

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramů (antabusu) s mědí
proti buněčné linii odvozené od karcinomu slinivky břišní**

**Non-profit drugs: The activity of disulfiram-copper complex against
a cell line derived from pancreatic cancer**

Bakalářská práce

Barbora Pastorková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vykonala samostatně s pomocí vedoucího práce.

Souhrn

Rakovina pankreatu je velmi agresivní onemocnění se značně vysokou úmrtností a krátkou dobou přežití. Dnes však existuje určitá naděje v novém přístupu k léčbě rakoviny, který používá tzv. inhibitory proteazomu. Proteazom slouží v buňce k degradaci proteinů. Před samotnou degradací musí být nejprve proteiny označeny ubikvitinem. Ubikvitinace a degradování proteinů vytváří tzv. ubikvitin-proteazomový systém (UPS).

První klinicky použitý inhibitor proteazomu bortezomib má velké úspěchy v léčbě mnohočetného myelomu, ovšem není účinný v pevných tumorech. Jiný přístup k inhibici proteazomu může představovat komplex starého protialkoholního léčiva antabusu (disulfiramu) s mědí. Některé studie naznačují, že tento inhibitor proteazomu by mohl potlačovat i pevné nádory.

Cílem této bakalářské práce je stanovit cytotoxicitu komplexu disulfiramu s mědí vůči vybrané buněčné linii odvozené od rakoviny slinivky břišní a srovnat je s toxicitami bortezomibu, chloridu měďnatého a diethyldithiokarbamátu sodného, jakožto formě disulfiramu vyskytující se v těle.

Pro případné zavedení antabusu do onkologické léčby rakoviny slinivky břišní je však třeba ověřit jeho aktivitu v klinických testech. A protože antabus nelze znovu patentovat, tyto klinické testy by musely být placeny vládami nebo charitami, aby v příznivém případě získaly levné a široce dostupné léčivo proti rakovině a zlevnily tak výrazně onkologickou léčbu (koncepte tzv. neziskových léků).

Summary

Pancreatic cancer is very aggressive disease with considerably high mortality and short time of survival. However, there is a hope today represented by a new approach to treatment of pancreatic cancer by a new class of drugs called "proteasome inhibitors". The proteasome makes for degradation of proteins in cell. Proteins must be labelled by ubiquitin before the degradation. Ubiquitination and degradation create so-called ubiquitin-proteasome system.

Bortezomib is the first inhibitor of proteasome which used in the clinic. Bortezomib is very successful in treatment of multiple myeloma, but it is not effective in solid tumors. The complex of an old antialcoholic drug antabus (disulfiram) with copper can be another approach of proteasome inhibition. Some studies foreshadow that this inhibitor of proteasome could suppress solid tumors.

The aim of this work is to determine cytotoxicity of disulfiram-copper complex against choice cell line derived from pancreatic cancer and compare it with toxicities of copper chloride, sodium diethyldithiocarbamate and bortezomib.

If we will not introduce the antabus in oncology of pancreatic cancer we have to verify its activity in clinical trials. Because antabus can not be patented again these clinical trials would have to be paid by governments and charities to obtain cheap and widely available treatment against cancer and so markedly cheapen oncology (conception so-called non-profit drugs).

Poděkování

Děkuji panu Mgr. Borisi Cvekovi, PhD. za cenné rady, připomínky a konzultace při tvorbě bakalářské práce a Mgr. Jindřichu Sedláčkovi za vedení při experimentální části bakalářské práce.

Obsah

1. Úvod.....	9
1.1 Rizikové faktory rakoviny pankreatu.....	9
1.2 Příznaky rakoviny pankreatu.....	10
2. Současné způsoby léčby rakoviny pankreatu.....	11
2.1 Rezistence vůči současné léčbě	13
2.2 Klinické testy prováděné na rakovině pankreatu.....	13
3. Degradace proteinů v buňce	15
3.1 Ubikvitin-proteazomový systém (UPS), ubikvitinace	16
3.2 Struktura a funkce proteazomu	18
4. Inhibitory proteazomu.....	21
4.1 Bortezomib.....	21
4.2 Inhibitory proteazomu druhé generace.....	23
4.3 Antabus (disulfiram)	24
5. Klinické testy	27
6. Neziskový lék – antabus.....	29
7. Cíl práce.....	30
8. Materiál a metodika	31
8.1 Materiál	31
8.1.1 Biologický materiál.....	31
8.1.2 Chemikálie	31
8.1.3 Roztoky.....	32
8.1.4 Laboratorní vybavení	32
8.1.5 Přístroje	33
8.2 Metodika: hodnocení cytotoxicity – MTT test	33
8.2.1 Princip metody	33

8.2.2 Postup práce.....	34
9. Výsledky.....	37
10. Diskuse.....	43
11. Závěr.....	45
12. Seznam použitých zkratk.....	46
13. Seznam použité literatury.....	48

1. Úvod

Rakovina slinivky břišní je onemocnění, kdy se rakovinné buňky nacházejí v tkáních slinivky břišní neboli pankreatu. Pankreas je orgán asi 14 cm dlouhý. Nachází se hluboko v břišní dutině mezi žaludkem a páteří. Obklopují jej játra, střeva a ostatní orgány. Nejširší část pankreatu se nazývá hlava, která je nejbližší tenkému střevu, prostřední část se nazývá tělo a nejtenčí část ocas. Pankreas vytváří šťávy obsahující enzymy, které pomáhají štěpit potravu. Tyto šťávy protékají systémem kanálků vedoucích do hlavního pankreatického kanálku, jenž ústí do dvanáctníku. Pankreas je také žláza, která produkuje insulin a další hormony. Tyto hormony vstupují do krevního řečiště a jsou roznášeny po celém těle, kde se jejich pomocí využívá nebo skladuje energie získaná z potravy. Insulin pomáhá kontrolovat množství cukru v krvi.

Existují dva hlavní typy rakoviny pankreatu: exokrinní a endokrinní. Exokrinní se vyskytuje častěji a začíná se tvořit v kanálku, který přivádí pankreatické šťávy. Endokrinní je méně častá a začíná se vytvářet v buňkách, které produkují hormony, tzv. ostrůvkové buňky [1]. Rakovina pankreatu nevykazuje v počátečních fázích žádné symptomy, a proto je choroba diagnostikována až v pokročilém stádiu, a tak je doba přežití velmi krátká, 3-6 měsíců. Každý rok je v US diagnostikováno přibližně 32 000 pacientů s rakovinou pankreatu a každý rok jich přibližně 31 000 zemře [2]. Nejčastěji jsou postiženi lidé ve věku 60-80 let. Rakovina pankreatu se častěji vyskytuje u mužů než u žen. U mužů je to čtvrtá a u žen pátá nejčastější příčina smrti způsobená rakovinou [3].

1.1 Rizikové faktory rakoviny pankreatu

Příčiny onemocnění nelze vždy přesně určit, avšak lidé s rizikovými faktory jsou více ohroženi. Nejdůležitějším rizikovým faktorem je kouření. U kuřáků je mnohem větší riziko, že se u nich projeví rakovina pankreatu než u nekuřáků. Větší riziko je u kuřáků, kteří kouří méně intenzivně delší dobu, než u kuřáků kouřících intenzivněji, ale kratší dobu [4]. Riziko také představuje dědičnost, genetické vloh z rodiny, také

životní styl a osobní návyky. Riziko rakoviny pankreatu také zvyšují různé průvodní choroby jako diabetes mellitus, chronický zánět pankreatu (pankreatitida) nebo také obezita, avšak drastická dieta může být v tomto ohledu také škodlivá [5]. Konzumace velkého množství alkoholu zvyšuje riziko rakoviny pankreatu až o 30% [6]. Při dlouhodobém požívání velkého množství alkoholu je vysoké riziko vzniku chronické pankreatitidy, což představuje nebezpečí vzniku rakoviny pankreatu [7].

1.2 Příznaky rakoviny pankreatu

Příznaky rakoviny pankreatu jsou viditelné až po určité době, až když je nádor větší. Projevuje se pak: tmavou močí, světlou stolicí, nažloutlým zbarvením kůže a očního bělma, bolestí v horní části břicha a uprostřed zad, nucením na zvracení a zvracením a stolicí plovoucí v záchodě. Pokročilé stádium rakoviny pankreatu se projevuje slabostí a velkou únavou, ztrátou chuti k jídlu nebo pocitu plnosti a ztrátou hmotnosti [1]. Symptomy v pokročilé fázi rakoviny pankreatu jsou potlačovány utišujícími prostředky [8].

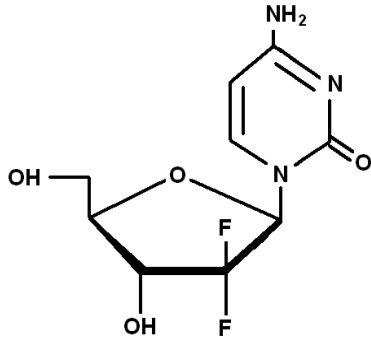
2. Současné způsoby léčby rakoviny pankreatu

Rakovina pankreatu se dá léčit čtyřmi způsoby: chirurgickou operací, chemoterapií, radioterapií nebo cílenou léčbou. Volba způsobu léčby se řídí hlavně tím, kde je na pankreatu tumor lokalizován, jestli se rakovina rozšiřuje (metastázuje), a důležitou roli také hraje věk a celkový zdravotní stav. U rizikových skupin se doporučuje screening pankreatu pro případné brzké odhalení rakoviny a časnou léčbu [9].

V současné době je rakovina pankreatu léčitelná jen v raném stádiu (před tím, než se rozšíří) a jen jestli se při operaci úplně odstraní tumor. Lidem, kteří nemohou být operováni, pomůže chemoterapie alespoň k prodloužení života [1]. Chirurgická operace je zlatým standardem pro léčbu rakoviny pankreatu s tím, že je ještě před operací aplikována tzv. neoadjuvantní (přípravná) terapie.

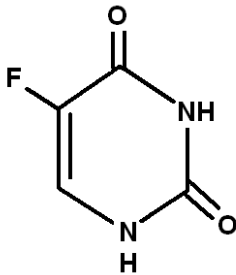
Dlouhou dobu bylo jedinou léčbou rakoviny pankreatu chirurgické odstranění primárního tumoru. Avšak operace jako taková nestačí, protože se rakovina pankreatu velmi často a rychle vrací. Proto je zapotřebí pooperační adjuvantní (podpůrné) chemoterapie. Adjuvantní terapie by se měla podat do osmi týdnů po operaci. V současné době se nejvíce používá gemcitabin [obr. 1] nebo 5-fluoruracil (5-FU) [obr. 2]. Gemcitabin se také využívá při léčbě jiných nádorových onemocněních, avšak nejvíce u rakoviny pankreatu [10].

Gemcitabin je analog báze deoxycytidinu se dvěma atomy fluoru vloženými do cyklu deoxyribózy. Gemcitabin je inaktivní až do doby, kdy pronikne do buňky, kde je na rozdíl od jiných analogů bází aktivně transportován přes buněčnou membránu. V buňce je pak fosforylován a pomalu eliminován, což zvyšuje jeho cytotoxický účinek. V jádře nádorové buňky se váže na DNA [11]. 5-FU je fluoropyrimidin, jehož mechanismus účinku spočívá v inkorporaci do RNA, kde zasahuje katalytickou podjednotku jaderného exosomu Rrp6 [12].



Obr. 1: Chemická struktura gemcitabin (2',2'-difluorodeoxycytidinu)

Gemcitabin je analog báze deoxycytidinu se dvěma atomy fluoru vloženými do cyklu deoxyribózy.



Obr. 2: Chemická struktura 5-fluoruracil (5-FU)

5-FU je fluoropyrimidin.

