

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BUNĚČNOU PROLIFERACI – MARKERY

David Potěšil, Vojtěch Adam, René Kizek

I. ÚVOD

Při pohledu na žebříček nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích zjistíme, že první místo zaujímají nádorová onemocnění, která se stávají stále větší obavou celého světa. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je každým rokem ve vyspělých zemích diagnostikováno asi 11 milionů případů onemocnění maligním nádorem a předpokládá se, že do roku 2020 vzroste počet na více než 16 miliónů. V současnosti jsou nádorová onemocnění příčinou smrti více než 6,7 miliónu lidí po celém světě, což znamená, že přibližně každých pět sekund na Zemi umírá jeden člověk na zhoubný novotvar. Z těchto důvodů vytvořila WHO v roce 2002 Univerzální program pro kontrolu rakoviny, který je možný adaptovat pro jakoukoliv zemi na světě. Jedním z hlavních bodů tohoto programu je „Screening a včasná diagnostika nádorového onemocnění“. Je velmi dobře známo, že včasná diagnostika nádorového onemocnění velmi výrazně zvyšuje šanci na úspěšnou léčbu pacienta trpícího tímto onemocněním. Proto, abychom mohli nádorové onemocnění včas diagnostikovat, potřebujeme vhodný ukazatel – nádorový marker. Jsou to látky, obvykle proteiny, které jsou produkovány v těle jako odpověď na vznik a rozvoj nádorového onemocnění anebo samotnou nádorovou tkání. Některé markery jsou specifické pouze pro jeden typ zhoubných nádorů, zatímco jiné mají širší specifitu a jsou použitelné i pro více typů nádorových onemocnění. Téměř všechny dnes používané markery však nejsou detekovatelné pouze v přítomnosti nádorového onemocnění, ale objevují se i při výskytu jiných onemocnění. V běžné praxi je nyní používána pouze malý počet nádorových markerů jako např. specifický antigen prostaty. Mnoho dalších potencionálních markerů je stále studováno, přičemž se kladou velké požadavky na snadnou detekci, dostupnost pro celou populaci (screening), závislost na stádiu onemocnění, ukazující vývoj onemocnění a objevující se již při samotném zrodu onemocnění – včasná diagnostika. Velké požadavky jsou kladeny také na vlastní metodu

stanovení. Měla by mít dostatečnou citlivost ke sledování hladiny markeru při fyziologických (případně i nižších) koncentracích za využití minimálních množství vzorku, měla by být rychlá s velkým počtem analýz za daný časový interval.

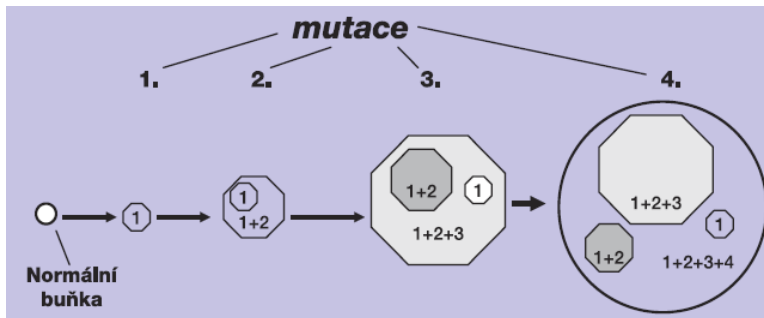
II. TEORETICKÁ ČÁST

Každým rokem je ve vyspělých zemích diagnostikováno přibližně 11 milionů případů onemocnění maligním nádorem a 6,7 milionu lidí ročně na tuto nemoc umírá. Národní onkologický registr České republiky poskytuje cenné informace o nově diagnostikovaných případech zhoubných onemocnění (Národní onkologický registr, 2005 2005 2005, Aschermannová, 2005, Juričková, 2006). V roce 2003 bylo nahlášeno 66 637 nových případů zhoubných novotvarů a nádorů in situ (diagnóza C00-C97 a D00-D09 dle 10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí). Incidence onemocnění (absolutní i relativní počty) je u mužů v současnosti jen nepatrně vyšší než u žen. Dlouhodobě u obou pohlaví incidence zaznamenává rostoucí trend. Počet nově hlášených případů v roce 2003 byl u žen téměř dvojnásobný než v roce 1975 (Národní onkologický registr, 2005 2005 2005). Incidence zhoubných nádorů (ZN) u mužů narůstala mezi roky 1975 a 2003 pomaleji. Absolutní počet zemřelých v roce 2003 narostl na 29 195 (16 208 mužů a 12 987 žen), což je 26,2 % z celkového počtu zemřelých v ČR. Podle statistik jsou jednou z nejčastějších onkologických diagnóz zhoubné nádory trávicího ústrojí, zejména kolorekta (dg.C18 až C21). Česká republika zaujímá těsně za Maďarskem druhou příčku v pomyslném žebříčku nejvyšší úmrtnosti na dg. C18 až C21 v Evropě. Zhoubné nádory u žen jsou v úhrnu diagnostikovány v mladším věku než u mužů, neboť některé diagnózy jsou početné už ve věkové skupině 30-59 let (Národní onkologický registr, 2005 2005 2005, Juričková, 2006). Z těchto důvodů vyhlásilo Ministerstvo zdravotnictví České republiky a Česká onkologická společnost program zaměřený na pokles výskytu zhoubných onemocnění v české populaci, který se má, kromě jiného, zaměřit na zlepšení včasné diagnostiky mezi něž náleží i hledání nových potenciálních nádorových markerů (Potesil, 2006).

