

**LÄÄKEAINERESISTENSSIMEKANISMIT
AIVOSYÖVISSÄ**

**ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentyminen ja
lääkeainealtistuksen vaikutus ilmentymiseen
syöpäsolulinjoissa *in vitro***

Tiina Puustinen
Pro gradu -tutkielma
Proviisorin koulutusohjelma
Itä-Suomen yliopiston farmasian laitos
Tammikuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta, Farmasian laitos
Proviisorin koulutusohjelma, Biofarmasia
PUUSTINEN TIINA, S.: Lääkeaineresistenssimekanismit aivosyövissä; ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentyminen ja lääkeainealtistuksen vaikutus ilmentymiseen syöpäsolulinjoissa *in vitro*
Opinnäytetutkielma, 81 s.
Ohjaajat: FaT Marika Ruponen ja FM Karoliina Soininen
Tammikuu 2012

Avainsanat: Monilääkeresistenssi, aivosyöpä, kuljetinproteiinit, doksorubisiini

Monilääkeresistenssin on havaittu heikentävän syöpähoitojen tehoa. Monilääkeresistenssi voi olla joko luonnollista tai hankittua ja sen taustalla voi olla useita mekanismeja. Aivosyövissä veriaivoeste rajoittaa lääkeaineiden pääsyä aivoihin. Lisäksi syöpäsolun resistenssimekanismit aiheuttavat resistenssiä. ABC-perheen kuljetinproteiinit heikentävät lääkeaineiden vaikutusta syöpäsoluissa pumpaamalla solun sisään kulkeutuneen lääkeaineen ulos soluista. Näiden kuljetinproteiinien on havaittu esiintyvän sekä veriaivoesteessä, että aivosyöpäsoluissa. Lisäksi DNA:n korjausmekanismien, kuten O6-metyyliguaaniini-DNA-metyylitransferaasi -entsyymien sekä emäspoisto ja nukleotidikorjausjärjestelmien, on havaittu aiheuttavan lääkeaineresistenssiä. Hoidon tehon parantamiseksi lääkehoidon ohelle on kehitteillä inhibiittoreita kuljetinproteiineille ja DNA:n korjausmekanismeille.

Erikoistyössä selvitettiin ABC-perheen kuljetinproteiinien (P-gp, MRP1-6 ja BCRP) ilmentymistä RNA-tasolla ihmisen syöpäsolulinjoissa ja maksan primäärisoluissa kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla. Solulinjat olivat lähtöisin munasarjasyövästä (HeLa), keuhkosityövästä (A549), munuaissyövästä (Caki-2) ja kolme glioomista (U87MG, U118MG ja T98G). Lisäksi neljässä syöpäsolulinjassa (U87MG, U118MG, T98G ja BT4C) selvitettiin muuttaako doksorubisiinialtistus kuljetinproteiinien (P-gp, MRP1, MRP2 ja BCRP) ilmentymistä.

Maksan ilmentymistasoihin suhteutettuna ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentymistasot vaihtelivat paljon tutkituissa solulinjoissa. Ainoastaan P-gp ilmentyi samalla tasolla kaikissa solulinjoissa. Esimerkiksi BCRP:n havaittiin ilmentyvän A549:ssa, HeLa:ssa, U87MG:ssa ja U118MG:ssa noin 20-kertaisesti maksaan verrattuna. Doksorubisiinialtistuksen seurauksena ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentyminen joko kasvoi tai heikentyi solulinjakohtaisesti. Esimerkiksi P-gp:n ilmentyminen kasvoi erittäin merkittävästi kontrolliin verrattuna T98G:ssa (noin 4-kertaisesti).

ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentyminen muuttuu ympäristötekijöiden vaikutuksesta. Mikäli ilmentyminen heikkenee, muut resistenssimekanismit saattavat kompensoida muutosta. Kuljetinproteiinien ilmentyminen tulisi jatkossa selvittää myös proteiinitasolla. Lisäksi voitaisiin tutkia lääkeainealtistuksen vaikutusta solulinjojen resistenssiin.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of health sciences, School of Pharmacy
Master of Science in Pharmacy, Biopharmacy
PUUSTINEN TIINA, S.: Drug resistance mechanisms in brain cancers; Expression of ABC-
efflux transporters in cancer cell lines and impact of drug exposure *in vitro*
Master's thesis, 81 pages
Supervisors: Pharm.D. Marika Ruponen and M.Sc. Karoliina Soininen
January 2012

Keywords: Multidrug resistance, brain cancer, efflux transporters, doxorubicin

The multidrug resistance is a major problem in the treatment of brain cancers. For example blood-brain barrier restricts the entering of many anti-cancer drugs into the brain. In addition, different molecular mechanisms in cancer cells are associated with the multidrug resistance. For example efflux transporters can transport drugs out of the cells and thus decrease the therapeutic effect of the drug. It has been observed that efflux transporters are expressed widely both in the blood-brain barrier and in the cancer cells. In addition, DNA repair mechanisms are known to cause the resistance. Inhibitors against efflux transporters and DNA repair mechanisms have been developed to improve drug efficiency.

The purpose of this study was to characterize the expression of ABC-transporters (P-gp, MRP1-6 and BCRP) at RNA-level in six human's cancer cell lines (U87MG, U118MG, T98G, A549, HeLa and Caki-2) and in primary liver cells by using quantitative polymerase chain reaction. In addition, the impact of doxorubicin exposure to the expression of four transporters (P-gp, MRP1, MRP2 and BCRP) was investigated in four cell lines (U87MG, U118MG, T98G and BT4C).

According to the results ABC-transporters were expressed in cell lines at variable levels. P-gp was expressed in all studied cell lines approximately at the same level. On the other hand, BCRP was expressed at 20-fold higher level in A549, HeLa, U87MG and U118MG than in the liver. Doxorubicin exposure was observed to influence on the expression of the transporters in the cell lines. For example P-gp expression was increased in T98G cells 4-fold compared with control.

Environmental changes may change the expression level of the efflux transporters. In addition, the other resistance mechanisms may compensate the change in the expression of the efflux transporters. However, the expression of the transporters should be investigated at the protein level. In addition, the multidrug resistance to doxorubicin should be investigated in the future.

ESIPUHE

Tein opinnäytetutkielmani Itä-Suomen yliopistossa farmasianlaitoksella Kuopiossa. Sekä kirjallisessa, että kokellisessa osassa ohjaajina toimivat FM Karoliina Soininen ja FaT Marika Ruponen. Opinnäytetyön ovat tarkastaneet FaT Marika Ruponen ja LT Eliisa Mannermaa.

Kiitokset ohjaajilleni mielenkiintoisesta erikoistyyöaiheesta sekä hyvästä ohjauksesta ja kannustuksesta. Kiitokset myös perheelleni ja ystäväilleni tuesta ja kannustuksesta.

Kuopiossa 17.1.2012

Tiina Puustinen

KÄYTETYT LYHENTEET

ABC	Adenosiinitrifosfaattia sitova kasetti
AQP4	Aquaporiini-4
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
BCRP	Rintasyövän resistenssiproteiini
BER	Emäksen poistokorjausjärjestelmä
cDNA	Komplementaarinen DNA
CT	Cycle threshold
DEPC	Dietyylipyrokarbonaatti
DMEM	Dulbeccon muokattu kotkan mediumi
dNTP	Deoksinukleotiditriposfaatti
DPBS	Dulbeccon fosfaattipuskuroitu suolaliuos
FBS	Naudan sikiön seerumi
FTC	Fumitremorgin C
IC50	Puolet maksimaalisesta inhibitiokonsentraatiosta
MDR	Monilääkeresistenssi
MGMT	O ⁶ -metyyliiguaniiin DNA-metyylitransferaasi
MMR	Yhteensopimattomuuksien korjausjärjestelmä
MRP	Monilääkeresistenssiproteiini
NBD	Nukleotidin sitova alue
NER	Nukleotidin poistokorjausjärjestelmä
O ⁶ -BG	O ⁶ -bentsyyliguaniiini
O ⁶ -BTG	O ⁶ -bromoetyyliguaniiini
PARP	Poly(ADPriboosi)polymeraasi
PCR	Polymeraasiketjureaktio
PEST	Penisilliinistreptomysiiniliuos

P-gp	P-glykoproteiini
q-PCR	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
siRNA	Pieni häiritsevä RNA
TE	Tris-EDTA
TMD	Solukalvon läpäisevä alue
WHO	Maailman terveysjärjestö

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

ESIPUHE

KÄYTETYT LYHENTEET

SISÄLTÖ

I KIRJALLISUUSKATSAUS	9
1 JOHDANTO	9
2 AIVOSYÖVÄT	11
3 VERIAIVOESTE.....	13
3.1 Rakenne	13
3.2 Lääkeaineiden kulkeutuminen veriaivoesteen läpi.....	14
3.3 Veriaivoesteen muutokset glioomissa	18
4 ABC-PERHEEN KULJETINPROTEIINIT	19
4.1 Rakenne	19
4.2 ABC-perheen kuljetinproteiinit aivosyövissä	21
4.3 ABC-perheen kuljetinproteiinit veriaivoesteessä	23
4.4 Inhibiittorit.....	25
5 DNA:N VAURIOITA KORJAAVAT MEKANISMIT AIVOSYÖVISSÄ.....	29
5.1 O ⁶ -metyyliguaaniini-DNA metyyli transferaasi.....	29
5.2 Yhteensopimattomuuksien korjausjärjestelmä	32
5.3 Emäspoisto- ja nukleotidikorjausjärjestelmä.....	34
6 YHTEENVETO	36
II KOKEELLINEN OSA	40
7 JOHDANTO	40
8 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	42
8.1 Solujen ylläpito.....	42
8.2 RNA:n eristystys ja kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio.....	43
8.3 Doksorubisiinialtistus	45

9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU.....	47
9.1 ABC-perheen kuljetinproteiinien RNA:n ilmentyminen syöpäsolulinjoissa	47
9.2 Doksorubisiinialtistuksen vaikutus ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentymiseen ..	52
10 POHDINTA	56
10.1 Solulinjojen karakterisointi	56
10.2 Lääkeainealtistuksen vaikutus kuljetinproteiinien ilmentymiseen.....	59
11 YHTEENVETO	63
12 KIRJALLISUUS	64

I KIRJALLISUUSKATSAUS

1 JOHDANTO

Aivosyöpiin kuuluu eri aivoalueilla sijaitsevia syöpiä, jotka kehittyvät eri aivokudostyyppien alkaessa kasvaa hallitsemattomasti mutaatioiden seurauksena. Yleisimpiä aivosyöpiä ovat gliasoluista kehittyneet glioomat (Theeler ja Groves 2011). Vuosina 2004–2007 yli 213 500 aivosyöpää diagnosoitiin Yhdysvalloissa ja näistä 36 % oli pahanlaatuisia (Kohler ym. 2011). Suomessa glioomia todetaan vuosittain noin 400 (Mäenpää 2010). Glioomien ensisijainen hoitomuoto on kasvaimen poisto leikkauksella, minkä jälkeen potilaalle annetaan sädehoitoa ja kemoterapiaa, jossa yleisimmin käytetään temotsolomidia (Mäenpää 2010, Declèves ym. 2006). Hoidosta huolimatta keskimääräinen glioomapotilaiden elinaika on ainoastaan 2–5 vuotta ja pahanlaatuisissa glioblastoomissa vain 14–15 kuukautta (Theeler ja Groves 2011).

Heikkoon hoidon tehoon saattaa olla monia syitä. Esimerkiksi monet lääkeaineet kulkeutuvat heikosti tai eivät ollenkaan veriaivoesteen läpi verenkierrosta aivoihin ja edelleen syöpäsoluihin (Begley 2004, Abbot ym. 2006). Lisäksi syöpähoidon tehottomuuden syynä voi olla syöpäsolujen resistenssi. Monilääkeresistenssi (MDR) tarkoittaa solun vastustuskykyä useille lääkeaineille tai sädehoidolle (Lu ja Shervington 2008, Liu 2009). MDR:n muodostumiseen vaikuttavat mekanismit ovat monimutkaisia, minkä vuoksi niitä ei vielä tunneta hyvin (Bähr ym. 2003, Lu ja Shervington 2008). On kuitenkin huomattu, että resistenssi voi esiintyä luontaisesti syöpäsoluissa tai kehittyä hoidon aikana, mitä kutsutaan opituksi resistenssiksi (Longley ja Johnston 2005, Liu 2009). Lisäksi hoidon aikana voi kehittyä ristiresistenssiä hoidossa käytetyn lääkeaineen lisäksi muille kemoterapiassa käytettäville lääkeaineille, vaikka niillä olisi erilainen vaikutusmekanismi (Longley ja Johnston 2005).

MDR voi johtua useista eri tekijöistä. Syöpäkudoksen kuljetinproteiinien on havaittu olevan merkittäviä MDR:n aiheuttajia (Kaspar 2009, Liu 2009). Niiden on huomattu kuljettavan syöpälääkkeitä ulos solusta. Kuljetinproteiineja on ihmisessä runsaasti, mutta tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään vain adenosiniinifosfaattia (ATP) sitova kasetti (ABC) -perheen tunnetuimpiin kuljetinproteiineihin. Näistä merkittävimpiä ovat P-glykoproteiini (P-gp), rintasyövänresistenssiproteiini (BCRP) ja monilääkeresistenssiproteiini 1 (MRP1).

ABC-perheen kuljetinproteiinien on todettu ilmentyvän aivosyövissä (Bähr ym. 2003, Benyahia ym. 2004). Esimerkiksi MRP1:n, MRP3:n ja MRP5:n on havaittu ilmentyvän useissa glioomasolulinjoissa (Bähr ym. 2003, Calatuzzolo ym. 2005). Lisäksi useiden ABC-perheen kuljetinproteiinien on todettu ilmentyvän veriaivoesteessä, missä ne rajoittavat lääkeaineiden pääsyä aivoihin (Paolinelli ym. 2001, Cooray ym. 2002, Uchida ym. 2011). Uloskuljettavien kuljetinproteiinien lisäksi resistenssiä voi aiheuttaa vähentynyt lääkeaineiden kuljetus soluihin sisäänkuljettavien kuljetinproteiinien välityksellä (Ambudkar ym. 2003, Longsley ja Johnston 2005).

Kuljetinproteiinien lisäksi resistenssiä voivat aiheuttaa lisääntyneet DNA:n korjausmekanismit. Esimerkiksi O⁶-metyyliiguanini-DNA metyyli transferaasi (MGMT) -entsyymi korjaa syöpälääkkeiden aikaansaamia DNA:n vaurioita (Kaina ym. 2010). Resistenssin taustalla voi olla myös muutokset DNA:ta korjaavissa yhteensopimattomuuksien korjausjärjestelmässä (MMR) tai emäksen poistokorjausjärjestelmässä (BER) (Marchesi ym. 2007, Villano ym. 2009). Muita resistenssiä aiheuttavia tekijöitä voivat olla esimerkiksi muutokset lääkeaineen vaikutuspaikoissa, solun apoptoosiin ajavien tekijöiden muuttunut toiminta tai lääkeaineen inaktivointi (Ambudkar ym. 2003, Longsley ja Johnston 2005). On myös esitetty, että aivosyövissä esiintyvät kantasolut voisivat lisätä resistenssiä (Ignatova ym. 2002). Kantasoluihin olisi teorian mukaan kertynyt resistenssimekanismia, jolloin hoito ei pystyisi tuhoamaan kantasoluja ja ne voisivat muodostaa uusia kasvaimia (Reya ym. 2001, Liu ym. 2006). Edellä mainittuja resistenssiä aiheuttavia tekijöitä ei kuitenkaan käsitellä tässä kirjallisuuskatsauksessa.

2 AIVOSYÖVÄT

Aivosyövät muodostavat vain noin 2 % kaikista syöivistä (Kleihues ym. 2001). Lapsilla ne ovat toiseksi yleisin syöpätyyppi leukemian jälkeen. Lisäksi aivosyövät ovat lasten syöivistä eniten kuolemia aiheuttavia. Aivosyövät luokitellaan Maailman terveysjärjestön (WHO) mukaan syöpäsolutyypeittäin (Read ym. 2006). Luokittelun ongelmana on kuitenkin se, että jotkut syövät eivät muistuta mitään tiettyä solutyyppeä. Lisäksi monet syövät ovat heterogeenisiä, eli niissä on erilaisia solutyyppejä sekaisin. WHO:n luokittelussa syövät lajitellaan myös pahanlaatuisuuden mukaan asteisiin I-IV, missä aste IV on pahanlaatuisin.

Aivojen eri solutyypeistä lähtöisin olevia aivosyöpiä on hyvin runsaasti (Read ym. 2006). Yleisimpiä ovat gliasoluista peräisin olevat glioomat, aivokalvosta lähtöisin olevat meningoomat ja lasten yleisin aivosyöpätyyppi, pikkuaivoista peräisin olevat medulloblastoomat (Read ym. 2006, Mawrin ja Perry 2010). Lisäksi aivoissa voi esiintyä muualta elimistöstä peräisin olevien syöpien etäpesäkkeitä. Niitä esiintyy noin 20–40 %:lla syöpäpotilaista (Kraker ja Blakeley 2008). Yleisimmät syövät, joista aivoetäpesäkkeitä muodostuu, ovat keuhko-, rinta- ja ruuansulatuskanavan syövät.

Glioomia on kolmea eri tyyppiä riippuen siitä, mistä gliasoluista syöpä on lähtöisin (taulukko 1) (Declèves ym. 2006). Oligodendrosyyteistä peräisin olevat glioomat reagoivat yleensä astroosyyteistä peräisin olevia kasvaimia paremmin hoitoon (Mäenpää 2010). Glioomat lajitellaan lisäksi muiden aivosyöpien tapaan neljään asteeseen pahanlaatuisuuden mukaan (taulukko 1) (Declèves ym. 2006, Read ym. 2006). Jaettaessa glioomat matalan ja korkean asteen glioomiin asteet I ja II luokitellaan mataliin ja III sekä IV korkeisiin. Asteen I glioomat ovat hyvänlaatuisia ja hoidetaan usein ainoastaan leikkauksella (Declèves ym. 2006). Myös asteen II glioomilla ennuste on usein hyvä, mutta ne voivat muuttua pahanlaatuisiksi. III asteen glioomilla ennuste on huonompi kuin I ja II asteen glioomilla. Ne ovat erilaistumattomia ja usein syntyneet II asteen gliooman muuttuessa. IV asteen ryhmään kuuluvat glioblastoomat. Ne ovat kaikkein aggressiivisimpia glioomia ja yleisimpiä aikuisten glioomista. Glioblastoomat ovat yleensä peräisin astroosyyteistä (Mäenpää 2010). Glioblastoomat voivat olla primäärisiä, jolloin ne muodostuvat suoraan astroosyyteistä tai sekundäärisiä, jolloin ne muodostuvat asteiden II ja III kautta.

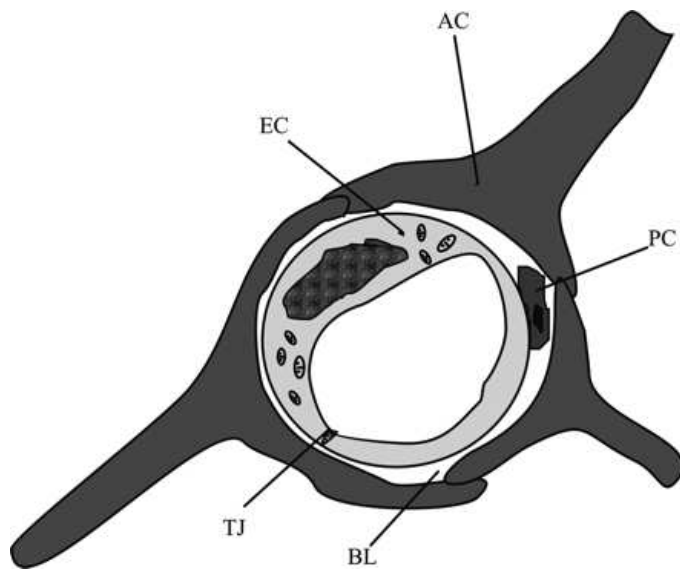
Taulukko 1. Gliomien luokittelu (Declèves ym. 2006)

Luokittelu	Erileistumisasteet
Astroosytooma	I: Piloosyyttiset astroosytoomat, ganglioglioomat
○ Lähtöisin astroosyyteistä	○ Hyvänlaatuisia
Oligodendrosytooma	II: Astroosytoomat tai oligodendrogliomat
○ Lähtöisin oligodendrosyyteistä	○ Hyvin erilaistuneita
Oligoastroosytooma	III: Anaplastiset astroosytoomat ja oligodendrogliomat
○ Sekoitus astroosyyttejä ja oligodendrosyyttejä	○ Erileistumattomia
	IV: Glioblastoomat
	○ Pahanlaatuisia

3 VERIAIVOESTE

3.1 Rakenne

Veriaivoeste rakentuu aivojen verisuonten endoteelisoluista sekä niitä ympäröivistä perisytyteistä ja astrozyyteistä (kuva 1). Veriaivoesteen tehtävä on pitää yllä aivoissa biologisesti vakaita olosuhteita ja estää haitallisten aineiden pääsyä aivoihin (Begley 2004). Veriaivoeste rajoittaa aivosairauksien, kuten aivosyöpien, hoitoa muodostamalla esteen lääkkeiden siirtymiselle verenkierrosta aivoihin (Begley 2004, Abbot ym. 2006). Lisäksi veriaivoesteen kuljetinproteiinit aiheuttavat MDR:ä aivosyöpien hoidossa.

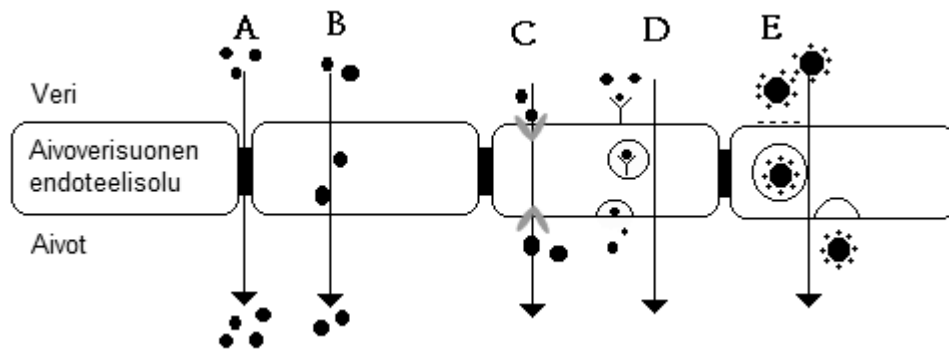


Kuva 1. Poikkileikkaus veriaivoesteen rakenteesta. Aivojen kapillaariverisuonia (valkoinen alue keskellä) ympäröivät endoteelisolut (EC) (Hawkins ja Davids 2005). Endoteelisolut ovat kiinni toisissaan tiiviiden liitosten (TJ) välityksellä. Endoteelisoluihin kudoksen puolelle on kiinnittynyt perisytyttejä (PC). Näiden ympärillä on kollageenistä ja muista proteiineista muodostunut tyvilevy (BL). Tyvilevyn ympärillä on astrozyyttejä (AC), jotka yhdistävät endoteelisolut neuroneihin (Abbot ym. 2006). Yhdessä neuronien kanssa endoteelisolut ja astrozytit muodostavat neurovaskulaarisen yksikön, joka osallistuu aivojen verenkierron ja veriaivoesteen läpäisevyyden säätelyyn (Hawkins ja Davids 2005, Abbot ym. 2006). Lähde: Hawkins ja Davids 2005.

