

Κεφάλαιο 38

Κυτταρικός κύκλος, φαρμακευτική αντίσταση και ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53

Δ. Μουρατίδου

Α. Μπούτης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ανάμεσα σε όλα τα φαινόμενα που σχετίζονται με τη διατήρηση ενός κυτταρικού πληθυσμού, το σπουδαιότερο, όπως είναι ευνόητο, είναι ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου και σ' αυτή την πολύπλοκη διεργασία, η μορφολογική και αριθμητική έκφανση συνοψίζεται στον κυτταρικό κύκλο. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελεί ένα από τα κεντρικά φαινόμενα της ζωής. Οι παράγοντες που συμμετέχουν στον έλεγχο και τη ρύθμιση των διεργασιών του κυτταρικού κύκλου αποτελούν έναν από τους κύριους στόχους της βιολογικής έρευνας. Η γνώση της διαδικασίας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελεί βασική προϋπόθεση για την κατανόηση των βασικών αρχών κυτταροκινητικής.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο κυτταρικός κύκλος, δηλαδή ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης του κυττάρου, αποτελεί το βασικό μηχανισμό με τον οποίο αναπαράγονται όλα τα έμβια όντα και, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, περιλαμβάνει τη διαίρεση του πυρήνα (μίτωση) και τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος (κυτταροκίνηση). Οι δύο μαζί αυτές διεργασίες αποτελούν τη φάση Μ του κυτταρικού κύκλου, ο οποίος διαιρείται στις φάσεις G₁ (προσυνθετική), S (συνθετική), G₂ (μετασυνθετική)

ή προμιτωτική) και Μ (μιτωτική) (Εικόνα 1). Ο κύκλος ζωής σε κύτταρα θηλαστικών με ταχεία διαίρεση διαρκεί περίπου 24 ώρες, ενώ ολόκληρη η φάση Μ διαρκεί περίπου μία ώρα, δηλαδή καταλαμβάνει μόνο ένα πολύ μικρό κλάσμα στο σύνολο του κυτταρικού κύκλου¹. Η περίοδος που παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο φάσεις Μ λέγεται μεσόφαση.

Στη μίτωση, δηλαδή στη διαίρεση του πυρήνα, κάθε χρωμόσωμα έχει αντιγραφεί και αποτελείται από δύο ταυτόσημες (αδελφές) χρωματίδες ή χρωματίδια. Οι αδελφές χρωματίδες είναι συνενωμένες σε όλο τους το μήκος με αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνειά τους και οι οποίες διασπώμενες επιτρέπουν το διαχωρισμό των χρωματίδων, ώστε να μετατρέπονται σε ανεξάρτητα χρωμοσώματα που έλκονται προς τους πόλους του κυττάρου. Η μίτωση διαιρείται σε πέντε στάδια:

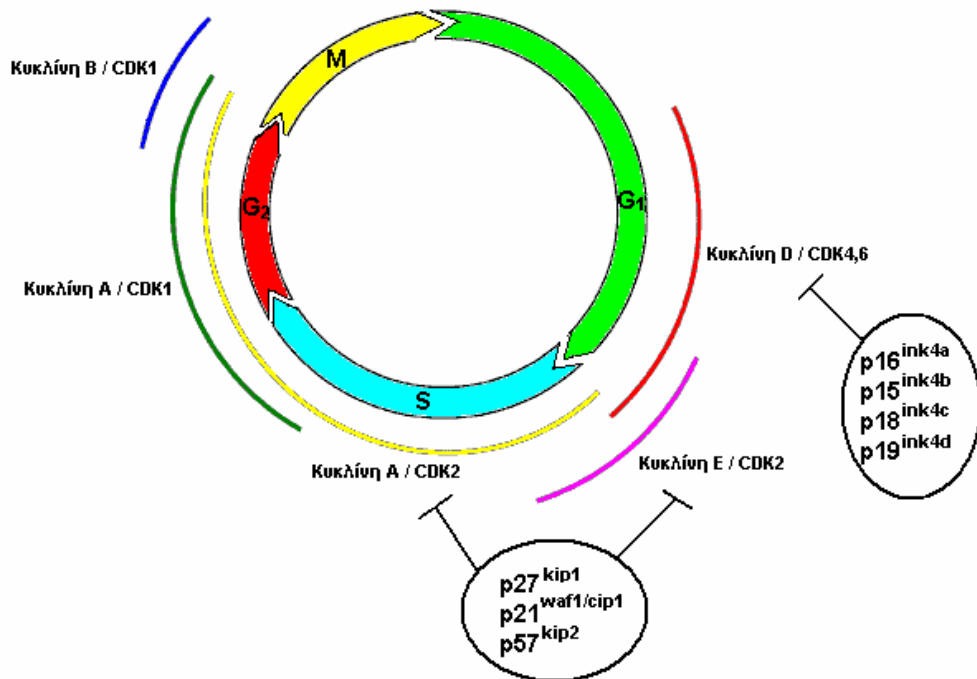
1. *Πρόφαση*: συμπύκνωση των αντιγραμμένων χρωμοσωμάτων και έναρξη σχηματισμού της ατράκτου ανάμεσα στα δύο κεντροσώματα.
2. *Προμετάφαση*: αποδόμηση πυρηνικού περιβλήματος μέσω φωσφορυλίωσης των λαμινών και πρόσδεση των χρωμοσωμάτων στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου μέσω των κινητοχώρων τους.

3. **Μετάφαση:** παράταξη των χρωμοσωμάτων στον ισημερινό της ατράκτου, στο μέσο της απόστασης ανάμεσα στους πόλους της. Οι ζευγαρωμένοι μικροσωληνίσκοι των κινητοχώρων πάνω σε κάθε χρωμόσωμα συνάπτονται στους αντίθετους πόλους της ατράκτου.

4. **Ανάφαση:** οι ζευγαρωμένες χρωματίδες διαχωρίζονται συγχρονισμένα και σχηματίζονται δύο θυγατρικά χρωμοσώματα. Κάθε χρωματίδη έλκεται προς το σύστοιχο πόλο της ατράκτου μέσω βρά-

χυνης των μικροσωληνίσκων, ενώ οι πόλοι της ατράκτου απομακρύνονται μεταξύ τους. Έτσι τα χρωμοσώματα διαχωρίζονται.

5. **Τελόφαση:** οι δύο ομάδες των θυγατρικών χρωμοσωμάτων φτάνουν στους πόλους της ατράκτου. Γύρω από την κάθε ομάδα σχηματίζεται ένα νέο πυρηνικό περιβλήμα μέσω αποφωσφορύλιωσης των λαμινών και έτσι ολοκληρώνεται το τέλος της μίτωσης.



Εικόνα 1. Κυτταρικός κύκλος. Διακρίνονται οι φάσεις του κύκλου και τα αντίστοιχα συμπλέγματα κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών καθώς και οι αναστολείς των CDKs.

Η κυτταροκίνηση ακολουθεί τη μίτωση. Το κυτταρόπλασμα διαιρείται στα δύο από το συστατικό δακτύλιο ακτίνης και μωσίνης που περισφίγγει το κύτταρο για να δημιουργήσει δυο θυγατρικά κύτταρα το καθένα με το δικό του πυρήνα. Οι μικροσωληνίσκοι επαναδιατάσσονται όπως διατάσσονται στη μεσόφαση.

Κάθε διπλοειδής πυρήνας, με εξαίρεση τα φυλετικά χρωμοσώματα (sex chromosomes) τα οποία καθορίζουν το φύλο, περιέχει δύο παραλλαγές κάθε χρωμοσώματος, μία από τον αρσενικό γονέα και μία από το θηλυκό. Κατ' αυτό τον τρόπο οι δύο παραλλαγές κάθε χρωμοσώματος (πατρικό και μητρικό) δεν είναι ταυτόσημες και αποκαλούνται ομόλογα

χρωμοσώματα (homologous chromosomes).

Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

Για την εύρυθμη ανάπτυξη του ευκαρυωτικού κυττάρου και τη διατήρηση όλων των λειτουργιών του σε φυσιολογικές συνθήκες απαιτείται η ρύθμιση και ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου σε όλα τα επίπεδα.

Ο κυτταρικός κύκλος διέπεται από ορισμένες βασικές και απαραβίαστες αρχές που εξασφαλίζουν το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων^{2,3}:

1. Τα αδρανή κύτταρα βρίσκονται στη φάση G₀ (φάση ανάπαυσης) του κυτταρικού κύκλου. Στην πραγματικότητα τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στη φάση G₁, αλλά λόγω αδράνειας ορισμένων μηχανισμών του κυτταρικού κύκλου απαιτείται περισσότερος χρόνος για τη μετάπτωση στη φάση S από ότι για τα κύτταρα της G₁ φάσης.

2. Κάθε φάση S ακολουθείται από μία φάση M και το αντίστροφο. Το κύτταρο δεν μπορεί να αρχίσει καινούρια φάση σύνθεσης DNA, αν δεν προηγηθεί μίτωση ούτε μπορεί να υποστεί δεύτερη μίτωση χωρίς την ολοκλήρωση της φάσης S.

3. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στους πολυκύτταρους οργανισμούς εξαρτάται από εξωκυττάρια σήματα που ελέγχουν την ανάπτυξη και την τροφική κατάσταση του κυττάρου ανάλογα με τις συνολικές ανάγκες του οργανισμού.

