

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Barbora Knoppová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovení chemorezistence u pacientů
s akutní lymfoblastickou leukemií**

Bakalářská práce

Barbora Knoppová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: MUDr. Michaela Špenerová

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
MUDr. Michaely Špenerové s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 2. 8. 2010

.....

Ráda bych poděkovala za odborné připomínky a vedení při zpracování této práce vedoucí práce MUDr. Michaele Špenerové.

SOUHRN

V této bakalářské práci jsem se zabývala stanovením chemorezistence *in vitro* podmínkách u pediatrických pacientů s diagnózou akutní lymfoblastické leukemie. Od těchto pacientů byly odebrány vzorky kostní dřeně 0. den před zahájením léčby a 8. den léčby. Z dodaných vzorků jsem vyizolovala leukemické buňky a nechala je kultivovat v různé koncentraci glukokortikoidu – dexamethasonu nebo prednisolonu. Pomocí 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromidového (MTT) testu jsem stanovila koncentraci léčiva, ve kterém bylo usmrceno 50 % leukemických buněk (EC_{50}). Ze získaných hodnot jsem určila, zda je pacient na studované glukokortikoidy senzitivní nebo rezistentní.

SUMMARY

In this bachelor's thesis I was determining the *in vitro* resistance of paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia. From these patients samples of bone marrow were obtained on 0th day before beginning of treatment and on 8th day of treatment. I isolated leukemic cells from bone marrow and cultivated them in different concentration of glucocorticoid – dexamethasone or prednisolone. By using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay I determined the concentration of drug, which kills 50 % leukemic cells (EC₅₀). According to the obtained values I determined whether the patient is sensitive or resistant to the studied glucocorticoids.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍLE PRÁCE	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1. Leukemie	10
3.1.1. Akutní lymfoblastická leukemie.....	10
3.1.1.1. <i>Klasifikace ALL</i>	11
3.1.1.2. <i>Klinické symptomy ALL</i>	13
3.1.1.3. <i>Diagnostika ALL</i>	14
3.1.1.4. <i>Příčiny vzniku ALL</i>	14
3.1.1.5. <i>Léčba ALL</i>	16
3.2. Glukokortikoidy.....	17
3.2.1. Glukokortikoidový receptor	18
3.2.1.1. <i>Struktura glukokortikoidového receptoru</i>	19
3.2.1.2. <i>Postranslační úpravy glukokortikoidového receptoru</i>	19
3.2.1.3. <i>Aktivace glukokortikoidového receptoru</i>	20
3.3. Apoptóza.....	21
3.4. Chemorezistence.....	23
3.5. Působení dexamethasonu a prednisolonu	24
4. MATERIÁL A METODIKA	25
4.1. Biologický materiál	25
4.2. Izolace leukemických buněk.....	25
4.3. MTT test	26
4.3.1. <i>Princip kolorimetrického MTT testu</i>	27
4.4. Použité chemikálie.....	27
4.5. Použité roztoky	27
4.6. Použité laboratorní přístroje	28
5. VÝSLEDKY	29
6. DISKUZE	31
7. ZÁVĚR	32
8. LITERATURA	33
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	40

1. ÚVOD

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastějším nádorovým onemocněním v dětském věku. V České republice ročně onemocní 70 až 90 dětí. Na léčbu tohoto onemocnění se zaměřují specialisté v hematonekologických centrech, kde postupují podle mezinárodně standardizovaných léčebných protokolů. Od osmdesátých let minulého století přistoupila česko-slovenská pracovní skupina pro dětskou hematonekologii na léčbu podle BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) protokolu. Za použití vysoce agresivních protokolů bylo dosaženo výrazně lepších léčebných výsledků, které ale byly neúměrně toxické a způsobovaly závažné nežádoucí vedlejší účinky. V současnosti jsou pacienti, jejichž nemoc je léčitelná i méně agresivním léčebným protokolem, nuceni podstoupit zbytečně intenzivní cytotoxickou léčbu. V budoucnu by bylo pro tyto pacienty výhodnější odklonit se od protokolární léčby a léčebné schéma jim přizpůsobit.

Přizpůsobení léčby ale předchází nalezení statisticky významné vazby mezi diagnostikovanými parametry, mezi které patří morfologické odlišnosti, rozdílný imunofenotyp, cytogenetické změny a neméně důležitým údajem je i stupeň vnímavosti na cytostatika, který lze určit v *in vitro* podmínkách použitím kolorimetrického MTT testu (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromidu). Včasné určení rezistence na některé z léčiv protokolu by mělo směřovat k úpravě léčebného postupu u konkrétního pacienta. Chemosenzitivní pacienti by byli léčeni s minimálně toxickou terapií oproti pacientům, kteří by vykazovali rezistenci, ti by byli léčeni agresivněji. Takovouto individualizací léčby by se dosáhlo zkvalitnění terapie (Mihál et al, 2000, 2004).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je stanovit *in vitro* chemorezistenci leukemických buněk dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií na kortikoidy – prednisolon a dexamethason pomocí cytotoxického MTT testu.

Z kostní dřeně pacientů vyizolovat nádorové buňky gradientovou centrifugací a následně kultivovat *in vitro* s testovanými látkami. V *in vitro* podmínkách sledovat reakci vyizolovaných vitálních nádorových buněk konkrétního pacienta na jednotlivé látky.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Leukemie

Leukemie jsou heterogenní skupinou onemocnění postihující hematopoetický systém. Blasticky transformované nádorové buňky ztrácejí schopnost diferenciaci ve zralou, plně funkční krevní buňku, ale mají zachovaný anebo vyšší proliferační potenciál. Tento stav vede k nekontrolovatelnému buněčnému dělení, leukemické blasty jsou kumulovány v kostní dřeni a způsobují její selhání, což má za následek celou řadu klinických a laboratorních projevů.

Leukemie můžeme klasifikovat podle různých kritérií, podle průběhu je lze rozdělit na akutní a chronické, podle toho, ve které vývojové řadě dojde k maligní transformaci pak na lymfoblastické a myeloidní leukemie. Akutní lymfatická leukemie (ALL) je charakterizována poruchou v proliferaci a diferenciaci lymfoidní vývojové řady, v důsledku čeho dochází k hromadění nezralých lymfocytů (lymfoblastů) v kostní dřeni. Pro akutní myeloidní leukemii (AML) je pak charakteristická přítomnost myeloblastů, které vznikají poruchou proliferace a diferenciaci myeloidní progenitorové buňky (Provan et al., 2007).

3.1.1. Akutní lymfoblastická leukemie

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastější pediatriickou hematologickou malignitou a nejčastějším dětským nádorovým onemocněním vůbec. Nejvyšší incidence onemocnění je ve věku 1 až 6 let (3,5/100 000 dětí do 15 let) a s rostoucím věkem klesá, po 40 roku věku dochází k mírnému nárůstu onemocnění. Nemoc je častější u chlapců než u dívek. U 95 – 98 % pediatrických pacientů je dosažena kompletní remise tj. stav, který je charakterizován vymizením symptomů nemoci, normalizací počtu bílých krvinek a obnovením správné funkce kostní dřene. Kompletní remise je diagnostikována, jestliže je v periferní krvi nejméně $1,5 \times 10^9/l$ neutrofilních segmentů, trombocytů je více než $100 \times 10^9/l$, hladina hemoglobinu je $> 100 \text{ g/l}$, v nátěrech nejsou přítomny žádné blasty a v kostní dřeni je méně než 25 % blastů. U 75 – 85 % pediatrických pacientů v remisi je předpoklad dlouhodobého přežití, avšak ve 20 – 25 % případů dochází k opětovnému návratu příznaků nemoci – relapsu, kdy se v periferní krvi nachází více jak 5 % blastů (Behrman et al, 2000; Mayer et al., 2002; Mihál 2004).

3.1.1.1. Klasifikace ALL

Klasifikace ALL je prováděna na základě imunofenotypu nebo morfologických vlastností maligních leukocytů izolovaných z pacientovy kostní dřeně. Maligní leukocyty se od normálních odlišují následujícími znaky: imunoglobulinovými přestavbami, změnami v genu pro T – lymfatický receptor, odlišnou expresí antigenů a rozdílnými glykoproteiny na svém povrchu.

Imunologická klasifikace vychází z rozdílného imunofenotypu určeného pomocí flow cytometrie. Touto klasifikací se ALL primárně dělí na ALL B řady, ALL T řady a na bifenotypickou ALL. U nemaligní B – lymfocytární řady jsou přítomny antigeny CD19, CD20, CD22 a u T – lymfocytární řady antigeny CD2, CD3 a CD7. Leukemické buňky mají tyto antigeny exprimovány odlišně a navíc nesou další typy antigenů, podle jejichž rozdílné exprese jsou rozlišovány podtypy ALL. V tabulce č. 1 je uvedena klasifikace ALL řady B.

