

Proteiny rezistence a chemorezistence u patientek s karcinomem ovaria

Proteins of Resistance and Drug Resistance in Ovarian Carcinoma Patients

Sedláková I.¹, Laco J.², Tošner J.¹, Caltová K.³, Červinka M.³, Řezáč A.¹, Špaček J.¹, Škapinec P.¹

¹ Porodnická a gynekologická klinika LF UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové, přednosta doc. MUDr. Jindřich Tošner, CSc.

² Fingerlandův ústav patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Aleš Ryška, PhD.

³ Ústav biologie a lékařské genetiky Lékařské fakulty Hradec Králové UK v Praze, přednosta prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.

Souhrn

Východiska: Cílem této práce je stanovení proteinů rezistence LRP (Lung Resistance Protein), Pgp (P-glykoprotein), MRP (Multidrug Resistance-Associated Protein), MRP3 a MRP5 a zjištění jejich závislosti na stadiu, stupni diferenciaci a histologickém typu ovariálního karcinomu a zhodnocení vztahu proteinů rezistence s chemorezistencí/chemosenzitivitou *in vitro* stanovenou MTT testem. **Soubor patientek a metodika:** Stanovení proteinů rezistence (LRP, Pgp, MRP, MRP3, MRP5) jsme provedli u 64 vzorků ovariálních karcinomů u patientek operovaných na Porodnické a gynekologické klinice FN HK v letech 2006–2010. Proteiny rezistence jsme stanovili metodou dvouступňové imunohistochemie. Chemorezistenci/chemosenzitivitu *in vitro* jsme zhodnotili MTT testem. **Výsledky:** Prokázali jsme vyšší hodnoty Pgp, MRP, MRP3 a MRP5 u patientek s pokročilým karcinomem ovaria (st. III + IV) v porovnání s pacientkami s časným stadiem onemocnění (st. I + II). Nejnižší hodnoty LRP, Pgp, MRP jsme zjistili u endometroidního ovariálního karcinomu. Vztah proteinů rezistence se stupněm diferenciaci jsme neprokázali. Zaznamenali jsme vyšší hodnoty Pgp, MRP, MRP3 a MRP5 u patientek s recidivou onemocnění. Prokázali jsme vyšší hodnoty Pgp a MRP u patientek chemorezistentních *in vitro* dle MTT testu. **Závěr:** Ze stanovených proteinů rezistence se nejpřesvědčivěji u karcinomu ovaria jeví Pgp a MRP. Stanovení Pgp a MRP by mohlo přispět k predikci léčebné odpovědi na primární chemoterapii u patientek s karcinomem ovaria.

Klíčová slova

karcinom ovaria – p170 – LRP – MRP – chemorezistence – MTT test

Summary

Background: To evaluate the correlation of resistance proteins LRP (Lung Resistance Protein), Pgp (P-glycoprotein), MRP (Multidrug Resistance-Associated Protein), MRP3 and MRP5 with stage, grade and histological type. To assess correlation of these resistance proteins with drug resistance/drug sensitivity *in vitro* by means of the MTT assay in ovarian cancer patients. To find the clinical outcome of these data. **Patients and Methods:** 64 women with epithelial ovarian cancer who underwent primary surgery in 2006–2010 had specimens stained with immunohistochemistry for LRP, MRP, MRP3, MRP5 and Pgp and MTT assay (MTT-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide). **Results:** Patients with late ovarian cancer had a higher Pgp, MRP, MRP3 and MRP5 level compared to ovarian cancer patients with early stage ovarian cancer. No correlation of resistance proteins with grading was found. Patients with high Pgp and MRP expression had significantly shorter progression-free survival. Patients with drug resistance *in vitro* by means of the MTT assay had higher Pgp and MRP expression. **Conclusion:** P-glycoprotein and MRP may be useful predictor for outcome of primary chemotherapy in patients with ovarian cancer.

Key words

ovarian cancer – p170-glycoprotein – Lrp-Lung resistance protein – MRP1 protein – Drug Resistance – MTT test

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NS 9737-3.

This study was supported by grant of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health NS 9737-3.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Iva Sedláková, Ph.D.

Porodnická a gynekologická klinika
Fakultní nemocnice
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: sedlakiva@seznam.cz

Obdrženo/Submitted: 18. 5. 2012

Přijato/Accepted: 30. 8. 2012

Východiska

Karcinom ovaria je nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické malignity (47 % úmrtí). Je zastoupen 5 % mezi všemi nádory u žen. Přestože byla léčbě zhoubných nádorů ovaria věnována velká pozornost, výsledky přežití pacientek se za posledních 20 let zlepšily minimálně, a to spíše v důsledku centralizace péče do center [1]. Hlavním klinickým problémem současné cytostatické léčby ovariálního karcinomu je léková rezistence na cytostatika (chemorezistence). Jejím následkem je selhání léčby [2]. Kompletní odpověď na primární chemoterapii je vysoká, mezi 50 a 70 %. Přesto 50–75 % pacientek s pokročilým ovariálním karcinodem onemocnění relabuje a dochází k rozvoji lékové rezistence, a to zejména mnohočetné (MDR) [3].

