

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Zuzana Macečková

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



**Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti
buněčné linii odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic.**

Bakalářská práce

Zuzana Macečková

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Mgr. Borise Cveka 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.

Prohlášení:

Čestně prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s pomocí svého vedoucího práce Mgr. Borise Cveka Ph.D. a pod vedením Mgr. Jinřicha Sedláčka v laboratoři. A že veškerá literatura použitá jako podklad mé práce je citována níže.

V Olomouci dne:..... Jméno:.....

Poděkování:

Velmi děkuji za vedení a rady panu Mgr. Borisi Cvekovi Ph.D. a za praktickou pomoc při zdolávání nástrah laboratoře Mgr. Jindřichovi Sedláčkovi.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Zuzana Macečková

Název práce: Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiram (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic.

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra genetiky a molekulární biologie, PŘF UP, Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, PhD.

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt: Rakovina plic je celosvětově nejrozšířenější nádorové onemocnění a také na ni umírá nejvíce lidí. Mezi typy rakovin plic má největší zastoupení nemalobuněčný karcinom plic. Přestože se stále vyvíjejí nové postupy léčby, pravdou je, že i s moderní léčbou pátý rok po diagnóze přežije pouze zlomek nemocných, proto je potřeba hledat nové a účinnější formy léčby.

Mezi novinkou v léčbě rakoviny jsou i inhibitory proteazomu. Proteazom je multiproteinový komplex v cytoplasmě buňky, který zodpovídá za degradaci nepotřebných či poškozených proteinů prostřednictvím ubikvitin-proteazomového systému. Blokováním aktivity proteazomu pak můžeme dosáhnout také zablokování NF- κ B dráhy, jenž je spojována hned s několika aspekty tumorigeneze.

Již dnes se v klinice používá inhibitor proteazomu bortezomib pro léčbu mnohočetného myelomu a lymfomu plášťových buněk. Přestože však vykazuje vysokou aktivitu v krevních nádorech, jeho aktivita v nádorech pevných je prakticky zanedbatelná.

Disulfiram (antabus) je dlouho používaným lékem proti alkoholismu a bylo prokázáno, že když tvoří komplexy s kovy (hlavně Cu a Zn), stává se z něj velmi účinný inhibitor proteazomu, vykazující aktivitu především v pevných nádorech. To z něj dělá velmi nadějný a hlavně levný lék proti rakovině. Koneckonců již v současné době probíhá hned několik klinických testů, které mají tuto teorii prokázat.

Cílem praktické části této práce pak bylo především dokázat, že komplex disulfiram s mědí vykazuje daleko vyšší aktivitu proti buněčné linii odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic A549 než jeho jednotlivé součásti.

Klíčová slova: Nemalobuněčný karcinom plic, proteazom, NF- κ B, CuEt, nezisková léčiva.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Zuzana Macečková

Title: Non-profit drugs: The activity of disulfiram-copper complex against a cell line derived from non-small cell lung carcinoma.

Type of thesis: bachelor paper

Department Department of genetics and molecular biology, Palacky University, Olomouc

Supervisor: Mgr. Boris Cvek, PhD.

The year of presentation: 2012

Abstract: Lung cancer is the most common cancer worldwide and it is also the number one cause of death by cancer. Among type of lung cancers is the most spread non-small cell lung carcinoma. Although new methods of treatment have been evolved, the truth is that even with modern treatment the fifth year after diagnosis survives only fraction of patients, this is the reason, why we need to look for new and more effective cure.

Proteasome inhibitors are the one of the news for cancer treatment. Proteasome is the multiprotein complex in the cytoplasm of the cell and it is responsible for degradation of unneeded or damaged proteins through the ubiquitin-proteasome system. By blocking proteasome activity can be achieved also blocking of NF- κ B pathway, which is associated with several aspects of tumorigenesis.

Today is in clinical use one of the proteasome inhibitors – bortezomib. It is used for treatment of multiple myeloma and mantle cell lymphoma. However bortezomib shows high activity in blood cancer, its activity in solid tumor is practically negligible.

Disulfiram (antabus) is a long-used drug for alcoholism treatment and it has been shown, that when it forms complexes with metals (mainly with Cu and Zn), it becomes a very potent inhibitor of proteasome, showing activity mainly in solid tumors. This makes it very promising and cheap candidate to cancer cure. After all, there are several ongoing trials to prove this theory.

The goal of practical part of this work was to prove that the complex of disulfiram and copper shows higher activity against cell lines derived from non-small lung carcinoma A549 than its individual components.

Keywords: non-small cell lung carcinoma, proteasome, NF- κ B, CuEt, non-profit drugs.

Obsah	
Úvod.....	2
1. Nemalobuněčný karcinom plic.....	3
2. Ubikvitin-proteazomový systém	7
3. Inhibitory proteazomu	10
3.1 NF- κ B dráha	11
3.2 Bortezomib	13
3.3 Disulfiram	15
4. Než přijde nové léčivo na trh.....	19
4.1 Nezisková léčiva	22
5. Praktická část.....	23
5.1 Materiál a vybavení laboratoře:.....	23
5.2 Metody:.....	24
5.3 Výsledky.....	27
5.3.1: aktivita CuEt při 24 hodinové inkubaci.....	27
5.3.1: aktivita CuEt při 48 hodinové inkubaci.....	30
5.3.1: srovnání aktivity CuEt a cisplatiny při 24 hodinové inkubaci.	32
5.4 Diskuze.....	33
5.5 Závěr	34
Zdroje:.....	34

Úvod

Rakovina plic je jednou z nejčastějších forem rakoviny, celosvětově pak má na svědomí přibližně 18% úmrtí vlivem nádorových onemocnění, což z ní činí nejsmrtelnější rakovinové onemocnění. Nejběžnějším typem rakoviny plic je pak nemalobuněčný karcinom plic. Jeho léčba je komplikovaná, a aby mohla být vůbec úspěšná, je nezbytné onemocnění objevit včas - ještě v operabilním stádiu. To se ovšem často nepodaří, a i když terapie proběhne úspěšně, neznamená to výhru, jelikož u tohoto typu karcinomu velmi často dochází k relapsu a pátý rok po diagnóze i s moderní léčbou přežije jen zlomek nemocných.

To je důvod, proč je nutné neustále vyvíjet a testovat nové a účinnější terapie a léčiva. Jednou z novinek v léčbě rakoviny jsou i inhibitory proteazomu. Proteazom je multiproteinový komplex v cytoplazmě buňky a je zodpovědný za degradaci nepotřebných, poškozených či toxických proteinů. Proteazom je součástí tak zvaného ubikviton-proteazomového systému. V tomto systému je protein určený k degradaci nejdříve přes enzymatickou kaskádu označen ubikvitinem, to někdy také bývá označováno jako „polibek smrti“, a následně proteolytickými podjednotkami proteazomu rozstříhán.

Tento systém je také zodpovědný za regulaci mnoha proteinů, včetně proteinů signálních drah kontrolující např.: expresi genů, buněčný cyklus a apoptózu atd. Jednou z těchto drah je i dráha NF- κ B. NF- κ B hraje důležitou roli hned v několika aspektech tumorigeneze a její aktivace je podmíněna správnou funkcí proteazomu. Jak už z názvu vyplývá – inhibitory proteazomu inhibují proteazom, a tím inhibují i dráhu NF- κ B, což může nejspíše vést až k léčbě rakoviny.

Důkazem, že inhibitory proteazomu mohou fungovat, je i první inhibitor proteazomu používaný v klinické praxi - bortezomib (VELCADE). Tato látka je užívána pro léčbu myeloidní leukémie a lymfomu pláštěvých buněk, kromě těchto rakovin bortezomib vykázal signifikantní aktivitu i v dalších typech krevních rakovin. Co se týče pevných nádorů, u nich bortezomib vykázal vesměs vynikající výsledky během preklinických testů, ovšem poté během testů klinických selhal – důvodem může být pravděpodobně jeho neschopnost dostat se dovnitř tumoru. To je důvod, proč hledat nové a účinnější inhibitory proteazomu.

Právě takovou látkou může být disulfiram (antabus), látka desetiletí užívaná k averzní terapii alkoholismu. Již v minulosti bylo popsáno několik případů protirakovinné aktivity disulfiramu, ačkoli přesný mechanismus působení nebyl znám. Až v posledních letech byl

podán důkaz, že disulfiram, především když tvoří komplexy s kovy Zn a Cu, vystupuje jako inhibitor proteazomu.

Hlavní výhodou disulfiramu oproti bortezomibu je za prvé to, že vykazuje aktivitu především v pavných nádorech, a za druhé to, že je to dlouho ozkoušený a známý lék, u kterého jsou známy vedlejší účinky, dávkování atd.

S tím je ovšem spojena jeden velký problém – nikdo do jeho testování nechce investovat, protože je tento lék nepatentovatelný. To z disulfiramu dělá jeden z příkladů, že dnešní schvalování léků je ne příliš efektivní a potřebuje nové přístupy např. znovupoužití starých léků, což je přístup, který by stagnujícímu farmaceutickému průmyslu mohl ušetřit značnou část výdajů a který by mohl zrychlit a zefektivnit, v případě disulfiramu, například léčbu rakoviny.

1. Nemalobuněčný karcinom plic

Plíce: Plíce jsou párový orgán, který slouží k výměně dýchacích plynů. K přívodu a odvodu těchto plynů do plic slouží horní a dolní cesty dýchací. V plicích jsou pak tyto plyny průduškami a průdušinkami rozvedeny po plicích až do plicních sklípků (alveol), kde se odehrává samotná výměna. Do krve vstupuje kyslík a z krve vystupuje oxid uhličitý, který je následně vydechnut. Pravá plíce má tři laloky a levá laloky dva. Plíce jsou obaleny dvěma blánami: poplicnicí (viscerální pleura) a pohrudnicí (parietální pleura), mezi těmito dvěma blánami je tekutina, která usnadňuje dýchání. [1]

Rakovina plic: Na celém světě vede žebříček nádorových onemocnění rakovina plic. V roce 2008 zaznamenala WHO (World Health Organization) celkem 1 092 056 případů rakoviny plic, což činí 12,7% ze všech případů rakoviny, také evidovala 948 993 úmrtí způsobených tímto onemocněním, což je 18,2% všech úmrtí následkem rakoviny [2]. Tato rakovina je u mužů na prvním místě, hned následována rakovinou prostaty, zatímco u žen hraje prim rakovina prsu a rakovina plic je až na čtvrtém místě [3]. Podíl rakoviny plic v rozvinutých a rozvíjejících se zemích je víceméně stejný. V posledních letech však vlivem boje proti kouření míra rakoviny plic v rozvinutých zemích Ameriky a Evropy klesá [4]. Naopak v Číně a několika zemích Asie a Afriky míra rakoviny stoupá vlivem nástupu kuřáckého boomu [5].

Rizikové faktory: Existuje velké množství příčin vzniku rakoviny plic, mezi méně časté patří špatné stravování, nedostatek pohybu, přítomnost genů podporující tento typ rakoviny a věk nad 65 let. Mezi ty početnější pak patří následující [6,7,8]:

Kouření: Je známo, že ve dvacátém století, kdy se rozmohlo kouření cigaret, se taky několikanásobně zvýšil výskyt rakoviny plic (viz. obr. 1.1). Je to způsobeno tím, že cigaretový kouř obsahuje až 60 známých karcinogenů.

U mužů kuřáků je šance, že se vyvine rakovina plic 23 x vyšší než u nekuřáků, u žen je pak tato šance 13 x vyšší. Dalším důležitým faktorem je počet vykouřených cigaret za rok, je dokázáno, že čím je celkový počet vykouřených cigaret za rok vyšší, tím je také vyšší pravděpodobnost vzniku rakoviny plic. Přes 50% všech případů rakoviny plic je detekovaných u kuřáků, 10% mužů a 20% žen s rakovinou plic pak nikdy nekouřilo [6]. Přestože

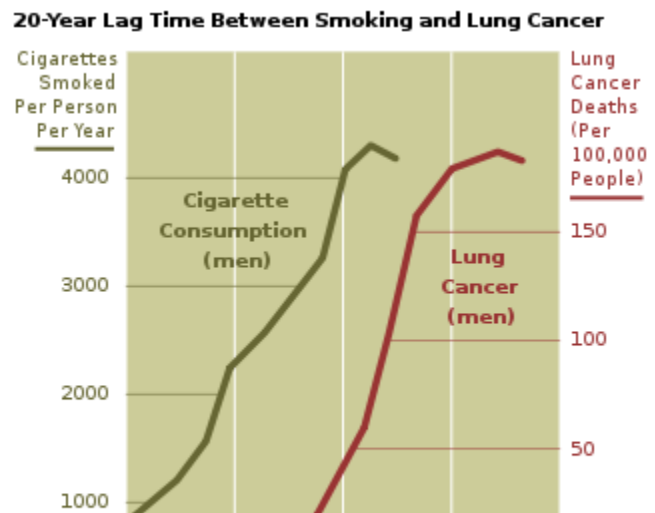
pasivní kouření není tak nebezpečné jako kouření aktivní, i člověk, který pouze vdechuje cigaretový kouř, vdechuje karcinogeny stejně jako kuřák, což může vést až ke vzniku rakoviny.

Znečištění vzduchu: Znečištěný vzduch je problém zejména industriálních oblastí a oblastí, kde se hojně spalují fosilní paliva, tato aktivita zamořeje vzduch rozličnými polutanty, od popílků až po polycyklické sloučeniny. Dlouhodobý pobyt v takto znečištěné oblasti může vést ke kumulaci karcinogenů a tím i ke zpuštění rakoviny, zejména pak rakoviny plic [10].

Radon: Radon je radioaktivní prvek, který se vyskytuje v horninách. Z hlediska karcinogeneze je nebezpečný zejména pro lidi, kteří pracují v dolech nebo pro lidi žijící na území, jehož podloží tento prvek obsahuje. [11]

Pití alkoholických nápojů: Bylo prokázáno, že větší šanci na vývin rakoviny plic mají lidé, kteří ve velké míře pijí pivo a konzumují při tom nedostatečné množství ovoce a zeleniny, naopak výskyt rakoviny se snižuje u lidí konzumující víno. Tyto výsledky mohou ovšem být také ovlivněny tím, že zejména s pitím piva je často spojené kouření. [12]

Nemalobuněčný karcinom plic: Je nejběžnějším typem rakoviny plic. Můžeme jej rozdělit do tří základních skupin: SCC karcinom (squamous cell carcinoma), velkobuněčný karcinom a adenokarcinom. Všechny tyto tři typy rakoviny plic mají podobné chování, léčbu i prognózu a někdy je obtížné je mezi sebou rozlišit. Příznaky nemalobuněčného karcinomu plic jsou:



Obr. 1. 1. Korelace mezi kouřením a vznikem rakoviny plic [9]

neustávající kašel, dechové obtíže, bolest na hrudi, vykašlávání krve, časté plicní infekce, únava a ztráta váhy bez zjevné příčiny. [7,13,14]

Stádia: Pro zahájení nejúčinnější léčby je nezbytné nejdříve co nejpřesněji určit stádium nemoci. Pro tuto potřebu vyvinula AJCC (American Joint Committee of Cancer) TNM systém, který bere v potaz tři aspekty nemoci. „T“ - tumor, řídí se velikostí a umístěním nádoru. „N“ - node (uzlina), indikuje zasažení uzlin rakovinou. „M“ - metasis (metastáze), určuje se podle toho, jak se rakovina rozšířila z místa vzniku po celém těle a vytvořila metastáze či ne. V roce 2010 prošel tento systém zásadními změnami pro přesnější určení stádia a tím také nasazení nejvhodnější léčby. [15-17]

Tab. 1.1: Stádia tumoru:

Stádium	Definice
TX	Primární tumor nelze hodnotit nebo byla prokázána přítomnost maligních buněk ve sputu nebo bronchiálním výplachu, ale nádor nebyl prokázán při vyšetřeních.
T0	Primární tumor nebyl prokázán.
Tis	Karcinom <i>in situ</i> .
T1	Maximální velikost tumoru 3 cm. Obklopen viscerální pleurou nebo plicní tkání.
T1a	Maximální velikost tumoru 2 cm.
T1b	Tumor má velikost mezi 2 a 3 cm v největším rozměru.
T2	Má větší rozměr než 3 cm. Postihuje hlavní bronchus do vzdálenosti maximálně 2 cm nebo větší do kariny. Postihuje viscerální pleuru. Způsobuje atelektázu nebo obstrukční bronchopneumonii šířící se do hilové oblasti, ale nepostihuje celou plíci.
T2a	Tumor má velikost mezi 3 a 5 cm v největším rozměru.
T2b	Tumor má velikost mezi 5 a 7 cm v největším rozměru.
T3	Tumor jakékoli velikosti, který postihuje tyto struktury: hrudní stěnu, bránici, viscerální pleuru, perikard, hlavní bronchus ve vzdálenosti bližší než 2 cm ke karině, ale nepostihuje karinu. Nebo způsobuje atelektázu nebo obstrukční bronchopneumonii celé plíce.
T4	Tumor jakékoli velikosti prorůstající do těchto struktur: srdce, velké cévy, průdušnice, jícen, obratle. Nebo tumor vytváří satelitní nádorové uzly ve stejném laloku. Nebo je přítomen pleurální výpotek.

