

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**VLIV INHIBICE PROTEAZOMU NA
ANTIPROLIFERAČNÍ ÚČINEK
ANTRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Jana Kroupová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 13. 5. 2016

Podpis:

Děkuji své školitelce PharmDr. Anně Jirkovské, Ph.D. za trpělivost, cenné rady, připomínky a informace poskytnuté při vypracování této diplomové práce. Také děkuji zaměstnancům a studentům Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za praktické rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji také za finanční podporu z grantu IGA NT/13457-4-2012, UNCE 204019/304019/2012 a SVV 260 294.

Hradec Králové, 2016

Jana Kroupová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Jana Kroupová

Školitel: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv inhibice proteazomu na antiproliferační účinek antracyklinových antibiotik

Antracyklinová antibiotika (daunorubicin, doxorubicin) patří mezi nejúčinnější protinádorová léčiva. V současné klinické praxi jsou používány nejčastěji v kombinacích, a to jak s „klasickými“, tak i novými „cílenými“ protinádorovými léčivy. Mezi tato nová protinádorová léčiva patří také inhibitory proteazomu (bortezomib a karfilzomib). Proteazom je multienzymový komplex v eukaryotických buňkách, který je zodpovědný za intracelulární degradaci proteinů. Inhibitory proteazomu se doposud uplatnily převážně v terapii mnohočetného myelomu, ale jejich potenciál je studován také u jiných malignit. Jejich použití v kombinaci s antracykliny se jeví jako možná alternativa v terapii některých nádorových onemocnění, avšak účinek kombinace antracyklinů a inhibitorů proteazomu na nádorové buňky nebyl dostatečně objasněn. Terapie antracykliny je také doprovázena závažným nežádoucím účinkem – kardiotoxicitou, jejíž potenciál může být kombinací s inhibitory proteazomu ovlivněn.

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit antiproliferační aktivitu inhibitorů proteazomu bortezomibu a karfilzomibu na buňky lidské promyelocytární leukemie (HL-60) a vliv těchto látek na antiproliferační účinek daunorubicinu na tyto nádorové buňky. Dalším cílem bylo také studovat jejich vliv na toxicitu daunorubicinu v *in vitro* modelu antracyklinové kardiotoxicity na izolovaných potkaních neonatálních ventrikulárních kardiomyocytech.

Antiproliferační aktivita inhibitorů proteazomu byla testována na suspenzní buněčné linii HL-60. Buněčná viabilita byla hodnocena pomocí MTT testu po 72hodinové inkubaci buněk s daunorubicinem, doxorubicinem, bortezomibem a karfilzomibem

v široké koncentrační škále. Z těchto dat byly vypočteny hodnoty IC_{50} pro všechny studované látky. Následně byl analyzován kombinační efekt metodou podle Chou a Talalaye. Bortezomib i karfilzomib vykazovaly poměrně výrazné antiproliferační účinky vůči leukemické buněčné linii s hodnotami IC_{50} v řádu jednotek nM. Avšak kombinace s antracykliny nevedla k výraznému zvýšení antiproliferačního účinku (kombinační index byl ve velké části koncentrační škály v hodnotách vyšších než 1).

Vliv inhibice proteazomu pomocí bortezomibu a karfilzomibu na viabilitu izolovaných neonatálních kardiomyocytů byl hodnocen po 48hodinové inkubaci s testovanými látkami pomocí stanovení aktivity laktátdehydrogenázy uvolněné z buněk do kultivačního média během inkubace. U obou látek byla stanovena hodnota IC_{50} . Dále byl na tomto modelu hodnocen vliv inhibice proteazomu na kardiotoxicitu daunorubicinu. Při tomto hodnocení bylo zjištěno, že inhibice proteazomu v našem schématu výrazně neovlivňuje toxicitu daunorubicinu vůči primárním neonatálním kardiomyocytům. Toto pozorování však bude nutno doplnit ještě dalšími hodnoceními v dalších časových schématech a koncentracích bortezomibu a karfilzomibu.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Jana Kroupová

Supervisor: PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of the proteasome inhibition of the antiproliferative effect of anthracycline antibiotics

Anthracycline antibiotics (daunorubicin, doxorubicin) belong to the most effective antitumor drugs. In current clinical practice they are used mostly in the combinations with either “classical” or new targeted antitumor drugs. The proteasome inhibitors (bortezomib and carfilzomib) are also viewed as a part of new “targeted” antitumor drugs. The proteasome is a multienzyme complex in eukaryotic cells which is responsible for intracellular degradation of proteins. The proteasome inhibitors have been largely used in the therapy of multiple myeloma, but their potential has been also studied in the case of other malignancies. Their use in the combination with anthracyclines could be a possible alternative in the therapy of some tumor illnesses, but the effect of combination of anthracyclines and proteasome inhibitors on tumor cells have not been sufficiently explained. The anthracycline therapy is also accompanied by serious adverse side effect – the cardiotoxicity, which potential could be influenced by the combination with proteasome inhibitors.

The main aim of this master thesis was the evaluation of the antiproliferative activity of proteasome inhibitors (bortezomib and carfilzomib) on human promyelocytic leukemia cells (HL-60) and the influence of these drugs on the antiproliferative effect of daunorubicin on these tumor cells. The next goal was also to study the influence of these drugs on the toxicity of daunorubicin in *in vitro* anthracycline cardiotoxicity model – isolated rat’s neonatal ventricular cardiomyocytes.

The antiproliferative activity of proteasome inhibitors was tested on suspension cell culture HL-60. The cell viability was evaluated by MTT test after 72 hours of the incubation of cells with daunorubicin, doxorubicin, bortezomib and carfilzomib

in a wide range of concentrations. IC_{50} of all studied drugs was calculated from these data. After that the combination effect of drugs was analyzed using Chou-Talalay method. Bortezomib and carfilzomib showed a quiet profound antiproliferative effects on leukemia cell culture with IC_{50} values in $nmol/dm^3$ unit order. The combination with anthracyclines did not lead to the significant increase of antiproliferative effect (the combination index was in wide range of concentration scale higher than 1).

The influence of proteasome inhibition by bortezomib and carfilzomib on the viability of isolated neonatal cardiomyocytes was evaluated after 48 hours of the incubation of cells with tested compounds. It was measured the activity of lactate dehydrogenase released from cells to the cultivating medium during the incubation. The values of IC_{50} for bortezomib and carfilzomib were determined. The influence of proteasome inhibition on daunorubicin cardiotoxicity was evaluated on that model. It was found that the proteasome inhibition in our scheme does not significantly influence the toxicity of daunorubicin towards primary neonatal cardiomyocytes. This observation must be supplemented also by other evaluations in the next time schemes and concentrations of bortezomib and carfilzomib.

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 10 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 12 |
| 2.1 | Antracyklinová antibiotika | 12 |
| 2.1.1 | Kardiotoxicita antracyklinů..... | 13 |
| 2.2 | Ubikvitin-proteazomový systém | 16 |
| 2.2.1 | Funkce v buňce | 16 |
| 2.2.2 | Lokalizace UPS | 16 |
| 2.2.3 | 26S proteazom..... | 17 |
| 2.2.4 | UPS v kardiomyocytech..... | 19 |
| 2.3 | Inhibitory proteazomu | 21 |
| 2.3.1 | Bortezomib..... | 22 |
| 2.3.2 | Karfilzomib | 24 |
| 2.4 | Mnohočetný myelom | 26 |
| 3 | CÍLE PRÁCE | 28 |
| 4 | MATERIÁL A METODIKA | 29 |
| 4.1 | Materiálové a přístrojové vybavení | 29 |
| 4.1.1 | Přístrojové vybavení..... | 29 |
| 4.1.2 | Ostatní pomůcky | 29 |
| 4.1.3 | Chemikálie | 30 |
| 4.1.4 | Buněčný materiál | 31 |
| 4.2 | Pracovní postupy | 33 |
| 4.2.1 | Kultivace | 33 |
| 4.2.2 | Antiproliferační experimenty | 33 |
| 4.2.3 | Stanovení buněčné viability – MTT test..... | 34 |
| 4.2.4 | Hodnocení toxicity látek vůči primárním potkaním neonatálním kardiomyocytům | 34 |
| 4.2.5 | Stanovení aktivity LDH | 35 |
| 4.2.6 | Hodnocení buněčné morfologie | 35 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.2.7 | Grafické a statistické zpracování experimentálních dat..... | 36 |
| 5 | VÝSLEDKY | 37 |
| 5.1 | Antiproliferační účinky sledovaných látek | 37 |
| 5.1.1 | Antiproliferační účinky daunorubicinu | 37 |
| 5.1.2 | Antiproliferační účinky doxorubicinu..... | 38 |
| 5.1.3 | Antiproliferační účinky bortezomibu | 39 |
| 5.1.4 | Antiproliferační účinky karfilzomibu | 40 |
| 5.1.5 | Analýza kombinačního efektu dle Chou a Talalaye | 41 |
| 5.2 | Hodnocení toxicity látek vůči potkaním neonatálním ventrikulárním kardiomyocytům | 42 |
| 5.2.1 | Toxicita bortezomibu | 42 |
| 5.2.2 | Toxicita karfilzomibu..... | 43 |
| 5.2.3 | Hodnocení morfologických změn neonatálních potkaních kardiomyocytů způsobených inhibitory proteazomu | 44 |
| 5.2.4 | Toxicita daunorubicinu v kombinaci s bortezomibem..... | 47 |
| 5.2.5 | Toxicita daunorubicinu v kombinaci s karfilzomibem | 48 |
| 6 | DISKUZE..... | 49 |
| 7 | ZÁVĚRY | 58 |
| 8 | SEZNAM ZKRATEK..... | 59 |
| 9 | LITERATURA | 60 |

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z hlavních příčin předčasného úmrtí. Výzkum látek s protinádorovým účinkem se začal rozvíjet po druhé světové válce, od té doby bylo identifikováno přes padesát různých farmakologických skupin protinádorových léčiv (Lincová a Farghali 2007). Počet nově diagnostikovaných malignit se každý rok zvyšuje, a proto je snahou lékařů i vědců stále nalézat nové látky a možnosti účinné terapie.

Antracyklinová antibiotika se řadí mezi nejúčinnější protinádorová léčiva. Jsou indikována v terapii solidních nádorů (karcinomy prsu, urogenitálního a gastrointestinálního traktu) i hematologických onemocnění (lymfomy, akutní a chronická leukémie). Díky své výjimečné účinnosti se ani po 50 letech jejich používání nestaly obsolentními – nová protinádorová léčiva se často používají v kombinaci právě s antracykliny. Přestože bylo vyvinuto několik tisíc nových struktur, v praxi se uplatnilo pouze několik analogů – epirubicin, idarubicin, pirarubicin, aclarubicin a valrubicin (Minotti a kol. 2004).

Užívání antracyklinů je limitováno jejich vážnými nežádoucími účinky – myelotoxicitou a kardiotoxicitou. Myelotoxicita, zahrnující trombocytopenii, granulocytopenii a anémii, se projevuje již v průběhu podávání antracyklinů a po ukončení terapie se krvetvorba obnovuje. Její výskyt lze omezit současným podáváním růstových faktorů (Balducci a Extermann 2000). Kardiotoxicita se naopak častěji vyskytuje až po ukončení terapie. Projevuje se dilatační kardiomyopatií, která může progredovat až do městnavého srdečního selhání. Toto poškození kardiomyocytů je považováno za ireverzibilní a rezistentní na léčbu (Lincová a Farghali 2007).

Odhadnout dopředu toxické poškození myokardu u daného pacienta a následný rozvoj manifestního srdečního selhání je velmi komplikované, situaci ztěžuje především vysoká interindividuální variabilita. U některých pacientů se toxické účinky antracyklinů projeví už při dávkách nižších než 300 mg/m^2 , u některých pacientů ani 1000 mg/m^2 nevyvolává závažnější srdeční poškození (Von Hoff a kol. 1979). U dětí je pak výskyt kardiovaskulárních komplikací ještě větší, což pravděpodobně souvisí s delší dobou přežití těchto pacientů (Oeffinger a kol. 2006).

Riziko srdečního poškození je ovlivněno také dalšími rizikovými faktory, jako jsou nízký nebo naopak vysoký věk, existující kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes mellitus, předchozí nebo současná léčba ozařováním mediastina nebo jinými kardiotoxickými léčivy (Yeh a kol. 2004).

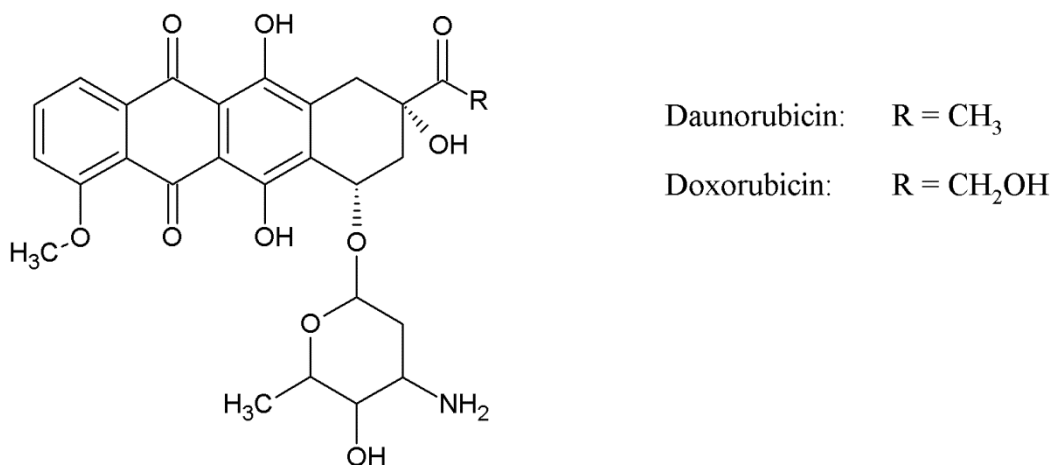
Jediným léčivem dosud registrovaným pro prevenci kardiotoxicity antracyklinů je dexrazoxan. Mechanismus jeho kardioprotektivního působení byl tradičně přisuzován jeho metabolizaci na chelatačně aktivní produkt ADR-925, který by díky schopnosti vychytávat volné katalyticky aktivní ionty železa mohl bránit vzniku volných kyslíkových radikálů v buňce. V posledních desetiletích se proto preklinický i klinický výzkum zaměřil především na oxidační stres způsobený antracykliny a jeho omezení pomocí antioxidantů a selektivnějších chelátorů železa. Výsledky studií ale neprokázaly účinnost těchto látek, která by byla srovnatelná nebo překračovala účinnost dexrazoxanu (Simunek a kol. 2009). Proto se v současné době stále více studií zaměřuje na možné alternativní mechanismy kardiotoxicity antracyklinů a kardioprotekce pomocí dexrazoxanu.