4. Κάθε κύτταρο που εισέρχεται αμετάκλητα στον κυτταρικό κύκλο και ξεπερνά ένα ορισμένο «σημείο περιορισμού» (restriction point) της G₁ φάσης θα ολοκληρώσει αυτόν ή θα υποστεί απόπτωση. Το σημείο αυτό ονομάζεται και «σημείο χωρίς επιστροφή» (point of no return).

5. Αποτυχία ολοκλήρωσης του κυτταρικού κύκλου ή βλάβη του DNA οδηγεί σε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης ή θάνατο του κυττάρου δια απόπτωσης. Ρυθμιστικές οδοί που αποτελούν τα «σημεία ελέγχου» (checkpoints) ελέγχουν τη μετάβαση μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και εξασφαλίζουν την ολοκλήρωσή του. Η μεταγωγή του σήματος που οδηγεί στην ανάπτυξη ενεργοποιεί επίσης τους αποπτωτικούς μηχανισμούς. Τα κύτταρα μάλιστα που πολλαπλασιάζονται είναι πιο ευάλωτα στην απόπτωση από ότι τα κύτταρα της G₀ φάσης.

6. Ο κυτταρικός κύκλος παρουσιάζει υψηλή εξελικτική διατήρηση ανάμεσα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται στους μηχανισμούς ελέγχου του ίδιου του κύκλου και στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα κύτταρα που εκτός των άλλων ελέγχουν τον αριθμό των κυττάρων στο σύνολο κάθε ιστού προκειμένου περί πολυκύτταρων οργανισμών (κυτταροκινητική, οργανογένεση κτλ).

Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιεί κατά καθορισμένη τάξη και ακολουθία τις απαιτούμενες πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν την κάθε διεργασία και στη συνέχεια, πάλι κατά καθορισμένη τάξη και ακολουθία, τις απενεργοποιεί μόλις τελειώσει η αντίστοιχη διεργασία. Όλα αυτά μάλιστα γίνονται κάτω από τη δεδομένη επήρεια συνθηκών και σημάτων ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων τόσο σε πολυκύτταρους οργανισμούς όσο και στις καλλιέργειες.

Η «καθοδήγηση» του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στη φωσφορυλίωση κρίσιμων πρωτεϊνών που επάγουν, ανα-

στέλλουν ή ρυθμίζουν την αντιγραφή του DNA, τη μίτωση και την κυτταροκίνηση. Η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελούν έναν από τους πιο κοινούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για τη μεταβολή της δραστηριότητας μιας πρωτεΐνης. Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης επιτελούνται από ειδικές ομάδες πρωτεϊνικών κινασών που καταλύουν τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από το ATP στην πλευρική αλυσίδα ενός συγκεκριμένου αμινοξέος της πρωτεΐνης-στόχου. Η αποφωσφορυλίωση γίνεται από άλλη ομάδα πρωτεϊνών, τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Τα πλεονεκτήματα των αντιδράσεων αυτών αποτελούν η ταχύτητα διεξαγωγής τους καθώς και η αφθονία του ATP στο κύτταρο⁴.

Κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες

Το σύστημα ελέγχου στηρίζεται σε «μοριακά φρένα» που σταματούν τον κύκλο στα σημεία ελέγχου (*checkpoints*)⁵. Με τον τρόπο αυτό, η μετάβαση από την G₁ και είσοδος στη φάση S ελέγχει την επάρκεια σε μέγεθος του κυττάρου, την καταλληλότητα του περιβάλλοντος σε θρεπτικές ουσίες και την παρουσία βλαβών στο DNA, ενώ η μετάβαση από την G₂ στην M φάση ελέγχει την επάρκεια σε μέγεθος του κυττάρου και την ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA.

Το σύστημα ελέγχου λειτουργεί με «όργανα» τα λειτουργικά συμπλέγματα κυκλίνης-κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης. Οι *κυκλίνες* (*cyclins*) αποτελούν ομάδα πρωτεϊνών του συστήματος ελέγχου που ευθύνεται για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνικών κινασών στις κατάλληλες χρονικές στιγμές του κυτταρικού κύκλου. Το όνομά τους προέρχεται από το γεγονός ότι το επίπεδο των

κυκλινών δεν είναι σταθερό αλλά κυμαίνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στο σύμπλοκο, η κυκλίνη παίζει το ρόλο του ρυθμιστή και η *κυκλινοεξαρτώμενη κινάση* ή *κινάση εξαρτώμενη από τις κυκλίνες* (*cyclin-dependent kinase, CDK*) το ρόλο του μιτωτικού καταλύτη. Για να είναι δραστική η CDK απαιτείται:

- i) σύζευξη με την αντίστοιχη κυκλίνη και
- ii) φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου, διεργασία που ελέγχεται από τις κινάσες που ενεργοποιούν τις CDKs (CDK-Activating kinases, CAKs).

Η πρωτεολυτική αποδόμηση των κυκλινών ή η ανασταλτική φωσφορυλίωση των CDKs συνήθως σηματοδοτούν τη μετάβαση στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου ή την αναστολή αυτού αντίστοιχα⁶⁻¹¹.

Σε πολλούς όγκους παρατηρείται απορύθμιση των CDKs και μάλιστα διαφόρων μορφών απορύθμιση. Για παράδειγμα, η καταστολή του p16 ή αλλοιώσεις του p53 μπορεί να σημαίνουν απώλεια της λειτουργικής ικανότητας ενδογενών κυκλινών. Από την άλλη μεριά, είναι δυνατό να προκληθεί υπερέκφραση της κυκλίνης D ή εξαλλαγή του γονιδίου Rb.

Οι παράγοντες που καθορίζουν τη διάρκεια της φάσης G₁ δεν έχουν διευκρινιστεί. Η μετάπτωση από τη φάση G₁ στη φάση S κατευθύνεται από τις CDK4 και CDK6 σε συνεργασία με την κυκλίνη D. Το σύμπλεγμα CDK-κυκλίνη φωσφορυλιώνει ένα παράγωγο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb (Rb=ρετινοβλάστωμα) το οποίο αναστέλλει τη δράση του E2F που είναι ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας¹²⁻¹³. Αυτή η

δράση του συμπλέγματος κυκλίνης-CDK αποτελεί την αντίδραση-κλειδί. Ο E2F δρα σε γονίδια που ωθούν το κύτταρο να προχωρήσει στη φάση S. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο E2F υπάρχουν συνολικά 6. Υπάρχουν όμως και ειδικοί αναστολείς των CDKs που δρουν αντίθετα κυρίως από το p53 αλλά και άλλα γονίδια^{7,9}.

Στη φάση S γίνεται διπλασιασμός του DNA. Η μηχανική του διπλασιασμού είναι εξαιρετικό φαινόμενο, καθώς κάθε ζεύγος από αυτά πρέπει να διπλασιαστεί μία και μοναδική φορά σε κάθε κύκλο. Τα ένζυμα που ρυθμίζουν το διπλασιασμό είναι οι DNA-πολυμεράσες, η δε τελομεράση ρυθμίζει την ασφάλεια του άκρου του DNA. Όταν ολόκληρο το γονιδίωμα έχει διπλασιαστεί, το κύτταρο μπαίνει πάλι σε μία ενδιάμεση φάση, τη φάση G₂. Τότε αρχίζει η δράση του συμπλέγματος κυκλίνης B με CDK1 που μέσω φωσφορυλίσεων οδηγεί στη μίτωση. Όμως το μεγαλύτερο μέρος των διεργασιών παραμένει άγνωστο¹¹.

Αναστολείς των κυκλινοεξαρθώμενων κινασών

Οι CDKs είναι δυνατό να διατηρούνται σε ανενεργό μορφή όταν βρίσκονται συνδεδεμένες με αναστολείς αυτών (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs). Οι αναστολείς των CDKs είναι μικρές πρωτεΐνες που ελέγχουν τη δραστηριότητα των CDKs, τη μετατόπισή τους στον πυρήνα και αποτελούν παράγοντες ελέγχου βλαβών του DNA και του σημείου ελέγχου της G₁⁹. Διακρίνουμε δύο είδη αναστολέων των κυκλινοεξαρθώμενων κινασών, τους γενικούς αναστολείς, που αναστέλλουν πολλαπλά συμπλέγματα κυκλίνης/CDK και τέτοιοι αναστολείς είναι οι p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} και p57^{KIP2} και τους ειδικούς αναστολείς, που αναστέλλουν

μόνο το σύμπλεγμα κυκλίνης D/CDK4 ή CDK6, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} και p19^{INK4d} (Εικόνα 1).