1. Nádorová onemocnění

1.1 Vznik zhoubného nádoru

Slovo rakovina vychází z řeckého slova karkinos = rak, nebo onkos = krab a latinského cancer = rak. Rychlost, s jakou se buňka množí a roste, patří k velmi přísně řízeným biologickým procesům, které zajišťují, aby míra buněčné proliferace odpovídala specifickým potřebám celého organismu. Vzácně dochází k poruchám těchto regulací a buňka se začíná nekontrolovatelně dělit. Populace těchto nežádoucích buněk, které neodpovídají na přirozené signály pro utlumení růstu, pak tvoří nádor. Rychle proliferující nádorové buňky představují pro tělo jistou zátěž, ale pokud v nich nedojde k dalším změnám, neohrozí život celého organismu. Buňky, které se sice rychle množí, ale jejich funkce a morfologie je zachována, vytváří benigní nádory. Benigní nádory zůstávají velmi dobře lokalizované a nešíří se do svého okolí. Buňky maligních nádorů mají naproti tomu snahu pronikat do svého okolí (invazivita), ale i na vzdálená místa (metastázy). Podstata přeměny zdravé buňky na nádorovou – tzv. maligní transformace – je doposud zahalena řadou otázek a nejasností. U nádorových buněk jsou pozorovány výrazné změny v jejich diferenciaci a DNA (Lee, a kol., 2004). Vznik maligního onemocnění je několika stupňový proces vzniku mutací genů kontrolujících proliferaci, diferenciaci a zánik buněk (Obr. 1).



Obr. 1: Klonální vývoj nádorových buněk. 1. mutace znamená počátek nádorové transformace. Buňky s 1. a 2. mutací postupně v nádorové tkáni přerůstají nebo nahrazují buňky s 1. mutací. Další genetické změny podněcují buněčnou populaci k větší agresivitě. Subklonální

genetická heterogenita nádoru je odrazem postupujícího vývoje nádorové tkáně. Převzato z (Masopust, 2004).

Ačkoli některé formy nádorů jsou dědičné, většina vzniká na podkladě mutace somatických buněk a je způsobena chybami v replikaci DNA nebo působením kancerogenů. Příkladem je např. efekt UV-záření na vzniku dimerů dvou sousedících pyrimidinů. Tato změna překáží normální transkripci i replikaci DNA. Účinek X-paprsků (ionizující záření) je odlišný: dochází k rozštěpení (přerušeni) DNA-řetězce; vznikají tak volné řetězce DNA, které musí být beze zbytku opět navázány opravným mechanismem. Nestane-li se tak, může dojít k translokaci určitých úseků chromosomů, což bývá příčinou aktivace speciálních genů označovaných jako protoonkogeny. Jedna genetická změna však nestačí navodit maligní transformaci buňky; ta obvykle vzniká až po několika (5ti až 10ti) genových mutacích v průběhu řady let (Masopust, 2004, Vorlíček, 1995). Genová změna navodí vznik nádorového fenotypu v možném sledu: proliferace epitelové buňky → hyperplazie → adenom → dysplazie → karcinom „in situ“ → karcinom invazivní. Přeměna normální tkáně organismu do stavu invazivní nádorové choroby trvá v průměru 5 – 10 let (Vorlíček, 1995). Průběh kancerogeneze bývá členěn do tří stádií:

Iničiační stádium, které představuje prvotní genetickou událost, tj. mutaci určitého kritického genu. Jde o období časově krátké, ale nevratné; iniciovaným buňkám přináší růstovou selekční výhodu. Buňka tak získává potenciál maligní transformace; v tomto stádiu se může proces zastavit.

Promoční stádium, oproti iničiační fázi trvá léta, až desetiletí; postižené buňky (klon) jsou stimulovány ještě k intenzivnější proliferaci. Promoční faktory samy o sobě nejsou však schopny vyvolat maligní nádorovou transformaci, jen ji podpořit. Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon stimulován, a naopak odstranění podpůrných faktorů může proces kancerogeneze zpomalit nebo i zastavit.

Stádium progresu je charakterizováno dalším postupným nahromaděním genetických změn jako je (a) nekontrolovaný růst pro trvalou aktivaci signální transdukce růstového stimulu, (b) alterace kritických bodů buněčného cyklu, (c) deregulace DNA-transkripčních faktorů. Nádor zůstává

nejprve v místě svého vzniku, ale aktivací dalších faktorů se začne šířit do nejbližšího okolí (invaze) a cestou krevního oběhu na místa vzdálená (metastázy). Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísun živin a kyslíku, který musí být zajištěn vytvořením cévního zásobení (nádorová neoangiogeneze) (Potesil, 2006)..

1.2 Benigní a maligní nádory

Podle způsobu šíření nádoru, a tím daného klinického chování, rozdělujeme nádory na benigní a maligní. Rozdíl v šíření jednotlivých nádorů je dán hlavně růzností v enzymatické výbavě a vlastnostech buněčných povrchů u buněk různých nádorů ve srovnání s buňkami netransformovanými.

Buňky benigních (nezhoubných) nádorů nemají oproti jiným proliferujícím buňkám buněčné povrchy výrazně změněny, a proto je jejich růst pouze expanzivní. Rostou většinou pomalu, mají organoidní stavbu a jsou homologní, zůstávají ohraničené, často vazivově opouzdřené a na okolí působí většinou pouze tlakem.

Maligní (zhoubné) nádory na rozdíl od benigních rostou vůči okolí agresivně a jsou nepřesně ohraničené. Změna povrchové struktury maligních buněk způsobuje změnu reaktivity při kontaktu s jinými buňkami. To má za následek propagaci tkáňovými štěrbinami – infiltrativní růst. Přítomnost proteáz a dalších enzymů na jejich povrchu vede při proliferaci k destrukci okolních tkání (invazivní růst), který je často provázen krvácením z narušených cév. K neohraničenosti přispívá i snížená kohezivita mezi maligními buňkami a snížená adhezivita nádorových buněk ke tkáňovým membránám, obě podmíněné poruchou mezibuněčných spojů v rámci změn buněčných povrchů. Změny povrchů vedou i k získání větší motility (pohyblivosti) nádorové buňky, a tím k usnadnění prostupu hostitelskou tkání (Vorlíček, 1995). Všechny zmíněné vlastnosti enzymatické výbavy a povrchů buněk maligních nádorů podmiňují i další velmi charakteristickou vlastnost maligního nádoru, kterou je nádorový rozsev – metastazování. Metastazování nádoru je vytváření dceřiných patologických ložisek v místech vzdálených od

primárního nádoru. Celý proces probíhá ve třech fázích. První fází je uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru hystolytickými faktory agresivního růstu (např. enzymy schopné uvolnit nádorové tkáně), ale i mechanickými vlivy, např. intratumorózním tlakem. Druhá fáze je představována transportem nádorových buněk na nové místo, probíhající buď ve formě implantačních metastáz (oddrolování částic primárního nádoru a jejich ujímání na vzdáleném místě dutiny), lymfogenních metastáz (šíření nádorových buněk lymfatickými cévami) nebo hematogenních metastáz (šíření nádorových buněk krevními cévami). Třetí fází je etablování uvolněných a transportovaných nádorových buněk na novém místě. Tato fáze je pro výsledný nádorový rozsev nejpodstatnější a její úspěšnost je, stejně jako u obou předchozích, dána faktory nádorové buňky i faktory hostitelskými (Pepper, a kol., 2003).

