

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Nikola Skoupá

Univerzita Palackého v Olomouci

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Inhibice NF–kappaB analogem kurkuminu u
BCR–ABL pozitivních buněk. Interakce
kurkuminu s ABC transportéry.**

Bakalářská práce

Nikola Skoupá

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

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

V Olomouci dne 7.5. 2014

.....

Děkuji doc. RNDr. Petru Mlejnkovi, Ph.D. za umožnění vypracování experimentální části bakalářské práce v laboratoři Ústavu biologie lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a dále za jeho odborné vedení, trpělivost a cenné rady. Poděkování patří i RNDr. Petru Doleželovi, Mgr. Romaně Bukvové a všem dalším spolupracovníkům za ochotnou spolupráci a za vytvoření přátelské atmosféry.

Shrnutí

Kurkumin je přírodní látka, kterou můžeme izolovat z oddenků rostliny kurkumy dlouhé (*Curcuma Longa*). U kurkuminu byly prokázány různé pozitivní účinky na lidský organismus. Významný vliv byl prokázán při působení na nádorové buňky. Negativní vlastností kurkuminu je jeho špatná biologická dostupnost v těle. Z tohoto důvodu se začalo zkoumat, jak jeho účinnost v těle zvýšit. Významná byla tvorba strukturních analogů kurkuminu. Vytvořením strukturního analogu EF24 [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) hepta-1,6-dien-3,5-dion] bylo dosaženo velmi pozitivních výsledků v oblasti léčby nádorových onemocnění. Tato bakalářská práce pojednává o působení látky EF24 na buňky chronické myeloidní leukémie u mateřské buněčné linie K562 a u odvozených buněčných linií K562/DOX a K562/HHT. Tyto odvozené buněčné linie mají fenotyp mnohočetné lékové rezistence díky zvýšené expresi P-glykoproteinu. Bylo prokázáno, že látka EF24 inhibuje proliferaci a viabilitu buněk, indukuje buněčnou smrt s morfologickými a biochemickými znaky apoptosy a nezpůsobuje blokaci v G1/S fázi a G2/M fázi buněčného cyklu. Zároveň se ukázalo, že exprese P-glykoproteinu neovlivňuje citlivost buněk vůči látce EF24.

Summary

Curcumin is a natural substance that can be isolated from the rhizomes of turmeric (*Curcuma Longa*). For curcumin were demonstrated various positive effects on the human body. Significant effect was demonstrated when exposed to tumor cells. The negative properties of curcumin is its poor bioavailability in the body. Therefore begun to explore how its efficacy in the body to increase. Appropriate was the formation of structural analogues of curcumin. Very positive results in the treatment of cancer was achieved by developing a structural analogue EF24 [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione]. This thesis deals with the effects of the substance EF24 on the cells of chronic myelogenous leukemia in the parent cell line K562 and derived cell lines K562/DOX and K562/HHT. These derived cell lines have a phenotype of multidrug resistance due to overexpression of P-glycoprotein. It has been shown that the substance EF24 inhibits proliferation and cell viability, induces cell death with morfological and biochemical hallmarks and causes blockage in the G1/S phase and G2/M phase of the cell cycle. It also showed that the expression of P-glycoprotein does not affect the sensitivity of the cells to the substance EF24.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Současný stav řešené problematiky.....	10
2.1 Kurkumin a jeho analog difenyl difluoroketon.....	10
2.1.1 Historie kurkuminu	10
2.1.2 Využití.....	12
2.1.3 Výskyt a složení kurkuminu	12
2.1.4 Působení kurkuminu na molekulární úrovni.....	12
2.1.5 NF–kappaB.....	13
2.1.6 Vliv kurkuminu na růstové faktory, angiogenezi a apoptosu	15
2.1.7 Metabolismus kurkuminu	15
2.1.8 Strukturní analog kurkuminu EF24	16
2.2 ABC transportéry.....	22
2.2.1 Struktura ABC transportérů	22
2.2.2 Funkční mechanismus ABC transportérů	23
2.2.3 Skladba ABC transportérů u člověka	24
2.2.4 Porucha funkce ABC transportérů u člověka	27
2.2.5 Podrodiny ABC transportérů podílející se na vzniku mnohočetné lékové rezistence.....	27
2.2.6 Inhibice ABC transportérů.....	30
3. Cíle práce.....	32
4. Materiál a metodika.....	33
4.1 Buněčné linie.....	33
4.2 Chemikálie a roztoky.....	34
4.3 Použité přístroje	34
4.4 Stanovení buněčné proliferace a viability	34
4.5 Stanovení počtu apoptotických buněk.....	35
4.6 Buněčný cyklus	36
4.7 Určení počtu živých a mrtvých buněk.....	36
4.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové	37
4.9 Detekce kaspasové aktivity	37
5. Výsledky.....	39
5.1 Vliv látky EF24 na proliferaci a viabilitu	39
5.2 Vliv látky EF24 na buněčný cyklus	40

5.3	Vliv látky EF24 na morfologii jader	47
5.4	Analýza kaspasové aktivity po působení látky EF24	50
6.	Diskuse	52
7.	Závěr	54
8.	Seznam použité literatury	55
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů	70

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí lidí na celém světě. Pod pojmem nádorové onemocnění se ukrývá mnoho variant této choroby. Existují jak pevné nádory (nádory prsu, varlat,...) tak nádory postihující krvetvornou tkáň (leukémie). Příčiny vzniku souvisí s mutacemi na úrovni DNA.

Leukémie je nádorové onemocnění, které postihuje kmenové krvetvorné buňky. Krevní buňky se nekontrolovatelně množí a vyplavují se z kostní dřeně do periferní krve a poté do celého těla. Nádorové krvinky přestávají plnit svou funkci v těle a ukládají se v různých orgánech (například ve slezině, játrech, plicích).

Podle rychlosti průběhu onemocnění dělíme leukémie na akutní (rychlý průběh) a chronickou (pomalý průběh, často diagnostikovány náhodně). Podle toho, který typ buněk je postižen nádorovým onemocněním, rozlišujeme myeloidní (postihuje granulocyty, monocyty) a lymfatickou leukémii (postihuje lymfocyty).

Buňky chronické myeloidní leukémie jsou typické výskytem tzv. Filadelfského chromosomu, který vzniká reciprokní translokací regionu genů z chromosomu 9 (přítomen gen *ABL*, Abelson Murine Leukemia Virus) na chromosom 22 (přítomen gen *BCR*, breakpoint cluster region). Vzniká fúzní onkogen *BCR-ABL*.

V oblasti léčby leukemických onemocnění můžeme sledovat v průběhu posledních několika let obrovské pokroky. Začaly se používat léky nové generace, které jsou cíleně uzpůsobené proti nádorovým buňkám – např. tyrosin kinasové inhibitory (TKIs). Problémem je, že se nemoc po určité době opět vrací. Příčinou je vznik rezistence.

Rezistence vzniká nejčastěji díky mutaci v *ABL* kinasové doméně. Jinou příčinou je amplifikace *BCR-ABL* genu. Dalším z faktorů je zvýšená exprese lékových transportérů (ABC transportérů) u nádorových buněk, což vede ke vzniku mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance, MDR). MDR se projevuje sníženou citlivostí nádorových buněk vůči celé řadě cytotoxických léčiv. Nejnovější léčiva jsou významná pro léčbu nádorových onemocnění, ale je stále nutné hledat nová a účinnější léčiva.

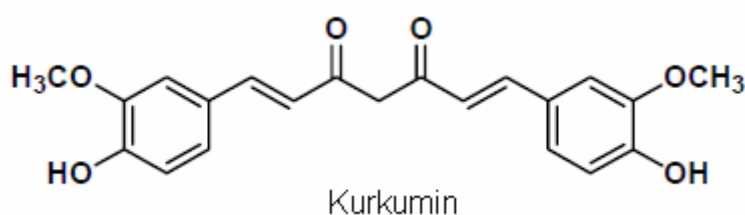
Jednou z možných alternativ jak cíleně působit proti nádorovým buňkám, je využití látek, které inhibují dráhu transkripčního faktoru NF- κ B. Pro buňky chronické myeloidní leukémie je tato signální dráha nepostradatelná a je pro ně typická její deregulace, což vede k danému onemocnění. Léčiva, která inhibují tuto dráhu mohou být výrazně přínosná pro léčbu nádorových onemocnění. Mezi tyto látky řadíme

například strukturní analog kurkuminu – EF24 [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) hepta-1,6-dien-3,5-dion]. Tato bakalářská práce se zabývá analogem kurkuminu – látkou EF24 a jejím vlivem na buňky chronické myeloidní leukémie.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Kurkumin a jeho analog difenyl difluoroketon

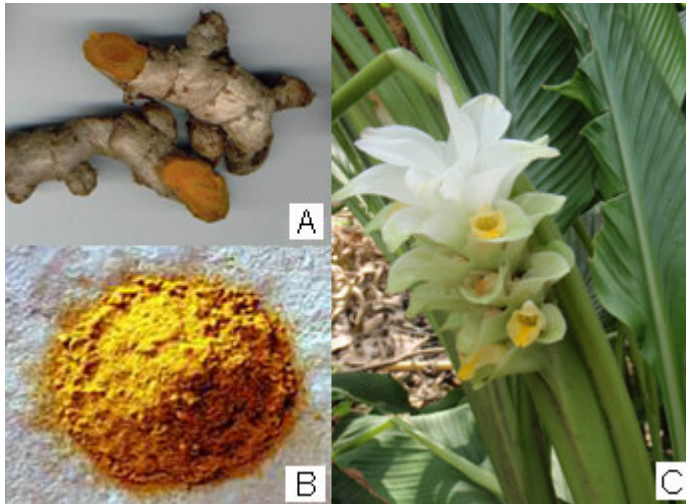
Vědci se již řadu let snaží nacházet nová a účinnější léčiva proti nádorovým onemocněním. Mimo jiné nacházejí také inspiraci v přírodních látkách – fytochemikáliích. Nicméně účinky těchto látek nebývají většinou zcela dokonalé, proto je snahou zvýšit pozitivní vlastnosti těchto látek. S postupným vývojem vědy farmakologové vytvářejí stále dokonalejší léčiva na základě fytochemikálií, u nichž se snaží potlačit nežádoucí účinky a zvýšit účinky pozitivní (Ohori *et al.*, 2006 – Surh, 2003). Mezi fytochemikálie tohoto typu řadíme i kurkumin.



Obr. č. 1: Chemická struktura kurkuminu – (1E,6E) 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) hepta-1,6-dien-3,5-dion (podle Basnet *et Skalko-Basnet*, 2011).

2.1.1 Historie kurkuminu

Kurkumin se získává mletím sušených oddenků z rostliny kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*) z rodiny zázvorovitých (*Zingiberaceae*) (Oyagbemi *et al.*, 2009 – Jagetia *et al.*, 2007) (viz obr. č. 1). Kurkuma dlouhá roste v tropickém pásu zejména v Indii. Dorůstá výšky asi 100 cm a patří mezi vytrvalé rostliny. Má podlouhlé vejčité listy, oválné podlouhlé oddenky a kvete bíle (Basnet *et Skalko-Basnet*, 2011). Kurkuminoidy (směs látek obsahující mimo jiné právě kurkumin) jsou obsaženy i v jiných rodech kurkumy (*Curcuma mangga*, *Curcuma aromatica* apod.), ale hlavním producentem kurkuminu je kurkuma dlouhá (Basnet *et Skalko-Basnet*, 2011) (viz obr. č. 2).



Obr. č. 2: Kurkuma dlouhá. A – Oddenky kurkumy dlouhé, B – získaný prášek po namletí sušených oddenků, C – *Curcuma longa* (podle Basnet et Skalko–Basnet, 2011; <http://www.inriodulce.com/links/Turmeric.html>).

Kurkumin byl mnoho staletí využíván v tradiční čínské a indické medicíně. První publikovaný vědecký článek, který se zmínil o kurkuminu, vyšel v roce 1748 (Basnet et Skalko–Basnet, 2011). Tuto látku poprvé izolovali v nečisté formě roku 1815 H. A. Vogel a J. Pelletier. Žlutou hmotu, kterou získali z kořenů kurkumy dlouhé, pojmenovali kurkumin (Gupta et al., 2012 – Vogel, H.A. et Pelletier, 1815). Později bylo zjištěno, že hmota navíc obsahuje pryskyřici a tumerický olej. V roce 1842 A. Vogel ml. získal čistý kurkumin (Gupta et al., 2012 – Vogel, A., 1842).

V roce 1910 J. Milobedzka a V. Lampe určili chemickou strukturu kurkuminu – diferuloylmethan neboli (1E,6E) 1,7–bis(4–hydroxy–3–methoxyfenyl) hepta–1,6–dien–3,5–dion (Gupta et al., 2012 – Milobedzka et al., 1910) (viz obr. č. 1). Roku 1913 stejná skupina vědců přišla na to, jak syntetizovat tuto sloučeninu (Gupta et al., 2012 – Lampe et Milobedzka, 1913). První publikace o využití kurkuminu jako léčiva vyšla roku 1937 (Zhou et al., 2011 – Albert, 1937). Studie za posledních 60 let dokazují celou řadu pozitivních účinků kurkuminu. Byly prokázány jeho účinky protinádorové, proapoptické, antiproliferační (Gupta et al., 2012 – Kuttan et al., 1985), antioxidantní (Oyagbemi et al., 2009 – Sharma, O.P., 1976; Kunchandy et al., 1990), protizánětlivé (Oyagbemi et al., 2009 – Srimal et al., 1973), antibakteriální (Gupta et al., 2012 – Schraufstatter et al., 1949), antiparazitické, antimykotické a antivirové.

2.1.2 Využití

Zájem o kurkumin se rok od roku zvyšuje nejen ve výzkumu léčiv, ale i v řadě dalších průmyslových odvětví. Výhodou je, že je snadno dostupný a není příliš drahý. Používá se nejčastěji v potravinářském průmyslu jako aroma, konzervační nebo barvicí činidlo (například v hořčici, margarínu, různých nápojích). Kurkumin je bezpečné barvivo a má podle mezinárodního číslování kód E100. Dále se kurkumin používá jako žlutá složka koření kari a přidává se do čaje. Rovněž se využívá v kosmetice (Basnet *et* Skalko–Basnet, 2011). U kurkuminu nebyly zjištěny žádné toxické nebo závažnější nežádoucí vedlejší účinky (Basnet *et* Skalko–Basnet, 2011 – Chainani–Wu, 2003).

2.1.3 Výskyt a složení kurkuminu

Kurkumin řadíme mezi přírodní hydrofobní polyfenoly. Polyfenoly jsou látky, které se vyskytují v zeleném nebo černém čaji, kávě, červeném víně, čokoládě, olivovém oleji, sóji, obilovinách a v různém ovoci nebo zelenině. Kurkumin získaný z oddenků kurkumy dlouhé není čistý, ale je směsí polyfenolických kurkuminoidů. Tyto kurkuminoidy způsobují žluté zbarvení kurkuminu. Zahrnujeme mezi ně diferuloylmethan (kurkumin), desmethoxykurkumin, bis–desmethoxykurkumin a nebo také nedávno identifikovaný cyklokurkumin (Basnet *et* Skalko–Basnet, 2011; Zhou *et al.*, 2011 – Kiuchi *et al.*, 1993).

2.1.4 Působení kurkuminu na molekulární úrovni

Na molekulární úrovni je kurkumin pleiotropní molekula, která buď přímo nebo nepřímo ovlivňuje funkce různých molekul a signálních drah.

Kurkumin ovlivňuje například funkci transkripčního faktoru NF–kappaB (Zhou *et al.*, 2011 – Shin *et al.*, 2009), aktivovaného proteinu–1 (Zhou *et al.*, 2011 – Dhandapani *et al.*, 2007) nebo proteinu STAT (signal transducer and activator of transcription) (Zhou *et al.*, 2011 – Rajasingh *et al.*, 2006; Bhattacharyya *et al.*, 2007). Tyto transkripční faktory regulují expresi genů, které se podílejí na tumorogenezi (Gupta *et al.*, 2012).

Dále kurkumin působí na enzymy řídící zánětlivé procesy. Například cyklooxygenasu–2 (COX–2), inducibilní syntasy oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase, iNOS) (Oyagbemi *et al.*, 2009 – Bengmark, 2006) nebo cytokiny

podporující zánět [například tumor nekrotizující faktor- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)] (Zhou *et al.*, 2011).

Dalším molekulárním cílem kurkuminu jsou protein kinasy, například protein kinasa C nebo mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK) (Zhou *et al.*, 2011 – Kim *et al.*, 2005; Rafiee *et al.*, 2009).

Kurkumin také dokáže zastavit buněčný cyklus v G0/G1 fázi nebo v G2/M fázi zvýšením exprese inhibitorů cyklin dependentních kinas (p21) nebo snížením exprese cyklinu B1 (Ohori *et al.*, 2006 – Park *et al.*, 2002).

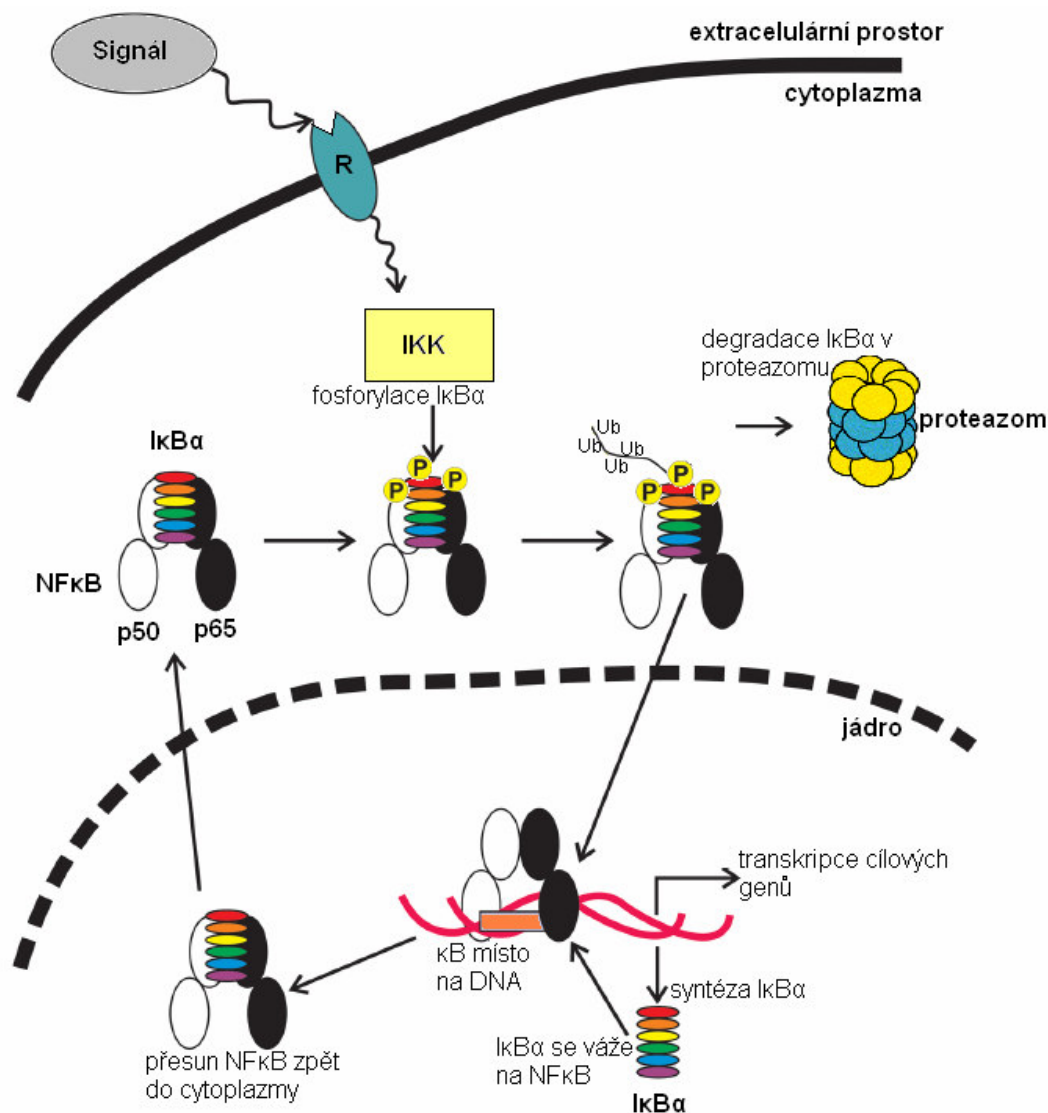
2.1.5 NF-kappaB

Významný je vliv kurkuminu na inhibici signální dráhy transkripčního faktoru NF-kappaB (Ohori *et al.*, 2006). NF-kappaB reguluje řadu genů důležitých pro imunitní odpověď, přežívání buněk, apoptosu, buněčnou proliferaci a diferenciaci buněk (Dyson *et Komives*, 2012 – Baeuerle, 1998; Baeuerle *et al.*, 1994). Deregulace této dráhy je příčinou vzniku různých zánětlivých onemocnění (Dyson *et Komives*, 2012 – Tak *et al.*, 2001; Karin *et al.*, 2002b) nebo nádorů (Dyson *et Komives*, 2012 – Karin *et al.*, 2002a).

