

## PRACA ORYGINALNA

## Badanie wpływu Selolu na ekspresję genów kodujących transportery błonowe i enzymy metabolizujące leki w komórkach nowotworowych wrażliwych i opornych

A study of the effect of Selol on the expression of genes encoding membrane transporters and drugs metabolism enzymes in sensitive and resistant tumour cells

Jadwiga Dudkiewicz Wilczyńska, Agnieszka Grabowska, Iza Książek, Karolina Nowak, Elżbieta Anuszevska

## STRESZCZENIE

Celem pracy było wykazanie różnic w ekspresji genów komórek ludzkiego nowotworu szyjki macicy (HeLa) i odpornej na winblastynę podlinii KB-V1, poddanych działaniu samej doksorubicyny oraz po łącznym podaniu Selolu 5% i doksorubicyny. Prowadzone badania zmierzają do wyjaśnienia mechanizmu działania Selolu w różnych typach komórek nowotworowych, w tym opornych wielolekowo. Poddanie komórek działaniu testowanych związków powoduje inne zmiany w grupie badanych genów w komórkach HeLa niż w komórkach KB-V1. Łączne podanie Selolu 5% i doksorubicyny wyzwała efekt cytotoksyczny w komórkach opornych KB-V1, co przypuszczalnie jest związane ze zmianą ekspresji genów ABCC2 i BCL2L1. Zaobserwowana zależność pozwala także lepiej zrozumieć molekularne podłoże oporności komórek linii KB-V1.

## SŁOWA KLUCZOWE

ekspresja genów, Selol 5%, doksorubicyna, HeLa, KB-V1

## ABSTRACT

The objective of this study was to demonstrate differences in the gene expression of human cervical cancer cells (HeLa) and vinblastine-resistant KB-V1 subline treated with doxorubicin alone and combination of Selol 5% and doxorubicin. Ongoing studies seek to clarify the mechanism of action of Selol in different types of cancer cells, including those which show multidrug resistance. Cells treatment with the tested compounds in

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków  
Narodowego Instytutu Leków  
w Warszawie

## ADRES

## DO KORESPONDENCJI:

Dr n. farm. Jadwiga Dudkiewicz Wilczyńska  
Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków  
Narodowego Instytutu Leków  
ul. Chełmska 30/34  
00-725 Warszawa  
tel. 22 851 43 69, 32 851 44 96  
email: jadvig@il.waw.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 5–6, 7–13  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

the group of genes tested in HeLa cells causes other changes than in KB-V1 cells. In the resistant cells, exposure to Selol 5% and doxorubicin, released the cytotoxic effects by changing the expression of ABCC2 and BCL2L1 genes. The observed dependence also allows better understanding the molecular mechanisms of resistance in the KB-V1 cell line.

## KEY WORDS

gene expression, Selol 5%, doxorubicin, HeLa cells, KB-V1 cells

## WSTĘP

Określony profil ekspresji genów w komórce decyduje o jej indywidualnych, specyficznych właściwościach i swoistej charakterystyce, pozwalając na ocenę mechanizmów pewnych biochemicznych ścieżek i umożliwiając porównanie pod tym względem różnych typów komórek [1,2]. Profil ekspresji genów w komórce może ulec zmianie w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, co może prowadzić m.in. do powstania chemiooporności komórek nowotworowych, która wiąże się z licznymi zmianami na poziomie komórkowym oraz genetycznym [3,4]. Zmiany w mechanizmach komórkowych wynikają m.in. z silnej aktywacji zależnych od ATP pomp błonowych, odpowiedzialnych za transport substancji toksycznych do i z komórki [5,6,7,8], co głównie jest skutkiem zmiany ekspresji genów z rodziny MDR (*multi drug resistance* – ABCB1), MRP (*multidrug resistance-associated protein* – ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCC6) lub TP53. Inną przyczyną lekooporności może być zakłócenie metabolizmu przez przyspieszenie procesów detoksykacyjnych związków farmakologicznie czynnych w komórkach nowotworowych prowadzące do ich inaktywacji, co z kolei jest efektem zmiany ekspresji genów uczestniczących w metabolizmie leków, w tym genów z rodziny cytochromu P450, genu S-transferazy glutationu czy dysmutazy ponadtlenkowej. Przyczyn lekooporności upatruje się też w zaburzeniach procesu apoptozy, związanych ze zmianą ekspresji białek regulatorowych z rodziny BCL-2/BAX, ponieważ mechanizmy działania większości leków przeciwnowotworowych oparte są na indukcji apoptozy w komórce. Stwierdzono przyhamowanie apoptozy w przypadku nadekspresji białek BCL-2 oraz BCL-XL [9,10,11,12].