Podle testů byla u pacientů užívajících 5-FU celková délka přežití 17,1 měsíců na rozdíl od pacientů, kteří byli pouze pozorováni, kde byla celková délka přežití 12,6 měsíců. Celková délka přežití pacientů užívajících gemcitabin byla 22,8 měsíců na rozdíl od pacientů, kteří jej neužívali, kde byla 20,2. Byl však také proveden test, kde se porovnával účinek gemcitabinu a 5-FU, kde délka přežití s gemcitabinem byla 23,6 měsíců a s 5-FU 23,0 měsíců. Další testy prokázaly, že účinek gemcitabinu je vyšší než 5-FU [10]. Navíc bylo zjištěno, že oxaloplatin zvyšuje účinek gemcitabinu, a to tak, že zvyšuje jeho citlivost při radioterapii [13]. Radioterapie (ozařování) je také jedna z možných podpurných terapií, avšak není vhodná pro každého pacienta, někdy je spíše škodlivá, např.: u pacientů s vysokým rizikem návratu rakoviny. Proto se více doporučuje chemoterapie. Většinou se uplatňuje určitá kombinace různých typů adjuvantní terapie. Doporučuje se buď, chemoterapie gemcitabinem

doprovázená radioterapií s 5-FU, nebo chemoterapii pouze gemcitabinem či 5-FU [10]. Testují se také různé deriváty gemcitabinu, které mají například vyšší účinek než samotný gemcitabin nebo se zkoumají jeho kombinace s jinou látkou [14].

2.1 Rezistence vůči současné léčbě

Protirakovinné léky, jako je např. gemcitabin, mohou vyvolat v buňkách rakoviny pankreatu rezistenci k apoptotickým stimulům. Rezistence se projevuje velkým množstvím molekulárních změn, ať už přerušením indukčních signálů apoptózy, nebo protiapoptickými ději. Rakovinné buňky pak vykazují změny v signálních drahách, jako např. v dráze NF- κ B [15]. NF- κ B je transkripční faktor, jehož aktivací může docházet k rozvoji tumoru [16]. Ovšem bylo zjištěno, že mnoho protirakovinných léčiv paradoxně aktivuje NF- κ B, což pak vede k přežití rakovinných buněk díky možnosti proliferace, angiogeneze, migrace, adheze, ochrany proti apoptóze a dalším vlastnostem, které v konečném důsledku způsobují rezistenci k danému léčivu. Protirakovinná léčiva aktivují zároveň několik různých drah a pozitivně i negativně tak regulují proces apoptózy. Rakovinné buňky tak balancují mezi životem a smrtí [17].

Rezistentní buňky se kromě ochrany proti apoptóze vyznačují také nadměrnou expresí histonových deacetyláz, které mimo jiné souvisí s acetylací dalších regulačních proteinů. V tomto smyslu se usiluje o lék, který by tyto problémy překonal. V řadě pre-klinických testů již uspělo mnoho inhibitorů proteazomu a deacetyláz histonů včetně inhibitorů nežádoucích signálních drah [15].

Rezistence je v současné době velkým problémem v léčbě takto zákeřné choroby, jako je rakovina pankreatu.

2.2 Klinické testy prováděné na rakovině pankreatu

Navzdory velkým pokrokům v léčbě rakoviny, rakovina pankreatu zůstává stále jednou z nejhůře léčitelných rakovin. Úmrtnost se téměř rovná počtu nálezů [2], proto je snaha vyvinout co nejefektivnější léčbu. Podle serveru National Cancer Institut bylo ke dni 25. 1. 2012 prováděno 427 klinických testů na rakovině pankreatu.

Nyní je klinicky testován nový přístup, a to podávání léku pomocí liposomů, nanočástic a uhlíkatých nanotrubiček. Tento přístup umožňuje lepší směřování léku proti specifickému agens při léčbě rakoviny pankreatu. Tento systém byl vyvinut jako multifunkční léčebné nanozařízení, například pro rozpoznání brzké fáze rakovinného bujení nebo pro cílenější podání léku. Touto cestou jsou do rakovinné buňky vpravovány léky proti rakovině (gemcitabin a 5-fluoruracil) a další látky, jako jsou siRNA, sebevražedné geny, onkolytické viry, malé molekuly inhibitoru a protilátky. Problém je však se specifičností a stabilitou antigenů, které váží léčivo na povrch rakovinné buňky, jelikož jsou exprimovány nádorovou buňkou. Podání léku pomocí liposomů však zlepšuje farmakokinetiku, snižuje vedlejší účinky a soustřeďuje lék hlavně na nádor. Tento přístup tedy zvyšuje efektivitu léčby tak těžko léčitelného onemocnění, jako je rakovina pankreatu [18,19].

V současné době je při vývoji léčiv více kladen důraz na molekulárně cílenou léčbu než na cytotoxicitu a nescifickou chemoterapii. Molekulárně cílená léčba se zaměřuje na specifické molekuly signálních drah, které jsou příčinou onkologických projevů. Tento přístup slibuje vyšší účinnost a nižší vedlejší účinky. Vývoj je však v tomto ohledu pomalý. Možným způsobem urychlení a vylepšení procesu by mohlo být sjednocení výzkumu o rakovině a vývoj specifického léku proti rakovině pro každého pacienta individuálně. Léčbě by předcházelo detailní porozumění genetiky a biologie pacienta a jeho rakoviny [20].

Ve smyslu molekulárně cílené léčby byl také zkoumán inhibitor proteazomu, bortezomib, látka zamezující degradaci proteinů v buňce. Bortezomib se ukázal jako účinný lék u pacientů s mnohočetným myelomem [21].

3. Degradace proteinů v buňce

V eukaryotické buňce je zajištěna degradace proteinů dvěma způsoby. Jedním z nich je autofágie, neboli proces buněčného sebepojídání. Proteiny nebo i organely určené k degradaci jsou uzavřeny do dvoumembránových vesikul, zvaných autofagozomy. Ty transportují svůj obsah do lysozómů, kde se proteiny rozloží na jednotlivé aminokyseliny a ty jsou vráceny zpět do cytosolu [22].

Degradaci intracelulárních proteinů v eukaryotické buňce také zabezpečují multiproteinové komplexy proteazomy. Proteazomy se však uplatňují také při mnoha základních biochemických mechanismech, jako jsou buněčný cyklus, včetně syntézy DNA, opravy transkripce a translace a také transdukce buněčných signálů [23]. Defektní proteiny, které vznikly špatným syntetizováním, jsou degradovány právě v proteazomu. Více než 30 % nově vzniklých proteinů je degradováno v proteazomu [24]. Nově vyniklé proteiny jsou přemístěny do endoplasmatického retikula, kde dochází ke kontrole kvality proteinů. Defektní proteiny pak putují do cytosolu, kde jsou degradovány proteazomem, který se nachází v blízkosti endoplasmatického retikula [25]. Proteazomy jsou lokalizovány v cytoplazmě i v jádře eukaryotických buněk, avšak množství v jednotlivých částech je různé. V cytoplazmě se proteazomy sdružují s centrozomy, cytoskeletem a vnější membránou endoplasmatického retikula. V jádře se vyskytují v nukleoplazmě, avšak v jadérku nikoliv [26]. Imunohistochemické testy ukázaly, že v buňkách různých druhů leukémií se nachází zvýšené množství proteazomů, převážně lokalizovaných v jádře [27].

Proteiny určené k degradaci jsou před vstupem do jinak zavřeného proteazomu nejprve značeny. Při tomto značení hraje roli polyubikvitinový řetězec, ten je spojen s degradační schopností proteinů. Ubikvitinový řetězec je složen minimálně ze čtyř molekul ubikvitinu. Ubikvitin je malý protein, skládající se ze 76 aminokyselin. Vyskytuje se pouze v eukaryotických buňkách, a to velmi hojně.

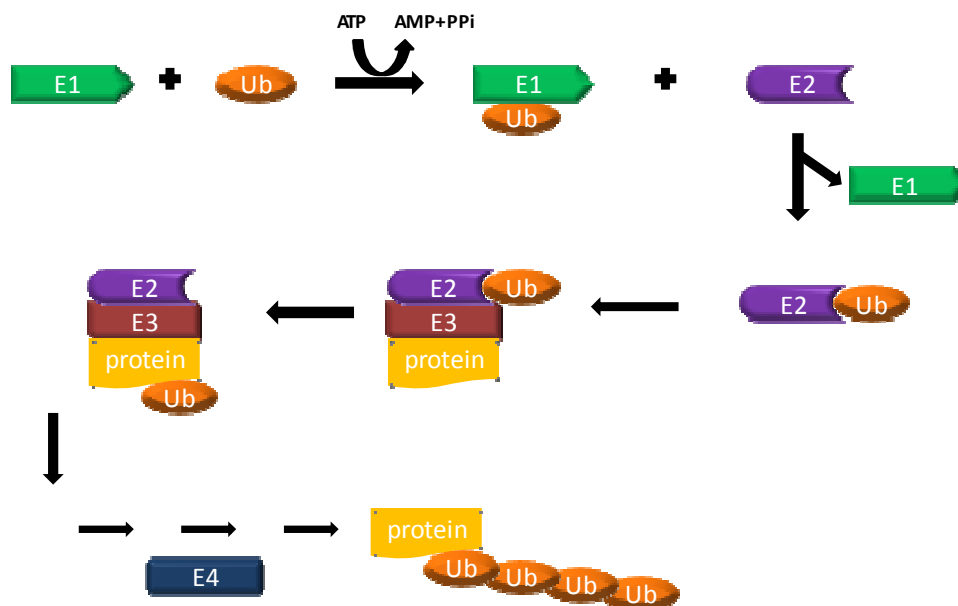
Takto označený protein se při vstupu do kanálu proteazomu rozvine a natáhne se podél něj. Zde je hydrolyzován na krátké peptidy. Ubikvitin sám o sobě nevstupuje do proteazomu, po destrukci označeného proteinu se uvolňuje a označuje další molekuly [28]. Tento proces označování proteinů se nazývá ubikvitin-proteazomový systém (UPS), který objevili Avram Hershko, Aaron Ciechanover a Irwin Rose, a v roce 2004 za něj dostali Nobelovu cenu [29].

O velký přínos v této oblasti se také zasloužil Alexandr Varshavsky, který zjistil, jakou má ubikvitin vlastně funkci, a to označování proteinů určených k degradaci. Dále také zjistil, že ubikvitinový systém hraje důležitou roli v buněčném cyklu, opravách DNA, syntéze proteinů, regulaci transkripce a v odpovědi na stres [30].

3.1 Ubikvitin-proteazomový systém (UPS), ubikvitinace

Ubikvitinace spočívá v souhře tří enzymů, tzv. E1-E2-E3 kaskáda [schéma 1]. Nejprve je ubikvitin aktivován enzymem E1 (ubikvitin aktivující enzym) za spotřeby energie ve formě ATP, poté je přenesen na enzym E2 (ubikvitin přenášejší enzym). Následně je ubikvitin přemístěn na protein určený k degradaci pomocí enzymu E3. Enzym E3 je ubikvitin-ligáza, která rozpoznává proteiny určené k degradaci. Ubikvitin je k enzymům vázán thioesterovou vazbou [28]. Rozmanitost enzymů E1 a E2 je malá na rozdíl od enzymů E3, které specificky rozpoznávají jednotlivé proteiny určené k degradaci [31]. Existují také enzymy E4, které jsou zodpovědné za prodlužování polyubikvitinového řetězce, tedy připojení ubikvitinu na již navázaný ubikvitin [32]. Jednotlivé molekuly ubikvitinu jsou mezi sebou vázány pomocí lysinu, nejčastěji K48. Vzniká tedy polyubikvitinový řetězec na proteinu určeném k degradaci. Takto označený protein je nejprve rozpoznán proteazomem, pak do něj vstupuje a následně je degradován [28]. Některé proteiny určené k degradaci však nejsou závislé na ubikvitinovém značení. Jedná se o proteiny s porušenou oblastí, která představuje universální strukturní signál pro degradaci v proteazomu [33].