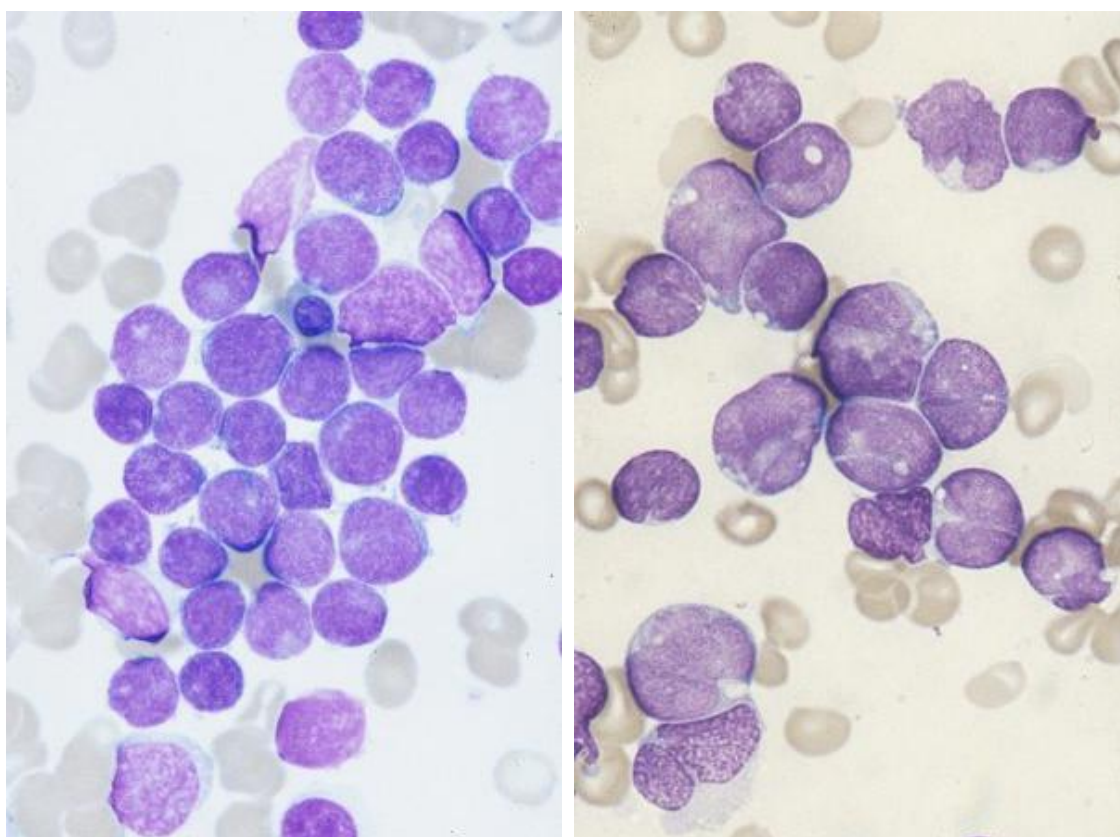
Tab. č. 1: Imunologická klasifikace ALL B řady (převzato a upraveno podle Mayer et al, 2002)

Typ B ALL	Podtyp	Charakteristika a imunofenotyp	Četnost u dětí [%]	Molekulární genetika	Prognóza
prekurzorová (BCP ALL)	<i>proB ALL</i>	velmi nezralé B prekurzory, CD10 ⁻	5 – 6 častá u kojenců	MLL/AF4	špatná
	<i>common ALL (cALL)</i>	vyzrálější preB lymfocyty, CD10 ⁺	50 – 65 nejvíce v předškolním věku	TEL/AML1, hyperdiploidie	příznivá
	<i>preB ALL</i>	nejvyšší stupeň vyzrání, obvykle CD10 ⁺ , cytoplazmat. IgM ⁺	15 - 30 nejvíce v předškolním věku	t(1;19)	příznivá
zralá B ALL		zralé B – lymfocyty, polovina CD10 ⁺ , antigeny B-řady ⁺	2 - 4	fúze onkogenu <i>myc</i>	příznivá

Obdobně je podle stupně zralosti dělena i ALL řady T, i když jednotlivé kategorie mají odlišnou prognózu, léčba podle protokolů používaných u nás není dále stratifikována,

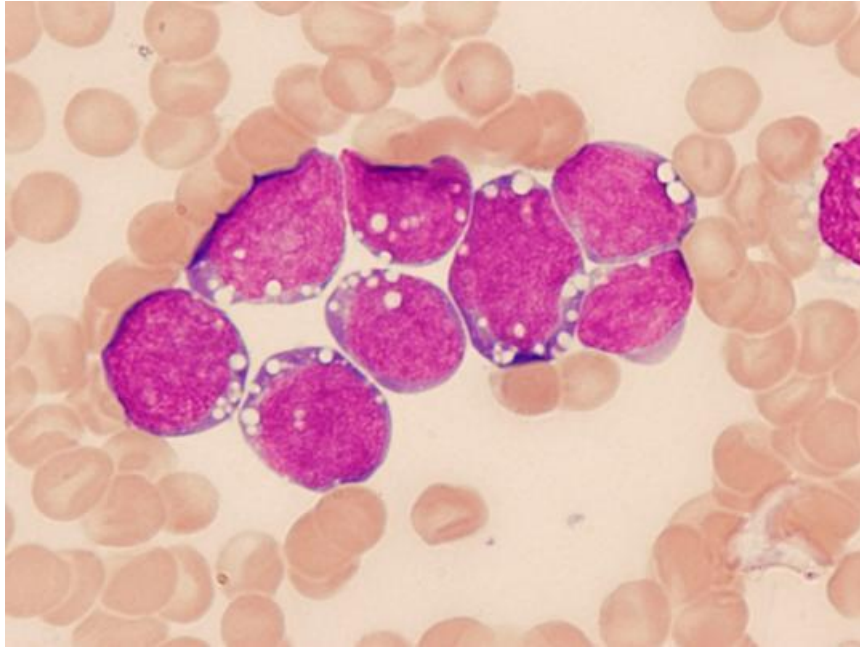
proto zde není uvedeno přesné dělení. Frekvence výskytu pediatrické ALL řady T je 12 – 15 %. U nemocných akutní bifenotypickou leukemií se nachází blasty exprimující antigeny, které se pojí jak s B- či T-řadou, tak s myeloidní řadou.

Na morfologických kritériích je založena tzv. FAB (French-American-British) klasifikace, která vznikla v roce 1976. Podle ní je ALL dělena na tři subtypy L1, L2 a L3. L1 subtyp je charakterizován malými blasty s nedostatečným obsahem cytoplazmy. Tyto blasty mají kulaté pravidelné jádro se shluky chromatinu a s nenápadným jadérkem, které může úplně scházet (viz Obr. č. 1). Subtyp L1 se vyskytuje v 70 – 80 % případů ALL. U L2 subtypu se vyskytují velké blasty s dostatečným množstvím cytoplazmy. Jádro blastů má nepravidelný tvar, chromatin je hrubě kondenzovaný a jadérko je nápadné (viz Obr. č. 1). V blastech L1 i L2 subtypu se mohou vyskytovat cytoplazmatické vakuoly. Poslední subtyp L3 je definován velkými blasty s kulatým jádrem, denzním chromatinem, nápadným jadérkem a cytoplazmatickými vakuolami viz Obr. č. 2 (Mayer et al., 2002; Pui, 2006; Pui et al, 2008).



Obr. č. 1: Blasty z kostní dřeně pacienta s cALL: subtyp L1 (vlevo), subtyp L2 (vpravo)

Zdroje: http://hmds.org.uk/insets/all_4.htm, http://hmds.org.uk/insets/all_5.htm



Obr. č. 2: Blasty ALL: subtyp L3

Zdroj: <http://home.ccr.cancer.gov/oncology/oncogenomics/WEBHemOncFiles/Review%20of%20Terms.html>

3.1.1.2. *Klinické symptomy ALL*

Prvními projevy nemoci jsou často nespecifické příznaky – tzv. B-symptomy, které doprovázejí i celou řadu dalších onemocnění. Patří k nim horečka, bledost, malátnost, únava, nechutenství, kloubní bolest, typická leukemická trias, jež zahrnuje hepatosplenomegálii, lymfadenopatii a krvácivou diatézu, je přítomna u asi jedné třetiny pacientů.

Klinické symptomy nemoci jsou nejčastěji projevem infiltrace blastů do kostní dřeně a jednotlivých tkání anebo orgánů. Infiltráty v kůži způsobují tzv. leukemia cutis, které jsou typické pro kongenitální a kojenecké leukemie. Následkem leukostázy v mozku jsou bolesti hlavy, zvracení, somnolence, v plicích je příčinou zrychleného a namáhavého dýchání. U pacientů se také vyskytuje bolest kostí a kompresivní fraktury obratlů.

V laboratorním nálezu může být přítomen normální anebo nižší počet leukocytů, hyperleukocytóza je přítomna v asi 50% případů. Leukocytózu může doprovázet významná trombocytopenie, která je příčinou poruch krevní koagulace, kdy se objevují hematomy, krvácení z dásní, epistaxe, krvácení do sítnice, menorrhagie, ale také krvácení do mozku či plic. V důsledku potlačení fyziologické krvetvorby je v periferní krvi přítomna normocytární normochromní anemie různého stupně. Vyskytuje se i neutropenie, která má za následek vznik infekcí různé etiologie a lokalizace, kdy jsou velmi časté plísňové infekce např. ústní kandidózy a invazivní plicní aspergilózy.

Komplikací onemocnění je leukemická infiltrace mozku, jejíž detekce je možná pomocí lumbální punkce s nálezem nádorových buněk v mozkomíšním moku. Infiltrace mozku způsobuje obrny hlavových nervů, strabismus, edém papily zrakového nervu a další. U chlapců se může objevit infiltrace testes (Mayer et al., 2002; Provan 2003, 2007).

3.1.1.3. Diagnostika ALL

Správné stanovení diagnózy ALL spočívá nejen ve zhodnocení anamnestických údajů a standardního klinického vyšetření, ale také v cytologické morfologii doplněné o cytochemii a výsledky dalších metod imunologických, cytogenetických a molekulárně genetických. Kritériem pro diagnózu ALL je obsah buněk kostní dřeně s jádrem tvořící lymfoblasty vyšší než 25 %.

V rámci diagnostiky ALL se jako vyšetřovaný materiál používá periferní krev, kostní dřeň a mozkomíšní mok. Pro cytologické vyšetření se používají nátěry barvené panoptickým barvením podle Pappenheima s použitím barviv Maye-Grünwaldova a Giemsa-Romanovského. Pro cytogenetické vyšetření karyotypu se používají buňky kultivované *in vitro*. Karyotyp je hodnocen pruhovacími technikami - G, C, R nebo Q pruhováním. Mezi další metody molekulární cytogenetiky patří fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), mnohobarevná *in situ* hybridizace (M-FISH), spektrální karyotypování (SKY) a srovnávací genomická hybridizace (CGH). Tyto metody se používají jak pro určení komplexních přestaveb karyotypu, tak pro detekci specifických nukleotidových sekvencí (Mayer et al., 2002; Mihál, 2004).