Jedną ze strategii zwiększania skuteczności i ograniczania toksyczności terapii onkologicznych jest wywoływanie chemiouwrażliwienia

komórek nowotworowych za pomocą innych związków, podawanych przed lub łącznie z cytostatykiem [13,13,15,16].

Celem pracy była analiza ekspresji genów kodujących transportery błonowe, tj.: ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCC6, ABCG2, BAX, BCL2, BCL2L1, MVP, RB1, TOP1, TOP2A, TOP2B, TP53, oraz genów: ARNT, BLMH, CLPTM1L, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, DHFR, EPHX1, GSK3A, GSTP1, NAT2, SOD1, SULT1E1, TPMT, kodujących enzymy metabolizujące leki w komórkach ludzkiego nowotworu szyjki macicy (HeLa) i odpornej na winblastynę podlinii KB-V1. Oceniano zmiany w ekspresji badanych genów w komórkach poddanych działaniu samej doksorubicyny (DOX) oraz po łącznym podaniu Selolu 5% i DOX. Selol 5% jest to związek organiczny zawierający selen IV, będący mieszaniną selenotriglicerydów, o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych [17]. Prowadzone badania zmierzają do wyjaśnienia mechanizmu działania Selolu w różnych typach komórek nowotworowych, w tym opornych wielolekowo. W badaniach wykonanych techniką PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) wykorzystano macierz „RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array: Human Cancer Drug Resistance and Metabolism” (SABiosciences), zawierającą badane geny.

## MATERIAŁ I METODY

## HODOWLE KOMÓRKOWE

Materiał do badań stanowiły hodowane komórki ludzkiej linii nowotworowej szyjki macicy HeLa oraz jej podlinii KB-V1 (German Collection), hodowane w pożywce EMEM (Lonza) (5%CO<sub>2</sub>, 37°C), wzbogaconej 10% FBS (Gibco) oraz dodatkiem 1% antybioty-

ków (Penicylina, Streptomycyna, Amfoterycyna B) (Lonza). W celu uzyskania fenotypu MDR komórki KB-V1 początkowo hodowano w EMEM z dodatkiem 0,5 µg/ml winblastyny. W dalszych eksperymentach w celu eliminacji rewertantów komórek KB-V1 co pięć pasażów dodawano do pożywki 0,5 µg/ml winblastyny. Eksperymenty z zastosowaniem ksenobiotyków wykonywano na kolejnych pasażach II–IV od podania winblastyny.

#### BADANIE PROLIFERACJI (TEST MTT)

Po 24 godzinach inkubacji do hodowli dodawano samą DOX w stężeniach: 0,29; 1,16 i 5,8 µg/ml lub w kombinacji z Selolem 5% (otrzymanym z WUM), w ilościach odpowiadających 1, 5 i 10 µg Se/ml. Równolegle prowadzono hodowlę komórek kontrolnych, w pożywce bez dodatku ksenobiotyków. Przeżywalność komórek po 24 godzinach inkubacji z dodatkiem lub bez dodatku ksenobiotyków oceniano w teście MTT. W tym celu, komórki inkubowano przez 4 godziny z 50 µl 0,5% roztworu odczynnika MTT. Powstałe kryształki formazanu rozpuszczano w 200 µl 99,7% izopropanolu. Absorbancję roztworów mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm, z zastosowaniem czytnika płytek iEMS Reader MF (Labsystems).