2. Nádorové markery

Nádorové markery jsou definovány jako laboratorně prokazatelné změny v biologických tekutinách, tkáních nebo buňkách, pomocí kterých je možno prokázat – riziko vzniku, přítomnost, prognózu, účinnost (škodlivost) terapie, vznik metastáz nebo reziduální choroby nádorového onemocnění (Masopust, 2004). Laboratorní průkaz nádorového onemocnění se v literatuře objevuje v 19. století spolu se vznikem oboru klinické chemie (Masopust, 2004). Důkazy rakovinového onemocnění byly v té době založeny na jednoduchých fyzikálně-chemických reakcích. Jednou z nich je například průkaz tzv. Bence Jonesovy bílkoviny v moči při zkoušce varem. Tato začíná precipitovat při teplotě kolem 80°C a znovu se rozpouští při 90°C. I v dnešní době je důkaz tohoto proteinu stále používaný v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií za využití citlivých a specifických imunochemických metod (Kyle, 1994).

Ve druhé polovině 20. století dochází k prudkému vývoji v oblasti tumorových markerů. V České republice byla tehdy vyvinuta metoda predikce nádorového onemocnění s využitím polarografických metod profesorem Brdičkou (Brdicka, 1937, Brdicka, 1937). Ve zkratce šlo o

polarografické stanovení proteinů obsahujících thiolovou (SH) skupinu nebo disulfidickou vazbu na základě katalytického vylučování vodíku ze základního elektrolytu. U onkologických pacientů byl tehdy pozorován nižší polarografický signál než v případě kontrolních osob. Již tehdy však Brdička upozornil na fakt, že výsledek stanovení není jednoznačný, a že pozitivní test může být zapříčiněn také jiným onemocněním (např. záněty, žaludečními vředy, infarkty myokardu).

V současnosti je známa celá skupina látek, především proteinů využívaných jako nádorové markery. Můžeme je klasifikovat do několika skupin (Masopust, 2004):

- nádorem tvořené
 - antigeny
 - onkofetální (α -fetoprotein, karcinoembryonální antigen)
 - onkoplacentární (lidský choriogonadotropin, izoenzymy alkalické fosfatázy)
 - „antigeny rakoviny“ (CA-19-9, CA 15-3)
 - paraproteiny
 - hormony (kalcitonin, katecholaminy)
 - enzymy (neuron-specifická enoláza)
- s nádorem sdružené (C-reaktivní protein, okulní krvácení)
- onkogeny a antionkogeny (protein p53)
- faktory transdukce signálu (gen HER-2/neu)

Problém se specifitou nádorových markerů není ojedinělý ani v současné klinické praxi. Specifita, ale také citlivost stanovení jsou i dnes limitovány celou řadou faktorů a ve většině případů i negativní nález nevylučuje přítomnost zhoubného nádoru. Pokud je nádorový marker nalezen, má význam pro sledování vývoje onemocnění u téhož nemocného a může být využit pro určení prognózy a sledování účinnosti léčby (Bates, 1991, Vorlíček, 1995).

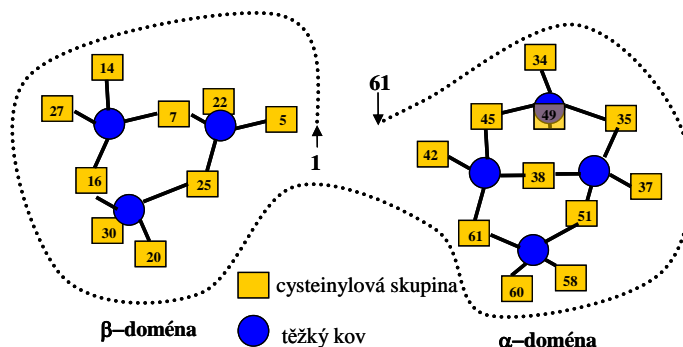
2.1 Nový nádorový marker?

Nedávno Theocharis a spolupracovníci pozorovali u řady zhoubných nádorů (prsů, kůže a pankreatu a další) zvýšenou hladinu metalothioneinu (Theocharis, a kol., 2004). Je pravděpodobné, že změny v expresi metalothioneinu (MT) mohou být prognostickým markerem u různých typů zhoubných nádorových onemocnění (Zelená, a kol., 2004). Nadměrná exprese MT byla pozorována u maligních a více gradovaných typů zhoubných nádorů prsu, kožních karcinomů, hepatocelulárního karcinomu, kožních melanomů, cervikálních karcinomů, akutní lymfoblastické leukémie, karcinomů pankreatu a je významně spojena s progresí a horší prognózou v nádorovém onemocnění. Naproti tomu bylo zjištěno, že nadměrná exprese MT souvisí s méně gradovanými typy nádorů u karcinomu tlustého střeva, karcinomu močového měchýře a fibroblastických kožních nádorů. U nádorového onemocnění kůže byla u 1270 pacientů také Weinlichem a jeho kolegy potvrzena nadměrná exprese MT (Weinlich, a kol., 2006). Další studie potvrzují korelaci mezi nadměrnou expresí MT a gradingem u karcinomu močového měchýře, vaječníku a karcinomu plic (Weinlich, a kol., 2003, White, 1998, Yamasaki, a kol., 2006, Zelger, a kol., 1993, Zelger, a kol., 1994).