Tato diplomová práce byla vypracována jako součást dlouhodobého výzkumu realizovaného na pracovištích Lékařské a Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Mechanismy antracyklinové kardiotoxicity a farmakologické kardioprotekce jsou na těchto pracovištích zkoumány už od 90. let minulého století. Na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty byl zaveden skupinou prof. MUDr. Vladimíra Geršla, CSc. *in vivo* model antracyklinové kardiotoxicity na králících, který používá klinicky relevantní aplikace antracyklinů a byl také validován pomocí dexrazoxanu. Na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty pak probíhá pod vedením doc. PharmDr. Tomáše Šimůnka, Ph.D. *in vitro* hodnocení antracyklinové kardiotoxicity, a to jak na buněčné linii potkaních kardiomyoblastů H9c2, tak i na izolovaných primárních neonatálních potkaních kardiomyocytech. Také zde probíhá hodnocení vlivu nových látek na antiproliferativní účinky antracyklinů. V roce 2012 se tato skupina, spolu s dalšími pracovišti, stala součástí centra pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém, které je jedním z univerzitních výzkumných center Univerzity Karlovy v Praze (UNCE 204019/304019/2012).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Antracyklinová antibiotika

Antracyklinová antibiotika (ANT, antracykliny) patří mezi jedny z nejúčinnějších protinádorových léčiv. První ANT byly izolovány ze *Streptomyces peucetius* v roce 1960 a byly pojmenovány doxorubicin (DOX, syn. adriamycin) a daunorubicin (DAU, syn. daunomycin). Struktura ANT je tvořena aglykonem a cukerným zbytkem (Obr. 1). Aglykon se skládá z tetracyklické struktury s chinonovými a hydrochinonovými skupinami na kruzích B a C, na kruhu D je v poloze 4 navázán methoxy substituent a v poloze 9 je připojen krátký boční řetězec s karbonylovou skupinou. Bazický monosacharid daunosamin je připojen glykosidickou vazbou v poloze 7 na kruh A, chemicky se jedná o 3-amino-2,3,6-trideoxy-L-lyxopyranosu. Jediný rozdíl mezi DOX a DAU je ve vedlejším řetězci, končícím u DOX primárním alkoholem, zatímco u DAU je zakončen methylem. Tento nepatrný rozdíl má však význam pro odlišné spektrum účinku (Minotti a kol. 2004).



Obr. 1. Chemická struktura daunorubicinu a doxorubicinu. Převzato z internetového zdroje (PubChem 2015b,c).

Cílovou strukturou ANT je DNA v jádře, kde dochází k inhibici replikace a transkripce. I přes jejich rozsáhlé klinické používání, přesný mechanismus účinku ANT v nádorových buňkách nebyl dosud zcela objasněn a stále zůstává rozporuplnou otázkou. V úvahu přichází interkalace do DNA, tvorba volných

radikálů, alkylace a zesítnění DNA, přímý účinek na membrány, inhibice topoizomerázy II, indukce apoptózy a další možné mechanismy (Minotti a kol. 2004).

DOX je podáván jako hydrochlorid intravenózně pomalou injekcí nebo krátkodobou infúzí (výjimečně dlouhodobou infúzí) v dávce 30-60 mg/m² každý třetí týden léčby. Používá se k léčbě ne Hodgkinových lymfomů, Hodgkinovy choroby, mnohočetného myelomu, akutní lymfoblastové a myeloidní leukémie. Další indikací jsou solidní nádory jako karcinom prsu, osteosarkom, malobuněčný bronchogenní karcinom a sarkom měkkých tkání. Liposomální léková forma se užívá v terapii Kaposiho sarkomu (Lincová a Farghali 2007). DAU se od DOX liší nižší distribucí do tkání a spektrem účinku – uplatnil se převážně v terapii krevních malignit.

Jejich užívání je však kromě vysoké protinádorové účinnosti spojeno také s řadou komplikací, jako je možný vývoj rezistence v některých typech nádorových buněk nebo toxicita vůči zdravým tkáním. K nejčastějším nežádoucím účinkům ANT patří alopecie (90–100 % případů). K projevu dochází nejčastěji třetí týden po první dávce. Emetogenní účinek se projeví ve 30–40 % případů. Kromě těchto poměrně častých, ale většinou zvládnutelných nežádoucích účinků patří k dalším nejčastějším nežádoucím účinkům neutropenie a trombocytopenie. Ty mohou být život ohrožující, ale ve většině případů jsou také zvládnutelné podáním růstových faktorů (Balducci a Extermann 2000). Vzácněji se objevuje hyperpigmentace a bolesti kloubů (Lincová a Farghali 2007).

Typickým nežádoucím účinkem ANT je jejich kardiotoxicita, jejíž výskyt vede k nutnosti omezení maximální možné kumulativní dávky ANT u daného pacienta (Wouters a kol. 2005), což může v některých případech značně omezit plný terapeutický potenciál ANT.

2.1.1 Kardiotoxicita antracyklinů

ANT jsou nejlépe prostudovaná protinádorová léčiva s prokázanou kardiotoxicitou (Yeh a kol. 2004). Tradiční teorií nejčastěji prezentovanou v odborné literatuře je, že jde o multifaktoriální děj, způsobený především oxidačním stresem z přítomnosti kyslíkových radikálů vznikajících po vytvoření stabilního komplexu mezi antracykliny a ionty železa z myoglobinu a hemoglobinu (Lincová a Farghali 2007).

Pokročilejší nebo naopak velmi nízký věk, ženské pohlaví a předchozí kardiovaskulární onemocnění jsou známými rizikovými faktory (Yeh a kol. 2004).

Klinická terminologie rozlišuje několik forem lišících se nástupem, projevy a závažností. Akutní kardiotoxicita není příliš častá (postihuje méně než 1 % pacientů), objevuje se do 24 hodin po první dávce a dá se snadno korigovat pomocí antiarytmik. Projevuje se změnami na EKG v úseku ST-T, prodloužením intervalu QT a arytmiemi. Bývá doprovázena nauzeou a zvracením (Lincová a Farghali 2007).

Chronická kardiotoxicita se objevuje náhle, nejčastěji během 1–2 měsíců po poslední dávce a rychle se zhoršuje. Její výskyt se dramaticky zvyšuje s kumulativní dávkou větší než 550 mg/m². Projevuje se kardiomyopatií doprovázenou známkami tachykardie, tachypnoe, plicní a venózní kongescí, pleurálními výpotky. Je ireverzibilní a poměrně rezistentní na následnou léčbu (Lincová a Farghali 2007). Substrukturální rysy kardiomyopatie se vyznačují ztrátou myofibril, dilatací sarkoplazmatického retikula, vakuolizací a zvýšeným počtem lysozomů (Minotti a kol. 2004). Zvláštním subtypem chronického typu kardiotoxicity je typ pozdní, který se manifestuje až po 4–20 letech od ukončení léčby. Bývá častá u dětí (Lincová a Farghali 2007).

Účinné strategie používané v klinické praxi pro omezení ANT kardiotoxicitu zahrnují především omezení celkové dávky pod jistou, relativně bezpečnou dávku, která je stanovena pro jednotlivé ANT (např. 450–550 mg/m² v případě DOX) a změnou způsobu podávání z rychlé infúze na kontinuální infúzi (probíhající po dobu 24 až 92 hodin). V současnosti se naděje vkládají také do nových lékových forem. Bylo vyvinuto například několik lipozomálních přípravků, u nichž se předpokládá, že by mohly vykazovat lepší účinnost při snížených dávkách, čímž by mohly způsobovat také nižší toxicitu (Wouters a kol. 2005). Jedinou doposud registrovanou látkou určenou k prevenci ANT kardiotoxicity je dexrazoxan. Tradičně se předpokládá, že dexrazoxan funguje jako proléčivo, jehož aktivní forma ADR-925 (derivát EDTA) by mohla být schopna chelatace volných katalyticky aktivních iontů železa a omezovat tak vznik volných kyslíkových radikálů (Simunek a kol. 2009). Tento mechanismus je však v poslední době zpochybňován a pozornost se přesouvá k alternativním mechanismům, např. schopnosti dexrazoxanu inhibovat topoizomerázu II (Lyu a kol. 2007).

Jednou ze strategií pro omezení kumulativní dávky může být i velmi časté klinické použití ANT v kombinacích. DOX je široce používán v kombinaci s etoposidem a cyklofosfamidem pro léčbu karcinomu plic. V kombinaci s platinovými a alkylačními činidly se uplatňuje v terapii karcinomu vaječníků (Cortes-Funes a Coronado 2007), kombinace DAU a cytarabinu je obvyklou indukční terapií pro pacienty s akutní myeloidní leukémií (Fernandez 2015) a pro léčbu pacientů s non-Hodgkinským lymfomem se využívá kombinace DOX s cyklofosfamidem, vinkristinem a prednisonem (Hande 1998), ke které je v některých případech přidáván i rituximab (Limat a kol. 2014). Z dalších kombinací se užívá ECF (epirubicin, cisplatina, 5-fluorouracil) v terapii karcinomu žaludku, CAF (cyklofosfamid, adriamycin, 5-fluorouracil) nebo FEC (5-fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid) pro léčbu rakoviny prsu (Apetoh a kol. 2008).

Zesílený protinádorový účinek těchto kombinovaných terapií je ale často doprovázen zvýšenou kardiotoxicitou, například při současném podávání paklitaxelu, který udržuje vyšší koncentraci ANT v plazmě. Alternativní strategií je užití docetaxelu, jenž nemá tak velký vliv na plazmatické koncentrace DOX a kombinační terapie rakoviny prsu je tak bezpečnější (Cortes-Funes a Coronado 2007).

Z klinické praxe lze pozorovat trend ke kombinaci ANT s moderní cílenou onkologickou léčbou pro zvýšení protinádorové odpovědi a snížení četnosti výskytu i závažnosti nežádoucích účinků. Mezi tato nová cílená protinádorová léčiva se řadí kromě monoklonálních protilátek, jakou je např. trastuzumab (Rayson a kol. 2008), i inhibitory tyrosinkináz (sunitinib, imatinib, erlotinib apod.) (Adams a Leggas 2007) a také inhibitory proteazomu (Lenz 2003).

2.2 Ubikvitin - proteazomový systém

2.2.1 Funkce v buňce

Proteazom je multienzymový komplex, který zprostředkovává intracelulární degradaci proteinů v eukaryotních buňkách. Někdy bývá tento komplex označován také jako ubikvitin-proteazomový systém (UPS). Proteiny určené k degradaci jsou nejprve označeny připojením polyubikvitinového řetězce díky tzv. ubikvitinovému systému, který tvoří tři enzymy. Jednotlivé monomery ubikvitinu (vysoce konzervativní polypeptidy tvořené 76 aminokyselinami) jsou nejdříve aktivovány ubikvitin-aktivujícím enzymem a poté jsou za pomoci ubikvitin-konjugačního enzymu připojeny na cílový protein vybraný a vázaný ubikvitin ligázou. Takto označený protein je poté dalším členem UPS – 26S proteazomem – rozložen na malé peptidy, ubikvitin je uvolněn a recyklován opět pomocí specifického ubikvitin-recyklujícího enzymu někdy nazývaného také deubikvitinační enzym (Glickman a Ciechanover 2002).

Svou aktivitou UPS kontroluje hladinu proteinů, které jsou důležité pro životní cyklus normálních i maligních buněk (např. cykliny, kaspázy, Bcl 2, jaderný faktor κ B apod.) a hraje klíčovou roli v mnoha biologických procesech, jako je buněčné dělení, vývoj a růst buňky, apoptóza a prezentace antigenu (Voges a kol. 1999).

2.2.2 Lokalizace UPS

K degradaci většiny proteinů (jak cytoplazmatických, tak membránových) pomocí UPS dochází převážně v cytoplazmě, ale jednotlivé komponenty byly nalezeny také v jádře (Glickman a Ciechanover 2002). Relativní zastoupení komponent proteazomu v jádře a cytoplazmě se značně liší v závislosti na typu buněk, růstových podmínkách, hustotě buněk, metodice použité při přípravě vzorku a detekci (Wójcik a DeMartino 2003). Vysoce proliferující a transformované buňky mají obvykle vyšší hladinu proteazomu a i jeho vyšší aktivitu oproti buňkám klidovým a netransformovaným (Kumatori a kol. 1990).

Pokusy *in vitro* s fluorescenčně označeným proteazomem ukázaly, že aktivní proteazomové komplexy vstupují do jádra přes jaderné póry nebo během opětovné stavby jaderné membrány po mitóze (Reits a kol. 1997). V průběhu apoptózy jsou

součásti proteazomu naopak přepravovány z jádra do cytoplazmy (Pitzer a kol. 1996).

V cytoplasmě se nachází buď volně rozptýlené, ale také se často asociují s centrozomem, vnějším povrchem endoplazmatického retikula a s cytoskeletární sítí (Wójcik a DeMartino 2003).