#### HODOWLE KOMÓREK PRZEZNACZONYCH DO IZOLACJI RNA

Po 24 godzinach inkubacji do hodowli dodawano tylko DOX w stężeniu 0,29 µg/ml lub DOX z dodatkiem Selolu 5%, w ilości odpowiadającej 10 µg/ml selenu, i kontynuowano hodowlę przez kolejne 24 godziny. Próbę kontrolną stanowiła hodowla komórek prowadzona w samej pożywce. Zastosowane stężenia DOX i Selolu zostały wybrane na podstawie wyników badania proliferacji.

#### IZOLACJA I OCZYSZCZANIE WYZIOLOWANEGO RNA I SYNTEZA cDNA

Całkowite RNA izolowano z około  $3 \times 10^6$  komórek, zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta zestawu: RNeasy Mini Kit (Qiagen). Integralność RNA potwierdzano elektroforetycznie przy użyciu systemu FlashGel® Dock (Lonza). Oczyszczanie całkowitego RNA z pozostałości genomowego DNA, a następnie syntezę jednoniciowego cDNA (odwrotna transkrypcja), przeprowadzono zgodnie z pro-

cedurą producenta (SABiosciences). Wyjściowa ilość RNA użyta na tym etapie wynosiła dla wszystkich prób 1 µg.

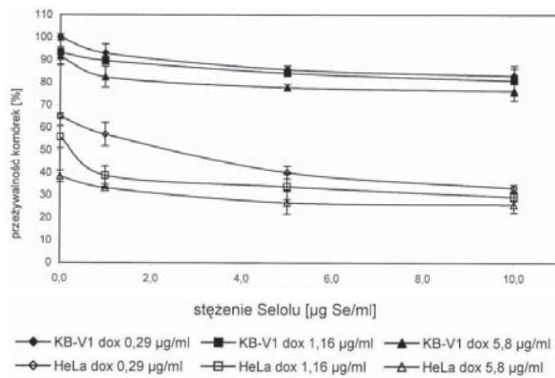
#### OZNACZANIE EKSPRESJI GENÓW METODĄ QRT-PCR

Analizę ilościową ekspresji genów wykonano na macierzy RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Cancer Drug Resistance and Metabolism, wykorzystując dedykowany zestaw odczynników SABiosciences RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix, w aparacie MX3005p (Stratagene). Analizę wyników metodą  $\Delta\Delta C_T$  przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta macierzy.

### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Niekorzystnym zjawiskiem, znacznie obniżającym skuteczność terapii DOX, jest wykształcenie przez niektóre komórki nowotworowe oporności na ten lek. Do komórek wykazujących krzyżową oporność na DOX zaliczana jest oporna na winblastynę linia KB-V1. Linie HeLa i jej podlinię KB-V1 wybrano dla wykazania różnic w ekspresji genów w komórkach wrażliwych i opornych na DOX. We wstępnym etapie omawianej pracy w teście MTT nie stwierdzono cytotoksycznego działania DOX w zakresie stężeń 0,29–5,8 µg/ml po 24 godzinach inkubacji komórek linii odpornej KB-V1. Mechanizm działania DOX polega przede wszystkim na hamowaniu aktywności topozomerazy II oraz indukowaniu powstawania wolnych rodników tlenowych. W pracy podjęto próbę sprawdzenia możliwości obniżenia oporności komórek KB-V1 na DOX przez zastosowanie selenu IV pochodzącego z Selolu 5%, wykazującego w zastosowanym zakresie stężeń działanie prooksydacyjne. Wykorzystując test MTT sprawdzono wpływ Selolu 5% w stężeniach 1, 5 i 10 µg Se/ml na proliferację komórek wrażliwych i opornych, traktowanych DOX w stężeniach 0,29; 1,16 i 5,8 µg/ml. Stwierdzono, że pod wpływem Selolu 5% następuje – w porównaniu z kontrolą – zależne od stężenia selenu dodanego do pożywki obniżanie proliferacji komórek obu badanych linii. Pod wpływem łącznego działania Selolu 5%, w ilości odpowiadającej 10 µg Se/ml i DOX w stężeniu 0,29 µg/ml, przeżywalność komórek odpornej linii KB-V1 obniżyła się o około 20%, a przeżywalność komórek HeLa spadła około 32% (ryc. 1).