3. Metalothioneiny

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa (Kasahara, a kol., 1991, Kizek, a kol., 2004, Kizek, a kol., 2004). Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům (Zn, Cd, As, atd.) je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace iontů kovů. Ze strukturních modelů lze předpokládat, že molekula MT se skládá ze dvou vazebných domén α a β , které jsou složeny z cysteinových klastrů. Kovalentní vazby atomů kovů se účastní sulfhydrylové zbytky cysteinů (Obr. 2). N-terminální část peptidu je označena jako α -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty a C-terminální část (β -doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem až 12 atomů. Klasifikačně byly MT rozděleny do tříd MT-I a MT-II s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, ze kterého

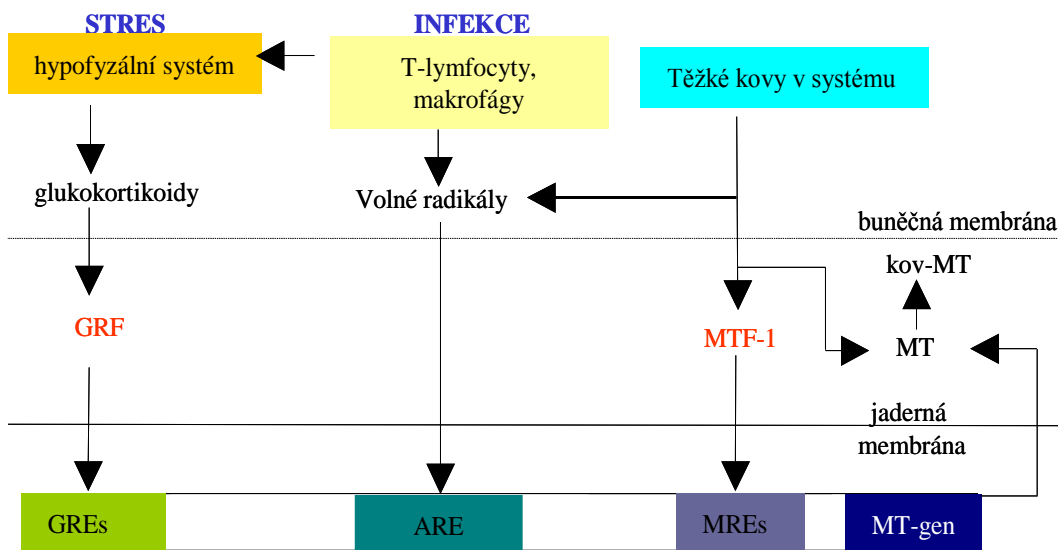
byly izolovány. I. třída zahrnuje savčí metalothioneiny tvořené 61 až 68 aminokyselinami s molekulovou hmotností 6–7 kDa. Ve II. třídě jsou zařazeny bakteriální MT, proteiny se vzdálenou podobností k I. třídě (Hamer, 1986).



Obr. 2: Předpokládané schéma vazebných domén (α a β) v molekule metalothioneinu. S: sulfhydrylové zbytky v molekule MT váží ionty kovů.

3.1 Biosyntéza metalothioneinů v lidském organismu

Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 isoform. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. MT-1 protein existuje ve více isoformách, respektive MT-1 protein vytváří více subtypů kódovaných sadou MT-1 genů (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1X). V organismu dospělých jedinců jsou nejvíce zastoupeny dvě isoformy MT (MT-1A, MT-2A), které se exprimují ve většině lidských tkání, v mozkové tkáni je přítomna pouze isoforma MT-3 (někdy označována jako růstový inhibiční faktor - GIF). V dlaždicovém epitelu je hojně zastoupena isoforma MT-4. MT-1 a MT-2 isoformy jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi nízkých koncentracích. Jejich exprese výrazně stoupá při indukci mnoha exogenními a endogenními faktory jako jsou UV záření, těžké kovy, stresové hormony, volné kyslíkové radikály a cytokininy uvolňující se z poškozené tkáně či xenobiotika. O molekulárním mechanismu exprese MT je prozatím známo velmi málo, ale pravděpodobně se ho účastní samotný kov vazbou na specifický transkripční faktor, protein označený jako MTF-1 (metal transcription factor 1).



Obr. 3: Schéma regulace exprese MT genu. Vlivem stresových faktorů se zvyšuje hladina cytokininů v aktivovaných T-lymfocytech a makrofázích. Hladina glukokortikoidů se při stresu prostřednictvím těchto cytokininů zvyšuje přes aktivovaný hypofyzální systém. Glukokortikoidy se v cytoplazmě vážou na GRF (glucocorticoid receptor complex) a ten pak aktivuje GRE (glucocorticoid responsive element). Zvýšená hladina kovů vazbou na MTF-1 (metal transcription factor) naopak aktivuje MRE (metal response element) v promotorové oblasti MT genu. Reaktivní kyslíkové radikály jsou schopny aktivace MT genu prostřednictvím antioxidant response element (ARE).

Komplex kov-MTF-1 pak v jádře nasedá na MRE (metal-responsive element) v promotorové oblasti MT-genu a spouští jeho transkripci. Na syntéze MT se mohou podílet další regulační proteiny prostřednictvím responzivních elementů jako je GRE (glucocorticoid response element), IRE (interferon response element), STAT (signal transducers and activator protein) nebo ARE (antioxidant response element), dále vazebné receptory spojené s tvorbou druhých posílů či aktivací běžných transkripčních faktorů (Obr. 3). Jednotlivé isoformy metalothioneinů se pak podílejí na metabolismu detoxikace a homeostázy těžkých kovů, účastní se ochrany organismu před vzniklými volnými kyslíkovými radikály a podporují regeneraci poškozené tkáně (Andrews, 2001, Hamer, 1986, Potesil, 2006).