NF-kappaB je heterodimer, který se v neaktivní formě vyskytuje v cytosolu všech typů buněk a tvoří komplex s proteinem s inhibiční funkcí nazývaným inhibitor-kappaB (I κ B) (Zhou *et al.*, 2011 – Hayden *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 1995). I κ B maskuje na NF-kappaB jadernou lokalizační sekvenci (Cilloni *et al.*, 2007). NF-kappaB se skládá u savců z pěti podjednotek (Rel, RelA neboli p65, RelB, p50 a p52) (Dyson *et Komives*, 2012).

NF-kappaB může být aktivován prostřednictvím několika signálních drah v důsledku různých podnětů (mikrobiální infekce, stres, karcinogeny, záření, oxidanty), které jsou rozeznány receptory (receptor pro cytokiny, Toll-like receptor). Pokud je I κ B fosforylován I κ B kinasami (IKKs), tak dojde k ubikvitinizaci I κ B a jeho následné degradaci v proteasomu. Po degradaci I κ B dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF-kappaB (Kasinski *et al.*, 2008). Aktivovaný NF-kappaB (podjednotka p65, p50) je translokován do jádra, kde se váže na cílové geny a indukuje expresi až 200 různých genů. Poté se v jádře syntetizuje nový I κ B, který se opět váže na NF-kappaB, přerušuje vazbu s DNA a přesune celý komplex opět do cytoplasmy (Siomek, 2012 – Ghosh *et al.*, 2002) (viz obr. č. 3).

Příkladem genů, které se exprimují v důsledku aktivace NF–kappaB je *c-myc* (Cilloni *et al.*, 2007) nebo *mdr1* gen zodpovědný za zvýšenou expresi P–glykoproteinu (P–gp) (Braun *et al.*, 2006 – Bentires–Alj *et al.*, 2003). Kurkumin zabraňuje aktivaci NF–kappaB tím, že zamezuje degradaci IκB a tím inhibuje p65 translokaci do jádra (Zhou *et al.*, 2011 – Singh *et al.* 1995b).



Obr. č. 3: Obecný mechanismus funkce transkripčního faktoru NF–kappaB. Po přijetí signálu receptorem se aktivují IKKs, které fosforylují IκB (v tomto případě IκBα). Následně dojde k ubikvitinaci a degradaci IκB ve 26S proteasomu. Volný NF–kappaB je translokován do jádra, kde nasedá na specifické κB místo na DNA a dojde k transkripci cílových genů. Mezitím se nově syntetizuje IκB, který se naváže na NF–kappaB, přeruší jeho vazbu s DNA a celý komplex přesune zpět do cytoplasmy (podle Dyson *et Komives*, 2012).

2.1.6 Vliv kurkuminu na růstové faktory, angiogenezi a apoptosu

Významný je také vliv kurkuminu na růstové faktory, angiogenezi a apoptosu. Růstové faktory a růstové receptory hrají důležitou roli při buněčné proliferaci a diferenciaci. Deregulace těchto faktorů způsobuje abnormální růst a vývoj buněk, což přispívá k maligní transformaci.

Angiogeneze je fyziologický proces, kdy se tvoří nové krevní kapiláry z již existujících kapilár. Tento krok je klíčový pro růst nádorů a metastáz (Zhou *et al.*, 2011 – Gasparini, 1995). Kurkumin působí na angiogenní růstové faktory a inhibuje angiogenezi (Zhou *et al.*, 2011 – Strimpakos *et al.*, 2008).

Apoptosa je fyziologický proces, kdy při rozsáhlém poškození buňky nastává její programovaná smrt. Při apoptose buňky zmenšují svůj objem, ztrácejí kontakt se sousedními buňkami, dochází u nich k degradaci cytoskeletu, cytoplasmatické a jaderné kondenzaci a následné fragmentaci chromatinu. Buňka se rozpadá a vytváří apoptotická tělíška různých velikostí. Apoptotické buňky jsou poté pohlceny ostatními buňkami (například makrofágy) (Kerr *et al.*, 1972 – Kerr, 1971, Subramaniam *et al.*, 2008, Oyagbemi *et al.*, 2009). Tento proces je důležitý pro udržování buněčné homeostasy (Zhou *et al.*, 2011 – Burz *et al.*, 2009). Deregulace apoptosy může vést ke vzniku nádorů, autoimunitnímu nebo degenerativnímu onemocnění (Zhou *et al.*, 2011 – Singh *et al.*, 1995a). „Microarray studie“ ukázaly, že kurkumin ovlivňuje expresi 104 genů z celkových 214 genů, které řídí apoptotické dráhy (Zhou *et al.*, 2011 – Ramachandran *et al.*, 2005).

2.1.7 Metabolismus kurkuminu

Negativní vlastností kurkuminu je jeho špatná vstřebatelnost přes střevní epitel do krve a rychlý metabolismus probíhající v těle. Kurkumin má tedy poměrně nízkou biologickou dostupnost (Gupta *et al.*, 2012 – Anand *et al.*, 2007). Za špatný metabolismus kurkuminu může pravděpodobně jeho hydrofobní povaha, špatná absorpce přes střevní epitel do krve a metabolismus probíhající ve střevě a v játrech (Zhou *et al.*, 2011 – Sharma, R.A. *et al.*, 2005). Studie prokázaly, že při podání 2 g kurkuminu v prášku byla tato látka v krevním séru nedetekovatelná nebo jen ve velmi malých koncentracích (Zhou *et al.*, 2011 – Shoba *et al.*, 1998). Při intravenózním a intraperitoneálním podávání léčiva krysám, bylo velké množství této látky a jejich metabolitů detekováno ve žluči (Basnet *et al.*, Skalko–Basnet, 2011 – Ravindranath *et al.*, 1981; Holder *et al.*, 1978).

Kurkumin podléhá v gastrointestinálním traktu metabolizaci tj. konjugacím a redukcím (Zhou *et al.*, 2011 – Ireson *et al.*, 2002), které vedou ke vzniku metabolitů jako dihydrokurkumin, tetrahydrokurkumin a hexahydrokurkumin (detekovány ve střevě a v játrech).

Tetrahydrokurkumin je ve srovnání se samotným kurkuminem více stabilní a má výraznější antioxidační a protizánětlivé účinky (Sugiyama *et al.*, 2003; Venkatesen *et al.*, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 1982). Bylo dokázáno, že hexahydrokurkumin snižuje expresi enzymu COX–2 (Shao *et al.*, 2003). Dále bylo prokázáno, že glukuronidy mají schopnost inhibovat funkci mikrotubulárních proteinů (Metzler *et al.*, 2013 – Pfeiffer *et al.*, 2007).

Tyto metabolity posléze podléhají glukuronidizaci za vzniku kurkumin glukuronidu, dihydrokurkumin glukuronidu, tetrahydrokurkumin glukuronidu a hexahydrokurkumin glukuronidu. Jinými redukcemi a konjugacemi mohou vznikat metabolity jako kurkumin sulfát nebo dihydroferulová kyselina (Zhou *et al.*, 2011 – Garcea *et al.*, 2005; Ireson *et al.*, 2002; Metzler *et al.*, 2013 – Hoehle *et al.*, 2007).

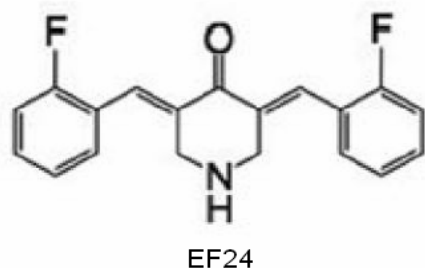
Metabolity kurkuminu si zachovaly své výhodné vlastnosti, ale z důvodu dalších konjugací (glukuronidizace) a redukcí jsou rychle z těla vyloučeny ven.

První možností, vedoucí k lepší biologické dostupnosti kurkuminu, je přidání sloučenin, které se naváží na kurkumin a umožní jeho lepší vstřebávání. Příkladem takové molekuly může být piperin (alkaloid nalezený v černém pepři a dlouhém pepři) (Basnet *et al.* Skalko–Basnet, 2011 – Shoba *et al.*, 1998). Druhou možností je použití různých pomocných systémů – liposomů (Li *et al.* 2005), micel (Suresh *et al.*, 2007) nebo fosfolipidových komplexů (Liu, A. *et al.* 2006). Třetí možností, jak zlepšit biologickou dostupnost kurkuminu v těle, je tvorba strukturních analogů (Preetha *et al.*, 2007; Otori *et al.*, 2006).

2.1.8 Strukturní analog kurkuminu EF24

Strukturní analogy vycházejí z původní struktury kurkuminu a vylepšují jeho vlastnosti tak, aby byl v těle lépe využitelný. Ames *et al.* vytvořili sloučeninu 3,5–bis(2–fluorobenzyliden)piperidin–4–on (EF24), což je fluorovaný analog kurkuminu (Liu, H. *et al.*, 2012). Ze středu molekuly kurkuminu byl odebrán kyslík a dva atomy uhlíku za vzniku monoketonu. Koncové benzenové kruhy byly obsazeny fluorem (Kasinski *et al.*, 2008). I když jsou kurkumin a EF24 strukturně podobné,

mechanismy účinku se liší. EF24 má navíc asi desetkrát silnější antiproliferační aktivitu než kurkumin (IC₅₀ kurkuminu je 13 μmol/l, IC₅₀ EF24 je 1,3 μmol/l).



Obr. č. 4: Chemická struktura EF24 – 3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on (podle Thomas *et al.*, 2008).

D. Subramaniam a jeho kolegové publikovali článek zabývající se látkou EF24 a jejím vlivem na buňky rakoviny tlustého střeva a prokázali, že EF24 potlačuje růst nádoru (Subramaniam *et al.*, 2008). Xenotransplantát lidského karcinomu tlustého střeva byl sledován u nahých myší. Nádor narostl do velikosti 500 mm³. Poté se po 3 týdny nechala působit určitá koncentrace látky EF24. Po třech týdnech byly nádorové objemy u vzorků s EF24 významně sníženy a nádor se již nezvětšoval. U kontrolních myší dosahovala velikost karcinomu přibližně 2000 mm³. U zvířecích modelů působil EF24 netoxicky a bylo dosaženo pozitivních výsledků.

Dále bylo touto studií dokázáno, že EF24 inhibuje signální dráhy důležité pro přežití nádorových buněk. Mezi tyto dráhy patří dráha fosfatidylinositol-3 kinasy (PI3K/Akt) a mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK).

PI3K/Akt dráha je považována za centrální regulátor buněčné proliferace a apoptosy (Subramaniam *et al.*, 2008 – Di Cristofano *et Pandolfi*, 2000; Chung *et Eng* 2005; Vazquez *et Sellers*, 2000; Cantley, 2002). Aktivovaná fosforyluje řadu proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu, které ve výsledku stimulují buněčný růst a inhibují apoptosu (Subramaniam *et al.*, 2008 – Chang, *et al.*, 2003). Cílem PI3K je například protein kinasa Akt, která inhibuje proapoptické geny a potlačuje buněčné receptory smrti, čímž zabraňuje apoptose (Suhara *et al.*, 2002).

MAPK jsou aktivovány řadou extracelulárních podnětů. Následuje fosforylační kaskáda, která vede k předání signálu až do jádra, kde tento signál ovlivňuje aktivitu řady transkripčních faktorů (Subramaniam *et al.*, 2008 – de Groot *et al.*, 1998; Malemud, 2007; Morrison *et Davis*, 2003; Rennefahrt *et al.*, 2005).

Studie D. Subramaniam dále prokázaly, že EF24 potlačuje expresi mRNA genů pro COX–2, interleukin–8 (IL–8) a vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF).

VEGF a IL–8 jsou důležité pro tvorbu nových kapilár v nádoru (angiogenezi). Bez angiogeneze se růst nádoru zastaví většinou na velikosti 1–2 mm z důvodu nedostatku živin a kyslíku. Nadměrná exprese IL–8 koreluje s rizikem zánětu, který pak souvisí se vznikem rakoviny (Subramaniam *et al.*, 2008 – Landi *et al.*, 2003).

COX–2 je enzym podporující produkci prostaglandinu (indukuje tvorbu zánětu). Zvýšená exprese COX–2 byla detekována u nádorových buněk. U těchto buněk byla pozorována rezistence vůči apoptose (Subramaniam *et al.*, 2008 – Tsujii *et al.*, 1995). Potlačením aktivity COX–2 léčivy nebo vyřazením genu pro COX–2 byla docílena inhibice růstu nádoru (Subramaniam *et al.*, 2008 – Ferrandez *et al.*, 2003; Harris, 2007; Marnett *et al.*, 2002).

V těchto studiích také prokázali, že EF24 zastavuje buněčný cyklus G2/M a G0 fázi. Po 24hodinovém působení 1 $\mu\text{mol/l}$ EF24 byl buněčný cyklus zastaven v G2/M fázi a po 48 hodinách v G0/G1 fázi.

Rovněž bylo D. Subramaniamovými studii dokázáno, že EF24 indukuje apoptosu u nádorových buněk. Klíčovou úlohu při apoptose hrají proteasy nazývané kaspasy, které po přijetí signálu iniciují kaspasovou řetězovou reakci. Po působení EF24 na nádorové buňky byla detekována zvýšená hladina kaspasy–3. Kaspasa–3 je efektorová molekula štěpící své substráty, což vede k buněčné smrti. Je aktivována kaspasou–9 (popřípadě kaspasou–8) (Subramaniam *et al.*, 2008 – Boatright *et al.*, 2003; Grutter, 2000). Čím je vyšší koncentrace EF24, tím je štěpení kaspas intenzivnější. Navíc bylo prokázáno, že EF24 inhibuje antiapoptotické geny *Bcl–2* a *Bcl–xL*.

K. Selvendiran a jeho kolegové ve své práci zveřejnili, že EF24 inhibuje signální dráhy důležité pro přežití nádorových buněk. Popsali vliv látky EF24 na nádorový supresorový gen – phosphatase and tensin homolog (PTEN) (Selvendiran *et al.*, 2007).

Mezi důležité signální dráhy, jejichž deaktivace může vést ke vzniku nádorového onemocnění patří PI3K/Akt a MAPK (Subramaniam *et al.*, 2008). Další příčinou vzniku nádoru může být potlačení nádorových supresorových genů (*p53*, *PTEN*) (Selvendiran *et al.*, 2007 – Yang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005).

PTEN je nádorový supresorový gen, který kóduje fosfatasu (reguluje buněčný cyklus). U nádorových buněk bývá *PTEN* gen často mutovaný (málo nebo zcela nefunkční) (Selvendiran *et al.*, 2007 – Li, 1998; Eng, C., 2003). Ve zdravých buňkách působí *PTEN* jako inhibitor PI3K/Akt dráhy. Defosforyluje fosfatidyl–inositol–3–fosfát (PIP3), což vede ke vzniku PIP2. Inaktivace *PTEN* kvůli genetické mutaci má za následek zvýšení aktivity PI3K/Akt u mnoha druhů tumorů (Selvendiran *et al.*, 2007 – Kurose *et al.*, 2001).

Jednou z funkcí nádorového supresorového proteinu p53 je kontrola fáze G1 a G2/M buněčného cyklu. Negativním regulátorem p53 je MDM2 (mouse double minute 2 homolog, ubikvitin ligasa), která blokuje jeho transkripční činnost nebo vede k jeho degradaci v proteasomu. Protože *PTEN* inhibuje PI3K/Akt dráhu, která podporuje translokaci MDM2 do jádra, tak se v buňce zvyšuje hladina nádorového supresoru p53, který poté indukuje vznik proteinu p21 (Selvendiran *et al.*, 2007 – Mayo *et al.*, 2002; el–Deiry *et al.*, 1993). Indukce p21 způsobí zastavení buněčného cyklu ve fázi G1/G0 nebo G2/M prostřednictvím inhibice navázání cyklin–cdk komplexu (Selvendiran *et al.*, 2007 – Coqueret, 2003).

EF24 zvyšuje účinek *PTEN* (inhibicí jeho proteasomové degradace), čímž inhibuje PI3K/Akt dráhu, což zabrání translokaci MDM2 do jádra. Výsledkem je zvýšená hladina p53 a následně p21. Buněčný cyklus buňky se zastaví ve fázi G1/G0 nebo G2/M nebo dojde k apoptose.

H. Liu a jeho kolegové publikovali článek zabývající se působením látky EF24 na jaterní nádorové buňky (Liu, H. *et al.*, 2012).

Svémi studií zjistili, že EF24 indukuje apoptosu a snižuje proliferaci buněk, čímž inhibuje růst nádoru. Byla detekována zvýšená aktivita kaspasy–3 a snížená exprese antiapoptického genu *Bcl–2*.

Prokázali, že EF24 inhibuje signální dráhy důležité pro přežití nádorových buněk – dráhu PI3K/Akt a MAPK. U buněk léčených látkou EF24 byla významně snížena hodnota VEGF a COX–2.

Dále dokázali, že po 48 hodinách působení 4 $\mu\text{mol/l}$ EF24 byl zastaven buněčný cyklus v G2/M fázi. CyklinB1/Cdc2 komplex (cell division cycle, Cdc) je klíčovým regulátorem buněčného cyklu v G2/M fázi. Inhibice cyklinu B1 (indukuje přechod z G2 do M fáze buněčného cyklu) a Cdc2 přispívá k zástavě buněčného cyklu v G2/M fázi. Western blotting ukázal, že po působení EF24 byla významně snížena

hladina cyklinu B1, Cdc2 a MDM2, zatímco u p53 a p21 (regulován p53, indukuje apoptosu) byla hladina zvýšena.