2.2.3 26S proteazom

Degradace proteinů pomocí 26S proteazomu je obecně ATP dependentní proces. Proteazom je threonin proteáza, N-koncový threonin β podjednotky poskytuje nukleofil, který atakuje karbonylovou skupinu peptidové vazby v cílovém proteinu. Schopnost rozpoznat a vázat polyubikvitinovaný substrát je dána 19S podjednotkou, ta uvolňuje substrát, posílá jej do katalytického komplexu 20S a zároveň odstraňuje dříve připojené molekuly ubikvitinu (Almond a Cohen 2002). 26S proteazom (pojmenovaný na základě jeho sedimentačního koeficientu) je 1500–2000 kDa velký komplex jádra a regulačních podjednotek (Almond a Cohen 2002).

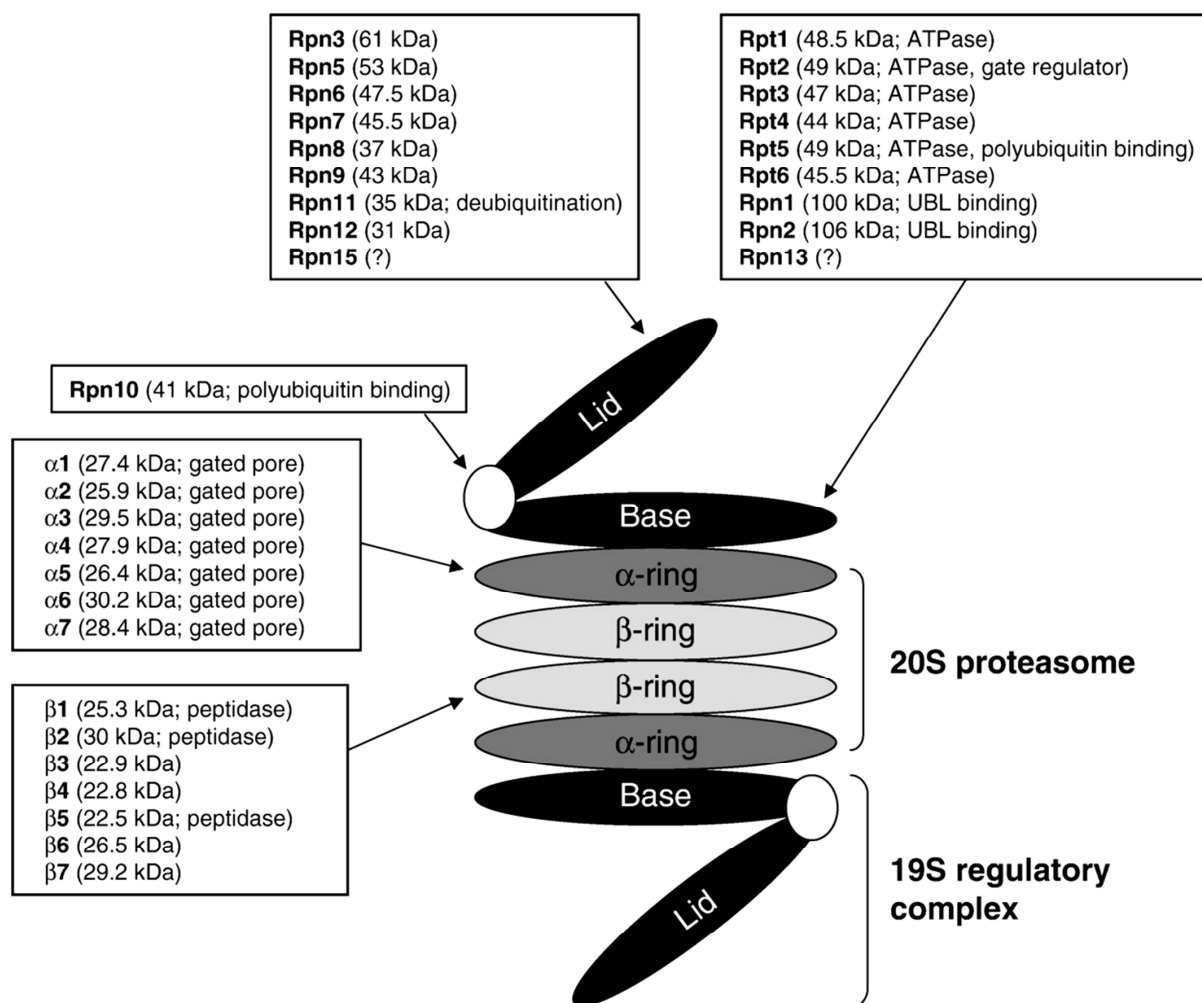
Katalytické jádro – 20S proteazom – je válcovitá struktura skládající se ze čtyř heptamerických kruhů (Obr. 2). Vnější kruhy obsahují α podjednotky, zatímco vnitřní kruhy obsahují proteolyticky aktivní β podjednotky (Almond a Cohen 2002). 20S proteazom je sám o sobě schopen degradovat oxidované proteiny v případě zvýšeného oxidačního poškození, a to nezávisle na ATP (Davies 2001). Standardní katalytické β podjednotky (β 1, β 2, β 5) jsou konstitutivně exprimované ve všech eukaryotních buňkách a mají různou proteolytickou aktivitu. Mechanismus hydrolýzy je stejný pro všechny podjednotky (aktivní místo je tvořeno vždy Thr1, Asp17 a Lys33). Specificita štěpení je ale pro každé aktivní místo určena jinými aminokyselinami, které se účastní vazby substrátu. Aktivní místa byla klasifikována na základě proteolýzy peptidových substrátů jako místa s kaspázovou, trypsinovou a chymotrypsinovou aktivitou pro štěpení po kyselých, bazických a hydrofobních aminokyselinách v tomto pořadí (Ferrington a Gregerson 2012).

Regulační podjednotkou 19S je 700 kDa velký komplex vážící se na oba konce 20S. Obsahuje přibližně 20 různých podjednotek, jejichž velikost kolísá mezi 25–110 kDa (Brooks a kol. 2000). Glickman a kolegové (1998) ve své studii prokázali, že se skládá ze dvou subkomplexů – „základu“ (angl. base) obsahujícího šest ATPáz

a „víčka“ (angl. lid). Základ sám o sobě je schopen degradovat peptidy a proteiny bez ubikvitinové značky, zatímco víčko vyžaduje proteiny ubikvitinem označené – poskytuje tedy vyšší úroveň specifity pro proteolytickou degradaci (Adams 2004).

Savčí buňky obsahují ještě jiný regulační komplex – 11S. Na rozdíl od 19S ale nereguluje degradaci velkých proteinů, ale podílí se na produkci antigenních proteinů a usnadňuje dodávání peptidů do lumen endoplazmatického retikula (Adams 2004).

Aktivita 20S katalytického jádra může být pozměněna inkorporací odlišné katalyticky aktivní β podjednotky a spojením s jiným regulačním komplexem. Například interferon γ indukuje syntézu tří β podjednotek, které mohou nahradit stavební jednotky 20S a vytvořit tzv. imunoproteazom (Ferrington a Gregerson 2012). Oxidační stres a prozánětlivé cytokiny jsou podněty, které vedou ke zvýšené produkci imunoproteazomů ve většině buněk. Funkcí imunoproteazomu je vytvářet peptidy pro prezentaci antigenu. Proto není překvapivé, že jeho bazální aktivita je vyšší v buňkách imunitního systému (Ferrington a Gregerson 2012).



Obr. 2. Schématické znázornění 26S proteazomu

Rpn – regulační částice non-ATPázy, Rpt – regulační částice ATPázy, UBL – ubiquitin podobné domény. Převzato z (Mearini a kol. 2008).

2.2.4 UPS v kardiomyocytech

UPS představuje hlavní nelysosomalní cestu degradování proteinů. Nedávné studie ukazují, že změna aktivity UPS vede k patogenezi a progresi různých srdečních chorob (Yu a kol. 2009).

Během posledních deseti let byla role UPS předmětem četných studií vedoucích k objasnění jeho funkce v kardiovaskulární fyziologii a patofyziologii. Díky velkým pokrokům v této oblasti, včetně použití proteomiky, se už ví, jak je srdeční proteazom regulován a jak se jeho regulace podílí na specifických funkcích v kardiomyocytech (Powell a kol. 2012). Srdeční proteazom má nejméně 34 různých podjednotek, z nichž některé podléhají srdeční specifické modifikaci. Variabilita

ve stavebních podjednotkách proteazomu umožňuje změnu specifity a selektivity a hraje tedy důležitou roli v regulaci degradace proteinů (Young a kol. 2008). Specifita UPS spočívá převážně v zapojení různých izoform ubikvitin ligázy E3. Zatímco existuje pouze jedna izoforma enzymu E1, izoform enzymu E2 je kolem padesáti, E3 izoform bylo popsáno více než sto a z toho jen několik z nich je specifických pro svaly.

Mnoho kardiovaskulárních patologií je spojeno s určitými odchylkami funkce UPS od normy – ať už zvýšení nebo snížení jeho aktivity. U mnoha patologií však není jasné, zda dysfunkce UPS byla primární příčinou onemocnění, nebo se jedná spíše o důsledek vyvolaný jiným primárním patologickým mechanismem. Je ale zřejmé, že jakmile se UPS stane nefunkčním, zhoršení nemoci je větší (Powell a kol. 2012). Tyto abnormality ve funkci proteazomu byly pozorovány na různých úrovních u ischemie myokardu, srdečního selhání, hypertrofie, aterosklerózy a dalších srdečních onemocnění (Yu a kol. 2009).

V případech, kdy byl proteazom funkčně aktivní a podílel se na patogenezi onemocnění, tak jeho inhibicí v srdeční tkáni byl prokázán kardioprotekční účinek. Na základě těchto poznatků je založeno možné použití inhibitorů proteazomu jako potenciálních kardioprotektiv. Experimentální práce se v současnosti soustředí převážně na ovlivnění UPS při ischemii myokardu, hypertrofických změnách a při srdečním selhání. Zaměření na ovlivnění kardiospecifických součástí UPS spolu s vyšší specificitou nových inhibitorů by mohlo nabídnout potenciální terapie pro kardiovaskulární onemocnění (Yu a kol. 2009).

2.3 Inhibitory proteazomu

In vitro a *in vivo* studie na různých rakovinných modelech ukázaly na několik vlastností této kategorie látek, které je možné uplatnit v protinádorové terapii. Specificita a přesný mechanismus účinku všech inhibitorů je stále předmětem zkoumání (Adams 2004).

I když krátkodobá expozice inhibitorů chrání buňky od různých toxických podnětů, dlouhodobá expozice těchto sloučenin je toxická téměř pro všechny buňky a způsobuje smrt apoptózou. Vztah mezi stupněm a trváním snížené proteolýzy a apoptózou je nejasný, stejně jako koncentrace a délka expozice vedoucí k buněčné smrti závisící na typu buněk. Proliferující buňky jsou obvykle citlivější k inhibitorům proteazomu než neproliferující buňky a mohou podléhat apoptóze již 4–48 hodin po podání inhibitoru. Tato větší citlivost proliferujících buněk k apoptóze může být následkem zastavení buněčného cyklu (Kisselev a Goldberg 2001).

Zvýšená náchylnost maligních buněk k inhibitorům, ve srovnání s normálními buňkami, nebyla definitivně stanovena. Základními charakteristikami maligních buněk jsou mimo jiných rychlá proliferace buněk a poruchy v kontrolních mechanismech buněčného cyklu. Z tohoto důvodu maligní buňky kumulují poškozené proteiny v mnohem větší míře než normální buňky, což zvyšuje jejich závislost na proteazomu jako mechanismu pro likvidaci (Adams 2004).

Ačkoli má proteazom více aktivních míst, k výraznému snížení odbourávání bílkovin není potřeba inhibice všech. Ve skutečnosti inhibice struktury s chymotrypsinovou aktivitou nebo její inaktivace mutací způsobí velký pokles proteolýzy. Naproti tomu inaktivace struktury s trypsinovou nebo kaspázovou aktivitou má pouze minimální vliv na výslednou proteolýzu. Většina inhibitorů vážících se na strukturu s chymotrypsinovou aktivitou je vysoce hydrofobní a tedy snáze prostupují do buněk než inhibitory vážící se na strukturu s trypsinovou a kaspázovou aktivitou, které obsahují zbytky s nábojem. Téměř všechny syntetické i přírodní inhibitory proteazomu účinkují převážně na $\beta 5$ podjednotku s chymotrypsinovou aktivitou, mnohem slabší vliv mají na dvou ostatních podjednotkách (Kisselev a Goldberg 2001). Nedávná studie ukázala, že inhibitory struktur s kaspázovou aktivitou senzitivizují maligní buňky k inhibitorům $\beta 5$ podjednotky (Mirabella a kol. 2011).

Většina inhibitorů proteazomu jsou krátké peptidy s elektrofilní skupinou navázanou na C-konci. Tento farmakofor interaguje, reverzibilně nebo ireverzibilně, s N-terminálním threoninem v aktivním místě proteazomu. Peptidová skupina inhibitoru je do značné míry zodpovědná za specifitu (Kisselev a Goldberg 2001, Groll a Huber 2004), i když ta může být ovlivněna i elektrofilním farmakoforem (Screen a kol. 2010). Podle typu farmakoforu jsou inhibitory rozděleny do 5 základních tříd:

- Peptidové aldehydy
- Peptidové boronáty
- Peptidové vinyl-sulfony
- Peptidové epoxyketony
- Nepeptidové inhibitory/ β -laktony

Přírodní inhibitor lactacystin a syntetické peptidové aldehydy byly prvními látkami, u kterých byla rozpoznána schopnost blokovat proteazom (Adams 2004).

Proteazom může být inhibován i jako sekundární cíl látek, původně účinkujících na jiné enzymy. Mezi ně patří například ritonavir, lovastatin, cyclosporin A, nebo již zmíněné ANT (Kisselev a Goldberg 2001, Fekete a kol. 2005).