Zauważalny wpływ Selolu 5% w komórkach wrażliwych i opornych traktowanych DOX wykorzystano w kolejnym eksperymencie przeprowadzonym dla porównania ekspresji genów związanych z opornością wielolekową i metabolizmem leków, w komórkach obu badanych linii. Do badania ekspresji genów zastosowano gotową macierz, na której jednocześnie można obserwować przebieg wielu reakcji PCR w czasie rzeczywistym, specyficznym dla wybranych genów. Przeprowadzono analizę ekspresji 16 genów związanych z opornością wielolekową oraz 21 genów uczestniczących w metabolizmie leków, wymienionych w celu pracy. Oceniano odpowiedź badanych komórek wrażliwych i opornych na zastosowane ksenobiotyki. Otrzymane profile ekspresji genów porównano odpowiednio: dla komórek linii odpornej KB-V1 i wrażliwej HeLa hodowanych w warunkach kontrolnych oraz dla komórek obu linii poddanych działaniu DOX, w porównaniu z odpowiednimi komórkami hodowanymi w warunkach kontrolnych i komórkami linii odpornej KB-V1 i wrażliwej HeLa w odpowiedzi na traktowanie samą DOX oraz Selolem 5% i DOX.



**Ryc. 1.** Wpływ selenu pochodzącego z Selolu 5% na przeżywalność komórek HeLa i KB-V1 traktowanych dokсорubicyną (DOX) w stężeniach 0,29; 1,16 i 5,8 µg/ml, w odniesieniu do komórek kontrolnych.

**Fig. 1.** Effect of selenium in Selol 5% on the survival rate of HeLa and KB-V1 cells, treated with doxorubicin (DOX) in concentrations 0.29; 1.16 and 5.8 µg/ml, in relation to control cells.

Porównując profile ekspresji genów w komórkach linii odpornej KB-V1 z wrażliwą HeLa w hodowli kontrolnej, stwierdzono różnicę ekspresji ( $\geq 4x$ ) dla 7 genów (tab. I). Wyższy poziom ekspresji w komórkach opornych dotyczył genów ABCB1, ABCC2, ABCC6, CYP1A2 i CYP2C19, niższą ekspresję stwierdzono dla genów ABCC3 i GSTP1. Uzyskane wyniki

wskazują, że komórki linii odpornej charakteryzują się zwiększoną ekspresją genów kodujących białka z rodziny ABC i cytochromu P450, a obniżoną aktywnością genu GSTP1, kodującego enzym S-transferazę glutationu. W jego obecności powstają w komórce koniugaty glutationu z ksenobiotykami, reakcje te są zaliczane do II fazy biotransformacji ksenobiotyków. Obniżona ekspresja genu GSTP1 wskazuje na obniżenie reakcji II fazy, co może być związane z nadekspresją genów ABCB1 i CYP2C19.

**Tabela I.** Profil ekspresji wybranych genów w komórkach linii odpornej w porównaniu z wrażliwą w hodowli kontrolnej. Wzrost ekspresji ↑, obniżenie ekspresji ↓

**Table I.** Expression profile of selected genes in drug-resistant compared with sensitive cell lines, in the control culture. Marked increase in the expression ↑, decrease the expression ↓

| Funkcja genu     | KBV-1 kontrola/HeLa kontrola |                 |
|------------------|------------------------------|-----------------|
|                  | symbol genu                  | krotność zmiany |
| Oporność na leki | ABCB1                        | 107,90 ↑        |
|                  | ABCC2                        | 7,38 ↑          |
|                  | ABCC3                        | 7,51 ↓          |
|                  | ABCC6                        | 9,41 ↑          |
| Metabolizm leków | CYP1A2                       | 5,89 ↑          |
|                  | CYP2C19                      | 18,37 ↑         |
|                  | GSTP1                        | 31,15 ↓         |

