

Univerzita Palackého v Olomouci

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Modulace cytotoxických účinků syntetického
analogu kurkuminu EF24 thioly**

Diplomová práce

Bc. Nikola Skoupá

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.

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

V Olomouci dne 29. 4. 2016

.....

Děkuji doc. RNDr. Petru Mlejnkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost a cenné rady při vypracování experimentální části diplomové práce v laboratoři Ústavu normální anatomie na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Velké poděkování patří také RNDr. Petru Doleželovi a Mgr. Elišce Růžičkové za ochotnou spolupráci a přátelskou atmosféru.

Shrnutí

Nádorové onemocnění nejčastěji vzniká z důvodu různých mutací v genech, které regulují proliferaci, diferenciaci, buněčnou smrt, adhezi buněk, apod. Nádorová onemocnění představují různorodou skupinu chorob, které mohou postihnout libovolnou tkáň. V diplomové práci se zabývám chronickou myeloidní leukémií (CML), která je charakteristická výskytem *bcr-abl* fúzního onkogenu kódujícího trvale aktivní tyrosinkinasu BCR-ABL. Významným objevem pro léčbu CML byla rodina tyrosinkinasových inhibitorů, která je specificky cílená na daný onkoprotein. Dalším významným molekulárním cílem u CML je inhibice dráhy transkripčního faktoru nuclear factor-kappaB (NF- κ B). Mezi inhibitory NF- κ B řadíme například syntetický analog kurkuminu 3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on (EF24). Bylo prokázáno, že EF24 má ve srovnání s kurkuminem vyšší biologickou dostupnost a má až 20x silnější antiproliferační účinky na nádorové buňky (Adams *et al.*, 2004). Práce A. Suna a spol. ukázala, že látka EF24 tvoří adukty s glutathionem (GSH) a tyto adukty jsou stejně cytotoxické jako samotné EF24 u buněk karcinomu prsu *in vitro* (Sun *et al.*, 2009). Tento výsledek se nám zdál překvapivý, a proto jsme se rozhodli zjistit, zda thioly (NAC, GSH) modulují cytotoxický účinek EF24 a zda vznikající adukty mají podobné cytotoxické účinky jako samotný EF24 u buněk CML.

V předchozí práci jsme zjistili, že EF24 indukuje apoptosu u buněk K562 a že exprese ABCB1 transportéru nesnižuje citlivost těchto buněk k látce EF24 (Skoupá, bakalářská práce, 2014). Naše nové výsledky, prezentované v předložené diplomové práci, ukázaly, že NAC i GSH zvyšují hladinu intracelulárního GSH, inhibují produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a snižují cytotoxické účinky EF24. Dále jsme zjistili, že důvodem těchto protektivních účinků je tvorba aduktů EF24 s thioly, které pravděpodobně nemají stejně cytotoxický efekt jako samotný EF24. Toto tvrzení bylo prokázáno u mono-aduktu EF24-NAC, u kterého bylo zjištěno, že má signifikantně nižší cytotoxické účinky než samotný EF24. Zároveň bylo zjištěno, že EF24 neovlivňuje expresi receptorů TRAIL-R2 a FAS a má protichůdné účinky na expresi XIAP a survivinu, což ve výsledku patrně nemá vliv na indukci buněčné smrti u buněk CML. Také bylo prokázáno, že exprese ABCG2 nesnižuje citlivost buněk k EF24.

Summary

Cancer is caused by various mutations in genes that regulate the proliferation, differentiation, cell death, cell adhesion, etc. Cancer represent heterologous group of disease that may occur in any tissue. My thesis deals with the chronic myeloid leukemia (CML), which is characterized by the presence of *bcr-abl* fusion oncogene coding for constitutively active BCR-ABL tyrosine kinase.

The discovery of family of tyrosin kinase's inhibitors, that specifically target the oncoprotein, was important for the treatment of CML. Another important molecular target of CML is the pathway of transcription factor nuclear factor-kappaB (NF-κB). Inhibitors of NF-κB include for example a synthetic analogue of curcumin 3,5-bis(fluorobenzylidene)-4-piperidone (EF24). It was demonstrated that EF24 exhibits higher biological availability in comparison to curcumin. In addition, EF24 is approximately 20 times more potent antiproliferative agent than curcumin (Adams *et al.*, 2004). Recently, it was reported that EF24 forms adducts with glutathione (GSH) and that these adducts are equally cytotoxic to EF24 in breast cancer cells *in vitro* (Sun *et al.*, 2009). Since these results were rather surprising for us we decided to find out whether thiols (NAC, GSH) can modulate the cytotoxic effect of EF24 and whether the resulting adducts have similar cytotoxic effects like EF24 in CML's cells.

In previous work we demonstrated that EF24 induces apoptosis in K562 cells and that expression of transporter ABCB1 decrease the sensitivity of these cells to the EF24 (Skoupá, thesis, 2014). Our results indicated that NAC and GSH prevent depletion of intracellular GSH, inhibit the production of reactive oxygen species (ROS) and reduce cytotoxic effects of EF24. We concluded, that the reason for these protective effects was the formation of EF24-thiol adducts, which have significantly lower cytotoxic effect than EF24 itself. This conclusion was confirmed for EF24-NAC mono-adduct, which exhibited significantly lower cytotoxicity than that found for EF24. We found that EF24 did not affect the expression of TRAIL-R2 and FAS receptor. We further observed that EF24 exhibited opposite effects on expression of XIAP and survivin, which ultimately had no effect cell death induction in CML cells. To extend our previous results we further demonstrated that the expression of ABCG2 did not affect the sensitivity of K562 cells to EF24.

Obsah

1. Úvod	8
2. Současný stav řešené problematiky	9
2.1 Chronická myeloidní leukémie	9
2.1.1 Historie objevu chronické myeloidní leukémie	9
2.1.2 Molekulární podstata chronické myeloidní leukémie	10
2.1.3 Buněčná podstata chronické myeloidní leukémie; fáze nemoci	15
2.1.4 Monitorování pacientů s chronickou myeloidní leukémií.....	19
2.1.5 Léčba chronické myeloidní leukémie.....	19
2.1.5.1 Oxid arsenitý	20
2.1.5.2 Busulfan, hydroxyurea.....	20
2.1.5.3 Interferon- α	21
2.1.5.4 Inhibice BCR-ABL tyrosinkinasy.....	22
2.2 Kurkumin a jeho analog difenyl difluoroketon.....	24
2.2.1 Přírodní látky s léčivými účinky.....	24
2.2.2 Vlastnosti a využití kurkuminu	25
2.2.2.1 Chemické vlastnosti kurkuminu	26
2.2.3 Působení kurkuminu na molekulární úrovni.....	27
2.2.4 Metabolismus kurkuminu	33
2.2.4.1 Metody pro zlepšení metabolismu kurkuminu v těle.....	33
2.2.5 Strukturální analog kurkuminu.....	34
2.2.5.1 Vlastnosti a využití látky EF24.....	34
2.3 Mnohočetná léková rezistence.....	37
2.3.1 ABC transportéry	38
2.3.1.1 Obecné vlastnosti ABC transportérů	38
2.3.1.2 Struktura ABC transportérů	38
2.3.1.3 Mechanismus přenosu substrátu.....	39
2.3.1.4 ABC transportéry a mnohočetná léková rezistence; další významní členové třech hlavních podrodin a jejich funkce	41
2.3.1.5 Inhibitory ABC transportérů	44

2.3.1.6 Kolaterální senzitivita	46
3. Cíle práce	47
4. Materiál a metodika	48
4.1 Buněčné linie	48
4.2 Použité chemikálie a roztoky.....	48
4.3 Použité přístroje	48
4.4 Stanovení buněčné proliferace a viability	49
4.5 Stanovení počtu živých a mrtvých buněk	49
4.6 Určení počtu apoptotických buněk	50
4.7 Buněčný cyklus	50
4.8 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové.....	51
4.9 Detekce aktivity kaspasy-3/7.....	51
4.10 Stanovení intracelulární hladiny léčiva	52
4.11 Stanovení extracelulární koncentrace léčiva v růstovém médiu.....	53
4.12 Měření oxidativního stresu buněk	53
4.13 Stanovení intracelulárního obsahu redukovaného glutathionu.....	53
4.14 Analýza exprese TRAIL-R2 a FAS receptoru.....	54
4.15 Stanovení exprese proteinů survivin a XIAP pomocí metody western blotting.....	55
5. Výsledky	57
5.1 Vliv thiolů na cytotoxické účinky látky EF24	57
5.2 Analýza oxidativního stresu po působení látky EF24	60
5.3 Tvorba aduktů EF24 s thioly	66
5.4 Vliv EF24 na expresi receptorů TRAIL-R2 a FAS	78
5.5 Analýza exprese proteinů inhibitorů apoptosy.....	81
5.6 Vliv exprese ABCG2 na cytotoxické účinky EF24	83
6. Diskuse	87
7. Závěr.....	90
8. Seznam použité literatury	91
9. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	116

1. Úvod

Nádorové onemocnění je podmíněno různými molekulárními mechanismy, přičemž nejčastěji jde o mutace v genech (získané nebo vrozené), které regulují proliferaci, diferenciaci, buněčnou smrt, adhezi buněk, apod. Existuje mnoho různých typů tohoto onemocnění charakteristických různým fenotypem i genotypem. Jde o nejčastější příčinu úmrtí obyvatel ve vyspělých zemích. Nádory můžeme dělit histochemicky na karcinomy (nádory kůže, sliznic), sarkomy (nádory pojivové tkáně), blastomy (nádory nervové soustavy), lymfomy (nádory mízních uzlin a lymfatické tkáně) a leukémie (nádorové onemocnění hematopoetické tkáně). Leukémií existuje celé spektrum. Jeden z prototypů je chronická myeloidní leukémie (CML). Za vznikem CML stojí *Abelson murine leukemia - breakpoint cluster region (bcr-abl)* fúzní onkogen, který vzniká reciprokou translokací regionu genů z chromosomu 9 na chromosom 22 u hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. Tento onkogen kóduje trvale aktivní tyrosinkinasu BCR-ABL, která je hlavním terapeutickým cílem CML.

Pro léčbu nádorů existují různé terapeutické přístupy - od chirurgického zákroku, přes ozařování až po chemoterapii. Moderní chemoterapie představuje různé typy léčiv, která jsou specifická vůči nádorovým buňkám. Díky tomu jsou potlačeny nežádoucí vedlejší účinky, které bývaly spojené s nescifickými léky používanými k chemoterapii dříve. U CML byla významným objevem rodina tyrosinkinasových inhibitorů (TKIs; Druker *et al.*, 2000). Problémem u těchto specificky cílených chemoterapeutik je jejich vysoká cena, ale také vznik lékové rezistence u nádorových buněk. Proto je nutné neustále vyvíjet nová a účinnější léčiva.

Kromě inaktivace onkoproteinu BCR-ABL je u CML dalším významným molekulárním cílem inhibice dráhy transkripčního faktoru nuclear factor-kappaB (NF- κ B). Buňky CML jsou charakteristické deregulací této dráhy. Mezi účinné inhibitory NF- κ B řadíme například syntetický analog kurkuminu EF24 [3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on], u kterého byly potlačeny negativní vlastnosti kurkuminu a byly u něj prokázány mnohem silnější protinádorové účinky ve srovnání s kurkuminem (Adams *et al.*, 2004). Látka EF24 u nádorových buněk inhibuje proliferaci, angiogenezi a indukuje apoptosu (Subramaniam *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2011). V rámci bakalářské práce bylo zjištěno, že EF24 indukuje apoptosu u buněk K562 v nízkých koncentracích a tento efekt není ovlivňován expresí ABCB1 transportéru. Proto jsme se rozhodli, s touto látkou dále pracovat a testovat její vliv na buňky CML.

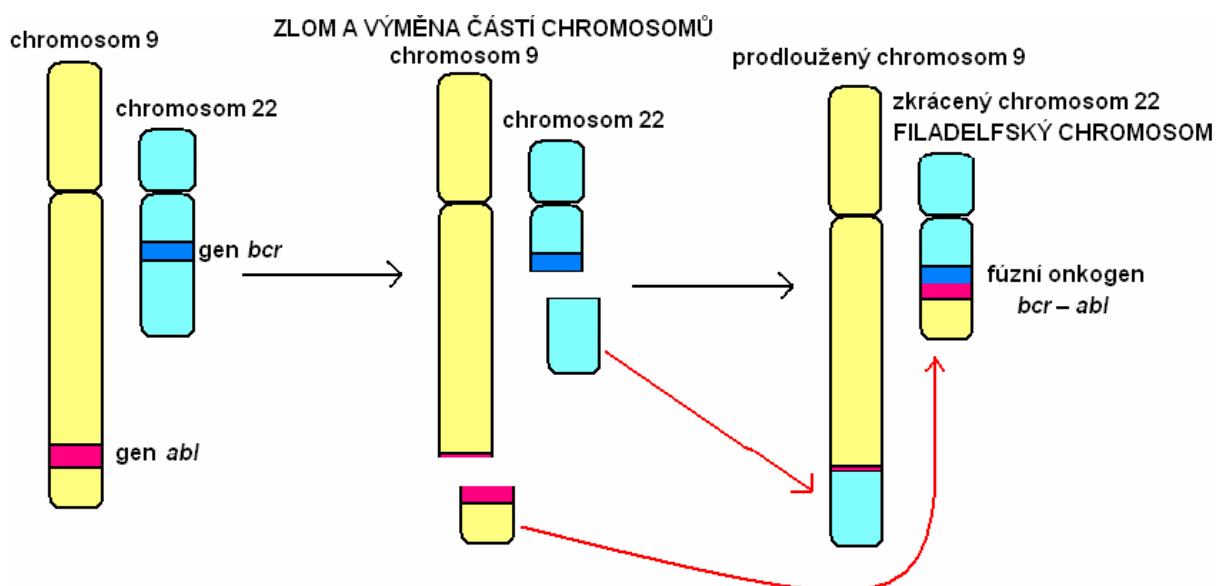
2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Chronická myeloidní leukémie

2.1.1 Historie objevu chronické myeloidní leukémie

CML je myeloproliferativní onemocnění vznikající u kmenových buněk kostní dřeně (Abramson *et al.*, 1977). Rudolf Virchow a John Henry Bennett poprvé popsali klinické projevy CML již roku 1845 (Bennett, 1845; Virchow, 1845). V roce 1865 R. Virchow poprvé použil výraz „leukémie“ (Virchow, 1865). Až o sto let později, roku 1960 ve Filadelfii, Peter Nowell a David Hungerford objevili a popsali malý chromosom z G skupiny - Filadelfský chromosom (Nowell, 1960). P. Nowell a D. Hungerford zjistili, že Filadelfský chromosom je pouze zkrácený 22. chromosom, který ztratil genetický materiál z jeho delších ramének chromatid. V roce 1973 Janet Rowleyová prokázala, že u chromosomu 22 nedochází k pouhému zmenšení, ale dochází zde k reciproké translokaci regionu genů mezi chromosomy 9 a 22 [t(9; 22) (q34; q11)] (Rowley, 1973; viz obr. č. 1). Podrobnější vysvětlení podali výzkumníci v roce 1983. Zjistili, že se této translokace účastní gen *abl* (9q34), který se přenesse ke genu *bcr* (22q11), čímž vzniká *bcr-abl* fúzní onkogen (Bartram *et al.*, 1983). Později vědci přišli na to, že takto vytvořený fúzní gen *bcr-abl* vede k trvalé aktivaci ABL tyrosinkinasy, která nekontrolovatelně aktivuje různé signální dráhy, což pak vede ke vzniku tohoto nádorového onemocnění (Sawyers, 1999; Goldman *et Melo* 2001; Kalidas *et al.*, 2001).

Filadelfský chromosom se nevyskytuje pouze u CML, ale také u 15 % až 30 % pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií a přibližně u 2 % pacientů s akutní myeloidní leukémií (Kalidas *et al.*, 2001).



Obr. č. 1: Schéma vzniku Filadelfského chromosomu. Fúzní onkogen *bcr-abl* vzniká v důsledku reciproké translokace mezi chromosomy 9 (gen *abl*) a 22 (přítomen gen *bcr*).

2.1.2 Molekulární podstata chronické myeloidní leukémie

BCR-ABL onkoprotein dosahuje velikostí 190, 210 nebo 230 kDa podle toho, v jakých místech ke zlomům na chromosomu 22 dojde. Povaha nemoci závisí na velikosti proteinu, přičemž 190 kDa protein má vyšší tyrosinkasovou aktivitu než protein o velikosti 210 kDa. Protein o velikosti 210 kDa bývá u pacientů s CML přítomen nejčastěji (Sawyers, 1999; Melo, 1996).

BCR-ABL tyrosinkinasa je klíčovým proteinem CML. Má vliv na signální dráhy regulující růst, diferenciaci, proliferaci a apoptosu buněk. BCR-ABL tyrosinkinasa také negativně ovlivňuje opravy DNA, což může mít za následek vznik různých mutací (např. inaktivace p53, aktivace RAS), které způsobují genomovou nestabilitu. Genomová nestabilita je pak zodpovědná za progresi do pokročilejších fází této nemoci (Druker *et al.*, 1996; Lugo *et al.*, 1990; van der Kuip *et al.*, 2004).

Mezi BCR-ABL ovlivněné signální dráhy patří mitogenem aktivovaná proteinkinasa kaskáda (MAPK), Janusova tyrosinkinasa-signal transducer and activation of transcription (JAK-STAT) nebo fosfatidylinositol-3-kinasová dráha spojená s proteinkinasa B (PI3K/Akt; Melo *et al.*, 2004; Pendergast *et al.*, 1991).

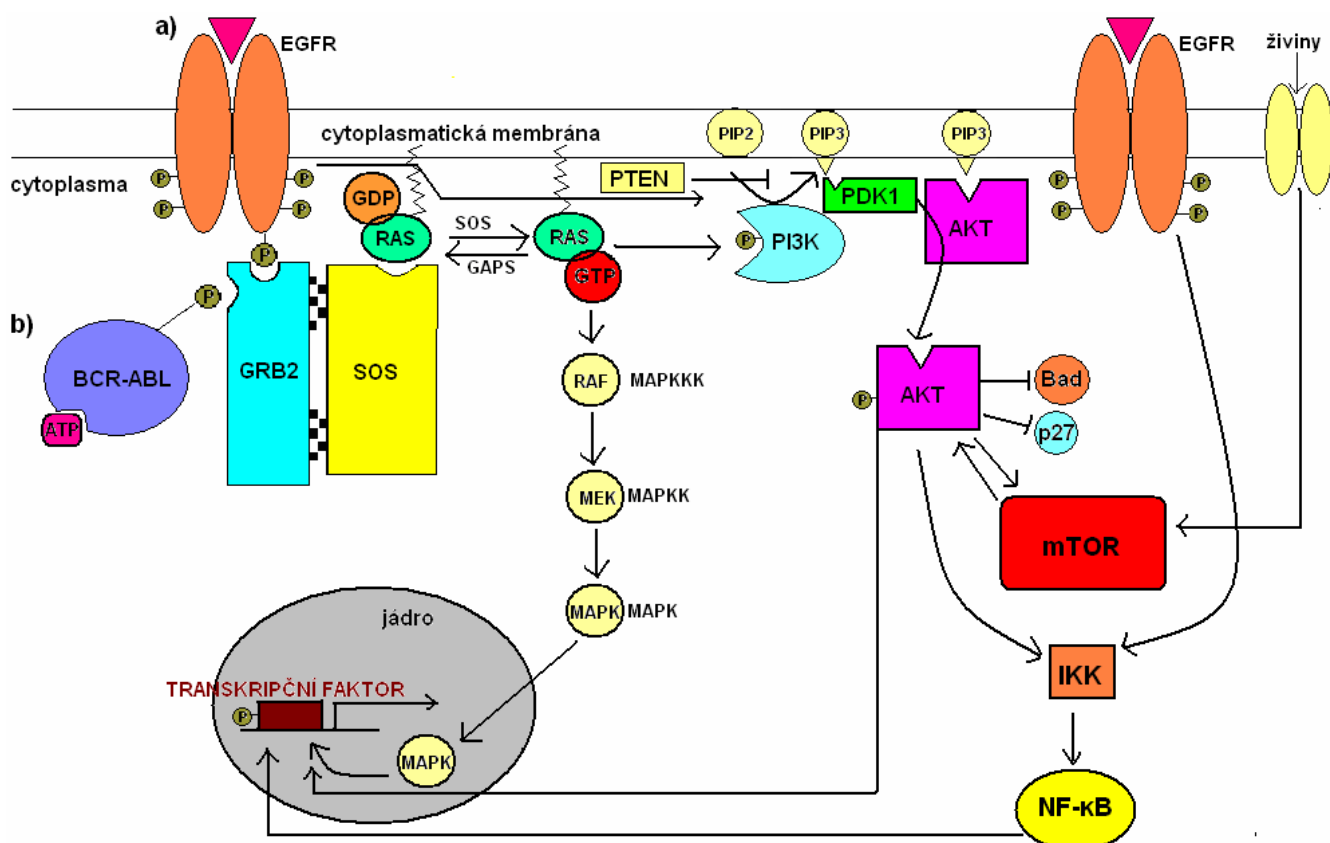
Ve zdravé buňce protein ABL translokuje mezi cytoplasmou a jádrem a podle potřeby fosforyluje cílové molekuly. Jakmile dojde ke vzniku fúzního onkogenu *bcr-abl*, tak translatovaný onkoprotein zůstává převážně v cytoplasmě, kde interaguje s většinou

proteinů, které se pak podílejí na deregulaci základních signálních drah (Pendergast *et al.*, 1991; Pendergast *et al.*, 1993). V normální buňce je MAPK kaskáda aktivována po přijetí růstového faktoru (mitogenu) příslušným receptorem, u kterého tímto dochází k dimerizaci a autofosforylaci. Po autofosforylaci receptor vytváří vazbu přes Src homology 2 (SH2) skupiny s proteinem growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), který následně interaguje s proteinem Son of Sevenless (SOS). Komplex GRB2/SOS aktivuje proteiny RAS výměnou kofaktorů guanosindifosfátu (GDP) za guanosintrifosfát (GTP) [opačný efekt mají GTPase-Activating Proteins (GAPs); Ren, 2005]. Aktivovaný protein RAS interaguje s fosforylační kaskádou MAPK, což nakonec vede k iniciaci proliferace buněk (Kim *et Choi*, 2010; viz obr. č. 2a). BCR-ABL tyrosinkinasa není závislá na aktivaci mitogenem, ale po přijetí adenosintrifosfátu (ATP) se rovnou váže přes SH2 skupiny s proteinem GRB2. Signální dráha je tedy trvale aktivní, což pak v konečném výsledku vede k nekontrolované proliferaci buněk (Pendergast *et al.*, 1991; viz obr. č. 2b).

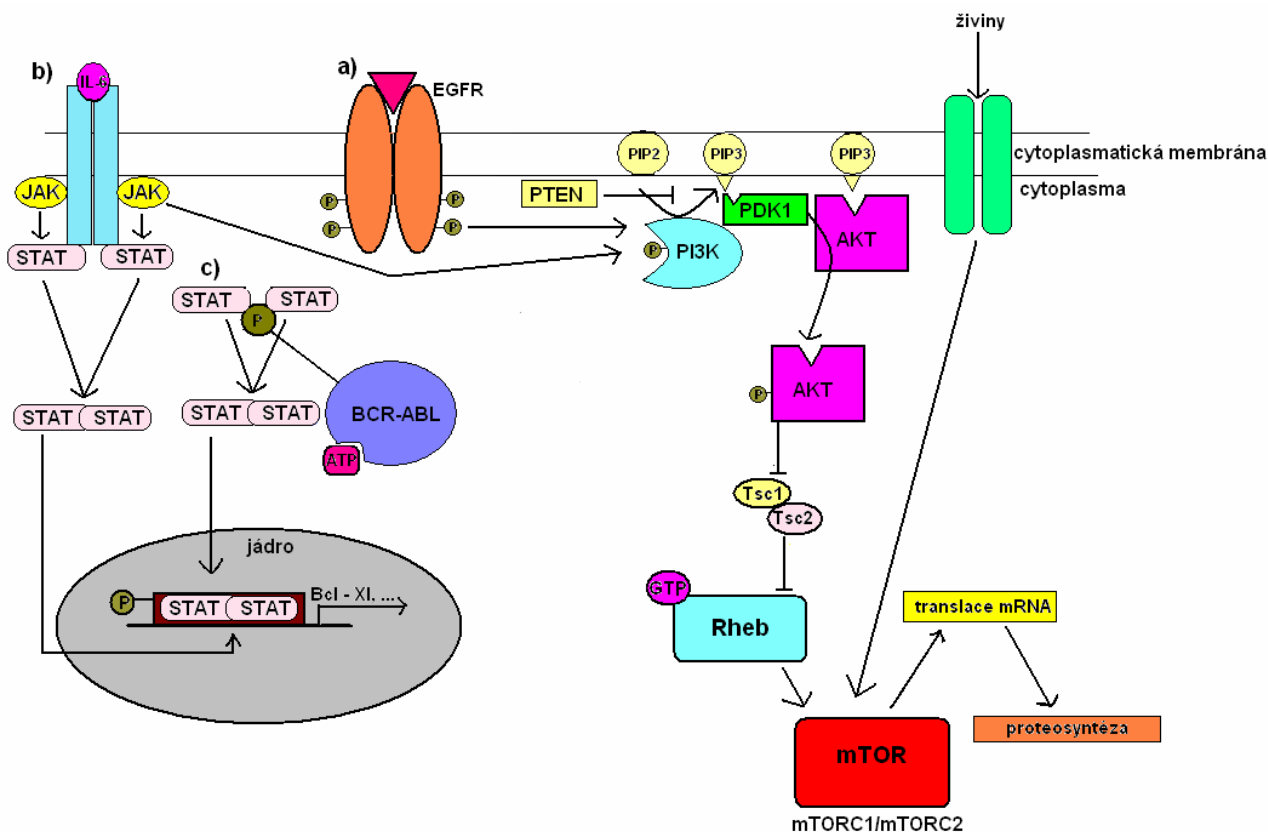
Aktivovaný RAS navíc také aktivuje PI3K/Akt dráhu. Lipidová kinasa PI3K fosforyluje fosfatidylinositol-(4,5)-difosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfát (PIP3). Negativní regulátor této dráhy je nádorový supresor phosphatase and tensin homolog (PTEN), který defosforyluje PIP3 na PIP2. PIP3 slouží jako vazebné místo pro Akt a pro její aktivátor 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1). Aktivovaná Akt vstupuje do jádra a fosforyluje cílové transkripční faktory regulující apoptotickou dráhu. Výsledkem je pak necitlivost buněk ke stimulům vedoucím k buněčné smrti (Franke *et al.*, 1997). Akt například zesiluje buněčnou proliferaci proteasomální degradací p27 [inhibitor cyklin dependentních kinas (CDKs)] a aktivací serin/threoninkinasy mechanistic target of rapamycin (mTOR; Skorski *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009; podrobnější popis průběhu této dráhy viz obr. č. 3a). Kinasa Akt také inaktivuje kaspasu-9 nebo přes protein 14-3-3 inaktivuje proapoptotický protein Bad (Liu *et al.*, 2009). Jedním z důležitých cílů Akt je transkripční faktor NF- κ B. Akt fosforyluje I κ B kinasu (IKK), čímž způsobuje aktivaci této dráhy. NF- κ B zesiluje expresi celého spektra genů s různou funkcí - například geny podporující buněčnou proliferaci, metastazování, angiogenezi, chemorezistenci, radiorezistenci, zánět a zeslabuje expresi proapoptotických genů (Sen *et al.*, 2011; Shishodia *et al.*, 2007). NF- κ B může být aktivován růstovými faktory, oxidativním stresem, virovou nebo bakteriální infekcí, zánětlivými cytokiny [např. interleukin-6 (IL-6), IL-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α)], chemoterapeutickými látkami, zářením gamma, UV zářením nebo

kouřením (Li *et Sethi*, 2010; He *et al.*, 2015-Sikora *et al.*, 2010). Po aktivaci dráhy je inhibitor kappaB (I κ B), tvořící v cytoplasmě komplex s NF- κ B, fosforylován IKKs. Fosforylovaný I κ B je následně označen ubiquitiny a degradován ve 26S proteasomu. NF- κ B je tímto uvolněn a z cytosolu translokuje do jádra, kde specificky nasedá na DNA a spouští transkripci cílových genů [c-myc, Bcl-2, Bcl-XI, cyklooxygenasa-2 (COX-2), apod.; viz obr. č. 4]. Konstitutivní aktivace tohoto transkripčního faktoru je znakem CML a také dalších nádorových nebo zánětlivých onemocněních (Shanmugam *et al.*, 2015).

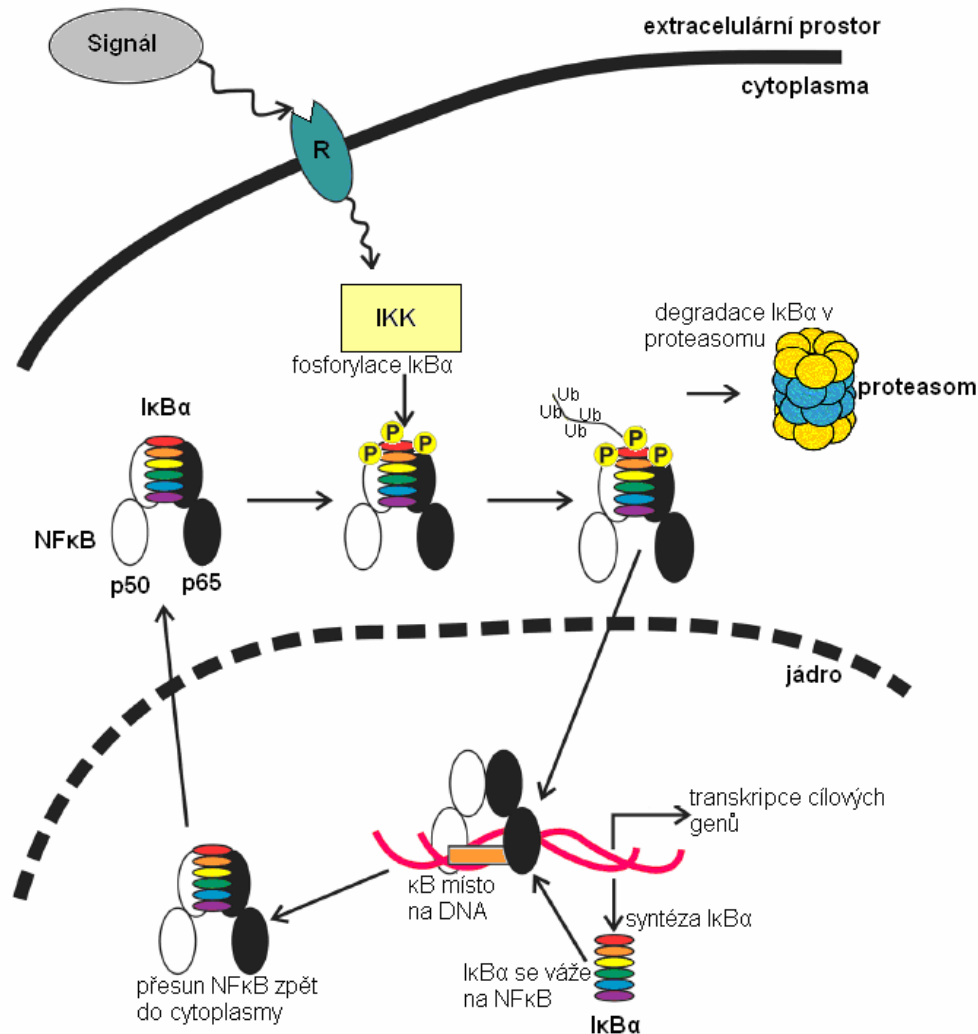
Poslední významnou signální dráhou, která je ovlivněna BCR-ABL onkoproteinem, je JAK-STAT dráha, která je typická pro hematopoetické buňky. Ve zdravých buňkách dochází po vazbě cytokinu (růstový faktor hematopoetických buněk) na příslušný receptor k dimerizaci a k translokaci STATs do jádra, kde regulují expresi příslušných genů. Translokace je zprostředkována aktivovanými JAKs, které jsou s receptorem spojené. Po navázání cytokinu JAKs fosforylují tyrosinové zbytky na receptoru a vytváří tak vazebná místa pro STATs. STATs se naváží přes SH2 skupiny na receptor a jsou pomocí JAKs fosforylovány a aktivovány. Receptory pro cytokiny mohou také spustit MAPK nebo PI3K/Akt signální dráhu [(vazba GRB2 na receptor a aktivace příslušné dráhy (Jatiani *et al.*, 2010; viz obr. č. 3b)]. Buňky CML nejsou závislé na cytokinech ani na JAKs. STATs jsou trvale aktivované a přes SH2 domény se váží na fosforylované tyrosiny onkoproteinu BCR-ABL (Ilaria Jr. *et Van Etten*, 1996; Carlesso *et al.*, 1996; viz obr. č. 3c). Klíčové transkripční faktory podílející se na BCR-ABL signalizaci jsou STAT1 a STAT5. Aktivace transkripčního faktoru STAT5 vede ke zvýšené expresi antiapoptotického proteinu Bcl-XI. Souhra PI3K/Akt a JAK-STAT dráhy způsobuje odolnost buňky před programovanou buněčnou smrtí (Melo *et Deininger*, 2004).



Obr. č. 2: Signální dráha MAPK a PI3K/Akt. a) Ve zdravé buňce je MAPK kaskáda aktivována po přijetí mitogenu receptorem. Po autofosforylaci receptor interaguje s proteinem GRB2, který poté vytváří vazbu s proteinem SOS. SOS aktivuje proteiny RAS (výměna GDP za GTP; opačný efekt mají GAPS). RAS následně interagují s fosforylační kaskádou MAPK, což pak v konečném výsledku vede k iniciaci proliferace buněk. Aktivovaný RAS navíc také aktivuje PI3K/Akt dráhu. PI3K fosforyluje PIP2 na PIP3 (negativní regulátor je PTEN). Na PIP3 se váže kinasa Akt a její aktivátor PDK1. Aktivovaná Akt vstupuje do jádra, kde fosforyluje cílové transkripční faktory regulující apoptotickou dráhu. Akt například zvyšuje buněčnou proliferaci proteasomální degradací p27 (inhibitor CDKs) a aktivací kinasy mTOR (podrobnější vysvětlení této dráhy na obr. č. 3a). Akt také inaktivuje proapoptotický protein Bad a aktivuje transkripční faktor NF- κ B fosforylací IKKs (podrobnější popis této dráhy na obr. č. 4). b) BCR-ABL tyrosinkinasa není závislá na aktivaci mitogenem. Po přijetí ATP vytváří vazbu s GRB2 a dráha dále probíhá analogicky jako ve zdravé buňce (schéma zjednodušeno).



