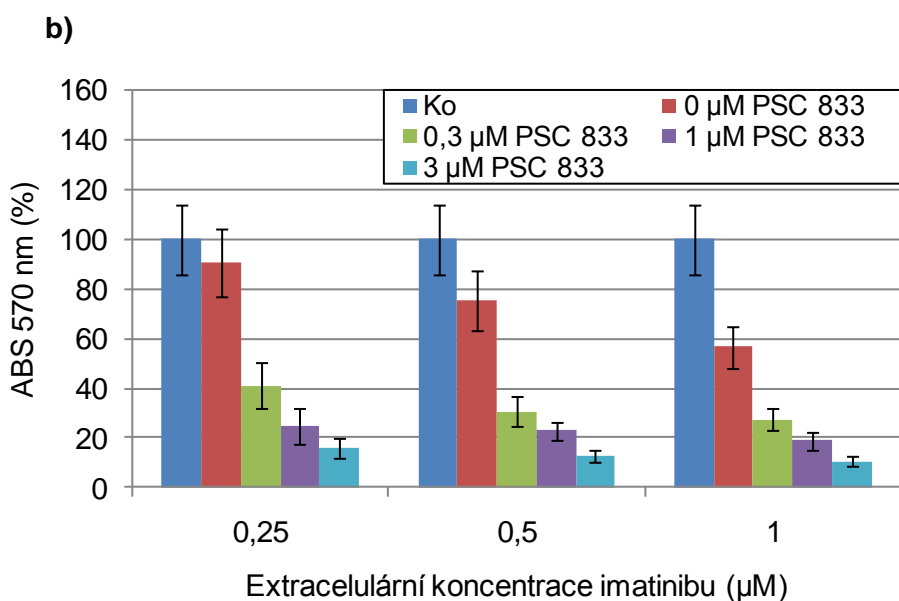
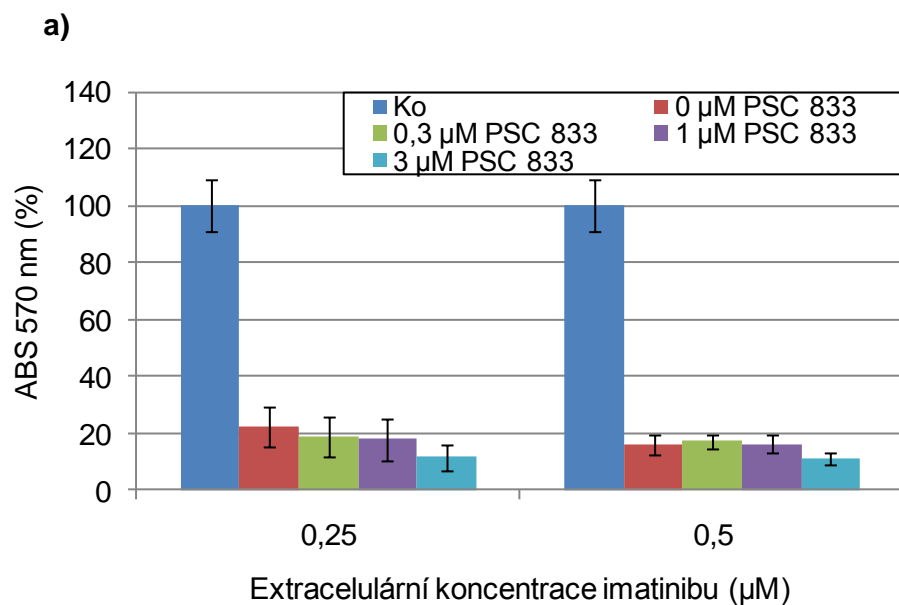
4.2.8.1 Vliv inhibitorů P-gp na citlivost buněk K562/DOX v přítomnosti imatinibu.

I v těchto experimentech jsme se pokusili potlačit rezistenci buněk K562/DOX k imatinibu pomocí CsA, PSC 833 a ZSQ. Buňky byly inkubovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti imatinibu v kombinaci s příslušným inhibitorem P-gp. Po 48 hodinové inkubaci byla buněčná suspenze podrobena MTT testu. Zjistili jsme podobně jako v případě Drb, že CsA v koncentraci 3 μM a vyšší „Obr.45“, PSC 8333 v koncentracích nad 1 μM „Obr.46“ a ZSQ v koncentracích nad 0,1 μM „Obr.47“ obnovují citlivost rezistentní linie K562/DOX k imatinibu. Nejúčinnější inhibitorem byl opět ZSQ. Vliv inhibitorů P-gp na cytotoxicitu imatinibu u buněk K562/DOX a K562 je shrnut v „Tab.10“.

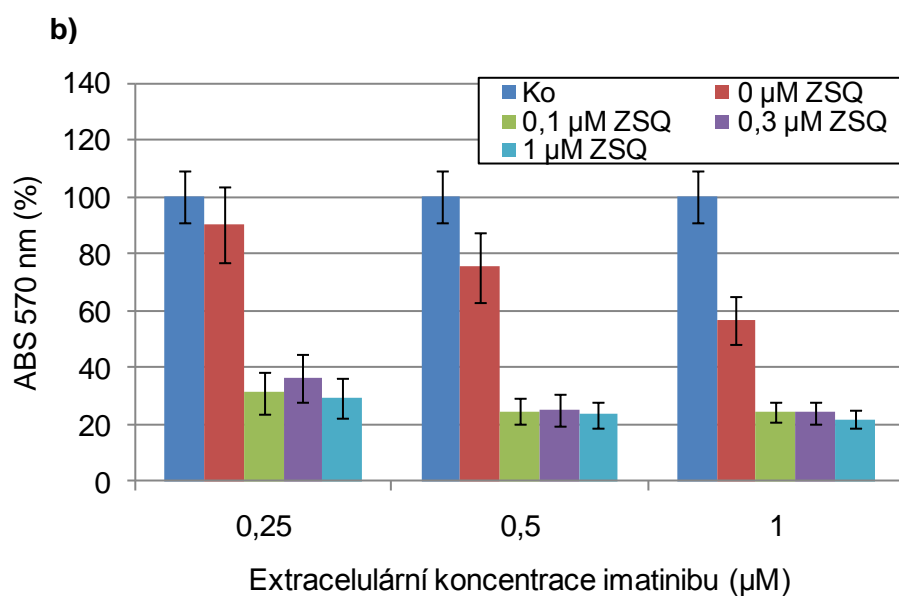
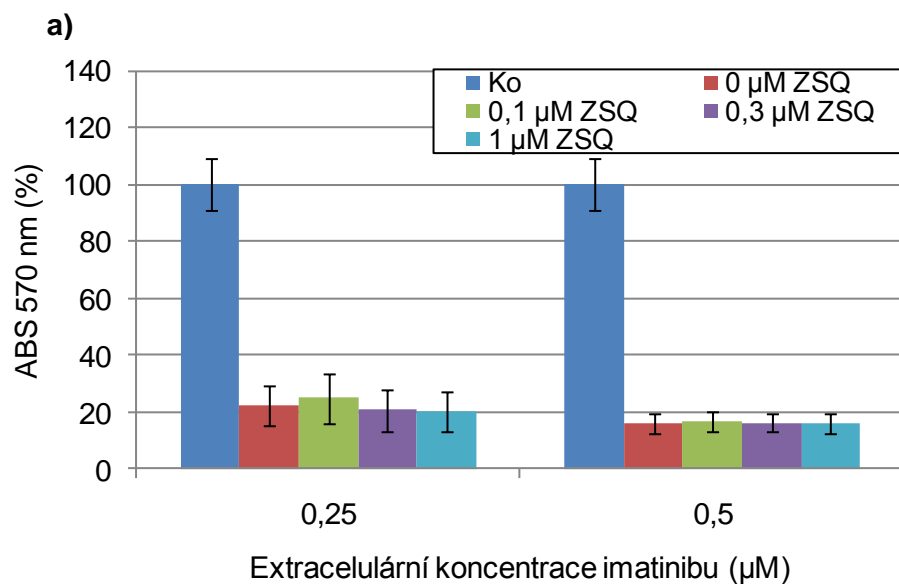
Obnovení citlivosti K562/DOX buněk pomocí CsA, PSC833 nebo ZSQ k imatinibu bylo doprovázeno výrazným nárůstem počtu apoptotických buněk jak plyne z analýzy morfologie jader „Obr.48b-50b“ nebo z výsledků průtokové cytometrie „Obr.51-53“. Podobný efekt nebyl pozorován u buněk K562 „Obr.48a-50a“. Pouze nejvyšší koncentrace CsA (3 a 5 μM) a PSC833 (3 μM) zvyšovaly počty apoptotických buněk u senzitivní linie „Obr.48a-50a“.



