

Univerzita Palackého v Olomouci

## **Bakalářská práce**

Olomouc 2012

Alena Kadlecová

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu)  
s mědí proti buněčné linii odvozené od gliomu**

Bakalářská práce

**Alena Kadlecová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2012**

**Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.**

Tato práce byla vypracována v rámci projektu OP VK  
CZ.1.07/2.3.00/20.0062. Levný lék antabus jako protinádorové  
léčivo: mechanismus účinku a klinické testy.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Borise Cveka, Ph.D. a s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Alena Kadlecová

## Abstrakt

Inhibitory proteazomu už více než 10 let vzbuzují zájem lékařů i výzkumníků díky své schopnosti selektivně vyvolávat apoptózu u rakovinných buněk. Mechanismus jejich fungování zatím není plně objasněn. První a zatím jediný používaný lék tohoto typu, bortezomib, prokázal svou účinnost například u mnohočetného myelomu nebo lymfomu plášťových buněk. Na druhou stranu, u mnohých jiných druhů rakovin bohužel nefunguje dostatečně. Mezi tyto patří podle všeho i gliomy, mozkové nádory vycházející z gliových buněk. Právě u nich je, kvůli často velké agresivitě a řadě dalších komplikací, jejichž důsledkem je vysoká úmrtnost pacientů, absence účinné léčby obzvláště palčivá. I proto je zcela pochopitelná snaha o nalezení nových inhibitorů, efektivnějších, které zároveň nesdílejí další komplikace, které s sebou léčba bortezomibem nese. Jednoho z těchto potenciálních inhibitorů, disulfiramu (neboli antabusu), se týká celá tato práce.

Cílem této práce je však i poukázat na to, že ne vždy je nutné vyvíjet nové léky, a že řešení by mohlo naopak spočívat i v hledání nových využití pro medikamenty již dlouho známé. Takovýmto lékem by mohl být i antabus, který se už přes 50 let využívá jako podpůrná farmakoterapie při léčbě alkoholismu. Komplexy antabusu s mědí mají velký potenciál při léčbě rakoviny, a to nejen mechanismem inhibice proteazomu, ale také díky schopnosti potlačovat angiogenezi nebo inhibovat NF $\kappa$ B dráhu. Dle dostupných informací disponují tyto komplexy také schopností pronikat hematoencefalickou bariérou. Díky tomu by mohly v budoucnu najít uplatnění i v léčbě gliomů.

## **Abstract**

It has been nearly 10 years since proteasome inhibitors proved their pro-apoptotic effect against cancer cells. The mechanism of their function has not been fully explained yet. The first and only approved drug of this type so far is bortezomib, which showed high efficacy against multiple myeloma and some other types of blood cancer. However, there are other types of cancer in which the treatment with bortezomib did not bring significant effect. According to all the information available, gliomas, brain tumors derived from glia cells, are one of these. Gliomas are often very aggressive and usually accompanied by various complications, therefore the absence of effective treatment is a very serious problem. It is one of the reasons why efforts are underway to invent new proteasome inhibitors which would be more effective and without the issues present in the treatment with bortezomib. In this thesis, I would like to introduce one of them, disulfiram (antabuse).

I would also like to point out that not only inventing new drugs, but also re-purposing old ones might be the solution. The aforementioned disulfiram, which is now used as a medication for alcoholics, could be one of those. Complexes of disulfiram and copper may have great potential in cancer treatment, not only because of their ability to inhibit proteasome, but also thanks to their anti-angiogenic effect, the ability to inhibit the NF $\kappa$ B pathway and other properties. Complexes might also be able to penetrate the hemato-encephalic barrier. Judging from all these facts, disulfiram seems suitable for glioma treatment.

Ráda bych poděkovala Mgr. Borisovi Cvekovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení, rady a poskytnuté materiály. Dále pak také děkuji Mgr. Jindřichovi Sedláčkovi za pomoc s realizací praktické části práce.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Úvod</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>5</b>
3.1	Mozkové nádory . . . . .	5
3.2	UPS . . . . .	12
3.3	Inhibitory UPS . . . . .	18
3.4	Antabus . . . . .	25
3.5	Klinické testy . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>37</b>
4.1	Biologický materiál . . . . .	37
4.2	Médium a použité chemikálie . . . . .	37
4.3	Přístroje . . . . .	39
4.4	Stručný postup . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>41</b>
5.1	MTT . . . . .	41
5.2	IC <sub>50</sub> . . . . .	44
5.3	Fotografická dokumentace . . . . .	45
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratek</b>	<b>54</b>
	<b>Literatura</b>	<b>56</b>



# 1 Cíle práce

Cílem této práce je jak rešeršní shrnutí základních poznatků týkajících se ubikvitin-proteazomového systému (UPS), inhibitorů proteazomu, disulfiramu a jeho možných protirakovinných účinků a konceptu neziskových léčiv, tak praktická realizace pokusů a zhodnocení, zda získané výsledky zapadají do nastíněného kontextu.

Cílem praktické části je srovnání toxicity bortezomibu, Cu(II)diethyldithiokarbamátu ( $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ ), diethyldithiokarbamátu sodného (Et) a  $\text{CuCl}_2$  na buněčnou kulturu A 172 odvozenou od lidského glioblastomu. Dle v teoretické části rozebraných poznatků a předpokladů očekáváme, že toxicita komplexu  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  bude vyšší než toxicita samotného ligandu Et nebo kovu ve formě  $\text{CuCl}_2$ . Bortezomib, běžně klinicky využívaný inhibitor proteazomu, poskytuje možnost srovnání. Výsledky jsou vyhodnocovány metodou MTT.

## 2 Úvod

Rakovina je v současné době jednou z nejpálčivějších zdravotních otázek a patří mezi nejčastější příčiny úmrtí u dospělých i dětí (přesné statistiky týkající se rakoviny je možné dohledat na stránkách National Cancer Institute<sup>1</sup>). Mezi nejagresivnější a nejhůře léčitelné druhy rakoviny patří některé typy gliomů, nádorů mozku odvozených od gliových buněk. [1] Právě na tento typ tumoru je zaměřena tato práce.

Léčba rakoviny je velice nákladou záležitostí a na některé typy tohoto onemocnění zatím efektivní léčba ani neexistuje. Nové metody léčení, hlavně ty farmakologické, jsou předmětem intenzivního výzkumu. Ten se ovšem potýká s celou řadou komplikací. I když byl v léčbě mnohých typů rakoviny zaznamenán velký pokrok, můžeme bohužel ve vývoji léků v posledních letech pozorovat smutný trend, a to stále stoupající náklady jejich výzkumu, přičemž stále nižší počet potenciálních léčiv se nakonec dostane do klinického využívání. [2] Problémem je často také malá účinnost těchto nových léků – pacienti málokdy bývají opravdu vyléčeni, obvykle dochází pouze k prodloužení života člověka o několik týdnů nebo měsíců. Kvalitu života těchto lidí, kteří se často potýkají s vážnými vedlejšími účinky léčby, také není možné opomíjet. [3] Tyto neuspokojivé výsledky vedou ke snahám o hledání alternativních metod vývoje léků. Jako velmi slibná možnost se jeví například pečlivé zaznamenávání pozitivních vedlejších účinků starých levných léčiv a hledání jejich nových využití [4], případně sponzorování potřebných testů z neziskových zdrojů. [5]

Na poli výzkumu nových léčebných metod bylo v posledních letech zaznamenáno několik úspěchů. Mezi ně se dá počítat výzkum mechanismu degradace proteinů, který nakonec vedl k vývoji léku známého jako bortezomib, který se dobře osvědčil v léčbě mnohočetného myelomu a některých dalších krevních typů rakovin. [6] Mechanismus působení bortezomibu je založen na inhibici proteazomu, organely zodpovědné za degradaci poškozených a nepotřebných proteinů v buňce. Princip poměrně selektivního působení těchto léčiv na rakovinné buňky

---

<sup>1</sup><http://seer.cancer.gov/statistics/>

je zatím předmětem debaty, jejíž základní myšlenky jsou shrnuty níže v samostatné kapitole.

I léčba bortezomibem je provázena celou řadou komplikací. Je podáván intravenózně a má mnoho vedlejších účinků, které v nejvážnějších zaznamenaných případech skončily až život ohrožujícími stavy, jako například srdečním selháním (viz například zde [7] nebo zde [8]). Velkým problémem je také jeho neúčinnost u mnoha typů rakovin, hlavně u solidních tumorů. [9]

Přesto však mají inhibitory proteazomu do budoucna obrovský potenciál. Nežádoucí účinky, které léčbu bortezomibem provázejí, nejsou zřejmě v mnohých případech přímým důsledkem inhibice proteazomu, ale jsou dány vedlejšími interakcemi léčiva v buňce. [10] Dá se tedy předpokládat, že by bylo možné je odstranit nebo alespoň zmírnit. Stejně tak způsob podávání a malá účinnost v solidních tumorech jsou problémy, které by se v budoucnu zřejmě daly vyřešit. Proto je mnoho nadějí vkládáno do vývoje nové generace inhibitorů proteazomu.

Je však nutné vkládat obrovské množství prostředků do vývoje nových efektivnějších léků? Možná by bylo schůdnější zapátrat mezi již dávno známými léky a pokusit se najít řešení zde. Látkou s obrovským protirakovinným potenciálem by mohl být disulfiram (neboli antabus), lék již téměř 60 let používaný jako adjuvans při léčbě alkoholismu. [5] Za protialkoholní účinky disulfiramu je zodpovědná jeho schopnost blokovat aldehyddehydrogenázu, enzym podílející se na metabolismu ethanolu. [11] Díky tomu dochází v těle k hromadění acetaldehydu, který způsobuje řadu nepříjemných fyzických projevů, které alkoholika odradí od dalšího pití. Disulfiram je však látkou značně nespecifickou a kromě aldehyddehydrogenázy interaguje také s celou řadou dalších proteinů. Momentálně se hovoří o jeho možném využívání při snahách zbavit se i jiných závislostí, než je alkoholismus. [12] [13] Nás však zajímají hlavně jeho možné protirakovinné účinky. Ty by pravděpodobně mohly být dány schopností komplexů metabolitu antabusu s mědí inhibovat proteazom (a to zřejmě jiným mechanismem, než je tomu u bortezomibu [14], což by mohlo řešit některé nedostatky léčby bortezomibem), ale také dalšími faktory, například schopností blokovat NF $\kappa$ B dráhu. [16]

Další obrovskou výhodou disulfiramu, která by se uplatnila v léčbě gliomů a rakovin mozku, je předpokládaná schopnost komplexů procházet hematoencefalickou bariérou. [17] Ta brání vstupu některých látek do mozku a chrání jej tak před poškozením, ovšem je také často příčinou selhání léčby mozkových nádorů, protože nepropustí aktivní látky na místo působení. [18] Tento problém by zřejmě komplex měl být schopen překonat.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mozkové nádory

#### Klasifikace

Jako rakovinu mozku označujeme abnormální růst buněk přímo v mozkové tkáni, ale i tumory mozkových plen. [1] Až 30 % mozkových nádorů jsou sekundární nádory (nemají původ v mozku, jsou to metastáze). Můžeme se také setkat s případy, kdy se do mozku rakovina rozšíří z okolních tkání (lebky, měkkých tkání hlavy a krku).<sup>1</sup>

Podle dostupných informací je v USA ročně rakovina mozku diagnostikována asi 22 500 pacientům, z toho přes 2000 jsou děti (podstatnou část úmrtí v důsledku rakoviny v dětském věku mají na svědomí právě mozkové tumory). [19] Asi 80 % veškerých mozkových nádorů u dospělých jedinců jsou gliomy, u dětí je to asi 30 %. Okolo 13 000 lidí v USA ročně gliomu podlehnou. Gliomy se všeobecně vyskytují více u mužů než u žen. Průměrný věk nemocných se liší v závislosti na typu nádoru.<sup>2</sup> Geografické posouzení výskytu je náročnější. Statisticky se gliomy nejvíce vyskytují ve vyspělých zemích jako jsou státy severní Evropy, Austrálie a Nový Zéland, USA nebo Kanada, nejméně pak v Indii nebo na Filipínách. Tyto informace však nejsou dostatečně spolehlivé, hlavně kvůli nestejně úrovni lékařské péče v jednotlivých státech. [20] Ovšem některé odchylky, jako například zvýšený výskyt v severní Evropě, rozhodně nejsou zanedbatelné.

Gliomy tvoří poměrně nekonzistentní skupinu nádorů v tom smyslu, že nejsou známé žádné mutace či změny na molekulární úrovni, které by pro ně byly charakteristické. [19] Vyjma vzácných dědičných syndromů a vysokých dávek ionizujícího záření nebyly prozatím prokázány ani typické environmentální vlivy, které by gliomy přímo způsobovaly, některé studie ovšem naznačují vliv výživy a dalších faktorů. Navzdory přetrvávajícím obavám nebyla zatím jednoznačně

<sup>1</sup>Výukové materiály pro studenty LF MU, <http://http://www.atlases.muni.cz>

<sup>2</sup><http://seer.cancer.gov/statfacts/html/brain.html>

prokázána souvislost mezi rakovinou mozku a používáním mobilních telefonů. [21] Výsledky jednotlivých průzkumů se však liší a některé naznačují, že tu souvislost být může, a že záření z mobilních telefonů má pravděpodobně i jiné biologické účinky.<sup>3</sup> Poměrně zajímavou věcí je také to, že některé genotypy, které vykazují zvýšené riziko výskytu astmatu a alergií, jsou pravděpodobně spojeny s menším rizikem propuknutí gliomu. [19]

Mozkové nádory rozdělujeme do několika skupin:

(Rozdělení je převzato ze stránek [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)<sup>4</sup> (verze z 8. července 2010) a vychází z klasifikace podle WHO. Na těchto stránkách, ve zdrojích, které jsou zde uvedeny nebo například v článku [1] je možno přečíst si více o jednotlivých typech mozkových nádorů.)

- a) Neuroepiteliální, jež se dále dělí do celé řady podskupin podle toho, zda vycházejí z gliových buněk nebo neuronů a také podle jejich histologických parametrů, umístění a celé řady dalších kritérií.
- b) Meningeální, nacházející se na mozkových obalech.
- c) Nádory zárodečných buněk, které se objevují nejčastěji u dětí ve věku 10–12 let. Jejich výskyt je téměř 10krát větší v Asii než v Evropě nebo Severní Americe.
- d) Nádory v oblasti tureckého sedla (prohlubeň v klínové kosti, ve které je uložena hypofýza).
- e) Nádory nejisté histogeneze, jejichž výskyt je poměrně vzácný a bývají spjaty s určitými nemocemi.
- f) Primární CNS lymfomy, které jsou typické hlavně pro pacienty trpící AIDS nebo jinou nemocí snižující imunitu.
- g) Nádory periferních nervů ovlivňující CNS.
- h) Sekundární nádory.

---

<sup>3</sup>A. Al-Orainey: Recent research on mobile phones effects; <http://www.who.int>

<sup>4</sup><http://www.cancer.gov>

## **Gliomy**

### **Gliové buňky**

Názvem gliom označujeme nejrozšířenější typ rakoviny mozku, která začíná v gliových buňkách. Rozeznáváme tři základní typy gliových buněk – mikroglie, astrocyty a oligodendroglie. [22]

Tyto buňky byly dlouhou dobu považovány pouze za obal neuronů zajišťující jejich výživu, ochranu a udržování stabilního prostředí. Již před 50 lety se začaly objevovat názory, že jejich funkce mohou být pro nervový přenos mnohem podstatnější. Dnes už víme, že gliové buňky dále zajišťují imunitní děje v mozku, správný průběh nervového vzruchu, podílejí se na tvorbě funkční synapse a za patologických podmínek mají také roli v přenosu signálů bolesti. [23]

### **Klasifikace gliomů**

Gliomy dělíme hlavně podle histologických kritérií, případně také podle umístění nebo rychlosti růstu nádoru [18] (v rámci klasifikačního systému primárních maligních tumorů podle WHO rozeznáváme stupně II–IV, stupeň I se používá pro označení benigní tkáně).<sup>5</sup>

Nádory druhého stupně jsou relativně pomalu rostoucí a diferencované. Oproti tomu nádory třetího stupně, také označované jako anaplastické, prodělaly zvrát k nezralejší formě buněk, a jsou tedy méně diferencované a rychleji rostou. Nejagresivnější a také bohužel nejčastěji se vyskytující jsou nádory čtvrtého stupně, mezi které patří glioblastomy (někdy nazývané „mnohotvárné glioblastomy“). Glioblastomy jsou jednou z nejagresivnějších rakovin vůbec. Vyznačují se velice rychlým růstem, dále pak vysokou schopností měnit svůj genom (mutace, delece úseků kódujících například tumor-supresorové geny atd.) nebo také hyperaktivací některých receptorů, například tyrosinkinázových, které jsou nezbytné pro vývoj mnoha typů rakoviny. [24]

Podle histologických kritérií a typu buněk, ze kterých vznikly, dělíme gliomy následovně: (Rozdělení je převzato ze stránek [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)<sup>6</sup> (verze z 8. července 2010) a vychází z

---

<sup>5</sup><http://www.who.int>

<sup>6</sup><http://www.cancer.gov>

klasifikace podle WHO. Na těchto stránkách, ve zdrojích, které jsou zde uvedeny nebo například v článcích [1] nebo [25] je možno přečíst si více o některých typech gliomů.)

a) Nádory pocházející z astrocytů:

- Pilocytické astrocytomy (stupeň I) – jsou výrazně ohraničené a pomalu rostoucí. Nejčastěji se vyskytují u dětí a mladších lidí.
- SEGA (zkratka ze Subependymal giant cell astrocytoma, stupeň I) – jsou benigní a pomalu rostoucí. Charakteristicky postihují pacienty trpící určitými degeneračními onemocněními mozku.
- Difúzní astrocytomy (stupeň II) – rostou pomalu, ale napadají okolní tkáň. Vyskytují se nejvíce u mladých dospělých, často u těch, kteří mají dědičné mutace proteinu p53. Tvoří asi 35 % všech astrocytomů.
- Pleiomorfnní xanthoastrocytomy (stupeň II) – jsou poměrně vzácné. Vyskytují se zejména u dětí a mladších pacientů.
- Anaplastické astrocytomy (stupeň III) – často vycházejí z difuzních astrocytomů.
- Glioblastomy (stupeň IV) – někdy pocházejí z předchozích typů gliomů, pak jim říkáme sekundární glioblastomy. Častěji se však objevují samy do sebe. Mají několik histologických variant a také je můžeme dále dělit podle genetických kritérií. Tvoří asi 50–60 % všech astrocytomů.

b) Oligodendrogliální nádory:

- Oligodendrogliomy (stupeň II) – tvoří asi 50 % všech oligodendrogliálních nádorů.
- Anaplastické oligodendrogliomy (stupeň III) – nejčastěji se objevují v čelním nebo spánkovém laloku.

c) Smíšené gliomy:

- Oligoastrocytomy (stupeň II) – jsou kombinací buněk pocházejících z oligodendrogliomů a difúzních astrocytomů. Nprovázejí je žádné charakteristické genetické změny ani nevykazují výskyt u žádné typické skupiny pacientů.