3.1.1.4. Příčiny vzniku ALL

Akutní lymfoblastická leukemie je onemocnění s multifaktoriální etiologií. Predisponujícími faktory pro vznik leukemie jsou některá kongenitální genetická onemocnění, která jsou charakterizována vysokým výskytem chromozomálních aberací. Tato onemocnění souhrnně označujeme jako syndromy chromozomální instability, patří zde např. Downův syndrom, ataxia telangiectasia (Syndrom Louis-Barové), Bloomův syndrom a Nijmegenův syndrom lomivosti. Predispozice mohou mít příčinu ve změněném počtu chromozómů: hyperdiploidii (> 50 chromozómů) nebo hypodiploidii (< 45 chromozómů). Při hyperdiploidii dochází nejčastěji k trizomii 4, 10 nebo 21 chromozómu (Downův syndrom). Hyperdiploidie se vyskytuje ve 25 % pediatrických pacientů s ALL

a je spojena s dobrou léčebnou prognózou. Hypodiploidie bývá diagnostikována přibližně u 1 % pediatrických pacientů a má špatnou léčebnou prognózu.

Nicméně i další genetické změny mají podíl na vzniku a rozvoji nemoci. K těmto genetickým změnám patří bodové mutace, delece, chromozomální translokace nebo genové amplifikace. Mutace v protoonkogenech, jejichž produkty se účastní normální regulace proliferace a diferenciaci buňky, vedou k jejich přeměně na onkogeny a buňku transformují v nádorovou. U více jak 50 % pacientů s T linií ALL bývá přítomen mutovaný gen NOTCH1 kódující transmembránový receptor, který reguluje normální vývoj buněk T linie. Mutace v tomto genu má za následek aktivaci MYC onkogenu a jeho nositelé mají příznivou prognózu. Transformaci buňky mají za následek i mutace v antionkogenech tj. genech potlačujících tvorbu nádoru, mezi které patří Rb-1 gen a p53 gen.

Kancerogenezi vyvolávají již zmíněné chromozomální translokace, které bývají u pacientů s ALL často identifikovány. Jde například o translokaci t(12;21) u B prekurzorové linie ALL (BCP-ALL), která způsobuje fúzi dvou genů, TEL genu odpovědného za regulaci vývoje hematopoetických buněk a AML1 genu nezbytného pro embryonální diferenciaci krevních buněk. Tato fúze vede k časným poruchám ve vývoji B linie lymfocytů. TEL/AML1 fúze se vyskytuje ve věku 1 – 5 let (25 – 30 %), velmi vzácně u adolescentů a dospělých. Je spojena s velmi dobrou prognózou (dlouhodobé přežití až 85 %) a také s dobrou chemoterapeutickou odpovědí. Při aberaci t(9;22), kdy vzniká tzv. philadelphský chromozóm, dochází k fúzi genů BCR a ABL způsobující konstitutivní expresi tyrosin kinázy. Fúzní gen BCR/ABL se vyskytuje u 5 % pacientů a je spojen se značně heterogenní léčebnou odpovědí. Aberací t(4;11) vzniká fúzní gen MLL/AF4, který je typický pro pediatrickou pro B-ALL. Produkt fúzního genu MLL/AF4 blokuje hematopoetickou diferenciaci a redukuje buněčnou smrt, což přispívá k leukemogenezi. Nositelé této translokace mívají špatnou prognózu.

Genetické změny vyvolává také ionizující záření, cytostatická léčba, účinek chemických látek (např. alkylačních činidel), ale i onkogenní viry, které způsobují mutagenezi skrze inkorporaci svého virového genomu do hostitelské DNA nebo častěji aktivací buněčného protoonkogenu (Behrman et al, 2000; Kovář, 2003; Mihál, 2004; Xia et al, 2005; Mihál, 2008; Pui et al, 2008).

3.1.1.5. *Léčba ALL*

Základem léčby dětské ALL je chemoterapie, avšak používá se i ozařování mozku a alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Chemoterapeutická léčba je rozdělena do třech fází: remisně-indukční fáze, konsolidační fáze a udržovací fáze. Cílem remisně-indukční fáze je eliminovat co nejvíce leukemických buněk a obnovit normální hematopoézu. V konsolidační fázi dochází k zintenzivnění léčby, aby se odstranily i zbývající rezistentní leukemické buňky a snížilo se tak riziko zhoršení nemoci (relapsu). Udržovací fáze léčení má předejít relapsu a trvá 2 až 2,5 roku (Pui et al, 2008).

V České republice jsou od roku 2002 pediatričtí pacienti léčeni podle ALL IC-BFM 2002 protokolu, do kterého jsou pacienti zařazeni podle několika kritérií, mezi které patří věk a *in vivo* odpověď na prednisolonovou předfázi léčby. Terapie dle tohoto protokolu vychází se stratifikace pacientů do skupin podle stupně rizika. Pacienti jsou zařazeni buď do skupiny se standardním rizikem, se středním rizikem nebo do skupiny s vysokým rizikem. Základem pro toto rozdělení je iniciální počet leukocytů v krvi, věk pacienta, počet blastů v periferní krvi 8. den léčby, morfologické odlišnosti blastů a chromozomální změny (Mihál, 2004).

V léčbě se používá kombinace cytostatik v závislosti na tom, do jaké prognostické skupiny byl pacient zařazen. Léčiva jsou podávána orálně, intravenózně nebo intrathekálně a jejich množství je specifikováno danému pacientovi. Kromě glukokortikoidů se používají například tato léčiva vinkristin, daunorubicin, doxorubicin, l – asparagináza, cytosin arabinosid, merkaptotuprin, metotrexát a další.

Úspěšnost léčby se odvíjí od genotypu ALL a rezistence leukemických blastů vůči chemoterapii. Bylo prokázáno, že nejdůležitějším a nezávislým prognostickým faktorem je rychlost redukce blastů v periferní krvi při iniciální týdenní léčbě prednisonem. Pacienti, kteří mají po této léčbě v krvi počet blastů pod 1000/ μ l (tzv. dobří respondeři na prednison) mají významně lepší prognózu než pacienti, kteří takto rychlé redukce nedosáhnou (tzv. špatní respondeři na prednisolon). Nepříznivou prognózu mají pacienti s iniciální leukocytózou $>50\,000/\mu$ l a významnou hepatosplenomegalií. Prognóza je ovlivněna věkem pacienta, kdy horší prognózu mají kojenci a nejlepší děti mezi 1 – 6 lety

Přes úspěch v iniciální fázi léčby dochází v některých případech k relapsu nemoci, který se projevuje novým nárůstem leukemických buněk v kostní dřeni nebo leukemickou infiltrací mozku anebo testes. Tyto leukemické blasty vykazují velmi často mnohočetnou

lékovou rezistenci. Ke zvratu relapsu je nutná intenzivní léčba vysokými dávkami cytostatik (Mayer et al, 2002).

3.2. Glukokortikoidy

Glukokortikoidy (GC) jsou deriváty cholesterolu a řadíme je mezi steroidní hormony. Jejich syntetické deriváty byly vyvinuty jako léčiva a v současnosti se staly jedněmi z nepředepisovanějších na světě pro léčbu mnoha nemocí.

V lidském těle jsou GC syntetizovány v kůře nadledvinek. Jejich tvorba je řízena hypotalamem, ze kterého se uvolňuje adrenokortikotropní hormon do krve a váže se na receptory v buňkách nadledvinek, tímto způsobí uvolnění GC.

Přibližně 90 % GC se váže na globuliny v krvi. Díky lipofilnímu charakteru, jsou schopné snadno procházet membránou buňky a působit tak ve veškerých tkáních. Uvnitř buňky interagují s cytoplazmou a jadernými glukokortikoidovými receptory (GR). Vzniklý komplex GC-GR ovlivňuje většinu hormonálně řízených činností.

GC se účastní mnoha biologických procesů. Působí na funkci buněk, tkání a orgánů, zapojují se do metabolismu meziproduktů proteinů, lipidů, sacharidů, podílí se na homeostáze glukózy, zachování cévního napětí, imunitní a zánětlivé regulace, mají vliv na centrální nervovou soustavu, na vývoj a programovanou buněčnou smrt (Duma et al, 2006).

Syntetické GC se užívají v léčbě imunitních a zánětlivých onemocnění, včetně astmatu, revmatoidní artritidy, degenerativní osteoartritidy, vředovitého zánětu tlustého střeva, eozinofilního zánětu žaludku, obranné reakce při transplantaci, komplikace při získaných imunodeficientních syndromech a dalších. Používají se i pro léčbu nemocí hematologického původu zahrnující Hodgkinův lymfom, ALL a mnohočetný myelom (Lu et Cidlowski, 2004). V lymfatických buňkách GC indukují zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a apoptózu (Tissing et al., 2003).

Při dlouhodobém užívání GC se objevují nepříznivé vedlejší účinky a vzniká také rezistence. Mezi nežádoucí vedlejší účinky patří například snížení svalové hmoty, rezistence na inzulin, usazování tuků, poruchy růstu, osteoporóza, katarakta, hypertenze, zvýšená fragilita cév a tvorba hematomů, zhoršené hojení ran a další. Aby se omezil vznik nežádoucích účinků, syntetizují se nová léčiva, která jsou tkáňově specifická (Mayer et al., 2002; Duma et al., 2006).

Žádoucí i nežádoucí účinky GC jsou způsobené aktivací transkripce genů. Například v lidských leukocytech GC pozitivně nebo negativně regulují přibližně 20 % exprimovaných genů. (Galon et al., 2002).

3.2.1. Glukokortikoidový receptor

Glukokortikoidy se váží na glukokortikoidový receptor (GR). Jedná se o jaderný steroidní receptor, který přísluší k transkripčním faktorům (Revollo et Cidlowski, 2009). Nachází se v cytosolu většiny lidských buněk (Hauk et al., 2002). GR je vysoce homologní k mineralokortikoidnímu, progesteronovému a androgenovému receptoru (Tissing et al., 2003).