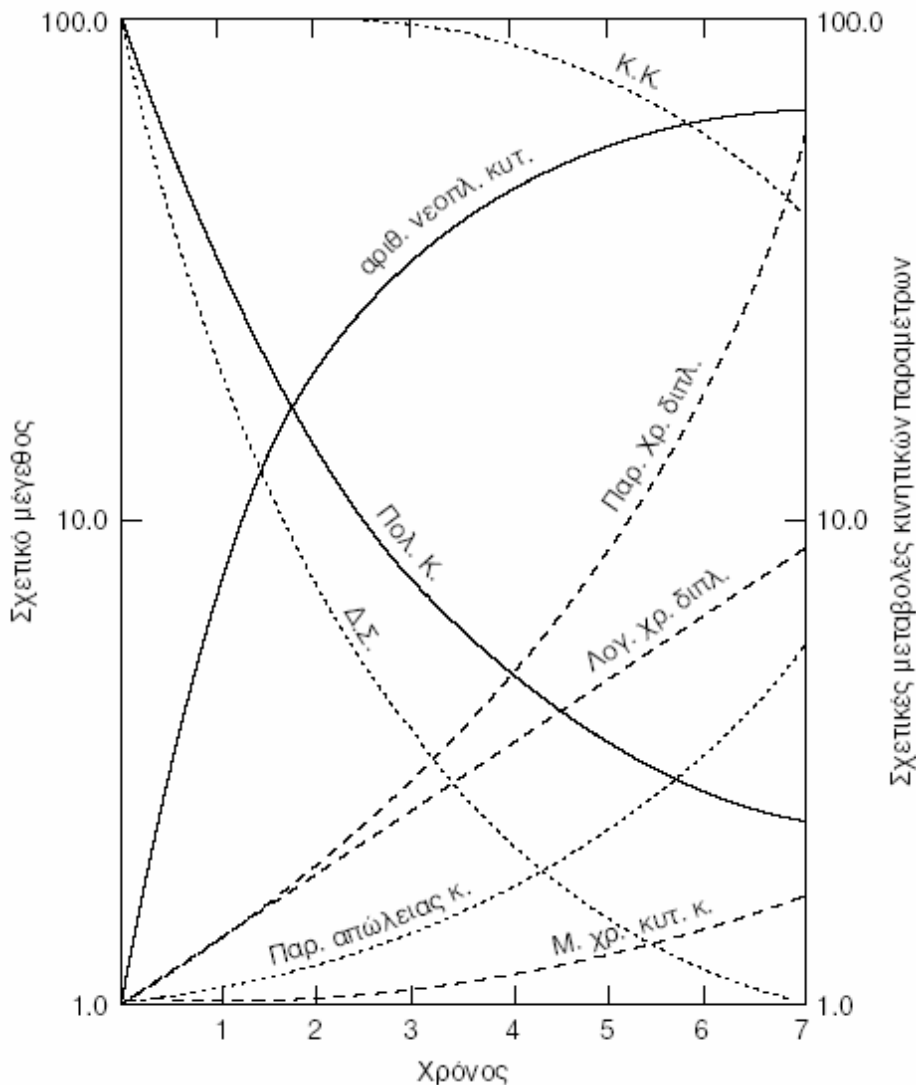
ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΤΙΚΗ – ΑΡΧΕΣ ΑΝΤΙ-ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Η κυτταροκινητική εξετάζει την κινητική της αύξησης των κυτταρικών πληθυσμών. Η γνώση της είναι απαραίτητη για την κατανόηση του πώς πορεύεται ένας πληθυσμός φυσιολογικών ή νεοπλασματικών κυττάρων υπό χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Μάλιστα με τη γνώση της κυτταροκινητικής είναι δυνατό να γίνουν κατανοητά φαινόμενα που δεν μπορεί κανείς να εξηγήσει μόνο με τα βιοχημικά και φαρμακολογικά δεδομένα¹⁴.

Καθώς τα κύτταρα ενός όγκου πολλαπλασιάζονται, το μέγεθος του όγκου μεγαλώνει ακολουθώντας μία ασύμμετρη σιγμοειδή καμπύλη που έχει σχέση με τον αριθμό τους και που λέγεται καμπύλη του Gompertz¹⁵ (Εικόνα 2). Αυξάνονται προοδευτικά ο χρόνος διπλασιασμού και το ποσοστό των κυττάρων που θνήσκουν, ενώ ελαττώνονται προοδευτικά το κλάσμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, το ποσοστό των κλωνογόνων κυττάρων και ο μιτωτικός δείκτης¹⁶. Για την ολοκλήρωση των σχέσεων κυτταροκινητικής και χημειοθεραπείας χρειάζεται αφενός η γνώση του σημείου δράσης του κυτταροστατικού στον κύκλο και αφετέρου η γνώση για το πού και πώς ισχύουν οι κανόνες του Skipper¹⁷⁻¹⁸, το μοντέλο των Goldie και Coldman¹⁹⁻²⁰ και το πρότυπο του Norton²¹. Το μοντέλο των Goldie και Coldman είναι ένα μαθηματικό πρότυπο που συσχετίζει την ευαισθησία των όγκων στα κυτταροστατικά με το ρυθμό

των αυτομάτων μεταλλάξεων που οδηγούν σε δευτερογενή αντίσταση. Τέλος

το πρότυπο του Norton έχει σχέση με την ετερογένεια των όγκων.



Εικόνα 2. Μεταβολές των κυρίων κυτταροκινητικών παραμέτρων (σηματικά) κατά την εξέλιξη ενός όγκου. Ο αριθμός των νεοπλασματικών κυττάρων αρχικά αυξάνεται εκθετικά, μετά επιβραδύνεται και τέλος φθάνει σε πλατώ (καμπύλη Gompertz). Ο χρόνος διπλασιασμού, ο ολικός χρόνος κυτταρικού κύκλου και ο παράγοντας απώλειας των κυττάρων, συνεχώς αυξάνονται. Το κλωνογόνο κλάσμα, το κλάσμα των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων και ο δείκτης σημασίας συνεχώς μειώνονται.

Φαρμακευτική αντίσταση

Η πρόοδος στον τομέα της θεραπευτικής των κακοήθων νεοπλασιών είναι συνεχής, ωστόσο οι περιπτώσεις οριστι-

κής επιτυχούς αντιμετώπισης (ίσης) με τη χημειοθεραπεία είναι ελάχιστες. Ως κυριότερος λόγος αποτυχίας της χημειοθεραπείας θεωρείται η ανάπτυξη

φαρμακευτικής αντίστασης (*drug resistance*)²². Σε συνθήκες εργαστηρίου η διάκριση μεταξύ ευαισθησίας (*sensitivity*) και αντίστασης σε ένα ή περισσότερα φάρμακα είναι ευχερής, αφού ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά προέλευσης.

Ωστόσο σε *in vivo* συνθήκες υπεισέρχονται ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που δυσχεραίνουν την εκτίμηση του φαινομένου, με αποτέλεσμα ως αντίσταση να χαρακτηρίζεται η αύξηση ή η μη συρρίκνωση του μεγέθους του όγκου μεταξύ των κύκλων χημειοθεραπείας. Συχνά γίνεται διάκριση μεταξύ ενδογενούς (*intrinsic*) και επίκτητης (*acquired*) αντίστασης. Ενδογενής αντίσταση παρατηρείται λόγω αυτόματων μεταλλάξεων πριν την έκθεση σε αντινεοπλασματικό φάρμακο, ενώ επίκτητη αντίσταση εμφανίζεται μετά από επανειλημμένη έκθεση στο φάρμακο και αφού προηγήθηκε αρχική περίοδος χημειοευαισθησίας.

Η έννοια της πρωτογενούς φαρμακευτικής αντίστασης στη χημειοθεραπεία του καρκίνου περιγράφηκε το 1979 από τους Goldie και Coldman¹⁹. Λίγες δεκαετίες νωρίτερα οι Luria και Delbrück²³ είχαν προσδιορίσει τη βάση του φαινομένου με την παρατήρηση της εμφάνισης ανθεκτικότητας λόγω αυτόματων μεταλλάξεων σε βακτηρίδια *Escherichia Coli* χωρίς την προηγούμενη έκθεση σε βακτηριοφάγους.

Εκτοτε προστέθηκε πληθώρα γνώσεων όσον αφορά τους μηχανισμούς φαρμακευτικής αντίστασης. Η βιολογική βάση του φαινομένου επικεντρώνεται στο ρόλο του γονιδίου p53 (βλέπε αντίστοιχη ενότητα), ενώ ο ρόλος της κυτταρικής κινητικής συνοψίζεται στην ανθεκτικότητα στη θεραπεία των κυττάρων

που βρίσκονται σε κατάσταση αδράνειας (φάση G₀). Στην τελευταία περίπτωση το πρόβλημα μπορεί να αρθεί με διατήρηση υψηλής συγκέντρωσης φαρμάκου, ώσπου το κύτταρο να βρεθεί στην ευαίσθητη φάση του κύκλου, ή με την επιλογή φαρμάκων ειδικών για συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου²⁴.

Πίνακας 1. Βιοχημικές οδοί φαρμακευτικής αντίστασης.

1. Διαταραχή μεταφοράς φαρμάκου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης
2. Ελάττωση ενδοκυττάριας ενεργοποίησης
3. Μεταβολή ή αύξηση της ποσότητας του ενδοκυττάρου στόχου
4. Αύξηση της ενδοκυττάριας απενεργοποίησης του φαρμάκου
5. Αυξημένη επιδιόρθωση
6. Φαινότυπος πολυφαρμακευτικής αντίστασης

Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη φαρμακευτικής αντίστασης είναι οι εξής (Πίνακας 1):

1. Διαταραχή μεταφοράς φαρμάκου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης

Η είσοδος των φαρμάκων στα νεοπλασματικά κύτταρα επιτυγχάνεται είτε με παθητική διάχυση είτε με διευκολυνόμενη μεταφορά²⁵. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει τη σύνδεση με πρωτεΐνη-υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης, μετακίνηση του συμπλόκου υποδοχέα-φαρμάκου και απελευθέρωση του φαρμάκου στο εσωτερικό του κυττάρου.

