

Hodnocení apoptózy buněk akutní myeloidní leukemie a B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie po kultivaci s cytostatiky a její vztah k mnohočetné rezistenci

K. Jankovičová¹, J. Krejsek¹, O. Kopecký¹, J. Voglová², Z. Škrabková³, J. Novosad¹

¹ Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta MUDr. Otakar Kopecký, CSc.

² Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

³ Ústav lékařské biofyziky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Pravoslav Stránský, CSc.

Souhrn: Selhání apoptózy při cytostatické léčbě leukemických onemocnění představuje jeden z mechanismů rezistence buněk k cytostatikům. Cílem práce bylo zavedení in vitro modelu ke sledování citlivosti klonu maligních buněk akutní myeloidní leukemie (AML) k doxorubicinu a buněk B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie (B-CLL) k chlorambucilu. Zajímal nás také vztah apoptózy po kultivaci buněk s cytostatikem k molekulám P-gp, MRP, LRP, Bcl-2 a Bax. Veškeré analýzy byly hodnoceny pomocí průtokové cytometrie. K detekci apoptotických buněk ve vzorku bylo použito 3 metod: annexinového testu, testu TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labeling) a detekce kaspázy 8. Po kultivaci buněk byl statisticky významný nárůst apoptotických buněk v kultuře pozorován u buněk AML, nikoliv u buněk B-CLL. Při analýze znaků mnohočetné rezistence byly zjištěny některé tendence ke vztahu především znaků P-gp a Bcl-2 k in vitro apoptóze buněk AML a B-CLL. U AML se jednalo zejména o negativní korelaci mezi funkcí P-gp a počtem apoptotických buněk hodnocených testem TUNEL. U B-CLL se jednalo o negativní korelaci mezi expresí P-gp a výsledky annexinového testu a expresí Bcl-2 a kaspázy 8.

Klíčová slova: akutní myeloidní leukemie – B-lymfocytární chronická lymfatická leukemie – apoptóza – mnohočetná rezistence – průtoková cytometrie

Apoptosis assessment in acute myeloid leukemia and B-cell chronic lymphocytic leukemia cells after in vitro cytostatics treatment and its relationship to multidrug resistance

Summary: Apoptosis failure during chemotherapy of leukemia is one of the multidrug resistance mechanisms. The aim of this study was to introduce in vitro model for malignant cell clone sensitivity testing. In vitro cytostatic treatment of acute myeloid leukemia (AML) and B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells and its relationship to P-gp, MRP, LRP, Bcl-2, and Bax proteins expression was also investigated. AML cells were treated with doxorubicin and B-CLL cells were treated with chlorambucil. Flow cytometry was used for all experiments evaluation. To detect the amount of apoptotic cells in the sample three methods were used: annexin test, TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labeling) test, and caspase 8 detection. After in vitro cytostatic treatment statistically significant increase in the number of apoptotic cells in the culture in the case of AML cells but not in the case of B-CLL cells was observed. When analysing multidrug resistance markers some tendencies to correlate with in vitro apoptosis reaction of AML and B-CLL cells were found above all by P-gp and Bcl-2 markers. AML cells displayed negative correlation between P-gp function and number of apoptotic cells detected by TUNEL test. B-CLL cells demonstrated negative correlation between P-gp expression and number of apoptotic cells detected by annexin test and negative correlation between Bcl-2 and caspase 8 expression.

Key words: acute myeloid leukemia – B-cell chronic lymphocytic leukemia – apoptosis – multidrug resistance – flow cytometry

Úvod

Poslední dekáda vykazuje výjimečný nárůst v poznání mechanismů, které souvisejí s chemoterapií, indukovanou

apoptózou a mechanismy rezistence [11]. Ta je často spojována s výskytem proteinů snižujících intracelulární koncentraci cytostatik. Patří mezi ně

členové rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérových proteinů P-gp a MRP, které se vyskytují v buňčných membránách a protein LRP

náležící do rodiny vault-proteinů [21,33,37]. Proteiny P-gp a MRP působí jako pumpy odčerpávající ven z buňky řadu chemicky i funkčně rozdílných cytostatik, LRP představuje ribonukleoproteinové tělísko zprostředkující transport cytostatik do buněčných vezikulů [1,23,19]. Laboratorně je výskyt těchto proteinů nejčastěji zjišťován pomocí monoklonálních protilátek nebo na úrovni mRNA [6,24,32]. Speciální metodikou pro testování aktivity membránových pump jsou funkční testy s fluorescenčními substráty a inhibitory pump [7,18,25,26].

Další významnou problematikou v oblasti chemorezistence nádorových buněk jsou změny v apoptotickém procesu, které znemožňují cytostatikům navodit smrt buňky apoptózou tak, jak je tomu při léčebném zásahu obvyklé [8,15,36]. Klíčovou efektorovou roli v apoptóze sehrává systém cysteinových proteáz – kaspáz, který čítá zhruba 10 proteinů interagujících s dalšími faktory apoptotického procesu a účastnících se proteolytické kaskády, na jejímž konci dochází k degradaci životně důležitých buněčných struktur jako je DNA, nitrobuňčné enzymy a strukturální proteiny [10,41]. Kaspázová kaskáda spojuje tzv. vnější a vnitřní signální dráhu apoptózy, která je spjata s řadou především mitochondriálních pochodů [3,4,11,39]. Důležitou roli v apoptotickém procesu hrají proteiny Bcl-2, Bax a další jim příbuzné proteiny [17,31,40]. Mají buď proapoptotické (Bax, Bad, Bak, Bik, Hrk, Bid, Bcl-X_s) nebo protiapoptotické (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1/BFL-1, Bcl-W) účinky a nadměrná exprese protiapoptotických členů této Bcl-2 rodiny proteinů často způsobuje rezistenci k navození apoptózy působením cytostatika [2,30]. Zvýšený výskyt proteinu Bcl-2 je uváděn u některých lymfomů, 85 % případů B-CLL, 40 % případů AML a také v blastické fázi chronické myeloidní leukemie [31].