Tento receptor je kódován genem, který je lokalizován na chromozómu 5 v oblasti 5q31 (Theriault et al., 1989). Gen pro GR se skládá celkem z 10 exonů, jejichž minimální velikost je 80 kb. Tento gen má tři rozdílné promotory, jejichž transkripty odpovídají třem variantám exonu 1: 1A, 1B a 1C. Přičemž exon 1A může být alternativně sestřižen do tří variant. Exon 1 tvoří pouze 5'-netranslatovanou sekvenci a exon 2 kóduje část aminokonce receptoru. Následujících devět exonů tvoří protein receptoru. Prvních osm je identických, kdežto devátý exon je heterologní (9 α a 9 β) (Encío et al., 1991; Tissing et al., 2006).

Alternativním sestřihem primárního transkriptu vzniká pět isoform: GR α , GR β , GR γ , GR - P a GR - A (Tissing et al., 2003).

Proteinové isoformy GR α a GR β mají prvních 727 aminokyselin stejných. GR β se liší od GR α tak, že posledních 50 aminokyselin je nahrazeno unikátní sekvencí 15 aminokyselin. GR β tak postrádá vazebnou steroidní doménu. Tento rozdíl způsobuje, že GR β není schopen vázat GC a ztrácí svou vazebnou afinitu k DNA, nemůže transaktivovat GC - senzitivní geny. V buňkách, kde je GR β více exprimovaný, dochází k tvorbě heterodimeru s GR α . Heterodimer se přemísť do jádra, kde působí jako inhibitor GR α receptoru (Hauk et al., 2002).

GR γ je výsledkem alternativního sestřihu, kdy jsou zachovány tři báze z intronu oddělující exon 3 a 4. Tyto tři báze kódují další aminokyselinu arginin v DNA vazebné doméně receptoru (Rivers et al., 1999).

Isoforma GR - P byla popsána u myelomové buněčné linie (Krett et al., 1995). GR - P je zkrácený oproti proteinu GR α na 676 aminokyselin, protože postrádá

exony 8 a 9. Je kódován exony 2 až 7 a částí intronu mezi 7 a 8 exonem (de Lange et al. 2001).

GR – A je menší než GR α protein, protože mu schází exony 5, 6 a 7. Tato isoforma je tvořena pouze 185 aminokyselinami (Moalli et al., 1993).

3.2.1.1. *Struktura glukokortikoidového receptoru*

Protein GR se skládá z několika odlišných oblastí: N – terminální domény NTD, DNA – vazebné domény DBD a C – terminální oblasti (Nicolaidis et al, 2010).

Prvních 421 aminokyselin NTD oblasti kóduje transaktivační doménu AF1. Dalších 65 aminokyselin utváří vysoce konzervované zinkové prsty DBD, které mají důležitou roli při homodimerizaci receptoru, DNA – vazebné specifitě a interakci s kofaktory (Zhou et Cidlowski, 2005). Pomocí zinkových prstů se receptor váže na glukokortikoidně odpovědné úseky (GRE) sekvence. DBD také zahrnuje jaderný lokalizační signál NLS1. První zinkový prst utváří doménu nezbytnou pro vazbu s transkripčními faktory: jaderným faktorem NF- κ B a aktivačním proteinem AP – 1. Tato vazba je důležitá pro transrepresi receptoru. Druhý zinkový prst zajišťuje dimerizaci receptoru a GRE – zprostředkovanou transaktivaci (Tissing et al., 2003).

C – terminální oblast je složena z 250 aminokyselin, které primárně tvoří ligand – vazebnou doménu LBD a obsahuje také motiv pro ligand – dependentní transaktivační doménu AF2. Funkčně je C – terminální oblast zahrnuta v interakci protein – protein s cytosolickými chaperony nebo s koregulátory. DBD i LBD obsahují jaderné lokalizační signály NLS (Zhou et Cidlowski, 2005).

3.2.1.2. *Postranlační úpravy glukokortikoidového receptoru*

Funkce GR může být ovlivněna posttranslačními úpravami: fosforylací, ubiquitinilací, sumoylací a acetylací.

Fosforylace pobíhá v oblasti NTD a může ovlivňovat lokalizaci receptoru a jeho schopnost modifikovat transkripci cílových genů. Hyperfosforylace během G2/M fáze může způsobovat resistenci ke GC.

Při ubiquitinilaci dochází ke kovalentní vazbě ubiquitinu a receptor je poté degradován v proteasomu. Touto degradací je regulována míra GC signalizace.

Během sumoylace je SUMO-1 kovalentně vázán na lysinové zbytky receptorového proteinu a ovlivňuje tím jeho stabilitu, lokalizaci a aktivitu transkripčních regulátorů (Duma et al., 2006).

Acetylace probíhá po navázání ligandu na GR a předchází přemístění receptoru do jádra. Acetylován je úsek bohatý na lysiny. Po acetylaci dochází k deacetylaci histon deacetylase 2, což umožní vazbu GR na NF- κ B a to způsobí represi genů ovlivněných GC (Ito et al., 2006).

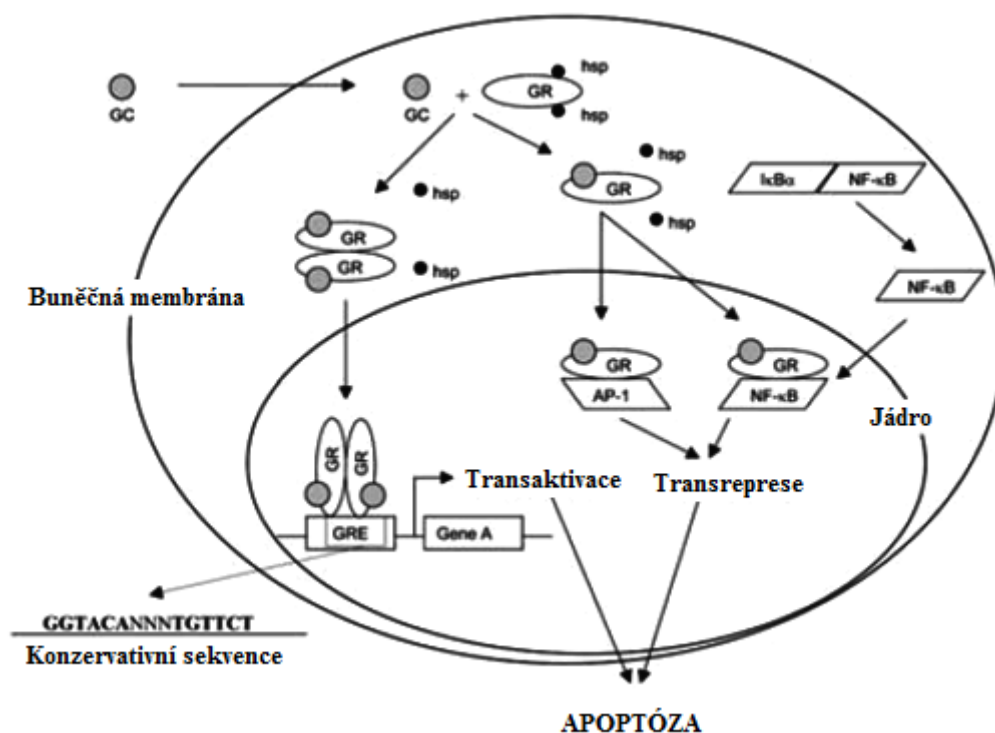
3.2.1.3. Aktivace glukokortikoidového receptoru

GR α se převážně nachází v cytoplazmě buňky, kde je součástí hetero-oligomerního komplexu s proteiny tepelného šoku HSP 90, 70 a 50 (Pratt 1993). Po vazbě ligandu - GC na GR dojde k disociaci proteinů vázaných na receptoru. Tímto se odkryje a aktivuje nukleární lokalizační signál NLS domény receptoru. GR komplex se přemístí do jádra jako homodimer, kde ovlivňuje expresi genů (Tissing et al., 2003).

GC mohou ovlivnit přibližně 900 genů a předpokládá se, že určité geny jsou v různých buňkách regulovány rozdílně. Mezi tyto geny patří například gen pro GR α , cyklin G2, glutamin syntázu, antigen CD53, NF- κ B inhibitor α a mnoho dalších (Schmidt et al, 2004).

GC indukují expresi po interakci s GREs nebo represi (viz. Obr. č. 3), kdy dochází k potlačení transkripce tvorbou komplexu GR s GC ligandem a transkripčními faktory AP-1 nebo NF- κ B, který se nachází v cytoplazmě v komplexu s I κ B α , od kterého je odštěpen a přemístěn do jádra. Exprese genů je zprostředkována vazbou GR na GREs, které se nachází v promotorové oblasti genů ovládaných GC. Rozpoznávaným úsekem GR je obrácená šesti - nukleotidová palindromická sekvence oddělená 3 nukleotidy GGT ACA NNN TGT TCT (Tissing et al., 2003). Ke každé palindromické sekvenci se váže jeden GR. Pro iniciaci transkripce využívá AF-1 a AF-2, které povrchově interagují s jadernými receptorovými koaktivátory a chromatin-přestavujícími komplexy. Některé koaktivátory utváří propojení mezi DBD glukokortikoidového receptoru a iniciačním transkripčním komplexem, a usnadňují tak přenos glukokortikoidového signálu k RNA-polymeráze II. Koaktivátory mají také vlastní histon acetyltransferasovou aktivitu, která umožňuje dekonenzaci chromatinu a tím zpřístupňuje DNA pro vazbu iniciačního transkripčního komplexu RNA-polymerázy II, tedy samotnou iniciaci transkripce. (Nicolaidis et al., 2010)

V buňkách sensitivních na GC může vést aktivace i represe genů k indukci programované buněčné smrti - apoptóze (Tissing et al., 2003).