Tab. 1.2: Stádia zasažení uzlin:

Stádium	Definice
NX	Nelze stanovit postižení uzlin.
N0	Bez metastáz v uzlinách.
N1	Metastáze v ipsilaterálních peribronchiálních a/nebo ipsilaterálních hilových uzlinách včetně postižení přímým prorůstáním primárního tumoru.
N2	Metastáze v ipsilaterálních mediastinálních a/nebo sub karinních lymfatických uzlinách.
N3	Metastáze v kontralaterálních mediastinálních a/nebo hilových uzlinách. Metastáze v ipsilaterálních nebo kontralaterálních skalenových nebo supraklavikulárních lymfatických uzlinách.

Tab. 1.3: Stádia detekce metastáz:

Stádium	Definice
MX	Vzdálená metastáze nelze prokázat.
M0	Vzdálené metastáze nejsou přítomny.

M1	Vzdálené metastáze jsou přítomny.
-----------	-----------------------------------

Tab. 1.4: Prognostické skupiny:

Stádium	T	N	M
Okultní karcinom	TX	N0	M0
Stádium 0	Tis	N0	M0
Stádium IA	T1	N0	M0
Stádium IB	T2a	N0	M0
Stádium IIA	T2b	N0	M0
	T1, T2a	N1	M0
Stádium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stádium IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b, T3	N2	M0
	T3, T4	N1	M0
	T4	N0	M0
Stádium IIIB	Jakékoli T	N3	M0
	T4	N2, N3	M0
Stádium IV	Jakékoli T	Jakékoli N	M1

Léčba: Jak již bylo řečeno, pro nasazení správné terapie je nezbytné co nejpřesněji určit stádium nemoci. Dnes existuje několik způsobů léčby, k terapii se však většinou používá kombinace těchto způsobů. [7,14-15]

Chirurgický zákrok: Jedná se o nejuspěšnější a nejčastěji volenou léčbu. Pacientovi se při ní vyjmou tumorem postižené tkáně a lymfatické uzliny nacházející se v blízkosti nádoru.

Radioterapie: Jedná se o cílenou léčbu. Nádorové buňky jsou při ní cíleně vystavovány velkým dávkám radiace, která by je měla zahubit.

Chemoterapie: Při léčbě nádorových onemocnění se většinou užívá více než jedna látka zároveň. Velkou nevýhodou této terapie je, že lék nepůsobí cíleně na nádorové buňky, ale postihuje i jiné buňky těla, což může mít vážné vedlejší účinky. Jednou z nejpoužívanějších a nejnámějších látek užívaných pro léčbu rakoviny je cisplatina, pro její širokou účinnost je pak zvána „penicilin na rakovinu“ [18]. Používá se i pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic, nicméně není příliš účinná a indukuje přežití pátého roku pouze kolem cca 13%, navíc vykazuje mnoho vedlejších účinků [19-20]. Proto je potřeba hledat nové, cílenější terapie, jednou z novinek v léčbě jsou i tzv. inhibitory proteazomu, ale tím se budeme zabývat později.

Cílená terapie: Použité látky působí cíleně a usmrcují nádorové buňky nebo zamezují jejich růstu a šíření.

Paliativní léčba: K této se přistupuje, když nemoc dosáhne pokročilého stádia a již není reálná naděje na vyléčení. Spočívá v podávání utišujících léků, které mají potlačit bolest a zkvalitnit zbytek pacientova života.

Prognóza: Nejlepší šanci na uzdravení mají ti, jimž byla nemoc diagnostikována v operabilním stádiu, u těchto pacientů je indikováno přežití do pátého roku až 60%. Bohužel u tohoto typu rakoviny dochází velmi často k relapsu. Ti, u nichž byla nemoc diagnostikována v neoperabilním stádiu, mají průměrnou dobu přežití jen 18-24 měsíců od diagnózy [7, 14]. Neustále se však vyvíjejí nové postupy léčby, jedním ze směrů, kterým se výzkum ubírá, jsou i inhibitory proteazomu, ale abychom byli schopni pochopit jejich fungování je nejdříve nezbytné představit si ubiquitin-proteazomový systém.

2. Ubikvitin-proteazomový systém



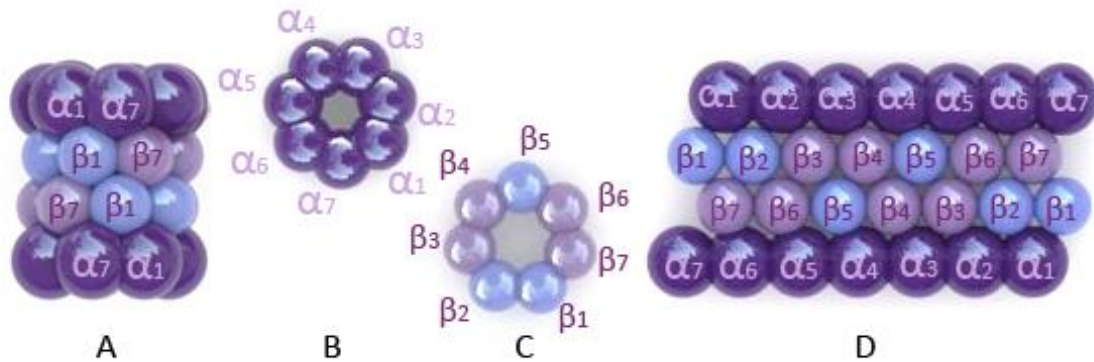
Proteazom: Proteazom je soudkovitý multiproteinový komplex nacházející se v cytoplazmě buňky. Jeho hlavní funkcí je degradovat nepotřebné, poškozené nebo toxické proteiny. Pro to, aby byl protein proteazomem zlikvidován, je většinou nezbytné, aby byl označen polyubikvitinovým řetězcem. Proteazom byl objeven relativně nedávno a dosud je jeho kompletní struktura a funkce ne zcela objasněna. V roce 2004 byla za jeho objevení a popsání udělena Nobelova cena pánům Aaronovi Ciechanoverovi, Avramovi Hershkovi a Irwinu Roseovi [21].

Obr. 2.1: 3D schéma 26 proteazomu

Struktura proteazomu: Pro eukaryotické a tedy i lidské buňky je typický 26S proteazom. Ten se skládá z 20S proteazomu (CP - core particle) a 19S proteazomu (RP – regulatory particle), jenž nasedá z obou stran na 20S proteazom [22-27]. 19S proteazom odpovídá za rozpoznání polyubikvitinovaného proteinu, jeho následnou deubikvitinaci a rozpletení, 20S proteazom za rozstříhání takto označeného proteinu. V některých případech na bázi nasedá 19S proteazom, ale 11S proteazom [22, 28-29], předpokládá se, že plní podobnou funkci, jen s tím rozdílem, že tato struktura je především zodpovědná za ničení produktů virů. Tato úloha také náleží tzv. imunoproteazomu, který mimo jiné zodpovídá za výrobu MHC (major histocompatibility complex) proteinů [23].

20S proteazom (CP): Skládá ze čtyř prstencových komplexů. Dvou prstenců α a dvou β , každý z nich se skládá ze sedmi částí (α_{1-7} , β_{1-7}). Tyto komplexy na sebe nasedají v pořadí $\alpha\beta\beta\alpha$.

α -komplexu je zodpovědný za otvírání a zavírání brány, která vpouští proteiny dovnitř 20S proteazomu. Uvnitř β -komplexu pak dochází k samotnému štěpení peptidových vazeb. Hlavní úlohu v tomto procesu zastávají jednotky β_2 (s aktivitou podobnou trypsinu), β_5 (s aktivitou podobnou chymotrypsinu) a β_1 (s aktivitou podobnou kaspázám), které obsahují proteázy. [22-24,26-28,30]

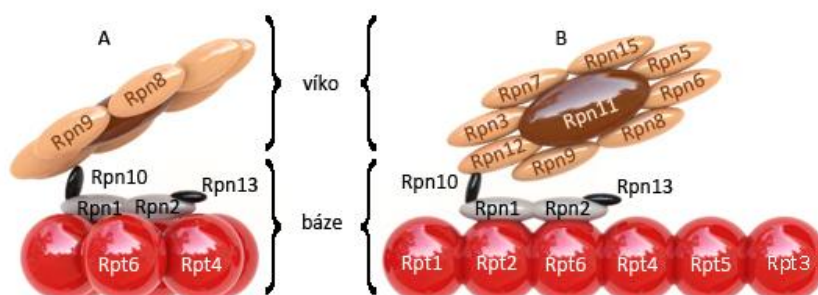


Obr. 2.2: schéma 20S proteazomu: A) 3D zobrazení, B) struktura α prstence, C) struktura β prstence, D) „rozvinutý“ 20S proteazom.

19S proteazom (RP): 19S proteazom se skládá z báze a víka, každá z těchto částí plní vlastní funkci. Hlavní funkcí 19S proteazomu je zachytit polyubikvitinovaný protein, rozplést jej a předat ho 20S proteazomu [22, 23].

Báze: Je desetiproteinový komplex. Obsahuje šest homologních AAA-ATPáz (Rpt₁- Rpt₆), které nasedají na α -komplex 20S proteazomu, a další čtyři jednotky (Rpn₁, Rpn₂, Rpn₁₀ a Rpn₁₃). Rpn₁₀ a Rpn₁₃ zachytávají polyubikvitinované proteiny. Rpn₁ a Rpn₂ pak fungují jako lepidlo a drží u sebe podjednotky proteazomu [22-23, 26, 27].

Víko: Je složeno nejméně z devíti jednotek (Rpn₃, Rpn₅, Rpn₆, Rpn₇, Rpn₈, Rpn₉, Rpn₁₁, Rpn₁₂ a Rpn₁₅). Hlavním účelem víka je deubikvitinovat zachycený protein a vrátit ubiquitin zpět do buňky. Víko má nejspíš i jiné funkce, ale ty dosud zůstávají neobjasněny. [22 -23]

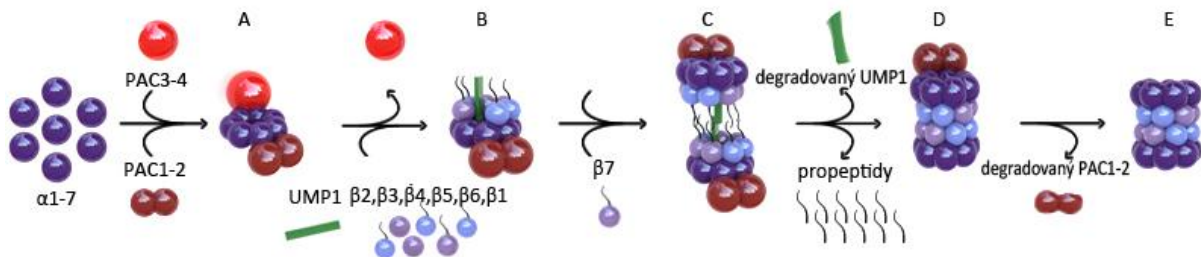


Obr. 2.3: schéma 19S proteazomu: A) 3D zobrazení, B) „rozvinutý“ 19S proteazom.

11S proteazom: V některých případech zastává funkci 19S proteazomu, ovšem s tím rozdílem, že není schopen zachytit velké proteiny, ale pouze polypeptidové řetězce, které často bývají produktem působení viru v buňce. [23, 28-29]

Imunoproteazom: Tyto proteazomy mají nahrazeny katalytické podjednotky β_1 , β_2 , β_5 podjednotkami β_{1i} , β_{2i} , β_{5i} . Je zodpovědný za výrobu MHC (major histocompatibility complex) proteinů, které jsou následně vystaveny na povrchu buňky jako antigeny. [23, 28-29]

Maturace proteazomu: Dodnes je většina tohoto děje značně nejasná. Zatím je známo, že 20S proteazom se sestavuje nezávisle na 19S proteazomu, a že se tyto jednotky spojují až následně. Celý proces začíná maturací 20S proteazomu (viz obr. 2. 4). Následuje sestavení 19S proteazomu, báze a víko se skládají také samostatně a až následně se spojí. Princip složení kompletního 26S proteazomu je zatím nejasný. [22-23]



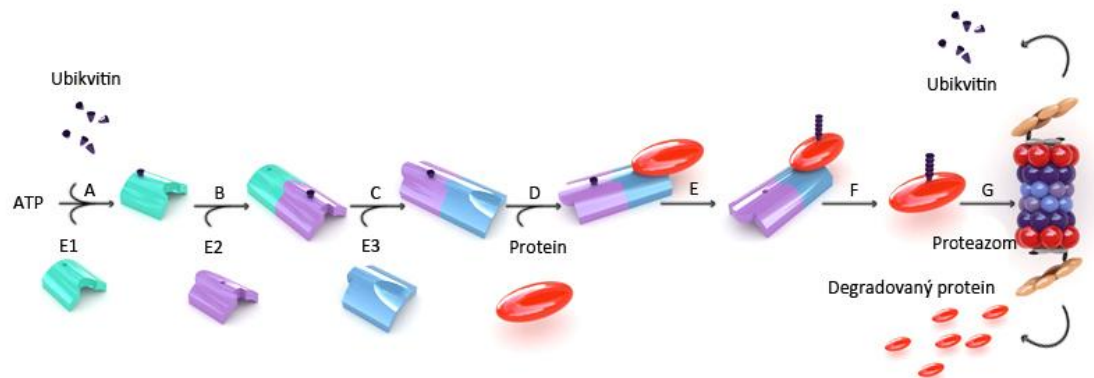
Obr. 2.4: schéma maturace 20S proteazomu: A) sestavení α prstence, při tom je potřeba dvou chaperonů (PAC1 - PAC2 a PAC3 - PAC4) B) připojení β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , β_6 , β_1 s propeptidy, odstranění PAC3-PAC4 a připojení chaperonu Ump1, vznik polovičního 20S proteazomu C) nasednutí β_7 a setkání dvou polovičních 20S proteazomů, D) degradace Ump1 a propeptidů, vznik pre-20S proteazomu E) degradace PAC1-PAC2, vznik 20S proteazomu. [22-23, 30]

Ubikvitinace: Jedná se o proces navázání ubikvitinu na protein. Ubikvitin se na protein může navázat různě, typ navázání ubikvitinu pak určuje osud proteinu. Jedním z osudů je i degradace proteinu 26S proteazomem. Polyubikvitinové řetězce také mohou sloužit v rámci buněčné signalizace.