Uvádí se 3 základní oblasti apoptotického procesu, k nimž se vztahuje řada buněčných dějů a potažmo metod ke stanovení apoptózy buněk. Jedná se o kondenzaci chromatinu (test TUNEL – Tdt-mediated dUTP nick end labeling), zhroucení membránového potenciálu mitochondrií a změny plazmatické membrány (annexinový test) [3,14,38]. Kultivace leukemických buněk s cytostatiky pomáhají zjišťovat účinnost cytostatika a míra odumírání leukemických buněk v kultuře se dá hodnotit různými testy, např. MTT (metyltiazoltetrazolium) testem nebo některým z testů na přítomnost apoptotických buněk [5,9,20].

Soubor nemocných a metodika

Soubor nemocných

Do studie bylo zařazeno 25 pacientů, 6 s diagnózou akutní myeloidní leukemie v záchytu onemocnění (1 muž a 5 žen) a 19 s diagnózou chronické lymfatické leukemie v různých stadiích onemocnění (14 mužů a 5 žen). Průměrný věk pacientů byl 66 let. Studie byla schválena etickou komisí a byl obdržen informovaný souhlas každého účastníka studie. Spolupráce byla vedena s hematologickými pracovišti Fakultní nemocnice Hradec Králové a hematologickými pracovišti východočeského regionu.

Vzorky

Pro analýzu byly použity vzorky periferní krve, popř. kostní dřeně. Jako protisrážlivé agens byl použit heparin. Pro kultivační pokusy byly použity výlučně vzorky periferní krve. Separované mononukleární buňky byly použity pro nepřímé značení nekonjugovanými protilátkami a pro funkční testy. Separace mononukleárních buněk byla uskutečněna v hustotním gradientu s použitím LymphoprepTM (Nyegaard & Co. A/S).

Značení proteinů asociovaných s rezistencí k cytostatikům

Protein P-gp byl značen pomocí monoklonální protilátky UIC2 (Immu-

notech) konjugované s fykoerytrinem (PE) a dále pomocí monoklonální protilátky MRK16 (Kamiya Biomedical Company) a sekundární protilátky konjugované s fykoerytrinem [F(ab')₂ anti-IgG, Immunotech]. Protein Bcl-2 byl po permeabilizaci pomocí kitu firmy Immunotech IntraPrepTM Permeabilization Reagent (Immunotech) značen monoklonální protilátkou Bcl-2/100 (PharMingen). Před značením proteinů MRP, LRP a Bax byla provedena separace mononukleárních buněk z periferní krve nebo kostní dřeně, vzorek byl fixován a permeabilizován pomocí roztoků IntraPrepTM Permeabilization Reagent (Immunotech). Protein MRP byl značen monoklonální protilátkou MRPr1 (Monosan, ředění 1 : 20), protein LRP byl značen monoklonální protilátkou LRP-56 (Monosan, ředění 1 : 50) a protein Bax byl značen monoklonální protilátkou 4F11 (Immunotech, ředění 1 : 20). Následně byly vzorky inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s fykoerytrinem [F(ab')₂ anti-IgG, Immunotech]. Inkubace s přímou protilátkou probíhala 20 minut a inkubace se sekundární protilátkou 25 minut.

Kontroly a vyhodnocení

Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru Epics[®]XL (Beckman Coulter Company). Pozitivity proteinů P-gp, MRP, LRP, Bax a Bcl-2 byly hodnoceny podle střední intenzity fluorescence MFI (mean fluorescence intensity) gatované populace. Za tímto účelem bylo striktně dodržováno stabilní nastavení parametrů cytometrické analýzy. Ve všech analýzách bylo dodrženo stejné ředění protilátek. Jako výsledek byl stanovován index MFI (MFI dané protilátky/MFI kontroly). Ke statistickému hodnocení výsledků byl použit program NCSS 6.0.21 (1996) a STATISTICA 99. Ze statistických testů byla použita analýza rozptylu s Bonferroniho porovnáním a Spearmanův korelační test.

Funkční testy

Jako fluorescenční substrát P-gp byl testován daunorubicin (625 ng/ml, Cérubidine, Laboratoire Roger Bellon) a Rhodamin 123 (62,5 nM, Sigma). Jako inhibitor P-gp byl testován verapamil (250 nM, Sigma) a cyklosporin A (120 µg/ml, Sigma). Vyseparované buňky byly inkubovány 30 min při 37 °C s fluorescenčním substrátem, pak 2krát promyty v PBS a 1 hod inkubovány s inhibitorem P-gp při 37 °C. Paralelně byla inkubována zkušavka bez inhibitoru a zkušavka bez fluorescenčního substrátu – kontrola autofluorescence.