- Anaplastické oligoastrocytomy (stupeň III).
- d) Ependymální gliomy (jsou odvozené od speciálního typu gliových buněk, ependyálních buněk, jež vystylají vnitřní povrch mozkových komor a míšního kanálu):
- Myxopapilární ependymom (stupeň I) – jedná se o pomalu rostoucí tumory, které se objevují hlavně v míše.
  - Subependymom (stupeň I) – vyskytuje se hlavně u starších pacientů mužského pohlaví a je dobře léčitelný chirurgickými zákroky.
  - Ependymom (stupeň II) – nejčastěji postihuje děti a mladší lidi.
  - Anaplastický ependymom (stupeň III).
- e) Neuroepiteliální nádory nejasného původu (bývají poměrně vzácné a informace o nich tedy nejsou dostatečné):
- Astroblastomy (nemají přidělený žádný stupeň podle WHO) – vyskytují se hlavně u mladších pacientů.
  - Chordoidní gliomy třetí komory (stupeň II) – působí velké komplikace, protože jsou lokalizovány blízko hypotalamu a je tedy často nemožné je úplně chirurgicky odstranit.
  - *Gliomatosis cerebri* (stupeň III) – má difúzní charakter a často se šíří po celém mozku. Ač jej neprovázejí žádné vyloženě charakteristické chromozomální změny, ty, které u něj nacházíme, jsou natolik odlišné od ostatních gliomů, že se dá zařadit do samostatné genetické kategorie.

Kromě toho se vyskytují ještě smíšené mozkové nádory, jež vycházejí z neurálních i gliových buněk. Jsou poměrně vzácné a až na výjimky mívají pacienti trpící touto formou rakoviny příznivou prognózu.<sup>7</sup>

Gliomy mohou tvořit metastázy mimo CNS, jedná se však o natolik ojedinělé případy, že se velmi dlouho myslelo, že mozkové nádory nejsou metastázování schopny [26] (první v literatuře zaznamenaný případ [27]). Příčinou je zřejmě přítomnost hematoencefalické bariéry (viz další

---

<sup>7</sup><http://www.cancer.gov>



kapitola). [28] Pro některé druhy gliomů, typicky pro glioblastomy, je však charakteristická difuze a rozprostření nádorových buněk v mozku (to má zřejmě souvislost s jejich dediferenciací a simulováním vlastností gliových prekurzorových buněk, které v průběhu vývoje CNS v mozku migrují). [29] To zhoršuje jejich léčitelnost, protože takovýto nádor je velice obtížné chirurgicky či radiologicky zacílit.

Rozlišování na benigní a maligní tkáň je u nádorů mozku dosti relativní. I méně agresivní formy gliomů jsou obvykle lékaři prognózovány jako potenciálně smrtelné – důvodem je to, že svým růstem utlačují okolní tkáň a zvyšují vnitrolební tlak, ale také jejich značná tendence k přechodu na maligní formy a výše zmiňované difuzi v mozku. [25] Je tedy zřejmé, že hledání co možná nejúčinnější farmakologické léčby gliomů je nutností. Léčba nádorů v této oblasti však s sebou nese specifické problémy, z nichž nejzávažnější je zřejmě neschopnost mnohých perspektivních medikamentů projít hematoencefalickou bariérou.

### **Problém hematoencefalické bariéry**

Hematoencefalická bariéra je komplex skládající se z buněk cévního endotelu, bazální membrány, pericytů, zakončení astrocytů a tkáňových bazofilů. [30] Díky těsné vazbě jednotlivých buněk, absenci fenestrací (okének) v cévách a omezení vezikulárního transportu je téměř nemožněn prostup jakýchkoli látek intracelulárními prostory. [31] Bariéra je také schopná produkovat řadu nejrůznějších transportérů a enzymů metabolizujících léčiva (různé typy transferáz, cytochromů...). Tím zajišťuje přísnou regulaci průchodu látek z krve do mozkové tkáně a úplně brání difuzi nežádoucích sloučenin, čímž se podílí na tvorbě optimálního prostředí pro funkci mozku. [32]

Problémem mnoha látek s potenciálem v léčbě onemocnění mozku je právě selektivnost hematoencefalické bariéry – léčiva jí jednoduše neprojdou a do mozku se nedostanou. Existují způsoby, jak tento problém překonat – může se jednat o přímou invazivní aplikaci látek do mozku, výhodnější jsou ovšem neinvazivní metody. Mezi ty patří například i prosté zvednutí dávky, využívá se však také široké škály specifických transportérů nebo interakcí s jinými léčivy, které pozmění propustnost bariéry vůči dalším látkám či naopak ovlivní jejich uvolňování z mozku atd. [18]

## Léčba gliomů

Současné metody léčby jsou založeny hlavně na radioterapii, chirurgických zákrocích a chemoterapii. [33] V posledních dvou dekáдах se jako slibná možnost pro budoucí léčbu ukazuje genová terapie založená hlavně na aktivaci genů pro apoptózu, tumor-supresorových genů nebo genů stimulujících imunitu pacienta, lýzi onkogenů pomocí upravených virů nebo blokaci mRNA pomocí tzv. antisense RNA. Tím je znemožněna transkripce specifických genů podílejících se na vzniku choroby. [34]

Specifikem v léčbě mozkových nádorů je využívání takzvaných  $\gamma$ -nožů. Navzdory názvu, který může být pro laiky zavádějící, nespočívá terapie pomocí  $\gamma$ -nože v přímém chirurgickém zákroku. Jedná se o radioterapeutickou metodu, při které dochází k přesnému zacílení velkých dávek gamma záření do té oblasti mozku, kde se nachází tumor. <sup>8 9</sup>

I když se díky značným pokrokům převážně v chirurgii (lepší monitorování mozku, neuro-navigace nebo „awake surgery“ – operace při vědomí pacienta zabraňující nechtěným poškozením mozku), avšak například i lepší rehabilitaci po operacích, daří délku života nemocných prodloužit [35], je prognóza pro pacienty, kterým byl gliom diagnostikován, velmi špatná. Pouze okolo 30% lidí s diagnostikovaným mozkovým nádorem (jakýmkoliv) přežívá déle než 5 let po diagnóze. [36] Medián délky dožití pacientů, kterým byla diagnostikována některá z agresivních forem rakoviny jako je například glioblastom, je pouze okolo 1 roku. [1] [37] Léčba je navíc stále často spojena s poruchami paměti, učení a pozornosti. Radioterapie a chemoterapie zabírá poměrně dobře u oligodendrogliomů, proto mají pacienti s tímto typem nádoru lepší prognózu. U jiných typů gliomů ovšem v současné době používané metody příliš nefungují a je tedy potřeba hledat novou účinnější léčbu.

---

<sup>8</sup><http://www.electa.com>

<sup>9</sup><http://www.radiologyinfo.org>

## 3.2 UPS

Těmito perspektivními novými léky by mohly být inhibitory ubikvitin-proteazomového systému (UPS). Než se však začneme těmito látkami podrobněji zabývat, je nutné si nejprve UPS popsat a vysvětlit jeho základní mechanismy.

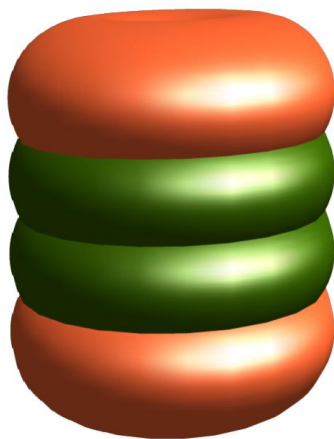
### Proteazomy

Systém byl objeven v souvislosti s výzkumem mechanismů degradace proteinů, jež započal v pozdních 60. letech a je spjat se jménem profesora A. Goldberga [38]. V 90. letech byly už základní mechanismy ubikvitin-proteazomového systému poměrně důkladně objasněny a za své poznatky v této oblasti byli dokonce A. Ciechanover, A. Hershko a I. Rose v roce 2004 vyznamenáni Nobelovou cenou za chemii. [39]

Proteazomy jsou bílkovinné komplexy, které se podílejí na degradaci asi 90 % poškozených nebo nepotřebných proteinů v buňce. Zbýlých 10 % je rozkládáno procesem zvaným autofagie. Autofagie je rozmanitý děj, při kterém bývá pohlcena část cytoplazmy, která může obsahovat i celé organely. Probíhá v lysozomech. U savců je znám i typ autofagie, který je řízen chaperony a vede k selektivní degradaci jednotlivých proteinů. [40]

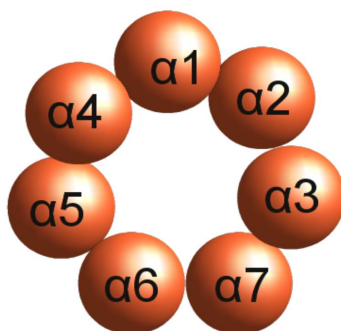
Známe několik typů proteazomů, nejčastěji vyskytující se jsou však dva – 20S a 26S proteazomy. 20S proteazomy (obr. 3.1) jsou útvary o přibližné velikosti  $16 \times 12$  nm a relativní molekulární hmotnosti asi 700 kDa. [41]

Obrázek 3.1: Schématické znázornění 20S proteazomu

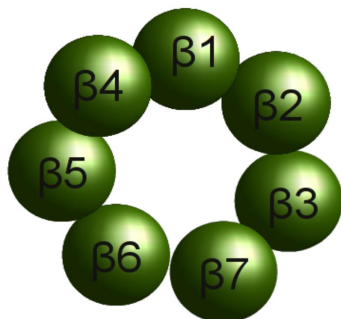


Skládají se z několika podjednotek. Tyto podjednotky jsou uspořádány po 7 do čtyřech prstenců (vnější  $\alpha$  (obr. 3.2) a vnitřní  $\beta$  (obr. 3.3),). Tyto podjednotky, i přes své rozdílné uspořádání, sdílejí podobný typ skládání daný kvartérní strukturou. Stejný typ skládání můžeme najít i u bakterií, což napovídá o značném evolučním stáří a vysoké konzervovanosti struktury proteazomu. [42]

Obrázek 3.2: Schématické znázornění  $\alpha$  prstence



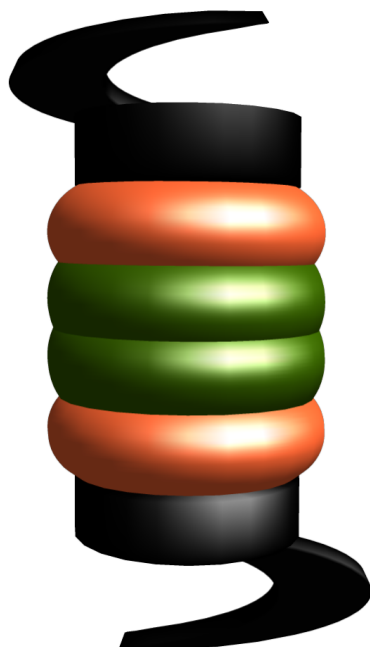
Obrázek 3.3: Schématické znázornění  $\beta$  prstence



V buňkách je možno nalézt desetitisíce molekul proteazomů, tvoří cca 3 % veškerého buněčného obsahu proteinů. Vyskytují se nejen v cytoplazmě, ale i v jádře. [43] U eukaryotního typu na nich rozeznáváme 6 aktivních míst s enzymatickou funkcí, pojmenovaných podle funkční podobnosti s jinými proteázami v těle – caspázou, trypsinem a chymotrypsinem (vždy 2 místa s patřičnou aktivitou, po jednom na každém  $\beta$  prstenci). Nacházejí se na podjednotkách  $\beta 1$  (caspáze podobná aktivita),  $\beta 2$  (trypsinu podobná aktivita) a  $\beta 5$  (chymotrypsinu podobná aktivita a preference ke štepení řetězců v rozvětvených místech nebo v místech s vyšším obsahem malých neutrálních AK). [44] Další podjednotky nemají proteázovou aktivitu.

20S proteazom je také základem 26S proteazomu (obr. 3.4) – tvoří jeho centrální část. Kromě něj obsahuje 26S proteazom ještě další dvě různé části (tzv. 19S), bázi a víko. Báze se skládá z deseti podjednotek, víko z devíti, a jejich úkolem je otevírat kanál v 20S proteazomu a rozpoznávat, zachytávat, deubikvitinovat, rozbalovat a translokovat proteiny určené k degradaci do centrální části, kde jsou rozštěpeny na úseky o 3–25 AK. Velikost fragmentů je dána vzdáleností jednotlivých aktivních míst. [42]

Obrázek 3.4: Schématické znázornění 26S proteazomu



Pro účely této práce je nezbytné představit jednu konkrétní doménu víka a to doménu Poh1. Jedná se o deubikvitinázu z třídy metaloproteáz, která se vyskytuje v savčích buňkách a obsahuje konzervovanou sekvenci aminokyselin nazývanou JAMM. [45] Ta se skládá ze dvou histidinů a molekul kyseliny asparagové a glutamové. JAMM sekvence vytváří po vazbě  $Zn^{2+}$  aktivní místo enzymu. Poh1 doména je nezbytná pro fungování proteazomu, protože zodpovídá za hydrolyzu izopeptidové vazby mezi substrátem a ubikvitinem, čímž zajišťuje deubikvitinaci proteinů vstupujících do proteazomu. Blokáce Poh1 vede ke značnému snížení buněčné viability. [46]

Pro průběh procesů na bázi a víku je charakteristická spotřeba velkého množství ATP, proto

také 26S proteazom (na rozdíl od samotného 20S proteazomu) potřebuje pro svou funkci energii. [47] Kromě popisovaných podjednotek můžeme někdy na proteazomu nalézt i další komplexy a mohou se na něj v menší míře reverzibilně vázat i jiné proteiny. Celková relativní molekulová hmotnost 26S proteazomu je cca 2500 kDa. [48]

Zvláštním případem jsou proteazomy podílející se na imunitní odpovědi, takzvané imunoproteazomy, které mají vlivem  $\gamma$ -interferonu i jiných látek pozměněnou strukturu svých podjednotek. V důsledku toho získávají lepší kontrolu nad tvořenými polypeptidy, které jsou následně prezentovány MHC I receptorům. [42] Velice zajímavé jsou také thymoproteazomy [49], které se, jak již název napovídá, nacházejí v brzlíku. Strukturně vycházejí z imunoproteazomů, obsahují však jednu zcela ojedinělou podjednotku, díky které je u nich potlačena chymotrypsinová aktivita. Díky tomu vznikají peptidy s hydrofobními zbytky, které jsou preferovanými cíly MHC I komplexů. [50] I thymoproteazomy mají vliv na správné fungování imunity.

## **Ubikvitin – proteazomový systém**

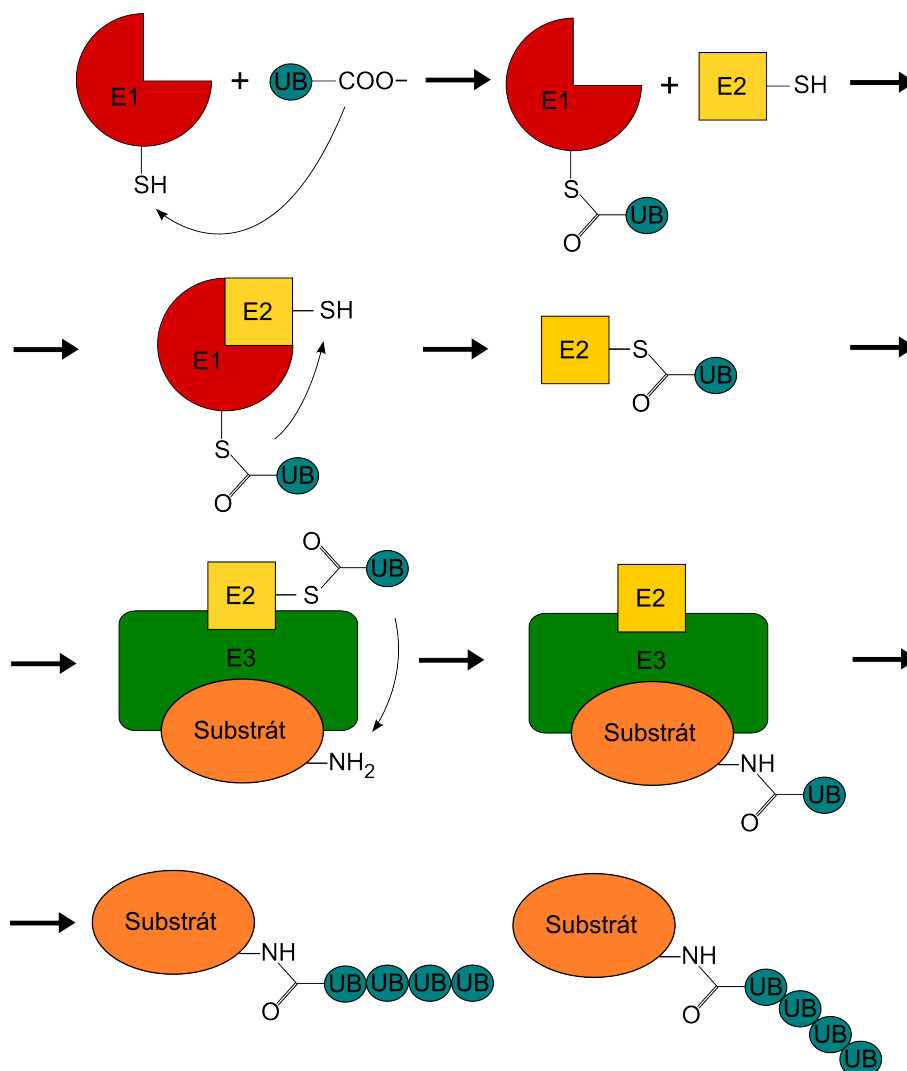
Degradace probíhající v 26S proteazomech je zprostředkována pomocí ubikvitinu. Jedná se o malý, vysoce konzervovaný protein s řetězcem o délce 76 aminokyselin, které se v různém počtu naváží na cílovou molekulu a tím ji určí k degradaci („kiss of death“). Proteiny určené k ubikvitinaci jsou fosforylovány, případně rozpoznávány podle AK zbytků na N-konci. [51]