Obr.45 Vliv CsA na viabilitu a proliferaci buněk kultivovaných v přítomnosti imatinibu. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti CsA a imatinibu a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku CsA a imatinibu. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



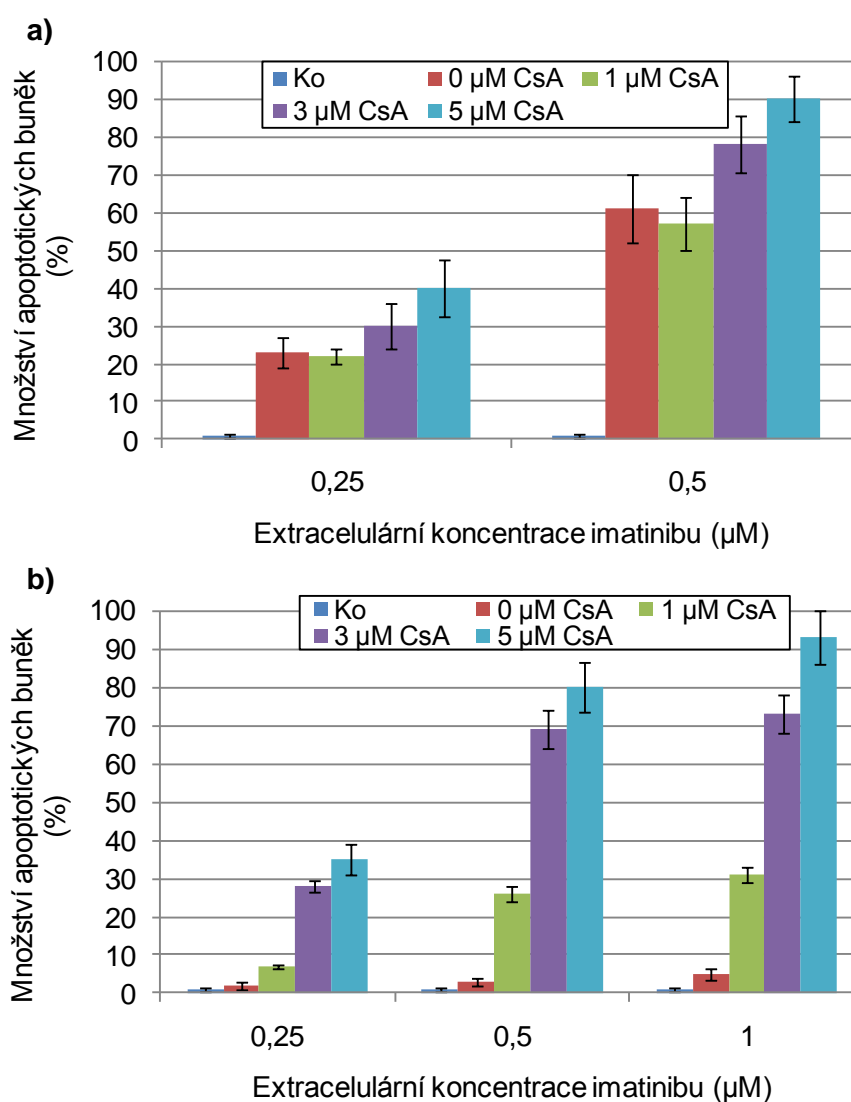
Obr.46 Vliv PSC 833 na viabilitu a proliferaci buněk kultivovaných v přítomnosti imatinibu. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti PSC 833 a imatinibu a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku PSC 833 a imatinibu. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



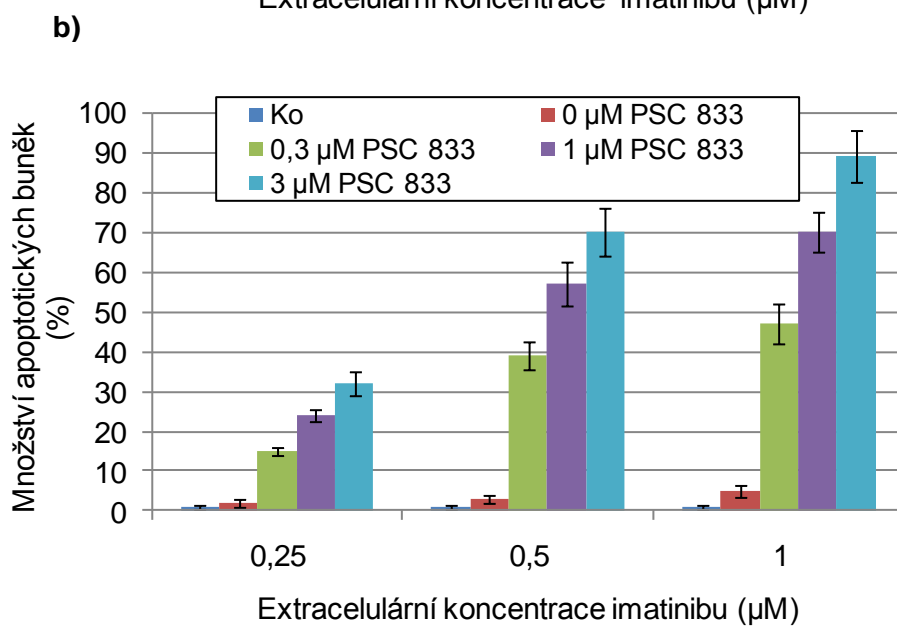
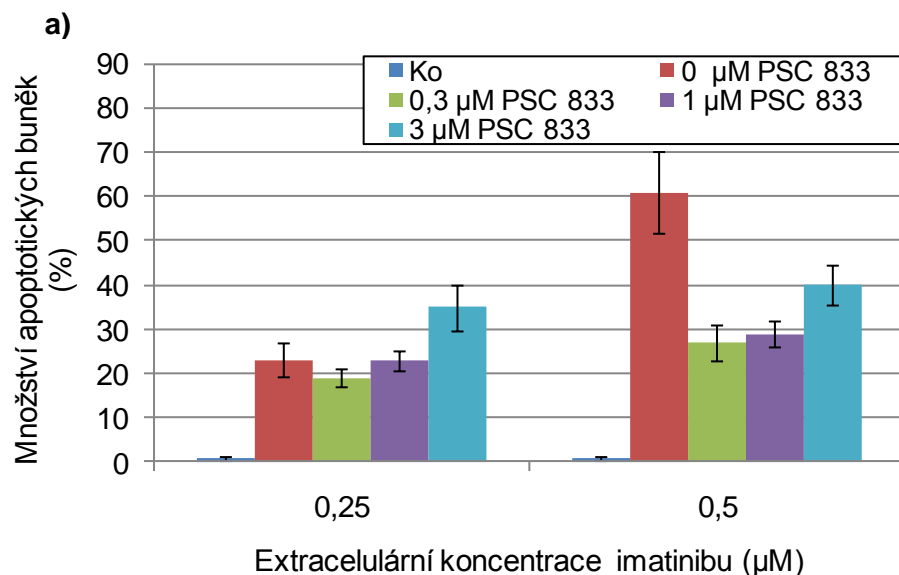
Obr.47 Vliv ZSQ na viabilitu a proliferaci buněk kultivovaných v přítomnosti imatinibu. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti ZSQ a imatinibu a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku ZSQ a imatinibu. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.

Tab.10 Vliv inhibitorů P-gp na cytotoxicitu imatinibu vyjádřené jako hodnoty IC₅₀ vypočtené z MTT testu.