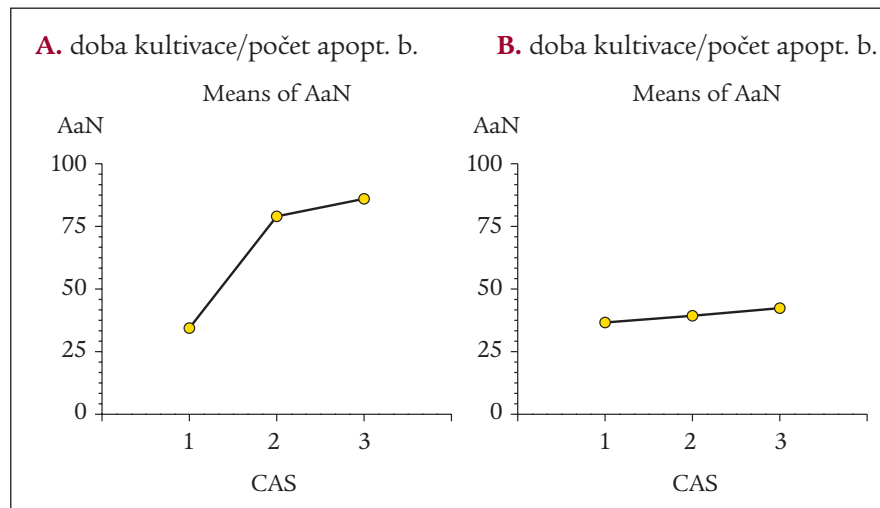
Kultivace buněk pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukemie (AML)

a B-lymfocytární chronické leukemie (B-CLL)

Vyseparované mononukleární buňky z periferní krve byly inkubovány v médiu RPMI 1640 s přidavkem 10 % telecího séra a gentamicinu, v 37 °C v prostředí 5 % CO₂. U vzorků B-CLL byla před kultivací provedena separace T-lymfocytů pomocí magnetických kuliček a monoklonální protilátky proti CD2, 6f10.3 (Immunotech). Koncentrace buněk byla 1 × 10⁶/ml. Vzhledem k následným analýzám byla doba kultivace s cytostatiky 22 hodin a 46 hodin. Každý vzorek byl paralelně kultivován ve třech kultivačních nádobách objemu 50 ml – kontrolní, testovací pro 22hodinovou inkubaci a testovací pro 46hodinovou inkubaci. K vzorkům AML byl přidán doxorubicin (1 µg/ml, Sigma) a k vzorkům B-CLL byl přidán chlorambucil (6 µg/ml, Sigma) jako jeden z nejčastěji užívaných cytostatik v léčbě tohoto onemocnění.

Annexinový test

Annexinový test – Annexin V FITC (Immunotech) jsme použili k rychlé detekci apoptotických buněk. Annexin V byl konjugován s fluorochromem FITC (fluorescein izothiokyanát). Buňky byly inkubovány ve tmě



Graf 1. Průměrný počet apoptotických buněk hodnocených annexinovým testem (AaN) v kontrolním vzorku (1), po 22 hodinách kultivace s cytostatikem (2) a 46 hodinách kultivace s cytostatikem (3) u skupiny pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukemie – AML (A) a B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie – B-CLL (B).

a v ledové lázni v přítomnosti pufru, annexinu V a propidium jodidu 10 minut. Následně byla provedena cytometrická analýza.

Značení kaspázy 8 pomocí protilátky 5F7

Buněčná suspenze o koncentraci 5 × 10⁵/ml byla permeabilizována roztoky IntraPrep™ Permeabilization Reagent (Immunotech). Permeabilizované buňky byly značeny monoklonální protilátkou proti kaspáze 8 – 5F7 (Immunotech) 20 minut. Vzorek byl dále značen čerstvě ředěnou (1 : 20) sekundární protilátkou konjugovanou s fykoerytrinem [F(ab')₂ anti IgG, Immunotech] v případě vzorků B-CLL. V případě vzorků AML byla buněčná suspenze inkubována s čerstvě ředěnou (1 : 20) sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescein izothiokyanátem FITC (anti-IgG, Biotest AG). Inkubace se sekundární protilátkou trvala 25 minut.

Test TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling)

Vzorek buněčné suspenze o koncentraci 5 × 10⁵/ml byl fixován 5,5 % roztokem formaldehydu v PBS (fosfátový pufr) 30 minut při 4 °C. Fixované buňky byly proprány a k sedimentu

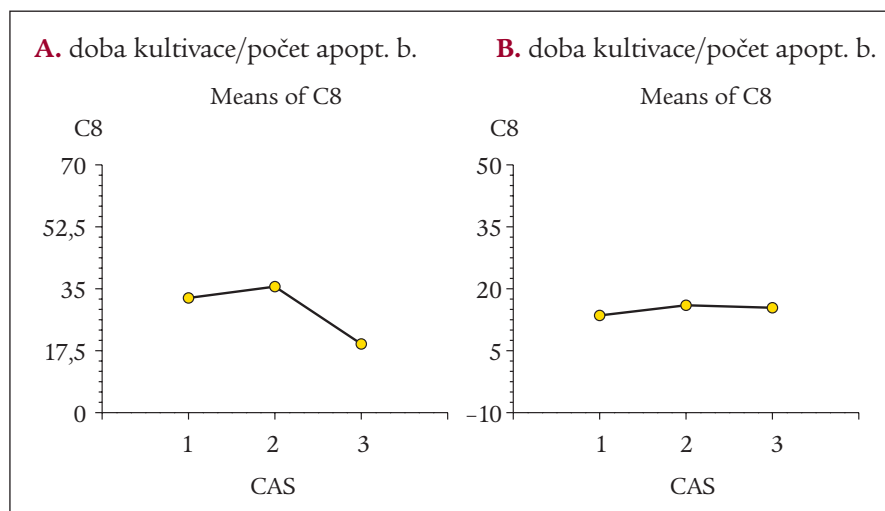
byl přidán 1,5 ml 0,5 % roztok TWEENU 20 (Sigma) v PBS. Permeabilizace probíhala 15 min při pokojové teplotě, následně byly buňky proprány. K permeabilizovaným buňkám byla přidána reakční směs obsahující TdT pufr, FITC-značené dUTP a TdT (komponenty kitu MEBSTAIN Apoptosis kit Direct, Immunotech). U vzorku představujícího negativní kontrolu byla v reakční směsi vynechána TdT. Inkubace se směsí enzymu a dUTP byla vedena při 37 °C 60 minut.