Maligní buněčné populace mohou být vůči chemoterapii rezistentní již během primární léčby. V tomto případě jde o tzv. přirozenou (primární) rezistenci. Získaná (sekundární) rezistence vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentními a účinnost cytostatické léčby se snižuje. Pokud při ztrátě citlivosti k jednomu přípravku vzniká současně rezistence na jiné, většinou strukturálně příbuzné cytostatikum, hovoříme o rezistenci zkřížené. Byly však popsány případy zkřížené rezistence mezi protinádorovými léčivy lišícími se jak strukturálně, tak mechanismem účinku. Takové případy rezistence pak nazýváme mnohočetná léková rezistence (Multi-Drug Resistance, MDR). MDR vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativním léčebným režimům obsahujícím nové druhy cytostatik nepoužitých v původní léčbě. Typická (klasická) MDR je zapříčiněna membránovým P-glykoproteinem (Pgp), který je produktem MDR1 genu. Jako atypická MDR jsou souhrnně označovány všechny mechanismy mnohočetné lékové rezistence, kterých se neúčastní Pgp [4].

Jedním ze základních mechanismů vzniku MDR je transportní funkce některých transmembránových proteinů ze skupiny tzv. ABC-transportérů (ATP binding cassette proteins). Jedním z nejvýznamnějších ABC-transportérů přispívajících k rozvoji MDR je P-glykoprotein (Pgp).

Jedná se o transmembránový glykoprotein o velikosti 170 kDa tvořený 1 280 aminokyselinami [5]. Tato ATP řízená effluxní pumpa využívá pro svou transportní funkci energii z hydrolýzy ATP [6]. MDR1 je běžně exprimován v játrech, ledvinách, střevech, mozku, děloze, varlatech a placentě [7]. Z toho vyplývá i jeho fyziologická funkce, kterou je především řízení absorpce, distribuce a exkrece celé řady xenobiotik včetně řady klinicky významných léčiv. Brání také průniku xenobiotik do mozku či reprodukčních orgánů [8]. Substráty Pgp je přitom řada protinádorových léčiv jako vinka-alkaloidy, antracykliny, taxany, kolchicin a actinomycin D [7]. Taxany jsou standardní součástí chemoterapie první linie pokročilého ovariálního karcinomu.

Cílem této práce je stanovení proteinů rezistence LRP (Lung Resistance Protein) (obr. 1), Pgp (P-glykoprotein) (obr. 2), MRP (Multidrug Resistance-Associated Protein) (obr. 3, 4), MRP3 a MRP5 a zjištění vztahu se stadiem, stupněm diferenciaci a histologickým typem ovariálního karcinomu. Dále pak zhodnocení vztahu proteinů rezistence s chemorezistencí/chemosenzitivitou *in vitro* stanovenou MTT testem.

Soubor pacientek a metodika

Soubor pacientek

Stanovení proteinů rezistence (LRP, Pgp, MRP, MRP3, MRP5) jsme provedli u 64 vzorků ovariálních karcinomů u pacientek operovaných na Porodnické a gynekologické klinice FN HK v letech 2006–2010. Primární chemorezistenci/chemosenzitivitu *in vitro* pomocí MTT testu jsme zhodnotili u 54 žen z tohoto souboru. Odběry vzorků na stanovení MTT testu byly prováděny během primární operace pro karcinom ovaria u pacientek, které před danou operací neprodělaly chemoterapii ani žádnou jinou léčbu pro ovariální karcinom. Jednalo se o pacientky s nově zjištěným karcinodem ovaria – chemonaivní. Žádná z těchto pacientek nebyla v minulosti léčena pro jiný karcinom. Všechny pacientky měly před operací podepsaný informovaný souhlas s odběrem vzorků tkáně, schválený Etickou komisí FN HK. Průměrný věk testovaných pacientek byl 63 let. Všechny pacientky z tohoto

souboru dostaly dle současných doporučených standardů v rámci adjuvantní chemoterapie první linie kombinaci paklitaxel a karboplatina.

Jednalo se o 8 pacientek se stadiem I (12,5 %), 1 pacientku se stadiem II (1,6 %), 45 pacientek se stadiem III (70,3 %) a 10 pacientek se stadiem IV (15,6 %). Dobře diferencovaný ovariální karcinom v tomto souboru mělo 6 pacientek (9,8 %), 14 pacientek středně diferencovaný ovariální karcinom (23 %) a 41 pacientek špatně diferencovaný karcinom ovaria (67,2 %). U 3 pacientek nebyl stupeň diferenciaci určen. Serózní ovariální karcinom mělo 45 žen (77,6 %), mucinózní ovariální karcinom 5 pacientek (8,6 %), endometroidní ovariální karcinom mělo 8 pacientek (13,8 %). Pacientky s jinými histologickými typy ovariálního karcinomu ani borderline tumory jsme do této práce nezahrnuli.