Ubikvitin: Je to malý globulární protein, který se skládá ze 76 aminokyselin [31]. Tento protein se vyskytuje prakticky ve všech eukaryotických buňkách. V buňce má širokou paletu funkcí, některé z nich nejsou doposud objasněny. Hlavními strukturami na tomto proteinu je C-terminální konec a 7 lyzinových podjednotek. [22, 32]

Enzymatická kaskáda: Pro to, aby byl ubikvitin připojen na cílový protein je většinou nezbytná spolupráce tří enzymů (E1 - ubikvitin aktivující enzym, E2 - ubikvitin-konjugující

enzymy, E3 - ubikvitinligáza). Enzymy E1 byly zatím objeveny dva [33], enzymů E2 kolem třiceti a E3 stovky, protože každý E3 je specifický pro jeden protein či skupinu proteinů. Celý proces začíná navázáním ubikvitinu na E1, tato reakce je závislá na přísunu energie ve formě ATP. Navázání se uskutečňuje thioesterovou vazbou mezi C-terminálním koncem ubikvitinu a cysteinem na enzymu. Takto aktivovaný ubikvitin je následně převeden na E2. Na E2 se ubikvitin také naváže přes cystein. E2 s navázaným ubikvitinem se poté napojí na E3, na E3 také nasedne protein určen k ubikvitinaci. Byly objeveny dva typy E3: a) ty, jež na sebe naváží ubikvitin z E2 přes thioesterovou vazbu a následně jej předají cílovému proteinu, těchto bylo objeveno asi třicet a b) ty, které zprostředkovávají převod ubikvitinu z E2 přímo na protein. Ubikvitin se váže na lysin obsažený v cílovém proteinu. [28, 31-32, 34]



Obr. 2.5: schéma enzymatické kaskády: A) aktivace systému ATP, ubikvitinace E1, B) nasednutí E2 a jeho ubikvitinace, C) nasednutí E3, D) nasednutí proteinu, E) ubikvitinace proteinu, F) uvolnění ubikvitinovaného proteinu, G) degradace proteinu proteazomem.

Polyubikvitinace: Když je protein označen ubikvitinem, může dojít k polyubikvitinaci, to znamená, že se na již navázaný ubikvitin naváží další, může jich být až kolem desítky. Vazba vzniká mezi C-terminálním koncem jednoho ubikvitinu a lyzinem druhého. Jak již bylo zmíněno, ubikvitin obsahuje celkem sedm lysinů, nicméně zatím bylo prokázáno, že vazby vedoucí k degradaci proteazomem se dějí pouze na Lys48, Lys11 a Lys63. [22, 28, 32, 35]

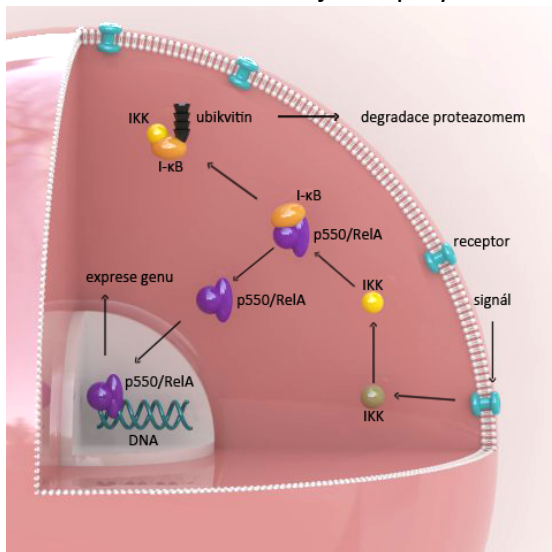
3. Inhibitory proteazomu

Jak již bylo řečeno, proteazom je klíčovou strukturou podílející se na odbourávání proteinů, včetně proteinů kontrolující buněčný cyklus. Protože regulace těchto proteinů je důležitá zejména pro rakovinné buňky, stává se z proteazomu atraktivní terč léčby rakoviny. V klinické praxi se již nyní užívá bortezomib (Velcade) pro léčbu mnohočetného myelomu [36] a lymfomu plášťových buněk [37]. Dalšími inhibitory pak prochází klinickými

testy. Dodnes není zcela znám přesný mechanismus, jakým inhibice proteazomu ovlivňuje děje v buňkách. Předpokládaným terčem jejich působení je signální dráha NF- κ B [38-40].

3.1 NF- κ B dráha

NF- κ B dráha je jednou ze signálních drah buňky regulující expresi genů. Je spouštěna především při zánětu a hlavní dopad má na geny zodpovědné za růst, proliferaci, apoptózu a imunitní odpověď. Celá dráha je inhibována I- κ B (inhibitor κ B). V normálním stavu je tato dráha neaktivní a neovlivňuje expresi genů. Ovšem spouští se působením cytokinů či růstových faktorů, které aktivují IKK (I- κ B kinázy). IKK fosforyluje I- κ B, na fosforylovaný I- κ B nasedne ubikvitin a dojde k polyubikvitinaci, takto polyubikvitovaný I- κ B je degradována



proteazomem. Po degradaci I- κ B je dráha aktivována. Heterodimer p50/RelA vstoupí do jádra, naváže se na specifická místa v DNA a spouští transkripci cílových genů. [41-44]

Obr. 3.1: schéma NF- κ B dráhy: Signál aktivuje IKK, ten fosforyluje I- κ B, což má za následek ubikvitinaci a degradaci I- κ B. Po odstranění I- κ B z p50/RelA tento heterodimer vstupuje do jádra a spouští expresi genů.

NF- κ B dráha jako odpověď na zánět: Zánětlivá reakce je odpovědí na poranění nebo infekci a je důležitá pro zahájení imunitní odpovědi, a právě tato odpověď je iniciována spuštěním signální dráhy NF- κ B, jejíž produkty aktivují imunitu [45] a podporují expresi genů zabraňující apoptóze [46]. Nicméně v některých případech (např.: při chronickém zánětu) může tato jindy nezbytná reakce iniciovat vznik rakoviny, toho si všiml již Virchow v roce 1863 [47-48]. Pokud je z nějakého důvodu narušena regulace této dráhy (např.: onkoproteiny virů, DNA mutace atd.), může dojít k její trvalé aktivaci a ta je spojena s několika aspekty tumorigeneze: proliferací buněk, zabráněním apoptózy (nesmrtelností), angiogenním účinek a schopností tvořit metastáze [39]. Spojení mezi zánětlivou reakcí, NF- κ B dráhou a tumorigenezí pak bylo dokázáno na dvou myších modelech [50-51].

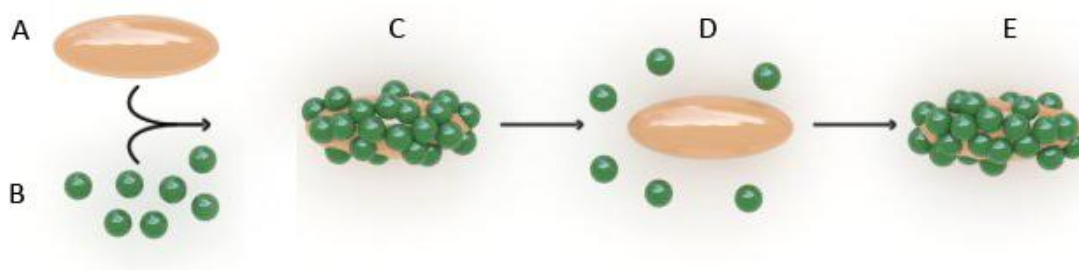
Dvě tváře NF- κ B: Aktivace NF- κ B na jednu stranu zabraňuje vzniku rakoviny, na druhou stranu však může způsobit tumorigenezi, rovnováha mezi těmito dvěma stavy je velmi

křehká a ještě není zcela pochopena [52]. V následující tabulce jsou stručně shrnuty některé funkce NF- κ B související s rakovinou [52-54]:

Tab. 3.1: funkce NF- κ B: role dráhy NF- κ B v rozvoji a potlačení rakoviny.

Podpora rakoviny	Suprese rakoviny
Přežití buňky Indukce exprese antiapoptických genů (Bcl-xL, XIAP, cIAP1 a 2). Suprese aktivity JNK(Jun N-terminal kinase).	Buněčná smrt Represe exprese antiapoptických genů skrz navázání RelA může vést k citlivění buňky k apoptickým signálům. Indukce exprese pro-apoptických genů (Fas, DR4, DR5).
Metastáze Regulace exprese adhezních molekul buňky (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) a genů, jež regulují metastáze (MMP9, uPA atd.).	Suprese tumoru Podpora apoptózou indukovanou p53, p53 může skrz p52 indukovat represi exprese Cyklinu D1. Regulace aktivity ARF.
Proliferace Exprese proto-onkogenů např.: Cyklin D1 a c-Myc.	Antiproliferace Inhibice JNK.
Angiogeneze Regulace VEGF, TNF, IL-1 a exprese IL-8.	
Nesmrtelnost Regulace exprese telomeráz.	

NF- κ B dráha a citlivost na rakovinnou léčbu: NF- κ B dráha mimo jiné zapíná i při toxickém podráždění buňky, které je normálně žádoucí, ale může být způsobeno i chemoterapií. To znamená, že při chemoterapii může dojít k aktivaci této dráhy a opětovnému posílení životnosti rakovinných buněk, což může vést až k rezistenci buněk [55].



Obr. 3.2: Schéma vlivu NF- κ B dráhy na protirakovinnou léčbu: A) buňka citlivá na protirakovinnou terapii (NF- κ B dráha neaktivní), B) účinná látka, C) protirakovinná reakce, D) zapnutí NF- κ B dráhy a vznik rezistence na účinnou látku, E) po inhibici NF- κ B dráhy se buňka opět stává citlivou na léčbu.

Inhibice NF- κ B dráhy: Dříve se myslelo, že by čistě teoreticky bylo při dlouhodobé inhibici této dráhy možné předcházet vzniku některým typům rakoviny spojovaných se zánětlivou reakcí, toto se chtělo dokázat na myších, ovšem když se pokusným zvířatům tato dráha

„vypnuta“, vyvinula se u nich spontánně rakovina, což je důkaz, že NF- κ B je nutná k předcházení vzniku rakoviny (viz. tabulka 3.1) [56]. Dlouhodobé zablokování nepřichází v úvahu i proto, že tato dráha má kruciální dopad na imunitu a jejím zablokováním by mohlo dojít až k imunodeficienci [49, 56]. Tyto experimenty také ukázaly, že zatím neznáme plné důsledky funkce NF- κ B dráhy v organismu a že zahrávat si s její regulací by mohlo být zbytečně riskantní. Co ovšem stojí za úvahu, je inhibice NF- κ B dráhy při léčbě rakoviny, protože tak by bylo možné předcházet turmorgenním účinkům NF- κ B např. vzniku rezistence na chemoterapii, vzniků metastáz, proliferaci atd. Jedním z typů látek, které připadají pro tento účel v úvahu, jsou inhibitory proteazomu [55].

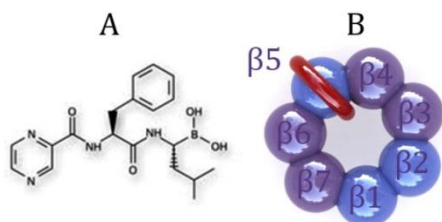
3.2 Bortezomib

Vývoj: V roce 1994 byl firmou ProScript vyvinut inhibitor proteazomu PS-341 (bortezomib), po roce testování se ukázalo, že tento přípravek vede k silné inhibici množení rakovinných buněk v myších modelech [57]. Nicméně do dalšího výzkumu nechtěl nikdo moc investovat, protože se předpokládalo, že v lidských pacientech bude mít bortezomib závažné vedlejší účinky. Díky navázání spolupráce s D. Livingstonem z Dana Farber Cancer Institute a E. Sausvillem z NCI (Nation Cancer Institute), nakonec v roce 1998 proběhla I. fáze klinických testů pod vedením R. Orlowského z University of North Carolina. Tyto klinické testy dokázaly, že bortezomib nemá závažné vedlejší účinky, v roce 2000 byl dokonce evidován případ 47-leté ženy, u které bylo po podání bortezomibu pozorováno úplné vymizení mnohočetného myelomu [36]. To vedlo k dalším testům léku. Výsledky byly tak přesvědčivé, že už v roce 2003 FDA (Food and Drug Administration), americká instituce pro povolování léčiv, schválila bortezomib pod obchodním názvem VELCADE pro léčbu relapsujícího mnohočetného myelomu. A to ještě před dokončením klinických testů. [58-60]

V roce 2008 byl VELCADE schválen jako lék první volby pro léčbu mnohočetného myelomu a nyní se užívá prakticky po celém světě. Je tak prvním inhibitorem proteazomu užívaným v klinické praxi. Je nutno také zdůraznit, že nevede k úplnému vyléčení nemoci, ale ve většině případů pouze k prodloužení života přibližně o 17,3 měsíce, přičemž citlivost na lék byla 8,4 měsíců [61], nicméně i to je lepší, než předchozí stav, kdy na mnohočetný myelom neexistovala prakticky žádná léčba. [57-60]

Mechanismus působení: V pokusech bylo dokázáno, že se bortezomib v proteazomu váže na serinovou proteázu v podjednotce β_5 (s aktivitou podobnou chymotrypsinu), čímž

reverzibilně inhibuje proteazom (viz. B) [62]. Touto inhibicí pak bortezomib působí v rakovině hned třemi mechanismy: ovlivněním NF- κ B dráhy, regulací kontrolních bodů buněčného cyklu a konečně ovlivněním mnoha dalších buněčných i mezibuněčných interakcí [63].



Obr. 3.3: A) chemická struktura Bortezomibu, B) mechanismus jeho působení v proteazomu

Bortezomib a NF- κ B dráha: Předpokládalo se, že bortezomib dráhu NF- κ B inhibuje tím, že zabraňuje degradaci I- κ B proteazomem a následné aktivaci NF- κ B, to se prokázalo i v preklinických a v klinických testech [64-65]. Pak ovšem přišlo převratné poznání týmu profesora Andersona, který podal důkazy, že v buňkách mnohočetného myelomu bortezomib přispívá k fosforylaci I- κ B α a tím k aktivaci NF- κ B dráhy, nikoli k její inhibici [66]. Jak tedy bortezomib přesně zabíjí rakovinné buňky, je stále nejasné.