Αλλαγές στη δομή ή τον αριθμό των μορίων της πρωτεΐνης-υποδοχέα οδηγεί σε ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου. Έχει διαπιστωθεί σε πειραματικά μοντέλα φαρμακευτικής αντίστασης ότι η απώλεια της πρωτεΐνης FBP (*folate binding protein*)

και η μειωμένη έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου σχετίζονται με μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση πλατίνης²⁶.

Η ανακάλυψη πρωτεϊνών-μεταφορέων, σχετιζόμενων με την πολυφαρμακευτική αντίσταση (multidrug resistance protein, MRP) έδωσε εξήγηση σε μηχανισμούς αντίστασης σε διάφορα φάρμακα, όπως στη μεθοτρεξάτη και τους αζωθυπερίτες²⁴, όχι όμως και στην πλατίνη.

Το μόριο cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter), που αποτελεί ομόλογο των MRP, υπερεκφράζεται σε καρκινικές σειρές ανθεκτικές στην πλατίνη, ενώ επιμόλυνση των σειρών αυτών με αντινοσηματικό (antisense) ολιγονουκλεοτίδιο cMOAT αύξησε στο πενταπλάσιο την ευαισθησία στην πλατίνη²⁷.

Διαταραχή της ενδοκυττάριας μεταφοράς του φαρμάκου μπορεί να οφείλεται και σε ενεργοποίηση μηχανισμών αποβολής του μετά την είσοδό του στο κύτταρο. Η διαδικασία αυτή παρατηρείται σε κύτταρα με το φαινότυπο της πολυφαρμακευτικής αντίστασης (βλέπε παρακάτω).

2. Ελάττωση ενδοκυττάριας ενεργοποίησης του φαρμάκου

Ορισμένοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες χορηγούνται ως προφάρμακα και μεταβολίζονται σε κυτταροτοξικά παράγωγα εντός του κυττάρου. Απώλεια ενός ή περισσοτέρων από τα ένζυμα που φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν το προφάρμακο, οδηγεί σε σημαντική ελάττωση της δραστηριότητας και εμφάνιση φαρμακευτικής αντίστασης.

Κλασικό παράδειγμα ελαττωμένης ενδοκυττάριας ενεργοποίησης αποτελεί η αντίσταση στους αντιμεταβολίτες 6-μερκαπτοπουρίνη, 6-θειογουανίνη, κυτ-

ταραβίνη και 5-φθοριουρακίλη. Ευνόητο είναι, ότι στις περιπτώσεις αυτές, η αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου δεν μπορεί να ανατρέψει το μηχανισμό της φαρμακευτικής αντίστασης²⁴.

3. Μεταβολή ή αύξηση της ποσότητας του ενδοκυττάριου στόχου

Πολλά αντινεοπλασματικά φάρμακα δρουν με αναστολή ενός φυσιολογικού ενζύμου και διαταραχή της αντίστοιχης βιοσυνθετικής οδού. Ορισμένα κύτταρα παρουσιάζουν ικανότητα υπερπαραγωγής του ενζύμου-στόχου, με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια του χορηγούμενου φαρμάκου, ή παράγουν παραλλαγμένο ένζυμο, το οποίο δεν προσβάλλεται από το φάρμακο. Με τον τρόπο αυτό, κύτταρα ανθεκτικά στη μεθοτρεξάτη, έχουν τη δυνατότητα παραγωγής αυξημένης ποσότητας διυδροφολικής αναγωγάσης ή παραλλαγής του ενζύμου που δεν αναστέλλεται από το φάρμακο²⁸. Με τον ίδιο τρόπο ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές της θυμιδυλικής συνθετάσης και της τοποϊσομεράσης ενοχοποιούνται για την αντίσταση στις φθοριοπυριμιδίνες και τους αναστολείς της τοποϊσομεράσης II.

4. Αύξηση της ενδοκυττάριας απενεργοποίησης του φαρμάκου

Τα κυτταροτοξικά φάρμακα εισερχόμενα στο κύτταρο αλληλεπιδρούν με πληθώρα ηλεκτρικά φορτισμένων μορίων. Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο της ομάδας αυτής. Πρόκειται για τριπεπτίδιο με μία ελεύθερη σουλφυδρυλική ομάδα κυστεΐνης, η οποία αντιδρά και απενεργοποιεί τους κυτταροτοξικούς παράγοντες.

Αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων της ομάδας S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (glutathione S-transferase, GST)

σχετίζεται με φαρμακευτική αντίσταση στους αλκυλιούντες παράγοντες και την πλατίνη. Απενεργοποίηση μπορεί να επέλθει και μέσω σύνδεσης με τις μεταλλοθειονίνες (metallothionein, MT), μία οικογένεια πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους, που σχετίζεται με την αντίσταση στη χλωραμβουκίλη, τη μελφάλη, τη δοξορουβικίνη και τη σισπλατίνη²⁹.

5. Αυξημένη επιδιόρθωση

Κατόπιν επίδρασης φαρμακευτικών παραγόντων βλαπτικών για το DNA ανακύπτουν μεταξύ άλλων οι ακόλουθοι οδοί αντιμετώπισης των βλαβών στην αλληλουχία του DNA³⁰⁻³¹:

- i. *Επιδιόρθωση με αποκοπή σφάλματος (mismatch excision repair, MMR)*. Με τον τρόπο αυτό διορθώνονται σφάλματα που έγιναν κατά την αντιγραφή του DNA ή και από ορισμένους εξωγενείς παράγοντες. Κριτήριο επιλογής της βάσης που θα διορθωθεί αποτελεί η κατάσταση μεθύλωσης του DNA. Η απώλεια δραστηριότητας του συστήματος επιδιόρθωσης με αποκοπή σφάλματος προκαλεί αστάθεια του γονιδιώματος (genomic instability) και σχετίζεται με χαμηλό βαθμού αντίσταση στην πλατίνη.
- ii. *Επιδιόρθωση με αποκοπή βάσης (base excision repair, BER)* στην περίπτωση τροποποίησης του DNA από αλκυλιούντες παράγοντες. Η αποκοπή της τροποποιημένης βάσης γίνεται από διάφορες γλυκοσυλάσες. Η ACH γλυκολάση διασπά το N-γλυκοσυλικό δεσμό μεταξύ της βάσης και της δεοξυριβόζης. Η ουρακίλ-DNA-γλυκοσυλάση (UNG1 πρωτεΐνη στον άνθρωπο) απομακρύνει ουρακίλη από το DNA, η οποία συνήθως προέρχεται από την απαμίνωση της κυτοσίνης, ενώ διορθώνει και την ενσωμάτωση της 5-φθοριουρακίλης. Η φορμαμι-

δο-πυριμιδινο-DNA-γλυκοσυλάση αποκόπτει 8-υδροξυγουανινο-τροποποιημένες (8oxoG) βάσεις συνήθως σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή οξειδωτικό stress.

- iii. *Επιδιόρθωση με αποκοπή νουκλεοτιδίου (nucleotide excision repair, NER)* στην περίπτωση μαζικών τροποποιήσεων του DNA όπως από την επίδραση της σισπλατίνης (CDDP). Οι μελέτες του μηχανισμού αυτού έδειξαν ότι δεν είναι απαραίτητος για την επιβίωση στον άνθρωπο. Έτσι, βρέθηκε ότι στην κληρονομική πάθηση μελαχρωματική ξηροδερμία (xeroderma pigmentosum, XP) η NER ανεπαρκεί σε άλλοτε άλλο βαθμό (ομάδες A-G). Οι κλασικές βλάβες που διορθώνονται με το μηχανισμό αυτό είναι κυκλοβουτανο-πυριμιδινικά διμερή (T-C, C-C, T-T, C-T) και βλάβες πυριμιδίνης/πυριμιδόνης. Οι πρωτεΐνες XPA και UV-DDB (human damage DNA-binding protein) αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε τέτοιες βλάβες. Η XPA σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη RPA που δεσμεύεται σε μονές έλικες DNA. Το σύμπλοκο αυτό φαίνεται πως δεσμεύεται στο DNA και ανοίγει τις έλικες αυτού. Στη συνέχεια ξετυλίγονται οι έλικες με πρωτεΐνες του TFIIH συμπλόκου. Στατικά του συμπλόκου TFIIH είναι οι πρωτεΐνες XPB και XPD που έχουν ιδιότητες ελικάσης και ξεκινούν τις διαδικασίες αποκοπής. Η 5' αποκοπή γίνεται από τις XPF και ERCC1 (exision repair cross-complementing), ενώ η 3' αποκοπή από την XPG. Η αποκατάσταση της έλλειψης τελικά γίνεται με την DNA-πολυμεράση δ ή ε και τη συμμετοχή της DNA λιγκάσης και του PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Αυξημένη έκφραση των γονιδίων XPA και ERCC1 έχει διαπιστωθεί σε ιστούς ασθενών με

ανθεκτικότητα στην πλατίνη.

iv. Απομεθυλίωση του DNA με την O⁶-μεθυλ-γουανινο-DNA-μεθυλοτρανσφεράση (O⁶-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT). Η MGMT είναι «ένζυμο αυτοκτονίας» που μεταφέρει μία μεθυλομάδα από μεθυλωμένες γουανίνες σε υπόλειμμα κυστεΐνης πάνω στην πρωτεΐνη. Με τον τρόπο αυτό διορθώνονται βλάβες από απλούς αλκυλιούντες παράγοντες όπως οι νιτροζουρίες.