Stanovení proteinů rezistence LRP, Pgp, MRP, MRP3, MRP5

Proteiny rezistence LRP (Lung Resistance Protein), Pgp (P-glykoprotein), MRP (Multidrug Resistance-Associated Protein), MRP3 a MRP5 jsme stanovili standardním postupem dvoustupňovou imunohistochemií ve Fingerlandově ústavu patologie ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Materiál získaný při operaci byl po odběru rutinně fixován v 10% formalinu. Ve všech případech byl proveden standardizovaný odběr tkáně na histologické (a následné imunohistochemické) vyšetření. Byly odebrány vždy nejméně tři vzorky z nádoru (zpravidla 1 bloček na 1 cm nádoru) se zaměřením na pouzdro, případně periferii tumoru. Tkáňové bločky byly dále zpracovány standardní histologickou technikou a zalaty do parafinu. Z každého bločku byly krájeny řezy o tloušťce 2–3 μm . Tyto řezy byly použity jednak k rutinnímu barvení hematoxylinem-eozinem, jednak k imunohistochemickému vyšetření. Stanoven byl histologický typ nádoru a stupeň jeho diferenciaci.

Parafinové bločky byly imunohistochemicky vyšetřeny za použití těchto primárních protilátek: Pgp (klon C494, Lab-Vision, Fremont, USA, ředění 1 : 50), LRP (klon 9D6, Lab-Vision, ředění 1 : 20), MRP (klon 33A6, Novocastra, Newcastle upon

Tyne, United Kingdom, ředění 1 : 100), MRP3 (klon DTX 1, Novocastra, ředění 1 : 100) a MRP5 (klon 69, Novocastra, ředění 1 : 50). Antigeny Pgp, LRP, MRP a MRP5 byly demaskovány inkubací v citrátovém pufru (pH 6) při teplotě 95 °C po dobu 30 min (Pgp a LRP), resp. 60 min (MRP a MRP5). Protein MRP3 byl demaskován v pufru S 3308 (DakoCytomation, Glostrup, Dánsko), pH 6, při teplotě 95 °C po dobu 60 min. K imunohistochemickému vyšetření byla použita nepřímá imunohistochemická metoda s použitím avidin-biotinového vizualizačního systému EnVision+ (DakoCytomation).

Ve světelném mikroskopu pak byla kvantitativně hodnocena pozitivita reakce, tj. procento pozitivních (hnědě zbarvených) nádorových buněk: Pgp – membránová, popř. i cytoplazmatická pozitivita, LRP – cytoplazmatická pozitivita, MRP – membránová, případně i cytoplazmatická pozitivita, MRP3 – membránová, případně i cytoplazmatická pozitivita, MRP5 – membránová a cytoplazmatická pozitivita.

Stanovení chemorezistence / chemosenzitivity in vitro MTT testem

Vzorky ovariálních karcinomů odebrané peroperačně na Porodnické a gynekologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové byly zpracovány v Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty Hradec Králové. Suspenze nádorových buněk byla získána z dodaných vzorků použitím enzymatického trávení a gradientovou centrifugací na hustotním gradientu Ficoll-Metatrizoát. Na začátku studie byl ověřován způsob enzymatického rozvolňování a optimální složení kultivačního média. Buňky byly dvakrát promyty v RPMI 1 640 [(2 mM glutamin, bikarbonát sodný, penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 mg/ml)]. Po druhém promytí byla buněčná paleta suspendována v kultivačním médiu [RPMI 1 640 s 2mM glutaminem bikarbonátem sodným, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 mg/ml), 15% fetálního sérum, 5 mg/ml inzulínu a 5 mg/ml transferinu] v konečné koncentraci 1–2 miliony buněk na mililitr. Na začátku studie byla také ověřována heterogenita buněčné populace. Buňky byly na-

Tab. 1. Hodnoty EC 50 pro jednotlivá cytostatika.

Hodnocení (EC 50 v µg/ml)	Rezistence	Hraniční vnímavost	Vnímovost
cisplatina	100–18,75	18,75–6,25	EC50 < 6,25
taxol	50–9,38	9,38–3,13	EC50 < 3,13
karboplatina	100–18,75	18,75–6,25	EC50 < 6,25
topotekan	50–9,38	9,38–3,13	EC50 < 3,13
gemcitabin	300–56,25	56,25–18,75	EC50 < 18,75
etoposid	50–9,38	9,38–3,13	EC50 < 3,13