Všechny třídy, až na peptidové boronáty, podle dřívějších prací vykazovaly vlastnosti nevhodné pro klinické studie – metabolickou nestabilitu, nedostatečnou enzymovou specifitu a ireverzibilní vazbu na proteazom. Prvním inhibitorem proteazomu zařazeným do klinického hodnocení byl bortezomib (Adams 2004). V současné době je bortezomib již používán pro léčbu mnohočetného myelomu (Kupperman a kol. 2010), v roce 2012 byl FDA registrován i karfilzomib v podobné indikaci (Adib a kol. 2012) a další inhibitory jsou ve fázi klinického testování – NPI-0052 (Chauhan a kol. 2005), CEP-18770 (Piva a kol. 2008), PR-047 (Zhou a kol. 2009) a MLN-9708 (Shah a kol. 2013).

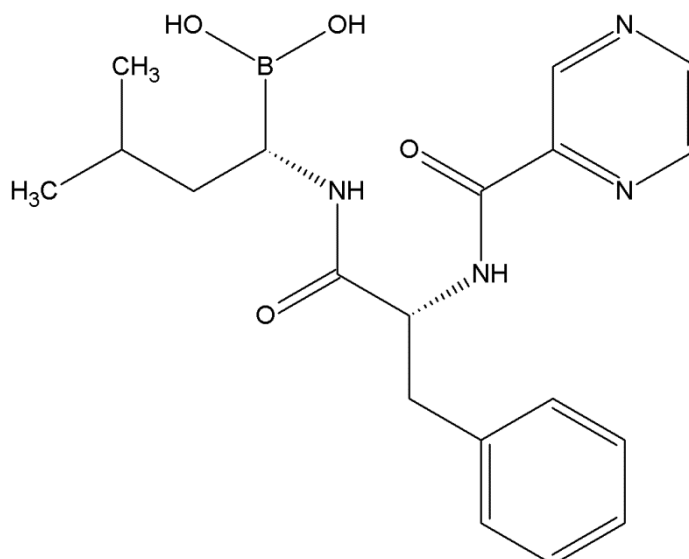
2.3.1 Bortezomib

Bortezomib (BORT, původní označení PS-341, Obr. 3) byl uveden na trh jako přípravek Velcade od Millennium Pharmaceuticals (PubChem 2015a). V květnu 2003 FDA schválila BORT v terapii mnohočetného myelomu u pacientů, kteří prodělali alespoň dvakrát předchozí léčbu a u kterých došlo k progresi onemocnění při poslední terapii. V dubnu 2004 byl schválen pro použití i v EU (Adams 2004).

Farmakokinetika ukázala krátký počáteční distribuční poločas (<15 minut) a velký distribuční objem (15 l/kg) svědčící o rychlém přestupu do tkání. Vazba na proteiny lidské plazmy je v průměru 83 %. Maximální inhibice podjednotky 20S proteazomu lze pozorovat jednu hodinu po podání BORT, obnova aktivity nastává po 48–72 hodinách. BORT je dobře snášen v dávkách ne vyšších než 3,0 mg (ekvivalent k 1,75 mg/m²) opakovaných ve dnech 1 a 4 každý druhý týden (Hamilton a kol. 2005). U některých pacientů se po několika cyklech BORT v dávkách vyšších než 1,0 mg/m² objevila zvýšená teplota a únava. Byla pozorována také trombocytopenie, ovšem nevyžadující podpůrnou transfúzi. Častým nežádoucím účinkem je průjem, jemuž se dá předcházet profylaktickým podáním loperamidu. U několika pacientů došlo k periferní neuropatii, ale tito pacienti již předtím prodělali léčbu platinou nebo taxanem (Adams 2002).

Aktivita BORT v různých typech nádorového onemocnění pravděpodobně zahrnuje celou řadu molekulárních mechanismů. Mechanismus jakým BORT vyvolává apoptózu je stále nejasný. *In vitro* testy a testy na zvířatech ukázaly, že BORT má aditivní účinek s jinými terapiemi. Kromě toho se prokázal jeho chemosenzitivní účinek, který tak umožňuje použití nižších dávek dalších protinádorových terapií k dosažení tumoricidního účinku srovnatelného s monoterapií. Tento efekt byl pozorován u kombinací BORT s DOX, melfalanem nebo dexamethasonem na buněčné linii mnohočetného myelomu (Hideshima a kol. 2001, Mitsiades a kol. 2003), s irinotekanem nebo radiační terapií u karcinomu tlustého střeva (Kozuch a kol. 2008), s gemcitabinem u rakoviny pankreatu (Fally a kol. 2003), s daclizumabem na modelu leukémie z T-buněk (Tan 2002), s radiační terapií, cyklofosfamidem a cisplatinou na modelu nádoru prsu u myší (Teicher a kol. 1999).

Také byla prokázána jeho schopnost obnovit citlivost na chemoterapeutické látky v rezistentních buněčných liniích. Konkrétně v buněčných liniích dříve rezistentních vůči doxorubicinu, melphalanu, mitoxantronu a dexamethasonu byl BORT schopen obnovit účinnost těchto látek (Adams 2004).



Obr. 3. Chemická struktura bortezomibu. Převzato ze zdroje www.pubchem.com (PubChem, 2015a)

2.3.2 Karfilzomib

Karfilzomib (KARF, původní označení PR-171, Obr. 4) byl uveden na trh jako Kyprolis od Onyx Pharmaceuticals (PubChem 2015d).

KARF je peptidový epoxyketon z druhé generace inhibitorů, ireverzibilně se váže a inhibuje vazebnou strukturu s chymotrypsinovou aktivitou 20S proteazomu. V červenci 2012 jej FDA schválila jako potenciální terapii pro pacienty s mnohočetným myelomem, kteří obdrželi alespoň dvě předchozí terapie, včetně BORT a imunomodulačního činidla, a u kterých došlo k progresi nemoci do šedesáti dní po ukončení poslední terapie. Je podáván intravenózně v dávce 20 mg/m^2 v průběhu 2–10 minut ve dnech 1, 2, 8, 9, 15 a 16 z celkem 28denního cyklu (Adib a kol. 2012).

V porovnání s BORT vykazuje stejnou účinnost, ale větší selektivitu k vazebné struktuře s chymotrypsinovou aktivitou. Hematologické maligní buňky vykazují větší citlivost na KARF již při krátké expozici, zatímco buňky solidních tumorů a netransformované buňky jsou méně citlivé (Demo a kol. 2007).

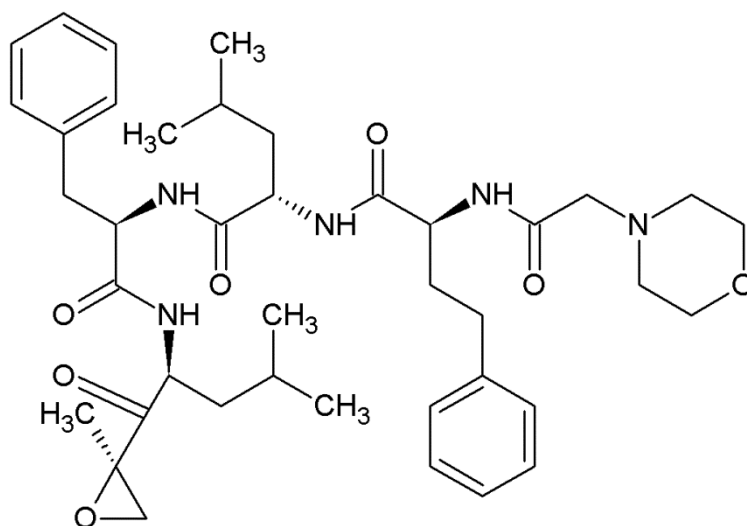
Terapie KARF může překonat primární a sekundární rezistenci vůči BORT a několika dalším chemoterapeutikům. Nicméně byla objevena už i rezistence ke KARF způsobená pravděpodobně zvýšením hladin P-glykoproteinu a mnohočetnou lékovou rezistencí efluxních pump, protože v *in vitro* testech bylo zjištěno, že

rezistence může být překonána pomocí inhibitoru P-glykoproteinu (např. verapamil) nebo peptidových analogů postrádajících farmakofor (Ao a kol. 2012).

KARF je obecně dobře snášen, běžnými nežádoucími účinky jsou únava, anémie, nauzea, trombocytopenie, dušnost, průjem, horečka, bolest hlavy, infekce horních cest dýchacích, periferní otoky, neutropenie a bolest zad (Adib a kol. 2012).

Aktivita KARF se projevuje při různých hematologiích i v pevných nádorech, včetně mnohočetného myelomu, akutní myeloidní leukémie, Burkittova lymfomu, Waldenströmově makroglobulinémie, rakoviny pankreatu a rakoviny plic (Adib a kol. 2012). Aktivita KARF je zesílena současným podáním inhibitorů histondeacetylázy (např. vorinostat) (Kuhn a kol. 2007).

V probíhajících klinických studiích se stále definuje jeho bezpečnost a účinnost u dalších malignit (Zangari a kol. 2011).



Obr. 4. Chemická struktura karfilzomibu Převzato ze zdroje www.pubchem.com (PubChem, 2015d)

2.4 Mnohočetný myelom

Přestože jsou inhibitory proteazomu hodnoceny v klinických studiích pro léčbu různých nádorových onemocnění (Papadopoulos a kol. 2013), v současnosti je jejich hlavní indikací terapie mnohočetného myelomu (MM). MM je zhoubné onemocnění způsobené maligní transformací B-lymfocytů, jejich klonální proliferací a akumulací plazmocytů (CMG 2015). MM tvoří asi 1 % všech rakovinných onemocnění a více než 10 % všech hematologických onemocnění (Adib a kol. 2012). V ČR je incidence mnohočetného myelomu 2,65/100 000 obyvatel. Jde o nemoc převážně starší populace – ve věkové kategorii 75–79 let je incidence 15,57/100 000 obyvatel, ve věku 20 až 40 let se tato choroba vyskytuje vzácně. Onemocnění je častější u mužů než u žen (CMG 2015). V Evropě je více než 40 000 nových případů diagnostikovaných každý rok.

Onemocnění se v klinické praxi klasifikuje buď jako symptomatický, nebo asymptomatický MM. K symptomatické formě je nutná přítomnost klonálních maligních plazmocytů v kostní dřeni, přítomnost monoklonálních imunoglobulinů v séru/moči a přítomnost alespoň jednoho z tzv. CRAB kritérií: hyperkalcémie, renální insuficience, anémie, kostní destrukce (Hájek a kol. 2011).

Mnohočetný myelom je stále dostupnými prostředky nevléčitelný. Protinádorová léčba je indikována pouze u pacientů se symptomatickým MM s přítomností CRAB kritérií (Hájek a kol. 2011). V případě asymptomatického MM se kromě podávání bisfosfonátů doporučuje pacienta pouze sledovat. Zpočátku se kontrolní vyšetření provádějí zhruba v dvouměsíčních intervalech, v případě opakovaně stabilních hodnot je možné interval prodloužit (Adam a Maisnar 2008).

Protinádorovou léčbou může být chemoterapie standardní, nebo standardní zakončená vysokodávkovanou chemoterapií s podporou transplantace krvetvorných buněk. Cytostatické léky se různě kombinují a tvoří různé léčebné režimy opakující se v pravidelných intervalech (většinou je interval jeden měsíc). Za optimální indukční chemoterapii před autologní transplantací se považuje chemoterapie VAD (vincristin, adriamycin – DOX a dexamethason). Nedílnou součástí protinádorové léčby je radioterapie (CMG 2015).

Podpůrná terapie zahrnuje podávání analgetik, bisfosfonátů (pro lepší efekt je doporučováno současné podávání vitamínu D a vápníku), léčbu anémie, dialyzační

léčbu při poškození ledvin, léčbu infekcí a podporu imunity, ortopedickou léčbu pro odlehčení kostry pomocí ortéz, případně operativní zákrok. Rehabilitační léčba by měla být součástí všech léčebných postupů, podporuje udržení svalové a kostní hmoty (CMG 2015).

Obrovský přínos pro terapii MM přinesly tři nové vysoce účinné látky – thalidomid, BORT a lenalidomid, které jsou obvykle kombinovány s glukokortikoidy nebo alkylačními cytostatiky (melfalan, cyklofosfamid) pro větší účinnost (Hájek a kol. 2011). Pro použití inhibitorů proteazomu v léčbě mnohočetného myelomu existuje několik argumentů.

Za prvé, inhibitory proteazomu snižují expresi vaskulární adhezní molekuly VCAM1 (Read a kol. 1995). Ta je nezbytná pro vazbu buněk MM k buňkám kostní dřeně, což má za následek ochranu buněk MM před apoptózou (Adams 2004).

Za druhé, proteazomová inhibice aktivace jaderného faktoru kappa B (NF- κ B) může snížit expresi interleukinu-6 (IL-6), který je růstovým faktorem buněk MM. Také se předpokládá, že IL-6 je zapojený do vytváření dexamethason-rezistentního fenotypu MM (Schenkein 2002).

Za třetí, kostní dřeň pacientů s MM vykazuje zvýšenou neovaskularizaci. V *in vivo* testech demonstrované anti-angiogenní vlastnosti BORT ukazují, že jedním z mechanismů, kterým inhibitory atakují mnohočetný myelom, je ovlivnění závislosti na neovaskularizaci kostní dřeně (Sunwoo a kol. 2001).

Studie dále ukázaly, že BORT působí aditivně nebo synergisticky s dalšími chemoterapeutiky, jako například dexamethasonem, melfalanem a pegylovaným liposomálním doxorubicinem (Hideshima a kol. 2001). BORT je jedním z nejúčinnějších léků současnosti u MM. Jeho mimořádnost v klinické praxi je dána vysokým počtem dosažených kompletních remisí, velmi rychlým nástupem účinku, a druhotně zjištěným profylaktickým účinkem proti tromboembolii (CMG 2015).

