

Katarzyna Lenart¹, Anna Szyda¹, Marek Kielbasiński², Danuta Duś¹, Maria Podolak-Dawidziak²¹Institut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu²Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Akademii Medycznej we Wrocławiu

Kliniczne skutki oporności wielolekowej w nowotworach

Clinical effects of multidrug resistance in neoplasms

Adres do korespondencji:prof. dr hab. med. Maria Podolak-Dawidziak
Klinika Hematologii, Akademia Medyczna
ul. Paustera 4, 50-367 Wrocław
e-mail: 1111@hemat.am.wroc.pl**STRESZCZENIE**

Oporność na cytostatyki jest ciągle jedną z głównych przyczyn niepowodzeń systemowej terapii przeciwnowotworowej. Najlepiej poznanym mechanizmem warunkującym powstanie lekooporności jest działanie błonowych białek transportowych, które aktywnie usuwają leki z komórek nowotworowych. Nieprawidłowa, podwyższona ekspresja tych białek jest najczęściej opisywanym czynnikiem związanym z opornością nowotworów na cytostatyki.

Spośród komórkowych białek transportowych najważniejszą funkcję pełni glikoproteina P (Pgp). Wzrost poziomu ekspresji tego białka uznaje się za niekorzystny czynnik rokowniczy zarówno w przypadku białaczek, jak i wielu rodzajów nowotworów litych. Znaczenie kliniczne pozostałych białek związanych z opornością wielolekową (MRP1, BCRP i LRP) jest przedmiotem intensywnych badań.

W modelach doświadczalnych i próbach klinicznych stosuje się różne strategie ograniczenia ekspresji Pgp. Wyprowadzenie drugiej i trzeciej generacji modulatorów Pgp jest źródłem nadziei na ograniczenie zjawiska lekooporności głównie w nowotworach układu chłonnego i krwiotwórczego.

Słowa kluczowe: białka oporności wielolekowej, guzy lite, nowotworowe choroby układu chłonnego i krwiotwórczego, inhibitory białek oporności wielolekowej

ABSTRACT

Resistance to chemotherapy remains a major cause of the systemic anti-cancer treatment failure. The best known mechanism is often attributed to the function of drug transporter proteins in the plasma membrane, which actively remove drugs from neoplastic cells. Abnormal overexpression of these proteins is the most frequently described factor connected with cytostatics resistance.

Among cellular transporter proteins the most important role plays glycoprotein P (Pgp). Increased level of this protein is considered as a poor prognostic factor both, in leukaemias and in many solid tumors. Clinical significance of other multidrug resistance proteins (MRP1, BCRP and LRP) remains subject of intensive studies.

In experimental models and clinical trials different strategies are used to limit Pgp expression. Introduction of the second and third generation of Pgp blockers is a source of hope for the reversion of multidrug resistance, especially in lymphoid and blood neoplastic disorders.

Key words: multidrug resistance proteins, solid tumors, lymphoid and blood neoplastic disorders, multidrug resistance proteins inhibitors

Wstęp

Zjawisko oporności wielolekowej (MDR, *multidrug resistance*) jest jedną z głównych przyczyn niepowodzeń systemowej terapii nowotworowej. Niektóre z nowotworów wykazują pierwotną oporność na stosowane leki, inne natomiast, początkowo wrażliwe, nabywają cechy lekooporności podczas chemioterapii.

Oporność wielolekowa jest definiowana jako nabycie przez komórki nowotworowe równoczesnej niewrażliwości na kilka grup różnych, niezwiązanych ze sobą czynników terapeutycznych, która rozwija się w odpowiedzi na stosowanie pojedynczego leku cytostatycznego. Szeroko rozumiana lekooporność może być następstwem różnorodnych uwarunkowań farmakologicznych i komórkowych. Spośród czynników farmakologicznych wpływ na rozwój lekooporności mogą mieć między innymi nieprawidłowe dawkowanie, zmiany metabolizmu oraz dostępności biologicznej leku. Komórkowe mechanizmy biorące udział w powstawaniu krzyżowej oporności wielolekowej dotyczą między innymi zmian w szybkości wnikania leków do komórki oraz w ich transporcie pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą, zmian ilości i powinowactwa enzymów docelowych dla cytostatyków, aktywacji lub inaktywacji związków farmakologicznych w komórkach nowotworowych, zdolności komórek nowotworowych do zaburzania regulacji procesu apoptozy, zmian w procesach naprawczych DNA a także możliwości aktywnego usuwania cytostatyków z komórki przez błonowe białka transportowe. Ten ostatni mechanizm jest najlepiej poznany, a nieprawidłowa, podwyższona ekspresja białek transportowych jest często opisywanym czynnikiem związanym z opornością nowotworów na cytostatyki.

Białka transportowe związane z opornością wielolekową

Większość białek oporności wielolekowej należy do dużej nadrodziny ABC (*ATP-binding cassette family*), do której zalicza się białka zawierające domenę wiążącą ATP. Nadrodzina ABC skupia białka występujące u organizmów zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. U tych ostatnich najważniejszym spośród białek transportowych jest glikoproteina P (Pgp). Jest ona kodowana przez gen *MDR1* zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 7 (7q21). Białko to, o ciężarze 170 kDa, składa się z 1280 aminokwasów. Jego strukturę drugorzędową tworzą dwie homologiczne części, zawierające hydrofobowe sekwencje przezbłonowe (TMD, *transmembrane domains*) oraz hydrofilne domeny wiążące nukleotydy (NBD, *nucleotide-binding domains*). Domena wiążąca nukleotydy zawiera dwa miejsca bezpośrednio zaangażowane w mechanizm hydrolizy ATP, tak

zwane motywy Walkera A i Walkera B. Natomiast w obrębie sekwencji hydrofobowych zlokalizowane są co najmniej dwa miejsca odpowiedzialne za wiązanie leków (DBS, *drugbinding sites*). Spektrum substratowe Pgp obejmuje wiele ważnych ksenobiotyków, w tym również cytostatyków, takich jak alkaloidy *Vinca* (winkrystyna, winblastyna), antracykliny (doksorubicyna, daunorubicyna), mitoksantron, aktynomycyna D, etopozyd, paklitaksel, kolchicyna, mitomycyna C i puromycyna [1, 2]. Częsteceki ksenobiotyków (gr. *xenos* — obcy) mają hydrofobowy charakter, cechuje je lipofilność, dzięki czemu przechodzą biernie przez błony komórkowe.