A. L. Kasinski a její kolegové publikovali článek, týkající se účinku látky EF24 na dráhu transkripčního faktoru NF–kappaB u různých typů nádorových buněk (Kasinski *et al.*, 2008). V této publikaci také porovnávají sílu účinku látky EF24 a kurkuminu.

Na základě dřívějších publikací ověřili, že EF24 má mnohem vyšší účinek při léčbě nádorových buněk než kurkumin (Kasinski *et al.*, 2008 – Adams, B.K. *et al.*, 2005; Adams, B.K. *et al.*, 2004).

Prokázali, že EF24 inhibuje IKK, čímž brání fosforylaci I κ B, blokuje translokaci transkripčního faktoru NF–kappaB do jádra a tím inhibuje expresi TNF– α a jiných zánětlivých cytokinů (Kasinski *et al.*, 2008 – Beg *et al.*, 1993). Inhibicí transkripčního faktoru NF–kappaB dochází k redukcii exprese NF–kappaB regulovaných genů pro COX–2, cyklin B1 nebo Bcl–2.

Mnoho chemoterapeutických látek vykazuje vedlejší účinky. Ty jsou důsledkem nespecifičnosti těchto látek vůči nádorovým buňkám a léčivo tak může působit také na zdravé buňky v okolí nádoru. Z tohoto důvodu pacienti obvykle trpí nevolnostmi, vypadáváním vlasů, hubnutím a depresemi. Proto je snaha nacházet léčiva, která by byla specifická vůči nádorovým buňkám. EF24 je sice látka nespecifické povahy, ale přesto pozorujeme, že působí především na nádorové buňky a minimálně na buňky zdravé.

A. Sun a jeho kolegové publikovali článek, ve kterém zveřejnili, že EF24 lze konjugovat s jinými molekulami (Sun *et al.*, 2006).

Krevní koagulační kaskáda zahrnuje krok, ve kterém protein faktoru VIIa (fVIIa) tvoří komplex s transmembránovým receptorem tkáňového faktoru (TF). TF je exprimován za různých patologických situací (například při poranění). Komplex TF–fVIIa iniciuje srážení krve (Sun *et al.*, 2006 – Nemerson, 1988) a následně je translokován do buňky endocytózou. Bylo prokázáno, že u nádorových buněk je TF abnormálně exprimován (Sun *et al.*, 2006 – Callander *et al.*, 1992; Contrino *et al.*, 1996). Toto zjištění dává možnost vytvořit lék, který by cíleně působil na tyto buňky.

S touto myšlenkou byla syntetizována molekula fenylyalanin–fenylyalanin–arginin chlormethyl keton (FFRck), která byla konjugována s látkou EF24 a následně s proteinem fVIIa, čímž se získala molekula označovaná EF24–FFRmk–fVIIa

(FFRmk – fenylalanin–fenylalanin–arginin methyl keton). Tato molekula asociuje s TF na povrchu membrány nádorových buněk a po endocytóze celého komplexu uvolní navázanou cytotoxickou látku do buňky. Předpokládá se, že se léčivo uvolní odštěpením pomocí proteas v cytoplasmě buněk. Molekula FFRmk–fVIIa vykazuje přibližně pětikrát vyšší afinitu k TF než nativní fVIIa (Sun *et al.*, 2006 – Sorensen *et al.*, 1997).

Zkoumala se účinnost tohoto komplexu jednak u buněk, které neexprimují TF a naopak u buněk, které jej vysoce exprimují. Výsledky testu životaschopnosti buněk ukazují, že TF–exprimující buňky léčené komplexem EF24–FFRmk–fVIIa, vykazují mnohem vyšší úmrtnost. Na zdravé buňky neexprimující TF má tento komplex jen velmi malý vliv. Komplex EF24–FFRck nemá žádný účinek na nádorové buňky, dokud nevytvoří vazbu s proteinem fVIIa.

Bylo dokázáno, že komplex EF24–FFRmk–fVIIa dosahuje vyššího účinku při léčbě nádorových buněk než samotné EF24, díky vyšší specifičnosti tohoto komplexu vůči nádorovým buňkám (Sun *et al.*, 2006).

I když vidíme, že EF24 má mnoho pozitivních výsledků, tak většina testů byla prováděna *in vitro*, případně *in vivo* na myších. Nicméně lidský organismus je mnohem složitější. Je nutné brát v úvahu spousty dalších okolností, které mohou bránit kladnému účinku této látky. Jednou z hlavních překážek je možný výskyt MDR. MDR je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických léčiv. Lékovou rezistenci rozlišujeme primární (buňky jsou rezistentní již při první léčbě danou látkou), sekundární (získaná, projevuje se až v průběhu léčby, citlivost může zůstat zachována vůči jiným léčivům) a zkříženou (buňka je rezistentní vůči různým typům léčiv, u buněk dochází ke vzniku MDR). Obecně může být vznik rezistence příčinou samotných léčiv (rychlá eliminace z těla, špatná resorpce, atd.) nebo může vznikat v důsledku cytogenetických, strukturálních nebo funkčních změn v buňce.

Konkrétní příklad příčiny vzniku lékové rezistence je zvýšená exprese antiapoptotických proteinů z rodiny Bcl–2. Rodina Bcl–2 zahrnuje jak antiapoptotické geny (např. *Bcl–2*, *Bcl–xL*) tak i proapoptotické geny (např. *bax*) (Adams, J.K. *et Cory*, 1998). Další možnou příčinou vzniku lékové rezistence je zvýšený DNA reparační mechanismus buňky (zvýšená exprese reparačních enzymů) nebo změna fáze buněčného cyklu (např. přechod do G0 fáze). U buněk vykazujících MDR se vyskytuje mutace genu p53. Transkripční faktor p53 reguluje expresi genů, které řídí

buněčný cyklus, apoptosu a reparaci DNA. Protein p53 se aktivuje při poškození DNA. Podle rozsahu poškození molekuly DNA buď dojde k expresi proteinu p21, který pozastaví buněčný cyklus a dojde k opravě, nebo dochází k apoptose buňky (exprese proapoptického genu *bax*). U nádorových buněk k těmto pochodům nedochází kvůli mutaci proteinu p53 (Grana *et al.* 1995; Taubert *et al.* 1996). Další možnou příčinou vzniku lékové rezistence je detoxikace léčiva. Tento děj může probíhat dvěma způsoby. Jedním z nich je metabolizace léčiva v buňce v léčivo nefunkční. Druhým způsobem detoxikace léčiva je jeho konjugace (například s glutathionem) a následná eliminace této látky ven z těla. Konjugace léčiva s glutathionem je katalyzována enzymem glutathion S–transferasou. Nadměrná exprese těchto enzymů může vést ke vzniku rezistence buňky (Stavrovskaya, 2000 – Tew, 1994). Významnou příčinou vzniku MDR je aberantní exprese některých členů rodiny ABC transportérů (ATP binding cassette transporters).

2.2 ABC transportéry

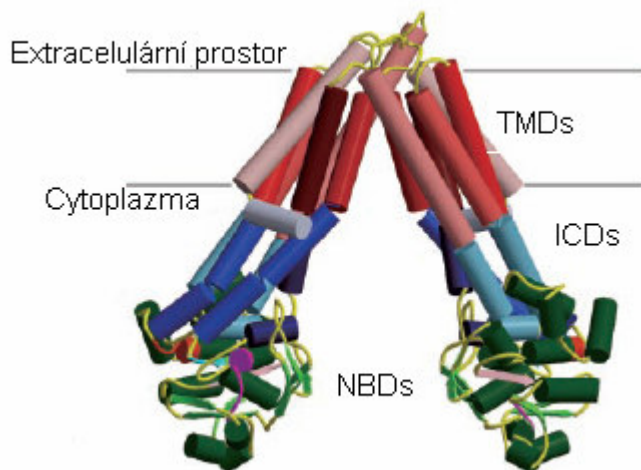
ABC transportéry představují velkou rodinu transmembránových proteinů exprimovaných v různých tkáních organismu. Vyskytují se u všech říší – od živočichů, přes rostliny až po bakterie. Hlavní funkcí ABC transportérů je jednosměrný přenos různorodých substrátů. Přenos může být organelový (např. mitochondrie u eukaryot) nebo přes plasmatickou membránu (Szakács *et al.*, 2006). Většina těchto transportérů zabezpečuje transport ven z buňky (exportéry, u prokaryot i eukaryot). Méně často transportují látky do buňky (importéry, u prokaryot) (Locher, 2009).

2.2.1 Struktura ABC transportérů

Struktura jednotlivých ABC transportérů byla stanovena pomocí rentgenové krystalografie (Linton, 2007). Prvním ABC transportérem, u kterého byla určena touto metodou podrobná struktura, byl transportér Sav1866 izolovaný z bakterie *Staphylococcus aureus* (Locher, 2009 – Dawson, *et al.*, 2006).

ABC transportéry se obecně skládají ze čtyř domén – dvě transmembránové domény (transmembrane domains, TMDs) a dvě nukleotid vázající domény (nucleotid binding domains, NBDs). Na TMDs se specificky váže substrát a jsou začleněné v membráně. NBDs jsou orientovány do cytoplasmy, váží adenosintrifosfát (adenosine triphosphate, ATP) a dochází zde k ATP hydrolýze (Linton, 2007; Rees *et*

al., 2009; Dean *et al.*, 2001a – Hyde, *et al.*, 1990) (viz obr. č. 5). NBDs jsou homologní v celé rodině ABC transportérů a slouží jako „motor“ pro TMDs, které bývají více variabilní (Linton, 2007; Locher, 2009; Rees *et al.*, 2009). Variabilita TMDs pravděpodobně souvisí s různorodostí substrátů, které se zde váží (Rees *et al.*, 2009).



Obr. č. 5: Struktura P-glykoproteinu (P-gp). Červeně – TMDs, modře – intracelulární domény (intracellular domains, ICDs – spojují TMDs a NBDs), zeleně – NBDs (podle Seigneuret *et Garnier–Suillerot*, 2003).

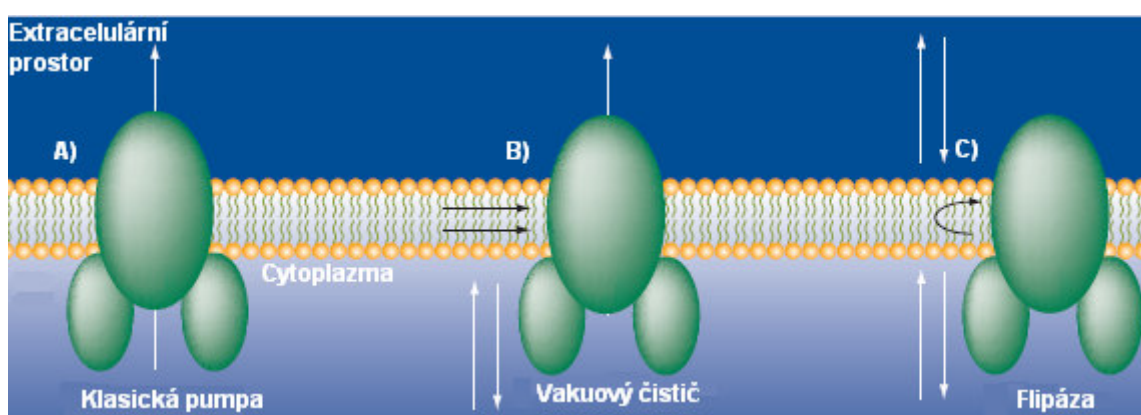
2.2.2 Funkční mechanismus ABC transportérů

Klíčovým krokem při přenosu substrátu ABC transportéry je hydrolýza dvou molekul ATP, která probíhá na NBDs. Předpokládá se, že jedna molekula ATP je důležitá pro konformační změnu proteinu, která způsobí uvolnění substrátu do extracelulárního prostoru. Druhá molekula ATP je pravděpodobně potřebná pro navrácení struktury proteinu do původní konformace. Dalším krokem je samotný transport substrátu přes plasmatickou membránu, u kterého ovšem není zatím znám přesný mechanismus. Byly popsány tři hypotézy, které vysvětlují možný přenos substrátu ABC transportérem.

První hypotézou je představa klasického kanálu, který transportuje hydrofobní látku z jedné strany membrány na opačnou stranu přes kanál vytvořený TMDs (Gottesman *et al.*, 1988). Tento model je v dnešní době považován za historický a jeho funkčnost nebyla potvrzena.

Druhou hypotézou je tzv. model hydrofobního vakuového čističe, která předpokládá, že dojde k distribuci substrátu ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány (ve vnějším i vnitřním lumenu) a poté dojde k interakci s ABC transportérem, který jej přenesse do extracelulárního prostoru (Ambudkar, *et al.* 1999).

Třetí hypotézou je tzv. flipázový model, kdy opět dojde k distribuci substrátu ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány. Substrát interaguje s ABC transportérem a je překlopen z vnitřního lumenu do vnějšího lumenu fosfolipidové dvojvrstvy, přes niž je pak vyloučen do extracelulárního prostředí (Sharom, 2008 – Higgins *et al.* 1992) (viz obr. č. 6).



Obr. č. 6: Mechanismus funkce ABC transportérů. A) klasická pumpa – přenos hydrofobní látky z cytoplasmy do extracelulárního prostoru přes hydrofilní kanál; B) hydrofobní vakuový čistič – dojde k distribuci substrátu ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány, substrát interaguje s ABC transportérem, který jej přenesse přímo do extracelulárního prostoru; C) flipáza – dojde k distribuci substrátu ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány, substrát interaguje s ABC transportérem, je překlopen z vnitřního lumenu do vnějšího lumenu fosfolipidové dvojvrstvy, přes niž je pak vyloučen do extracelulárního prostředí (podle Sharom, 2008).

2.2.3 Skladba ABC transportérů u člověka

V lidském genomu bylo detekováno asi 48 genů, které kódují ABC transportéry. Tyto transportéry byly rozděleny podle různých funkcí do sedmi podrodin označených A–G (ABCA–ABCG) (Locher, 2009 – Dean, 2005; Szakács *et al.*, 2006 – Dean *et al.*, 2001b) (viz tabulka č. 1).

V dnešní době jsou známy ABC transportéry ze tří podrodin, které se podílejí na přenosu léčiv, čímž způsobují lékovou rezistenci buněk (Szakács *et al.*, 2006).

Nejvýznamnějšími transportéry podílející se na vzniku MDR jsou P-gp (P-glycoprotein, MDR1, ABCB1), rezistentní protein rakoviny prsu (breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2) a protein 1 spojený s MDR (multidrug resistance protein 1, MRP1, ABCC1) (Szakács *et al.*, 2006 – Ozvegy, *et al.*, 2001) (viz obr. č. 7). Transportér ABCG2 patří mezi tzv. poloviční transportéry. Poloviční transportéry obsahují jen jednu NBD a jednu TMD. Jsou kódovány dvěma molekulami mRNA. Transportér ABCG2 je funkční pouze ve formě homodimeru (Mo *et Zhang*, 2012; Szakács *et al.*, 2006 – Ozvegy, *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2001a – Hyde, *et al.*, 1990).

Tabulka č. 1 : Seznam některých zástupců z rodiny ABC transportérů vyskytujících se v lidském organismu (Ambudkar *et al.*, 2003 – Dean *et al.*, 2001b; Linton, 2007; Szakács *et al.*, 2006; Dean *et al.*, 2001a – Tyzack *et al.*, 2000).

Podrodina	Název transportéru	Jiný název	Místo exprese	Porucha funkce	Substráty
ABCA	ABCA1	ABC1	mozek	Tangierova choroba	cholesterol, fosfolipidy
ABCB	ABCB1	P-gp	mozek, ledviny, nadledviny, játra, zažívací trakt, kmenové buňky, buňky imunitního systému	vznik MDR	peptidy, steroidní hormony, lipidy, chemoterapeutické látky
ABCC	ABCC1	MRP1	erythrocyty, plíce, žaludek, nadledviny, ledviny, močový měchýř, tlusté střevo, varlata, placenta	vznik MDR	glutathion, glutathionové, sulfátové a glukuronidové konjugáty, chemoterapeutické látky
ABCD	ABCD1	ALD	peroxisomy	Adrenoleukodystrofie	velmi dlouhé řetězce mastných kyselin
ABCE	ABCE1	OABP, RNS4I	vaječníky, varlata, slezina	neznámá	protein vázající oligoadenylát
ABCF	ABCF1	ABC50	součást ribosomálního komplexu ?	neznámá	neznámé
ABCG	ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	mozek, ledviny, játra, placenta, střevo, kmenové buňky	vznik MDR	steroidní hormony, lipidy, chemoterapeutické látky

2.2.4 Porucha funkce ABC transportérů u člověka

Porucha funkce ABC transportérů bývá způsobena nejčastěji různými genovými mutacemi. Při nesprávné funkci ABC transportérů dochází u člověka ke vzniku rozmanitých genetických onemocnění. Mezi tato onemocnění řadíme například poruchu krvácivosti (Linton, 2007 – Albrecht *et al.*, 2005), cystickou fibrózu (transportér ABCC7), oční (Linton, 2007 – Martinez–Mir *et al.*, 1998) nebo jaterní poruchy (Linton, 2007 – Jacquemin, 2000; Rees *et al.*, 2009). U těchto onemocnění dochází k selhání transportu substrátu nebo iontů přes fosfolipidovou membránu (Linton, 2007 – Dean *et al.*, 2001b).

U nádorových buněk při aberantní expresi některých ABC transportérů dochází ke vzniku MDR. Příčinou vzniku MDR je eliminace chemoterapeutických látek z buňky. Aberantní exprese transportéru a tím způsobená léková rezistence má pravděpodobně více příčin [například amplifikace genu kódujícího daný transportér (Mo *et Zhang*, 2012 – Ross *et al.*, 1999; Juranka *et al.*, 1989 – Bradley *et al.*, 1988) nebo transkripční, posttranskripční, translační nebo posttranslační regulace (Juranka *et al.*, 1989 – Shen *et al.* 1986; Bradley *et al.*, 1989; Mo *et Zhang*, 2012).

2.2.5 Podrodiny ABC transportérů podílející se na vzniku mnohočetné lékové rezistence

2.2.5.1 ABCB podrodina

Jediným transportérem z této podrodiny podílející se na vzniku MDR je transportér ABCB1 (P–gp). Byl objeven roku 1976 R. L. Julianem a V. Lingem (Fukuda *et Schuetz*, 2012 – Juliano *et Ling*, 1976). Tento protein je velký 170 kDa a nachází se zejména v buňkách transportního epitelu jater, ledvin, zažívacího traktu, placenty, v kmenových buňkách a buňkách imunitního systému (Szakács *et al.*, 2006 – Cordon–Cardo *et al.*, 1990; Thiebaut *et al.*, 1989). P–gp přenáší neutrální nebo kladně nabitě hydrofobní sloučeniny (Szakács *et al.*, 2006 – Ambudkar *et al.*, 1999). Přirozenými substráty pro P–gp jsou peptidy, steroidní hormony, lipidy a malé cytokiny (Sharom, 2008). Z chemoterapeutických léčiv P–gp transportuje vinca alkaloidy (vinblastin, vinkristin), antracykliny (doxorubicin, daunorubicin) nebo taxany (paclitaxel, docetaxel) (Szakács *et al.*, 2006 – Ambudkar *et al.*, 1999; Shukla *et al.*, 2011 – Gottesman *et al.*, 2002). Dalšími jeho substráty jsou některé TKIs (např. imatinib), antihistaminika (terfenadin), antibiotika (erytromycin), fluorescenční látky

(Hoechst 33342), přírodní látky (kurkuminoidy) a také různé toxiny, jedy a různorodé látky obsažené v potravě (Sharom, 2008).