Veriaivoesteen endoteeli poikkeaa rakenteeltaan ja toiminnaltaan elimistön muista endoteeleistä (Paolinelli ym. 2010). Veriaivoesteen endoteelisoluille on tyypillistä alhainen pinosytoosiaktiivisuus, mitokondrioiden suuri määrä ja solujen väliset tiiviit liitokset (Hawkins ja Davids 2005, Paolinelli ym. 2010). Tiiviit liitokset estävät vesiliukoisten molekyylien kulkeutumisen solujen välistä diffuusiolla (Lee ym. 2001, Begley 2004). Tiiviiden liitosten lisäksi aineiden pääsyä aivoihin rajoittavat metaboloivat entsyymit ja kuljetinproteiinit (Abbot ym. 2006, Paolinelli ym. 2010). Veriaivoesteessä on sekä solunsisäisiä että -ulkoisia metaboloivia entsyymejä kuten peptidaaseja ja P450-entsyymejä, jotka metaboloimalla lääkaineita estävät niiden pääsyä aivoihin (Abbot ym. 2006). Veriaivoesteessä esiintyy myös paljon sekä ulos-, että sisäänkuljettavia kuljetinproteiineja (Abbot ym. 2009). Nämä kuljettavat sisään ravintoaineita ja poistavat solusta haitallisia aineita ja metaboliatuotteita.

3.2 Lääkeaineiden kulkeutuminen veriaivoesteen läpi

Veriaivoeste heikentää aivoihin kohdistuvien lääkehoitojen onnistumista, sillä se rajoittaa monien lääkeaineiden pääsyä aivoihin. Vesiliukoisten molekyylien diffuusio solujen väleistä on erittäin vähäistä tiiviiden liitosten vuoksi. Rasvaliukoiset molekyylit voivat sen sijaan läpäistä veriaivoesteen passiivisella diffuusiolla solukalvojen läpi (kuva 2) (Abbot ym. 2006, Zhao ym. 2009). Solukalvoja läpäisevien molekyylien koon on oltava alle 500 daltonia ja logaritminen oktanolivesi-jakautumiskerroin $-0,5-6$ (Pardridge 2005, Abbot ym. 2009, Pasha ja Gupta 2010). Rasvaliukoiset lääkeainemolekyylit ovat kuitenkin usein kuljetinproteiinien substraatteja (Abbot ym. 2006). Tällöin uloskuljettavat kuljetinproteiinit heikentävät niiden pääsyä veriaivoesteen läpi. Toisaalta sisäänkuljettavat kuljetinproteiinit voivat parantaa läpäisyä. Suuret molekyylit pääsevät puolestaan kulkeutumaan veriaivoesteen läpi transsytoosilla, joka voi olla joko absorptiivista tai reseptorivälitteistä (Pardridge 2005, Abbot ym. 2009). Ongelmana kuitenkin on, että transsytoosi on veriaivoesteessä vähäistä verrattuna elimistön muihin endoteeleihin (Abbot ym. 2006).



Kuva 2. Veriaivoesteen läpäisyreitit. Lääkeaineet (musta pallo) voivat läpäistä veriaivoesteen käyttäen useita eri reittejä. **A)** Hyvin pienet hydrofiiliset molekyylit voivat diffundoitua tiiviiden liitosten (musta suorakulmio) läpi solujen väleistä (Abbot ym. 2006, Zhao ym. 2009). **B)** Rasvaliukoiset molekyylit voivat läpäistä veriaivoesteen passiivisella diffuusiolla solukalvojen läpi (Abbot ym. 2006). **C)** Kantajaproteiinit (harmaa) voivat viedä lääkkeitä veriaivoesteen läpi, mikäli lääkeaine muistuttaa kantajaproteiinin substraattia (Abbot ym. 2006, Alarm ym. 2010). **D)** Reseptorivälitteisessä transsytoosissa lääkeaine sitoutuu reseptoriin, mikä johtaa endosytoosiin (Alarm ym. 2010). Lääkeaine kuljetetaan solun läpi rakkulassa ja vapautetaan eksosytoosilla solun toisella puolella. Myös isot molekyylit voivat kulkeutua transsytoosilla veriaivoesteen läpi (Abbot ym. 2010, Alarm ym. 2010). **E)** Adsorptiotranssytoosilla veriaivoesteen voivat läpäistä positiivisesti varautuneet aineet, jotka sitoutuvat solun pinnan sitoutumiskohtiin (Abbot ym. 2010).

Suurin osa aivosyöpien hoitoon käytetyistä ja tutkituista lääkkeistä ei pysty läpäisemään veriaivoestettä (taulukko 2) (Juillerat-Jeanneret 2008). Tästä johtuen lääkkeiden veriaivoesteen läpäisykyvyn tehostamiseksi on kehitetty erilaisia keinoja. Lääkkeitä voidaan antaa injektiona suoraan keskushermostoon, jolloin veriaivoeste voidaan ohittaa (Deeken ja Löscher 2007). Injektio voidaan antaa esimerkiksi kovakalvon alle, valtimeen tai aivokammioon (Cloughesy ym. 1997, Newton ym. 2003, Deeken ja Löscher 2007). Lisäksi lääkkeitä voidaan viedä vaikutuskohteeseen aivoihin asennettavien implanttien avulla (Alarm ym. 2010, Noël ym. 2011). Esimerkiksi karmustiinin antamista implanttina kasvaimen poiston yhteydessä kasvaimen onkaloon on tutkittu (Noël ym. 2011). Implantti vapautti lääkettä 2-3 viikon ajan. Etua kontrolliin verrattuna ei kuitenkaan havaittu.

Taulukko 2. Esimerkkejä syöpälääkkeiden veriaivoesteen läpäisystä (Greig ym. 1990, Brewster ym. 1994, Boyle ym. 2004, Elonen 2007, Juillerat-Jeanneret 2008, Li ym. 2011 ja DrugBank 2011).

Läpäisee			Ei läpäisee		
Lääkeaine	Koko	LogP	Lääkeaine	Koko	LogP
Temotsolomidi	194 Da	2,8	Doksorubisiini	543 Da	- 0,5
Irinotekaani	587 Da	3,2	Paklitakseli	854 Da	3
Lomustiini	234 Da	3	Sisplatiini	300 Da	-2,2
Karmustiini	214 Da	1,5	Metotreksaatti	454 Da	-2,2
			Vinkristiini	825 Da	2,8
			Vinblastiini	811 Da	3,9
			Gansikloviiri	255 Da	-1,7

Lääkeaineiden läpäisyn parantamiseksi on tutkittu myös veriaivoesteen väliaikaista avaamista (Abbot ym. 2006). Avaamisen tulisi olla mahdollisimman lyhytaikainen, ettei se vahingoita aivoja. Kaulavaltimoon infuusiona annetulla hypertonisella arabinoosi- tai mannitoliliuoksella on saatu tiiviit liitokset levenemään korkean osmoottisen paineen takia ja onnistuttu lisäämään kasvaimeen kulkeutuvan lääkeaineen määrää (Rapoport 2001, Abbot ym. 2006). Eläinkokeissa on saatu lupaavia tuloksia myös tulehduksen välittäjäaineilla, kuten bradykiniinillä, mutta kliiniset tutkimukset eivät ole tukeneet eläinkokeiden tuloksia (Emerich ym. 1999, Prados ym. 2003). Esimerkiksi annettaessa bradykiniinin reseptorin agonistia (RPM-7) infuusiona rotalle todettiin, että myöhemmin injektiona annetun karboplatiinin määrä lisääntyi kontrolliin verrattuna (Emerich ym. 1999). Toisaalta agonistilla ei ollut vaikutusta, jos karboplatiini annettiin samanaikaisesti infuusiona. Kuitenkin myöhemmin kliinisessä tutkimuksessa glioomapotilailla ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa RPM-7:ää ja karboplatiinia saaneilla potilailla verrattuna kontrolliin (Prados ym. 2003). Tutkijat kuitenkin arvelivat, että erilaisella annostuksella voitaisiin saavuttaa hyötyä.

Veriaivoesteen väliaikaista avaamista on tutkittu myös muilla aineilla kuten etanolilla ja pinta-aktiivisilla aineilla kuten glyserolilla (Alarm ym. 2010). Aineilla on saatu tiiviit liitokset avautumaan ja lääkeaineen määrää aivoissa kasvatettua. Lisäksi ultraäänen avulla on pyritty saamaan aikaan paikallinen, väliaikainen veriaivoesteeseen häiriö, jolloin sen läpäisevyys lääkeaineille paranisi. (Hynynen ym. 2001, Hynynen 2008). Kaneilla tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että ultraäänen avulla onnistuttiin saamaan aikaan paikallinen veriaivoesteen avautuminen vanhingoittamatta ympäröivää aivokudosta (Hynynen ym. 2001).

Lääkeaineista on kehitetty muunnoksia ja konjugaatteja, jotka läpäisevät veriaivoesteen alkuperäistä lääkeainetta tehokkaammin. Hyvin läpäisevä lääkeaine ei saisi rakenteeltaan olla uloskuljettavien kuljetinproteiinien substraatti (Pasha ja Gupta 2010). Sen sijaan sisäänkuljettavien kantajaproteiinien substraatti tai solun pinnan reseptoreihin sitoutuva rakenne on eduksi lääkeaineelle (Abbot ym. 2010, Alarm ym. 2010). Myös positiivisesta varauksesta on hyötyä, koska silloin lääkeaine sitoutuu tehokkaasti negatiivisesti varautuneeseen verisuonenseinän endoteelisolukerrokseen ja voi helposti läpäistä veriaivoesteen adsorptiotranssytoosilla (Alarm ym. 2010). Lisäksi lääkeaineen rasvaliukoisuuden lisääminen saattaa parantaa veriaivoesteen läpäisyä (Pasha ja Gupta 2010).

Lääkeaineen läpäisykykyä parantavia ominaisuuksia pyritään myös lisäämään kehittämällä lääkkeitä aihiolääkkeitä tai yhdistämällä lääkeaine kantajaan (Alarm ym. 2010, He ym. 2011). Lääkeaine voi olla joko kantajan sisällä tai kantajan pintaan kiinnitetty. Kantaja vapauttaa lääkeaineen päästyään veriaivoesteen läpi. Kantajan läpäisykykyä voidaan parantaa kiinnittämällä sen pintaan ligandi, jonka solunpinnan reseptori tunnistaa (Soni ym. 2008, He ym. 2011). Kantajina on tutkittu esimerkiksi dendrimeeriä, jonka sisään lääkeaine oli kapseloitu (He ym. 2011). Dendrimeerin avulla doksorubisiinia kulkeutui enemmän veriaivoesteen läpi kuin vapaata doksorubisiinia. Lisäksi havaittiin, että dendrimeerin pintaan kiinnitetyt kaksi erilaista aktiivista kohdentajaa tehostivat veriaivoesteen läpäisyä vielä lisää. Lisäksi toisessa tutkimuksessa havaittiin transferrinillä pinnoitetun liposomin, jonka sisässä oli 5-fluorourasiiliä, läpäisevän veriaivoesteen pelkkää liposomia tai lääkeainetta paremmin (Soni ym. 2008). Transferrinin oletettiin sitoutuvan veriaivoesteessä rautaa kuljettavaan reseptoriin ja kulkeutuvan sisään reseptorivälitteisellä transsytoosilla.

3.3 Veriaivoesteen muutokset glioomissa

Veriaivoesteen on arveltu muuttuvan läpäisevämmäksi glioomissa (Grabb ja Gilbert 1995, Papadopoulos ym. 2001). Glioomapotilailla on havaittu turvotusta ja painetta aivoissa, minkä arvellaan johtuvan nesteen kertymisestä aivoihin veriaivoesteen verisuonten läpäisevyyden lisääntyessä. Veriaivoesteen solumallin on todettu olevan läpäisevämpi kasvatettaessa sitä gliomasolulinjojen kanssa kuin kontrollina olleiden endoteelisolujen kanssa (Grabb ja Gilbert 1995). Toisaalta on huomattu, että terveiden astrosyyttien tapaan toimivat rotan solut vahvistivat veriaivoestettä. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että astrosyyttien tai gliomasolujen ei tarvinnut olla kosketuksissa veriaivoesteen solujen kanssa, vaan vaikutus välittyi solujen erittämien erilaisten liukoisten tekijöiden välityksellä.

Veriaivoesteen läpäisevyyden on havaittu korreloivan gliooman pahanlaatuisuusasteen kanssa (Papadopoulos ym. 2001). Korkeamman asteen glioomissa veriaivoesteen läpäisy oli matalan asteen gliomia tai tervettä aivokudosta suurempaa. Syyksi havaittiin, että korkean asteen glioomissa tiiviitä liitoksia oli vähemmän ja ne olivat avautuneet, jolloin solujen välit olivat suurempia. Lisäksi havaittiin, että tiiviille liitoksille tärkeää okkludiiniproteiinia oli vähemmän korkean asteen glioomissa kuin matalan asteen. Okkludiinin ja pahanlaatuisuuden välillä havaittiin selvä käänteinen korrelaatio. Okkludiinin vähäisyyden arveltiin selittävän tiiviiden liitosten avautumista ja veriaivoesteen läpäisyn kasvua.

Veriaivoesteen läpäisyn parantumisen syyksi on myös arveltu tyvilevyn koostumuksen muutoksia (Rascher ym. 2002). Glioomapotilailla on havaittu tyvilevyssä alentunut solun ulkoisen proteoglykaanin agriinin määrä. Agriinia on todettu esiintyvän normaalissa tyvilevyssä ja keskushermoston verisuonissa. Agriinin vähenemisen arvellaan vaikuttavan veriaivoesteen astrosyyttien vesikanavaproteiini aquaporin-4 (AQP4):n määrään (Noell ym. 2007). Tiedetään, että kasvatettaessa astrosyyttejä agriinin kanssa AQP4:n ilmentyminen astrosyyteissä kasvoi verrattuna kontrolliin. Agriinin havaittiin myös lisäävän solujen vedenottokapasiteettia ja -nopeutta. Täten arvellaan, että gliomassa agriinin väheneminen tyvilevyssä saisi aikaan astrosyyteissä häiriön veden kulkeutumisessa, jonka seurauksena astrosyyttien toiminta häiriintyisi. Astrosyytit osallistuvat veriaivoesteen tiiviiden liitosten säätelyyn, jolloin niiden häiriintynyt toiminta saattaa löystyttää endoteelin tiiviitä liitoksia.

4 ABC-PERHEEN KULJETINPROTEIINIT

4.1 Rakenne

ABC-perheen kuljetinproteiinit ovat solukalvolla sijaitsevia proteiineja, joilla on hyvin laaja substraattikirjo (taulukko 4). Kuljetinproteiinien rakenteessa on solukalvon läpäisevä osa, solun sisäinen osa ja solun ulkopuolinen osa (kuva 3) (Kaspar 2009). Nämä kuljetinproteiinit muodostavat solukalvon läpi kanavan, jonka kautta substraatit siirretään solun ulkopuolelle.

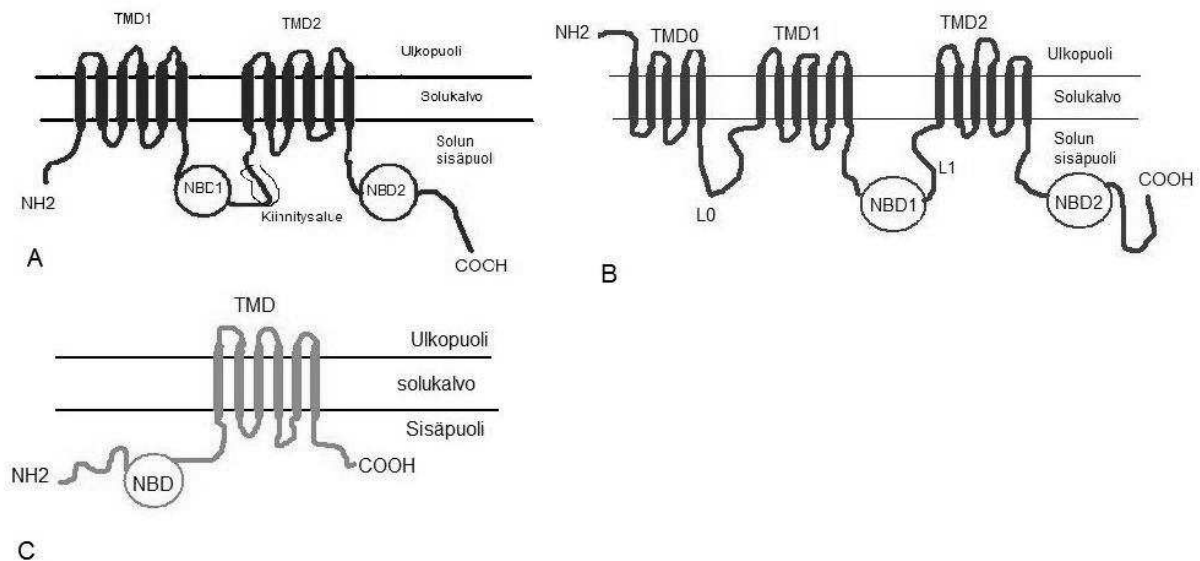
Solun sisäpuolella sijaitsee hydrofiilinen nukleotidin sitova alue (NBD) (Kaspar 2009). NBD:n avulla kuljetinproteiini voi sitoa ja hydrolysoida ATP:a, mikä mahdollistaa aineiden poistamisen solusta konsentraatiogradienttia vastaan (Sarkadi ym. 2006, Kaspar 2009, Liu 2009). NBD:n lisäksi ABC-perheen kuljetinproteiineissa on solukalvon läpäiseviä alueita (TMD) (Sarkadi ym. 2006, Liu 2009). Yksi TMD koostuu viidestä tai kuudesta hydrofobisesta solukalvon läpäisevästä kierteestä ja näiden välissä olevista luupeista. (Sarkadi ym. 2006, Jones ym. 2009, Liu 2009). Toimiva kuljetinproteiini rakentuu kahdesta NBD:sta ja kahdesta tai useammasta TMD:sta (kuva 3) (Sarkadi ym. 2006, Kaspar 2009).

ABC-perheen kuljetinproteiineja koodaa ihmisellä 49 geeniä ja ne luokitellaan seitsemään alaluokkaan (ABCA–ABCG) rakenteen perusteella (Sarkadi ym. 2006, Sharom 2008, Liu 2009). Kuljetinproteiineja esiintyy useissa kudoksissa kuten maksassa, suolistossa ja munuaisissa ja niillä on tärkeä rooli lääkkeiden jakautumisessa, imeytymisessä ja eliminaatiossa (de Lange 2004, Kaspar 2009).

P-gp on ABC-perheen kuljetinproteiineista tunnetuin. Se on täyskuljetinproteiini, joka muodostuu kahdesta samanlaisesta osasta (kuva 3A) (Ambukar ym. 2003, Liu 2009). Osat muodostuvat yhdestä TMD:sta ja yhdestä NBD:sta. Osia yhdistää kiinnitysalue (Ambukar ym. 2003). P-gp:ssa sekä C- että N-terminaalipää ovat solukalvon sisäpuolella. Samankaltainen rakenne on myös MRP4:llä, MRP5:llä, MRP8:lla ja MRP9:llä (Yabuuchi ym. 2001, Kruh ja Belinsky 2003).

MRP1 muistuttaa rakenteeltaan P-gp:a (kuva 3B) (Kool ym. 1997, Liu 2009). Siinä on kuitenkin kahden TMD:n ja NBD:n lisäksi yksi viidestä kierteestä koostuva TMD (TMD0) N-terminaalipäässä (Kool ym. 1997, Bakos ja Homolya 2007, Liu 2009). TMD0 on kiinni TMD1:ssä kahdesta kierteestä muodostuvan kiinnitysalueen (L1) avulla. MRP1:n N-terminaalipää on solun ulkopuolella, toisin kuin P-gp:lla (Bakos ja Homolya 2007). Samankaltainen rakenne on myös MRP2:lla, MRP3:lla, MRP6:lla ja MRP7:llä (Kruh ja Belinsky 2003).

BCRP on rakenteeltaan puolikuljetinproteiini (kuva 3C) (Doyle ym. 1998). Se muodostuu yhdestä TMD:sta ja yhdestä NBD:sta. Nämä osat ovat eri järjestyksessä kuin P-gp:ssa ja MRP1:ssä. BCRP:n C- ja N-terminaalipää ovat solukalvon sisäpuolella. Kaksi BCRP-molekyyliä, joita yhdistää disulfididisidos, muodostavat biologisesti aktiivisen homodimeerirakenteen (Kage ym. 2002).



Kuva 3. Esimerkkejä adenosinitrifosfaattia sitova kasetti (ABC) -perheen kuljetinproteiinien rakenteista. A) P-glykoproteiini (P-gp) B) monilääkeresistenssiproteiini 1 (MRP1) C) rintasyövän resistenssiproteiini (BCRP). ABC-perheen kuljetinproteiinit koostuvat solukalvon läpäisevistä alueista (TMD) ja solun sisäpuolella sijaitsevista nukleotidin sitovista alueista (NBD). Täyskuljetinproteiini muodotuu osista, joita yhdessä pitävät kiinnitysalueet (L1 ja L0).

4.2 ABC-perheen kuljetinproteiinit aivosyövissä

ABC-perheen kuljetinproteiinien on huomattu osallistuvan MDR:iin poistamalla syöpälääkkeitä syöpäsoluista. Muun muassa P-gp:n ja MRP1:n ilmentymistä on tutkittu potilailta eristetyistä gliomanäytteistä ja glioomasolulinjoista. Kuljetinproteiinien on havaittu ilmentyvän vaihtelevasti eri glioomasolulinjoissa, vaikka solulinjat ovat kaikki peräisin glioblastoomasta (taulukko 3). MRP1:n, MRP3:n ja MRP5:n on havaittu ilmentyvän useissa glioblastoomasolulinjoissa. Sen sijaan MRP2:n ilmentymisen on todettu olevan heikkoa. BCRP:n ilmentymistä glioblastoomasolulinjoissa on tutkittu vain vähän.