Mechanizm działania Pgp nie jest ostatecznie wyjaśniony i istnieją na ten temat dwie teorie. Według pierwszej z nich Pgp działa jak flipaza, usuwając substancje hydrofobowe z cytoplazmatycznej do zewnętrznej części dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, skąd mogą one dyfundować do przestrzeni pozakomórkowej. Druga hipoteza sugeruje działanie Pgp jako „zmiatacza” hydrofobowego (*hydrophobic vacuum cleaner*), umożliwiającego usuwanie związków hydrofobowych na zewnątrz komórki z wyżej wymienionej warstwy lipidowej błony.

Obecność Pgp stwierdza się w wielu prawidłowych tkankach. Glikoproteina P pełni w nich ważne funkcje fizjologiczne. Wysokie stężenie Pgp stwierdzono na powierzchni komórek pełniących funkcje wydzielnicze, między innymi kory nadnerczy, komórki kanalików żółciowych wątroby, nabłonka proksymalnego odcinka kanalików nerkowych i przewodów trzustkowych. Niższy poziom ekspresji Pgp cechuje między innymi komórki nabłonka jelit i przewodów trzustkowych, komórki śródbłonka naczyń włosowatych mózgu, płuca i jądra, komórki łożyska, komórki wydzielnicze jajników oraz komórki układu limfatycznego [2]. Uważa się, że Pgp uczestniczy również w transporcie z komórki czynników endogennych, o czym mógłby świadczyć wysoki poziom ekspresji Pgp w komórkach gruczołów wydzielania wewnętrznego. Obecność w mózgu gleju otaczającego naczynia krwionośne oraz narządowo specyficznego śródbłonka naczyń włosowatych zapewnia istnienie bariery krew–mózg, utrudniającej przechodzenie z krwi do tkanki mózgowej wielu substancji, w tym również leków. Obecność Pgp na powierzchni komórek śródbłonków naczyń włosowatych może być jednym z funkcjonalnych składników nie tylko bariery krew–mózg, ale także bariery jelitowej czy nerkowej. Z kolei Pgp obecna w komórkach łożyska może pełnić istotną rolę ochronną dla rozwijającego się płodu przed działaniem różnorodnych substancji toksycznych [3]. Rola Pgp w prawidłowych limfocytach wciąż nie jest w pełni poznana. Sugeruje się, że Pgp obecna w limfocytach CD8+ i komórkach NK może mieć znaczenie dla ich aktywności cytotosycznej. Wykazano, że Pgp w limfocytach T pośredniczy w przezbłonowym transporcie cytokin, głównie interleu-

kiny 2 (IL-2), interleukiny 4 (IL-4) i interferonu gamma (IFN- γ). Mechanizm tego transportu pozostaje wciąż niejasny [3]. Stosunkowo dużo Pgp występuje na macierzystych komórkach krwiotwórczych, a jej stężenie obniża się w miarę rozwoju i różnicowania się komórek macierzystych do dojrzałych docelowych komórek krwi. Wpływ glikoproteiny P na proliferację i różnicowanie się komórek macierzystych krwi następuje prawdopodobnie poprzez czynniki regulatorowe dla tych procesów.

Do nadrodziny ABC należą też inne ważne białka, związane z opornością nowotworów na cytostatyki, takie jak: białko oporności wielolekowej (MRP1, *multidrug resistance protein 1*) oraz białko oporności raka sutka (BCRP, *breast cancer resistance protein*).

Białko oporności wielolekowej jest błonowym białkiem transportowym o ciężarze 190 kDa, zależnym od ATP. Łańcuch 1522 aminokwasów białka MRP1 jest kodowany przez gen zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 16 (16p13.1). Białko MRP występuje w błonie komórkowej oraz w innych błonach organelli komórkowych. Jest obecne w wielu prawidłowych tkankach i typach komórek, w tym w erytrocytach, hepatocytach oraz w komórkach *mastocytoma*. Podwyższoną ekspresję MRP1 zaobserwowano między innymi w raku płuca, raku okrężnicy, ostrej białaczce szpikowej oraz zwojaku współczulnym zarodkowym u dzieci. Nadekspresja MRP1 towarzyszy oporności komórek nowotworowych na antracykliny, alkaloidy *Vinca*, etopozyd, a także na jony metali ciężkich (arsenu i antymonu) [2].

Białko oporności raka sutka zidentyfikowano po raz pierwszy w 1998 roku w linii komórek raka piersi MCF-7. Gen kodujący BCRP znajduje się na chromosomie 4 (4q22) i koduje produkt o długości 655 aa. Funkcjonalne białko przezbłonowe BCRP jest homodimerem złożonym z dwóch takich podjednostek. Białko BCRP, podobnie jak Pgp, znajduje się w wielu prawidłowych tkankach organizmu (między innymi w komórkach łożyska, kanalików żółciowych, jelita i śródbłonna mózgu). W związku z tym prawdopodobne jest, że białko to również pełni fizjologiczną funkcję ochrony organizmu przed działaniem toksycznych substancji. Podobnie jak Pgp, BCRP jest też obecne na powierzchni komórek macierzystych krwi [4]. Nadekspresja BCRP w ludzkich komórkach nowotworowych wiąże się z opornością tych komórek na wiele cytostatyków. Do leków przeciwnowotworowych usuwanych aktywnie z komórki przez BCRP należą: mitoksantron, doksorubicyna, daunorubicyna, metotreksat, SN-38 i topotekan [5]. Znaczenie kliniczne BCRP w oporności wielolekowej jest obecnie przedmiotem intensywnych badań.