Aberantní exprese P-gp je detekována při různých typech rakoviny (prsů, vaječníků, varlat, tlustého střeva nebo při leukémii).

Dalšími transportéry patřícími do podrodiny ABCB jsou například ABCB11 (transportér žlučových kyselin), ABCB4 (sekrece fosfatidilcholinu) (van Helvoort *et al.*, 1996), ABCB2 a ABCB3 (poloviční transportéry tvořící homodimery, transportují peptidy do endoplazmatického retikula) (Dean *et al.*, 2001a).

Struktura P-gp je uvedena na obr. č. 7.

2.2.5.2 ABCC podrodina

ABCC (MRP) je další významnou podrodinou podílející se na vzniku MDR. Zahrnuje sedm transportérů, které mají vliv na rezistenci buněk (například ABCC2, ABCC3 nebo ABCC6), jeden transportér ovlivňující vznik MDR (ABCC1) a dva transportéry podílející se na transportu iontů přes membránu (ABCC8, ABCC7). Tyto transportéry jsou exprimovány v buňkách ledvin, močového měchýře, tlustého střeva, plic, placenty, varlat, v erythrocytech nebo kostní dřeni (Shukla *et al.*, 2011 – Eckford *et al.*, 2009).

Významným zástupcem této rodiny zapojeným do vzniku MDR je transportér ABCC1 (Cole *et al.*, 1992). Tento transportér přenáší glutathion, konjugáty glutathionu s léčivem, konjugáty kyseliny glukuronidové s léčivem nebo konjugáty sulfátu s léčivem. Z protinádorových léčiv transportuje některé vinca alkaloidy (vinblastin, vinkristin) nebo antracykliny (doxorubicin, daunorubicin). Dalšími jeho substráty jsou některé TKIs (imatinib), antibiotika (grepafloxacin), fluorescenční látky (kalcein) nebo přírodní látky (kurkuminoidy) (Sharom, 2008).

Transportér ABCC8 (sulfonylurea receptor, SUR) reguluje funkci draselného kanálu, se kterým tvoří komplex (Linton, 2007 – Inagaki *et al.*, 1995). Je receptorem pro sulfonylureu (léčivo používané pro zvýšení sekrece insulínu při onemocnění cukrovkou) (Thomas *et al.*, 1995).

Transportér ABCC7 (transmembránový regulátor na cystickou fibrózu, CFTR) je iontový kanál, který přenáší chloridové ionty (Linton, 2007 – Tabcharani *et al.*, 1991). Jeho nefunkčnost je příčinou onemocnění známém jako cystická fibróza (Sharom, 2008).

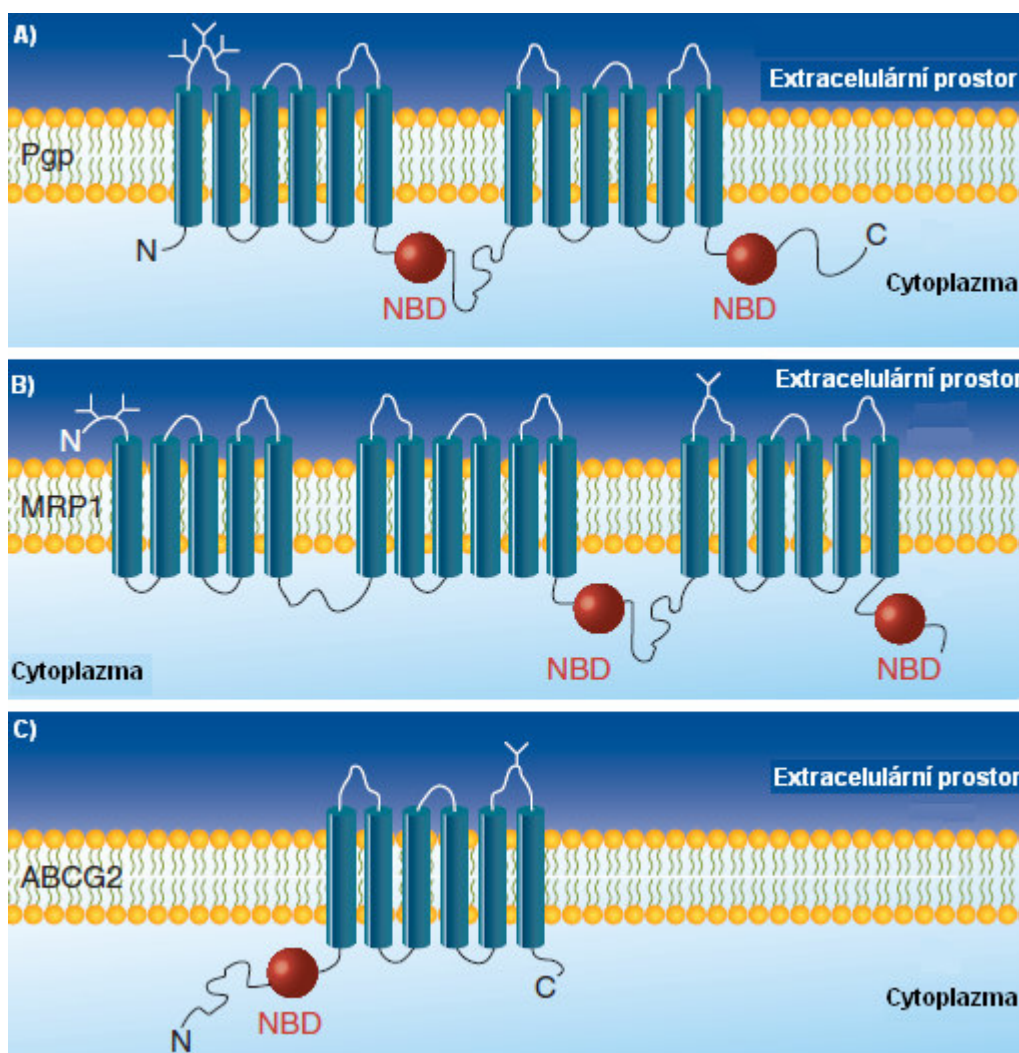
SUR a CFTR se svými funkcemi od typických ABC transportérů liší. Jsou součástí rodiny ABC transportérů, protože u nich dochází k přeměně energie na NBDs. Tuto energii nevyužívají pro transport přes membránu, ale jen pro změnu konformace. Stačí jim tedy pouze jedna molekula ATP (Linton, 2007).

Struktura transportéru ABCC1 je uvedena na obr. č. 7.

2.2.5.3 ABCG podrodina

Třetí významnou podrodinou podílející se na vzniku MDR je podrodina ABCG. Na lékové rezistenci se podílí transportér ABCG2 (Doyle *et al.*, 1998). Je exprimován podobně jako P-gp zejména v játrech, střevě, ledvinách, placentě (Shukla *et al.*, 2011 – Doyle *et al.*, 1998) a rovněž přenáší hydrofobní látky (Sharom, 2008). Z protinádorových léčiv transportuje například mitoxantron nebo bisantren. Dalšími jeho substráty jsou některé TKIs (nilotinib), antibiotika (norfloxacin), fluorescenční látky (Hoechst 33342) nebo přírodní látky (kurkuminoidy) (Sharom, 2008).

Struktura transportéru ABCG2 je uvedena na obr. č. 7.



Obr. č. 7: Předpokládaná membránová topologie třech významných ABC transportérů podílejících se na vzniku MDR. A) P-gp – 12 TM segmentů, dvě NBDs, N-konec i C-konec se nachází v cytoplasmě; B) ABCC1 – struktura podobná s P-gp, ale obsahuje navíc pět TM segmentů na N-konci TMD, N-konec je orientován do extracelulárního prostoru, C-konec se nachází v cytoplasmě; C) ABCG2 – poloviční transportér – jedna TMD a jedna NBD, šest TM segmentů, NBD je lokalizovaná na N-konci TMD (podle Sharom, 2008).

2.2.6 Inhibice ABC transportérů

Řešením zamezení vzniku MDR může být podávání látek inhibujících funkci ABC transportérů (Shukla *et al.*, 2011 – Shukla *et al.*, 2008). Nejznámějšími a nejvíce studovanými jsou inhibitory P-gp. Tyto inhibitory můžeme rozdělit do tří generací. Do první a druhé generace zahrnujeme kompetitivní inhibitory. Do třetí generace patří nekompetitivní inhibitory.

První generace léčiv vykazovala nízkou účinnost. Účinné dávky působily až při vysokých koncentracích, které ovšem měly řadu toxických účinků (Leopard *et al.*, 2003). Docházelo k inhibici P-gp i v jiných tkáních, kde byl tento transportér potřeba pro eliminaci použitých chemoterapeutik (Ling, 1997) nebo k interakci s jinými transportéry. Do této generace můžeme zahrnout verapamil a cyklosporin A.

Léčiva druhé generace vykazovala lepší účinnost v nižších dávkách, ovšem toxicita byla stále vysoká a interakce s jinými transportéry nebyla stále omezena (Sharom, 2008). Do této generace patří valspodar (analog cyklosporinu A) (Twentyman *et al.*, 1991) nebo birikodar.

Třetí generace zahrnuje nekompetitivní inhibitory, které vykazují nízkou toxicitu a vysokou účinnost a specifitu vůči P-gp (Sharom, 2008 – Szakacs *et al.*, 2006). Do této generace patří zosuquidar.

Před několika málo lety byly identifikovány látky inhibující funkci ABCG2 a MRP1 transportérů (Sharom, 2008 – Robey *et al.*, 2007). Mezi inhibitory ABCG2 transportéru patří pantoprazol, nilotinib, birikodar, tariquidar a elacridar. Mezi látky inhibující MRP1 transportér zahrnujeme birikodar (Sharom, 2008).

Mezi látky s inhibující funkcí patří také TKIs. Bylo prokázáno, že některé TKIs jsou nejen substrátem pro transportéry ABCG2 a P-gp, ale při vyšších koncentracích u nich byl prokázán vůči těmto transportérům také inhibiční účinek (např. nilotinib). (Mo *et Zhang*, 2012 – Houghton *et al.*, 2004; Mo *et Zhang*, 2012 – Ozvegy-Laczka *et al.*, 2004; Robey *et al.*, 2010 – Lagas *et al.*, 2009; Hegedús *et al.*, 2002).

3. Cíle práce

- Vypracovat rešerši pojednávající o vlivu přírodních a syntetických kurkuminů na proliferaci leukemických buněk.
- Zjistit, zda exprese P-gp ovlivňuje citlivost leukemických buněk k EF24.
- Popsat mechanismus buněčné smrti, který je indukován látkou EF24 u leukemických buněk.

4. Materiál a metodika

4.1 Buněčné linie

Buněčná linie K562

Tato mateřská linie buněk je charakteristická výskytem tzv. Filadelfského chromosomu, který je příčinou vzniku chronické myeloidní leukémie (CML). CML je genetické nádorové onemocnění vznikající u kmenových buněk kostní dřeně. Filadelfský chromosom vzniká reciproknou translokací genů [t(9; 22) (q34; q11)]. Výsledkem této translokace je zkrácený 22. chromosom, kde se k sobě dostaly geny *ABL* (kóduje tyrosin kinasu, lokalizován na chromosomu 9) a *BCR* (umístěný na chromosomu 22) za vzniku fúzního *BCR-ABL* onkogenu. Tvorbou fúzního onkogenu se stává tyrosin kinasa trvale aktivní a nekontrolovatelně fosforyluje další molekuly a dráhy (Neves *et al.*, 1999; Faderl *et al.*, 1999; Sawyers, 1999; Verfaillie, 1998).

Buněčná linie K562 byla získána z ECACC (European Collection of Cell Cultures, Velká Británie).

Buněčná linie K562/DOX

Tato buněčná linie má fenotyp MDR díky zvýšené expresi P-gp. Byla odvozena od mateřské linie K562 její dlouhodobou kultivací s doxorubicinem. Buněčnou linii naší laboratoři poskytl profesor J. P. Marie (University of Paris 6, Francie).

Buněčná linie K562/HHT

Tato buněčná linie má fenotyp MDR díky zvýšené expresi P-gp. Byla odvozena od mateřské linie K562 její dlouhodobou kultivací s homoharringtoninem. Buněčnou linii naší laboratoři poskytl profesor J. P. Marie (University of Paris 6, Francie).

Jednotlivé buněčné linie byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% obsahem fetálního bovinního séra a s přidavkem streptomycinu a penicilinu v koncentracích 0,1 mg/ml. Kultivace probíhala v kultivačních lahvích v inkubátoru při 37°C a 5% obsahu CO₂.

4.2 Chemikálie a roztoky

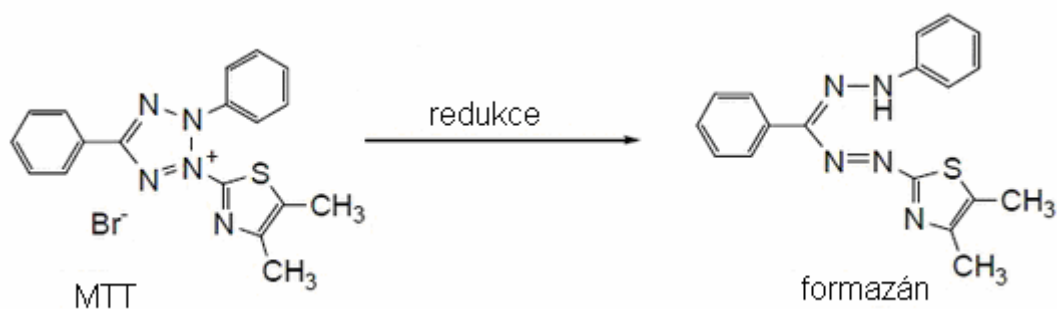
1x PBS (phosphate buffered saline):	130 mmol/l NaCl
	10 mmol/l NaH ₂ PO ₄
	2,7 mmol/l KCl
	1,8 mmol/l KH ₂ PO ₄
	pH 7,4
Fixační roztok:	96% ethanol
EF24 (3,5-bis(2-fluorobenzyliden)piperidin-4-on):	Sigma – Aldrich, USA

4.3 Použité přístroje

Biocenter	inkubátor (SalvisLab, Švýcarsko)
BOEco M-240	centrifuga (BioTech, Německo)
BOEco U-32R	centrifuga (BioTech, Německo)
Vi-CELL™XR	analyzátor buněčné viability (Beckman Coulter, USA)
Steril VBH	laminární box (Steril, Itálie)
GENios Plus	spektrofotometr (Tecan, Rakousko)
Cytomics fc 500	průtokový cytometr (Beckman Coulter, USA)
Olympus BX	fluorescenční mikroskop s kamerou Olympus DP50

4.4 Stanovení buněčné proliferace a viability

Stanovení buněčné proliferace a viability bylo prováděno pomocí tzv. MTT testu (Mosmann, 1983), který využívá látku nazývanou tetrazoliová sůl neboli 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT). V živých buňkách je tato rozpustná žlutá sůl redukována pomocí produktů dehydrogenas na nerozpustný fialový formazán (krystaly). Formazán se rozpouští v ethanolu a vyhodnotí se spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Množství vytvořeného formazánu je přímo úměrné počtu živých buněk.



Obr. č. 8: Redukce žluté tetrazoliové soli na fialové krystaly MTT formazánu (podle <http://www.dojindo.com/store/p/302-MTT.aspx>)

K 1 ml vzorku se přidá 100 µl MTT a inkubuje se při 37°C. Po uplynutí 1 hod se přenese buněčná suspenze s vytvořeným formazánem do mikrozkuvek a získá se sediment centrifugací (5 min, 3000 ot./min, laboratorní teplota). Přidá se 500 µl okyseleného ethanolu (96% ethanol s HCl), který extrahuje formazán. Roztok se centrifuguje (5 min, 14 000 ot./min, laboratorní teplota). 200 µl obarveného supernatantu se přepipetuje do mikrotitrační destičky. Množství vzniklého formazánu se měří na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm.

Použité roztoky a chemikálie:

MTT roztok: 5 mg/ml 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid

4.5 Stanovení počtu apoptotických buněk

Stanovení počtu apoptotických buněk se provádí na základě změny morfologie jader. Apoptotické buňky jsou charakteristické tím, že redukují svůj objem a dochází u nich ke kondenzaci chromatinu (tvorba apoptotických tělísek).

Fixace buněk: Buněčná suspenze se zafixuje. 1 ml vzorku se centrifuguje (5 min, 2500 ot./min, laboratorní teplota). Odpipetuje se supernatant a přidá se 130 µl 1x PBS a 350 µl 96% ethanolu.

Ze zafixovaného vzorku se odebere 200 µl a centrifuguje se (5 min, 2400 ot./min, laboratorní teplota). Odpipetuje se supernatant. K sedimentu se přidá 25 – 50 µl barvicího roztoku. Morfologii jader můžeme pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. Počítá se počet apoptotických buněk z celkových 200 – 300 objektů.

Použité roztoky a chemikálie:

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

4.6 Buněčný cyklus

Některá barviva (ethidium bromid, propidium jodid, DAPI,...) se specificky a stechiometricky váží na nukleové kyseliny. Těchto barviv se využívá v průtokové cytometrii k určení buněčného cyklu (podle obsahu DNA v jednotlivých fázích) a k odhadu počtu apoptotických buněk. Buňky v G1 fázi jsou charakteristické diploidním (2n) počtem chromosomů. Při replikaci (S fáze) se počet chromosomů zdvojnásobuje. V G2/M fázi je počet chromosomů v buňce 4n. Apoptotické buňky aktivují enzymy endonukleasy, které štěpí DNA na fragmenty (apoptotická tělíška). V procesu barvení v hypotonickém Vindalově roztoku dochází k extrakci těchto fragmentů, čímž se obsah DNA v buňkách snižuje a na histogramu pozorujeme subpopulaci buněk s nižším obsahem DNA (hypodiploidní buňky).

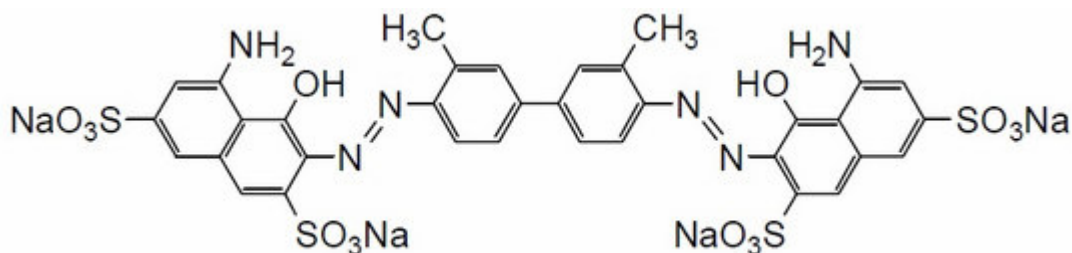
Buněčná suspenze se centrifuguje (5 min, 2400 ot./min, laboratorní teplota), odebere se supernatant. K sedimentu se přidá 500 µl Vindalova roztoku (inkubace 30 min ve tmě, laboratorní teplota).

