

17 Změny hladiny metalothionenu v buněčných liniích neuroblastomu vystavených působení platinových cytostatik.

Křížková S.^{1,3}, Fabrik I.⁴, Hraběta J.⁵, Eckschlager T.⁵, Adam V.^{2,3}, Kizek R.¹

- 1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno
- 2) Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno
- 3) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
- 4) Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
- 5) Klinika dětské hematologie a onkologie, II. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha 5, Česká republika

Klíčová slova:

Metalothionein; Zhoubné nádory; Cis-platina; MDR; Neuroblastom

Úvod

V České Republice jsou zhoubné novotvary druhou nejzávažnější příčinou úmrtí. Podobně je tomu i ve světě. Ročně je u nás nově diagnostikováno více než 50 tisíc případů nádorového onemocnění u lidí různého věku a přibližně polovina z nich nádorového onemocnění podlehe (Abrahamova, 2005, Jurickova, 2006). Chemoterapeutika na bázi platinových komplexů jsou v současnosti používána v chemoterapii širokého spektra maligních onemocnění. Biologická aktivita prvního platinového cytostatika – cisplatinu (*cis*-diamin-dichlor-platina), byla objevena v roce 1965 během studia vlivu elektrického proudu na růst bakterií. Od té doby byly syntetizovány a ověřeny jako antikancerogenní medikament stovky platinových komplexů, z nichž nejznámější jsou cisplatina, karboplatina, oxaliplatin, lobaplatina a ormaplatina. Ačkoliv je cisplatina úspěšně používána v chemoterapii zhoubných nádorů více než 25 let, její biochemický mechanismus účinku stále není detailně prozkoumán. Cytotoxický účinek cisplatinu spočívá ve vzniku aduktů s DNA, především na guanin a adenin, což má za následek prokřížení vláken DNA a tím narušení mitózy.

Z řady klinických studií je známo, že rezistence vůči cytostatikům je častou příčinou selhání terapie (Lindgren, et al., 2006, Logachenko, et al., 2005). Rezistence nádorových buněk k cytostatikům vzniká různými mechanismy a celý proces je na úrovni buňky multifaktoriální. Obzvláště komplikovaná je terapie nádorového onemocnění při vzniku mnohočetné lékové rezistence (MDR; multidrug resistance). Jednou z příčin rezistence nádorových buněk je snížená koncentrace cytostatik v místě cílů působení léčiva. Na změny hladiny cytostatik v buňkách se podílí některé membránové proteiny jako Pgp, MRP a LRP. Složitost vzniku MDR dokládají i změny řady genů účastnících se apoptózy nebo nádorových supresorů, dalším faktorem MDR rezistence může být přímá detoxikace cytostatik, nejčastěji je zvýšena aktivita enzymů, které xenobiotika oxidují či konjugují s endogenními konjugujícími činidly. Kromě výše uvedených mechanismů je možné spojovat vznik MDR rezistence se zvýšenou expresí nízkomolekulárního proteinu metalothioneinu (MT). Metalothionein patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti 6-10 kDa. MT se skládají ze dvou vazebných domén α , β které jsou složeny z cysteinových klastrů. N-terminální část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty; C-terminální část peptidu (α -doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů (Kägi, 1993, Kägi and Schäffer, 1988). Tato schopnost metalothioneinu může mít za následek snížení terapeutické hladiny volného cytostatika a tím zvyšovat schopnost rezistentních nádorových buněk přežít v přítomnosti terapeutických dávek cisplatinu.

Materiál a metody

Chemikálie. Pokud není uvedeno jinak, všechny chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, USA.

Biologické vzorky

Buněčné linie odvozené od neuroblastomu vysokého rizika a od nich odvozené linie rezistentní k cis-platině byly kultivovány v přítomnosti 1, 0,1 nebo 0,01 μM cis-platinu nebo karboplatiny.

Příprava biologického vzorku

Vzorky byly mechanicky homogenizovány za snížené teploty, centrifugovány po dobu 30 min při 4 °C, 15 000 g (Eppendorf 5402, USA). Většina balastních proteinů byla odstraněna tepelnou denaturací (15 min po dobu 99 °C v termobloku Eppendorf 5430, USA) a následnou centrifugací při 4 °C, 15 000 g po dobu 15 min (Eppendorf 5402, USA).