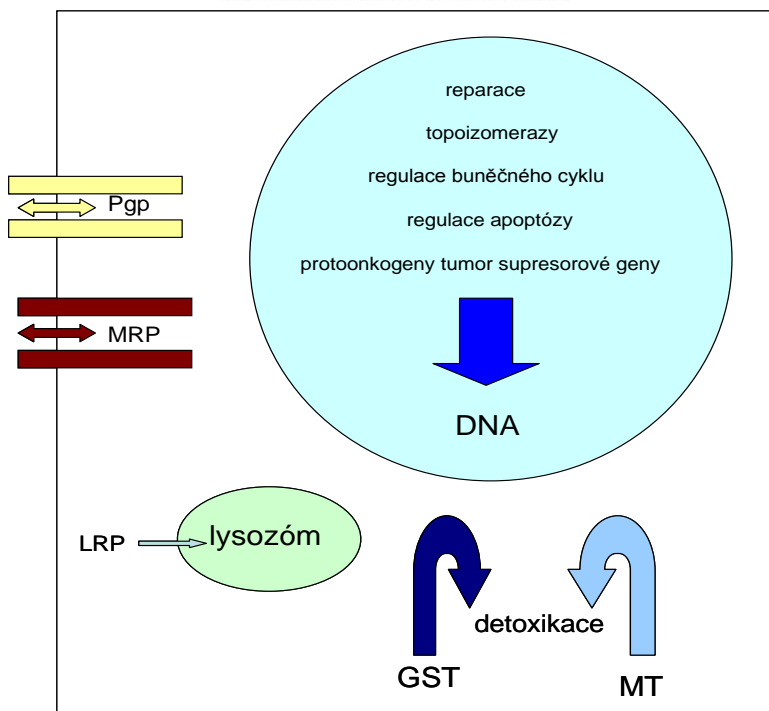
Souvislost mezi hladinou metalothioneinu a rakovinou je na samém počátku zkoumání. Nejnovější výzkumy ovšem naznačují, že existuje vztah mezi množstvím metalothioneinu a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru (Nakayama, a kol., 2002, Theocharis, a kol., 2002, Yamasaki, a kol., 2006). Druhou a velmi závažnou otázkou při studiu souvislosti mezi rakovinou a metalothioneinem je změna jeho množství v přítomnosti protinádorových léčiv (především na bázi platiny) (Potesil, 2006)..

4. Protinádorová léčba

Léčba zhoubných nádorů se dělí na kurativní (nádorové ložisko je zcela odstraněno) a paliativní (ložisko není z důvodu jeho rozsahu odstraněno úplně). Kurativní léčba je volena v případě, že charakter a rozsah nádoru dávají předpoklad pro jeho odstranění z organismu, a tím vyléčení nemocného. Nejčastěji se používá kombinace léčebných metod. Paliativní léčba se používá v případě, že není možné celkové odstranění nádoru. Léčebným cílem je zlepšení stavu nemocného, a to léčbou bolesti a obstrukčních příznaků. V minulosti se za jedinou účinnou léčbu zhoubných nádorů považoval chirurgický výkon. V poměrně nedávné době však byly vypracovány léčebné postupy, které jsou účinné a které daly podnět k přehodnocení všech léčebných metod. Dnes je zcela jasné, že nejlepších výsledků se dosahuje, když se léčba provádí multidisciplinárně. Chirurgická léčba má zásadní význam u solidních nádorů a v paliativním léčení. Léčba zářením se používá v kurativní léčbě u mnoha nádorů a má velký význam i v paliativním léčení. Chemoterapie a hormonální terapie se používá v samostatné léčbě jen u několika nádorů, ale při kombinované léčbě a v paliativní léčbě má velký význam u mnoha nádorů (Smith, a kol., 1993, Vorlíček, 1995).

4.1 Vznik mnohočetné rezistence na léčbu nádorových onemocnění

Z řady klinických studií je známo, že rezistence vůči cytostatikům je vážnou komplikací léčby nemocných se zhoubnými nádory (Lindgren, a kol., 2006, Logashenko, a kol., 2005). Rezistence nádorových buněk k cytostatikům pravděpodobně vzniká z různých příčin a celý proces je na úrovni buňky zcela jistě multifaktoriální (Obr. 4). Obzvláště komplikovaná je terapie nádorového onemocnění v případě mnohočetné rezistence (MDR; multidrug resistance). Jednou z příčin rezistence nádorových buněk je snížená koncentrace cytostatik v místě cíle působení léčiva. Na změny hladiny cytostatik v buňkách se podílí některé membránové proteiny jako Pgp, MRP a LRP. Pgp je membránový fosfoglykoprotein s ATPázovou aktivitou, který se nachází v cytoplazmatické membráně. S tímto proteinem byla asociována MDR rezistence především na cytostatika vyrobená z alkaloidy rodů Vinca, antracykliny, taxany a epipodofylotoxiny. Dalším významným je protein MRP (membránový transportní protein), který se nachází v cytoplazmatické membráně i membránách uvnitř buňky. Úroveň exprese MRP v nádorových buňkách se liší od exprese v normálních buněčných typech, což naznačuje buď změněnou funkci nebo aktivitu v rezistentních nádorových buňkách. Pro vznik MDR rezistence je také významný LRP, což je cytosolový protein (Dollner, a kol., 2004, Hoffmann a Kroemer, 2004, Rihova, a kol., 2005). Funkce LRP zatím není plně vysvětlena. Předpokládá se, že LRP umožňuje ukládání cytostatik v buňce do vezikulů či lyzozomů. Zajímavé je také to, že většinu zmíněných receptorů blokují flavonoidní sloučeniny jako např. genistein (Potesil, 2006)..



Obr. 4: Možné buněčné mechanismy účastníci se procesu rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům; Pgp = membránový fosfoglykoprotein, MRP = membránový transportní protein, LRP = cytosolový protein, Bcl-2 = proti apoptotický protein, GST = glutation-S-transferázy, MT = metalothionein.

Rezistence způsobená změnami topoizomeráz vede k rezistenci způsobené změnou molekulárního cíle cytostatik. Mechanismus účinku těchto látek spočívá ve stabilizaci štěpného komplexu, a tím inhibici opětovného spojení rozštěpené DNA. Složitost vzniku MDR rezistence je možné spojit s řadou genů účastnících se apoptózy nebo nádorových supresorů. Takovým proteinem je protein Bcl-2 jehož změněná exprese rodiny byla nalezena v mnoha nádorových buňkách. Velice často dochází v nádorových buňkách k poškození genů, které se účastní v regulaci buněčného cyklu. Tato poškození vedou ke zvýšené aktivitě cyklin dependentních kináz a nekontrolované proliferaci. Je známo, že v některých nádorových buňkách je tímto způsobem poškozena funkce nádorových supresorů (např. proteinu p53).