Výsledky

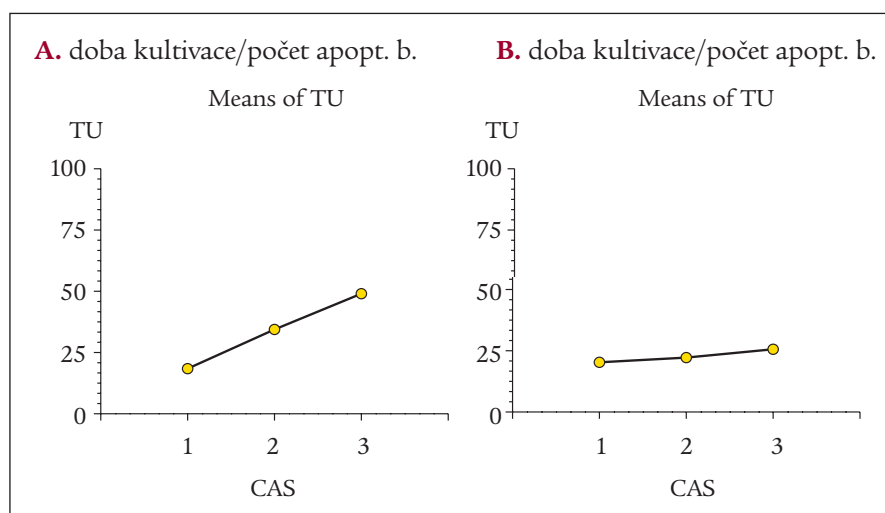
1. AML

Porovnání hodnot kultivace v čase

Výpočty byly získány metodou analýzy rozptylu s opakováním měření (Bonferroniho test) a zjištěny byly následující tendence: počet apoptotických buněk hodnocených annexinovým testem po přidání cytostatika významně vzrostl za dobu kultivace 22 hodin (p = 0,0010). Další kultivace buněk až do 46 hodin od počátku kultivace již nepřinesla žádnou statisticky významnou změnu. Docházelo, avšak v podstatně menší míře k nárůstu apoptotických buněk v kultuře (graf 1). Testem na přítom-



Graf 2. Průměrný počet apoptotických buněk pozitivních na kaspázu 8 (C8) v kontrolním vzorku (1), po 22 hodinách kultivace s cytostatikem (2) a 46 hodinách kultivace s cytostatikem (3) u skupiny pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukemie – AML (A) a B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie – B-CLL (B).



Graf 3. Průměrný počet apoptotických buněk hodnocených testem TUNEL (TU) v kontrolním vzorku (1), po 22 hodinách kultivace s cytostatikem (2) a 46 hodinách kultivace s cytostatikem (3) u skupiny pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukemie – AML (A) a B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie – B-CLL (B).

nost kaspázy 8 nebyla za 22 hodin zjištěna žádná statisticky významná změna v kultuře buněk kultivovaných s cytostatikem, zato v dalším časovém intervalu (kultivace do 46 hod od podání cytostatika) je již změna statisticky významná. Jedná se o pokles procenta apoptotických buněk pozitivních v tomto znaku ($p = 0,0180$) (graf 2). Počet apoptotických buněk zjištěných testem TU-

NEL po podání cytostatika za 22 hodinové a 46 hodinové kultivace mírně zvýšil, ale tento nárůst nebyl prokázán jako statisticky významný (graf 3; tab).

Vztah výsledků kultivačních pokusů a znaků rezistence vůči cytostatikům

Korelační analýzou vztahu výsledků kultivačních pokusů a znaků mno-

hočetné rezistence byla nalezena negativní korelace mezi reakcí v testu TUNEL a výsledky funkčního testu membránových pump v obou časových intervalech (22 hod. – Spearmanův korelační koeficient $R_s = -0,95$; počet pacientů $n = 6$; $p = 0,014$; 46 hod – $R_s = -0,97$; $n = 6$; $p = 0,005$) (graf 4).

2. B-CLL

Porovnání hodnot kultivace v čase

Analýzou rozptylu výsledků kultivačních pokusů u každé ze 3 použitých metod nebyly zjištěny žádné významné změny v počtu živých resp. apoptotických buněk po podání cytostatika (tab). Jsou patrné velké rozdíly mezi jednotlivými pacienty a soubor se jeví co do apoptózy buněk B-CLL in vitro velmi nehomogenní.

Vztah výsledků kultivačních pokusů a znaků rezistence vůči cytostatikům

Korelační analýzou mezi výsledky kultivačních pokusů a znaky mnohočetné rezistence buněk byly nalezeny některé zajímavé závislosti, a to u těchto dvojic: v intervalu 22 hodin pozitivní korelace mezi reakcí v testu na kaspázu 8 a expresí P-gp při značení protilátkou UIC2 ($R_s = 0,53$; $n = 19$; $p = 0,041$) (graf 5), negativní korelace mezi počtem apoptotických buněk v annexinovém testu a expresí P-gp při značení protilátkou MRK16 ($R_s = -0,56$; $n = 19$; $p = 0,016$) (graf 6) a v intervalu 46 hodin pozitivní korelace mezi reakcí v testu TUNEL a expresí P-gp při značení protilátkou UIC2 ($R_s = 0,56$; $n = 19$; $p = 0,031$) (graf 7) a negativní korelace mezi reakcí v testu na kaspázu 8 a expresí proteinu Bcl-2 ($R_s = -0,58$; $n = 19$; $p = 0,024$) (graf 8).