Dosavadní výsledky: Jak už bylo řečeno, bortezomib se nyní používá jako lék první volby pro léčbu mnohočetného myelomu [36] a lymfomu pláštěvých buněk [37]. Testování léku však stále probíhá a vychází nespočet článků o jeho účincích. Kromě mnohočetného myelomu a lymfomu pláštěvých buněk prokázal bortezomib signifikantní aktivitu i v následujících typech rakoviny: lymfom kožních T-buněk [67], MALT lymfom [68], Waldenströмова makroglobulinemie [68]. Při preklinických studiích v pevných nádorech bortezomib vykázal vysokou aktivitu, ta se bohužel neprokázala při klinických testech [70]. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je to, že bortezomib je relativně velká molekula a má problém se k buňkám tumoru dostat vlásečnicemi vyživujícími nádor, to je také možná příčina toho, proč si tak dobře vedl v testech *in vitro*, ale následně selhal v testech *in vivo* či v některé z fází klinických testů. Je možné, že jiné typy inhibitorů proteazomu budou vykazovat lepší výsledky v pevných nádorech než bortezomib [71]. Dalším důvodem, proč hledat nové inhibitory proteazomu je pak ten, že přestože má bortezomib slibné výsledky, má řadu závažných vedlejších účinků (prokázáno ve více než 1 pacientovy z deseti) [72]: periferní neuropatie [73], trombocytopenie, anemie, pásový opar, gastrointestinální potíže. Dalšími potížemi pak jsou [74]: snížený tlak, srdeční potíže (potvrzený případ selhání srdce vlivem bortezomibu [75]), onemocnění jater a plicní problémy.

Nemalobuněčný karcinom plic a borteomib: Borteomib není schváleným lékem pro nemalobuněčný karcinom plic, protože studie, které proběhly, ukázaly zanedbatelnou aktivitu borteomibu. [76]

Preklinická studie: V preklinických studiích dosahoval borteomib vynikajících výsledků. A indukoval smrt rakovinných buněk hned několika mechanismy [77-79].

Klinické studie: V první fázi vykázal borteomib nejlepší výsledky v kombinaci s gemcitabinem a karboplatinou, této kombinaci nevykazoval zásadní toxicitu a několik u několika pacientů byla pozorována pozitivní reakce na terapii [80-82]. V druhé fázi se prokázalo, že borteomib projevuje určitou aktivitu u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic samostatný, jeho efektivita však byla vyšší v kombinaci doxetacelem [82]. Nicméně tyto výsledky nebyly přesvědčivé, a tak nebylo spuštěna žádná III. fáze klinických testů [83].

3.3 Disulfiram

Historie: V 19. století byl disulfiram užíván pro zpracování gumy, o jeho možném použití jako léku proti alkoholismu začal poprvé uvažovat E. E. Williams, když si všiml, že dělníci vystavení disulfiramu mají po požití alkoholu nepříjemné stavy, což v nich vyvolalo až nedobrovolnou abstinenci [84]. Po požití alkoholu vyvolá disulfiram nepříjemné pocity, protože inhibuje aldehyd dehydrogenázu, následkem toho není při metabolismu alkoholu acetaldehyd převeden na acetát a hromadí se v těle, výsledkem je snížení krevního tlaku, zvýšení tepu, zarudnutí obličeje a bolesti hlavy [84-85]. Dalším důvodem pro schválení disulfiram jako léku proti alkoholismu bylo to, že ani při dlouhodobém užívání nevykazuje závažné vedlejší účinky [86]. V roce 1951 schválila FDA disulfiram pod názvem Antabus jako averzní terapii pro léčbu závislosti na alkoholu, dalšími závislostmi, kde se nyní používá antabus jako podpůrná látka je závislost na kokainu a gamblerství [87], ovšem tyto závislosti nemají nic společného a metabolismem alkoholu, to znamená, že antabus musí v těle ovlivňovat i jiné fyziologické pochody, než odbourávání alkoholu.

První zmínka o možném použití antabusu v léčbě rakoviny se objevila v článku z roku 1977 [88], ten popisuje případ ženy, která byla v roce 1956, ve svých 35 letech operována kvůli agresivní rakovině prsu. O tři roky později se u ní vyskytly metastázy v páteři, žebrech a pánvi. Od roku 1961 se tato pacientka léčila antabusem ze závislosti na alkoholu a došlo u ní k vymizení všech metastáz. Ani za deset let nedošlo k recesi, zemřela v roce 1971 pádem z okna v důsledku opilosti, ovšem bez příznaků rakoviny.

Na přelomu osmdesátých a devadesátých let se uvažovalo o použití metabolitu disulfiramu-ditiokarbu pod názvem immuthiol jako léku proti AIDS, byl dokonce úspěšně použit v klinických testech [87], ovšem další výzkum tyto výsledky nepotvrdil a od testů bylo upuštěno. Možným vysvětlením tohoto neúspěchu je nedostatek mědi ve stravě testovaných [90].

Ve stejné době byl ditiokarb použit jako adjuvant v druhé fázi klinických testů proti rakovině prsu [91]. Tohoto testu se zúčastnilo 64 žen, polovina z nich dostávala ditiokarb sodný a druhá polovina placebo. Výsledky byly příznivé: za šest let žilo 81% žen, kterým byl podáván ditiocarb, zatímco ve skupině beroucí placebo žilo pouze 55% žen. Nicméně i přes tyto slibné výsledky byl výzkum opuštěn, protože předpoklad, že tato úspěšnost je dána blahodárným účinkem ditiocarbu na imunitu, se ukázal mylným [92].

Pozoruhodný účinek antabusu v boji proti rakovině, zejména když vytvoří komplexy s kovy, dokazuje také pokus, při kterém byl nevléčitelně nemocné ženě s metastází melanomu v játrech každý den podáván disulfiram společně s glukonátem zinečnatým. Výsledky byly ohromující, po třech měsících metastáze zmizela a pacientka mohla opustit nemocnici. Nutné dodat, že tato žena, i po 53 měsících, kdy brala každý den dávku disulfiramu s glukonátem zinečnatým, žila v dobré zdravotní kondici a bez vedlejších účinků terapie [93].

Disulfiram asi působí hned několika mechanismy:

Disulfiram a rezistence na léčbu rakoviny: P-glykoproteiny (P-gp) využívají ATP, aby transportovaly cytotoxické látky z buňky, vzhledem k tomu že mezi tyto látky patří i chemoterapeutika, jsou i ony pomocí P-gp z buňky pumpovány ven. Proto je při chemoterapii žádoucí zastavit proces maturace P-gp a předejít tak vzniku rezistence [94-95]. V roce 2000 bylo in-vitro dokázáno, že metabolity disulfiramu inhibují aktivitu ATPáz a tím inhibují P-gp, tato inhibice má přímý vliv na zvýšení citlivosti buňky k Vinblastinu a Colchicilinu. Vzhledem k tomu, že na rozdíl od dnes používaného Cyklosporinu A, disulfiram nemá závažnější vedlejší činky, je ideálním adeptem na adjuvant během chemoterapie, pro zvýšení citlivosti buňky na léčbu a předcházení vzniku rezistence [96].

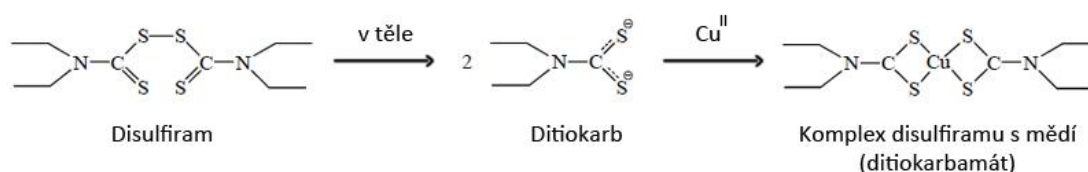
Disulfiram a angiogeneze: Šíření rakoviny a zvětšování nádoru je většinou podmíněn vývojem cév zásobící tumor živinami – angiogenezí. Na základě důkazu, že disulfiram v C6 gliomu a Lewisově karcinomu plic inhibuje angiogenzi a zpomaluje růst tumoru [97], byly v březnu 2006 spuštěny klinické testy v Izraeli a Německu [98]. V těchto testech disulfiram vystupuje jako adjuvant pro léčbu pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic

cisplatinou, tento experiment byl ukončen v prosinci 2009, nicméně výsledky ještě nejsou k dispozici. V jiné studii z devadesátého roku [99], se však ukazuje, že kombinace cisplatiny s disulfiramem nepřináší pacientovi žádnou úlevu a nemá ochrannou funkci proti poškození ledvin, ba právě naopak může indukovat vznik jiných toxicit. Důvodem tohoto selhání je nejspíše reakce cisplatiny s disulfiramem [100].

Disulfiram in-vitro inhibuje MMP (matrix metalloproteinasy), konkrétně MMP-2 a MMP-9 [101], což má v důsledku antiangiogenní účinky in-vivo a to bez projevů toxicity [102]. Disulfiram, kromě toho, že inhibuje MMP-2, MMP-9, také snižuje hladinu TNF- α (tumor necrosis factor - α) a VEGF (vascular endothelial growth factor), což jsou látky podporující angiogenezi [103].

Antabus a E3 ligázy: E3 ligázy jsou nezbytnou součástí UPS systému, mnohé z těchto ligáz pak mají tzv. RING-fingers doménu, obsahující zinek. Odstraněním zinku z této struktury je možné narušit funkci těchto E3 ligáz a zastavit tak degradaci tumorsupresorových proteinů jako p53 a p27 [104]. Například u cca 56% invazivních rakovin prsu se exprimuje E3 ligáza BCA2 (breast cancer associated gene 2), která hraje důležitou roli v životaschopnosti rakovinných buněk [105]. Bylo dokázáno, že disulfiram je schopen z tohoto proteinu vytrhnout zinek a inhibovat tak tento, pro rakovinu důležitý, protein [105-106].

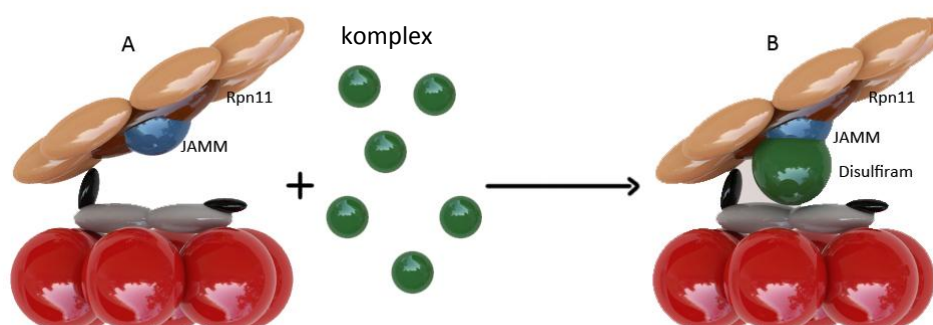
Antabus, proteazom a NF- κ B: Jak jsme viděli, disulfiram nepřímo interaguje s NF- κ B a UPS různými způsoby, tyto účinky jsou zapříčiněny zejména vysokou chelatační schopností nevázaného disulfiramu, který z proteinů vytrhává kovy a tím zastavuje jejich funkci. V předchozích případech disulfiram vystupoval především jako adjuvant, ovšem v případě, že se podá společně s kovem (zejména s mědí či zinkem), je pravděpodobné, že může vystupovat jako samostatné léčivo [107]. Disulfiram a jeho metabolit ditiokarb ochotně tvoří cheláty s kovy za vzniku komplexů a je prokázáno, že právě tyto komplexy ditiokarbamatů přímo inhibují NF- κ B inhibicí proteazomu [108].



Obr. 3.4: Chemická struktura Disulfiramu, Ditiokarbu a komplexu s mědí.

Původní teorie z počátku devadesátých let vysvětlující inhibici NF- κ B disulfiramem, říkala, že tato inhibice je způsobena tím, že dithiokarbamáty zabraňují degradaci I κ B, zamezením jeho fosforylace [109-110]. Následující teorie tvrdila, že vzhledem k tomu, že aktivace NF- κ B je způsobena i oxidativním stresem, může být tlumena dithiokarbamáty, které fungují jako antioxidanty [111]. Nicméně současná teorie je taková, že hlavním důvodem, proč tyto komplexy inhibují NF- κ B, je ten, že inhibují proteazom [112-114].

Nedávné studie ukázaly, že komplexy antabusu, na rozdíl od bortezomibu, nemají vliv na funkci 20S proteazomu, ale mohou mít vliv na 19S proteazom [115]. Předpokládá se, že tato aktivita souvisí s Poh1/Rpn11, jedním z proteinů víka proteazomu. Poh1/Rpn11 obsahuje JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) doménu, která má ve své struktuře zinek, tato podjednotka je zásadní pro deubikvitnaci proteinů, a tedy i pro život buňky [116-117]. Právě tato částice asi reaguje s komplexy disulfiramu s mědí (dále CuEt) a zinkem, což pravděpodobně způsobuje ztrátu funkce Poh1/Rpn11 a tím inhibici proteazomu [107-108, 116].



Obr. 3.5: Schéma interakce 19S proteazomu s CuEt: A) normální 19S proteazom, B) po interakci 19S proteazomu s CuEt se vstup do 26S proteazomu zablokuje a dojde k jeho inhibici.

Všechny tyto teorie spolu s důkazem, že CuEt je skutečně inhibitorem proteazomu [112], daly vzniknout klinické studii, která nyní probíhá v Utahu. Zde se testuje efektivita antabusu podávaného společně s glukonátem měďnatým proti nádorům jater [118]. Následně byly spuštěny další dvě klinické studie, jedna probíhá v Kalifornii [119] a druhá v Marylandu a Severní Karolíně [120].

Klinické testy v Utahu: Tyto testy byly zahájeny v červenci 2008, testuje se zde účinnost antabusu podávaného společně s glukonátem měďnatým. Obě tyto látky se podávají časově odděleně, aby se zamezilo negativním vedlejším účinkům. Glukonát měďnatý se bere ráno,

půl hodiny před snídaní, antabus se bere s večeří. Kromě toho, že tento harmonogram zabraňuje nežádoucím vedlejším účinkům, také zajišťuje, aby byla v době požití antabusu v krvi co největší koncentrace mědi, která ochotně tvoří s antabusem účinný komplex. Tyto testy se soustřeďují na primární a sekundární nádory v játrech, protože se předpokládá, že právě v játrech bude množství účinného komplexu nejvyšší a tudíž i efektivita bude nejlepší. Výsledky však zatím nejsou k dispozici. [118]

Problémy s financováním: Ačkoli jsou výsledky antabusu zatím velmi nadějně, je zde problém s financováním klinických testů. Málokdo chce totiž investovat do léku, který mu pravděpodobně v budoucnu nepřinese velké zisky. Antabus je, jak bylo řečeno, dlouho používaným a známým lékem, je již patentovaný a v české lékárně je k dostání za cca 400 Kč (50 tablet po 400 mg) [121], proto není investice do jeho nových klinických testů pro firmy atraktivní. Abychom pochopili, jak je schválení léku obtížné a nákladné nám poslouží další kapitola.

4. Než přijde nové léčivo na trh

Pro zlepšení kvality lékařské péče je nezbytné neustále vyvíjet nové postupy léčby. Neopomenutelné zastoupení v tomto procesu má vývoj nových léčebných látek (léků). Pro úspěch je nutná spolupráce vědců, lékařů a dobrovolníků a v neposlední řadě také sponzor nebo několik sponzorů, kteří zaplatí výlohy s vývojem a testování nového léku, které se může vyšplhat až ke stovkám miliónů dolarů. Sponzory jsou většinou farmaceutické firmy, které chtějí léčivo uvést na trh a vydělat na něm, proto jsou ceny nových léků relativně vysoké a např. léčba rakoviny je neuvěřitelně drahá. Celý proces uvedení na trhu je složitý a děje se tak v několika krocích (viz. níže), které se musí řídit přísnými pravidly pro vývoj a testování nových léčebných látek.