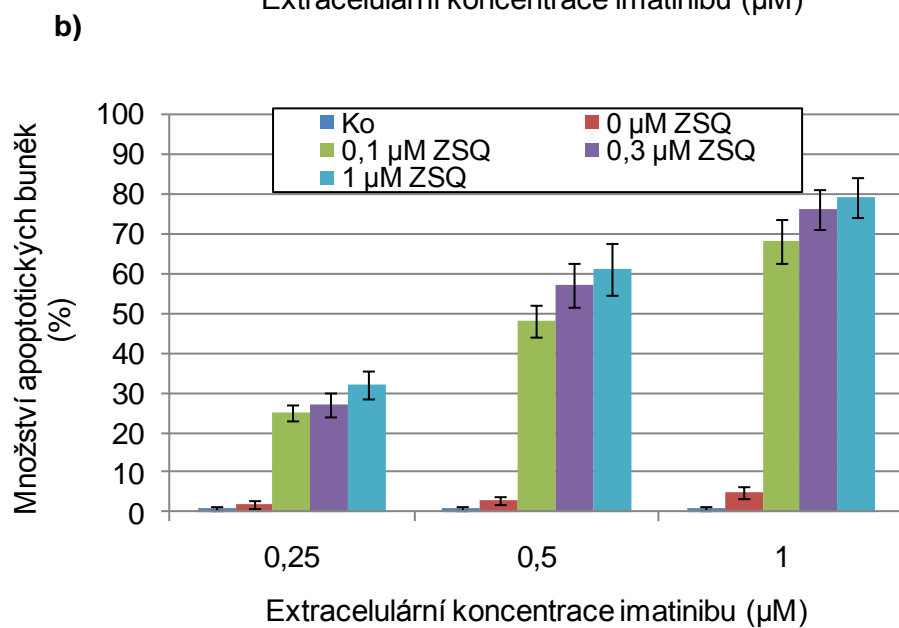
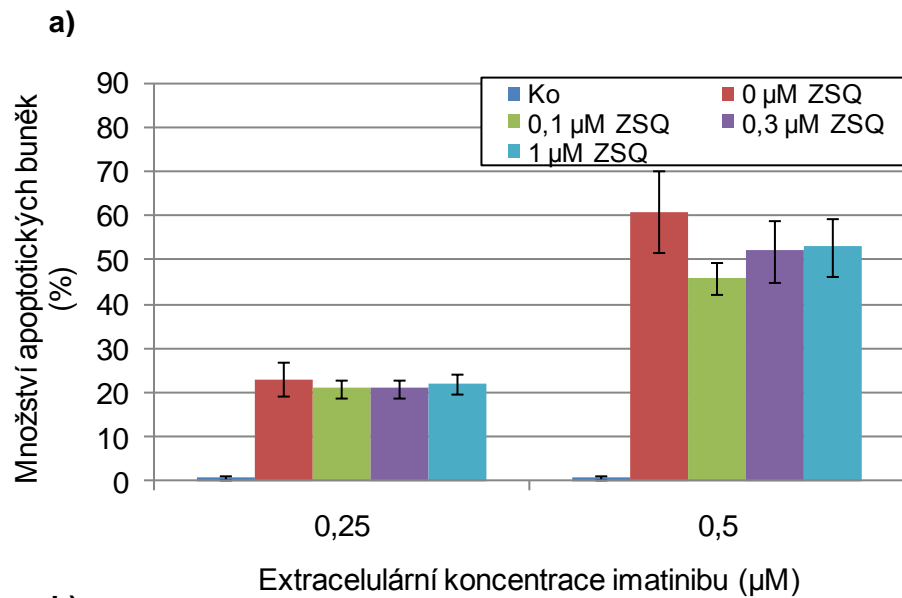
Působení	K562/DOX IC ₅₀ (nM)	K562 IC ₅₀ (nM)
Imatinib	1597,0	145,2
Imatinib +1 μM CsA	467,3	136,5
Imatinib +3 μM CsA	108,5	125,5
Imatinib +5 μM CsA	103,1	117,2
Imatinib +0,3 μM PSC833	361,7	149,7
Imatinib +1 μM PSC833	138,5	149,6
Imatinib +3 μM PSC833	112,3	133,8
Imatinib +0,1 μM ZSQ	144,2	144,3
Imatinib +0,3 μM ZSQ	129,7	143,8
Imatinib +1 μM ZSQ	141,1	138



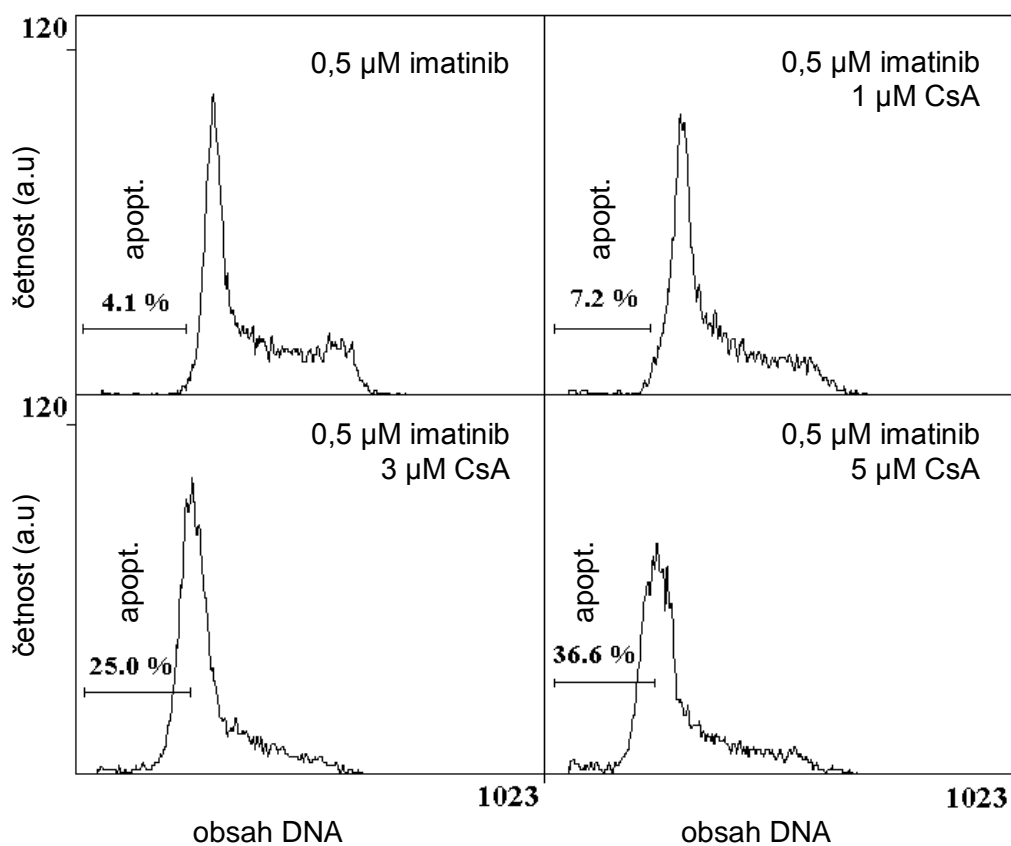
Obr.48 Vliv CsA na indukcii apoptosy u buněk kultivovaných v přítomnosti imatinibu. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti CsA a imatinibu a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku CsA a imatinibu. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



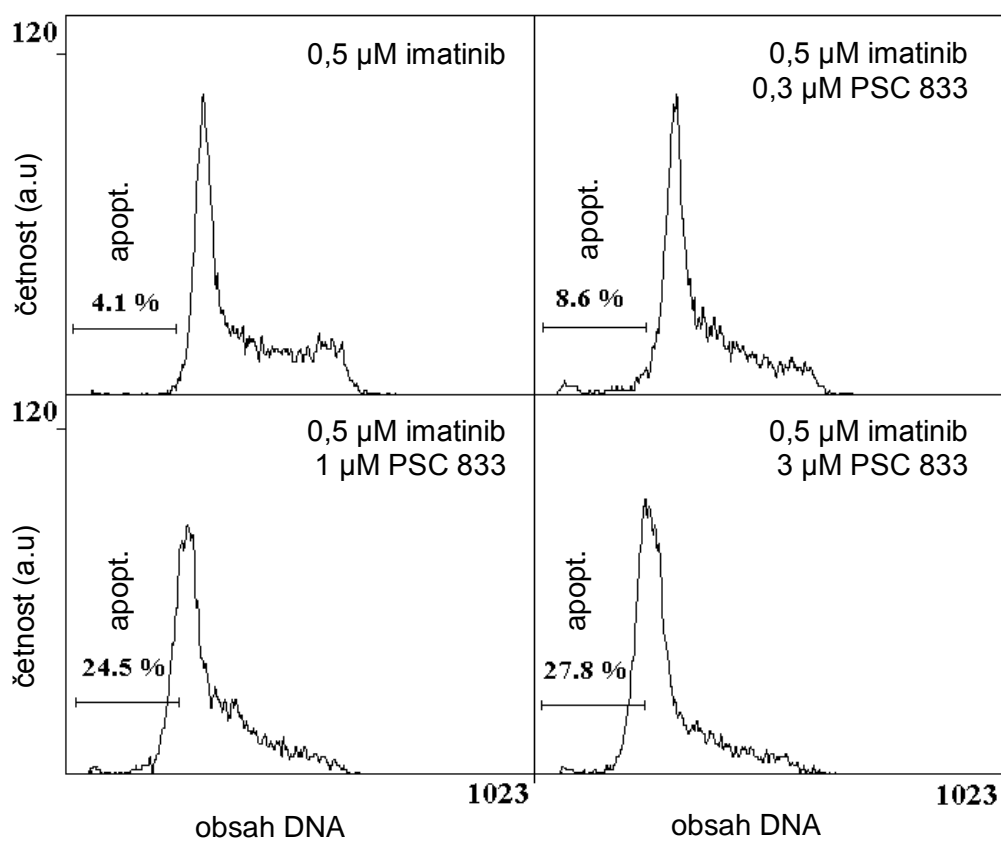
Obr.49 Vliv PSC 833 na indukci apoptozy u buněk kultivovaných v přítomnosti imatinibu. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti PSC 833 a imatinibu a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku PSC 833 a imatinibu. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