Obr. č. 3: Signální dráha mTOR a JAK-STAT a) Signální dráha mTOR se skládá ze dvou komplexů - mTORcomplex1 (mTORC1; citlivý k rapamycinu) a mTORC2 (není citlivý k rapamycinu). mTORC1 je důležitý pro kontrolu buněčného růstu. Je aktivován vnějšími podněty, jako jsou růstové faktory, aminokyseliny, energetické hladiny nebo buněčný stres. Také může být aktivován kinasou Akt, která inhibuje tuberous sclerosis heterodimer (Tsc1/Tsc2). Tento komplex zabraňuje funkci malé GTPasy Rheb, která je důležitým stimulátorem mTORC1. Výsledkem aktivace mTORC1 je pak fosforylace substrátů, které podporují anaboličké procesy, jako jsou syntéza proteinů nebo lipidů. Naopak jsou inhibovány procesy kataboličké jako například autofagie. mTORC2 je také aktivován růstovými faktory, ale přesný mechanismus aktivace není zatím zcela objasněn. mTORC2 aktivuje Akt, čímž podporuje buněčné přežití. Také ovlivňuje dynamiku cytoskeletu, kontroluje transport iontů a růst buňky. Deregulace signální dráhy mTOR přispívá ke vzniku cukrovky typu 2, obezité, neurodegenerativním a nádorovým onemocněním (Hoeffler *et al.*, 2010; Jacinto *et al.*, 2004). b) Signální dráha JAK-STAT se ve zdravých buňkách aktivuje po vazbě cytokinu na příslušný receptor. Součástí receptoru jsou JAKs, které na něm vytvářejí fosforylační tyrosinových zbytků vazebná místa pro STATs a po jejich vazbě je fosforylují. STATs poté dimerizují a translokují do jádra, kde stimuluje transkripci příslušných genů. Receptory pro cytokiny mohou také aktivovat MAPK nebo PI3K/Akt signální dráhu. c) Buňky CML nejsou závislé na cytokinech ani na JAKs. STATs se váží na fosforylované tyrosiny onkoproteinu BCR-ABL, čímž dochází k jejich trvalé aktivaci (schéma zjednodušeno).

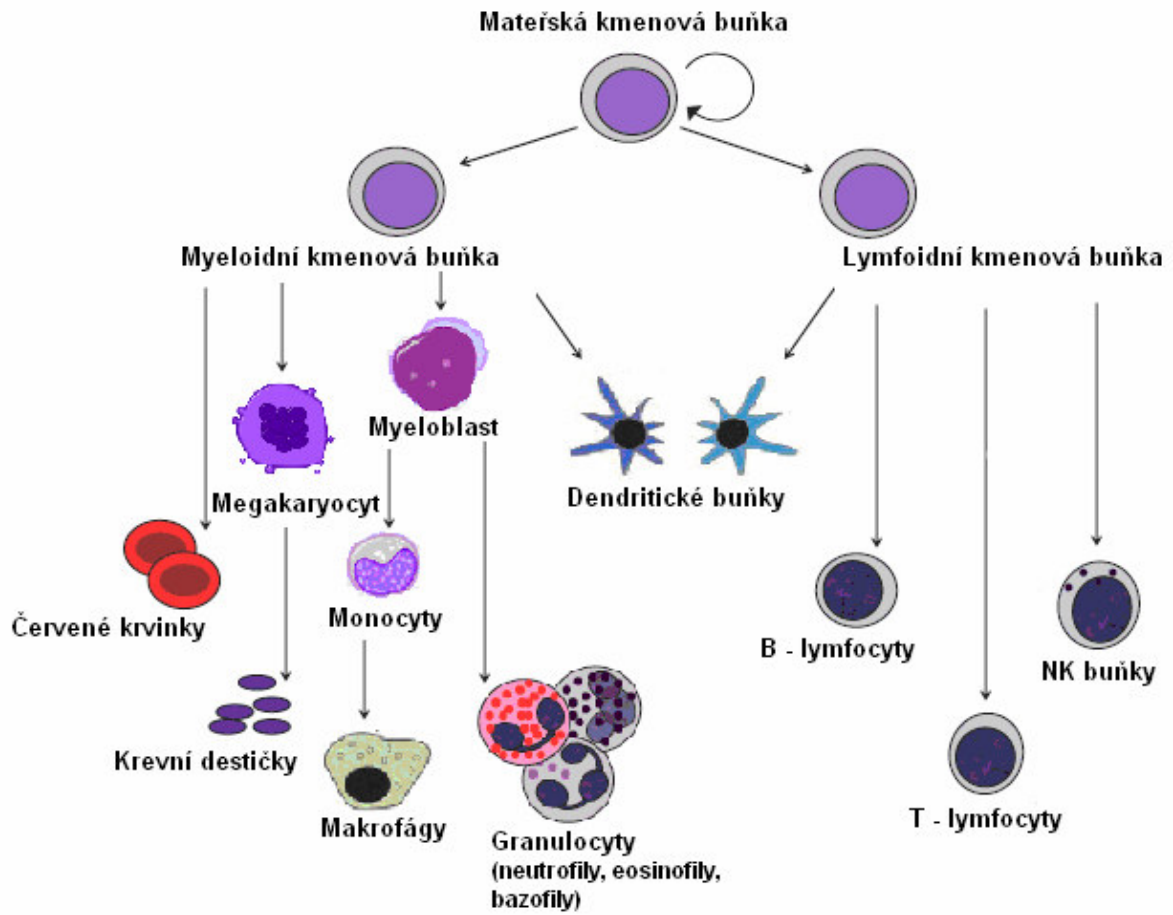


Obr. č. 4: Signální dráha transkripčního faktoru NF-κB. NF-κB signální dráha může být aktivována růstovými faktory, oxidativním stresem, virovou nebo bakteriální infekcí, zánětlivými cytokiny, chemoterapeutickými látkami a mnoha dalšími podněty. IκB, který tvoří v cytoplasmě komplex s NF-κB, je po aktivaci dráhy fosforylován IKKs, poté je označen ubikvitiny a degradován v proteasomu. NF-κB translokuje do jádra, kde specificky nasedá na DNA a spouští transkripci cílových genů (schéma zjednodušeno; upraveno podle Dyson *et Komives*, 2012).

2.1.3 Buněčná podstata chronické myeloidní leukémie; fáze nemoci

Jak již bylo zmíněno, Filadelfský chromosom vzniká v kmenových buňkách kostní dřeně. Kmenové buňky se dělí buď symetricky, čímž vznikají nové buňky kmenové nebo nesymetricky, čímž vzniká jedna buňka kmenová a jedna progenitorová, která dále diferencuje do určitého typu krevní buňky. Diferenciace je podmíněna změnou genové exprese (exprese/represe genů pro danou krevní řadu), kterou řídí

transkripční faktory, modulátory chromatinu, mikroRNA a další molekuly (Davidson, 2010). Kmenové buňky lze charakterizovat jako multipotentní (diferencují do všech typů krevních buněk), se schopností sebeobnovy, nesymetrického dělení a také migrace (Maximow, 1909; Becker, 1963). Diferencují v myeloidní a lymfoidní řadu buněk. Z myeloidní řady vznikají červené krvinky (transport O_2 a CO_2), megakaryocyty, ze kterých se diferencují krevní destičky (úloha při srážení krve), myeloblasty, z nichž se dále diferencují monocyty a granulocyty. Granulocyty jsou součástí imunitního systému a dělí se na neutrofilny, eosinofily a bazofily. Z monocytů vznikají makrofágy (také účast v imunitním systému). Lymfoidní řada se diferencuje v T- a B- lymfocyty a v buňky nazývané tzv. „přirození zabijáci“ (natural killer cells - NK buňky; Rieger *et* Schroeder, 2012; Akashi *et al.*, 2000). Jak lymfoidní, tak myeloidní řada je schopna diferencovat v buňky dendritické (součástí imunitního systému; Traver *et al.*, 2000; viz obr. č. 5).

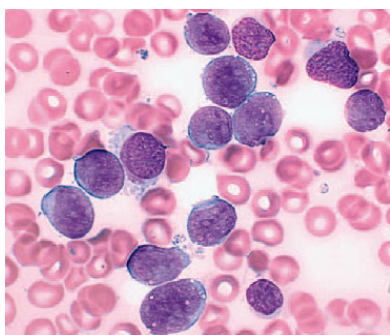


Obr. č. 5: Schéma diferenciacie kmenové buňky. Mateřská kmenová buňka má schopnosť sebeobnovy, nesymetrického dělení a diferenciacie. Při nesymetrickém dělení vzniká jedna buňka kmenová a druhá progenitorová, která pak dále diferenciuje buď v myeloidní nebo lymfoidní krevní linii. Z myeloidní řady buněk vznikají červené krvinky; megakaryocyty, ze kterých se diferencují krevní destičky; myeloblasty, z nichž se dále diferencují monocyty a granulocyty. Z monocytů vznikají makrofágy a granulocyty se dále dělí se na neutrofil, eosinofil a bazofil. Lymfoidní řada se diferenciuje v T- a B- lymfocyty a v NK buňky. Jak lymfoidní, tak myeloidní řada je schopna diferencovat v buňky dendritické (upraveno podle Rieger *et* Schroeder, 2012; Passegué *et al.*, 2003).

CML mívá dvě až tři fáze. První fáze je chronická, druhá akcelerovaná a třetí blastická fáze (blastický zvrát). Počáteční příznaky mívají většinou pomalý nástup, a proto jsou těžko odhalitelné (Vardiman, 2009). Pacientovi je CML většinou diagnostikována až při pravidelné lékařské prohlídce, když je u něj prokázáno zvýšené množství leukocytů v krvi (Sawyers, 1999). Symptomy CML jsou například únava, ztráta váhy, noční pocení, snadná tvorba modřin nebo krvácení. CML může

postihnout člověka jakékoliv věkové skupiny, avšak ve větší míře se projevuje u starších osob. Jako vnější faktor vzniku této nemoci se prokázal vliv ionizujícího záření (Clarkson *et al.*, 1997).

Pro chronickou fázi je typická leukocytosa (více než $10 \cdot 10^7$ leukocytů/ml), výskyt myeloblastů nebo promyelocytů (nezralé bílé krvinky) v kostní dřeni a následně i v periferní krvi a splenomegálie (zvětšená slinivka břišní; O'Dwyer, 2002; Spiers *et al.*, 1977; viz obr. č. 6). Pro akcelerovanou fázi je charakteristický nárůst bílých krvinek na úrovni blastů v kostní dřeni a krvi, zvýšené množství bazofilů v krvi, zvýšení nebo snížení počtu trombocytů a snížení nebo mírné zvýšení počtu erytrocytů. Také bývají pro tuto fázi typické různé chromosomální abnormality (Kantarjian *et al.*, 1988). V blastové fázi sledujeme mnohonásobně zvýšený počet blastů ($\geq 20\%$) v kostní dřeni a krvi, přičemž blasty mohou být lymfoidního, myeloidního nebo smíšeného fenotypu (von Bubnoff *et Duyster*, 2010; Faderl *et al.*, 1999). Funkční buňky (červené/bílé krvinky, krevní destičky apod.) v těle rychle ubývají. Používaná chemoterapie přestává účinkovat (zvýšený počet mutací, vyšší výskyt rezistencí), proto je nejvhodnější provést transplantaci kostní dřeně (O'Dwyer, 2002). U některých pacientů se blastický zvrát projeví jako extramedulární (mimodřeňový), kdy stěry periferní krve a kostní dřeně odpovídají chronické fázi nemoci, ale například slezina nebo lymfatické uzliny jsou infiltrovány velkým počtem blastů (O'Dwyer, 2002). Progrese do pokročilejších fází nemoci je zapříčiněna klonální evolucí (selekce mutovaných nádorových buněk s výhodou růstu) a narůstajícími chromosomálními abnormalitami (Vardiman, 2009).



Obr. č. 6: Mikroskopický pohled na stěr kostní dřeně u pacienta s blastickou fází CML (fialově znázorněny blasty; upraveno podle Vardiman, 2009).

2.1.4 Monitorování pacientů s chronickou myeloidní leukémií

Úspěšnost léčby pacientů s CML se posuzuje na základě řady kritérií. Využívají se testy hematologické, cytogenetické a molekulární (viz tab. č. 1). Vzorky se odebírají z periferní krve nebo z kostní dřeně. Molekulární testy jsou nejpřesnější a zahrnujeme mezi ně například fluorescenční *in-situ* hybridizaci (FISH) nebo reverzní transkripci spojenou s polymerasovou reakcí (RT-PCR). Metoda FISH slouží k detekci fúzního genu *bcr-abl* a metodou RT-PCR lze detekovat BCR-ABL mRNA transkripty (Kalidas *et al.*, 2001).

Tab. č. 1: Monitorování chronické fáze CML v průběhu léčby imatinibem (Baccarani *et al.*, 2006).

Odpověď na léčbu	Monitorování
Kompletní hematologická odpověď	V PK leukocyty < $10 \cdot 10^6/\text{ml}$
	V PK trombocyty < $450 \cdot 10^6/\text{ml}$
	V diferenciálním krevním obraze žádné prekurzory granulocytů
	V PK < 5 % basofilů
	Slezina nehmatná
Cytogenetická odpověď (z kostní dřeně)	Kompletní: 0 % Ph+ buněk
	Parciální: 1-35 % Ph+ buněk
	Malá: 36-65 % Ph+ buněk
	Minimální: 66-95 % Ph+ buněk
	Žádná: > 95 % Ph+ buněk
Molekulární odpověď (detekce pomocí RT-PCR)	Kompletní. BCR-ABL transkripty nejsou detekovatelné
	Velká: vyjádřena jako poměr onkogenu <i>bcr-abl</i> a genu <i>abl</i> (nebo jiného kontrolního genu), kdy tento poměr vychází < 0,1

PK: periferní krev, Ph+: přítomen Filadelfský chromosom

2.1.5 Léčba chronické myeloidní leukémie

Díky pochopení molekulárních a buněčných mechanismů probíhajících v buňkách při CML je snadnější navrhnout léčiva, která budou cíleně působit na jednotlivé molekuly. Léčba je nejvíce účinná v chronické fázi CML. Pravděpodobnost uzdravení s pokročilejší fází nemoci klesá (von Bubnoff *et Duyster*, 2010). CML je jednou z mála nádorových onemocnění, u kterého je příčinou vzniku nemoci pouze jeden onkogen - v tomto případě právě *bcr-abl*. Díky tomu je velmi vhodná molekulárně cílená terapie (Daley *et al.*, 1990; Lugo *et al.*, 1990).

Mezi ověřená a používaná léčiva CML zahrnujeme dříve používaný oxid arsenitý (OA), dále busulfan nebo hydroxyureu (chemoterapie), interferon- α (IFN- α) a v současné době jsou nejvýznamnější TKIs (O'Dwyer, 2002). Jednou z možností léčby je také alogenní transplantace kmenových buněk kostní dřeně, avšak při této

metodě nebývá výsledek vždy kladný. Tento krok pacient většinou podstupuje až jako poslední léčebnou variantu. Po transplantacích bývá častá smrt pacienta, nebo transplantovaný štěp kostní dřeně tělo nepřijme a dochází k infekcím (Gratwohl *et al.*, 1998; O'Dwyer, 2002).

2.1.5.1 Oxid arsenitý

Z historického hlediska se právě OA používal jako první léčivo při terapii CML. Již v roce 1800 bylo prokázáno, že OA má protileukemické účinky a roku 1930 byla tato sloučenina poprvé použita při léčbě CML (Forkner *et Scott*, 1931). OA tvoří vazbu s I κ B, čímž zamezuje jeho degradaci a tím inhibuje transkripční faktor NF- κ B (Kapahi *et al.*, 2000). Arsenité sloučeniny mohou přispívat k tvorbě reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS), které poškozují mitochondriální membránu, čímž dochází k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu (Chen, Y.C, *et al.*, 1998). Výsledkem je aktivace kaspas, které degradují strukturální, regulační proteiny a proteiny účastnící se reparace DNA. Důsledkem těchto dějů je apoptosa buňky. OA působí nejen na CML, ale i na ostatní leukémie a pevné nádory (O'Dwyer, 2002). Například inhibuje tvorbu promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α (PML/RAR α) fúzního proteinu u akutní promyelocytární leukémie (Shao *et al.*, 1998; Chen, G. Q., *et al.*, 1997).

2.1.5.2 Busulfan, hydroxyurea

Busulfan byl pro léčbu CML poprvé použit v roce 1953 (Galton, 1953). Pacienti po terapii busulfanem vykazují prodloužení života přibližně o 35-47 měsíců (Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group, 1997). U busulfanu byly detekovány závažné nežádoucí účinky (útlum krvetvorby, srdeční a jaterní potíže, nevolnosti, horečky, neplodnost) a podezření, že napomáhá progresi do pozdějších fází nemoci (Hehlmann *et al.*, 1994). Proto je používán až v pozdních fázích CML, při zjištěné rezistenci na hydroxyureu, jako jedna z posledních variant možné léčby (O'Dwyer, 2002).

O několik let později se začala místo busulfanu, k léčbě CML, používat hydroxyurea. Hydroxyurea je vhodná ke snížení počtu leukocytů před zahájením léčby pomocí IFN- α nebo pro kombinovanou léčbu ke zvýšení efektu terapie. Hydroxyurea vede ke kompletní nebo částečné hematologické odpovědi až u 80 % pacientů, ale pacientů s kompletní cytogenetickou odpovědí nepřesahuje 5 % (Hehlmann *et al.*, 1994). Pacienti léčení hydroxyureou mají život prodloužen přibližně o 48-67 měsíců

(Hehlmann, 1988). Hydroxyurea byla prokázána jako silnější léčivo u CML a vykazuje menší množství nežádoucích účinků v porovnání s busulfanem (Bolin *et al.*, 1982). V současné době se chemoterapie hydroxyureou využívá v méně rozvinutých zemích, u lidí starších 70 let, u osob netolerujících IFN- α léčbu, u lidí rezistentních na TKI a jiná léčiva nebo u pacientů, kteří jsou v čekacím období před transplantací kostní dřeně (von Bubnoff *et Duyster*, 2010).

2.1.5.3 Interferon- α

Začátky IFN- α terapie se datují roku 1983, kdy Moshe Talpaz a spol. zjistili, že IFN leukocytů indukuje u CML cytoredukci (Talpaz *et al.*, 1983). Roku 1986 The Food and Drug Administration USA (FDA) schválili IFN- α jako lék (Asmana Ningrum, 2014). U IFN- α terapie je dosaženo kompletní hematologické odpovědi přibližně u 80 % pacientů a kompletní cytogenetické odpovědi asi u 7-10 % případů (Kantarjian *et al.*, 1995). Progrese nemoci je díky IFN- α zpomalena a život některých pacientů prodloužen až o deset let. Podává se pacientům ve formě podkožní injekce. Negativní vlastností jsou časté nežádoucí účinky (příznaky podobné chřipce; horečky, nechutenství, deprese, útlum krvetvorby, apod.; Deininger *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2006; Goldman, 2007)

IFN- α je protein z rodiny cytokinů produkovaný imunitními buňkami důležitý v regulaci imunitního systému. Váže se na receptor pro interferon, který je asociován s JAK-STAT dráhou. Ta je po navázání ligandu aktivována a spouští expresi IFN- α indukovaných genů (Jonasch *et Haluska*, 2001). Dodnes není zcela jasné, jak přesně IFN- α u buněk CML funguje. *In vitro* studie prokázaly, že IFN- α moduluje genovou expresi, podporuje diferenciaci buněk a apoptosu, inhibuje růst buněk a proliferaci a vyvolává imunitní odpověď. „Microarray analýzy“ ukázaly, že IFN- α vyvolává expresi více než 300 různých genů (Der *et al.*, 1998). Tyto geny kódují proteiny apoptosy (např. FAS, kaspasu-4, kaspasu-8), imunomodulační proteiny (např. MHC I a II), obranné proteiny (např. IL-15 a IL-6) a transkripční faktory (Chawla-Sarkar *et al.*, 2003). Přesná funkce mnoha IFN- α indukovaných genových produktů není známá. V progenitorových buňkách CML IFN- α zvyšuje expresi FAS receptoru („receptor smrti“), čímž se zvyšuje citlivost buněk na FAS ligand (Selleri *et al.*, 1997). Kromě aktivace apoptosy, IFN- α ovlivňuje klíčové regulátory buněčného cyklu včetně retinoblastomového proteinu (pRb; nádorový supresor; důležitá role při buněčném cyklu), cdc25A (fosforylase, odstraňuje inhibiční fosfát CDKs), cyklinů a CDKs. Tato

vlastnost IFN- α může zablokovat nebo prodloužit fáze buněčného cyklu, což může vést k diferenciaci buněk nebo k nástupu apoptosy (Kumar *et Atlas*, 1992; Subramaniam *et al.*, 1998). Dalším účinkem IFN- α je inhibice produkce hematopoetických stimulačních cytokinů, které podporují proliferaci progenitorových buněk v kostní dřeni (např. IL-1 β ; Peschel *et al.*, 1996). Navíc IFN- α může způsobit inhibici proliferace progenitorových buněk CML tím, že obnoví normální hematopoetické mechanismy. U zdravých progenitorových buněk receptory β 1-integrinu zprostředkovávají adhezi buněk ke stromatu kostní dřene a jejich aktivaci je spuštěn antiproliferační signál. Tyto regulační mechanismy jsou u buněk CML nefunkční, ale právě IFN- α je může obnovit (Bhatia *et Verfaillie*, 1998). Antiproliferační potenciál IFN- α u progenitorů CML pravděpodobně vyžaduje aktivaci MAPK p38 (člen fosforylační kaskády MAPK). Bylo prokázáno, že IFN- α fosforyluje p38, který pak spouští expresi IFN- α indukovaných genů (Mayer *et al.*, 2001; Zou *et Calame*, 1999). Kromě inhibice proliferace je IFN- α schopen indukovat imunitní buňky (B- a T- lymfocyty, dendritické buňky, NK buňky; Andrews *et al.*, 1987; Weng *et al.*, 2012).

Při léčbě pacientů s CML se často IFN- α kombinuje s jinými léky, jako jsou TKI, vinblastin, cytarabin a dalšími (Wang *et al.*, 2002).

2.1.5.4 Inhibice BCR-ABL tyrosinkinasy

Počátkem roku 1990 vědci začali pátrat po sloučenině, která by mohla inhibovat BCR-ABL tyrosinkinasovou aktivitu (Druker *et Lydon*, 2000). Syntetizovali sérii malých fenylaminopyrimidinových molekul s potencionální inhibiční aktivitou. Mezi nejvýznamnější molekuly tohoto typu se zařadil imatinib methansulfonát (Glivec, Novartis, Switzerland; viz obr. č. 7). FDA uznali imatinib jako lék proti CML v květnu roku 2001 (O'Dwyer, 2002). Imatinib obsazuje místo pro vazbu ATP na neaktivním proteinu BCR-ABL, díky čemuž nemůže dojít ke konformační změně nutné k BCR-ABL aktivaci (Schindler *et al.*, 2000; Gambacorti-Passerini *et al.*, 1997). TKIs jsou pro léčbu CML v současné době nejvíce používané. Terapie imatinibem dosahuje velmi pozitivních výsledků. Kompletní hematologická odpověď byla diagnostikována asi u 96 % pacientů a kompletní cytogenetická odpověď přibližně u 57 % pacientů. I přes získané pozitivní výsledky v některých případech léčba selhává (rezistentní pacienti; Hochhaus *et al.*, 2008b).

Rezistenci můžeme rozdělit na primární, kdy v očekávaný čas není dosažena

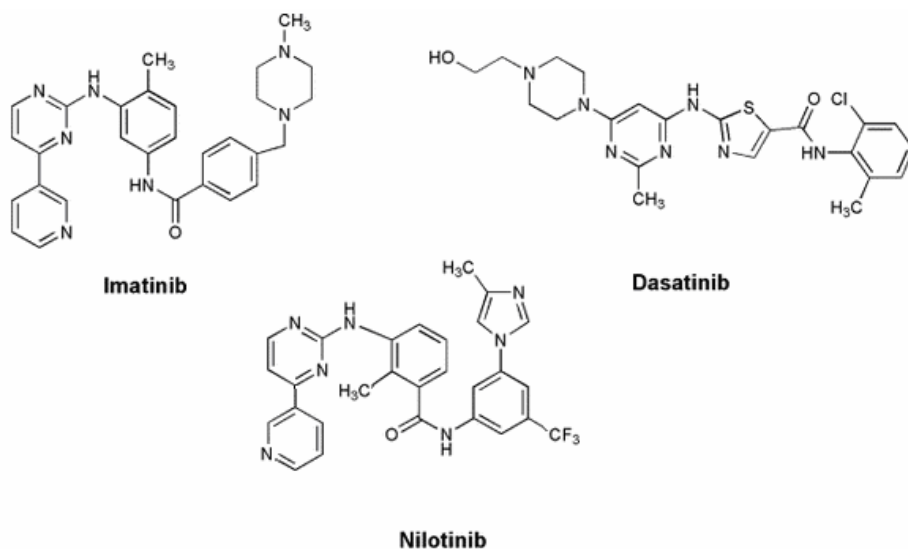
kompletní cytogenetická ani hematologická odpověď, a získanou, kdy se rezistence projeví až během úspěšné léčby. Získaná rezistence se dále dělí podle její závislosti/nezávislosti na genu *bcr-abl* (Marin *et al.*, 2008; Quintás-Cardama *et al.*, 2009). Příkladem vzniku rezistence *bcr-abl* závislé může být zvýšená exprese díky amplifikaci genu *bcr-abl* nebo díky deregulaci jeho exprese. Nejčastější příčinou vzniku rezistence *bcr-abl* závislé jsou bodové mutace genu *bcr-abl*, kterých je celé spektrum. Mohou způsobit změny na vazebné doméně pro imatinib nebo se důsledkem konformační změny sníží afinita imatinibu k BCR-ABL proteinu. Nejzávažnější bodovou mutací je T315I. Při této mutaci dochází k substituci aminokyseliny isoleucinu za threonin, který je důležitý při vazbě TKIs (le Coutre *et al.*, 2000; Mahon *et al.*, 2000; Gorre *et al.*, 2001). Při léčbě rezistentních pacientů se volí různé postupy. Jednou z možností je zvýšení dávek imatinibu (základní dávka je 400 mg/den), nebo podávání imatinibu v kombinaci s jinými sloučeninami (s IFN- α , hydroxyureou, daunorubicinem nebo cytarabinem; Castagnetti *et al.*, 2009; Thiesing *et al.*, 2000). Jinou možnou variantou je podávání TKIs druhé generace jako jsou dasatinib (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) a nilotinib (Novartis; Hochhaus *et al.*, 2008a; viz obr. č. 7).

Nilotinib je sloučenina strukturně podobná s imatinibem a působí při nižších koncentracích než imatinib (Weisberg *et al.*, 2005). Denní dávka nilotinibu je 300 mg. Dasatinib je sloučenina, která není strukturně podobná s imatinibem a působí také při nižších koncentracích než imatinib (Shah *et al.*, 2004). Denní dávka dasatinibu je 100 mg. Ve srovnání s nilotinibem je dasatinib více cytotoxický (Tokarski *et al.*, 2006). Nilotinib i dasatinib nahrazují imatinib v situacích, kdy jeho účinky selhávají v důsledku vzniku rezistencí. Jedinou výjimkou je mutace T315I, kdy dochází ke vzniku rezistence jak vůči imatinibu, tak i vůči nilotinibu a dasatinibu (Hochhaus, 2006).

V dnešní době existují také inhibitory třetí generace, kam patří například lék ponatinib, který je účinný vůči většině mutací způsobujících rezistenci na imatinib včetně T315I (O'Hare *et al.*, 2009).

Rezistence nezávislá na *bcr-abl* genu může být například způsobena zvýšeným transportem léčiva ven z buňky pomocí lékových transportérů (ABCB1, ABCG2, apod.) nebo deregulací apoptotické dráhy (Marktel *et al.*, 2003; Cortes *et al.*, 2003). Imatinib, nilotinib i dasatinib jsou substráty ABC transportérů (Sharom, 2008; Dohse *et al.*, 2010). Studie Lina-Yu Lu a spol. naznačuje, že ponatinib není substrátem ABC

transportérů (Lu *et al.*, 2015).



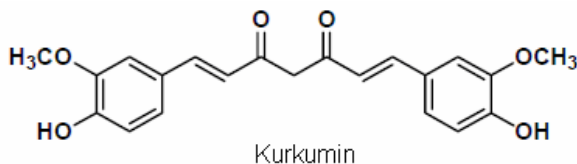
Obr. č. 7: Chemická struktura imatinibu, dasatinibu a nilotinibu.

Cílem terapie CML je snížit množství nádorových buněk v organismu a zpomalit progresi nemoci do dalších fází. Díky pokrokům v medicíně je zachraňováno stále více pacientů. V terapii CML existuje pokrok, nicméně i nejmodernější léčiva postupně selhávají v důsledku vzniku rezistencí u nádorových buněk. Proto je důležité stále vyvíjet nová a účinnější léčiva.

2.2 Kurkumin a jeho analog difenyl difluoroketon

2.2.1 Přírodní látky s léčivými účinky

Některé přírodní látky mohou sloužit jako léčiva, která lze využít v klinické praxi. Příkladem protinádorových přírodních léčiv jsou vinkristin (z rostliny barvínek; *Vinca rosea*), etopsid (z rostliny mandragora; *Podophyllum peltatum*) nebo taxol (z tisů; *Taxus brevifolia*; Mans *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2012). Některé přírodní látky, jako například kurkumin (viz obr. č. 8) nebo gossypol (z bavlníku; *Gossypium*; Band *et al.*, 1989) mají sice celou řadu pozitivních vlastností, ale nemohou sloužit přímo jako léčiva kvůli negativním vedlejším účinkům, rychlému metabolismu v těle nebo například nízké rozpustnosti. Tyto látky jsou pro vědce molekulárním vzorem pro syntézu nových účinnějších léků.



Obr. č. 8: Chemická struktura kurkuminu - (1E,6E) 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) hepta-1,6-dien-3,5-dion

2.2.2 Vlastnosti a využití kurkuminu

Kurkumin / diferuloyl methan / (1E,6E) 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)hepta-1,6-dien-3,5-dion je přírodní polyfenolická žlutá látka. Získává se mletím sušených odděnků rostliny kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*) patřící do rodiny zázvorovitých (*Zingiberaceae*), která se pěstuje v tropických a subtropických oblastech (Jagetia *et* Aggarwal, 2007). Z odděnků kurkumy dlouhé se nezíská pouze kurkumin (77 %), ale také látky strukturně podobné jako demethoxykurkumin (17 %), bisdemethoxykurkumin (3 %) a cyklokurkumin (< 1 %). Souhrně se tyto látky nazývají kurkuminoidy (Lao *et al.*, 2006, Kiuchi *et al.*, 1993).

Kurkumin je jedno z nejrozšířenějších koření na světě, které proslulo svou barvou a chutí v koření kari. Také se používá jako barvivo, aroma nebo jako konzervační látka v hořčici, másle nebo třeba majonéze (Epstein *et al.*, 2010). Kromě častého využití v potravinářském průmyslu, má kurkumin, díky svým zdraví prospěšným účinkům a nízké toxicitě, velmi hojné využití v lékařství. Po mnoho staletí byl kurkumin používán indické a čínské medicíně. Od roku 1815, kdy byl kurkumin poprvé z odděnků izolován (Vogel *et* Pelletier, 1815), až do roku 1970 bylo vydáno jen několik článků týkajících se jeho chemické struktury, syntézy a vlastností. První publikace o využití kurkuminu jako léčiva vyšla roku 1937 (Albert, 1937). Zájem o tuto látku se začal zvyšovat poté, co Bharat Aggarwal a spol. roku 1995 objevili její protinádorové účinky *in vitro* (Singh *et* Aggarwal, 1995). Postupně byly prokázány (*in vitro* popř. *in vivo* na myších) jeho proapoptotické, antiproliferační (Kuttan *et al.*, 1985), protizánětlivé (Srimal *et al.*, 1973), antioxidační (Sharma, 1976; Kunchandy *et* Rao, 1990), antiparazitické, antibakteriální, antivirové a antimykotické účinky (Schraufstatter *et* Bernt, 1949). Od tohoto širokého spektra účinků se potom odvozuje uplatnění kurkuminu při léčbě mnoha onemocněních jako jsou záněty, kožní onemocnění, alergie, astma, jaterní nemoci, revmatismus, artritida, parazitické nemoci, průjemy, zácpy, horečky a další (kurkumin musí být upravený, aby byl v těle

biologicky dostupný; Aggarwal *et al.*, 2007; Ammon *et Wahl*, 1991).

2.2.2.1 Chemické vlastnosti kurkuminu

Kurkumin lze rozpustit v polárních rozpouštědlech jako jsou ethanol, methanol, acetonitril, chloroform nebo dimethylsulfoxid (Maheshwari *et al.*, 2006). Z bližšího pohledu je kurkumin symetrická molekula s chemickým vzorcem $C_{21}H_{20}O_6$ a s molekulovou hmotností 368,38 g/mol. Strukturní vzorec se skládá ze dvou aromatických kruhů (O-methoxy fenoly) propojených sedmi uhlíky nesoucích α , β -nenasyčené β -diketony (Gupta *et al.*, 2011; Priyadarsini, 2009; viz obr. č. 8). β -diketonová skupina hraje důležitou roli v antioxidačních vlastnostech kurkuminu a vykazuje keto- nebo enol- tautomerii podle pH prostředí, kde se kurkumin nachází (Anand *et al.*, 2008).

Kurkumin je stabilní v kyselém pH a podléhá degradaci v neutrálním a bazickém pH (Priyadarsini, 2009; Price *et Buescher*, 1997). Degradace kurkuminu probíhá pravděpodobně hydrolyticky přes β -diketo skupiny. Kurkumin také podléhá rychlejšímu rozkladu při vystavení slunečnímu záření (Khurana *et Ho*, 1988; Priyadarsini, 2009). Produkty degradace kurkuminu jsou ferulová kyselina, feruloyl methan, feruloyl aldehyd a vanilin. Degradace může být významně potlačena přítomností lipidů, liposomů, albuminů, cyklodextrinů, polymerů a antioxidantů jako jsou N-acetylcystein (NAC), kyselina askorbová nebo glutathion [(GSH; váží se přes β -diketo skupiny, čímž tato místa obsazují a degradace je znemožněna (Priyadarsini, 2009)].

Kurkumin snadno podléhá oxidaci (je donorem vodíků), reversibilní a ireversibilní nukleofilní adici (Michaelova adice), hydrolytické degradaci a enzymatickým reakcím. Všechny tyto reakce vedou k různým molekulárním změnám a zároveň k jiným biologickým funkcím této látky.

Michaelova adice

Nenasycená β -diketo skupina kurkuminu se podílí na nukleofilních adičních reakcích (Michaelova adice). β -diketo skupina představuje elektrofilní iont a slouží jako akceptor elektronů. Anionty $-OH^-$, $-SH^-$ a $-SeH^-$ představují nukleofilní ionty a slouží jako donory elektronů. Aby reakce probíhala správně, tak je velmi důležité pH prostředí. Michaelova adice byla velmi důležitá pro pochopení metabolismu kurkuminu v živých buňkách (Awasthi *et al.*, 2000; Lersel *et al.*, 1996).

Zajímavé jsou reakce kurkuminu s biologickými thioly jako je GSH (mají $-SH$ skupinu;

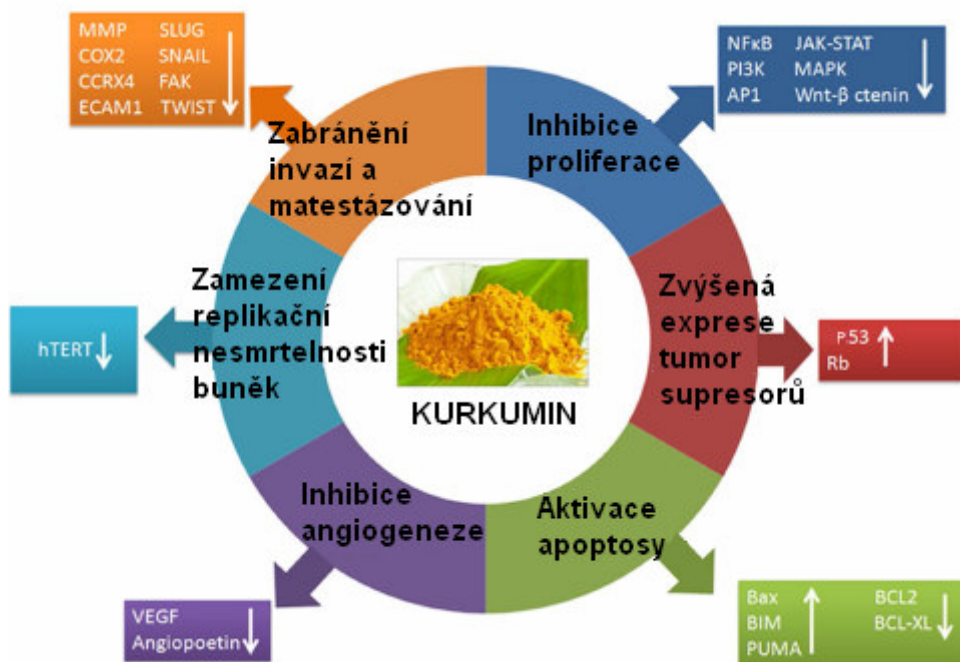
Awasthi *et al.*, 2000; Lersel *et al.*, 1996). Vznik aduktu kurkumin-GSH vede postupně k vyčerpání GSH v buňce a tím ke ztrátě ochrany buňky před oxidativním stresem. I když několik zpráv naznačuje, že by se mělo jednat o reversibilní reakce, tak v živých systémech to zatím nebylo potvrzeno. Několik studií prokázalo, že vyčerpání thiolů v buňkách před podáním specifického léku, má silnější protinádorový efekt, než použití specifického léku samotného (Garcia-Ruiz *et al.*, 2000). Podobná situace nastává při adici thioredoxin reductasy s kurkuminem. Thioredoxin reductasa je důležitá při udržování buněčné redox-homeostázy. V aktivním centru tohoto enzymu se nachází selenocystein. Skupina $-SeH^+$ je silný nukleofil a tvoří ochotně adukt s kurkuminem. Interakce způsobí inhibici tohoto enzymu (Gupta *et al.*, 2011).