Diskuse

Pro in vitro simulaci, i když značně zjednodušenou, působení cytostatika na leukemické buňky jsme použili kultivační testy buněk AML s doxorubicinem a B-CLL s chlorambu-

Tab. Průměrné hodnoty relativního zastoupení apoptotických buněk a směrodatné odchylky u pacientů s diagnózou akutní myeloidní leukemie (AML) po in vitro kultivaci buněk s doxorubicinem a u pacientů s diagnózou B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie (B-CLL) po in vitro kultivaci buněk s chlorambucilem.

diagnóza	vzorek	procento apoptotických buněk					
		annexinový test		kaspáza 8		test TUNEL	
		Ø	s	Ø	s	Ø	s
AML	kontrola	38,17	± 29,8	32,4	± 13,16	18,4	± 15,18
	kultivace 22 hod	81,33	± 15,45	35,6	± 22,56	34,4	± 13,45
	kultivace 46 hod	86	± 9,85	19,4	± 18,96	49	± 26,05
B-CLL	kontrola	36,63	± 24,14	13,53	± 6,4	20,27	± 20,7
	kultivace 22 hod	39,32	± 26,5	16	± 9,15	22,2	± 19,44
	kultivace 46 hod	44,06	± 26,65	15,4	± 10,30	25,6	± 19,92

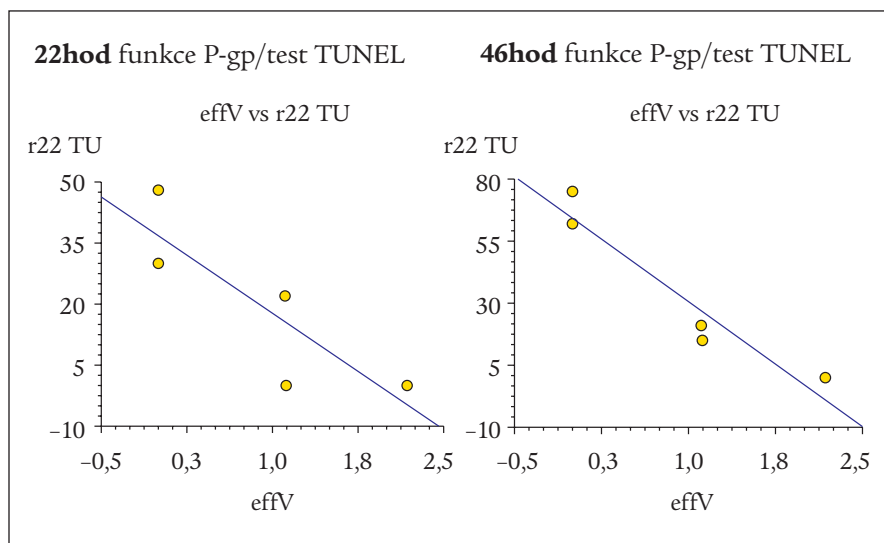
cílem. Kultivace probíhaly vždy po dobu 22 a 46 hodin paralelně s kontrolami bez cytostatika, tak jak byla realizace testu uskutečnitelná v podmínkách běžného chodu klinické laboratoře. Cílem práce bylo ustavit model pro testování in vitro rezistence leukemických buněk k cytostatikům, stanovit nejvhodnější podmínky a testy vyhodnocující reakci buněk v kultuře. Podle Filipitse et al je AML považována za modelové onemocnění pro studium rezistence k cytostatikům [12].

U AML docházelo u většiny vzorků ke značnému nárůstu apopto-

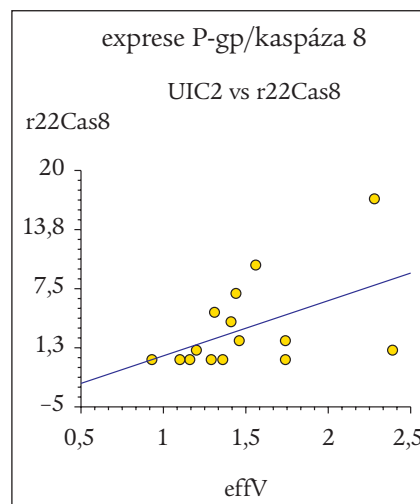
tických buněk po 22 hodinách kultivace s doxorubicinem, měřeno annexinovým testem. Oba další provedené testy na kaspázu 8 a test TUNEL neprokázaly nárůst apoptotických buněk v kultuře jako statisticky významný. Test exprese kaspázy 8 se jeví pro hodnocení apoptózy po in vitro kultivaci buněk s cytostatiky jako ne zcela vhodný. Účast kaspázy 8 v apoptóze blastů AML indukované doxorubicinem je nejspíš zanedbatelná. Bylo publikováno, že spontánní apoptóza buněk AML vykazuje signifikantní korelace s odpovědí na indukční chemoterapii [40]. Ně-

které další studie však ukazují, že in vitro testy s cytostatiky mají svá úskalí. Při studiu reakcí myeloidních buněk v kultuře bylo zjištěno, že nedostatek cytokinů, které zabraňují apoptóze, může přispívat in vitro k citlivosti k daunorubicinu, a tak poskytovat falešné výsledky [9].