Použité roztoky a chemikálie:

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

4.7 Určení počtu živých a mrtvých buněk

K určení počtu živých a mrtvých buněk se používá přístroj Vi-CELL™XR. Tento přístroj využívá trypanovou modř, která proniká jen do mrtvých buněk a přes cytoplasmatickou membránu živých buněk neprochází. Obarví se tedy jen mrtvé buňky, které mají cytoplasmatickou membránu porušenou. K měření se používá 600 µl buněčné suspenze. Přístroj vyhodnotí viabilitu buněk v procentech a určí počet buněk na mililitr.



Obr. č. 9: Chemická struktura trypanové modři – 3,3'-[[3,3'-dimethyl-(1,1'-bifenylyl)-4,4'-diyl]bis(azo)]-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-naftalen) disulfonová kyselina (převzato z <http://www.dojindo.com/store/p/193-Cellstain-Trypan-Blue.aspx>).

Použité roztoky a chemikálie:

Trypanová modř: Sigma – Aldrich, USA

4.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Pro stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové se využívá adsorpce barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu. Výsledkem je modré zbarvení, které detekujeme na spektrofotometru.

K 1 μ l přečištěného extraktu se přidá 1 ml činidla Bradfordové (inkubace 10 min, laboratorní teplota). Následně se do mikrotitrační desky napipetuje 200 μ l vzorku. Na spektrofotometru se měří absorbance při 595 nm. Podle kalibrační křivky za použití bovinního sérového albuminu jako standardu se určí potřebná koncentrace proteinu pro následnou analýzu.

Použité roztoky a chemikálie:

Činidlo Bradfordové: 50 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml methanolu; 100 ml 85% H_3PO_4 ; 850 ml deionizované vody

4.9 Detekce kaspasové aktivity

Klíčovou úlohu při apoptose hrají proteasy nazývané kaspasy. Ty jsou zodpovědné za proteolytický rozpad buněk. Nejdůležitější molekulou je kaspasa-3, která společně s kaspasou-7 má identickou DEVDasovou aktivitu, protože štěpí stejný substrát (Ac-DEVD-AMC). Pomocí fluorescenčně značeného substrátu lze tuto aktivitu detekovat.

- Buněčná lýze (odstranění cytoplasmatické membrány)

Sediment se získá centrifugací 3×10^6 buněk (5 min, 1500 ot./min, 4°C). Sediment se jedenkrát promyje 2 ml 1x PBS a roztok se resuspenduje. Vzorek se opět

centrifuguje (5 min, 1500 ot./min, 4°C), odebere se supernatant, přidá se 100 µl lyzačního roztoku. Inkubuje se za občasného promíchání na vortexu. Po 30 min se vzorky centrifugují (10 min, 18 000 ot./min, 4°C). K analýze kaspasové aktivity se odebere supernatant, který obsahuje potřebné proteiny.

- Analýza kaspasové aktivity

Do mikrotitrační desky napipetujeme 200 µl pufru pro kaspasu a přidáme vypočítané množství lyzátu obsahujícího 50 µg proteinu (určené metodou Bradfordové). Reakce je zahájena po přidání substrátu o výsledné koncentraci 50 µmol/l (inkubace 30 min ve tmě, laboratorní teplota). Následně se měří fluorescence vzorků na spektrofotometru při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm. V přítomnosti inhibitoru (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) o koncentraci 1 µmol/l docházelo k nesespecifickému štěpení substrátu. Od každé naměřené aktivity byla odečtena hodnota vzorku s přítomným inhibitorem. Rozdíl naměřených hodnot mezi vzorkem se substrátem a vzorkem se substrátem a inhibitorem dává reálnou aktivitu kaspasy-3.

Použité roztoky a chemikálie:

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

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

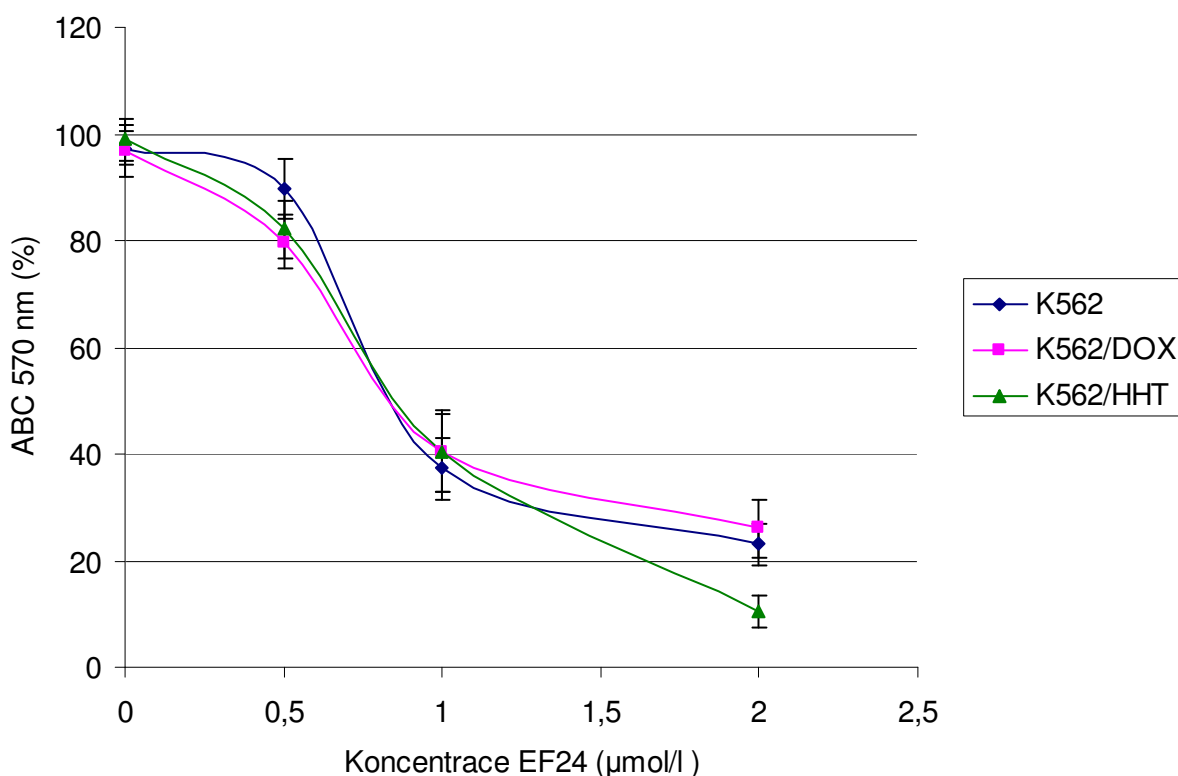
Substrát: 0,25 mmol/l acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl kumarin (Ac-DEVD-AMC)

5. Výsledky

V experimentech bylo pracováno s buňkami K562/DOX a K562/HHT, které mají fenotyp MDR díky zvýšené expresi P-gp. Všechny experimenty se srovnávaly s kontrolní mateřskou linií K562 (neexprimuje žádný ABC transportér). Buňky byly vystaveny 24hod působení látky EF24. Byly sledovány parametry proliferace, viability, buněčného cyklu a mechanismu buněčné smrti.

5.1 Vliv látky EF24 na proliferaci a viabilitu

Rezistentní buněčné linie K562/DOX, K562/HHT a kontrolní mateřská linie K562 byly vystaveny působení látky EF24. Po 24 hod byl proveden MTT test. Bylo prokázáno, že exprese P-gp neovlivňuje citlivost buněk vůči látce EF24 (viz graf č. 1).

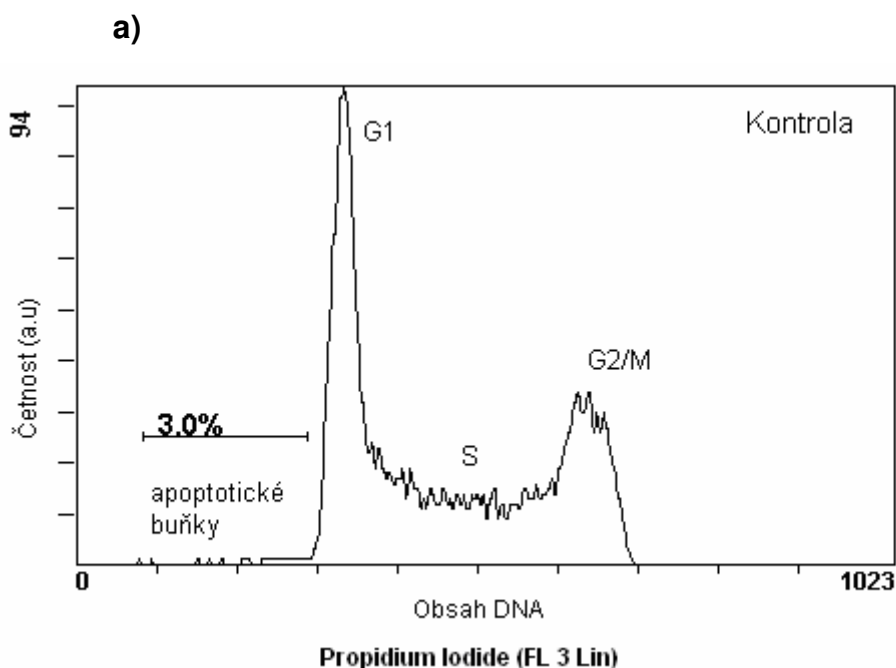


Graf č. 1: MTT test. Vliv látky EF24 na proliferaci a viabilitu u rezistentních buněčných linií K562/DOX, K562/HHT a u kontrolní mateřské linie K562. Data jsou získána z průměru tří měření. Je uvedena směrodatná odchylka.

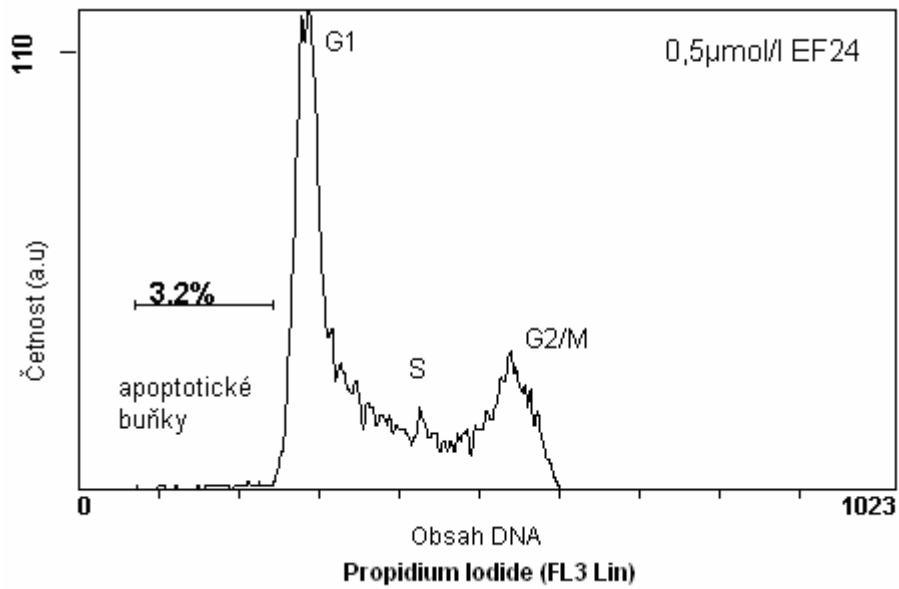
5.2 Vliv látky EF24 na buněčný cyklus

Rezistentní buněčné linie K562/DOX, K562/HHT a kontrolní mateřská linie K562 byly vystaveny působení látky EF24 po dobu 24 hod. Následně byla provedena analýza buněčného cyklu na průtokovém cytometru. S narůstající koncentrací látky EF24 byly u jednotlivých buněčných linií sledovány počty hypodiploidních buněk odpovídajících buňkám apoptotickým. Typické histogramy jsou uvedeny na obr. č. 10–12. Počty apoptotických buněk jednotlivých buněčných linií se mezi sebou příliš neliší. Po působení látky EF24 nepozorujeme výrazné zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi ani v G2/M fázi. Graf č. 2 zobrazuje průměrné hodnoty četnosti výskytu hypodiploidních (apoptotických) buněk naměřené na základě průtokové cytometrie. Z grafu je vidět, že se počty apoptotických buněk jednotlivých buněčných linií mezi sebou příliš neliší. Rezistentní buněčná linie K562/DOX je méně citlivá než rezistentní buněčná linie K562/HHT. Naopak rezistentní buněčná linie K562/HHT vykazuje vyšší citlivost než mateřská buněčná linie K562. Z toho můžeme usoudit, že exprese P-gp neovlivňuje citlivost buněk vůči EF24.

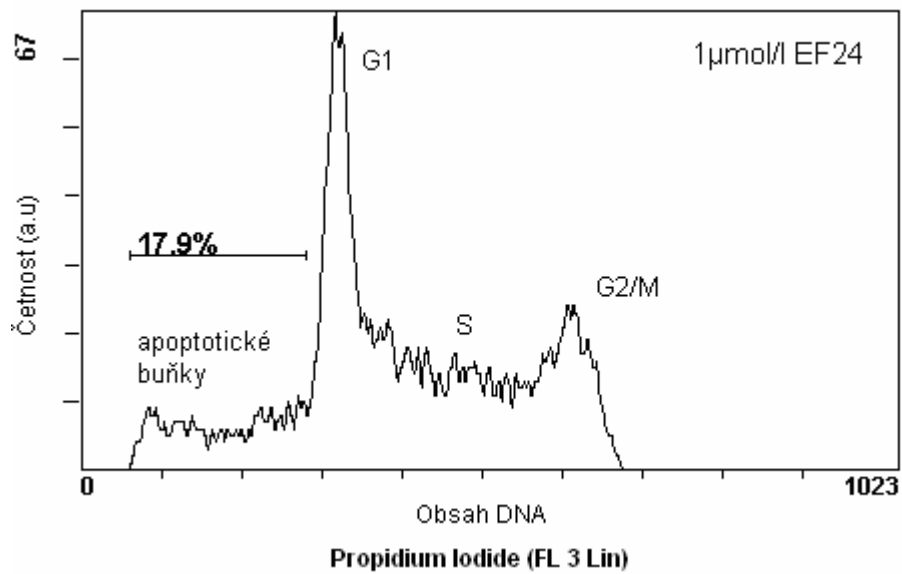
- Mateřská buněčná linie K562:



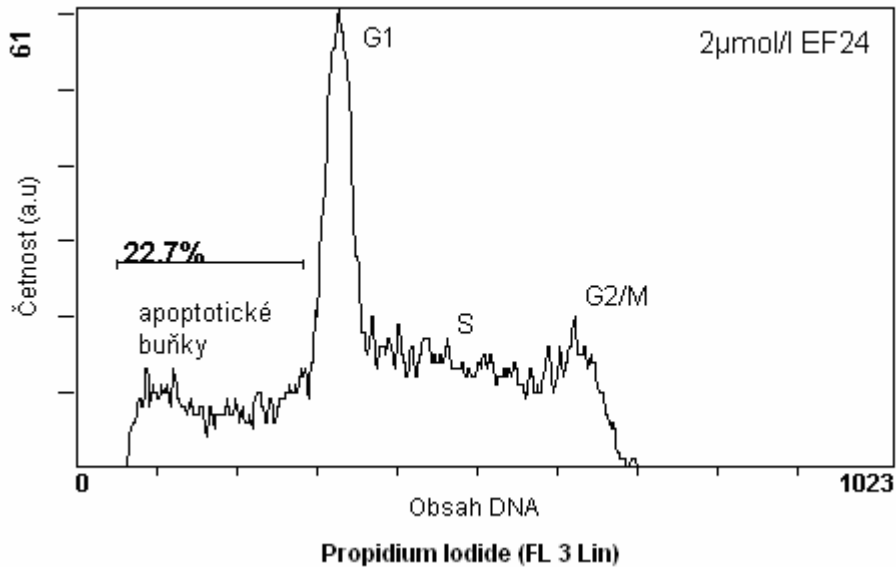
b)



c)

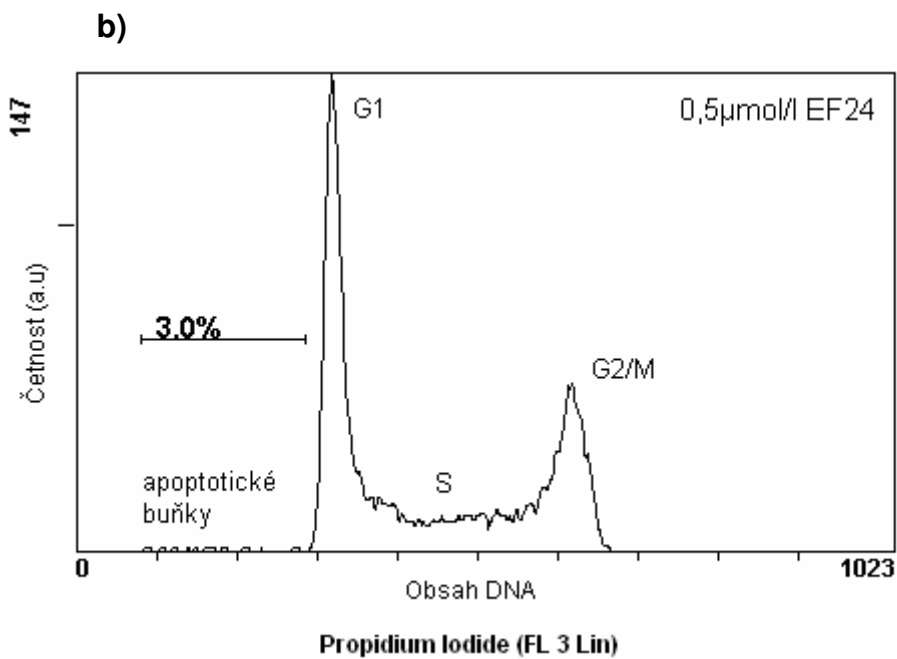
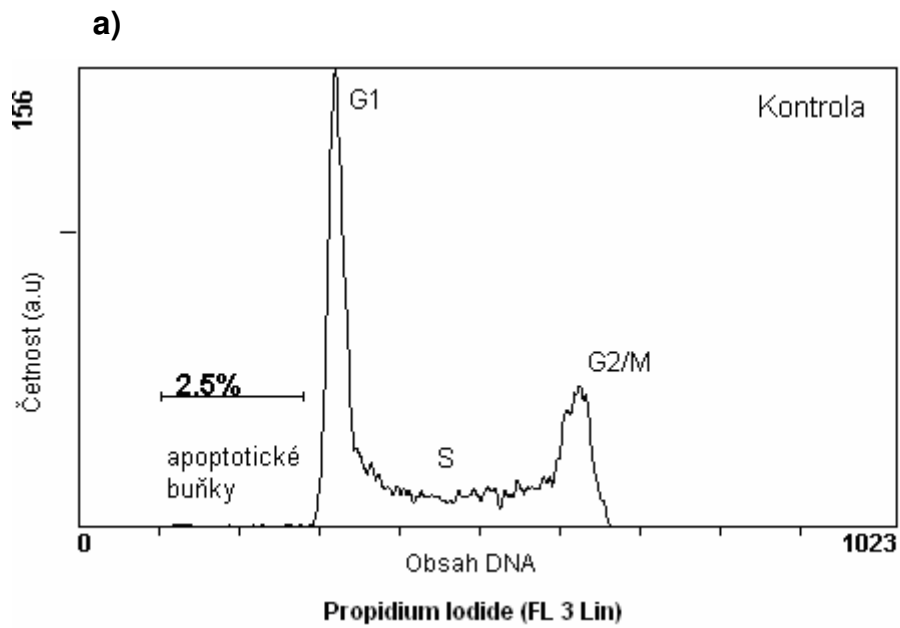