W komórkach opornych, traktowanych 0,29 µg/ml DOX obserwowano – w porównaniu z kontrolą (bez DOX) – wzrost ekspresji tylko genu ABCC3 (tab. II), dla którego wyjściowy poziom ekspresji w komórkach kontrolnych był zdecydowanie niższy niż w komórkach wrażliwych (tab. I). Natomiast w komórkach HeLa pod wpływem DOX obserwowano aż 28-krotnie wyższą niż w próbie kontrolnej nadekspresję genu ABCB1, co może świadczyć o uruchamianiu mechanizmów obrony przed ksenobiotykiem przez komórki wrażliwe (tab. II). W komórkach wrażliwych traktowanych DOX stwierdzono także nadekspresję genów: CYP1A1, CYP2C19, CYP2E1 i CYP3A5. W komórkach obu linii pod wpływem DOX, obserwowano – obok szeroko wyrażonej nadekspresji genów z rodziny cytochromu P450 – wzmożoną odpowiedź dla genu EPHX1 kodującego mikrosomalną hydrolazę epoksydową i genu SULT1E1 kodującego sulfotransferazę estrogenową. Mikrosomalna hydrolaza epoksydowa typu 1 pełni ważną funkcję w detoksykacji organizmu. Sulfotransferaza estrogenowa wiąże estron w nieaktywną postać siarczanu, wpływając na pozagonadalny poziom estrogenów [18]. W pracy Evansa i wsp. [19] stwierdzono,



że w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego proliferacja jest stymulowana przez estradiol niezwiązany w połączenia siarczanowe na skutek braku lub tylko niewielkiej aktywności tego enzymu. W naszych badaniach – zarówno w komórkach nowotworowych wrażliwych, jak i opornych traktowanych DOX – obserwowano zwiększoną ekspresję genu kodującego enzym sulfotransferazę estrogenową, co być może przekłada się na zahamowanie proliferacji tych komórek, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Obserwowana odpowiedź większej liczby genów metabolizmu leków w komórkach wrażliwych prawdopodobnie wynika z faktu, że do wnętrza tych komórek dociera więcej DOX niż do komórek opornych, charakteryzujących się wyższą efektywnością pozbywania się ksenobiotyków. Zjawisko to wyjaśnia obserwowane różnice w cytotoksycznym działaniu DOX na obie linie komórkowe.

wych, jak i opornych nie obserwowano zmian w ekspresji genu ABCC2 po podaniu samej DOX w porównaniu z poziomem wyjściowym, oznaczonym w hodowli komórek kontrolnych (tab. II). Pod wpływem łącznego podawania DOX i Selolu 5% obserwowano także utrzymującą się w komórkach opornych nadekspresję genu ABCB1 w porównaniu z komórkami wrażliwymi. Zestawiając otrzymaną krotność zmiany z wartością otrzymaną z porównania ekspresji tego genu w warunkach kontrolnych (tab. I) stwierdzono, że uległa ona obniżeniu o około 2 razy. Ponadto poziom ekspresji dwóch innych genów – ABCC1 i ABCG2, należących do grupy kodującej białka błonowe transportujące leki, był 4–5 razy niższy w komórkach opornych (tab. III). Na szczególną uwagę zasługuje wystąpienie tylko w komórkach opornych około 4-krotnego obniżenia ekspresji genu BCL2L1 pod wpływem Selolu 5% (tab.