Taulukko 3. Kuljetinproteiinien ilmentyminen mRNA-tasolla jatkuvissa glioblastoomasolulinjoissa. + ilmentyy, - ei ilmenny, tyhjä ei tunneta.

Solulinja	P-gp	BCRP	MRP1	MRP2	MRP3	MRP4	MRP5	Lähde
8MG	-		+	-	+	+	+	Declèves ym. 2002
A172	-		+	-	+	+	+	Bähr ym. 2003
D272MG	-		+	-	+	-	+	Bähr ym. 2003
GL15	-		+	-	+	+	+	Declèves ym. 2002
IN157			-	-	+			Haga ym. 2001
LN-18	+		-	+	+	+	+	Bähr ym. 2003
LN-229	+		+	-	+	-	+	Bähr ym. 2003
T98G	+		+	-	+	-	-	Bähr ym. 2003
U343			+	-	+			Haga ym. 2001
U87MG	-		+	-	-	-	+	Tanaka ym. 2000, Bähr ym. 2003, Nakai ym. 2009

Potilailta eristetyistä gliomanäytteistä heti eristyksen jälkeen tutkittaessa on havaittu eroa parempiennusteisten matalan asteen (asteet I ja II) gliomien ja pahanlaatuisten korkean asteen (asteet III ja IV) gliomien välillä kuljetinproteiinien ilmentymisessä. MRP1:n havaittiin ilmentyvän proteiinitasolla enemmän korkean kuin matalan asteen oligodendroglioomissa (Benyahia ym. 2004). Matalan asteen oligodendroglioomissa MRP1 ilmentyi vain 10 %:ssa kasvaimen soluista kun taas korkeamman asteen kasvaimissa se ilmentyi yli 90 %:ssa soluista. On myös havaittu, että MRP1:n lisäksi MRP3 ja MRP4 ilmentyvät proteiinitasolla enemmän korkean kuin matalan asteen glioomissa (Calatuzzolo ym. 2005). P-gp:lla ei kuitenkaan ole havaittu vastaavaa eroa. Tutkittaessa ilmentymistä mRNA-tasolla millään kuljetinproteiinilla ei havaittu eroa matalan ja korkean asteen gliomien välillä (Calatuzzolo ym. 2005, Bronger ym. 2005).

Oligodendrogliomien on todettu reagoivan astrozytoomia paremmin syöpähoitoon (Mäenpää 2010). Syynä tähän saattavat olla kuljetinproteiinit, koska niitä on havaittu ilmentyvän vähemmän oligodendrosytoomissa kuin astrozytoomissa (Bronger ym. 2005, Valera ym. 2009). MRP3:n, MRP4:n ja MRP5:n havaittiin ilmentyvän potilailta eristetyissä astrozytoomissa oligodendrosytoomia korkeammalla tasolla (Bronger ym. 2005, Valera ym. 2007). Toisaalta BCRP:n on huomattu ilmentyvän oligodendroglioomissa runsaammin kuin astrozytoomissa (Valera ym. 2007).

Kuljetinproteiinien arvellaan aiheuttavan resistenssiä syöpälääkkeille. Niiden määrän on arveltu kasvavan lääkehoidon aikana ja esimerkiksi pitkäaikaisen doksorubisiinialtistuksen on todettu kasvattavan P-gp:n ja MRP1:n määrää leukemiasoluissa (Baran ym. 2007, Kweon ym. 2010). Sen sijaan lyhytaikaisemmissa vinplastiinialtistuksissa havaittiin P-gp:n, MRP1:n ja BCRP:n määrien alenevan altistuksen seurauksena gliomasolulinjoissa (Valera ym. 2007). Pitkäaikaisessa altistuksessa kuljetinproteiinien määrän kasvaminen saattaa mahdollisesti johtua soluissa tapahtuvasta valinnasta, eikä niinkään proteiinien ilmentymisen kasvusta. Kuljetinproteiinien ilmeneminen gliomasoluissa ei kuitenkaan johdu pelkästään lääkehoidosta, vaikka kemoterapia saattaa kasvattaa ilmentymisen tasoa syöpäsoluissa. Kahdessa tutkimuksessa suurin osa potilaista ei ollut saanut kemoterapiaa eikä sädehoitoa ennen kasvaimen poistoa (Benyahia ym. 2004, Bronger ym. 2005). Tästä huolimatta gliomasoluissa havaittiin ilmentyvän useita kuljetinproteiineja.

4.3 ABC-perheen kuljetinproteiinit veriaivoesteessä

Veriaivoesteessä ilmentyy runsaasti ABC-perheen kuljetinproteiineja, mikä heikentää aivosyöpien hoitoon käytettävien lääkeaineiden tehoa (taulukko 4) (Paolinelli ym. 2010). Kuljetinproteiinien ilmentymisestä veriaivoesteessä on saatu ristiriitaisia havaintoja (taulukko 4). Esimerkiksi vuonna 2002 todettiin, etteivät MRP1 ja MRP5 ilmenny proteiinitasolla ihmisen veriaivoesteessä (Cooray ym. 2002). Myöhemmässä tutkimuksessa molempien kuljetinproteiinien kuitenkin todettiin ilmentyvän veriaivoesteessä (Nies ym. 2004). Myös MRP4:n on todettu eräissä tutkimuksissa puuttuvan veriaivoesteestä, mutta myöhemmin sen havaittiin ilmentyvän proteiinitasolla ihmisen veriaivoesteessä (Cooray ym. 2002, Nies ym. 2004, Uchida ym. 2011). Lisäksi MRP3:n ja MRP7:n on havaittu ilmentyvän mRNA-tasolla, mutta ei proteiinitasolla (Cooray ym. 2002, Warren ym. 2009, Uchida ym. 2011). Tutkimuksissa saatujen ristiriitaisten tulosten syynä voi mahdollisesti olla erilainen menetelmä. Eri menetelmillä saattaa olla erilainen herkkyys tunnistaa pieniä määriä proteiineja. Proteiinitason ja mRNA-tason erojen syynä saattaa olla se, ettei RNA:sta tuoteta toiminnallista proteiinia.

Kuljetinproteiinien ilmentymistä veriaivoesteessä on vertailtu ihmisen ja jyräjän välillä. MRP4:n on huomattu ilmentyvän mRNA-tasolla ihmisen veriaivoesteessä heikosti verrattuna hiiren veriaivoesteeseen (Warren ym. 2009). Myöhemmin myös proteiinitasolla havaittiin sama ero (Uchida ym. 2011). Lisäksi huomattiin, että proteiinitasolla P-gp:a ilmentyi vähemmän ihmisen veriaivoesteessä kuin hiiren. P-gp oli myös toiminnallisesti aktiivisempi hiiressä kuin ihmisessä. Toisaalta BCRP:n todettiin ilmentyvän proteiinitasolla huomattavasti enemmän ihmisellä kuin hiirellä ja tasojen olevan korkeampia kuin muiden tutkittujen ABC-perheen kuljetinproteiinien.

Kuljetinproteiinien sijaintia veriaivoesteessä ei tunneta hyvin, mutta niiden on todettu sijaitsevan sekä verenkierron puoleisella että aivojen puoleisella solukalvolla (taulukko 4) (Virgintino ym. 2002, Bendayan ym. 2006). P-gp:n on esimerkiksi väitetty sijaitsevan pelkästään verenkierron puoleisella solukalvolla (Virgintino ym. 2002). Toisaalta Bendayan kumppaneineen havaitsi, että se sijaittisi molemmin puolin endoteelia (Bendayan ym. 2006). MRP1:n on havaittu sijaitsevan molemmilla solukalvoilla jyräjällä, mutta heikommin aivojen puolella (Roberts ym. 2008).

Taulukko 4. ABC-perheen kuljentinproteiinien ilmentyminen ihmisen ja jyrsijän veriaivoesteen soluissa. + ilmenee, - ei ilmene, (+) ilmenee matalalla tasolla ja -/+ ristiriitainen tulos, tyhjä ei tutkittu.

Kuljetin proteiini	Ilmentyminen mRNA-tasolla		Ilmentyminen proteiinitasolla		Proteiinin sijainti verenkierron tai aivojen puoleisella solukalvolla		Lähteet
	Ihminen	Jyrsijä	Ihminen	Jyrsijä	Ihminen	Jyrsijä	
P-gp	+	+	+	+	veren / molemmilla	veren	Cooray ym. 2002, Virgintino ym. 2002, Bendayan ym. 2006, Roberts ym. 2008, Uchida ym. 2011, Yousif ym. 2007
MRP1	+	+	- / (+)		veren	veren aivojen	Cooray ym. 2002, Nies ym. 2004, Roberts ym. 2008, Uchida ym. 2011
MRP2	(+)	-	-	-			Cooray ym. 2002, Nies ym. 2004, Warren ym. 2009, Yousif ym. 2007
MRP3	+	+	-				Cooray ym. 2002, Warren ym. 2009
MRP4	+	+	- / +	+	veren	veren	Cooray ym. 2002, Nies ym. 2004, Warren ym. 2009, Roberts ym. 2008, Uchida ym. 2011
MRP5	+	+	- / +		veren	aivojen	Cooray ym. 2002, Nies ym. 2004, Roberts ym. 2008, Uchida ym. 2011
MRP6	(+)	+	-				Warren ym. 2009, Uchida ym. 2011
MRP7	+	-	-				Warren ym. 2009, Uchida ym. 2011
MRP8	-	-	-				Warren ym. 2009, Uchida ym. 2011
MRP9	-	-	-				Warren ym. 2009, Uchida ym. 2011
BCRP	+	+	+	+	veren	veren	Cooray ym. 2002, Zhang ym. 2003, Roberts ym. 2008, Uchida ym. 2011

4.4 Inhibiittorit

ABC-perheen kuljetinproteiinien aiheuttaman lääkeresistenssin välttämiseksi on kehitetty aineita, jotka inhiboivat kuljetinproteiinien toimintaa (Fox ja Bates 2007). Inhibiittoreiden yhdistämisellä syöpälääkkeiden kanssa toivotaan syöpälääkkeiden tehon paranevan. Kuitenkaan inhibiittorit eivät ole vielä saaneet myyntilupaa syövän hoidossa.

Ensimmäisen polven inhibiittoreita ovat P-gp:a inhiboivat sydän- ja verenpainelääkkeenäkin käytettävä verapamiili, reumalääkkeenä käytettävä siklosporiini A sekä rytmihäiriölääke amiodaroni (taulukko 5) (Tsuruo ym. 1981, Hyafil ym. 1993, Bardelmeijer ym. 2004). Näiden inhibiittoreiden on todettu olevan tehokkaita, mutta niiden affiniteetti P-gp:iin on heikko. Tämän takia niitä on jouduttu käyttämään suurina annoksina, jotka aiheuttivat toksisuutta. Lisäksi myöhemmin ensimmäisen polven inhibiittoreiden havaittiin vaikuttavan sytokromi P450-entsyymien toimintaan ja olevan myös P-gp:n substraatteja (Hyafil ym. 1993, Helgason ym. 2006, Fox ja Bates 2007).

Toisen polven inhibiittoreihin kuuluu muun muassa valspodar (PSC-833) (taulukko 5) (Fox ja Bates 2007). Valspodar on siklosporiini D:n johdannainen, jolla on 10–20 -kertainen affiniteetti P-gp:iin verrattuna siklosporiini D:hen (Fox ja Bates 2007). Valspodarin tehoa on tutkittu *in vitro* -tutkimusten lisäksi myös kliinisesti (Kolitz ym. 2010, O'Brien ym. 2010). Näissä tutkimuksissa valspodarin haitaksi kuitenkin havaittiin sen farmakokineettiset yhteisvaikutukset kuten sytokromi P450-entsyymien inhibointi syöpälääkkeiden kanssa, minkä vuoksi samaan aikaan annettavien syöpälääkkeiden toksisuus kasvoi (O'Brien ym. 2010).

Kolmannen polven inhibiittoreita ovat tariquidar, elacridar, ONT-093, laniquidar ja zosuquidar (taulukko 5) (Newman ym. 2000, van Zuylen ym. 2000, Morschhauser ym. 2007, Hubensack ym. 2008). Niillä ei ole toisen polven inhibiittoreiden kaltaisia farmakokineettisiä yhteisvaikutuksia syöpälääkkeiden kanssa ja suurin osa on spesifisiä P-gp:lle (van Zuylen ym. 2002, Morschhauser ym. 2007, Abraham ym. 2009). Ne eivät myöskään ole P-gp:n substraatteja (Hyafil ym. 1993, Abraham ym. 2009). Kaikkia kolmannen polven inhibiittoreita on tutkittu *in vitro*- ja *in vivo* -tutkimusten lisäksi myös kliinisesti (van Zuylen ym. 2002, Chi ym. 2005, Morschhauser ym. 2007, Hubensack ym. 2008, Abraham ym. 2009). Niiden on todettu olevan turvallisia ja soveltuvan yhdistettäväksi useiden syöpälääkkeiden kanssa.

P-gp:n lisäksi myös BCRP:n inhibiittoreita on tutkittu, mutta suurinta osaa ainoastaan *in vitro*. Fumitremorgin C (FTC) oli ensimmäisiä tutkittuja BCRP:n inhibiittoreita (taulukko 5), jonka kuitenkin myöhemmin todettiin olevan neurotoksinen (Allen ym. 2002, Kühnle ym. 2009). FTC:n pohjalta kehitettiin johdannaisia, joista tehokkain oli Ko143. Se on spesifinen BCRP:lle kun taas P-gp:n inhibiittoreista elacridarin ja tariquidarin on todettu estävän myös BCRP:n toimintaa (Breedveld ym. 2005, Kühnle ym. 2009). Uusin BCRP:lle löydetty inhibiittori on apatinibi. Sen on havaittu inhiboivan P-gp:a ja BCRP:a *in vitro* (Mi ym. 2010)

Myös MRP kuljetinproteiineille on kehitetty inhibiittoreita (taulukko 5). Monet MRP:ja inhiboivista aineista inhiboivat kaikkia MRP:ja. MRP1:n inhibiittoreista biricodaria on tutkittu myös kliinisessä faasin II tutkimuksessa (Gandhi ym. 2007). Tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, ettei biricodarin yhdistämisestä vinkristiinini tai doksorubisiiniin kanssa saavutettu merkittävää hyötyä syövän hoidossa.

Taulukko 5. ABC-perheen kuljetinproteiineja.

Geeni (sijainti kromosomissa)	Muut lyhenteet	Proteiinin koko	Substraatit	Inhibiittorit	Lähteet
ABCB1 (7q21)	P-gp MDR1 clcs pgy	170 kDa	vinblastiini vinkristiini doksorubisiini daunorubisiini etoposidi teniposidi paklitakseli dosetakseli topotekaani irinotekaani karpoplattiini temotsolomidi	siklosporiini A verapamiili valspodar tariquidar laniquidar ONT-093 zosuquidar elacridar PAK-104P biricodar	Bähr ym. 2003, Chang 2007, Hyafil ym.1993, Sharom 2008, GeneCards 2010, Bardelmeijer ym. 2004, Abraham ym. 2009, van Zuylen ym. 2002, Newman ym. 2000, Hubensack ym. 2008, ITC 2010, Liu 2009, Yamazaki ym. 2008, Schaich ym. 2009
ABCC1 (16p13)	MRP1 GS-X ABC29	190kDa	doksorubisiini daunorubisiini epirubisiini vinblastiini vinkristiini etoposidi teniposidi topotekaani irinotekaani metotreksaatti	indometasiini probenecidi MK571 verapamiili PAK-104P biricodar	Sharom 2008, Liu 2009, GeneCards 2010, Kool ym. 1997, Palerno ym. 2004, Minderman ym. 2004
ABCC2 (10q24)	MRP2 cMOAT	174 kDa	vinblastiini vinkristiini sisplattiini paklitakseli dosetakseli doksirubisiini metotreksaatti etoposidi mitoksantroni	siklosporiini A delaviridiini efavirenz emitrikitabiini MK571 propenesidi	Kool ym. 1997, GeneCards 2010, Fletcher ym. 2010, ITC 2010, Juan ym. 2010 Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

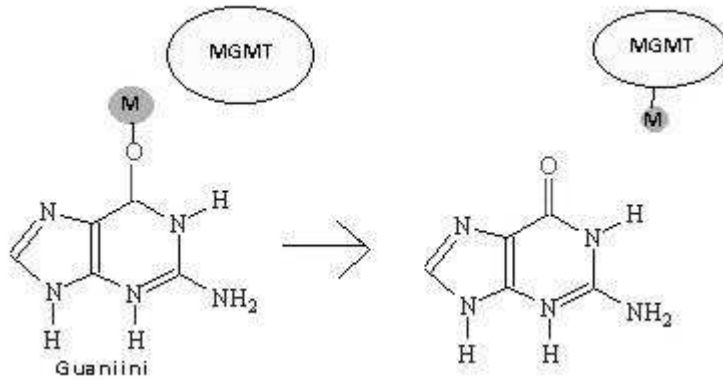
Geeni (sijainti kromosomissa)	Muut lyhenteet	Proteiinin koko	Substraatit	Inhibiittori	Lähteet
ABCC3 17q22	MRP3	169 kDa	etoposidi sisplatiini metotreksaatti	delaviridiini efavirenz emitrikitabiini MK571	Haga ym. 2001, ITC 2010, GeneCards 2010, Hopper ym. 2001
ABCC4 13q32	MRP4	150 kDa	tiopuriinit metotreksaatti kamfoterisiini gansikloviiri	selekoksibi diklofenaakki probenesidi MK571	GeneCards 2010, Fletcher ym. 2010, El-Sheikh ym. 2008, Reid ym. 2003, ITC 2010, Adachi ym. 2002
ABCC5 3q27	MRP5	160 kDa	tiopuriinit metotreksaatti sisplatiini	probenesidi sildenafilii trequinsin	GeneCards 2010, Fletcher ym. 2010, Reid ym. 2003
ABCC6 16p13	MRP6	165 kDa	doksorubisiini daunorubisiini sisplatiini etoposidi	indometasiini propenesidi	GeneCards 2010, Fletcher ym. 2010, Iliás ym. 2002
ABCC10 6p21	MRP7	162 kDa	vinblastiini vinkristiini paklitakseli dosetakseli	MK571 sulfinpyratsoni siklosporiini A	GeneCards 2010, Fletcher ym. 2010, Chen ym 2003
ABCC11 16q12	MRP8	154 kDa	tiopuriinit	-	GeneCards 2010, Fletcher ym. 2010
ABCC12 16q12	MRP9	152 kDa	-	-	GeneCards 2010
ABCG2 4q22	BCRP MXR1 ABCP	72 kDa	doksorubisiini daunorubisiini topotekaani irinotekaani metotreksaatti epirubisiini etoposidi tenoposidi imatinibi	fumitremorgin C imatinibi elacridar Ko143 tryprostatin A novobiocin apatinibi	Lu ja Shervingto 2008, Sharom 2008, Liu 2009, Breedveld ym. 2005, Kühnle ym. 2009, Woehlecke ym. 2003, Shiozawa ym. 2004, Mi ym. 2010, ITC 2010

5 DNA:N VAURIOITA KORJAAVAT MEKANISMIT AIVOSYÖVISSÄ

5.1 O⁶-metyyليguaniini-DNA metyyli transferaasi

Temotsolomidia käytetään gliomien hoidossa ensisijaisena lääkeä (Mäenpää 2010, Kato ym. 2010). Temotsolomidi kuuluu alkyloiviin syöpälääkkeisiin (Villano ym. 2009). Nämä lääkeaineet liittyvät DNA:han alkyyliryhmän. Tällöin DNA:n kaksoiskierre vaurioituu, mikä johtaa solun apoptoosiin. Tärkeimmät temotsolomidin aikaansaamista alkyloinneista ovat metylaatio O⁶-asemassa olevassa guaniinissa, N³-adeniinissa ja N⁷-guaniinissa (Broniscer ym. 2007, Palma ym. 2009, Villano ym. 2009). Temotsolomidin lisäksi muita aivosyöpien hoitoon käytettäviä alkyloiviasyöpälääkkeitä ovat muun muassa prokarbatsiini ja nitrosoureat, joihin kuuluvat lomustiini ja karmustiini.

Alkyloivien syöpälääkkeiden aikaansaamia DNA:n vaurioita korjaa O⁶-metyyليguaniini-DNA metyyli transferaasi (MGMT), joka siirtää O⁶-guaniinissa olevan metyyli ryhmän aktiiviseen kohtaansa ja korjaa DNA:n vaurion (kuva 4) (Kaina ym. 2010). MGMT:n on havaittu ilmentyvän runsaasti sekä normaalissa, että syöpäkudoksessa. Sen on myös todettu olevan suurin resistenssin aiheuttaja temotsolomidille. Ilmentymistasoissa on kuitenkin eroja kudosten ja ihmisten välillä. MGMT:n on kuitenkin todettu olevan aktiivisempi syöpäkudoksessa verrattuna ympäröivään normaaliin kudokseen (Preuss ym. 1996, Kaina ym. 2010).