sazeny 6 hod v kultivační lahvi. Po 6 hod bylo médium odsáto, neadherované buňky byly shromážděny centrifugací při 500 ot./min a využity pro paralelní stanovení. Při hodnocení senzitivity bylo použito třídenního MTT (WST-1) testu. Buněčná suspenze byla pipetována do 96jamkových destiček v koncentraci 6 000–10 000 buněk na jamku a ponechána přes noc v inkubátoru. Druhý den bylo k buňkám přidáno médium s naředěným cytostatikem. Rezistence/senzitivita byla testována u cisplatiny (Ebewe Pharma, Rakousko), paklitaxelu (Pliva-Lachema, Česká republika), karboplatiny (Ebewe Pharma, Rakousko), topotekanu (GlaxoSmithKline, Velká Británie), gemcitabinu (Eli Lilly, Česká republika) a etoposidu (Teva Pharm, Česká republika). Aby bylo možné stanovit inhibiční koncentraci IC50, byly nádorové buňky vystaveny působení každého cytostatika v šesti různých koncentracích po dobu tří dnů při 37 °C, 5 % CO₂ a pokusy byly nejméně dvakrát opakovány. Kontrolní nádorové buňky byly kultivovány bez použití cytostatik. Na závěr kultivace

bylo ke každé jamce přidáno 100 mikrolitrů WST-1 rozpuštěného v kultivačním médiu a bylo inkubováno další dvě hodiny. V případě živých buněk je tetrazoliová sůl redukována mitochondriálními dehydrogenázami na formazan. Tato kolorimetrická reakce byla sledována fotometrickým měřením při 450 nm s referenční vlnovou délkou 690 nm. Přežívání nádorových buněk (Tumor Cell Survival – TCS) jsme vypočítali pomocí následujícího vzorce:

$$TCS = \frac{\text{absorbance v jamkách s cytostatikou}}{\text{absorbance v kontrolních jamkách}} \times 100$$

TCS50 (EC50) hodnota je koncentrace daného cytostatika, která je letální pro 50 % nádorových buněk a byla vypočítána ze získaných křivek dávkové závislosti (tab. 1).

Statistické zpracování

Pro základní charakteristiku souboru jsme použili deskriptivní metody statistiky. Pro vztahy kvalitativních parametrů se testovala hypotéza nezávislosti v kontingenční tabulce vůči alternativě zá-

Tab. 2. Hodnoty proteinů rezistence LRP, Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 v závislosti na stadiu onemocnění (I + II) a (III + IV).

	p	I + II		III + IV	
		průměr	min–max	průměr	min–max
LRP	0,6	75,7 %	30–100	65,6 %	0–100
Pgp	0,18	56,4 %	10–100	69,6 %	0–100
MRP1	0,37	65,0 %	0–100	78,3 %	0–100
MRP3	1,0	4,2 %	0–30	7,5 %	0–100
MRP5	0,99	0,7 %	0–10	5,3 %	0–100

LRP – Lung Resistance Protein, Pgp – P-glykoprotein, MRP – Multidrug Resistance-Associated Protein 1, MRP3 – Multidrug Related Protein 3, MRP 5 – Multidrug Related Protein 5, p – hladina významnosti.

Tab. 3. Hodnoty proteinů rezistence LRP, Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 v závislosti na histologickém typu ovariálního karcinomu.

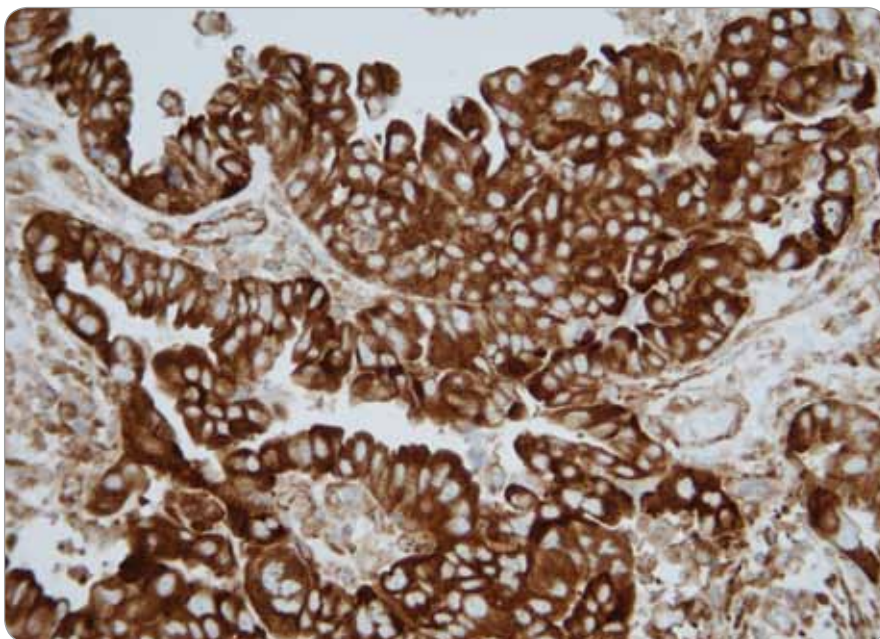
Proteiny rezistence	p	Serózní OCa n = 47		Mucinózní OCa n = 4		Endometroidní OCa n = 10	
		průměr	min-max	průměr	min-max	průměr	min-max
LRP	0,74	67,7 %	0–100	75,0 %	0–100	66,0 %	0–100
Pgp	0,15	71,7 %	0–100	90,0 %	60–100	50,0 %	0–100
MRP1	0,28	80,9 %	0–100	87,5 %	50–100	64,0 %	0–100
MRP3	0,001	1,49 %	0–40	32,5 %	0–100	13,0 %	0–100
MRP5	0,65	4,7 %	0–100	2,5 %	0–10	6,0 %	0–60

LRP – Lung Resistance Protein, Pgp – P-glykoprotein, MRP1 – Multidrug Related Protein 1, MRP3 – Multidrug Related Protein 3, MRP 5 – Multidrug Related Protein 5, p – hladina významnosti.