Elektrochemická analýza

Vzorky buněk byly analyzovány na přístroji 747 VA Stand ve spojení s 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko) s chlazeným prostorem pro uložení vzorků (4°C). Elektrochemický analyzátor byl sestaven v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0.4 mm²; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda.

Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 mol.dm⁻³ a amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9.6) byl po každých 5 analýzách vyměněn. DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0.7 V, konečný potenciál -1.75 V, modulační čas 0.057 s, časový interval 0.2 s, potenciálový krok 2 mV/s, modulační amplituda -250 mV, E_{ads} = 0 V. Pro úpravu a vyhodnocování dat byl použit software GPES 4.9 (EcoChemie, Švýcarsko).

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

Výsledky a diskuze

V práci byl srovnáván efekt působení cytostatik cisplatinu a karboplatinu v 1, 0,1 a 0,01 μM koncentraci na senzitivní a rezistentní buněčné linie neuroblastomu UKF-NB-4. Po uplynutí 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 a 72 hod byla stanovena hladina metalothioneinu v těchto buňkách. U rezistentní linie byl pozorován nárůst hladiny MT v závislosti na koncentraci a druhu cytostatika.

U karboplatinu byly změny v hladině metalothioneinu pozorovatelné již od počátku experimentu, kdy u dvou nejvyšších koncentrací byla hladina MT snížena u rezistentních linií ve srovnání se senzitivními. V 6. hodině experimentu došlo u rezistentních linií k prudkému nárůstu hladiny MT, který byl následován poklesem a následným prudkým zvýšením hladiny MT u rezistentní nádorové linie od 48. hod. Tato zvýšená hladina byla pozorována po zbytek experimentu. U nejnižší koncentrace cytostatika byl pozorován obdobný trend, ale s méně výraznými změnami (Obr. 1).

U cisplatinu lze rozdíly v hladině MT mezi senzitivní a rezistentní linií popsat obdobně, ale s tím rozdílem, že zvýšená hladina MT se ustálila již po 24 h experimentu (Obr. 2).

Kolísání hladiny MT u expozice cisplatině a karboplatině s obdobným průběhem u všech aplikovaných koncentrací cytostatika lze vysvětlit počátečním vysycením veškerého volného MT cytostatikem a jeho následným odstraněním z buňky, což se projevilo jako pokles hladiny MT v buňkách. Rezistentní linie na rozdíl od senzitivní zareagovala na přítomnost cytostatika zvýšením exprese MT, což bylo zaznamenáno jako strmý nárůst jeho hladiny. Zjištěné rozdíly v hladině metalothioneinu jsou v dobré shodě s již dříve zjištěnými poznatky o průběhu detoxikace platinových cytostatik pomocí thiolových sloučenin, které zvyšují jejich schopnost přežít v přítomnosti platinových cytostatik (Prusa, et al., 2006).