6. Φαινότυπος πολυφαρμακευτικής αντίστασης (multidrug-resistance phenotype, MDR)

Μελέτες που έγιναν στις αρχές της δεκαετίας του '70 κατέδειξαν πως κυτταρικές σειρές που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε μία ομάδα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (αλκαλοειδή της vinca) εμφάνιζαν στη συνέχεια αντίσταση και σε άλλες ομάδες φαρμάκων χωρίς εμφανή συσχέτιση (ανθρακυκλίνες, επιποδοφυλλοτοξίνες)³². Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε πλειοτροπική φαρμακευτική αντίσταση (pleiotropic resistance). Οι Juliano και Ling το 1976³³ περιέγραψαν μία γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης, μοριακού βάρους 170 kD, ως υπεύθυνη για το φαινόμενο αυτό. Η πρωτεΐνη αυτή, γνωστή ως Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (P-glycoprotein, P-gp), λειτουργεί ως κυτταρική αντλία για την εξώθηση τοξικών μορίων από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου³⁴.

Η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη βρίσκεται στα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα σε χαμηλά επίπεδα. Σχετικά αυξημένα επίπεδα ανιχνεύονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, στο φλοιό των επινεφριδίων, στα ηπατικά κύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των εγκεφαλικών τριχοειδών. Σε νεοπλασματικά κύτταρα που παρουσιάζουν πολυφαρ-

μακευτική αντίσταση, η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη βρίσκεται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη και τη συσκευή Golgi και παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα είτε με αυξημένο ρυθμό παραγωγής είτε με ενίσχυση (amplification) των υπεύθυνων γονιδίων για την παραγωγή της.

Το γονίδιο *mdr-1* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης που σχετίζεται με την πολυφαρμακευτική αντίσταση, καθώς και για μία μεγάλη ομάδα γλυκοπρωτεϊνών-μεταφορέων (ATP-binding cassette proteins) με σημαντικού βαθμού ομολογία μεταξύ τους²⁴. Πρόσφατα περιγράφηκε και η πρωτεΐνη της πολυφαρμακευτικής αντίστασης (multidrug-resistance protein, MRP), μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 190 kD, υπεύθυνη για την απομάκρυνση πολλών αντινεοπλασματικών φαρμάκων από το κύτταρο και σχετιζόμενη με το φαινότυπο της πολυφαρμακευτικής αντίστασης³⁵⁻³⁶.

Η «κλασική» πολυφαρμακευτική αντίσταση (classic MDR) ή εξαρτώμενη από την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη φαρμακευτική αντίσταση αναφέρεται στην πλειοτροπική αντίσταση, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω, σε αντιδιαστολή με τη «μη κλασική» ή «άτυπη» MDR (nonclassic ή atypical MDR), που περιλαμβάνει διάφορους κυτταρικούς φαινοτύπους, με διαφορετικού βαθμού πλειοτροπική αντίσταση. Στην τελευταία περίπτωση προτείνεται ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης που προκαλεί τη φαρμακευτική αντίσταση, π.χ. «πλειοτροπική αντίσταση τοποϊσομεράσης II», για τη διάκριση από την κλασική MDR.

Μηχανισμοί αντίστασης έναντι αναστολέων τοποϊσομεράσης

Οι τοποϊσομεράσες I και II είναι ενδοπυρηνικά ένζυμα αποκατάστασης των ρήξεων της διπλής έλικας του DNA. Οι

μηχανισμοί αντίστασης έναντι των αναστολέων της τοποϊσομεράσης I δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και αναφέρονται επιγραμματικά στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Μηχανισμοί αντίστασης έναντι αναστολέων της τοποϊσομεράσης I.

1. Μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση φαρμάκου
2. Μειωμένη μετατροπή του φαρμάκου σε ενεργά παράγωγα
3. Αυξημένη έξοδος φαρμάκου από το κύτταρο
4. Μειωμένη έκφραση ή δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης I
5. Μειωμένη ευαισθησία υποδοχέων τοποϊσομεράσης I

Δράση αναστολέων τοποϊσομεράσης II έχουν διάφορα χημειοθεραπευτικά, όπως οι επιποδοφυλλοτοξίνες (ετοποσίδη, τενιποσίδη), οι ανθρακυκλίνες (δοξορουβικίνη, επιρουβικίνη), η μιτοξαντρόνη και η ακτινομυκίνη-D. Η φαρμακευτική αντίσταση στις ουσίες αυτές δε σχετίζεται με την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, αν και αποτελεί μέρος του φαινότυπου της MDR. Ενοχοποιούνται μεταβολές στην έκφραση ή τη δραστηριότητα της τοποϊσομεράσης II, καθώς και γενετικές ανωμαλίες του γονιδίου που την κωδικοποιεί³⁷. Με τους μηχανισμούς αυτούς εξηγείται εν μέρει η διασταυρούμενη αντίσταση σε φάρμακα-δηλητήρια της τοποϊσομεράσης II.

Μηχανισμοί αντίστασης στην πλατίνη

Η κυτταροτοξική δράση της σισπλατίνης και των αναλόγων αυτής στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκων με το DNA (adducts), με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Οι μηχανισμοί φαρμακευτικής αντίστασης στα ανάλογα της πλατίνης έχουν ήδη περιγραφεί παραπάνω και συνοψίζονται στον πίνακα 3³⁸⁻³⁹.

Πίνακας 3. Μηχανισμοί φαρμακευτικής αντίστασης στην πλατίνη.

1. Μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση
2. Αυξημένη απενεργοποίηση (αδρανοποίηση από τη γλουταθειόνη)
3. Αυξημένη επιδιόρθωση DNA - αυξημένη αντοχή σε βλάβες του DNA

Μηχανισμοί αντίστασης στις ταξάνες

Ο κυριότερος μηχανισμός αντίστασης στις ταξάνες είναι ο φαινότυπος της πολυφαρμακευτικής αντίστασης (βλ. παραπάνω). Τα προϊόντα MDR1 και MDR2 του γονιδίου MDR1 ενοχοποιούνται για τη διαταραχή μεταφοράς των ταξανών, ενώ οι MRP1 και MRP2 σχετίζονται με την αντίσταση στα αλκαλοειδή της vinca, όχι όμως και στις ταξάνες⁴⁰. Γενετικές ανωμαλίες στη δομή της α- και β-τουμπουλίνης έχουν ως αποτέλεσμα διαταραχές στον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Έτσι περιγράφονται «υποσταθερά» (hypostable) μικροσωληνάκια με ευαισθησία στα αλκαλοειδή της vinca και ανθεκτικότητα στις ταξάνες και «υπερσταθερά» (hyperstable) μικροσωληνάκια με αντίθετα χαρακτηριστικά. Τέλος η ακεραιότητα γονιδίων όπως το p53 και το bcl-2 σχετίζονται με την ευαισθησία στις ταξάνες⁴¹.

Γονίδιο p53

Το γονίδιο p53 αποτελεί το σημαντικότερο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που σχετίζεται με τον καρκίνο στον άνθρωπο. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και κωδικοποιεί ένα μόριο mRNA μεγέθους 2,2-25 kb. Η σημασία του έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζει υψηλή εξελικτική διατήρηση και υπολογίζεται πως τουλάχιστον 50% των νεοπλασιών στον άνθρωπο παρουσιάζουν μετάλλαξη του γονιδίου αυτού^{24,42}. Η πρωτεΐνη p53 αποτελεί μείζονα ενεργοποιητή της μεταγραφής και ευθύνεται για την αναστολή

του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G₁ και G₂ κατόπιν έκθεσης του κυττάρου σε παράγοντες βλαπτικούς για το DNA. Παράλληλα με τη δράση της στα σημεία ελέγχου, η p53 πρωτεΐνη επάγει την απόπτωση μετά από μη επανορθώσιμη βλάβη του DNA. Αν και δεν έχει διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός επιλογής ενός εκ των δύο οδών για το κύτταρο, φαίνεται πως ενοχοποιούνται συνυπάρχουσες γενετικές ανωμαλίες, καθώς και εξωγενείς παράγοντες. Ορισμένοι κυτταρικοί τύποι, όπως τα λεμφοκύτταρα και τα γεννητικά κύτταρα, παρουσιάζουν υψηλότερους τίτλους p53-mRNA, και οι όγκοι οι προερχόμενοι από τα κύτταρα αυτά φαίνεται πως παρουσιάζουν ευχερέστερη πρόσβαση στους αποπτωτικούς μηχανισμούς σε σχέση με τους περισσότερους όγκους επιθηλιακής προέλευσης⁴³⁻⁴⁴.