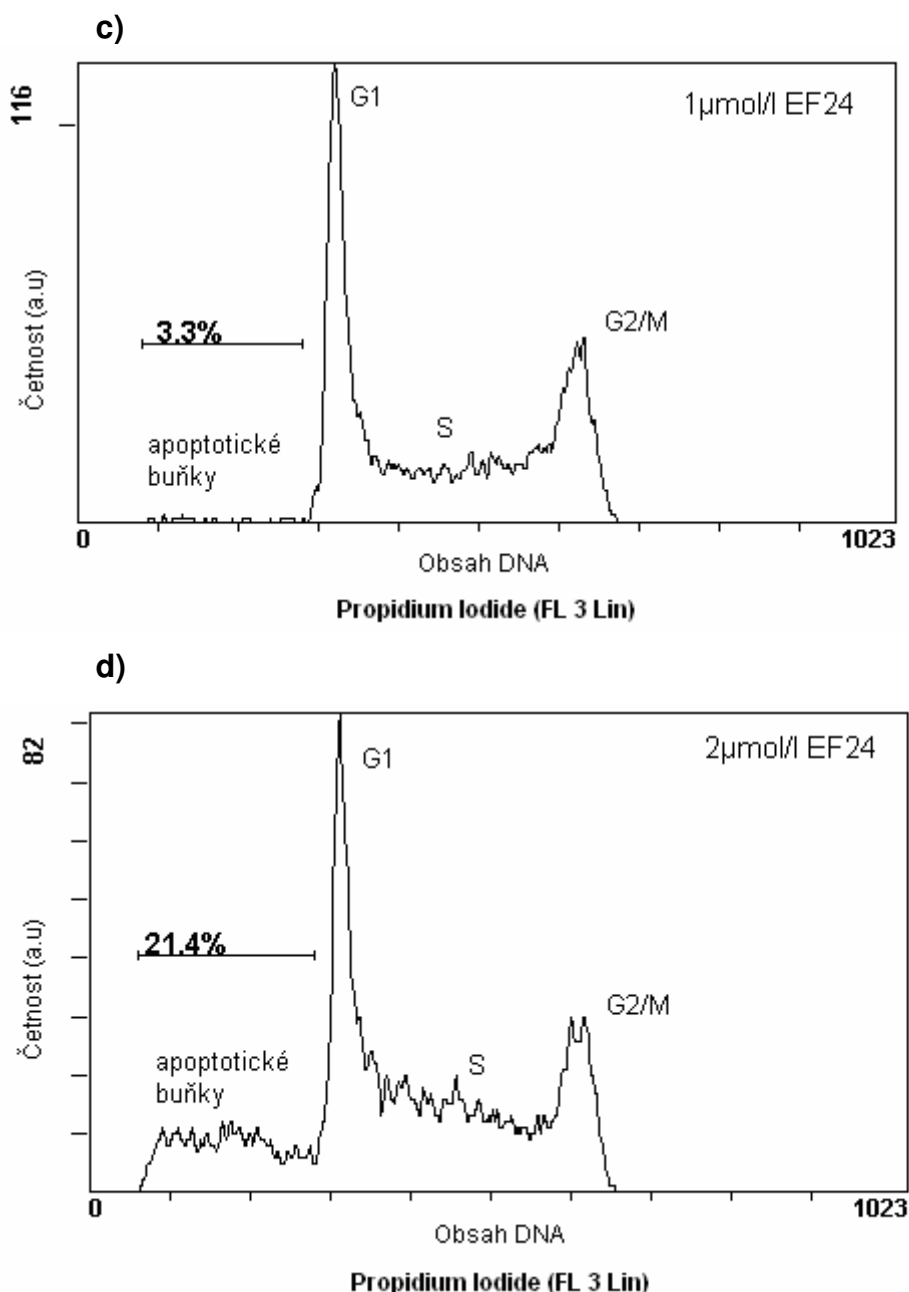
d)



Obr. č. 10: Vliv EF24 na buněčný cyklus u mateřské buněčné linie K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu s přidavkem EF24 (24 hod, 37°C), následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Na ose x je zobrazena intenzita fluorescence propidium jodidu, která odpovídá obsahu DNA v jádře. Na ose y je zobrazena četnost jednotlivých buněk v daných fázích buněčného cyklu. Na histogramech je také zobrazena četnost apoptotických buněk, které odpovídají hypodiploidním buňkám. a) Kontrolní neovlivněné buňky. b) – d) Buňky ovlivněné látkou EF24.

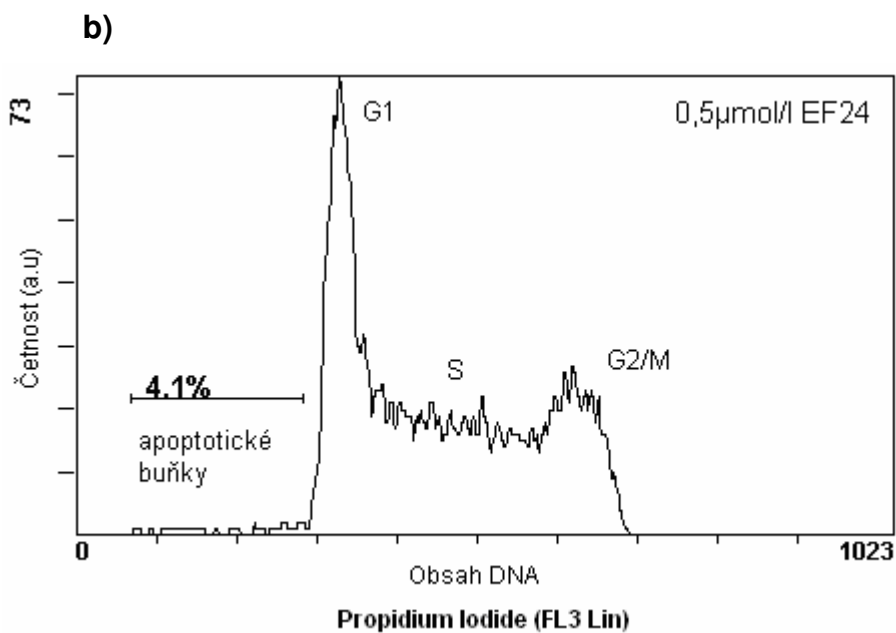
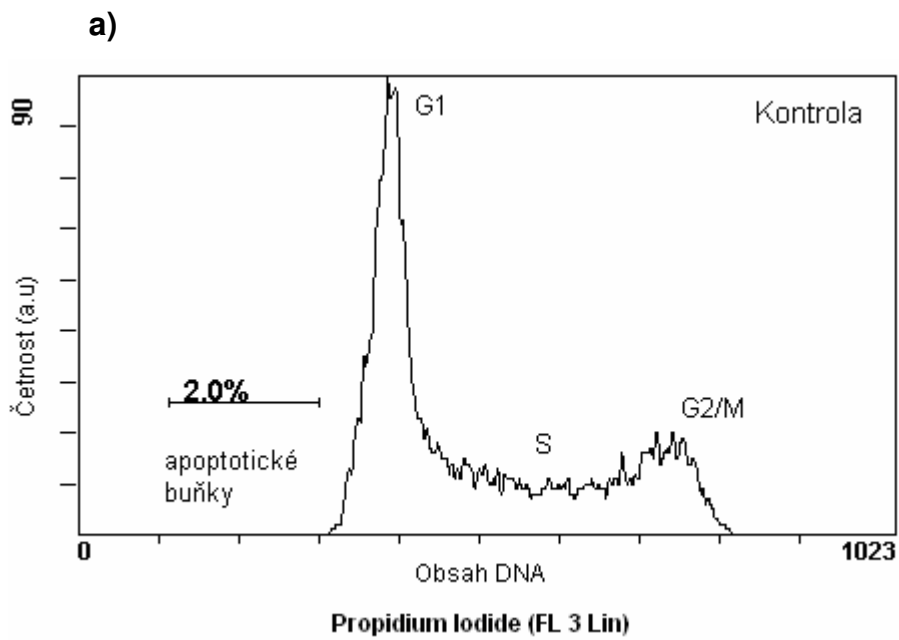
- Rezistentní buněčná linie K562/DOX

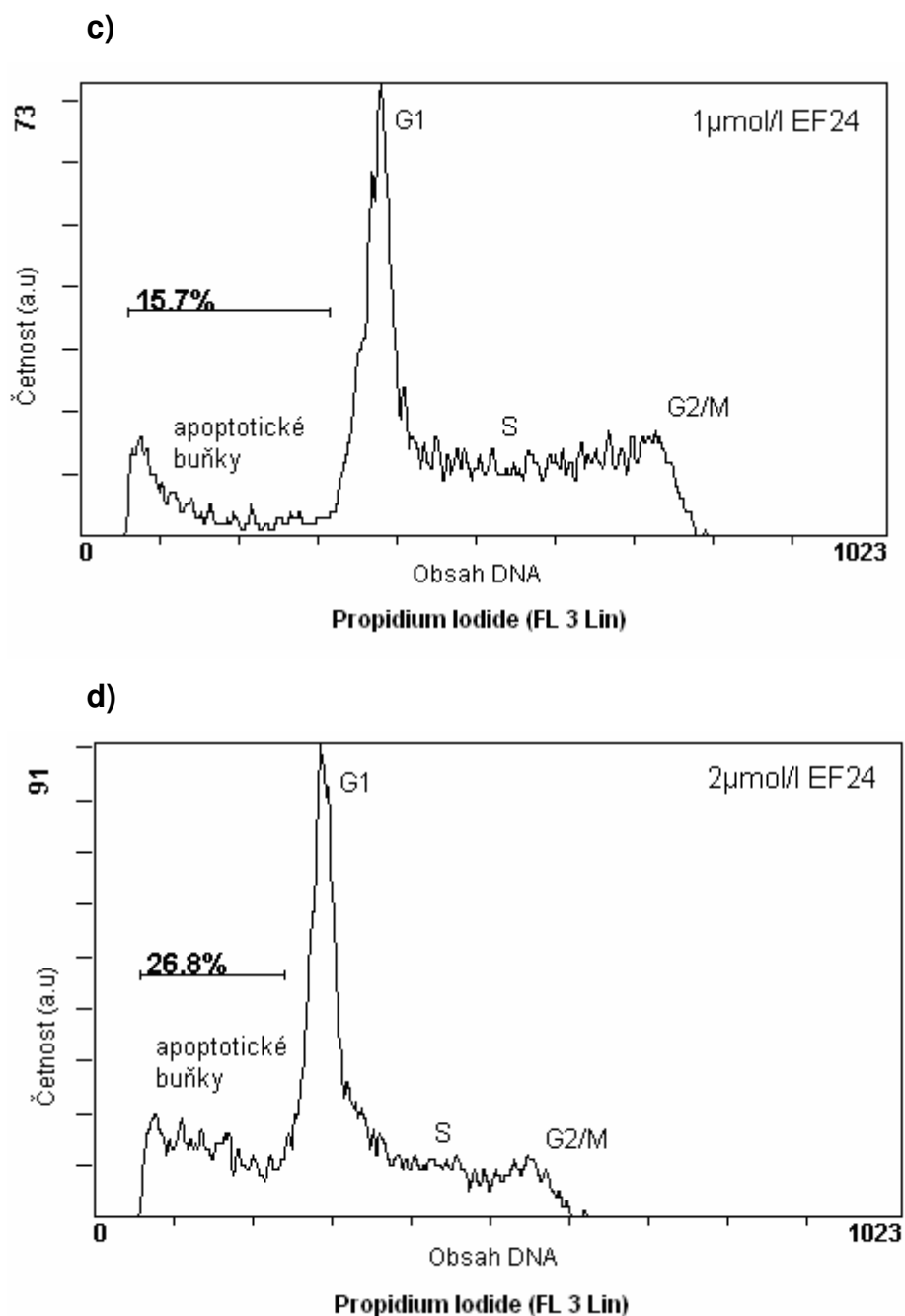




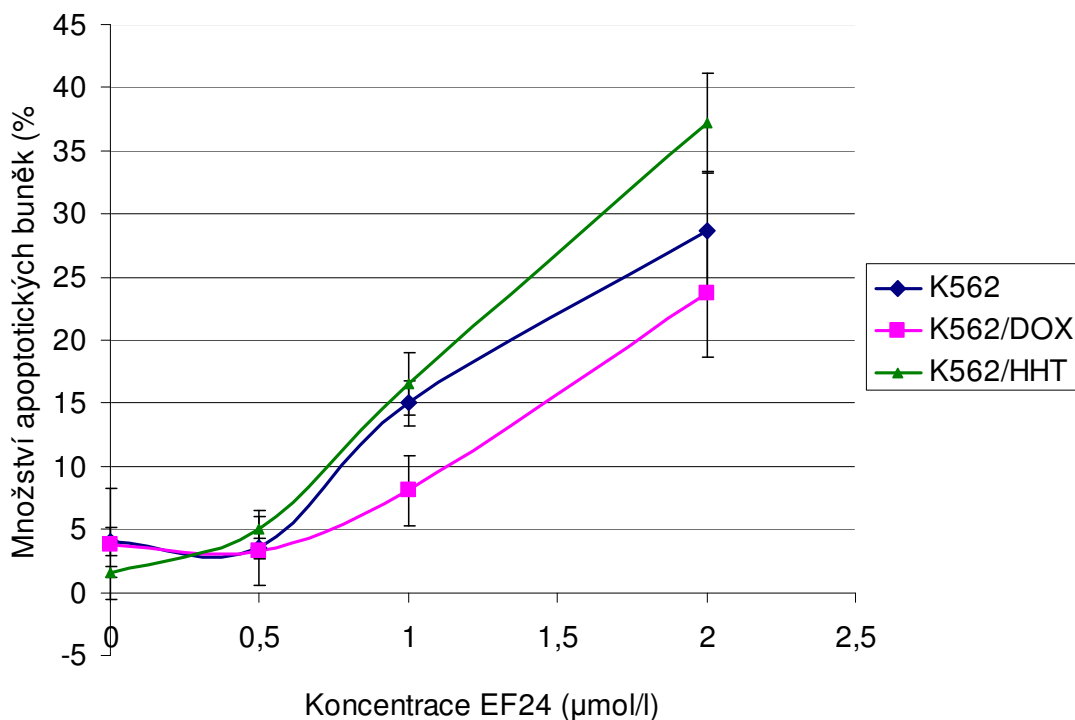
Obr. č. 11: Vliv EF24 na buněčný cyklus u rezistentní buněčné linie K562/DOX. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu s přidavkem EF24 (24 hod, 37°C), následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Na ose x je zobrazena intenzita fluorescence propidium jodidu, která odpovídá obsahu DNA v jádře. Na ose y je zobrazena četnost jednotlivých buněk v daných fázích buněčného cyklu. Na histogramech je také zobrazena četnost apoptotických buněk, které odpovídají hypodiploidním buňkám. a) Kontrolní neovlivněné buňky. b) – d) Buňky ovlivněné látkou EF24.

- Rezistentní buněčná linie K562/HHT





Obr. č. 12: Vliv EF24 na buněčný cyklus u rezistentní buněčné linie K562/HHT. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu s přidavkem EF24 (24 hod, 37°C), následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Na ose x je zobrazena intenzita fluorescence propidium jodidu, která odpovídá obsahu DNA v jádře. Na ose y je zobrazena četnost jednotlivých buněk v daných fázích buněčného cyklu. Na histogramech je také zobrazena četnost apoptotických buněk, které odpovídají hypodiploidním buňkám. a) Kontrolní neovlivněné buňky. b) – d) Buňky ovlivněné látkou EF24.



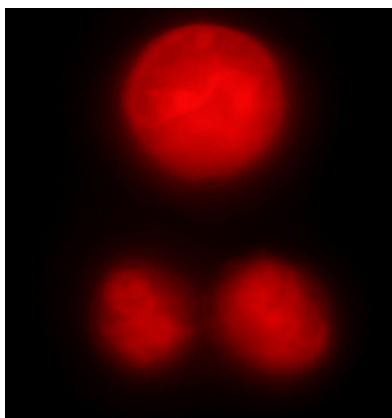
Graf č. 2: Analýza buněčného cyklu. Vliv látky EF24 na množství apoptotických (hypodiploidních) buněk u rezistentních buněčných linií K562/DOX, K562/HHT a u kontrolní mateřské linie K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu s přidavkem EF24 (24 hod, 37°C), následně byly obarveny Vindalovým roztokem a měřeny na průtokovém cytometru. Data jsou získána z průměru tří měření. Je uvedena směrodatná odchylka.

5.3 Vliv látky EF24 na morfologii jader

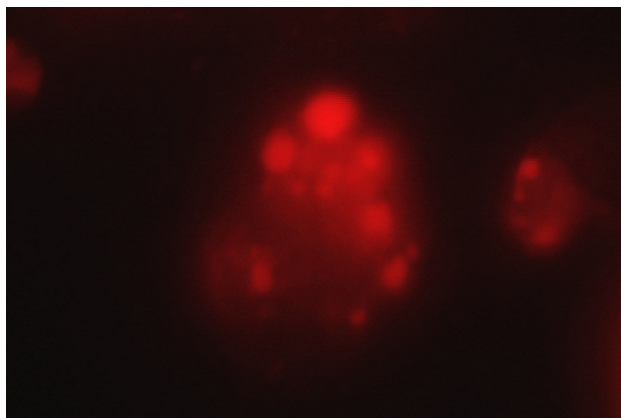
Aby bylo ověřeno, že se buněčná smrt děje apoptotickým mechanismem, tak byla u rezistentních buněčných linií K562/DOX, K562/HHT a u kontrolní mateřské linie K562 zkoumána morfologie jader. Buňky byly fixovány, následně byly obarveny propidium jodidem a sledovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Intaktní buňky a buňky tvořící apoptotická tělíska jsou uvedeny na obr. č. 13–15. Graf č. 3 zobrazuje průměrné hodnoty počtu apoptotických buněk spočítaných pomocí fluorescenčního mikroskopu. Rozdíl v počtu apoptotických buněk sledujeme až při vyšších koncentracích. Rezistentní buňky K562/DOX sice vykazují nižší počty apoptotických buněk než mateřské buňky K562, ale rezistentní buněčná linie K562/HHT obsahuje více apoptotických buněk než K562/DOX i K562. Z toho můžeme usoudit, že exprese P-gp neovlivňuje citlivost buněk vůči EF24.