**Tabela II.** Zmiany pod wpływem doksorubicyny (DOX) w profilu ekspresji genów w komórkach linii wrażliwej i odpornej w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Wzrost ekspresji ↑, obniżenie ekspresji ↓

**Table II.** Changes in the profile of gene expression under the influence of doxorubicin (Dox) in sensitive and drug-resistant cell lines compared with control cells. Marked increase in the expression ↑, decrease the expression ↓

| Funkcja genu     | HeLa +Dox/HeLa kontrola |                 | KB-V1+ Dox/KB-V1 kontrola |                 |
|------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
|                  | symbol genu             | krotność zmiany | symbol genu               | krotność zmiany |
| Oporność na leki | ABCB1                   | 28,30 ↑         | ABCC3                     | 6,30 ↑          |
|                  | CYP1A1 CYP2B6           | 21,20 ↑         | CYP2B6 CYP2C8 CYP3A4      | 5,27 ↑          |
| Metabolizm leków | CYP2C19                 | 9,39 ↑          | EPHX1                     | 4,31 ↑          |
|                  | CYP2C8                  | 18,71 ↑         | SULT1E1                   | 9,57 ↑          |
|                  | CYP2E1                  | 5,92 ↑          |                           | 7,38 ↑          |
|                  | CYP3A4                  | 8,40 ↑          |                           | 7,01 ↑          |
|                  | CYP3A5                  | 9,42 ↑          |                           |                 |
|                  | EPHX1                   | 4,12 ↑          |                           |                 |
|                  | SULT1E1                 | 4,32 ↑          |                           |                 |
|                  |                         | 9,75 ↑          |                           |                 |

W pracy zbadano także wpływ łącznego podawania DOX i Selolu 5% na profil ekspresji badanych genów w komórkach obu linii. Zastosowane w tym badaniu stężenia 0,29 µg/ml DOX i Selolu 5%, w ilości odpowiadającej 10 µg Se/ml, zostały wybrane na podstawie wyników uzyskanych w teście MTT. Pod wpływem łącznego podania Selolu i DOX w odniesieniu do inkubacji komórek z samą DOX nastąpiła zmiana ekspresji genów z rodziny ABC (tab. III). W komórkach wrażliwych ok. 7-krotnie wzrosła ekspresja genu ABCC6, natomiast w komórkach opornych ekspresja genu ABCB1 była 8-krotnie wyższa, zaś genu ABCC2 aż 82-krotnie niższa. Zarówno w komórkach wrażli-

III). Gen BCL2L1 jest zaliczany do dużej rodziny genów kodujących białka o właściwościach antyapoptycznych. Obserwowany spadek ekspresji genu BCL2L1 powinien w efekcie doprowadzić do zmian w równowadze proliferacja komórkowa – śmierć komórki, na korzyść tej ostatniej. Dla genów biorących udział w metabolizmie leków w komórkach linii wrażliwej pod wpływem Selolu 5% obserwowano dalszy wzrost ekspresji genów z rodziny cytochromu P450, co dotyczy szczególnie genu CYP1A2. W analogicznym układzie badawczym w komórkach linii odpornej stwierdzono wzrost ekspresji większej liczby genów z rodziny cytochromu P450, niż po podaniu samej DOX.

Analiza zmian ekspresji genów z rodziny cytochromu P450 wskazuje, że dynamika tych zmian w komórkach linii wrażliwej jest dużo wyższa niż w komórkach linii odpornej. Z bezpośredniego porównania profilu ekspresji badanych genów w komórkach linii odpornej z wrażliwą pod wpływem łącznego podawania ksenobiotyków wynika, że poziom ekspresji trzech genów (CYP1A1, CYP1A2 i CYP2D6) jest niższy w komórkach linii odpornej. W odpowiedzi komórek linii odpornej na podanie Selolu 5% stwierdzono wzrost poziomu ekspresji genu transferazy glutationu (GSTP1), kodującego białko enzymatyczne zaangażowane w obronę przed stresem oksydacyjnym. Zmia-

ny takiej nie zaobserwowano w komórkach linii wrażliwej. Natomiast z bezpośredniego porównania zmian zachodzących w obu liniach wynika, że poziom ekspresji tego genu był wyższy w linii wrażliwej. Obserwacja ta może potwierdzać przypuszczalny prooksydacyjny mechanizm działania Selolu, polegający na indukowaniu powstawania wolnych rodników tlenowych w komórce. Natomiast zaobserwowane zmiany w ekspresji genów ABCC2 i BCL2L1 mogą bezpośrednio wywoływać pojawienie się efektu obniżenia przeżywalności komórek opornych, pod wpływem łącznego działania Selolu 5% i DOX w porównaniu z działaniem tylko DOX (ryc. 1).