Obr. č. 3: Schéma GC indukované apoptózy (upraveno podle Tissing et al., 2003)

3.3. Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je charakterizovaná několika morfologickými změnami: svaštěním buňky, tvorbou puchýřů na membráně, vznikem apoptotických tělísek, štěpením a kondenzací DNA, aktivací kaspáz a výskytem fosfatidylserinu ve vnější membráně buňky. Iniciací apoptózy probíhá dvěma signálními drahami vnější a vnitřní. Vnější dráha je aktivována ligandem vázajícím se na membránový Fas – receptor a vnitřní dráhu spouští proteiny Bcl-2 skupiny, které vedou k poškození mitochondriální membrány (Schmidt et al, 2004). Přičemž vnější dráha nehraje zásadní roli při odpovědi na působení GC, ale vnitřní ano (Ashkenazi A. et Dixit V. M., 1999).

První dráhu zahajují faktory způsobující nekrózu tumoru TNF, mezi něž patří CD95 a TNF – spřažený ligand indukující apoptózu TRAIL. Tyto faktory stimulují nahromadění Fas – receptoru a navázání Fas – spřažené domény FADD a kaspázy-8, které vytvoří

signální komplex indukující smrt DISC. Aktivaci kaspázy-8 je zahájena kaspázová kaskáda vedoucí k apoptóze. Kaspáza-8 může také způsobit apoptózu cestou poškození mitochondrie (Fulda S., 2009).

V druhé dráze hrají důležitou roli faktory uvolněné z mezimembránového prostoru mitochondrie. Pro-apoptické proteiny skupiny Bcl-2 (Bak a Bax) utvoří póry ve vnější mitochondriální membráně, tím se změní potenciál membrány a dojde k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru. (Desagher S. et Martinou J. C., 2000). Uvolněny jsou i další faktory: faktory indukující apoptózu AIF, sekundární mitochondriální aktivátor kaspázy Smac a proteiny inhibující apoptózu IAP. V cytosolu cytochrom c vytvoří apoptózový komplex s Apaf-1 a kaspázou-9 a aktivuje tak kaspázu-3. Kaspázy mohou být také aktivovány pomocí Smac, který inhibuje IAP (Fulda S., 2009).

Kaspázy jsou cysteinové proteázy obsahující aktivní cysteinový zbytek, který je nutný pro proteolytickou aktivitu. Podstatou aktivace kaspáz je rozštěpení proteinu v místě zbytku kyseliny asparagové. Předpokládá se, že aktivace kaspáz má charakter aktivační kaskády přičemž jednotlivé aktivované kaspázy štěpí příslušné cílové proteiny. Jestliže je v buňce aktivován gen p53, vede tato postupná aktivace k apoptóze. (Kovář, 2003).

Protein p53 je tumor supresorový protein regulující obě dráhy apoptózy. Je kódován antionkogenem nacházejícím se na 17. chromozómu. Tento protein působí jako sekvenčně specifický transkripční faktor, který odlišně ovlivňuje mnoho rozdílných promotorových oblastí. A proto hraje významnou roli při regulaci buněčného cyklu a indukci apoptózy v důsledku poškození DNA. Protein p53 aktivovaný na základě detekce poškození DNA indukuje transkripci proteinu p21, který funguje jako inhibitor cyklin-dependentní kinázy řídící vstup buňky do S fáze buněčného cyklu, důsledkem je zastavení růstu buňky a apoptóza. (Zhao et al., 2000; Kovář, 2003).

Správná funkce proteinů zapojených v apoptóze může mít významný vliv na vznik rezistence ke GC a tak ovlivnit průběh i léčbu ALL.

3.4. Chemorezistence

Chemorezistence je obecně definována jako neschopnost buňky nebo celého organismu vyvolat dostatečnou odpověď na působení určité látky.

Glukokortikoidová rezistence může být způsobena nedostatečnou koncentrací intracelulárního GC, která vzniká jako následek oslabeného vstřebávání, zvýšené přítomnosti proteinů vážících steroidy, snížené aktivity enzymů konvertující GC nebo overexpresí genů ABC transportéru, kde řadíme geny kódující P-glykoprotein, protein asociovaný s multilékovou rezistencí a protein plicní rezistence.

Další příčina může být v samotném GR, v jeho mutaci, variantě isoformy nebo v nedostatečné expresi (Schmidt et al, 2004). Ukázalo se, že u pacientů s ALL, kteří jsou sensitivní na prednisolon, se vyskytuje více sestřihových variant GR γ než u pacientů na prednisolon rezistentních (Lauten et al., 2009). Poměr GR β /GR α je nižší u pacientů s BCP-ALL, kteří dobře reagují na léčbu GC než u pacientů s T linií ALL, B linií ALL nebo s Philadelphským chromozómem, tedy s horší prognózou (Koga et al, 2005). Avšak Beesley et al. 2009 zkoumali rezistenci na vzorcích T-ALL, které nebyly vystavené GC, a vyslovili názor, že rezistence není spojena s mutací v GR nebo s mírou jeho exprese.

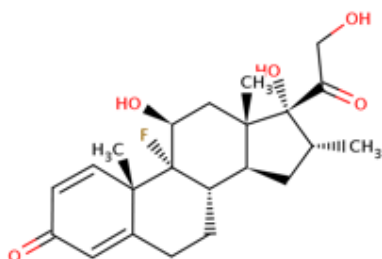
Na vznik rezistence a průběh nemoci mají také vliv proteiny zapojené v signálních drahách apoptózy. Například odlišnou expresi vykazují proteiny skupiny Bcl-2 kontrolující neporušenost vnější mitochondriální membrány. Do této skupiny patří antiapoptotické proteiny Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L a Bcl2A1, multidoménové proapoptotické proteiny Bax a Bak a proapoptotické BH3-only proteiny Bad, Bim, Puma, Bid, Bik, Noxa a Bmf (Vogler et al., 2009). Antiapoptotický protein Mcl-1 je více exprimován u pacientů B-ALL rezistentních na prednisolon (Holleman et al., 2006). Proapoptotický protein Bim vykazuje vyšší expresi u leukemické linie buněk CEM-C7, které byly vystaveny působení dexamethasonu (Wang et al., 2003). Apoptózu buněk B linie pacientů s ALL, lze navodit inhibicí BCL2 použitím antisense oligonukleotidu (Szegedi et al., 2008) nebo antagonistickými molekulami ABT-737 a ABT-263, které inhibují antiapoptotické proteiny Bcl-X_L, Bcl-2 a Bcl-w (Lock et al, 2008).

I rozdílná exprese proteinů survivinu a livinu, patřící mezi IAP, ovlivňuje průběh nemoci. U dětských pacientů s BCP-ALL s relapsem je survivin exprimován 10 krát více než u normálních hematopoetických buněk (Troeger et al., 2007). Exprese proteinu livinu

je odlišná u pacientů s chromozomálními aberacemi. U pacientů s fúzním genem TEL/AML1, pro které je charakteristický příznivý průběh nemoci, byl livin exprimován o 28 % více než u pacientů s chromozomální přestavbou t(9;22)/11q23, jejichž onemocnění má horší průběh (Choi et al., 2007).

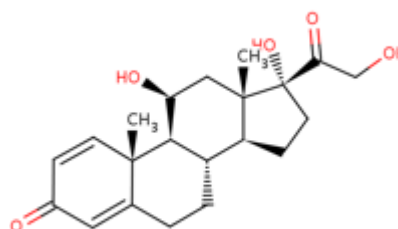
3.5. Působení dexamethasonu a prednisolonu

Dexamethason (DEX) a prednisolon (PRED) jsou syntetické glukokortikoidy, které se pro svůj dlouhodobý účinek staly základem léčby dětské ALL. Jejich struktura je znázorněna na obrázcích č. 4 a 5.



Obr. č. 4: Struktura dexamethasonu

Zdroj: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01234>



Obr. č. 5: Struktura prednisolonu

Zdroj: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00860>

Stejné množství těchto dvou GC působí různě. Výsledky *in vitro* testů ukázaly, že účinek je DEX 16 až 35x vyšší než PRED. V léčbě ALL má DEX delší účinek než PRED, a proto je ho možné detekovat v centrální nervové soustavě. (McNeer et Nachman, 2010). Oproti PRED působí DEX 9x silnějším protizánětlivým účinkem (te Poele et al., 2007). Prednisolon je aktivní forma vznikající hydroxylací prednisonu v játrech (Mayer et al., 2002).

Dexamethason u pacientů s ALL vyvolává rozdílnou regulaci proapoptotických a antiapoptotických proteinů Bcl-2 skupiny. Inhibuje antiapoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-xL a aktivuje proapoptotické proteiny Bak a Bax, které zapříčiňují uvolnění cytochromu c. Dexamethason má rovněž schopnost navodit časnou aktivaci kaspázy-2 a kaspázy-3 a spustit tak reakce vedoucí k apoptóze (Laane et al., 2007). Prednisolon působí obdobně, také redukuje Bcl-2 a Bcl-xL a zvyšuje expresi Bax (Casale et al, 2003).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Biologický materiál

Jako biologický materiál byly použity leukemické buňky izolované ze vzorků kostní dřeně, které byly odebrány od dětských pacientů s diagnózou ALL. Jednalo se o pacienty, kteří byli diagnostikováni ve spolupracujících onkohematologických centrech napříč Českou republikou. Kostní dřeň byla získána aspirační biopsií nejčastěji ze spina iliaca posterior superior kosti kyčelní, kosti hrudní anebo kosti holenní nečastěji v celkové anestezii. Množství odebrané kostní dřeně bylo variabilní a pohybovalo se v rozmezí 1 – 10 ml. Kostní dřeň byla odebrána do sterilní falkonky s 20 ml transportního média. Do transportního média s přídavkem 0,1 ml heparinu bylo odebráno 20 ml periferní krve. Vzorky byly dopraveny do laboratoře a zpracovány do 24 hodin.