- Mateřská buněčná linie K562

a)



b)



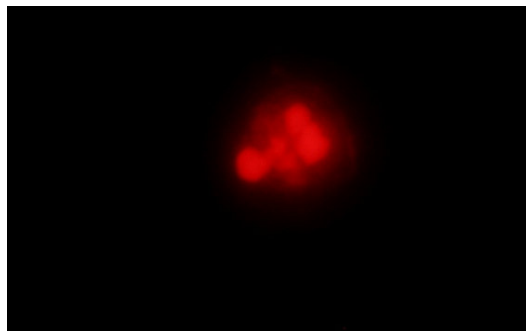
Obr. č. 13: Typická morfologie jader u mateřské buněčné linie K562 barvené propidium jodidem. a) Neovlivněné buňky K562. b) Buněčná linie K562 po 24hod působení 2 μ mol/l EF24.

- Rezistentní buněčná linie K562/DOX

a)

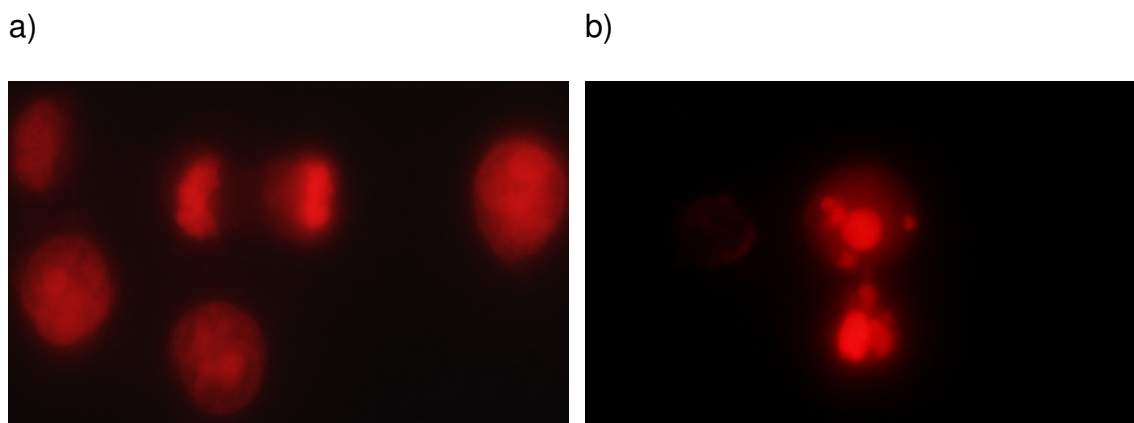


b)

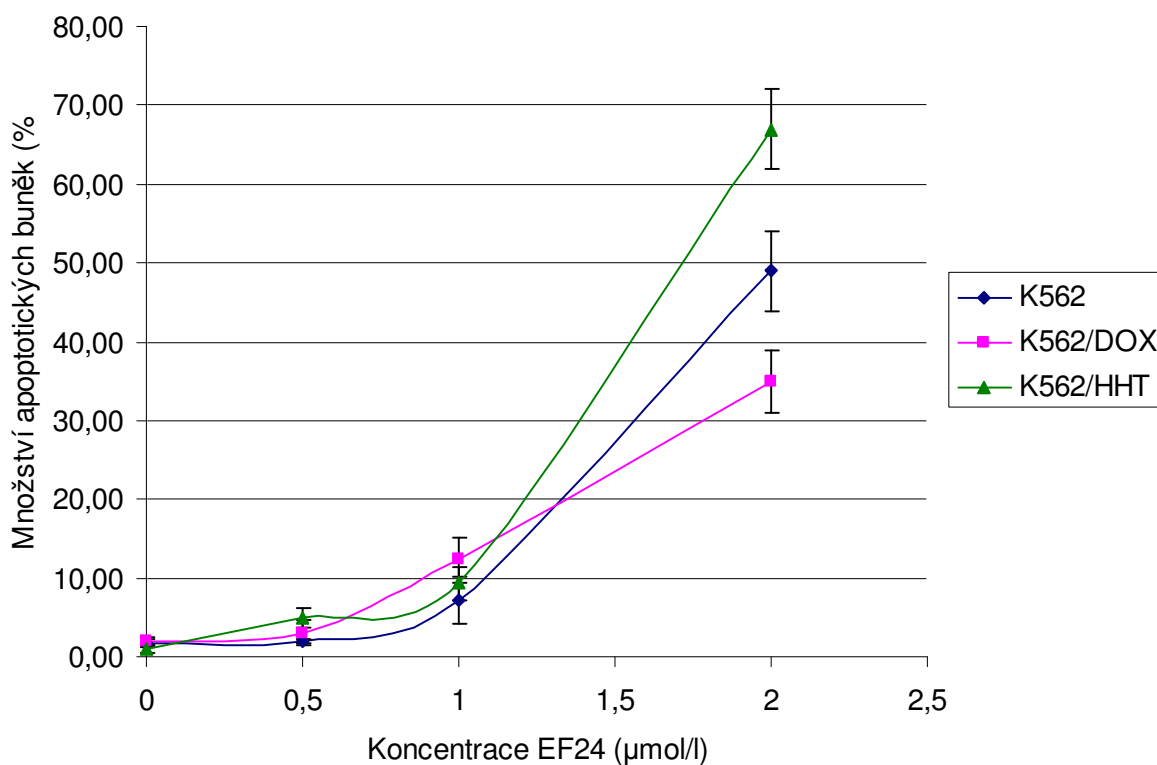


Obr. č. 14: Typická morfologie jader u rezistentní buněčné linie K562/DOX barvené propidium jodidem. a) Neovlivněná buňka K562/DOX. b) Buněčná linie K562/DOX po 24hod působení 2 μ mol/l EF24.

- Rezistentní buněčná linie K562/HHT



Obr. č. 15: Typická morfologie jader u rezistentní buněčné linie K562/HHT barvené propidium jodidem. a) Neovlivněné buňky K562/HHT. b) Buněčná linie K562/HHT po 24hod působení 2 μ mol/l EF24.

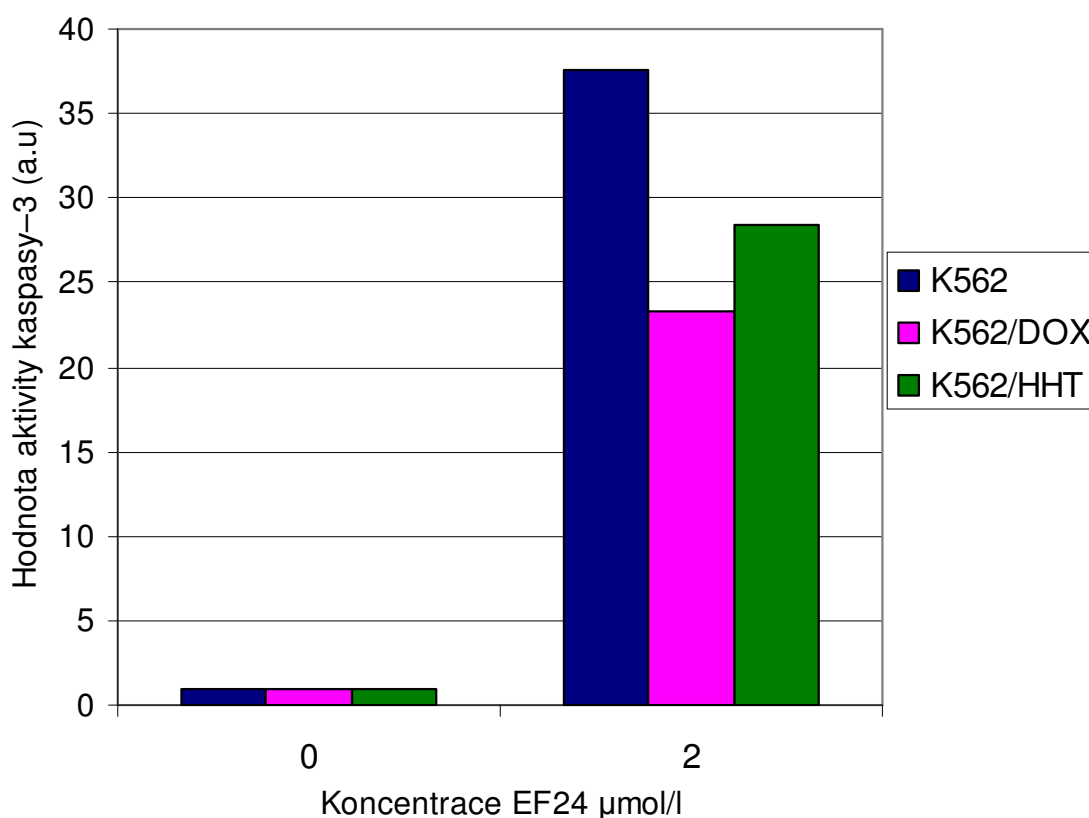


Graf č. 3: Analýza morfologie jader. Vliv látky EF24 na množství apoptotických buněk u rezistentních buněčných linií K562/DOX, K562/HHT a u kontrolní mateřské linie K562. Buňky byly fixovány, následně byly obarveny propidium jodidem a sledovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Data jsou získána z průměru tří měření. Je

uvedena směrodatná odchylka. Rozdíl v počtu apoptotických buněk sledujeme až při vyšších koncentracích.

5.4 Analýza kaspasové aktivity po působení látky EF24

Aby bylo potvrzeno, že látka EF24 indukuje apoptosu, tak byla provedena analýza kaspasové aktivity. Kaspasy jsou zodpovědné za proteolytický rozpad buněk. Klíčovou molekulou je kaspasa-3, která má s kaspasou-7 identickou DEVDasovou aktivitu, protože štěpí stejný substrát (Ac-DEVD-AMC). Pomocí fluorescenčně značeného substrátu lze tuto aktivitu detekovat. V přítomnosti inhibitoru (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) dochází k nesespecifickému štěpení substrátu. Graf č. 4 zobrazuje závislost hodnoty aktivity kaspasy-3 na koncentraci látky EF24. Neovlivněné buněčné linie vykazují nízkou aktivitu kaspasy-3. Buněčné linie ovlivněné EF24 vykazují vysokou aktivitu kaspasy-3.



Graf č. 4: Analýza kaspasové aktivity. Vliv látky EF24 na hodnotu aktivitu kaspasy-3 u rezistentních buněčných linií K562/DOX, K562/HHT a u kontrolní mateřské linie K562. Buňky byly kultivovány ve standardním růstovém médiu s přidavkem EF24

(24 hod, 37°C), následně byla provedena buněčná lýze, byly izolovány proteiny a byla provedena analýza kaspasové aktivity.

6. Diskuse

Teoretická část této bakalářské práce pojednává o inhibici NF–kappaB analogem kurkuminu u BCR–ABL pozitivních buněk a dále o interakci analogu kurkuminu s ABC transportéry. Experimentální část zahrnuje výsledky působení analogu kurkuminu (látky EF24) na mateřskou buněčnou linii K562 (neexprimuje žádný ABC transportér) a na buňky odvozené od této mateřské linie – K562/HHT a K562/DOX, které mají fenotyp MDR díky zvýšené expresi P–gp.

Byla provedena analýza buněčné proliferace a viability (MTT test), buněčného cyklu, morfologie jader a kaspasové aktivity. Látka EF24 byla použita v koncentracích 0 $\mu\text{mol/l}$; 0,5 $\mu\text{mol/l}$; 1 $\mu\text{mol/l}$ a 2 $\mu\text{mol/l}$. Buňky byly s EF24 kultivovány ve standardním médiu po dobu 24 hod (37°C).

Z výsledků MTT testu můžeme usoudit, že EF24 inhibuje proliferaci a viabilitu buněk (viz graf č. 1). Toto tvrzení je v souladu s publikacemi D. Subramaniam (Subramaniam *et al.*, 2008) a H. Lia (Liu, H. *et al.*, 2012). Exprese P–gp neovlivňuje rezistenci buněk vůči EF24. MTT test nedokáže odhadnout, čím je způsoben pokles produkce formazánu. Zda je pokles ovlivněn jen inhibicí proliferace nebo je proliferace snížena na úkor buněčné smrti nebo mají vliv obě složky. Aby byla tato otázka zodpovězena, tak byla provedena analýza buněčného cyklu.

Analýza buněčného cyklu dokázala, že po působení EF24 narůstá počet apoptotických (hypodiploidních) buněk v dané populaci (viz graf č. 2). Typické histogramy ukazují, že po působení látky EF24 se nevyskytuje zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi ani v G2/M fázi (viz obr. č. 10–12). Tyto výsledky jsou v rozporu s publikací D. Subramaniam a jeho kolegů v článku zabývajícím se látkou EF24 a jejím vlivem na buňky rakoviny tlustého střeva. V těchto studiích prokázali, že EF24 zastavuje buněčný cyklus v G2/M fázi a v G0/G1 fázi (Subramaniam *et al.*, 2008). Rozdílné výsledky by mohly být způsobeny odlišností různých typů použitých buněk. Z výsledků průtokového cytometru můžeme usoudit, že pokles proliferace buněk je na úkor indukce buněčné smrti.

Aby byl potvrzen výskyt apoptosy, tak byla sledována morfologie jader pomocí fluorescenčního mikroskopu a byla provedena analýza kaspasové aktivity. Sledováním morfologie jader bylo potvrzeno, že EF24 indukuje buněčnou smrt, která má morfologické znaky apoptosy. Buňky ztrácejí kontakt se sousedními buňkami, dochází u nich k degradaci cytoskeletu, cytoplasmatické a jaderné kondenzaci

a následné fragmentaci chromatinu. Buňka se rozpadá a vytváří apoptotická tělíška (viz obr. č. 13–15). Analýzou kaspasové aktivity bylo zjištěno, že v průběhu procesu buněčné smrti indukované EF24 docházelo ke zvýšení aktivity kaspasy přibližně 25 x oproti kontrolním neovlivněným buňkám (viz graf č. 4). To je důkaz toho, že buněčná smrt má apoptotický charakter s biochemickými znaky.

Těmito postupnými analýzami se prokázalo, že charakter buněčné smrti po působení látky EF24 je apoptotický s morfologickými a biochemickými znaky.

Po provedení MTT testu se ukázalo, že buňky mateřské buněčné linie K562 i rezistentní buňky K562/DOX a K562/HHT vykazují stejný pokles viability a proliferace po působení různých koncentrací látky EF24 (viz graf č. 1). Na základě analýzy buněčného cyklu a morfologie jader je zřejmé, že po působení vyšší koncentrace EF24 mají rezistentní buňky K562/DOX nižší obsah apoptotických buněk než mateřské buňky K562, což by mohlo svědčit o rezistenci buněk K562/DOX. Naopak K562/HHT vykazují vyšší citlivost vůči látce EF24 a přitom jsou charakteristické vysokou expresí P-gp (není ukázáno). Z výsledků je patrné, že se zde projevují vlivy jiných faktorů, které nesouvisí s expresí P-gp (viz graf č. 2, 3).

Nedávno byly provedeny experimenty s inhibítozem transportéru P-gp – PSC 833 (valsopodar). Po aplikaci inhibítora nebyl detekován vliv na rezistentní buňky (předběžné experimenty, byly provedeny pouze dvakrát, výsledky neuvedeny). Můžeme tedy usoudit, že exprese P-gp neovlivňuje citlivost buněk vůči EF24.

7. Závěr

- Byla vypracována rešerše na téma vliv přírodních a syntetických kurkuminů na proliferaci leukemických buněk.
- Pomocí MTT testu bylo prokázáno, že EF24 inhibuje proliferaci a viabilitu buněk. Nebyl detekován rozdíl mezi senzitivními a rezistentními buněčnými liniemi.
- Z výsledků průtokového cytometru a podle sledované morfologie jader bylo prokázáno, že EF24 indukuje buněčnou smrt, která má morfologické znaky apoptosy. Rezistentní buňky K562/DOX po působení vyšší koncentrace EF24 obsahovaly nižší počty apoptotických buněk než mateřské buňky K562. Naopak K562/HHT vykazovaly vyšší citlivost vůči látce EF24.
- Z histogramů bylo zjištěno, že EF24 nezpůsobuje blokaci v G1/S fázi a G2/M fázi buněčného cyklu.
- Pokles proliferace buněk je na úkor indukce buněčné smrti.
- Podle analýzy kaspasové aktivity bylo potvrzeno, že EF24 indukuje apoptosu, která má biochemické znaky.
- Bylo zjištěno, že exprese P-gp neovlivňuje citlivost buněk vůči EF24.

8. Seznam použité literatury

Adams, B. K., Cai, J., Armstrong, J., Herold, M., Lu, Y. J., Sun, A., Snyder, J. P., Liotta, D. C., Jones, D. P., Shoji, M. (2005): EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism. *Anticancer Drugs* (16): 263–275

Adams, J. M., Cory, S. (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* (281): 1322–1326

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 anti-cancer and antiangiogenesis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (12): 3871–3883

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

Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (39): 361–398

Ambudkar, S. V. Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., Gottesman, M. M. (2003): P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* (22): 7468–7485

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

Baeuerle, P. A. (1998): I κ B–NF- κ B structures: at the interface of inflammation control. *The Journal of Cell Biology* (95): 729–731

Baeuerle, P. A., Henkel, T. (1994): Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review of Immunology* (12):141–179

Basnet, P., Skalko-Basnet, N. (2011): Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules* (16): 4567–4598

Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V., Baldwin, A. S. Jr. (1993): Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a

mechanism for NF- κ B activation. *Molecular and Cellular Biology* (13): 3301–3310

Bengmark, S. (2006): Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF κ B 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

Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M. P., Bours, V. (2003): NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* (22): 90–97

Bhattacharyya, S., Mandal, D., Saha, B., Sen, G. S., Das, T., Sa, G. (2007): Curcumin prevents tumor-induced T-cell apoptosis through Stat-5a-mediated Bcl-2 induction. *The Journal of Biological Chemistry* (282):15954–15964

Boatright, K. M., Salvesen, G. S. (2003): Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* (15): 725–731

Bradley, G., Juranka, P. F., Ling, V. (1988): Mechanism of multidrug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* (948): 87–128

Bradley, G., Naik, M., Ling, V. (1989) P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Research* (49): 2790–2796

Braun, T., Carvalho, G., Fabre, C., Grosjean, J., Fenaux, P., Kroemer, G. (2006): Targeting NF- κ B in hematologic malignancies. *Cell Death and Differentiation* (13): 748–758

Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., Irimie, A. (2009): Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncologica* (48): 811–821

Callander, N. S., Varki, N., Rao, L. V. (1992): Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* (70): 1194–1201

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

Catz, S. D., Johnson, J. L. (2001): Transcriptional regulation of *bcl-2* by nuclear factor κ B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* (20): 7342–7351

Chainani-Wu, N. (2003): Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: A component of turmeric (*Curcuma longa*). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* (9): 161–168

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

Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H., Ballard, D. W. (1997): Suppression of tumor necrosis factor–induced cell death by inhibitor of apoptosis c – IAP2 is under NF–kappaB control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (94): 10057–10062

Chung, J. H., Eng, C. (2005): Nuclear–Cytoplasmic Partitioning of Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 (PTEN) Differentially Regulates the Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Research* (65): 8096–8100

Cilloni, D., Martinelli, G., Messa, F., Baccarani, M., Saglio G. (2007): Nuclear factor kB as a target for new drug development in myeloid malignancies. *The hematology journal* (92): 1224–1229

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): Over–expression of a transporter gene in multidrug–resistant human lung cancer cell line. *Science* (258): 1650–1654