Ze zjawiskiem oporności wielolekowej wiąże się również białko raka płuc związane z opornością (LRP, *lung cancer resistance-related protein*), nienależące do nadrodziny białek ABC. Jest to również białko transporto-

we, o ciężarze 110 kDa, kodowane przez gen zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 16 (16p13.2.), w pobliżu genu *MRP*. Białko LRP występuje w obrębie błony jądrowej i przypuszczalnie pełni rolę w usuwaniu cytostatyków z jądra do cytozolu. Pierwotnie LRP wyizolowano z Pgp-negatywnych, lekoopornych komórek raka płuca, lecz jest ono obecne także w wielu prawidłowych tkankach, między innymi w nabłonku oskrzeli, nabłonku przewodu pokarmowego, w keratynocytach oraz w makrofagach. Prawdopodobnie pełni również fizjologiczną funkcję ochronną przed szkodliwym działaniem metabolitów i ksenobiotyków. Ekspresję LRP wykazano w różnych typach nowotworów (między innymi w raku żołądka, raku oskrzeli, raku jajnika, w szpiczaku mnogim oraz w ostrej białaczce szpikowej u dorosłych i dzieci). Poziom ekspresji LRP wiąże się z opornością na doksorubicynę, winkrystynę, karboplatynę, cisplatynę i melfalan. W wielu doniesieniach wzrost poziomu ekspresji LRP uznaje się za niekorzystny marker rokowniczy, szczególnie w przypadku ostrej białaczki szpikowej [1, 4].

Często obserwuje się jednoczesną ekspresję białek MRP i LRP lub MRP, LRP oraz Pgp w przypadkach ostrej białaczki szpikowej u dorosłych i u dzieci. To wieloczynnikowe pochodzenie oporności na leki cytostatyczne jest przyczyną trudności, jakie napotyka onkolodzy przy próbach klinicznych ograniczenia tego zjawiska.

Inne czynniki warunkujące oporność wielolekową

Jednym z tych czynników jest ludzka transferaza S glutationu (GST, EC 2.5.1.18) należąca do rodziny transferaz glutationowych. Uczestniczy ona w biotransformacji ksenobiotyków, metabolizmie leków, ochronie lipidów i kwasów nukleinowych przed działaniem nadtlenków, jak też w izomeryzacji prostaglandyn. W prawidłowych komórkach jest zlokalizowana w cytoplazmie. Podwyższoną ekspresję jej izozymu pi (π) — GST π , o lokalizacji jądrowej — stwierdza się w stadium przednowotworowym i w nowotworach. Jest uważana za jeden z markerów nowotworowych w raku szyjki macicy i glejaku [6, 7], raku jądra, raku jajnika i raku jelita grubego [8]. Wysoka ekspresja GST π , o lokalizacji jądrowej, towarzyszy zwłaszcza nowotworom wtórnie opornym na doksorubicynę, cisplatynę i związki alkilujące.

Kolejnym czynnikiem związanym z występowaniem oporności wielolekowej jest topoizomeraza II alfa (topo II α), enzym niezbędny dla życia komórki, istotny dla replikacji DNA, aktywny w fazach S/G2/M cyklu komórkowego. Inhibitory topo II α są aktywnymi związkami cytotoksycznymi. Należą do nich między innymi aktynomycyna D, antracykliny, epipodofilotoksyny, mitok-

santron, etopozyd i amsakryna. Tworzą one stabilne kompleksy z DNA, czego następstwem jest programowana śmierć komórki (apoptoza). Do innej grupy leków znoszących aktywność topo II α należą tak zwane inhibitory katalityczne, blokujące funkcję katalityczną enzymu. Jednak podczas leczenia wymienionymi cytostatykami często rozwija się oporność wielolekowa. Ponieważ mają one różne punkty uchwytu, to rozwijane są, często równolegle, dwa rodzaje oporności. Jeden z nich dotyczy zmienionej aktywacji leku lub jego zwiększonej detoksyfikacji, przy udziale enzymów zależnych od glutationu (GST), drugi modyfikuje transport leku do komórki, czemu często towarzyszy nadekspresja Pgp i innych białek transportowych [9].

Występowanie oraz znaczenie kliniczne Pgp w nowotworach

Nowotwory, w których stwierdza się ekspresję Pgp, można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej należą nowotwory wywodzące się z tkanek pierwotnie wykazujących ekspresję Pgp (między innymi wątroby, nerek, trzustki, jelit i kory nadnerczy), które są uważane za pierwotnie odporne. Do drugiej grupy zalicza się nowotwory wywodzące się z tkanek, które wyjściowo charakteryzują się niskim stężeniem Pgp i podczas chemioterapii rozwijają oporność, która utrzymuje się po jej zakończeniu. Do tej grupy należą między innymi: rak piersi, drobnokomórkowy rak płuca, ostra i przewlekła białaczka szpikowa, przewlekła białaczka limfocytowa, chłoniaki niezłośliwe, mięsaki, gwiaździaki i zwojaki współczulne zarodkowe.

W ostatnich latach najliczniejsze są doniesienia związane z ekspresją Pgp w komórkach białaczkowych. Zaobserwowano, że Pgp występuje przed leczeniem u około 30% chorych na ostrą białaczkę szpikową, a w stadium nawrotu tego nowotworu u ponad 50% pacjentów [10]. Poza tym stwierdzono, że u chorych na ostrą białaczkę szpikową poziom ekspresji Pgp w blastach był niższy (17%) w grupie osób młodszych (poniżej 35 rż.) niż u starszych (39%), co częściowo tłumaczy lepszą odpowiedź na leczenie cytostatykami w młodszym wieku [11]. Uznaje się, że obecność Pgp na komórkach stanowi niekorzystny czynnik rokowniczy w ostrej białaczce szpikowej [12, 13]. Zwiększony odsetek komórek blastycznych wykazujących obecność Pgp wiąże się nie tylko z gorszą odpowiedzią na leczenie, ale też z szybszym nawrotem choroby oraz krótszym czasem przeżycia [14–16]. Filipits i wsp. ocenili wyniki leczenia uzyskane u 111 chorych na ostrą białaczkę szpikową i stwierdzili, że odsetki całkowitych remisji w grupach pacjentów wykazujących niską, średnią i wysoką ekspresję Pgp wynosiły odpowiednio 77%, 68% i 38%, a średni czas życia odpowiednio 1,4 vs. 0,8 i 0,4 roku [14]. Natomiast w wy-

padku chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną nie jest jednoznaczne, czy Pgp ma znaczenie prognostyczne, ponieważ część autorów wskazuje na niekorzystną wartość rokowniczą wzrostu ekspresji Pgp w blastach chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej [17], lecz inni nie potwierdzają tej zależności [18]. Liczba doniesień dotyczących ekspresji Pgp w przewlekłej białaczce szpikowej jest niewielka. Większość autorów wskazuje, że w tym nowotworze Pgp ma prawdopodobnie znaczenie prognostyczne dla czasu trwania kryzy blastycznej [19].