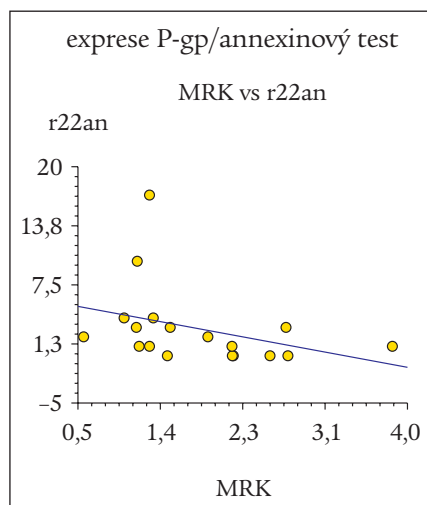
U buněk B-CLL naopak nebyl statisticky významný nárůst apoptotických buněk po kultivaci s chlorambucilem v žádném časovém intervalu. Mezi vzorky jednotlivých pacientů byl poměrně velký rozdíl týkající se apoptotické reakce B-CLL buněk in vitro. Tato skutečnost prav-



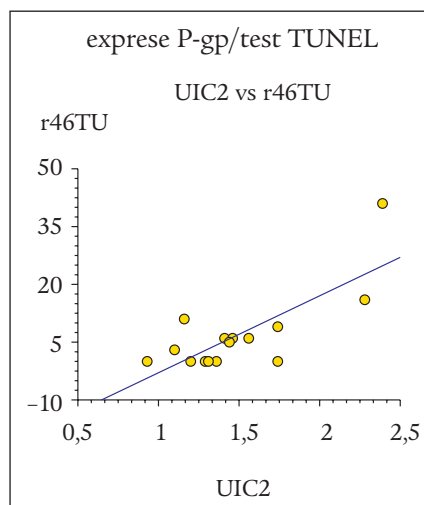
Graf 4. Negativní korelace mezi funkcí proteinu P-gp (effV) a apoptotickou reakcí buněk akutní myeloidní leukemie (AML) po 22hodinové a 46hodinové kultivaci s doxorubicinem při detekci testem TUNEL (r22TU, r46TU).



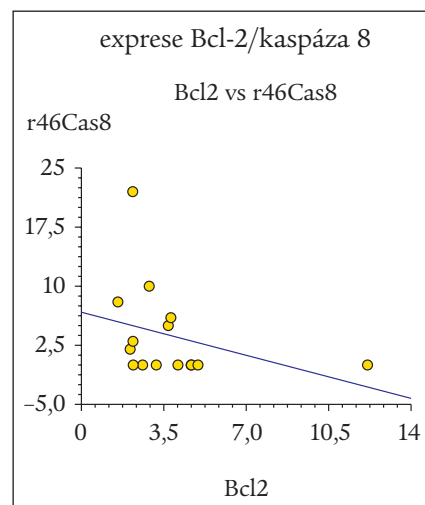
Graf 5. Pozitivní korelace mezi expresí P-gp při detekci protilátkou UIC2 a expresí kaspázy 8 po 22hodinové kultivaci buněk B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie – B-CLL (r22Cas8).



Graf 6. Negativní korelace mezi expresí P-gp při detekci protilátkou MRK-16 (MRK) a apoptotickou reakcí buněk B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie (B-CLL) po 22hodinové kultivaci při hodnocení annexinovým testem (r22an).



Graf 7. Pozitivní korelace mezi expresí P-gp při detekci protilátkou UIC2 a apoptotickou reakcí buněk B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie (B-CLL) po 46hodinové kultivaci při detekci testem TUNEL (r46TU).



Graf 8. Negativní korelace mezi expresí Bcl-2 a expresí kaspázy 8 po 46hodinové kultivaci buněk B-lymfocytární chronické lymfatické leukemie (B-CLL) (r46Cas8).

děpodobně souvisela s odlišnými stadii onemocnění, ale i předešlou léčbou u jednotlivých pacientů. Na rozdíl od pacientů s AML totiž nebyly vzorky pacientů s B-CLL vyšetřovány pouze při záchytu onemocnění. Buňky B-CLL, které v organismu jen těžko podléhají apoptóze, v kultuře spontánně hynuly docela dobře, avšak tato tendence nebyla umocněna přidáním chlorambucilu do kultury. Toto zjištění se shoduje s výsledky jiných studií. Vermes et al uvádějí, že ačkoliv jsou in vitro kultivované B-CLL lymfocyty velice náchylné ke spontánní apoptóze, více než normální B-lymfocyty [38], in vivo je tomu naopak [27]. To odpovídá též patogenezi tohoto doposud nevyléčitelného onemocnění, které je charakteristické zablokováním buněk v G_0/G_1 fázi buněčného cyklu, inhibicí apoptózy a následujícím hromaděním dlouhožijících nádorových buněk [20]. Co se týče apoptózy B-CLL buněk, bylo publikováno, že je inhibována imunokomplexy za účasti okolních leukocytů [13] a že in vitro testy ukázaly proapopto-

tický efekt anti-sense oligonukleotidů proti Bcl-2 mRNA [28] a proapoptotický efekt IL-4, kterého by se dalo s úspěchem využít v imunoterapii B-CLL [22].

Výsledky kultivačních testů, tedy míru apoptózy ve vzorcích po kultivaci buněk s cytostatiky jsme hodnotili také ve vztahu ke znakům mnohočetní rezistence. Korelační analýzou u vzorků AML byly zjištěny silné negativní korelace mezi výsledky testu TUNEL a výsledky funkčního testu membránových pump s použitím doxorubicinu a verapamilu. Silná negativní korelace výsledků testu TUNEL a výsledků funkčního testu odpovídá předpokladu, že čím rezistentnější buňky, tím méně podílu apoptotických buněk v testu TUNEL a zároveň narůstající index MFI u funkčních testů.