2.2.3 Působení kurkuminu na molekulární úrovni

Bylo prokázáno, že deregulace signálních drah, které řídí zánětlivou reakci v buňkách, přispívá ke vzniku nádorového onemocnění (Sethi *et al.*, 2012). Typická je zvýšená hladina zánětlivých cytokinů [interleukiny, TNF- α], zánětlivých enzymů [COX-2, inducibilní syntasa oxidu dusnatého (iNOS)], matrixových metaloproteinás (MMPs), transkripčních faktorů [NF- κ B (Sethi *et Tergaonkar*, 2009)], STATs (Siveen *et al.*, 2014), Akt a ROS (Manning *et Cantley*, 2007; Aggarwal *et al.*, 2006; Balkwill *et Mantovani*, 2001).

Průlomové bylo zjištění, že kurkumin působí protinádorově *in vitro* a ovlivňuje celou řadu biologických drah zapojených právě do zánětlivých procesů, dále do onkogenní exprese, metastázování, angiogeneze, apoptosy, regulace buněčného cyklu, buněčné proliferace a růstu (Bengmark, 2006).

V roce 2000 Douglas Hanahan a Robert A. Weinberg navrhli teorii, že nádorové buňky sdílejí několik společných znaků důležitých pro transformaci zdravé buňky na buňku nádorovou. Kurkumin působí na všech těchto šest základních znaků nádorových buněk a tím dokáže zastavit vývoj nádoru *in vitro* (Hanahan *et Weinberg*, 2000; viz obr. č. 9).



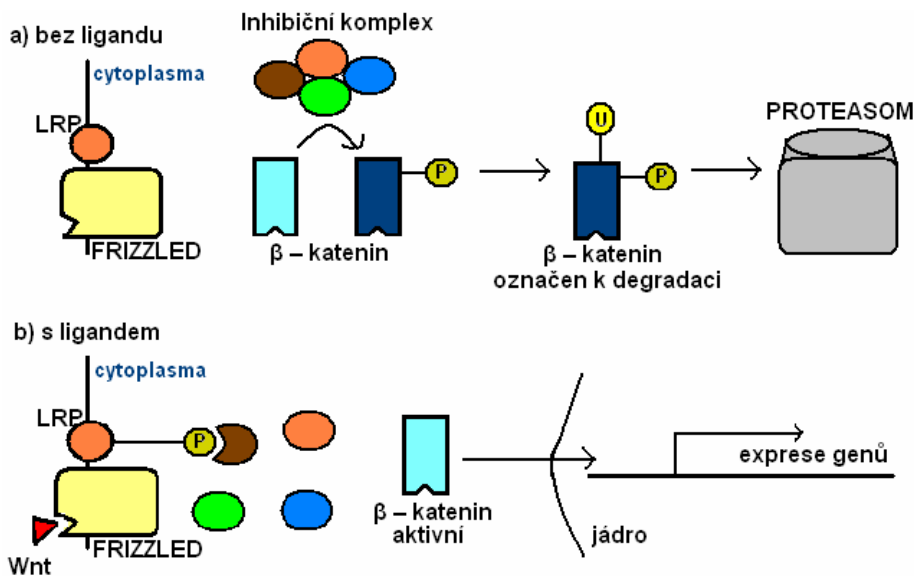
Obr. č. 9: Působení kurkuminu na šest základních znaků nádorových buněk *in vitro*. Kurkumin snižuje proliferaci inhibicí drah NF- κ B, PI3K, MAPK atd. Zvyšuje expresi nádorových supresorových genů (p53; pRb), proapoptotických proteinů (Bax, Bim, Puma) a zároveň snižuje expresi antiapoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-XI). Inhibuje angiogenezi sníženou expresí VEGF/VEGFR a angiopoetinu. Omezuje replikační nesmrtelnost buněk snížením aktivity telomerasy (hTERT) a redukuje tvorbu metastáz inhibicí adhezních molekul (MMP, SLUG, SNAIL, apod.; upraveno podle Bose *et al.*, 2015).

Kurkumin brání nadměrné proliferaci buněk

Transkripční faktor NF- κ B zvyšuje expresi genů podporujících buněčnou proliferaci, metastázování, angiogenezi, chemorezistenci, radiorezistenci, zánět a potlačuje expresi proapoptotických genů (Sen *et al.*, 2011; Sethi *et Tergaonkar*, 2009; Shishodia *et al.*, 2007). Produkty těchto genů jsou MAPKs, PI3K/Akt, c-myc, iNOS, cyklin D, CDKs, VEGF, Bcl-2, Bcl-XI, X-vázané inhibitory apoptosy (XIAPs; inhibitory kaspas), COX-2 a další (Aggarwal *et al.*, 2006; Cildir *et al.*, 2013; Lin, 2004). Konstitutivní aktivace NF- κ B přispívá k tvorbě nádoru. Kurkumin inhibuje proteasomální degradaci I κ B (Tuorkey, 2014) a brání vstupu NF- κ B do jádra (Kuttan *et al.*, 2007).

Dalším cílem kurkuminu je Wingleless (Wnt)/ β -katenin dráha (Kuttan *et al.*, 2007; Lin, 2007; viz obr. č. 10). Wnt/ β -katenin dráha je důležitá pro proliferaci, diferenciaci,

adhezi, migraci kmenových buněk a má klíčovou roli v embryogenezi. Aktivace dráhy začíná navázáním glykoproteinu Wnt na receptor Frizzled, čímž dojde k fosforylaci koreceptoru LRP, který následně fosforyluje degradační tetramer β -kateninu. Ten se skládá z proteinu Axinu, nádorového supresoru *adenomatous polyposis coli* (APC), casein kinase 1 α (CK1 α) a glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). β -katenin je efektorová molekula a v nepřítomnosti ligandu Wnt je fosforylován tetramerním komplexem a následně je degradován v proteasomu. Po aktivaci dráhy a rozpadu komplexu je β -katenin translokován do jádra, kde spouští genovou expresi cílových genů (Wodarz *et Nusse*, 1998). Deregulace Wnt dráhy je znakem několika typů leukémií včetně CML (Kikuchi, 2003). Kurkumin aktivuje GSK-3 β , snižuje expresi samotného β -kateninu a zároveň i jeho cílové molekuly - cyklinu D (Tuorkey, 2014). Cyklin D je protoonkogen, jehož expresi řídí NF- κ B nebo Wnt/ β -katenin dráha. Společně s CDK4 má klíčovou roli v progresi buněčného cyklu a v proliferaci. U mnoha typů nádorů bývá zvýšená jeho exprese (Bharti *et al.*, 2002; Choudhuri *et al.*, 2005). Inhibice exprese cyklinu D a CDK4 vede k zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi (Tuorkey, 2014). Jedna z možností, jak může kurkumin inhibovat CDKs, je zvýšením exprese inhibičních proteinů (p16, p21, p27; Srivastava *et al.*, 2007). U RAS hyperaktivovaných buněk kurkumin inhibuje Akt a jeho podřízené molekuly (např. mTOR), čímž podporuje zastavení buněk v G2/M fázi buněčného cyklu (Ono *et al.*, 2013).



Obr. č. 10: Schéma signální dráhy Wnt. a) β -katenin je v nepřítomnosti ligandu Wnt fosforylován tetramerním komplexem a je degradován v proteasomu. b) Po navázání glykoproteinu Wnt na receptor Frizzled dojde k fosforylaci koreceptoru LRP, který následně fosforyluje degradační tetramer β -kateninu. Poté je aktivní β -katenin translokován do jádra, kde spouští expresi příslušných genů (upraveno podle Zhang *et al.*, 2015; schéma zjednodušeno).

Kurkumin podporuje expresi nádorových supresorů

Nádorové buňky potlačují aktivitu nádorových supresorů, které brání zdravé buňce, aby se transformovala v buňku nádorovou. Protein p53 je důležitý nádorový supresor, který rozhoduje na základě buněčných signálů, zda má buňka proliferovat, navodit senescenci nebo apoptosu. Inaktivace p53 a aktivace NF- κ B bývají základními znaky mnoha typů nádorů a hrají zásadní roli v jeho progresi (Dey *et al.*, 2008). Několik pokusů *in vitro* ukázalo, že kurkumin zvyšuje expresi proteinu p53, indukuje jeho jadernou translokaci, zvyšuje DNA vazebnou aktivitu p53 (Choudhuri *et al.*, 2002) a následnou expresi p21 a proapoptotického proteinu Bax (Liontas *et al.*, 2004; Kunnumakkara *et al.*, 2008). Kurkumin také inhibuje fosforylaci a následnou degradaci pRb (Tsvetkov *et al.*, 2005).

Kurkumin indukuje apoptosu u nádorových buněk

Apoptosa je programovaná buněčná smrt důležitá při embryogenezi a při udržování homeostáze. Deregulace apoptosy přispívá k neurodegenerativním nebo autimunitním onemocněním (hyperaktivovaná apoptosa). Pokud je apoptotická dráha nefunkční, dochází k tvorbě nádorů. Charakteristickým morfologickým rysem

apoptosy je kondenzace chromatinu a cytoplasmu, tvorba membránových váčků, intaktní mitochondrie a lysosomy. Apoptosa není spojena se zánětem, postihuje jednotlivé buňky a pro celý proces je potřeba energie ve formě ATP. Apoptotická tělíčka jsou později fagocytována okolními buňkami (Kerr *et al.*, 1972). Důležitým biochemickým znakem apoptosy je aktivace kaspasových proteas, které následně aktivují specifické endonukleasy a štěpí různé strukturní, regulační a DNA reparační proteiny (Yuan *et al.*, 1992; Enari *et al.*, 1998).

Rozeznáváme tři biochemické dráhy vedoucí k aktivaci kaspas: vnitřní (mitochondriální), vnější (přes „receptory smrti“ a jejich ligandy) nebo prostřednictvím cytotoxických T-lymfocytů (CTL). Pokud buňka podlehně určité dávce stresu, tak se spouští vnitřní dráha. Pomocí proapoptotických proteinů z Bcl-2 rodiny (Bax, Bid, Bak, atd.) dojde k rozvolnění vnější mitochondriální membrány. Z mezimembránového prostoru se uvolní aktivátory buněčné smrti, z nichž je nejdůležitější cytochrom c. Ten vytvoří v cytosolu buňky heptamerový komplex (apoptosom) s Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf 1), prokaspasou-9 a ATP. Prokaspasa-9 se aktivuje a proteolyticky štěpí další podřízené kaspasy, které se tímto také postupně aktivují. Vnější dráha je závislá na „receptorech smrti“ (FAS, TNF). Buňky imunitního systému receptory rozpoznají a uvolňují ligandy, které se na receptory váží. Přes adaptorové molekuly aktivují kaspasu-8, která dále štěpí podřízené kaspasy (Ashkenazi *et al.*, 1998). Třetí biochemická dráha vedoucí k apoptose buňky spočívá v exocytóze proteinové granule z CTL, která obsahuje perforin a granzym B (proteasa štěpící cílové proteiny za zbytkem kyseliny asparagové; Caputo *et al.*, 1994). Granzym B se do buňky dostává přes specifický receptor endocytosou. Perforin vytváří v cílové buňce pór, který způsobí lokálně osmotický šok a následné uvolnění granzymu B z endosomu (Darmon *et al.*, 1995), který začne štěpit cílové molekuly (např. kaspasu-3, protein Bid), což vede k apoptose buňky.

Signální dráhy vedoucí k buněčné smrti jsou u nádorových buněk deregulované. Může u nich dojít k inaktivaci p53 nebo alternativnímu zvýšení exprese antiapoptotických genů (Bcl-2, Bcl-XL) a molekul důležitých pro přežití buněk (IGF1/2). Zároveň mohou snížit expresi proapoptotických genů (Bax, Bim, Puma) nebo vyřadit z funkce apoptotickou dráhu závislou na ligandech pro „receptory smrti“ (Chakraborty *et al.*, 2010).

Kurkumin zvyšuje expresi proapoptotických molekul a snižuje expresi

antiapoptotických molekul *in vitro* (Mukhopadhyay *et al.*, 2001). Zároveň podporuje štěpení prokaspas a inhibuje XIAPs (Reuter *et al.*, 2008; Bush *et al.*, 2001). Kurkumin také aktivuje lysosomální proteasy, fosfatasy a lipasy, které spouští autofagii (Karunagaran *et al.*, 2005).

Kurkumin inhibuje angiogenezi

Angiogeneze je tvorba nových krevních kapilár. Je velmi důležitá pro rozvod živin a kyslíku do všech orgánů a tkání a pro odvod oxidu uhličitého. Nově vznikající nádory nemají toto krevní propojení. Po dosažení určité velikosti nádoru, začínají nádorové buňky sekretovat růstové faktory, které interagují s receptory endoteliálních buněk okolních krevních kapilár, což pak vede k iniciaci angiogeneze (Semenza, 2013).

Tvorbu nových kapilár udržuje v rovnováze transkripční faktor hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α). Při dostatku kyslíku (normoxie) je v buňkách HIF-1 α oxidován, následně ubikvitinylován a degradován ve 26S proteasomu (Semenza, 2013). Při nedostatku kyslíku (hypoxie) dochází v buňce ke stabilizaci HIF-1 α , který se váže na DNA a spouští expresi cílových genů (VEGF, FGF, MMPs, angiopoietin, apod.; Schofield *et al.*, 2004). Angiogení molekuly spolu s jejich receptory jsou kurkuminem inhibovány, čímž je přerušena celá angiogenní signální dráha (Bhandarkar *et al.*, 2007).

Kurkumin inhibuje trvalou telomerasovou aktivitu, čímž brání replikační nesmrtelnosti buněk

Enzym telomerasa slouží k tomu, aby se DNA nezkracovala při jednotlivých replikacích (k udržování délky telomer). V nádorových buňkách je telomerasa trvale aktivní, a proto buňky mohou neustále proliferovat. Kurkumin inhibuje telomerasu a snižuje její expresi (mRNA). Buňka po zkrácení telomer aktivuje p53, který navodí senescenci nebo apoptosu (Lee *et al.*, 2010).

Kurkumin brání invazi a metastázování nádorových buněk

Invaze a metastázování jsou důležité pro rozšiřování nádorových buněk do cílových částí organismu. Kurkumin snižuje expresi adhezních molekul, které jsou nezbytné pro udržení metastáz [například intracelulární adhezní molekuly-1 (ICAM -1), endoteliální adhezní molekuly leukocytů-1 (ELAM-1) apod.; Shehzad *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 1998]. Dále kurkumin inhibuje MMPs, což jsou endopeptidasy závislé

na zinku, schopné degradovat složky extracelulární matrix, čímž usnadňují buňkám metastázovat (Shanmugam *et al.*, 2015). Kurkumin také brání činnosti transkripčních faktorů jako jsou SLUG, SNAIL, FAK, TWIST a dalších, které hrají klíčovou úlohu při metastázování (Bose *et al.*, 2015).

2.2.4 Metabolismus kurkuminu

I když to vypadá, že je kurkumin dokonalý a díky této látce máme ve všech nemocech vyhráno, tak opak je pravdou. Kurkumin nemůže být klinicky využit, protože má velmi špatnou vstřebatelnost přes střevní epitel, je nerozpustný ve vodě a má velmi rychlý metabolismus probíhající ve střevě a v játrech (Anand *et al.*, 2007). Pozitivní účinky kurkuminu byly většinou prokázány *in vitro* nebo *in vivo* na myších. Pozitivní bylo zjištění, že kurkumin i přes své špatné vlastnosti působí v těle nepřímo. Zesiluje aktivaci střevní alkalické fosfatasy, která je silným antioxidantem a protizánětlivou složkou produkovanou ve střevním epitelu (Ghosh *et al.*, 2014; Lallès, 2014). Při metabolizaci kurkuminu v těle dochází k O-konjugacím a redukcím. Sloučeniny vzniklé metabolizací kurkuminu si zachovaly své prospěšné vlastnosti, ale v důsledku jejich následných reakcí v těle (další redukce, konjugace, glukuronidizace) jsou z těla rychle vyloučeny. Produkty O-konjugace kurkuminu jsou kurkumin sulfát a kurkumin glukuronid. Produkty redukce jsou dihydrokurkumin, tetrahydrokurkumin, hexahydrokurkumin a oktahydrokurkumin (Anand *et al.*, 2008). Dalšími minoritními produkty, které vznikají při metabolizaci kurkuminu, jsou dihydrokurkumin glukuronid, tetrahydrokurkumin glukuronid, ferulová kyselina a dihydroferulová kyselina. Je známo, že tyto produkty vznikají enzymatickou cestou, ale stále se neví, přesně které enzymy stojí za jejich vznikem. Diskutovalo se také nad procesem hydrolytické degradace probíhající přes β -diketony. Ale protože se kurkumin vyskytuje v těle v komplexu s proteiny nebo i jinými biomolekulami, které se váží přes β -diketo skupiny, tak jsou tato místa obsazená a degradace je znemožněna. Navíc je hydrolytická degradace mnohem pomalejší než enzymatická reakce. Kurkumin by byl touto cestou metabolizován velmi pomalu, což by se vylučovalo s doloženým tvrzením o jeho rychlé metabolizaci (Gupta *et al.*, 2011).

2.2.4.1 Metody pro zlepšení metabolismu kurkuminu v těle

Pro zlepšení biologické dostupnosti kurkuminu se ukázalo jako slibné využití piperinu jako adjuvans (alkaloid izolovaný z černého nebo dlouhého pepře; Sehgal *et al.*, 2011), dále využití nanotechnologií (Bisht *et al.*, 2007) a také syntéza strukturních

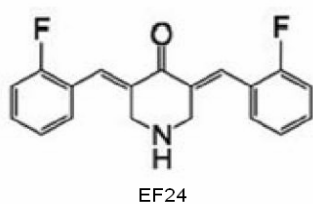
analogů (He *et al.*, 2015).

V případě nanotechnologií vědci zkouší využít pomocné systémy jako jsou liposomy, nanočástice, micely, nanogely, nanoemulze a další (Bonifácio *et al.*, 2014; Kunwar *et al.*, 2006). Kurkumin je s těmito částicemi držen dohromady pomocí hydrofobních interakcí. I když se nanotechnologie zdají být ideálním systémem pro dodání léku do těla, tak jsou zde také komplikace. Musí být vyřešeno a ověřeno, jak specificky cílit lék k nádorovým buňkám, jaká je nosnost nanočástice pro danou dávku léčiva, jaký bude osud nanočástice v *in vivo* systému (interakce s biologickým mikroprostředím, akumulace v orgánech), jestli nejsou nosičové molekuly a jejich metabolity toxické, jaká je stabilita nosičových molekul během dlouhodobého skladování a jaké budou celkové výrobní náklady (Anand *et al.*, 2007; Kunnumakkara *et al.*, 2008).

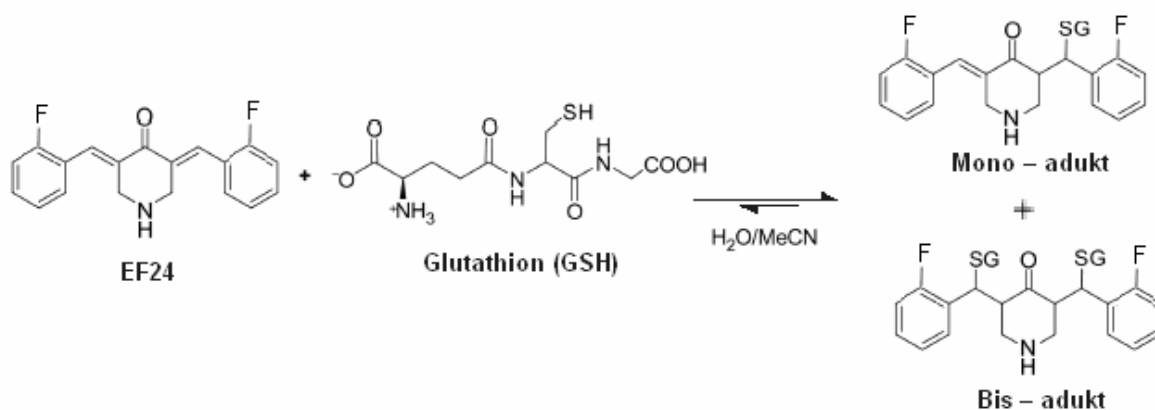
2.2.5 Strukturní analog kurkuminu

2.2.5.1 Vlastnosti a využití látky EF24

Nejvíce slibnou metodou se zdá být syntéza strukturních analogů kurkuminu. Vědci vychází při syntéze těchto molekul ze strukturního vzorce kurkuminu a snaží se ho pozměnit tak, aby se eliminovaly jeho negativní vlastnosti a zvýšily jeho vlastnosti pozitivní. Syntetizovali analog kurkuminu: 3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on / difenyl-difluoroketon / EF24 (Adams *et al.*, 2004; viz obr. č. 11). Bylo prokázáno, že tato krystalická žlutá látka má ve srovnání s kurkuminem vyšší biologickou dostupnost, 10x až 20x silnější cytotoxicitu a je více rozpustná ve vodě (Adams *et al.*, 2004; Subramaniam *et al.*, 2008). O metabolismu látky EF24 zatím není příliš známo, ale podobně jako kurkumin podléhá Michaelově adici. U látky EF24 hraje hlavní roli při adici karbonylová nenasycená skupina (viz obr. č. 12). Aiming Sun a spol. provedli konjugaci látky EF24 s GSH a cysteinem (obsahující dipeptidy). Došlo ke vzniku bezbarvých ve vodě rozpustných aduktů, které byly charakterizovány pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography/mass spectrometry, LC/MS). Jejich výsledky ukazují, že tyto vzniklé adukty mají stejnou cytotoxicitu jako samotný EF24 a představují slibnou řadu stabilních, ve vodě rozpustných protinádorových léčiv (Sun *et al.*, 2009).



Obr. č. 11: Chemická struktura látky EF24 [3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on].



Obr. č. 12: Michaelova adice GSH na EF24 za tvorby mono- a bis-aduktů.

Stejně jako kurkumin, tak i látka EF24 působí na šest základních znaků nádorových buněk, které byly definovány D. Hanahanem a R. A. Weinbergem (Hanahan *et al.* Weinberg, 2000).

Látka EF24 inhibuje signální dráhy důležité pro přežívání a proliferaci buněk

Bylo prokázáno, že látka EF24 má silnější antiproliferační účinky než kurkumin (Liu *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2011; Subramaniam *et al.*, 2008).

PI3K/Akt dráha hraje důležitou roli v přežívání buněk (Cantley, 2002). Aktivovaná Akt spouští expresi mnoha proteinů účastnících se regulace buněčného cyklu, stimulace růstu buněk a inhibice apoptosy (Chang *et al.*, 2003). EF24 inhibuje fosforylaci a následnou aktivaci Akt, čímž potlačuje celou PI3K dráhu. EF24 také brání fosforylaci MAPK, čímž tuto dráhu inhibuje (Liu *et al.*, 2012; Subramaniam *et al.*, 2008).

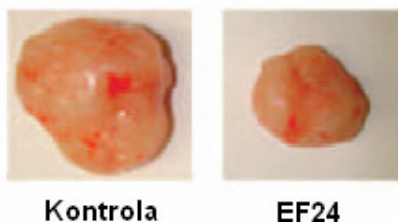
EF24 inhibuje IKK v signální dráze NF- κ B. Díky tomu nedojde k degradaci I κ B a následné aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B a jeho translokaci z cytoplasmy do jádra. NF- κ B genové produkty nejsou exprimovány (Bcl-2, COX-2, cyklin B1; Shanmugam *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2011).

EF24 indukuje apoptosu a zastavení buněčného cyklu

Látka EF24 indukuje apoptosu při mnohem nižších dávkách než kurkumin. Výsledky Dharmalingama Subramaniam a spol. ukazují, že EF24 aktivuje kaspasu-3 (klíčová molekula apoptotické dráhy) u nádorových buněk tlustého střeva. Western blot analýza prokázala snížení exprese antiapoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-XI), zatímco hladiny proapoptotického proteinu Bax byly beze změny (Subramaniam *et al.*, 2008). Haitao Liu a spol. a Yingjian Liang a spol. prokázali, že EF24 zastavuje u nádorových buněk karcinomu vaječníků a jater buněčný cyklus v G2/M fázi a zároveň spouští apoptotickou dráhu zvýšenou expresí PTEN (Liu *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2011). Western blot analýza ukázala snížení exprese cyklinu B1, CDK2, Bcl-2, Bcl-XI a zvýšení hladiny proteinů p53, p21 a také Bax. Komplex cyklinu B1 a CDK2 je klíčovým regulátorem kontrolního bodu G2/M fáze buněčného cyklu. Nádorový supresorový protein p53 je v neaktivním stavu inhibován proteinem mouse double minute 2 homolog (MDM2; ubikvitin ligasa). Po působení EF24 je hladina MDM2 snížena, p53 je aktivován a v jádře spouští expresi p21. Protein p21 se váže na komplex cyklinu B1 a CDK2, čímž ho inaktivuje a buňka je zastavena v G2/M fázi buněčného cyklu. Následně je navozena senescence nebo apoptosa (Agarwal *et al.*, 1995).

EF24 inhibuje růst nádoru

D. Subramaniam a spol. a Y. Liang a spol. zjistili, že EF24 potlačuje růst nádoru. Pozorovali to na xenoimplantátech lidských nádorových buněk u nahých myší. U myší léčených EF24 přestal nádor po určitém čase růst v porovnání s kontrolními neovlivněnými myšmi (Subramaniam *et al.*, 2008, Liang *et al.*, 2011; viz obr. č. 13).



Obr. č. 13: Nádor tlustého střeva. Vlevo kontrolní neovlivněné buňky, vpravo po působení EF24 (upraveno podle Subramaniam *et al.*, 2008).

EF24 inhibuje expresi onkogenů a angiogenezi

COX-2 je enzym, který při zánětlivých signálech přijatých buňkou zesiluje produkci prostaglandidu, který zvyšuje teplotu, bolestivé vjemy, prokrvení, apod. Zesílená exprese COX-2 během tumorogeneze způsobuje odolnost buňky vůči apoptotickým stimulům (Tsujii *et al.*, 1995). EF24 inhibuje tvorbu enzymu COX-2.

Nádory o velikosti nad cca 1-2 mm³ potřebují krevní zásobení. VEGF a IL-8 jsou silnými induktory růstu kapilární sítě do nádoru. Prostaglandidy a další tumorogenní mediátory zesilují expresi proteinů VEGF a IL-8 v epiteliálních buňkách. Po působení EF24 jsou hladiny proteinů VEGF a IL-8 v buňkách významně sníženy (Liu *et al.*, 2012; Subramaniam *et al.*, 2008).

2.3 Mnohočetná léková rezistence

Léková rezistence je jedna z hlavních příčin selhání léčby u nádorového onemocnění. Můžeme ji rozdělit na dva hlavní typy, a to buď na primární (přirozenou), nebo sekundární (získanou) rezistenci. Primární rezistence buněk se projevuje již při prvním podání léčiva. Sekundární rezistence se začíná projevovat až v průběhu úspěšné léčby. Dále existuje zkřížená rezistence, při níž buňky neodpovídají na léčbu látek, které si jsou strukturou i mechanismem účinku podobné (Skovsgaard, 1978). Vyskytují se i případy, kdy buňky přestávají odpovídat na léčbu látek, které si nejsou v ničem podobné. V takovém případě hovoříme o mnohočetné lékové rezistenci (multidrug resistance, MDR). Příčiny vzniku MDR jsou různé:

- a) zvýšená aktivita genů ovlivňujících detoxikaci léčiv (glutathion-S-transferasa, cytochromy P450, apod.);
- b) změny v regulaci buněčné smrti (aktivace proliferačních drah, zvýšená exprese antiapoptotických proteinů, snížená exprese proapoptotických proteinů);
- c) alterace buněčného cyklu a zvýšené opravy DNA (např. zvýšená aktivita topoisomerasy II);
- d) změny v transportu látek ven z buněk [zvýšená exprese ATP binding cassette transporters (ABC transportérů)];
- e) další neobvyklé mechanismy (např. sekvestrace léčiva lysozomy; není o nich příliš známo).

Změny v transportu látek ven z buněk díky ABC transportérům jsou nejlépe prozkoumaným mechanismem vzniku MDR (Gottesman *et al.*, 2002).

2.3.1 ABC transportéry

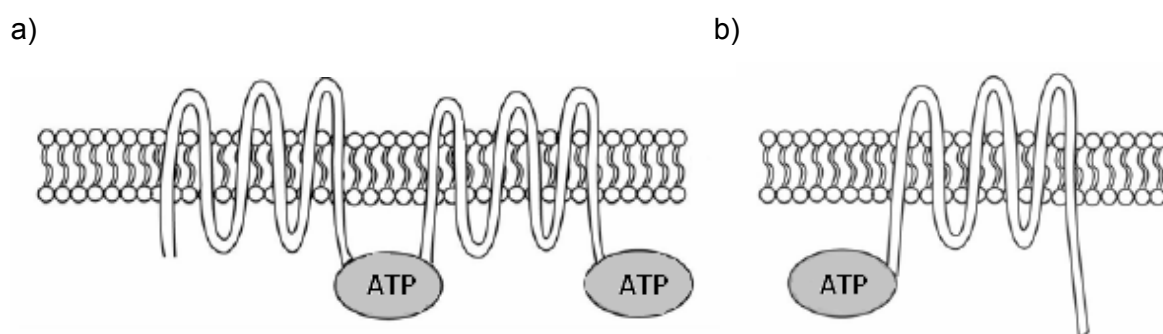
2.3.1.1 Obecné vlastnosti ABC transportérů

ABC transportéry jsou transmembránové proteiny patřící do jedné z největších rodin membránových proteinů (Dassa *et Bouige*, 2001; Locher, 2009). Bylo prokázáno, že lidský genom kóduje 48 ABC transportérů (Dean *et al.*, 2001; Sheps *et al.*, 2004). Tyto proteiny byly seřazeny podle fylogenetických analýz do sedmi podrodin A - G (Dean *et al.*, 2001). V rámci eukaryot je jejich funkcí aktivní transport příslušných substrátů ven přes cytoplasmatickou membránu nebo oběma směry přes membránu organel (Dean *et Annilo*, 2005). Protože transportér využívá energii ve formě ATP, tak přenos může probíhat i proti koncentračnímu spádu (Locher, 2009). Účastní se přenosu širokého spektra nízkomolekulárních hydrofobních substrátů. Patří mezi ně lipidy, cholesterol, sacharidy, aminokyseliny, oligopeptidy, nukleotidy, endogenní metabolity, ionty (pouze ABCC7) a další. ABC transportéry jsou důležité například při prezentaci antigenů, transportu žlučových kyselin, homeostázi železa v mitochondriích a regulaci ATP závislých iontových kanálů. Také hrají hlavní roli v ochraně citlivých orgánů před toxickými cizorodými látkami. Nejvíce jsou exprimovány v hematoencefalické bariéře a orgánech, které se podílejí na resorpci nebo vylučování různých látek. Při zvýšené expresi některých ABC transportérů vzniká MDR (Dean *et al.*, 2001). Transportéry spojené s MDR jsou P-glycoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) a breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2; Ozvegy *et al.*, 2001; Gottesman *et al.*, 2002). Naopak při selhání transportu substrátu přes lipidovou dvojvrstvu jsou způsobeny závažné poruchy, jako jsou krvácivost (ABCA1; Albrecht *et al.*, 2005), hypercholesterolemie (ABCG5; Rudkowska *et Jones*, 2008), cystická fibróza (ABCC7; Riordan *et al.*, 1989) nebo cukrovka (ABCC8; Vaxillaire *et al.*, 2007; Rees *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Struktura ABC transportérů

ABC transportéry mají, až na výjimky, charakteristickou stavbu. Většina transportérů má dvě transmembránové domény (transmembrane domains, TMDs) a dvě nukleotid vázající domény (nucleotid binding domains, NBDs). Jedna TMD se většinou skládá z šesti α -helikálních transmembránových řetězců a slouží ke specifické vazbě substrátu (Pohl *et al.*, 2005; viz obr. č. 14a). NBDs se nachází v cytoplasmě, přičemž váží a následně hydrolyzují ATP. Na rozdíl od TMDs jsou v rámci celé rodiny

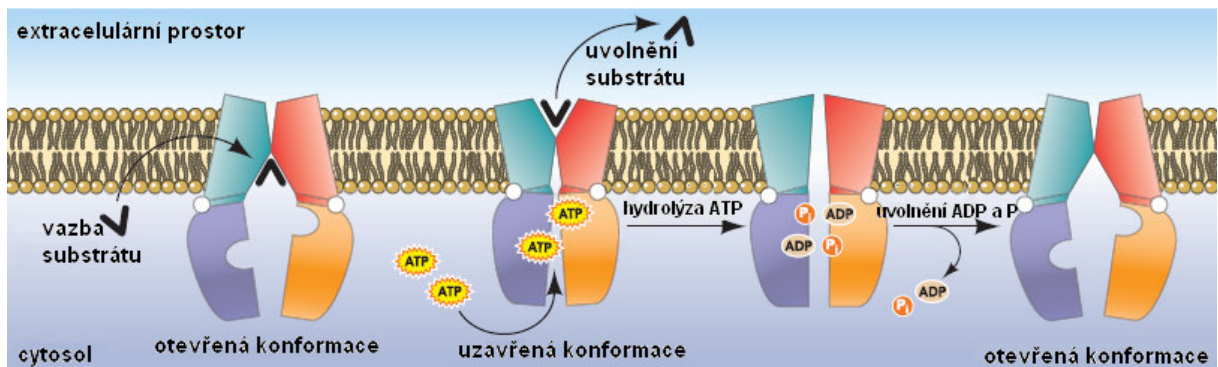
homologní. Variabilita TMDs souvisí s různorodostí substrátů vázajících se na tuto doménu. Jako všude, tak i zde existují výjimky, které se svou strukturou liší. Příkladem jsou ABCB2 a ABCG2, tzv. „poloviční“ transportéry, které obsahují jen jednu NBD a jednu TMD. ABCB2 je funkční pouze ve formě heterodimeru (Momburg *et al.*, 1994) a ABCG2 transportér je funkční pouze ve formě homodimeru (Gottesman *et al.*, 2002; viz obr. č. 14b). Při expresi tzv. „polovičního“ transportéru jsou potřeba formálně dvě molekuly mRNA (v případě heterodimeru dvě různé mRNA) na rozdíl od exprese celého transportéru, kde stačí jedna molekula mRNA (Szakács *et al.*, 2006).