Oceny oporności wielolekowej guzów litych dokonuje się głównie na podstawie badania ekspresji Pgp i MRP1. Jednak w zależności od zastosowanej metody oznaczenia i przyjętego poziomu ekspresji uznawanego za nieprawidłowy wyniki znacznie się różnią.

Metaanaliza przeprowadzona u chorych na raka piersi wykazała ekspresję Pgp w komórkach nowotworowych u 41% chorych przed rozpoczęciem leczenia i wzrost tego odsetka po leczeniu [19, 20]. Inni autorzy stwierdzali ekspresję Pgp nawet u 80% chorych [21, 22]. Burger i wsp. ocenili mRNA dla Pgp u 59 chorych na raka piersi i potwierdzili obecność istotnej statystycznie korelacji między poziomem ekspresji Pgp a odpowiedzią na leczenie. Reakcja na leczenie była znacznie słabsza u chorych wykazujących wysoką ekspresję Pgp 2/12 (17%) niż niską 32/47 (68%) [23].

Wysoką ekspresję Pgp stwierdzono u drobnokomórkowego (80%) i niedrobnokomórkowego (100%) raku płuca. Young i wsp. metodą RT-PCR wykazali ekspresję Pgp odpowiednio u 25% i 43% chorych na te nowotwory [24]. Natomiast w innym doświadczeniu mRNA dla Pgp stwierdzono u 27% chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca [25].

Nieliczni autorzy badali obecność Pgp w rakach pęcherza moczowego. Stwierdzono obecność Pgp również w prawidłowej tkance pęcherza [26]. W nowotworach o niskim stopniu zróżnicowania mRNA dla Pgp stwierdzano rzadko, natomiast w nowotworach o wysokim zróżnicowaniu odsetek guzów wykazujących ekspresję Pgp wynosił 27% [26]. Nakagawa i wsp. [27] metodą immunohistochemiczną badali ekspresję Pgp u 33 chorych z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego. Przed chemioterapią Pgp była obecna u 22 chorych (67%), a po chemioterapii indukcja ekspresji Pgp wystąpiła u 4 chorych (14%). Nie wykazano istotnej zależności między poziomem ekspresji Pgp a skutecznością leczenia. Park i wsp. [28] analizowali wpływ poziomu ekspresji Pgp na odpowiedź na dokсорubicynę u 28 chorych na raka pęcherza moczowego, którzy nie byli wcześniej poddawani chemioterapii. Autorzy ci również nie stwierdzili korelacji między początkowym poziomem ekspresji Pgp u chorych a skutecznością zastosowanego leku. Tylko u nielicznych pacjentek z rozpoznaniem raka jajnika komórki nowotworu wykazują ekspresję Pgp, co

potwierdza brak odpowiedzi na stosowane inhibitory Pgp [29]. Zjawisko oporności wielolekowej stwierdzono również w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego u dzieci i uzyskano dobre wyniki, stosując chemioterapię skojarzoną z inhibitorem Pgp, cyklosporyną [30].

Znaczenie kliniczne innych białek transportowych związanych z lekoopornością nowotworów

Mimo że białko Pgp jest jedną z głównych przyczyn powstawania lekooporności nowotworów, również inne białka transportowe mogą być związane z tym zjawiskiem.

Ekspresja MRP1 jest powszechna w ostrych i przewlekłych białaczkach. Wczesne doniesienia wskazywały na związek między poziomem ekspresji MRP1 a odpowiedzią na leczenie w białaczkach, ale wiele nowszych prac nie potwierdza tej zależności. Ustalenie znaczenia MRP1 w tych nowotworach wciąż wymaga precyzyjnych badań.

Białko oporności wielolekowej jest powszechnie obecne w komórkach raka piersi, ale występuje ono również w towarzyszących nowotworowi tkankach prawidłowych. Filipits i wsp. metodą RT-PCR wykazali obecność MRP1 we wszystkich spośród 134 analizowanych nowotworów piersi, podczas gdy Pgp było obecne w 80 (60%) z nich [31]. Burger i wsp. [23] również badali obecność mRNA dla MRP1 u 59 chorych na raka piersi. Wykazali oni istnienie pewnej, nieistotnej statystycznie, korelacji między poziomem ekspresji MRP1 a odpowiedzią na leczenie w analizowanej grupie chorych. W drobnokomórkowym raku płuca ekspresję mRNA dla MRP1 stwierdzono w 88% przypadków, a obecność MRP1 w 100% analizowanych nowotworów [24, 25].

W raku pęcherza moczowego ekspresja MRP1 wydaje się wykazywać odwrotną tendencję niż ekspresja Pgp, a więc maleje wraz ze wzrostem zróżnicowania guza. Wykazano, że MRP1 jest obecne w 55% nisko zróżnicowanych guzów i rzadko spotykane (8%) w guzach o wysokim stopniu zróżnicowania [32]. Po chemioterapii podwyższyła się ilość mRNA mierzona metodą RT-PCR dla obu tych białek — dla Pgp 5-krotnie a dla MRP1 — 2-krotnie [33]. Badanie immunohistochemiczne poziomu ekspresji MRP1 u 28 chorych na raka pęcherza wykazało jego obecność przed chemioterapią u 1 z 28 chorych (4%) i indukcję ekspresji MRP1 po chemioterapii u 6 badanych (21%) [27].