Analýza vzorků B-CLL ukázala také závislosti mezi některými znaky mnohočetné rezistence a výsledky kultivačních pokusů. Jelikož efekt chlorambucilu na in vitro apoptózu buněk B-CLL nebyl prokázán, můžeme zde hodnotit pouze vliv in vitro

kultivace B-CLL buněk na spontánní apoptózu. U proteinu Bcl-2 byla zjištěna negativní korelace s výsledky testu na kaspázu 8 po 46hodinové kultivaci buněk. Toto naše zjištění podporuje skutečnost, že buňky pozitivní v Bcl-2 mají menší schopnost podlehnout apoptóze. Význam hladiny proteinů Bcl-2 a Bax při procesu apoptózy je takový, že by bylo zajímavé měřit hladinu těchto proteinů v leukemických buňkách před kultivací a po ní, abychom si mohli udělat představu, jakou změnu jsou podmínky kultivace v tomto směru schopny navodit. Po 48hodinové kultivaci buněk B-CLL s chlorambucilem dokázali Pepper et al, že zvýšená exprese Bax byla nezbytná pro indukci apoptózy a stejná práce ukázala, že rezistence ke chlorambucilu je zprostředkována neúspěšnou indukcí Bax a selekcí subklonů s vysokou expresí Bcl-2 [27]. U proteinu P-gp byla nalezena negativní korelace s výsledky annexinového testu při detekci P-gp protilátkou MRK16. Tato negativní korelace odpovídá představě, že buňky exprimující ve větší mí-

ře P-gp méně reagují na kultivační podmínky apoptózou. Dále byly u proteinu P-gp nalezeny pozitivní korelace s expresí kaspázy 8 a výsledky testu TUNEL při detekci P-gp protilátkou UIC2. Tyto pozitivní korelace jsou v rozporu s předchozí a nedokážeme je vysvětlit. Celá situace je však natolik složitá, že výsledky lze považovat pouze za orientační také vzhledem k malému souboru vyšetřených pacientů. Je známo, že chlorambucil není substrátem P-gp, a proto by neměla být exprese P-gp a reakce buněk B-CLL na chlorambucil v přímé souvislosti. Přesto jsme měli v úmyslu reakci B-CLL buněk na chlorambucil vzhledem k expresi P-gp sledovat, a to z důvodu dalších možných vlivů P-gp na apoptózu buněk kromě odčerpávání cytostatik. Práce Higashiho et al ukázala, že P-gp vykazuje kromě effluxu ještě jiné nepopsané funkce, které modulují citlivost AML blastů k chemoterapii [16,26]. Bylo také zjištěno, že leukemické buňky pozitivní v P-gp mají větší obsah mtDNA, což vede ke změnám energetického metabolismu, a může to ovlivnit citlivost buněk k apoptóze [19]. Dále bylo zjištěno, že P-gp inhibuje apoptózu zprostředkovanou kaspázami [34] a inhibuje apoptózu indukovanou ozářením buněk [35].

Závěrem lze poznamenat, že se podařilo zavést vhodné modelové podmínky pro testování citlivosti buněk AML k doxorubicinu, ne však buněk B-CLL k chlorambucilu. Je však otázkou, zda spontánní apoptóza in vitro sama o sobě neskýtá cenné informace, které by vypovídaly o citlivosti konkrétního nádorového klonu k apoptóze. Z testů použitých k detekci apoptotických buněk ve vzorku bychom jednoznačně doporučili annexinový test pro svou jednoduchost a bezkonkurenční rychlost zpracování vzorku. Co se týče korelací apoptotické reakce buněk a exprese znaků spojených s mnohočetnou rezistencí, je nutno je považo-

vat pouze za orientační a považovat je za jakýsi impuls k dalším výzkumům. V návaznosti na tuto práci by bylo vhodné zejména rozšířit soubor pacientů, pokusit se paralelně testovat více koncentrací cytostatika, popř. další cytostatika používaná při léčbě těchto onemocnění.

Výhledově se v této oblasti otevírají nové možnosti dané zejména novými poznatky o procesech apoptózy, ale i mnohočetné rezistence jako takové. Molekulární objevy v oblasti mnohočetné rezistence odhalily mnoho genů pro transportní proteiny, byly vyvinuty nové metodiky, objeveny nové modulatory [29]. Společně s novými poznatky přibývá též různých laboratorních možností, fluorescenčních substrátů membránových pump, monoklonálních protilátek dostupných pro klinické laboratoře i technických možností daných přístrojovým vybavením.

Práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR č projektu: M/20-3/98.

Poděkování

Autoři děkují Janě Hrdinové za pomoc při úpravách textu.

Literatura

- Arceci RJ. Can multidrug resistance mechanisms be modified? Br J Haematol 2000; 110: 285–291.
- Aviram A, Rabizadeh E, Zaira Y et al. Expression of bcl-2 and bax in cells isolated from B chronic lymphocytic leukemia patients at different stages of the disease. Eur J Haematol 2000; 64: 80–84.
- Baisch H, Bollmann H, Bornkessel S. Degradation of apoptotic cells and fragments in HL-60 suspension cultures after induction of apoptosis by camptothecin and ethanol. Cell Prolif 1999; 32: 303–319.
- Banker DE, Cooper JJ, Fennell DA et al. PK11195, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, chemosensitizes acute myeloid leukemia cells to relevant therapeutic agents by more than one mechanism. Leuk Res 2002; 26: 91–106.
- Banker DE, Groudine M, Willman CL et al. Cell cycle perturbations in acute

myeloid leukemia samples following in vitro exposures to therapeutic agents. Leuk Res 1998; 22: 221–239.