Μεταλλάξεις του γονιδίου p53 παρατηρούνται σε όγκους του παχέος εντέρου, του πνεύμονος, του εγκεφάλου, του μαστού και άλλων οργάνων⁴⁵. Οι βλάβες αφορούν στο 75-80% ελλείψεις, ενώ δεύτερη σε συχνότητα είναι η μη νοηματική εστιακή μετάλλαξη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή μίας άτυπης πρωτεΐνης. Μελέτες σε διαγονιδιακά πειραματόζωα "knock out", στα οποία είχαν αδρανοποιηθεί και τα δύο γονίδια p53, έδειξαν ότι η απωλεσθείσα λειτουργικότητα του p53 οδήγησε σε αντίσταση στη χημειο- και ακτινοθεραπεία⁴⁶. Η δυνατότητα ωστόσο ευαισθητοποίησης κυτταρικών σειρών με διαταραγμένη λειτουργία του p53 σε διάφορους αντινεοπλασματικούς παράγοντες απέδειξε ότι η σχετιζόμενη με το p53 χημειοανθεκτικότητα εξαρτάται από πληθώρα άλλων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων.

Η έκθεση του κυτταρικού DNA σε επι-

βλαβείς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία και η χημειοθεραπεία, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p53. Η πρωτεΐνη αυτή αναστέλλει τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₁, γεγονός που επιτρέπει την επιδιόρθωση του DNA πριν περάσει στη φάση S⁴⁴. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται ο μη διπλασιασμός μεταλλαγμένου DNA, για το λόγο αυτό το γονίδιο p53 ονομάζεται και «φρουρός του γονιδιώματος». Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταλλαγμένες μορφές του p53 κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αλλοιωμένη λειτουργικότητα, οι οποίες μπορούν να αδρανοποιήσουν τη φυσική (wild-type) πρωτεΐνη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «κυρίαρχη αρνητική δράση» (dominant negative effect), εξαιτίας του γεγονότος ότι η αδρανοποίηση της μίας από τις δύο ογκοκατασταλτικές θέσεις φαίνεται να λειτουργεί ως κυρίαρχη, αφού η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αναστέλλει το προϊόν του δεύτερου φυσιολογικού αλληλόμορφου γονιδίου.

Το DNA μπορεί να υποστεί βλάβες καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, για το λόγο αυτό είναι απαραίτητα περισσότερα σημεία ελέγχου (checkpoints) που θα εξασφαλίζουν τη δυνατότητα αναστολής του κυτταρικού κύκλου στις διάφορες φάσεις αυτού⁴⁶⁻⁴⁷. Ωστόσο ορισμένα μόρια «αισθητήρες» ελέγχουν περισσότερα από ένα σημεία. Έτσι, η p21, ισχυρός αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, μπορεί να αναστείλει τον κύκλο στη μετάπτωση G₁/S αλλά και στην περίπτωση εκτροπικής μίτωσης (ανίχνευση βλάβης κατά τη διάρκεια της δημιουργίας της ατράκτου στη μετάφαση, σημείο ελέγχου ανευπλοειδίας). Η φωσφορυλίωση από την ATM κινάση (ataxia-telangiectasia mu-

tated) και ενεργοποίηση των κινασών CHK1 και CHK2 στη φάση S αναστέλλει τις φωσφατάσες που είναι απαραίτητες για τη μετάπτωση της φάσης G₁ στην S και της G₂ στην M⁴⁶. Στους περισσότερους κυτταρικούς πληθυσμούς της φάσης S η βλάβη του DNA προκαλεί μέσα σε λίγα λεπτά αύξηση του p53, αλλά έναρξη των μηχανισμών της απόπτωσης σε λίγες ώρες. Το p53 επάγει πρωτεΐνες ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι η p21, η GADD-45, η 14-3-3σ πρωτεΐνη, το bax, η CD95, η DR5 κ.ά. Η 14-3-3σ πρωτεΐνη αναστέλλει τη CDK1 και προκαλεί έτσι αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₂. Μία άλλη σημαντική πρωτεΐνη που επάγεται από το p53 είναι η MDM2. Αυτή συνοδεύει το p53 από τον πυρήνα και επιτρέπει την αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα, διασφαλίζοντας έτσι τον έλεγχο και τον παροδικό χαρακτήρα του μηνύματος του p53.

Άλλος σημαντικός παράγων που συμμετέχει στους μηχανισμούς απόπτωσης είναι ο μεταγραφικός παράγων E2F-1. Ο E2F-1, που απελευθερώνεται από το Rb κατά τη φωσφορυλίωσή του στη φάση G₁, δεσμεύεται και απενεργοποιείται από την hDM2 (η πρωτεΐνη MDM2 στον άνθρωπο). Φαίνεται πως η hDM2 πρωτεΐνη μπορεί να δράσει ως παράγων επιβίωσης του κυττάρου μέσω της δέσμευσης του E2F και ανεξάρτητα από την παρουσία του p53. Τέλος η c-abl πρωτεΐνη, που αποτελεί τυροσινική κινάση, υφίσταται ATM-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση και εμποδίζει τόσο την απόπτωση όσο και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου⁴⁸. Μείζονα ρόλο στην απάντηση του κυττάρου στη βλάβη του DNA φαίνεται πως διαδραματίζει η ισορροπία μεταξύ αποπτωτικών (bax) και αντι-αποπτωτικών μηνυμάτων (bcl-2) πάνω

στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η επίδραση του p53 στο *mdr-1* γονίδιο. Το φυσιολογικό p53 φαίνεται πως καταστέλλει τον προαγωγέα (promoter) του *mdr-1* γονιδίου, ενώ το μεταλλαγμένο p53 τον διεγείρει. Επομένως διαταραχές του p53 σχετίζονται με την υπερπαραγωγή προϊόντων υπεύθυνων για την είσοδο στη φάση S και την ταχεία κυτταρική ανάπτυξη, άρα και με τη φαρμακευτική αντίσταση. Ο μηχανισμός αυτός ενοχοποιείται για την αντίσταση στη μεθοτρεξάτη, την υδροξουρία, τη φλουνταραμπίνη, την κυτταραβίνη και την 5-φθοριουρακίλη (5-FU)²⁴.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

Η βασική έρευνα στο χώρο της ογκολογίας έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην ανακάλυψη μεθόδων αντιστροφής της φαρμακευτικής αντίστασης (*drug resistance reversal therapy, DRRT*) είτε με τη χρήση νέων ουσιών τροποποιητών είτε με την κατάλληλη τροποποίηση των θεραπευτικών σχημάτων. Οι κυριότερες μέθοδοι αντιστροφής της φαρμακευτικής αντίστασης αναφέρονται συνοπτικά στον πίνακα 4.

Η απλούστερη μέθοδος παράκαμψης της φαρμακευτικής αντίστασης είναι η επιλογή κατάλληλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων με το μέγιστο δυνατό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Στην περίπτωση αυτή δεν εξετάζεται η χημειοανθεκτικότητα των νεοπλασματικών κυττάρων, αλλά μόνο η γνώση των μηχανισμών δράσης του κάθε φαρμάκου. Ο συνδυασμός φαρμάκων επιτρέπει¹⁵:

- Μέγιστη επίτευξη κυτταρικού θανάτου
- Αποφυγή αύξησης της τοξικότητας με

χρήση φαρμάκων χωρίς αλληλοεπικαλυπτόμενη τοξικότητα

- Θανάτωση κυτταρικών κλώνων με διαφορετικές γενετικές ανωμαλίες εντός ενός ετερογενούς νεοπλασματικού κυτταρικού πληθυσμού
- Πρόληψη ή επιβράδυνση της ανάπτυξης φαρμακευτικής αντίστασης

Πίνακας 4. Μέθοδοι αντιστροφής της φαρμακευτικής αντίστασης.

1. Επιλογή κατάλληλου χημειοθεραπευτικού σχήματος
2. Χορήγηση εναλλασσόμενων χημειοθεραπευτικών σχημάτων χωρίς διασταυρούμενη αντίσταση
3. Εντατικοποίηση της χημειοθεραπείας
4. Χρήση βιολογικών τροποποιητών
5. Παράκαμψη της P-gp σχετιζόμενης φαρμακευτικής αντίστασης
6. Χρήση λιποσωμιακών χημειοθεραπευτικών
7. Χρήση νέων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων με αντινεοπλασματική δράση μη εξαρτώμενη από την P-gp

Ιδιαίτερη σημασία από άποψη φαρμακοκινητικής έχει η επιλογή της σειράς χορήγησης των χημειοθεραπευτικών για την παράκαμψη της σχετιζόμενης με τον κυτταρικό κύκλο φαρμακευτικής αντίστασης⁴⁹.

Η χορήγηση εναλλασσόμενων χημειοθεραπευτικών σχημάτων εφαρμόστηκε από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 με βάση τις πρωτοποριακές εργασίες των Goldie και Goldman. Εφόσον η τοξικότητα δεν επέτρεπε την ταυτόχρονη χορήγηση όλων των δραστικών φαρμάκων, προτιμήθηκε η εναλλασσόμενη χορήγηση θεραπευτικών συνδυασμών χωρίς διασταυρούμενη αντίσταση. Ωστόσο σε μεταγενέστερες μελέτες^{21,50} φάνηκε ότι λόγω της μη απόλυτης εφαρμογής του μοντέλου των Goldie και Goldman στην κλινική πράξη δεν ήταν

δυνατή η επιλογή συνδυασμών χωρίς καθόλου διασταυρούμενη αντίσταση. Έτσι αποδείχτηκε και σε επακόλουθες μελέτες η υπεροχή της διαδοχικής έναντι της εναλλασσόμενης χορήγησης των δραστικών φαρμάκων.