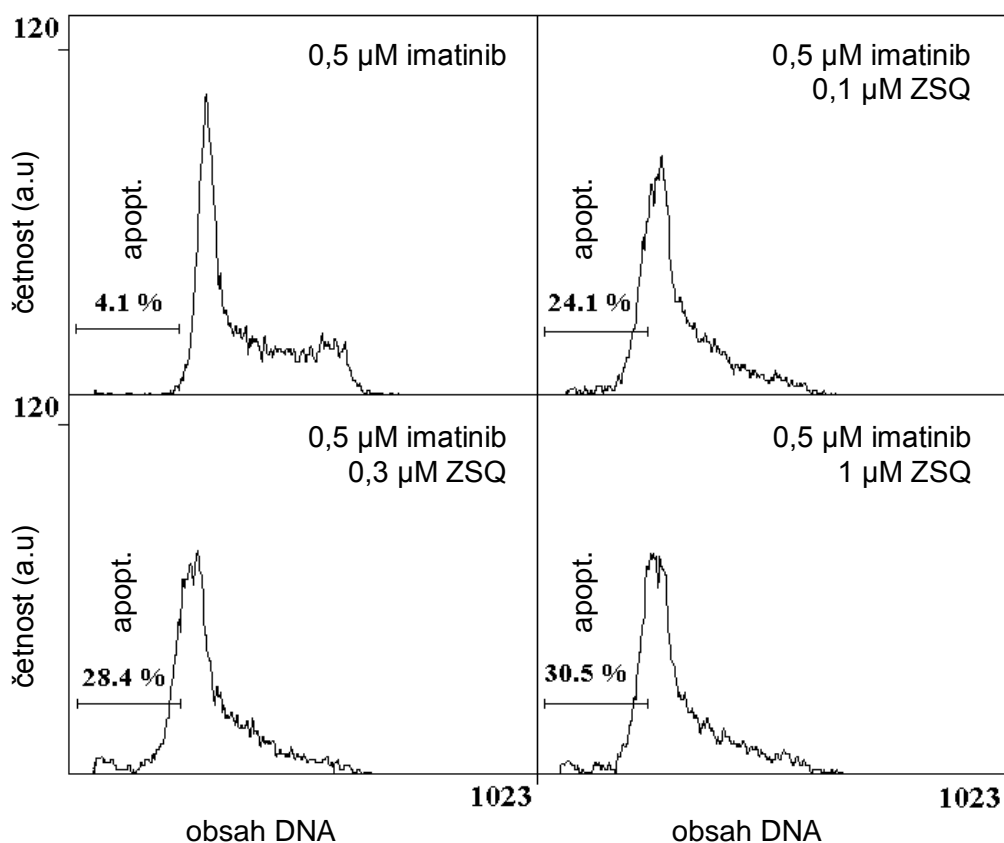
Obr.50 Vliv ZSQ na indukci apoptosy u buněk kultivovaných v přítomnosti imatinibu. a) Buňky K562. b) Buňky K562/DOX. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti ZSQ a imatinibu a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku ZSQ a imatinibu. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



Obr.51 Vliv CsA na buněčný cyklus linie K562/DOX inkubované v přítomnosti imatinibu. Buněčná linie byla inkubována ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti CsA v kombinaci s imatinibem, následně fixována EtOH a obarvena propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických (hypoploidních) buněk. Histogramy představují typický výsledek.

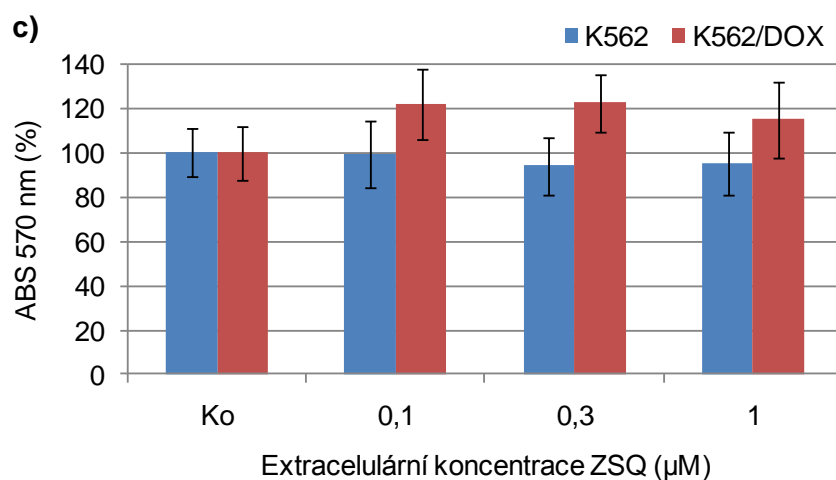
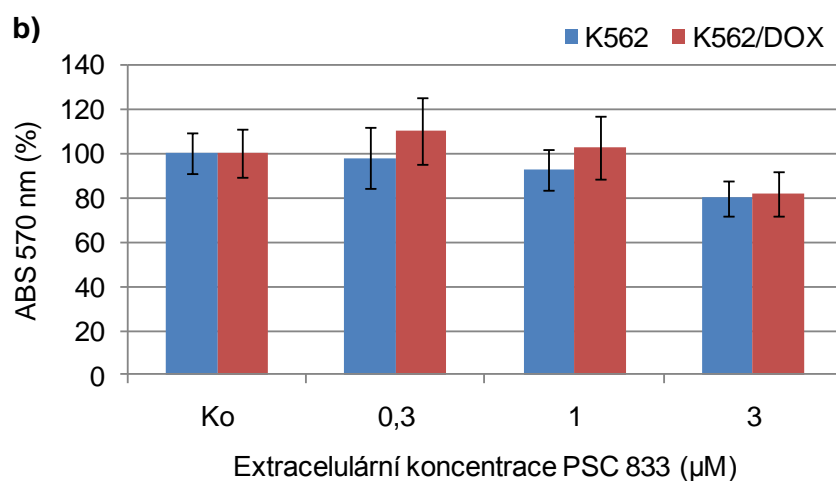
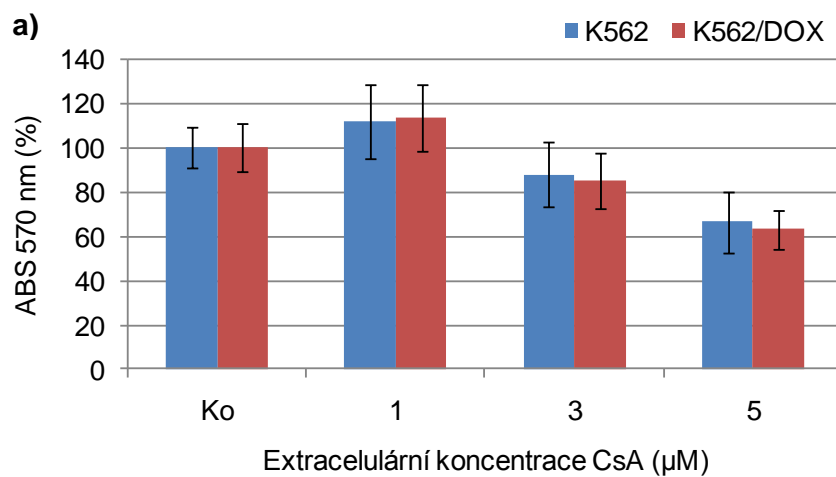


Obr.52 Vliv PSC 833 na buněčný cyklus linie K562/DOX inkubované v přítomnosti imatinibu. Buněčná linie byla inkubována ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti PSC 833 v kombinaci s imatinibem, následně fixována EtOH a obarvena propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických (hypoploidních) buněk. Histogramy představují typický výsledek.