Obr. č. 14: Složení ABC transportérů. a) Většina ABC transportérů má dvě TMDs a dvě NBDs. b) Některé ABC transportéry obsahují jen jednu NBD a jednu TMD - tzv. „poloviční“ transportéry (např. ABCB2; upraveno podle Stefková *et al.*, 2004).

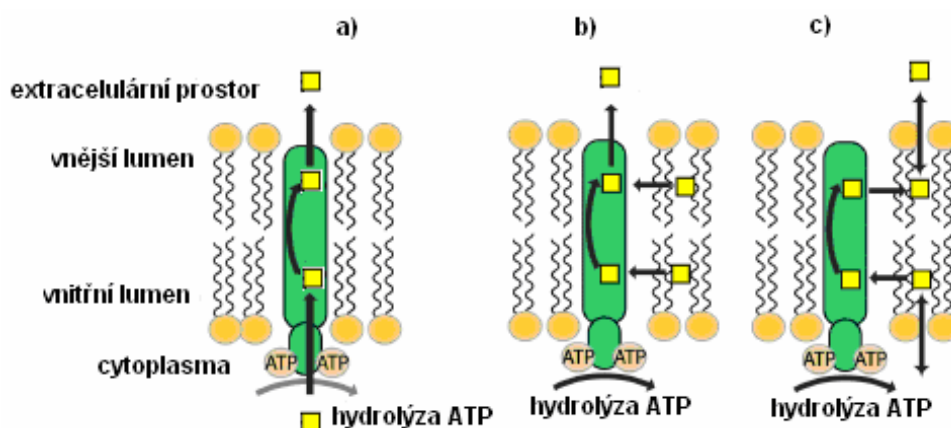
2.3.1.3 Mechanismus přenosu substrátu

Vše začíná vazbou substrátu na TMDs, které se nachází v tzv. otevřené konformaci s vysokou afinitou ke svému substrátu. Po vazbě substrátu dochází k navázání dvou molekul ATP a k následné dimerizaci NBDs, které vytváří uzavřenou konformaci. Hydrolýza první molekuly ATP vyvolává konformační změnu na TMDs a podpoří translokaci substrátu (Kreimer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1996). Hydrolýza druhé molekuly ATP změní uzavřenou konformaci NBDs na otevřenou. Uvolní se fosfor a ADP (Rees *et al.*, 2009; Locher, 2009; viz obr. č. 15).



Obr. č. 15: Mechanismus přenosu substrátu. Substrát se váže na TMDs, které se nachází v otevřené konformaci. Poté dochází k navázání dvou molekul ATP a k následné dimerizaci NBDs, které tvoří uzavřenou konformaci. Hydrolyza první molekuly ATP vyvolává konformační změnu na TMDs a podpoří translokaci substrátu. Hydrolyza druhé molekuly ATP změní uzavřenou konformaci NBDs na otevřenou. Uvolní se fosfor a ADP (upraveno podle Locher, 2009).

Pro přenos substrátu ABC transportéry byly navrženy tři modely (viz obr. č. 16). Historicky první model nebyl prokázán a funguje na principu klasického kanálu vytvořeného TMDs. V druhém modelu, tzv. vakuovém čističi, se substrát distribuuje v celé lipidové dvojvrstvě a poté interaguje s transportérem, který jej přímo přenáší ven z buňky. Nejpravděpodobnější model popisující transport substrátu ABC transportéry je tzv. flipázový. Substrát opět vstupuje přes vnitřní lumen, kde interaguje s ABC transportérem a dochází k jeho překlopení do lumenu vnějšího. Z vnějšího lumenu je pak vyloučen do extracelulárního prostoru (Jones *et George*, 2012).



Obr. č. 16: Tři navržené modely přenosu substrátu ABC transportéry. a) Princip klasického kanálu. b) Tzv. vakuový čistič interaguje se substrátem, který je distribuován v lipidové dvojvrstvě, a přímo jej transportuje ven z buňky. c) Tzv. flipázový model; substrát prochází do vnitřního lumenu, kde interaguje s transportérem a je jím překlopen do lumenu vnějšího, odkud pak prochází do extracelulárního prostředí (podle Tarling *et al.*, 2013).

2.3.1.4 ABC transportéry a mnohočetná léková rezistence; další významní členové třech hlavních podrodin a jejich funkce

Jak již bylo zmíněno, ABC transportéry související se vznikem MDR jsou ABCB1, ABCC1 a ABCG2 (Ozvegy *et al.*, 2001; Gottesman *et al.*, 2002). Kromě fyziologických substrátů tyto transportéry přenášejí i léčiva. Při aberantní expresi způsobují zvýšený export chemoterapeutik, použitých pro léčbu pacienta, ven z buněk. Důvodem zvýšené exprese těchto ABC transportérů mohou být například genové amplifikace (Riordan *et al.*, 1985), epigenetické regulace [např. demethylace (Turner *et al.*, 2006), acetylace histonů (To *et al.*, 2008)], regulace na úrovni transkripce (Hamada *et al.*, 2001) nebo posttranskripční regulace [např. mikroRNA (To *et al.*, 2009)]. Některé orgány, které mají fyziologicky vysokou míru exprese těchto transportérů, jsou přirozeně rezistentní (pokud by v této tkáni vznikl nádor, tak je primárně rezistentní).

ABCB podrodina

Nejvýznamnějším členem této podrodiny, který stojí za vznikem MDR, je 170 kDa velký ABCB1 transportér (struktura je uvedena na obr. č. 17a). Byl poprvé identifikován a popsán v roce 1976 (Juliano *et al.*, 1976). Nachází se na apikální membráně epitelálních buněk hematoencefalické bariéry, jater, ledvin, gastrointestinálního traktu, placenty a také je součástí kmenových buněk (Szakács *et al.*, 2006; Cascorbi, 2006; Gottesman *et al.*, 2002). Substráty ABCB1 jsou většinou hydrofobní nebo amfifilní povahy o molekulové hmotnosti od 300 do 1000 Da. Přirozenými substráty jsou lipidy, steroidní hormony, peptidy nebo i malé cytokiny (Drach *et al.*, 1996). Dalšími přenášenými látkami jsou například vinca alkaloidy (vinblastin, vinkristin, vindesin), taxany (paclitaxel, docetaxel), antracykliny (doxorubicin, daunorubicin), epipodofylotoxiny (etopsid) a TKIs (imatinib, dasatinib, nilotinib; Cascorbi, 2006). ABCB1 také transportuje antibiotika (erytromycin), antihistaminika, analgetika (morfin), imunosupresivní látky (cyklosporin A), steroidy nebo fluorescenční látky (Hoechst 33342, Rhodamin 123). Látky přenášené transportérem ABCB1 jsou chemicky i funkčně odlišné, z čehož vyplývá, že vazebné místo pro substrát je dosti flexibilní (Gottesman *et al.*, 2002). ABCB1 bývá vysoce exprimovaný u nádorů vaječníků, tlustého střeva, ledvin, jater a u různých typů leukémií (Chan *et al.*, 1991).

Dalšími transportéry patřící do této rodiny jsou například ABCB2, ABCB3, ABCB4,

ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB10 a ABCB11. ABCB2 a ABCB3 jsou tzv. „poloviční“ transportéry, které tvoří heterodimery a přenášejí oligopeptidy z cytoplasmy do endoplasmatického retikula (Momburg *et al.*, 1994). ABCB4 je flipasa fosfatidylcholinu a ABCB11 se účastní přenosu žlučových kyselin z jaterních buněk do žluči (Van Helvoort *et al.*, 1996). Mutace v genech těchto dvou transportérů může způsobit různé formy progresivní familiární intrahepatální cholestáze (Strautnieks *et al.*, 1998). ABCB6, ABCB7, ABCB8 a ABCB10 jsou tzv. „poloviční“ transportéry nacházející se v mitochondriích a přenášející železo v komplexu s různými molekulami (Shukla *et al.*, 2011).

ABCC podrodina

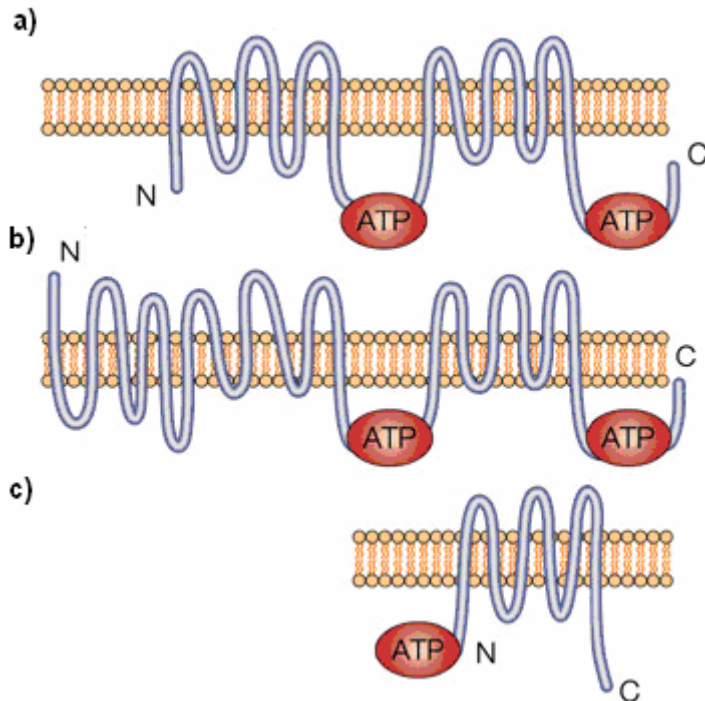
ABCC1 byl prvním identifikovaným členem této podrodiny a později u něj bylo prokázáno, že stojí za vznikem MDR (Cole *et al.*, 1992; struktura je uvedena na obr. č. 17b). Nachází se v bazolaterální membráně epitelálních buněk a transportuje své substráty do krve (Evers *et al.*, 1996). Je exprimován v plicích, ledvinách, nadledvinkách, močovém měchýři, slezině, žaludku, tlustém střevě, placentě, varlatech, kostní dřeni, erytrocytech, v pomocných T-buňkách a ve svalových buňkách. ABCC1 preferuje záporně nabitě substráty, které snadněji přenáší pokud jsou konjugovány s GSH, sulfátem nebo glukuronidem. Transportuje například chemoterapeutika [vinca alkaloidy, antracykliny, etopsidy, methotrexát, TKIs (Ishikawa *et al.*, 2000)], fluorescenční látky (kalcein), antibiotika (difloxacin) nebo přírodní látky (kurkuminoidy; Shukla *et al.*, 2011). Aberantní exprese ABCC1 byla prokázána u nádoru gastrointestinálního traktu, plic, prsu, prostaty, vaječnicků, také u melanomů a leukémií (Hipfner *et al.*, 1999).

Také některé další transportéry z této podrodiny se podílejí na lékové rezistenci: ABCC2, ABCC3, ABCC6 a ABCC10. Tyto transportéry ovšem nejsou spojeny s MDR, ale přenáší pouze skupiny léčiv s podobnou strukturou. ABCC2 se nachází v jaterních a střevních buňkách. Transportuje bilirubin a různá xenobiotika z jater do žlučových cest (Dietrich *et al.*, 2001). Při nesprávné funkci tohoto transportéru vzniká onemocnění známé jako Dubin-Johnsonův syndrom (hyperbilirubinémie; Paulusma *et al.*, 1996). ABCC2 transportuje chemoterapeutika jako například vinkristin, vinblastin, doxorubicin nebo etopsid (Cui *et al.*, 1999). ABCC3 transportér se nachází v játrech, střevě, ledvinách a přenáší žlučové kyseliny nebo konjugáty s glukuronidem, sulfátem, GSH do krve (Konig *et al.*, 1999). Z léčiv transportuje

například metothrexát nebo etopsid (Kool *et al.*, 1999). ABCC6 je exprimován v játrech a ledvinách a z chemoterapeutik přenáší například doxorubicin, daunorubicin nebo etopsid (Belinsky *et al.*, 2002). ABCC10 transportuje léčiva jako jsou například vinkristin, vinblastin nebo některé taxany (Hopper-Borge *et al.*, 2004). Zvláštní postavení v ABCC podrodině má atypický transportér ABCC7 [cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR); Tabcharani *et al.*, 1991], který nepřenáší substráty, ale tvoří iontový kanál pro chloridové ionty. Při nesprávné funkci tohoto transportéru vzniká autosomálně recesivní onemocnění známé jako cystická fibróza (Quinton, 1999).

ABCG podrodina

Významným členem této podrodiny stojícím za vznikem MDR je tzv. „poloviční“ transportér ABCG2 (struktura je uvedena na obr. č. 17c). ABCG2 se nachází stejně jako ABCB1 na apikální membráně epitelálních buněk a bývá přirozeně exprimován v hematopoetických kmenových buňkách, hematoencefalické bariéře, plicích, játrech, ledvinách, nadledvinkách, prsní tkáni, placentě, prostatě a v gastrointestinálním traktu (Doyle *et al.*, 1998; Maliepaard *et al.*, 2001). Fyziologickými substráty jsou lipidy, steroidní hormony nebo oligopeptidy (Sarkadi *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2012). Spektrum přenášených chemoterapeutik je blízké transportéru ABCB1 [například antracykliny, mitoxantron, etopsid, topotekan, TKIs (Ozvegy-Laczka *et al.*, 2005)]. Dalšími látkami, které ABCG2 transportuje jsou například fluorescenční barviva (Hoechst 33342, rhodamin 123), antibiotika (norfloxacin) nebo přírodní látky (kurkuminoidy; Sarkadi *et al.*, 2004-Litman *et al.*, 2001). Zvýšená exprese tohoto transportéru byla zjištěna u různých typů leukémií (Ross *et al.*, 2000), nádoru prsu (Robey *et al.*, 2007), vaječníků (Maliepaard *et al.*, 1999), tlustého střeva (et *al.*, 1999), žaludku (Stein *et al.*, 2002) a plic (Kawabata *et al.*, 2001).



Obrázek č. 17: Struktura ABC transportérů stojících za vznikem MDR. a) ABCB1 se skládá ze dvou TMDs a dvou cytoplasmatických NBDs; N-konec i C-konec se nachází v cytoplasmě. b) Struktura ABCC1 je podobná s ABCB1, jen obsahuje navíc pět transmembránových šroubovic přidaných na N-konci jedné TMD; N-konec vyčnívá do extracelulárního prostoru, C-konec se nachází v cytoplasmě. c) ABCG2 je tzv. „poloviční“ transportér skládající se z jedné TMD a jedné NBD; N-konec i C-konec se nachází v cytoplasmě (upraveno podle Gottesman *et al.*, 2002).

2.3.1.5 Inhibitory ABC transportérů

Jedna z možností jak vyřešit problém s MDR, která je způsobena ABC transportéry, je využití inhibitorů ABC transportérů, kterými se omezí nadměrný transport chemoterapeutik ven z buněk.

Inhibitory ABCB1 se dělí do tří generací. První generace zahrnuje cyklosporin A a verapamil (Tsuruo *et al.*, 1981; Slater *et al.*, 1986). Problémem byla jejich nízká specifita, relativně nízká účinnost a v dávkách potřebných pro inhibici byly toxické. Fungovaly na principu kompetitivní inhibice. Inhibitory druhé generace vykazovaly vyšší účinnost při nižších dávkách, ovšem problémem byla stále jejich nespecifičnost (Twentyman *et al.*, 1991). Druhá generace obsahovala ve většině případů analogy látek z první generace. Příkladem je valsopodar (analog cyklosporinu A), který má až 10x vyšší účinnost než cyklosporin. Dalším inhibitorem této generace je například biricodar. Inhibice funguje na principu kompetice. Do třetí generace

inhibitorů patří zosuquidar (Dantzig *et al.*, 1996), tariquidar (Roe *et al.*, 1999), elacridar (Hyafil *et al.*, 1993) a dofequidar (Naito *et al.*, 2002). Tyto inhibitory vykazují nízkou toxicitu, vysokou specifitu a vysokou účinnost vůči ABCB1. Fungují na principu nekompetitivní inhibice.

Negativní vlastností všech inhibitorů je, že blokují ABCB1 i v jiných tkáních, kde je tento transportér potřebný pro eliminaci chemoterapeutik, která jsou pacientovi podávána zároveň s inhibitory. Důsledkem může být zvýšená cytotoxicita samotného chemoterapeutika nebo doprovodných léčiv (Ling, 1997).

V roce 1995 byl poprvé objeven inhibitor transportéru ABCG2 nazývaný fumitremorgin C (Gekeler *et al.*, 1995). Bohužel u něj byla prokázána neurotoxicita (Rabindran *et al.*, 2000). Dalším inhibitorem byl Ko143 (analog fumitremorginu; Allen *et al.*, 2002) a PZ-39 (Peng *et al.*, 2009). PZ-39 se váže na ABCG2 a způsobuje jeho endocytózu a následnou degradaci v lysozomu. Později byly objeveny látky s inhibičním účinkem jako například TKIs (Houghton *et al.*, 2004; Ozvegy-Laczka *et al.*, 2004), flavonoidy (resveratrol; Cooray *et al.*, 2004) nebo pantoprazol. Bylo prokázáno, že mnoho inhibitorů ABCB1 jsou společné s inhibitory ABCG2. Příkladem je elacridar (Bruin *et al.*, 1999), reserpin (Wierdl *et al.*, 2003), cyklosporin A (Qadir *et al.*, 2005), dofequidar, tariquidar (Robey *et al.*, 2004), biricodar (Germann *et al.*, 1997) a kurkumin (Zhang *et al.*, 2014).

Mezi inhibitory ABCC1 patří například biricodar, flavonoidy, GSH deriváty a analogy raloxifenu (Boumendjel *et al.*, 2005).

Můžeme vidět, že některé inhibitory jsou zároveň substráty příslušných transportérů [například TKIs (Hegedüs *et al.*, 2002) nebo kurkumin (Sharom, 2008; Zhang *et al.*, 2014)]. Při podání vyšších koncentrací těchto látek byly prokázány jejich inhibiční účinky. Některé inhibitory působí proti všem třem ABC transportérům stojících za vznikem MDR. To může být výhodou při léčbě pacientů. Bohužel ne všechny inhibitory mohou být použity v klinické praxi.

Dalšími možnostmi inhibice ABC transportérů je využití monoklonálních protilátek, které se váží na lidský ABCB1 a znemožňují transport substrátů (Mechetner *et al.*, 1992). Studuje se také technologie malých interferujících RNA (small interfering RNA, siRNA; ovlivňují expresi genů), která snižuje expresi *abcb1* genu (Widmer *et al.*, 2007), nebo regulace transkripčních faktorů, které inhibují ABCB1 (Jin *et al.*, 2000). U těchto přístupů stále chybí klinické studie k tomu, aby mohlo dojít k jejich terapeutickému využití.

2.3.1.6 Kolaterální senzitivita

Kolaterální senzitivita je efekt, který by mohl pomoci pro léčbu pacientů s MDR, která je způsobena ABC transportéry. Významným průlomem bylo zjištění, že některé látky jsou více cytotoxické u buněk exprimujících ABCB1 než u buněk, které ho neexprimují (Bech-Hansen *et al.*, 1976). Princip zvýšené cytotoxicity látek na buňky exprimující ABCB1 zatím nejsou zcela objasněny. Negativní vlastností těchto látek je opět blokáce ABCB1 i v jiných tkáních, kde je tento transportér potřebný pro eliminaci chemoterapeutik, která jsou pacientovi sekundárně podávána (Hall *et al.*, 2009; Pluchino *et al.*, 2012; Gauthier *et al.*, 2013).

3. Cíle práce

- Vypracovat rešerši pojednávající o přírodních a syntetických kurkuminech.
- Zjistit, zda thioly (NAC, GSH) modulují cytotoxický účinek látky EF24.
- Zjistit, zda EF24 způsobuje oxidativní stres a depleci GSH u buněk chronické myeloidní leukémie.
- Zjistit, zda adukty EF24 s thioly (NAC, GSH) mají podobné cytotoxické účinky jako samotný EF24.
- Zjistit, zda EF24 zvyšuje expresi „receptorů smrti“ u buněk chronické myeloidní leukémie.
- Analýza exprese vybraných inhibitorů apoptosy.
- Zjistit, zda exprese ABCG2 ovlivňuje citlivost leukemických buněk k EF24.

4. Materiál a metodika

4.1 Buněčné linie

Buněčná linie K562

Buněčná linie K562 je charakteristická výskytem tzv. Filadelfského chromosomu, který kóduje fúzní BCR-ABL tyrosinkinasu zodpovědnou za maligní transformaci buněk (Sawyer, 1999). Tato buněčná linie byla získána z ECACC (European Collection of Cell Cultures, Velká Británie).

Buněčná linie K562/ABCG2

Buněčná linie K562/ABCG2 je odvozená z mateřské buněčné linie K562 za použití retrovirové transdukce, přičemž vektor nesl „wild-type“ alelu ABCG2 transportéru (Elkind *et al.*, 2005). Tato buněčná linie byla laskavě poskytnuta naší laboratoři profesorem B. Sarkadim (National Blood Center and Semmelweis University, Budapest, Hungary).

Kultivace buněčných linií probíhala v RPMI 1640 médiu s 10% obsahem fetálního hovězího séra a s přidavkem streptomycinu a penicilinu v koncentracích 0,1 mg/ml. Kultivace byla prováděna v kultivačních lahvích v inkubátoru (37°C, 5% obsah CO₂).

4.2 Použité chemikálie a roztoky

1x phosphate buffered saline (PBS): 130 mmol/l NaCl; 10 mmol/l NaH₂PO₄; 2,7 mmol/l KCl; 1,8 mmol/l KH₂PO₄; pH 7,4

EF24 (3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on): Sigma-Aldrich, USA

NAC: Sigma-Aldrich, USA

GSH: Sigma-Aldrich, USA

KO143: Sigma-Aldrich, USA

Katalasa: Sigma-Aldrich, USA

4.3 Použité přístroje

CelCulture inkubátor (ESCO, USA)

BioVortex V1 vortex (BioSan, Lotyšsko)

BOEco M-240 centrifuga (BioTech, Německo)

HERMLE Z 326 K centrifuga (LaborTechnik, Německo)

Vi-CELL™XR analyzátor počtu buněk a buněčné viability (Beckman Coulter, USA)

MSC-Advantage	laminární box (ThermoScientific, USA)
GENios Plus	spektrofotometr (Tecan, Rakousko)
Cytomics fc 500	průtokový cytometr (Beckman Coulter, USA)
XDS-3FL	fluorescenční mikroskop s kamerou (OPTIKA, USA)
Bio-TDB 100	termoblok (BioSan, Lotyšsko)
OS-10	třepačka (BioSan, Lotyšsko)
MiniProtean-3 cell	aparatura pro elektroforetickou separaci (BioRad, USA)
TransBlot SD	aparatura pro western blotting (BioRad, USA)
PowerPac HC	zdroj elektrického napětí (BioRad, USA)
API 3200	hmotnostní detektor s trojitým kvadrupólem (MDS SCIEX, Ontario, Kanada)

4.4 Stanovení buněčné proliferace a viability

Ke stanovení buněčné proliferace a viability byl použit tzv. MTT test (Mosmann, 1983). Tento test využívá redukci tetrazoliové soli [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid; MTT] metabolicky aktivními buňkami pomocí produktů dehydrogenas na nerozpustný fialový formazán, který se pak z buněk extrahuje okyseleným ethanolem. Množství vzniklého formazánu odpovídá počtu živých buněk. Vyhodnocení se provádí spektrofotometricky při 570 nm.

K 1 ml buněčné suspenze se přidá 100 µl MTT a inkubace probíhá 1 hod v inkubátoru při 37° C. Buňky se sedimentují centrifugací (5 min, 3000 ot./min, laboratorní teplota). Vzniklý sediment buněk se extrahuje okyseleným ethanolem. Roztok obsahující formazán se pročistí centrifugací (5 min, 14 000 ot./min, laboratorní teplota). Množství vzniklého formazánu se vyhodnocuje spektrofotometricky při 570 nm. Absorbance neovlivněných buněk odpovídá 100 %.

Použité roztoky a chemikálie:

MTT roztok: 5 mg/ml 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
96% (v/v) ethanol s 0,04M HCl

4.5 Stanovení počtu živých a mrtvých buněk

Počty živých a mrtvých buněk určuje přístroj Vi-CELL™XR. Počty buněk jsou stanoveny pomocí kamery a odpovídajícího softwaru pro analýzu obrazu. Pro rozlišení živých a mrtvých buněk se využívá barvení pomocí trypanové modři. Trypanová modř je látka, která se dostává jen do buněk s porušenou

cytoplasmatickou membránou, které se tímto obarví. K měření se používá 600 μ l buněčné suspenze, u které přístroj určí počet buněk v mililitru média a vyhodnotí viabilitu v procentech.

Použité roztoky a chemikálie:

Trypanová modř: Sigma-Aldrich, USA

4.6 Určení počtu apoptotických buněk

Počet apoptotických buněk se stanovuje podle změny morfologie jader. Apoptotické buňky zmenšují svůj objem, dochází u nich ke kondenzaci cytoplazmy a jádra a následné fragmentaci chromatinu. Buňka vytváří apoptotická tělíška, která mohou být následně pohlcena ostatními buňkami. Jádra je možné obarvit fluorescenčními látkami (například propidium jodidem), která se váží na DNA a mohou být pozorována pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Fixace buněk: 1 ml buněčné suspenze se sedimentuje centrifugací (5 min, 2500 ot./min, laboratorní teplota) a ke vzniklému sedimentu se přidá 500 μ l fixačního roztoku.

Barvení buněk: 200 μ l fixovaných buněk se sedimentuje centrifugací (5 min, 2400 ot./min, laboratorní teplota). Sediment se rozsuspenduje přidávkem barvicího roztoku (25-50 μ l). Morfologie jader se pozoruje pomocí fluorescenčního mikroskopu a počítají se počty buněk s fragmentovaným chromatinem z celkového počtu 200-300 buněk.

Použité roztoky a chemikálie:

Fixační roztok: 1x PBS : 96% (v/v) ethanol v poměru 3:7

Barvicí roztok: 70 % (v/v) 1x PBS; 30 % (w/v) glycerinu; 1 μ g/ml propidium jodidu (Invitrogen, USA)

4.7 Buněčný cyklus

Fluorescenční barviva, která tvoří stechiometricky komplexy s DNA, lze využít k určení obsahu DNA (například propidium jodid, ethidium bromid nebo DAPI). Tento postup lze využít k určení fází buněčného cyklu a k odhadnutí počtu apoptotických buněk. Obsah DNA se v jednotlivých fázích buněčného cyklu mění. Buňky v G1 fázi mají diploidní počet chromosomů (2n), v S fázi se počet chromosomů zdvojnásobuje a v G2/M fázi je počet chromosomů v buňce tetraploidní (4n). Apoptotické buňky mají výrazně snížený obsah DNA v důsledku degradace DNA a jejího uvolnění do

okolního prostředí (hypodiploidní buňky). Obsah DNA lze měřit pomocí průtokového cytometru.

1 ml buněčné suspenze se sedimentuje centrifugací (5 min, 2400 ot./min, laboratorní teplota). Vzniklý sediment se rozsuspenduje v 500 µl Vindalova roztoku a inkubace probíhá 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Následně se vzorek analyzuje průtokovým cytometrem při 488/525 nm. Výsledný histogram znázorňuje relativní zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, případně i počty apoptotických (hypodiploidních) buněk.

Použité roztoky a chemikálie:

Vindalův roztok: 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Serva, Německo); 200 µg/ml RNasa A; 20 µg/ml propidium jodid (Invitrogen, USA); 1x PBS

4.8 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Metoda Bradfordové využívá barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250, které se stechiometricky váže na molekulu proteinu. Intenzita výsledného modrého zabarvení odpovídající množství proteinů se detekuje pomocí spektrofotometru při 595 nm.

K 1 ml činidla Bradfordové se přidá 1 µl přečištěného buněčného extraktu. Směs se inkubuje 10 min při laboratorní teplotě. Vzniklé zabarvení se vyhodnocuje na spektrofotometru při 595 nm. Kalibrace se provádí pomocí hovězího sérového albuminu.

Použité roztoky a chemikálie:

Činidlo Bradfordové (1 l): 50 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml methanolu; 100 ml 85% H₃PO₄; 850 ml deionizované vody

Hovězí sérový albumin jako standard

4.9 Detekce aktivity kaspasy-3/7

Při apoptose hrají hlavní úlohu cysteinové proteasy nazývané kaspasy, které stojí za proteolytickým rozkladem buněk. Klíčovou molekulou je kaspasa-3, jejíž aktivitu lze sledovat pomocí hydrolýzy fluorescenčně značeného substrátu Ac-DEVD-AMC. Množství uvolněného AMC odpovídá aktivitě kaspasy-3/7.

- **Buněčná extrakce**

Přibližně 3x10⁶ buněk se sedimentuje centrifugací (5 min, 1500 ot./min, 4°C) a sediment se promyje vychlazeným 1x PBS. K promytému sedimentu buněk se přidá 100 µl extrakčního roztoku. Buňky se extrahují 30 min na ledu za občasného

promíchání. Buněčný lyzát je přečištěn centrifugací (10 min, 18 000 ot./min, 4°C). V extraktu se stanoví množství proteinů pomocí metody Bradfordové. Buněčný extrakt se buď zamrazí nebo se přímo použije pro stanovení aktivity kaspasy-3/7.

- **Analýza aktivity kaspasy-3/7**

Do mikrotitrační desky se napipetuje pufr pro měření kaspasové aktivity. Přidá se buněčný extrakt obsahující 50 µg proteinu a substrát do výsledné koncentrace 50 µmol/l, čímž je zahájena reakce. Každý vzorek se měří dvakrát. Jednou pouze se substrátem a podruhé se substrátem a inhibítorem (do výsledné koncentrace 1 µmol/l), který je nutný pro přesné určení aktivity kaspasy-3/7, kvůli odhalení štěpení substrátu nescifickými proteasami. Fluorescence vzorků se měří v určitých časech na spektrofotometru při vlnové délce 360/465 nm. Od naměřených hodnot aktivit (vzorek pouze se substrátem) je odečtena hodnota vzorku s přidaným inhibítorem. Rozdíl těchto hodnot je skutečná aktivita kaspasy-3/7.

Použité roztoky a chemikálie:

Pufr pro měření kaspasové aktivity: 25 mmol/l HEPES; 5 mmol/l dithiotreitol; 2 mmol/l EGTA; 2 mmol/l MgCl₂; pH 7,2

Extrakční roztok: 50 mmol/l HEPES; 5 mmol/l dithiotreitol; 0,5% Triton X-100; koktejl inhibitorů proteas (Roche); pH 7,2

Substrát: acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl kumarin (Ac-DEVD-AMC)

Inhibitor: N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO

4.10 Stanovení intracelulární hladiny léčiva

Buněčná suspenze se inkubuje se studovanou látkou 3-5 hod, poté se nanese na vrstvu silikonového oleje a sedimentuje se centrifugací (15 min, 5 000 ot./min, laboratorní teplota). Tím dojde k rychlému oddělení buněk od růstového média. Po odsátí a vysušení veškerého média a většiny oleje, se přidá příslušné množství extrakčního činidla a inkubuje se 10 min na ledu. Poté se vzorky sedimentují centrifugací (10 min, 18 000 ot./min, 4° C) a k měření na LC-MS/MS se odebere čistý buněčný extrakt obsahující studované látky.

Použité roztoky a chemikálie:

Silikonové oleje: 1,03 g/ml; Sigma-Aldrich

Extrakční činidlo pro látku EF24: 500 µl 5% kyseliny mravenčí (w/v)

4.11 Stanovení extracelulární koncentrace léčiva v růstovém médiu

Stanovení extracelulární hladiny EF24 v plnohodnotném růstovém médiu se sledovalo u látky EF24 samotné a v kombinaci s NAC nebo GSH. V daných časech se z reakční směsi odebíralo 100 µl, ke kterým se přidalo 500 µl okyseleného roztoku (pro zastavení reakce). Vzorky se následně přečistily centrifugací (10 min, 18 000 ot./min, 4°C) a analyzovaly na LC-MS/MS.

4.12 Měření oxidativního stresu buněk

Buňky jsou chráněny proti oxidativnímu stresu antioxidantními enzymy a antioxidanty (například GSH; Cadenas, 1997). Důvodem vzniku oxidativního stresu bývá obvykle zvýšená produkce ROS v důsledku chemické reakce, snížené produkce antioxidantů nebo inhibice antioxidantních enzymů. Zvýšená produkce ROS může vést k různým změnám v buňce a většinou vede k poškození membrán mitochondrií (ROS poškozují lipidy) a k následné indukci buněčné smrti (apoptosy; Kovacic *et al.*, 2005). Pro přímé měření oxidativního stresu buněk se využívá tzv. fluorescenčních sond, což jsou speciální sloučeniny, které se až po modifikaci a oxidaci v buňce mění ve fluorescenční barviva. Příkladem je 2',7'-dichlorofluorescein diacetát (DCHF-DA), což je ester fluoresceinu, který je nepolární a proto se jednoduše dostává přes buněčné membrány. V buňce existují enzymy zvané esterasy, které DCHF-DA hydrolyzují na DCHF (odstraňují diacetát). V přítomnosti ROS je DCHF oxidován a mění se ve fluorescenční látku (LeBel *et al.*, 1992). Produkci ROS je pak možné monitorovat buď pomocí fluorescenční mikroskopie, nebo pomocí průtokového cytometru. K 1 ml buněčné suspenze se přidá DCHF-DA a inkubace probíhá 30 min při 37° C. Množství oxidovaného DCHF je stanoveno pomocí průtokové cytometrie při 488/525 nm.

Použité roztoky a chemikálie:

Fluorescenční barva: 2',7'-dichlorofluorescein diacetát (Sigma-Aldrich)

4.13 Stanovení intracelulárního obsahu redukováného glutathionu

GSH je důležitá látka, která má silné antioxidantní vlastnosti, podílí se významně na redox-homeostázi buněk a má detoxikační vlastnosti (váže různá xenobiotika a konjugát s GSH je následně eliminován z těla ven; Pastore *et al.*, 2001).

Buněčná suspenze byla zpracována podobně jako u stanovení intracelulární hladiny léčiva (viz 4.10). Jako extrakční činidlo bylo použito 500 µl 5% kyseliny

mravenčí (w/v).

Použité roztoky a chemikálie:

Silikonové oleje: 1,03 g/ml; Sigma-Aldrich

Extrakční činidlo GSH: 500 µl 5% kyseliny mravenčí (w/v)

4.14 Analýza exprese TRAIL-R2 a FAS receptoru

„Receptory smrti“ TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-R2 (TRAIL-R2) a FAS aktivují kaspasové proteasy prostřednictvím tzv. „vnější apoptotické dráhy“. Nádorové buňky ze začátku tyto receptory exprimují ve vysoké míře. Imunitní systém tyto buňky rozpozná a pomocí „ligandů smrti“ u nich navodí apoptosu. Až časem dochází u nádorových buněk ke změnám signálních drah regulujících buněčnou smrt (mutace, snížená exprese receptorů) a buňky začínají unikat imunitnímu systému. Nádorové buňky dokáží například zvýšit expresi tzv. „decoy“ receptorů, které vycytávají „ligandy smrti“ bez iniciace apoptotické dráhy (Ashkenazi *et* Dixit, 1999). Některé látky jsou schopné u nádorových buněk indukovat zvýšenou expresi „receptorů smrti“ a tím u nich navodit apoptosu. Analýza exprese „receptorů smrti“ TRAIL-R2 a FAS se provádí pomocí fluorescenčně značených protilátek, které jsou specifické pro extracelulární doménu receptoru. Měření se provádí na průtokovém cytometru při 488/525 nm.