3 Cíle práce

- Stanovení antiproliferačních účinků DAU a DOX na buněčné linii HL-60 a výpočet hodnot IC_{50} .
- Stanovení antiproliferačních účinků BORT a KARF na buněčné linii HL-60 a výpočet hodnot IC_{50} .
- Stanovení antiproliferačních účinků kombinace BORT a KARF s DAU na buněčné linii HL-60 metodou dle Chou-Talalaye a výpočtem kombinačních indexů.
- Stanovení toxicity BORT a KARF vůči potkaním neonatálním ventrikulárním kardiomyocytům.
- Stanovení účinků kombinace BORT a KARF s DAU na potkaní neonatální ventrikulární kardiomyocyty.
- Hodnocení morfologických změn a toxicity vyvolané BORT a KARF na neonatálních ventrikulárních kardiomyocytech pomocí fluorescenční mikroskopie.

4 Materiál a metodika

4.1 Materiálové a přístrojové vybavení

4.1.1 Přístrojové vybavení

- Box s laminárním prouděním Aura 2000 m.a.c. (BioAir, Itálie)
- Buněčný inkubátor, model 311 (Forma Scientific, USA)
- Mikroskop Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Japonsko) s kamerou COOL-1300Q (VDS Vosskuhler, Německo)
- Vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)
- Bürkerova komůrka (Fisher Scientific, Německo)
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200 (Tecan, Rakousko)
- Laboratorní třepačky vortex (BioTech, Česká republika)
- Desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph, Německo)
- Analytické váhy ScalTec SBC 22 (Scaltec, Německo)
- Centrifuga
- Třepaný inkubátor NB205 (N-Biotek, Korea)
- Hlubokomrazící box

4.1.2 Ostatní pomůcky

- Automatické pipety Eppendorf research plus různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- Pipety elektronické 8-kanálové BioHit Picus 5–100 μ l a 50–1200 μ l (BioHit, Finsko)
- Sterilní špičky různého rozsahu (Eppendorf, Německo a BioHit, Finsko)
- Sérologické sterilní pipety 2, 5, 10 a 25 ml (TPP, Švýcarsko)
- Mikrotitrační destičky 96jamkové (TPP, Švýcarsko)
- Plastové sterilní kultivační lahve T75 (TPP, Švýcarsko)
- Petriho misky 100 mm a 150 mm (TPP, Švýcarsko)
- 12jamkové destičky (TPP, Švýcarsko)
- Laboratorní sklo a plasty sterilní (Thermo Fischer Scientific, Česká republika)

- Plastové sterilní zkumavky různého objemu (TPP, Švýcarsko)
- Mikrozukavky 0,5 a 1,5 ml (Eppendorf, Německo)
- Sterilní nástroje (nůžky, pinzeta, skalpel, buničina)

4.1.3 Chemikálie

- RPMI-1640 kultivační médium (Sigma, Německo)
- Teplem deaktivované fetální bovinní sérum (Lonza, Česká republika)
- Směs penicilinu a streptomycinu 5000 U/ml (Lonza, Česká republika)
- Daunorubicin (Daunoblastina 20 mg – Pfizer, Švýcarsko)
- Doxorubicin (Teva, Česká Republika)
- Bortezomib (Huaren Chemicals, Čína)
- Karfilzomib (Huaren Chemicals, Čína)
- Trypanová modř (Sigma, Německo)
- DMSO (dimethylsulfoxid), $\geq 99,9\%$ (Sigma, Německo)
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) (Sigma, Německo)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma, Německo)
- Isopropanol (Sigma, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)
- Triton X-100 (Sigma, Německo)
- Ultradestilovaná voda (MQ, přístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)
- TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Penta, Česká republika)
- Kolagenáza (Invitrogen, USA)
- Pankreatin (Sigma, Německo)
- NAD⁺ (nikotinamidadeninindinukleotid)
- 80% kyselina mléčná (Penta, Česká republika)
- Dithiothreitol
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)
- Médium DMEM/F12 1:1 (s 2 mM glutaminem) (Lonza, Švýcarsko)
- Koňské sérum (Lonza, Švýcarsko)
- Pyruvát sodný (100 mM, sterilní, pro buněčné kultury, Lonza, Švýcarsko)

- ADS pufr (116 mM NaCl, 5,3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,13 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES)
- HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonová kyselina)
- Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- Propidium jodid (Molecular Probes, USA)
- Další běžné laboratorní chemikálie

4.1.4 Buněčný materiál

V experimentech hodnotících antiproliferační účinek látek byla použita buněčná linie HL-60. Tyto buňky byly poprvé izolovány z periferní krve v roce 1977 (Collins a kol. 1977) od pacientky s akutní promyelocytární leukémií. Buňky rostou v suspenzní kultuře, jejich doba zdvojení kolísá mezi 20–45 hodinami (Birnie 1988). Ze své podstaty jsou nediferencované, ale mohou být indukovány k terminální diferenciaci na granulocyty, monocyty, makrofágy nebo eosinofily (Collins 1987). Naše buněčná kultura byla získaná z americké banky buněčných linií (American Type Culture Collection; ATCC). Pro cytotoxické experimenty byly použity buňky 12. až 40. generace.

Pro další část experimentů hodnotících vliv inhibitorů proteazomu na kardiotoxicitu antracyklinů byla použita primární kultura potkaních neonatálních ventrikulárních kardiomyocytů (NVCM) izolovaných z 1–3denních mláďat potkanů kmene Wistar dle standardních metodik (Jirkovska-Vavrova a kol. 2015). Po dekapitaci byla extrahovaná srdce opláchnuta vychlazeným ADS pufrům s 5mM glukózou a skalpelem rozmělněna. K tomuto homogenátu bylo přidáno 10–12 ml směsi enzymů (kolagenázy a pankreatinu) v ADS pufru s glukózou. Suspenze byla podrobena sérii šesti 20minutových inkubací v této směsi. Po každé inkubaci se suspenze nechala dekantovat 2 minuty a supernatant byl přenesen do 10ml sterilní plastové zkumavky, kde byl smíchán s 1 ml koňského séra pro inaktivaci enzymů. Buněčná frakce byla z této suspenze oddělena centrifugací (5 minut, 350 x g při laboratorní teplotě). Peleta byla resuspendována v 1 ml koňského séra. Tyto spojené buněčné frakce byly znovu přečištěny centrifugací (8 minut, 1250 rpm). Peleta byla resuspendována v médiu DF15 (DMEM/F12, 4mM pyruvát, 5 % fetálního bovinního séra, 10 % koňského séra, 1 % směsi penicilinu a streptomycinu). Suspenze byla nanesena na Petriho misku a vložena na dvě hodiny do inkubátoru. Během této doby

fibroblasty adherují na dno, zatímco kardiomyocyty zůstanou v suspenzi. Po dvou hodinách byla stanovena viabilita a koncentrace buněk v suspenzi a výsledná koncentrace byla upravena na 800 tisíc buněk/ml.

Suspenze byla nanesena po 1 ml na jamku na 12jamkové kultivační destičky potažené 1% želatinou. Po 40 hodinách inkubace bylo vyměněno médium za DF5 (DMEM/F12, 4mM pyruvát, 5% fetální bovinní sérum, 1% směs penicilinu a streptomycinu). Po 24 hodinách se opět vyměnilo médium a po dalších 24 hodinách mohl být proveden experiment (v kultivačním médiu bez séra a pyruvátu).

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Kultivace

Kultivace buněk HL-60 probíhala ve sterilních plastových kultivačních lahvích o objemu 75 ml za použití média RPMI-1640 s 10 % fetálního bovinního séra a s 1 % směsí penicilinu a streptomycinu. Buňky byly uchovávány v inkubátoru za podmínek imitujících prostředí lidského těla – tedy při 37 °C a v atmosféře 5 % oxidu uhličitého. Z důvodu předcházení kontaminace vzorků se pracovalo za sterilních podmínek v laminárním boxu. Kultivační médium i všechny přidávané roztoky byly vytemperovány na 37 °C.

Pasážování se provádělo každý 3. – 4. den, aby nedošlo k přemnožení buněk a tím i vyčerpání živin v kultivačním médiu. Po důkladné homogenizaci buněčné kultury byl odebrán vzorek o objemu 20 µl do připravené nesterilní mikrozkuřavky. Ke vzorku bylo přidáno 20 µl 0,4% roztoku trypanové modři a po dvouminutové inkubaci bylo napipetováno 10 µl promíseného vzorku do obou částí Bürkerovy komůrky. Pod mikroskopem byl spočítán počet živých buněk v pěti z devíti čtverců na každé straně počítací komůrky. Živé buňky se trypanovou modří neobarví – mají schopnost aktivně vylučovat vstřebané barvivo, a proto se jeví jako světlé útvary na modrém pozadí. Pro zjištění počtu buněk v 1 ml suspenze byl počet buněk v deseti čtvercích vynásoben dvěma tisíci. Poté byla suspenze zředěna kultivačním médiem na koncentraci 0,1M/ml a objem 20–25 ml. Nová kultivační lahev s takto připravenou suspenzí byla označena datem, číslem pasáže a názvem buněk a umístěna do inkubátoru. Zbylá suspenze, která nebyla potřebná k pasáži, se využila na antiproliferační experimenty.

4.2.2 Antiproliferační experimenty

Suspenze o koncentraci 0,2 M/ml byla nanášena na sterilní 96jamkovou kultivační destičku multikanálovou pipetou. Do sloupců 3 až 10 bylo nanášeno po 50 µl této suspenze na jamku. Sloupce 2 a 11 sloužily jako negativní kontrola s nulovou viabilitou – nanášeno pouze 100 µl kultivačního média. Do sloupců 3 a 10 bylo přidáno pouze 50 µl kultivačního média. Tyto sloupce sloužily jako kontrola s maximální proliferací. Do sloupců 4 až 9 bylo nanášeno 50 µl kultivačního média s přidávanými testovanými látkami. Vždy bylo použito stejné množství zásobního

roztoku zkoušené látky, aby konečná koncentrace DMSO byla 0,1 % ve všech vzorcích.

Poté byly destičky vloženy do inkubátoru na 72 hodin a následně byla vyhodnocena viabilita buněk pomocí MTT testu.

4.2.3 Stanovení buněčné viability – MTT test

Pro stanovení viability buněk byl použit tzv. MTT test. Jeho principem je metabolizace žlutého 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) na modrofialový krystalický formazan. Těto přeměny jsou schopné pouze živé buňky s aktivně respirujícími mitochondriemi (Ciapetti a kol. 1993).

Po 72hodinové ovlivňovací fázi s testovanými látkami bylo do každé jamky nanášeno 25 μ l připraveného roztoku MTT v PBS o koncentraci 3 mg/ml, předehřátého na 37 °C. Tyto destičky byly opět vráceny do inkubátoru. Po uplynutí 3hodinové inkubace bylo přidáno do všech jamek 100 μ l lyzačního roztoku složeného z izopropanolu, 0,1M kyseliny chlorovodíkové a 5% Tritonu X-100. Destičky byly umístěny na třepačku, kde byly při 600 rpm třepány přes noc.

Po úplném rozpuštění krystalků formazanu byla měřena absorbance na spektrofotometru TECAN při dvou vlnových délkách – absorpční maximum modrého formazanu (570 nm) a referenční měření žlutého MTT (690 nm). Od absorbance při 570 nm byla odečtena absorbance při 690 nm. Z hodnot z šesti paralelních měření v jednotlivých sloupcích byla vypočtena průměrná hodnota a od tohoto výsledku byla odečtena průměrná hodnota sloupce s nulovou viabilitou. Buněčná proliferace byla poté vyjádřena jako procenta průměrné hodnoty maximální proliferace – kontrolního sloupce.

4.2.4 Hodnocení toxicity látek vůči primárním potkaním neonatálním kardiomyocytům

Před experimentem bylo kultivační médium vyměněno za médium bez séra a pyruvátu (DMEM/F12, 1% směs penicilinu a streptomycinu). Do jamek byly přidány testované látky v množství 1 μ l na 1 ml média v jamce a destičky byly vloženy do inkubátoru.

Po 48hodinové inkubaci byly po promíchání odebrány 500 μ l vzorky do mikroskopavek. Kontrolní vzorky byly poté zbaveny zbytku kultivačního média a buňky byly lyzovány 1 ml lyzačního roztoku (fosfátový pufr, EDTA, dithiothreitol, 10% Triton X-100, pH 7,8) pro stanovení množství celkové aktivity laktátdehydrogenázy ve vzorcích. Po pěti minutách byl opět po promíchání odebrán 500 μ l vzorek do mikroskopavek. Vzorky byly vloženy do hlubokomrazícího boxu, kde byly skladovány do stanovení při -80°C.

4.2.5 Stanovení aktivity LDH

Laktátdehydrogenáza (LDH) je nitrobuněčný enzym metabolizující laktát na pyruvát a oxidovanou formu nikotinamidadenindinukleotidu (NAD⁺) na jeho redukovanou formu (NADH). Při narušení cytoplazmatické membrány se tento enzym uvolňuje do okolního média. Jeho aktivity lze proto využít pro stanovení cytotoxicity (Korzeniewski a Callewaert 1983, Decker a Lohmann-Matthes 1988). Měření bylo prováděno na mikrotitračních destičkách, kde byl spektrofotometricky stanovován přírůstek NADH kinetickou metodou.

Před měřením byly jak vzorky, tak i reakční směs (Tris 35mM laktát, NAD⁺) vytemperovány na pokojovou teplotu. Do jamek bylo nanášeno 50 μ l promíchaného vzorku v duplikátu. Potom bylo přidáno 300 μ l reakčního roztoku a absorbance vzorků byla měřena na spektrofotometru TECAN při vlnové délce 340 nm po dobu 2 minut ve 30s intervalech při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení bylo provedeno v MS Excel vypočtením rozdílu počáteční a koncové aktivity v jedné minutě lineárního úseku.