V neposlední řadě je možné vznik MDR rezistence spojit se zvýšenou činností reparačních mechanismů DNA. Cytostatika indukující různé primární změny v molekule DNA (např.

cisplatina se vmezeňuje mezi dva guaniny v DNA). Léčebný efekt může být právě potlačen vlivem oprav reparačními enzymy. Z hlediska výsledku reparačního procesu je možné sledovat různé mechanismy reparací: reverze poškození DNA, excizní reparace DNA a inducibilní reparační mechanismy související s tzv. SOS reparací.

Dalším faktorem MDR rezistence může být přímá detoxikace cytostatik. Nejčastěji je zvýšena aktivita enzymů, které xenobiotika oxidují či konjugují s endogenními konjugačními činidly. Enzymy oxidující xenobiotika tvoří početnou skupinu enzymů, z nichž největší roli hrají mikrosomální monooxygenázy. Ke konjugačním enzymům, inaktivujícím cytostatika konjugací s endogenními substráty, patří zejména glutathion-S-transferázy. Právě glutathiontransferázový systém byl rozsáhle studován v souvislosti s rezistencí k cytostatikům u leukemických buněk (Skorski, 2002, Vendrik, a kol., 1992, Volm, 1998).

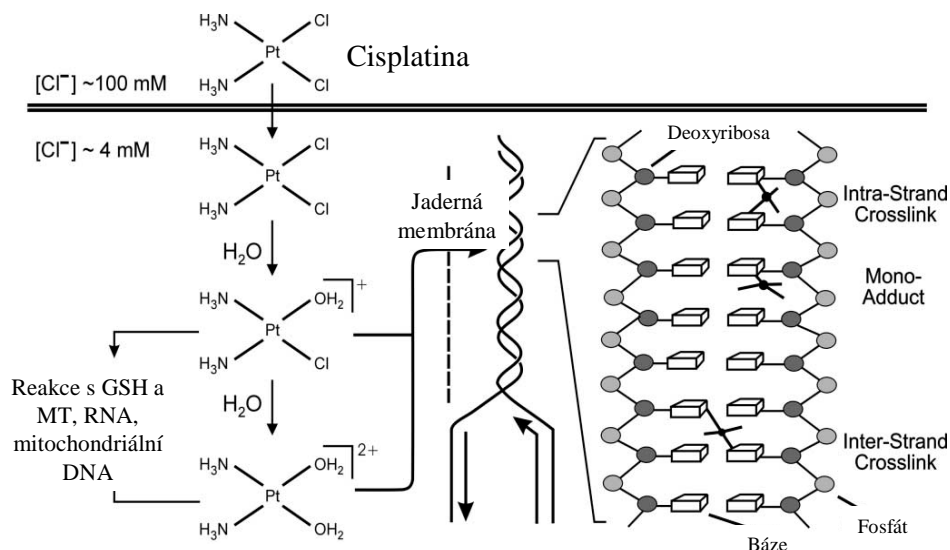
Navíc, kromě všech výše uvedených mechanismů je možné spojovat vznik MDR rezistence také se zvýšenou expresí nízkomolekulárního proteinu metalothioneinu (MT). Biologickou funkcí MT je vazba a homeostáza iontů kovů v organismech. Jak bylo popsáno výše, regulace exprese MT na molekulárním úrovni se pravděpodobně účastní samotný těžký kov (případně protinádorové léčivo na bázi těžkého kovu, např. platiny) vazbou na specifický transkripční faktor MTF-1. Komplex kov-MTF-1 pak v jádře nasedá na MRE v promotorové oblasti MT-genu čímž spouští jeho transkripci (Cai, a kol., 2005, Goodman, a kol., 2005, Il'yasova a Schwartz, 2005). Mimo jiné v okamžiku, kdy se v organismu objeví externě podaný kov (protinádorové léčivo) dojde k rychlému nárůstu MT koncentrace (Kizek, a kol., 2004, Zelená, a kol., 2004). Exprimovaný MT začne okamžitě vyvazovat podávané protirakovinové léčivo. Výsledkem je prudký pokles biologicky aktivní koncentrace léčiva, a tedy i jeho účinnosti (Alberts, a kol., 1998, Kizek, a kol., 2004, Naito, a kol., 1999, Zelená, a kol., 2004).

4.1.1 Cisplatina a hladina MT

Koncem šedesátých let minulého století byl do klinické praxe zaveden cis-diamindichloroplatnatý komplex $(Pt(NH_3)_2Cl_2)$ – cisplatina, který tvoří adukty s molekulou

DNA. Ovšem ani po tak dlouhé době není zcela jasné, zda cytotoxický efekt léčiva nesouvisí s vazbou cisplatinu k jinému cílovému místu v buňce – proteinu nebo RNA. Bylo prokázáno, že cisplatinu se váže v počtu asi 22 molekul na jednu molekulu DNA, na jednu molekulu RNA je to 170 – 33 tisíckrát méně a na molekulu proteinu ještě 33 tisíckrát méně než na RNA (Brabec, 1990). Nutno podotknout, že vlastní testy byly prováděny pouze na izolovaných molekulách a nikoliv v samotných buňkách. Zjištěná data tedy nemusí přímo odpovídat situaci in vivo.