Znaczenie ekspresji BCRP w lekooporności nowotworów jest wciąż kontrowersyjne. Białko to znane jest od niedawna, a w większości prac jego ekspresję w komórkach nowotworowych zbadano wyłącznie na poziomie mRNA. Często napotykaną przez badaczy trudnością jest brak korelacji wyników uzyskanych metodą RT-PCR

z wynikami otrzymywanymi innymi metodami, takimi jak barwienie immunocytochemiczne i testy czynnościowe. Niektórzy badacze wskazują, że w ostrej białaczce szpikowej istnieje związek między ekspresją BCRP w komórkach blastycznych a odpowiedzią na leczenie i średnim czasem życia chorych [34], lecz inni nie potwierdzają takiej zależności [35, 36].

Poza białaczkami wykazano znaczną ekspresję BCRP w szpiczaku mnogim, nowotworach piersi, płuca, układu pokarmowego, nerek i endometrium. Nieliczne prace dotyczą znaczenia klinicznego BCRP w tych nowotworach. Grupa badaczy, analizując obecność BCRP u 25 chorych na raka piersi, nie znalazła znamiennej statystycznie korelacji między poziomem mRNA dla BCRP a odpowiedzią na leczenie i czasem przeżycia chorych [37]. Również Burger i wsp. [23] w cytowanym wcześniej badaniu z udziałem 59 chorych na raka piersi nie wykazali istotnej statystycznie zależności pomiędzy poziomem mRNA dla BCRP a odpowiedzią na leczenie. W ostatnich latach zwrócono uwagę na znaczenie kliniczne białka LRP w lekooporności białaczek. Białko LRP występuje u około połowy chorych z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej i jest uznawane przez wiele grup badaczy za niekorzystny marker prognostyczny w tej chorobie [38–40]. Sprzeczne są wyniki dotyczące klinicznej roli ekspresji LRP w ostrej białaczce limfoblastycznej — wyniki uzyskane przez niektórych autorów potwierdzają znaczenie tego białka [41], a wyniki uzyskane przez innych nie [11].

Z kolei w raku płuca poziom ekspresji LRP był niższy u nieleczonych chorych z rozpoznaniem drobnokomórkowego raka płuca niż u chorych na raka niedrobnokomórkowego [42]. Podobne wyniki uzyskali Dingemans i wsp. [43], którzy stwierdzili ponadto istotnie wyższy poziom ekspresji MRP1 również w niedrobnokomórkowym raku płuc. Dane te są zgodne z obserwacjami klinicznymi i większą wrażliwością na chemioterapię wykazywaną przez chorych na drobnokomórkowego raka płuca.

Związek pomiędzy pojawieniem się jądrowego GST π podczas chemioterapii a czasem przeżycia chorych został opisany w raku szyjki macicy i w glejaku [6]. Poszukiwania swoistych inhibitorów GST π użytecznych klinicznie pozostają dotąd w fazie eksperymentów na zwierzętach. Natomiast oznaczanie poziomu GST π jako czynnika predykcyjnego, zwłaszcza w zestawieniu z innymi białkami oporności wielolekowej (między innymi Pgp, MRP1, BCRP), zaczyna być wprowadzane do praktyki klinicznej. O celowości oceny lekooporności świadczą wyniki badania japońskiej grupy Matsumoto i wsp. [7], którzy na podstawie wcześniejszego oznaczenia białek MDR w guzie dobrali indywidualnie zestaw cytotatystyków dla chorych z glejakiem, uzyskując zahamowanie wzrostu guzów u 7 z 9 (78%) leczonych.

Również poziom ekspresji topo II α i jej lokalizacja bywają wykorzystywane w charakterze markerów progresji nowotworowej. U chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną Uggla i wsp. [44] stwierdzili pojawianie się topo II α w nietypowej fazie cyklu — G0/G1. Korzystne wyniki leczenia pacjentów były odwrotnie skorelowane z odsetkiem komórek charakteryzujących się tą anomalią. Z kolei Grandgirard i wsp. [45] zaobserwowali związek między potwierdzoną immunocytochemicznie obecnością topo II α w komórkach białaczkowych u dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną a skróceniem czasu przeżycia. W raku jelita grubego [46] oznaczano immunohistochemicznie stężenie białek MDR: Pgp, MRP, LRP oraz topo II α . Okazało się, że stężenie topo II α w tkance nowotworowej w okresie wznowy było znacznie wyższe od stwierdzonego w guzie pierwotnym. Również wysoki poziom ekspresji topo II α okazał się czynnikiem predykcyjnym w drobnokomórkowym raku płuca [47].

Próby zniesienia zjawiska oporności wielolekowej w nowotworach

W ostatnich latach podejmowano liczne próby ograniczenia zjawiska oporności wielolekowej, związanego z nadekspresją Pgp. Polegały one na zastosowaniu różnorodnych „chemioczulaczy” — związków, które wiążąc się z transporterem MDR, blokują jego działanie, w wyniku czego komórka staje się bardziej wrażliwa na działanie leku. Do tej grupy związków należą naturalne i syntetyczne substancje farmakologiczne, przeciwciała monoklonalne, immunotoksyny, oligonukleotydy antysensowne, a ostatnio również siRNA. Ich stosowanie stwarza możliwość zmniejszenia lekooporności w modelach eksperymentalnych, jednak w badaniach klinicznych nie wszystkie z nich przynoszą zadowalające efekty, głównie ze względu na brak wybiórczości i działania niepożądane.

Najwięcej uwagi w badaniach klinicznych poświęca się blokowaniu miejsc wiążących leki w obrębie glikoproteiny P poprzez zastosowanie modulatorów Pgp. Strategia ta polega na równoczesnym zastosowaniu w terapii nowotworowej leku cytostatycznego oraz związku (modulatora), który skutecznie rywalizuje z cytostatykiem o dostęp do białka transportowego. Modulator ze względu na wyższy stopień powinowactwa do pompy lub osiągane wyższe stężenie w komórce, doprowadza do osiągnięcia stanu nasycenia białka, dzięki czemu usuwanie cytostatyku z komórki może zostać znacznie ograniczone.