4.2.6 Hodnocení buněčné morfologie

Po 48hodinové inkubaci s KARF a BORT byly vzorky na 12jamkové destičce obarveny dvěma fluorescenčními sondami – Hoechst 33342 a propidium jodidem. Hoechst 33342 je modré fluorescenční barvivo, které se váže na DNA a má schopnost volně procházet buněčnými membránami. Pomocí této sondy můžeme rozlišit apoptotické buňky, které výrazněji modře fluoreskují díky zhuštěnému chromatinu. Propidium jodid je červeně fluoreskující sonda, která se také váže na DNA, ale neprochází membránou živých buněk. Barví tedy pouze chromatin

nekrotických buněk – s nárustem fluorescenčního signálu propidium jodidu je proto možné hodnotit nárůst cytotoxicity. Barvení probíhalo v kultivačním médiu, do kterého bylo přidáno 3 mg/ml Hoechst 33342 a 10 mg/ml propidium jodidu. Po patnáctiminutové inkubaci byly v temnu pořízeny snímky s modrým fluorescenčním filtrem (λ_{ex} : 360 nm, λ_{em} : 460 nm), s červeným fluorescenčním filtrem (λ_{ex} : 560 nm, λ_{em} : 630 nm) a bez filtru ve fázovém kontrastu.

Snímky byly pořízeny invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse se zdrojem UV Nikon S-CHG se rtuťovou lampou a filtry Texas Red (TxR), a DAPI (Nikon, Japonsko) s kamerou COOL-1300Q (VDS Vosskühler, Německo) s použitím software NIS-Elements AR 2.20 (Laboratory Imaging, Česká republika).

4.2.7 Grafické a statistické zpracování experimentálních dat

Vyhodnocení experimentálních dat získaných jako hodnoty absorbance pomocí spektrofotometru TECAN bylo provedeno v MS Excel. Hodnoty procentní proliferace byly následně graficky i statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., U.S.A.).

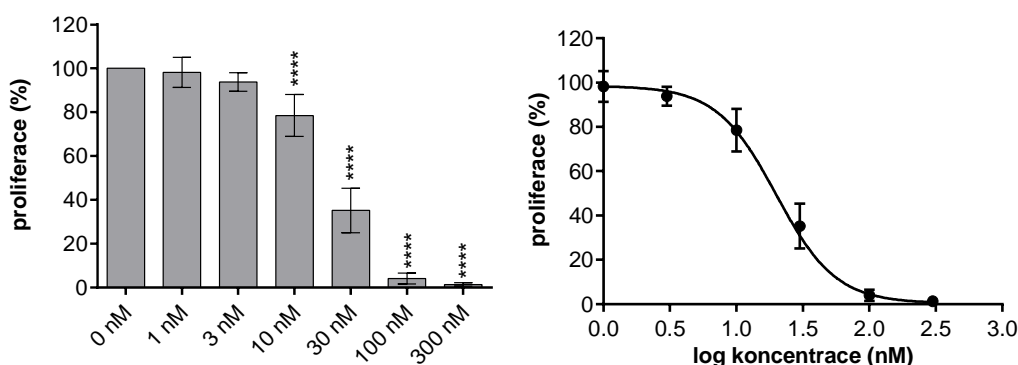
Průměrná hodnota ze čtyř nezávislých měření s odpovídající odchylkou byla vynesena do sloupcového nebo spojnicového grafu. Statistická významnost byla hodnocena pomocí metody One-Way ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka. Pro výpočet hodnot IC_{50} a kombinačního indexu dle Chou-Talalaye byl použit program CompuSyn (Chou 2006).

5 Výsledky

5.1 Antiproliferační účinky sledovaných látek

5.1.1 Antiproliferační účinky daunorubicinu

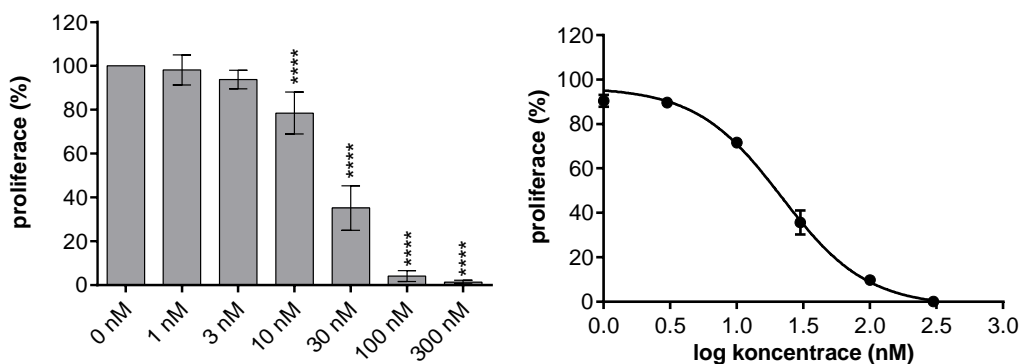
Po 72hodinové inkubaci buněčné kultury HL-60 s DAU (1–300 nM) bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk od koncentrace 10 nM. Pokus byl vyhodnocen testem MTT. Průměrná absorbance šesti replikátů byla vztažena k průměrným hodnotám v kontrolních vzorcích a vyjádřena jako procenta těchto kontrolních vzorků. Kontrolní skupina (0 nM) odpovídá 100% buněčné proliferaci (nebyla ovlivněna žádnými přidanými látkami). Z průměrných hodnot ze čtyř nezávislých měření byla vypočtena hodnota IC_{50} (koncentrace látky, která způsobí snížení buněčné proliferace na polovinu) 17,36 nM.



Obr. 5. Graf znázorňující proliferaci buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s různými koncentracemi daunorubicinu. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „****“ – hodnoceno metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka (**** – $p \leq 0,0001$).

5.1.2 Antiproliferační účinky doxorubicinu

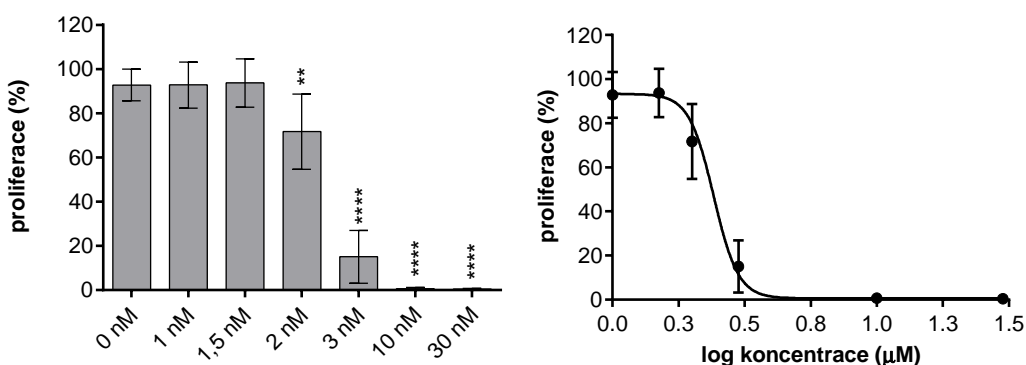
Po 72hodinové inkubaci buněčné kultury HL-60 s DOX (1–300 nM) bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk již od první použité koncentrace – 1 nM. Pokus byl vyhodnocen testem MTT. Průměrná absorbance šesti replikátů byla vztažena k průměrným hodnotám v kontrolních vzorcích a vyjádřena jako procenta těchto kontrolních vzorků. Kontrolní skupina (0 nM) odpovídá 100% buněčné proliferaci (nebyla ovlivněna žádnými přidanými látkami). Z průměrných hodnot ze čtyř nezávislých měření byla vypočtena hodnota IC_{50} (koncentrace látky, která způsobí snížení buněčné proliferace na polovinu) 21,67 nM.



Obr. 6. Graf znázorňující proliferaci buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s různými koncentracemi doxorubicinu. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „****“ – hodnoceno metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka (**** – $p \leq 0,0001$).

5.1.3 Antiproliferační účinky bortezomibu

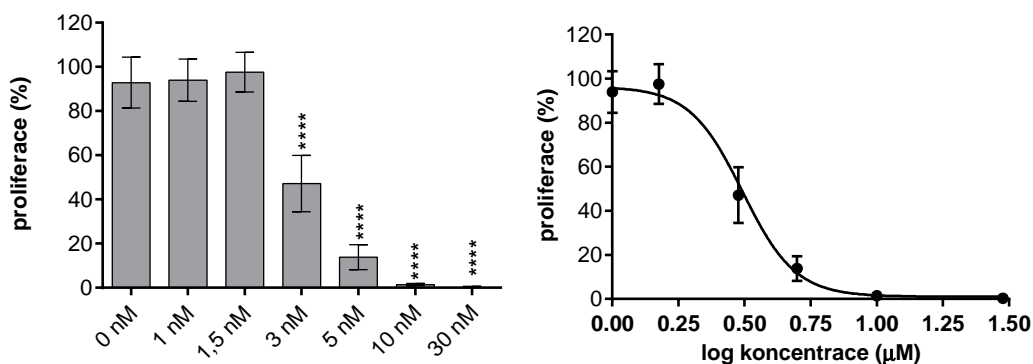
Po 72hodinové inkubaci buněčné kultury HL-60 s BORT (1–30 nM) bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk od koncentrace 2 nM. Pokus byl vyhodnocen testem MTT. Průměrná absorbance šesti replikátů byla vztažena k průměrným hodnotám v neovlivněných vzorcích a vyjádřena jako procenta těchto vzorků. Kontrolní skupina (0 nM) odpovídá proliferaci buněk ovlivněných pouze DMSO v koncentraci 0,1 % – DMSO bylo použito pro rozpuštění BORT a jeho finální koncentrace je stejná ve všech skupinách. Z průměrných hodnot ze čtyř nezávislých měření byla vypočtena hodnota IC₅₀ (koncentrace látky, která způsobí snížení buněčné proliferace na polovinu) 2,51 nM.



Obr. 7. Graf znázorňující proliferaci buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s různými koncentracemi bortezomibu. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „*“ – hodnoceno metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka (** – $p \leq 0,01$, **** – $p \leq 0,0001$).

5.1.4 Antiproliferační účinky karfilzomibu

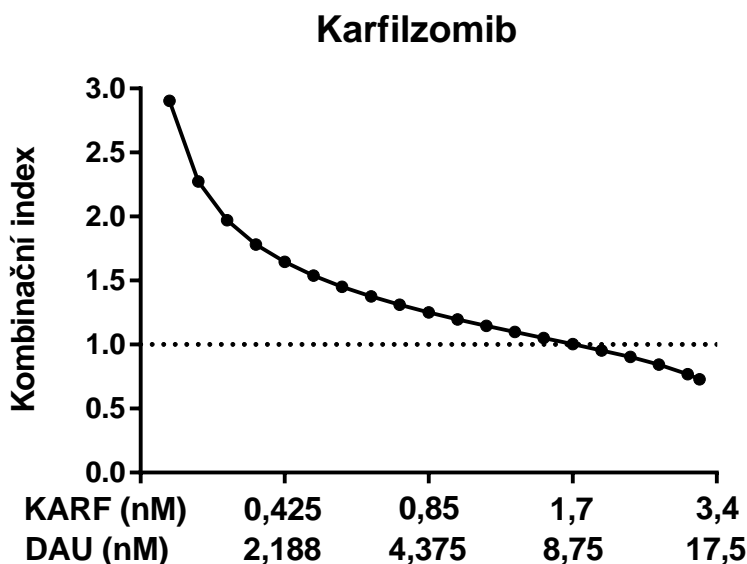
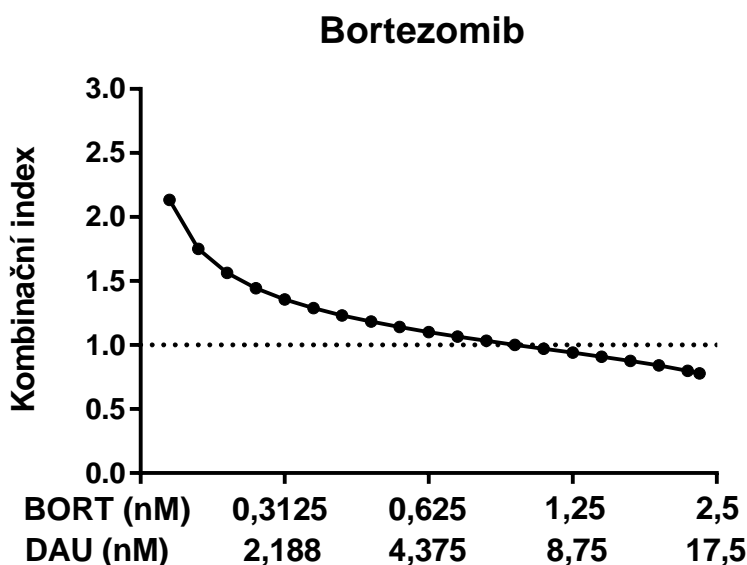
Po 72hodinové inkubaci buněčné kultury HL-60 s KARF (1–30 nM) bylo zaznamenáno statisticky významné a dávkově závislé snížení proliferace buněk od 3 nM. Pokus byl vyhodnocen testem MTT. Průměrná absorbance šesti replikátů byla vztažena k průměrným hodnotám v neovlivněných vzorcích a vyjádřena jako procenta těchto vzorků. Kontrolní skupina (0 nM) odpovídá proliferaci buněk ovlivněných pouze DMSO v koncentraci 0,1 % – DMSO bylo použito pro rozpuštění KARF a jeho finální koncentrace je stejná ve všech skupinách. Z průměrných hodnot ze čtyř nezávislých měření byla vypočtena hodnota IC_{50} (koncentrace látky, která způsobí snížení buněčné proliferace na polovinu) 3,40 nM.



Obr. 8. Graf znázorňující proliferaci buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s různými koncentracemi karfilzomibu. Buněčná proliferace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „*“ – hodnoceno metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka (**** – $p \leq 0,0001$).