Navázaná cisplatinu (Obr. 5) způsobuje nečitelnost dané sekvence DNA pro DNA-polymerázu a vzniká tak poškození, které vede k razantní inhibici replikace DNA (Brabec a Kašpárková, 2005). Zastaví se také transkripce a následná translace na kódovaný protein. Proti této situaci se organismus brání. Má vypracovaný mechanismus jak tyto struktury opravovat (mutátorové geny). Pokud byly experimentálně opravné mechanismy v buňkách vyřazeny z činnosti došlo k vyšší vazbě cisplatinu na DNA. Ze získaných experimentálních dat vyplývá, že mutátorové proteiny velmi intenzivně ovlivňují protirakovinovou léčbu. Navíc v případě, že se v organismu objeví externě podaný kov (protinádorové léčivo) dojde k rychlému nárůstu MT koncentrace. Exprimovaný MT začne okamžitě vyvazovat podávané protirakovinové léčivo. Výsledkem je prudký pokles koncentrace léčiva, a jeho množství se stane biologicky velmi málo účinné (Alberts, a kol., 1998, Kizek, a kol., 2004, Naito, a kol., 1999, Satoh, a kol., 1993, Zelená, a kol., 2004).



Obr. 5: Schéma vstupu cisplatiny do jádra a její interakce s DNA. Převzato a upraveno dle (Kartalou a Essigmann, 2001).

4.1.2 Radioterapie a hladina MT

Radioterapie je léčebná metoda založená na účinku ionizujícího záření na živé tkáně. Při interakci energie záření s tkáněmi dochází v určitých časových sledech ke změnám, které v závislosti na druhu, kvalitě, velikosti ozářeného tělního objemu a dávce záření vedou k funkčním a morfologickým změnám tkání. Důsledkem je dočasné či trvalé poškození, nebo i smrt buněk (Vorlíček, 1995). Ionizující záření však také rozkládá v organismu přítomnou vodu na volné hydroxylové ($\bullet\text{OH}$) a superoxidové ($\bullet\text{O}_2$) radikály, které jsou charakterizovány přítomností nepárových elektronů. V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxylový radikál ($\text{R-O-O}\bullet$), který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál. Tato řetězová reakce je přerušena buď vazbou dvou radikálů nebo reakcí s antioxidantem. Jedním z těchto antioxidantů je, vedle glutationu nebo vitamínů C a E, také metalothionein (Chubatsu a Meneghini, 1993, Takemura, a kol., 1995). Převaha volných radikálů nad antioxidanty se nazývá oxidační stres (Potesil, 2006)..

Literatura

- <https://snzr.ksrzis.cz/snzr/nor/>. Národní onkologický registr, Národní onkologický registr, 2005, roč. č., s.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JHONSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998.
- ANDREWS, G. K. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals*, 2001, roč. 14. č. 3-4, s. 223-237.
- ASCHERMANNOVÁ, A. Úvodník. *The Lancet Oncology - Czech*, 2005, roč. 4. č. 2, s. 81-81.
- BATES, S. E. Clinical-Applications of Serum Tumor-Markers. *Ann. Intern. Med.*, 1991, roč. 115. č. 8, s. 623-638.
- BRABEC, V. Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatinu. *Biol. Listy*, 1990, roč. 55. č. 1, s. 42-55.
- BRABEC, V.; KAŠPÁRKOVÁ, J. Modifications of DNA by platinum complexes - Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist. Updates*, 2005, roč. 8. č. 3, s. 131-146.
- BRDICKA, R. Application of the polarographic effect of proteins in cancer diagnosis. *Nature*, 1937, roč. 139. č., s. 330-330.
- BRDICKA, R. Polarographic investigation in serological cancer diagnosis. *Nature*, 1937, roč. 139. č., s. 1020-1021.
- CAI, L.; LI, X. K.; SONG, Y.; CHERIAN, M. G. Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. *Curr. Med. Chem.*, 2005, roč. 12. č. 23, s. 2753-2763.
- DOLLNER, R.; GRANZOW, C.; WERNER, J. A.; DIETZ, A. Is there a role for chemosensitivity tests in head and neck cancer? *Onkologie*, 2004, roč. 27. č. 3, s. 310-315.
- GOODMAN, V. L.; BREWER, G. J.; MERAJVER, S. D. Control of copper status for cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 2005, roč. 5. č. 7, s. 543-549.
- HAMER, D. H. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry*, 1986, roč. 55. č., s. 913-951.

- HOFFMANN, U.; KROEMER, H. K. The ABC transporters MDR1 and MRP2: Multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab. Rev.*, 2004, roč. 36. č. 3-4, s. 669-701.
- CHUBATSU, L. S.; MENEGHINI, R. Metallothionein Protects DNA from Oxidative Damage. *Biochem. J.*, 1993, roč. 291. č., s. 193-198.
- IL'YASOVA, D.; SCHWARTZ, G. G. Cadmium and renal cancer. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 2005, roč. 207. č. 2, s. 179-186.
- JURIÈKOVÁ, L. Zhoubné nádory v roce 2006. Aktualní informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2006, roč. č. 2, s. 1-4.
- KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J. M. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 2001, roč. 478. č. 1-2, s. 1-21.
- KASAHARA, K.; FUJIWARA, Y.; NISHIO, K.; OHMORI, T.; SUGIMOTO, Y.; KOMIYA, K.; MATSUDA, T.; SAIJO, N. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer lines to cisplatin. *Cancer Res.*, 1991, roč. 51. č. 12, s. 3237-3242.
- KIZEK, R.; VACEK, J.; ADAM, V.; VOJTÍŠEK, B. Metallothionein - cisplatin and anticancer therapy. *Klin. Biochem. Metab.*, 2004, roč. 13. č. 2, s. 72-78.
- KIZEK, R.; VACEK, J.; ADAM, V.; VOJTÍŠEK, B. Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. *Klin. Biochem. Metab.*, 2004, roč. 12. č. 2, s. 72-78.
- KIZEK, R.; VACEK, J.; TRNKOVÁ, L.; KLEJDUS, B.; HAVEL, L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. *Chem. Listy*, 2004, roč. 98. č. 4, s. 166-173.
- KYLE, R. A. The Monoclonal Gammopathies. *Clin. Chem.*, 1994, roč. 40. č. 11B, s. 2154-2161.
- LEE, B. N.; DANTZER, R.; LANGLEY, K. E.; BENNETT, G. J.; DOUGHERTY, P. M.; DUNN, A. J.; MEYERS, C. A.; MILLER, A. H.; PAYNE, R.; REUBEN, J. M.; WANG, X. S.; CLEELAND, C. S. A cytokine-based neuroimmunologic mechanism of cancer-related symptoms. *Neuroimmunomodulation*, 2004, roč. 11. č. 5, s. 279-292.