Schéma 1: Ubikvitinace



E1 - ubikvitin aktivující enzyme, E2 - ubikvitin přenášejíci enzyme, E3 - ubikvitin-ligáza
Ub – ubikvitin, ATP – zdroj energie

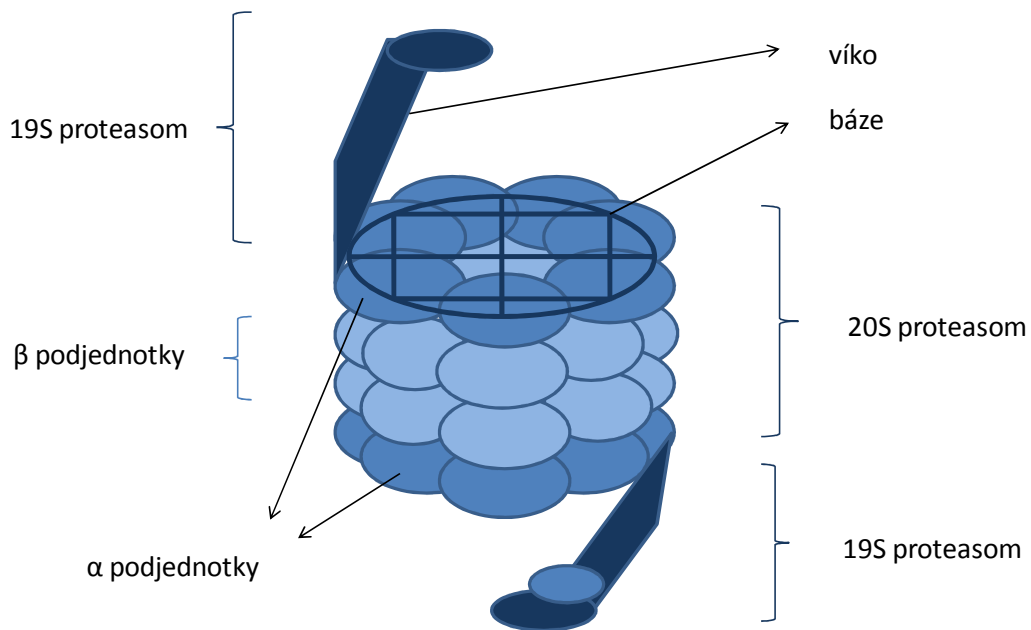
Ubikvitinace je reversibilní děj, dochází tedy i k odstranění ubikvitinu. Tento děj zajišťují enzymy ze skupiny isopeptidáz, zvané deubikvitinázy (DUB). Struktura a funkce těchto enzymů je velmi rozmanitá [34]. Hrají roli například při posttranslačních úpravách nebo v apoptóze a proliferaci. Deubikvitinázy mohou pozitivně regulovat aktivitu proteazomu tím, že odštěpují ubikvitin až po navázání proteinu na proteazom a zajistit tak jeho degradaci. Negativní regulace aktivity proteazomu pak spočívá ve zkrácení nebo odstranění polyubikvitinového řetězce ještě před navázáním proteinu na proteazom, tedy zamezení degradace proteinu.

DUBy mohou mít různou substrátovou specifitu [35]. Deubikvitinázy můžeme rozdělit do několika skupin: ubikvitin specifické proteázy (USP), ubikvitin C-terminální hydrolázy (UCH), otubain proteázy (z rakoviny vaječníku - OUT), proteázy Machado-Josephovy nemoci (MJD) a JAMM/MPN [26]. JAMM proteázy obsahují Zn^{2+} vazebné místo. Mezi tyto metalopeptidázy patří i DUBy: Rpn11 a Poh1, které jsou životně důležité pro správné fungování proteazomu [36, 37].

3.2 Struktura a funkce proteazomu

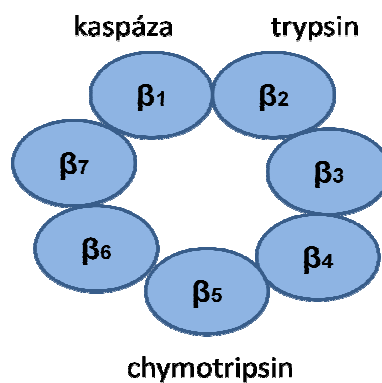
Protein označený polyubikvitinovým řetězcem je rozpoznáván 26S proteazomem. 26S proteazom se skládá z 20S a 19S proteazomu. 20S proteazom je struktura válcovitého tvaru a tvoří hlavní část proteazomu, kde dochází k degradaci označených proteinů. [23] 19S proteázom je regulační část proteazomu, zvaná také PA700. Skládá se z víka a báze. Víko zajišťuje deubikvitinaci vstupujících proteinů pomocí Poh1 deubikvitinázy s JAMM doménou a dalších DUBů. Báze slouží k regulaci vstupu proteinů do 20S proteazomu. Báze obsahuje AAA ATPázy, které rozplétají protein a posouvají jej do 20S proteazomu. [38, 39]

20S proteazom je tvořen čtyřmi pod sebou uspořádanými kruhy, v pořadí α_{1-7} , β_{1-7} , β_{1-7} , α_{1-7} . Tzn. dva vnější kruhy, představují sedm α podjednotek, které interagují s víkem a dva vnitřní kruhy představují sedm β podjednotek, které mají proteolytickou aktivitu [obr. 3]. Aktivní místa β podjednotek jsou ukryty uvnitř válcovité struktury, což zabraňuje nespecifické degradaci proteinů. β_1 podjednotka má aktivitu podobnou kaspázám, β_2 podjednotka má aktivitu podobnou trypsinu a β_5 podjednotka má aktivitu podobnou chymotrypsinu [23] [obr. 4]. α podjednotky mohou sloužit k případnému uskladnění rozpleteného proteinu pro zajištění kontinuální proteolýzy [40]. Díky symetrické stavbě proteazomu mohou proteiny určené k degradaci do proteazomu vnikat z obou stran [41].



Obr. 3: Struktura 26S proteazomu

26S proteazom se skládá z 20S a 19S proteazomu. 19S proteazom se skládá z víka a báze. 20S proteazom je tvořen dvěma kruhy α podjednotek a dvěma kruhy β podjednotek.



Obr. 4: Průřez 26S protezomem

Každý kruh 20S proteazomu je tvořen sedmi podjednotkami. β podjednotky jeví uvnitř 20S proteazomu enzymatickou aktivitu. β_1 podjednotka má aktivitu podobnou kaspázám, β_2 podjednotka má aktivitu podobnou trypsinu a β_5 podjednotka má aktivitu podobnou chymotrypsinu.

Proteiny jsou tedy degradovány na malé oligopeptidy, které opouští proteazom. V buňce jsou pak dále štěpeny až na aminokyseliny, které slouží k další proteosyntéze [42]. Proteazom je také využíván imunitním systémem, kdy degraduje nežádoucí proteiny (patogeny), které jsou pak prezentovány na povrchu buňky, kde slouží jako antigen pro T-lymfocyty [43].

Degradace proteinů není však jedinou funkcí 26S proteazomu, uplatňuje se také při aktivaci různých proteinů tím, že degraduje jeho určitou část. Jedním z těchto proteinů je i dimerní nukleární faktor κB (NF- κB), což je transkripční faktor. V buňce se vyskytuje mnoho různých typů NF- κB . NF- κB jsou v cytoplazmě udržovány v inaktivní formě pomocí skupiny inhibitorů NF- κB (I- κB). Při aktivaci NF- κB dochází nejprve k fosforylaci I- κB tzv. I- κB kinázami (IKK), což pak vede při průchodu proteazomem k degradaci I- κB . Aktivovaný NF- κB pak volně prostupuje do jádra a váže se na sekvenci DNA do κB místa, kde reguluje expresi genů. Geny regulované NF- κB kontrolují programovanou buněčnou smrt, adhezi buněk, proliferaci, vrozenou i získanou imunitní odpověď, zánět, odpověď na buněčný stres a přestavbu tkání. Exprese těchto genů je však regulována mnoha dalšími transkripčními faktory. Výsledek aktivace NF- κB tedy závisí na aktuálním stavu a celkovém kontextu indukce [44]. Aktivaci NF- κB a z ní vyplývající nežádoucí exprese genů, bychom mohli zabránit inhibicí proteazomu, kde dochází k aktivaci NF- κB . Inhibitory proteazomu se jeví jako vhodná terapie v léčbě rakoviny.

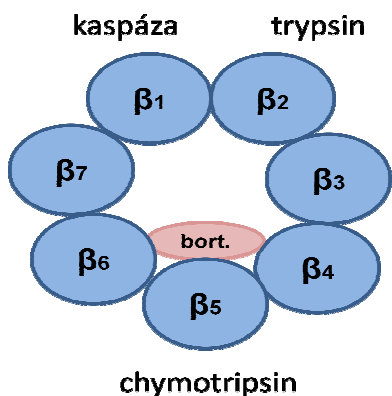
4. Inhibitory proteazomu

Zdálo by se, že stačí inhibovat proteazom a tím i aktivaci NF- κ B, abychom získali protirakovinné léčivo. Zjistilo se však, že i velmi nadějný inhibitor proteazomu bortezomib, který se využívá v léčbě mnohočetného myelomu, místo aby inhiboval, aktivuje dráhu NF- κ B. Bortezomib i další inhibitory proteazomu snižují regulaci exprese I- κ B a spouští fosforylaci I- κ B a tím aktivují NF- κ B. Tento problém by mohl vyřešit inhibitor I- κ B kinázy (IKK) MLN120 [45]. Dráha NF- κ B tedy už není hlavním cílem při hledání vhodné terapie rakoviny.

Inhibitory proteazomu se dají rozdělit do pěti hlavních skupin: peptidové aldehydy, vinylpeptidové sulfony, peptidové boráty, peptidové epoxyketony a β -laktony [46].

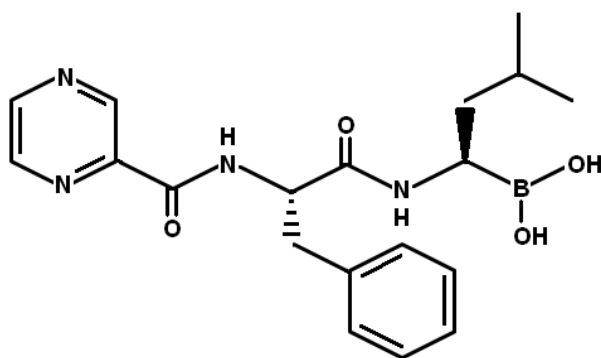
4.1 Bortezomib

Peptidové analogy kyseliny borité inhibují proteazom v místě, kde je jeho aktivita podobá chymotrypsinu (β_5 podjednotka) v jádře 20S proteazomu [obr. 5]. Sloučeninu tohoto typu vyvinul J. Adams, kterou nazval PS-341, dnes známou jako bortezomib neboli lék Velcade [obr. 6] [46]. Bortezomib je forma prášku a Velcade je jeho roztok pro injekční podání [47]. Ukázalo se, že bortezomib navozuje apoptózu a má protirakovinné účinky [46]. Bortezomib byl také použit na buněčných kulturách rakoviny pankreatu a zjistilo se, že snižuje proliferaci rakovinných buněk *in vitro* [48]. *In vivo* byl bortezomib testován na myších, do kterých byly vloženy štěpy různých typů lidské rakoviny. Po podání bortezomibu se snížil růst i objem tumoru [49]. V dalších fázích klinických testů měl bortezomib velmi velký úspěch při léčbě mnohočetného myelomu. Jednalo se o velmi významné zlepšení nemoci až její úplné vymizení [21]. Bortezomib jako první inhibitor proteazomu prošel klinickými testy a je používán u lidských pacientů v běžné klinické léčbě [46].



Obr. 5: Vazebné místo bortezomibu ve 20S proteazomu

Bortezomib inhibuje proteazom v místě, kde je jeho aktivita podobá chymotrypsinu (β_5 podjednotka) v jádře 20S proteazomu.



Obr. 6: Chemická struktura bortezomibu

Bortezomib je peptidový analog kyseliny borité.

Problém v léčbě rakoviny pankreatu klasickými cytostatiky, jako je gemcitabin, je rezistence. Proto se zkusilo zkombinovat gemcitabin s inhibítor proteazomu. Zjistilo se, že díky inhibici proteazomu se sníží obsah regulátoru buněčného cyklu a také je přítomna apoptotická kontrola. Tyto skutečnosti vedou ke zvýšené citlivosti buněk rakoviny pankreatu ke gemcitabinu [50]. Bortezomib tedy zvyšuje účinek gemcitabinu u rakoviny pankreatu [51].

Ve srovnání s klasickými cytostatiky je bortezomib citlivější [52] a podává se v nižších dávkách [53]. Bortezomib je velmi účinný v případě krevních nádorů, jako je

mnohočetný myelom [54], lymfom plášťových buněk [55], MALT- lymfom [56], Waldenstromova macroglobulinemie [57] nebo leukemie [58].