Εντατικοποίηση της χημειοθεραπείας

Η εισαγωγή της έννοιας της έντασης δόσης (*dose intensity*) στη χημειοθεραπεία έγινε από τον Hryniuk το 1984⁵¹, ως η χορηγούμενη ποσότητα του φαρμάκου στη μονάδα του χρόνου (μετρούμενη σε mg/m²/εβδομάδα). Φαίνεται πως η αθροιστική ένταση δόσης σχετίζεται άμεσα με το θεραπευτικό αποτέλεσμα σε μία σειρά νεοπλασιών¹⁵. Η εντατικοποίηση της χημειοθεραπείας επιτυγχάνεται:

1. με αύξηση της χορηγούμενης δόσης,
2. με ελάττωση των μεσοδιαστημάτων χορήγησης των φαρμάκων και
3. με τη διαδοχική χορήγηση ενός ή περισσότερων φαρμάκων

Με τη μέθοδο αυτή προλαμβάνεται η ταχεία ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων στα μεσοδιαστήματα της θεραπείας και αυξάνεται η πιθανότητα οριστικού ελέγχου του όγκου με την καταστροφή και του τελευταίου νεοπλασματικού κυττάρου σύμφωνα με την κυτταροκινητική τύπου Gompertz.

Η λογική της χρησιμοποίησης υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας (*high-dose chemotherapy*) με αιματολογική υποστήριξη βασίζεται στο γεγονός ότι νεοπλασματικά κύτταρα ανθεκτικά στη συμβατική δόση ενός ή περισσότερων φαρμάκων γίνονται ευαίσθητα σε υψηλότερες δόσεις είτε λόγω απόλυτης αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φαρμάκου είτε λόγω επαγωγής κυτταρικού θανάτου ακόμη και σε περιπτώσεις ελαττωματικού p53⁵². Η χημειοθεραπεία υψη-

λών δόσεων με αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών χρησιμοποιείται κυρίως σε κατ' εξοχήν χημειοευαίσθητα νεοπλάσματα (λευχαιμίες, λεμφώματα, όγκοι από γεννητικά κύτταρα) και αποδίδει περισσότερο σε περιπτώσεις με κατὰ το δυνατό μικρότερο νεοπλασματικό φορτίο, όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από το φαινόμενο του λογαριθμικού θανάτου (log kill) στην καμπύλη ανάπτυξης κατά Gompertz²⁴.

Χρήση βιολογικών τροποποιητών

Μία από τις πιο σύγχρονες μεθόδους παράκαμψης της φαρμακευτικής αντίστασης και βελτίωσης του θεραπευτικού αποτελέσματος είναι η χρήση νέων ουσιών με δράση βιολογικού τροποποιητή.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ομάδα των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών. Πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη φαρμακευτική αντίσταση, όπως η P-gr και η τοποϊσομεράση II, υφίστανται μεταμεταφραστική τροποποίηση από πρωτεϊνικές κινάσες. Η αναστολή των οδών αυτών με μικρομοριακές ουσίες επιτρέπει την παρέμβαση στο μηχανισμό της φαρμακευτικής αντίστασης και με τον τρόπο αυτό επίταση της δράσης των χημειοθεραπευτικών.

Η συγχορήγηση αναστολέων των πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών με χημειοθεραπευτικά έχει ήδη μπει στην κλινική πράξη, τουλάχιστον σε μερικές μορφές νεοπλασμάτων, όπως για παράδειγμα ο συνδυασμός trastuzumab (Herceptin®) με πακλιταξέλη ή με βινορελμπίνη στον καρκίνο του μαστού. Στην πρώτη περίπτωση με την προσθήκη του trastuzumab, η μη συγκράτηση του κυτταρικού κύκλου παρά τη βλάβη της μιτωτικής ατράκτου που προκαλείται από την πακλιταξέλη, φαίνεται ότι επάγει την απόπτωση και ενισχύει τη δράση της

πακλιταξέλης⁵³, εξηγώντας με τον τρόπο αυτό την ευαισθητοποίηση προς την πακλιταξέλη που προκαλεί η χορήγηση trastuzumab και την καλή συνέργεια των δύο φαρμάκων in vivo. Αυτά τα δεδομένα συμφωνούν με τη θεωρία ότι η συγκράτηση του κυτταρικού κύκλου συμβαίνει για να δοθεί χρόνος στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς ώστε να διορθώσουν τις βλάβες και να αποτραπεί η απόπτωση⁵⁴⁻⁵⁵.

Άλλη ομάδα πρωτεϊνικών αναστολέων που ερευνάται είναι οι αναστολείς των CDKs, που φαίνεται σε προκλινικά μοντέλα να αναστέλλουν τη σχετιζόμενη με τον κυτταρικό κύκλο φαρμακευτική αντίσταση, όταν συγχορηγούνται με χημειο- ή ακτινοθεραπεία^{49,56-57}. Οι ουσίες αυτές έχουν ήδη εισέλθει σε κλινικές μελέτες φάσης II και III συνδυασμού με κλασικά κυτταροτοξικά φάρμακα⁵⁸.

Ως μέθοδος παράκαμψης της αντίστασης που οφείλεται στο σύστημα της γλουταθειόνης έχει χρησιμοποιηθεί μία ουσία αναστολέας της συνθετάσης της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης, η *μπουθειονίνη-σουλφοξιμίνη* (*buthionine sulfoximine*, BSO)⁵⁹. Η BSO προκαλεί ένδεια γλουταθειόνης στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας κυτταρικών σειρών στη σισπλατίνη και αλκυλιούντες παράγοντες. Τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από in vitro μελέτες, ενώ ήδη διεξάγονται κλινικές μελέτες σε ανθεκτικό καρκίνο του πνεύμονα και των ωοθηκών²⁹.

Η συγχορήγηση φυλλικού οξέος με την 5-φθοριουρακίλη χρησιμοποιείται ευρέως για την αύξηση του θεραπευτικού αποτελέσματος. Σε περιπτώσεις αντίστασης στην 5-FU έχει βρεθεί μειωμένος βαθμός συγγένειας της θυμιδυλικής συνθετάσης με τα παράγωγα της 5-

FU. Φαίνεται λοιπόν ότι η αφθονία φυλλικού οξέος μπορεί μερικώς να μετριάσει το φαινόμενο και με τον τρόπο αυτό να αυξήσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα της 5-FU.

Μια διαφορετική μέθοδος αντιστροφής της αντίστασης είναι η παρέμβαση στην οικογένεια πρωτεϊνών bcl-2. Πρόκειται για ισχυρούς αναστολείς της απόπτωσης που προκαλείται από εξωγενείς παράγοντες, όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία και τα κυτταροστατικά⁶⁰. Η bcl-2 πρωτεΐνη υπερεκφράζεται σε πολλές νεοπλασματικές νόσους, όπως ο καρκίνος του μαστού, ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, τα μη Hodgkin λεμφώματα και το μελάνωμα. Χορήγηση bcl-2 αντινοσηματικού ολιγονουκλεοτιδίου (antisense oligonucleotide) σε κυτταρικές σειρές λευχαιμίας και λεμφώματος ανέστρεψε τη χημειοαντοχή των σειρών αυτών, ωστόσο τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα δεν έχουν μεταφραστεί σε αντίστοιχα κλινικά οφέλη στις έως τώρα γνωστές κλινικές μελέτες συνδυασμού με χημειοθεραπεία⁶¹.

Παράκαμψη της P-gp σχετιζόμενης φαρμακευτικής αντίστασης

Πληθώρα φαρμάκων έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιστροφή της φαρμακευτικής αντίστασης που σχετίζεται με την P-γλυκοπρωτεΐνη (πίνακας 5).

Η βεραπαμίλη, που δρα ως αποκλειστής διαύλων ασβεστίου, χορηγούμενη *in vitro* σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις, φάνηκε να απενεργοποιεί την αντλία της P-γλυκοπρωτεΐνης, εμποδίζοντας την ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του φαρμάκου⁶². Η βεραπαμίλη χορηγήθηκε συγχρόνως με τη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, ανθεκτικό στο συνδυασμό βινκριστίνης, δοξορουβικίνης και δεξα-

μεθαζόνης (VAD), με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της P-γλυκοπρωτεΐνης και εμφάνιση 3 αντικειμενικών ανταποκρίσεων μεταξύ 8 ασθενών⁶³.

Πίνακας 5. Τροποποιητές της φαρμακευτικής αντίστασης που σχετίζεται με την P-γλυκοπρωτεΐνη.

- Αποκλειστές διαύλων ασβεστίου
 - Βεραπαμίλη
 - Διλτιαζέμη
- Ορμονικοί παράγοντες
 - Ταμοξιφαίνη
 - Προγεστερόνη
- Κυκλοσπορίνη Α και ανάλογα (PSC-833)
- Αναστολείς καλμοδουλίνης
 - Χλωροπρομαζίνη
 - Τριφθοριοπεραζίνη
- Αντιισταμινικά
- Υπερθερμία
- Κινίνη, κινιδίνη
- Λονιδαμίδη

Ωστόσο τα αρχικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα δεν επαληθεύτηκαν σε μεγαλύτερη μελέτη από τους ίδιους ερευνητές⁶⁴. Εξάλλου η δράση της βεραπαμίλης ως τροποποιητή προϋποθέτει χορήγηση σε δόσεις που ενέχουν κίνδυνο τοξικότητας από το καρδιαγγειακό, όπως κολποκοιλιακό αποκλεισμό, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και υπόταση.