Obecnie istnieją trzy generacje modulatorów Pgp. Leki należące do pierwszej generacji (cyklosporyna A i werapamil) zaczęto stosować w badaniach nad modyfikacją zjawiska MDR już dwadzieścia lat temu. Jednak zwią-

ki te wykazują liczne niepożądane skutki uboczne, takie jak immunosupresja i nefrotoksyczność w wypadku cyklosporyny A oraz działanie hipotensyjne i zaburzające przewodzenie przedsionkowo-komorowe w wypadku werapamilu. Z tych względów mimo początkowego entuzjazmu rozpoczęto poszukiwania nietoksycznych i bardziej skutecznych analogów tych związków. I tak preparat o nazwie PSC833 (valsopodar) jest analogiem cyklosporyny A pozbawionym efektu immunosupresyjnego i toksycznego, a jednocześnie posiadającym ponad 10-krotnie wyższą aktywność blokującą w porównaniu z cyklosporyną A [5]. PSC833 zalicza się do drugiej generacji modulatorów Pgp. Jednak wyniki badań klinicznych faz I–III z zastosowaniem tego modulatora w leczeniu różnych nowotworów są bardzo sprzeczne [4]. Inne związki należące do drugiej generacji modulatorów Pgp to VX-710 (birikodar), dekswerapamil i deksguldygina. Leki te cechuje większa skuteczność i mniejsza toksyczność w porównaniu ze związkami, z których się wywodzą. Jednak i one nie są pozbawione cech zmniejszających ich użyteczność w terapii przeciwnowotworowej, ponieważ istotnie hamują metabolizm i wydzielenie ksenobiotyków usuwanych przez Pgp z prawidłowych tkanek, co przyczynia się do nasilenia toksyczności i wymusza redukcję dawek modulatorów stosowanych w próbach klinicznych. Częstym zjawiskiem jest kompetycyjne działanie modulatora i leku cytostatycznego w stosunku do enzymów cytochromu P450 3A4, co prowadzi do nieprzewidywalnych efektów ubocznych dotyczących farmakokinetyki cytostatyków w komórce nowotworowej.

W ostatnich latach otrzymano modulatory trzeciej generacji, z których niektóre: XR9576 (tariquidar), R101933 (laniquidar), LY3335979 (zosuquidar) i ONT-093 (OC144-093) weszły już w fazę prób klinicznych. Związki te charakteryzuje wysoka specyficzność w stosunku do Pgp, a więc nie wywierają one wpływu na czynność innych białek transportowych. Nie zmieniają one również farmakokinetyki leków cytostatycznych w komórce nowotworowej lub czynią to w nieznacznym stopniu. Dowiedziano, że w stężeniach stosowanych w leczeniu przeciwnowotworowym nie mają one wpływu na cytochrom P450 3A4 [4].

Najbardziej obiecującym spośród trzeciej generacji modulatorów glikoproteiny P wydaje się związek XR9576 (tariquidar). W odróżnieniu od modulatorów pierwszej i drugiej generacji, które jako substrat konkurują z cytostatykiem o miejsce wiązania leku na cząsteczce Pgp, XR9576 wiąże się specyficznie i niekompetycyjnie do Pgp ze znacząco większym powinowactwem, czego efektem jest zablokowanie funkcji Pgp jako białka transportowego w komórce. Efekt ten jest wielokrotnie silniejszy i dłuższy niż dla pierwszej i drugiej generacji modulatorów Pgp. W badaniach *in vitro* wykazano, że funkcja transportowa Pgp w badanej hodowli komórkowej była wciąż za-

blokowana po 22 godzinach od usunięcia XR9576 z medium hodowlanego. W tych samych warunkach eksperymentalnych czas blokowania pompy Pgp przez cyklosporynę A wynosił 60 minut [48].

Trzecia generacja modulatorów Pgp stanowi najbardziej obiecującą grupę związków, które w najbliższych latach mogą się przyczynić do zniesienia lub ograniczenia zjawiska MDR u chorych na nowotwory. Przewodzone są dalsze badania kliniczne dotyczące zastosowania tej grupy związków w terapii skojarzonej z lekami cytostatycznymi.

Aktualne wyniki prób klinicznych nad odwróceniem zjawiska lekooporności za pomocą modulatorów Pgp wskazują na to, iż u chorych na nowotwory lite szanse na uzyskanie remisji są o wiele mniejsze niż w nowotworach układowych [2]. U 23 chorych na raka okrężnicy i odbytu opornych na epirubicynę, stosując cytostatyk łącznie z cyklosporyną A, uzyskano odpowiedź pozytywną tylko w 1 przypadku [49]. Lehnert [50] podawał 23 chorym na raka piersi epirubicynę w połączeniu z dekswerapamilem, uzyskując częściową odpowiedź u 4 osób.

Istnieją jednak pojedyncze doniesienia, w których wykazano korzystny wpływ modulatorów Pgp na efektywność chemioterapii. Belpomme i wsp. [51] zastosowali werapamil podawany doustnie wraz z odpowiednią chemioterapią w grupie 99 chorych na raka piersi i uzyskali wyższy odsetek odpowiedzi na leczenie (27% vs. 11% w grupie kontrolnej), a także stwierdzili przedłużenie średniego czasu życia pacjentek (323 dni vs. 209 dni). Również skojarzenie doustnie podawanego werapamilu z chemioterapią w niedrobnokomórkowym raku płuca u 72 chorych dało zadowalające efekty w postaci wydłużenia czasu przeżycia chorych i lepszej odpowiedzi na leczenie [52]. Natomiast u chorych na drobnokomórkowego raka płuca w okresie oporności na konwencjonalną chemioterapię zastosowanie werapamilu nie zmieniło wyniku leczenia [53].

Próby obniżenia lekooporności u chorych na nowotwory układu krwiotwórczego roszą dużo większe nadzieje. List i wsp. [54] w badaniach prowadzonych przez Południowo-Zachodnią Grupę Onkologiczną (SWOG, *Southwest Oncology Group*) w grupie 226 chorych na ostrą białaczkę szpikową wykazali, że dożylnie podana cyklosporyna A w skojarzeniu z cytarabiną i daunorubicyną spowodowała istotne zmniejszenie oporności na zastosowane cytostatyki. W grupie leczonych z zastosowaniem cyklosporyny A i w grupie kontrolnej odpowiedź na leczenie uzyskano odpowiednio u 69% i 53% chorych, a także zaobserwowano wydłużenie czasu trwania remisji choroby i średniego czasu życia.