Buněčná suspenze se sedimentuje centrifugací (5 min, 2400 ot./min, laboratorní teplota) a rozsuspenduje se do vysoké hustoty (cca 2×10^6 buněk/ml). K 50 µl koncentrované suspenze buněk se přidá fluorescenčně značená protilátka proti danému receptoru. Suspenze se inkubuje za stálého míchání 1 hod při 4° C. Poté se vzorek promyje 1x PBS a opět se sedimentuje centrifugací (5 min, 2400 ot./min, laboratorní teplota). K peletu se přidá 500 µl nového 1x PBS. Množství navázané protilátky odpovídající expresi receptoru je měřeno pomocí průtokové cytometrie. Použije se isotypová kontrola podle doporučení prodejce (nespecifická fluorescenčně protilátka).

Použité roztoky a chemikálie:

Protilátka proti receptoru TRAIL-R2: Monoclonal Antibody to CD262/TRAIL-R2 fluorescein conjugated; 1F-461-C100

Protilátka proti receptoru FAS: Monoclonal Antibody to CD95/FAS fluorescein conjugated; 1F-362-T100

4.15 Stanovení exprese proteinů survivin a XIAP pomocí metody western blotting

Survivin a XIAP patří do rodiny proteinů inhibitorů apoptosy (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs; Crook *et al.*, 1993). IAPs inhibují kaspasy a působí pouze na kaspasu-9, kaspasu-7 a kaspasu-3. Jsou inaktivovány faktory z mezimembránového prostoru mitochondrií - Smac/Diablo a Omi/HtrA2. U člověka bylo popsáno osm členů rodiny IAPs: Apollon/BRUCE, cIAP-1, cIAP-2, IAP-like protein-2 (ILP-2), Livin, Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), survivin a XIAP (Obexer *et al.*, 2014). Nádorové buňky mohou mít expresi IAPs zvýšenou, čímž je u nich potlačena indukce apoptosy. Survivin je exprimovaný pouze v nádorových buňkách popřípadě v embryonálních buňkách (Sah *et al.*, 2006). XIAP je silný inhibitor kaspasy-9 a kaspasy-3/7 a současně je popsán jeho funkční vztah k NF- κ B (Galbán *et al.*, 2010; Deveraux *et al.*, 1997). IAPs mohou být některými látkami inhibovány, čímž je zvýšena citlivost nádorových buněk k apoptotickým signálům (Almagro *et al.*, 2012).

- Buněčná extrakce

3 x 10⁶ buněk se sedimentuje centrifugací (5 min, 1500 ot./min, 4°C) a sediment se promyje vychlazeným 1x PBS. K promytému sedimentu buněk se přidá 100 μ l extrakčního RIPA pufru. Buňky se extrahují 30 min na ledu za občasného promíchání. Buněčný lyzát je přečištěn centrifugací (10 min, 18 000 ot./min, 4°C). V extraktu se stanoví množství proteinů pomocí metody Bradfordové. Vzorky se zamrazí nebo se přímo použijí pro SDS-PAGE.

- Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Vzorky se naředí vodou do výsledné koncentrace 5 μ g/ μ l a denaturují se v přítomnosti Laemmliho pufru (95° C, 5 min).

- Vzorky nanášíme na 10% akrylamidový gel a provede se elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE; 80 V/120 V).

- Separované proteiny se přenáší z gelu na membránu (semi-dry western blotting; 0,15 A na jednu membránu; 30 min). Membrána se blokuje 1 hod v 5% blokovacím mléce. Nanese se primární protilátka naředěná v mléce na koncentraci doporučenou výrobcem (inkubace přes noc při 4° C). Membrána se promývá v 1x PBS + 0,1% TWEEN20. Nanese se sekundární protilátka, která je konjugovaná s příslušným enzymem (opět se ředí v mléce do výsledné koncentrace doporučené výrobcem;

inkubace 1 hod při laboratorní teplotě). K promyté membráně se ve fotokomoře přidá ECL kit obsahující substrát pro enzym navázaný na sekundární protilátce. Díky vznikající chemiluminiscenci lze pozorovat na fotografickém filmu černé proužky, které odpovídají jednotlivým proteinům (GE HealthCare). Film se naskenuje do počítače a intenzita jednotlivých proužků se vyhodnotí příslušným programem.

Použité roztoky a chemikálie:

RIPA pufr: 150 mM NaCl; 1% NP-40 pufr; 50mM TRIS; 50mM NaF; 5mM EDTA; 5mM pyrofosfát sodný dekahydrát (NAPP); dH₂O + koktejl inhibitorů proteas + fosfatas (Roche); pH 8

Nanášecí Laemliho pufr (6x): 12% SDS; 0,3M TRIS (pH 8,9); 0,3% bromfenolová modř; 60% glycerol; 0,75M dithiotreitol (DTT)

Standard molekulových hmotností: Spectra Multicolor (Thermo Scientific)

Elektrodový pufr (1 l): 100 ml Running pufr 10x; 100 ml 10% SDS; 900 ml dH₂O

10x Running pufr (1 l): 30 g TRIS; 145 g glycinu; 1 l dH₂O

Transfer pufr (1 l): 100 ml Running pufru; 200 ml methanolu; 700 ml dH₂O

5% blokovací mléko (100 ml): 5 g sušeného mléka (bez tuku); 100 ml 1x PBS + 0,1% TWEEN20

1x PBS + 0,1% TWEEN20 (1 l): 100 ml 10x PBS; 1 ml TWEEN20; 900 ml dH₂O

Primární protilátka: Survivin (71G4B7) Rabbit mAb; XIAP (D228W) Rabbit mAb; Cell Signaling Technology

Sekundární protilátka: Polyclonal Swine antiRabbit immunoglobulins/HRP (horseradish peroxidase; Dako)

ECL kit: GE HealthCare (UK)

Vývojka: G354 (AGFA)

Ustalovač: G150 (AGFA)

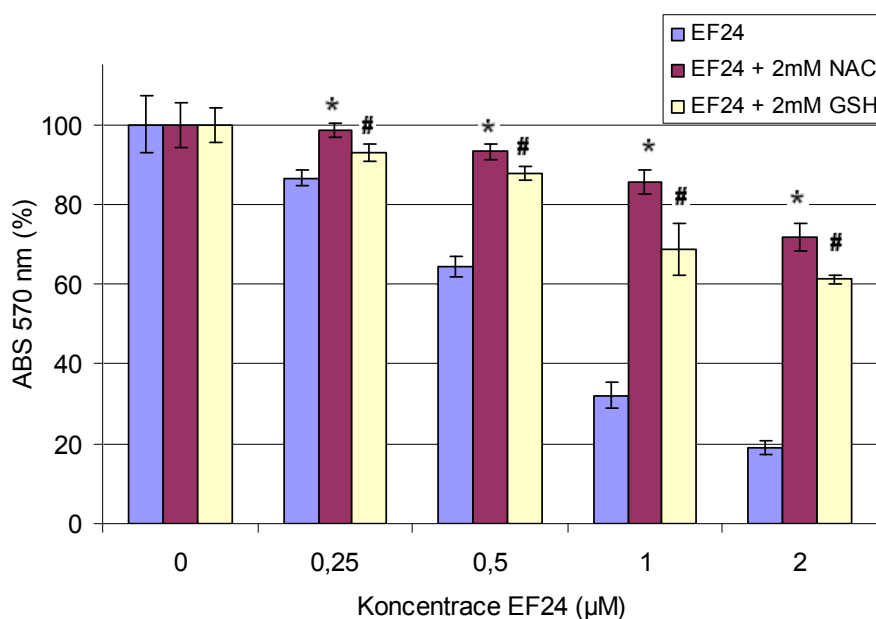
5. Výsledky

5.1 Vliv thiolů na cytotoxické účinky látky EF24

Předcházející výsledky z naší laboratoře ukázaly, že EF24 inhibuje proliferaci a indukuje buněčnou smrt s morfologickými a biochemickými znaky apoptosy u buněk K562 (Skoupá, bakalářská práce, 2014). Nedávné výsledky ukázaly, že molekula EF24 může tvořit adukty s thioley Michaelovou adicí (např. s GSH) a že tyto adukty mají stejné cytotoxické účinky jako samotná látka EF24 u buněk MDA-MB-435 *in vitro* (Sun *et al.*, 2009). Protože je tento výsledek poněkud překvapivý, tak jsme se rozhodli zjistit, zda podobný efekt lze pozorovat i u buněk K562.

- Vliv thiolů na proliferaci a viabilitu buněk ovlivněných EF24

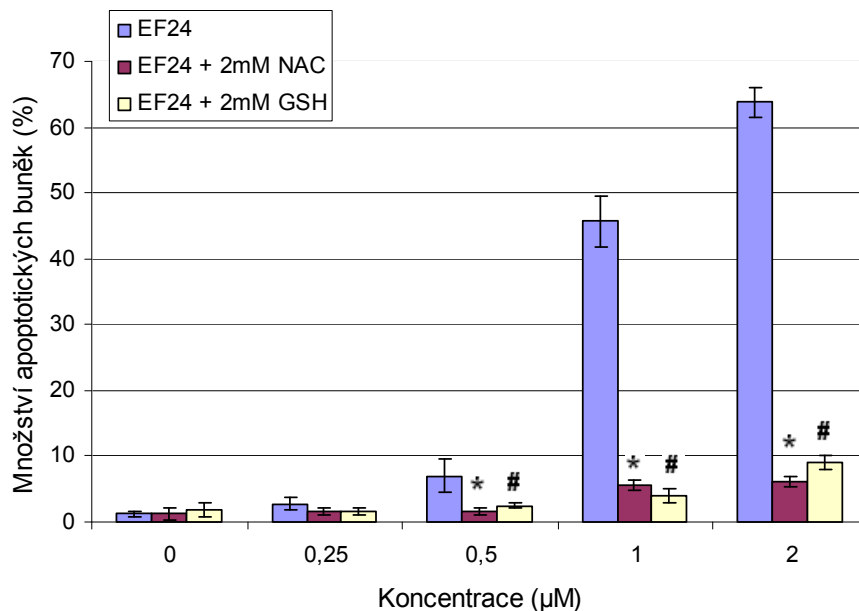
Buňky K562 byly vystaveny působení látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH po dobu 24 hod. Měření pomocí MTT testu ukázalo signifikantní protektivní účinek jak po působení NAC, tak po působení GSH (viz obr. č. 18).



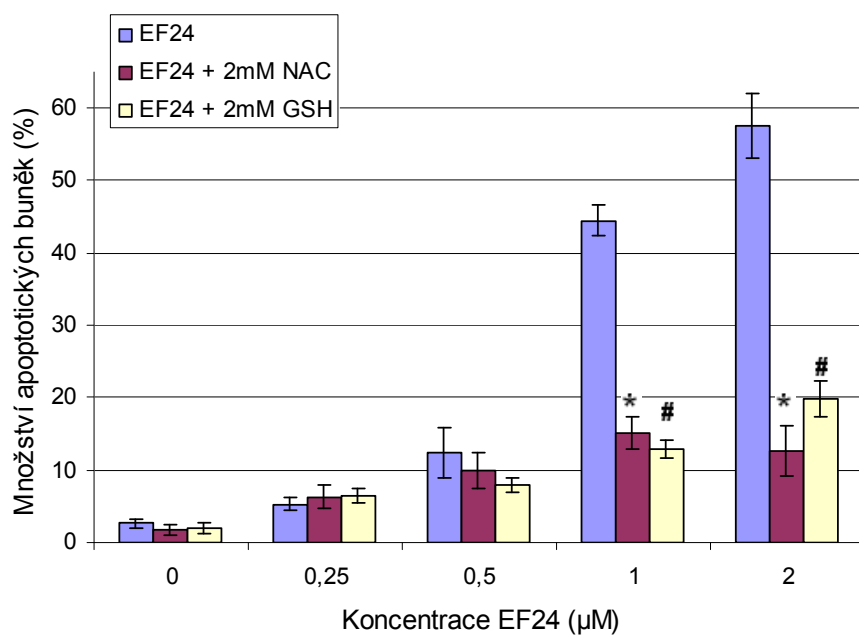
Obr. č. 18: Vliv NAC a GSH na proliferaci a viabilitu K562 buněk inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC (P<0,05); #... statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM GSH (P<0,05).

- Vliv thiolů na indukci apoptosu u buněk ovlivněných EF24

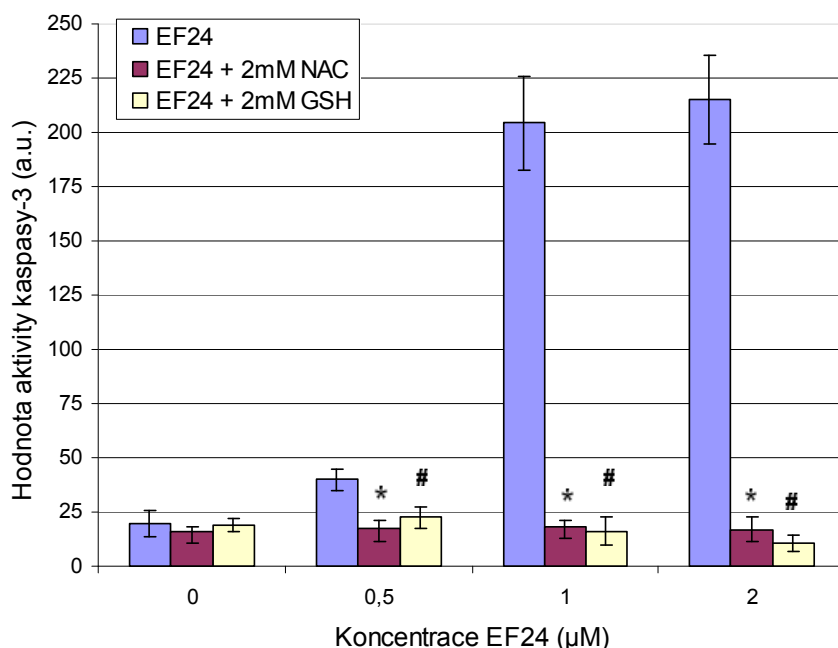
Buňky K562 byly vystaveny působení látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH po dobu 24hod. Následně byla provedena analýza morfologických a biochemických změn, které doprovází apoptosu. Morfologická analýza jader ukázala, že počty apoptotických buněk po působení kombinace látky EF24 s 2mM NAC nebo 2mM GSH se výrazně snížily (viz obr. č. 19). Analýza obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie rovněž potvrdila signifikantně snížený počet hypodiploidních buněk po působení látky EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (viz obr. č. 20). Také měření enzymové aktivity kaspasy-3/7 ukazuje, že buňky po působení látky EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH vykazují nízkou aktivitu kaspasy-3/7. Naopak buňky po působení samotné látky EF24 vykazují výrazné zvýšení aktivity kaspasy-3/7 (viz obr. č. 21).



Obr. č. 19: Vliv NAC a GSH na morfologii jader buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC ($P < 0,05$); #... statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM GSH ($P < 0,05$).



Obr. č. 20: Vliv NAC a GSH na výskyt hypodiploidních buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC ($P < 0,05$); #... statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM GSH ($P < 0,05$).



Obr. č. 21: Vliv NAC a GSH na aktivitu kaspasy-3/7 u buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (17 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC ($P < 0,05$); #... statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM GSH ($P < 0,05$).

Výše uvedené výsledky ukazují, že NAC i GSH mají protektivní účinek na buňky K562 ovlivněné látkou EF24. Na základě těchto výsledků nicméně nelze předpokládat, že adukty vzniklé mezi EF24 a NAC nebo GSH mají stejné cytotoxické účinky jako samotné EF24. V další části práce jsme se zaměřili na mechanismus této protekce a na cytotoxické vlastnosti aduktů EF24 s thioley, zejména na cytotoxické vlastnosti mono-aduktu EF24-NAC.

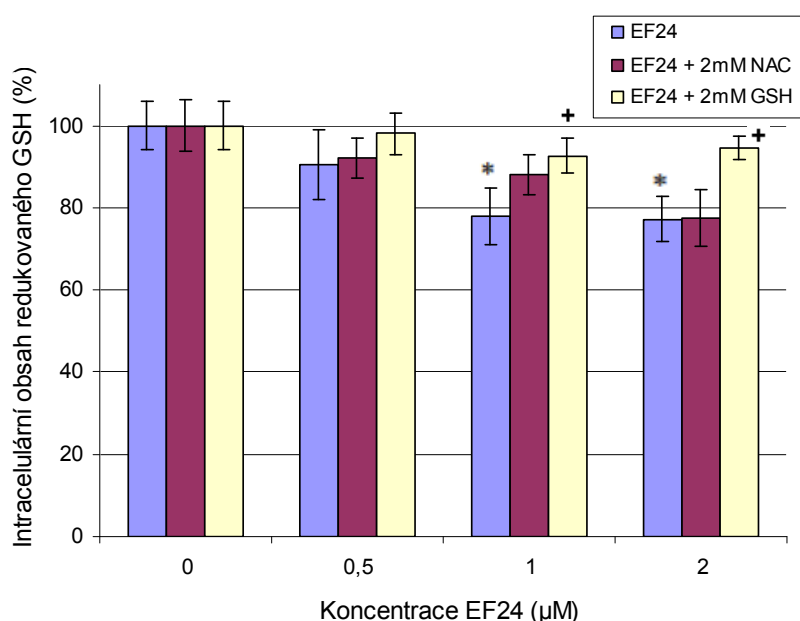
5.2 Analýza oxidativního stresu po působení látky EF24

Buňky jsou chráněny proti oxidativnímu stresu antioxidantními enzymy a antioxidanty (například GSH). Oxidativní stres se obvykle manifestuje zvýšenou produkcí ROS v důsledku chemické reakce, snížené produkce antioxidantů nebo inhibice antioxidantních enzymů. Zvýšená produkce ROS může vést k indukci buněčné smrti.

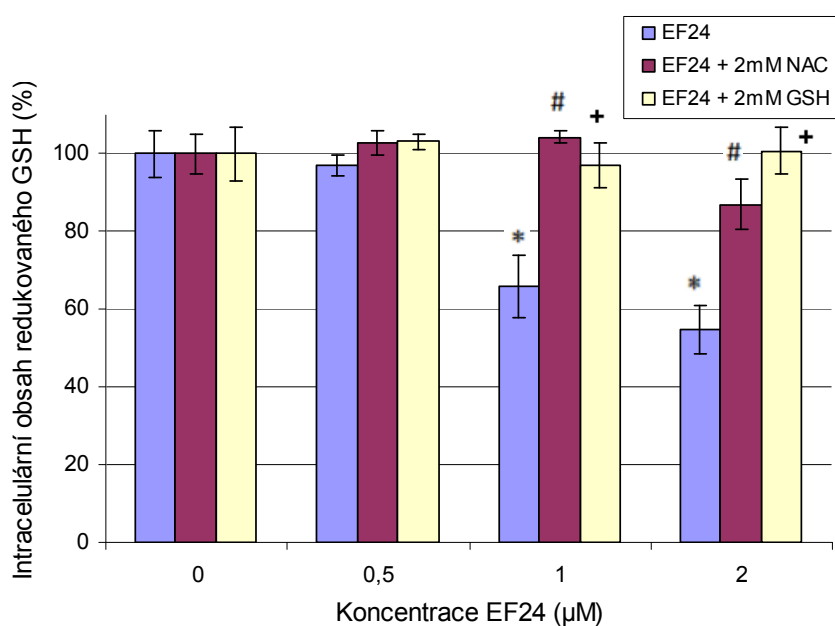
- Vliv thiolů na intracelulární hladinu GSH u buněk ovlivněných EF24

Nejdříve bylo sledováno, zda samotné EF24 ovlivňuje intracelulární hladinu redukovaného GSH u buněk K562. Podle předpokladů se ukázalo, že EF24 od koncentrace 1 μ M způsobuje signifikantní snížení GSH (po 3 i 6 hod; viz obr. č. 22). Následně byl zkoumán vliv extracelulárního NAC a GSH na intracelulární hladinu GSH. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti zvyšující se koncentrace EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH. Z obr. č. 22 je zřejmé, že NAC i GSH mají protektivní účinky a inhibují snižování intracelulární hladiny GSH v porovnání s působením samotné látky EF24.

a)



b)



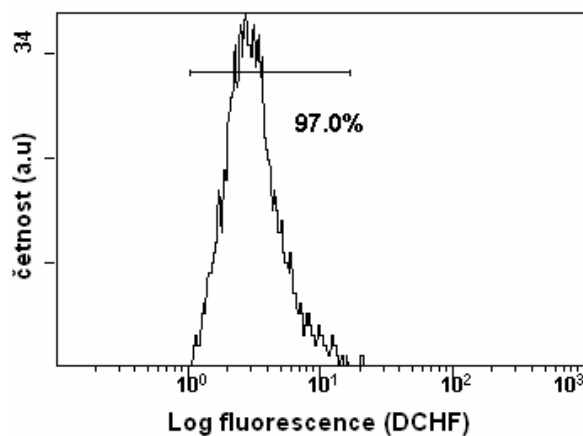
Obr. č. 22: Vliv NAC a GSH na intracelulární obsah redukovaného GSH u buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti zvyšující se koncentrace EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (37° C). a) Analýza intracelulárního obsahu GSH po 3 hod. b) Analýza intracelulárního obsahu GSH po 6 hod. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl v intracelulárním obsahu GSH u buněk K562 po působení EF24 v porovnání s kontrolou ($P < 0,05$); #...statisticky významný rozdíl v intracelulárním obsahu GSH mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC ($P < 0,05$); +...statisticky významný rozdíl v intracelulárním obsahu GSH mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM GSH ($P < 0,05$).

- Vliv thiolů na produkci ROS u buněk ovlivněných EF24

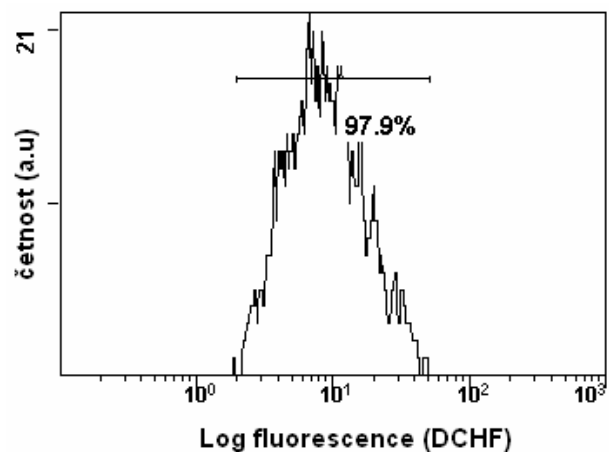
Pro přímé měření oxidativního stresu buněk se využívá tzv. fluorescenčních sond, což jsou speciální sloučeniny, které se až po modifikaci a oxidaci v buňce mění ve fluorescenční barviva (např. DCHF-DA; LeBel *et al.*, 1992). Produkci ROS je pak možné monitorovat buď pomocí fluorescenční mikroskopie nebo pomocí průtokového cytometru.

Nejdříve bylo sledováno, zda samotné EF24 ovlivňuje produkci ROS u buněk K562. Ukázalo se, že EF24 od koncentrace 0,5 μ M způsobuje signifikantní zvýšení ROS (po 3 hod; viz obr. č. 23). Následně byl zkoumán vliv extracelulárního NAC a GSH na produkci ROS. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti zvyšující se koncentrace EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH. Přídavek NAC i GSH způsobuje signifikantní snížení produkce ROS v porovnání s působením samotné látky EF24.

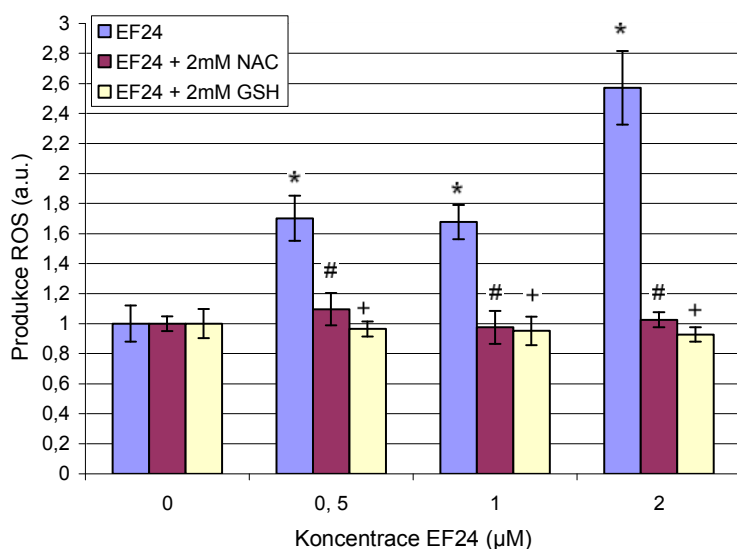
a) i) Kontrola



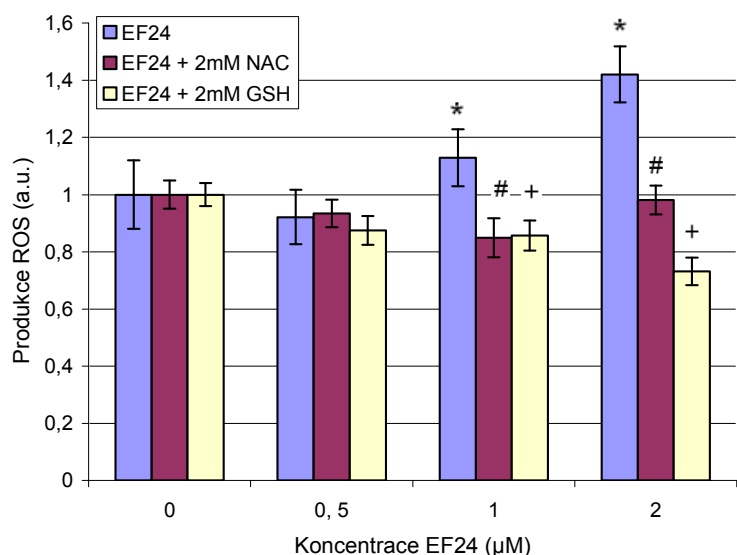
ii) 2 μ M EF24



b)



c)

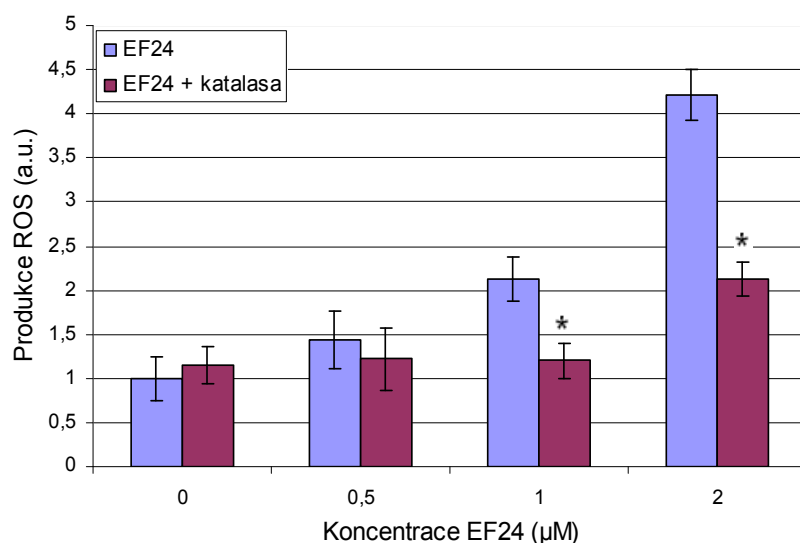


Obr. č. 23: Vliv NAC a GSH na produkci ROS u buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (3 hod; 6 hod; 37° C). a) Typické obrázky analýzy oxidativního stresu: i) Kontrolní neovlivněný vzorek (3hod); ii) Vzorek po působení 2µM EF24 (3hod). b) Vliv NAC a GSH na produkci ROS u buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24 po dobu 3 hod; c) Vliv NAC a GSH na produkci ROS u buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24 po dobu 6 hod. Střední hodnota fluorescence u kontrolního vzorku byla položena číslu 1. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl v produkci ROS u buněk K562 po působení EF24 v porovnání s kontrolou ($P < 0,05$); #...statisticky významný rozdíl v produkci ROS mezi buňkami ovlivněnými samotným EF24 a EF24 v kombinaci s NAC ($P < 0,05$); +...statisticky významný rozdíl v produkci ROS mezi buňkami ovlivněnými samotným EF24 a EF24 v kombinaci s GSH ($P < 0,05$).

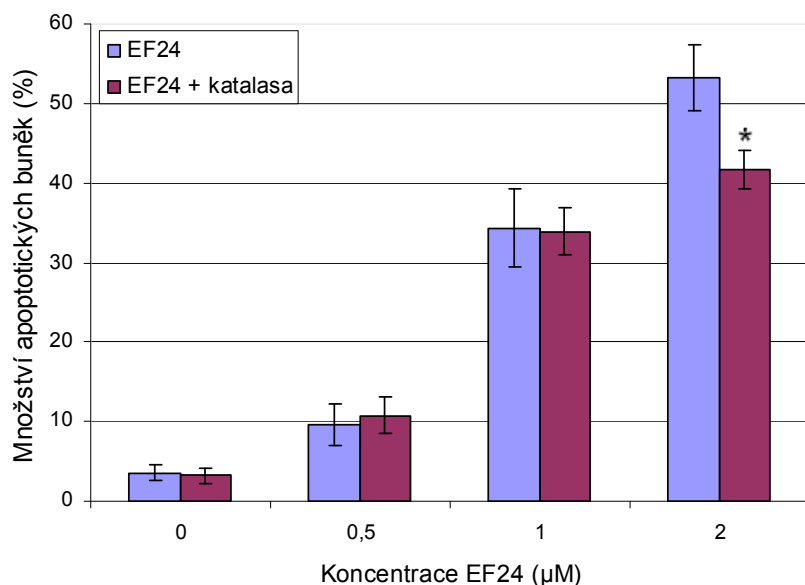
Z výše uvedených výsledků je patrné, že látka EF24 indukuje apoptosu, kterou předchází snížení intracelulární hladiny GSH (viz obr. č. 22) a zvýšená produkce ROS (viz obr. č. 23). Protože NAC i GSH jsou silné antioxidanty a také zabraňují depleci GSH, bylo by možné protektivní účinky obou látek vysvětlit tímto jednoduchým způsobem. Další analýza však ukazuje, že výše popsaným způsobem protektivní účinky NAC a GSH na K562 buňky ovlivněné EF24 nelze zcela vysvětlit.

- Inhibice produkce ROS a indukce apoptosy u buněk ovlivněných EF24

Dále jsme studovali, do jaké míry způsobuje zvýšená produkce ROS apoptosu. Buňky K562 jsme proto inkubovali v přítomnosti EF24 a EF24 v kombinaci s katalasou. Oxidativní stres ovšem pravděpodobně není hlavní příčinou indukce buněčné smrti, protože katalasa snížila počet apoptotických buněk signifikantně pouze pro 2 μ M EF24 (viz obr. č. 25), ačkoliv signifikantní pokles produkce ROS byl naměřen pro 1 μ M i 2 μ M EF24 (viz obr. č. 24).



Obr. č. 24: Vliv katalasy na produkci ROS u buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti EF24 a EF24 v kombinaci s katalasou (250 U/ml; 3 hod, 37° C). Kontrolní hodnota byla položena číslu 1. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl v produkci ROS u buněk K562 po působení EF24 a EF24 v kombinaci s katalasou ($P < 0,05$).



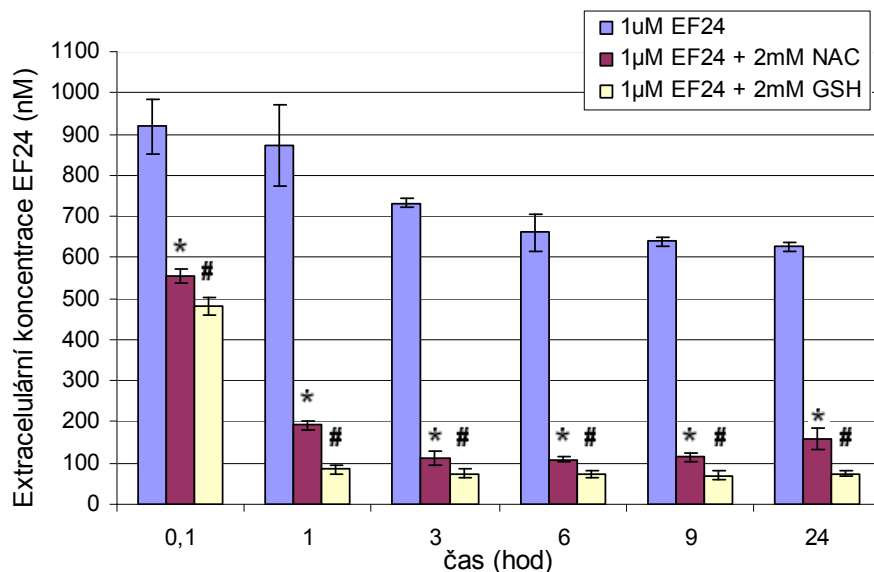
Obr. č. 25: Vliv katalasy na výskyt apoptotických buněk K562 inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s katalasou (250 U/ml; 24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s katalasou ($P < 0,05$).

5.3 Tvorba aduktů EF24 s thioley

Dále jsme zkoumali vznik aduktů EF24 s thioley v růstovém médiu a uvnitř buněk.

a) Stabilita látky EF24 ve standardním růstovém médiu po působení thiolů

Do standardního média bylo přidáno EF24 nebo EF24 v kombinaci s NAC, případně EF24 v kombinaci s GSH. V časových intervalech byly odebírány vzorky a obsah volného EF24 byl analyzován pomocí LC-MS/MS. Samotný EF24 je ve standardním médiu relativně stabilní, k mírnému poklesu koncentrace této látky dochází zřejmě z důvodu reakcí s komponenty média. Po působení NAC nebo GSH dochází k výraznému úbytku volného EF24, což naznačuje, že pravděpodobně dochází ke vzniku příslušných aduktů (viz obr. č. 26).

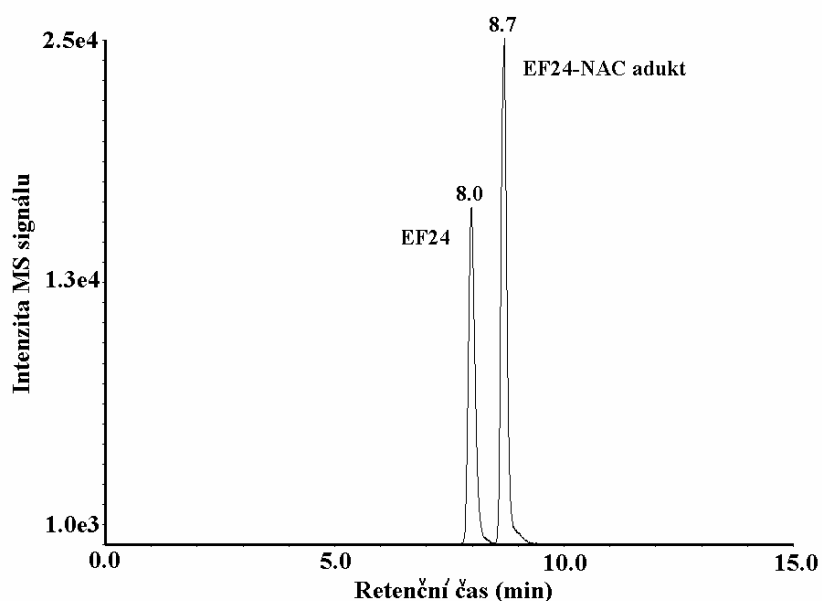


Obr. č. 26: Vliv NAC a GSH na stabilitu EF24 ve standardním růstovém médiu. Do standardního média byla přidána 1µM EF24 nebo 1µM EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 1µM EF24 v kombinaci 2mM GSH. Po přidání NAC (kyselá sůl) a také GSH (okyselený roztok pro zabránění oxidace GSH) klesne pH média na hodnotu 6,8. V časových intervalech byly odebrány vzorky a obsah volného EF24 byl analyzován pomocí LC-MS/MS. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi extracelulární koncentrací látky EF24 (nM) bez/v kombinaci s NAC v čase ($P < 0,05$); #... statisticky významný rozdíl mezi extracelulární koncentrací látky EF24 (nM) bez/v kombinaci s GSH v čase ($P < 0,05$).