Tab. 4. Hodnoty proteinů rezistence LRP, Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 v závislosti na výskytu recidivy onemocnění.

Proteiny rezistence	p	Recidiva			
		ano (n = 27)		ne (n = 17)	
		průměr	min-max	průměr	min-max
LRP	0,58	64,4 %	0–100	75,2 %	20–100
Pgp	0,25	70,4 %	0–100	57,6 %	0–100
MRP1	0,004	86,3 %	0–100	54,7 %	0–100
MRP3	0,75	10,0 %	0–100	9,4 %	0–100
MRP5	1,0	4,4 %	0–100	6,3 %	0–100

LRP – Lung Resistance Protein, Pgp – P-glykoprotein, MRP1 – Multidrug Related Protein 1, MRP3 – Multidrug Related Protein 3, MRP 5 – Multidrug Related Protein 5, p – hladina významnosti.



Obr. 1. Obráz difúzní cytoplazmatické pozitivitu LRP.

vislosti. Byl použit Fischerův přesný test nezávislosti.

Výsledky

Při sledování vztahu proteinů rezistence se stadiem onemocnění jsme zaznamenali u všech proteinů rezistence mimo LRP nárůst průměrných hodnot směrem od časných stadií k pokročilým. Pacientky s pokročilým ovariálním karcinodem (III + IV) měly vyšší hodnoty Pgp, MRP, MRP3, MRP5 než pacientky s časným onemocněním (I + II), viz tab. 2. V případě hodnocení vztahu proteinů rezistence vůči histologickému typu ovariálního karcinomu nejvyšší hodnoty všech proteinů rezistence mimo MRP5 vykazoval mucinózní ovariální karcinom, i když zde je nutné zohlednit nízký počet pacientek. Nejnižší hodnoty LRP, Pgp, MRP jsme zaznamenali u endometroidního karcinomu ovaria (tab. 3). Při hodnocení klinické odpovědi, tedy výskytu recidivy a délky PFS (Progression Free Survival), jsme počítali pouze s pacientkami s dostatečným follow-up (min. 12 měsíců od ukončení primární léčby). Získané výsledky opět směřují k potvrzení vztahu chemorezistence *in vitro* s klinickým průběhem onemocnění. Zaznamenali jsme vyšší hodnoty všech proteinů rezistence (mimo LRP) u pacientek s prokázanou recidivou v porovnání s pacientkami bez recidivy ovariálního karcinomu (tab. 4).

Dále jsme hodnotili vztah chemorezistence/chemosenzitivity *in vitro* stanovené MTT testem k proteinům rezistence LRP, Pgp, MRP, MRP3, MRP5 stanoveným imunohistochemicky. Zjistili jsme jednoznačný nárůst průměrných hodnot Pgp a MRP směrem od chemosenzitivity k chemorezistenci *in vitro* stanovené MTT testem. Chemorezistence/chemosenzitivita stanovená *in vitro* MTT testem dle našich výsledků tedy koreluje s hodnotami proteinů rezistence Pgp a MRP. Pacientky chemorezistentní *in vitro* dle MTT testu měly vyšší hodnoty proteinů rezistence Pgp a MRP, přičemž významnější vztah byl patrný u Pgp. Vyšší hodnoty tohoto proteinu rezistence jsme zjistili u pacientek dle MTT testu rezistentních *in vitro*, a to v případě všech testovaných cytostatik (tab. 5). Pro další proteiny rezistence LRP a MRP jsme pro-

Tab. 5. Vztah proteinů rezistence LRP, Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 s primární chemorezistencí/chemosenzitivitou *in vitro* stanovenou MTT testem na jednotlivá cytostatika.

% n	Cisplatina			Karboplatina			Paklitaxel			Topotekan			Gemcitabin		
	rez.	hran.	senz.	rez.	hran.	senz.	rez.	hran.	senz.	rez.	hran.	senz.	rez.	hran.	senz.
5	13	36	28	13	12	19	25	10	7	4	38	43	–	5	
p	0,32			0,33			0,07			0,21			0,60		
LRP	86,0	73,8	63,6	70,4	74,6	55,8	57,3	78,0	64,0	55,7	82,5	72,1	69,1	–	64,0
p	0,02			0,47			0,63			0,77			0,17		
PgP	100	80,7	60,5	75,4	70,8	53,3	69,5	72,0	61,0	74,3	75,0	69,5	71,8	–	42,0
p	0,40			0,44			0,84			0,79			0,59		
MRP1	86,0	74,6	68,6	70,7	80,0	66,6	65,8	72,4	81	62,8	75,0	70,7	73,7	–	54,0
p	0,46			0,21			0,27			0,42			0,21		
MRP3	0	16,9	12,2	5,35	23,8	16,6	1,6	20,4	12,0	2,9	0	14,2	10,4	–	20,0
p	0,72			0,72			0,19			0,19			0,58		
MRP5	0	4,6	5,3	2,9	5,4	8,3	0	0	2,0	17,1	0	3,42	5,8	–	0