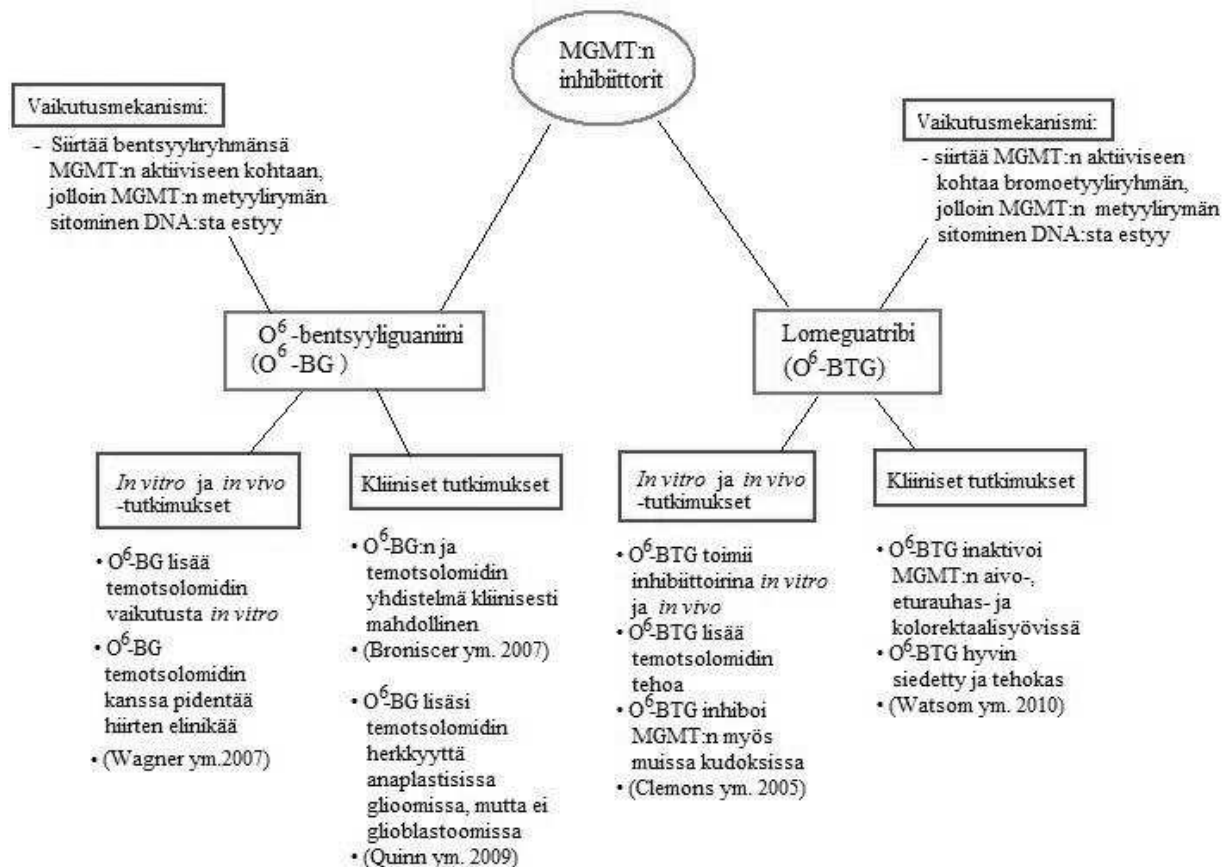
Kuva 4. O⁶-metyyliguaaniini-DNA metyylitransferaasin (MGMT) toimintamekanismi. Temotsolomidi liittää DNA:n guaniiniin metyyliryhmän (M). MGMT korjaa DNA:n vaurion sitomalla metyyliryhmän aktiiviseen kohtaansa.

MGMT:n määrän on todettu korreloivan glioblastooman hoitoennusteeseen (Watanabe ym. 2011). Solut, joissa on runsaasti MGMT:a ovat 4–10 kertaa resistentimpiä nitrosoureoille kuin solut, joista MGMT puuttuu (Gerson 2004). Lisäksi on selvitetty, että MGMT ilmenee enemmän korkean asteen glioomissa verrattuna matalan asteen glioomiin (Fruehauf ym. 2006). MGMT:n on todettu ilmentyvän korkealla tasolla 63 %:ssa uusista hoitamattomista glioblastoomista (Wiewrodt ym. 2008). Lisäksi sen määrän on huomattu olevan suurempi uusiutuneessa glioblastoomassa verrattuna alkuperäiseen saman potilaan glioblastoomaan. Syyksi tähän arvellaan, että glioblastooman uusiutuessa lääkeaineet stimuloivat MGMT:n ilmentymistä tai kasvaimessa tapahtuu valintaa, jolloin ne solut, joissa on paljon MGMT:a selviävät (Wiewrodt ym. 2008). Uusiutuneissa glioblastoomissa havaittiin, että MGMT:n määrät kasvoivat enemmän potilailla, jotka saivat sädehoitoa ja alkyloivia aineita verrattuna pelkkää sädehoitoa saaneisiin. Lisäksi matala MGMT-aktiivisuus korreloi lääkehoidon tehokkuuteen (Wiewrodt ym. 2008, Watanabe ym. 2011).

MGMT:n aiheuttamaa resistenssiä aivosyövässä on pyritty vähentämään MGMT-geenin hiljentämisellä (Kato ym. 2010). MGMT:n promoottorin metylaation on huomattu estävän geenin ilmentymisen ja täten olevan yhteydessä tehokkaampaan temotsolomidihoittoon glioomissa (Kaina ym. 2010, Felsberg ym. 2011, Watanabe ym. 2011). On ajateltu, että promoottorin metylaatioaste voisi mahdollisesti toimia markkerina, jolla ennustettaisiin temotsolomidin tehoa (Felsberg ym. 2011). Kuitenkin tutkimuksessa on todettu, että MGMT:n promoottorin metylaatio säilyi suurimmalla osalla potilaista samana glioblastooman uusiutumisen jälkeen hoidosta riippumatta. Tästä tutkijat päättelivät, että mahdollisesti jokin muu mekanismi kuin metylaatio vaikuttaa resistenssin lisääntymiseen syövän uusiutumisessa.

Temotsolomidiresistenssiä on yritetty vähentää hiljentämällä MGMT geenin ilmentymistä pienen häiritsevän RNA:n (siRNA) avulla (Kato ym. 2010). Tutkimuksessa todettiin, että MGMT:n määrä väheni ja temotsolomidin sytotoksisuus lisääntyi. Lisäksi siRNA:n ja temotsolomidin yhdistelmää tutkittiin hiiriin istutetuissa glioomissa ja siRNA:n huomattiin vähentävän merkittävästi MGMT:n määrää ja lisäävän temotsolomidin tehoa pelkkää temotsolomidia saaneisiin hiiriin verrattuna.

MGMT:lle on myös kehitetty inhibiittoreita parantamaan alkyloivien aineiden tehoa aivosyöpien hoidossa (kuva 5) (Villano ym. 2009). Inhibiittoreiden toiminta perustuu MGMT:n kertakäyttöisyyteen. MGMT voi reagoida vain yhden metyyliryhmän DNA:sta kanssa, jolloin toiminnan jatkaminen edellyttää uuden entsyymin tuottamista. Inhibiittorit siirtävät MGMT:n aktiiviseen kohtaan bentsyyli- tai bromoetyyliryhmän, jolloin MGMT ei pysty enää sitomaan metyyliryhmää DNA:sta (Villano ym. 2009, Watson ym. 2010). Esimerkiksi inhibiittoreilla havaittiin tehoa kasvainsoluissa, mutta ne aiheuttivat luuytimen vajaatoimintaa kliinisessä käytössä, minkä takia temotsolomidin annosta laskettiin alle tarpeellisen tason (Villano ym. 2009, Kato ym. 2010). Lisäksi huomattiin, että inhibiittorit ovat toksisia myös normaalissa kudoksessa (Kaina ym. 2010).



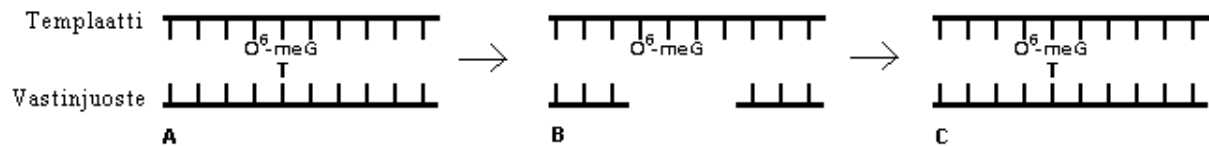
Kuva 5. O⁶-metyyliguaniini-DNA metyyliyhäntäsiirran (MGMT) inhibiittorit, niiden vaikutusmekanismit ja esimerkkejä tutkimuksista.

5.2 Yhteensopimattomuusien korjausjärjestelmä

Toinen alkyloivien syöpälääkkeiden tehoon vaikuttava DNA:n korjausjärjestelmä on yhteensopimattomuusien korjausjärjestelmä (MMR), johon kuuluu useita proteiineja (Villano ym. 2009). MMR tunnistaa väärin pariutuneet emäkset sekä emästen deleetiot ja insertiot uudessa syntetisoidussa DNA-juosteessa ja pyrkii korjaamaan ne. MMR:n virheetön toiminta lisää temotsolomidin tehoa ja sen puutteen on todettu aiheuttavan resistenssiä temotsolomidille aivosyövissä (Felsberg ym. 2011).

MMR pyrkii korjaamaan DNA:n kahdentuessa syntetisoituun vastinjuosteeseen muodostuneita virheitä (Marchesi ym. 2007). Temotsolomidin alkyloimassa DNA:n templaattijuosteessa guaniiniin on kiinnittynyt metyyliryhmä. Tämän seurauksena guaniinin pariin vastinjuosteeseen muodostuu virheellisesti tymidiini sytosiinin sijaan (kuva 6). MMR tunnistaa tämän virheen ja pyrkii korjaamaan sen. Korjaus kohdistuu kuitenkin vain vastinjuosteeseen, eikä templaattiin, jossa virhe on. Korjauksen päätteeksi vastinjuoste muodostetaan uudelleen templaatin mukaan, jolloin metyloituneen guaniinin pariin muodostuu jälleen tymidiini. MMR tunnistaa virheen uudelleen ja korjaus alkaa alusta. Useat turhat korjaukset aiheuttavat DNA:han aukkoja, jotka johtavat DNA:n kaksoiskierrteen rikkoutumiseen ja apoptoosiin.

MMR:n proteiinien määrän vähenemisen on huomattu olevan yleistä glioblastoomissa, mikä saattaa edistää resistenssiä ja syövän uusiutumista (Felsberg ym. 2011). Kuitenkaan vähenemisen ei ole todettu olevan yhteydessä vain kemoterapiaan vaan myös pelkällä sädehoidolla hoidettuihin kasvaimiin.

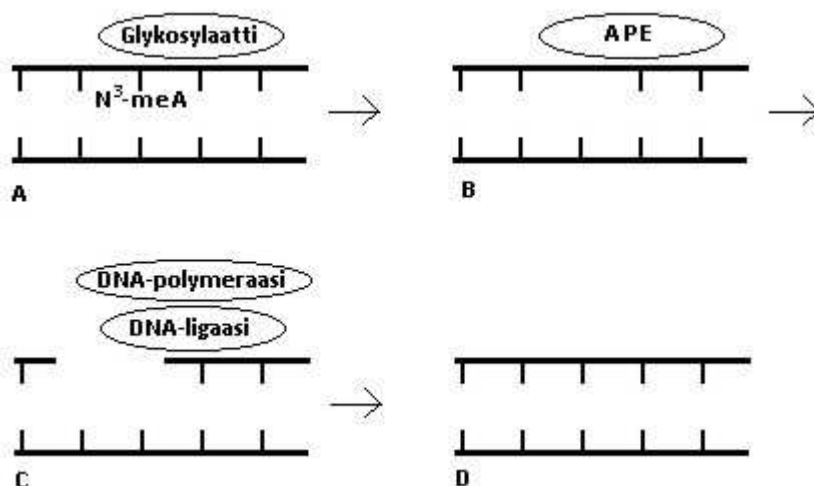


Kuva 6. Yhteensopimattomuuksien korjausjärjestelmän (MMR) toiminta temotsolomidin metyloimassa DNA:ssa. **A**) Metyloituneen guaniinin (O⁶-meG) pariin on vastinjuosteeseen virheellisesti muodostunut tymidiini (T). MMR tunnistaa tämän tymidiinin. **B**) MMR poistaa palan vastinjuosteesta tymidiinin ympäriltä. **C**) Vastinjuoste korjataan templaattina olevan DNA:n mukaisesti, jolloin sama virhe muodostuu uudelleen, metyloituneen guaniinin pariin tulee taas tymidiini ja korjaus alkaa alusta.

5.3 Emäspoisto- ja nukleotidikorjausjärjestelmä

Temotsolomidille resistenssiä aiheuttaa myös DNA:n virheitä korjaava emäspoistokorjausjärjestelmä (BER). Se korjaa temotsolomidin aiheuttamia DNA:n N³-adeniinin ja N⁷-guaniinin alkylointeja (kuva 7) (Marchesi ym. 2007, Villano ym. 2009). Toisin kuin MMR:ssä BER:n korjaus kohdistuu suoraan DNA:han. Kuitenkaan BER:n merkitys temotsolomidiresistenssille ei ole yhtä merkittävä kuin MGMT:n, sillä N³-adeniinin metylointi on vain 9 % temotsolomidin aikaansaamista virheistä DNA:ssa (Villano ym. 2009). Lisäksi BER toimii suurimmassa osassa syöpäsoluja, joten temotsolomidin N³-adeniinin metyloinnin merkitys on hyvin vähäinen. Kuitenkin N³-adeniinin metylointi on soluille tappava, joten BER:n inhibointi parantaisi temotsolomidin tehoa.

Nukleotidikorjausjärjestelmän (NER) toiminta on samankaltaista kuin BER:n (Henderson ym. 2010). Se poistaa vaurioituneen kohdan DNA:sta ja syntetisoi tilalle uuden palan juostetta. Se pystyy kuitenkin poistamaan laajemman palan vaurioitunutta DNA:ta kuin BER (Rouillon ja White 2011). NER:ään kuuluu useita proteiineja, jotka voivat tunnistaa ja korjata DNA:n virheitä. NER aiheuttaa resistenssiä erityisesti karboplatiinille, joka muodostaa sidoksia DNA-ketjujen kanssa ja saa aikaan ristsidoksen DNA-ketjujen välille.



Kuva 7. Emäspoistokorjausjärjestelmän (BER) toiminta. **A)** Glykosylaatit tunnistavat temotsolomidin metyloiman adeniinin (N³-meA) DNA:ssa ja poistavat sen. **B)** Endonukleaasi (APE) pilkkoo DNA-juosteen emäksettömästä kohdasta. **C)** DNA-polymeraasi ja DNA-ligaasi syntetisoivat uuden juosteen. **D)** Korjattu DNA-juoste.

BER:ssä olennainen proteiini on Poly(ADPriboosi)polymeraasi (PARP) (Villano ym. 2009). Se vaikuttaa muun muassa endonukleasin ja DNA-polymeraasin toimintaan (Marchesi ym. 2007). PARP:n inhibiittoreiden on havaittu lisäävän temotsolomidin tehoa soluissa, joissa on puutteellinen MMR riippumatta MGMT:n määrästä (Villano ym. 2009). Tutkittuja inhibiittoreita ovat CEP-8983 ja ABT-888 (Miknyoczki ym. 2007, Palma ym. 2009). Molempien on todettu lisäävän temotsolomidin tehoa *in vivo* ja yhdistelmän temotsolomidin kanssa olevan hyvin siedetty. ABT-888 on edennyt faasin II kliinisiin tutkimuksiin. Tavoitteena olisi kehittää yhdistelmä temotsolomidin, MGMT:n inhibiittorin ja PARP inhibiittorin kesken, jotta temotsolomidin tehoa voitaisiin parantaa aivosyöpien hoidossa (Villano ym. 2009).

6 YHTEENVETO

Monilääkeresistenssi aivosyöpien hoidossa johtuu pääosin veriaivoesteen ja syöpäkudoksen resistenssimekanismeista. Ensin lääkeaineen on läpäistävä veriaivoeste. Veriaivoesteen tiiviit liitokset estävät monien lääkeaineiden kulkeutumisen verenkierrosta aivokudokseen. Lisäksi veriaivoesteen endoteelin soluissa esiintyy runsaasti metaboloivia entsyymejä ja kuljetinproteiineja, jotka heikentävät lääkeaineiden veriaivoesteen läpäisyä (Abbot ym. 2006, Paolinelli ym. 2010). Tämän jälkeen lääkeaineen on päästävä syöpäkudokseen ja sitouduttava vaikutuskohtaan syöpäsolussa vasteen aikaansaamiseksi. Syöpäkudoksessa esiintyy kuitenkin monia resistenssimekanismeja, kuten kuljetinproteiineja ja DNA:n vaurioita korjaavia mekanismeja (Ambudkar ym. 2003, Benyahia ym. 2004, Calatuzzolo ym. 2005). Taulukossa 6 esitetään yhteenvetona glioomien hoidossa käytettävät lääkeaineet ja niiden tunnetut resistenssimekanismit.

Veriaivoeste on merkittävä aivosyöpälääkkeiden tehoa rajoittava tekijä ja on ajateltu, että tehostamalla lääkeaineiden pääsyä aivoihin veriaivoesteen läpi voitaisiin parantaa hoidon vastetta. Kuitenkin myös lääkeaineilla, jotka pääsevät veriaivoesteen läpi, kuten temotsolomidilla, hoitotulokset ovat huonoja. Tämä osoittaa, ettei vain veriaivoesteen läpäisyä parantamalla voida vaikuttaa resistenssiin, vaan myös syöpäkudoksen resistenssimekanismit ovat merkittäviä selittäviä tekijöitä hoidon heikkoon tehoon. Lääkeaineille, jotka eivät pysty läpäisemään veriaivoestettä, se kuitenkin muodostaa merkittävimmän esteen (Bähr ym.2003). Toisaalta veriaivoesteen on havaittu löystyvän glioomapotilailla, mikä mahdollisesti saattaa parantaa syöpälääkkeiden pääsyä aivoihin (Grabb ja Gilbert 1995, Papadopoulos ym. 2001).

Veriaivoesteen kuljetinproteiinien ovat merkittäviä resistenssin kannalta. On huomattu, että kuljetinproteiinit poistamalla saadaan syöpälääkkeen määrä poistogeenisillä hiirillä aivoissa suuremmaksi kuin kontrollissa (Leggas ym. 2004). Samoja kuljetinproteiineja ilmentyy myös syöpäkudoksessa ja hiiriin istutetuissa kasvaimissa niiden merkitys on havaittu suureksi (Hyafil ym. 1993, Calatuzzolo ym. 2005). Aivosyöpäkudoksen kuljetinproteiinien merkitys on kuitenkin vielä epäselvä. Niiden suhteellista merkitystä veriaivoesteen kuljetinproteiinien lisänä ei tunneta.

Resistenssiä aiheuttavat monet mekanismit, joiden merkitys vaihtelee lääkeainekohtaisesti. Kuljetinproteiineja on tutkittu runsaasti ja on huomattu, että kuljetinproteiineja inhiboimalla voidaan *in vitro* parantaa lääkeaineiden tehoa (Hyafil ym. 1993, Newman ym. 2000). Kuitenkin kuljetinproteiinien lisäksi on myös muita resistenssin aiheuttajia ja osalle lääkeaineista kuljetinproteiinien merkitys on huomattavasti vähäisempi, jolloin muut resistenssimekanismit muodostuvat tärkeämmiksi. Esimerkiksi temotsolomidin ei tiedetä olevan P-gp:n lisäksi muiden kuljetinproteiinien substraatti ja sille tärkeimmät resistenssin aiheuttajat ovat DNA:n korjausmekanismit MGMT ja BER. MGMT:n inhibointia tutkittaessa on huomattu, että temotsolomidin teho yhdessä inhibiittorin kanssa paranee verrattuna pelkkää temotsolomidia saaneisiin (Clemons ym. 2005, Broniscer ym. 2007). Tämä osoittaa MGMT:n olevan merkittävä tekijä temotsolomidin resistenssissä. Kuitenkaan inhibointi ei poista resistenssiä kokonaan, joten resistenssiin vaikuttavat myös muut tekijät. Resistenssi on monien mekanismien summa, jossa mekanismit täydentävät toisiaan ja yhden sammuttamisella saavutetaan vain osittaista hyötyä.

Kuljetinproteiinien, MGMT-entsyymien ja BER-järjestelmän inhibiittoreilla on pyritty välttämään MDR:ä. Kuljetinproteiinien inhibiittoreilla on saavutettu hyötyä, mutta ongelmana kuitenkin on kuljetinproteiinien runsaus (Newman ym. 2000, Hubensack ym. 2008). Yhtä inhiboitaessa saattavat muut kuljetinproteiinit kompensoida sen toimintaa. Siksi inhibiittoreiden tulisi olla useaa kuljetinproteiinia inhiboivia. Kuitenkin tällöin havaitaan toksisuutta elimistön terveissä kudoksissa, koska kuljetinproteiineja ilmentyy elimistössä useissa kudoksissa ja inhibiittorit vaikuttavat myös niissä. Myös MGMT:n ja BER:n inhibiittoreilla on saavutettu hyötyä *in vivo* (Clemons ym. 2005, Broniscer ym. 2007, Miknyoczki ym. 2007). Kuitenkin myös näiden inhibiittoreiden ongelmana on inhibitio normaalissa kudoksessa. Koska resistenssiä aiheuttavat monet tekijät, sen voittamiseksi syöpälääkkeeseen tulisi yhdistää useita erilaisia inhibiittoreita ja mahdollisesti myös veriaivoesteen läpäisyä parantavaa lääkeainetta. Tällöin kuitenkin normaalit kudokset kärsivät, koska samat mekanismit, jotka suojaavat syöpäsoluja, suojaavat myös normaaleja soluja.

Taulukko 6. Glioomalääkkeiden resistenssimekanismit.

Lääkeaine	Lyhenne	Annostelu	Resistenssimekanismit	Lähteet
Irinotekaani	CPT-11	suoneen	<ul style="list-style-type: none"> • P-gp, MRP1, MRP4, MRP7, BCRP • Muutokset topoisomeraasi I:n määrässä ja toiminnassa • Apoptoosin vähentyminen 	Elonen 2007, Chu ym. 1999, Norris ym. 2005, Hopper-Borge ym. 2009, Takahata ym. 2008, Kanzawa ym. 1990, Tentori ym. 2006, Cusack ym. 2000,
Karboplatiini	CBP	suoneen	<ul style="list-style-type: none"> • Ei läpäise veriaivoestettä • P-gp • Apoptoosin vähentyminen • Glutationi • NER • Heikentynyt soluunotto 	Parney ja Chang 2003, Yamazaki ym. 2008, Keating ym. 2010, Byun ym. 2005, Henderson ym. 2010, Ishida ym. 2002,
Karmustiini	BCNU	suoneen	<ul style="list-style-type: none"> • MGMT 	Elonen 2007, Gerson 2004,
Lomustiini	CCNU	suun kautta	<ul style="list-style-type: none"> • MGMT 	Parney ja Chang 2003, Brent ym. 1985,
Prokarbatsiini	PCZ	suun kautta	<ul style="list-style-type: none"> • MGMT 	Parney ja Chang 2003,
Temotsolomidi	TMZ	suun kautta	<ul style="list-style-type: none"> • MGMT • Vähentynyt MMR • BER 	Marchesi ym.2007, Villano ym. 2009, Kato ym. 2010,
Vinkristiini	VCR	suoneen	<ul style="list-style-type: none"> • Ei läpäise veriaivoestettä • P-gp, MRP1, MRP2, MRP7 • Mutaatiot vaikutuskohdassa 	Parney ja Chang 2003, Tsuruo ym. 1981, Benyahia ym. 2004, Kawabe ym. 1999, Cheung ym. 2010, Hopper-Borge ym. 2009,

II KOKEELLINEN OSA

7 JOHDANTO

Syöpäsolulinjojen karakterisointi on tärkeää, koska niitä käytetään yleisesti malleina lääkekehityksessä. Erityisesti ABC-perheen kuljetinproteiinien karakterisointi on tärkeää, koska ne vaikuttavat solulinjan lääkeaineresistenssiin ja heikentävät lääkeaineiden tehoa. ABC-perheen kuljetinproteiineista P-gp:n, MRP1-6:n, ja BCRP:n tiedetään ilmentyvän elimistössä useissa kudoksissa ja monet aivosyöpälääkkeet ovat niiden substraatteja. Näitä kuljetinproteiineja ilmentyä myös ihmisen syöpäsolulinjoissa (Bähr ym. 2003).