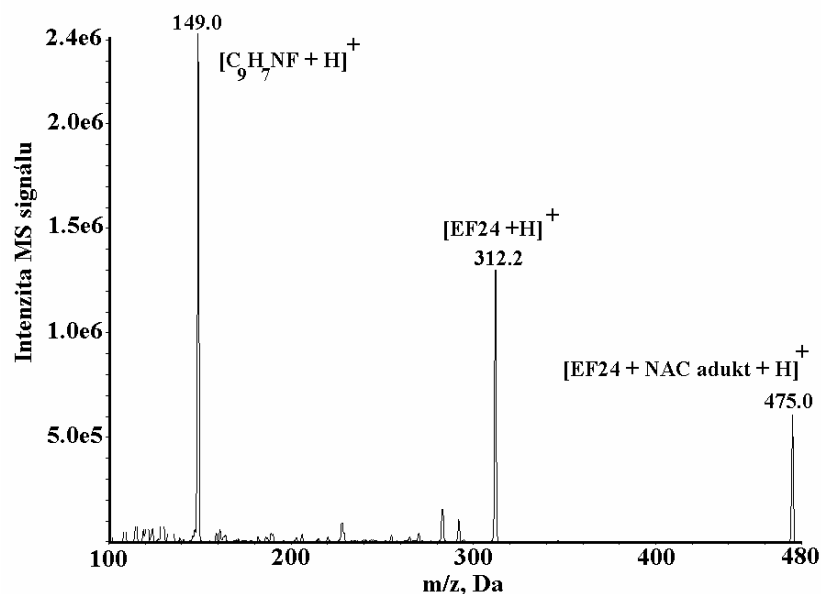
b) Charakteristika aduktů EF24 s thioley

Podle literatury jsme usuzovali, že pokles volného EF24 po působení NAC nebo GSH je způsoben vznikem příslušných mono- a bis-aduktů (Sun *et al.*, 2009). Protože jsou bis-adeny minoritní produkty Michaelovy adice (Sun *et al.*, 2009), zaměřili jsme se pouze na detekci a charakteristiku příslušných mono-aduktů. LC-MS/MS analýza mono-aduktu EF24-NAC a mono-aduktu EF24-GSH je uvedena na obr. č. 27 a 28.

a)

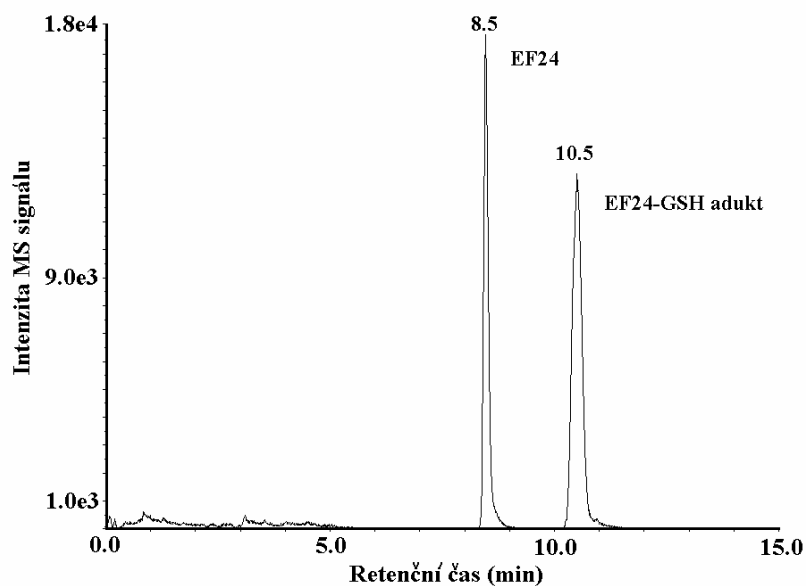


b)

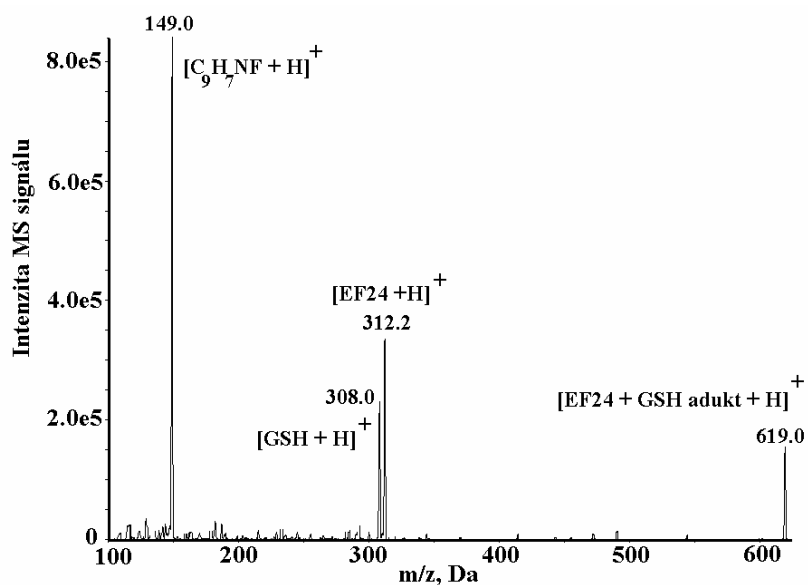


Obr. č. 27: Charakteristika aduktu EF24 s NAC ve vodném roztoku. Ve vodném roztoku byla namíchána směs 20 μ M EF24 v kombinaci s 2mM NAC (pH 5,5) a obsah mono-aduktu EF24-NAC byl analyzován pomocí LC-MS/MS. HPLC analýza s hmotnostní detekcí mono-aduktu EF24-NAC: a) Chromatogram EF24 a mono-aduktu EF24-NAC (prekursorový molekulární ion m/z 312,2, případně 475,0; produktový molekulární ion m/z 149,0 pro oba ionty); b) Hmotnostní spektrum molekulárního iontu mono-aduktu (m/z 475,0), fragmentace na produktový ion EF24+H (m/z 312,2) a C_9H_7NF+H (m/z 149,0).

a)



b)

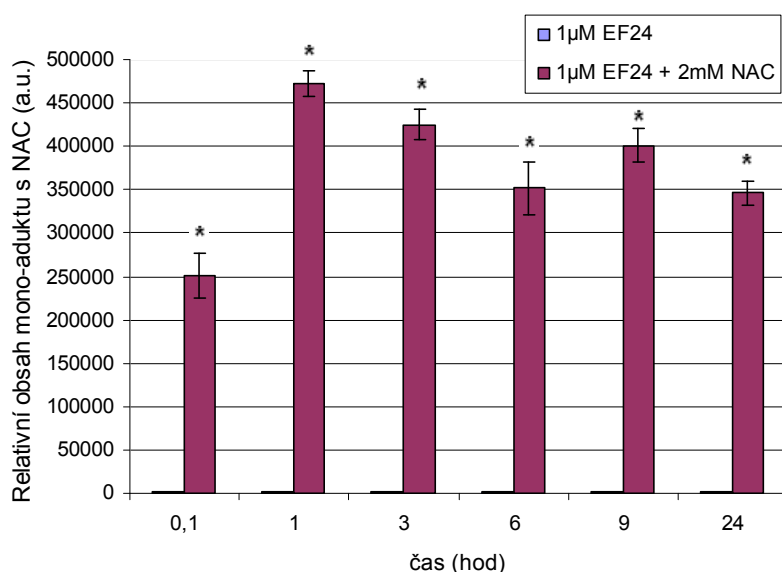


Obr. č. 28: Charakteristika aduktu EF24 s GSH ve vodném roztoku. Ve vodném roztoku byla namíchána směs 20 μ M EF24 v kombinaci s 2mM GSH (pH 5,5) a obsah mono-aduktu EF24-GSH byl analyzován pomocí LC-MS/MS. a) Chromatogram EF24 a mono-aduktu EF24-GSH (prekursorový molekulární ion m/z 312,2, případně 619,0; produktový molekulární ion m/z 149,0 pro oba ionty); b) Hmotnostní spektrum molekulárního iontu mono-aduktu (m/z 619,0), fragmentace na produktový ion EF24+H (m/z 312,2), GSH+H (m/z 308,0) a C₉H₇NF+H (m/z 149,0).

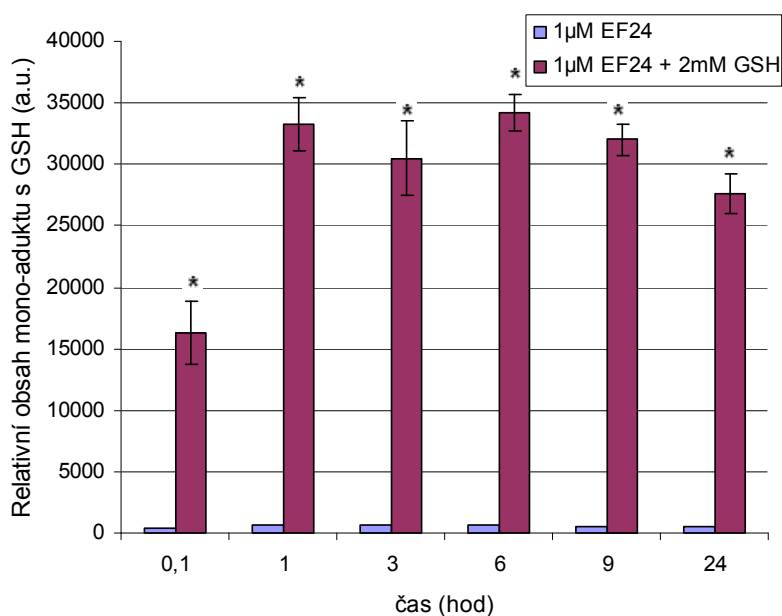
c) Tvorba aduktů EF24 s thioley v růstovém médiu

Nejdříve jsme zjišťovali, zda dochází k tvorbě aduktů EF24 s thioley v růstovém médiu bez přítomnosti buněk. Do standardního média bylo přidáno EF24 nebo EF24 v kombinaci s NAC (nebo s GSH). V časových intervalech byly odebrány vzorky a obsah aduktů byl analyzován pomocí LC-MS/MS. Z analýzy je zřejmé, že v růstovém médiu bez buněk dochází k rychlé tvorbě mono-aduktů EF24-NAC a EF24-GSH (viz obr. č. 29). Tyto výsledky naznačují, že úbytek volného EF24 lze vysvětlit tvorbou příslušných aduktů v růstovém médiu s přidavkem NAC nebo GSH, ikdyž nemáme k dispozici přesná kvantitativní data a tvorba příslušných bis-aduktů nebyla analyzována.

a)



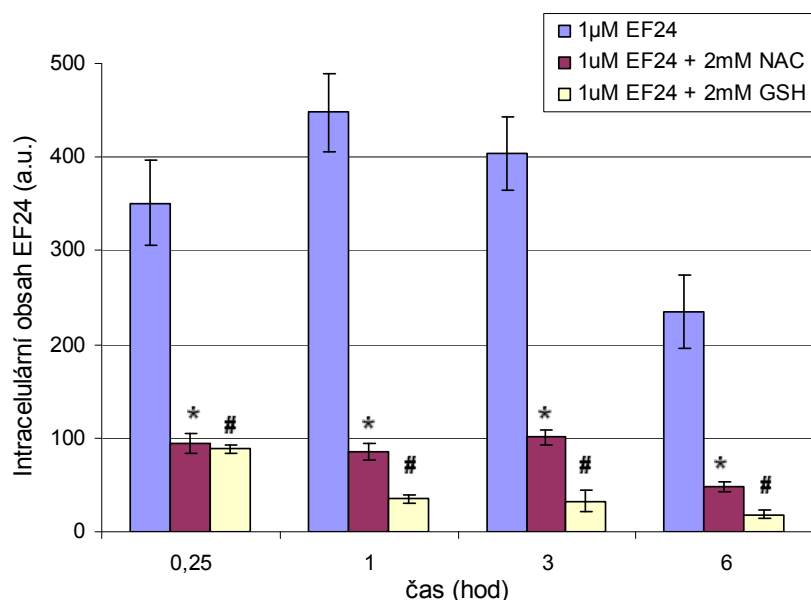
b)



Obr. č. 29: Semikvantitativní analýza aduktů EF24 s thioley ve standardním růstovém médiu. Do standardního média bylo přidáno 1µM EF24 a 1µM EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH. V časových intervalech byly odebírány vzorky a obsah aduktů byl analyzován pomocí LC-MS/MS. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. a) Analýza aduktů ve směsi 1µM EF24 s 2mM NAC. *...statisticky významný rozdíl mezi extracelulárním obsahem aduktu EF24 bez a v kombinaci s NAC v čase ($P < 0,05$). b) Analýza aduktů ve směsi 1µM EF24 s 2mM GSH. *...statisticky významný rozdíl mezi extracelulárním obsahem aduktu EF24 bez a v kombinaci s GSH v čase ($P < 0,05$).

d) Stabilita látky EF24 v buňkách K562 po působení thiolů

Buňky byly inkubovány s látkou EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (37° C). V daných časových intervalech byl pomocí LC-MS/MS analyzován intracelulární obsah volného EF24. Je vidět, že 2mM NAC a 2mM GSH způsobují signifikantní úbytek intracelulárního obsahu volného EF24 (viz obr. č. 30).



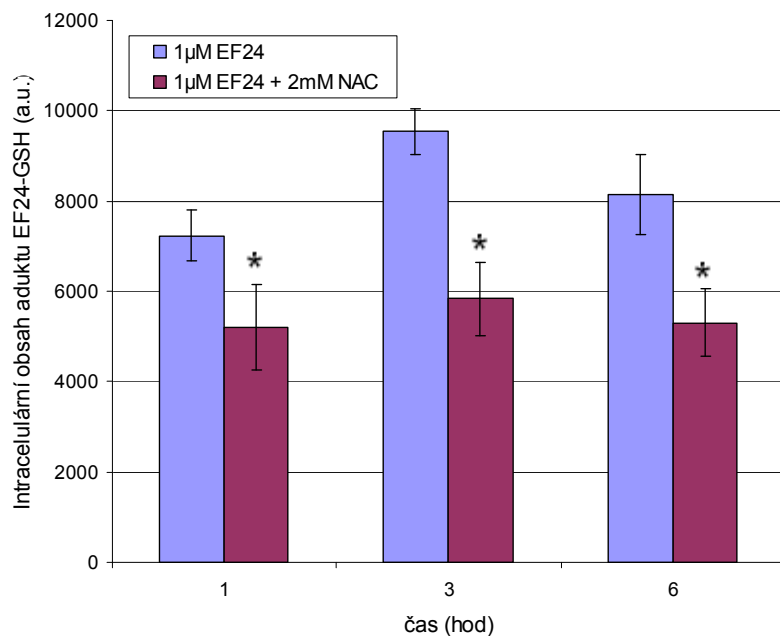
Obr. č. 30: Vliv NAC a GSH na stabilitu EF24 v buňkách K562. Buňky byly inkubovány s 1µM EF24 a 1µM EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (37° C). V časových intervalech byl pomocí LC-MS/MS analyzován intracelulární obsah volného EF24. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC ($P < 0,05$); #... statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM GSH ($P < 0,05$).

e) Tvorba intracelulárních aduktů EF24 s thiolů

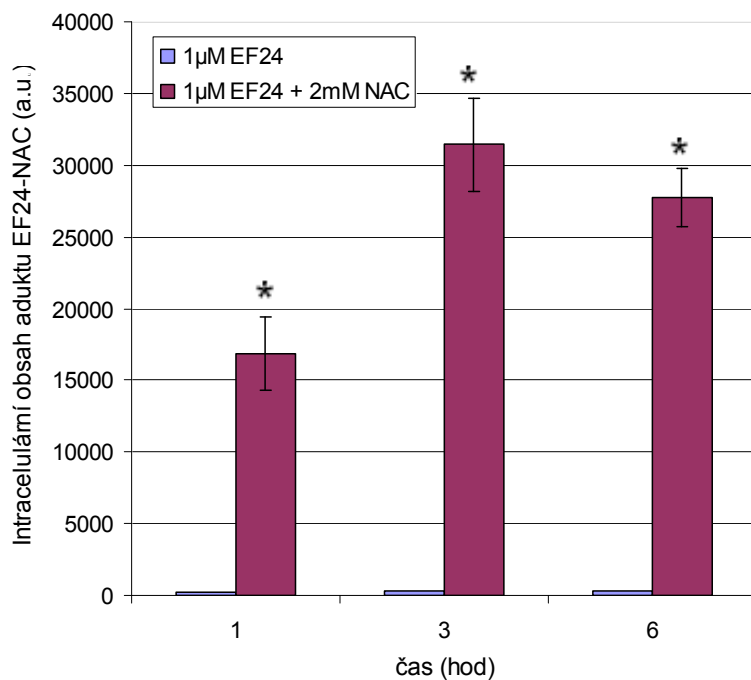
Dále jsme měřili vznik intracelulárních aduktů s thiolů. Buňky obsahují vysokou koncentraci GSH, a tak intracelulární tvorba mono-aduktu EF24-GSH byla zjištěna podle předpokladů (viz obr. č. 31a). Přídavek extracelulárního NAC indukoval vznik intracelulárního mono-aduktu EF24-NAC a inhiboval vznik mono-aduktu EF24-GSH (viz obr. č. 31b). Podobně přídavek extracelulárního GSH inhiboval vznik intracelulárního mono-aduktu EF24-GSH (viz obr. č. 31c).

Tyto výsledky naznačují, že patrně hlavním protektivním účinkem NAC a GSH je rychlá konverze extra i intracelulárního EF24 na příslušné adukty.

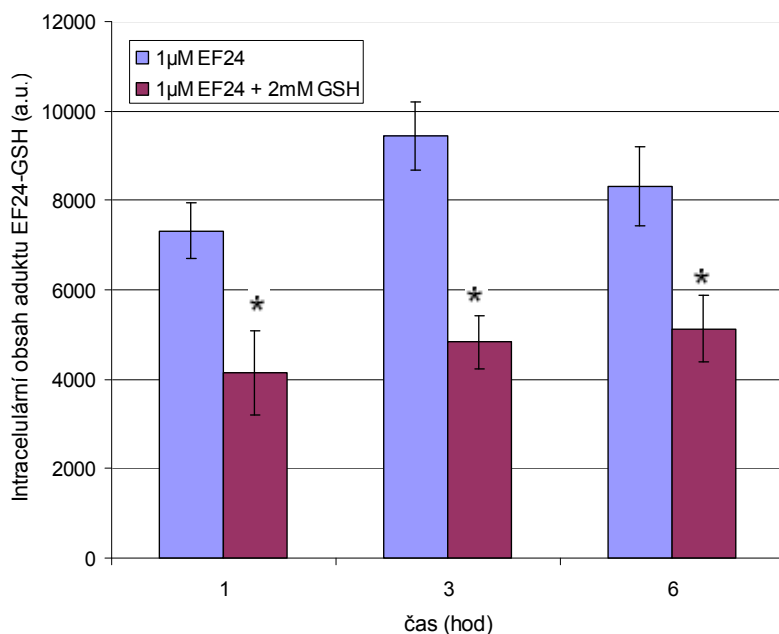
a)



b)



c)



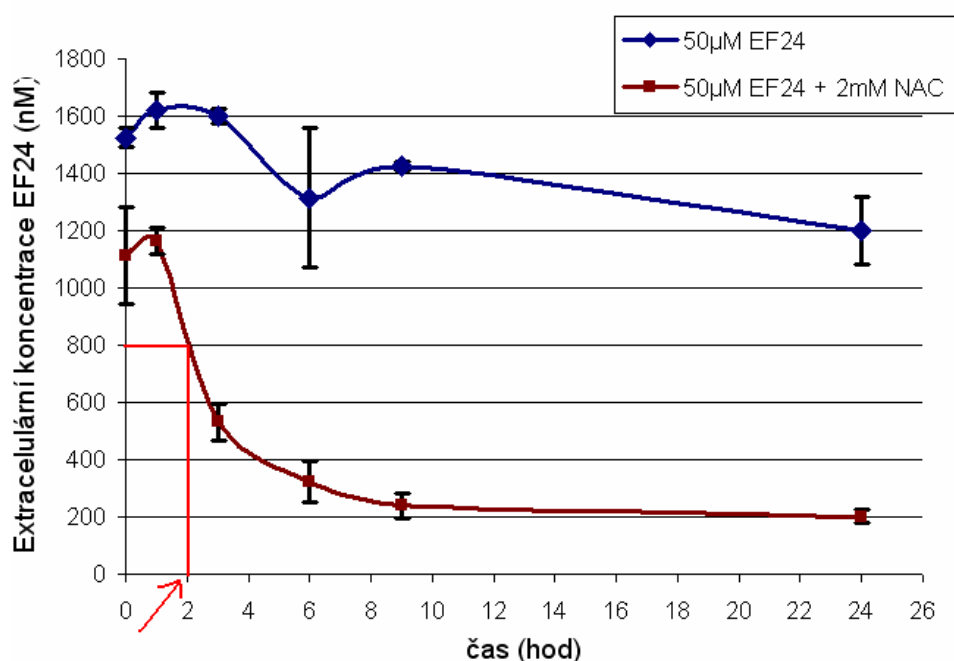
Obr. č. 31: Intracelulární tvorba mono-aduktu EF24 s thioley. Buňky byly inkubovány s 1µM EF24 a 1µM EF24 v kombinaci s 2mM NAC nebo 2mM GSH (37° C). V časových intervalech byl pomocí LC-MS/MS analyzován intracelulární obsah aduktů EF24-NAC a EF24-GSH. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. a) Intracelulární tvorba mono-aduktu EF24-GSH po působení samotné látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC (P<0,05). b) Intracelulární tvorba mono-aduktu EF24-NAC po působení samotné látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM NAC. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM NAC (P<0,05). c) Intracelulární tvorba mono-aduktu EF24-GSH po působení samotné látky EF24 a EF24 v kombinaci s 2mM GSH. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a kombinace látky EF24 s 2mM GSH (P<0,05).

f) Analýza cytotoxických účinků aduktů na buňky K562

Výše uvedené výsledky rovněž nepřímou ukáží, že vznikající adukty nemají stejné cytotoxické účinky jako samotné EF24. Abychom potvrdili tuto hypotézu, provedli jsme následující experimenty.

Do standardního média byla přidána látka EF24 do výsledné koncentrace 50µM

a NAC do výsledné koncentrace 2mM (to stejné bylo provedeno pro GSH; výsledky neukázány). V časových intervalech byly odebírány vzorky a obsah volného EF24 byl analyzován pomocí LC-MS/MS. Cílem bylo zjistit, kdy bude polovina EF24 v reakční směsi konvertována na adukty (viz obr. č. 32; šipkou označen čas, kdy je polovina EF24 konvertovaná na adukty). Tato směs pak byla přidána k buňkám v růstovém médiu tak, aby nominální koncentrace EF24 byla 0,25; 0,5; 1 a 2 μ M EF24 (reálná koncentrace volného EF24 ve směsi je však poloviční). Po 24 hod se měřil cytotoxický efekt této směsi na buňky K562 v porovnání se samotným EF24. Residuální koncentrace extracelulárního NAC (80 μ M; přítomné po přidání k buněčné suspenzi) neměla vliv na intracelulární obsah volného EF24 (výsledky neukázány).

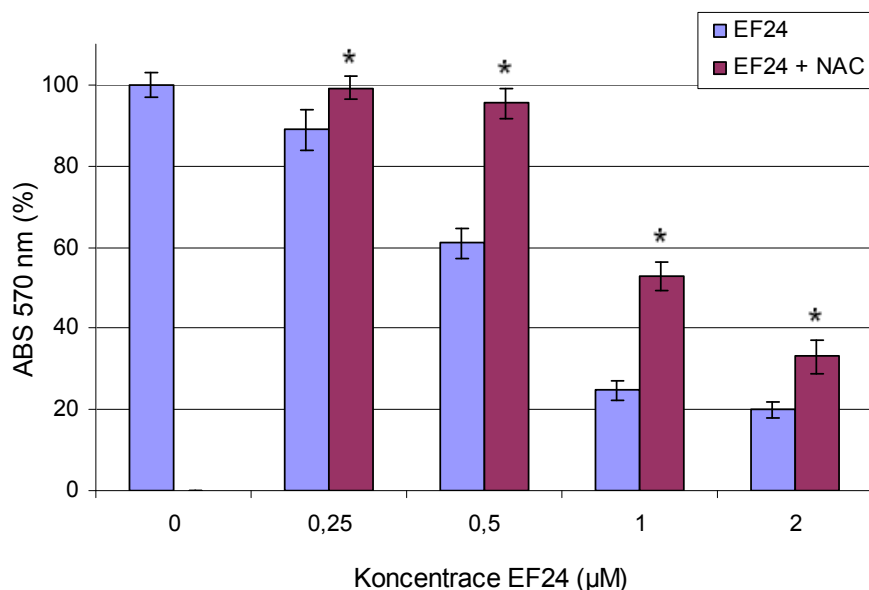


Obr. č. 32: Vliv NAC na stabilitu EF24 ve standardním růstovém médiu. Do standardního média bylo přidáno 50 μ M EF24 a 50 μ M EF24 v kombinaci s 2mM NAC. V časových intervalech byly odebírány vzorky a obsah volného EF24 byl analyzován pomocí LC-MS/MS. Šipkou je označen čas, kdy je polovina směsi zkonjugovaná a polovina je tvořena volným EF24. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou.

Vliv aduktů EF24 s NAC na proliferaci a viabilitu buněk

Buňky K562 byly vystaveny působení látky EF24 a reakční směsi EF24 s NAC, kde polovina EF24 byla přeměněna na adukty. Po 24hod inkubaci byly porovnávány cytotoxické účinky pomocí MTT testu. Měření jasně ukázalo, že samotné EF24 má

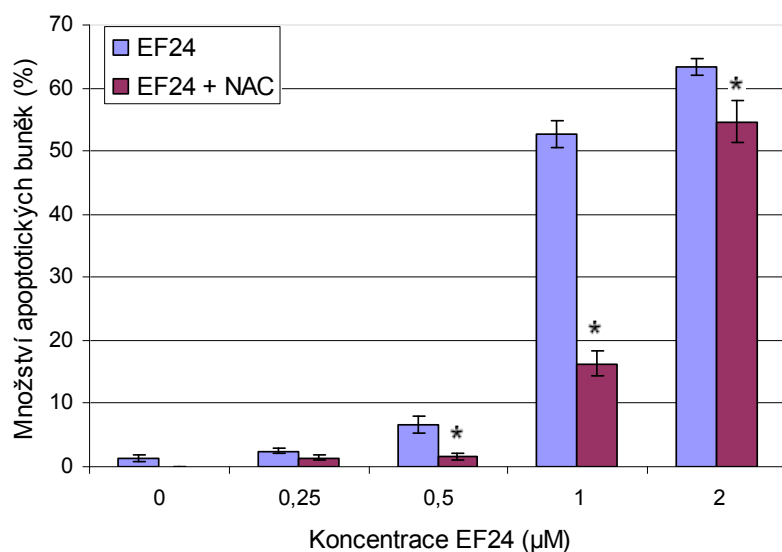
signifikantně vyšší cytotoxický účinek než EF24, které je z poloviny přeměněné na adukty (viz obr. č. 33).



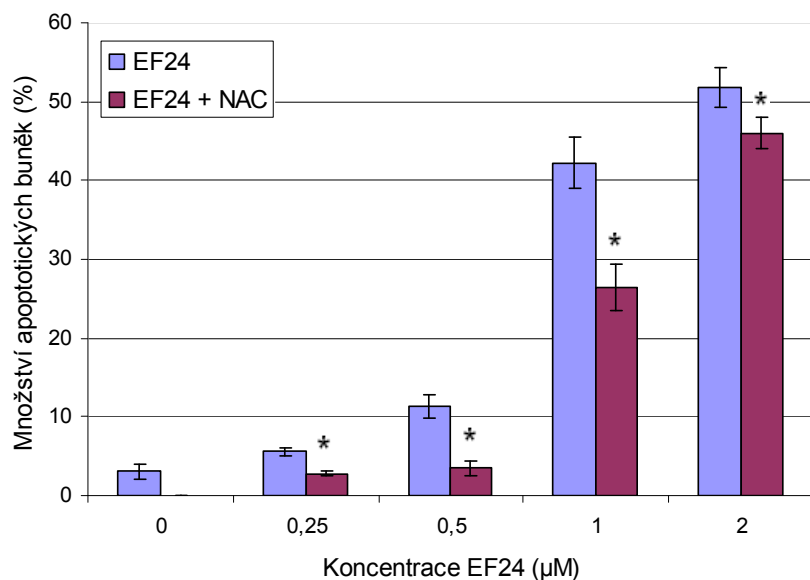
Obr. č. 33: Vliv aduktů EF24 s NAC na proliferaci a viabilitu K562 buněk. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a směsi, která obsahuje jednu polovinu EF24 přeměněnou na adukty s NAC (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a směsi látky EF24 s NAC (P<0,05).

Vliv aduktů EF24 s NAC na indukci apoptosy u buněk K562

Buňky K562 byly kultivovány v přítomnosti látky EF24 a reakční směsi EF24 s NAC, kde polovina EF24 byla přeměněna na adukty. Po 24hod inkubaci byla provedena analýza morfologických a biochemických změn spojených s apoptosou. Morfologická analýza jader ukázala, že v přítomnosti samotného EF24 dochází k signifikantnímu zvýšení počtu apoptotických buněk než po působení EF24, které je z poloviny přeměněné na adukty (viz obr. č. 34). Analýza obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie rovněž potvrdila signifikantně zvýšený počet hypodiploidních buněk po působení samotného EF24 (viz obr. č. 35).



Obr. č. 34: Vliv aduktů EF24 s NAC na morfologii jader buněk K562. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a směsi, která obsahuje jednu polovinu EF24 přeměněnou na adukty s NAC (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *... statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a směsi látky EF24 s NAC ($P < 0,05$).



Obr. č. 35: Vliv aduktů EF24 s NAC na výskyt hypodiploidních buněk K562. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a směsi, která obsahuje jednu polovinu EF24 přeměněnou na adukty s NAC (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi buňkami K562 po působení EF24 a směsi látky EF24 s NAC ($P < 0,05$).

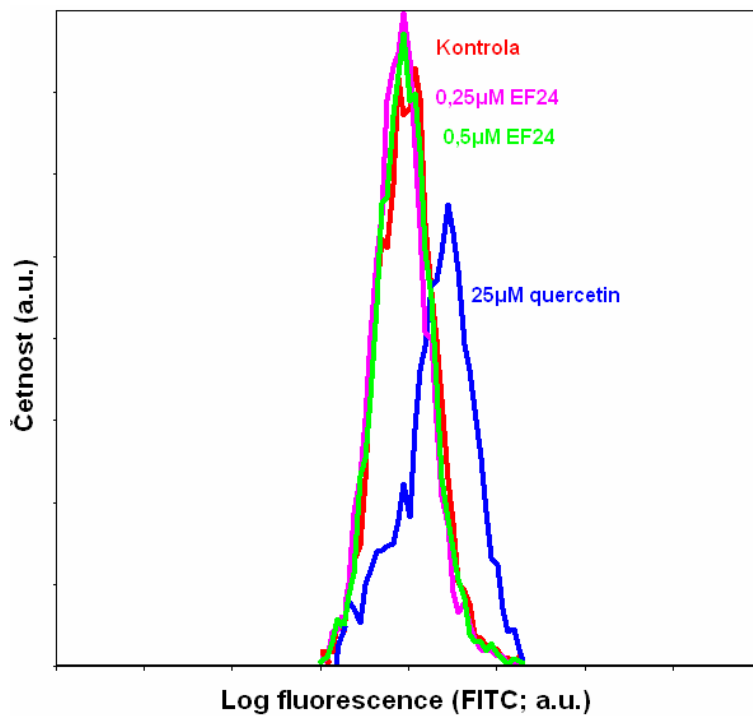
Výše uvedené výsledky ukazují, že adukty EF24-NAC vykazují signifikantně nižší cytotoxické účinky než samotná látka EF24 u buněk K562.

5.4 Vliv EF24 na expresi receptorů TRAIL-R2 a FAS

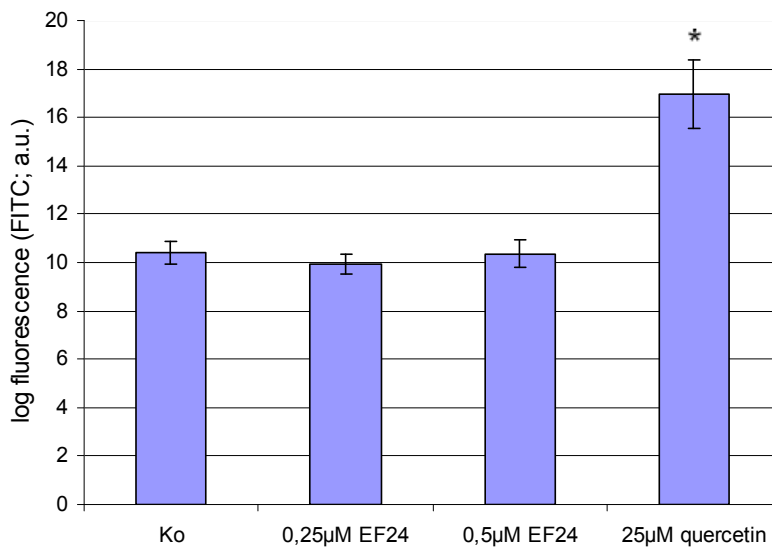
Práce jiných autorů naznačují, že EF24 zesiluje svůj proapoptotický účinek prostřednictvím zvýšené exprese a sekrece ligandu FAS u buněk karcinomu vaječníků (Selvendiran *et al.*, 2007). Zvýšená sensitivita buněk vůči vnějším proapoptotickým stimulům může být podobně navozena zvýšenou expresí tzv. „receptorů smrti“. Některé látky jsou schopné u nádorových buněk indukovat zvýšenou expresi těchto receptorů. Proto jsme studovali, zda látka EF24 zvyšuje expresi receptorů TRAIL-R2 a FAS u leukemických buněk K562. Tyto „receptory smrti“ aktivují kaspasovou kaskádu tzv. „vnější apoptotickou dráhou“.