- LINDGREN, M.; ROSENTHAL-AIZMAN, K.; SAAR, K.; EIRIKSDOTTIR, E.; JIANG, Y.; SASSIAN, M.; OSTLUND, P.; HALLBRINK, M.; LANGEL, U. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, roč. 71. č. 4, s. 416-425.
- LOGASHENKO, E. B.; VLADIMIROVA, A. V.; ZENKOV, A. N.; REPKOVA, M. N.; VEN'YAMINOVA, A. G.; CHERNOLOVSKAYA, E. L.; VLASSOV, V. V. Reversion of the multiple-drug resistance phenotype mediated by short interfering RNAs. *Russ. Chem. B+*, 2005, roč. 54. č. 5, s. 1298-1305.
- MASOPUST, J. Nádorové markery věera, dnes a zítra (1. část). *Labor Aktuell*, 2004, roč. č. 4, s.
- NAITO, S.; YOKOMIZO, A.; KOGA, H. Mechanisms of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma. *Int. J. Urol.*, 1999, roč. 6. č. 9, s. 427-439.
- NAKAYAMA, A.; FUKUDA, H.; EBARA, M.; HAMASAKI, H.; NAKAJIMA, K.; SAKURAI, H. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002, roč. 25. č. 4, s. 426-431.
- PEPPER, M. S.; TILLE, J. C.; NISATO, R.; SKOBE, M. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.*, 2003, roč. 314. č. 1, s. 167-177.
- POTESIL, D. Využití elektroanalytických metod v diagnostice nádorových onemocnění, Katedra analytické chemie, Brno: Masarykova Univerzita Brno, 2006.
- RIHOVA, B.; STROHALM, J.; KOVÁØ, M.; MRKVAN, T.; ŠUBR, V.; HOVORKA, O.; ŠÍROVÁ, M.; ROZPRIMOVÁ, L.; KUBÁÈKOVÁ, K.; ULBRICH, K. Induction of systemic antitumour resistance with targeted polymers. *Scand. J. Immunol.*, 2005, roč. 62. č., s. 100-105.
- SATOH, M.; KONDO, Y.; MITA, M.; NAKAGAWA, I.; NAGANUMA, A.; IMURA, N. Prevention of Carcinogenicity of Anticancer Drugs by Metallothionein Induction. *Cancer Res.*, 1993, roč. 53. č. 20, s. 4767-4768.
- SKORSKI, T. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, roč. 2. č. 5, s. 351-360.

- SMITH, T. J.; HILLNER, B. E.; DESCH, C. E. Efficacy and Cost-Effectiveness of Cancer-Treatment - Rational Allocation of Resources Based on Decision-Analysis. *J. Natl. Cancer I.*, 1993, roč. 85. č. 18, s. 1460-1474.
- TAKEMURA, Y.; MUKAI, T.; SENOO, K.; SUZUKI, M. Decomposition of Organic Chlorine Compounds by Fentons Reaction on Reticulated Iron. *Kagaku Kogaku Ronbun.*, 1995, roč. 21. č. 1, s. 32-40.
- THEOCHARIS, S.; KARKANTARIS, C.; PHILIPIDES, T.; AGAPITOS, E.; GIKA, A.; MARGELI, A.; KITTAS, C.; KOUTSELINIS, A. Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Histopathology*, 2002, roč. 40. č., s. 143-151.
- THEOCHARIS, S. E.; MARGELI, A. P.; KLIJANIENKO, J. T.; KOURAKLIS, G. P. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*, 2004, roč. 45. č. 2, s. 103-118.
- VENDRIK, C. P. J.; BERGERS, J. J.; DEJONG, W. H.; STEERENBERG, P. A. Resistance to Cytostatic Drugs at the Cellular-Level. *Cancer Chemoth. Pharm.*, 1992, roč. 29. č. 6, s. 413-429.
- VOLM, M. Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Res.*, 1998, roč. 18. č. 4C, s. 2905-2917.
- VORLÍÈEK, J. *Klinická onkologie II. díl.* Brno: Vydavatelství Masarykovy Univerzity, 1995.
- WEINLICH, G.; BITTERLICH, W.; MAYR, V.; FRITSCH, P. O.; ZELGER, B. Metallothionein-overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Brith. J. of Dermatol.*, 2003, roč. 149. č., s. 535-541.
- WEINLICH, G.; EISENDLE, K.; HASSLER, E.; BALTACI, M.; FRITSCH, P. O.; ZELGER, B. Metallothionein - overexpression as a highly significant prognostic factor in melanoma: a prospective study on 1270 patients. *Brit. J. Cancer*, 2006, roč. 94. č. 6, s. 835-841.
- WHITE, R. L. Tumor suppressing pathways. *Cell*, 1998, roč. 92. č., s. 591-592.

- YAMASAKI, Y.; SMITH, C.; WEISZ, D.; VAN HUIZEN, I.; XUAN, J.; MOUSSA, M.; STITT, L.; HIDEKI, S.; CHERIAN, M. G.; IZAWA, J. I. Metallothionein expression as prognostic factor for transitional cell carcinoma of bladder. *Urology*, 2006, roč. 67. č. 3, s. 530-535.
- ZELENÁ, J.; POTEŠIL, D.; VACEK, J.; ADAM, V.; HRADECKÝ, J.; PRŮŠA, R.; KIZEK, R.; VOJTÍŠEK, B. Metallothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění. *Klin. Onkol.*, 2004, roč. 17. č. 6, s. 190-195.
- ZELGER, B.; HITTMAIR, A.; SCHIR, M.; AL., E. Metallothionein expression in nonmelanoma skin cancer. *Appl. Immunohistochem.*, 1993, roč. 2. č., s. 254-260.
- ZELGER, B. W. H.; SIDOROFF, A.; STANZL, U. Deep penetrating dermatofibroma vs. dermatofibrosarcoma protruberans - a clinicopathologic comparison. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1994, roč. 18. č., s. 677-686.