K vazbě polyubikvitinového řetězce dochází obvykle přes lysin 48 (typicky signál k degradaci), méně často pak přes jiné molekuly lysinu v ubikvitinu. Důležitým vazebným místem je lys 63, přičemž se uvažuje, že ubikvitinace v této oblasti není primárním signálem k degradaci [52], ale spíše k regulaci celé škály dalších procesů, od endocytózy až po transkripci. [53] Dochází k formování mnoha typů řetězců o různých délkách a vlastnostech. Ve výjimečných případech mohou být řetězce i rozvětvené či jinak atypické. [54]

Substrát je připojen izopeptidovou vazbou mezi koncovým karboxylem ubikvitinu a vedlejší aminoskupinou lysinu v substrátu. Ubikvitin je za spotřeby energie aktivován E1 enzymem. Vazba se děje přes C-konec glycinového zbytku ubikvitinu na cysteinový zbytek E1. Ubikvitin je poté přenesen opět na cysteinový zbytek v aktivním místě ubikvitin-konjugujícího enzymu E2 a nakonec je připojen na některou sekundární aminoskupinu konkrétního proteinu za katalýzy

ubikvitin ligázy, taktéž zvané E3. (obr. 3.5) Poslední krok může fungovat více mechanismy – přímou vazbou ubikvitinu na E3 a přenosem obdobným způsobem, jako u předchozích reakcí nebo, v případě, že vazba E3 a ubikvitinu není možná, může docházet k přímému přenosu z E2 na cílový protein za asistence E3. Všechny zmíněné enzymy mohou mít několik různých forem. [55] Ubikvitin-ligázy jsou dokonce specifické pro různé skupiny proteinů, rozeznáváme tedy stovky různých typů, které jsou všeobecně děleny do několika skupin podle svých aktivních domén (HECT, RING, U-BOX, PHD). [56] Do procesu jsou někdy zapojeny také další enzymy (E4), které jsou zodpovědné za prodlužování polyubikvitinového řetězce. [57] Kromě toho je fungování proteazomu ovlivňováno také řadou dalších proteinů, které jsou s ním asociovány. [48]

Obrázek 3.5: Schéma ubikvitin – proteazomového systému



Polyubikvitinové řetězce se dále naváží na víko proteazomu. To spolu s bází a částí  $\alpha$  prsence, která tvoří vstup do centrálního válce, poté pomocí enzymů deubikvitináz (DUBs) oddělí ubikvitinový řetězec, denaturuje cílový protein, čímž dojde k jeho rozbalení do primární struktury, a odešle ho do centrálního válce k degradaci. Deubikvitinaci prozatím nebyla věnována taková pozornost, jako jiným procesům v rámci UPS, nicméně v poslední době je čím dál zjevnější velký význam tohoto procesu v mnoha dějích v buňce. [58] Některé DUBs jsou s největší pravděpodobností přímo spjaty s rakovinnými procesy, a proto je výzkum v této oblasti další možnou perspektivou v rámci léčby této choroby.

UPS má v buňkách několik základních funkcí: [9] [59]

- a) Likviduje nepotřebné a poškozené proteiny, přičemž zároveň poskytuje substrát pro tvorbu proteinů nových.
- b) Jak již bylo výše naznačeno, podílí se také na imunitě, kdy rozkladem cizorodého proteinu poskytuje antigeny.
- c) Spouští funkci některých substrátů, které potřebují pro aktivaci částečnou degradaci svých částí.
- d) Reguluje mnoho nezbytně důležitých procesů. Mezi substráty proteazomu totiž patří celá škála molekul ovlivňujících dělení buněk, buněčný cyklus, transkripci, apoptózu atd.

Některé proteiny ke svému štěpení nepotřebují značení ubikvitinem. Jedná se hlavně o špatně složené proteiny, u kterých chyby v patřičných částech mohou samy o sobě sloužit jako signál k degradaci. [60] Dalším příkladem mohou být oxidované proteiny, které jsou likvidovány nespécificky jak 26S, tak 20S proteazomem. Jejich rozpoznávání zajišťují s největší pravděpodobností odkrytá hydrofobní místa, která se při změnách terciární a sekundární struktury proteinů při oxidačních procesech dostanou na povrch. Vliv mají i chemické změny na jednotlivých AK. [61]

Zajímavá je také možnost kooperace proteazomů s dalšími buněčnými strukturami, například pochod zvaný ERAD (endoplasmatic reticulum-associated degradation), kdy jsou nesprávně složené proteiny označeny v ER a posílány přilehlým proteazomům k degradaci [62]



[63], či vychytávání proteinů v cytoplazmě pomocí speciálních kompartmentů. [64] Druhý zmíněný jev je závislý na rozpustnosti proteinů, nerozpustné agregáty jsou likvidovány výše zmíněným mechanismem autofagie.

### 3.3 Inhibitory UPS

#### Historie

V následujícím textu byly kromě níže citovaných použity tyto zdroje: rozhovor s J. Adamsem v Myeloma today, červen 2003 <sup>10</sup>, článek The Velcade Story (autor Scott Alen) zveřejněný v Boston Globe, květen 2007 <sup>11</sup> a článek Velcade: First in a New Class of Cancer Drug (autor Kathleen Fink) zveřejněný v Science Progress (Harvard Medical School). <sup>12</sup>

V 90. letech započaly snahy uplatnit nové objevy týkající se ubikvitin-proteazomového systému v medicíně. Původní myšlenkou bylo využít blokaci UPS v léčbě chorob spjatých se svalovou atrofií. Další výzkum ovšem přinesl poznatky o roli proteazomů v imunitním systému, regulaci transkripce atd., proto nakonec padlo rozhodnutí zaměřit se na hledání jiných možných perspektiv blokace. S myšlenkou zaměřit se na rakovinu přišel J. Adams, a i přes počáteční skepsi, předpokládané vážné vedlejší účinky a řadu finančních komplikací se mu nakonec podařilo prosadit a vyzkoušet látku, známou jako bortezomib (generický název) nebo Velcade (obchodní název), na pacientce s mnohočetným myelomem. Výsledky byly nad očekávání – došlo k naprostému vymizení rakoviny. Tento signifikantní úspěch spolu s absencí fungující terapie v případě mnohočetného myelomu nakonec přesvědčily firmu Millenium Pharmaceuticals k investici do dalších testů. Ty se netýkaly jen mnohočetného myelomu, ale také chronické lymfocytické leukemie a celé řady pevných tumorů. [65] V roce 2003 byl Velcade schválen jako lék pro pacienty s relapsujícím mnohočetným myelomem, dokonce ještě předtím, než byla dokončena 3. fáze klinických testů.

Prozatím se jedná o jediný schválený inhibitor proteazomu na trhu, nicméně v současné době probíhá řada klinických testů, které mají za cíl vývoj látek, jež nebudou sdílet některé

---

<sup>10</sup>myeloma.org

<sup>11</sup><http://www.boston.com>

<sup>12</sup>scienceprogress.hms.harvard.edu

nedostatky bortezomibu. Mezi ty patří například intravenózní podávání, toxicita při vyšších dávkách, tvorba rezistence, interakce s některými látkami přirozeně se vyskytujícími v těle [66] nebo nedostatečná účinnost v solidních tumorech [67].

## Možné mechanismy působení

Látky fungující na principu inhibice ubikvitin-proteazomového systému (dále v textu označované zkratkou PI) mohou pracovat několika různými způsoby. Nejtypičtější je přímá inhibice  $\beta$  prstenců centrální 20S části na jednom či více aktivních místech. Tato inhibice může být jak reverzibilní (bortezomib), tak ireverzibilní (charakteristické pro tzv. „PI druhé generace“, které však nejsou v klinické praxi zatím využívány). [59] Kromě toho jsou zde i perspektivy co se blokáce jiných částí ubikvitin-proteazomové dráhy týče, například narušení funkce 19S části (například prostřednictvím výše zmiňované inhibice DUBs) [68] nebo blokáce E3 ligáz. [69]

Velmi zajímavá věc je selektivita těchto inhibitorů k rakovinným buňkám. Ta může být dána několika faktory. Rakovinné buňky vyžadují více než zdravé buňky správnou degradaci regulátorů buněčného cyklu, a proto jsou mnohem citlivější k jeho narušení a také k pro-apoptickým stimulům. Některé regulátory transkripce ovlivňující průběh buněčného cyklu také spouštějí geny, jejichž produkty jsou nutné pro vyvolání PI indukované buněčné smrti. Vzhledem ke zvýšeným nárokům na růst a dělení jsou rakovinné buňky všeobecně náročnější co se jak syntézy, tak rozkladu proteinů týče, a jsou tedy k chybám v degradaci náchylnější. [9]

Co přesně stojí za protirakovinnými účinky PI zatím není přesně objasněno, nicméně byla objevena řada mechanismů a na základě nich vypracováno několik hypotéz, jak by tomu mohlo být.

Možným mechanismem funkce může být snižování hladiny některých anti-apoptických proteinů (prostřednictvím stabilizace jejich inhibitorů) nebo naopak stabilizace některých pro-apoptických proteinů, jako je například p53. Tento protein, zvaný někdy také „strážce genomu“, je důležitý regulátor buněčného cyklu. Je schopen zastavit buněčný cyklus, iniciovat opravy poškozené DNA a v případě příliš rozsáhlého poškození molekuly vyvolává apoptózu. [70] Funkce tohoto proteinu je v rakovinných buňkách často potlačena a blokáce PI vede k jeho stabilizaci. [71] I zde se však vyskytují mnohé nejasnosti – podle některých výsledků PI fungují

nezávisle na p53 v buňkách, kde je úplně zablokovan. [72] [73]

Druhou skupinou proteinů, které vyvolávají apoptózu u rakovinných buněk, jsou proteiny ze skupiny BCL-2. Mezi tyto proteiny patří například Bim, který v kombinaci s dalšími látkami (taxany) způsobí apoptózu skrze narušení mikrotubulárního systému buňky [74]. Akumulace gamma-tubulinu, ale i některých dalších proteinů také způsobuje smrt buňky, tentokrát zase mechanismem spjatým s narušením funkce centrosomu. [75] Dalšími proteiny, které bývají v některých buněčných liniích díky PI akumulovány a mohou vést k její apoptóze jsou Noxa, Bik a MCL-1. Jejich mechanismy působení i projevy v různých rakovinných buňkách jsou rozdílné, souvisejí však s destabilizací potenciálu na mitochondriální membráně. [76] [9]

Často zmiňované jsou také účinky inhibitorů proteazomu proti angiogenezi, procesu tvorby nových krevních kapilár, která je zcela nezbytná pro růst nádorů a také jeho metastázování. Inhibitory proteazomu ovlivňují tento proces v mnoha směrech – narušují proces degradace bazální membrány, jež probíhá za účelem lepšího prokrvení nově vznikajících tkání, brzdí proliferaci buněk a mohou také ovlivňovat rovnováhu angiogenních faktorů. [77]

Nedostatečná funkce proteazomu vede logicky k hromadění nepotřebných a narušených proteinů. Tato situace vede k přetížení endoplazmatického retikula, což může vést ke spuštění obranných mechanismů buňky. Pokud akumulace proteinů překročí určitou hranici, dojde k apoptóze. [76]

Některé výsledky také naznačují možnost, že by účinkem bortezomibu mohlo dojít k senzitivizaci buněk vůči NK (natural killer) buňkám imunitního systému. V buněčných kulturách odvozených od rakoviny prsu byla vlivem bortezomibu zvýšena exprese genů spjatých s apoptózou a receptorů signalizujících buněčnou smrt. [78]

Všechny tyto děje jsou pochopitelně mnohem komplikovanější a jejich přesný průběh a stejně tak další vliv PI na ně je zatím předmětem výzkumu. Velice podstatnou skutečností je rozdílné působení inhibitorů v různých buňkách [79] nebo možnost odlišného působení dalších inhibitorů, které fungují jiným mechanismem než bortezomib.

## **Bortezomib v praxi**

Bortezomib je prozatím klinicky používán k léčbě mnohočetného myelomu a lymfomu pláštěných buněk. [6] Klinické testy se slibnými výsledky v současné době probíhají u některých dalších krevních typů rakovin (další typy lymfomů, některé druhy leukemie a Waldenstromovy makroglobulinemie). Nepříliš velkou účinnost prokázal bortezomib také u některých sarkomů a malobuněčného karcinomu plic. Žádný signifikantní efekt nebyl zaznamenán v léčbě pevných tumorů. [9]

Právě velmi nízká účinnost bortezomibu v pevných nádorech je v současlivnosti jejich funkce rozpoznávat ubikvitinové řetězce dobře předmětem diskuze. Jedním z navrhovaných důvodů je například fakt, že většina pacientů, kterým byl bortezomib podáván, už byla předtím léčena chemoterapeutiky, která mohla způsobit neočekávané změny v nádorech. V preklinických testech, ve kterých se bortezomib původně jevil slibně, byly používány vzorky nádorů, jež do kontaktu s chemoterapeutiky nepřišly. Proto se předpokládá, že stejně i u pacientů, kteří ještě nebyli vystaveni chemoterapii, by mohly být výsledky léčby lepší. Stejně tak správnější naplánování léčby (načasování v rámci buněčného cyklu apod.) by mohlo vést k vyšší účinnosti. [59] Je také možné, že bortezomib funguje dobře pouze u nádorů s určitými vlastnostmi (například zvýšenou expresí izoforem cyklinu D). [80] Problémem bortezomibu, stejně jako i dalších léčiv, by mohla být i ta skutečnost, že kvůli zrychlené anigiogenezi dochází k tvorbě neplnohodnotných cév s většími póry a z toho důvodu mohou do rakovinných buněk vnikat ve větší míře vysokomolekulární látky. [81] To vede ke zvýšení vnitrobuněčného tlaku a neschopnosti léčiva dostat se na místo působení. Nádorů krve se tento problém pochopitelně netýká, a právě to by také mohlo být důvodem, proč v jejich případě bortezomib funguje.

Zajímavá je také možnost kombinovat bortezomib (případně jiné PI) s dalšími látkami, ať už za účelem zvýšení jejich účinku nebo potlačení již výše zmiňované rezistence. Těmito látkami mohou být klasická chemoterapeutika, dále například inhibitory  $\text{NF}\kappa\text{B}$  dráhy, inhibitory heat shock proteinů (látky, které zajišťují správné uspořádání proteinů do terciální struktury, čímž zvyšují odolnost buňky k apoptóze [82]) nebo také látky potlačující u buňky schopnost autofagie (inhibicí proteazomu může docházet ke stimulaci mechanismů autofagie na přežití buňky[83]). V současné době probíhá několik klinických testů zaměřených právě na tyto kombinace a ně-

které z nich se již dostaly i do klinického využití. Prvním z nich byla kombinace bortezomibu s chemoterapeutikem melphalan a látkou ze skupiny kortikosteroidů, prednisonem. [84] Tyto pokusy prokázaly prodloužení života pacientů o několik měsíců v porovnání s kontrolní skupinou bez bortezomibu. Dnes už je tato kombinace běžně využívána u mnohočetného myelomu jako léčba první volby. [85]

## Nežádoucí účinky

Užívání bortezomibu i své nevýhody. Příliš vysoké dávky vyvolávají u pacientů celou řadu nežádoucích účinků (přehled těchto efektů je možné si přečíst na stránkách příslušných úřadů oprávněných ke schvalování léčiv jako je EMA nebo u nás SÚKL, případně na oficiálních stránkách bortezomibu <sup>13</sup>) – od únavy a bolesti hlavy přes bolesti končetin, průjmy, zvracení, poruchy příjmu potravy, anemii, iontovou disbalanci, prudké poklesy tlaku až po trombocytopenii (poškození krevních destiček) a nejpálčivější vedlejší efekt vůbec, neuropatii [86] (narušení periferního nervového systému). Zaznamenány byly také případy selhání srdce. [7] [8] Tyto účinky můžeme zatím zmírnit pouze správným dávkováním. Dalším problémem je také nutnost intravenózního podávání. V blízké době však můžeme doufat ve schválení jiných přípravků na bázi PI, k nimž bude lidský organismus více tolerantní a snese je ve větších dávkách, a které bude možné podávat jiným způsobem.

Na základě prozatímních výsledků však můžeme předpokládat, že některé nežádoucí efekty léčiva nejsou dány přímo inhibicí proteazomu. Bylo zjištěno, že bortezomib interaguje také s jinými cíly v buňce. Pozitivní je to, že další testované PI nemají podle získaných dat neurodegenerativní účinky, a že by tedy při užívání těchto novějších léčiv zřejmě nemělo docházet k neuropatii. [10]

Ve srovnání s nežádoucími účinky některých cytostatik je však nutno říct, že léčba bortezomibem patří stále spíše mezi ty šetrnější. Nežádoucí účinky (NÚ) chemoterapie se dělí na krátkodobé (ty, které pacient pozoruje přímo v průběhu léčby) a dlouhodobé (pozdější komplikace). [87] Mezi krátkodobé účinky patří hlavně nauzea, zvracení, bolesti, únava, ztráta vlasů, změny a narušení chuti, případně jiných smyslů a celá řada dalších. Mezi nejzávažnější dlou-

---

<sup>13</sup><http://www.velcade.com>

hodobé účinky patří hlavně narušení imunity nebo neplodnost. Míra, s jakou se komplikace projeví, záleží na celé řadě faktorů – od typu léčiva až po konkrétní charakteristiky pacientů. Někdy je nutné užívání také řady dalších medikamentů, které mají za úkol NÚ zmírňovat. [88]

V mnohých případech možná nejzávažnějším problémem, který se však váže k jakékoli léčbě, je také zhoršení kvality života pacientů, jejich špatný psychický stav a narušení života v sociální sféře. [89]

Jako pro mnoho dalších léčiv, i pro bortezomib bohužel platí, že si proti nim mohou rakovinné buňky vytvořit rezistenci. Ta je dána několika faktory – například nadměrnou expresí a mutacemi  $\beta 5$  podjednotky [90] [91], snižováním hladiny výše zmíněných proteinů ze skupiny BCL-2 pomocí epigenetických mechanismů, nadměrnou expresí anti-apoptických proteinů, modifikacemi proteinu p27, který pak vzhledem ke změně struktury nebo lokalizace v buňce není schopen blokovat buněčný cyklus [9], zvýšením hladiny chaperonů a heat shock proteinů [92], aktivací výše zmíněných mechanismů autofagie (ovšem role autofagie v přežívání rakovinných buněk je stále předmětem diskuse) [93], ale také třeba i zvýšenou hladinou antioxidantů [94], které mohou chránit buňky před inhibicí proteazomu nebo snižovat proteotoxicitu. [95] Problémem může být také aktivace  $\text{NF}\kappa\text{B}$  dráhy.