Kuljetinproteiinien karakterisoinnissa solulinjoista voidaan käyttää useita menetelmiä. Polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla voidaan selvittää kuljetinproteiinin ilmentymisen mRNA-tasolla (Smith ja Osborn 2009). Kvantitatiivinen PCR (q-PCR) mahdollistaa tarkkojen RNA-määrien kvantitoinnin. Western blot:illa spesifisten vasta-aineiden avulla näytteestä saadaan määritettyä proteiinitason ilmentymisen spesifisten fluoresoivien leimojen avulla (Kurien ym. 2011). Myös muiden fluoresenssiväryjäysmenetelmien avulla pystytään karakterisoimaan proteiinien ilmentymistä (Suzuki ym. 2007).

Tutkimukset ovat osoittaneet, että pahanlaatuisemmissa, korkeamman asteen glioomissa kuljetinproteiineja ilmentyä enemmän kuin matalan asteen glioomissa (Benyahia ym. 2004, Calatuzzolo ym. 2005). Lisäksi on todettu, että altistus lääkeaineille nostaa kuljetinproteiinien ilmentymistä syöpäsolulinjoissa (Shinoda ym. 2005, Turner ym. 2006). Toiset kokeet ovat taas osoittaneet, että kuljetinproteiinien ilmentymisen on laskenut solulinjassa altistuksen seurauksena (taulukko 7) (Valera ym. 2009). Ristiriitaisten tutkimustulosten vuoksi tarvitaan jatkotutkimuksia.

Taulukko 7. Tutkimuksia, joissa syöpäsoluja on altistettu lääkeaineille ja tutkittu altistuksen vaikutusta kuljetinproteiinien ilmentymiseen. + ilmentyminen kasvaa, - ilmentyminen pienenee, ± ei muuosta ilmentymisessä. DOX doksorubisiini, VIN vinplastiini, CIS sislplatiini

Altistusaika	Lääkeaine	Pitoisuus	Solulinja	Tulos	Lähde
6 päivää	DOX	1,34µM	Munasarjasyövistä soluja	P-gp ± MRP1 ± BCRP ±	Di Nicolantonio ym. 2005
6 päivää	DOX	0,828 µM	Rintasyövistä soluja	MRP1+ P-gp ± BCRP±	Di Nicolantonio ym. 2005
20h	DOX	0,1µM	Myelooma: RPMI-8226, NCI-H929	BCRP+	Turner ym. 2006
Viikkoja	DOX	?	Gliooma: T98G, LN-229	P-gp ±	Rieger ym. 2000
12kk	DOX	220 nM	Leukemia (AML)	P-gp+ MRP1+	Baran ym. 2007
3kk	DOX	?	Leukemia (AML)	MRP1+	Kweon ym. 2010
24h	DOX	50 nM	Keuhkosyöpä	MRP1+	Shinoda ym. 2005
24h, 48h	DOX	0,1µg/ml	Glioblastooma: U87MG	P-GP+	Rittierodt ja Harada 2003
24h, 48h	DOX	0,1µg/ml	Rotan glioblastooma: 9L	P-GP+	Rittierodt ja Harada 2003
24h	VIN	10 nM ja 60 nM	Astrozytooma I: R28	P-GP+ MRP1- BCRP±	Valera ym. 2009
24h	VIN	10nM ja 60 nM	Anaplastinen astrozytooma: UW46	P-GP+ MRP1- BCRP-	Valera ym. 2009
24h	VIN	10 nM	Glioblastooma: SF188	P-GP- MRP1 ± BCRP-	Valera ym. 2009
24h	VIN	60 nM	Glioblastooma: SF188	P-GP- MRP1+ BCRP±	Valera ym. 2009
Pitkään	DOX	50 µM	Glioblastooma: U87MG	P-GP + MRP1+	Vanpouille ym. 2009
Pitkään	CIS	20 nM	Glioblastooma: U87MG	P-GP ± MRP1 +	Vanpouille ym. 2009

Tämän työn tarkoituksena oli määrittää kahdeksan ABC-perheen kuljetinproteiinin (P-gp, MRP1–6 ja BCRP) ilmentyminen kuudessa ihmisen pahanlaatuisessa syöpäsolulinjassa mRNA-tasolla. Tutkimuksessa solulinjoina käytettiin kolmea glioblastoomasolulinjaa (U87MG, U118MG, T98G), munuaisen karsinoma solulinjaa (Caki-2), kohdunkaulan adenokarsinomasoluja (HeLa) ja keuhkojen karsinomasoluja (A549). Lisäksi ihmisen glioomasolulinjoja (U87MG, U118MG, T98G) ja rotan glioomasolulinjaa (BT4C) altistettiin syöpälääke doksorubisiinille ja tutkittiin, miten altistus vaikuttaa ABC-perheen kuljetinproteiinien (P-gp, MRP1, MRP2 ja BCRP) ilmentymiseen mRNA-tasolla. Doksorubisiinin tiedetään olevan substraatti ainakin P-gp:lle, MRP1:lle, MRP2:lle, MRP6:lle ja BCRP:lle (Sharom 2008, Fletcher ym. 2010).

8 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

8.1 Solujen ylläpito

Erikoistyössä käytettiin kuutta ihmisen pahanlaatuista syöpäsolulinjaa (taulukko 8) ja rotan glioomasolulinjaa. Kaikki solulinjat saatiin Seppo Ylä-Herttulan ryhmästä (Ark Therapeutics Oyj, Sandmair ym. 2000). Caki-2-solujen kasvatusliuoksena käytettiin McCoy's 5A + GlutaMax:a (Gibco[®], Carlsbad, USA), johon oli lisätty 10 % inaktivoitua naudan sikiön seerumia (FBS) (Gibco[®], Carlsbad, USA) ja 1 % penisilliinistreptomysiiniliuosta (PEST) (Euro Lane, Siziano, Italia). T98G-solujen kasvatusmediumi koostui Minimal Essential Medium Eagle:sta (Sigma-Aldrich[®], LTD Irwinr, Iso-Britannia), johon lisättiin 10 % FBS:a ja 1 % PEST:a. U87MG-, U118MG-, BT4C-, A549- ja HeLa-soluille käytettiin Dulbecco's Modified Eagle's Medium:a (DMEM) (Sigma-Aldrich[®], LTD Irwinr, Iso-Britannia), johon lisättiin 10 % FBS:a ja 1 % PEST:a. Solut kasvatettiin inkubaattorissa 37 °C:ssa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa. Solut jaettiin ylläpitoon uusille maljoille kaksi kertaa viikossa jakosuhteilla A549 1:7–1:40, U87MG 1:3–1:5, U118MG 1:3–1:5, T98G 1:3–1:6, BT4C 1:50, HeLa 1:6–1:20 ja Caki-2 1:3–1:5.

Taulukko 8. Käytetyt ihmisen pahanlaatuiset syöpäsolulinjat.

Solulinja	Morfologia	Elin	Sairaus	ATCC [®] tuotenumero
U87MG	Epiteeli	Aivo	Glioblastooma, astrozytooma	HTB-14 TM
U118MG	Sekamuoto	Aivo	Glioblastooma, astrozytooma	HTB-15 TM
T98G	Fibroblasti	Aivo	Multiforminen glioblastooma	CRL-1690 TM
Caki-2	Epiteeli	Munuainen	Puhdas solukarsinooma	HTB-47 TM
HeLa	Epiteeli	Kohdunkaula	Adenokarsinooma	CCL-2 TM
A549	Epiteeli	Keuhko	Karsinooma	CCL-185 TM

8.2 RNA:n eristys ja kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio

RNA:n eristys. Maljalla kasvavilta soluilta poistettiin medium ja solut huuhdeltiin fosfaattipuskuriliuoksella (PBS). Solut hajotettiin 4 ml:lla TRI-reagenssia (Ambion[®], Foster City, USA) (Chomczynski ja Sacchi 1987). Tämän jälkeen 1 ml solususpensiota siirrettiin neljään putkeen ja lisättiin 200 µl kloroformia (Sigma-Aldrich[®], St Louis, USA). Sentrifugoinnin (12 000 g, 15 min) jälkeen yläfaasi kerättiin talteen ja siihen lisättiin 500 µl isopropanolia (Sigma-Aldrich[®], St Louis, USA) RNA:n saostamiseksi. Näytteet sentrifugoitiin (12 000 g, 10 min) ja supernatantti poistettiin. Solupelletit pestiin kaksi kertaa 1 ml:lla 75 %:sta etanolia (Altia, Helsinki, Suomi). RNA-näytteet säilytettiin -70 °C:ssa etanolissa.

DNaasi-käsittely. RNA-pelletit liuotettiin pelletin koosta riippuen 30–50 µl:aan dietyylipyrokarbonaatti (DEPC) -vettä. Näytteisiin lisättiin 10-kertaista DNase-puskuria (Ambion[®], Foster City, USA) 0,1-kertainen määrä näytteen tilavuudesta ja 2 U DNase-entsyymiä (Ambion[®], Foster City, USA), joka hajotti näytteissä mahdollisesti olevan DNA:n. Näytteitä inkuboitiin 20–30 minuuttia lämpöblokillä 37 °C:ssa. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin 5 µl inaktivaatioreagenssia (Ambion[®], Foster City, USA), joka inaktivoi DNaasi-entsyymien. Näytteitä inkuboitiin 2 minuuttia huoneenlämmössä, sentrifugoitiin (12 000 g, 2 min) ja supernatantti siirrettiin uuteen putkeen.

RNA-pitoisuuden määrittäminen. Näytteiden RNA-pitoisuuden määrittämistä varten näytteet laimennettiin pelletin koosta riippuen 1:400–1:800 Tris-EDTA (TE) -puskuriin. Laimennettuja näytteitä pipetoitiin 50 µl kuoppalevyn kuoppiin ja lisättiin 50 µl RiboGreen-reagenssia (Molecular probes[®], Eugene, USA), joka oli laimennettu 1:200 TE-puskuriin. Tämän jälkeen RNA-pitoisuus näytteissä määritettiin mittaamalla näytteen fluoresenssi Victor2 1420-012 Multilabel counter -fluorometrillä (Perkin Elmer INC, Waltham, USA). Pitoisuus laskettiin standardisuoran avulla (0; 0,1875; 0,375; 0,75; 1,5 ja 3,0 ng/µl). Tämän jälkeen RNA laimennettiin pitoisuuteen 0,4 µg/µl DEPC-veteen.

cDNA-synteesi. Jokaisesta näytteestä otettiin 2 µg RNA:ta komplementaarisen DNA (cDNA) synteesiä varten. RNA:n lisäksi reaktioseokseen lisättiin 2 µl DEPC-vettä, 4 µl 5x puskuria M-MuLV-entsyymille (Fermentas, Vilna, Liettua), 2 µl deoksinukleotiditriposfaatteja (dNTPs) (Fermentas, Vilna, Liettua) ja 3 µl pd(M6)aluketta (1µg/µl) (Amersham Bioscience, Upsala, Ruotsi). Seosta inkuboitiin 70 °C:ssa 3 minuuttia RNA:n denaturoimiseksi, minkä jälkeen näytteet siirrettiin jäälle, jolloin alukkeet sitoutuivat RNA:han. Seuraavaksi näytteisiin lisättiin reaktioseos, joka sisälsi 2 µl DEPC-vettä, 30 U M-MuLV-entsyymiä (M-MuLV Reverse Transkriptase, Fermentas, Vilna, Liettua) ja 20 U RiboLock RNase inhibiittoria (Fermentas, Vilna, Liettua). Näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa 60 minuuttia, minkä jälkeen inkubaatiota jatkettiin 70 °C:ssa 10 minuuttia. Näytteet säilytettiin -70 °C:ssa.

qPCR-analyysi: P-gp, BCRP, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 ja MRP6 kuljetinproteiinien ilmentyminen mRNA-tasolla määritettiin q-PCR:lla käyttäen valmiita Applied Biosystems™:n alukkeita (Applied Biosystems™ TaqMan® Gene expression assay) (taulukko 9). PCR-reaktioseos valmistettiin valmistajan (Applied Biosystems™) ohjeiden mukaan. Reaktioseoksessa oli 4 µl näytettä, 10 µl TaqMan® Master Mix:ä, 5 µl vettä ja 1 µl alukkeita. PCR-ajot suoritettiin Applied Biosystems™:n 7500 Real-Time PCR Systems -laitteella. PCR:ssa oli 40 toistoa, joita edelsi 10 min alkudenaturaatio 95 °C:ssa. Jokainen toisto koostui juosteiden erottumisesta (15 sekuntia 95 °C) sekä alukkeiden liittymisestä ja juosteiden pidentymisestä (1 minuutti 60 °C). Jokaisen toiston jälkeen laite mittasi näytteiden fluoresenssin. Jokaiselle näytteelle määritettiin ”Cycle threshold” (CT) -arvot fluoresenssikuvauksen eksponentiaaliselta alueelta ja arvot suhteutettiin β-aktiinin CT-arvoihin.

Kuljetinproteiinien ilmentyminen määritettiin myös ihmisen maksan mRNA-näytteestä, jonka lahjoitti Mika Reinisalo (Küblbeck ym. 2010). Maksan RNA:lle tehtiin cDNA-synteesi ja q-PCR-ajo kuten edellä on kuvattu.

Taulukko 9. Käytetyt alukkeet ja niiden tuotenumerot.

Aluke	Tuotenumero
P-gp	Hs00184500_m1
MRP1	Hs00219905_m1
MRP2	Hs00166123_m1
MRP3	Hs00358656_m1
MRP4	Hs00195260_m1
MRP5	Hs00194701_m1
MRP6	Hs00184566_m1
BCRP	Hs01053790_m1
rotan P-gp	Rn00561753_m1
rotan mrp1	Rn00574093_m1
rotan mrp2	Rn00588341_m1
rotan bcrp	Rn00710585_m1

8.3 Doksorubisiini-altistus

Altistuskoetta edeltävänä päivänä U87MG, U118MG, T98G ja BT4C -solut jaettiin 6-kuoppalevyille 500 000 solua/kuoppa. Altistuskokeessa käytettiin doksorubisiinin IC50-pitoisuutta (taulukko 10), jotka Karoliina Soinen oli aiemmin määrittänyt. Soluja altistettiin kasvatusliuokseen laimennetulle doksorubisiinille (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA) 24 tunnin ajan. Kontrollisoluille vaihdettiin tuore kasvatusliuos altistuksen yhteydessä.

Altistuksen jälkeen soluista eristettiin RNA ja käännettiin cDNA:ksi valmistajan ohjeen mukaan (Ambion[®]) Cells-to-CT -kittiä (TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-CT kit, Ambion[®], Foster City, USA) käyttäen.

RNA:n eristys. Solut irrotettiin maljalta trypsiinillä (trypsin-EDTA 0,5 %, Gibco[®], Carlsbad, USA) ja resuspensoitiin DPBS:iin (Dulbeccos's phosphate buffer saline, Gibco[®], Carlsbad, USA). Solut laskettiin, sentrifugoitiin (7500 g, 5 min) ja resuspensoitiin PBS:een niin, että 1 µl sisälsi 10 000 solua. Suspensiosta otettiin 5 µl:n näytteet ja solut hajotettiin 50 µl:lla lysis-liuosta (Lysis Solution, Ambion[®], Foster City, USA), johon oli lisätty 1 U DNAase-entsyymiä (DNase I, Ambion[®], Foster City, USA). Näytteitä inkuboitiin 5 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen entsyymien toiminta pysäytettiin lisäämällä näytteisiin 5 µl Stop-liuosta (Stop Solution, Ambion[®], Foster City, USA) ja inkuboimalla 2 minuttia huoneenlämmössä. Näytteet säilytettiin -70 °C:ssa.

cDNA-synteesi. Näytteisiin lisättiin seosta, jossa oli 37,5 µl puskuria (RT Buffer, Ambion[®] Foster City, USA), 3,75 µl 20 x entsyymiseosta (Ambion[®], Foster City, USA), 18,75 µl nukleaaeista vapaata vettä (nuclease-free water, Ambion[®], Foster City, USA) ja 15 µl RNA:ta. Näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa 60 minuuttia, jonka jälkeen inkubaatiota jatkettiin 95 °C:ssa 5 minuuttia. Valmiit näytteet säilytettiin -70 °C:ssa. Näytteistä määritettiin P-gp:n, MRP1:n, MRP2:n ja BCRP:n geenien ilmentyminen mRNA-tasolla q-PCR:lla kuten edellä on kuvattu. Altistuksessa jokaisesta solulinjasta oli kaksi rinnakkaista kuoppaa ja näistä molemmista otettiin kaksi näytettä, joista kustakin tehtiin kaksi rinnakkaista q-PCR-ajoon. Altistuskoe toistettiin kaksi kertaa, jolloin q-PCR:ssa oli yhteensä 16 rinnakkaista.

Taulukko 10. Dokсорubisiinin IC50-pitoisuudet solulinjoissa 24 tunnin altistuksen jälkeen.

Solulinja	IC₅₀
U87MG	4,472 µM
U118MG	4,418 µM
T98G	8,056 µM
BT4C	0,09 µM

8.4 Tilastolliset menetelmät

Tulokset käsiteltiin Microsoft Excel -ohjelmistolla ja muutettiin tilastollisiksi kuvaajiksi GraphPad Prism 5 -tietokoneohjelman (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA) avulla. Tilastollisena menetelmänä käytettiin kaksisuuntaista student t-testiä 95 %:n luottamusvälillä.

9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

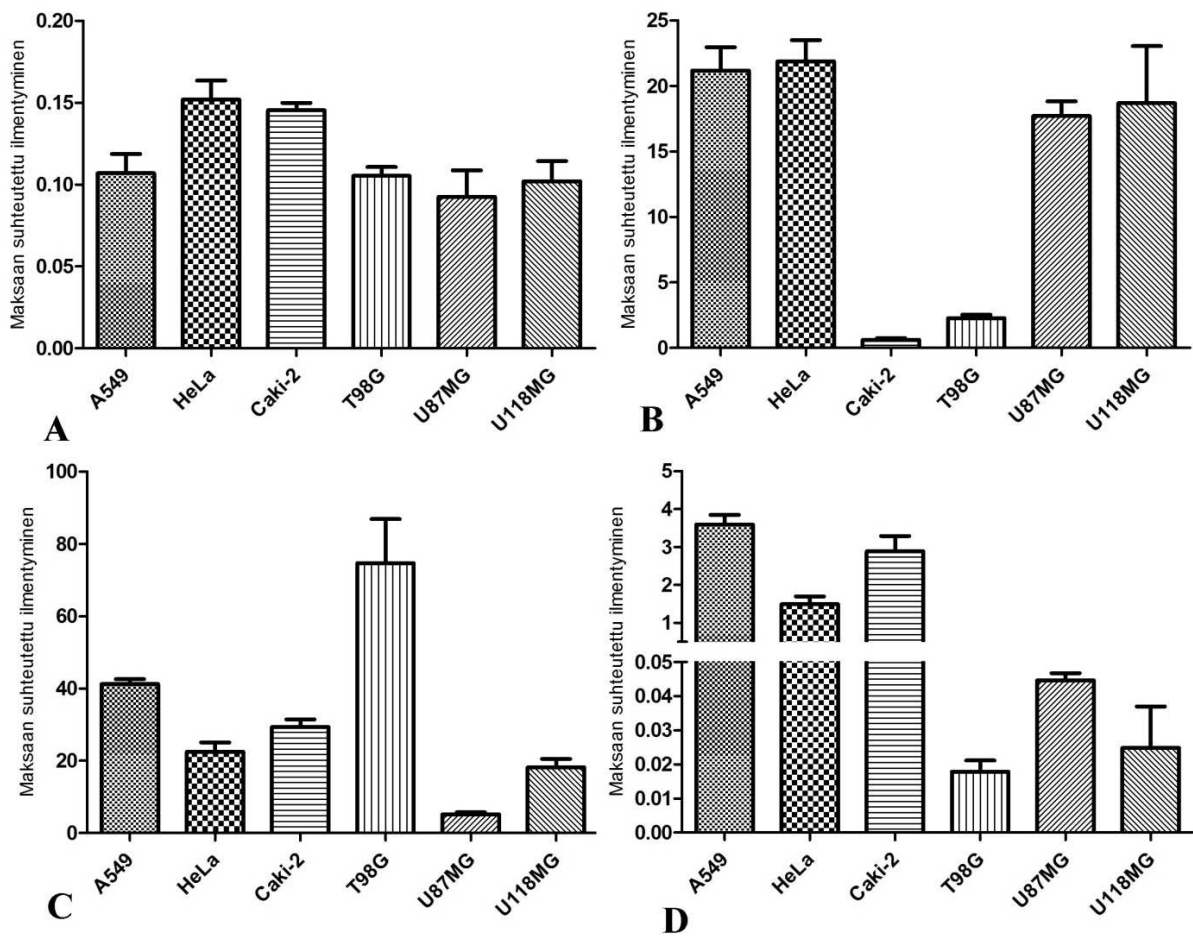
9.1 ABC-perheen kuljetinproteiinien RNA:n ilmentyminen syöpäsolulinjoissa

Seitsemästä syöpäsolulinjasta tutkittiin ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentymistä RNA-tasolla käyttäen q-PCR:ta. RNA eristettiin kahdesta rinnakkaisesta solunäytteestä, jotka analysoitiin PCR-ajossa kolmena rinnakkaisena. Näytteiden CT-arvot normalisoitiin β -aktiinin CT-arvoihin. Tämän jälkeen saatu tulos suhteutettiin edelleen maksan normalisoituihin CT-arvoihin, jotta kuljetinproteiinien merkityksen arviointi helpottuisi. Käytetty menetelmä oli puoli-kvantitatiivinen, minkä takia kuljetinproteiinien ilmentymistä ei voitu vertailla geenien välillä, vaan ainoastaan yhden geenin sisällä.