Preklinické hodnocení: Hlavním cílem těchto testů je zjistit co nejvíce informací o léčebné látce před tím, než je podána člověku. Existuje několik způsobů preklinického hodnocení:

In vitro: aplikování látky na tkáňové kultury, následně se pozoruje např. úmrtnost buněk, reaktivnost látky...

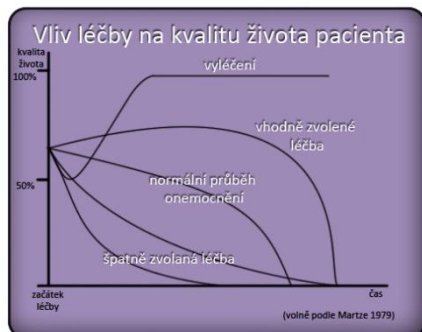


Obr. 4.1: schéma postupu vývoje léku

In vivo: látka se vpraví do zvířete, které bylo zbaveno vlastní imunity a poté je nakaženo nemocí, o níž nám jde. Pozorujeme celkový zdravotní stav nakaženého zvířete (u nádorů třeba to, zda se nádor zmenšil, zvětšil nebo zůstal stejné velikosti). Tyto pokusy jsou nezbytné před podáním přípravku člověku.

In silico: jedná se o zkoumání fyzikálních, chemických a farmaceutických vlastností léčebné látky pomocí počítačových modelů. Tento způsob se teprve v začátcích, hlavní vizí do budoucna je vytvoření kompletního softwaru, který by byl schopen na základě zadaných parametrů předpovědět vlastnosti zkoumané látky (kinetika, dynamika látky, adsorpce, penetrace...), tyto simulace by následně umožnily vyvinout nový přípravek rychleji a levněji. [128]

Všechny tyto testy mají vyhodnotit benefit a riziko spojené s podáním léku člověku. Hodnotí se například tyto aspekty: vztah dávka-účinek, toxicita, jak cílená tak vedlejší, dále teratogenní, mutagenní, kancerogenní a imunotoxický účinek na organismus. Jestliže se u testované látky shledá, že benefit převažuje rizika, pak je možno pořádat SÚKL (v České republice) o povolení zahájení vlastního klinického hodnocení a první podání látky člověku. [122, 124, 126-127]



Obr. 4.2: Vliv léčby na kvalitu života pacienta: Křivka uprostřed ukazuje nemocného, který není nijak léčen a onemocnění u něj probíhá přirozeně. Vhodným zvolením léčby můžeme buď dosáhnout kompletního vyléčení, nebo pozvednutím kvality života, například potlačením symptomů onemocnění, prodloužením života atd. Naopak nevhodně zvolenou léčbou se kvalita života zhorší a může dojít i k předčasné smrti.[129]

Klinické hodnocení: Hlavním cílem těchto testů je zjistit působení léčivé látky na člověka, má několik fází. Tyto testy se provádějí většinou v zařízeních, kde je dobrovolník po celou dobu pokusu pod přísným lékařským dohledem.

Fáze I: První podání léku člověku. Této studie se většinou účastní zdraví nebo nevléčitelně nemocní (testování cytostatik). Testuje se jen malá skupina dobrovolníků (cca 20-100 lidí). Hlavním cílem těchto pokusů je zjistit vliv léčebné látky na lidský organismus. Sleduje se tolerance na přípravek, farmakokinetika a farmakodynamika léku. Dalším cílem těchto testů je zjistit optimální dávku, dobrovolníkům se nejdříve podá jen zlomek odhadované konečné

dávky a následně se dávka zvyšuje. Zjišťuje se také, který způsob podání je nejvhodnější (tablety, do krve, do svalů...).

Fáze II: Zvána také *“Pilot trial”*. Hlavním cílem je zjistit účinek a bezpečnost látky u nemocných. Účastní se jí větší skupina dobrovolníků (cca 30-200). V této fázi se hledá nejefektivnější časový odstup jednotlivých dávek a možné kontradikce. Právě v této fázi se většinou ukáže, že látka nepracuje, jak se plánovalo, nebo vykáže toxicitu.

Fáze III: Klinický kontrolovaný pokus. Účastní se ho mnoho dobrovolníků (300-10000) a může se provádět i v několika zařízeních najednou. Hlavním cílem je zjistit, jak je nový lék účinný ve srovnání s dosud užívaným lékem. Dobrovolníci jsou náhodně rozdělení (randomizování) do dvou skupin, první se podává testovaná látka druhé skupině placebo. Objektivnost zajišťuje mimo jiné i to, že dobrovolník neví, zda bere testovanou látku nebo placebo. Jestliže lék projde všemi fázemi testování, je možné jej předložit k registraci. V České republice je možné lék registrovat buď u SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv) nebo u EMEA (Evropská léková agentura).

Registrace: V tomto kroku SÚKL nebo EMEA hodnotí veškerou dokumentaci pořízenou na základě I.-III. fáze klinického hodnocení. Výsledkem je závěrečná zpráva s příslušným rozhodnutím. Povolení léku uděluje SÚKL na pět let, poté si musí výrobce zažádat o prodloužení tohoto povolení. SÚKL v ČR průměrně posuzuje 300 léků ročně. V ČR se při schvalování léčiva postupuje podle legislativy EU. [125]

IV. fáze: *“Postmarketingová fáze”*. Sleduje bezpečnost léku z dlouhodobého hlediska. Sledují se kontradikce s jinými léky či s potravinami, vliv léku na různé skupiny lidí (děti, staří lidé, těhotné ženy...). Hlavním cílem těchto pozorování je konečné doplnění informací o indikaci, kontradikci a dávkování. Pokud se zjistí, že látka vykazuje vedlejší účinky, o kterých se před tím nevědělo, může být stažena z trhu. [122-123, 126-127]

Závěr: Než je nové léčivo uvedeno na trh musí projít mnoha testy a zkouškami. Jedná se o komplikovaný proces, na němž se podílí mnoho vědců, lékařů a dobrovolníků. Nesmíme také zapomínat, že než se lék dostane k uživateli, zabere to roky zkoumání a značné množství peněz a i pak může být přípravek z trhu stažen pro dříve nedekovaný vedlejší účinek.



Obr. 4.3: Schema délky vývoje nového léku: Časové údaje jsou pouze ilustrativní, vývoj léku může trvat i mnohem déle.

4.1 Nezisková léčiva

Za posledních 10 až 15 let bylo do vývoje jednoho léčiva průměrně investováno mezi pětistý miliony a dvěma biliony USD [130,131], což není zanedbatelná částka, nicméně přestože se investice do vývoje neustále zvyšují, počet nově schválených léčiv se nezvyšuje, ba naopak od roku 1990 poklesl [130]. Tento fenomén je jasným důkazem toho, že momentální systém vývoje a schvalování léčiv je značně neefektivní a potřebuje změnu. Jedním z navrhovaných řešení je nové použití již existujících léků [131].

Hlavní výhodou tohoto přístupu je snížení nákladů. Existující lék již prošel testy bezpečnosti a toxicity a proto může přejít rovnou do II. fáze klinických testů, takto může celý proces schválení léku zlevnit až o 40% [132].

Již dnes je známo několik léčiv, které díky tomuto přístupu využívají pro léčbu rakoviny [133]. Arzenik, původně užívaný pro léčbu syfilis se dnes ve formě trioxidu užívá pro léčbu promyelocytární leukémie [134], jako terapie této nemoci se také využívá Tretonion, původně určen pro léčbu těžkého akné [135]. Thaladomid, vyvinut pro léčbu ranních nevolností během těhotenství, který byl následně stažen z trhu kvůli teratogenním účinkům, se dnes používá pro léčbu mmj. mnohočetného myelomu [136]. Všechny tyto objevy jsou důkazem toho, že nové využití známých léků není cesta špatným směrem.

Nicméně tento přístup s sebou nese i zásadní problém. Přestože by se takto náklady na schválení nového užití stávajícího léku výrazně redukovaly, stále se za klinické testy musí platit a farmaceutické firmy a laboratoře vlastně nemají důvod do tohoto testování investovat, protože na rozdíl od úplně nového léku, nemohou na starý lék získat patent a nemohou na něm zbohatnout [130].

A právě z tohoto důvodu vznikají organizace jako je Global Cures, která získává peníze od vlád a neziskových organizací na rozjetí klinických testů léků, do kterých by jinak nikdo neinvestoval [137].

Další cestou, jako nově užívat známé léky je takzvaný off-label use (mimoznačkové použití), to znamená, předepisování známých léků k jiným účelům, než na které byly vyvinuty. Tento přístup je volen hlavně ve dvou případech: 1. pokud jsou přesvědčivé vědecké či klinické důkazy, že by mohl pacientovi pomoci, ačkoli ještě není oficiálně schválen a za 2. u vzácných nemocí, u kterých je velmi obtížné spustit klinickou studii, kvůli nedostatku

pacientů. Zejména v onkologii by byl tento přístup velmi užitečný, protože existuje nepřehledné množství typů rakovin a jedna látka většinou může léčit větší počet z nich [138]. Tento přístup se v některých zemích nachází v šedé zóně zákona, v některých, jako v ČR je zakázán.

Pro oba tyto přístupy jsou však nutné informace, proto se uvažuje o novém konceptu postmarketingové fáze. Dnes se v ní ověřují jen negativní vedlejší účinky, ovšem vize pro budoucnost je změnit přístup tak, aby se zjišťovaly i vedlejší účinky pozitivní. Na internetu je již dnes v provozu několik internetových serverů, kde je možno se získat informace o nemoci a léčbě, podělit se svými zkušenostmi, popřípadě získat kontakt s podobně postiženými lidmi, tento přístup zajišťuje aktivní přístup pacientů a jejich rodin a může mít pozitivní dopad při hledání nových využití starých léků. [130]

Nunost změnu stávajícího systému schvalování léčiv vytyčil i ve svém článku i šéf FDA F. Colins [139].

5. Praktická část

Cíl práce: Cílem práce je stanovit, zda má komplex disulfiramu s mědí signifikantní aktivitu proti buňčné linii A549 odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic. Metodou použitou pro tento účel byl test toxicity tzv. MTT assay.

5.1 Materiál a vybavení laboratoře:

Biologický materiál: buněčná linie odvozená od nemalobuněčného karcinomu plic A549.

Vybavení laboratoře:

Přístroje a zařízení: autokláv PS20A Chirana, Česká republika; box skříňový mrazicí (-80) SAN Sanyo, Japonsko; centrifuga spectrafuge 5415R eppendorf; centrifuga 5810R eppendorf; centrifuga Mini Labnet International, USA; centrifuga MR22i Jouan, USA; Inkubátor Contherm, Nový zeland; lednice Calex, Česká republika; mikroskop T2 103411 Olympus, ČR; kahan; laminární box SafeFASTTop, faster, Itálie; napěťový zdroj Enduro 300V , Labnet, USA; pipeta multi-kanálová (30-300 μ M), biohit Proline plus; pipetovací nástavec SWIFTPET+ (Pipeta floubox), PZ HTL S.A.; přístroj na výrobu deionizované vody, Aqua osmotic, Česká republika; sada pipet (0,1-2,5 μ M, 0,5-10 μ M, 2-20 μ M, 10-100 μ M, 50-200 μ M, 100-1000 μ M) Eppendorf; spektrofotometr Tecan, Švýcarsko;

třepačka Reax top Heindolpoh, Německo; váhy AFP 210L, USA; váhy Kern ABS 80-4 , Německo; vodní lázeň vodní lázeň LCB 11(330 x270x380) LabTech, Česká republika; výrobník ledu F100 Compact, ČR.

Plasty: centrifugační zkumavky, konické 50ml (Orange Scientific); centrifugační zkumavky, konické 15ml (Orange Scientific); epTIPS 0,1 - 10 μ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf); epTIPS 2 - 200 μ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf); epTIPS 50 - 1 000 μ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf); expell 200 ul (špičky nesterilní bez filtru); expell 10 ul (špičky nesterilní bez filtru); kultivační destičky 96 jamkové (Orange Scientific); kultivační destičky 24 jamkové (Orange Scientific); kultivační destičky 6 jamkové (Orange Scientific); kultivační láhev 25 cm², filter cap (Orange Scientific); kultivační láhev 75 cm², filter cap (Orange Scientific); kultivační láhev 150 cm², filter cap (Orange Scientific); kultivační miska 100mm, PS (Orange Scientific); mikrozukavky 0,5ml (Tubes for you); mikrozukavky 1,5ml (Tubes for you); mikrozukavky 2 ml (Tubes for you); Pipette Tip, 1000 ,Type A Gelloading (bioplastic); stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití 2ml (Chirana).

Chemikálie a roztoky: Amoniak-vodný roztok 25%,10001-25A, Lach:Ner; Bortezomib, Millenium Pharmaceuticals; Cis-platina 479306-1G Sigma-Aldrich; CuCl₂, 307483-100G Sigma-Aldrich; Diethyldithiokarbamát sodný trihydrát, 22,868-0 Sigma-Aldrich; Etanol 65%; Fetal Bovine Serum; Komplex diethyldithiokarbamátu Cu(EtDTC)₂, Mgr. Boris Cvek Ph.D.; L-glutamin G63921-VL Sigma-Aldrich; MTT roztok: 3 mg MTT/ml PBS; MTT rozpouštěcí roztok: DMSO/ 1% NH₃; Penicilin streptomycin (100x) P11-010 PAA5%; PBS 1x (pH 7,4) NaCl 4g, KCl 0,1g, Na₂HPO₄x12 H₂O 1,605g, KH₂PO₄ 0,01g; RPMI-1640 Medium; With sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, cell culture tested, R0883-6X500ML, Sigma-Aldrich; Triton-X 100, 37240, Serva; Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich; Trypsin-EDTA solution; 0.25%, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA . 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red, sterile-filtered, cell culture tested, T4049-500ML Sigma-Aldrich; Zmrazovací médium: FBS/DMSO (9:1); Zásobní roztok bortezomibu 3,5 mM (w/v) DMSO; Zásobní roztok Cu(EtDTC)₂ v DMSO (20 mM) - z důvodu nízké stability komplexu byl roztok připravován vždy před začátkem experimentu.

5.2 Metody:

Při práci s buněnými liniemi je nutné dbát několika zásad, abychom linie nepoškodili či nenakazili nějakou bakteriální, plísňovou či houbovou infekcí. Linie vždy uchováváme ve

sterilních podmínkách a pracujeme s nimi jen ve sterilním laminárním boxu. Rovněž roztoky, které s liniemi přicházejí do styku musí být sterilní – to je zajištěno autoklávováním. Abychom linie nepoškodili je vždy před prací nutné ohřát médium a PBS 1x na fyziologickou teplotu cca 37°C.

Práce s buněčnými liniemi:

Rozmražení buněčné linie: Rozmražení buněk provádíme, když chceme začít pracovat s buňkami dlouhodobě uschovanými v mrazícím boxu při -80°C. Před samotným rozmražením je nejdříve nutné ohřát si médium na cca 37°C ve vodní lázni. Buňky vyjmeme z mrazáku a přeneseme je na pracovní plochu. Poté si vlijeme 10 ml ohřátého média do flakonky a pipetou přeneseme 1 ml tohoto média do kryozkumavky a nasáváním a vypoštěním média z pipety postupně buňky rozmrazujeme a přenášíme do kultivační láhve (25 cm²). Postup opakujeme dokud nejsou všechny buňky rozmrazeny. Poté přemístíme kultivační láhev do inkubátoru (5% CO₂, 37°C) a necháme inkubovat po 24 hodin – poté vyměníme médium.