Bortezomib má také i své nevýhody, podává se pouze injekčně, neúčinkuje v některých pevných tumorech a už i u něj se objevuje rezistence [54]. Další nevýhodou je jeho vysoká cena [59] na to, že nijak výrazně neprodlužuje život oproti ostatním cytostatikům. Bortezomib byl porovnáván s dexamethasonem u pacientů s recidivou mnohočetného myelomu. Medián návratu onemocnění byl u bortezomibu 6,22 měsíců a u dexamthasonu 3,49 měsíců [53]. Bortezomib má jako každý lék i vedlejší účinky jako jsou trombocytopenie, neuropatie, periferní neuropatie, průjem a únava [60].

Proto je snaha vytvořit nové lepší a účinnější inhibitory proteazomu, kterým se říká inhibitory proteazomu druhé generace.

4.2 Inhibitory proteazomu druhé generace

Tyto inhibitory by se daly rozdělit do dvou skupin: reverzibilní inhibitory s podobnou chemickou strukturou jako bortezomib a ireverzibilní inhibitory se zcela jinou strukturou. Do první skupiny patří látka nazvaná MLN9708, u které byla objevena protirakovinná aktivita i u pevných nádorů [61]. Také zde můžeme zařadit inhibitor CEP-18770, který je zase účinný při perorálním podání oproti bortezomibu [62]. Do druhé skupiny inhibitorů proteazomu druhé generace můžeme zařadit látku NPI-0052 známou jako salinosporamid A nebo marizomib, která byla izolovaná z mořské aktinomycety *Salinispora tropica* pro svou vysokou cytotoxicitu kvůli silné inhibici proteazomu. Marizomib je svou strukturou bicykl β -lakton- γ -laktam. Tato látka byla testována mimo jiné i na modelu lidské rakoviny pankreatu, kde bylo ukázáno, že efektivně vyvolává apoptózu u buněk rakoviny pankreatu. NPI-0052 inhibuje proteazom jinak než borzetomib, a proto je zajímavé tyto dvě látky použít v kombinaci, pak bychom měli dostat účinnější a lepší protirakovinné léčivo [63]. Ireverzibilní inhibitor proteazomu je také Carfizomib, jehož struktura je založená na peptidyl-epoxyketonu. Carfilzomib se stejně jako bortezomib primárně váže na β_5 podjednotku s aktivitou podobnou chymotripsinu. V preklinických testech *in vitro* a *in vivo* však bylo prokázáno, že carfilzomib je účinný jak proti krevním tak proti pevným nádorům [64].

Zcela nový typ inhibice proteazomu se nezaměřuje na 20S proteasom, ale na 19S proteasom, a to konkrétně na inhibici deubikvitinázy Poh1 obsažené ve víku [37]. Starý lék proti alkoholismu antabus (disulfiram) je s největší pravděpodobností právě inhibitor Poh1 a dalších proteinů obsahujících JAMM doménu v 19S proteazomu a má tedy protirakovinnou aktivitu [65].

4.3 Antabus (disulfiram)

První zmínka o tom, že by antabus mohl působit proti rakovině, je v článku z roku 1976 [66]. Pacientka trpěla metastazující rakovinou prsu, kde se metastázy nacházely už i v kostech. Její štěstí v neštěstí bylo to, že se stala alkoholičkou a musela se tedy léčit antabusem. Během následujících let metastázy zcela vymizely. Po vyléčení žila ještě dalších 10 let až do chvíle, kdy nešťastnou náhodou vypadla z okna třetího poschodí.

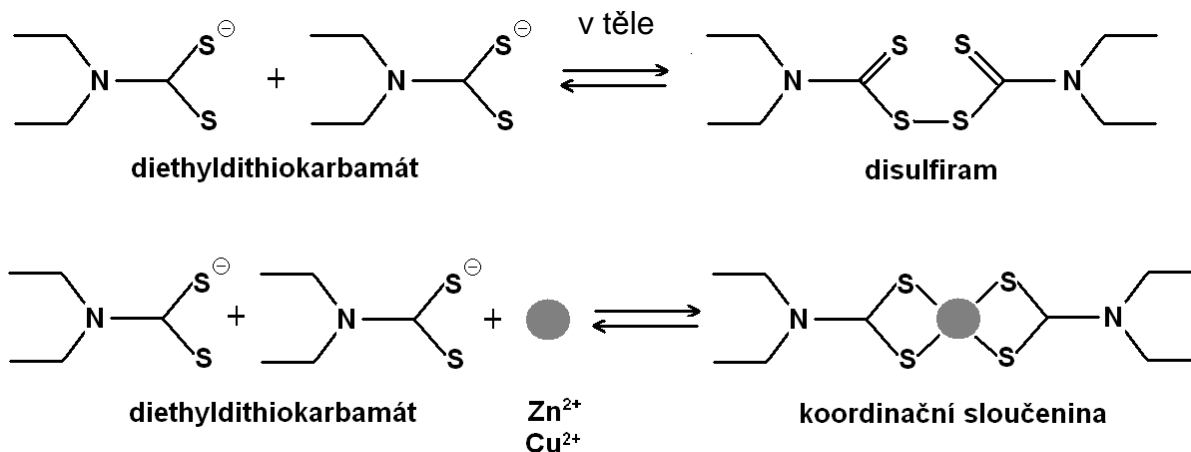
Základní farmakologický účinek antabusu je ireversibilní inhibice alkohol dehydrogenázy, která v metabolismu alkoholu přeměňuje acetaldehyd na acetát. Acetaldehyd se hromadí v těle a po požití alkoholu způsobuje nepříjemný stav [67]. Antabus tedy pomáhá v léčbě alkoholismu při odvykání od alkoholu a používá se jako prevence proti recidivě alkoholismu [68]. Antabus je v těle metabolizován na diethyldithiokarbamát neboli dithiokarb [obr. 7], který je zodpovědný za mechanismus účinku antabusu [69].

Dithiokarb byl před 20 lety intenzivně zkoumán kvůli možným příznivým účinkům na imunitu v léčbě AIDS [70]. Podle [71] dithiokarb údajně zpomalil průběh nemoci u pacientů s AIDS. Poté však byly provedeny dvojité zaslepené klinické testy s placebo kontrolou na více výzkumných pracovištích a zjistilo se, že dithiokarb nemá žádný vliv na pacienty s AIDS [72].

V dalším výzkumu byl diethyldithiokarbamát sodný využit jako adjuvantní imunoterapie v léčbě nemetastazující rakoviny prsu. Proběhl dvojité zaslepený klinický test, kde byli pacienti rozděleni do dvou skupin, jedna s dithiokarbamátem sodným a druhá s placebem. Po šesti letech bylo celkové přežití první skupiny 81 % a ve skupině s placebem to bylo jen 55 % [73].

Zjistilo se, že antabus jeví vysokou protirakovinnou aktivitu v komplexu s těmito těžkými kovy, jako je měď nebo zinek [obr. 7]. Čtyřiašedesátileté pacientce

ve IV. stádiu očního melanomu metastazujícího do jater podávali schválenou dávkou antabusu pro léčbu alkoholismu a glukonát zinečnatý třikrát denně. Již po dvou měsících se zdravotní stav pacientky zlepšil natolik, že se mohla vrátit do práce. Po třech měsících léčby testy ukázaly, že byl tumor redukován více jak o polovinu. Pacientce byl nadále podáván antabus se zinkem a žila dalších 53 měsíců bez zhoršení zdravotního stavu [74].



Obr. 7: Chemická struktura a chování antabusu (disulfiram) v těle a tvorba jeho komplexu s mědí nebo zinkem

Antabus (disulfiram) je v těle metabolizován na diethyldithiokarbamát. Antabus jeví vysokou protirakovinnou aktivitu v komplexu s těžkými kovy, jako je měď nebo zinek.

V dalším výzkumu bylo zjištěno, že za protirakovinným účinkem antabusu stojí inhibice proteasomu. Měď se normálně vyskytuje v tkáních a séru mnoha typů lidské rakoviny, kde je potřebná pro angiogenezi, tedy vývoji tumoru. Měď by proto mohla splňovat úlohu zacílení léčiva přímo na tumor. Po podání netoxického antabusu vytváří s mědí komplex, který silně inhibuje proteasomální aktivitu v buněčné linii rakoviny prsu *in vitro*. Také spouští apoptózu u „nesmrtelných“ rakovinných buněk, zajišťuje tedy jejich smrt. Štěp lidské rakoviny prsu byl vložen do myši *in vivo*, kde komplex antabusu s mědí výrazně snížil růst tumoru o 74 %. Podobně však reagovala i měď samotná. Protirakovinné účinky souvisí s inhibicí proteasomu, a tedy i s výše zmíněnou inhibicí dráhy NF-κB a také indukci apoptózy [75].

Jak se zdá, komplex antabusu se zinkem nebo mědí je účinný v případě pevných nádorů na rozdíl od bortezomibu. Proto je jeho mechanismus účinku velkou otázkou, která je dnes intenzivně studována.

Návrhem mechanismu účinku komplexu antabusu s mědí nebo zinkem je, že se váže na proteiny s JAMM doménou nacházející se ve víku 19S proteasomu [76]. JAMM doména je totiž velmi podobná doméně vážící kovy v karboxypeptidáse A [77]. Zde nejspíš dochází k inhibici deubikvitinázy Poh1, která byla již dříve navrhována jako molekulární cíl léčby rakoviny [37].

Z hlediska rakoviny pankreatu se komplex disulfiramu se zinkem zatím osvědčil v adjuvantní terapii při testu *in vivo*. Do myši byl vložen štěp rakoviny pankreatu rezistentní na gemcitabin a byl jí vpravován antabus se zinkem v kombinaci se standardním cytostatikem gemcitabinem. Výsledky ukázaly kompletní potlačení růstu tumoru po osmi injekcích ve čtyřech týdnech [78].

Dnes již probíhá I. fáze klinických testů s číslem NCT00742911 na Universitě v Utahu, kde je pacientům s rakovinou jater podáván antabus s glukonátem měďnatým. Předpokládané ukončení je v červenci 2012 [79]. Pacienti denně dostávají 250 mg disulfiramu během večere a glukonát měďnatý s maximálním obsahem elementární mědi 8 mg během snídane. Doba podávání jednotlivých složek komplexu antabusu s mědí je různá proto, aby komplex nevznikal ve střevě, kde působí toxicky, čímž vznikají nežádoucí účinky [80].

5. Klinické testy

Na základě výzkumných studií jsou v klinických testech testovány nové způsoby léčby, které jsou mnohdy poslední nadějí pacientů s pokročilým stádiem rakoviny. Klinické testy ověřují, zda jsou nové léky účinné a bezpečné. Testují se nové léky, způsoby léčby a kombinace léků, včetně kombinací s operacemi, chemoterapií, cílenou terapií a radioterapií [1]. Klinické testy se provádí až po důkladném preklinickém testování založeném na hodnotných informacích, poté jsou výsledky prezentovány farmaceutickým firmám (investorům) a ty v případě úspěchu udělují finanční prostředky, čili grant. Klinických testů se většinou účastní pacienti se specifickým zdravotním stavem potřebným pro testování. V klinických testech obecně je určována účinnost a efektivnost buď nové látky u pacientů s určitou chorobou, nebo jiné dávky léků, než se běžně užívají. Dále může být již podávaný lék testován pro jiné využití, než bylo dříve schváleno [81]. Podle [82] by se měly sledovat případné pozitivní účinky léku i na jiná onemocnění, kterými pacient také trpí. Sníží se tak cena, protože se ušetří za vývoj nového léku.