Tulosten perusteella P-gp näyttäisi ilmentyvän kaikissa solulinjoissa lähes samalla tasolla. Runsainta P-gp:n ilmentyminen on HeLa- ja Caki-2-solulinjoissa. Ilmentyminen on kuitenkin kaikissa solulinjoissa heikompaa verrattuna maksaan, jossa se ilmenee noin 6–10 kertaa korkeammalla tasolla solulinjoihin verrattuna (kuva 8A ja taulukko 12). BCRP sen sijaan ilmentyy noin 20 kertaa voimakkaammin A549-, U87MG-, U118MG- ja HeLa-solulinjoissa kuin maksassa. T98G:ssa ja Caki-2:ssa BCRP:n ilmentyminen on maksan tasolla (kuva 8B). T98G:ssa ja Caki-2:ssa BCRP:n ilmentyminen on huomattavasti muita solulinjoja heikompaa, muissa solulinjoissa se ilmentyy 8-35 kertaa T98G- ja Caki-2-solulinjoja voimakkaammin. Kirjallisuuden mukaan P-gp:n että BCRP:n on todettu ilmentyvän maksassa kohtalaisella tasolla (Fojo ym. 1987, Maliepaard ym. 2001, Hilgendorf ym. 2007).

Kuvassa 8C esitetään MRP1:n ilmentyminen solulinjoissa. Tulokset osoittavat, että MRP1 ilmentyy korkeimmalla tasolla T98G-solulinjassa. Siinä sen ilmentyminen on noin 2-14-kertaista verrattuna muihin solulinjoihin. MRP1 ilmentyy kaikissa solulinjoissa maksaa runsaammin. Heikointa ilmentyminen on U87MG -solulinjassa, mutta siinäkin MRP1 ilmentyy 5-kertaisesti maksaan verrattuna. MRP1:n voimakas ilmentyminen solulinjoissa selittyy sillä, ettei tätä kuljetinproteiinia esiinny ihmisen maksassa juuri lainkaan (König ym. 1999, Hilgendorf ym. 2007). Kuitenkin alhaisten CT-arvojen (noin 21–28) perusteella voidaan olettaa, että MRP1 ilmentyy solulinjoissa suhteellisen korkealla tasolla.

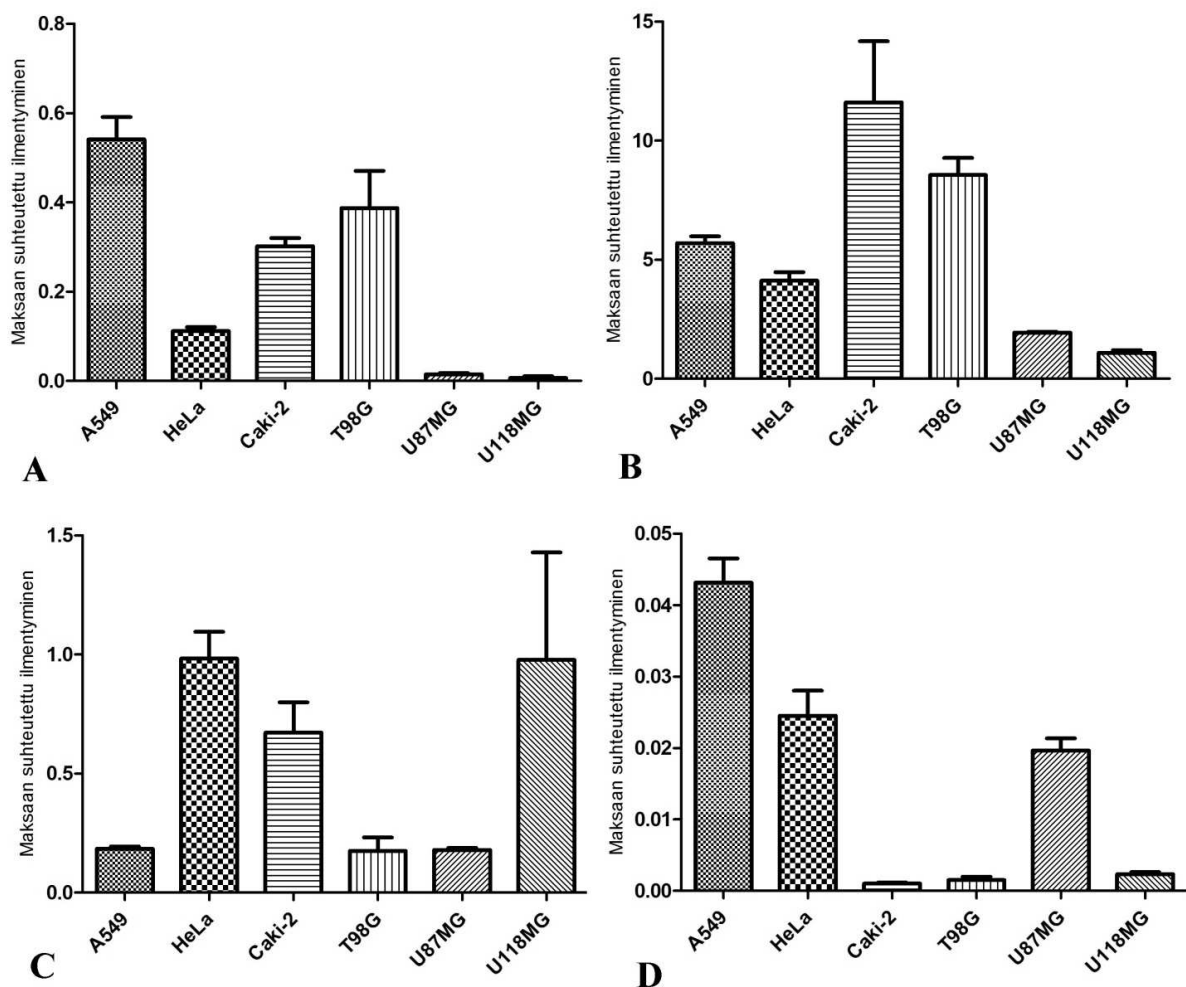
Kuvasta 8D nähdään, että MRP2 ilmentyy huomattavan paljon heikommin glioomasolulinjoissa (T98G, U87MG ja U118MG) kuin A549-, HeLa- ja Caki-2-solulinjoissa (kuva 8D). Ilmentyminen HeLa-solulinjassa on noin 44-kertaa korkeammalla tasolla kuin glioomasolulinjoissa. Myös ilmentyminen maksassa on runsasta verrattuna glioomasolulinjoihin, noin 20–50-kertaista. Sen sijaan muissa solulinjoissa MRP2 ilmentyy maksaa runsaammin, 2–4 -kertaisesti verrattuna maksaan. MRP2:n onkin kirjallisuudessa todettu ilmentyvän maksassa korkealla tasolla (Hilgendorf ym. 2007).



Kuva 8. A) P-gp:n, B) BCRP:n, C) MRP1 ja D) MRP2 ilmentyminen solulinjoissa maksan tasoihin suhteutettuna (keskiarvo \pm SEM, n=6).

Kuvasta 9A havaitaan, että MRP3:n ilmentyminen on voimakkainta A549:ssä, kun taas kahdessa glioomasolulinjassa (U87MG ja U118MG) se ilmentyy hyvin heikosti muihin solulinjoihin verrattuna. Esimerkiksi Caki-2-soluissa MRP3 ilmentyy noin 22-kertaa voimakkaammin kuin U87MG-solulinjassa. MRP3 ilmentyy kaikissa tutkituissa solulinjoissa alhaisemmalla tasolla kuin maksassa. Toisaalta kirjallisuudessa sen ilmentyminen on todettu maksassa runsaaksi (Kiuchi ym. 1988, König ym. 1999). Myös MRP4:n ilmentyminen on heikointa U87MG- ja U118MG-solulinjoissa (kuva 9B). Kuitenkin se ilmentyy maksaa voimakkaammin kaikissa tutkituissa solulinjoissa (1-12-kertaisesti). Kuvasta 9B nähdään, että kaikkein runsainta MRP4:n ilmentyminen on Caki-2-solulinjassa, missä se ilmentyy 12-kertaisesti maksaan verrattuna ja noin 6-kertaisesti verrattuna U87MG-solulinjaan.

Kuvasta 9C huomataan, että MRP5 ilmentyy runsaimmin HeLa-, U118MG-, ja Caki-2-solulinjoissa, joissa se ilmentyy noin 6-kertaisesti verrattuna sitä heikoiten ilmentäviin solulinjoihin (A549, T98G, U87MG). Maksaan verrattuna MRP5 ilmentyy solulinjoissa heikosti, ilmentyminen maksassa on noin 1–5 kertaa solulinjoja korkeammalla tasolla. Toisaalta MRP5:n ilmentyminen maksassa on todettu kirjallisuudessa alhaiseksi (Hilgendorf ym. 2007). Myös MRP6 ilmentyy kaikissa solulinjoissa heikosti verrattuna maksaan. Maksassa se ilmentyy noin 25–1000 kertaa voimakkaammin kuin solulinjoissa (kuva 9D). Runsainta ilmentyminen on A549:ssä, jossa se ilmentyy noin 29-kertaisesti verrattuna solulinjoihin, joissa ilmentyminen on heikointa (Caki-2, T98G, U118MG). MRP6:n on todettu ilmentyvän maksassa kohtalaisella tasolla (Kool ym. 1999, Hilgendorf ym. 2007). MRP6:n ilmentyminen poikkeaa CT-arvojen perusteella usealla yksiköllä monessa solulinjassa (A549, HeLa, Caki-2 ja T98G) muista kuljetinproteiineista. Sen CT-arvot olivat välillä 30–36 ja ne olivat muiden kuljetinproteiinien arvoja suurempia solulinjoissa.



Kuva 9. A) MRP3:n, B) MRP4:n, C) MRP5:n ja D) MRP6:n ilmentyminen solulinjoissa maksan tasoihin suhteutettuna (keskiarvo \pm SEM, n=6).

Solulinjoja keskenään vertailtaessa voitiin päätellä, että kaikki tutkitut kuljetinproteiinit ilmentyivät A549 ja HeLa solulinjoissa vähintään kohtalaisella tasolla (taulukko 11). Yleisesti ottaen BCRP, MRP1, MRP2 ja MRP4 ilmentyivät solulinjoissa korkealla tasolla maksaan verrattuna kun taas P-gp, MRP3, MRP5 ja MRP6 ilmentyivät solulinjoissa matalammalla tasolla kuin maksassa. Glioomasolulinjoissa erityisesti MRP3 ja MRP6 ilmentyivät hyvin heikosti.

Taulukko 11. Yhteenveto kuljetinproteiinien ilmentymisestä solulinjoissa. + ilmentyy selvästi verrattuna muihin solulinjoihin, ± ilmentyy heikommin verrattuna muihin solulinjoihin, - ilmentyy hyvin heikosti verrattuna muihin solulinjoihin.

	P-gp	BCRP	MRP1	MRP2	MRP3	MRP4	MRP5	MRP6
A549	+	+	+	+	+	+	±	+
U87MG	+	+	-	-	-	±	±	+
U118MG	+	+	+	-	-	±	+	-
HeLa	+	+	+	+	±	+	+	+
Caki-2	+	-	+	+	+	+	+	-
T98G	+	-	+	-	+	+	±	-

Taulukko 12. Kuljetinproteiinien ilmentyminen solulinjoissa verrattuna maksaan.

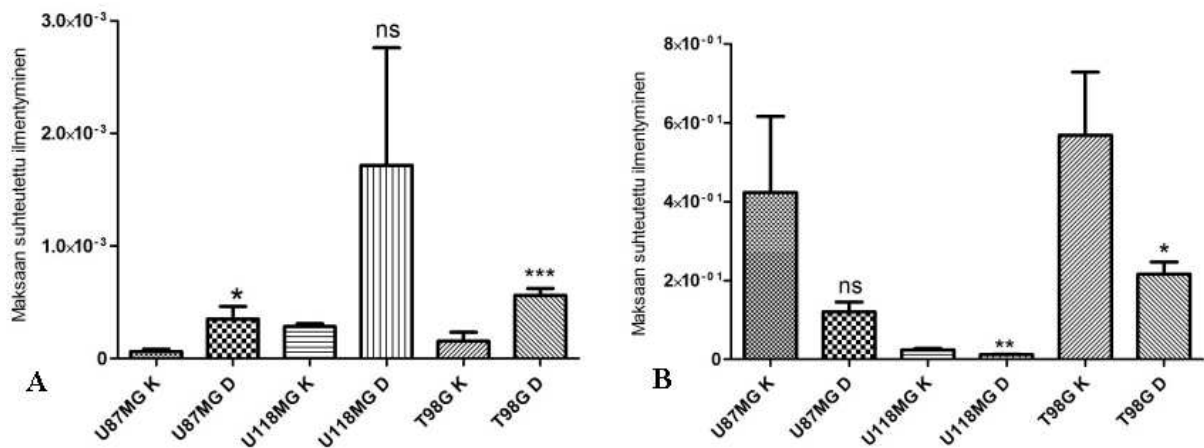
Kuljetinproteiini	Kertaisuusero maksaan	Taso maksaan verrattuna	Taso maksassa kirjallisuudessa	Lähde
P-gp	~ 0,1	Alhaisempi	Kohtalainen	Fojo ym. 1987, Hilgendorf ym. 2007
BCRP	~ 1-21	Korkeampi	Kohtalainen	Maliepaard ym. 2001, Hilgendorf ym. 2007
MRP1	~5-75	Korkeampi	Hyvin matala	König ym. 1999, Hilgendorf ym. 2007
MRP2	~ 0,02 – 3,5	Alhaisempi/korkeampi	Korkea	Guardigli ym. 2005, Hilgendorf ym. 2007
MRP3	~ 0,02- 0,5	Alhaisempi	Korkea	Kiuchi ym. 1988, König ym. 1999
MRP4	~1-12	Korkeampi	Matala	Hilgendorf ym. 2007
MRP5	~0,2 -1	Alhaisempi	Matala	Hilgendorf ym. 2007
MRP6	~0,001- 0,04	Alhaisempi	Kohtalainen	Kool ym. 1999, Hilgendorf ym. 2007

9.2 Doksorubisiinialtistuksen vaikutus ABC-perheen kuljetinproteiinien ilmentymiseen

Doksorubisiinin vaikutusta kuljetinproteiinien ilmentymiseen tutkittiin neljässä glioblastoomasolulinjassa (U87MG, U118MG, T98G ja BT4C) q-PCR:lla. Tutkimukseen valittiin neljä kuljetinproteiinia (P-gp, MRP1, MRP2 ja BCRP), joiden substraatti doksorubisiinin tiedetään olevan (Sharom 2008, Fletcher ym. 2010). Tulokset suhteutettiin maksan CT-arvoihin, kuten edellä on kuvattu.

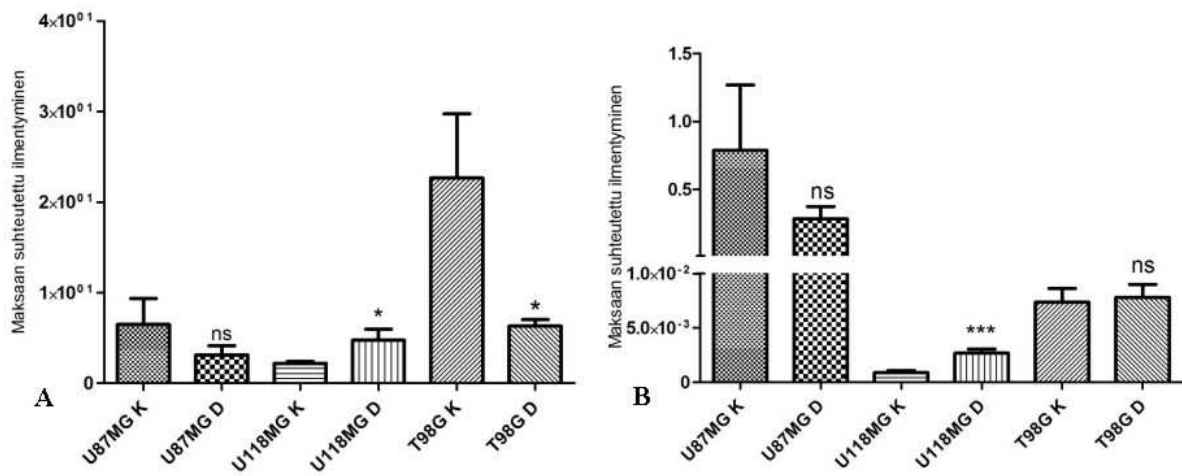
P-gp:n ilmentyminen näyttäisi kasvavan kaikissa solulinjoissa altistuksen seurauksena (kuva 10A ja taulukko 13). U87MG:ssa havaitaan tilastollisesti lähes merkittävä noin 6-kertainen kasvu kontrolliin verrattuna. Myös U118MG:ssa havaitaan 6-kertainen kasvu keskiarvoissa kontrolliin verrattuna, mutta suuren hajonnan vuoksi tulos ei ole merkittävä. Lisäksi T98G:ssa P-gp:n ilmentyminen lisääntyy erittäin merkittävästi verrattuna kontrolliin (noin 4-kertainen kasvu).

Sen sijaan BCRP:n määrä pienenee kaikissa solulinjoissa doksorubisiinialtistuksen seurauksena (kuva 10B). BCRP:n ilmentyminen heikkenee U87MG:ssa noin 0,3-kertaiseksi verrattuna kontrolliin, mutta tulos ei ole tilastollisesti merkittävä. Sen sijaan U118MG:ssa altistus alentaa BCRP:n ilmentymistä merkittävästi, noin puoleen kontrollin ilmentymistasoista. Myös T98G:ssa havaitaan melkein merkittävä ilmentymisen heikkeneminen verrattuna kontrolliin 0,4-kertaiseksi.



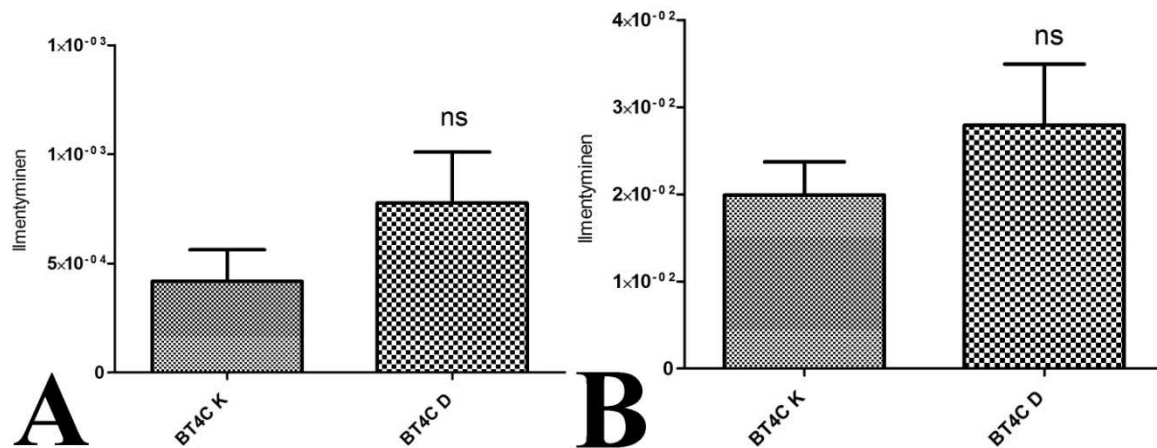
Kuva 10. A) P-gp:n ja B) BCRP:n ilmentymisen muutos doksorubisiinilla altistettuna (D) verrattuna kontrolliin (K). Tilastollisena menetelmänä käytettiin kaksisuuntaista student t-testiä (p-arvot: ns > 0,05; * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; n=16).

MRP1:n ilmentyminen kasvaa U118MG:ssa doksorubisiini-altistuksen seurauksena 2-kertaiseksi ja tämä on lähes merkittävä (kuva 11A). Kuitenkin T98G:ssa havaitaan melkein merkittävä ilmentymisen pieneneminen, 0,3-kertaiseksi verrattuna kontrolliin. Kuvasta 11A huomataan, että U87MG:ssa MRP1:n ilmentyminen pienenee puoleen, mutta tulos ei ole merkittävä. Kuvasta 11B nähdään, että MRP2:n määrä kasvaa erittäin merkittävästi U118MG:ssa, 3-kertaiseksi. Kuitenkin U87MG:ssa huomataan ilmentymisen heikentyminen 0,4-kertaiseksi, mutta se ei ole merkittävä.



Kuva 11. A) MRP1:n ja B) MRP2:n ilmentyminen altistuskokeessa. Tilastollisena menetelmänä käytettiin kaksisuuntaista student t-testiä (p-arvot: ns > 0,05; * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; n=16).

BT4C-solulinja on rotasta eristetty, joten sitä ei voitu suhteuttaa maksaan, koska käytettävissä ei ollut rotan maksa. Tulosten perusteella MRP2 ja BCRP geenit eivät ilmenny lainkaan solulinjassa. P-gp:n ja MRP1:n geenien ilmentyminen näyttäisi heiman kasvavan altistuksen vaikutuksesta, mutta erot eivät ole merkittäviä (kuva 12).



Kuva 12. BT4C-solulinjassa altistuskokeessa kuljetinproteiinien ilmentyminen A) P-gp, B) MRP1. Tilastollisena menetelmänä käytettiin kaksisuuntaista student t-testiä (p-arvot: ns > 0,05; * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; n=16).

Taulukossa 13 esitetään yhteenveto saaduista tuloksista. P-gp:n ilmentyminen näyttäisi kasvavan dokсорubisiinialtistuksen vaikutuksesta kaikissa tutkituissa solulinjoissa. BCRP:n ilmentyminen puolestaan näyttäisi heikentyvän solulinjoissa. MRP1:n ja MRP2:n kohdalla ilmentyminen joko kasvaa tai heikkenee solulinjasta riippuen. BT4C-solulinjassa P-gp:n ja MRP1:n ilmentyminen kasvaa mutta ei merkittävästi.

Taulukko 13. Yhteenveto altistuskokeen tuloksista. Luku kertoo kertaisuuseron kontrolliin verrattuna. Nuoli kuvaa muutokseen suuntaa kontrollista altistettuun ja tähdet kuvaavat tulosten merkitsevyydestä Tilastollisena menetelmänä käytettiin kaksisuuntaista student t-testiä (ns = ei merkitsevä (p > 0,05), * = melkein merkitsevä (p < 0,05), ** = merkitsevä (p < 0,01), *** = erittäin merkitsevä (p < 0,001)).