## **$\text{NF}\kappa\text{B}$ dráha**

Názvem  $\text{NF}\kappa\text{B}$  je označována rodina dimerních proteinů fungujících jako transkripční faktory, které jsou základem drah zodpovědných za mnohé fyziologické funkce, jako je vývoj a růst buněk, a také za reakce na různé fyzikální a chemické faktory i patogenem vyvolané stresy. Dysregulace této dráhy vede k celé řadě patologických změn a stojí za řadou onemocnění, včetně těch rakovinných. [96]

Dimery se skládají z proteinů p50, p52, p65 (RelA), c-Rel a RelB [97], které sdílejí Rel homologní doménu zodpovědnou za vazbu na DNA. Proteiny se navzájem kombinují, čímž vytvářejí celou řadu specifických transkripčních faktorů a ovlivňují expresi řady genů. Produkty těchto genů potlačují zánětlivou reakci organismu, řídí opravy v buňkách a také rozhodují o buněčné smrti. [98] Právě skrze tyto geny  $\text{NF}\kappa\text{B}$  dráha reguluje přežití buněk, ale také potlačuje proapoptický potenciál mnohých chemoterapeutik. [99]

V klidovém stavu je NF $\kappa$ B navázán na protein I $\kappa$ B, jenž NF $\kappa$ B za normálních podmínek inhibuje. U některých NF $\kappa$ B proteinů I $\kappa$ B přímo kryje místa zodpovědná za translokaci do jádra, většinou však zodpovídají za rovnovážný přesun proteinů mezi jádrem a cytolem. [100] Mnohé cytokiny, růstové faktory a podle všeho i inhibitory proteazomu a mnohé další stimuly však mohou aktivovat I $\kappa$ B kinázový komplex (IKK), který indukuje fosforylaci, ubikvitinaci a následnou degradaci I $\kappa$ B. Tím dochází k silnému posunu rovnováhy k přenosu do jádra a spuštění následujících dějů. [101]

Známe kanonickou a nekanonickou dráhu, které se i přes podobnosti v základních věcech navzájem liší. Každá je ovlivňována jinými faktory, je jinak aktivovaná a závislá na jiných IKK. Díky tomu ovlivňují různé procesy. [97]

Efekt NF $\kappa$ B na velké množství procesů je dán také variabilitou na úsecích DNA, kam se faktory váží a také posttranskripčními úpravami NF $\kappa$ B proteinů.<sup>14</sup> [100]

Dříve se zcela logicky uvažovalo, že dojde-li k inhibici proteazomů, není I $\kappa$ B degradován, komplex je ustálen a dráha nepokračuje. Funkční proteazomy jsou také nutné k samotné syntéze NF $\kappa$ B, protože některé z proteinů potřebují částečnou degradaci pro svou funkci. Právě blokáce NF $\kappa$ B dráhy byla dříve považována za hlavní příčinu protirakovinných účinků PI. [9] Dnes již však máme výsledky, které správnost tohoto předpokládaného mechanismu popírají. V roce 2009 byl zveřejněn článek, který ukazuje, že přítomnost PI naopak vede ke snížení syntézy I $\kappa$ B a tím ke spuštění dráhy [102]. Přesto je však tato teorie stále rozšířená.

## **Inhibitory proteazomu v léčbě mozkových nádorů**

V současnosti probíhají testy mající za cíl ukázat, zda by byla možná léčba gliomů pomocí inhibitorů proteazomu. Výsledky některých z nich naznačují potenciální účinek bortezomibu proti gliomovým „stem-like“ buňkám, navíc s téměř nulovým poškozením mozkových kmenových buněk. [103] Mozkové kmenové buňky jsou nezbytné pro obnovu a správnou funkci nervového systému [104] a při léčbě cytostatiky bývají mnohdy poškozovány, proto je možnost, že by účinek PI mohl být selektivní vůči nádorovým buňkám, velice příznivým faktorem. U některých gliomových buněčných linií lze po podání bortezomibu sledovat zvýšenou citlivost na TRAIL

<sup>14</sup>T. Gilmore - NF $\kappa$ B Transcription Factors; <http://www.nf-kb.org>

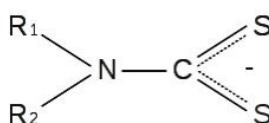
[105] (protein, který po vazbě na určitý receptor v buňce indukuje apoptózu). Také linie odvozené od medulloblastomu jsou vůči bortezomibu citlivé, v tomto případě je předpokládaným mechanismem účinku stabilizace malého pro-apoptického proteinu NOXA, který za podmínek oxidativního stresu indukuje buněčnou smrt. [106] Navzdory příznivě vyznívajícím výsledkům v preklinickém hodnocení zde však zůstává možnost, že látka při podání pacientovi selže. [6]

Nedávno byla ukončena první fáze klinických testů, zkoumajících účinky bortezomibu na maligní formy gliomu. Bortezomib sám o sobě neměl výrazný efekt, stejně jako u jiných solidních tumorů. Možným důvodem nedostatečného působení však může být i to, že není schopen efektivně pronikat do CNS. I u pacientů, u kterých došlo k pozastavení průběhu choroby (a kterých byla bohužel menšina), neměl pozitivní efekt bortezomibu dlouhého trvání. Momentálně v této oblasti probíhají testy s kombinacemi bortezomibu a jiných látek, jejichž výsledky možná budou lepší. [107] Nevalný úspěch bortezomibu však nevylučuje silnější protirakovinné účinky jiných PI, které budou schopny efektivněji pronikat do mozku, případně které proteazom inhibují odlišným způsobem než bortezomib.

### 3.4 Antabus

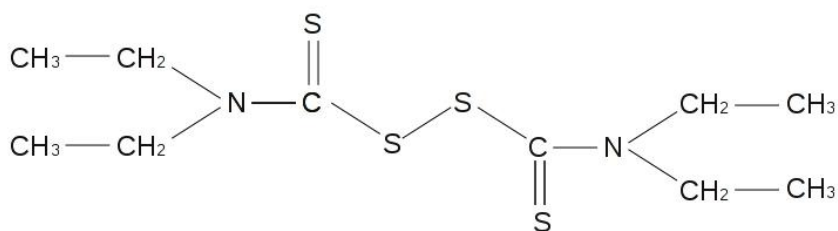
Těmito látkami, které jsou zřejmě schopny jak snažšího průniku do mozku, tak (mimo jiné) fungování jako PI na jiném principu, než je tomu u bortezomibu, by mohly být komplexy dithiokarbamátů s mědí. Dithiokarbamáty (obr. 3.6) jsou poloamidy kyseliny dithiokarbamové. Příkladem dithiokarbamátu je látka ditiocarb (diethylthiokarbamát, obr. 3.8), která je hlavním metabolitem léčiva disulfiramu (obr. 3.7) neboli antabusu. Z chemického hlediska je antabus tertaethylthiuram disulfid. [108] Již od 50. let minulého století je využíván jako podpůrný prostředek pro léčbu alkoholismu. [109]

Obrázek 3.6: Obecná struktura dithiokarbamátů

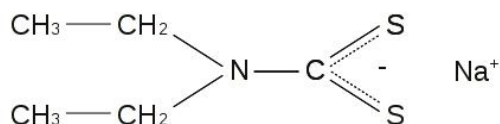




Obrázek 3.7: Disulfiram



Obrázek 3.8: Diethyldithiokarbamat sodný (Ditiocarb)



Dithiokarbamáty byly známy už koncem 19. století a v době, kdy byly uvedeny do lékařské praxe, se běžně používaly také třeba jako vulkanizační a antioxidační činidla v gumárenském průmyslu, v analytické chemii nebo jako fungicidy a insekticidy v zemědělství. [110]

## Historie

Disulfiram byl zaveden do lékařské praxe už v 30. letech minulého století, původně jako lék proti parazitům (diethyldithiokarbamat je schopen tvořit cheláty s mědí, dokáže blokovat dýchací řetězec některých nižších organismů [111]). V roce 1937 byl E. E. Williamsem poprvé pozorován vliv dithiokarbamatů (a tedy potažmo i disulfiramu) na metabolismus ethanolu. V jisté továrně na kaučuk byly zaznamenány řady nepříjemných fyziologických symptomů u pracovníků, kteří poté, co byli vystaveni působení dithiokarbamatů, požili byt' jen malé množství alkoholu. [112] Díky těmto účinkům byl v roce 1951 antabus schválen jako lék proti alkoholismu. [109]

Již v 70. letech se objevil case report [113], na základě kterého dnes můžeme předpokládat protirakovinné efekty disulfiramu u lidí (možné mechanismy účinku rozebrány v dalších kapitolech). U pacientky, která kvůli relapsu rakoviny prsu propadla alkoholismu, došlo po nasazení léčby disulfiramem k úplnému vymizení primárního tumoru i metastáz v kostech.

V 80. a 90. letech minulého století byl ditiokarb podroben testům, jejichž cílem bylo prozkoumat účinky látky na imunitní systém člověka a možné využití při léčbě pacientů nakažených HIV virem [114]. Přes slibné výsledky počátečních pokusů však těmito testy ditiocarb neprošel. [115]

## Účinky antabusu v organismu

Důvodem používání disulfiramu jako adjuvans při léčbě alkoholismu je jeho schopnost reverzibilně blokovat aldehyddehydrogenázu, která oxiduje acetaldehyd, vzniklý při odbourávání ethanolu, na acetát. [11] V důsledku toho pak dochází k hromadění acetaldehydu v těle, a jeho zvýšená hladina dále vede k nežádoucím účinkům (tachykardie, snížení tlaku, pocení, závratě; v těžších případech může dojít až k srdeční arytmii, křečím a kolapsu pacienta). [116]<sup>15</sup>

Disulfiram není selektivním lékem. Kromě aldehyddehydrogenázy je schopen reagovat v těle i s řadou jiných proteinů. Jeho užíváním dochází například také k inhibici přeměny dopaminu na noradrenalin v mozku. Existuje celá řada mechanismů, které se na tomto jevu podílejí, nejdůležitějším z nich je však blokáce dopamin  $\beta$ -hydroxylázy. Tímto způsobem poté dochází k zesílení nežádoucích účinků, pokud dojde k požití ethanolu, protože v důsledku snížení hladiny noradrenalinu se zvýší efekt acetaldehydu na srdeční tkáň. Zastavení dráhy dopaminu vede také k hypersenzitivitě a podpoře negativních stavů, které prožívají někteří uživatelé kokainu [12] [117]. Mezi užíváním kokainu a alkoholismem existuje provázanost, která dle názoru některých odborníků nemá obdobu u žádné jiné drogy – podle průzkumů až 80 % lidí závislých na kokainu je zároveň i alkoholiky. Účinky proti oběma substancím by tedy mohly být při terapii těchto pacientů velkou výhodou. [109]

Prostřednictvím inhibice dopamin  $\beta$ -hydroxylázy dochází také ke snížení hladiny noradrenalinu v mozku. Na základě toho se předpokládá, že by disulfiram potenciálně mohl napomáhat potlačení některých dalších závislostí, například gamblerství. [13]

---

<sup>15</sup><http://www.sukl.cz>

## **Komplex disulfiramu s mědí a inhibice proteazomu**

O mechanismech působení komplexů disulfiramu s mědí na rakovinné buňky zatím nebylo nashromážděno mnoho poznatků. Stejně jako u antabusu, i potenciál kovů v léčbě nádorového bujení je již dlouho znám. [118] Prvním a prozatím jediným schváleným prostředkem na bázi kovů pro léčbu některých typů tumorů je cisplatina a její analoga. Účinky této látky tkví v jejích schopnostech vázat se pevně na DNA. [119]

Primárním cílem komplexů disulfiramu s mědí jsou však s největší pravděpodobností proteazomy. Získaná data naznačují, že komplex antabusu a mědí je aktivní proti 26S proteazomu, ovšem v případě purifikovaného 20S proteazomu schopnost inhibice klesá. Navrhovaným vysvětlením je inhibice JAMM domény na víku proteazomu. [120] Tuto hypotézu podporuje ještě několik dalších skutečností, například podobnost domény s jiným enzymem, u kterého již dříve byla inhibice pomocí kovů prokázána. [121]

Zajímavé je, že komplexy disulfiramu s jinými kovy působí pravděpodobně taktéž jako PI, nicméně jiným mechanismem. Například komplexy se zlatem inhibují 20S proteazom. Předpokládá se, že blokují chymotrypsinovou aktivitu. [122] [123]

Pozitivní efekt může často vyvolat i pouze podávání samotného antabusu, ovšem pravděpodobně z toho důvodu, že u mnoha typů rakovin, jakožto i jiných nemocí (často diskutované jsou například neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova, Parkinsonova a Creutzfeldt-Jakobova choroba), se u pacientů objevuje zvýšená hladina mědi v tkáních a krevním séru [124] (důvodem je nejspíš to, že je měď nezbytným kofaktorem při angiogenezi a dalších procesech nezbytných pro růst nádoru). Tím je umožněna tvorba chelátů i bez umělého dodání kovů. [125]

Ditiocarb byl prozatím úspěšně použit ve II. fázi klinických testů jako pomocná látka při léčbě rakoviny prsu. [126] V tomto testu byl pozitivní vliv látky zjevný – v kontrolní skupině, kde byla terapie doplněna o ditiocarb, byl počet přeživších pacientek, u kterých nedošlo po 6 letech od léčby k relapsu, asi o 20 % vyšší než ve skupině bez antabusu.

V současné době probíhá I. fáze klinických testů disulfiramu s glukonátem měďnatým na pacientech s primárními i sekundárními nádory jater. Tyto testy jsou financovány University of Utah. <sup>16</sup>

---

<sup>16</sup><http://www.clinicaltrials.gov>

Přípravek také dobře účinkuje *in vitro* proti melanomu [127] [128] či některým typům rakoviny plic. [129] Laboratorní testy také naznačují možný účinek komplexu proti dalším typům rakoviny. [108]

## **Další možné protirakovinné účinky**

### **Další protirakovinné účinky komplexu**

Účinky komplexu disulfiramu s mědí mohou spočívat i v jeho schopnosti blokovat NF $\kappa$ B dráhu (na rozdíl od ostatních PI, které, jak již bylo výše rozebíráno, dráhu naopak spíše indukují). Dithiokarbamáty mohou totiž díky své schopnosti tvořit cheláty s kovovými ionty být schopny blokovat tzv. Fentonovu reakci, při které je peroxid vodíku rozkládán na hydroxylový radikál, který je pravděpodobně nezbytný pro spuštění NF $\kappa$ B dráhy. [16] Objevují se však i výsledky popírající toto tvrzení [130], a tento mechanismus pravděpodobně není jedinou příčinou schopnosti komplexů blokovat dráhu – ta může spočívat i v blokaci IKK komplexů kovy atd. [131]

### **Možné protirakovinné účinky antabusu**

I když se předpokládá, že protirakovinné účinky antabusu tkví hlavně ve tvorbě komplexu s mědí, podle některých experimentů by i samotný disulfiram mohl mít určitý efekt na rakovinné buňky nebo potlačovat některé nežádoucí jevy, které jsou s rakovinou spojeny.

Výsledky experimentů napovídají, že je disulfiram schopný potlačovat angiogenezi prostřednictvím inhibice některých pro ni nezbytných faktorů, například MMP-2 a MMP-9 (matrix metaloproteinázy). [132] Ty ve své struktuře obsahují zinek, což z nich dělá cíle disulfiramu. Jsou z větší části zodpovědné za degradaci mezibuněčné hmoty, jež je pro růst nádoru a angiogenezi nezbytná. [15] Na blokování angiogeneze se může podílet i schopnost antabusu inhibovat superoxiddismutázu. [129]

Disulfiram taktéž snižuje rezistenci buněk vazbou na některé ABC (ATP binding cassette) transportéry, konkrétně P-glykoproteiny (zvané také MDR1) a MRP1 (multidrug resistance protein 1). [133] Inhibuje některé jejich modifikace a zároveň je schopen interakcí s hotovým proteinem zablokovat substrátem stimulovanou hydrolýzu ATP, která je pro jejich funkci nezbytná. Tyto proteiny fungují v buňkách jako transportéry celé řady látek včetně léčiv a jejich metabo-

litů, proto je jejich zvýšená exprese spjata s jevem zvaným “multidrug resistance“ (mnohočetná léková rezistence) [134] – účinnou látku z buněk odčerpávají. [135] Zablokováním transporterů můžeme zvýšit koncentraci účinné látky (například komplexu) na hladinu potřebnou pro žádoucí protirakovinný efekt.