Na počátku vývoje nového léčiva je syntéza nových chemických látek. Čím více informací je známo o vzájemném vztahu mezi strukturou a účinkem, tím cíleněji lze hledat nové účinné látky. O biologických účincích nové látky informují preklinické testy. Pro první orientaci postačují biochemicko-farmakologické testy nebo pokusy na buněčných kulturách, izolovaných buňkách nebo orgánech. Tyto modely však nikdy nemohou napodobit komplexní biologické děje probíhající v živém organismu, proto se musí potenciální léčiva testovat na zvířatech. Teprve pokusy na zvířatech demonstrují, zda se požadovaný účinek látky skutečně dostaví a zda se při tom neprojeví toxické účinky. Sleduje se toxicita při akutním a chronickém podávání látky, mutagenita, kancerogenita nebo i teratogenita. Na zvířatech se musí zjistit, jak se nová sloučenina v organismu resorbuje, jak se rozděluje v tkáních a jak se z organismu eliminuje (farmakokinetika). Již v preklinických pokusech na zvířatech se jen velmi malý počet testovaných sloučenin ukáže jako potenciálně vhodný pro použití u člověka. Klinické testy začínají I. fází u zdravých pokusných osob, aby se zjistilo, zda se účinek pozorovaný u zvířat dostaví také u lidí. Stanovuje se vztah mezi dávkou a účinkem. V II. fázi se látka poprvé podává jako potenciální léčivo v předpokládané indikaci vybraným nemocným lidem. Jestliže se prokáže dobrá

účinnost a nepatrný výskyt nežádoucích účinků, následuje III. fáze, v níž se na větším počtu pacientů srovnává terapeutická účinnost nové látky se standardní terapií [83]. Ve II. a III. fázi klinických testů se využívá tzv. randomizované studie, kde je náhodně určeno, jestli bude pacient dostávat testovanou látku nebo placebo. Placebo je falešný lék bez účinku, který umožňuje ukázat účinek testované látky. V těchto fázích klinických testů je také využíváno dvojitě zaslepených testů, kde lékař ani pacient neví, jestli je pacientovi podávána testovaná látka nebo placebo. Tuto informaci má pouze sponzor klinických testů, který ji pak poskytne výzkumníkům [81]. Jako určitá forma pokusu na lidech musí být klinické testy nových léčiv kontrolovány a schvalovány příslušnými etickými komisemi v souladu s mezinárodním etickým kódem. V průběhu klinických testů se prokáže neupotřebitelnost mnoha testovaných látek. Tak nakonec asi z 10 000 nově syntetizovaných látek zbyde pouze jedna vhodná jako léčivo. Schvalovací řízení pro nové léčivo probíhá na základě žádosti výrobce na úrovni státního úřadu. Žadatel musí na základě pokusných výsledků preklinických a klinických testů prokázat, že nové léčivo odpovídá kritériím účinnosti a nezávadnosti. Po schválení a registraci smí být nové léčivo s obchodním názvem uvedeno na trh jako lék. Během všeobecného používání se dále sleduje, zda se léčivo osvědčuje, což je IV. fáze klinických testů. Teprve mnohaleté pozorování umožňuje stanovit skutečné terapeutické hodnoty nového léku [83].

Vývoj nového léku je tedy velmi drahá a dlouhodobá záležitost. Odhaduje se, že vývoj jednoho nového léku stojí asi 800 milionů amerických dolarů a trvá průměrně 15 let. Navíc se čím dál víc zvyšuje množství peněz, které protečou klinickými testy [84]. Během 90. let selhalo 70 % onkologických léčiv ve II. fázi a 59 % ve III. fázi klinických testů [85]. Finanční prostředky pro klinické testování poskytují farmaceutické firmy, které své peníze získávají zpátky prodejem nových úspěšných léků, které jsou tím pádem drahé [84].

Velkým problémem je však fakt, že antabus má již své využití v léčbě alkoholismu a nelze znovu patentovat. Farmaceutické firmy by tedy nezískaly zpět peníze, které by vložily do klinických testů pro využití antabusu v protirakovinné léčbě [86].

6. Neziskový lék – antabus

Vzhledem k vysoké ceně a dlouhodobosti vývoje nového léčiva by se měly znovu prozkoumávat účinky již schválených léků. V mnoha případech se již stalo, že lék byl původně uznán pro léčbu úplně jiné nemoci, než na kterou se pak používal. Tento přístup by výrazně zkrátil dobu testování a hlavně zlevnil klinické testy [87]. Léky, které jsou již používány, by mohly být vyhodnoceny už ve II. fázi klinických testů, čímž by se ušetřilo 40% z celkové ceny klinických testů [84]. Podle [86] je však vyvíjeno malé úsilí pro znovu zúčelnění starých, již uznaných léků. Měly bychom vyvíjet levné léky pro vážně nemocné pacienty než drahou léčbu, která jen krátce prodlouží pacientovi život [88].

Jedním způsobem, jak používat lék pro nový účel, je ho znovu patentovat. Avšak tento systém je neefektivní, protože léky budou pořád drahé a nedostupné pro mnoho lidí nejen v chudých zemích světa. Slibným přístupem, jak používat léky s novým účelem, a přitom je znovu nepatentovat, je získání finančních prostředků na klinické testy od vlády nebo charitativních organizací. Tento přístup vede k zlepšení zdravotnického systému a zároveň k vývoji levných neziskových léků dostupných všem lidem po celém světě [86]. Jednou z takových charitativních organizací je GlobalCures podporující vývojem neziskových léků proti rakovině. Zakladatelkou této iniciativy je Vidula Skhutme, kterou k tomu vedla nepříjemná zkušenost, kdy její kamarádka onemocněla rakovinou prsu a nebylo možné ji vyléčit dostupnou chemoterapií. GlobalCures získává peníze veřejnou dobročinností. Tato nezisková organizace mnohem víc dbá na kvalitu léčiva a pacienty než farmaceutické firmy, které se orientují hlavně na zisk z prodeje léčiv [89].

Pokud by však neziskový lék v klinických testech selhal, peníze od vlády a charitativních organizací by byly promarněny. Proto musí být pečlivě vybrán startovní případ ve vývoji neziskových léků. V tomto smyslu je vhodným kandidátem antabus [86]. Pacienti s rakovinou mohou získat jednu 500mg tabletu antabusu denně za 1-2 amerických dolarů, což znamená, že roční léčba antabusem by stála pouhých 550 amerických dolarů [90]. Antabus jako starý lék proti alkoholismu a nový proti rakovině by se měl stát startovním případem pro vývoj neziskových léků [91].

7. Cíl práce

Cílem experimentální práce bylo zjistit, jaká je cytotoxicita bortezomibu vůči vybrané buněčné linii odvozené od karcinomu slinivky břišní. Porovnat ji s cytotoxicitou alternativního inhibitoru proteazomu diethyldithiokarbamátem měďnatým, což je syntetický komplex antabusu s mědí. Zároveň porovnat cytotoxicitu jednotlivých složek komplexu: samotného diethyldithiokarbamátu ve formě diethyldithiokarbamátu sodného a samotné mědi ve formě chloridu měďnatého.

Cílem bylo také stanovit hodnoty IC_{50} bortezomibu, diethyldithiokarbamátu měďnatého, diethyldithiokarbamátu sodného a $CuCl_2$. Hodnoty IC_{50} představují koncentraci testovaných látek mající za následek 50% úhyn nebo snížení proliferace u sledované buněčné linie [92].

8. Materiál a metodika

8.1 Materiál

8.1.1 Biologický materiál

- Adherentní buněčná linie odvozená od karcinomu pankreatu MIA-Pa-Ca-2. Tato linie byla odvozena od nediferenciované lidské rakoviny pankreatu, která byla získána od pětádesátiletého bělošského muže. Buňky jsou velké s robustní cytoplazmou, mají vysoký stupeň aneuploidie a mají tendenci růst na sobě, eventuelně rostou volně v suspenzi [93].

8.1.2 Chemikálie

- CuCl_2 , 307483-100G, Sigma-Aldrich
- Dezinfekce Izorapid, Oro-clean chemie
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; With 4500 mg/L glucose, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, cell culture tested, D6546-6X500ML, Sigma-Aldrich
- Fetal Bovine Serum; Heat Inactivated, sterile-filtered, cell culture tested, F9665-500ML, Sigma-Aldrich
- Komplexy diethyldithiokarbamátu sodného a diethyldithiokarbamátu měďnatého, Mgr. Boris Cvek Ph.D.
- L-glutamin G63921-VL, Sigma-Aldrich
- Penicilinn/Streptomycin (100ml), P11-010 PAA, The Cell Culture Company
- Triton-X 100, 37240, Serva
- Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich
- Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda přístrojem Aqua osmotic.

8.1.3 Roztoky

- Médium (50 ml bovinního séra, 5 ml penicilin/streptomycin, 5 ml L-glutaminu)
- Methyltetrazoliová sůl (MTT) roztok: 3 mg MTT/ml PBS, Sigma-Aldrich
- MTT rozpouštěcí roztok: DMSO/ 1% NH₃
- PBS 10x (pH 7,4) NaCl 40g, KCl 1g, Na₂HPO₄ x12 H₂O 16,05g, KH₂PO₄ 0,1g
- PBS 1x (pH 7,4) NaCl 4g, KCl 0,1g, Na₂HPO₄x12 H₂O 1,605g, KH₂PO₄ 0,01g
- 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
- Zásobní roztok bortezomibu 3,5 mM (w/v) DMSO, Bortezomib, Millenium Pharmaceuticals
- Zásobní roztok CuEt v DMSO (20 mM). Z důvodu nízké stability byl roztok komplexu připravován vždy před jednotlivými experimenty.

8.1.4 Laboratorní vybavení

- 0,5ml mikrozkušavky, Tubes for you
- 1,5ml mikrozkušavky, Tubes for you
- 2ml mikrozkušavky, Tubes for you
- 50ml centrifugační zkumavky, konické, Orange Scientific
- epTIPS 0,1 - 10 µl, 2 x 500 špiček, Eppendorf
- epTIPS 2 - 200 µl, 2 x 500 špiček, Eppendorf
- epTIPS 50 - 1 000 µl, 2 x 500 špiček, Eppendorf
- Immobilon[®]-P Polyvinylidene Difluoride membranes, Millipore
- Kultivační destičky 96 jamkové, Orange Scientific
- Kultivační láhev (75 cm²), filter cap, Orange Scientific
- Petriho misky, Orange scientific
- Plastové pipety, Orange scientific

- Stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití 2ml, Chirana
- stojany, Bürkerova komůrka, kahan, zapalovač, gumové rukavice

8.1.5 Přístroje

- Inkubátor Contherm, Nový zeland
- Laminární box SafeFASTTop, faster, Itálie
- Membránová pumpa, KNF-lab, Francie
- Mikroskop T2 103411, Olympus, ČR
- Pipeta multi-kanálová (30-300 μ l), biohit Proline plus
- Pipetovací nástavec SWIFTPET+ (Pipeta floubox), PZ HTL S.A.
- Sada pipet (0,1-2,5 μ l, 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l), Eppendorf
- Spektrofotometr Tecan, Švýcarsko
- Třepačka reax Top Heidolf, Německo
- Váhy Kern ABS 80-4 , Německo
- Vodní lázeň LCB 11(330 x270x380) LabTech, Česká republika

8.2 Metodika: hodnocení cytotoxicity – MTT test

8.2.1 Princip metody

MTT test je metoda umožňující detekovat cytotoxicitu testované látky vůči buněčné linii. Testovaná látka je rozpuštěna v kultivačním médiu, aby nedošlo k inhibici buněčného cyklu, pak je aplikovaná přímo na buněčnou linii. Buněčná linie s testovanou látkou je ponechána po určitou dobu (24 h, 48 h, 72 h) v inkubátoru při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Po uplynutí této doby je k buněčné linii přidán roztok žluté tetrazoliové soli MTT-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid, který je metabolizován mitochondriálními enzymy živých buněk na nerozpustný fialový formazán. Přesněji, mitochondriální dehydrogenázy redukují žlutou formu MTT na fialový produkt. Míra zbarvení je přímo úměrná viabilitě

(životnosti) buněk. Zbarvení je změřeno spektrofotometrem při 570 nm a z hodnot absorpance je vypočítána viabilita. Výhodou této metody je její rychlost, jednoduchost a nízká cena. Nevýhodou však je, že při opakování může vzniknout relativně vysoká chyba měření. Tato metoda neposkytuje přesné informace o tom, co se s buňkou děje (cytotoxický/cytostatický efekt, popř. indukce proliferace) [94].

8.2.2 Postup práce

1) Kultivace buněk

- Adherentní buněčná linie MIA-Pa-Ca-2 byla kultivována ve střední plastové kultivační láhvi (75cm²) s 15-20 ml média.