Solulinja	P-gp	BCRP	MRP1	MRP2
U87MG	5,6 ↑ *	0,3 ↓ ns	0,5 ↓ ns	0,4 ↓ ns
U118MG	6,0 ↑ ns	0,5 ↓ **	2,1 ↑ *	3,0 ↑ ***
T98G	3,6 ↑ ***	0,4 ↓ *	0,3 ↓ *	1,0 ↔
BT4C	1,9 ↑ ns		1,4 ↑ ns	

10 POHDINTA

10.1 Solulinjojen karakterisointi

Kuudesta ihmisen pahanlaatuisesta syöpäsolulinjasta (U87MG, U118MG, T98G, Caki-2, HeLa ja A549) karakterisoitiin kahdeksan ABC-perheeseen kuuluvan kuljetinproteiinin (P-gp, MRP1-6 ja BCRP) ilmentyminen RNA-tasolla q-PCR:ta käyttäen. Tulosten perusteella P-gp ilmentyi tasaisesti kaikissa solulinjoissa, kun taas muilla kuljetinproteiineilla oli enemmän hajontaa solulinjojen välillä. A549- ja HeLa-solulinjoissa kuljetinproteiinien ilmentyminen oli korkeimmalla tasolla verrattuna muihin solulinjoihin. Tutkimuksessa karakterisoitiin U118MG-solulinjan kuljetinproteiinien ilmentyminen, mistä ei löydy julkaistuja tutkimustuloksia. Myös HeLa- ja Caki-2-solulinjat karakterisoitiin tarkemmin kuin kirjallisuudessa on aiemmin kuvattu.

Tutkimuksessa saadut tulokset olivat osittain ristiriitaisia verrattuna kirjallisuuteen (taulukko 14). U87MG-solulinjan kohdalla tässä tutkimuksessa saadut tulokset P-gp, MRP2, MRP3 ja MRP4 geenien kohdalla ovat jonkin verran ristiriidassa kirjallisuuden kanssa (Bähr ym. 2003). Aiemmin on esitetty, että P-gp, MRP2, MRP3 ja MRP4 eivät ilmentyisi U87MG:ssa, mutta tässä tutkimuksessa kaikki geenit ilmentyivät tutkitussa solulinjassa (Bähr ym. 2003). Eräänä selittävänä tekijä voi olla tutkimuksissa käytettyjen PCR-menetelmien erilaisuus. Myös T98G-solulinjassa MRP2 ja MRP5 todettiin tässä työssä ilmentyvän kun taas aiemmissa tutkimuksissa näiden ilmentymistä ei havaittu (kuva 8D) (Bähr ym. 2003, Nakai ym. 2009).

MRP1:n ja BCRP:n tulokset olivat melko hyvin linjassa kirjallisuuden kanssa (Robey ym. 2001, Bähr ym. 2003, Ee ym. 2004, Takara ym. 2009). MRP6:n osalta ei kirjallisuudesta löytynyt tutkimuksia tutkituilla solulinjoilla. Syynä ristiriitoihin heikosti ilmenevillä kuljetinproteiineilla saattaa mahdollisesti olla eri PCR-menetelmien herkkyys tunnistaa pieniä määriä kuljetinproteiineja. Lisäksi kasvatusolosuhteilla saattaa mahdollisesti olla vaikutusta kuljetinproteiinien ilmentymiseen. Kasvatuksen aikana kuljetinproteiinien ilmentymisessä saattaa myös tapahtua muuntumista.

Taulukko 14. Kuljetinproteiinien mRNA-tason ilmentyminen solulinjoissa. Vasemmalla puolella kirjallisuudesta löytyvä tulos (K) ja oikealla tässä tutkimuksessa saatu (T). + ilmentyy kohtalaisesti tai runsaasti, ± ilmentyy heikosti, - ei ilmenny lainkaan, * tutkittu proteiinitasolla, tyhjä ei löydy kirjallisuudesta.

Solulinja	P-gp		MRP1		MRP2		MRP3		MRP4		MRP5		MRP6		BCRP		Lähteet
	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	
A549	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	±	+	Lehmann 2001, Lee ym. 2007, Huang ym. 2006, Torkey ym. 2005, Robey ym. 2001
HeLa	-*	+	-*	+		+		+		+		+		+	+	+	De Rosa ym.2004, Takara ym. 2009, Ee ym. 2004, Laberge ym. 2007
Caki-2		+		+		+		+		+		+		±		±	
U87MG	-	+	±	+	-	±	-	±	-	+	±	+		+		+	Nakai ym. 2009, Tanaka ym. 2000, Mohri ym. 2000, Bähr ym. 2003
U118MG		+		+		±		±		+		+		±		+	
T98G	+	+	+	+	-	±	+	+	±	+	-	+		±	+	±	Erichman 2001, Mohri ym. 2000, Bähr ym. 2003

Tässä tutkimuksessa käytettiin positiivikontrollina ihmisen maksaa, koska siinä ilmentyy runsaasti ABC-perheen kuljetinproteiineja ja ilmentymisen tasot tunnetaan melko hyvin (Hilgendorf ym. 2007). Solulinjojen tulokset suhteutettiin maksan ilmentymistasoihin, jotta saatiin suuntaa kuljetinproteiinien ilmentymistasoista solulinjoissa.

Ihmisen maksassa on MRP2:n ja MRP3:n ja BCRP:n todettu ilmentyvän kohtalaisella tasolla (Kiuchi ym. 1988, König ym. 1999, Hilgendorf ym. 2007, Qadri ym. 2009). Osassa tutkituista solulinjoista näiden kuljetinproteiinien havaittiin ilmentyvän maksaa korkeammalla tasolla (kuvat 8 ja 9), mikä saattaa viitata siihen, että näiden kuljetinproteiinien merkitys tutkituissa solulinjoissa on suuri. Erityisesti BCRP:n ilmentyminen oli voimakasta, mistä voidaan päätellä, että BCRP on todennäköisesti merkittävä kuljetinproteiini tutkituissa solulinjoissa. Toisaalta maksanäytteen BCRP:n ilmentyminen oli PCR-tulosten perusteella melko heikkoa, mikä voi mahdollisesti vääristää tulosta.

MRP5 ja MRP6 ilmentyivät solulinjoissa maksan tasolla tai sitä alhaisemmalla tasolla (kuvat 9C ja 9D). Voi olla, että MRP5:n ja MRP6:n merkitys on muita kuljetinproteiineja vähäisempi tutkituissa solulinjoissa, sillä niiden on todettu ilmentyvän maksassa heikolla tai kohtalaisella tasolla (Hilgendorf ym. 2007). Myös P-gp:n ilmentyminen solulinjoissa maksaan verrattuna oli heikkoa. Sillä voisi olla kuitenkin merkitystä solulinjoissa, koska ilmentyminen maksassa oli tutkituista kuljetinproteiineista voimakkainta maksan CT-arvojen perusteella.

Ilmentymisten maksaan suhteuttamisen heikkoutena on, että maksassa ei ilmenny kaikkia tutkituista kuljetinproteiineista. MRP1 ei ilmenny maksassa juuri lainkaan (Hilgendorf ym. 2007). Lisäksi MRP4 ja MRP5 on todettu ilmentyvän maksassa hyvin alhaisella tasolla (Hilgendorf ym. 2007). Näiden proteiinien maksaan suhteutettu ilmentyminen antoi suuria arvoja, mutta niiden todellista merkitystä on kuitenkin vaikea arvioida. Tutkimukseen olisi ollut hyvä ottaa lisäksi toinenkin runsaasti kuljetinproteiineja sisältävä näyte, esimerkiksi ihmisen munuainen tai solulinja, jossa kuljetinproteiinien ilmentyminen tiedetään runsaaksi. Myös negatiivikontrolli, jossa kuljetinproteiinien tasojen tiedetään olevan alhaisia, olisi mahdollisesti ollut hyödyllinen. Tällöin kuljetinproteiinien ilmentymistasoja olisi voitu mahdollisesti arvioida luotettavammin.

PCR on saattanut aiheuttaa virheitä tuloksiin, koska menetelmä on hyvin herkkä. Samasta näytteestä saatiin kahdessa eri mittauksessa poikkeavia tuloksia. Syynä eroihin saattoivat mahdollisesti olla pipetointivirheet. Kokeet olisi ollut hyvä toistaa, jotta virheiden merkitys vähenisi. Myös β -aktiiniin suhteuttaminen saattaa aiheuttaa virhettä tuloksiin, mikäli sen mittauksessa on tullut virheitä. Toisen endogeenisen geenin lisääminen voisi parantaa tulosten luotettavuutta. Lisäksi olisi erityisen tärkeää määrittää kuljetinproteiinien ilmentyminen proteiinitasolla RNA-tason lisäksi. Veriaivoesteen kuljetinproteiinien ilmentymistä tutkittaessa on todettu, että vaikka proteiini ilmentyy RNA-tasolla, sitä ei välttämättä havaita proteiinitasolla (Cooray ym. 2002).

Kuljetinproteiinien ilmentymisen ja solulinjojen doksorubisiinin IC50-arvojen välillä näyttäisi olevan heikko korrelaatio. Tutkituista solulinjoista A549:lle ja HeLa:lle ei ollut määritetty IC50-arvoja. Solulinjoista Caki-2:lla oli suurin IC50-arvo (n. 14 μ M). Seuraavana oli T98G (n. 8,1 μ M), U87MG (n. 4,5 μ M) ja alhaisin U118MG (n. 4,4 μ M). Kuljetinproteiinien ilmentyminen korreloi IC50-arvoihin melko hyvin. Eniten kuljetinproteiineja ilmentyi Caki-2-solulinjassa, sitten T98G:ssa ja U87MG:ssa. U118MG kuitenkin poikkesi linjasta, siinä kuljetinproteiineja ilmentyi samankaltaisella profiililla kuin T98G-solulinjassa. IC50-arvojen ja kuljetinproteiinien välillä oleva korrelaatio saattaa kertoa kuljetinproteiinien vaikutuksesta resistenssin muodostumiseen.

10.2 Lääkeainealtistuksen vaikutus kuljetinproteiinien ilmentymiseen

Vuorokauden mittaisen doksorubiini-altistuksen vaikutusta neljän kuljetinproteiinin (P-gp, BCRP, MRP1 ja MRP2) ilmentymiseen tutkittiin kolmessa ihmisen glioblastoomasolulinjassa (U87MG, U118MG ja T98G) sekä rotan glioblastoomasolulinjassa (BT4C). U118MG ja BT4C soluissa ei ole aiemmin tutkittu doksorubiini-altistuksen vaikutusta. Puolestaan U87MG:ssa ja T98G:ssa vastaavia tutkimuksia on suoritettu hieman erilaisella pitoisuudella ja altistusajalla (taulukko 7). Tässä tutkimuksessa tutkittiin myös doksorubiini-altistuksen vaikutusta MRP2:n ilmentymiseen, mitä ei ole aiemmin julkaistu.

MRP2:n ja BCRP:n ei havaittu ilmentyvän BT4C:ssa lainkaan. Altistuksen seurauksena BT4C:ssa ei havaittu P-gp:ssa eikä MRP1:ssä tilastollisesti merkittävää muutosta, vaikka kummankin geenin ilmentymisessä havaittiin altistuksen seurauksena hieman nousua. Vastaavia tutkimuksia, joissa olisi tutkittu BT4C-solulinjan kuljetinproteiinien tasoja, ei löytynyt kirjallisuudesta.

Lääkeainealtistuksen on aiemmissa tutkimuksissa todettu lisäävän solulinjan resistenttiyttä. Kuljetinproteiinien määrän on todettu kasvavan lääkeainealtistuksen seurauksena, mikä saattaa olla yksi selittävä tekijä resistenssin lisääntymisessä (Rittierodt ja Harada 2003). Kuljetinproteiinien määrän kasvu voi mahdollisesti johtua solulinjan muuntumisesta ympäristötekijöiden vaikutuksesta. Kuljetinproteiinien ilmentyminen saattaa myös tehostua, kun syöpäsolu pyrkii poistamaan haitallista lääkeainetta solusta.

Tuloksista huomattiin, että doksorubisiini-altistus nosti P-gp:n ilmentymisen tasoa U87MG:ssa noin 6-kertaisesti verrattuna kontrolliin, mikä oli myös tilastollisesti melkein merkittävä tulos (kuva 10A). Tästä poiketen aiemmin on havaittu samassa solulinjassa 24 tuntia kestävä doksorubisiini-altistuksen nostavan P-gp:n määrää 1,2-kertaiseksi kontrolliin verrattuna (Rittierodt ja Harada 2003). Tutkimuksessa käytetty doksorubisiinin pitoisuus oli 0,2 μM . Tässä tutkimuksessa pitoisuus sen sijaan oli hieman suurempi, 4,4 μM , mikä saattaa mahdollisesti selittää suuremman P-gp:n ilmentymisen kasvun. Toisaalta toisessa tutkimuksessa 50 μM doksorubisiinipitoisuuden havaittiin nostavan P-gp:n ilmentymistasoa U87MG:ssa noin 3-kertaisesti (Vanpouille ym. 2009). Kyseisessä tutkimuksessa käytetty altistusaika oli kuitenkin pitkä, mikä saattaa vaikuttaa tuloksiin. Tutkimuksessa havaittiin myös resistenssin doksorubisiinille ja ristiresistenssin kahdelle muulle syöpälääkkeelle (sisplatiini ja paklitakseli) kasvavan, doksorubisiinin LD50-arvo kasvoi 36-kertaiseksi altistuksen seurauksena.

BCRP:n ilmentymistason todettiin laskevan kahdessa solulinjassa (U118MG ja T89G), noin puoleen kontrollista (kuva 10B). Kuitenkin BCRP:n ilmentymisen on aiemmin havaittu kasvavan 20 tunnin doksorubisiini-altistuksen seurauksena keuhkosityöpäsolulinjoissa (Turner ym. 2006). Lisäksi on havaittu, että MRP1:n RNA taso kasvaa 24 tunnin doksorubisiini-altistuksen seurauksena myeloomasolulinjassa noin 3-kertaiseksi (Shinoda ym. 2005). Tässä tutkimuksessa myös todettiin, että MRP1-geenin ilmentyminen kasvoi U118MG-solulinjassa 2-kertaisesti. Toisaalta T98G-solulinjassa MRP1:n ilmentyminen pieneni 0,3-kertaiseksi verrattuna kontrolliin.

Aiemmissä tutkimuksissa on myös huomattu kuljetinproteiinien määrien alenevan lääkeaine-altistuksen seurauksena. Pitkäaikaisessa viikkoja kestäneessä doksorubisiini-altistuksessa pienellä pitoisuudella havaittiin, että P-gp:n määrä ja resistenttiys doksorubisiinille eivät muuttuneet T98G-solulinjassa (Rieger ym. 1999). Kuitenkin tässä tutkimuksessa P-gp:n määrän todettiin kasvavan noin 4-kertaiseksi kontrolliin verrattuna. Syynä eroon saattaa mahdollisesti olla suurempi pitoisuus. On myös mahdollista, että pidempiaikaisessa altistuksessa kuljetinproteiinien määrä palaa lähtötasolle, vaikka se alussa nousisi korkeammaksi. Palautuminen voi mahdollisesti tapahtua myös lyhytkestöisen altistuksen jälkeen.

Tutkimukset ovat osoittaneet, että altistettaessa toisella P-gp:n ja MRP1:n substraatilla, vinplastiinilla, P-gp:n määrä pieneni glioblastoomasolulinjassa (SF188) 24 tunnin altistuksen seurauksena (Valera ym. 2009). Kontrollissa se ilmentyi noin 30-kertaisesti verrattuna altistettuun. Toisaalta anaplastisessa astrozytomasolulinjassa (UW46) P-gp:n määrä kasvoi 4-kertaiseksi, mikä oli samansuuntainen tulos tässä tutkimuksessa saatujen tulosten kanssa. Tässä tutkimuksessa todettiin T98G:ssa P-gp:n ilmentymisen kasvavan noin 4-kertaisesti ja U87MG:ssa noin 6-kertaisesti. Lisäksi havaittiin, että MRP1 nousi hieman U118MG-solulinjassa. Toisaalta sen havaittiin laskevan T98G-soluissa. Myös aiemmin havaittiin, että 24 tunnin vinplastiini-altistus nosti MRP1:n määrää SF188-solulinjassa, noin 2-kertaiseksi kontrolliin verrattuna, mutta 72 tunnin jälkeen määrä oli laskenut alkuperäisestä noin viidesosaan (Valera ym. 2009).

Tutkimukset osoittavat solulinjojen reagoivan eri tavalla lääkeainealtistukseen ja kasvattavan tai pienentävän eri kuljetinproteiinien määriä. Syynä kuljetinproteiinien ilmentymistasojen heikkenemiseen altistuksen seurauksena saattaa olla muiden kuljetinproteiinien ilmentymisen tehostuminen, jolloin ne kompensoisivat toisten määrän pienenemistä. Tässä tutkimuksessa havaittiin, että samassa solulinjassa joidenkin kuljetinproteiinien ilmentyminen kasvoi ja toisten aleni. Myös Valeran ja kumppaneiden tutkimuksessa havaittiin sama SF188- ja UW46-solulinjoissa (Valera ym. 2009). Lisäksi he havaitsivat, että 24 tunnin vinplastiinialtistus alensi BCRP:n määrää UW46-solulinjassa, vaikka vinplastiini ei ole BCRP:n substraatti. Tulosten perusteella arveltiin, että syynä kuljetinproteiinien määrän alenemiseen saattoi mahdollisesti olla geenin transkriptiota säätelevien molekulaaristen reittien muutos.

Syynä kuljetinproteiinien määrän pienenemiseen altistuksen seurauksena voisi olla myös muiden resistenssimekanismien lisääntyminen, jolloin kuljetinproteiinien merkitys pienenesi. On myös mahdollista, että kuljetinproteiineja ilmennetään jo maksimitasolla solussa, jolloin niiden määrää ei voida enää lisätä. On kuitenkin huomioitava, että tutkimuksissa ei tutkittu lääkeaineen toksisuutta, joten ei voida tietää, ovatko solulinjat muuttuneet resistentimmiksi altistuksen aikana.

11 YHTEENVETO

Kuljetinproteiinien ilmentyminen vaihteli solulinjoissa. Tutkituista syöpäsolulinjoista HeLa- ja A549-solulinjoissa ABC-perheen kuljetinproteiineja ilmentyi runsaimmin. Tutkimuksessa löydettiin doksorubisiinin IC50-arvojen ja kuljetinproteiinejen ilmentymisen välille heikko korrelaatio ja voidaan olettaa, että solulijat, joissa ilmentyy runsaasti ABC-perheen kuljetinproteiineja, ovat resistentimpiä syöpälääkkeille. Tutkituista kuljetinproteiineista ainakin MRP2:n ja BCRP:n pääteltiin olevan solulinjoissa merkittäviä, koska ne ilmentyivät solulinjoissa maksaa runsaammin ja niiden ilmentyminen ihmisen maksassa on todettu korkeaksi tai kohtalaiseksi (Hilgendorf ym. 2007). MRP5:n ja MRP6:n merkitys solulinjoissa sen sijaan todettiin vähäiseksi. Myös MRP1 ja MRP4 ilmentyivät solulinjoissa maksaa runsaammin. Niiden ilmentyminen on kuitenkin todettu maksassa heikoksi (Hilgendorf ym. 2007).

Doksorubisiinialtistuksen havaittiin muuttavan kuljetinproteiinien ilmentymistä solulinjoissa. Merkittävimmät muutokset todettiin U118MG-solulinjassa MRP2:lla, jonka ilmentyminen kasvoi 3-kertaiseksi ja T98G:ssa P-gp:lla, jonka ilmentyminen suureni 4-kertaiseksi. Toisaalta solulinjoissa havaittiin myös kuljetinproteiinien ilmentymisen heikentymistä altistuksen seurauksena. Kuljetinproteiineista P-gp:n ilmentyminen voimistui kaikissa solulinjoissa, kun taas BCRP:n ilmentyminen heikentyi.

12 KIRJALLISUUS

Abbott N, Patabendige A, Dolman D, Yusof S ja Begleya D: Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease* 37: 13-25, 2009

Abbott N, Rönnbäck L ja Hansson E: Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 41-53, 2006

Abraham J, Edgerly M, Wilson R ym: A Phase I Study of the P-Glycoprotein Antagonist Tariquidar in Combination with Vinorelbine. *Clin Cancer Res* 15; 3574, 2009

Woehlecke M, Sampath J, Lan L ym: Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem* 277(41):38998-9004, 2002

Alarm M, Beg S, Samad A: Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40:385-403, 2010

Allen J, van Loevezijn A, Lakh J ym: Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 1: 417, 2002

Ambudkar S ym: P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22. 7468–7485, 2003

Bakos E ja Homolya L: Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Eur J Physiol* 453:621–641, 2007

Baran Y, Gür B, Kaya P, Ural A, Avcu F ja Gündüz U: Upregulation of multi drug resistance genes in doxorubicin resistant human acute myelogenous leukemia cells and reversal of the resistance. *Hematology*. 12(6):511-7, 2007

Bardelmeijer H, Ouwehand M, Beijnen J, Schellens J ja van Tellingen O: Efficacy of novel P-glycoprotein inhibitors to increase the oral uptake of paclitaxel in mice. *Investigational New Drugs* 22: 219–229, 2004.

Begley D: Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45, 2004

Bendayan R, Ronaldson P, Gingras D ja Bendayan M: In Situ Localization of P-glycoprotein (ABCB1) in Human and Rat Brain. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 54: 1159-1167, 2006

Benyahia B, Huguet S, Declèves X ym: Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. *J Neurooncol.* 66(1-2):65-70, 2004

Boyle F, Eller S ja Grossman S: Penetration of intra-arterially administered vincristine in experimental brain tumor. *Neuro-oncol.* 6: 300–305, 2004

Breedveld P, Plum D, Cipriani G ym: The Effect of Bcrp1 (Abcg2) on the In vivo Pharmacokinetics and Brain Penetration of Imatinib Mesylate (Gleevec): Implications for the Use of Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Inhibitors to Enable the Brain Penetration of Imatinib in Patients. *Cancer Res* April 65: 2577, 2005

Brent T, Houghton P ja Houghton J: O6-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity correlates with the therapeutic response of human rhabdomyosarcoma xenografts to 1-(2-chloroethyl)-3-(trans-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(9):2985-9, 19985

Brewster M, Raghavan K, Pop E, Bodor N: Enhanced delivery of ganciclovir to the brain through the use of redox targeting. *Antimicrob Agents Chemother.* 38(4):817-23, 1994

Bronger H, König J, Kopplow K: ABCC Drug Efflux Pumps and Organic Anion Uptake Transporters in Human Gliomas and the Blood-Tumor Barrier. *Cancer Res* 65: 11419, 2005

Broniscer A, Gururangan S, MacDonald T ym: Phase I Trial of Single-Dose Temozolomide and Continuous Administration of O6-Benzylguanine in Children with Brain Tumors: a Pediatric Brain Tumor Consortium Report. *Clin Cancer Res* 13:6712, 2007

Byun S, Kim S, Choi H, Lee C ja Lee E: Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU International* 95:1086–1090, 2005

Bähr O. ym: P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell lines, but not in primary glioma cells. *Brain Pathology* 2003

Calatuzzolo C, Gelati M, Ciusani E, ym: Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST-p in human glioma. *Journal of Neuro-Oncology* 74:113–121, 2005

Chang X: A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev* 26:15–37, 2007

Chen Z-S, Hopper-Borge E, Belinsky M ym. Characterization of the Transport Properties of Human Multidrug Resistance Protein 7 (MRP7, ABCC10), *Molecular Pharmacology* 63: no. 2: 351-358, 2003

Cheung CH, Wu SY, Lee T ym: Cancer cells acquire mitotic drug resistance properties through beta I-tubulin mutations and alterations in the expression of beta-tubulin isotypes. *PLoS One*. 5(9):e12564, 2010

Chi K, Chia K, Dixon R ym: A phase I pharmacokinetic study of the P-glycoprotein inhibitor, ONT-093, in combination with paclitaxel in patients with advanced cancer. *Investigational New Drugs* 23: 311–315, 2005.