Byla popsána také blokáce E3 ligáz pomocí antabusu. [136] Inhibiční efekt léčiva podávaného spolu s mědí na UPS může být tedy výsledkem hned několika procesů. [131]

### **Disulfiram v léčbě gliomů**

Prozatím dostupné výsledky naznačují, že u pokusných zvířat došlo po podání disulfiramu k prokazatelnému potlačení růstu C6 gliomu [129] (v článku navrhovaným mechanismem účinku je výše zmíněná inhibice superoxiddismutázy a zablokování angiogeneze, jak však již bylo v předchozím textu nastíněno, je pravděpodobné, že disulfiram v buňkách působí na více úrovních, včetně tvorby komplexu s endogenní mědí a inhibice proteazomu). Komplexy dithiokarbamátů s mědí mají obrovskou výhodu v tom, že dokáží snadno procházet membránami do tkání a nález dietyldithiokarbamátu měď natého v mozkové tkáni zvířat napovídá o schopnosti tohoto komplexu procházet hematoencefalickou bariérou. [17]

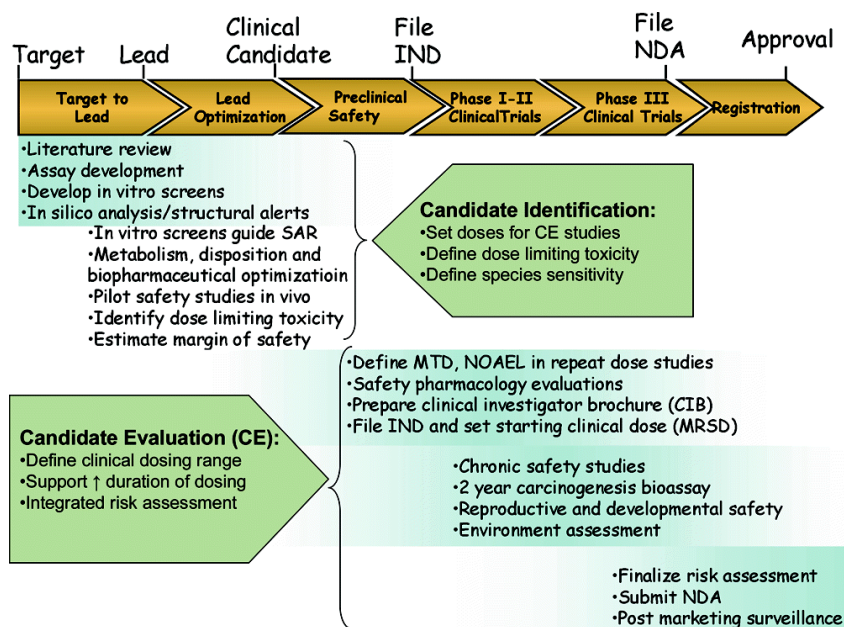
## **3.5 Klinické testy**

Výhodou antabusu by mohla být také skutečnost, že se jedná o lék dlouho využívaný v klinické praxi a tedy nepatentovatelný, a v případě jeho širšího využívání proti rakovině by značně klesly náklady na léčbu oproti novým látkám. [137]

Vývoj nového léčiva je velice nákladný a časově náročný proces. [4] Před uvedením na trh prochází lék nejrůznějšími testy, které zaberou v průměru 13 let a cenově vycházejí asi na miliardu USD. Přitom až 95 % látek těmito testy neprojde a nedostanou se do klinického užívání. [2] Zatímco náklady neustále stoupají, zatímco počet každoročně schválených léčiv má tendenci spíše klesat. [3]

## Průběh klinických testů nových léčiv

Obrázek 3.9: Schéma shrnující průběh klinických testů (zdroj: [138])



Ještě předtím, než se látka začne klinicky testovat, je potřeba provést její preklinické hodnocení. Jedná se o proces, jehož délka trvání se pohybuje okolo 5 let, a jehož hlavními cíli je získat potřebné informace o účinné látce a zhodnotit benefity i rizika plynoucí z možného užívání léku. Ověřuje se akutní, krátkodobá i dlouhodobá toxicita látky, mechanismy účinku, metabolismus a případná toxicita metabolitů, chemická stabilita látky a mnoho dalších parametrů. Podle nich se potom určí vhodná dávka, způsob podání a další kritéria, která mají zaručit co nejvyšší možnou bezpečnost před prvním podáním člověku. Využívané metody jsou hlavně testy *in vitro* [139], *in vivo* na pokusných zvířatech [140], experimenty na tkáňových kulturách, samostatných orgánech, jednotlivých buňkách nebo jejich izolovaných součástech či produktech. Poměrně novou a zajímavou věcí jsou také testy *in silico* pomocí počítačových simulací. [141] [142]

Projde-li nadějná látka úspěšně preklinickým hodnocením, může začít hodnocení klinické. Klinické testy mají celkem 4 fáze. V první fázi dochází k prvnímu podání přípravku lidem. Jedná se o řádově desítky dobrovolníků, většinou zdravých jedinců; pouze v případě, že se jedná o léčivo, u kterého můžeme předpokládat vážné nežádoucí účinky (cytostatika apod.), je lék v této fázi podáván nemocným, kterých je také často méně než uváděný počet. [143] [107]

Kvůli takto nízkému počtu testovaných osob nelze na této úrovni zcela ověřit, zda je lék opravdu účinný v lidském organismu či nikoliv (což obzvláště platí u terapií proti rakovině). Začíná se podáním malé dávky – 1/10 množství, u kterého ještě nebyly zaznamenány toxické účinky na zvířatech. Tyto dávky se postupně zvyšují a podávají v různých intervalech. Cílem je sledovat nežádoucí účinky a stanovit vhodné dávkování. V druhé fázi klinických testů dochází k dalšímu testování léku na několika stovkách nemocných subjektů, přičemž u vzácnějších chorob může být opět počet dobrovolníků menší (i v těchto případech by však měl počet pacientů dosáhnout určité hodnoty, výpočet dostatečného množství pacientů, které teoreticky stačí na prokázání účinnosti léku v této fázi viz například [144], známe však i jiné výpočty podle jiných autorů, např. [145]). Hlavním úkolem těchto testů je blíže prozkoumat farmakokinetické (absorbování látky, její distribuce po těle a způsoby její eliminace) a farmakodynamické (fyziologické účinky látky v těle) vlastnosti přípravku v nemocném organismu, ale také dále zkoušet, jaký rozsah dávky je ten nejvhodnější. [146] [147] V další, třetí fázi klinických testů, dochází k dalšímu hodnocení terapeutických účinků léku. [148] Látka je podávána několika tisícům subjektů, které jsou pečlivě vybírány podle předem stanovených kritérií jako je váha, věk, pohlaví, stádium nemoci apod.

Testy často probíhají na více pracovištích, zejména z toho důvodu, aby bylo vůbec možné sehnat dostatečné množství pacientů. Tyto studie, nazývané též multicentrické, ovšem mají i další výhody – je zde možnost porovnat výsledky z několika pracovišť a do testů se zahrnuje více skupin pacientů, čímž je tedy dosaženo větší variability.

Jsou prováděny tzv. zaslepené studie, kdy je kontrolní skupině lidí podáváno placebo a ani lékař neví, kteří z pacientů dostávají kterou látku. Pokud lék projde uspokojivě všemi těmito testy, je mu po předložení veškeré požadované dokumentace příslušným úřadem udělena registrace (u nás platí registrace 5 let a poté je nutno ji obnovit) a může jít volně do prodeje.

Úřadem udělujícím registrace je v EU je EMA (European medicines agency) <sup>17</sup>, která je decentralizovaná a má za úkol korigovat fungování jednotlivých ústavů v členských státech EU (u nás je to Státní ústav pro kontrolu léčiv – SÚKL). <sup>18</sup> V USA, odkud pochází většina nově schvalovaných léčiv, má tuto pravomoc FDA (U.S. Food and drug administration). <sup>19</sup>

---

<sup>17</sup><http://www.ema.europa.eu>

<sup>18</sup><http://www.sukl.cz>

<sup>19</sup><http://www.fda.gov>

Tím však klinické testy nekončí, ale přecházejí do poslední, čtvrté fáze, kdy je lék po dobu 4 nebo 5 let po uvedení na trh dále kontrolován a zkoumají se další možné nežádoucí účinky, které se při testech na úzkém vzorku populace nemusely projevit.<sup>20</sup>

(Pro získání všeobecných informací o průběhu klinických testů byly kromě výše uvedených použity informace zveřejněné na stránkách National Cancer Institute<sup>21</sup> a American Cancer Society<sup>22</sup>)

## Neziskové léky

Je logické, že farmaceutické firmy musejí v rámci snahy o prosperitu pečlivě chránit své výrobky. Prostředkem, který k tomu využívají, jsou patenty, které zaručují svému držiteli časově omezený monopol na podnikatelské využití vynálezu. Patentová politika chemických a farmaceutických výrobků se v konečném důsledku nijak neliší od politiky týkající se jiných vynálezů. Pro platnost patentu je nutné, aby jeho vlastník platil tzv. udržovací poplatky (a to zvláště v každém státě, kde je jeho výrobek využíván; pro léčiva je navíc typické, že před schválením v některých státech, včetně ČR, je nutné provést další testy, což prodlužuje dobu mezi vývojem nového léku a schválením v příslušném státě až na dalších několik let). Maximální délka platnosti patentu je 20 let. Firma držící patent na určité léčivo (společnosti, které se kromě distribuce a výroby léku zabývají také výzkumem a vývojem nových léčiv jsou označovány jako tzv. „origin companies“) tedy po dobu několika let smí jako jediná toto léčivo vyrábět a také pochopitelně stanovovat jeho cenu – je logické, že tato bude řádově převyšovat výrobní náklady, aby se firmě vrátil veškerý vklad, který do výrobku investovala a k tomu navíc generovala zisk. Po vypršení platnosti patentu se výroby léku mohou ujmout i další společnosti (tzv. „generic companies“) a jeho cena značně poklesne.

Vzhledem k tomu, že systém patentů zabezpečující firmám na určitý čas privilegium v užívání nového výrobku, pohání společnosti k velkým investicím do vyvíjení nových léčiv a technologií, jsou patenty ve farmacii často považovány za velice úspěšnou a dobře fungující formu

---

<sup>20</sup><http://www.clinicaltrials.gov>

<sup>21</sup><http://http://www.cancer.gov/clinicaltrials>

<sup>22</sup><http://www.cancer.org>



motivace k vynakládání prostředků ze soukromých zdrojů pro výzkum. [149] Tento názor však mnozí odborníci nesdílí a naopak tvrdí, že patenty výzkum zpomalují a zdražují. [150]

Patentový systém není koncipován na míru potřebám farmaceutického průmyslu a nebere v potaz dlouhou cestu, kterou musí projít patentovaný výrobek předtím, než je možné jej uvést na trh. Kvůli tomu dochází často ke znemožnění výzkumu perspektivních léčiv, například z toho důvodu, že byly informace o nich zveřejněny příliš brzy a žádost o patent nevešla v platnost ve stanoveném časovém limitu (produkt je poté považován za veřejný a nebere se v potaz, že bez dalšího výzkumu a schválení nepřinese veřejnosti žádný benefit – se stejným problémem se setkáváme i v případě, když jsou účinky některé látky označeny jako „příliš zjevné“ a tedy nepatentovatelné), nebo proto, že byly spolu s kvantem dalších komponent naopak patentovány příliš brzy, a i přes svůj potenciál nebyly prvotně zhodnoceny jako profitabilní – výzkumu ohledně těchto látek se nemůže ujmout žádná jiná společnost, a ani firma držící patent se už k nim obvykle nevrací z toho důvodu, že by kvůli časové prodlevě nestihla tento produkt dostatečně zhodnotit. [149]

Jak už bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, vývoj nového léčiva je značně časově i finančně náročný proces. Kvůli tomu se léky stávají velice nákladnou záležitostí, což může v chudších zemích vést až k naprosté absenci kvalitní lékařské péče. Jako zajímavé řešení se tedy jeví hledání nových využití pro staré léky. [5] To by ušetřilo obrovské množství finančních prostředků, ale také třeba umožnilo výzkum ve skromnějších podmínkách díky odpadnutí nutnosti prošetřovat obrovské množství potenciálně účinných látek. [151] Běžnou praxí je dnes zaznamenávání a hlášení negativních účinků léků, se kterými se pacienti setkávají v průběhu jejich užívání – pokud by se stejným způsobem začaly monitorovat i naopak pozitivní vlastnosti léčiv, mohly by se takto získané informace stát velice cenným nástrojem při hledání jiných uplatnění pro dané medikamenty. K vytipování slibných léků se samozřejmě pojí nutnost vzniku databází, psaných jak odborníky, tak lidmi užívajícími dané léčivo, a knihoven shromažďujících informace a vzorky všech léčiv, které by mohly být zkoumány. Otázkou je také financování takového projektu. [4]

Cílem farmaceutických společností, stejně tak jako jiných firem, je zcela pochopitelně mít ze svých výrobků maximální možný zisk. Tyto firmy si proto nemohou dovolit investovat peníze do nových testů starých, již jednou patentovaných léků, které se ukázaly být perspektivními

v léčbě jiných chorob, než na jaké byly původně určeny. V současné době zde neexistuje možnost, aby se společností jejich obrovská investice vrátila. Nabízí se několik možností řešení této situace. Patří mezi ně například reformy legislativy patentů, které by omezily výše rozebírané problémy nepatentovatelných látek, do kterých se staré léky s novými perspektivami dají započítat, a možnost „repatentizace“ nebo zavedení obdoby patentů ze strany úřadů zodpovídajících za bezpečnost léčiv, které by je ovšem připravily o jejich hlavní výhodu – nízkou cenu a snadnou dostupnost. Navíc by mohly vést k dalším sporným bodům (různá cena pro pacienty užívající lék za různými účely atd.). Také by se zde mohl vzniknout prostor pro takzvaný „evergreening“, neboli snahu firem několikrát patentovat jeden výrobek za účelem prodloužení svého monopolu na něj, a další zneužívání.

Je zde také možnost financování výzkumu nových léků ze státních peněz, to s sebou však také nese řadu komplikací a rizik, jako je nedostatek prostředků a vybavení a neschopnost konkurence soukromým firmám. [149]

Další poměrně slibnou cestou by mohlo být získávání peněz od dobrovolných dárců. V současné době existuje několik charitativních organizací, jež se touto problematikou zabývají. První z nich byla The Institute for OneWorld Health (iOWH), vzniklá v roce 2006 a pokoušející se sehnat prostředky na léčení různých infekčních chorob, které by se tak stalo cenově dostupným pro pacienty z rozvojových zemí.<sup>23</sup> Pro nás nejzajímavější organizací je ovšem Global Cures. Byla založena v létě roku 2008 profesorem Harvard Medical School V. Sukhatmem a sídlí v Bostonu. Zabývá se tvorbou databáze, poskytováním informací pacientům a sháněním financí na sponzorování slibných terapií proti rakovině – od výzkumu účinků některých potravinových doplňků a různých dalších chemických komponent či speciálních diet až (a pro nás především) po výše rozebírané hledání nových využití pro již schválené léky. To se týká těch stále ještě pod patentovou ochranou, jako celecoxib (inhibitor COX-2) nebo některé statiny (léky snižující hladinu lipidů v krvi), až po ty s již vypršeným patentem či nikdy nepatentovaných, např. chloroquin (proti malárii), digitoxin neboli digitalis (léčba různých srdečních onemocnění), cimetidin (užíván k léčbě řady zažívacích potíží) a mnohých dalších.<sup>24</sup>

Sponzorován z peněz dobrovolníků je i v tomto článku popsán výzkum [152], který si klade

---

<sup>23</sup><http://www.oneworldhealth.org>

<sup>24</sup><http://www.globalcures.org>

za cíl hledat alternativní léčbu agresivních mozkových nádorů. Strategie spočívá v prověřování konkrétních parametrů mozkových nádorů a následném hledání nejlepší možné terapie pomocí speciálně vytvořených algoritmů – a to i mezi léky, které nejsou primárně zamýšleny k léčbě rakoviny. Tento projekt, kloubící v sobě koncept tzv. „personalized medicine“, tedy efektivnější léčby zvolené „na míru“ konkrétnímu pacientovi dle jeho individuálních dispozic a také snahu o vytipování a využívání potenciálních léčiv k jiným účelům, než k jakému byly původně určeny, je financován z nadací vedených rodiči, jejichž děti onemocněly neuroblastomem.

Podle mého názoru by stála za úvahu i širší reforma metod schvalování nových léčiv a jisté uvolnění celého procesu. Ač je nutnost přísné kontroly bezpečnosti nových léčiv zcela jistě neodiskutovatelná, v mnohých případech, mezi které patří i onemocnění agresivními formami rakoviny, u kterých nezabírá schválená léčba, by bylo přínosem, kdyby pacienti měli šanci zvážit a svobodně se rozhodnout (samozřejmě za předpokladu přístupnosti všech potřebných informací a možnosti konzultací s odborníky), zda by v jejich konkrétním případě nebylo lepší podstoupit jisté riziko a vyzkoušet léčbu, jejíž bezpečnost není zcela zaručená, a to bez zbytečného zdržování a omezování složitými administrativními procesy. Tito lidé mají v současné době příležitost přihlásit se jako dobrovolníci do různých fází klinických testů, pro mnohé pacienty však toto technicky nepřipadá v úvahu (například pacienti z Evropy těžko budou dojíždět do příslušných nemocnic v USA, kde testy probíhají). Nemluvě o tom, že potenciální možnosti léčby nejsou pouze ty, u kterých probíhají klinické testy, což bylo ostatně rozebíráno ve většině této podkapitoly. Samozřejmostí by se ve všech zemích měla stát možnost, aby lékaři se svolením pacienta měli právo předepsat jiné, než běžně využívané přípravky, pokud jsou přesvědčeni o možném přínosu tohoto jednání. Ke všem těmto návrhům by ovšem byla nutná dobře propracovaná legislativa, která by maximálně omezila možnosti zneužití postupu.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

- Buněčná linie A 172 (88062428, HPA Culture Collections)

Toxicita byla testována na buňkách odvozených od lidského glioblastomu získaného od 53letého pacienta mužského pohlaví. Jedná se o adherentní linii.

### 4.2 Médium a použité chemikálie

#### Médium

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose; with 4500 mg/L glucose, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, cell culture tested (D6546-6X500ML Sigma-Aldrich)
- Fetal Bovine Serum (FBS); heat inactivated, sterile-filtered, cell culture tested (F9665-500ML Sigma-Aldrich)
- L-glutamin (G63921-VL Sigma-Aldrich)
- Penicilin streptomycin (100x) P11-010 PAA5%

#### Chemikálie

##### Toxikanty

- Triton-X 100 (37240, Serva)
- Zásobní roztok bortezomibu (Millenium Pharmaceuticals)  $c = 3,5 \text{ mM}$ , v dimethylsulfoxidu (DMSO)

- Zásobní roztok  $\text{CuCl}_2$   $c = 800 \text{ mM}$  (307483-100G Sigma-Aldrich), v  $\text{H}_2\text{O}$
- Zásobní roztok diethyldithiokarbamátu sodného trihydrátu (Et)  $c = 200 \text{ mM}$  (22,868-0 Sigma-Aldrich) v  $\text{H}_2\text{O}$
- Zásobní roztok komplexu  $\text{Cu(II)}$ diethyldithiokarbamátu ( $\text{Cu(EtDTC)}_2$ )  $c = 20 \text{ mM}$ , v DMSO (V tomto případě byl roztok z důvodu nízké stability připravován před každým experimentem zvlášť.)

### MTT

- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnetrazolium bromid) roztok (M5655 Sigma-Aldrich), 3 mg MTT v 1 ml PBS (Phosphate Buffered Saline)
- 1%  $\text{NH}_3$  (10001-25A Lach:Ner)
- DMSO (10001-25A Lach:Ner)

### Ostatní

- Deionizovaná voda
- Dezinfekce: Izorapid, Oro-clean chemie
- DMSO (D8418 Sigma-Aldrich)
- PBS 10x (pH 7,4):  $\text{NaCl} - 40\text{g}$ ,  $\text{KCl} - 1\text{g}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O} - 16,05\text{g}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1\text{g}$
- Trypanová modř (T146-256 Sigma-Aldrich)
- Trypsin-EDTA solution 0.25%; 2.5 g porcine trypsin, 0.2 g EDTA, 4Na/l Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red; sterile-filtered, cell culture tested, (T4049-500ML Sigma-Aldrich)
- Zmrazovací médium FBS / DMSO (9:1)

## 4.3 Přístroje

- Centrifuga 5810R, Eppendorf
- Inkubátor Contherm, Nový Zéland
- Laminární box SafeFASTTop, faster, Itálie
- Mikroskop T2 103411 Olympus, Česká republika
- Pipeta multi-kanálová (30-300  $\mu\text{mol}$ ), biohit Proline plus
- Pipetovací nástavec SWIFTPET+ (Pipeta flowbox), PZ HTL S.A.
- Příklad na výrobu deionizované vody, Aqua osmotic, Česká republika
- Sada pipet (0,1-2,5  $\mu\text{mol}$ , 0,5-10  $\mu\text{mol}$ , 2-20  $\mu\text{mol}$ , 10-100  $\mu\text{mol}$ , 50-200  $\mu\text{mol}$ , 100-1000  $\mu\text{mol}$ ), Eppendorf
- Spektrofotometr Tecan, Švýcarsko

## 4.4 Stručný postup

Buňky v kultivační lahvi bylo nutné před použitím propláchnout PBS a krátkodobě vystavit působení trypsinu, aby došlo k jejich uvolnění ze dna lahve (trypsinizace). Viabilita buněk v suspenzi se hodnotila barvením trypanovou modří, která neproniká do živých buněk. Poté se propočítal objem suspenze, jež obsahuje požadované množství buněk (cca 25 000 na 1 jamku). Následovalo vyšetření buněk, kdy se suspenze naředila čistým médiem, pomocí multikanálové pipety nanasla na 96jamkovou mikrotitrační destičku a byla ponechána přes noc v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.