2) Pasážování

- Z kultivační láhve bylo odsáto médium a buňky byly propláchnuty 2-5 ml 1x PBS ohřátého na 37°C, následně byl přidán 1 ml trypsinu a kultivační láhev byla ponechána na 1 minutu v inkubátoru.
- Poté bylo přidáno 9 ml média ohřátého na 37°C, kvůli neutralizaci trypsinu a byly resuspendovány buněčné shluky pomocí pipety.
- Do kultivační láhve bylo vráceno 1 ml buněčné suspenze a bylo přidáno 15-20 ml nového média.

3) Počítání a výsev buněk

- Z buněčné suspenze bylo odebráno 10 µl a již v nesterilním prostředí bylo přidáno 90 µl trypanové modři. Z této suspenze bylo odebráno dvakrát 5 µl a vpraveno do každé ze dvou mřížek Bürkerovy komůrky, poté byla suspenze na mřížkách přikryta krycím sklíčkem a pod mikroskopem byly počítány buňky v 5 čtvercích každé mřížky, tj. 10 čtverců dohromady.
- Z průměrného počtu buněk v jednom čtverci bylo vypočítáno množství buněčné suspenze pro výsev do kultivační destičky tak, aby bylo v každé jamce 25 000 buněk.
- Osmikanálovou pipetou bylo do každé požadované jamky kultivační destičky vneseno 200 µl připravené buněčné suspenze. Kultivační destička byla ponechána přes noc v inkubátoru.

4) Příprava roztoků

- Každá látka byla testována ve čtyřech různých koncentracích v tripletu (jedna koncentrace ve třech opakováních, tj. tři jamky na 96 jamkové kultivační destičky).
- Ze zásobního roztoku bortezomibu (3,5 mM) byly připraveny roztoky o koncentracích 0,001; 0,01; 0,1 a 1 mol/l, kde rozpouštědlem bylo DMSO.
- Byl připraven zásobní roztok diethyldithiokarbamátu měďnatého – CuET (20 mM, Mr = 360 g/mol), navážka 0,00144 g CuET byla doplněna 200 μ l DMSO. Ze zásobního roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích 1; 5; 10; 15 mol/l, kde rozpouštědlem bylo DMSO.
- Byl připraven zásobní roztok diethyldithiokarbamátu sodného - ET (200 mM, Mr = 225,3 g/mol), navážka 0,09012 g ET byla doplněna 2 ml destilované vody. Ze zásobního roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích 10; 25; 50; 100, kde rozpouštědlem byla destilovaná voda.
- Byl připraven zásobní roztok chloridu měďnatého (800 mM, Mr = 170,5 g/mol), navážka 0,27 g byla doplněna 2 ml destilované vody. Ze zásobního roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích 400; 600; 800; 1000 mol/l, kde rozpouštědlem byla destilovaná voda.
- Vodné roztoky byly navíc přefiltrovány přes sterilní membránu z důvodu možné kontaminace deionizované vody.

5) Aplikace testovaných látek:

- Z každého jednotlivého připraveného roztoku o různých koncentracích byl vždy odebrán 1 μ l a vložen do připraveného 1 ml média, koncentrace tedy byly v končeném důsledku v μ mol/l.
- Z kultivační destičky bylo po částech odsáto médium a do každé jamky s buňkami bylo aplikováno 200 μ l roztoku o čtyřech různých koncentracích každé látky, vždy v tripletu.
- Dále bylo aplikováno 200 μ l na jamku s buňkami od každé kontroly: kontrola vlivu rozpouštědla: DMSO s médiem v poměru 1:1000, destilovaná voda s médiem v poměru 1:1000, dále pozitivní kontrola: Triton-X s médiem v poměru 300:700 a negativní kontrola: samotné médium.
- Kultivační destička byla pak ponechána v inkubátoru 24 hodin.

6) MTT test:

- Kapalný obsah kultivační destičky byl odstraněn a jamky byly promyty 100 μ l 1x PBS, poté bylo aplikováno 100 μ l žlutého roztoku MTT s médiem v poměru 1:9, kultivační destička byla inkubována 45 minut, poté byl obsah znovu odstraněn a aplikováno 100 μ l roztoku 1% amoniaku v DMSO.
- Stupně fialového zbarvení u jednotlivých koncentrací jednotlivých látek byly proměřeny spektrofotometrem (vlnová délka 570 nm), dle přednastaveného protokolu pro MTT.

9. Výsledky

V experimentu byla zjišťována cytotoxicita bortezomibu, CuET, ET a CuCl₂ vůči buněčné linii odvozené od karcinomu slinivky břišní MIA-Pa-Ca-2. Doba působení testované látky byla 24 hodin. Každá látka byla testována ve čtyřech koncentracích, a to v tripletu (tři jamky na 96 jamkové kultivační destičce). Hodnoty absorbancí pro každou koncentraci byly zprůměrovány a od této hodnoty odečten blank, tedy pozadí, jež představovalo průměr hodnot absorbancí jamek, kde byl aplikován Triton-X. Viabilita buněk byla spočítána podle vztahu:

$$\text{(vzorek – blank) / (kontrola vlivu rozpouštědla – blank) x 100,}$$

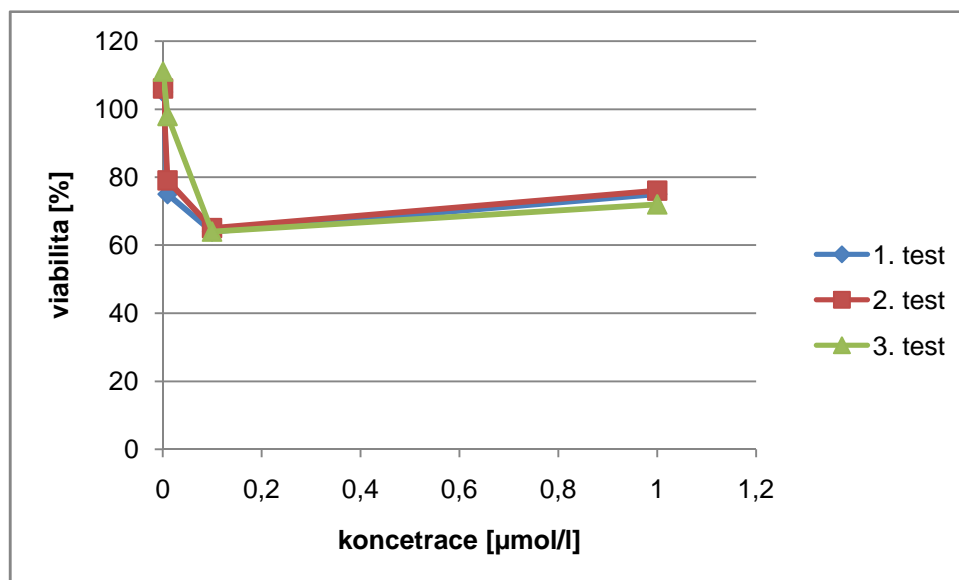
kde vzorek je průměr absorbancí po působení dané látky o dané koncentraci, blank je průměr absorbancí po působení Tritonu-X a kontrola vlivu rozpouštědla je průměr absorbancí po působení rozpouštědla, v kterém byla daná látka rozpouštěna, tedy DMSO nebo destilovaná voda.

Celý test byl proveden ve třech na sobě nezávislých opakováních. V následujícím přehledu je ukázána viabilita buněk versus koncentrace testovaných látek.

Tab. I: Závislost koncentrace bortezomibu a viability buněk

Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Viabilita [%]			
	1. test	2. test	3. test	průměr
0,001	105	106	111	107
0,01	75	79	98	84
0,1	64	65	64	64
1	75	76	72	74

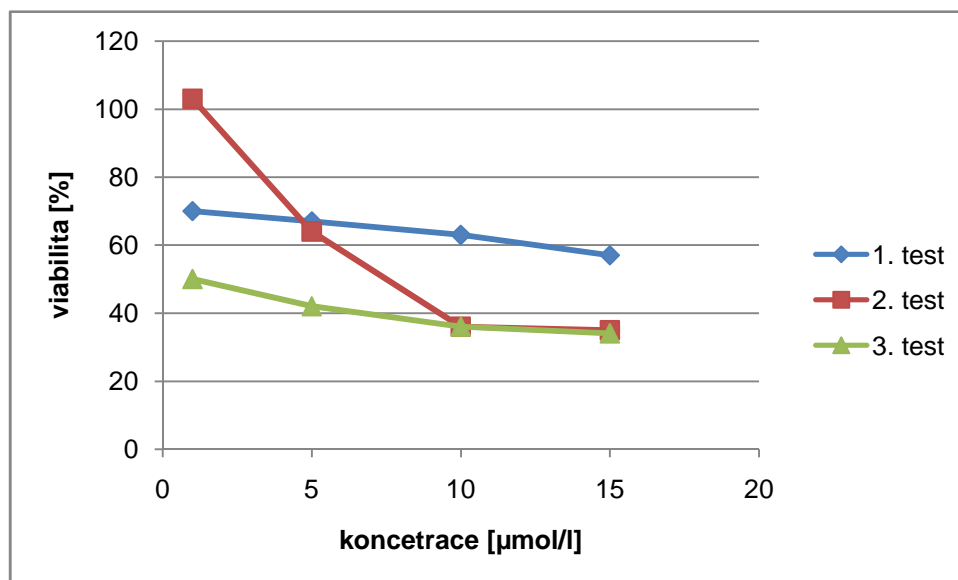
Graf 1: Viabilita buněk po působení bortezomibu



Tab. II: Závislost koncentrace CuET a viability buněk

Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Viabilita [%]			
	1. test	2. test	3. test	průměr
1	70	103	50	74
5	67	64	42	58
10	63	36	36	45
15	57	35	34	42

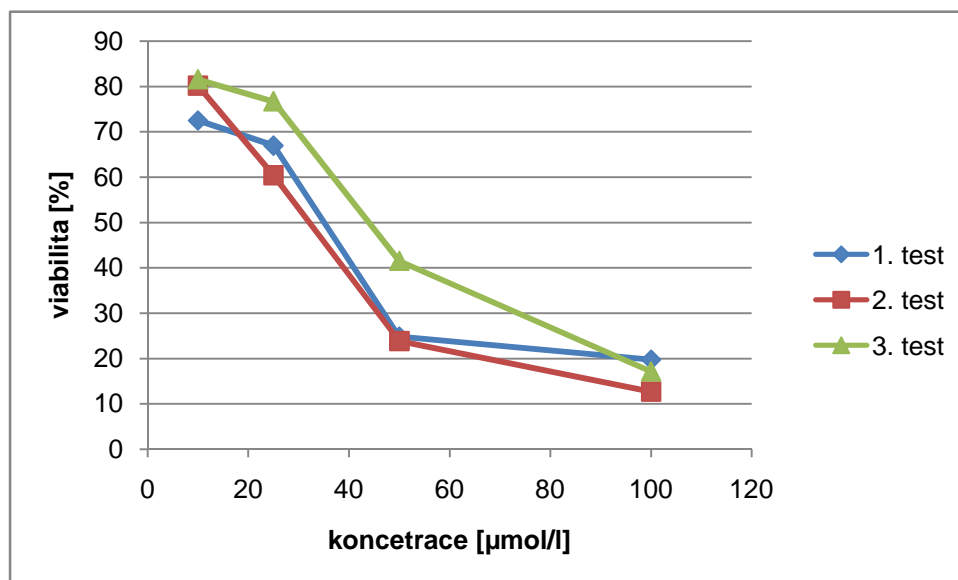
Graf 2: Viabilita buněk po působení CuET



Tab. III: Závislost koncentrace ET a viability buněk

Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Viabilita [%]			
	1. test	2. test	3. test	průměr
10	72	80	82	78
25	67	60	77	68
50	25	24	42	30
100	20	13	17	17