Cordon–Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R., Melamed, M. R. (1990): Expression of the multidrug resistance gene product (P–glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (38): 1277–1287

Contrino, J., Hair, G., Kreutzer, D. L., Rickles, F. R. (1996): *In situ* expression of antigenic and functional tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nature Medicine* (2): 209–215

Coqueret, O. (2003): New roles for p21 and p27 cell–cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology* (13): 65–70

Dawson, R. J. P., Locher, K. P. (2006): Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* (443): 180–185

de Groot R. P., Coffey, P. J., Koenderman, L. (1998): Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL–3/ IL–5/GM–CSF receptor family. *Cell Signalling* (10): 619–628

Dean, M. (2005): The genetics of ATP–binding cassette transporters. *Methods in Enzymology* (400): 409–429

Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001a): The human ATP–binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* (42): 1007–1017

- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001b) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* (11): 1156–1166
- Dhandapani, K. M., Mahesh, V. B., Brann, D. W. (2007): Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *Journal of Neurochemistry* (102): 522–538
- Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P. (2000): The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* (100): 387–390
- 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 of the United States of America* (95): 15665–15670
- 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
- Eckford, P. D., Sharom, F. J. (2009): ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chemical Review* (109): 2989–3011
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* (75): 817–825
- Eng, C. (2003): PTEN: one gene, many syndromes. *Human Mutation* (3):183–198
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H. M. (1999): The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* (341): 164–172
- Ferrandez, A., Prescott, S., Burt, R. W. (2003): COX-2 and colorectal cancer. *Current Pharmaceutical Design* (9): 2229–2251
- Fukuda, Y., Schuetz, J. D. (2012): ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical Pharmacology* (83): 1073–1083
- Garcea, G., Berry, D. P., Jones, D. J., Singh R, Dennison, A. R., Farmer, P. B., Sharma, R. A., Steward, W. P., Gescher, A. J. (2005): Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (14): 120–125
- Gasparini, G. (1995): Biological and clinical role of angiogenesis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* (36):103–107
- Ghosh, S., Karin, M. (2002): Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* (109): 81–96

- Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* (2): 48–58
- Gottesman, M. M., Pastan, I. (1988): The multidrug transporter, a double-edged sword. *The Journal of Biological Chemistry* (263): 12163–12166
- Grana, X . , Reddy, E. P. (1995): Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth supressor genes and cyclin dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Blood* (11): 211–219
- Grutter, M. G. (2000): Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology* (10): 649–55
- Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., Aggarwal, B. B. (2012): Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (39): 283–299
- Harris, R.E. (2007): Cyclooxygenase–2 (COX–2) and the inflammogenesis of cancer. *Subcellular Biochemistry* (42): 93–126
- Hayden, M. S., Ghosh, S. (2008): Shared principles in NF–kappaB signaling. *Cell* (132): 344–362
- Hegedűs, T., Órfi, L., Seprődi, 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
- Higgins, C. F., Gottesman, M. M. (1992): Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in Biochemical Sciences* (17): 18–21
- Hoehle, S. I., Pfeiffer, E., Metzler, M. (2007): Glucuronidation of curcuminoids by human microsomal and recombinant UDP–glucuronosyltransferases. *Molecular Nutrition & Food Research* (51): 932–938
- Holder, G. M., Plummer, J. L., Ryan, A. J. (1978): The metabolism and excretion of curcumin (1,7–bis–(4–hydroxy–3 methoxyphenyl)–1,6– heptadiene–3,5–dione) in the rat. *Xenobiotica* (8): 761–768
- Hong, R. L., Spohn, W. H., Hung, M. C. (1999): Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. *Clinical Cancer Research* (5): 1884–1891
- 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

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

Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., Higgins, C. F. (1990): Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* (346): 362–365

Inagaki, N., Gonoj, T., Clement, J. P. T., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J. (1995): Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* (270): 1166–1170

Ireson, C. R., Jones, D. J., Orr, S., Coughtrie, M. W., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P., Gescher, A. J. (2002): Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (11): 105–111

Jacquemin, E. (2000): Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. *Clinical Liver Disease* (4): 753–763

Jagetia, G. C., Aggarwal, B. B. (2007): Spicing up of the immune system by curcumin. *Journal of Clinical Immunology* (27): 19–35

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

Juranka, P. F., Zastawn, R. L., Ling, V. (1989): P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* (3): 2583–2592

Kawakami, H., Tomita, M., Matsuda, T., Ohta, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Hatano, M., Tokuhisa T., Mori, N. (2005): Transcriptional activation of survivin through the NF- κ B pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *International Journal of Cancer* (115): 967–974

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., Li, Z. W. (2002a): NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer* (2): 301–310

Karin, M., Lin, A. (2002b): NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* (3): 221–227

Kasinski, A. L., Du, Y., Thomas, S. L., Zhao, J., Sun, S. Y., Khuri, F. R., Wang, C. Y., Shoji, M., Sun, A., Snyder, J. P., Liotta, D., Fu, H. (2008): Inhibition of I κ B Kinase-Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway by 3,5-Bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a Novel Monoketone Analog of Curcumin. *Molecular Pharmacology* (74): 654–661

Kerr, J. F. R. (1971): Shrinkage Necrosis: a Distinct Mode of Cellular Death. *The Journal of Pathology* (105): 13–20

Kerr, J. F. R., 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

Khoshnan, A., Tindell, C., Laux, I., Bae, D., Bennett, B., Nel, A. E. (2000): The NF- κ B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4⁺ lymphocytes. *The Journal of Immunology* (165): 1743–1754

Kim, G. Y., Kim, K. H., Lee, S. H., Yoon, M. S., Lee, H. J., Moon, D. O., Lee, C. M., Ahn, S. C., Park, Y. C., Park, Y. M. (2005): Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF- κ B as potential targets. *The Journal of Immunology* (174): 8116–8124

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

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

Kurose, K., Zhou, X. P., Araki, T., Cannistra, S. A., Maher, E. R., Eng, C. (2001): Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *American Journal of Pathology* (158): 2097–2106

Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., George, M. C. (1985): Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Letters* (29): 197–202

Lagas, J. S., van Waterschoot, R. A., van Tilburg, V. A., Hillebrand, M. J., Lankheet, N., Rosing, H., Beijnen, J. H., Schinkel, A. H. (2009): Brain accumulation of dasatinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by elacridar treatment. *Clinical Cancer Research* (15): 2344–2351

Lampe, V., Milobedzka, J. (1913): Studien über Curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* (46): 2235–2237

Landi, S., Moreno, V., Gioia-Patricola, L., Guino, E., Navarro, M., de Oca, J., Capella, G., Canzian, F., Bellvitge Colorectal Cancer Study Group (2003): Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α , NF κ B, and peroxisome proliferator-activated receptor with colorectal cancer. *Cancer Research* (63): 3560–3566

Lee, S., Choi, E. J., Jin, C., Kim, D. H. (2005): Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecologic Oncology* (97): 26–34

Leopard, G. D., Fojo, T., Bates, S. E. (2003): The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* (8): 411–424

Li, L., Braiteh, F. S., Kurzrock, R. (2005): Liposome–encapsulated curcumin: *in vitro* and *in vivo* effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *The Cancer Journal* (104): 1322–1331

Li, J., Simpson, L., Takahashi, M., Miliareisis, C., Myers, M. P., Tonks, N., Parsons, R. (1998): The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Research* (58): 5667–5672

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

Linton, K. J. (2007): Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* (22): 122–130

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, A., Lou, H., Zhao, L., Fan, P. (2006): Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (40): 720–727

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

Mayo, L. D., Dixon, J. E., Durden, D. L., Tonks, N. K., Donner, D. B. (2002): PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *The Journal of Biological Chemistry* (277): 5484–5489

Malemud, C. J. (2007): Inhibitors of stress–activated protein/ mitogen–activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Pharmacology* (7): 339–343

Marnett, L. J., DuBois, R. N. (2002): COX–2: a target for colon cancer prevention. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (42): 55–80

Martinez–Mir, A., Paloma, E., Allikmets, R., Ayuso, C., del Rio, T., Dean, M., Vilageliu, L., Gonzalez–Duarte, R., Balcells, S. (1998): Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene *ABCR*. *Nature Genetics* (18): 11–12

- Metzler, M., Pfeiffer, E., Schulz, S. I., Dempe, J. S. (2013): Curcumin uptake and metabolism. *BioFactors* (39): 14–20
- Milobedzka, J., Kostanecki, S., Lampe, V. (1910): Zur Kenntnis des Curcumins. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* (43): 2163–2170
- Minderman, H., O'Loughlin, K. L., Pendyala, L., Baer, M. R. (2004): VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clinical cancer Research* (10): 1826–1834
- 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
- Morrison, D. K., Davis, R. J. (2003): Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (19): 91–118
- Mosmann, T. (1983): Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* (65): 55–63
- Mukhopadhyay, A., Basu, N., Ghatak, N., Gujral, P. K. (1982): Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. *Agents and Actions* (12): 508–515
- Nemerson, Y. (1988): Tissue factor and hemostasis. *Blood* (71): 1–8
- Neves H., Ramos C., Gomes da Silva M., Parreira A, Parreira L. (1999): The nuclear topography of *ABL*, *BCR*, *PML* and *RAR α* genes: evidence of gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* (93): 1197–1207
- Ohori, H., Yamakoshi, H., Tomizawa, M., Shibuya, M., Kakudo, Y., Takahashi, A., Takahashi, S., Kato, S., Suzuki, T., Ishioka, C., Iwabuchi, Y., Shibata, H. (2006): Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* (5): 2563–2571
- Oyagbemi, A. A., Saba, A. B., Ibraheem, A. O. (2009): Curcumin: from food spice to cancer prevention. *Asian Pacific journal of cancer prevention* (10): 963–937
- 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

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

Park, M. J., Kim, E. H., Park, I. C., Lee, H. C., Woo, S. H., Lee, J. Y., Hong, Y. J., Rhee, C. H., Choi, S. H., Shim, B. S., Lee, S. H., Hong, S. I. (2002): Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by upregulating cyclin–dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53. *International Journal of Oncology* (21): 379–383

Pfeiffer, E., Hoehle, S. I., Walch, S. G., Riess, A., Solyom, A. M., Metzler, M. (2007): Curcuminoids form reactive glucuronides *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (55): 538–544

Preetha, A., Banerjee, R., Huilgol, N. (2007): Tensiometric profiles and their modulation by cholesterol: implications in cervical cancer. *Cancer Investigation* (25): 172–181

Rafiee, P., Nelson, V. M., Manley, S., Wellner, M., Floer, M., Binion, D. G., Shaker, R. (2009): Effect of curcumin on acidic pH–induced expression of IL–6 and IL–8 in human esophageal epithelial cells (HET–1A): role of PKC, MAPKs, and NFkappaB. *American Journal of Physiology–Gastrointestinal and Liver Physiology* (296): 388–398

Rajasingh, J., Raikwar, H. P., Muthian, G., Johnson, C., Bright, J. J. (2006): Curcumin induces growth–arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active JAK–STAT pathway in T–cell leukemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (340): 359–368

Ramachandran, C., Rodriguez, S., Ramachandran, R., Raveendran Nair, P. K., Fonseca, H., Khatib, Z., Escalon, E., Melnick, S. J. (2005): Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines. *Anticancer Research* (25): 3293–3302

Ravindranath, V., Chandrasekhara, N. (1981): Metabolism of curcumin: Studies with [3H]curcumin. *Toxicology* (22): 337–344

Rees, D. C., Johnson, E., Lewinson, O. (2009): ABC transporters: The power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (10): 218–227

Rennefahrt, U., Janakiraman, M., Ollinger, R., Troppmair, J. (2005): Stress kinase signaling in cancer: fact or fiction? *Cancer Letters* (217): 1–9

Robey, R. W., Massey P. R., Amiri-Kordestani, L., Bates, S. E. (2010): ABC transporters: unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS. *Anti–cancer Agents in Medicinal Chemistry* (10): 625–633

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

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., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., Doyle, L. A. (1999): Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantroneselected cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* (91): 429–433

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

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

Seigneuret, M., Garnier–Suillerot, A. (2003): A Structural Model for the Open Conformation of the *mdr1* P-glycoprotein Based on the *MsbA* Crystal Structure. *The Journal of Biological Chemistry* (278): 30115–30124

Selvendiran, K., Tong, L., Vishwanath, S., Bratasz, A., Trigg, N. J., Kutala, V. K., Hideg, K., Kuppusamy, P. (2007): EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *The Journal of Biological Chemistry* (282): 28609–28618

Shao, J., Lee, S. B., Guo, H., Evers, B. M., Sheng, H. (2003): Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin. *Cancer Research* (63): 5218–5223

Sharma, O.P. (1976): Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical Pharmacology* (25): 1811–1812

Sharma, R. A., Gescher, A. J., Steward, W. P. (2005): Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer* (41): 1955–1968

Sharom, F. J. (2008): ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* (9): 105–127

Shen, D. W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1986): Human multidrugresistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* (232): 643–645

- Shin, H. K., Kim, J., Lee, E. J., Kim, S. H. (2010): Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF- κ B activations. *Phytotherapy Research* (24): 577–582
- Shukla, S., Ohnuma, S., Ambudkar, S.V. (2011): Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Current Drug Targets* (12): 621–630
- Shukla, S., Wu, C. P., Ambudkar, S. V. (2008): Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* (4): 205–223
- Siomek, A. (2012): NF- κ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochimica Polonica* (59): 323–331
- Sorensen, B. B., Persson, E., Freskgard, P.-O., Kjalke, M., Ezban, M., Williams, T., Rao, V. M. (1997): Incorporation of an active site inhibitor in factor VIIa alters the affinity for tissue factor. *The Journal of Biological Chemistry* (272): 11863–11868
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P. S. (1998): Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica* (64): 353–356
- Singh, N., Anand, S. (1995a): Apoptosis in health and disease. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* (39): 91–94
- Singh, S., Aggarwal, B. B. (1995b): Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *The Journal of Biological Chemistry* (270): 24995–25000
- Srimal, R. C., Dhawan, B. N. (1973): Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (25): 447–452
- Srinivasan, M. (1972): Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. *Indian Journal of Medical Sciences* (26): 269–270
- Stavrovskaya, A. A. (2000): Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Moscow)* (65): 95–106
- Strimpakos, A. S., Sharma, R. A. (2008): Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxidants & Redox Signaling* (10): 511–545
- 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

Sugiyama, Y., Kawakishi, S., Osawa, T. (1996): Involvement of the β -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochemical Pharmacology* (52): 519–525

Suhara, T., Kim, H. S., Kirshenbaum, L. A., Walsh, K. (2002): Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Molecular and Cellular Biology* (22): 680–691

Sun, A., Shoji, M., Lu, Y. J., Liotta, D. C., Snyder, J. P. (2006): Synthesis of EF24-Triptide Chloromethyl Ketone: A Novel Curcumin-Related Anticancer Drug Delivery System. *Journal of Medicinal Chemistry* (49): 3153–3158

Suresh, D., Srinivasan, K. (2007): Studies on the *in vitro* absorption of spice principles—curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food and Chemical Toxicology* (45): 1437–1442

Surh, Y. J. (2003): Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* (3): 768–780

Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., Gottesmann, M. M. (2006): Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* (5): 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

Tak, P. P., Firestein, G. S. (2001): NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation* (107): 7–11

Taubert, H., Meye, A., Wurl, P. (1996): Prognosis is associated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Research* (56): 4134–4136

Tew, K. D. (1994): Glutathione-associated enzymes in anti-cancer drug resistance. *Cancer Research* (54): 4313–4320

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., Willingham, M. C. (1989): Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (37): 159–164

Thomas, P. M., Cote, G. J., Wohlk, N., Haddad, B., Mathew, P. M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R. F., Bryan, J. (1995) Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* (268): 426–429

Thomas, S. L., Zhong, D., Zhou, W., Malik, S., Liotta, D., Snyder, J. P., Hame, E., Giannakakou, P. (2008): EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1. *Cell Cycle* (7): 2409–2417

Tsujii, M., DuBois, R. N. (1995): Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* (83): 493–501

Twentyman, P. R., Bleehen, N. M. (1991): Resistance modification by PSC–833, a novel nonimmunosuppressive cyclosporin. *European Journal of Cancer* (27): 1639–1642

Tyzack, J. K., Wang, X., Belsham, G. J., Proud, C. G. (2000): ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP–dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry* (275): 34131–34139

van Helvoort, A., Smith, A. J., Sprong, H., Fritzsche, 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. *The Journal of Cell Biology* (87): 507–517

Vazquez, F., Sellers, W. R. (2000): The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3–kinase signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* (1470): 21–35

Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. (1995): Rel/NF–kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development* (9): 2723–2735

Venkatesen, P., Unnikrishnan, M. K., Sudheer Kumar, M., Rao, M. N. A. (2003) Effect of curcumin analogues on oxidation of haemoglobin and lysis of erythrocytes. *Current Science* (84): 74–78

Verfaillie, C. M. (1998): Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* (12): 1–29

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

Vogel, A. Jr. (1842): *Journal de Pharmacie et de Chimie* (3): 20

Yang, X., Fraser, M., Moll, U. M., Basak, A., Tsang, B. K. (2006): Akt–mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase–dependent mitochondrial death pathway. *Cancer Research* (66): 3126–3136

Zhou, H., Beevers, C. S., Huang, S. (2011): Targets of curcumin *Current Drug Targets* (3): 332–347

Internetové zdroje:

<http://www.dojindo.com/store/p/193-Cellstain-Trypan-Blue.aspx>

<http://www.dojindo.com/store/p/302-MTT.aspx>

<http://www.inriodulce.com/links/Turmeric.html>

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
ATP	adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
<i>BCR</i>	breakpoint cluster region
<i>BCR–ABL</i>	fúzní leukemický gen
BCRP, ABCG2	breast cancer resistance protein (rezistentní protein rakoviny prsu)
Cdc	cell division cycle
CFTR	transmembránový regulátor na cystickou fibrózu
CML	chronická myeloidní leukémie
COX–2	cyklooxygenasa–2
ECACC	European Collection of Cell Cultures
fVIIa	protein faktoru VIIa
FFRck	fenylalanin–fenylalanin–arginin chlormethyl keton
ICDs	intracellular domains (intracelulární domény)
IκB	inhibitor–kappaB
IKK	IκB kinasa
IL–8	interleukin–8
iNOS	inducible nitric oxide synthase (inducibilní syntasa oxidu dusnatého)
MAPK	mitogenem aktivované protein kinasy
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MDR	multidrug resistance (mnohočetná léková rezistence)
MDR1, ABCB1, P–gp	P–glycoprotein
MRP1, ABCC1	multidrug resistance protein 1 (protein 1 spojený s MDR)
MTT	3–(4,5 dimethylthiazol–2–yl)–2,5–difenyl tetrazolium bromid
NBDs	nucleotid binding domains (nukleotid vázající domény)
PI3K/Akt	fosfatidylinositol–3 kinasa
PIP3	fosfatidyl–inositol–3–fosfát
PTEN	phosphatase and tensin homolog

STAT	signal transducer and activator of transcription
SUR	sulfonylurea receptor
TF	tkáňový faktor
TKIs	tyrosin kinasové inhibitory
TMDs	transmembrane domains (transmembránové domény)
TNF- α	tumor necrosis factor- α (tumor nekrotizující faktor- α)
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulární endoteliální růstový faktor)