Před vlastními pokusy byly přichystány zásobní roztoky látek (vyjma bortezomibu). Spočítané navážky látek se rozpustily v daném objemu rozpouštědla. Et a CuCl<sub>2</sub> se dobře rozpouští ve vodě, vzniklý roztok byl zvortexován a pro zamezení případné kontaminace bakteriemi přefiltrován přes membránový filtr s póry o velikosti 0.2  $\mu\text{m}$ . Takto připravené roztoky bylo možné zmrazit a uchovávat. Na rozpuštění Cu(EtDTC)<sub>2</sub> bylo nutno použít DMSO a připravoval

se před každým experimentem zvlášť. Roztoky toxikantů o požadovaných koncentracích (pro  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ : 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM; pro Et: 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM; pro  $\text{CuCl}_2$ : 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM; pro bortezomib 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM) se získávaly postupným ředěním. Tyto koncentrace byly zvoleny na základě předchozích experimentů a doporučení Mrg. Jindřicha Sedláčka. Roztok byl poté napipetován do takového množství média, aby došlo k dalšímu naředění 1 : 1000 (roztok : médium). Výsledné koncentrace toxikantu jsou tedy mikromolární. Takto obohacená média byla nanášena na mikrotitrační destičku připravenou z předchozího dne, médium s danou koncentrací toxikantu bylo pokaždé nanášeno do 3 jamek. Vliv vody a DMSO na buňky byl prověřován kultivací buněk v médiu s přidanými rozpouštědly (1 ml média / 1  $\mu\text{l}$  DMSO, 1 ml média / 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ). Roztok Tritonu-X (630  $\mu\text{l}$  média / 70  $\mu\text{l}$  Triton-X) byl použit jako pozitivní kontrola. Příprava buněk na fotografování probíhala podobným způsobem, pouze s tím rozdílem, že buňky byly vysázeny ve větším množství na 6jamkovou mikrotitrační destičku.

Po 24hodinové inkubaci byly jamky propláchnuty PBS a na buňky se nanášelo médium smíchané s roztokem žluté tetrazoliové soli, MTT. Mikrotitrační destička byla ponechána cca 1 hodinu v inkubátoru a výsledek byl poté vizualizován pomocí MTT rozpouštěcího roztoku (DMSO / 1%  $\text{NH}_3$ ). Intenzita zbarvení byla vyhodnocena pomocí spektrofotometru (570 nm).

Získané hodnoty absorbancí v jamkách s jednotlivými koncentracemi toxikantů se zprůměrovaly a vztáhly k průměrné hodnotě absorbance změřené v jamkách s negativní kontrolou. Bylo nutné vzít v potaz i vliv pozadí (odečíst průměrnou hodnotu absorbance v jamkách s Tritonem-X). Po vynásobení 100 lze získat hodnotu viability v %.

Mezi vlastními experimenty bylo nutné udržovat vhodné podmínky pro růst buněk pravidelnými výměnami média a pasážováním. V případě potřeby bylo možné buňky také zamrazit. Suspenze byla centrifugována 3 minuty při 1500 rpm a po odsátí přebytečného média bylo přidáno zmrazovací médium. Buňky byly urychleně přeneseny do kryozkumavek a uchovávány v mrazáku při  $-80^\circ\text{C}$ . Rozmražování buněk se uskutečňovalo postupným proplachováním 1 ml média.

# 5 Výsledky

## 5.1 MTT

Princip metody MTT spočívá v tom, že je barvivo v živých buňkách metabolizováno mitochondriálními enzymy a jejich činností se přemění na fialový produkt – formazán. [153] Čím vyšší je tedy počet životaschopných buněk, tím je zbarvení intenzivnější. Hodnotu viability získáme porovnáním absorbance v jamkách s daným toxikantem o stanovené koncentraci s absorbancí negativní kontroly (čisté médium). Výhodami MTT jsou její jednoduchost a rychlost, nevýhodou metody je její menší přesnost.

Cílem experimentu bylo zjistit a porovnat toxicity jednotlivých látek. Výsledky byly získány ze 3 nezávislých experimentů. Experiment bylo nutné provést vícekrát kvůli nutosti měnit koncentrace Et a  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ , které byly zpočátku příliš vysoké a látky tedy vykazovaly příliš velkou toxicitu.

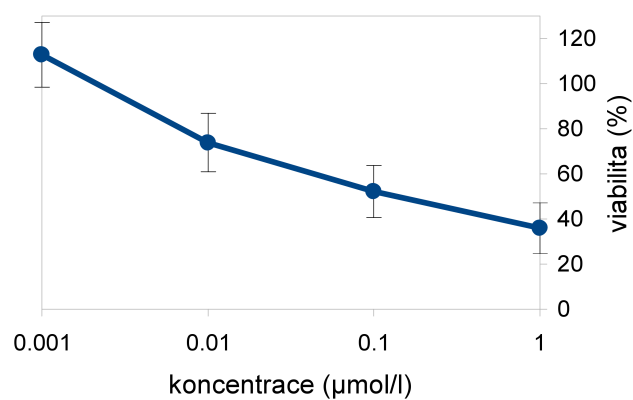
### Bortezomib

Tabulka 5.1: Viabilita buněk A 172 – Bortezomib

Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Viabilita (%)			Průměr
1	9,98	51,41	46,22	<b>35,87</b>
0,1	28,32	74,40	54,08	<b>52,26</b>
0,01	48,23	100,51	72,97	<b>73,90</b>
0,001	82,10	139,08	117,52	<b>112,90</b>



Obrázek 5.1: Graf č. 1 – Viabilita (%) – Bortezomib

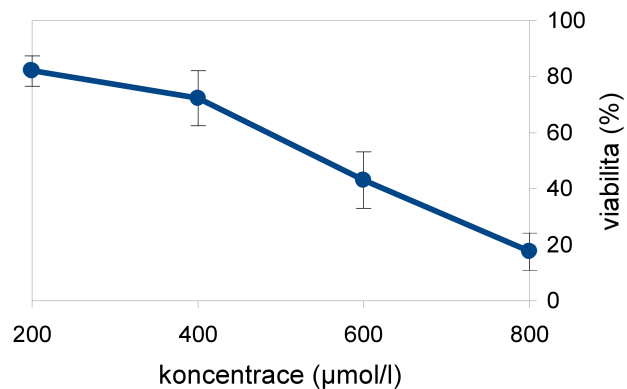


## CuCl<sub>2</sub>

Tabulka 5.2: Viabilita buněk A 172 – CuCl<sub>2</sub>

Koncentrace (μM)	Viabilita (%)			<b>Průměr</b>
800	10,85	9,02	32,67	<b>17,51</b>
600	33,07	29,75	66,12	<b>42,98</b>
400	49,74	82,17	84,85	<b>72,25</b>
200	74,46	89,69		<b>82,07</b>

Obrázek 5.2: Graf č. 2 – Viabilita (%) – CuCl<sub>2</sub>

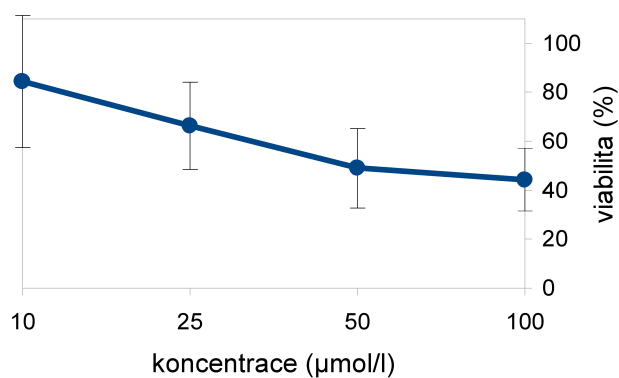


## Diethyldithiokarbamat sodný

Tabulka 5.3: Viabilita buněk A 172 – Et

Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Viabilita (%)			<b>Průměr</b>
100	64,43	53,24	15,38	<b>44,35</b>
50	67,11	68,39	11,61	<b>49,04</b>
25	82,86	90,99	25,31	<b>66,39</b>
10	129,09	99,47	24,52	<b>84,36</b>

Obrázek 5.3: Graf č. 3 – Viabilita (%) – Et

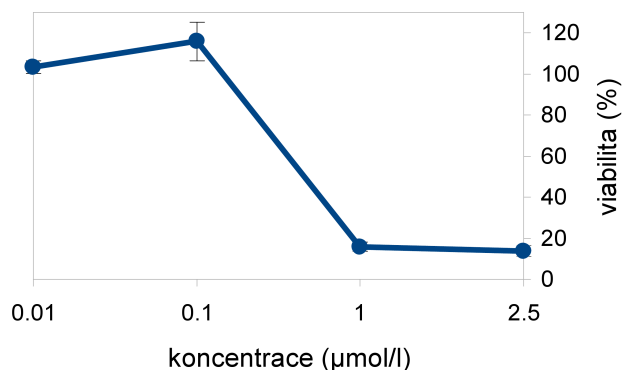


## Cu(II)diethyldithiokarbamat

Tabulka 5.4: Viabilita buněk A 172 – Cu(EtDTC)<sub>2</sub>

Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Viabilita (%)			<b>Průměr</b>
2,5	15,33	7,83	18,31	<b>13,82</b>
1	15,40	11,55	20,73	<b>15,90</b>
0,1	134,69	116,21	96,63	<b>115,84</b>
0,01	103,28	96,99	109,75	<b>103,34</b>

Obrázek 5.4: Graf č. 4 – Viabilita (%) – Cu(EtDTC)<sub>2</sub>



Na první pohled se může zdát, že se výsledky získané pro Cu(EtDTC)<sub>2</sub> od ostatních liší – zatímco u všech třech dalších látek můžeme pozorovat postupný pokles viability v závislosti na koncentraci toxikantu, u Cu(EtDTC)<sub>2</sub> dochází k prudkému poklesu viability v rozmezí koncentrací mezi 0.1 µM a 1 µM. Tento rozdíl je však nemožné nějak jasně interpretovat za základě získaných dat. Je však možné, že vypovídá o jiném mechanismu účinku.

Také skutečnost, že v jamce s nejnižší koncentrací Cu(EtDTC)<sub>2</sub> (0.01 µM) je viabilita buněk nižší, než v následující jamce (kde je koncentrace Cu(EtDTC)<sub>2</sub> 0.1 µM), se může zdát neobvyklá. Tato odchylka však může být dána nepřesností metody.

## 5.2 IC<sub>50</sub>

Ze závislosti „dose-response“ byly pomocí lineární regrese v programu ED50 plus v1.0 stanoveny hodnoty IC<sub>50</sub> (tedy taková koncentrace látky, při které dochází k odumřené 50 % buněk).

Tabulka 5.5: Hodnoty IC<sub>50</sub>

IC <sub>50</sub> (µM)	1	2	3	Průměr	SD
Bortezomib	0,65	0,62	0,30	<b>0,52</b>	0,19
CuCl <sub>2</sub>	553,08	546,29	744,03	<b>614,46</b>	112,26
Et	82,79	100,80	101,26	<b>94,95</b>	10,54
Cu(EtDTC) <sub>2</sub>	0,90	0,90	1,08	<b>0,96</b>	0,10

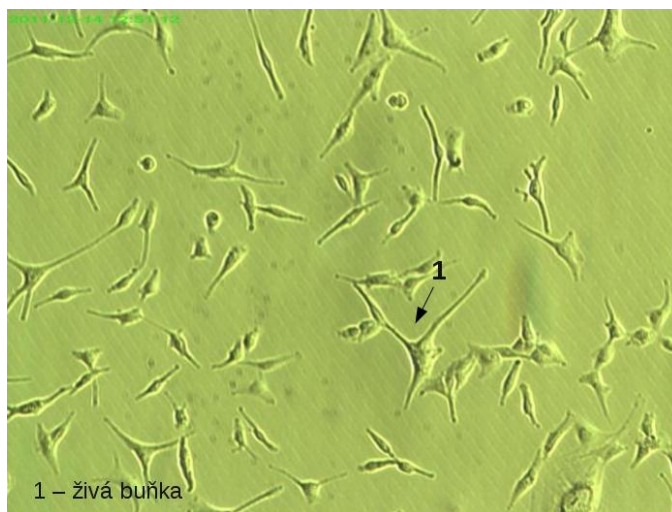
Hodnota  $IC_{50}$  je u  $Cu(EtDTC)_2$  výrazně nižší než je tomu u Et a  $CuCl_2$ . Náš předpoklad, že komplex vykazuje vyšší toxicitu než ligand a kov samostatně, se tedy potvrdil.

### 5.3 Fotografická dokumentace

Buňky byly inkubovány v médiu s toxikantem o takové koncentraci, která odpovídá spočítané  $IC_{50}$ . Morfologie těchto buněk byla vizuálně srovnávána s buňkami kultivovanými v čistém médiu. [154]

#### Buňky kultivované v čistém médiu

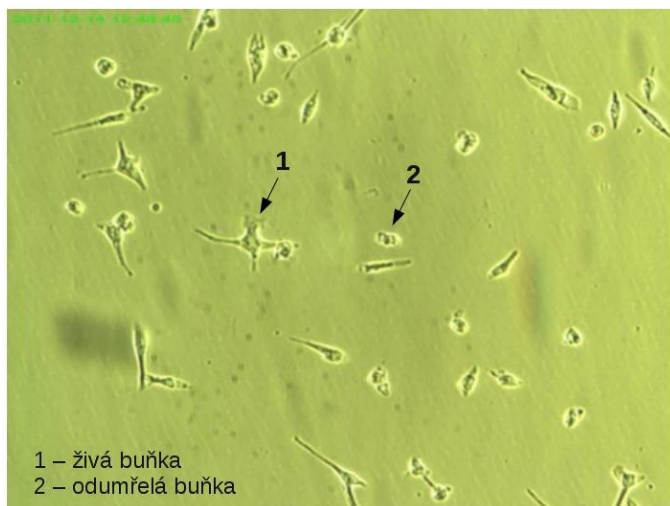
Obrázek 5.5: Fotografie č. 1 – buňky kultivované v čistém médiu



Na fotografii pořízené z jamky s čistým médiem je možné pozorovat poměrně velký počet buněk, které jsou ve většině případů živé.

## Buňky kultivované v bortezomibu

Obrázek 5.6: Fotografie č. 2 – buňky kultivované v bortezomibu



## Buňky kultivované v $\text{CuCl}_2$

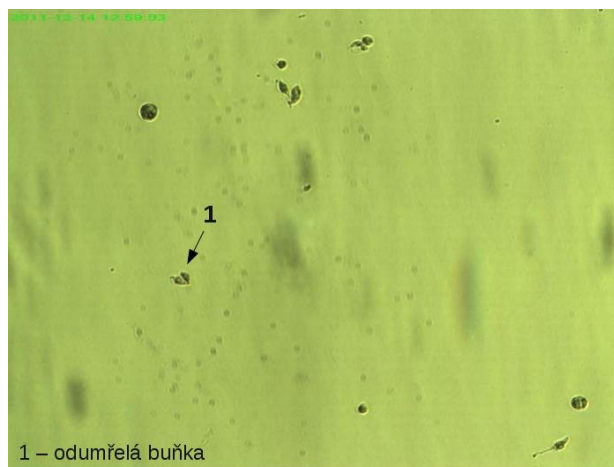
Obrázek 5.7: Fotografie č. 3 – buňky kultivované v  $\text{CuCl}_2$



Na fotografiích buněk inkubovaných s  $\text{CuCl}_2$  a bortezomibem lze pozorovat jak živé, tak mrtvé buňky, a to přibližně v rovnoměrném zastoupení. Takovýto výsledek byl očekáván. V dalších dvou případech je však situace jiná.

## Buňky kultivované v Cu(II)diethyldithiokarbamátu

Obrázek 5.8: Fotografie č. 4 – buňky kultivované v Cu(EtDTC)<sub>2</sub>



Buňky inkubované Cu(EtDTC)<sub>2</sub> byly téměř všechny odumřelé (jejich nízký počet na fotografii je způsoben uvolněním odumřelých buněk z podložky a jejich následným odstraněním spolu s médiem při přípravě na fotografování). Tuto skutečnost můžeme vysvětlit poměrně jednoduše – vzhledem k výše popsanému průběhu pokusu (prudký pokles viability) je zřejmé, že spočítaná hodnota IC<sub>50</sub> pravděpodobně nebude přesná.

## Buňky kultivované v Diethyldithiokarbamátu sodném

Obrázek 5.9: Fotografie č. 5 – buňky kultivované v Et



Obdobného výsledku jako u komplexu bylo dosaženo i u Et. V průběhu experimentální části bylo možné pozorovat poměrně zajímavý trend, a to postupné klesání viability buněk vystavených působení Et s přibývajícím počtem pasáží (dobou kultivace). Zatímco čerstvě rozmražené buňky vykazovaly poměrně vysokou viabilitu, u buněk déle používaných k pokusům viabilita klesala. Na fotografie byly použity starší buňky (pátá pasáž). Možné příčiny tohoto jevu budou blíže rozebrány v diskuzi.

## 6 Diskuze

Původní předpoklad, tedy že toxicita komplexu bude vyšší, než toxicita kovu a ligandu zvlášť, že potvrdil. Získaná hodnota  $IC_{50}$  pro  $Cu(EtDTC)_2$  byla  $0.96 \mu M$ , tedy výrazně menší než u  $CuCl_2$  ( $614,46 \mu M$ ) a Et ( $94,95 \mu M$ ). Téměř odpovídá hodnotě změřené u inhibitoru proteazomu schváleného v klinické praxi, bortezomibu ( $0.52 \mu M$ ). Vzhledem k tomu, že buňky kultivované s koncentrací  $Cu(EtDTC)_2$  odpovídající  $IC_{50}$  odumírají prakticky ve 100 % případů, dá se předpokládat, že reálná hodnota  $IC_{50}$  bude nižší, a že je tedy komplex ve skutečnosti ještě toxicitější.  $IC_{50}$  nebyla určena přesně zřejmě kvůli prudkému poklesu viability mezi jednotlivými koncentracemi toxikantu. Pro přesné určení hodnoty  $IC_{50}$  by bylo třeba provést další série experimentů a zvolit užší rozmezí koncentrací komplexu.