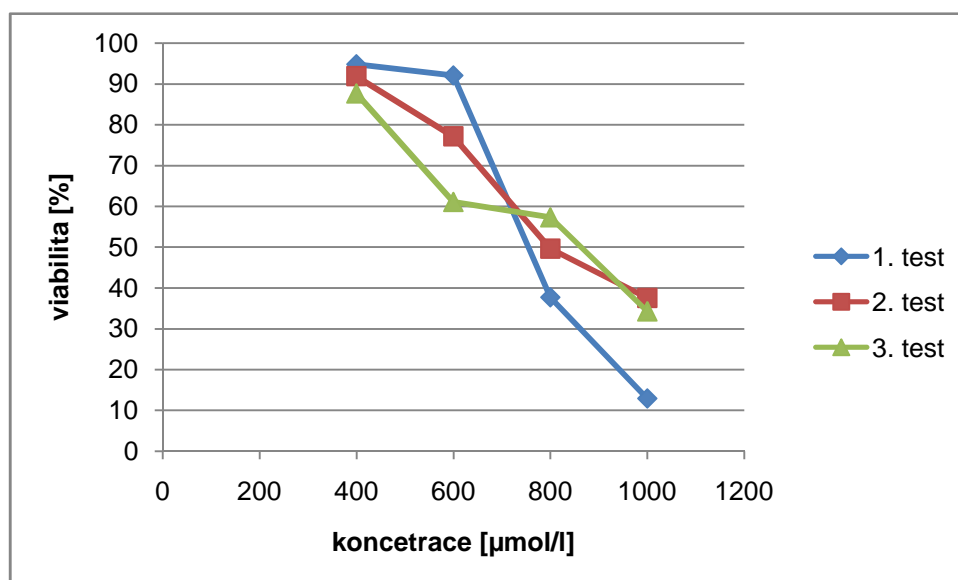
Graf 3: Viabilita buněk po působení ET



Tab. IV: Závislost koncentrace CuCl_2 a viability buněk

Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	Viabilita [%]			
	1. test	2. test	3. test	průměr
400	95	92	88	92
600	92	77	61	77
800	38	50	57	48
1000	13	38	34	28

Graf 4: Viabilita buněk po působení CuCl_2



Hlavní parametr cytotoxicity na rakovinných liniích je tzv. hodnota IC_{50} , což je koncentrace testovaných látek, při které je 50% viabilita buněk. Neboli koncentrace testovaných látek mající za následek 50% úhyn nebo snížení proliferace u sledované buněčné linie [92]. Hodnota byla odečtena z grafu lineární regrese závislosti viability a koncentrace testované látky podle programu ED50 plus.

Tab. V: IC_{50} testovaných látek

látka	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]			IC_{50}	SD
	1.test	2.test	3.test	průměr	[$\mu\text{mol/l}$]
Bortezomib	>1	>1	>1	>1	-
CuET	>15	>15	>15	>15	-
ET	62	52	64	59	6,5
CuCl₂	780	890	898	856	66,0

SD = směrodatná odchylka

10. Diskuse

Cytotoxicita bortezomibu, CuET, ET a CuCl_2 byla testována ve čtyřech koncentracích vůči buněčné linii odvozené od karcinomu slinivky břišní MIA-Pa-Ca-2. Doba působení testované látky byla 24 hodin. Test byl proveden ve třech na sobě nezávislých opakováních.

Bortezomib byl testován v koncentracích 0,001; 0,01; 0,1 a 1 $\mu\text{mol/l}$, přičemž průměrná viabilita při koncentraci 0,001 $\mu\text{mol/l}$ byla 107 %, při 0,01 $\mu\text{mol/l}$ 84 %, při 0,1 $\mu\text{mol/l}$ 64 % a při 1 $\mu\text{mol/l}$ 74 %. Viabilita při koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ byla paradoxně vyšší než při 0,1 $\mu\text{mol/l}$ [viz tab. I]. Výsledky nebyly příliš reprodukovatelné, a proto se nepodařilo určit přesnou hodnotu IC_{50} . Výsledky všech tří testů byly však podobné a jednotlivé křivky závislosti koncentrace a viability vykazovaly velmi podobný průběh [viz graf 1]. Pokud by bylo dosaženo hodnoty IC_{50} bortezomibu, byla by vyšší než 1 $\mu\text{mol/l}$ [viz tab. V]. Avšak IC_{50} vyšší než 1 $\mu\text{mol/l}$ je pro bortezomib vysoká hodnota. Hodnoty IC_{50} bortezomibu jsou většinou nižší než 1 $\mu\text{mol/l}$, např. IC_{50} u buněčné linie odvozené od rakoviny prsu testované v naší laboratoři bylo 0,757 $\mu\text{mol/l}$ [95]. Takto vysoká hodnota IC_{50} ukazuje na možnou rezistenci buněk rakoviny pankreatu MIA-Pa-Ca-2 vůči bortezomibu. Bortezomib byl v jiné práci testován na buněčné kultuře MIA-Pa-Ca-2 v kombinaci s gemcitabinem, který se používá jako standardní léčba rakoviny pankreatu. Ukázalo se, že pokud je po gemcitabinu přidán k buněčné linii bortezomib, zvyšuje se citlivost buněk ke gemcitabinu [96]. Bortezomib sám o sobě tedy není příliš cytotoxický pro buňky rakoviny pankreatu, ale může alespoň zvyšovat účinek gemcitabinu [50, 51].

Komplex antabusu s mědí (CuET) byl testován ve vyšších koncentracích než bortezomib, a to 1; 5; 10; a 15 $\mu\text{mol/l}$. Průměrná viabilita při koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ byla 74 %, což odpovídá průměrné viabilitě bortezomibu při stejné koncentraci, při koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ to bylo 58 %, při 10 $\mu\text{mol/l}$ 45 % a při 15 $\mu\text{mol/l}$ 42 % [viz tab. II]. Při koncentraci 10 a 15 $\mu\text{mol/l}$ je průměrná viabilita velmi podobná, může to souviset se špatnou rozpustností CuET v médiu při vyšších koncentracích. Z grafu 2 [viz graf 2] je zřetelné, že jedna ze tří křivek (2. test) má standardní průběh a ostatní mají spíše pozvolnější průběh. Nepodařilo se zreprodukovat test ve třech nezávislých opakováních, nejspíš z důvodu špatné rozpustnosti CuET v médiu a tedy nepřesné koncentrace. Proto se ani zde nepodařilo určit přesnou hodnotu IC_{50} .

Pokud by bylo dosaženo hodnoty IC_{50} CuET, byla by vyšší než 15 $\mu\text{mol/l}$ [viz tab. V]. Jestliže je však koncentrace CuET vyšší než 15 $\mu\text{mol/l}$, vytváří se v roztoku krystaly a CuET se dále v médiu nerozpouští [vlastní pozorování]. Doba působení CuET na buňky rakoviny pankreatu MIA-Pa-Ca-2 však byla pouhých 24 hodin. Výsledky by se mohly lišit, kdyby doba působení byla 48 nebo 72 hodin. Například při testování pterostilbenu na stejné buněčné linii rakoviny pankreatu MIA-Pa-Ca-2 byla prokázána výrazně snížená viabilita ve všech testovaných koncentracích až po 72 hodinách [97]. Výsledky se také mohou lišit, když je daná látka testovaná na buněčné kultuře nebo v živém organismu, jak už bylo ukázáno ve článku [78], kde komplex antabusu se zinkem v kombinaci s gemcitabinem výrazně potlačil růst nádoru pankreatu u myši. Vysoká hodnota IC_{50} CuET může být známkou rezistence buněk rakoviny pankreatu MIA-Pa-Ca-2 vůči CuET. Rezistence je velkým problémem u rakoviny pankreatu, zvláště pak při hledání vhodné terapie [98].

Samotný diethyldithiokarbamát (ET) vykazoval standardní průběh závislosti viability na koncentraci ve všech třech pokusech [viz graf 3]. Jak je zřetelné z grafu, viabilita buněk postupně klesá se zvyšující se koncentrací. ET byl testován v těchto koncentracích: 10; 25; 50 a 100 $\mu\text{mol/l}$. Při koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ byla průměrná viabilita 78 %, při 25 $\mu\text{mol/l}$ 68 %, při 50 $\mu\text{mol/l}$ 30 % a při 100 $\mu\text{mol/l}$ 17 % [viz tab. III]. Testované koncentrace ET jsou však vyšší než u CuET, jelikož je lépe rozpustný než CuET. Hodnota IC_{50} byla odečtena z grafu lineární regrese závislosti viability a koncentrace ET. Průměrná hodnota IC_{50} je 59 $\mu\text{mol/l}$ se směrodatnou odchylkou 6,5 $\mu\text{mol/l}$. [viz tab. V]. Tato hodnota je poměrně vysoká, a proto se dá usoudit, že je ET pro buňky rakoviny pankreatu MIA-Pa-Ca-2 málo toxický.

Samotná měď jevila cytotoxicitu až při velmi vysokých koncentracích, které byly 400; 600; 800 a 1000 $\mu\text{mol/l}$. Při koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$ byla průměrná viabilita 92 %, při 600 $\mu\text{mol/l}$ 77 %, při 800 $\mu\text{mol/l}$ 48 %, při 1000 $\mu\text{mol/l}$ 28 % [viz tab. IV]. Viabilita buněk postupně klesá se zvyšující se koncentrací [viz graf 4]. Hodnota IC_{50} byla odečtena z grafu lineární regrese závislosti viability a koncentrace CuCl_2 . Průměrná hodnota IC_{50} je 856 $\mu\text{mol/l}$ se směrodatnou odchylkou 66,0 $\mu\text{mol/l}$ [viz tab. V]. Tato hodnota je velmi vysoká a dá se říct, že měď je pro buňky rakoviny pankreatu MIA-Pa-Ca-2 netoxická.

11. Závěr

Na buněčné linii odvozené od karcinomu slinivky břišní byly testovány inhibitory proteazomu bortezomib, který se již používá v klinické praxi [46] a alternativní inhibitor proteazomu CuET. Ani u jedné látky se nepodařilo stanovit přesné hodnoty IC_{50} . Víme však, že IC_{50} bortezomibu je vyšší než 1 $\mu\text{mol/l}$ a IC_{50} CuET je vyšší než 15 $\mu\text{mol/l}$. Testovány byly také jednotlivé složky komplexu CuET, kdy ET vykazoval hodnotu IC_{50} 59 $\mu\text{mol/l}$ a Cu^{2+} 856 $\mu\text{mol/l}$.

Kvůli nereprodukovatelnosti výsledku bortezomibu a CuET není možné porovnat jejich vzájemnou cytotoxicitu, ani porovnat cytotoxicitu CuET s jeho jednotlivými složkami, ET a Cu^{2+} .

Možným důvodem vysokých hodnot IC_{50} bortezomibu a CuET je rezistence buněk rakoviny pankreatu MIA-Pa-Ca-2 k těmto látkám. Rezistence je u rakoviny pankreatu všeobecně závažný problém [98]. Rakovina pankreatu je velmi agresivní onemocnění a v současné době proti ní neexistuje žádná chemoterapie, která by ji úplně vyléčila [2].

12. Seznam použitých zkratek

5 - FU - 5 - fluoruracil

19S - regulační část proteazomu

20S - proteolytická část proteazomu

26S - multiproteinový komplex proteazom

AAA ATPázy - ATPázy spojené s různými buněčnými aktivitami

AIDS - acquired immunodeficiency syndrome

bort. - bortezomib

CEP-18770 - inhibitor proteazomu, Cephalon & Cell Therapeutics Europe

CO₂ - oxid uhličitý

CuCl₂ - chlorid měďnatý

CuET - diethyldithiokarbamát měďnatý

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DUB - deubikvitináza

E1 - ubikvitin aktivující enzym

E2 - ubikvitin přenášející enzym

E3 - ubikvitin-ligáza

E4 - polyubikvitinový řetězec prodlužující enzym

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

ET - diethyldithiokarbamát

IC₅₀ - half maximal inhibitory concentration

IKK - I-κB kináza

I-κB - inhibitor NF-κB

JAMM/MPN - JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme

MALT- lymfom - mucosa-associated lymphoid tissue

MG-132 - inhibitor proteazomu

MIA-Pa-Ca-2 - buněčná linie odvozená od karcinomu pankreatu, pancreatic cancer

MJD - proteázy Machado-Josephovy nemoci

MLN120 - inhibitor proteazomu, Millenium Pharmaceuticals

MLN9708 - inhibitor proteazomu Millenium Pharmaceuticals

MTT - methylnitrotetrazoliová sůl
NCT00742911 - číslo klinických testů CuET v Utahu
NF- κ B - nukleární faktor NF- κ B
NPI-0052 - inhibitor proteazomu, Nereus Pharmaceuticals
OUT - otubain proteázy (z rakoviny vaječníku)
PA700 - regulační část proteazomu
PBS - fosfátový fyziologický pufr
Poh1 - Pad one homolog-1
PS-341 - inhibitor proteazomu, ProScript - bortezomib
Rpn11 - Regulatory particle non-ATPase-like 11
Rrp6 - Ribosomal RNA Processing
SD - směrodatná odchylka
Ub - ubikvitin
UCH - ubikvitin C-terminální hydrolázy
UPS - ubikvitin proteazomový systém
USP - ubikvitin specifické proteázy
 α_{1-7} , β_{1-7} , β_{1-7} , α_{1-7} - podjednotky proteazomu
 κ B – sekvenční místo v DNA

13. Seznam použité literatury

[1] Převzato z internetové stránky:

<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/pancreatic>

dne 15. 8. 2010.