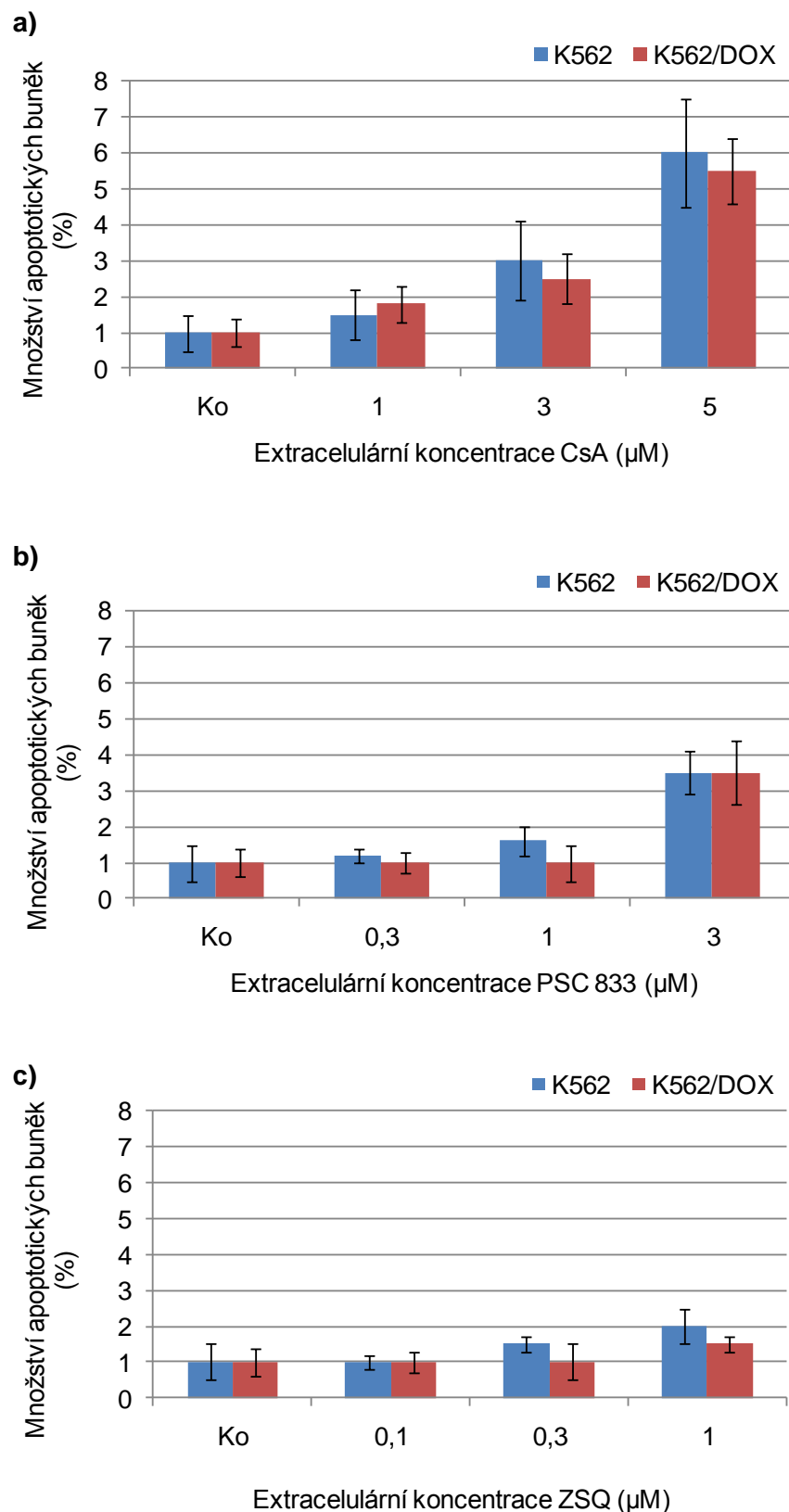


Obr.53 Vliv ZSQ na buněčný cyklus linie K562/DOX inkubované v přítomnosti imatinibu. Buněčná linie byla inkubována ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti ZSQ v kombinaci s imatinibem, následně fixována EtOH a obarvena propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických (hypoploidních) buněk. Histogramy představují typický výsledek.

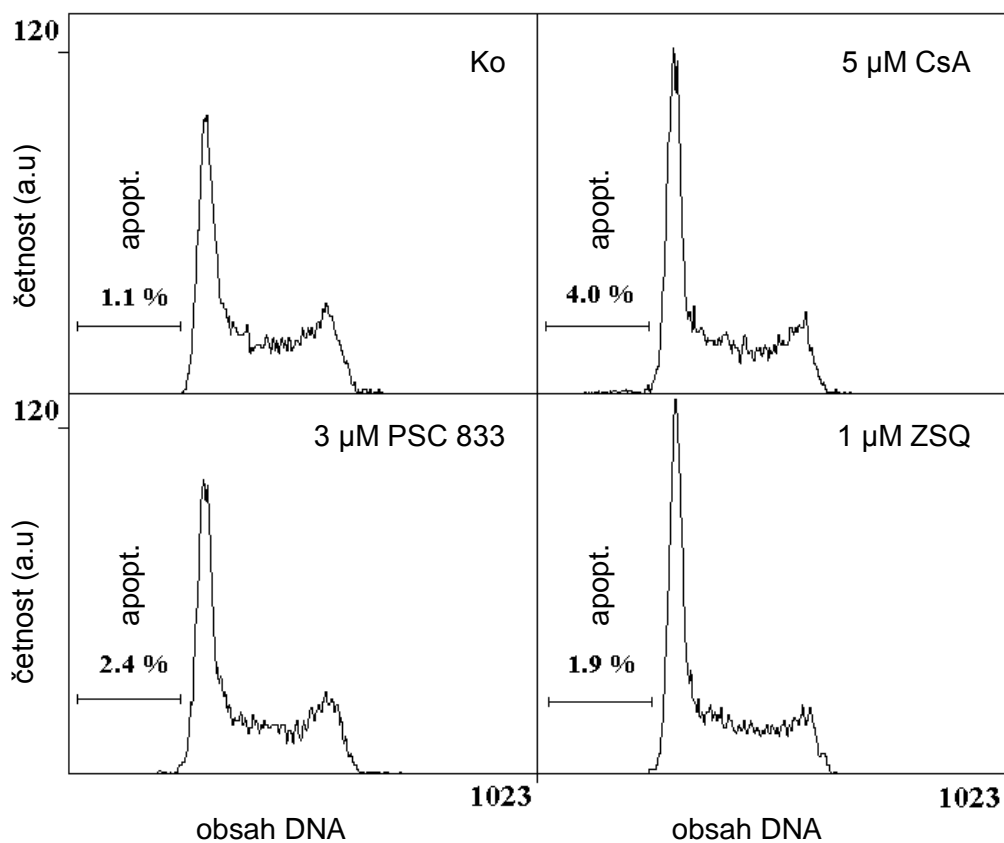
Cytotoxický efekt samotných inhibitorů u obou buněčných linií po 48 hodinové inkubaci byl stanoven pomocí MTT testu. Zjistili jsme, že obě buněčné linie jsou přibližně stejně citlivé k použitým inhibitorům, a že CsA i PSC 833 jsou mírně cytotoxické „Obr.54“. Dále bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace inhibitoru CsA a PSC 833 mají na obě linie mírný proapoptotický efekt, kdežto ZSQ nikoliv „Obr.55“. Stejně výsledky byly pozorovány při analýze buněčného cyklu na průtokovém cytometru „Obr.56“.



Obr.54 Vliv inhibitorů P-gp (CsA, PSC833, ZSQ) na viabilitu a proliferaci buněčné linie K562 a K562/DOX. a) Inhibitor CsA. b) Inhibitor PSC 833 c) Inhibitor ZSQ. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti inhibitorů a následně byla stanovena viabilita a proliferace pomocí MTT testu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přidavku inhibitoru. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



Obr.55 Vliv inhibitorů P-gp (CsA, PSC833, ZSQ) na indukci apoptozy u buněčné linie K562 a K562/DOX. a) Inhibitor CsA. b) Inhibitor PSC 833 c) Inhibitor ZSQ. Buněčné linie byly inkubovány ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti inhibitorů a následně bylo stanoveno množství apoptotických buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku inhibitoru. Zobrazená data jsou získána ze tří měření a jsou uvedena se směrodatnou odchylkou.



Obr.56 Vliv inhibitorů P-gp na buněčný cyklus linie K562/DOX. Buněčná linie byla inkubována ve standardním růstovém médiu (48 h, 37 °C) v přítomnosti inhibitorů, následně fixována EtOH a obarvena propidium jodidem. Na ose x je intenzita měřené fluorescence, která odpovídá množství DNA. Na histogramu je zobrazena četnost apoptotických (hypoploidních) buněk. Ko- kontrolní buňky rostoucí ve standardním růstovém médiu bez přídavku inhibitorů. Histogramy představují typický výsledek.