Jednak istnieją liczne doniesienia dotyczące nowotworów układowych, w których nie wykazano efektu działania modulatorów Pgp w próbach klinicznych lub gdzie zaobserwowane różnice w odpowiedzi na leczenie były

nieznaczne. W badaniach III fazy przeprowadzonych przez *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) z zastosowaniem PSC-833 w skojarzeniu z cytostatykami w leczeniu ostrej białaczki szpikowej u chorych powyżej 60. roku życia nie wykazano zwiększenia skuteczności leczenia [55]. Sonnenveld i wsp. [56] u chorych na szpiczaka mnogiego leczonych winkrystyną, dokсорubicyną i deksametazonem (schemat VAD) w skojarzeniu z cyklosporyną A nie obserwowali znaczącej poprawy w odpowiedzi na leczenie ani też wydłużenia średniego czasu życia. Na leczenie z udziałem cyklosporyny A i chemioterapii odpowiedziało 53% chorych w porównaniu z 49% chorych poddanych samej chemioterapii. Średni czas przeżycia wynosił w obu grupach odpowiednio 8,6 miesiąca i 5,8 miesiąca; zaobserwowano natomiast znaczny wzrost toksyczności w porównaniu z grupą kontrolną.

W innej próbie klinicznej 22 chorych na szpiczaka mnogiego poddano chemioterapii według schematu VAD w skojarzeniu z wysokimi dawkami werapamilu podawanego dożylnie i uzyskano częściową remisję u 5 z nich (23%) [57]. Randomizowane badania III fazy przeprowadzone przez SWOG w dużej grupie 123 chorych z rozpoznaniem szpiczaka mnogiego leczonych według schematu VAD z werapamilem podawanym doustnie (63 pacjentów) nie wykazały istotnych różnic w zakresie odpowiedzi na leczenie i długości średniego czasu przeżycia w porównaniu z grupą kontrolną chorych otrzymujących wyłącznie chemioterapię VAD [58].

Po początkowym entuzjazmie, który był związany z wynikami badań I i II fazy na temat wykorzystania modulatorów Pgp, badania fazy III przyniosły wiele rozczarowań. Liczne negatywne doniesienia dotyczące modulatorów pierwszej i drugiej generacji skłaniają do intensyfikacji prac nad rozwojem preparatów modulujących trzeciej generacji, z którymi obecnie wiąże się największe nadzieje. Kolejne lata powinny przynieść realną szansę wykorzystania tych związków w leczeniu przeciwnowotworowym.

Podsumowanie

Pojawienie się oporności wielolekowej w komórkach nowotworowych jest powszechnie występującym zjawiskiem w wielu rodzajach nowotworów litych oraz układowych i uznaje się je za niekorzystny czynnik rokowniczy. Nowotwór może uruchomić różnorodne, często złożone, mechanizmy obrony przed aktywnością cytostaticzną stosowanych leków, takie jak procesy detoksyfikacji lub aktywnego usuwania leku z komórki. Obecnie możliwe jest ich oznaczanie jako markerów progresji nowotworu, natomiast swoiste inhibitory Pgp znajdują się w ostatnich fazach badań klinicznych. Mechanizmy pozwalające na rozwój oporności wielolekowej, jak również sposoby jej zapobiegania lub znoszenia, są nadal

przedmiotem intensywnych badań, zmierzających do odkrycia nowych, skutecznych inhibitorów MDR. Obiecującym kierunkiem badań może być rozwój metod diagnostycznych które mogłyby umożliwiać monitorowanie pełnego stanu wrażliwości nowotworów u poszczególnych chorych w celu wybrania skutecznej chemioterapii.