[2] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59: 225-49.

[3] Krejs GJ. Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis.* 2010; 28: 355-8.

[4] Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, Kraft P, Mendelsohn JB, Hartge P, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol.* 2009; 170: 403-13.

[5] Yamaguchi K. How to define patients at high risk for pancreatic cancer. *Pancreatology.* 2011; 11: 3-6.

[6] Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, Negri E, Vecchia CL. Alcohol Consumption and Cancer Risk. *Nutr Cancer.* 2011; [Epub ahead of print].

[7] Převzato z internetové stránky:

<http://cancerhelp.cancerresearchuk.org/type/pancreatic-cancer/about/pancreatic-cancer-risks-and-causes#alcohol>

dne 7. 10. 2011

[8] Labori KJ, Hjermstad MJ, Wester T, Buanes T, Loge JH. Symptom profiles and palliative care in advanced pancreatic cancer: a prospective study. *Support Care Cancer.* 2006; 14: 1126-33.

[9] Ramesh H. Management of pancreatic cancer: current status and future directions. *Indian J Surg.* 2010; 72: 285-9.

- [10] Katz MH, Fleming JB, Lee JE, Pisters PW. Current status of adjuvant therapy for pancreatic cancer. *Oncologist*. 2010; 15: 1205-13.
- [11] Gesto DS, Cerqueira NM, Fernandes PA, Ramos MJ. Gemcitabine: A Critical Nucleoside for Cancer Therapy. *Curr Med Chem*. 2012; [Epub ahead of print].
- [12] Silverstein RA, González de Valdivia E, Visa N. The incorporation of 5-Fluorouracil into RNA affects the ribonucleolytic activity of the exosome subunit rrp6. *Mol Cancer Res*. 2011; 9: 332-40.
- [13] Morgan MA, Meirovitz A, Davis MA, Kollar LE, Hassan MC, Lawrence TS. Radiotherapy combined with gemcitabine and oxaliplatin in pancreatic cancer cells. *Transl Oncol*. 2008; 1: 36-43.
- [14] Sloat BR, Sandoval MA, Li D, Chung WG, Lansakara-P DS, Proteau PJ, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor activities of a gemcitabine derivative carried by nanoparticles. *Int J Pharm*. 2011; 409: 278-88.
- [15] Arlt A, Muerköster SS, Schäfer H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2010; [Epub ahead of print].
- [16] Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors*. 2007; 29: 19-35.
- [17] Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 297-309.
- [18] Yu X, Zhang Y, Chen C, Yao Q, Li M. Targeted drug delivery in pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1805: 97-104.
- [19] Yang F, Jin C, Jiang Y, Li J, Di Y, Ni Q, et al. Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: From bench to bedside. *Cancer Treat Rev*. 2011; [Epub ahead of print].

- [20] de Bono JS, Ashworth A. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature*. 2010; 467: 543-9.
- [21] Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2609-17.
- [22] Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2007; 27: 19–40.
- [23] Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol*. 2010; 20: 391-401.
- [24] Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000; 404: 770-4.
- [25] Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*. 2009; 458: 453-60.
- [26] Wójcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 579-89.
- [27] Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 7071-5.
- [28] Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome System of Protein Degradation and Processing. *Biochemistry (Moscow)*. 2009; 74: 1411-42.
- [29] Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005; 44: 5932-43.

- [30] Varshavsky A. Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30: 283-6.
- [31] Jianping J, Xue L, Steven P, Gygi J, Wade Harper. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature.* 2007; 447: 1135-38.
- [32] Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* 1999; 96: 635-44.
- [33] Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol.* 2009; 386: 814-27.
- [34] Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 550-63.
- [35] Soboleva TA, Baker RT. Deubiquitinating enzymes: their functions and substrate specificity. *Curr Protein Pept Sci.* 2004; 5: 191-200.
- [36] Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science.* 2002; 298: 611-5.
- [37] Gallery M, Blank JL, Lin Y, Gutierrez JA, Pulido JC, Rappoli D, et al. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 262-8.
- [38] Li X, Demartino GN. Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin. *Biochem J.* 2009; 421: 397-404.

- [39] Striebel F, Kress W, Weber-Ban E. Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol.* 2009; 19: 209-17.
- [40] Sharon M, Witt S, Felderer K, Rockel B, Baumeister W, Robinson CV. 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *J Biol Chem.* 2006; 281: 9569-75.
- [41] Hutschenreiter S, Tinazli A, Model K, Tampé R. Two-substrate association with the 20S proteasome at single-molecule level. *EMBO J.* 2004; 23: 2488-97.
- [42] Vabulas RM, Hartl FU. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science.* 2005; 310: 1960-3.
- [43] Kloetzel PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol.* 2004; 5: 661-9.
- [44] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 49-62.
- [45] Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells. *Blood.* 2009; 114: 1046-52.
- [46] Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell.* 2004; 5: 417-21.
- [47] Převzato z internetové stránky:
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0028140>
dne 17. 3. 2012

- [48] Shah SA, Potter MW, McDade TP, Ricciardi R, Perugini RA, Elliott PJ, et al. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem.* 2001; 82: 110-22.
- [49] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; 59: 2615-22.
- [50] Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ. Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome. *J Surg Res.* 2001; 100: 11-7.
- [51] Awasthi N, Schwarz MA, Schwarz RE. Proteasome inhibition enhances antitumour effects of gemcitabine in experimental pancreatic cancer. *HPB (Oxford).* 2009; 11: 600-5.
- [52] Eom HS, Min CK, Cho BS, Lee S, Lee JW, Min WS, et al. Retrospective comparison of bortezomib-containing regimens with vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Jpn J Clin Oncol.* 2009; 39: 449-55.
- [53] Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2005; 352: 2487-98.
- [54] Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, et al. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 3954-64.
- [55] Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW, Sridhara R, Justice R, et al. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 5291-4.

[56] Troch M, Jonak C, Müllauer L, Püspök A, Formanek M, Hauff W, et al. A phase II study of bortezomib in patients with MALT lymphoma. *Haematologica*. 2009; 94: 738-42.

[57] Treon SP, Hunter ZR, Matous J, Joyce RM, Mannion B, Advani R, et al. Multicenter clinical trial of bortezomib in relapsed/refractory Waldenstrom's macroglobulinemia: results of WMCTG Trial 03-248. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 3320-5.

[58] Jagani Z, Song K, Kutok JL, Dewar MR, Melet A, Santos T, et al. Proteasome inhibition causes regression of leukemia and abrogates BCR-ABL-induced evasion of apoptosis in part through regulation of forkhead tumor suppressors. *Cancer Res*. 2009; 69: 6546-55.

[59] Převzato z internetové stránky:

<http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/13515/55420/55420.pdf>

dne 30. 1. 2012

[60] Chari A, Mazumder A, Jagannath S. Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics*. 2010; 4: 273-87.

[61] Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, et al. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res*. 2010; 70: 1970-80.

[62] Piva R, Ruggeri B, Williams M, Costa G, Tamagno I, Ferrero D, et al. CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood*. 2008; 111: 2765-75.

[63] Potts CB, Albitar XM, Anderson CK, Baritaki S, Berkers C, Bonavida B, et al. Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11: 254-84.

- [64] Kuhn JD, Orlowski ZR, Bjorklund CC. Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSI). *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11: 285-95.
- [65] Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11: 332-7.
- [66] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Progr Clin Biol Res* 1977; 12: 47-53
- [67] Petersen EN. The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1992; 369: 7-13.
- [68] Banyas P. The clinical use of disulfiram (Antabuse): a review. *J Psychoactive Drugs*. 1988; 20: 243-61.
- [69] Vallari RC, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science*. 1982; 216: 637-9.
- [70] Cvek B. Failure of ditiocarb (diethyldithiocarbamate) therapy: was diet the reason? *Curr HIV Res*. 2009; 7: 254.
- [71] Reisinger EC, Kern P, Ernst M, Bock P, Flad HD, Dietrich M. Inhibition of HIV progression by dithiocarb. German DTC Study Group. *Lancet*. 1990; 335: 679-82.
- [72] Hersh EM, Brewton G, Abrams D, Bartlett J, Galpin J, Gill P, et al. Ditiocarb sodium (diethyldithiocarbamate) therapy in patients with symptomatic HIV infection and AIDS. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *JAMA*. 1991; 265: 1538-44.
- [73] Dufour P, Lang JM, Giron C, Duclos B, Haehnel P, Jaeck D, et al. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy*. 1993; 6: 9-12.

[74] Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD Jr, Dreau D, Austin C, et al. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner *in vitro*, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3: 1049-60.

[75] 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 Res.* 2006; 66: 10425-33.

[76] 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. *J Med Chem.* 2008; 51: 6256-8.

[77] Larsen KS, Auld DS. Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry.* 1991; 30: 2613-8.

[78] Dalla Pozza E, Donadelli M, Costanzo C, Zaniboni T, Dando I, Franchini M, et al. Gemcitabine response in pancreatic adenocarcinoma cells is synergistically enhanced by dithiocarbamate derivatives. *Free Radic Biol Med.* 2011; 50: 926-33.

[79] Převzato z internetové stránky:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00742911>

dne 5. 10. 2011

[80] Převzato z internetové stránky:

<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=614004&version=HealthProfessional&protocolsearchid=6900494>

dne 3. 4. 2012

[81] Převzato z internetové stránky:

http://en.wikipedia.org/wiki/Clinical_trial

dne 12. 3. 2011

[82] Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science*. 2009; 324: 1394-5.

[83] Lülmann H, Mohr K, Ziegler A, Bieger D. Barevný atlas farmakologie. Grada Publishing, spol s.r.o., Praha 2011. 2. vydání. pp. 6-7. ISBN: 80-7169-973-X

[84] DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ*. 2003; 22: 151-85.

[85] Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 203-14.

[86] Cvek B. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discov Today*. 2011; [Epub ahead of print].

[87] Chong CR, Sullivan DJ Jr. New uses for old drugs. *Nature*. 2007; 448: 645-6.

[88] Fojo T, Grady C. How much is life worth: cetuximab, non-small cell lung cancer, and the \$440 billion question. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101: 1044-8.

[89] Převzato z internetové stránky:

<http://www.global-cures.org>

dne 27. 3. 2012

[90] Převzato z internetové stránky:

<http://www.pharmacychecker.com/compare-drug-prices-online-pharmacies/ANTABUSE-500+mg/38005/67830>

dne 27. 3. 2012

[91] Cvek B. Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int J Cancer*. 2010; 127: 2486.

[92] Převzato z internetové stránky:

<http://en.wikipedia.org/wiki/IC50>

dne 15. 4. 2012

[93] Převzato z internetové stránky:

http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85062806&collection=ecacc_gc

dne 5. 4. 2012

[94] Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303: 474-82.

[95] Dvořáková H. Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od karcinomu prsu. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc 2012; pp. 49.

[96] Fahy BN, Schlieman MG, Virudachalam S, Bold RJ. Schedule-dependent molecular effects of the proteasome inhibitor bortezomib and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Surg Res.* 2003; 113: 88-95.

[97] Mannaal PW, Alosi JA, Schneider JG, McDonald DE, McFadden DW. Pterostilbene inhibits pancreatic cancer *in vitro*. *J Gastrointest Surg.* 2010; 14: 873-9.

[98] Naumann K, Schmich K, Jaeger C, Kratz F, Merfort I. Noxa/Mcl-1 balance influences the effect of the proteasome inhibitor MG-132 in combination with anticancer agents in pancreatic cancer cell lines. *Anticancer Drugs.* 2012; [Epub ahead of print].