Buňky byly vystaveny působení 0,25 a 0,5 μ M EF24 (tyto koncentrace nejsou pro buňky tolik cytotoxické). Po 24 hod byla provedena analýza exprese receptorů TRAIL-R2 a FAS pomocí fluorescenčně značených protilátek a vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru. Jako pozitivní kontrola byl zvolený quercetin, který indukuje zvýšenou expresi těchto receptorů. Obr. č. 36 a 37 zobrazují typické záznamy a grafy analýzy exprese receptoru TRAIL-R2 a FAS u buněk K562 po působení látky EF24. Z výsledků můžeme usoudit, že látka EF24 nemá významný vliv na expresi receptorů TRAIL-R2 a FAS (viz obr. č. 36 a 37).

a)

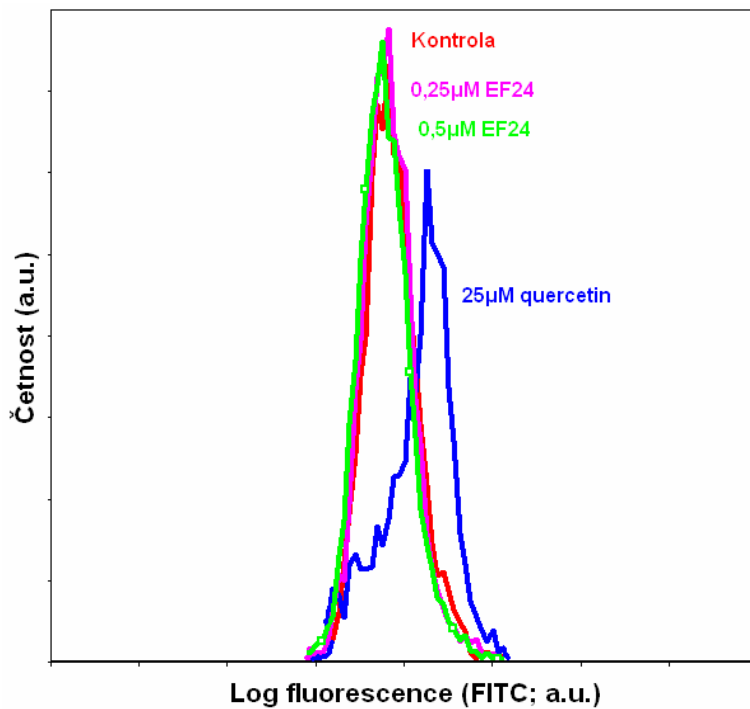


b)

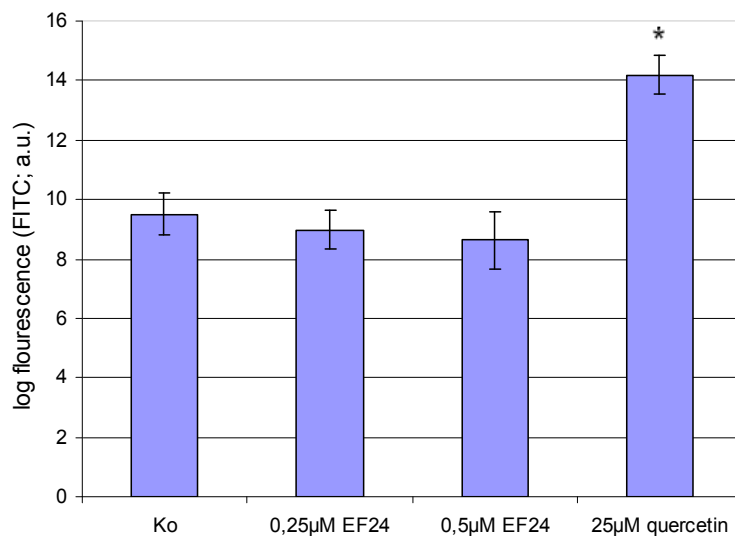


Obr. č. 36: Analýza exprese TRAIL-R2 receptoru u buněk K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a quercetinu jako pozitivní kontroly (24 hod, 37° C). a) Typický záznam analýzy exprese receptoru TRAIL-R2 u buněk K562 po působení látky EF24; b) Vliv látky EF24 na expresi receptoru TRAIL-R2. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi neovlivněnými buňkami a buňkami po působení látky EF24 nebo quercetinu ($P < 0,05$).

a)



b)



Obr. č. 37: Analýza exprese FAS receptoru u buněk K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a quercetinu jako pozitivní kontroly (24 hod, 37° C). a) Typický záznam analýzy exprese receptoru FAS u buněk K562 po působení látky EF24; b) Vliv látky EF24 na expresi receptoru FAS. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl mezi neovlivněnými buňkami a buňkami po působení látky EF24 nebo quercetinu ($P < 0,05$).

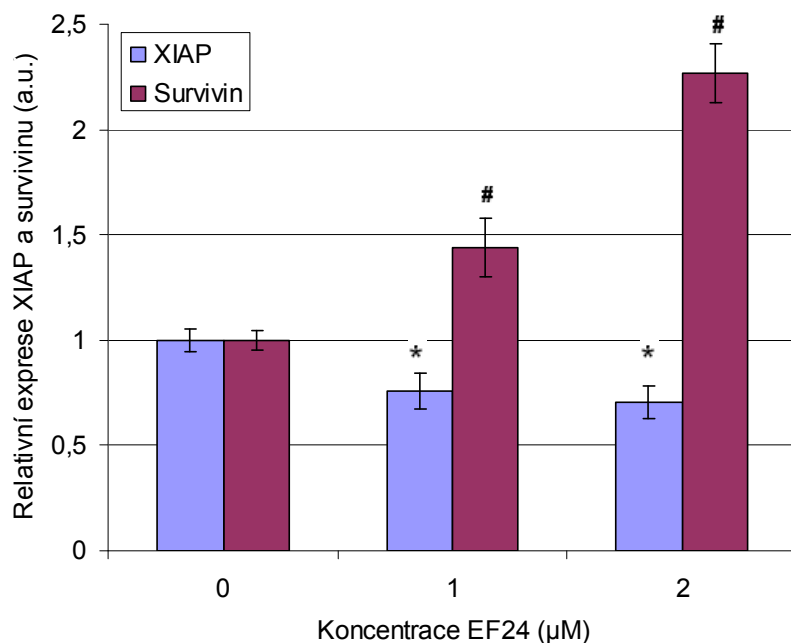
5.5 Analýza exprese proteinů inhibitorů apoptozy

Survivin a XIAP patří do rodiny IAPs (Crook *et al.*, 1993). IAPs inhibují kaspasy a jsou inaktivovány Smac/Diablolem a Omi/HtrA2, což jsou faktory z mezimembránového prostoru mitochondrií. U savců bylo identifikováno osm členů rodiny IAPs: Apollon/BRUCE, cIAP-1, cIAP-2, ILP-2, Livin, NAIP, survivin a XIAP (Obexer *et al.*, 2014). Nádorové buňky mohou mít expresi IAPs zvýšenou, čímž je u nich potlačena indukce apoptozy. Například survivin je exprimovaný pouze v nádorových buňkách popřípadě v embryonálních buňkách (Sah *et al.*, 2006). XIAP je nejen významným inhibitorem kaspasy-9 a kaspasy-3/7, ale jeho exprese je komplexním způsobem provázaná s NF- κ B (Galbán *et al.*, 2010; Deveraux *et al.*, 1997). Některé látky mohou inhibovat IAPs a tím zvýšit citlivost nádorových buněk k apoptotickým signálům (Almagro *et al.*, 2012). Proto jsme se v dalších experimentech zaměřili na úlohu těchto faktorů v procesu indukce buněčné smrti látkou EF24.

Buněčná linie K562 byla inkubována s látkou EF24 (17 hod, 37° C). Byla provedena izolace proteinů, následná elektroforetická separace proteinů a western blotting. Z výsledků je vidět, že exprese proteinu XIAP se významně snížila, zatímco exprese survivinu se významně zvýšila (viz obr. č. 38).



b)



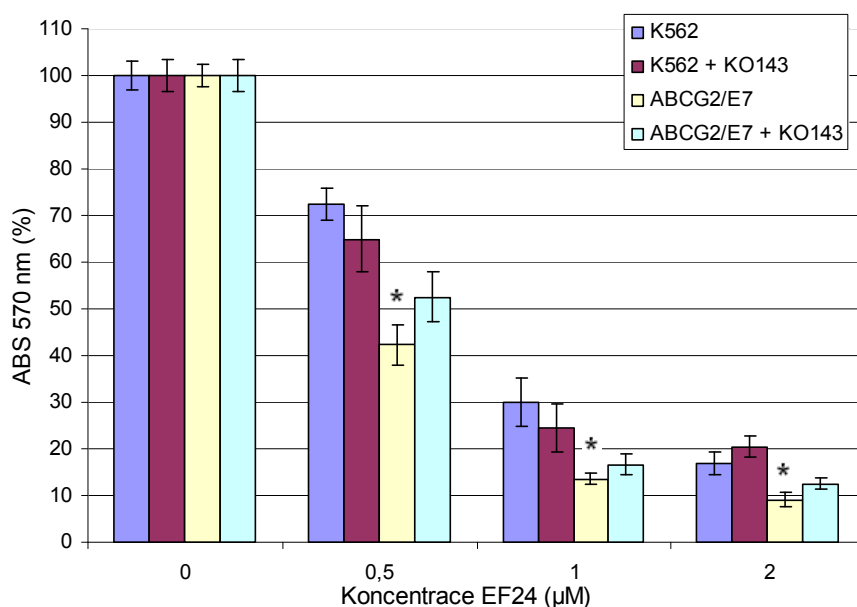
Obr. č. 38: Vliv látky EF24 na expresi XIAP a survivinu. a) Typické obrázky western blottu: XIAP - 1: kontrola; 2: 1μM EF24; 3: 2μM EF24; Survivin - 1: kontrola; 2: 1μM EF24; 3: 2μM EF24; Hsp 90 - 1: kontrola; 2: 1μM EF24; 3: 2μM EF24; b) Denzitometrické kvantitativní hodnocení exprese XIAP a survivinu. Kontrolní hodnota byla položena číslu 1. Hodnoty byly normalizovány na množství vneseného proteinu Heat shock protein 90 (Hsp90). Denzitometrické kvantitativní hodnocení exprese proteinů bylo provedeno pomocí programu ImageJ. Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl v expresi XIAP mezi neovlivněnými buňkami a buňkami po působení látky EF24 ($P < 0,05$); #...statisticky významný rozdíl v expresi survivinu mezi neovlivněnými buňkami a buňkami po působení látky EF24 ($P < 0,05$).

5.6 Vliv exprese ABCG2 na cytotoxické účinky EF24

V předcházejících experimentech jsme ukázali, že ABCB1 neovlivňuje citlivost leukemických buněk k EF24 (Skoupá, bakalářská práce, 2014). Proto jsme se rozhodli vyzkoušet vliv této látky také na další významný lékový transportér - ABCG2. V experimentech jsme použili buňky K562/ABCG2/E7, které mají fenotyp MDR díky zvýšené expresi ABCG2.

- Vliv exprese ABCG2 na proliferaci a viabilitu buněk ovlivněných EF24

Buňky K562/ABCG2/E7 byly vystaveny působení látky EF24 a EF24 v kombinaci s 0,3 μ M KO143 (inhibitor transportéru ABCG2) po dobu 24 hod. Buňky K562, které neexprimují ABCG2, byly použity jako kontrola. Měření pomocí MTT testu překvapivě ukázalo, že buňky K562/ABCG2/E7 jsou citlivější než buňky K562. Inhibitor neměl vliv na citlivost buněk vůči EF24 (viz obr. č. 39).

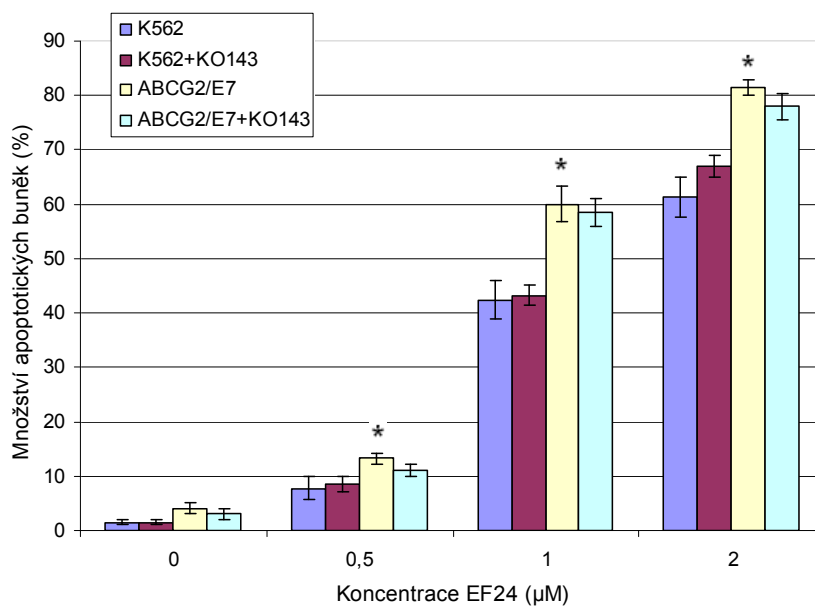


Obr. č. 39: Vliv exprese ABCG2 na proliferaci a viabilitu buněk inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 0,3 μ M KO143 (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl po působení látky EF24 mezi buňkami K562 a K562/ABCG2/E7 (P<0,05).

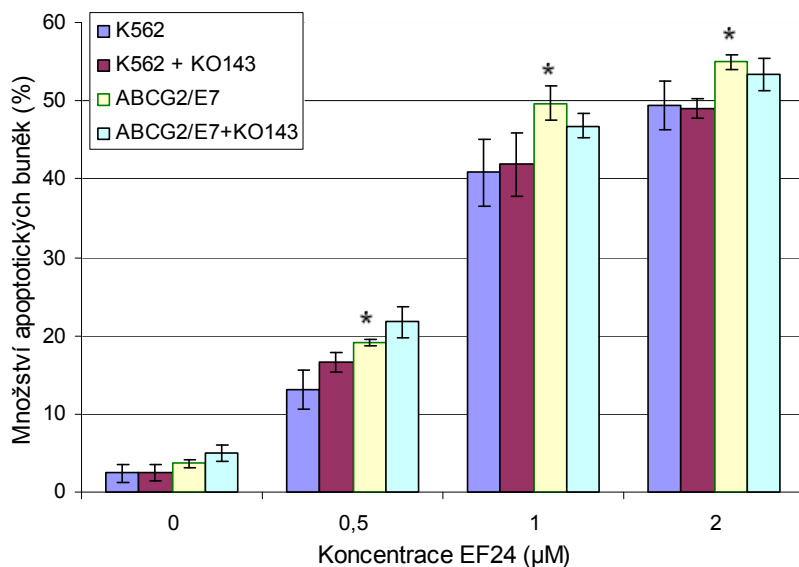
- Vliv exprese ABCG2 na indukci apoptozy u buněk ovlivněných EF24

Buňky K562 a K562/ABCG2/E7 byly vystaveny působení EF24 a EF24 v kombinaci s 0,3 μ M KO143 po dobu 24h. Následně byla provedena analýza morfologických a biochemických znaků apoptozy. Morfologická analýza jader ukázala nárůst apoptotických buněk u linie K562/ABCG2/E7 v porovnání s kontrolními buňkami K562. Po přidání inhibitoru nebyl detekován rozdíl (viz obr. č. 40).

Analýza obsahu DNA pomocí průtokové cytometrie rovněž ukázala, že u buněk K562/ABCG2/E7 došlo ke zvýšení počtu hypodiploidních buněk v porovnání s K562. Inhibitor opět neměl vliv na citlivost buněk vůči EF24 (viz obr. č. 41).



Obr. č. 40: Vliv exprese ABCG2 na morfologii jader leukemických buněk inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 0,3 μ M KO143 (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl po působení látky EF24 mezi buňkami K562 a K562/ABCG2/E7 (P<0,05).

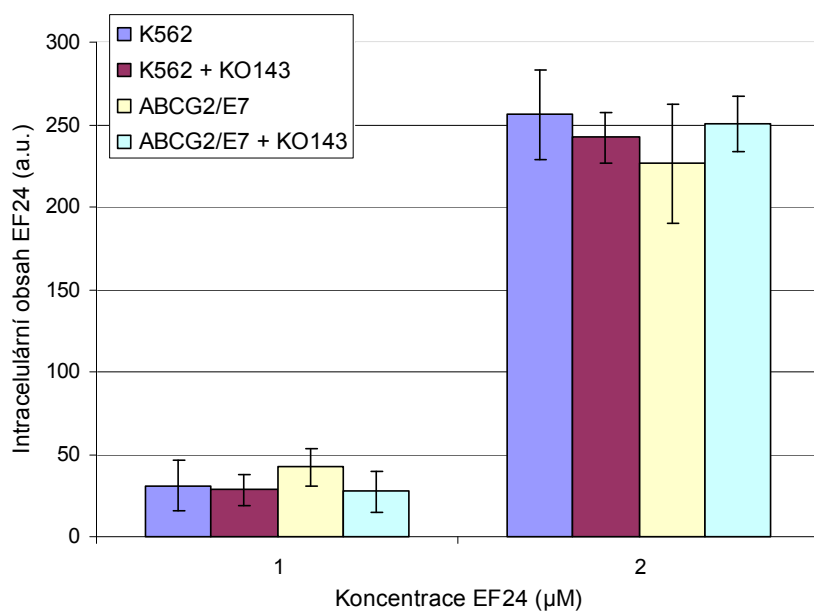


Obr. č. 41: Vliv exprese ABCG2 na výskyt hypodiploidních leukemických buněk inkubovaných v přítomnosti EF24. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 0,3μM KO143 (24 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou. *...statisticky významný rozdíl po působení látky EF24 mezi buňkami K562 a K562/ABCG2/E7 (P<0,05).

Výsledky naznačují, že exprese ABCG2 nesnižuje cytotoxické účinky EF24 na leukemické buňky K562. Překvapivě byla sledována signifikantně vyšší citlivost u buněk K562/ABCG2/E7 vůči látce EF24. Šlo by uvažovat o kolaterální sensitivitě, ale tato hypotéza byla vyvrácena experimentem s K562/ABCG2/G7 buňkami, které mají podobnou expresi ABCG2 transportéru jako K562/ABCG2/E7. Výsledky u těchto buněk ukázaly srovnatelnou citlivost s kontrolními buňkami K562 (výsledky neukázány).

- Vliv exprese ABCG2 na intracelulární hladinu EF24

ABC transportéry způsobují svojí aktivitou snížení intracelulární hladiny léčiva v buňkách, čímž dochází ke vzniku rezistence. Aby se potvrdily předcházející výsledky, tak byla měřena intracelulární hladina EF24 u buněk K562 a K562/ABCG2/E7. Buňky byly inkubovány s látkou EF24 a EF24 v kombinaci s 0,3μM KO143 po dobu 3 hod při 37° C. Intracelulární obsah látky EF24 se u buněk K562 a K562/ABCG2/E7 výrazně neliší a to ani po přidání inhibitoru ABCG2 transportéru (viz obr. č. 42).



Obr. č. 42: Intracelulární obsah EF24 u buněk K562 a K562/ABCG2/E7. Buňky K562 byly kultivovány ve standardním růstovém médiu v přítomnosti látky EF24 a EF24 v kombinaci s 0,3μM KO143 (3 hod, 37° C). Výsledky představují průměrnou hodnotu ze tří měření se směrodatnou odchylkou.

Výsledky ukazují, že EF24 není substrátem ABCG2 transportéru.

6. Diskuse

Teoretická část této diplomové práce popisuje nádorové onemocnění CML a přehled léčebných postupů v historickém kontextu. Další část úvodu se zabývá hledáním alternativních protinádorových léčiv, jejichž předlohy lze nalézt v přírodě. V této souvislosti je zde popsán terapeutický potenciál analogu kurkuminu EF24 a jeho vliv na transkripční faktor NF- κ B. Závěrečná část teoretického úvodu popisuje úlohu ABC transportéru při vzniku fenoménu MDR u nádorových buněk.

Experimentální část zahrnuje zejména výsledky vlivu thiolů na cytotoxické účinky látky EF24 na modelové linii buněk chronické myeloidní leukemie K562.

Nedávné výsledky v literatuře ukázaly, že molekula EF24 může Michaelovou adicí tvořit adukty s thiol, konkrétně s GSH, a že tyto adukty mají stejné cytotoxické účinky jako samotná látka EF24 u buněk MDA-MB-435 *in vitro* (Sun *et al.*, 2009). Protože se nám zdál tento výsledek překvapivý, rozhodli jsme se zjistit, zda podobný efekt lze pozorovat i pro jiné thioly (například NAC) a u jiných buněk (K562).

Z předcházejících experimentů jsme věděli, že EF24 má silné antiproliferační účinky a indukuje buněčnou smrt s morfologickými a biochemickými znaky apoptosy u buněk K562 (Skoupá, bakalářská práce, 2014).

Nově získané výsledky v rámci této diplomové práce ukázaly, že EF24 indukuje apoptosu, kterou předchází snížení intracelulární hladiny GSH (viz obr. č. 22) a zvýšená produkce ROS (viz obr. č. 23). Dále jsme zjistili, že přidavek extracelulárního NAC a GSH k buňkám ovlivněným látkou EF24 má signifikantní protektivní účinek a inhibuje indukci apoptosy (viz. obr. č. 18-23). Vzhledem k tomu, že NAC i GSH jsou známá antioxidační činidla, která navíc zabraňují depleci GSH, nabízí se jednoduché vysvětlení protektivního účinku. Další detailní experimenty nicméně ukazují, že výše popsaným způsobem nelze zcela vysvětlit protektivní účinky NAC a GSH na buňky K562 ovlivněné EF24.

Podle výsledků LC-MS/MS analýz jsme zjistili, že přidavek NAC nebo GSH do růstového média vede k rychlému úbytku volného EF24, a to extra i intracelulárně (viz obr. č. 26; 30). Z dalších analýz je zřejmé, že v růstovém médiu (i bez buněk) dochází k rychlé tvorbě mono-aduktů EF24-NAC a EF24-GSH (viz obr. č. 29). K tvorbě příslušných mono-aduktů EF24-NAC a EF24-GSH dochází i intracelulárně (viz obr. č. 31). Tyto výsledky jsou v souladu s literárními údaji (Sun *et al.*, 2009) a naznačují, že úbytek volného EF24 je zřejmě možné vysvětlit tvorbou příslušných

aduktů v růstovém médiu s přidavkem NAC nebo GSH. Vznikem příslušných bisaduktů jsme se nezabývali, vzhledem k tomu, že jsou minoritním produktem reakce (Sun *et al.*, 2009). Úplnou kvantitativní analýzu jsme nebyli schopni provést, protože jsme neměli standardy příslušných aduktů.

Výše uvedené experimenty zároveň naznačují, že adukty EF24 s NAC nebo GSH nemají stejné cytotoxické účinky jako samotný EF24 (viz obr. č. 18-21).

Abychom potvrdili naše předpoklady, že adukty EF24 s thioley nemají stejný cytotoxický účinek jako samotné EF24, působili jsme na buňky směsí, která obsahovala polovinu volného a polovinu přeměněného EF24 na adukty s NAC a cytotoxické působení této směsi jsme porovnávali se samotným EF24. Naše výsledky jasně ukázaly, že samotné EF24 má signifikantně vyšší cytotoxický účinek než EF24, které je z poloviny přeměněné na adukty (viz obr. č. 33-35).

Analogické experimenty pro GSH nebyly dokončeny. Na základě výše uvedených experimentů se domníváme, že hlavní cytoprotektivní efekt NAC (a patrně i GSH) spočívá v rychlé konverzi EF24 na příslušné adukty, které mají signifikantně nižší cytotoxický účinek než samotné EF24. Přímý důkaz, že i adukty EF24 s GSH jsou méně toxické než samotné EF24 nemáme.

V literatuře je zmíněno, že EF24 zesiluje svůj proapoptotický účinek prostřednictvím zvýšené exprese a sekrece ligandu FAS u buněk karcinomu vaječníků (Selvendiran *et al.*, 2007). Protože zvýšená citlivost buněk vůči vnějším proapoptotickým stimulům může být také navozena zvýšenou expresí tzv. „receptorů smrti“, tak jsme sledovali, zda látka EF24 zvyšuje expresi receptorů TRAIL-R2 a FAS u buněk K562. Z dosažených výsledků můžeme usoudit, že látka EF24 nemá významný vliv na expresi receptorů TRAIL-R2 a FAS (viz obr. č. 36; 37).

Dále jsme studovali vliv EF24 na expresi vybraných antiapoptotických proteinů z rodiny IAPs. Zaměřili jsme se pouze na dva, konkrétně survivin a XIAP, které mají podstatný význam pro přežívání řady nádorových buněk. Je známo, že survivin je exprimovaný pouze v nádorových popřípadě v embryonálních buňkách a je považován za významný faktor, který činí nádorové buňky méně citlivé vůči signálům buněčné smrti (Sah *et al.*, 2006). Exprese XIAP je komplexním způsobem propojena s dráhou transkripčního faktoru NF- κ B, kromě toho účinně inhibuje kaspasové proteasy (Galbán *et Duckett*, 2010; Deveraux *et al.*, 1997). Z výsledků je patrné, že EF24 má protichůdné účinky na expresi vybraných antiapoptotických proteinů

z rodiny IAPs, které se patrně navzájem eliminují: exprese survivinu byla překvapivě zvýšena a exprese XIAP byla snížena (viz obr. č. 38).

V předcházejících experimentech bylo prokázáno, že ABCB1 neovlivňuje citlivost leukemických buněk k EF24 (Skoupá, bakalářská práce, 2014). Proto jsme se rozhodli vyzkoušet vliv této látky také na ABCG2 transportér. Z výsledků lze usoudit, že exprese ABCG2 transportéru nezpůsobuje rezistenci u buněk K562/ABCG2/E7 vůči látce EF24 (viz obr. č. 39-42). Překvapivě byla sledována signifikantně vyšší citlivost u buněk K562/ABCG2/E7 (viz obr. č. 39-42). Hypotéza o možné kolaterální sensitivitě byla nicméně vyvrácena experimentem s K562/ABCG2/G7 buňkami, které mají podobnou expresi ABCG2 transportéru jako K562/ABCG2/E7. Výsledky u těchto buněk ukázaly srovnatelnou citlivost s kontrolními buňkami K562 (výsledky neukázány). Z dosažených výsledků je patrné, že EF24 je velmi slibnou látkou s potenciálem pro léčbu pacientů s MDR fenotypem spojeným se zvýšenou expresí ABC transportérů, protože EF24 není substrátem dvou nejdůležitějších lékových transportérů: ABCB1 (Skoupá, bakalářská práce, 2014) a ABCG2 (výsledky této práce).

7. Závěr

- Apoptosu indukovanou EF24 předchází pokles intracelulární hladiny GSH a zvýšená produkce ROS.
- NAC i GSH zamezují snížení intracelulární hladiny GSH, inhibují produkci ROS a snižují proapoptotické účinky EF24.
- Protektivní účinky NAC i GSH spočívají zejména v tom, že v jejich přítomnosti dochází k rychlé extra a intracelulární konverzi EF24 na příslušné adukty, jejichž cytotoxické účinky jsou pravděpodobně nižší.
- Prokázali jsme, že mono-adukt EF24-NAC má signifikantně nižší cytotoxické účinky než samotný EF24.
- EF24 neovlivňuje expresi receptorů TRAIL-R2 nebo FAS.
- Vliv EF24 na expresi sledovaných inhibitorů apoptosy má protichůdné účinky.
- Exprese ABCG2 neovlivňuje intracelulární hladinu EF24 a nesnižuje citlivost buněk k EF24.

8. Seznam použité literatury

Abramson, S., Miller R.G., Phillips, R.A. (1977): The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *The Journal of Experimental Medicine* (145):1567-1579

Adams, B.K., Ferstl, E.M., Davis, M.C., Herold, M., Kurtkaya, S., Camalier, R.F., Hollingshead, M.G., Kaur, G., Sausville, E.A., Rickles, F.R., Snyder, J.P., Liotta, D.C., Shoji, M. (2004): Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as ant-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (12): 3871-3883

Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Stark, G.R. (1995): p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts *Proceedings of the National Academy of Sciences* (92): 8493-8497

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G. (2006): Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology* (72): 1605-1621

Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H. (2007): Curcumin: the Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (595):1-75

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. (2000): A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* (404): 193-197

Albert, O. (1937): Turmeric (curcumin) in biliary diseases. *The Lancet* (229): 619-621

Albrecht, C., McVey, J.H., Elliott, J.I., Sardini, A., Kasza, I., Mumford, A.D., Naoumova, R.P., Tuddenham, E.G., Szabo, K., Higgins, C.F. (2005): A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood* (106): 542-549

Allen, J.D., van Loevezijn, A., Lakhai, J.M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J.H., Koomen, G.J., Schinkel, A.H. (2002): Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter *in vitro* and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Molecular Cancer Therapeutics* (1): 417-425

Almagro, M.C., Vucic, D. (2012): The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental oncology* (3): 200-211

Ammon, H.P., Wahl, M.A. (1991): Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* (57): 1-7

Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., Aggarwal, B.B. (2007): Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics* (4): 807-818

Anand, P., Thomas, S.G., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Sung, B., Tharakan, S.T., Misra, K., Priyadarsini, I.K., Rajasekharan, K.N., Aggarwal, B.B. (2008): Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical Pharmacology* (76): 1590-1611

Andrews, D.F., Singer, J.W., Collins, S.J. (1987): Effect of recombinant α -interferon on the expression of the *bcr-abl* fusion gene in human chronic myelogenous human leukemia cell lines. *Cancer Research* (47): 6629-6632

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* (281): 1305-1308

Asmana Ningrum, R. (2014): Human interferon alpha-2b: a therapeutic protein for cancer treatment. *Scientifica* (2014): 1-8

Awasthi, S., Pandya, U., Singhal, S.S., Lin, J.T., Thiviyanathan, V., Seifert, W.E., Awasthi, Y.C., Ansari, G.A. (2000): Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S transferase PI-1. *Chemico-Biological Interactions* (128): 19-38

Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Niederwieser, D., Silver, R., Hehlmann, R. (2006): Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* (108): 1809-1820

Balkwill, F., Mantovani, A. (2001): Inflammation and cancer: Back to Virchow? *The Lancet* (357): 539-545

Band, V., Hoffer, A. P., Band, H., Rhinehardt, A. E., Knapp, R. C., Matlin, S. A., Anderson, D. J. (1989): Antiproliferative effect of gossypol and its optical isomers on human reproductive cancer cell lines. *Gynecologic Oncology* (32): 273-277

Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G, Ferguson-Smith, M.A., Davies, T., Stone, M., Heisterkamp, N., Stephenson, J.R., Groffen, J. (1983): Translocation of *c-abl* oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelogenous leukemia. *Nature* (306): 277-280

Becker, A.J., McCulloch, E.A., Till, J.E. (1963): Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* (197): 452-454

- Bech-Hansen, N.T., Till, J.E., Ling, V. (1976): Pleiotropic Phenotype of Colchicine-Resistant Cho Cells: Cross-Resistance and Collateral Sensitivity. *Journal of Cellular Physiology* (88): 23-31
- Belinsky, M. G., Chen, Z. S., Shchaveleva, I., Zeng, H., Kruh, G. D. (2002): Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Research* (62): 6172-6177
- Bengmark, S. (2006): Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* (30): 45-55
- Bennett, J.H. (1845): Two cases of disease and enlargement of the spleen in which death took place from the presence of purulent material in the blood. *The Edinburgh Medical and Surgical Journal* (64): 413-423
- Bhandarkar, S. S., Arbiser, J. L. (2007): Curcumin as an inhibitor of angiogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (595): 185-195
- Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S., Aggarwal, B.B. (2002): Curcumin (diferuloylmethane) downregulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaB and IkappaB alpha kinase in human multiple myeloma cells leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* (101): 1053-1062
- Bhatia, R., Verfaillie, C. M. (1998): The effect of interferon- α on beta-1 integrin mediated adhesion and growth regulation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia & Lymphoma* (28): 241-254
- Bisht, S., Feldmann, G., Soni, S., Ravi, R., Karikar, C., Maitra, A., Maitra, A. (2007): Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for humancancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology* (17): 3-12
- Bolin, R.W., Robinson, W.A., Sutherland, J., Hamman, R.F. (1982): Busulfan versus hydroxyurea in long-term therapy of chronic myelogenous leukemia (50): 1683-1686 *Cancer*.
- Bonifácio, B.V., Silva, P.B., Ramos, M.A., Negri, K.M., Bauab, T.M., Chorilli, M. (2014): Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Journal of International Journal of Nanomedicine* (9): 1-15
- Bose, S., Panda, A. K., Mukherjee, S., Sa G. (2015): Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system. *Cell Division* (10): 6-19
- Boumendjel, A., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Perrotton, T., Di Pietro, A. (2005): Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Medicinal Research Reviews* (25): 453-472

Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R., Bates, S.E. (1999): Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Letters* (146): 117-126

Bush, J.A., Cheung, K.J. Jr., Li, G. (2001): Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Experimental Cell Research* (271): 305-314

Cantley, L.C. (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* (296):1655-1657

Caputo, A., James, M. N. G., Powers, J. C., Hudig, D., Bleackley, R. C. (1994): Conversion of the substrate specificity of mouse proteinase granzyme B. *Nature Structural & Molecular Biology* (1): 364-367

Carlesso, N., Frank, D.A., Griffin, J.D. (1996): Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *The Journal of Experimental Medicine* (183):811-820

Cascorbi, I. (2006): Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & Therapeutics* (112): 457-473

Castagnetti, F., Palandri, F., Amabile, M., Testoni, N., Luatti, S., Soverini, S., Iacobucci, I., Breccia, M., Rege Cambrin, G., Stagno, F., Specchia, G., Galieni, P., Iuliano, F., Pane, F., Saglio, G., Alimena, G., Martinelli, G., Baccarani, M., Rosti, G., GIMEMA CML Working Party (2009): Results of high-dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: a phase 2 trial of the GIMEMA CML Working Party. *Blood* (113): 3428-3434

Cildir, G., Akincilar, S.C., Tergaonkar, V. (2013): Chronic adipose tissue inflammation: All immune cells on the stage. *Trends in Molecular Medicine* (19): 487-500

Clarkson, B. D., Strife, A., Wisniewski, D., Lambek, C., Carpino, N. (1997): New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia. *Leukemia* (11): 1404-1428

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

Cooray, H.C., Janvilisri, T., van Veen, H.W., Hladky, S.B., Barrand, M.A. (2004): Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (317): 269-275

- Cortes, J.E., Talpaz, M., Giles, F., O'Brien, S., Rios, M.B., Shan, J., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Thomas, D.A., Wierda, W., Ferrajoli, A., Jeha, S., Kantarjian, H.M. (2003): Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* (101): 3794-3800
- Crook, N.E., Clem, R.J., Miller, L.K. (1993): An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology* (67): 2168–2174
- Cui, Y., König, J., Buchholz, J.K., Spring, H., Leier, I., Keppler, D. (1999): Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Molecular Pharmacology* (55): 929-937
- Daley, G.Q., Van Etten, R.A., Baltimore, D. (1990): Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 *bcr/abl* gene of the Philadelphia chromosome. *Science* (247): 824-830
- Dantzig, A.H., Shepard, R.L., Cao, J., Law, K.L., Ehlhardt, W.J., Baughman, T.M., Bumol, T.F., Starling, J.J. (1996): Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979. *Cancer Research* (56): 4171-4179
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W., Bleackley, R. C. (1995): Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* (377): 446-448
- Dassa, E., Bouige, P. (2001): The ABC or ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology* (152): 211-229
- Davidson, E.H. (2010): Emerging properties of animal gene regulatory networks. *Nature* (468): 911-920
- Dean, M., Annilo, T. (2005): Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (6): 123-142
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* (42): 1007-1017
- Deininger, M.W., O'Brien, S.G., Ford, J.M., Druker, B.J. (2003): Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *Journal of Clinical Oncology* (21): 1637-1647
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H. (1998): Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (95): 15623-15628

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* (388): 300-304

Dey, A., Tergaonkar, V., Lane, D.P. (2008): Double-edged swords as cancer therapeutics: Simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways. *Nature Reviews Drug Discovery* (7): 1031-1040

Dietrich, C. G., de Waart, D.R., Ottenhoff, R., Bootsma, A.H., van Gennip, A.H., Elferink, R.P. (2001): Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* (22): 805-811

Dohse, M., Scharenberg, C., Shukla, S., Robey, R.W., Volkmann, T., Deeken, J.F., Brendel, C., Ambudkar, S.V., Neubauer, A., Bates, S.E. (2010): Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metabolism and Disposition* (38): 1371-1380

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

Drach, J., Gsur, A., Hamilton, G., Zhao, S., Angerler, J., Fiegl, M., Zojer, N., Raderer, M., Haberl, I., Andreeff, M., Huber H. (1996): Involvement of P-glycoprotein in the Transmembrane Transport of Interleukin-2 (IL-2), IL-4, and Interferon- γ in Normal Human T-Lymphocytes. *Blood* (88): 1747-1754

Druker, B.J., Lydon, N.B. (2000): Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Investigation* (105): 3-7

Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lydon, N.B. (1996): Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. *Nature Medicine* (2): 561-566