4.2.8.2 Vliv inhibitorů P-gp na intracelulární obsah imatinibu u buněk K562/DOX

Zatím neuvedeno

4.3 Diskuse

Drb je sloučenina, kterou lze podle mnoha autorů stanovit přímo v buňkách pomocí fluorescenční spektroskopie. Naše výsledky nicméně ukázaly, že tento postup není vhodný pro porovnání intracelulárního obsahu Drb u senzitivních a rezistentních nádorových buněk. Drb interaguje s DNA, která podstatným způsobem ovlivňuje intenzitu jeho fluorescence. Obvykle ji zhasí (Ohnuma et al., 1975). Naše výsledky nicméně ukázaly, že vliv DNA na intenzitu fluorescence Drb je velmi komplexní a že za určitých podmínek může DNA stimulovat intenzitu fluorescence Drb (Krumpochova et al., v tisku). Zhasení či stimulace intenzity fluorescence Drb DNA záleží na jejich vzájemném hmotnostním poměru (Krumpochova et al., v tisku). Tyto výsledky naznačily, že jednoduché stanovení intracelulárního obsahu Drb pomocí fluorescenční spektroskopie nemusí být přesné obzvláště u nádorových buněk, protože jsou aneuploidní (Duesberg et al., 2004). Protože naše senzitivní (K562) a rezistentní (K562/DOX nebo K562/HHT300) buněčné linie se liší svým obsahem genomové DNA, je evidentní, že takové měření nemusí poskytnout správné výsledky. Proto jsme se rozhodli pro přímé stanovení intracelulárního obsahu volného Drb po extrakci z buněk. Abychom zajistili rychlé oddělení buněk od média a současně zabránili transportu Drb, použili jsme centrifugaci buněk přes vrstvu silikonového oleje (Harris et al., 1968, Andreasen et al., 1974). Vzhledem k tomu, že většina intracelulárního Drb je interkalována do DNA, museli jsem použít silná extrakční činidla. Mezi nejúčinnější patřily roztok 10% (w/v) SDS a 1% FA v 50% EtOH/voda (v/v) „Obr.17“. Protože, SDS silně zhasí signál na MS/MS detektoru „Tab.5“, používali jsme 1% FA v 50% EtOH/voda (v/v). Naše výsledky ukázaly, že vyvinutá metoda je vhodná pro měření intracelulárních hladin Drb v senzitivních i rezistentních leukemických buňkách „Obr.19“.

Drb i imatinib jsou známé substráty P-gp (Kartner et al., 1983, Nooter et al., 1990, Mahon et al., 2003), a proto zjištění, že linie K562/DOX, která exprimuje P-gp, je rezistentní k oběma léčivům nebylo překvapující. Nicméně, rezistence K562/DOX buněk k Drb a imatinibu byla rozdílná. Zatímco senzitivita K562/DOX buněk k Drb byla přibližně 90krát menší než u buněk K562 „Tab.6“ citlivost stejných buněk k imatinibu byla pouze 11krát nižší „Tab.9“. Snížená citlivost K562/DOX buněk k Drb i k imatinibu byla provázena sníženou akumulací obou léčiv „Obr.40b, 21b“ a „Tab.8, 11“. Rozdíly v intracelulárních hladinách obou léčiv u senzitivní a rezistentní linie však neodpovídaly rozdílu v citlivosti „Tab.6, 8, 9 a 11“ Intracelulární hladina Drb a imatinibu byla u K562/DOX buněk přibližně 11krát a 7krát nižší než u K562 buněk „Tab.8 a 11“, citlivost stejných buněk k imatinibu byla pouze 11krát nižší „Tab.9“. Tento zjevný nepoměr v

rozdílech citlivostí a intracelulární hladinách obou léčiv je způsoben několika faktory. Jedním z nich je fakt, že cytotoxický efekt Drb se měří po 72 h „Obr.21“ zatímco cytotoxicita imatinibu se vyhodnocuje už po 48 h „Obr.40“. Dvoudenní interval působení Drb nebylo možné zvolit, protože k indukci apoptosy, zde dochází až 3. a 4. den (není ukázáno). Drb 48 h projevuje své cytotoxické účinky na úrovni inhibice proliferace (není ukázáno). Další faktor, který patrně přispívá k vysvětlení pozorovaných rozdílů, je různá účinnost transportu Drb a imatinibu P-gp. Třetím a neméně podstatným důvodem pro vysvětlení pozorovaných rozdílů je silná vazba Drb na DNA (Gigli et al., 1989, Sauvant et al., 2008).

Aplikací každého z inhibitorů, CsA, PSC833 nebo ZSQ bylo možno obnovit citlivost K562/DOX buněk k Drb „Obr.26-28“ a „Tab.7“ nebo imatinibu „Obr.45-47“ a „Tab.10“. Účinky použitých inhibitorů P-gp byly provázeny zvýšenou inhibicí buněčné proliferace a zvýšenou indukcí apoptosy jak plyne z morfologické analýzy buněčných jader „Obr.22-23“ a „Obr.41-42“, nebo měření aktivace kaspasy-3 „Obr.25 a 44“. Zvýšenou indukcí apoptosy bylo možno měřit pomocí průtokové cytometrie, zejména v případě imatinibu „Obr.51-53“. Analýza apoptosy v případě kombinovaného působení Drb a inhibitorů P-gp byla méně přesvědčivá „Obr.32-34“. Důvodem je zřejmě menší mechanická odolnost, což vede k podhodnocení počtu apoptotických buněk. Tento efekt byl doprovázen zvýšením intracelulární hladiny Drb „Obr.38-39“ a „Tab.8“ i imatinibu „Obr.57-58“ a „Tab.11“. Detailní analýza však ukazuje, že CsA i PSC833 obnovuje citlivost K562/DOX buněk, aniž by došlo k odpovídajícímu zvýšení intracelulárních hladin těchto léčiv. Jinými slovy, je zřejmé, že reverze rezistence buněk K562/DOX k daunorubicinu a imatinibu navozená cyklosporinem A nebo valsopodarem je pouze z části vysvětlitelná inhibicí P-gp. Částečně je tento účinek podmíněn mechanismy, které nesouvisí s inhibicí P-gp, a odrážejí cytotoxické vlastnosti samotných inhibitorů (Lavie et al. 1997, Cabot et al 1998). ZSQ, na rozdíl od CsA a PSC 833, obnovuje citlivost K562/DOX buněk k Drb „Obr.28“ a „Tab.7“ i k imatinibu „Obr.47“ a „Tab.10“ za současného zvýšení intracelulární hladiny obou léčiv odpovídající hodnotám, které lze nalézt u senzitivních K562 buněk „Obr.38 a 57“

Naše výsledky jednoznačně ukazují, že hledání kvantitativních vztahů mezi intracelulární hladinou léčiva a senzitivitou rezistentních nádorových buněk k tomuto léčivu umožňuje posoudit účinnost inhibitorů lékových transportérů včetně P-gp nebo podíl lékových transportérů na pozorované rezistenci.

5. Závěr

- 1) Byla dokončena validace originální metody pro stanovení intracelulárního obsahu daunorubicinu u nádorových buněk s fenotypem mnohočetné lékové rezistence *in vitro*.
- 2) Buňky K562/DOX, které exprimují P-glykoprotein, jsou přibližně 90krát méně citlivé k daunorubicinu a přibližně 11krát méně citlivé k imatinibu ve srovnání s K562 buňkami, které neexprimují P-glykoprotein.
- 3) Cyklosporin A, valspodar i zosuquidar zcela obnovují citlivost rezistentních K562/DOX buněk k daunorubicinu a imatinibu.
- 4) Buňky K562/DOX, které exprimují P-glykoprotein, mají přibližně 11krát nižší intracelulární hladinu daunorubicinu a přibližně 7krát menší intracelulární hladinu imatinibu ve srovnání s K562 buňkami, které neexprimují P-glykoprotein.
- 5) Účinky cyklosporinu A, valspodaru i zosuquidaru jsou provázeny zvyšováním intracelulárních hladin daunorubicinu a imatinibu u rezistentních K562/DOX buněk. Pouze zosuquidar, na rozdíl od cyklosporinu A a valspodaru, indukoval zvýšení intracelulární hladiny obou léčiv na hodnoty, které byly nalezeny v senzitivních buňkách K562.
- 6) Naše výsledky ukazují, že reverzi rezistence buněk K562/DOX k daunorubicinu a imatinibu indukovanou cyklosporinem A a valspodarem lze pouze z části vysvětlit inhibicí P-glykoproteinu. Naproti tomu reverzi rezistence buněk K562/DOX k daunorubicinu a imatinibu indukovanou zosuquidarem lze vysvětlit inhibicí P-glykoproteinu.

6. Literatura

- Allikmets R., Schriml L. M., Hutchinson A., Romano-Spica V., Dean M. (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* **58**, 5337-5339.
- Altenberg G. A., Vanoye C. G., Horton J. K., Reuss L. (1994) Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug-resistant cells: evidence against direct drug extrusion from the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4654-4657.
- Ambudkar S. V., Dey S., Hrycyna C. A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M. M. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 361-398.
- Ambudkar S. V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z. E., Gottesman M. M. (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**, 7468-7485.
- An X., Tiwari A. K., Sun Y., Ding P.R., Ashby C.R. Jr., Chen Z.S. (2010) BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk. Res.* **34**, 1255-1268.
- Andreasen P. A., Schaumburg B. P., Osterline K., Vinten J., Gammeltoft S., Gliemann J. (1974) A rapid technique for separation of thymocytes from suspensions by centrifugation through silicone oil. *Anal. Biochem.* **59**, 610-616.
- Bakos E., Evers R., Szakács G., Tusnády G. E., Welker E., Szabó K., de Haas M., van Deemter L., Borst P., Váradi A., Sarkadi B. (1998) Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 32167-32175.
- Bakos E., Homolya L. (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch.* **453**, 621-641.
- Cabot M. C., Han T. Y., Giuliano A. E. (1998) The multidrug resistance modulator SDZ PSC 833 is a potent activator of cellular ceramide formation. *FEBS Lett.* **431**, 185-188.
- Cole S. P., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E., Grant C. E., Almquist K. C., Stewart A. J., Kurz E. U., Duncan A. M., Deeley R. G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654.
- Cortes J. E., Talpaz M., O'Brien S., Faderl S., Garcia-Manero G., Ferrajoli A., Verstovsek S., Rios M. B., Shan J., Kantarjian H. M. (2006) Staging of chronic myeloid leukemia in imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* **106**, 1306-1315.
- Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. (1995) Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5531-5541.