**Tabela III.** Zmiany w profilu ekspresji wybranych genów w komórkach linii wrażliwej i odpornej hodowanej z dodatkiem doksorubicyny (DOX) i Selolu 5% w porównaniu z hodowlą tych komórek traktowanych samą DOX oraz w komórkach opornych w porównaniu z wrażliwymi pod wpływem łącznego podawania DOX i Selolu. Wzrost ekspresji ↑, obniżenie ekspresji ↓

**Table III.** Changes in the expression profile of selected genes in sensitive and drug-resistant cell lines, grown with the addition of doxorubicin (DOX) and Selol 5% compared with culture these cells treated with DOX alone and in drug-resistant cells compared with sensitive under the influence of co-administration of DOX and Selol. Marked increase in the expression ↑, decrease the expression ↓

| Funkcja genu     | HeLa+Selol+Dox/<br>/HeLa + Dox |                 | (KBV-1+Selol+ Dox)/<br>/(KBV-1 + Dox) |                 | (KBV-1+Selol+ Dox)/<br>/(HeLa +Selol+ Dox) |                 |
|------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|--|-----------------|
|                  | symbol genu                    | krotność zmiany | symbol genu                           | krotność zmiany | symbol genu                                | krotność zmiany |
| Oporność na leki | ABCC6                          | 6,93 ↑          | ABCB1                                 | 8,13 ↑          | ABCB1                                      | 54,71 ↑         |
|                  |                                |                 | ABCC2                                 | 82,48 ↓         | ABCC1                                      | 4,55 ↓          |
|                  |                                |                 | BCL2L1                                | 4,04 ↓          | ABCG2                                      | 5,33 ↓          |
|                  |                                |                 |                                       |                 | BCL2L1                                     | 4,52 ↓          |
| Metabolizm leków | CYP1A1                         | 4,57 ↑          | CYP1A1                                | 8,28 ↑          | CYP1A1                                     | 20,50 ↓         |
|                  | CYP1A2                         | 47,08 ↑         | CYP1A2                                | 5,11 ↑          | CYP1A2                                     | 4,15 ↓          |
|                  | CYP2B6 CYP2C19                 | 9,56 ↑          | CYP2C19                               | 10,19 ↑         | CYP2 D6                                    | 7,23 ↓          |
|                  | CYP2C8                         | 27,70 ↑         | CYP2C8 CYP2C9                         | 6,52 ↑          | GSTP1                                      | 12,35 ↓         |
|                  | CYP2C9                         | 10,72 ↑         | CYP2E1                                | 7,33 ↑          |  |                 |
|                  | CYP2D6                         | 7,42 ↑          | CYP3A5                                | 18,37 ↑         |  |                 |
|                  | CYP2E1                         | 12,92 ↑         | GSTP1                                 | 5,95 ↑          |  |                 |
|                  | CYP3A5                         | 6,53 ↑          |                                       | 5,79 ↑          |  |                 |
|                  |                                | 5,78 ↑          |                                       |                 |  |                 |

### WNIOSKI

1. W komórkach wrażliwych HeLa pod wpływem DOX wzrasta poziom ekspresji genu ABCB1, co może świadczyć o uruchamianiu mechanizmu obronnego związanego z aktywnym transportem błonowym.
2. Opierając się na wynikach cytotoksyczności i różnicach w profilach ekspresji genów

w komórkach obu linii potwierdzono występowanie cech oporności w komórkach KB-V1.