4.2. Izolace leukemických buněk

Nádorové buňky byly izolovány metodou centrifugace v hustotním gradientu. Zkumavky s 5 ml gradientu byly převrstveny 5 ml dodaného materiálu. Zkumavky byly centrifugovány 30 min při 2200 ot/min. Následně byly Pasteurovou pipetou posbírány prstence leukemických buněk do samostatných zkumavek, které byly doplněny promývacím médiem. Zkumavky byly zcentrifugovány 7 min při 1600 ot/min. Po centrifugaci byl supernatant slit, jestliže sediment obsahoval erytrocyty, bylo nutné je pomocí deionizované sterilní vody zlyzovat a lýzu zastavit přidáním MEM média. Zkumavka byla opět doplněna promývacím médiem a zcentrifugována 7 min při 1400 ot/min. Následovalo slítí supernatantu, roztřepání sedimentu, doplnění promývacím médiem a centrifugace 7 min při 1400 ot/min. Vzniklý sediment byl roztřepán a bylo přidáno kultivační ALL médium tak, aby byly buňky naředěné na koncentraci $2,5 \times 10^6$ /ml, která je potřebná pro stanovení rezistence pomocí MTT testu. Buněčná suspenze byla důkladně resuspendována.

Počet buněk v suspenzi byl zjištěn sčítáním v Bürkerově komůrce pod světelným mikroskopem. Po smíchání 10 μ l suspenze s 10 μ l trypanové modři, bylo ve 25 velkých čtvercích komůrky spočteno množství neobarvených leukemických buněk. Obarvené buňky byly mrtvé buňky, jejichž poškozenou membránou pronikla trypanová modř.

4.3. MTT test

Pro kolorimetrický MTT test byla použita 96 jamková destička obsahující 20 μ l GC v různé koncentraci nebo 20 μ l kultivačního média sloužící jako kontrola. Jako slepá zkouška (blank) byly použity jamky obsahující pouze ALL médium (viz Obr. č. 6.).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Blank	Kontrola	6,0					242,4				
C			0,75					30,3				
D			0,0937					3,7875				
E			0,0117					0,4534				
F			0,0014					0,0591				
G			0,0001					0,0073				
H												
	DEX						PRED					

Obr. č. 6: Schéma 96 jamkové destičky s jednotlivými koncentracemi GC uvedených v μ g/ml

Do každé jamky bylo přidáno 80 μ l naředěné buněčné suspenze. Destička byla inkubována v inkubátoru 72 hodin při 37 °C v 5,12 % CO₂ atmosféře. Po ukončení kultivace bylo do jednotlivých jamek včetně blanku a kontroly přidáno 10 μ l MTT. Jestliže buňky kultivaci přežily, došlo na mitochondriální membráně ke konverzi žlutého solubilního MTT na modré nerozpustné krystaly formazanu. Tyto krystaly byly rozpouštěny ve 100 μ l 10 % SDS o pH = 5 v termostatu po dobu 12 hodin. Poté byla změřena absorbance v jamkách při vlnové délce 540 nm pomocí mikrodestičkového spektrofotometru.

Výsledky byly zpracovány pomocí počítačového programu Chemorezist. Hodnoty chemosenzitivity byly vyjádřeny v EC₅₀, tj. v koncentraci (μ g/ml) léčiva, která usmrtí 50% buněčné nádorové populace.

4.3.1. Princip kolorimetrického MTT testu

MTT test se používá pro určení buněčné proliferace a cytotoxicity protinádorových léčiv. Podstatou testu je metabolická redukce, při níž je solubilní žlutá tetrazoliová sůl MTT přeměněna na nerozpustné modré jehlicovité krystalky formazanu. K redukci dochází působením dehydrogenáz na mitochondriální membráně živých buněk. Krystalky formazanu jsou následně rozpuštěny silným detergentem a vzniklý roztok je spektrofotometricky měřen při vlnové délce 540 nm. MTT je redukován pouze na respiračně aktivních mitochondriích, proto jamky obsahující živé buňky jsou intenzivně zbarveny. Zatímco jamky s usmrcenými buňkami mají barvu žlutou, protože zde k redukci nedošlo. Princip konverze popsali v roce 1954 Black a Speer a v roce 1983 jej Mosman zavedl do laboratorní praxe (Scudiero, 1988; Berridge et Tan, 1993).

4.4. Použité chemikálie

dexamethason fosfát (Dexona), dodecylsulfát sodný (Sigma), tepelně inaktivované telecí sérum FCS (Sigma), Ficoll 400 (Pharmacia LKB), gentamycin (Sigma), glutamin (Sigma), heparin (Spofa), insulin, MEM médium (Sigma), Minimální Eaglovo médium (Sigma), MTT (Sigma), penicilin, prednisolon fosfát (lékárna FN Olomouc), RPMI 1640 médium (Sigma), saturovaný lidský transferin (Sigma), streptomycin, Telebrix, trypanová modř, NaCl, NaHCO₃ (Sevac), Na₂HPO₄ · 1 H₂O, Na₂HPO₄ · 12 H₂O, KCl, KH₂PO₄.

4.5. Použité roztoky

Gradient

H₂O 1000,0 ml
Ficoll 400 72,2 g (= 7,33 % roztok)
Telebrix 200,0 ml
pH 7,2 – 7,4
hustota 1,077 kg/l

Kultivační médium

FCS 15,0 ml
gentamycin 3,0 mg (penicilin 100 j./ml a streptomycin 100 µg/ml)
glutamin 25,0 mg

insulin 300,0 μ l
transferin 0,5 mg
RPMI 1640 100,0 ml

PBS pufr

NaCl 16,0 g
KCl 0,4 g
Na₂HPO₄ . 12 H₂O 6,0 g
Na₂HPO₄ . 1 H₂O 0,3 g
KH₂PO₄ 0,4 g
H₂O 2000,0 ml

Promývací médium

Minimální Eaglovo médium 10x ředěné 100,0 ml
gentamycin 3,0 mg
NaHCO₃ 7,5 % 1,0 – 2,0 ml

Roztok MTT

PBS 1,0 ml
MTT 5 mg

Transportní médium (pro 5 ml kostní dřeně)

kultivační médium 20,0 ml
heparin 50,0 μ l

Trypanová modř

trypanová modř 0,5 g
PBS 100,0 ml

4.6. Použité laboratorní přístroje

Centrifuga (Eppendorf), flow box (Trigon plus), inkubátor (Trigon plus),
mikrodestičkový spektrofotometr Labsystems iEMS Reader MF, světelný mikroskop.

5. VÝSLEDKY

Celkový soubor 40 dětských pacientů s nově diagnostikovanou ALL byl tvořen 23 chlapci a 17 dívkami ve věku od 0,5 roku do 17 let (průměrný věk 6 let). Od těchto pacientů byly získány vzorky kostní dřeně (KD) 0. den před zahájením léčby a 8. den léčby. U vzorků byla pomocí MTT testu určena chemosensitivita.

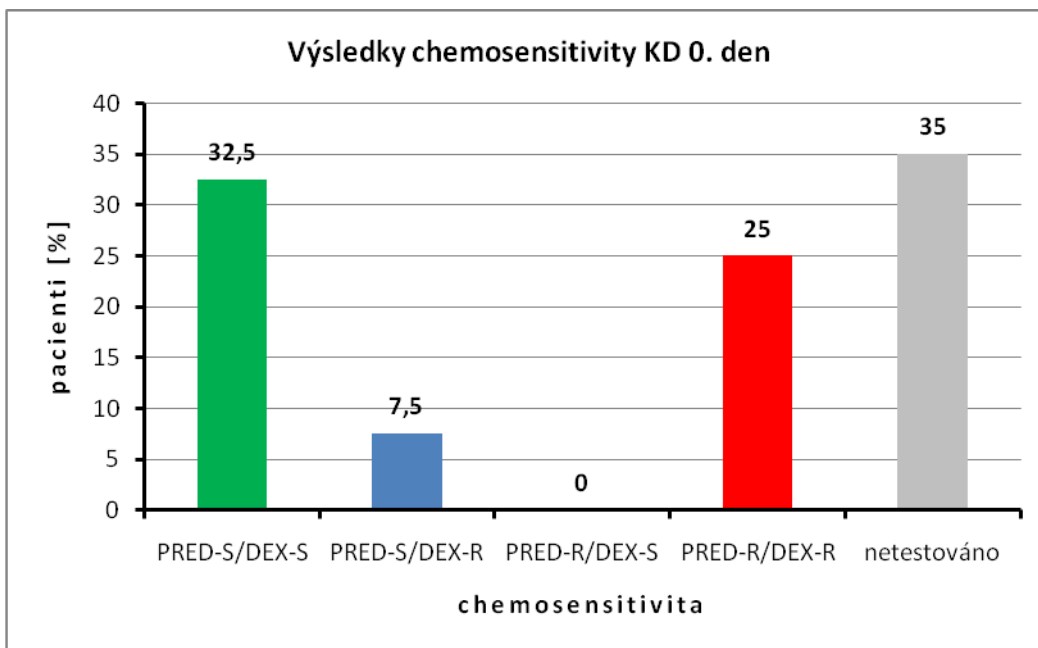
Podle získaných hodnot EC_{50} byli pacienti rozděleni na senzitivní anebo rezistentní na DEX nebo PRED. Jestliže byla hodnota EC_{50} DEX $< 0,0937 \mu\text{g/ml}$ anebo hodnota EC_{50} PRED $< 3,7875 \mu\text{g/ml}$, byl pacient senzitivní na daný GC. Byla-li hodnota vyšší, pacient byl rezistentní.

Z procentuálního počtu pacientů senzitivních anebo rezistentních na DEX anebo PRED testovaných na vzorcích KD odebrané 0. den byly sestaven graf č. 1. Ze vzorků odebraných 8. den léčby byl obdobně sestaven graf č. 2.