Dyson, H. J., Komives, E. A. (2012): Role of disorder in I κ B-NF κ B interaction. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (64): 499-505

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, S., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M. (1999): The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* (341): 164-172

Elkind, N.B., Szentpétery, Z., Apáti, Á., Özvegy-Laczka, C., Várady, G., Ujhelly, O., Szabó, K., Homolya, L., Váradi, A., Buday, L., Kéri, G., Német, K., Sarkadi, B. (2005): Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib), *Cancer Research* (65): 1770-1777

- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* (391): 43-50
- Epstein, J., Sanderson, I.R., MacDonald, T.T. (2010): Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from *in vitro*, animal and human studies. *Journal of Nutrition Cambridge Journals* (103): 1545-1557
- Evers, R., Zaman, G.J., Van Deemter, L., Jansen, H., Calafat, J., Oomen, L.C., Oude Elferink RP, Borst, P., Schinkel, A.H. (1996): Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *Journal of Clinical Investigation* (97): 1211-1218
- Forkner, C.E., Scott, T.F.M. (1931): Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia. *The Journal of the American Medical Association* (97): 3-5
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. (1997): PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* (88): 435-437
- Galbán, S., Duckett, C.S. (2010): XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death & Differentiation* (17): 54-60
- Galton, D.A.G. (1953): Myleran in chronic myeloid leukemia. *Lancet* (1): 208-213
- Gambacorti-Passerini, C., le Coutre, P., Mologni, L., Fanelli, M., Bertazzoli, C., Marchesi, E., Di Nicola, M., Biondi, A., Corneo, G.M., Belotti, D., Pogliani, E., Lydon, N.B. (1997): Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR-ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells, Molecules and Diseases* (23): 380-394
- Garcia-Ruiz, C., Mari, M., Morales, A., Colell, A., Ardite, E., Fernandez-Checa, J.C. (2000): Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* (32): 56-65
- Gauthier, C., Ozvegy-Laczka, C., Szakacs, G., Sarkadi, B., Di Pietro, A. (2013): ABCG2 is not able to catalyze glutathione efflux and does not contribute to GSH-dependent collateral sensitivity. *Frontiers in Pharmacology* (4): 138-142
- Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K.H., Ulrich, W.R., Beck, J. (1995): The Leukotriene LTD4 Receptor Antagonist Mk571 Specifically Modulates MRP Associated Multidrug Resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (208): 345-352
- Germann, U.A., Shlyakhter, D., Mason, V.S., Zelle, R.E., Duffy, J.P., Galullo, V., Armistead, D.M., Saunders, J.O., Boger, J., Harding, M.W. (1997): Cellular and biochemical characterization of VX-710 as a chemosensitizer: reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *in vitro*. *Anticancer Drugs* (8): 125-410

- Ghosh, S.S., Gehr, T.W., Ghosh, S. (2014): Curcumin and chronic kidney disease (CKD): Major mode of action through stimulating endogenous intestinal alkaline phosphatase. *Molecules* (19): 20139-20156
- Goldman, J.M., Melo, J.V. (2001): Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* (344):1084-1086
- Goldman, J.M. (2007): How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood* (110): 2828-2837
- 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., Fojo, T., Bates, S.E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* (2):48-58
- Gratwohl, A., Hermans, J., Goldman, J.M., Arcese, W., Carreras, E., Devergie, A., Frassoni, F., Gahrton, G., Kolb, H.J., Niederwieser, D., Ruutu, T., Vernant, J.P., de Witte, T., Apperley, J. (1998): Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *The Lancet* (352): 1087-1092
- Gupta, S., Prasad, S., Ji, H.K., Patchva, S., Webb, L.J., Priyadarsini, K.I., Aggarwal, B.B. (2011): Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural Product Reports* (28): 1937-1955
- Hall, M.D., Handley, M.D., Gottesman, M.M. (2009): Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends in Pharmacological Sciences* (10): 546-556
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* (100): 57-70
- He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., Du, Z. (2015): Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules* (20): 9183-9213
- Hochhaus, A. (2006): Chronic myelogenous leukemia (CML): resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Annals of Oncology* (17): 274-279
- Hegedüs, T., Örfi, L., Seprödi, A., Váradi, A., Sarkadi, B., Kéri G. (2002): Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta* (1587): 318-325
- Hehlmann, R. (1988): Cytostatic therapy in chronic myelogenous leukemia: Review and perspectives. *Chronic Myelocytic Leukemia and Interferon*: 102-112

Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H.J., Pralle, H., Hossfeld, D.K., Queisser, W., Löffler, H., Hochhaus, A., Heinze, B. and the German CML Study Group (1994): Randomized comparison of interferon- α with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* (84): 4064-4077

Hipfner, D.R., Deeley, R.G., Cole, S.P. (1999): Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta* (1461): 359-376

Hoeffler, C.A., Klann, E. (2010): mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences* (33): 67-75

Hochhaus, A., Baccarani, M., Deininger, M., Apperley, J.F., Lipton, J.H., Goldberg, S.L., Corm, S., Shah, N.P., Cervantes, F., Silver, R.T., Niederwieser, D., Stone, R.M., Dombret, H., Larson, R.A., Roy, L., Hughes, T., Müller, M.C., Ezzeddine, R., Countouriotis, A.M., Kantarjian, H.M. (2008a): Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* (22):1200-1206

Hochhaus, A., Druker, B., Sawyers, C., Guilhot F, Schiffer, C.A., Cortes, J., Niederwieser, D.W., Gambacorti-Passerini, C., Stone, R.M., Goldman, J., Fischer, T., O'Brien, S.G., Reiffers, J.J., Mone, M., Krahnke, T., Talpaz, M., Kantarjian, H.M. (2008b): Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. *Blood* (111): 1039-1043

Hopper-Borge, E., Chen, Z. S., Shchaveleva, I., Belinsky, M. G., Kruh, G. D. (2004): Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Research* (64): 4927-4930

Houghton, P.J., Germain, G.S., Harwood, F.C., Schuetz, J.D. Stewart, C.F., Buchdunger, E., Traxler, P. (2004): Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 *in vitro*. *Cancer Research* (64): 2333-2337

Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N.C., Druker, B.J., Gabert, J., Grimwade, D., Hehlmann, R., Kamel-Reid, S., Lipton, J.H., Longtine, J., Martinelli, G., Saglio, G., Soverini, S., Stock, W., Goldman, J.M. (2006): Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* (108): 28-37

Hyafil, F., Vergely, C., Du Vignaud, P., Grand-Perret, T. (1993): *In vitro* and *in vivo* reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Research* (53): 4595-4602

- Chakraborty, J., Banerjee, S., Ray, P., Hossain, D.M., Bhattacharyya, S., Adhikary, A., Chattopadhyay, S., Das, T., Sa, G. (2010): Gain of cellular adaptation due to prolonged p53 impairment leads to functional switchover from p53 to p73 during DNA damage in acute myeloid leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry* (285): 33104-33112
- Chan, H.S., Haddad, G., Thorner, P.S., DeBoer, G., Lin, Y.P., Ondrusek, N., Yeger, H., Ling, V. (1991): P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine* (325): 1608-1614
- Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. (2003): Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* (17): 590-603
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., Borden, E.C. (2003): Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* (8): 237-249
- Chen, G. Q., Shi, X. G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Chen, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. (1998): Involvement of reactive oxygen species and caspase-3 activation in arsenite-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* (177): 324-333
- Choudhuri, T., Pal, S., Agwarwal, M.L., Das, T., Sa, G. (2002): Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Letters* (512): 334-340
- Choudhuri, T., Pal, S., Das, T., Sa, G. (2005): Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry* (280): 20059-20068
- Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group: Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia (1997): A meta-analysis of seven randomized trials. *Journal of the National Cancer Institute* (89): 1616-1629
- Ilaria, R.L. Jr., Van Etten, R.A. (1996): P210 and P190 (BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *The Journal of Biological Chemistry* (271): 31704-31710
- Ishikawa, T., Kuo, M.T., Furuta, K., Suzuki, M. (2000): The human multidrug resistance-associated protein (MRP) gene family: from biological function to drug molecular design. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (38): 893-897
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rügge, M.A., Hall, A., Hall, M.N. (2004): Mammalian TORcomplex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology* (6): 1122-1128

- Jagetia, G. C., Aggarwal, B. B. (2007): Spicing up of the immune system by curcumin. *Journal of Clinical Immunology* (27): 19-35
- Jatiani, S. S., Baker, S. J., Silverman, L. R., Reddy, E. P. (2010): JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders. *Genes & Cancer* (1): 979-993
- Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., Scotto, K.W. (2000): Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (97): 6775-6779
- Jonasch, E., Haluska, F. G. (2001): Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The Oncologist* (6): 34-55
- Jones, P.M., George, A.M. (2012): Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (48): 39-50
- Juliano, R. L., Ling, V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* (455): 152-162
- Kalidas, M., Kantarjian, H., Talpaz, M. (2001): Chronic myelogenous leukemia. *The Journal of the American Medical Association* (286): 895-898
- Kantarjian, H.M., Dixon, D., Keating, M.J., Talpaz, M., Walters, R.S., McCredie, K.B., Freireich, E.J. (1988): Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* (61): 1441-1446
- Kantarjian, H.M., Smith, T.L., O'Brien, S., Beran, M., Pierce, S., Talpaz, M. (1995): Prolonged survival following achievement of cytogenetic response with alpha-interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *The Leukemia service, Annals of Internal Medicine* (122): 254-261
- Kapahi, P., Takahashi, T., Natoli, G., Adams, S.R., Chen, Y., Tsien, R.Y., Karin, M. (2000): Inhibition of NF- κ B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of I κ B kinase. *The Journal of Biological Chemistry* (275): 36062- 36066
- Karunagaran, D., Rashmi, R., Kumar, T.R. (2005): Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* (5): 117-129
- Kawabata, S., Oka, M., Shiozawa, K., Tsukamoto, K., Nakatomi, K., Soda, H., Fukuda, M., Ikegami, Y., Sugahara, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Doyle, L.A., Ross, D.D., Kohno, S. (2001): Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (280): 1216-1223

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* (26): 239-257

Khurana, A., Ho, C.T. (1988): High performance liquid chromatographic analysis of curcuminoids and their photo-oxidative decomposition compounds in *curcuma longa*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (11): 2295-2304

Kim, E.K., Choi, E.J. (2010): Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* (1802): 396-405

Kikuchi, A. (2003): Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Science* (94): 225-229

Kiuchi, F., Goto, Y., Sugimoto, N., Akao, N., Kondo, K., Tsuda, Y. (1993): Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (41):1640-1643

Konig, J., Rost, D., Cui, Y., Keppler, D. (1999): Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* (29): 1156-1163

Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., de Vree, J.M., Smith, A.J., Jansen, G., Peters, G.J., Ponne, N., Scheper, R.J., Elferink, R.P., Baas, F., Borst, P. (1999): MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (96): 6914-6919

Kreimer, D.I., Chai, K.P., Ferro-Luzzi Ames, G. (2000): Nonequivalence of the nucleotide-binding subunits of an ABC transporter, the histidine permease, and conformational changes in the membrane complex. *Biochemistry* (39): 14183-14195

Kumar, R., Atlas, I. (1992): Interferon α induces the expression of retinoblastoma gene product in human Burkitt lymphoma Daudi cells: role in growth regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (89): 6599-6603

Kumar, A., Dhawan, S., Hardegen, N.J., Aggarwal, B.B. (1998): Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF) -mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor- κ B activation. *Biochemical Pharmacology* (55): 775-783

Kunchandy, E., Rao, M. N. A. (1990): Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmacology* (58): 237-240

Kunnumakkara, A.B., Anand, P., Aggarwal, B.B. (2008): Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters* (269):199-225

- Kunwar, A., Barik, A., Pandey, R., Priyadarsini, K.I. (2006): Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta* (1760): 1513-1520
- Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., George, M. C. (1985): Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Letters* (29): 197-202
- Kuttan, G., Kumar, K.B., Guruvayoorappan, C., Kuttan, R. (2007): Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (595): 173-184
- Lallès, J.P. (2014): Intestinal alkaline phosphatase: Novel functions and protective effects. *Nutrition Reviews* (72): 82-94
- Lao, C.D., Ruffin, M.T., Normolle, D., Heath, D.D., Murray, S.I., Bailey, J.M., Boggs, M.E., Crowell, J., Rock, C.L., Brenner, D.E. (2006): Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (6):10-14
- Le Bel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy S. C. (1992): Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology* (5): 227-231
- Le Coutre, P., Tassi, E., Varella-Garcia, M., Barni, R., Mologni, L., Cabrita, G., Marchesi, E., Supino, R., Gambacorti-Passerini, C. (2000): Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* (95):1758-1766
- Lee, J.H., Chung, I.K. (2010): Curcumin inhibits nuclear localization of telomerase by dissociating the Hsp90 co-chaperone p23 from hTERT. *Cancer Letters* (290): 76-86
- Lersel, M.L., Ploemen, J.P., Struik, I., van Amersfoort, C., Keyzer, A.E., Schefferlie, J.G., van Bladeren, P.J. (1996): Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by α , β -unsaturated carbonyl derivatives. *Chemico-Biological Interactions* (102): 117-132
- Li, F., Sethi, G. (2010): Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* (1805): 167-180
- Liang, Y., Yin, D., Hou, L., Zheng, T., Wang, J., Meng, X., Lu, Z., Song, X., Pan, S., Jiang, H., Liu, L. (2011): Diphenyl Difluoroketone: A Potent Chemotherapy Candidate for Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* (6): 23908
- Lin, J.K. (2004): Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible action mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Archives of Pharmacal Research Journal* (27): 683-692
- Lin, J.K. (2007): Molecular targets of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (595): 227-243

Ling, V. (1997): Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (40): 3-8

Liontas, A., Yeger, H. (2004): Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. *Anticancer Research* (24): 987-998

Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E. (2001): From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences* (58): 931-959

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J. (2009): Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* (8): 627-644

Liu, H., Liang, Y., Wang, L., Tian, L., Song, R., Han, T., Pan, S., Liu, L. (2012): *In vivo* and *in vitro* suppression of hepatocellular carcinoma by EF24, a curcumin analog. *Public Library of Science One* (7): e48075

Liu, R., Sharom, F.J. (1996): Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry* (35): 11865-11873

Locher, K. P. (2009): Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* (364): 239-245

Lu, L., Saunders, V.A., Leclercq, T.M., Hughes, T.P., White, D.L. (2015): Ponatinib is not transported by ABCB1, ABCG2 or OCT-1 in CML cells. *Leukemia* (29): 1792-1794

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

Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R.C. (2006): Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences* (78): 2081-2087

Mahon, F.X., Deininger, M.W.N., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M., Melo, J.V. (2000): Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* (96):1070-1079

Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., Schellens, J.H. (2001): Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research* (61): 3458-3464

Maliepaard, M., van Gastelen, M.A., de Jong, L.A., Pluim, D., van Waardenburg, R.C., Ruevekamp-Helmers, M.C., Floot, B.G., Schellens, J.H. (1999): Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Research* (59): 4559-4563

Manning, B.D., Cantley, L.C. (2007): AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* (129): 1261-1274

Mans, D. R. A., Da Rocha, A. B., Schwartzmann, G. (2000): Anticancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* (5): 185-198

Marin, D., Milojkovic, D., Olavarria, E., Khorashad, J.S., de Lavallade, H., Reid, A.G., Foroni, L., Rezvani, K., Bua, M., Dazzi, F., Pavlu, J., Klammer, M., Kaeda, J.S., Goldman, J.M., Apperley, J.F. (2008): European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood* (112): 4437-4444

Marktél, S., Marin, D., Foot, N., Szydlo, R., Bua, M., Karadimitris, A., De Melo, V.A., Kotzampaliris, P., Dazzi, F., Rahemtulla, A., Olavarria, E., Apperley, J.F., Goldman, J.M. (2003): Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica* (88): 260-267

Maximow, A. (1909): Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugtiere. *Folia haematologica* (8): 125-134

Mayer, I.A., Verma, A., Grumbach, I.M., Uddin, S., Lekmine, F., Ravandi, F., Majchrzak, B., Fujita, S., Fish, E.N., Plataniias, L.C. (2001): The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon- α in BCR-ABL-expressing cells. *The Journal of Biological Chemistry* (276): 28570-28577

Mechetner, E.B., Roninson, I.B. (1992): Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (89): 5824-5828

Melo, J.V. (1996): The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* (88): 2375-2384

Melo, J.V., Deininger, M.W.N. (2004): Biology of chronic myelogenous leukemia-signaling pathways of initiation and transformation. *Hematology/Oncology Clinics of North America* (18): 545-568

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 Research* (59): 8-13

- Mo, W., Zhang, J. T. (2012): Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (3): 1-27
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J. C., Butcher, G. W., Hammerling, G. J., Neefjes J. J. (1994): Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* (367): 648-651
- Mukhopadhyay, A., Bueso-Ramos, C., Chatterjee, D., Pantazis, P., Aggarwal, B.B. (2001): Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* (20): 7597-7609
- Naito, M., Matsuba, Y., Sato, S., Hirata, H., Tsuruo, T. (2002): MS-209, a quinoline-type reversal agent, potentiates antitumor efficacy of docetaxel in multidrug-resistant solid tumor xenograft models. *Clinical Cancer Research* (8): 582-588
- Nowell, P.C., Hungerford, D.A. (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* (132):1497- 500
- O'Dwyer, M. (2002): Multifaceted approach to the treatment of Bcr-Abl-positive leukemias. *Oncologist* (7):30- 8
- O'Hare, T., Shakespeare, W.C., Zhu, X., Eide, C.A., Rivera, V.M., Wang, F., Adrian, L.T., Zhou, T., Huang, W.S., Xu, Q., Metcalf, C.A., Tyner, J.W., Loriaux, M.M., Corbin, A.S., Wardwell, S., Ning, Y., Keats, J.A., Wang, Y., Sundaramoorthi, R., Thomas, M., Zhou, D., Snodgrass, J., Commodore, L., Sawyer, T.K., Dalgarno, D.C., Deininger, M.W., Druker, B.J., Clackson, T. (2009): AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* (16): 401-412
- Obexer, P., Ausserlechner, M. J. (2014): X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein-A Critical Death Resistance Regulator and Therapeutic Target for Personalized Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* (4): 197-205
- Ono, M., Higuchi, T., Takeshima, M., Chen, C., Nakano, S. (2013): Differential anti-tumor activities of curcumin against Ras- and Src-activated human adenocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (436): 186-191
- Ozvegy-Laczka, C., Cserepes, J., Elkind, N. B., Sarkadi, B. (2005): Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates* (8): 15-26
- Ozvegy-Laczka, C., Hegedus, T., Varady, G., Ujhelly, O., Schuetz, J.D., Varadi, A., Keri, G., Orfi, L., Nemet, K., Sarkadi, B. (2004): High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Molecular Pharmacology* (65): 1485-1495

Ozvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A., Sarkadi, B. (2001): Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (285): 111-117

Pan, L., Chai, H. B., Kinghorn, A. D. (2012): Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Frontiers in Bioscience* (4): 142-156

Passegué, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E., Weissman, I.L. (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1): 11842-11849

Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L.M., Tozzi, G., Federici, G. (2001): Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clinical Chemistry* (47): 1467-1469

Paulusma, C. C., Bosma, P.J., Zaman, G.J., Bakker, C.T., Otter, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Borst, P., Oude Elferink, R.P. (1996): Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* (271): 1126-1128

Pendergast, A.M., Müller, 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

Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J. Schlessinger, J., Gishizky, M.L. (1993): *bcr-abl*-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* (75): 175-185

Peng, H., Dong, Z., Qi, J., Yang, Y., Liu, Y., Li, Z., Xu, J., Zhang, J.T. (2009): A Novel Two Mode-Acting Inhibitor of ABCG2-Mediated Multidrug Transport and Resistance in Cancer Chemotherapy. *PLoS ONE* (4): e5676

Peschel, C., Aulitzky, W.E., Huber, C. (1996): Influence of interferon- α on cytokine expression by the bone marrow microenvironment-impact on treatment of myeloproliferative disorders. *Leukemia & Lymphoma* (22): 129-134

Pohl, A., Devaux, P.F., Herrmann, A. (2005): Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta* (1733): 29-52

Price, L.C., Buescher, R.W. (1997): Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. *Journal of Food Science and Technology* (62): 267-269

Priyadarsini, K.I. (2009): Photophysics, Photochemistry and Photobiology of Curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C* (10): 81-96

- Pluchino, K.M., Hall, M.D., Goldsborough, A.S., Callaghan, R., Gottesman, M.M. (2012): Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug Resistance Updates* (15): 98-105
- Qadir, M., O'Loughlin, K.L., Fricke, S.M., Williamson, N.A., Greco, W.R., Minderman, H., Baer, M.R. (2005): Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clinical Cancer Research* (11): 2320-2326
- Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H.M., Cortes, J.E. (2009): Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control Journal* (16):122-131
- Quinton, P.M. (1999): Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiological Reviews* (79): 3-22
- Rabindran, S.K., Ross, D.D., Doyle, L.A., Yang, W., Greenberger, L.M. (2000): Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Research* (60): 47-50
- Rieger, M.A., Schroeder, T. (2012): Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (4): 1943-1964
- 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): 817-823
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* (245): 1066-1073
- Rees, D. C., Johnson, E., Lewinson, O. (2009): ABC transporters: The power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (10): 218-227
- Ren R. (2005): Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews Cancer* (5):172-183
- Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B., Diederich, M. (2008): Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochemical Pharmacology* (76): 1340-1351
- Robey, R.W., Polgar, O., Deeken, J., To, K.W., Bates, S.E. (2007): ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* (26): 39-57
- Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., Bates, S.E. (2004): Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Research* (64): 1242-1246

Roe, M., Folkes, A., Ashworth, P., Brumwell, J., Chima, L., Hunjan, S., Pretswell, I., Dangerfield, W., Ryder, H., Charlton, P. (1999): Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (9): 595-600

Ross, D.D., Karp, J.E., Chen, T.T., Doyle, L.A. (2000): Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* (96): 365-368

Rowley, J.D. (1973): Letter: a new consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* (243): 290-293

Rudkowska, I., Jones, P. J. H. (2008): Polymorphisms in Abcg5/G8 transporters linked to hypercholesterolemia and gallstone disease. *International Life Sciences Institute* (42): 343-348

Sah, N.K., Khan, Z., Khan, G.J., Bisen, P.S. (2006): Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters* (244): 164-171

Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Németh, K., Váradi, A. (2004): ABCG2-a transporter for all seasons. *FEBS Letters* (567): 116-120

Sawyers, C.L. (1999): Chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* (340):1330-1340

Selleri, C., Sato, T., Del Vecchio, L., Luciano, L., Barrett, A.J., Rotoli, B., Young, N.S., Maciejewski, J.P. (1997): Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon- α in chronic myelogenous leukemia. *Blood* (89): 957-964

Sehgal, A., Kumar, M., Jain, M., Dhawan, D.K. (2011): Combined effects of curcumin and piperine in ameliorating benzo (a) pyrene induced DNA damage. *Food and Chemical Toxicology* (49): 3002-3006

Semenza, G.L. (2013): HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *Journal of Clinical Investigation* (123): 3664-3671

Sen, G.S., Mohanty, S., Hossain, D.M., Bhattacharyya, S., Banerjee, S., Chakraborty, J., Saha, S., Ray, P., Bhattacharjee, P., Mandal, D., Bhattacharya, A., Chattopadhyay, S., Das, T., Sa, G. (2011): Curcumin enhances the efficacy of chemotherapy by tailoring p65NF κ B-p300 cross-talk in favor of p53-p300 in breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry* (286): 42232-42247

Sethi, G., Shanmugam, M.K., Ramachandran, L., Kumar, A.P., Tergaonkar, V. (2012): Multifaceted link between cancer and inflammation. *Bioscience Reports* (32): 1-15

- Sethi, G., Tergaonkar, V. (2009): Potential pharmacological control of the NF-kappaB pathway. *Trends in Pharmacological Sciences* (30): 313-321
- Shah, N.P., Tran, C., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., Sawyers, C.L. (2004): Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* (305): 399-401
- Shanmugam, M. K., Rane, G., Kanchi, M. M., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., Tan, B. K. H., Kumar, A. P., Seth, G. (2015): The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules* (20): 2728-2769
- Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F.F., Riccioni, R., Rosenauer, A., Davison, K., Lamph, W.W., Waxman, S., Pelicci, P.G., Lo Coco, F., Avvisati, G., Testa, U., Peschle, C., Gambacorti-Passerini, C., Nervi, C., Miller, W.H. Jr. (1998): Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR α protein in acute promyelocytic leukemia cells. *Journal of the National Cancer Institute* (90):124-133
- Sharma, O.P. (1976): Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical Pharmacology* (25): 1811-1812
- Sharom, F. J. (2008): ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* (9): 105-127
- Shehzad, A., Lee, Y.S. (2013): Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors* (39): 27-36
- Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L., Ling, V. (2004): The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biology* (5): 15-22
- Shi, G.Y., Jia, P.M., Liu, M.M., He, K.L., Niu, C., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Paul, P., Naoe, T., Kitamura, K., Miller, W., Waxman, S., Wang, Z.Y., de The, H., Chen, S.J., Chen, Z. (1997): Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* (89): 3345-3353
- Shishodia, S., Singh, T., Chaturvedi, M.M. (2007): Modulation of transcription factors by curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (595): 127-148
- Shukla, S., Ohnuma, S., Ambudkar, S.V. (2011): Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Current Drug Targets* (12): 621-630
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B., Kuriyan, J. (2000): Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* (289):1938-1942
- Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (5): 343-354

Schraufstatter, E., Bernt, H. (1949): Antibacterial action of curcumin and related compounds. *Nature* (164): 456-457

Sikora, E., Scapagnini, G., Barbagallo, M. (2010): Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immunity & Ageing* (7): 1-4

Singh, S.; Aggarwal, B. (1995): Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (Diferuloylmethane). *The Journal of Biological Chemistry* (270): 24995-25000

Slater, L.M., Sweet, P., Stupecky, M., Gupta, S. (1986): Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia *in vitro*. *Journal of Clinical Investigation* (77): 1405-1408

Siveen, K.S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A.P., Tan, B.K., Sethi, G., Bishayee, A. (2014): Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* (1845): 136-154

Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M.Z., Wen, S.C., Zon, G., Gewirtz, A.M., Perussia, B., Calabretta, B. (1995): Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR-ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosomepositive cells. *Blood* (86):726-736

Skovsgaard, T. (1978). Mechanism of cross-resistance between vincristine and daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Research* (38): 4722-4732

Spiers, A.S., Bain, B.J., Tumer, J.E. (1977): The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia: study of 50 untreated Philadelphia-positive cases. *Scandinavian journal of haematology* (18): 25-38

Srimal, R. C., Dhawan, B. N. (1973): Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (25): 447-452

Stein, U., Lage, H., Jordan, A., Walther, W., Bates, S.E., Litman, T., Hohenberger, P., Dietel, M. (2002): Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells. *International Journal of Cancer* (97): 751-760

Strautnieks, S. S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Németh, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., Thompson, R.J. (1998): A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature Genetics* (20): 233-238

Srivastava, R.K., Chen, Q., Siddiqui, I., Sarva, K., Shankar, S. (2007): Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). *Cell Cycle* (6): 2953-2961

Stavrovskaya, A.A. (2000): Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* (65): 95-106

Stefková, J., Poledne, R., Hubáček, J.A. (2004): ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiological Research* (5): 235-243

Subramaniam, P.S., Cruz, P.E., Hobeika, A.C., Johnson, H.M. (1998): Type I interferon induction of the Cdk-inhibitor p21WAF1 is accompanied by ordered G1 arrest, differentiation and apoptosis of the Daudi B-cell line. *Oncogene* (16): 1885-1890

Subramaniam, D., May, R., Sureban, S. M., Lee, K. B., George, R., Kuppusamy, P., Ramanujam, R. P., Hideg, K., Dieckgraefe, B. K., Houchen, C. W., Anant, S. (2008): Diphenyl difluoroketone: a curcumin derivative with potent *in vivo* anticancer activity. *Cancer Research* (68): 1962-1969

Sun, A., Lu, Y.J., Hu, H., Shoji, M., Liotta, D.C., Snyder, J.P. (2009): Curcumin analog cytotoxicity against breast cancer cells: exploitation of a redox-dependent mechanism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (19): 6627-6631

Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., Gottesman, M.M. (2006): Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* (3): 219-234

Tabcharani, J. A., Chang, X. B., Riordan, J. R., Hanrahan, J. W. (1991): Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* (352): 628-631

Talpaz, M., McCredie, K.B., Mavligit, G.M., Gutterman, J.U. (1983): Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* (62): 689-692

Tarling, E.J., de Aguiar Vallim, T.Q., Edwards, P.A. (2013): Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol Metab.* (24): 342-350

Thiesing, J.T., Ohno-Jones, S., Kolibaba, K.S., Druker, B.J. (2000): Efficacy of STI571, an Abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against Bcr-Abl-positive cells. *Blood* (96): 3195-3199

To, K. K., Polgar, O., Huff, L.M., Morisaki, K., Bates, S. E. (2008): Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells. *Molecular Cancer Research* (6): 151-164

- 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 Research* (66): 5790-5797
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G., Weissman, I. L. (2000): *Science* (290): 2152-2154
- Tsuji, M., DuBois, R.N. (1995): Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* (83): 493-501
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981): Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research* (41): 1967-1972
- Tsvetkov, P., Asher, G., Reiss, V., Shaul, Y., Sachs, L., Lotem, J. (2005): Inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (102): 5535-5540
- Tuorkey, M.J., (2014): Curcumin a potent cancer preventive agent: Mechanisms of cancer cell killing. *Interventional Medicine and Applied Science* (6):139-146
- Turner, J.G., Gump, J.L., Zhang, C., Cook, J.M., Marchion, D., Hazlehurst, L., Munster, P., Schell, M.J., Dalton, W.S., Sullivan, D.M. (2006): ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood* (108): 3881-3889
- Twentyman, P.R., Bleehen, N.M. (1991): Resistance modification by PSC-833, a novel nonimmunosuppressive cyclosporin. *European Journal of Cancer* (27): 1639-1642
- Van der Kuip, H., Moehring, A., Wohlbold, L., Miething, C., Duyster, J., Aulitzky, W.E. (2004): Imatinib mesylate (STI571) prevents the mutator phenotype of BCR-ABL in hematopoietic cell lines. *Leukemia Research* (28): 405-408
- Van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Friezsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., Van Meer, G. (1996): MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* (87): 507-517
- Vardiman, J.W. (2009): Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. *American Journal of Clinical Pathology* (132): 250-60

Vaxillaire, M., Dechaume, A., Busiah, K., Cavé, H., Pereira, S., Scharfmann, R., Perez de Nanclares, G., Castano, L., Froguel, P., Polak, M., the SUR1-Neonatal Diabetes Study Group (2007): Brief Report New ABCC8 Mutations in Relapsing Neonatal Diabetes and Clinical Features. *Diabetes* (56): 1737-1741

Virchow, R. (1845): Weisess blut. *Froiep's Notizen* (36):151-156

Virchow, R. (1865): Gesammelte abhandlugen zur wissenschaftlichen medizin. Die Leukaemie:190-211

Vogel, H. A., Pelletier, J. (1815): Examen chimique de la racine de curcuma. *Journal de Pharmacie* (1): 289-300

von Bubnoff, N., Duyster, (2010): Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Deutsches Ärzteblatt International* (107):114-211

Wang, Y. S., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Bordens, R., Wyss, D. F. (2002): Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews* (54): 547-570

Weisberg, E., Manley, P.W., Breitenstein, W., Brügggen, 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

Weng, K., Xie, X., Qiu, G., Gu, W. (2012): Clinical reagents of GM-CSF and IFN- α induce the generation of functional chronic myeloid leukemia dendritic cells *in vitro*. *Cytotechnology* (64): 75-81

Widmer, N., Rumpold, H., Untergasser, G., Fayet, A., Buclin, T., Decosterd, L.A. (2007): Resistance reversal by RNAi silencing of MDR1 in CML cells associated with increase in imatinib intracellular levels. *Leukemia* (21): 1561-1562

Wierdl, M., Wall, A., Morton, C.L., Sampath, J., Danks, M.K., Schuetz, J.D., Potter, P.M. (2003): Carboxylesterase-mediated sensitization of human tumor cells to CPT-11 cannot override ABCG2-mediated drug resistance. *Molecular Pharmacology* (64): 279-288

Wodarz, A., Nusse, R. (1998): Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (14): 59-88

Yuan, J., Horvitz, H. R. (1992): The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* (116): 309-320

Zhang, X., Hao, J. (2015): Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling. *American Journal of Cancer Research* (5): 2344-2360

Zhang, X., Chen, Q., Wang, Y., Peng, W., Cai H. (2014): Effects of curcumin on ion channels and transporters. *Frontiers in Physiology* (5): 94-99

Zou, X., Calame, K. (1999): Signaling pathways activated by oncogenic forms of Abl tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry* (274): 18141-18144

9. Seznam použitých zkratk a symbolů

ABC transportéry	ATP binding cassette transporters
<i>abl</i>	Abelson Murine Leukemia Virus
Ac-DEVD-AMC	acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl kumarin
Apaf 1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP	adenosintrifosfát
<i>bcr</i>	breakpoint cluster region
<i>bcr-abl</i>	fúzní leukemický gen
BCRP, ABCG2	breast cancer resistance protein
Cdc	cell division cycle
CDKs	cyklin dependentní kinasy
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator (transmembránový regulátor na cystickou fibrózu)
CK1 α	casein kinase 1 α
CML	chronická myeloidní leukémie
COX-2	cyklooxygenasa-2
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
DCHF-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetát
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EF24	3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on
ELAM-1	endoteliální adhezní molekuly leukocytů-1
FDA	The Food and Drug Administration USA
FGF	fibroblastový růstový faktor
FISH	fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizaci
GAPS	GTPase-Activating Proteins
GDP	guanosindifosfát
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 β
GSH	glutathion
GTP	guanosintrifosfát
Hsp90	Heat shock protein 90
hTERT	telomerasa

HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α
ICAM -1	intracelulární adhezní molekuly-1
IFN- α	interferon- α
I κ B	inhibitor-kappaB
IKK	I κ B kinasa
IL-6 (1)	interleukin-6 (1)
ILP-2	IAP-like protein-2
iNOS	inducible nitric oxide synthase (inducibilní syntasa oxidu dusnatého)
JAK-STAT	Janusova tyrosinkinasa-signal transducer and activation of transcription
LC/MS	liquid chromatography/mass spectrometry
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinasy
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MDR	multidrug resistance (mnohočetná léková rezistence)
MDR1, ABCB1, P-gp	P-glycoprotein
MMPs	matrixové metaloproteinasy
MRP1, ABCC1	multidrug resistance protein 1
mTOR	mechanistic target of rapamycin
mTORC1 (2)	mTORcomplex1 (2)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NAC	N-acetylcystein
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NBDs	nucleotid binding domains (nukleotid vázající domény)
NF- κ B	nuclear factor-kappaB
NK buňky	natural killer cells
OA	oxid arsenitý
PBS	phosphate buffered saline
PKD1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K/Akt	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIP2	fosfatidylinositol-(4,5)-difosfát
PIP3	fosfatidyl-inositol-3-fosfát
PML/RAR α	promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α

pRb	retinoblastomový protein
PTEN	phosphatase and tensin homolog
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverzní transkripci spojenou s polymerasovou reakcí
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného
siRNA	small interfering RNA
SOS	Son of Sevenless
STAT	signal transducer and activator of transcription
SH2	Src homology 2
SUR	sulfonylurea receptor
TF	tkáňový faktor
TKIs	tyrosinkinasové inhibitory
TMDs	transmembránové domény
TNF- α	tumor necrosis factor- α (tumor nekrotizující faktor- α)
Tsc1/Tsc2	tuberous sclerosis heterodimer
TRAIL-R2	TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 2
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulární endoteliální růstový faktor)
Wnt/ β -katenin	Wingless/ β -katenin
XIAPs	X-vázané inhibitory apoptosy