Výsledky experimentu napovídají, že protirakovinná aktivita samotného dietyldithiokarbamátu, hlavního metabolitu antabusu, je asi 100krát menší než aktivita komplexu. V teoretické části ovšem bylo odkázáno na několik publikací, které určitou protirakovinnou aktivitu ligandu dokládají. Všeobecně nelze říct, do jaké míry námi získané výsledky reflektují skutečnou aktivitu disulfiramu *in vivo*. Je možné, že ta by mohla být vyšší (vzhledem také k některým předpokládaným mechanismům účinku antabusu, jako je blokování angiogeneze [15] [129] [132], které našimi experimenty nebylo možné ověřit). Je však nutné připomenout, že léčivo zřejmě tvoří v těle komplexy s endogenní mědí a je tedy nemožné účinky těchto látek od sebe oddělit a přesně rozlišit, do jaké míry je za možnou protirakovinnou aktivitu u lidí (kterou lze předpokládat na základě dobrých výsledků klinických testů Ditiocarbu jako pomocné látky při léčbě rakoviny prsu [126] nebo case reportu popisujícím spontánní vymizení metastáz u pacientky užívající disulfiram [113]) zodpovědný účinek samotného Et a nakolik je dána vzniklým komplexem. Námi získané výsledky však naznačují, že hlavní účinnou látkou je komplex. Na druhou stranu ale nelze opomíjet schopnost antabusu blokovat ABC transportéry [133] a tedy jeho možný potenciál v překonávání mnohočetné lékové rezistence. Obrovskou výhodou léčby kombinací antabusu a mědi by mohlo být to, že komplex i nekomplexovaný ligand by v těle



pacienta mohly pracovat paralelně, působit na rakovinné buňky na několika úrovních a zároveň i bránit některým mechanismům rezistence. [108]

Zajímavým zjištěním bylo to, že v průběhu experimentu se zvyšovala toxicita samotného ligandu v závislosti na počtu pasáží a době, po jakou byly buňky používány. Tento jev můžeme vysvětlit několika způsoby. U buněk A 172 bylo možné také pozorovat postupné zpomalování růstu. Zatímco u mladších buněk trvalo 3 dny, než se namnožily natolik, aby mohly být použity k pokusům, u starších buněk se tato doba prodlužovala až na 7 dní. Dle publikace [155] může prodloužená doba kultivace před provedením MTT značně ovlivnit výsledky testů, konkrétně vede ke snížení změřené hodnoty absorbance. Tento jev je však v publikaci vysvětlován kontaktní inhibicí a vyčerpáním živin v médiu. Ani jedno z těchto vysvětlení se nedá aplikovat na náš případ, protože kvůli pomalému růstu buněk se kontaktní inhibice dá vyloučit a nebyly pozorovány ani barevné změny média, které by signalizovaly jeho vyčerpání. Navíc snížení absorbance nemusí nutně vést k nižším vypočítaným hodnotám viability (absorbance klesá všeobecně, tedy i v jamkách s negativní kontrolou a spočítané % živých buněk by se tedy nemělo nijak výrazně lišit). V neposlední řadě nemůžeme tímto způsobem vysvětlit ani selektivní pokles viability v Et, zatímco u ostatních toxikantů zůstávaly hodnoty viability poměrně konstantní. I když tedy úvahu, že by výsledky mohly být ovlivněny délkou kultivace, nemůžeme rozhodně zavrhnout, je nutné hledat i jiná vysvětlení.

Jak již bylo výše zmíněno, předpokládme, že účinek samotného ligandu na rakovinnou buňku není příliš velký, a že mechanismus jeho působení zřejmě spočívá hlavně ve vytváření komplexů s endogenními kovy přirozeně obsaženými v buňce. Nabízí se tedy vysvětlení, že v průběhu kultivace docházelo v buňkách k akumulaci Cu a postupně tedy při vlastních experimentech rostla i hladina vzniklého toxického komplexu. Tato akumulace mohla být způsobena fenotypovými změnami buněk v průběhu kultivace – jako nejlogičtější možnost se jeví zvýšení počtu nebo aktivity transportérů mědi. Příjem a pohyb mědi v buňkách je stále zatím poměrně málo probádanou oblastí. [156] Centrální roli v importu tohoto kovu do buněk hraje přenašeč Ctr1. [157] Akumulace mědi byla v buněčných kulturách odvozených od gliomu dříve zaznamenána [158] a byla pozorována také v jiných typech buněčných linií (například jaterních) [159], nemluvě o akumulaci *in vivo*, zmiňované již v teoretické části. [124] Na fotografie byly použity starší buňky (pátá pasáž). V těchto buňkách již tedy koncentrace kovů mohla být podstatně

vyšší než v době, kdy byly použity pro předchozí experiment. Z toho by samozřejmě vyplývala i proměnlivost odpovídající hodnoty  $IC_{50}$ , která v této fázi pokusu mohla být značně posunuta do nižších hodnot.

Jedná se pochopitelně o pouhou hypotézu. Potvrzení platnosti tohoto tvrzení by vyžadovalo experimentálně prokázat – ať už dalšími měřeními toxicity Et, zaměřenými přímo na tento jev, analytickým měřením obsahu mědi v buňkách nebo například studiem exprese a aktivity zmíněných transportérů.

## 7 Závěr

Cílem praktické části této práce bylo srovnat toxicitu komplexu  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  s účinky jeho jednotlivých součástí – diethyldithiokarbamátu sodného, který zastupuje ligand a  $\text{CuCl}_2$ , jenž reprezentuje účinky kovu – a také s vlivem inhibitoru proteazomu schváleného v klinické praxi, bortezomibu, na buněčnou linii odvozenou od lidského glioblastomu.

Z výsledků spočítané hodnoty  $\text{IC}_{50}$  skutečně naznačují, že toxicita komplexu je mnohem vyšší, než toxicita kovu a ligandu jednotlivě. Řádově je podobná toxicitě bortezomibu. U buněk inkubovaných v médiu s koncentrací  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  odpovídající hodnotě  $\text{IC}_{50}$  docházelo k apoptóze buněk ve větší míře, než bylo očekáváno. Vzhledem k charakteru průběhu pokusu, kdy došlo k náhlému poklesu viability buněk, lze očekávat určitou nepřesnost získané hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Skutečná hodnota  $\text{IC}_{50}$ , pro jejíž získání by bylo nutné provést další sérii experimentů s užším zvoleným rozmezím koncentrací, bude nižší. To ovšem znamená, že jsou protirakovinné vlastnosti komplexu ještě silnější a zvažujeme-li tedy budoucí možnosti uplatnění antabusu v léčbě rakoviny, jedná se o příznivou skutečnost.

Pozoruhodné je také postupné zvyšování toxického účinku diethyldithiokarbamátu sodného (ligandu) na buňky. Navrhovaným vysvětlením jsou fenotypové změny buněk v průběhu kultivace, které vedou ke zvýšenému příjmu mědi a tedy větší tvorbě toxického komplexu. Příčinou by ale mohl být i zpomalený růst buněk déle používaných k pokusům a jejich upadání do klidového stavu.

Dosavadní poznatky v této oblasti i provedené experimenty naznačují, že by disulfiram v kombinaci s mědí skutečně mohl mít potenciál v léčbě rakoviny. Kromě přesného určení rozsahu toxických účinků komplexu na rakovinné buňky by do budoucna bylo zajímavé dále prověřit jeho schopnost procházet hematoencefalickou bariérou. Pokud se tato jeho schopnost prokáže, můžeme předpokládat, že by disulfiram mohl přinést pokrok i v léčbě gliomů.

Antabus má také oproti novým látkám obrovskou výhodu – díky mnohaletým zkušenostem s jeho užíváním v klinické praxi zde není důvod k obavám z nepředpokládaných vedlejších

účinků, přestože zatím nebyly provedeny veškeré potřebné testy jeho protirakovinného působení. Pro pacienty, u kterých běžné metody léčby selhaly, a kteří hledají pomoc jinde, by antabus mohl už v současné době být slibnou volbou. Do budoucna by ovšem bylo žádoucí získávat další poznatky o tomto jistě potenciálním léku a provést další experimenty a hlavně klinické testy. Možností jak získat prostředky na klinické testy v současné době nepatentovatelných látek je několik – ať již legislativní úpravy, které by farmaceutickým firmám umožnily repatentovat tyto léky nebo získávání peněz jiným způsobem, například od dobrovolných dárců. Pokud by se dařilo nashromáždit dostatek prostředků druhým popsáním způsobem, mohli bychom do budoucna doufat ve schválení léčiv, které by byly levnější a tím pádem dostupnější třeba i pro pacienty z rozvojových zemí.

## 8 Seznam použitých zkratek

ABC transportéry – ATP binding cassette transportéry

AK – Aminokyselina

ATP – Adenosintrifosfát

BCL-2 – B-cell lymphoma 2 (proteiny regulující apoptózu)

CNS – Centrální nervová soustava

COX-2 – Cyklooxygenáza 2

Cu(EtDTC)<sub>2</sub> – Cu(II)diethyldithiokarbamát

DMSO – Dimethylsulfoxid

DUB – Deubikvitináza

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová

EMA – European Medicines Agency

ER – Endoplazmatické rétikulum

ERAD – Endoplasmic reticulum associated degradation

Et – Diethyldithiokarbamát sodný

FBS – Fetal bovine serum

FDA – Food and Drug

IC<sub>50</sub> – Half maximal inhibitory concentration

IKK – Inhibitor of kappa B kinase

iOWH – Institute of OneWorld Health

JAMM – JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme

kDa – Kilodalton

MDR1 – Multidrug resistance protein 1

MRP1 – Multidrug resistance-associated protein 1

MHC – Major histocompatibility complex

MMP – Matrix metaloproteináza

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid  
NF $\kappa$ B – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NK buňky – Natural killer buňky imunitního systému  
NÚ – Nežádoucí účinky  
PBS – Phosphate buffered saline  
PI – Inhibitor proteazomu  
Poh1 – Pad one homolog 1  
rpm – Rotation per minute (otáčky za minutu)  
SEGA – Subependymal giant cell astrocytoma  
SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv  
TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand  
UPS – Ubikvitin-proteazomový systém  
WHO – World Health Organization

# Literatura

- [1] L. M. DeAngelis. Brain tumors. *N. Engl. J. Med.*, 344:114–123, 2001.
- [2] F. S. Collins. Mining for therapeutic gold. *Nat Rev Drug Discov*, 10:397, 2011.
- [3] H. Grabowski. Are the economics of pharmaceutical research and development changing? productivity, patents and political pressures. *Pharmacoeconomics*, 22:15–24, 2004.
- [4] M. S. Boguski, K. D. Mandl, and V. P. Sukhatme. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science*, 324:1394–1395, 2009.
- [5] B. Cvek. Nonprofit drugs as the salvation of the world’s healthcare systems: the case of antabuse (disulfiram). *Drug Discovery Today*, page doi:10.1016/j.drudis.2011.12.010, 2011.
- [6] B. Cvek and Z. Dvorak. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Curr. Pharm. Des.*, 17:1483–1499, 2011.
- [7] A. Hacıhanefioglu, P. Tarkun, and E. Gonullu. Acute severe cardiac failure in a myeloma patient due to proteasome inhibitor bortezomib. *Int. J. Hematol.*, 88:219–222, 2008.
- [8] A. Gupta, A. Pandey, and S. Sethi. Bortezomib-induced congestive cardiac failure in a patient with multiple myeloma. *Cardiovasc. Toxicol.*, pages 1–4, 2011.
- [9] D. J. McConkey and K. Zhu. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist. Updat.*, 11:164–179, 2008.
- [10] S. Arastu-Kapur, J. L. Anderl, M. Kraus, F. Parlati, K. D. Shenk, S. J. Lee, T. Muchamuel, M. K. Bennett, C. Driessen, A. J. Ball, and C. J. Kirk. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin. Cancer Res.*, 17:2734–2743, 2011.

- [11] R. C. Vallari and R. Pietruszko. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science*, 216:637, 1982.
- [12] M. Gaval-Cruz and D. Weinshenker. Mechanisms of disulfiram-induced cocaine abstinence: antabuse and cocaine relapse. *Mol. Interv.*, 9:175, 2009.
- [13] J. Mutschler, M. Buhler, M. Grosshans, A. Diehl, K. Mann, and F. Kiefer. Disulfiram, an option for the treatment of pathological gambling? *Alcohol Alcohol.*, 45:214–216, 2010.
- [14] R. C. Todd and S. J. Lippard. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 1:280–291, 2009.
- [15] S. G. Shian, Y. R. Kao, F. Y. H. Wu, and C. W. Wu. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol. Pharm.*, 64:1076, 2003.
- [16] R. Schreck, B. Meier, D. N. Männel, W. Dröge, and P. A. Baeuerle. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor  $\kappa$  b activation in intact cells. *J. Exp. Med.*, (5):1181, 1992.
- [17] Y. Suzuki, S. Fujii, T. Tominaga, T. Yoshimoto, T. Yoshimura, and H. Kamada. The origin of an epr signal observed in dithiocarbamate-loaded tissues:: Copper (ii)-dithiocarbamate complexes account for the narrow hyperfine lines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1335:242–245, 1997.
- [18] J. T. Huse and E. C. Holland. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer*, 10:319–331, 2010.
- [19] J. A. Schwartzbaum, J. L. Fisher, K. D. Aldape, and M. Wrensch. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 2:494–503, 2006.
- [20] M. Wrensch, Y. Minn, T. Chew, M. Bondy, and M. S. Berger. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neurooncology*, 4:278, 2002.
- [21] M. Kundi. The controversy about a possible relationship between mobile phone use and cancer. *Environ. Health Perspect.*, 117:316–324, 2009.



- [22] W. F. Ganong. *Přehled lékařské fyziologie*. Avicenum Praha, 1976.
- [23] C. I. Svensson and E. Brodin. Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. *Mol. Interv.*, 10:25–38, 2010.
- [24] M. J. Hickey, C. C. Malone, K. L. Erickson, M. R. Jadus, R. M. Prins, L. M. Liau, and C. A. Kruse. Cellular and vaccine therapeutic approaches for gliomas. *J. Transl. Med.*, 8:100, 2010.
- [25] A. Behin, K. Hoang-Xuan, A. F. Carpentier, and J. Y. Delattre. Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 361:323–331, 2003.
- [26] T. Schweitzer, GH Vince, C. Herbold, K. Roosen, and J. C. Tonn. Extraneural metastases of primary brain tumors. *J. Neurooncol.*, 53:107–114, 2001.
- [27] C. L. Dolman. Lymph node metastasis as first manifestation of glioblastoma. Case report. *J. Neurosurg.*, 41:607–609, 1974.
- [28] H. J. Hoffman and P. K. Duffner. Extraneural metastases of central nervous system tumors. *Cancer*, 56:1778–1782, 1985.
- [29] C. Dai, J. C. Celestino, Y. Okada, D. N. Louis, G. N. Fuller, and E. C. Holland. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev.*, 15:1913–1925, 2001.
- [30] P. Ballabh, A. Braun, and M. Nedergaard. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.*, 16:1–13, 2004.
- [31] S. Trojan. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing a.s., 2003.
- [32] M. W. Bradbury. The blood-brain barrier. *Exp. Physiol.*, 78:453–472, 1993.
- [33] C. Krakstad and M. Chekenya. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol. Cancer*, 9:135, 2010.

- [34] K. Iwami, A. Natsume, and T. Wakabayashi. Gene therapy for high-grade glioma. *Neurol. Med. Chir.*, 50:727–736, 2010.
- [35] N. Mikuni and S. Miyamoto. Surgical treatment for glioma: extent of resection applying functional neurosurgery. *Neurol. Med. Chir.*, 50:720–726, 2010.
- [36] R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62:10–29, 2012.
- [37] J. C. Buckner. Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin. Oncol.*, 30:10–14, 2003.
- [38] A. L. Goldberg and J. F. Dice. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Ann. Rev. Biochem.*, 43:835–869, 1974.
- [39] A. Hershko. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle&ast. *Cell Death Differ.*, 12:1191–1197, 2005.
- [40] V. Todde, M. Veenhuis, and I. J. van der Klei. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1792:3–13, 2009.
- [41] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. Molecular biology of the cell. 2002. *Garland Science*, 2002.
- [42] L. Borissenko and M. Groll. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem. Rev.*, 107:687–717, 2007.
- [43] P. J. Elliott and J. S. Ross. The proteasome: a new target for novel drug therapies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 116:637–646, 2001.
- [44] C. S. Arendt and M. Hochstrasser. Identification of the yeast 20s proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:7156, 1997.
- [45] X. I. Ambroggio, D. C. Rees, and R. J. Deshaies. Jamm: A metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.*, 2(1):e2, 2003.

- [46] M. Gallery, J. L. Blank, Y. Lin, J. A. Gutierrez, J. C. Pulido, D. Rappoli, S. Badola, M. Rolfe, and K. J. MacBeth. The jamm motif of human deubiquitinase poh1 is essential for cell viability. *Mol. Cancer Ther.*, 6:262, 2007.
- [47] A. L. Goldberg. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.*, 35:12–17, 2007.
- [48] D. S. Leggett, J. Hanna, A. Borodovsky, B. Crosas, M. Schmidt, R. T. Baker, T. Walz, H. Ploegh, and D. Finley. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol. Cell*, 10:495–507, 2002.
- [49] S. Murata, Y. Takahama, and K. Tanaka. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Curr. Opin. Immunol.*, 20:192–196, 2008.
- [50] L. Klein, M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.*, 9:833–844, 2009.
- [51] A. Varshavsky. The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.*, 22:383–387, 1997.
- [52] T. Grune, T. Reinheckel, and K. J. Davies. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.*, 11:526–534, 1997.
- [53] L. Hicke. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:195–201, 2001.
- [54] F. Ikeda and I. Dikic. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep.*, 9:536–542, 2008.
- [55] A. Hershko and A. Ciechanover. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:425–479, 1998.
- [56] K. I. Nakayama and K. Nakayama. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6:369–381, 2006.
- [57] T. Hoppe. Multiubiquitylation by e4 enzymes: “one size” doesn’t fit all. *Trends Biochem. Sci.*, 30:183–187, 2005.