Z grafu č. 1 vyplývá, že na oba testované GC bylo 32,5 % ($n = 13$) pacientů senzitivních a 25 % ($n = 10$) pacientů bylo rezistentních. U 7,5 % ($n = 3$) se vyskytla zároveň senzitivita na PRED a rezistence na DEX.

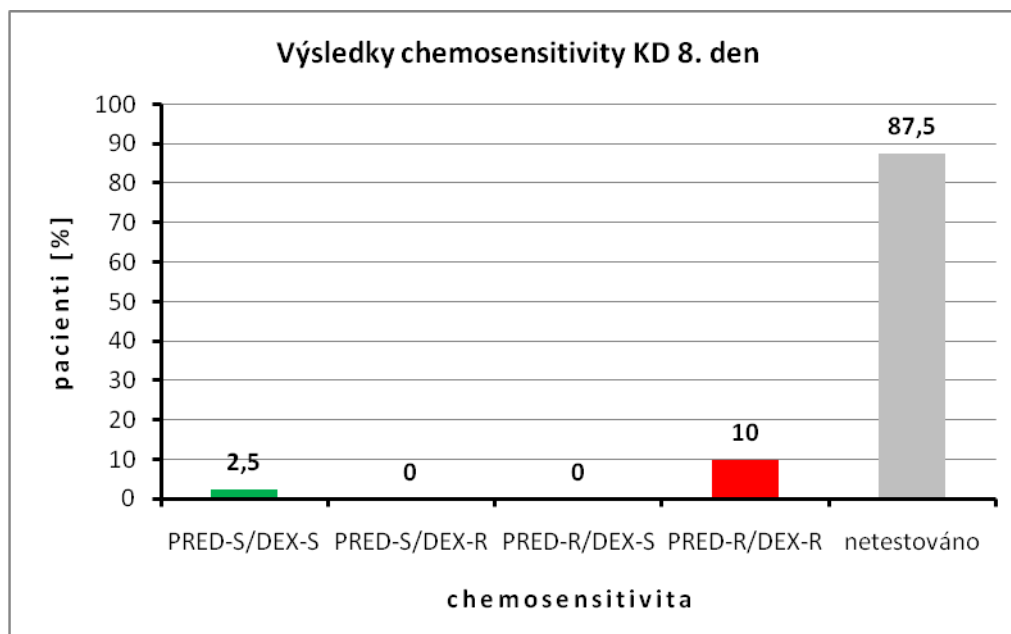
V grafu č. 2, který shrnuje výsledky chemosensitivity stanovené 8. den prednisolonové předfáze léčby, lze pozorovat pokles v počtu testovaných vzorků, protože došlo k výraznému úbytku blastů v KD, který byl důsledkem příznivé odpovědi pacienta na léčbu.

Z výsledných hodnot EC_{50} stanovených 0. den u senzitivních pacientů byla vypočtena průměrná hodnota, která činila pro DEX $0,024 \mu\text{g/ml}$ a pro PRED $0,764 \mu\text{g/ml}$.



Graf č. 1: Výsledky chemosensitivity KD 0. den

(vysvětlivky: S – senzitivní, R – rezistentní)



Graf č. 2: Výsledky chemosensitivity KD 8. den

(vysvětlivky: S – senzitivní, R – rezistentní)

6. DISKUZE

Zabývala jsem se cytotoxickým účinkem syntetických derivátů kortisolu - dexamethazonu a prednisolonu, jež mají velmi podobnou strukturu, avšak míra s jakou indukují apoptózu se liší. Důvodem může být rozdílná afinita ke glukokortikoidovému receptoru leukemických buněk, která se odvíjí od rozdílné isoformy a míry exprese receptoru, jež má svůj původ ve struktuře DNA.

Mezi pacienty testovanými na chemosensitivitu blastů z KD před zahájením léčby se vyskytli pacienti, kteří byli senzitivní (32,5 %) anebo rezistentní (25 %) na oba glukokortikoidy, avšak leukemické buňky vykázaly i rozdílnou *in vitro* odpověď u tří pacientů (7,5 %). Tyto blasty byly vnímavé na PRED, ale na DEX byly rezistentní. Výsledky nedávno publikované studie ukázaly, že nejlépe apoptózu navozuje právě PRED (Haarman et al., 2008).

Stanovením chemosensivity se zabývali v roce 1999 Mihál et al., kdy ale pro rozdělení pacientů na vnímavé anebo rezistentní použili vyšší koncentrace glukokortikoidů (hodnoty EC_{50} byly pro senzitivní u PRED < 12,0 $\mu\text{g/ml}$ a u DEX < 0,15 $\mu\text{g/ml}$), proto nelze jejich výsledky optimálně porovnat. Avšak u 30 % (n = 21) pacientů zjistili rozdílnou odpověď, kdy 14 % (n = 10) bylo senzitivních na PRED a rezistentních na DEX a právě naopak 16 % (n = 11) pacientů.

Osmý den léčby bylo testováno pouze 12,5 % pacientů, zbylí pacienti zareagovali příznivě na prednisolonovou předfázi, a tudíž nebylo v jejich vzorku dostatečné množství blastů pro další test.

7. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem stanovila chemosensitivitu u pediatrických pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií. Použila jsem cytotoxický MTT test, který má řadu výhod, ale i nevýhod. Hlavní předností tohoto testu je, že získané výsledky odpovídají klinické odpovědi pacienta a proto je možné jich využít při optimalizaci léčebného postupu u konkrétního pacienta. Avšak při interpretaci výsledků musíme však brát v úvahu, že cytotoxický účinek testovaných látek zasáhne nejenom maligní buňky, ale i buňky zdravé (Kaspers et Veerman, 2003).

Zjistila jsem, že v *in vitro* podmínkách vykazují leukemické buňky pacientů na oba testované glukokortikoidy rozdílnou odpověď jak v rámci senzitivity, tak i v rámci rezistence. Rezistence k těmto léčivům je závažným jevem a vede ke komplikacím v léčbě, a proto nalezení příčiny jevu a její předejití anebo odstranění by zvýšilo kvalitu terapie.

8. LITERATURA

Knihy a vědecké články:

Ashkenazi A. a Dixit V. M.: Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 255 – 260, 1999.

Beesley A., Weller R. E., Senanayake S., Welch M. a Kees U. R.: Receptor mutation is not a common mechanism of naturally occurring glucocorticoid resistance in leukaemia cell lines. *Leukemia Research* 33, 321 – 325, 2009.

Behrman R. E., Kliegman R. a Jenson H. B.: Nelson Textbook of Pediatrics, 16th edition. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 2000.

Berridge M. V. a Tan A. S.: Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 474 – 482, 1993.

Casale F., Addeo R., D'Angelo V., Indolfi P., Poggi V., Morgera C., Crisci S., a Di Tullio M. T.: Determination of the in vivo effects of prednisone on Bcl-2 family protein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Oncology* 22, 123 – 128, 2003.

Desagher S. a Martinou J. C.: Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10, 369 – 77, 2000.

Duma D., Jewell Ch. M. a Cidlowski J. A: Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102, 11 – 21, 2006.

Encío I. J. a Sevilla D. Detera-Wadleigh: The Genomic Structure of the Human Glucocorticoid Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 7182-7188, 1991.

Fulda S.: Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukaemia. *British Journal of Haematology* 145, 441 – 454, 2009.

Galon J., Franchimont D., Hiroi N., Frey G., Boettner A., Ehrhart – Bornstein M., O Shea J., Chrousos G. P. a Bornstein S. R.: Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *The FASEB Journal* 16, 61 – 71, 2002.

Haarman E. G., Kaspers G. J. L., Pieters R., Rottier M. M. A. a Veerman A. J. P.: Circumvention of glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia Research* 32, 1417 – 1423, 2008.

Hauk P. J., Goleva E., Strickland I., Vottero A., Chrousos G. P., Kisich K. O. a Leung D. Y. M.: Increased Glucocorticoid Receptor β Expression Converts Mouse Hybridoma Cells to a Corticosteroid-Insensitive Phenotype. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 27, 361–367, 2002.

Holleman A., den Boer M. L., de Menezes R. X., Cheok M. H., Cheng Ch., Karin M. Kazemier K. M., Janka-Schaub G. E., Göbel U., Ulrike B. Graubner U. B., Evans W. E. a Pieters R.: The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 107, 769 – 776, 2006.

Choi J., Hwang Y. K., Sung K. W., Lee S. H., Yoo K. H., Jung H. L., Koo H. H., Kim H. J., Kang H. J., Shin H. Y. a Ahn H. S.: Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 109, 471 - 477 2007.

Ito K., Yamamura S., Essilfie - Quaye S., Cosio B., Ito M., Barnes P. J. a Adcock I. M.: Histone deacetylase 2 – mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- κ B suppression. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 7 – 13, 2006.

Kaspers G. J. a Veerman A. J.: Clinical significance of cellular drug resistance in childhood leukemia. *Recent Results in Cancer Research* 161, 196 – 220, 2003.

Koga Y., Matsuzaki A., Suminoe A., Hattori H., Kanemitsu S. a Hara T.: Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor alpha and beta is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatric Blood and Cancer* 45, 121–127, 2005.

Kovář J.: Buněčná proliferace a mechanismy její regulace. Praha, Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2003.

Krett N. L., Pillay S., Moalli P. A., Greipp P. R. a Rosen S.: A Variant Glucocorticoid Receptor Messenger RNA Is Expressed in Multiple Myeloma Patients. *Cancer Research* 55, 2727 – 2729, 1995.

Laane E., Panaretakis T., Pokrovskaja K., Buentke E., Corcoran M., Söderhäll S., Heyman M., Mazur J., Zhivotovsky B., Porwit A. a Grandér D.: Dexamethasone-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members. *Haematologica – The Hematology Journal* 92, 1460 – 1469, 2007.

de Lange P., Segeren M., Koper J. W., Wiemer E., Sonneveld P., Brinkmann A., White A., Brogan I. J., de Jong F. H. a Lamberts S. W. J.: Expression in Hematological Malignancies of a Glucocorticoid Receptor Splice Variant That Augments Glucocorticoid Receptor – mediated Effects in Transfected Cells. *Cancer Research* 6, 3937 – 3941, 2001.