3. Łączne podanie Selolu 5% i DOX wyzwała efekt cytotoksyczny w komórkach opornych KB-V1, co przypuszczalnie jest związane ze zmianą ekspresji genów ABCC2 i BCL2L1. Zaobserwowana zależność pozwala lepiej zrozumieć molekularne podłoże oporności komórek linii KB-V1 na doksorubicynę.

Praca częściowo finansowana przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej ze środków strukturalnych w ramach Działania 1.2. „Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki” Programu Innowacyjna Gospodarka 2007–2013. Laureatka I konkursu w programie-POMOST, mgr Agnieszka Grabowska, dziękuje za wsparcie.

## PIŚMIENNICTWO

1. Zhao Y., You H., Liu F. i wsp. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Lett* 2002; 185: 211–218.
2. Song J.H., Choi Ch.H., Yeom H.J., Hwang S.Y., Kim T.S. Monitoring the gene expression profiles of doxorubicin-resistant acute myelocytic leukemia cells by DNA microarray analysis. *Life Sci.* 2006; 79: 193–202.
3. Huang Y, Sadée W. Drug sensitivity and resistance genes in cancer chemotherapy: a chemogenomics approach. *DDT* 2003; 8: 356–363.
4. d'Amato T.A., Landreneau R.J., Ricketts W. i wsp. Chemotherapy resistance and oncogene expression in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Cardivasc. Surg.* 2007; 133: 352–363.
5. Jakoniuk D. Rola transportu błonowego w zjawisku oporności wielolekowej. *Post. Biol. Kom.* 2004; 31: 703–715.
6. Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007; 446:749–757.
7. Gillet J.P., Efferth T., Steinbach D. i wsp. Microarray – Based detection of multidrug resistance in human tumor cells by expression profiling of of ATP-binding cassette transporter genes. *Cancer Res.* 2004; 64: 8987–8993
8. Boháčová V., Sulová Z., Dovinová I. i wsp. L1210 cells cultivated under the selection pressure of doxorubicin or vincristine express common mechanisms of multidrug resistance based on the overexpression of P-glycoprotein. *Toxicol in Vitro* 2006; 20: 1560–1568.
9. Longley D.B., Johnston P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 2005; 205: 275–292.
10. Szenajch J., Cieślak A. Molekularne mechanizmy chemooporności w raku nerki. *Współcz. Onkol.* 2005; 9: 123–128.
11. Poma P., Notarbartolo M., Labbozzetta M. The antitumor activities of curcumin and of its isoxazole analogue are not affected by multiple gene expression changes in an MDR model of the MCF-7 breast cancer cell line: analysis of the possible molecular basis. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 20:329–35.
12. Riedel R.F., Porrello A., Pontzer E. i wsp. A genomic approach to identify molecular pathways associated with chemotherapy resistance. *Mol. Cancer. Ther.* 2008; 7: 3141–3149.
13. Suchocki P., Misiewicz I., Skupinska K., Waclawek K., Fijalek Z., Kasprzycka-Guttman T. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. *Oncol. Rep.* 2007; 18: 893–899.
14. Effenberger K., Breyer S., Schobert R. Modulation of doxorubicin activity in cancer cells by conjugation with fatty acyl and terpenyl hydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45: 1947–1954.
15. Dai C.L., Tiwari A.K., Wu C.P. i wsp. Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. *Cancer Res.* 2008; 68: 7905–7914.
16. Yang Z., Wu D., Bui T., Ho R.J. A novel human multidrug resistance gene MDR1 variant G571A (G191R) modulates cancer drug resistance and efflux transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 327: 474–481.
17. Fitak B., Grabowski M., Suchocki P. *Pol. Pl* 176530 (Cl. A61K31/095)
18. Licznarska B., Baer-Dubowska W. Intrakrynologia estrogenów a terapia i chemioprewencja w nowotworach piersi. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2010; 64: 220–230.
19. Evans T.R., Rowlands M.G., Luqmani Y.A., Chander S.K., Coombes R.C. Detection of breast cancer-associated estrone sulfatase in breast cancer biopsies and cell lines using polymerase chain reaction. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1993; 46: 195–201.