- [58] S. Hussain, Y. Zhang, and P. J. Galardy. DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle*, 8:1688–1697, 2009.
- [59] R. Z. Orłowski and D. J. Kuhn. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin. Cancer Res.*, 14:1649, 2008.
- [60] J. M. Baugh, E. G. Viktorova, and E. V. Pilipenko. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J. Mol. Biol.*, 386:814–827, 2009.
- [61] T. Grune, K. Merker, G. Sandig, and K. J. A. Davies. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305:709–718, 2003.
- [62] E. D. Werner, J. L. Brodsky, and A. A. McCracken. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:13797, 1996.
- [63] J. Michael Lord, J. Davey, L. Frigerio, and L. M. Roberts. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. In *Semin. Cell Dev. Biol.*, volume 11, pages 159–164. Elsevier, 2000.
- [64] D. Kaganovich, R. Kopito, and J. Frydman. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature*, 454:1088, 2008.
- [65] Q. P. Dou and R. H. Goldfarb. Bortezomib (millennium pharmaceuticals). *IDrugs*, 5:828–834, 2002.
- [66] D. Chen, M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar, and Q. P. Dou. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets*, 11:239–253, 2011.

- [67] J. J. Driscoll, A. Minter, D. A. Driscoll, and J. K. Burris. The ubiquitin+proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 11:242–246, 2011.
- [68] P. D’Arcy, S. Brnjic, M. H. Olofsson, M. Fryknas, K. Lindsten, M. De Cesare, P. Perego, B. Sadeghi, M. Hassan, R. Larsson, and S. Linder. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat. Med.*, 17:1636–1640, 2011.
- [69] Y. Sun. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.*, 2:623–629, 2003.
- [70] B. Vogelstein, S. Sur, and C. Prives. p53: The most frequently altered gene in human cancers. *Nat. Edu.*, 3:6, 2010.
- [71] D. R. Green and G. Kroemer. Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. *Nature*, 458:1127, 2009.
- [72] S. J. Strauss, K. Higginbottom, S. Jülicher, L. Maharaj, P. Allen, D. Schenkein, T. A. Lister, and S. P. Joel. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in b-cell lymphoma cell lines. *Cancer Res.*, 67:2783, 2007.
- [73] J. Yu, S. Tiwari, P. Steiner, and L. Zhang. Differential apoptotic response to the proteasome inhibitor bortezomib [velcade, ps-341] in bax-deficient and p21-deficient colon cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, 2:694, 2003.
- [74] T. T. Tan, K. Degenhardt, D. A. Nelson, B. Beaudoin, W. Nieves-Neira, P. Bouillet, A. Villunger, J. M. Adams, and E. White. Key roles of bim-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy. *Cancer Cell*, 7:227–238, 2005.
- [75] C. Didier, A. Merdes, J. E. Gairin, and N. Jabrane-Ferrat. Inhibition of proteasome activity impairs centrosome-dependent microtubule nucleation and organization. *Mol. Biol. Cell*, 19:1220, 2008.

- [76] A. Brüning, P. Burger, M. Vogel, M. Rahmeh, K. Friese, M. Lenhard, and A. Burges. Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis. *Invest. New Drugs*, 27:543–551, 2009.
- [77] K. G. Daniel, D. J. Kuhn, A. Kazi, and Q. P. Dou. Anti-angiogenic and anti-tumor properties of proteasome inhibitors. *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:529–541, 2005.
- [78] E. Ames, W. H. Hallett, and W. J. Murphy. Sensitization of human breast cancer cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity by proteasome inhibition. *Clin. Exp. Immunol.*, 155:504–513, 2009.
- [79] J. Codony-Servat, M. A. Tapia, M. Bosch, C. Oliva, J. Domingo-Domenech, B. Mellado, M. Rolfe, J. S. Ross, P. Gascon, A. Rovira, and J. Albanell. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 5:665–675, 2006.
- [80] P. L. Bergsagel, W. M. Kuehl, F. Zhan, J. Sawyer, B. Barlogie, and J. Shaughnessy. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*, 106:296–303, 2005.
- [81] M. J. Williamson, M. D. Silva, J. Terkelsen, R. Robertson, L. Yu, C. Xia, P. Hatsis, B. Bannerman, T. Babcock, Y. Cao, et al. The relationship among tumor architecture, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of bortezomib in mouse xenograft models. *Mol. Cancer Ther.*, 8(12):3234, 2009.
- [82] E. L. Davenport, H. E. Moore, A. S. Dunlop, S. Y. Sharp, P. Workman, G. J. Morgan, and F. E. Davies. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood*, 110:2641, 2007.
- [83] W. X. Ding, H. M. Ni, W. Gao, Y. F. Hou, M. A. Melan, X. Chen, D. B. Stolz, Z. M. Shao, and X. M. Yin. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J. Biol. Chem.*, 282:4702, 2007.
- [84] J. F. San Miguel, R. Schlag, N. K. Khuageva, M. A. Dimopoulos, O. Shpilberg, M. Kroppf, I. Spicka, M. T. Petrucci, A. Palumbo, O. S. Samoiloova, et al. Bortezomib plus

- melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.*, 359:906–917, 2008.
- [85] J. Picot, K. Cooper, J. Bryant, and A. J. Clegg. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bortezomib and thalidomide in combination regimens with an alkylating agent and a corticosteroid for the first-line treatment of multiple myeloma: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess*, 15:1–204, Dec 2011.
- [86] A. A. Argyriou, G. Iconomou, and H. P. Kalofonos. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood*, 112:1593, 2008.
- [87] A. H. Partridge, H. J. Burstein, and E. P. Winer. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monograph*, 2001:135, 2001.
- [88] A. M. Griffin, P. N. Butow, A. S. Coates, A. M. Childs, P. M. Ellis, S. M. Dunn, and M. H. N. Tattersall. On the receiving end v: patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy in 1993. *Ann. Oncol.*, 7:189, 1996.
- [89] K. C. Calman. Quality of life in cancer patients—an hypothesis. *J. Med. Ethics*, 10:124–127, 1984.
- [90] R. Oerlemans, N. E. Franke, Y. G. Assaraf, J. Cloos, I. van Zantwijk, C. R. Berkers, G. L. Scheffer, K. Debipersad, K. Vojtekova, C. Lemos, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit  $\beta 5$  (psmb5) gene mutation and overexpression of psmb5 protein. *Blood*, 112:2489–2499, 2008.
- [91] S. Lü, J. Yang, X. Song, S. Gong, H. Zhou, L. Guo, N. Song, X. Bao, P. Chen, and J. Wang. Point mutation of the proteasome  $\beta 5$  subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of jurkat t cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326:423–431, 2008.
- [92] E. L. Davenport, G. J. Morgan, F. E. Davies, et al. Untangling the unfolded protein response. *Cell Cycle*, 7:865, 2008.

- [93] B. Levine, J. Yuan, et al. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.*, 115:2679, 2005.
- [94] W. Zou, P. Yue, N. Lin, M. He, Z. Zhou, S. Lonial, F. R. Khuri, B. Wang, and S. Y. Sun. Vitamin C inactivates the proteasome inhibitor PS-341 in human cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 12:273–280, 2006.
- [95] L. Zhang, J. E. Littlejohn, Y. Cui, X. Cao, C. Peddaboina, and W. R. Smythe. Characterization of bortezomib-adapted I-45 mesothelioma cells. *Mol. Cancer*, 9:110, 2010.
- [96] A. Kumar, Y. Takada, A. M. Boriek, and B. B. Aggarwal. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J. Mol. Med.*, 82:434–448, 2004.
- [97] M. S. Hayden and S. Ghosh. Shared principles in nf- $\kappa$ b signaling. *Cell*, 132:344–362, 2008.
- [98] M. Karin et al. Nuclear factor- $\kappa$ b in cancer development and progression. *Nature*, 441:431–436, 2006.
- [99] C. Nakanishi and M. Toi. Nuclear factor- $\kappa$ b inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer*, 5:297–309, 2005.
- [100] S. Ghosh and M. Karin. Missing pieces in the nf- $\kappa$ b puzzle. *Cell*, 109:81–96, 2002.
- [101] X. Dolcet, D. Llobet, M. Encinas, J. Pallares, A. Cabero, J. A. Schoenenberger, J. X. Comella, and X. Matias-Guiu. Proteasome inhibitors induce death but activate nf- $\kappa$  on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J. Biol. Chem.*, 281:22118, 2006.
- [102] T. Hideshima, H. Ikeda, D. Chauhan, Y. Okawa, N. Raje, K. Podar, C. Mitsiades, N. C. Munshi, P. G. Richardson, R. D. Carrasco, et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor- $\kappa$  activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 114:1046, 2009.
- [103] X. Gong, P. H. Schwartz, M. E. Linskey, and D. A. Bota. Neural stem/progenitors and glioma stem-like cells have differential sensitivity to chemotherapy. *Neurology*, 76:1126, 2011.



- [104] A. A. Davis and S. Temple. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature*, 372:263–266, 1994.
- [105] E. P. Jane, D. R. Premkumar, and I. F. Pollack. Bortezomib sensitizes malignant human glioma cells to trail, mediated by inhibition of the nf- $\kappa$  signaling pathway. *Mol. Cancer Ther.*, 10:198, 2011.
- [106] S. Ohshima-Hosoyama, M. A. Davare, T. Hosoyama, L. D. Nelon, and C. Keller. Bortezomib stabilizes NOXA and triggers ROS-associated apoptosis in medulloblastoma. *J Neurooncol*, 2011.
- [107] S. Phuphanich, J. G. Supko, K. A. Carson, S. A. Grossman, L. Burt Nabors, T. Mikkelsen, G. Lesser, S. Rosenfeld, S. Desideri, and J. J. Olson. Phase 1 clinical trial of bortezomib in adults with recurrent malignant glioma. *J. Neurooncol.*, 100:95–103, 2010.
- [108] B. Cvek. Targeting malignancies with disulfiram (antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr. Cancer Drug Targets*, 11:332–337, 2011.
- [109] J. J. Suh, H. M. Pettinati, K. M. Kampman, and C. P. O’Brien. The status of disulfiram: a half of a century later. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 26:290, 2006.
- [110] G. D. Thorn and R. A. Ludwig. *The dithiocarbamates and related compounds*. Elsevier Publishing Co., 1962.
- [111] L. W. Scheibel, A. Adler, and W. Trager. Tetraethylthiuram disulfide (antabuse) inhibits the human malaria parasite plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10):5303, 1979.
- [112] E. E. Williams. Effects of alcohol on workers with carbon disulfide. *JAMA*, 109:1472–3, 1937.
- [113] E. F. Lewison. Spontaneous regression of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monograph*, 44:23, 1976.

- [114] H. Picolet, J. M. Lang, J. L. Touraine, J. M. Livrozet, T. Sahumare, M. Kirstetter, C. Trepo, G. Retornaz, P. Chossegras, J. Barrier, et al. Multicenter, randomized, placebo-controlled study of ditiocarb (imuthiol) in human immunodeficiency virus infected asymptomatic and minimally symptomatic patients-by the hiv 87 study group. *AIDS Res. Human Retroviruses*, 9:83–89, 1993.
- [115] B. Cvek. Failure of ditiocarb (diethyldithiocarbamate) therapy: Was diet the reason? *Curr. HIV Res.*, 7:254–254, 2009.
- [116] J. D. Moriarty. The use of antabus in the therapy of alcoholic patients. *Calif. Med.*, 73:144, 1950.
- [117] R. D. Bruce. Medical interventions for addictions in the primary care setting. *Top HIV Med.*, 18:8–12, 2010.
- [118] M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, and Q. P. Dou. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.*, 16:1813–1825, 2010.
- [119] L. Kelland. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 7:573–584, 2007.
- [120] B. Cvek, V. Milacic, J. Taraba, and Q. P. Dou. Ni (ii), cu (ii), and zn (ii) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J. Med. Chem.*, 51:6256–6258, 2008.
- [121] K. S. Larsen and D. S. Auld. Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry*, 30:2613–2618, 1991.
- [122] V. Milacic, D. Chen, L. Ronconi, K. R. Landis-Piwowar, D. Fregona, and Q. P. Dou. A novel anticancer gold (iii) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20s proteasome and 26s proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res.*, 66:10478, 2006.

- [123] V. Milacic and Q. P. Dou. The tumor proteasome as a novel target for gold (iii) complexes: implications for breast cancer therapy. *Coord. Chem. Rev.*, 253:1649–1660, 2009.
- [124] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, and C. Santini. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med. Res. Rev.*, 30:708–749, 2010.
- [125] D. Chen, Q. C. Cui, H. Yang, and Q. P. Dou. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.*, 66:10425, 2006.
- [126] P. Dufour, J. M. Lang, C. Giron, B. Duclos, P. Haehnel, D. Jaeck, J. M. Jung, and F. Oberling. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy*, 6:9–12, 1993.
- [127] D. Cen, D. Brayton, B. Shahandeh, F. L. Meyskens, and P. J. Farmer. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J. Med. Chem.*, 47:6914–6920, 2004.
- [128] S. S. Brar, C. Grigg, K. S. Wilson, W. D. Holder, D. Dreau, C. Austin, M. Foster, A. J. Ghio, A. R. Whorton, G.W. Stowell, et al. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic amp-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol. Cancer Ther.*, 3:1049, 2004.
- [129] M. Marikovsky, N. Nevo, E. Vadai, and C. Harris-Cerruti. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int. J. Cancer*, 97:34–41, 2002.
- [130] M. Hayakawa, H. Miyashita, I. Sakamoto, M. Kitagawa, H. Tanaka, H. Yasuda, M. Karin, and K. Kikugawa. Evidence that reactive oxygen species do not mediate nf- $\kappa$  activation. *EMBO Rep.*, 22:3356–3366, 2003.
- [131] B. Cvek and Z. Dvorak. Targeting of nuclear factor- $\kappa$ b and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr. Pharm. Des.*, 13:3155–3167, 2007.

- [132] H. Cho, T. Lee, J. Park, K. Park, J. Choe, D. Sin, Y. Park, Y. Moon, K. Lee, J. Yeo, et al. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of mmp-2 and mmp-9 expression. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 40:1069, 2007.
- [133] Z. E. Sauna, X. H. Peng, K. Nandigama, S. Tekle, and S. V. Ambudkar. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked atp binding cassette transporters mdr1 (abcb1) and mrp1 (abcc1). *Mol. Pharm.*, 65:675, 2004.
- [134] M. M. Gottesman, T. Fojo, and S. E. Bates. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, 2:48–58, 2002.
- [135] T. W. Loo and D. M. Clarke. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92:898, 2000.
- [136] A. M. Burger, P. Phatak, M. Wilson, and A. K. Seth. Disulfiram inhibits the e3 ligase activity of breast cancer associated gene 2 (bca2) and the growth of bca2-expressing breast cancers in vitro and in vivo. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 4:118, 2006.
- [137] B. Cvek. Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int. J. Cancer*, 127:2486–2486, 2010.
- [138] J. L. Stevens. Future of toxicology mechanisms of toxicity and drug safety: Where do we go from here? *Chem. Res. Toxicol.*, 19:1393–1401, 2006.
- [139] S. Whitebread, J. Hamon, D. Bojanic, and L. Urban. Keynote review: in vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development. *Drug Discov. Today*, 10:1421–1433, 2005.
- [140] M. R. Fielden and K. L. Kolaja. The role of early in vivo toxicity testing in drug discovery toxicology. *Expert. Opin. Drug Saf.*, 7:107–110, 2008.
- [141] W. L. Jorgensen. The many roles of computation in drug discovery. *Science*, 303:1813–1818, 2004.

- [142] S. Becker, A. Mang, A. Toma, and T. M. Buzug. In-silico oncology: an approximate model of brain tumor mass effect based on directly manipulated free form deformation. *Int. J. Comput. Assist. Radiol. Surg.*, pages 1–16, 2010.
- [143] J. Cortes, D. Thomas, C. Koller, F. Giles, E. Estey, S. Faderl, G. Garcia-Manero, D. McConkey, G. Patel, R. Guerciolini, et al. Phase i study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clin. Cancer Res.*, 10:3371–3376, 2004.
- [144] R. Simon. Optimal two-stage designs for phase II clinical trials. *Control. Clin. Trials*, 10:1–10, 1989.
- [145] K. Chen and M. Shan. Optimal and minimax three-stage designs for phase II oncology clinical trials. *Contemp. Clin. Trials*, 29:32–41, 2008.
- [146] P. G. Richardson, B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagannath, D. Irwin, S. V. Rajkumar, G. Srkalovic, M. Alsina, R. Alexanian, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 348:2609–2617, 2003.
- [147] R.I. Fisher, S.H. Bernstein, B.S. Kahl, B. Djulbegovic, M.J. Robertson, S. de Vos, E. Epner, A. Krishnan, J.P. Leonard, S. Lonial, et al. Multicenter phase ii study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 24:4867, 2006.
- [148] R. Z. Orlowski, A. Nagler, P. Sonneveld, J. Blade, R. Hajek, A. Spencer, J. San Miguel, T. Robak, A. Dmoszynska, N. Horvath, I. Spicka, H. J. Sutherland, A. N. Suvorov, S. H. Zhuang, T. Parekh, L. Xiu, Z. Yuan, W. Rackoff, and J. L. Harousseau. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J. Clin. Oncol.*, 25:3892–3901, 2007.
- [149] B. N. Roin. Unpatentable drugs and the standards of patentability. *Tex. L. Rev.*, 87:503, 2008.
- [150] E. R. Gold, W. Kaplan, J. Orbinski, S. Harland-Logan, and S. N-Marandi. Are patents impeding medical care and innovation? *PLoS Med.*, 7:e1000208, 2010.

- [151] C. R. Chong and D. J. Sullivan. New uses for old drugs. *Nature*, 448:645–646, 2007.
- [152] J. Couzin-Frankel. Personalized medicine. Pushing the envelope in neuroblastoma therapy. *Science*, 333:1569–1571, 2011.
- [153] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65:55–63, 1983.
- [154] G. Hacker. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, 301:5–17, 2000.
- [155] A. M. Sieuwerts, J. G. Klijn, H. A. Peters, and J. A. Foekens. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 33:813–823, 1995.
- [156] J. R. Prohaska and A. A. Gybina. Intracellular copper transport in mammals. *J. Nutr.*, 134:1003–1006, 2004.
- [157] Y. Nose, E. M. Rees, and D. J. Thiele. Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem. Sci.*, 31:604–607, 2006.
- [158] Y. Qian, E. Tiffany-Castiglioni, and E. D. Harris. Copper transport and kinetics in cultured C6 rat glioma cells. *Am. J. Physiol.*, 269:892–898, 1995.
- [159] A. L. Weiner and R. J. Cousins. Copper accumulation and metabolism in primary monolayer cultures of rat liver parenchymal cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 629:113–125, 1980.