Piśmiennictwo

- Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 2003; 8: 411–424.
- Sorokin D., Duś D. Rola P-gp i innych białek transportowych w oporności wielolekowej. *Nowotwory* 1999; 49: 576–584.
- Sankatsing S.U.C., Beijnen J.H., Schinkel A.H., Lange J.M.A., Prins J.M. P-glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 2004; 48: 1073–1081.
- Ross D.D. Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2004; 17: 641–651.
- Thomas H., Coley H.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; 10: 159–165.
- Goto S., Ihara Y., Urata Y. i wsp. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. *FASEB J.* 2001; 15: 2702–2714.
- Matsumoto Y., Morisaki K., Miyake K. i wsp. Chemotherapy for gliomas based on the expression levels of drug resistant genes. *No Shinkei Geka.* 2001; 29: 625–630.
- Henderson C.J., McLaren A.W., Moffat G.J., Bacon E.J., Wolf C.R. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem. Biol. Interact.* 1998; 24: 111–112: 69–82.
- Fortune J.M., Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anti-cancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 2000; 64: 221–253.
- Han K., Kahng J., Kim M. i wsp. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia. *Acta Haematol.* 2000; 104: 174–180.
- Leith C.P., Kopecky K.J., Chen I.M. i wsp. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1999; 94: 1086–1099.
- Duś D., Podolak-Dawidziak M. Multidrug resistance mechanisms in acute leukaemias. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005; 14: 407–414.
- Podolak-Dawidziak M., Duś D., Kielbiński M., Paprocka M., Kuliszewicz-Janus M., Kuliczowski K. The clinical significance of the multidrug resistance proteins expression with acute myeloid leukaemia. 46th Annual Meeting American Society of Hematology, 4–7 grudnia 2004, San Diego, California. *Blood* 2004; 186b abstract 4411.
- Filipits M., Stranzl T., Pohl G. i wsp. Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis. *Leukemia* 2000; 14: 68–76.
- Leith C.P., Kopecky K.J., Godwin J. i wsp. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997; 89: 3323–3329.
- van der Heuvel-Eibrink M.M., Sonneveld P., Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; 38: 94–110.
- Goasguen J.E., Dossot J.M., Fardel O. i wsp. Expression of the multidrug resistance-associated P-glycoprotein (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood* 1993; 81: 2394–2398.
- Wattel E., Lepelletier P., Merlat A. i wsp. Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia: absence of correlation with response to treatment. *Leukemia* 1995; 9: 1870–1874.
- Turkina A.G., Logacheva N.P., Stromskaya T.P. i wsp. Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 457: 477–488.
- Trock B.J., Leonessa F., Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1997; 89: 917–931.
- Chung H.C., Rha S.Y., Kim J.H. i wsp. P-glycoprotein: the intermediate end point of drug response to induction chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer. Res. Treat.* 1997; 42: 65–72.
- Chevillard S., Pouillart P., Beldjord C. i wsp. Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 1996; 77: 292–300.
- Burger H., Foekens J.A., Look M.P. i wsp. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 827–836.
- Young L.C., Campling B.G., Voskoglou-Nomikos T., Cole S.P., Deeley R.G., Gerlach J.H. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin. Cancer. Res.* 1999; 5: 673–680.
- Galimberti S., Marchetti A., Buttitta F. i wsp. Multidrug resistance related genes and p53 expression in human non small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 1998; 18: 2973–2976.
- Clifford S.C., Neal D.E., Lunec J. High level expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in the normal bladder urothelium: a potential involvement in protection against carcinogens? *Carcinogenesis* 1996; 17: 601–604.
- Nakagawa M., Emoto A., Nasu N. i wsp. Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer. *J. Urol.* 1997; 157: 1260–1264; dyskusja: 1264–1265.
- Park J., Shinohara N., Liebert M., Noto L., Flint A., Grossman H.B. P-glycoprotein expression in bladder cancer. *J. Urol.* 1994; 151: 43–46.
- Joly F., Mangioni C., Nicoletto M. A phase 3 study of PSC 833 in combination with paclitaxel and carboplatin (PC-PSC) versus paclitaxel and carboplatin (PC) alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary cancer of the peritoneum. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2002; 21: 202a.
- Chan H.S.L., Grogan T.M., DeBoer G., Haddad G., Gallie B.L., Ling V. Diagnosis and reversal of multidrug resistance in paediatric cancers. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A: 1051–1061.
- Filipits M., Suchomel R.W., Dekan G. i wsp. MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. *Clin. Cancer. Res.* 1996; 2: 1231–1237.
- Clifford S.C., Neal D.E., Lunec J. Alterations in expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in high-grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cancer* 1996; 73: 659–666.
- Tada Y., Wada M., Migita T. i wsp. Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int. J. Cancer* 2002; 98: 630–635.
- Benderra Z., Faussat A.M., Sayada L. i wsp. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7896–7902.
- Abbott B.L., Colapietro A.M., Barnes Y., Marini F., Andreeff M., Sorrentino B.P. Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood* 2002; 100: 4594–4601.
- van der Kolk D.M., Vellenga E., Scheffer G.L. i wsp. Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99: 3763–3770.
- Faneyte I.F., Kristel P.M., Maliepaard M. i wsp. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 1068–1074.
- Filipits M., Pohl G., Stranzl T., Schepel R.J., Pirker R. Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1998; 91: 1508–1513.
- List A.F., Spier C.S., Grogan T.M. i wsp. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87: 2464–2469.

40. Pirker R., Pohl G., Stranzl T. i wsp. The lung resistance protein (LRP) predicts poor outcome in acute myeloid leukemia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 457: 133–139.
41. Oh E.J., Kahng J., Kim Y. i wsp. Expression of functional markers in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 2003; 27: 903–908.
42. Rybarova S., Hajdukova M., Hodorova I. i wsp. Expression of the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) and the lung resistance-related protein (LRP) in human lung cancer. *Neoplasma* 2004; 51: 169–174.
43. Dingemans A.M., van Ark-Otte J., van der Valk P., Apolinario R.M., Scheper R.J., Postmus P.E., Giaccone G. Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann. Oncol.* 1996; 7: 625–630.
44. Ugglia B., Mollgard L., Stahl E. i wsp. Expression of topoisomerase IIalpha in the G0/G1 cell cycle phase of fresh leukemic cells. *Leuk. Res.* 2001; 25: 961–966.
45. Grandgirard N., Ly-Sunnaram B., Ferrant D. i wsp. Impact of topoisomerase II alpha and spermine on the clinical outcome of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 2004; 28: 479–486.
46. Lazaris A.C., Kavantzis N.G., Zorzos H.S., Tsavaris N.V., Davaris P.S. Markers of drug resistance in relapsing colon cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002; 128: 114–118.
47. Dingemans A.M., Witlox M.A., Stallaert R.A., van der Valk P., Postmus P.E., Giaccone G. Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2048–2058.
48. Mistry P., Stewart A.J., Dangerfield W. i wsp. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* 2001; 61: 749–758.
49. Verweij J., Herweijer H., Oosterom R. i wsp. A phase II study of epidoxorubicin in colorectal cancer and the use of cyclosporin-A in an attempt to reverse multidrug resistance. *Br. J. Cancer.* 1991; 64: 361–364.
50. Lehnert M. Chemotherapy resistance in breast cancer. *Anticancer Res.* 1998; 18: 2225–2226.
51. Belpomme D., Gauthier S., Pujade-Lauraine E. i wsp. Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann. Oncol.* 2000; 11: 1471–1476.
52. Millward M.J., Cantwell B.M., Munro N.C., Robinson A., Corris P.A., Harris A.L. Oral verapamil with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a randomised study. *Br. J. Cancer* 1993; 67: 1031–1035.
53. Milroy R. A randomised clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small cell lung cancer. West of Scotland Lung Cancer Research Group and the Aberdeen Oncology Group. *Br. J. Cancer* 1993; 68: 813–818.
54. List A.F., Kopecky K.J., Willman C.L. i wsp. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001; 98: 3212–3220.
55. Baer M.R., George S.L., Dodge R.K. i wsp. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 2002; 100: 1224–1232.
56. Sonneveld P., Suci S., Weijermans P. i wsp. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC); Leukemia Cooperative Group (LCG); Dutch Haemato-Oncology Cooperative Study Group (HOVON): Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: an EORTC-HOVON randomized phase III study (06914). *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 895–902.
57. Salmon S.E., Dalton W.S., Grogan T.M. i wsp. Multidrug-resistant myeloma: laboratory and clinical effects of verapamil as a chemosensitizer. *Blood* 1991; 78: 44–50.
58. Dalton W.S., Crowley J.J., Salmon S.S. i wsp. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study. *Cancer* 1995; 75: 815–820.