Cowan-Jacob S. W., Guez V., Fendrich G., Griffin J. D., Fabbro D., Furet P., Liebetanz J., Mestan J., Manley P. W. (2004) Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. *Mini. Rev. Med. Chem.* **4**, 285-299.

Cripe L. D., Uno H., Paietta E. M., Litzow M. R., Ketterling R. P., Bennett J. M., Rowe J. M., Lazarus H. M., Luger S., Tallman M. S. (2010) Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood* **116**, 4077-4085.

Dean M. (2009) ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **14**, 3-9.

Dean M., Allikmets R. (2001) Complete characterization of the human ABC gene family. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 475-479.

Degos L. (2001) John Hughes Bennett, Rudolph Virchow... and Alfred Donné: the first description of leukemia. *Hematol. J.* **2**, 1.

Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15665–15670.

Druker B. J. (2008) Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* **112**, 4808-4817.

Druker B. J., Guilhot F., O'Brien S. G., Gathmann I., Kantarjian H., Gattermann N., Deininger M. W., Silver R. T., Goldman J. M., Stone R. M., Cervantes F., Hochhaus A., Powell B. L., Gabrilove J. L., Rouselot P., Reiffers J., Cornelissen J. J., Hughes T., Agis H., Fischer T., Verhoef G., Shepherd J., Saglio G., Gratwohl A., Nielsen J. L., Radich J. P., Simonsson B., Taylor K., Baccarani M., So C., Letvak L., Larson R. A.; IRIS Investigators. (2006) Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2408-2417.

Druker B. J., Talpaz M., Resta D. J., Peng B., Buchdunger E., Ford J. M., Lydon N. B., Kantarjian H., Capdeville r., Ohno-Jones S., Sawyers C. L. (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1031-1037.

Duesberg P., Fabarius A., Hehlmann R. (2004) Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* **56**, 65-81.

Ehrlich P. (1891) *Farbenanalytische Untersuchung zur Histologie und Klinik des Blutes*, 137 s, Verlag von August Hirschwald, Berlin, Germany.

Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., Kantarjian H. M. (1999a) Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann. Intern. Med.* **131**, 207-219.

Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian H. M. (1999b) The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **34**, 164-172.

Fialkow P. J., Jacobson R. J., Papayannopoulou T. (1977) Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am. J. Med.* **63**, 125-130.

Fischer V., Rodríguez-Gascón A., Heitz F., Tynes R., Hauck C., Cohen D., Vickers A. E. (1998) The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A. Implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 802-811.

Friedreich N. (1857) Ein neuer Fall von leukämie. *Virchows Arch. A Pathol. Pathol. Anat.* **12**, 37-58.

Gambacorti-Passerini C., Barni R., le Coutre P., Zucchetti M., Cabrita G., Cleris L., Rossi F., Gianazza E., Brueggen J., Cozens R., Pioltelli P., Pogliani E., Corneo G., Formelli F., D'Incalci M. (2000) Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1641-1650.

Gigli M., Rasoanaivo T. W., Millot J. M., Jeannesson P., Rizzo V., Jardillier J. C., Arcamone F., Manfait M. (1989) Correlation between growth inhibition and intranuclear doxorubicin and 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin quantitated in living K562 cells by microspectrofluorometry. *Cancer Res.* **49**, 560-564.

Gorre M. E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P. N., Sawyers C. L. (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-880.

Gottesman M.M. (2002) Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**, 615-627.

Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 48-58.

Graham S. M., Jørgensen H. G., Allan E., Pearson C., Alcorn M. J., Richmond L., Holyoake T. L. (2002) Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**, 319-325.

Groffen J., Stephenson J. R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C. R., Grosveld G. (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93-99.

Harris E., van Dam K. (1968) Changes of total water and sucrose space accompanying induced ion uptake or phosphate swelling of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **106**, 759-766.

Heisterkamp N., Groffen J., Stephenson J. R., Spurr N. K., Goodfellow P. N., Solomon E., Carritt B., Bodmer W. F. (1982) Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature* **299**, 747-749.

Higgins C. F., Gottesman M. M. (1992) Is the multidrug transporter flippase? *Trends Biochem. Sci.* **17**, 18-21.

Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H. P., Brockmöller J., Johné A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U. (2000) Functional polymorphisms

of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 3473–3478.

Hochhaus A., Kreil S., Corbin A. S., La Rosée P., Müller M. C., Lahaye T., Hanfstein B., Schoch C., Cross N. C., Berger U., Gschaidmeier H., Druker B. J., Hehlmann R. (2002) Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* **16**, 2190-2196.

Chen J., Lu G., Lin J., Davidson A. L., Quijcho F. A. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell* **12**, 651–661.

Indrák K., Faber E., Jarošová M. (2009) Léčba chronické myeloidní leukemie (CML) v éře imatinibu. *Vnitř. Lék.* **55**, 65-73.

Juliano R. L., Ling V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta.* **455**, 152-162.

Kantarjian H. M., Cortes J., La Rose´e P., Hochhaus A. (2010) Optimizing therapy for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer* **116**, 1419-1430.

Kartner N., Shales M., Riordan J. R., Ling V. (1983) Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res.* **43**, 4413-4419.

Kioka N., Tsubota J., Kakehi Y., Komano T., Gottesman M. M., Pastan I., Ueda K. (1989) P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 224-231.

Krishna R., Mayer L. D. (2000) Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **11**, 265-283.

Krumphochova P., Kocurova A., Dolezel P., Mlejnek P. (v tisku) Assay for determination of daunorubicin in cancer cells with multidrug resistance phenotype. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*

Kurzrock R., Gutterman J. U., Talpaz M. (1988) The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* **319**, 990-998.

Lavie Y., Cao H., Volner A., Lucci A., Han T. Y., Geffen V., Giuliano A. E., Cabot M. C. (1997) Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 1682-1687.

Locher K. P. (2009) Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **27**, 239-245.

Lombardo L. J., Lee F. Y., Chen P., Norris D., Barrish J. C., Behnia K., Castaneda S., Cornelius L. A., Das J., Doweiko A. M., Fairchild C., Hunt J. T., Inigo I., Johnston K., Kamath A., Kan D., Klei H., Marathe P., Pang S., Peterson R., Pitt S., Schieven G. L., Schmidt R. J., Tokarski J., Wen M. L., Wityak J., Borzilleri R. M. (2004) Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-

ylamino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J. Med. Chem.* **47**, 6658-6661.

Ludescher C., Thaler J., Drach D., Drach J., Spitaler M., Gattlinger C., Huber H., Hofmann J., (1992), Detection of activity of P-glycoprotein in human tumour samples using rhodamine 123. *Br. J. Haematol.* **82**, 161-168.

Lugo T. G., Pendergast A. M., Muller A. J., Witte O. N. (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**, 1079-1082.

Mahon F. X., Belloc F., Lagarde V., Chollet C., Moreau-Gaudry F., Reiffers J., Goldman J. M., Melo J. V. (2003) MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* **15**, 2368-2373.

Mao Q., Unadkat J. D. (2005) Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* **7**, 118-133.

McGahon A., Bissonnette R., Schmitt M., Cotter K. M., Green D. R., Cotter T. C. (1994) BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* **83**, 1179-1187.

McWhirter J. R., Galasso D. L., Wang J. Y. (1993) A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7587-7595.

Melo J. V. (1996) The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **10**, 751-756.

Melo J. V., Myint H., Galton D. A., Goldman J. M. (1994) P190 BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia? *Leukemia* **8**, 208-211.

Mlejnek P., Novak O., Dolezel P. (2011) A non-radioactive assay for precise determination of intracellular levels of imatinib and its main metabolite in Bcr-Abl positive cells. *Talanta* **83**, 1466-1471.

Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., Brangi M., Greenberger L., Dean M., Fojo T., Bates S. E. (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **59**, 8-13.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.

Nagar B., Bornmann W. G., Pellicena P., Schindler T., Veach D. R., Miller W. T., Clarkson B., Kuriyan J. (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* **62**, 4236-4243.