Pasážování buněčné linie: Pasážování buněk slouží k předcházení přerostení linie v kultivační láhvi. Před samotným pasážováním vždy posoudíme stav kolonie pomocí inverzního mikroskopu, pokud usoudíme, že konfluence buněk dosáhla zhruba 90%, pasážujeme. Buňky byly většinou pasážovány cca 3x týdně (co 2-3 dny). Nejříve z kultivačních lahví odsajeme staré kultivační médium, přidáme přibližně 6 ml PBS 1x a povrch na kterém rostou buňky opláchneme, PBS 1x následně odsajeme. Poté pipetujeme 1 ml trypsinu (v případě, že pracujeme v kultivační láhvi 75 cm², v případě, že pracujeme s jiným typem láhve, objem trypsinu a následně použité objemy náležitě upravíme). Po přidání trypsinu láhev vložíme do inkubátoru s přednastavenými 37°C a necháme trypsin přibližně dvě minuty působit. Následně láhev vyndáme z inkubátoru, pod mikroskopem zkontrolujeme míru trypsinizace, pokud je dostatečná, láhev několikrát proklepneme, aby buňky sjely ze stěny a přidáme 9 ml média pro zneutralizování trypsinu a rozsuspendujeme. Přibližně 8 ml suspenze přeneseme do předem připravené zkumavky pro další práci s buňkami. Ke zbytku přidáme kultivační médium a umístíme do inkubátoru. Kvůli nebezpečí kontaminace je nutné měnit láhev vždy cca po třech pasážích.

Počítání buněk: Počítání buněk je nezbytné pro zjištění množství buněk v suspenzi. Z připravené suspenze z předchozího kroku si odebereme 10 µl a vložíme do mikrozukavky. Přidáme 90 µl trypanové modři a promícháme. Z takto připravené suspenze odpipetujeme 10 µl do Bürkeho komůrky, přikryjeme krycím sklíčkem a vložíme pod mikroskop. Buňky

počítáme v náhodně vybraných čvercích ohraničených dvěma čarami. Konečný počet v ml získáme tak, že součet počtů buněk ze čtverců vyděláme deseti a následně vynásobíme 10^5 .

Zamražení buněk: Metoda zamrazování je výhodná, pokud chceme buňky dlouhodobě uchovat a nepracovat s nimi. Buňky připravené ze ve zkumavce z pastování stočíme při 1500 rpm po tři minuty. Buňky nám přisednou ke stěně zkumavky a my odsajeme médium. Následně přidáme roztok FBS/DMSO (9:1). Buňky tímto roztokem co nejrychleji rozsuspendujeme a vpipetujeme do kryoskumavek. Co nejrychleji umístíme do mrazíčního boxu a uchováváme při -80°C .

Testy toxicity - MTT assay:

Princip metody: Před samotným testem se buňky nechají inkubovat se zkoumanou látkou, která je rozpuštěná v sérovém médiu. Každá z koncentrací zkoumané látky musí být v tripletu a musí být použita pozitivní (čisté médium) a negativní (triton) kontrola.

U MTT testů se vychází z předpokladu, že živé buňky mají funkční mitochondriální dehydrogenázy, zatímco mrtvé či poškozené buňky nikoli. Tyto dehydrogenázy jsou schopné redukovat methylnitrotetrazoliové soli, které mají v oxidovaném stavu žlutou barvu, zatímco ve stavu redukovaném tmavě fialovou. Platí tady přímá úměra: čím větší počet životaschopných buněk, tím více funkčních mitochondriálních dehydrogenáz a tím větší množství fialového produktu, ten možno detekovat spektrofotometrickými metodami.

MTT nám tedy umožní stanovit změnu počtu buněk inkubovaných ve zkoumané látce vzhledem ke kontrole. Hlavní výhodou tohoto testu je jeho jednoduchost, rychlost a finanční nenáročnost, nevýhodou pak je, že nemůžeme určit přesnou příčinu smrti buněk a navíc při opakování může nastat poměrně vysoká chyba měření.

Provedení: Před samotným provedením si nejdříve spočítáme buňky a zředíme si je v suspenzi tak, aby počet buněk byl přibližně 25000 buněk/ 200 μl . Připravíme si 96 jemkovou desku a spočítáme si, kolik jamek budeme potřebovat: musíme počítat s tím, že každou látku budeme testovat v několika koncentracích a v tripletu, dále se musíme připravit jamky pro negativní a pozitivní kontrolu – rovněž v tripletu. Následně do jamek nepipetujeme 200 μl předem připravené suspenze a necháme v inkubátoru inkubovat 24 hodin při 37°C aby se nám buněčné kolonie rozrostly. Po uplynutí této doby skontrolujeme rovnoměrnost výsevu buněk mikroskopem. Pokud jsou dna jamek rovnoměrně porostlé buňkami přistoupíme k dalšímu kroku. Odsajeme staré médium a nepipetujeme nově připravené – se zkoumanou látkou. Kromě roztoků testovaných látek nezapomene ještě přidat pozitivní kontrolu – čisté

médium, negativní kontrolu (140 μ l média + 60 μ l 20% tritonu) a kontrolu pro vliv rozpouštědla (médium + rozpouštědlo ve stejné koncentraci jako ve vzorcích). Destičku si následně přehledně popíšeme a opět vložíme do inkubátoru a inkubujeme po dobu zvolenou v návrhu experimentu. Po uplynutí této doby destičku vyjmeme, médium vyklepneme a každou jamku promyjeme 100 μ l PBS 1x. Následně přidáme MTT roztok - MTT: medium = 1: 9. A necháme inkubovat 40-60 min v inkubátoru při 37°C. Následně destičku vytáhneme, vyklepneme a do jamek nepipetujeme 100 μ l rozpouštěcího roztoku DMSO + NH_3 . Měl by nám vzniknout fialový produkt. Nakonec absorbanci jednotlivých jamek změříme spektrofotometru při vlnové délce 570 nm a výsledné naměřené hodnoty přepočítáme na viabilitu buněk v jednotlivých jamkách.

5.3 Výsledky

5.3.1: aktivita CuEt při 24 hodinové inkubaci

Cíl experimentu: Dokázat, zda komplex CuEt vykazuje vyšší toxicitu vůči buněčné linii odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic A549 než jeho jednotlivé složky – měď a dithiodiethykarbamát. Zároveň také porovnat jeho toxicitu s toxicitou jiného inhibitoru proteazomu – bortezomibu.

Použité látky:

1. CuCl_2 – koncentrace 900 μ M, 800 μ M, 600 μ M a 400 μ M.
2. Dithiodiethykarbamát sodný - koncentrace 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M a 10 μ M.
3. CuEt - koncentrace 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M a 1 μ M.
4. Bortezomib - koncentrace 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M a 0,001 μ M.

Výsledky: V tabulce 5.1 jsou uvedeny viability při jednotlivých koncentracích roztoků, průměrná IC_{50} a směrodatná odchylka. Z výsledků je patrné, že nejvyšší toxicitu vykazuje bortezomib a to 1,07 μ M, IC_{50} komplexu CuEt pak bylo asi desetinásobně vyšší a to 10,87 μ M, jednotlivé části komplexu pak měly toxicitu výrazně nižší - dithiodiethykarbamát sodný 357,2 μ M, nicméně této hodnoty není možné reálně dosáhnout, kvůli rozpustnosti této látky – z toho plyne, že dithiodiethykarbamát sodný je prakticky netoxický. Nejvyšší IC_{50} měl pak CuCl_2 a to 787,03 μ M. Grafické srovnání těchto hodnot pak můžeme vidět v grafech 5.1 a 5.2, ze kterých je jasně patrné, že nejvyšší toxicitu vykazuje bortezomib a nejnižší CuCl_2 . Poté, co jsme stanovili IC_{50} u všech látek jsme použili šestijamkovou kultivační desku a nechali buňky inkubovat po 24 hodin při 37°C při IC_{50} jednotlivých látek (kromě

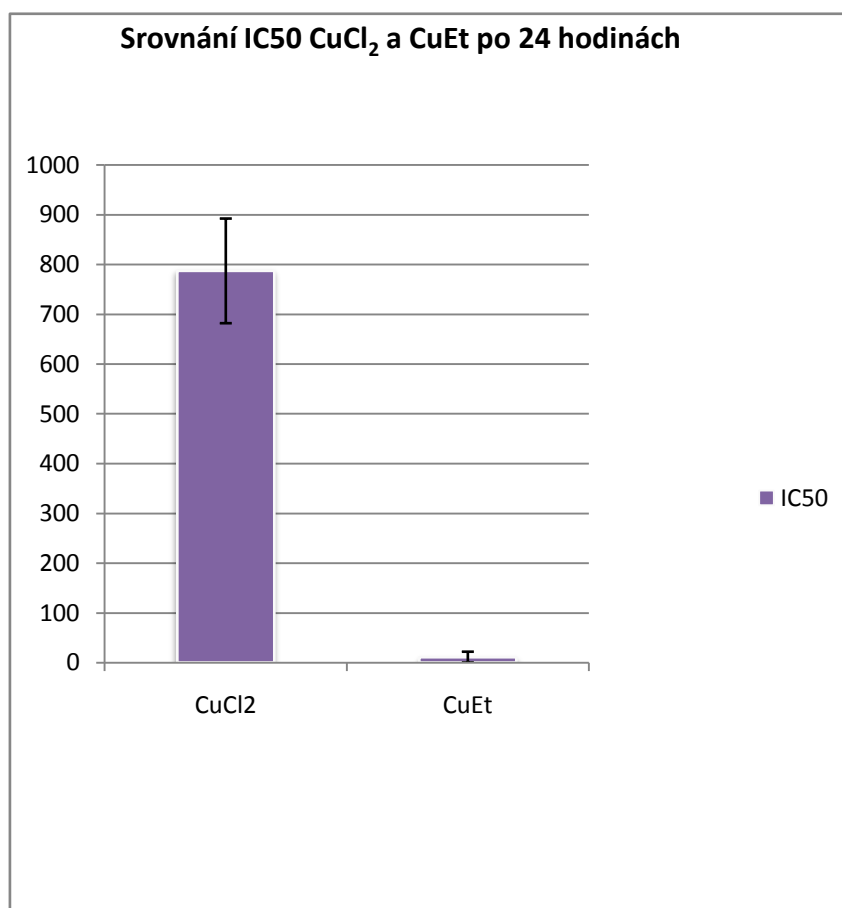
dithiodiethykarbamátu sodného, jehož IC50 nelze v roztoku dosáhnout) a následně mikroskopem pozorovali morfologické změny buněk v porovnání s kontrolou viz. tabulka 5.2. Na první pohled je patrné, že hustota buněk při koncentracích IC50 je přibližně poloviční než u kontroly, což je pochopitelné, dále můžeme vidět, že největších morfologických změn doznaly buňky kultivované s CuEt. Je možné zahlédnout apoptické váčky a celkovou změnu morfologie buněk. U CuCl₂ a bortezomibu nebyly změny morfologie až tak výrazné.

Tab. 5.1: Výsledky 24 hodinové inkubace buněk A549 s CuCl₂, dithiodiethykarbamátem sodným, CuEt a bortezomibem – viability při jednotlivých koncentracích, průměrné IC50 a směrodatná odchylka.

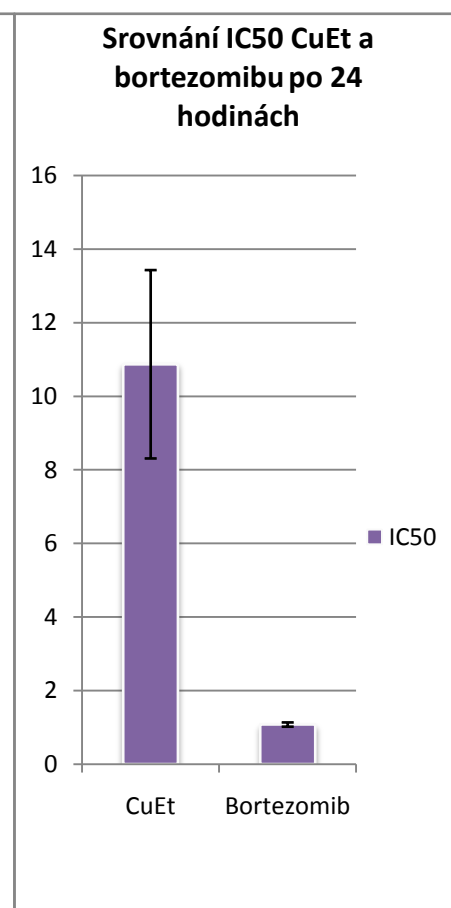
CuCl ₂					
c (μM)	Experiment 1 Viabilita (%)	Experiment 2 Viabilita (%)	Experiment 3 Viabilita (%)		
900	25,8	37,4	35,9		
800	30,9	50,1	43,5		
600	45,2	59,9	43,1		
400	79	77,3	100	Průměr IC50	Směrodatná odchylka
IC50	729,6	908,4	723,1	787,03	105,16
Dithiodiethykarbamát sodný					
c (μM)	Viabilita (%) Experiment 1	Viabilita (%) Experiment 2	Viabilita (%) Experiment 3		
200	70,6	74,3	64,7		
100	83,9	87,6	93		
50	100,1	91,3	93		
10	105,6	96	92,5	Průměr IC50	Směrodatná odchylka
IC50	285,59	437,7	348,3	*	
* IC50 > 200 – není jej možné dosáhnout kvůli rozpustnosti dithiodiethykarbamátu sodného.					
CuEt					
c (μM)	Viabilita (%) Experiment 1	Viabilita (%) Experiment 2	Viabilita (%) Experiment 3		
10	50,9	50,3	53,9		
5	47,7	83,2	57,7		
2,5	60,2	88,9	88		