Lauten M., Fernandez-Munoz I., Gerdes K., von Neuhoff N., Welte K., Schlegelberger B., Schrappe M. a Beger C.: Kinetics of the In Vivo Expression of Glucocorticoid Receptor Splice Variants During Prednisone Treatment in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Pediatric Blood and Cancer*, 52, 459 – 463, 2009.

Lock R., Carol H., Houghton P. J., Morton Ch. L., Kolb E. A., Gorlick R., Reynolds P., Maris J. M., Keir S. T., Wu J. a Smith M. A.: Initial Testing (Stage 1) of the BH3 Mimetic ABT-263 by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatric Blood and Cancer* 50, 1181 – 1189, 2008.

Lu N. Z. a Cidlowski J. A.: The Origin and Functions of Multiple Human Glucocorticoid Receptor Isoforms. *New York Academy of Sciences* 1024, 102–123, 2004.

Mayer J., Starý J. a kol.: Leukemie. Praha: Grada Publishing, 2002.

McNeer J. L. a Nachman J. B.: The optimal use of steroids in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: no easy answers. *British Journal of Haematology*, 149, 638 – 652, 2010.

Mihál V.: Hodnocení diagnostiky a léčby akutní lymfoblastické leukémie v dětském věku. *Klinická onkologie*, 92 – 96, 2004 (suplement).

Mihál V.: Akutní lymfoblastická leukemie dospívajících a mladých dospělých – identická biologická kategorie? *Onkologie* 2 (3), 167 – 172, 2008.

Mihál V., Hajdúch M., Nosková V., Feketová G., Jess K., Gojová L., Kašpárek I., Starý J., Blažek B., Pospíšilová D. a Novák Z.: Differential antileukemic activity of prednisolone and dexamethasone in freshly isolated leukemic cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 457, 461 – 471, 1999.

Mihál V., Hajdúch M., Janošťáková A., Šafářová M., Nosková V., Pospíšilová D. a Novák Z.: Využití in vitro analýzy lékové rezistence v léčbě leukemií dětského věku. *Klinická Onkologie* zvláštní číslo 2, 39 – 42, 2000.

Moalli P. A., Pillay S., Krett N. L. a Rosen S. T.: Alternatively Spliced Glucocorticoid Receptor Messenger RNAs in Glucocorticoid – resistant Human Multiple Myeloma Cells. *Cancer Research* 53, 3877 – 3879, 1993.

Nicolaidis N. C., Galataa Z., Kinob T., Chrousos G. P. a Charmandari E.: The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids* 75, 1-12, 2010.

te Poele E. M., de Bont E. S. J. M., Boezen H. M., Revesz T., Bökkerink J. P. M., Beishuizen A., Nijhuis I. J. M., Nijhuis C. S. M. O., Veerman A. J. P., Kamps W. A.: Dexamethasone in the maintenance phase of acute lymphoblastic leukaemia treatment: Is the risk of lethal infections too high? *European Journal of Cancer* 43, 2532 – 2536, 2007.

Pratt W. B.: The Role of Heat Shock Proteins in Regulating the Function, Folding, and Trafficking of the Glucocorticoid Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 21455 – 21458, 1993.

Provan D.: ABC of Clinical Haematology: Third Edition. London: Blackwell Publishing, 2007.

Provan D.: ABC of Clinical Haematology: Second Edition. London: Blackwell Publishing, 2003.

Pui C. H.: Childhood leukemias. Cambridge University Press, 2006. Dostupné online z: http://books.google.cz/books?id=zuFcFsVxLIEC&pg=PA29&lpg=PA29&dq=childhood+leukemias+L1&source=bl&ots=h6_Xnm8xwn&sig=YaBBJ3aAYKzk1YXUCGOKdfEW8NQ&hl=cs&ei=8xRETLq8DsqmOMemxcME&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CCgQ6AEwAg#v=onepage&q=childhood%20leukemias%20L1&f=false

Pui C. H., Robison L. L. a Look A. T.: Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 371, 1030 – 1043, 2008.

Revollo J. R. a Cidlowski J. A.: Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling. *Glucocorticoids and Mood: Annals of the New York Academy of Sciences*, 167 – 178, 2009.

Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S. a Norman M.: Insertion of an Amino Acid in the DNA – Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor as a Result of Alternative Splicing. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84, 4283 – 4286, 1999.

Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Paul K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D. a Boyd M. R.: Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 48, 4827 – 4833, 1988.

Schmidt S., Rainer J., Ploner C., Presul E., Riml S. a Kofler R.: Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death and Differentiation* 11, 45 – 55, 2004.

Szegedi I., Katona K., Horváth A., Molnár A., Aradi J. a Kiss C.: Bcl-2 Antisense Oligonucleotide Inhibits the Proliferation of Childhood Leukemia/lymphoma Cells of the B-cell Lineage. *Pathology and Oncology Research*, 14, 275 – 279, 2008.

Theriault A., Boyd E., Harrap S. B., Hollenberg S. M. a Connor J. M.: Regional chromosomal assignment of the human glucocorticoid receptor gene to 5q31. *Human Genetics* 83, 289-291, 1989.

Tissing W. J. E., Meijerink J. P. P., Brinkhof B., Broekhuis M. J. C., Menezes R. X., den Boer M. L. a Pieters R.: Glucocorticoid-induced glucocorticoid-receptor expression and promoter usage is not linked to glucocorticoid resistance in childhood ALL. *Blood* 108, 1045 – 1049, 2006.

Tissing W. J. E., Meijerink J. P. P., den Boer M. L. a Pieters R.: Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17, 17-25, 2003.

Troeger A., Siepermann M., Escherich G., Meisel R., Willers R., Gudowius S., Moritz T., Laws H. J., Hanenberg H., Ulrich Goebel U., Janka-Schaub G. E., Mahotka C. a Dilloo D.: Survivin and its prognostic significance in pediatric acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia. *Haematologica – The Hematology Journal* 92, 1043 - 1050, 2007.

Vogler M., Dinsdale D., Dyer M. J. S. a Cohen G. M.: Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death and Differentiation* 16, 360 – 367, 2009.

Wang Z., Malone M. H., He H., McColl K. S. a Distelhorst C. W.: Microarray Analysis Uncovers the Induction of the Proapoptotic BH3-only Protein Bim in Multiple Models of Glucocorticoid-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 23861 – 23867, 2003.

Xia Z. B., Popovic R., Chen J., Theisler C., Stuart T., Santillan D. A., Erfurth F., Diaz M. O. a Zeleznik-Le N. J.: The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14028 – 14033, 2005.

Zhao R., Gish K., Murphy M., Yin Y., Notterman D., Hoffman W. H., Tom E., Mack D. H. a Levine A. J.: Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes and Development* 14, 981 – 993, 2000.

Zhou J. a Cidlowski J. A.: The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70, 407 – 417, 2005.

Internetový zdroj:

<http://www.genenames.org/>

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenin
ABC	adenosintrifosfát vázající kazeta
ABL	c-abl oncogen 1
AF	aktivační funkce
AIF	faktor indukující apoptózu
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
AML1	acute myeloid leukemia 1
AP	aktivační protein
Apaf-1	faktor aktivující apoptotickou proteázu 1
B-ALL	akutní lymfoblastická leukemie odvozená od B linie
Bcl-2	skupina proteinů identifikována v lymfomu B-buněk (B-cell lymphoma)
BCP-ALL	prekurzorová B akutní lymfoblastická leukemie
BCR	breakpoint cluster region
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BH3-only proteiny	proteiny, které mají pouze jednu z Bcl-2 homologních oblastí (BH3)
C	cytosin
CD	antigeny na povrchu buňky (cluster of differentiation)
CEM	buněčná linie odvozená od buněk akutní lymfoblastické leukemie
DBD	DNA – vazebná doména
DEX	dexamethason
DISC	signální komplex indukující smrt
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC ₅₀	koncentrace glukokortikoidu v µg/ml, při které přežívá 50 % nádorových buněk
FAB	Francouzsko - Americko – Britská klasifikace
FADD	Fas-spřažená doména
FCS	fetální telecí sérum
G	guanin

G2	druhá generační fáze buněčného cyklu
GC	glukokortikoidy
GR	glukokortikoidový receptor
GRE	glukokortikoidně odpovědné úseky (glucocorticoid response elements)
HSP	proteiny tepelného šoku
IAP	proteiny inhibující apoptózu
IC	interkontinentální
I κ B α	jaderný faktor
kb	kilobáze
KD	kostní dřev
LBD	ligand – vazebná doména
M	mitotická fáze buněčného cyklu
MEM	Minimální Eaglovo médium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
MYC	gen homologní ke genu izolovaného z viru ptačí myelocytomatózy
MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
N	adenin, guanin, cytosin nebo thymin
NF	jaderný faktor
NLS1	jaderný lokalizační signál
NOTCH1	Notch homolog 1
NTD	N – terminální doména
p21	gen pro inhibitor cyklin dependentní kinázy 1A
p53	tumor supresorový gen, jehož protein má velikost 53 kDa
PBS	fosfátový pufr
PRED	prednisolon
q	dlouhé rameno chromozómu
RB-1	retinoblastomový gen
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	syntetická fáze buněčného cyklu
SDS	dodecylsulfát sodný
Smac	sekundární mitochondriální aktivátor kaspázy
SUMO-1	malý ubiquitin – podobný modifikátor

T	thymin
t	translokace
T-ALL	akutní lymfoblastická leukemie odvozená od T linie
TEL	neboli ETV6 (ets variant 6), kóduje transkripční faktory
TNF	faktor způsobující nekrózu tumoru
TRAIL	TNF – spřažený ligand indukující apoptózu
11q23	aberrace v oblasti genu MLL
t(1;19)	translokace, kterou vzniká onkoprotein E2A/PBX1, který blokuje diferenciaci primární myeloidní progenitorové buňky