Nooter K., Sonneveld P., Oostrum R., Herweijer H., Hagenbeek T., Valerio D. (1990) Overexpression of the *mdr1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by cyclosporin-A. *Int. J. Cancer* **45**, 263-268.

- Nooter K., Westerman A. M., Flens M. J., Zaman G. J., Scheper R. J., van Wingerden K. E., Burger H., Oostrum R., Boersma T., Sonneveld P. (1995) Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1301-1310.
- Nowell P. C., Hungerford D. A. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132**, 1497.
- Ohnuma T., Holland J. F., Chen J. H. (1975) Pharmacological and therapeutic efficacy of daunomycin:DNA complex in mice. *Cancer Res.* **35**, 1767-1772.
- O'Brien S. G., Guilhot F., Larson R. A., Gathmann I., Baccarani M., Cervantes F., Cornelissen J. J., Fischer T., Hochhaus A., Hughes T., Lechner K, Nielsen J. L., Rousselot P., Reiffers J., Saglio G., Shepherd J., Simonsson B., Gratwohl A., Goldman J. M., Kantarjian H., Taylor K., Verhoef G., Bolton A. E., Capdeville R, Druker B. J., IRIS Investigators (2003) Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 994-1004.
- Pane F., Frigeri F., Sindona M., Luciano L., Ferrara f., Cimino R., Meloni G., Saglio G., Salvatore F., Rotoli B. (1996) Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* **88**, 2410-2414.
- Pendergast A. M., Muller A. J., Havlik M. H., Maru Y., Witte O. N. (1991) BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* **66**, 161-171.
- Puil L., Liu J., Gish G., Mbamalu G., Bowtell D., Pelicci P. G., Arlinghaus R., Pawson T. (1994) Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* **13**, 764-773.
- Raviv Y., Pollard H. B., Bruggemann E. P., Pastan J., Gottesman M. M. (1990) Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 3975-3980.
- Riordan J. R., Deuchars K., Kartner N., Alon N., Trent J., Ling V. (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* **316**, 817-819.
- Robey R. W., Honjo Y., Morisaki K., Nadjem T. A, Runge S., Risbood M., Poruchynsky M. S., Bates S. E. (2003) Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br. J. Cancer* **89**, 1971-1978.
- Ros J. E., Libbrecht L., Geuken M., Jansen P. L., Roskams T.A. (2003) High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J. Pathol.* **200**, 553-560.
- Rosenberg M. F., Callaghan R., Modok S., Higgins C. F., Ford R. C. (2005) Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J. Biol. Chem.* **280**, 2857-2862.
- Rowley J. D. (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290-293.

Saeki T., Ueda K., Tanigawara Y., Hori R., Komano T. (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**, 6077-6080.

Sarkadi B., Homolya L., Szakács G., Váradi A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol. Rev.* **86**, 1179-1236.

Sauvant C., Thews O., Wirth C., Gekle M. (2008) Direct determination of intracellular daunorubicin in intact confluent monolayers of AT1 prostate carcinoma cells using a multiwell-multilabel counter. *Anal. Biochem.* **381**, 81-85.

Sawyers C. L. (1997) Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. *Baillieres Clin. Haematol.* **10**, 223-231.

Sawyers C. L. (1999) Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1330-1340.

Sawyers C. L., Hochhaus A., Feldman E., Goldman J. M., Miller C. B., Ottmann O. G., Schiffer C. A., Talpaz M., Guilhot F., Deininger M. W., Fischer T., O'Brien S. G., Stone R. M., Gambacorti-Passerini C. B., Russell N. H., Reiffers J. J., Shea T. C., Chapuis B., Coutre S., Tura S., Morra E., Larson R. A., Saven A., Peschel C., Gratwohl A., Mandelli F., Ben-Am M., Gathmann I., Capdeville R., Paquette R. L., Druker B. J. (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* **99**, 3530-3539.

Simon S. M., Schindler M. (1994) Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3497-3504

Schinkel A. H. (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 161-170.

Schinkel A. H., Smit J. J., van Tellingen O., Beijnen J. H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C. A., van der Valk M. A., Robanus-Maandag E. C., te Riele H. P., et al. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **77**, 491-502.

Talpaz M., Silver R. T., Druker B. J., Goldman J. M., Gambacorti-Passerini C., Guilhot F., Schiffer C. A., Fischer T., Deininger M. W., Lennard A. L., Hochhaus A., Ottmann O. G., Gratwohl A., Baccarani M., Stone R., Tura S., Mahon F. X., Fernandes-Reese S., Gathmann I., Capdeville R., Kantarjian H. M., Sawyers C. L. (2002) Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* **99**, 1928-1937.

Thomas H., Coley H. M. (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* **10**, 159-165.

Tokarski J. S., Newitt J. A., Chang C. Y., Cheng J. D., Wittekind M., Kiefer S. E., Kish K., Lee F. Y., Borzilleri R., Lombardo L. J., Xie D., Zhang Y., Klei H. E. (2006) The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* **66**, 5790-5797.

van Herwaarden A. E., Wagenaar E., Merino G., Jonker J. W., Rosing H., Beijnen J. H., Schinkel A. H. (2007) Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1247-1253.

Wang J. Y. (1993) Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 35-43.

Weisberg E., Manley P. W., Breitenstein W., Brügger J., Cowan-Jacob S. W., Ray A., Huntly B., Fabbro D., Fendrich G., Hall-Meyers E., Kung A. L., Mestan J., Daley G. Q., Callahan L., Catley L., Cavazza C., Azam M., Neuberg D., Wright R. D., Gilliland D. G., Griffin J. D. (2005) Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**, 129-141.

Westfall D. E., Zhang L., Song S., Lee S. (2008) Concurrent megakaryocytic and erythroid chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **132**, 1021-1025.

White D. L., Saunders V. A., Dang P., Engler J., Zannettino A. C., Cambareri A. C., Quinn S. R., Manley P. W., Hughes T. P. (2006) OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* **108**, 697-704.

Yang K., Wu J., Li X. (2008) Recent advances in research on P-glycoprotein inhibitors. *Biosci. Trends* **2**, 137-146.

7. Seznam použitých zkratek

ABC	ATP vazebná kazeta
ABCB1	ABC transportní protein patřící do podrodiny B
ABCC1	ABC transportní protein patřící do podrodiny C
ABCG2	ABC transportní protein patřící do podrodiny G
<i>ABL</i>	lidský homolog myššího onkogenního viru (Abelson Murine Leukemia Virus)
ABS	absorbance
ADP	adenosin difosfát
ARG	<i>ABL</i> related gene
ATP	adenosin trifosfát
BCR	breakpoint cluster region (oblast zlomů na 22. chromosomu)
BCRP	breast cancer resistance protein
<i>BCR-ABL</i>	fúzní leukemický gen
CML	chronická myeloidní leukemie
CRKL	CRK-oncogene-like protein
CsA	cyklosporin A
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Drb	daunorubicin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykoltetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
FA	kyselina mravenčí
GAP	GTPasa aktivující protein
GDP	guanosin difosfát
GEF	faktor vyměňující GTP za GDP
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2 (adaptorový protein pro receptor růstového faktoru)
GTP	guanosin trifosfát
h	hodina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
hOCT1	human organic cationic transporter (lidský transportér organických kationtů)

I	isoleucin
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
KIT	tyrosin kinasový receptor
M	methionin
MDR	multidrug resistance (mnohočetná léková rezistence)
MeOH	methanol
mRNA	mediátorová RNA
MRP1	multidrug resistance protein
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
m-bcr	minor breakpoint cluster region
M-bcr	major breakpoint cluster region
μ-bcr	micro breakpoint cluster region
NBD	nukleotid vazebná doména
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α (receptor pro destičkový růstový faktor)
PDGFR β	platelet-derived growth factor receptor β (receptor pro destičkový růstový faktor)
Ph ⁺ chromosom	Philadelphia chromosom
PIPES	piperazinethansulfonová kyselina
PSC 833	Valspodar
p145 ^{ABL}	ABL protein o velikosti 145 kDa
p160 ^{BCR}	BCR protein o velikosti 160 kDa
p190 ^{BCR-ABL}	leukemický protein o velikosti 190 kDa
p210 ^{BCR-ABL}	leukemický protein o velikosti 210 kDa
p230 ^{BCR-ABL}	leukemický protein o velikosti 230 kDa
P-gp	P-glykoprotein
RAC	GTPasa podobná RAS
RAS	Rat sarcoma
RecA	rekombinasa A
rIFN	rekombinantní interferon alfa
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptasy
SDS	dodecylsulfát sodný
SH (1, 2, 3)	SRC homologní domény
SNP	single nucleotide polymorphisms

SRC	rous sarcoma virus
T	threonin
TMD	transmembránová doména
ZSQ	zosuquidar