LRP – Lung Resistance Protein, Pgp – P-glykoprotein, MRP1 – Multidrug Related Protein 1, MRP3 – Multidrug Related Protein 3, MRP 5 – Multidrug Related Protein 5, p – hladina významnosti, rez. – rezistence, hran. – hraniční senzitivita, senz. – senzitivita.

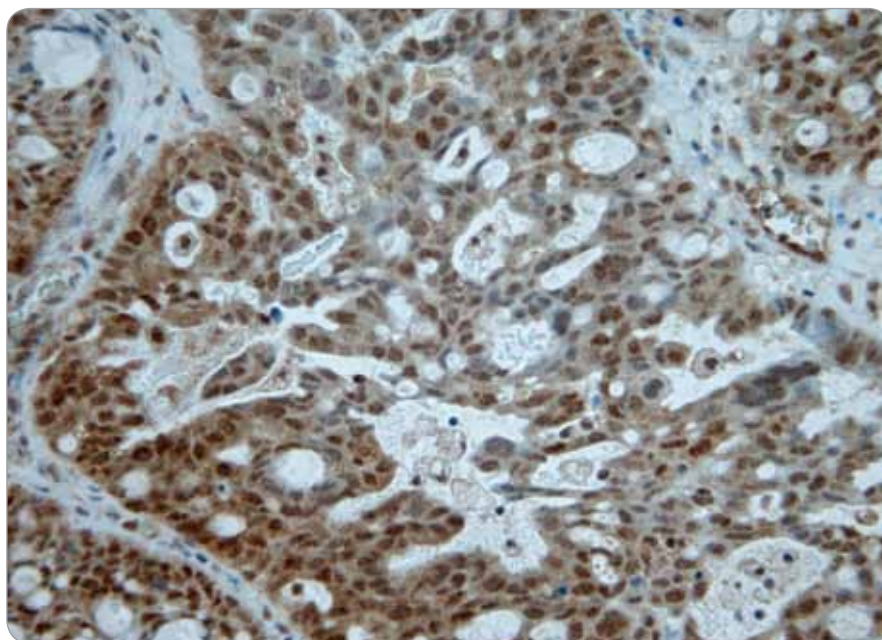
kázali vztah s chemorezistencí/chemosenzitivitou stanovenou *in vitro* MTT testem u karboplatiny a cisplatiny. MRP3 a MRP5 s chemorezistencí *in vitro* stanovenou MTT testem dle našich výsledků nekoreluje. Ani ve vztahu k ostatním sledovaným parametrům jsme význam MRP3 a MRP5 u pacientek s karcinomem ovaria nenalezli. I zde jsme prokázali největší význam Pgp a MRP u pacientek s karcinomem ovaria.

Diskuze

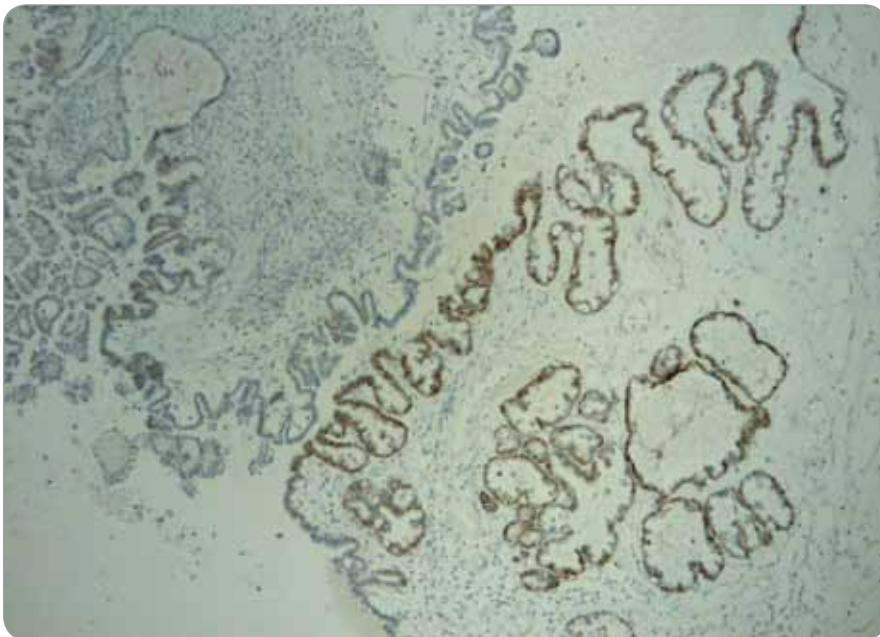
Z literárních údajů se zatím jako nejperspektivnější z proteinů rezistence u ovariálního karcinomu jeví P-glykoprotein. Jsou publikovány studie ukazující jasnou souvislost mezi expresí Pgp a klinicko-patologickými údaji pacientek s karcinomem prsu [9,10]. Naproti tomu existují studie, jež vliv exprese Pgp na rozvoj a průběh terapie karcinomu prsu neprokázaly [11]. Pacientky s karcinomem prsu s vysokou expresí MDR1 léčené antracykliny nebo taxany přežívaly kratší dobu než pacientky léčené jinými režimy [5]. P-glykoprotein významně ovlivňuje rezistenci určitých maligních nádorů. Význam proteinů rezistence u ovariálního karcinomu je zatím kontroverzní a výsledky nejsou jednoznačné. Izquierdo et al sledovali expresi LRP, MRP a Pgp u ovariálních karcinomů a pouze LRP prokázali jako independentní prognostický faktor odpo-