Άλλες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι άλλοι αποκλειστές διαύλων ασβεστίου, όπως η διλτιαζέμη, ανταγωνιστές της καλμοδουλίνης, όπως η χλωροπρομαζίνη και η τριφθοριοπεραζίνη, ορμονικοί παράγοντες όπως η ταμοξιφαίνη και η προγεστερόνη και το ανοσοκατασταλτικό κυκλοσπορίνη και ανάλογά της⁶⁵.

Χρήση λιποσωμιακών χημειοθεραπευτικών

Η σύζευξη χημειοθεραπευτικών φαρ-

μάκων με λιποσώματα αποτελεί μέθοδο αύξησης της συγκέντρωσης του φαρμάκου στα κύτταρα-στόχους. Τα λιποσώματα συγκεντρώνονται στους συμπαγείς όγκους εξαιτίας της αυξημένης διαπερατότητας των αγγείων του όγκου και της πτωχής λεμφαγγειακής αποχέτευσης⁶⁵⁻⁶⁶. Με τον τρόπο αυτό προσλαμβάνονται και εγκλωβίζονται στον όγκο έως και αρκετές ημέρες μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται έως και δεκαπλάσια συγκέντρωση του φαρμάκου στον ιστό-στόχο⁶⁶.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σύγχρονη έρευνα στο χώρο της ογκολογίας επικεντρώνεται στην ανεύρεση νεότερων μηχανισμών αντιστροφής του φαινομένου της φαρμακευτικής αντίστασης. Η εισαγωγή στη θεραπευτική νέων ουσιών που εκλεκτικά στοχεύουν συγκεκριμένους δρόμους της μεταγωγής σήματος, ανοίγει νέους δρόμους στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Οσοτόσο παραμένουν αντικειμενικά προβλήματα η αναγνώριση των μηχανισμών φαρμακευτικής αντίστασης με κλινική σημασία στη θεραπευτική και η επιλογή των κατάλληλων φαρμάκων και τροποποιητών για βελτιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος με σύγχρονη ελαχιστοποίηση της τοξικότητάς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. New York: Garland Science 2002, pp. 983-1026.
2. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994, 266: 1821-30.
3. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998, 60: 601-17.

4. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, editors. *Biochemistry*. 5th Edition. New York: W. H. Freeman and Company 2002, pp. 261-94.
5. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989, 246: 629-34.
6. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995, 374: 131-4.
7. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995, 9: 1149-63.
8. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, 13: 261-91.
9. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999, 13: 1501-12.
10. Yaffe MB, Cantley LC. Signal transduction. Grabbing phosphoproteins. *Nature* 1999, 402: 30-1.
11. Huang M, Wang Y, Cogut SB, Mitchell BS, Graves LM. Inhibition of nucleoside transport by protein kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 304: 753-60.
12. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997, 88: 355-65.
13. Irmiler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997, 388: 190-5.
14. Boutis L, Koukourikos S, Karemphyllis T. Cell kinetic analysis of the Pliss-Lymphosarcoma of the rat and implications for the treatment of human lymphomas. *Chemioterapia* 1985, 4 Suppl 2: 1171-3.
15. Chu E, DeVita VT. Principles of medical oncology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. 7th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004, pp. 295-306.
16. Schenken LL. Proliferative character and growth modes of neoplastic disease as determinants of chemotherapeutic efficacy. *Cancer Treat Rep* 1976, 60: 1761-76.
17. Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS.

- Experimental evaluation of potential anti-cancer agents XIII: On the criteria and kinetics associated with curability of experimental leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1964, 35: 1-111.
18. Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anti-cancer agents XIV: Further studies on certain basic concepts underlying chemotherapy of leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1965, 45: 5-28.
 19. Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979, 63: 1727-33.
 20. Goldie JH, Coldman AJ. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treat Rep* 1983, 67: 923-31.
 21. Norton LA. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res* 1988, 48: 7067.
 22. Blagosklonny MV. Targeting cancer cells by exploiting their resistance. *Trends Mol Med* 2003, 9: 307-12.
 23. Luria SE, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 1943, 28: 491.
 24. Goldie JH. Drug resistance. In: Perry MC (Ed). *The chemotherapy source book*. 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001, pp. 37-48.
 25. Miller AA, Ratain MJ, Schilsky RL. Principles of pharmacology. In: Perry MC (Ed). *The chemotherapy source book*. 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001, pp. 14-23.
 26. Shen DW, Pastan I, Gottesman M. Cross-resistance to Methotrexate and metals in human cisplatin-resistant cell lines results from a pleiotropic defect in accumulation of these compounds associated with reduced plasma membrane binding proteins. *Cancer Res* 1998, 58: 268-75.
 27. Koike K, Kawabe T, Tanaka T, et al. A canallicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res* 1997, 57: 5475-9.
 28. Flintoff WF, Assesani K. Methotrexate resistant Chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry* 1980, 19:4321-7.
 29. Πεκτασίδης Δ. Μηχανισμοί φαρμακευτικής αντοχής των καρκινικών κυττάρων. Στο: Φούντζηλας Γ, Μπαρμπούνης Β (Εκδ). *Βασικές αρχές θεραπείας του καρκίνου*. Θεσσαλονίκη: University Studio Press 1997. σελ. 233-54.
 30. Robinson MO. DNA repair pathways. Mechanisms and defects in the maintenance of genome stability. In: Bronchud MH, Foote MA, Peters WP, Robinson MO, editors. *Principles of molecular oncology*. Totowa, NJ: Humana Press 2000, pp. 257-70.
 31. Hopfner KP, Putnam CD, Tainer JA. DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol* 2002, 12: 115-22.
 32. Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970, 30: 1174-9.
 33. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976, 455: 152-9.
 34. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989, 58: 137-71.
 35. Cole SPC, Bhardway G, Gerbach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992, 258: 1650-4.
 36. Zaman GJR, Flens MJ, van Leusden MR, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 8822-6.
 37. Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F, Rudolph P. Culprit and victim – DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol* 2002, 3: 235-43.
 38. Kelland LR. Preclinical perspectives on

- platinum resistance. *Drugs* 2000, 59 Suppl 4: 1-8.
39. Wernyj RP, Morin PJ. Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel. *Drug Resist Updat* 2004, 7: 227-32.
 40. Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: Microtubule dynamics, drug transport and cell death. *J Clin Oncol* 1999, 17: 1061-70.
 41. Rowinsky EK, Tolcher AW. Antimicrotubule agents. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. 7th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004, pp. 390-415.
 42. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994, 54, 4855-78.
 43. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1996, 56: 892-8.
 44. Huang LC, Clarkin KC, Wahl GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 4827-32.
 45. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998, 16: 3158-68.
 46. El-Deiry WS. The role of p53 in chemosensitivity and Radiosensitivity. *Oncogene* 2003, 22:7486-95.
 47. Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 15209-14.
 48. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000, 407: 777-83.
 49. Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: An emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2001, 7: 2168-81.
 50. Day RS. Treatment sequencing, asymmetry, and uncertainty: protocol strategies for combination chemotherapy. *Cancer Res* 1986, 46: 3876.
 51. Hryniuk W, Bush H. The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1984, 2: 1281.
 52. Brandt SJ, Peters WP, Atwater SK, et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1988, 318: 869-76.
 53. Yu D. Mechanisms of ErbB2-mediated paclitaxel resistance and trastuzumab-mediated paclitaxel sensitization in ErbB2-overexpressing breast cancers. *Semin Oncol* 2001, 28 (5 Suppl 16): 12-7.
 54. Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B, et al. Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat Med* 1997, 3: 1034-6.
 55. Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 1999, 18: 1131-8.
 56. Boutis AL, Papazisis KT, Destouni E, Pistevou-Gompaki K, Papadopoulos L, Lambropoulos A, Boutis L, Kortsaris AH. CDK-inhibitor olomoucine and gamma-irradiation induced apoptosis and cell cycle arrest in Raji and K562 cell lines. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2002, 43: 129.
 57. Grant S, Roberts JD. The use of cyclin-dependent kinase inhibitors alone or in combination with established cytotoxic drugs in cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2003, 6: 15-26.
 58. Meijer L, Raymond E. Roscovitine and Other Purines as Kinase Inhibitors. From Starfish Oocytes to Clinical Trials. *Acc Chem Res* 2003, 36: 417-25.
 59. Somfai-Relle S, Suzukake K, Vistica BP, Vistica DT. Reduction in cellular glutathione by buthionine sulfoximine and

- sensitization of murine tumor cells resistant to L-phenylalanine mustard. *Biochem Pharmacol* 1984, 33: 485-90.
60. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998, 281 (5381): 1322-6.
 61. Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer* 2004, 101: 2491-502.
 62. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981, 41: 1967-72.
 63. Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS, et al. 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: 815-20.
 64. Dalton WS, Grogan TM, Meltzer PS, et al. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1989, 7: 415-24.
 65. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000, 11: 265-83.
 66. Mayer LD, Shabbits JA. The role for liposomal drug delivery in molecular and pharmacological strategies to overcome multidrug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 2001, 20: 87-93.