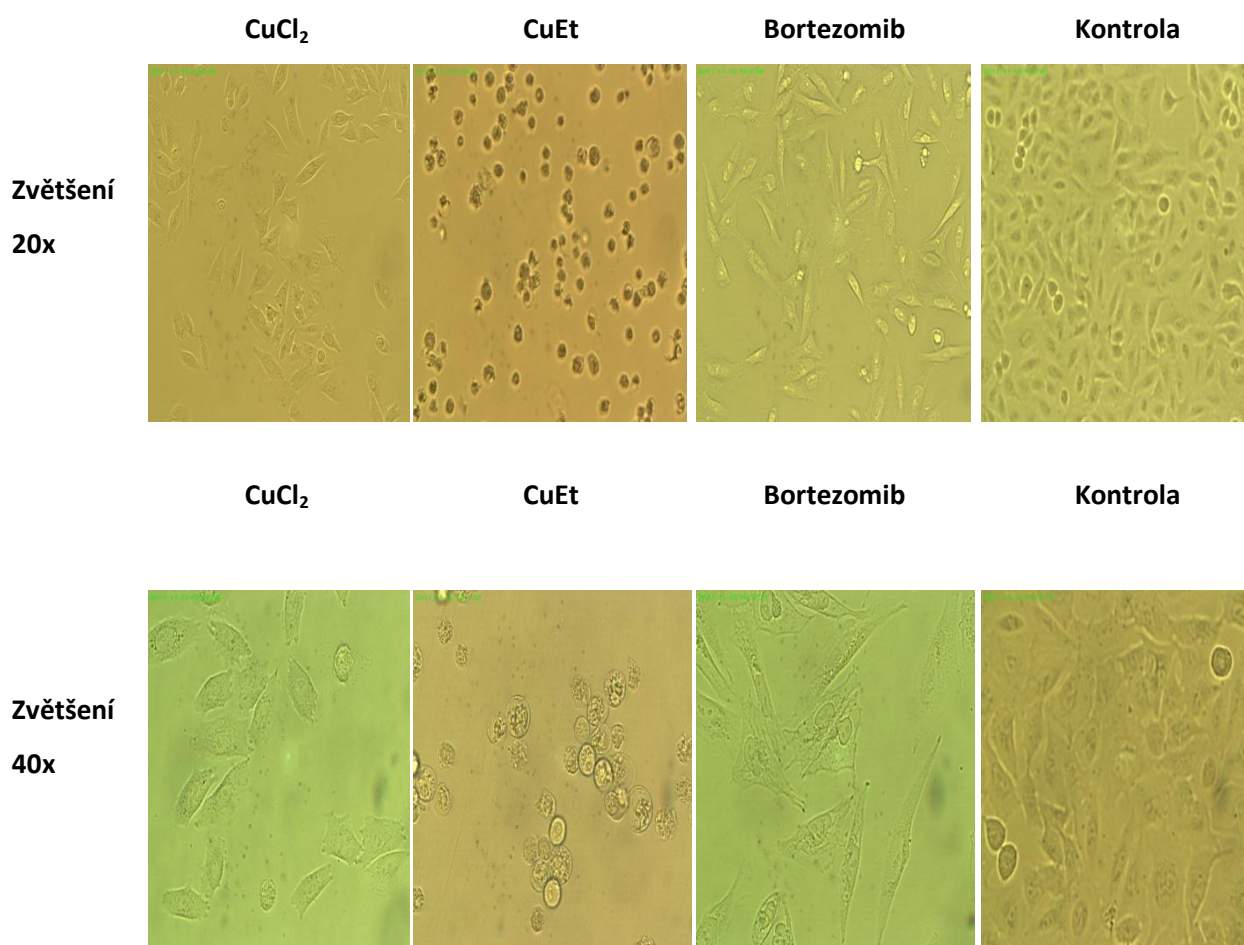
1	74,6	109,3	100	Průměr IC50	Směrodatná odchylka
IC50	13,82	9,28	9,5	10,87	2,56
Bortezomib					
c (μ M)	Viabilita (%) Experiment 1	Viabilita (%) Experiment 2	Viabilita (%) Experiment 3		
1	56	37,2	48,7		
0,1	68	57,1	77		
0,0					
1	95	66,8	89,5		
0,001	100	72,5	86,6	Průměr IC50	Směrodatná odchylka
IC50	1,1209	1,009	1,092	1,07	0,06

Graf. 5.1: Srovnání IC50 CuCl₂ a CuEt po 24 hodinách:



Graf. 5.2: Srovnání IC50 CuEt a bortezomibu po 24 hodinách:



Tab. 5.2: srovnání morfologie buněk linie A549 při IC50 jednotlivých látek:

5.3.1: aktivita CuEt při 48 hodinové inkubaci

Cíl experimentu: Ověřit si, zda vzhledem k morfologickým změnám buněk při IC50 CuEt z předchozího experimentu, neklesne toto IC50 při delší inkubaci buněk s CuEt, pro srovnání jsme použili také bortezomib.

Použité látky:

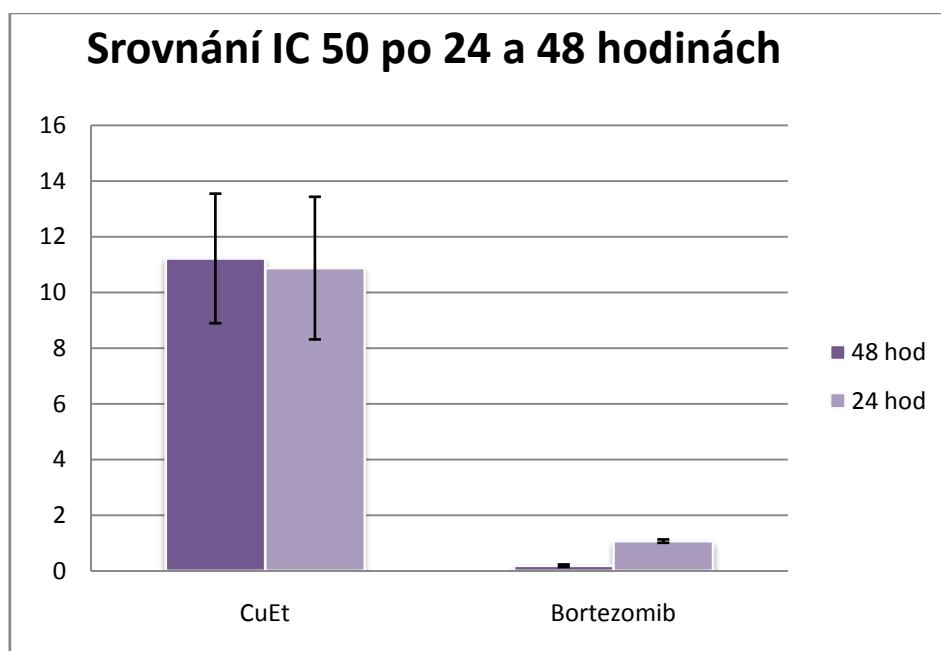
1. CuEt - koncentrace 10 μM , 5 μM , 2,5 μM a 1 μM .
2. Bortezomib - koncentrace 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM a 0,001 μM .

Výsledky: V tabulce 5.3 jsou uvedeny viability při jednotlivých koncentracích roztoků, průměrná IC50 a směrodatná odchylka. Z výsledků je patrné, že vyšší toxicitu vykazuje bortezomib a to 0,19 μM , IC50 komplexu CuEt pak bylo asi stonásobně vyšší a to 11,21 μM . V grafu 5.3 je pak na porovnání IC50 při 24 hodinové a 48 hodinové inkubaci patrné, že IC50 CuEt se prakticky nezměnilo, zatímco IC50 bortezomibu kleslo desetkrát.

Tab. 5.3: Výsledky 48 hodinové inkubace buněk linie A549 s CuEt a bortezomibem– viability při jednotlivých koncentracích, průměrné IC50 a směrodatná odchylka.

CuEt					
c (μM)	Viabilita (%) Experiment 1	Viabilita (%) Experiment 2	Viabilita (%) Experiment 3		
10	55	105	63		
5	62	116	68		
2,5	90	128	84		
1	91	161	123	Průměr IC50	Směrodatná odchylka
IC50	11,3	13,5	8,85	11,22	2,33
Bortezomib					
c (μM)	Viabilita (%) Experiment 1	Viabilita (%) Experiment 2	Viabilita (%) Experiment 3		
1	17	11	12		
0,1	42	41	35		
0,0					
1	53	48	49		
0,001	123	140	118	Průměr IC50	Směrodatná odchylka
IC50	0,23	0,14	0,19	0,18	0,05

Graf 5.3: srovnání IC50 CuEt a bortezomibu po 24 a 48 hodinách inkubace.



5.3.1: srovnání aktivity CuEt a cisplatiny při 24 hodinové inkubaci.

Cíl experimentu: Porovnat toxicitu cisplatiny a CuEt vůči buněčné linii A549 odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic při 24 hodinové expozici.

Použité látky:

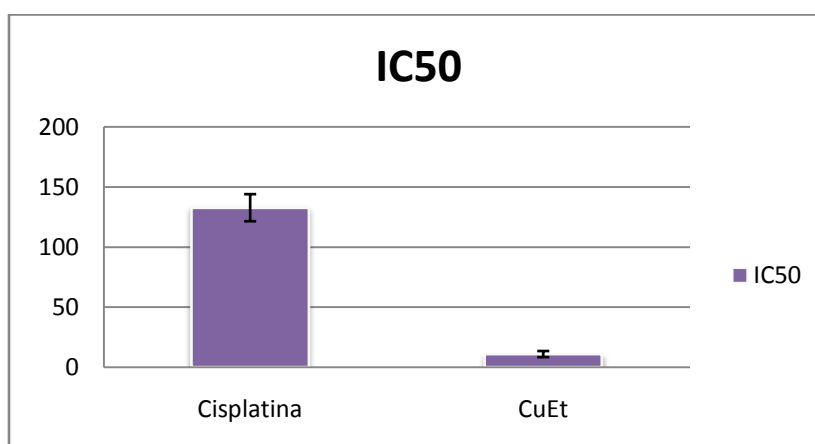
1. CuEt - koncentrace 10 μM , 5 μM , 2,5 μM a 1 μM - viz. 5.3.1: aktivita CuEt při 24 hodinové inkubaci.
2. Cisplatin - koncentrace 150 μM , 100 μM , 50 μM a 25 μM .

Výsledky: V tabulce 5.4 jsou uvedeny viability při jednotlivých koncentracích roztoků, průměrná IC50 a směrodatná odchylka. Průměrné IC50 cisplatiny bylo 132,6 μM , zatímco CuEt 10,87 μM . Grafické srovnání těchto hodnot pak můžeme vidět v grafu 5.4. Je patrné, že CuEt má v buněčné linii A549 více jak desetinásobnou aktivitu při porovnání s cisplatinou.

Tab. 5.4: Výsledky 24 hodinové inkubace buněk linie A549 s cisplatinou – viability při jednotlivých koncentracích, průměrné IC50 a směrodatná odchylka.

Cisplatin					
c (μM)	Viabilita (%) Experiment 1	Viabilita (%) Experiment 2	Viabilita (%) Experiment 3		
150	30,5	45,9	40,6		
100	53,7	74,2	61,7		
50	91,1	78,5	79,7		
25	90,5	101,2	94,7	Průměr IC50	Směrodatná odchylka
IC50	121,1	143,6	133,2	132,6	11,3

Graf 5.4: Srovnání IC50 cisplatiny a CuEt po 24 hodinách:



5.4 Diskuze

IC₅₀ CuCl₂ je 787,03 μM, dithiodiethykarbamátu sodného 357,2 μM, CuEt 10,87 μM a bortezomibu 1,07 μM. Z výsledku je patrné, že dithiodiethykarbamát sodný je netoxický z důvodu jeho rozpustnosti, CuCl₂ je pak toxický až při vysokých koncentracích – ovšem vzhledem k tomu, že této koncentrace nelze v krvi dosáhnout, je netoxický. CuEt je pak daleko více toxický než jeho jednotlivé části (měď a dithiodiethykarbamát). Při porovnání CuEt a bortezomibu má bortezomib desíkrát vyšší toxicitu, nicméně faktem zůstává, že přestože v *in-vitro* testech u nemalobuněčném karcinomu plic bortezomib dosahuje skvělých výsledků [77-79], *in vivo* či během klinických testů v pevných nádorech selhává [56], tento fakt je nejspíš dán tím, že bortezomib je relativně veliká a k tomu polární molekula a má problém se dostat dovnitř tumoru [71]. Naproti tomu CuEt je látka nepochární a snadno pronikne do organismu - projde například i hematoencefalickou bariérou [140], proto je zde celkem vysoká pravděpodobnost, že přestože vykazuje nižší toxicitu vůči buňkám nemalobuněčného karcinomu plic *in vitro*, *in vivo* bude situace jiná.

Při porovnání morfologických změn na buňkách je patrné, že CuEt způsobuje daleko zřetelnější změny morfologie, dokonce indukuje vznik apoptických váčků. Proto jsme předpokládali, že při delší expozici CuEt se poměr IC₅₀ bortezomibu a CuEt změní – mysleli jsme, že toxicita CuEt se při delší expozici zvýší, zatímco toxicita bortezomibu zůstane přibližně na stejné úrovni. Nicméně opak byl pravdou. Jedním z možných vysvětlení tohoto efektu je ten, že výsledky působení komplexu se dostaví až po nějaké době – viz. [93], kde se účinek dostavil až po třech měsících, zatímco účinek bortezomibu se dostavil již po cca 42 dnech [36]. Dalším možným vysvětlením tohoto jevu pak je to, že CuEt se může rozpadat a tím se snižuje jeho účinnost, proto se v klinických testech disulfiram bere každý den [118], zatímco bortezomib se bere v cyklech (1 cyklus - 21 dní, lék se bere 1, 4, 8 a 11 den, pak následuje 10 dnů pauzy) [36].

Cisplatina je hojně rozšířená chemoterapeutická látka a samotná či v kombinacích s dalšími látkami se používá jako terapie nejrůznějších typů rakovin, včetně nemalobuněčného karcinomu plic [19, 20]. Látky, které proti buněčným liniím vykazují vyšší toxicitu než právě cisplatina, bývají často považovány za možné budoucí chemoterapeutika [141]. IC₅₀ cisplatinu proti buněčné linii A549 bylo naměřeno 132,6 μM, zatímco IC₅₀ CuEt proti stejné buněčné linii bylo pouhých 10,87 μM. To znamená, že CuEt vykazuje více jak

desetinásobnou toxicitu oproti této buněčné linii než cisplatina a to z tohoto komplexu činí dobrým adeptem pro další testování.

Ovšem při pohledu na tyto výsledky nesmíme zapomínat, že MTT testy jsou značně nepřesné a měly by nám sloužit pouze jako orientační ukazatele, zda látky nějakou aktivitu vůči buňkám vykazují či nikoli. Abychom mohli o nějaké látce prohlásit, že je možnou budoucí aktivní látkou v boji proti rakovině, MTT testy nestačí, látku je potřeba podrobit dalším testům, zejména na zvířatech, abych si tento předpoklad potvrdili.

5.5 Závěr

IC₅₀ komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic A549 bylo naměřeno 10,87 μM. IC₅₀ CuCl₂ bylo naměřeno 787,03 μM a IC₅₀ dithiodiethykarbamátu sodného 357,2 μM. Tímto měřením jsme si potvrdili původní předpoklad, že CuEt vykazuje daleko vyšší toxicitu než jeho jednotlivé části (měď a dithiodiethykarbamát). IC₅₀ komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí bylo také mnohonásobně vyšší než IC₅₀ cisplatiny proti stejné linii. To spolu se skutečností, že antabus v kombinaci s mědí za vzniku CuEt nevykazuje prakticky žádné závažné vedlejší účinky, z něj dělá zajímavou látku pro další testování a možné budoucí chemoterapeutikum pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic.

Zdroje:

- [1] <http://www.webmd.com/lung/picture-of-the-lungs>
- [2] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- [3] <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>
- [4] Marshall E. Cancer research and the \$90 billion metaphor. *Science* 2011, 602, 1540-1541.
- [5] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians* 2011, 61, 69-90.
- [6] <http://lungcancer.about.com/od/causesoflungcance1/a/smokinglungcancer.htm>
- [7] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survival. *Mayo Clinic Proceedings* 2008, 83, 584-594.