vědi na chemoterapii a přežití [12]. Goff et al naopak nezaznamenali rozdíl hodnot LRP a MRP u pacientek chemosenzitivních a chemorezistentních [13]. Další studie u ovariálního karcinomu taktéž neprokázala význam exprese LRP ve vztahu k léčebné odpovědi u pacientek s karcinomem ovaria [14]. Materna et al prokázali prognostický význam Pgp a MRP2 u pacientek s karcinomem ovaria [15]. Pro posouzení významu míry exprese Pgp pro predikci úspěšnosti chemoterapie je rozhodujícím faktorem

výběr cytostatika. V případě použití cytostatik, která jsou substráty Pgp, např. taxany, existuje předpoklad, že terapie může vést ke vzniku mnohočetné lékové rezistence. Díky případně zvýšené expresi Pgp mohou být taková léčiva za účasti transportní funkce Pgp předčasně vylučována z nádorových buněk, což může způsobit pokles účinku léčby [5]. To potvrzuje i naše práce: zjistili jsme vyšší hodnoty Pgp a MRP u pacientek s chemorezistencí *in vitro* stanovenou MTT testem. U těchto pacientek jsme zá-



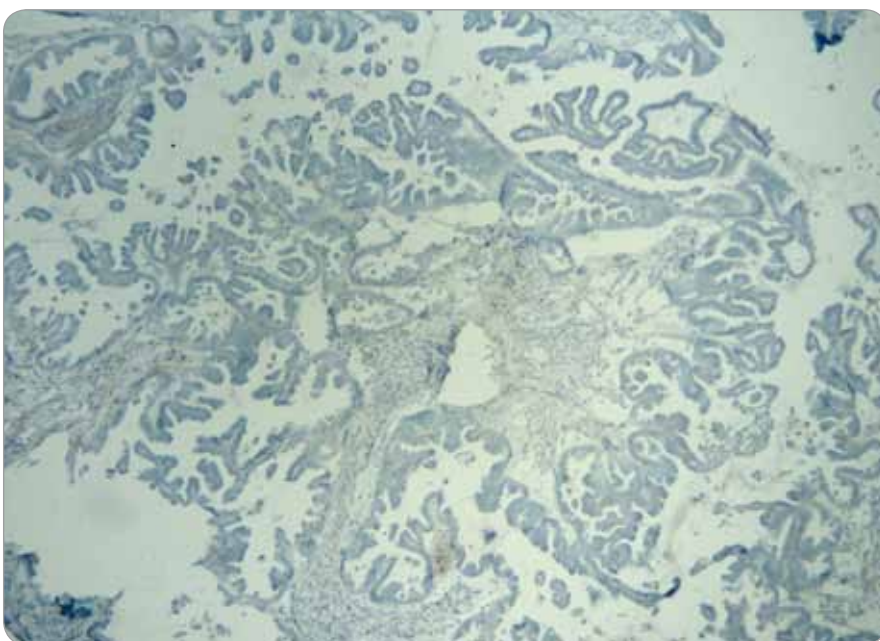
Obr. 2. Obráz difúzní pozitivita Pgp.



Obr. 3. Obrázek fokální cytoplasmatické pozitivitu MRP3.

roveň zaznamenali častější výskyt recidivy ve sledovaném období. Vztah chemorezistence *in vitro* stanovené MTT testem s horší odpovědí na primární léčbu jsme prokázali již dříve [16]. Vyšší hodnoty P-glykoproteinu jsme prokázali u pacientek chemorezistentních *in vitro* v porovnání s pacientkami chemosenzitivními *in vitro* dle MTT testu, a to pro všechna testovaná cytostatika včetně

platinových preparátů. V současnosti se uvádí souvislost hodnot Pgp především s chemorezistencí na taxany [17,18]. To může být dáno skutečností, že většina prací věnovaných proteinům rezistence u ovariálního karcinomu je prováděna na buněčných liniích [18–20]. V naší práci jsme hodnotili proteiny rezistence z jednotlivých vzorků ovariálních karcinomů a stanovení chemorezistence/



Obr. 4. Obrázek negativitu MRP5.