5.1.5 Analýza kombinačního efektu dle Chou a Talalaye

Buněčná kultura HL-60 byla inkubována 72 hodin s DAU v kombinaci s BORT nebo KARF v podílech a násobcích IC_{50} jednotlivých látek. Výsledky jsou vyjádřeny jako tzv. „FA–CI plot“, tedy graf znázorňující vztah ovlivněného podílu buněk (hodnota vyjadřující podíl použité koncentrace dvou látek k jejich hodnotám IC_{50}) a vypočteného kombinačního indexu. Hodnoty kombinačního indexu vyjadřují synergický ($CI < 1$), aditivní ($CI = 1$), nebo antagonistický ($CI > 1$) účinek.

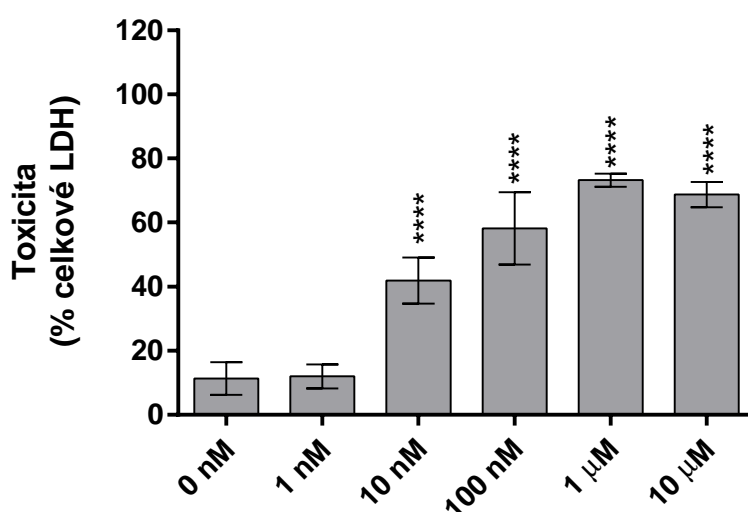


Obr. 9. Graf znázorňující interakci daunorubicinu (DAU) s bortezomibem (BORT) nebo karfilzomibem (KARF) na buněčné linii HL-60 po 72hodinové inkubaci.

5.2 Hodnocení toxicity látek vůči potkaním neonatálním ventrikulárním kardiomyocytům

5.2.1 Toxicita bortezomibu

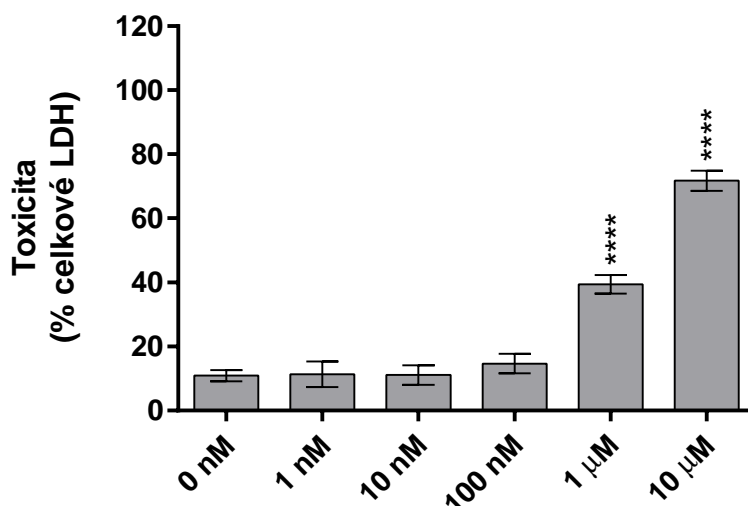
Po 48hodinové inkubaci NVCM buněk s BORT (1 nM – 10 μ M) byla zaznamenána statisticky významná a dávkově závislá toxicita BORT v koncentracích vyšších než 10 nM. Kontrolní skupina odpovídá buněčné viabilitě ovlivněné pouze rozpouštědlem (0,1 % DMSO).



*Obr. 10. Graf znázorňující toxicitu bortezomibu (1 nM – 10 μ M) na kulturu primárních potkaních neonatálních kardiomyocytů. Toxicita BORT hodnocená jako aktivita LDH uvolněná do kultivačního média po 48 hodinách inkubace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „****“ – hodnoceno metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka (**** - $p \leq 0,0001$).*

5.2.2 Toxicita karfilzomibu

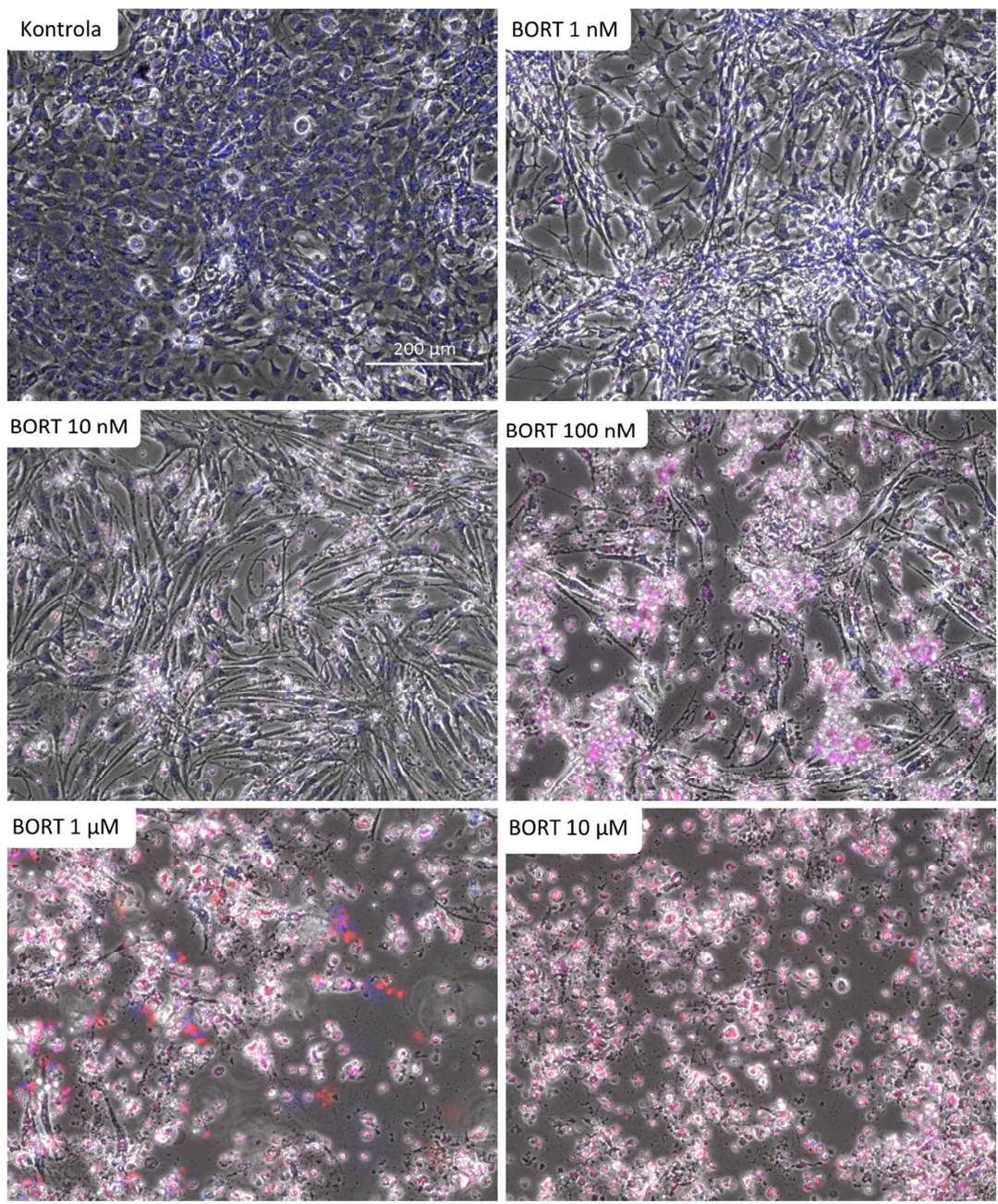
Po 48hodinové inkubaci NVCM buněk s KARF (1 nM – 10 μ M) byla zaznamenána statisticky významná a dávkově závislá toxicita v koncentracích vyšších než 1 μ M. Kontrolní skupina odpovídá buněčné viabilitě ovlivněné pouze rozpouštědlem (0,1 % DMSO).



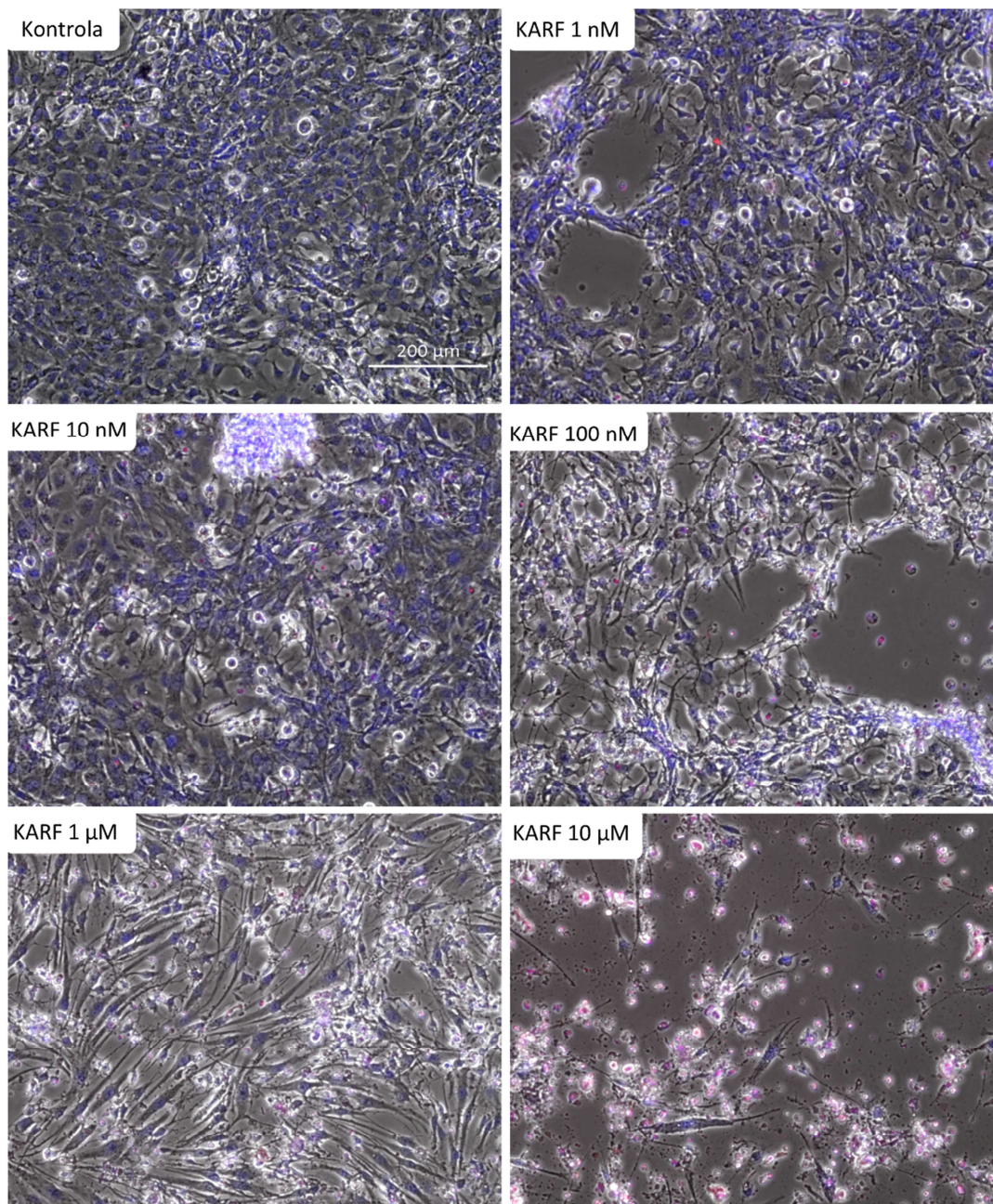
Obr. 11. Graf znázorňující toxicitu karfilzomibu (1 nM – 10 μ M) kulturu primárních potkaních neonatálních kardiomyocytů. Toxicita KARF hodnocená jako aktivita LDH uvolněná do kultivačního média po 48 hodinách inkubace je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „“ – hodnoceno metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka (**** - $p \leq 0,0001$).*

5.2.3 Hodnocení morfologických změn neonatálních potkaních kardiomyocytů způsobených inhibitory proteazomu

Fotografie byly pořízeny po 48hodinové inkubaci buněk NVCM s BORT nebo KARF o různé koncentraci. Buňky byly označeny sondami Hoechst 33342 (modrá fluorescence) a propidium jodidem (červená fluorescence). V porovnání s kontrolní skupinou je viditelné zvýšení množství červeně obarvených jader kardiomyocytů v závislosti na koncentraci použitých inhibitorů proteazomu, změna morfologie a vzrůstající toxicita inhibitorů proteazomu vůči kultuře NVCM v závislosti na vzrůstající koncentraci.



Obr. 12. Změny morfologie neonatálních potkaních kardiomyocytů po 48hodinové inkubaci s bortezomibem (BORT). Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu vykazuje chromatin v jádrech živých buněk modrou fluorescenci (sonda Hoechst 33342), červená fluorescence označuje jádra buněk nekrotických (sonda propidium jodid).