- [8] <http://lungcancer.about.com/od/causesoflungcance1/a/causeoverview.htm>
- [9] http://en.wikipedia.org/wiki/Lung_cancer
- [10] Kim KH, Jahan SA, Kabir E. A review of diseases associated with household air pollution due to the use of biomass fuels. *Journal of Hazardous Materials* 2011, 192, 425-431.
- [11] Taeger D, Fritsch A, Wiethège T, Johnen G, Eisenmenger A. Role of exposure to radon and silicosis on the cell type of lung carcinoma in German uranium miners. *Cancer* 2006, 106, 881-889.
- [12] Benedetti A, Parent ME, Siemiatycki J. Consumption of alcoholic beverages and risk of lung cancer: results from two case-control studies in Montreal, Canada. *Cancer Causes Control* 2006, 17, 469-80.
- [13] <http://lungcancer.about.com/od/otherresources/a/nonsmallcell.htm>
- [14] <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/lung>
- [15] Hammerschmit S, Wirtz H. Lung cancer: Current diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt International* 2009, 106, 809-820.
- [16] <http://www.doctorslounge.com/index.php/articles/page/340>
- [17] <http://www.cancerstaging.org/staging/index.html>
- [18] <http://www.cisplatin.org/>
- [19] Scagliotti GV, Fossati R, Torri V, Crinò L, Giaccone G. Randomized study of adjuvant chemotherapy for completely resected stage I, II, or IIIA non-small-cell Lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2003, 95, 1453-1461.
- [20] Suehisa H, Toyooka S. Adjuvant chemotherapy for completely resected non-small-cell lung cancer. *Acta Medica Okayama* 2009, 63, 223-230.
- [21] Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell death and differentiation* 2005, 12, 1191-1197.
- [22] Benford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roeloffs J. Assembly, structure and function of the 26S proteasome. *Trends in Cell Biology* 2010, 20, 391-401.
- [23] Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy* 2009, 85, 12-36.
- [24] Naujokat C, Saric T. Consive review: Role and function of the ubiquitin-proteasome system in mammalian stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2007, 25, 2408-2418.

- [25] Schrader EK, Harstad KG, Matouschek A. Targeting proteins for degradation. *Nature Chemical Biology* 2009, 5, 815-822.
- [26] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry* 2009, 78, 477-513.
- [27] Maupin-Furlow JA, Humbart MA, Kirkland PA, Li W, Reuter ChJ, Wright AJ, Zhou G. Proteasome from structure to function: Perspectives from archaea. *Current Topics in Developmental Biology* 2006, 75, 125-169.
- [28] Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008, 1786, 153-177.
- [29] DeMartino GN, Gillette TG. Proteasome: Machines for all reason. *Cell* 2007, 129, 659-662.
- [30] Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashoroda H. Dissecting β -ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *The EMBO Journal* 2008, 27, 2204-2213.
- [31] Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. Ubiquitin as the central cellular regulator. *Cell* 2004, 116, 29-32.
- [32] Hochstrasser M. Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell* 2006, 124, 27-34.
- [33] Jin J, Li X, Gygi SP, Harper JW. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 2007, 447, 1135-1139.
- [34] Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2005, 44, 5932-5943.
- [35] Harper JW, Schulman BA. Structural complexity in ubiquitin recognition. *Cell* 2006, 124, 1133-1136.
- [36] Orlowski RZ, Voorhees PM, Garcia RA, Hall MD, Kudrik FJ. Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 2004, 105, 3058-3065.
- [37] Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clinical cancer research* 2007, 13, 5291-5294.
- [38] Orlowski Z, Kuhn J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Lesson from first decade. *Clinical Cancer Research* 2008, 14, 1649-1657.

- [39] McConey DJ, Zhu K. Mechanism of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resistance Update 2008*, 11, 164-179.
- [40] Cvek B, Dvorad Z. Targeting of nuclear factor- κ B by dithiocarbamate complexes with metals. *Current Pharmaceutical Desing 2007*, 13, 3155-3167.
- [41] McConey DJ, Zhu K. Mechanism of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resistance Update 2008*, 11, 164-179.
- [42] Cvek B, Dvorad Z. Targeting of nuclear factor- κ B by dithiocarbamate complexes with metals. *Current Pharmaceutical Desing 2007*, 13, 3155-3167.
- [43] Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer developmnet and progression. *Nature 2006*, 441, 431-436.
- [44] Chiu Y, Zhao M, Chen ZJ. Ubiquitin in NF- κ B signaling. *Chemical Reviews 2009*, 109, 1549-1560.
- [45] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology 2004*, 25, 280-288.
- [46] Karin M. Nuclear facot- κ B in cancer development and progression. *Nature 2006*, 441, 431-436.
- [47] Hagemann T, Balkwill F, Lawrence T. Inflammation and cancer: A double-edged sword. *Cancer Cell 2007*, 12, 300-301.
- [48] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature 2002*, 420, 860-867.
- [49] Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer 2002*, 2, 301-310.
- [50] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature 2004*, 431, 461-466.
- [51] Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell 2004*, 118, 285-296.
- [52] Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death & Differentiation 2006*, 13, 759-772.
- [53] Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene 2003*, 56, 8961-8982.
- [54] Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation 2005*, 115, 2625-2632.

- [55] Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* 2005, 5, 297-309.
- [56] Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2007, 11, 119-132.
- [57] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research* 1999, 59, 2615-2622.
- [58] <http://myeloma.org/ArticlePage.action?articleId=1029>
- [59] http://www.boston.com/business/healthcare/articles/2007/05/06/the_velcade_story/
- [60] <http://scienceprogress.hms.harvard.edu/velcade.html>
- [61] Richardson PG, Xie W, Mitsiades C, Chanan-Khan AA. Single-Agent Bortezomib in Previously Untreated Multiple Myeloma: Efficacy, Characterization of Peripheral Neuropathy, and Molecular Correlations With Response and Neuropathy. *Journal of Clinical Oncology* 2009, 27, 3518-3525.
- [62] Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2003, 5, 417-421.
- [63] Cvek B, Dvorak Z. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Current Pharmaceutical Design* 2011, 17, 1483-1499.
- [64] Papandreou NCh, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T. Phase I Trial of the Proteasome Inhibitor Bortezomib in Patients With Advanced Solid Tumors With Observations in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2004, 22, 2108-2121.
- [65] Van Waes C, Chang AA, Lebowitz PF, Druzgal CH, Chen Z. Inhibition of nuclear factor-kB and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head-and-neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology & Biology & Physics* 2005, 63, 1400-1412.
- [66] Hideshima T, Ikeda H, Chauhan H, Okawa Y, Raje N. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 2009, 114, 1046-1052.
- [67] Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K. Bortezomib induces apoptosis in T lymphoma cells and natural killer lymphoma cells independent of epstein-barr virus infection. *International Journal of Cancer* 2011, ??.

- [68] Conconi A, Martinelli G, Lopez-Guillermo A, Zinzani PL, Ferreri AJ. Clinical activity of bortezomib in relapsed/refractory MALT lymphomas: results of a phase II study of the International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG). *Annals of Oncology* 2011, 22, 689-695.
- [69] Dimopoulos MA, Chen C, Kastiris E, Gavriatopoulou M, Treon SP. Bortezomib as a treatment option in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2010, 10, 110-117.
- [70] Milano A, Perri F, Caponigro F. The ubiquitin-proteasome system as a molecular target in solid tumors: an update on bortezomib. *OncoTargets and therapy* 2009, 2, 171-178.
- [71] Williamson MJ, Silva MD, Terkelsen J, Robertson R, Yu L. The relationship among tumor architecture, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of bortezomib in mouse xenograft models. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009, 12, 3234-3243.
- [72] http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000539/human_med_001130.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
- [73] Argyriou AA, Iconomou G, Kalofonos HP. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood* 2008, 112, 1593-1599.
- [74] <http://www.velcade.com/AboutVelcade.aspx>
- [75] Gupta A, Pandey A, Sethi S. Bortezomib-Induced Congestive Cardiac Failure in a Patient with Multiple Myeloma. *Cardiovascular Toxicology* 2011, ???
- [76] Dubey S, Shiller SH. Three emerging new drugs for NSCLC: pemetrexed, bortezomib, and cetuximab. *The Oncologist* 2005, 10, 282-281.
- [77] Ling YH, Liebes L, Jiang JD. Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical Cancer Research* 2003, 9, 1145–1154.
- [78] Yang Y, Ikezoe T, Saito T. Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling. *Cancer Science* 2004, 95, 176–180.
- [79] Sunwoo JB, Chen Z, Dong G. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2001, 7, 1419–1428.

- [80] Davies AM, Ruel C, Lara PN, Lau DH, Gumerlock PH. The proteasome inhibitor bortezomib in combination with gemcitabine and carboplatin in advanced non-small cell lung cancer: a California Cancer Consortium Phase I study. *Journal of Thoracic Oncology* 2008, 3, 68-74.
- [81] Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J. A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clinical Cancer Research* 2002, 8, 2505–2511.
- [82] Fanucchi MP, Fossella FV, Belt R, Natale R, Fidias P. Randomized phase II study of bortezomib alone and bortezomib in combination with docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006, 31, 5025-33.
- [83] Williams EE. Effects of alcohol on workers with carbon disulfide. *JAMA* 1937, 109, 1472.
- [84] <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid=10285201>
- [85] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum.* 1992, 369, 15-26
- [86] Børup C, Kaiser A, Jensen E. Long-term Antabuse treatment: tolerance and reasons for withdrawal. *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum.* 1992, 369, 47-49.
- [87] Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP. The status of disulfiram: a half of a century later. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2006, 26, 290-302.
- [88] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Progress in clinical and biological research* 1977, 12, 47-53.
- [89] Lang JM, Touraine JL, Trepo C, Choutet P, Kirstetter M. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of ditiocarb sodium ('Imuthiol') in human immunodeficiency virus infection. *The Lancet* 1988, 8613, 702-706.
- [90] Cvek B. Failure of ditiocarb (diethyldithiocarbamate) therapy: was diet the reason? *Current HIV Research* 2009, 7, 254.
- [91] Dufour P, Lang JM, Giron C, Duclos B, Haehnel P. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy* 1993, 6, 9-12.
- [92] Vanham GL, Kestens L, Van Hoof J, Penne G, Colebunders R. Immunological parameters during treatment with ditiocarb (Imuthiol). *AIDS* 1993, 7, 525-530.
- [93] Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD Jr, Dreau D. 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. *Molecular cancer therapeutics* 2004, 9, 1049-1060.

[94] Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008,38,802-8032.

[95] Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Disulfiram metabolites permanently inactivate the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology* 2004, 6, 426-433.

[96] Loo TW, Clarke DM. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, 11, 898-902.

[97] Marikovsky M, Nevo N, Vadai E, Harris-Cerruti C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *International Journal of Cancer* 2002, 97, 34-41.

[98] <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00312819>

[99] Verma S, Stewart DJ, Maroun JA, Nair RC. A randomized phase II study of cisplatin alone versus cisplatin plus disulfiram. *American Journal of Clinical Oncology* 1990, 13, 119-124.

[100] Bouvet D, Michalowicz A, Crauste-Manciet S, Brossard D. Proxost KEXAFS and IR structural study of platinum-based anticancer drugs' degradation by diethyl dithiocarbamate. *Inorganic Chemistry* 2006, 45, 3393-3398.

[101] Cho HJ, Lee TS, Park JB, Park KK, Choe JY. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2007, 40, 1069-1076.

[102] Shian SG, Kao YR, Wu FY, Wu CW. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Molecular Pharmacology* 2003, 64, 1076-1084.

[103] Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *The Journal of Immunology* 2003, 170, 2993-3001.

[104] Brahehi G, Kona FR, Fiasella A, Buac D, Soukupová J. Exploring the structural requirements for inhibition of the ubiquitin E3 ligase breast cancer associated protein 2 (BCA2) as a treatment for breast cancer. *Journal of Medicine Chemistry* 2010, 53, 2757-2765.

[105] Burger AM, Gao Y, Amemiya Y, Kahn HJ, Kitching R. A novel RING-type ubiquitin ligase breast cancer-associated gene 2 correlates with outcome in invasive breast cancer. *Cancer Research* 2005,65, 10401-10412.

[106] Burger A, Amemiya Y, Kitching R, Seth AK. Novel RING E3 ubiquitin ligases in breast cancer. *Neoplasia* 2006, 8, 689-695.

- [107] Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Current Cancer Drug Targets* 2011, 11, 332-337.
- [108] Cvek B, Dvorak Z. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Current Pharmaceutical Design* 2007, 30, 3155-3167.
- [109] Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *Journal of Experimental Medicine* 1992, 175, 1181-1194.
- [110] Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Jung S, Avraham A. In vivo stimulation of I kappa B phosphorylation is not sufficient to activate NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology* 1995, 15, 1294-1301.
- [111] Liu J, Shigenaga MK, Yan LJ, Mori A, Ames BN. Antioxidant activity of diethyldithiocarbamate. *Free radical research* 1996, 24, 461-472.
- [112] Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. 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 Research* 2006, 21, 10425-33.
- [113] Cvek B, Dvorak Z. The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug discovery today* 2008, 15-16, 716-722.
- [114] Kim I, Kim CH, Kim JH, Lee J, Choi JJ. Pyrrolidine dithiocarbamate and zinc inhibit proteasome-dependent proteolysis. *Experimental cell research* 2004, 298, 229-238.
- [115] Cvek B, Milacic V, Taraba J, Dou QP. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008, 51, 6256-6258.
- [116] Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS biology* 2004, 2, 113-119.
- [117] Gallery M, Blank JL, Lin Y, Gutierrez JA, Pulido JC. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Molecular cancer therapeutics* 2007, 6, 262-268.
- [118] <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=614004&version=HealthProfessional&protocolsearchid=9121773>

- [119] <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=582607&version=HealthProfessional&protocolsearchid=9121773>
- [120] <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=673460&version=HealthProfessional&protocolsearchid=9121773>
- [121] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0058947>
- [122] <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/learning>
- [123] <http://clinicaltrials.gov/ct2/info/understand>
- [124] <http://www.leky.sukl.cz/jake-jsou-faze-testovani>
- [125] <http://www.leky.sukl.cz/encyklopedie/jak-se-registruje-lek>
- [126] <http://www.sukl.cz/obecne-otazky>
- [127] http://en.wikipedia.org/wiki/Clinical_trial
- [128] http://en.wikipedia.org/wiki/In_silico
- [129] Martínková, Jiřina a kolektiv: Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, Grada Publishing, Praha, 2007, s. 88.
- [130] Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP. Drug discovery: Repurposing with a difference. *Science* 2009, 5933, 1394-1395.
- [131] Chong CR, Sullivan DJ Jr. New uses for old drugs. *Nature* 2007, 7154, 645-646.
- [132] Grabowski H. Are the economics of pharmaceutical research and development changing?: productivity, patents and political pressures. *Pharmacoeconomics* 2004, 22, 15-24.
- [133] Aronson JK. Editors' view Old drugs – new uses. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2007, 64, 563–565.
- [134] Jurcic JG, Soignet SL, Maslak AP. Diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Current Oncology Reports* 2007, 9, 337-344.
- [135] Gillis JC, Goa KL. Tretinoin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and use in the management of acute promyelocytic leukaemia. *Drugs* 1995, 50, 897-923.
- [136] Dürk HA. Maintenance therapy for multiple myeloma with particular emphasis on thalidomide. *Onkologie* 2006, 29, 582-590.
- [137] <http://www.global-cures.org/>
- [138] Casali PG. The off-label use of drugs in oncology: a position paper by the European Society for Medical Oncology (ESMO). *Annals of Oncology* 2007, 18, 1923-1925.

- [139] Collins FS. Mining for therapeutic gold. *Nature Reviews Drug Discovery* 2011, 10, 397.
- [140] 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. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997, 1335,242–245.
- [141] Yang Y, Lv QJ, Du QY, Yang BH, Lin RX. Combined effects of Cantide and chemotherapeutic drugs on inhibition of tumor cells' growth in vitro and in vivo. *The World Journal of Gastroenterology* 2005, 16, 2491-2496.