/chemosenzitivity MTT testem jsme zahajovali do dvou hodin od vlastního odběru vzorků.

Kavallaris et al prokázali kratší bezpříznakové období i celkovou dobu přežití u pacientek s vyššími hodnotami Pgp [21]. Stejně výsledky prokázali i Baekelandt et al [22]. Raspolini et al zaznamenali korelaci Pgp s odpovědí na chemoterapii [23]. Z velké variability zveřejněných výsledků vyplývá potřeba individuálního stanovení míry exprese Pgp a jejího vlivu na úspěšnost terapie karcinomu ovaria u konkrétních pacientek a nutnost dalších studií zejména s využitím tkáně jednotlivých ovariálních karcinomů. Teprve potom se můžeme přiblížit ke skutečnému poznání vlivu proteinů rezistence na klinický průběh onemocnění a jeho využití v klinické praxi.

Závěr

Zjistili jsme vztah proteinů rezistence s histologickým typem a stadiem ovariálního karcinomu. Nalezli jsme změny hodnot P-glykoproteinu a MRP v závislosti na klinickém průběhu onemocnění. Zaznamenali jsme vztah P-glykoproteinu a MRP s chemorezistencí/chemosenzitivitou *in vitro* stanovenou MTT testem. Prokázali jsme vyšší hodnoty P-glykoproteinu u pacientek rezistentních *in vitro* dle MTT testu, a to pro všechna testovaná cytostatika. Vyšší hodnoty MRP a LRP jsme zjistili pro platinové preparáty u pacientek rezistentních *in vitro* dle MTT testu. Dle našich výsledků by stanovení Pgp a MRP mohlo přispět k predikci léčebné odpovědi na primární chemoterapii u pacientek s karcinodem ovaria.

Literatura

1. Cibula D, Petruželka L et al. Onkogynekologie. Praha: Grada Publishing 2009.
2. Fruehauf PJ, Alberts DS. In vitro drug resistance versus chemosensitivity: two sides of different coins. *J Clin Oncol* 2005; 23(15): 3641–3643.
3. Ozols RF, Schwartz PE, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma and peritoneal carcinoma. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Cancer: principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 2001: 597–632.
4. Nosková V, Hajdúch M, Mihál V et al. Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. typická MDR. *Klin Onkol* 2000; 13(2): 4–9.
5. Václavíková R, Hubáčková M, Kubala E et al. Expres genu mnohočetné lékové rezistence 1 (MDR1) a její vý-

- znam v rozvoji a terapii karcinomu prsu. *Klin Onkol* 2007; 20(3): 253–259.
6. Zhang JT. The multi-structural feature of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein: implications for its mechanism of action (hypothesis). *Mol Membr Biol* 2001; 18(2): 145–152.
 7. Kuwano M, Uchiyama T, Hayakawa H et al. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci* 2003; 94(1): 9–14.
 8. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 36(2–3): 179–194.
 9. Larkin A, O'Driscoll L, Kennedy S et al. Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study. *Int J Cancer* 2004; 112(2): 286–294.
 10. Schneider J, Gonzales-Roces S, Pollán M et al. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2001; 3(3): 183–191.
 11. Seymour L, Bezwoda WR, Dansey RD. P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36(1): 61–69.
 12. Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(16): 1230–1237.
 13. Goff BA, Paley PJ, Greer BE et al. Evaluation of chemoresistance markers in woman with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 81(1): 18–24.
 14. Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG et al. Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10): 2798–2805.
 15. Materna V, Pleger J, Hoffman U et al. RNA expression of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response. *Gynecol Oncol* 2004; 94(1): 152–160.
 16. Sedláková I, Tošner J, Řezáč A et al. Rezistence/sensitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. *Česk Gynkol* 2011; 76(3): 184–189.
 17. Xing H, Wang S, Weng D et al. Knock-down of P-glycoprotein reverses taxol resistance in ovarian cancer multicellular spheroids. *Oncol Rep* 200; 17(1): 117–122.
 18. Kamazawa S, Kigawa J, Kanamori Y et al. Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of Paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 86(2): 171–176.
 19. Scheffer GL, Kool M, Heijn M et al. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2000; 60(18): 5269–5277.
 20. Odening KE, Rutz R, Laufs S et al. Enhanced complement resistance in drug-selected P-glycoprotein expressing multi-drug-resistant ovarian carcinoma cells. *Clin Exp Immunol* 2008; 155(2): 239–248.
 21. Kavallaris M, Leary JA, Barrett JA et al. MDR1 and multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression in epithelial ovarian tumors. *Cancer Lett* 1996; 102(1–2): 7–16.
 22. Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM et al. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000; 20(2B): 1061–1067.
 23. Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A et al. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(5): 815–823.