Závěr

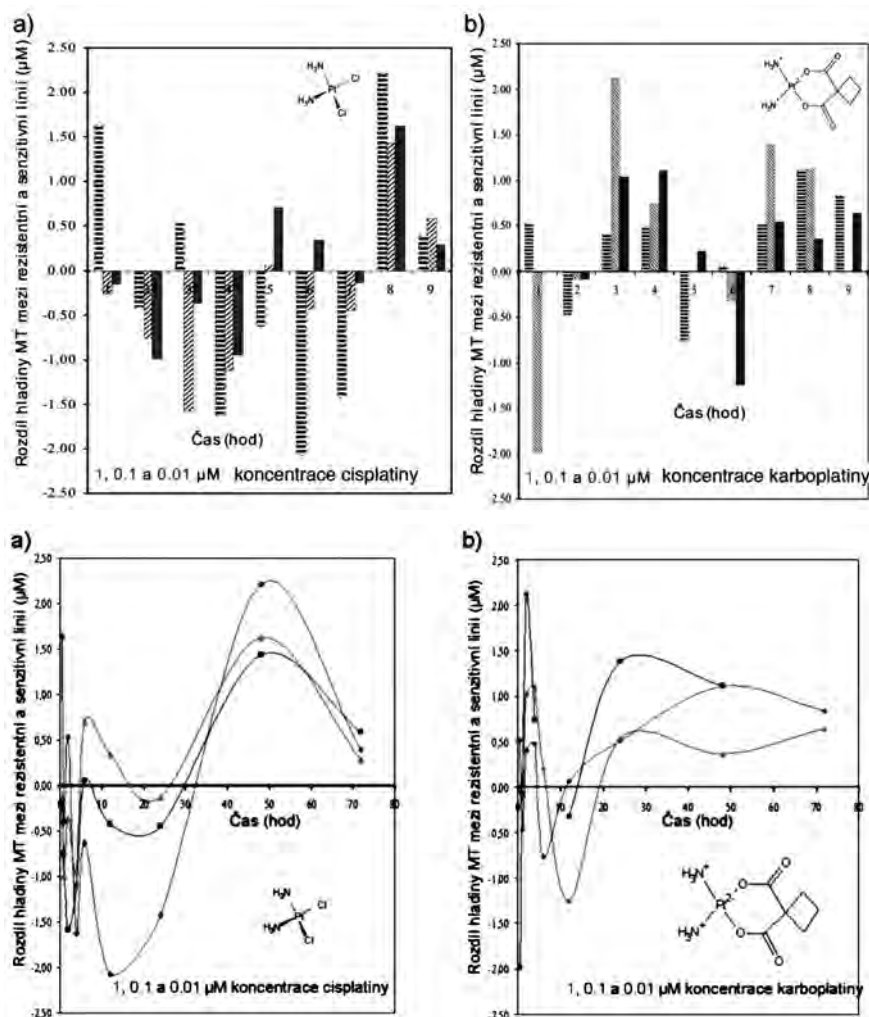
Ze získaných výsledků vyplývá, že buněčné linie neuroblastomu UKF-NB-4 rezistentní a senzitivní k cisplatině reagují odlišně na přítomnost platinových cytostatik cisplatinu a karboplatinu. Hladina metalothioneinu byla zvýšená u rezistentních neuroblastomových nádorových linií ve srovnání se senzitivními již po uplynutí 24 hod expozice. Dále bylo pozorováno, že hladina metalothioneinu se zvyšuje v závislosti na koncentraci platinového cytostatika. Uvedené skutečnosti naznačují, že metalothionein hraje roli v rezistenci nádorových buněk k platinovým cytostatikům.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podpořena ze zdroje GA AV IAA401990701

Literatura:

1. ABRAHAMOVA, J. Národní onkologický registr. <http://www.uzis.cz/cz/nor/norindx.htm>, 2005, roč. č., s.



Obr. 1, 2

(a) Rozdíl obsahu metalothioneinu mezi rezistentní a senzitivní neuroblastomovou nádorovou linií UKF-NB-4 v závislosti na době expozice třem koncentracím karboplatinu (1, 0,1 a 0,01 μM)

(b) Rozdíl obsahu metalothioneinu mezi rezistentní a senzitivní neuroblastomovou nádorovou linií UKF-NB-4 v závislosti na době expozice třem koncentracím cisplatinu (1, 0,1 a 0,01 μM).

EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

2. JURICKOVA, L. Zhoubné nádory v roce 2003. Aktuální informace ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2006, roč. č. 2, s. 1-4.
3. KÄGI, J. H. R. Overview of metallothionein. Metallobiochemistry Part B: metallothionein and related molecules. Methods Enzymol., 1993, roč. 205. č., s. 613-626.
4. KÄGI, J. H. R.; SCHÄFFER, A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry, 1988, roč. 27. č. 23, s. 8509-8515.
5. 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. Biochemical Pharmacology, 2006, roč. 71. č. 4, s. 416-425.
6. 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. Russian Chemical Bulletin, 2005, roč. 54. č. 5, s. 1298-1305.
7. PRUSA, R.; SVOBODA, M.; BLASTIK, O.; ADAM, V.; ZITKA, O.; BEKLOVA, M.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Increase in content of metallothionein as marker of resistance to cisplatin treatment. Clinical Chemistry, 2006, roč. 52. č. 6, s. A174-A175.