6. Beck WT, Grogan TM. Methods to detect P-glycoprotein and implications for other drug resistance-associated proteins. Leukemia 1997; 11: 1107–1109.

7. Brügger D, Herbart H, Gekeler V et al. Functional analysis of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein related multidrug resistance in AML-blasts. Leuk Res 1999; 123: 467–475.

8. Dive C. Avoidance of apoptosis as a mechanism of drug resistance. J Int Med 1997; 242(Suppl 740): 139–145.

9. Efferth T, Fabry U, Osieka R. Apoptosis and resistance to daunorubicin in human leukemic cells. Leukemia 1997; 11: 1180–1186.

10. Elkon KB. Caspases: Multifunctional proteases. J Exp Med 1999; 190: 1725–1727.

11. Fennell DA, Cotter FE. Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective chemotherapy. Br J Haematol 2000; 111: 52–60.

12. Filipits M, Stranzl T, Pohl G et al. Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis. Leukemia 2000; 14: 68–76.

13. Gamberale R, Geffner JR, Trevani A et al. Immune complexes inhibit apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia B cells. Br J Haematol 1999; 107: 870–876.

14. Gorman AM, Samali A, McGowan AJ et al. Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. Cytometry 1997; 29: 97–105.

15. Hickman JA. Apoptosis and chemotherapy resistance. Eur J Canc 1996; 32A: 921–926.

16. Higashi Y, Turzanski J, Pallis M et al. Contrasting in vitro effects for the combination of fludarabine, cytosine arabinoside (Ara-C) and granulocyte colony-stimulating factor (FLAG) compared with daunorubicin and Ara-C in P-glycoprotein-positive and P-glycoprotein-negative acute myeloblastic leukaemia. Br J Haematol 2000; 111: 565–569.

17. Inohara N, Ding L, Chen S et al. HAKIRI, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival – promoting proteins Bcl-2 and Bcl-XL. EMBO J 1997; 16: 1686–1694.

18. Jankovičová K, Krejsek J, Kopecký O. Mnohočetná rezistence leukemických buněk k cytostatikům – funkční testy akumulace fluorescenčních barviv hodnocené průtokovou cytometrií. *Vnitř Lék* 2001; 47: 25–29.
19. Jia L, Liu KZ, Newland AC et al. Pgp-positive leukaemic cells have increased mtDNA but no increased rate of proliferation. *Br J Haematol* 1999; 107: 861–869.
20. Klein A, Miera O, Bauer O et al. Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair. *Leukemia* 2000; 14: 40–46.
21. Krishan A, Morgan FC, Andritsch I. Drug retention, efflux and resistance in tumor cells. *Cytometry* 1997; 29: 279–285.
22. Lundin J, Kimby E, Bergmann L et al. Interleukin 4 therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia: a phase I/II study. *Br J Haematol* 2001; 112: 155–160.
23. Marie JP, Huet S, Faussat AM et al. Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1086–1094.
24. Okochi E, Iwahashi T, Tsuruo T. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. *Leukemia* 1997; 11: 1119–1123.
25. Pallis M, Russell NH. Functional multidrug resistance in acute myeloblastic leukaemia: a standardized flow cytometric assay for intracellular daunorubicin accumulation. *Br J Haematol* 1998; 100: 194–197.
26. Pallis M, Turzanski J, Harrison G et al. Use of standardized flow cytometric determinants of multidrug resistance to analyse response to remission induction chemotherapy in patients with acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 104: 307–312.
27. Pepper C, Thomas A, Hoy T et al. Chlorambucil resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is mediated through failed Bax induction and selection of high Bcl-2-expressing subclones. *Br J Haematol* 1999; 104: 581–588.
28. Pepper C, Thomas A, Hoy T et al. Antisense-mediated suppression of Bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 107: 611–615.
29. Ramachandran C, Melnick SJ. Multidrug resistance in human tumors – molecular diagnosis and clinical significance. *Mol Diagnosis* 1999; 4: 81–94.
30. Reed JC. Bcl-2 family protein and mechanisms of chemoresistance in lymphomas and leukemias. *Adv Leuk Lymph* 1995; 5: 3–11.
31. Reed JC. Bcl-2 family proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematological malignancies. *Sem Hematol* 1997; 34: 9–19.
32. Robert J. Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches. *Eu J Clin Invest* 1999; 29: 536–545.
33. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 467–473.
34. Ruefli AA, Bernhard D, Tainton KM et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells. *Int J Cancer* 2002; 99: 292–298.
35. Ruth AC, Roninson IB. Effects of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer Res* 2000; 60: 2576–2578.
36. Sellers WR, Fisher DE. Apoptosis and cancer drug targeting. *J Clin Invest* 1999; 104: 1655–1661.
37. van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Therapeutics* 2000; 38: 94–110.
38. Vermes I, Haanen C, Richel DJ et al. Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. *Acta Haematol* 1997; 98: 8–13.
39. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 1999; 93: 3587–3600.
40. Wuchter C, Karawajew L, Ruppert V et al. Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage, and cytogenetics. *Leukemia* 1999; 13: 1943–1953.
41. Xerri L, Devilard E, Bouabdallah R et al. FADD expression and caspase activation in B-cell lymphomas resistant to Fas-mediated apoptosis. *Br J Haematol* 1999; 106: 652–661.

Mgr. Karolína Jankovičová
www.fnhk.cz
e-mail: kajako@email.cz

Doručeno do redakce: 28. 1. 2004
Přijato po recenzi: 26. 4. 2004

www.vnitrnilekarstvi.cz