Chomczynski P ja Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162(1):156-9, 1987

Chu X, Suzuki H, Ueda K, Kato Y, Akiyama S ja Sugiyama Y: Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*. 288(2):735-41, 1999

Clemons M, Kelly J, Watson A ym: O6-(4-bromophenyl)guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *Br J Cancer*.93(10):1152-6, 2005

Cloughesy T, Gobin P, Black K ym: Intra-arterial carboplatin chemotherapy for brain tumors: a dose escalation study based on cerebral blood flow. *J Neurooncol*. 35(2):121-31, 1997

Cooray H, Blackmore C, Maskel, L ja Barrant Margery: Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *NeuroReport* 13: 2059-2063, 2002

Cusack J Jr, Liu R ja Baldwin S Jr: Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* 60(9):2323-30, 2000

Deeken J ja Löscher W: The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res* 13:1663, 2007

Declèves X, Fajac A, Lehmann-Che J ym: Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines. *Int J Cancer.* 98(2):173-80, 2002

Declèves X, Amiel A, Delattre J ja Schermann J: Role of ABC Transporters in the Chemoresistance of Human Gliomas. *Current Cancer Drug Targets* 6:433-445, 2006.

Doyle L, Yang W, Abruzzo L ym: A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *PNAS* 95:15665-15670, 1998

DrugBank. Departments of Computing Science & Biological Sciences, University of Alberta. Päivitetty vuonna 2011. Haettu internetistä 9.3.2011: <http://drugbank.ca/>

Ee P, He X, Ross D ja Beck W: Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference. *Mol Cancer Ther.* 3(12):1577-83, 2004

Elonen E: Kasvainten lääkehoito. Kirjassa: Farmakologia ja Toksikologia, ss.951-989, 7. painos. Toim. Koulu M ja Tuomisto J, Medicina, Kuopio 2007

El-Sheikh A, van den Heuvel J, Koenderink J, Russel F: Effect of hypouricaemic and hyperuricaemic drugs on the renal urate efflux transporter, multidrug resistance protein 4. *Br J Pharmacol.* 155(7):1066-75, 2008

Emerich D, Snodgrass P, Dean R ym: Enhanced delivery of carboplatin into brain tumours with intravenous Cereport™ (RMP-7): dramatic differences and insight gained from dosing parameters. *Br J Cancer.* 80:964-970, 1999

Erlichman C, Boerner S, Hallgren C ym: The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux. *Cancer Res.* 61(2):739-48, 2001

Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S ym: Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer.* 2011

Fletcher J, Haber M, Henderson M ja Norris M: ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer* 10, 147-156, 2010

Fojo A, Ueda K, Slamon D, Poplack D, Gottesman M, Pastan I: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(1):265-9, 1987

Fox E ja Bates S: Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert rev. Anticancer Ther.* 7: 447-459, 2007

Fruehauf J, Brem H, Brem S ym: In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clin Cancer Res.* 12(15):4523-32, 2006

Gandhi L, Harding M, Neubauer M ym: A phase II study of the safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor VX-710 combined with doxorubicin and vincristine in patients with recurrent small cell lung cancer. *Cancer* 109(5):924-32, 2007

GeneCards. Weizmann Institute of Science 1996, Päivitetty vuonna 2010. Haettu Internetistä 22.10.2010: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB1&search=mdr1>

Gerson S: MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 4(4):296-307, 2004

Grabb PA ja Gilbert M: Neoplastic and pharmacological influence on the permeability of an in vitro blood-brain barrier. *J Neurosurg.* 82(6):1053-8, 1995

Greig N, Soncrant T, Shetty H, Momma S, Smith Q ja Rapoport S: Brain uptake and anticancer activities of vincristine and vinblastine are restricted by their low cerebrovascular permeability and binding to plasma constituents in rat. *Cancer Chemother Pharmacol.* 26(4):263-8, 1990

Guardigli M, Marangi M, Casanova S, Grigioni W, Roda E ja Roda A: Chemiluminescence Quantitative Immunohistochemical Determination of MRP2 in Liver Biopsies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 53(12): 1451–1457, 2005

Haga S, Hinoshita E, Ikezaki K ym. Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. *Cancer Research*. 92: 211–219, 2001

He H, Li Y, Jia X ym: PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors. *Biomaterials*. 32(2):478-87, 2011

Helgason H, Kruijtz C, Huitema A ym: Phase II and pharmacological study of oral paclitaxel (Paxoral) plus ciclosporin in anthracycline-pretreated metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 95(7): 794–800, 2006

Henderson P, Li T, He M ym: A microdosing approach for characterizing formation and repair of carboplatin-DNA monoadducts and chemoresistance. *Int J Cancer*. 2010

Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A ja Karlsson J: Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos*. 35(8):1333-40, 2007

Hopper E, Belinsky M, Zenga H ym. Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Letters* 162: 181-191, 2001

Hopper-Borge E, Xu X, Shen T, Shi Z, Chen Z, Kruh G: Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res*. 2009 69(1):178-84, 2009

Huang R, Murry D, Kolwankar D, Hall S ja Foster D: Vincristine transcriptional regulation of efflux drug transporters in carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol*. 71(12):1695-704, 2006

Hubensack M, Müller C, Höcherl P ym: Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:597–607, 2008

Hyafil F, Vergely C, Vignaud P, Grand-Perret T: In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res*. 53:4595-602, 1993

Hynynen K: Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60:1209-1217, 2008

Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N ja Jolesz F: Noninvasive MR Imaging-guided Focal Opening of the Blood-Brain Barrier in Rabbits. *Radiology*. 220:640-6, 2001

Ignatova T, Kukekov V, Laywell E, Suslov O, Vrionis F ja Steindler D: Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39:193–206, 2002

Iliás A, Urbán Z, Seidl T ym: Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J Biol Chem*. 277:16860-7, 2002

International Transporter Consortium (ITC): Giacomini K, Huang S, Tweedie D ym: Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* 9: 215-236, 2010

Ishida S, Lee J, Thiele D ja Herskowitz I: Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(22):14298-302, 2002

Jones P, O'Mara M, George A: ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochemical Sciences* 34(10):520-31, 2009

Juan M, González-Pons E, Planas J: Multidrug resistance proteins restrain the intestinal absorption of trans-resveratrol in rats. *J Nutr*. 140(3):489-95, 2010

Juillerat-Jeanneret L: The targeted delivery of cancer drugs across the blood–brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discovery Today* 13: 1099-1106, 2008

Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T ym: Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer*. 97(5):626-30, 2002

Kaina B, Margison G ja Christmann M: Targeting O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 67(21):3663-81, 2010

Kanzawa F, Sugimoto Y, Minato K ym: Establishment of a camptothecin analogue (CPT-11)-resistant cell line of human non-small cell lung cancer: characterization and mechanism of resistance. *Cancer Res.* 50(18):5919-24, 1990

Kaspar P: Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*364(1514): 239–245, 2009

Kato T, Natsume A, Toda H ym: Efficient delivery of liposome-mediated MGMT –siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Therapy* 17:1363-71, 2010

Kawabe T, Chen Z, Wada M ym: Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* 6;456(2):327-31, 1999

Keating A, Kim G, Jones A ym: Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases in astrocytoma cells leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity. *Mol Cancer Ther.* 9(5):1298-307, 2010

Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson C, Sugiyama Y: cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.* 433(1-2):149-52, 1988

Kleihues P, Louis D, Scheithauer B ym: The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(3):215-25, 2001

Kohler B, Ward E, McCarthy B, ym: Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst.* 103(9):714-36, 2011

Kolitz J, George S, Marcucci G ym: P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. *Blood.* 116(9):1413-21, 2010

Kool M, de Haas M, Scheffer G ym: Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. *Cancerresearch* 57: 3537-3547, 1997

Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F ja Borst P: Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 59:175-82, 1999

Kraker J ja Blakeley J: Neurologic Manifestations of Brain Metastases Kirjassa: Brain Metastasis : A Multidisciplinary Approach ss. 1-27 Toim. Kleinberg L, Demos Medical Publishing, New York 2008

Kruh ja Belinsky: The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22:7537–7552, 2003.

Kurien B, Dorri Y, Dillon S, Dsouza A ja Scofield R: n overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 717:55-67, 2011

Kuppens I, Witteveen E, Jewell R ym: A Phase I, Randomized, Open-Label, Parallel-Cohort, Dose-Finding Study of Elacridar (GF120918) and Oral Topotecan in Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 13: 3276, 2007

Kühnle M, Egger M, Miller C ym: Potent and Selective Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Derived from the p-Glycoprotein (ABCB1) Modulator Tariquidar. *J. Med. Chem.* 52:1190–1197, 2009

Küblbeck J, Reinisalo M, Mustonen R ja Honkakoski P: Up-regulation of CYP expression in hepatoma cells stably transfected by chimeric nuclear receptors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 40: 263–272, 2010

Kweon S, Song J ja Kim T: Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 395(1):104-10, 2010

König J, Rost D, Cui Y ja Keppler D: Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 29(4):1156-63, 1999

Laberge R, Karwatsky J, Lincoln M, Leimanis M ja Georges E: Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 73(11):1727-37, 2007

de Lange E: Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood–CSF barrier. *Elsevier B.V.*56: 1793-1809, 2004

Lee G, Dallas S, Hong M ja Bendayan R: Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations. *Pharmacological Reviews* 53:569-596, 2001

Lee J, Lund-Smith C, Borboa A, Gonzalez A, Baird A ja Eliceiri B: Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Res.* 8;1288:125-34. 2009

Lee S, Kim H, Lee J, Lee I ja Kang B: Inhibition of topoisomerase I activity and efflux drug transporters' expression by xanthohumol. *Arch Pharm Res.* 30(11):1435-9, 2007

Leggas M, Adachi M, Scheffer G ym: Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol.* 24(17):7612-21, 2004

Lehmann T, Köhler C, Weidauer E, Taege C ja Foth H: Expression of MRP1 and related transporters in human lung cells in culture. *Toxicology.* 167(1):59-72, 2001

Li M, Si L, Pan H ym: Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. *Int J Pharm.* 403(1-2):37-45, 2011

Liu F: Mechanism of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Theray. *Taiwan J Obstet Gynecol* 48, 2009

Liu G, Yuan X, Zeng Z ym: Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 5:67, 2006

Longley D ja Johnston P: Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology* 205: 275–292, 2005.

Lu C ja Shervington A: Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem* 312:71-80, 2008

- Maliepaard M, Scheffer G, Faneyte I ym: Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61(8):3458-64, 2001
- Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F ja De Vecchis L: Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res.* 56(4):275-87, 2007
- Mawrin C ja Perry A: Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 99:379–391, 2010
- Mercier C, Declèves X, Masseguin C ym: P-glycoprotein (ABCB1) but not multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) is induced by doxorubicin in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem.* 87(4):820-30, 2003
- Mi Y, Liang Y, Huang H ym: Apatinib (YN968D1) Reverses Multidrug Resistance by Inhibiting the Efflux Function of Multiple ATP-Binding Cassette Transporters. *Cancer Res* 70: 7981, 2010
- Miknyoczki S, Chang H, Grobelny J ym: The selective poly(ADP-ribose) polymerase-1(2) inhibitor, CEP-8983, increases the sensitivity of chemoresistant tumor cells to temozolomide and irinotecan but does not potentiate myelotoxicity. *Mol Cancer Ther.* 6(8):2290-302, 2007
- Minderman H, O'Loughlin K, Pendyala L, Baer M: VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin Cancer Res.* 10(5):1826-34, 2004
- Mohri M, Nitta H ja Yamashita J: Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in human gliomas. *J Neurooncol.* 49(2):105-15, 2000
- Morschhauser F, Zinzani P, Burgess M, Sloots L, Bouafia F, Dumontet C: Phase I/II trial of a P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), given orally in combination with the CHOP regimen in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 48(4):708-15, 2007
- Mäenpää H: Gliooma kuriin. *Aikakauskirja Duodecim* 126(14):1669-75, 2010

Nakai E, Park K, Yawata T ym: Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. *Cancer Invest.* 27(9):901-8, 2009

Newman M, Rodarte J, Benbatoul K ym: Discovery and Characterization of OC144-093, a Novel Inhibitor of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance. *Cancer Res* 60:2964, 2000

Newton H, Slivka M, Volpi C ym: Intra-arterial carboplatin and intravenous etoposide for the treatment of metastatic brain tumors. *J Neurooncol.* 61(1):35-44, 2003

Di Nicolantonio F, Mercer S, Knight L ym: Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer.* 18:5:78, 2005

Nies A, Jedlitschky, König J ym: Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129:349–360, 2004

Noell S, Fallier-Becker P, Beyer C, Kröger S, Mack A ja Wolburg H: Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci.*26(8):2109-18, 2007

Noël G, Schott R, Froelich S ym: Retrospective Comparison of Chemoradiotherapy Followed by Adjuvant Chemotherapy, With or Without Prior Gliadel Implantation (Carmustine) After Initial Surgery in Patients With Newly Diagnosed High-Grade Gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011

Norris M, Smith J, Tanabe K ym: Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. *Mol Cancer Ther.* 4(4):547-53, 2005

O'Brien M, Lacayo N, Lum B ym: Phase I study of valsopodar (PSC-833) with mitoxantrone and etoposide in refractory and relapsed pediatric acute leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 54(5):694-702, 2010

Palma J, Wang Y, Rodriguez L ym: ABT-888 confers broad in vivo activity in combination with temozolomide in diverse tumors. *Clin Cancer Res.* 15(23):7277-90, 2009

Paolinelli R, Corada M, Orsenigo F ja Dejana E: The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? *Pharmacological Research* 2010

Papadopoulos M, Saadoun S, Woodrow C ym: Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 27(5):384-95, 2001

Pardridge W: *The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development.* *NeuroRx.* 2(1):3-14, 2005

Parney I ja Chang S: Current chemotherapy for glioblastoma. *Cancer J.*9(3):149-56, 2003

Pasha S ja Gupta K: Various drug delivery approaches to the central nervous system. *Expert Opin Drug* 7(1):113-35, 2010

Prados M, Schold S, Fine H ym: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol.* 5(2):96-103, 2003

Preuss I, Haas S, Eichhorn U ym: Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect Prev.* 20(2):130-6, 1996

Qadri I, Hu L, Iwahashi M, Al-Zuabi S, Quattrochi L ja Simon F: Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). *Toxicol Appl Pharmacol.* 234(3):281-92, 2009

Quinn J, Jiang S, Reardon D ym: Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol.* 27(8):1262-7, 2009

Rascher G, Fischmann A, Kröger S, Duffner F, Grote E ja Wolburg H: Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol.* 104(1):85-91. 2002

Rapoport S: Advances in osmotic opening of the blood-brain barrier to enhance CNS chemotherapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 10:1809-18, 2001

Read T, Hegedus B, Wechsler-Reya R ja Gutmann D: The neurobiology of neurooncology. *Ann Neurol.* 60(1):3-11, 2006

Reid G, Wielinga P, Zelcer N ym: Characterization of the Transport of Nucleoside Analog Drugs by the Human Multidrug Resistance Proteins MRP4 and MRP5. *Molecular Pharmacology* 63(5):1094-1103, 2003

Reya T, Morrison S, Clarke M ja Weissman I: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111, 2001

Rieger L, Rieger J, Winter S ym: Evidence for a constitutive, verapamil-sensitive, non-P-glycoprotein multidrug resistance phenotype in malignant glioma that is unaltered by radiochemotherapy in vivo. *Acta Neuropathol.* 99(5):555-62, 2000

Rittierodt ja Harada: Repetitive doxorubicin treatment of glioblastoma enhances the PGP expression--a special role for endothelial cells. *Exp Toxicol Pathol.* 55(1):39-44, 2003

Roberts L, Black D, Raman C ym: Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience* 155:423-438, 2008

Robey R, Honjo Y, van de Laar A ym: A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochim Biophys* 1512(2):171-82, 2001

de Rosa M, Sillence D, Ackerley C ja Lingwood C: Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem.* 279(9):7867-76, 2004

Rouillon C ja White M: The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Res Microbiol.* 162(1):19-26, 2011

Salerno M, Loechariyakul P, Saengkhae C ja Garnier-Suillerot A: Relation between the ability of some compounds to modulate the MRP1-mediated efflux of glutathione and to inhibit the MRP1-mediated efflux of daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1;68(11):2159-65, 2004

Sandmair A, Turunen M, Tyynelä K ym: Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: Effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions. *Cancer Gene Ther.* 7(3):413-21, 2000

Sarkadi B, Homolya L, Szakács G *et al*: Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol. Rev.* 86: 1179-1236, 2006

Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M *et al*: A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann Oncol.* 20(1):175-81, 2009 *mistry* 41 (47): 13989–14000, 2009

Sharom F: ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 9:105-27, 2008

Shinoda C, Maruyama M, Fujishita T, *et al*: Doxorubicin induces expression of multidrug resistance-associated protein 1 in human small cell lung cancer cell lines by the c-jun N-terminal kinase pathway. *Int J Cancer* 117:21–31, 2005

Shiozawa K, Oka M, Soda H *et al*: Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. *International Journal of Cancer* 108:146–151, 2004

Smith JA, Osborn: Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 67(1):6-20, 2009

Soni V, Kohli D, Jain S: Transferrin-conjugated liposomal system for improved delivery of 5-fluorouracil to brain. *J Drug Target* 16:73-8, 2008

Suzuki T, Matsuzaki T, Hagiwara H, Aoki T *et al* Takata K: Recent Advances in Fluorescent Labeling Techniques for Fluorescence Microscopy. *Acta Histochem Cytochem.* 40(5): 131–137, 2007

Takahata T, Ookawa K, Suto K *et al*: Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 102(4):399-407, 2008

Takara K, Kitada N, Yoshikawa E *et al*: Molecular changes to HeLa cells on continuous exposure to SN-38, an active metabolite of irinotecan hydrochloride. *Cancer Lett.* 278(1):88-96, 2009

Tanaka S, Kamitani H, Amin M ym: Preliminary individual adjuvant therapy for gliomas based on the results of molecular biological analyses for drug-resistance genes. *J Neurooncol.* 46(2):157-71, 2000

Tentori L, Leonetti C, Scarsella M ym: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase prevents irinotecan-induced intestinal damage and enhances irinotecan/temozolomide efficacy against colon carcinoma. *FASEB J.* 20(10):1709-11, 2006

Theeler B ja Groves M: High-Grade Gliomas. *Curr Treat Options Neurol.* 2011

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman M, Pastan I ja Willingham M: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(21):7735-8, 1987

Torky A, Stehfest E, Viehweger K, Taeye C ja Foth H: Immuno-histochemical detection of MRPs in human lung cells in culture. *Toxicology.* 207(3):437-50, 2005

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S ym: Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 41:1967-1972, 1981

Turner J, Gump J, Zhang C, ym: ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood.* 108(12):3881-9, 2006

Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y ym: Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem.* 2011

Wagner L, McLendon R, Yoon K, Weiss B, Billups C ja Danks MK: Targeting methylguanine-DNA methyltransferase in the treatment of neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 13:5418-25, 2007

Valera E, Lucio-Eterovic A, Neder L ym: Quantitative PCR analysis of the expression profile of genes related to multiple drug resistance in tumors of the central nervous system. *J Neurooncol* 85:1-10, 2007

Valera E, de Freitas Cortez M, de Paula Queiroz R, ym: Pediatric glioblastoma cell line shows different patterns of expression of transmembrane ABC transporters after in vitro exposure to vinblastine. *Childs Nerv Syst.* 25(1):39-45, 2009

Vanpouille C, Le Jeune N, Kryza D ym: Influence of multidrug resistance on (18)F-FCH cellular uptake in a glioblastoma model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 36(8):1256-64, 2009

Warren M, Zerangue N, Woodford K ym: Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacological Research*,59: 404-413, 2009

Watanabe R, Nakasu Y, Tashiro H ym: O⁶-methyltransferase expression in tumor cells predicts outcome of radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide therapy in patients with primary glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* 2011

Watson A, Sabharwal A, Thorncroft M ym: Tumor O⁶-methylguanine-DNA Methyltransferase Inactivation by Oral Lomeguatrib. *Clin Cancer Res* 16:743, 2010

Wiewrodt D, Nagel G, Dreimüller N, Hundsberger T, Pernecky A ja Kaina B: MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *International Journal of Cancer Issue* 122:1391–1399, 2008

Villano J, Seery T ja Bressler L: Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64:647-655, 2009

Virgintino D, Robertsonb D, Errede M ym: Expression of P-Glycoprotein in Human Cerebral Cortex Microvessels. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50:1671-1676, 2002

Woehlecke H, Osada H, Herrmann A ja Lage H: Reversal of breast cancer resistance protein–mediated drug resistance by tryprostatin A. *International Journal of Cancer* 107: 721–728, 2003

Yabuuchi H, Shimizu H, Takayanagi S ja Ishikawa T: Multiple Splicing Variants of Two New Human ATP-Binding Cassette Transporters, ABCC11 and ABCC12. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288:933–939, 2001

Yamazaki H, Shimizu M, Murayama N, Tanaka K, Nion S, Cecchelli R: Increased transendothelial permeability of anti-cancer agent carboplatin with the aid of hyperbaric oxygenation. *Xenobiotica*. 38(10):1298-304, 2008

Yousif S, Marie-Claire C, Roux F, Scherrmann J ja Declèves X: Expression of drug transporters at the blood–brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy. *Brain Research* 1134:1-11, 2007

Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade M, Zhang H, Ball M ja Stanimirovic D: Expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB* 17(14):2085-7, 2003

Zhao R, Raub T, Sawada G ym: Breast Cancer Resistance Protein Interacts with Various Compounds in Vitro, but Plays a Minor Role in Substrate Efflux at the Blood-Brain Barrier. *DMD* 37:1251–1258, 2009

van Zuylen L, Sparrebooma A, van der Gaas A ym: The Orally Administered P-glycoprotein Inhibitor R101933 Does Not Alter the Plasma Pharmacokinetics of Docetaxel. *Clin Cancer Res* 6: 1365, 2000

van Zuylen L, Sparrebooma A, van der Gaas A ym: Disposition of docetaxel in the presence of P-glycoprotein inhibition by intravenous administration of R101933. *European Journal of Cancer* 38:1090-1099, 2002