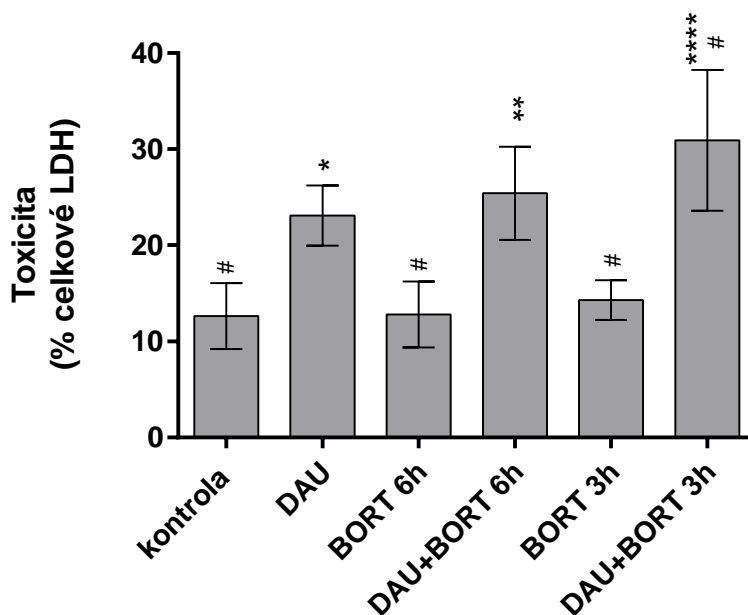


Obr. 13. Změny morfologie neonatálních potkaních kardiomyocytů po 48hodinové inkubaci s karfilzomibem (KARF). Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu vykazuje chromatin v jádrech živých buněk modrou fluorescenci (sonda Hoechst 33342), červená fluorescence označuje jádra buněk nekrotických (sonda propidium jodid).

5.2.4 Toxicita daunorubicinu v kombinaci s bortezomibem

Kombinační testy probíhaly ve dvou odlišných schématech. Kultura byla s DAU (1,2 μM) a BORT (2,5 nM) inkubována buď současně po dobu 3 hodin, nebo byla inkubace s BORT zahájena 3 hodiny před začátkem 3hodinové inkubace s DAU.

V obou případech nevykazoval samotný BORT signifikantně vyšší toxicitu oproti kontrolním vzorkům ovlivněných pouze rozpouštědlem (0,1 % DMSO). DAU způsobil signifikantní nárůst aktivity LDH uvolněné do kultivačního média oproti kontrolním vzorkům. Kombinace s BORT tuto toxicitu zhoršila statisticky signifikantně pouze v případě, kdy byly obě látky podány zároveň (DAU + BORT 3h).

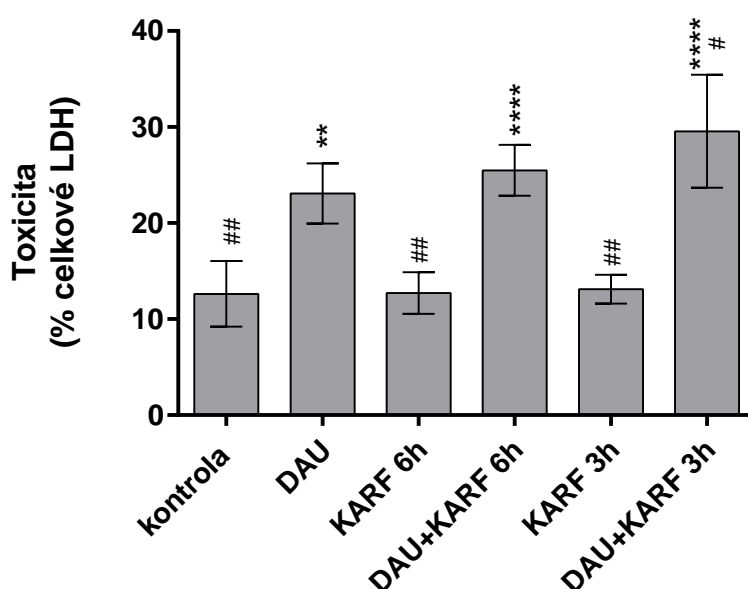


Obr. 14. Graf znázorňující toxicitu bortezomibu (BORT; 2,5 nM) a daunorubicinu (DAU 1,2 μM) a jejich kombinace vůči primárním neonatálním kardiomyocytům v různých inkubačních schématech. Toxicita BORT, DAU nebo jejich kombinace byla hodnocena jako aktivita LDH uvolněná do kultivačního média po 48 hodinách následné inkubace bez látek a je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna toxicity hodnocená metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „*“, statisticky významná změna oproti efektu samotného DAU je v grafu označena symbolem „#“ (**** - $p \leq 0,0001$, # - $p \leq 0,05$).

5.2.5 Toxicita daunorubicinu v kombinaci s karfilzomibem

Kombinační testy probíhaly ve dvou odlišných schématech. Kultura byla s DAU (1,2 μM) a KARF (2,5 nM) inkubována buď současně po dobu 3 hodin, nebo byla inkubace s KARF zahájena 3 hodiny před začátkem 3hodinové inkubace s DAU.

V obou případech nevykazoval samotný KARF signifikantně vyšší toxicitu oproti kontrolním vzorkům ovlivněných pouze rozpouštědlem (0,1 % DMSO). DAU způsobil signifikantní nárůst aktivity LDH uvolněné do kultivačního média oproti kontrolním vzorkům. Kombinace s KARF tuto toxicitu zhoršila statisticky signifikantně pouze v případě, kdy byly obě látky podány zároveň (DAU + KARF 3h).



Obr. 15. Graf znázorňující toxicitu bortezomibu (BORT; 2,5 nM) a daunorubicinu (DAU 1,2 μM) a jejich kombinace vůči primárním neonatálním kardiomyocytům v různých inkubačních schématech. Toxicita BORT, DAU nebo jejich kombinace byla hodnocena jako aktivita LDH uvolněná do kultivačního média po 48 hodinách následné inkubace bez látek a je vyjádřena jako průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou. Statisticky významná změna toxicity hodnocená metodou OneWay ANOVA s post-hoc testem dle Holm-Šidáka oproti kontrolní skupině je v grafu označena symbolem „*“, statisticky významná změna oproti efektu samotného DAU je v grafu označena symbolem „#“ (**** - $p \leq 0,0001$, # - $p \leq 0,05$).

6 Diskuze

Proteazom je multikatalytická proteáza, přítomná ve všech eukaryotních buňkách, která je primárně zodpovědná za intracelulární degradaci proteinů. Tím, že se podílí na degradaci regulačních proteinů nebo jejich inhibitorů, je jeho funkce nezbytná pro celou řadu signálních drah. Zapojení proteazomu do regulace zásadních buněčných procesů vedla ke zkoumání jeho inhibice jako potenciální protinádorové terapie. BORT byl prvním proteazomovým inhibitorem, který byl zaveden do klinického hodnocení díky vysoké protinádorové aktivitě prokázané v preklinických testech, a to jak pro monoterapii, tak v kombinační terapii s „klasickými“ protinádorovými léčivými. V současnosti se soudí, že potenciál inhibitorů proteazomu je dosud prozkoumaný pouze z části a kromě protinádorových účinků mohou být tyto látky účinné i u zánětlivých stavů (Adams 2004).

Mechanismus účinku inhibitorů proteazomu zůstává stále nejasný. Několik hypotetických mechanismů bylo navrženo, mezi nimi zvýšení aktivity p53 (Shinohara a kol. 1996), akumulace p27 a p21 inhibitorů cyklin-dependentních kináz (Lenz 2003) a pro-apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2 (Almond a Cohen 2002), aktivace stresem aktivovaných proteinkináz (Callus a Mathey-Prevot 1998), snížení aktivity anti-apoptotického NF- κ B (Grandin a kol. 2015), aktivace apoptózy pomocí odpovědi na stres endoplasmatického retikula způsobený akumulací poškozených proteinů (ER-stress response). Také zabraňuje degradaci několika cyklinů a inhibitorů cyklin-dependentních kináz, což vede k zastavení buněčného cyklu a následně k apoptóze (von Metzler a kol. 2009).

Hlavní indikací pro inhibitory proteazomu je v současnosti mnohočetný myelom, ale v preklinickém hodnocení byly používány i pro terapii jiných hematologických malignit a také některých solidních nádorů (Almond a Cohen 2002, Lenz 2003). Jsou využívány jak v monoterapii, tak často i v kombinacích (převážně v klinických studiích) jak s relativně novými skupinami protinádorových léčiv, jako jsou např. analoga thalidomidu lenalidomid (Stewart a kol. 2015) a pomalidomid (Highsmith a kol. 2014), ale také s tradičními skupinami protinádorových léčiv, jako jsou etoposid, cyklofosfamid a DOX (Lenz 2003, Moreau 2014).

Právě kombinace s ANT, které patří mezi jedny z neúčinnějších protinádorových léčiv, ale jejich použití je limitováno dávkově závislou kardiotoxicitou, se jeví jako

potenciálně využitelná. Nicméně do této doby existuje pouze málo studií zabývajících se vlivem kombinace inhibitorů proteazomu a ANT jak z hlediska protinádorového účinku, tak možného ovlivnění (ať už pozitivního či negativního) antracyklinové kardiotoxicity. Cílem této diplomové práce tedy bylo částečně přispět k tomuto tématu.

Jako první jsme tedy hodnotili antiproliferační účinky BORT a KARF na buněčné linii lidské promyelocytární leukemie HL-60. Antiproliferační účinky byly stanoveny pomocí MTT testu po 72 hodinách inkubace s BORT nebo KARF v koncentracích od 1 nM do 1 μ M. Toto relativně velké rozpětí bylo pro přesnější výpočet hodnot IC_{50} dále upraveno na 1–30 nM. Vypočtené hodnoty IC_{50} jsou popsány v Tabulce 1.

| Testovaná látka | IC_{50} |
|-----------------|-----------|
| daunorubicin | 17,36 nM |
| doxorubicin | 21,67 nM |
| bortezomib | 2,51 nM |
| karfilzomib | 3,40 nM |

Tabulka 1 - Stanovené hodnoty IC_{50} jednotlivých látek u buněčné linie HL-60

Oba testované inhibitory proteazomu vykazovaly významný antiproliferační účinek již ve velmi malých koncentracích ($IC_{50} \approx 3$ nM). Použité ANT (DAU a DOX) měly za identických podmínek slabší (3–9 \times menší) antiproliferační účinnost v porovnání s inhibitory proteazomu. Zároveň naše výsledky ukázaly o něco větší toxicitu BORT oproti KARF.

Demo a kol. (2007) ve své studii hodnotili cytotoxické účinky BORT a KARF na řadě nádorových buněčných linií (hematologických malignit – mnohočetného myelomu, akutní lymfoblastické leukemie, lymfomu B buněk, Burkittova lymfomu – i solidních nádorů – kolorektálního, plicního a pankreatického karcinomu) a také

netransformovaných buněk (HUVEC lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly a normálních lidských kožních fibroblastů). Kultury byly vystaveny látkám buď kontinuálně po dobu 72 hodin, nebo po dobu pouze jedné hodiny, následně bylo vyměněno médium za nové a po 72 hodinách následné inkubace bez přítomnosti inhibitorů v kultivačním médiu byla stanovena buněčná viabilita. Po vyhodnocení vykazoval KARF větší cytotoxické účinky než BORT bez ohledu na typ buněk ve schématu, kdy byly látky v kultivačním médiu přítomny pouze po dobu jedné hodiny. Ve schématu stejném, jako bylo použito v této práci (72 hodin kontinuální expozice), bylo dosaženo řádově stejných hodnot IC_{50} u většiny buněčných linií jako v našich experimentech s buněčnou linií HL-60 (IC_{50} řádově v jednotkách nM) a nedal se vypočítat obecně vyšší účinek KARF než BORT. Obě látky byly obecně více cytotoxické pro buněčné linie hematologických nádorů než nádorů solidních nebo netransformovaných buněk. Nebyly pozorovány žádné rozdíly v rychlosti nástupu inhibice proteazomu (Demo a kol. 2007).

Kuhn a kol. (2007) popsal účinky KARF na vzorcích získaných od pacientů s mnohočetným myelomem. Po expozici KARF bylo pozorováno statisticky významné snížení životaschopných buněk v porovnání s jejich protějšky ovlivněných BORT, což ukazuje na celkový trend ke zvýšené citlivosti myelomové buněčné linie ke KARF (Kuhn a kol. 2007).

Tyto studie se opírají o fakt, že zatímco BORT je reverzibilní inhibitor proteazomu, KARF je ireverzibilní inhibitor (Kisselev a Goldberg 2001) a že tedy pomalejší rychlost obnovy aktivity proteazomu u KARF tak vede k větší toxicitě. Prokázána byla ale pouze mírně nižší rychlost obnovení aktivity proteazomu u KARF než u BORT (Demo a kol. 2007), přičemž tato obnova funkce proteazomu po inhibici KARF je důsledkem indukce transkripce mRNA a *de novo* syntézy (Mitsiades a kol. 2003).

Toxicita KARF je stále předmětem klinického hodnocení. Jsou obavy, že jeho ireverzibilní mechanismus účinku by mohl vést ke zvýšené toxicitě podobné té projevené u BORT – cytopenii, GIT obtížím, periferní neuropatii. Zároveň by díky jiné farmakodynamice a farmakokinetice mohlo dojít k nové a dosud necharakterizované toxicitě (Kuhn a kol. 2007).

V další fázi jsme se zaměřili na sledování účinků inhibice proteazomu na antiproliferační účinek ANT. Ke kombinačním experimentům byla využita metoda podle Chou a Tatalay, která pro hodnocení vzájemného ovlivnění účinků dvou látek využívá stanovení kombinačního indexu. Kombinační index (CI) je kvantitativní hodnota určující stupeň interakce dvou a více látek v kombinaci. Pokud je tato hodnota rovna 1, výsledný efekt je aditivní. Pokud je hodnota menší než 1, výsledný efekt je synergistický. Pokud je hodnota větší než 1, výsledný efekt je antagonistický (Chou 2010). Pro tato stanovení byly opět použity cytotoxicitní experimenty vyhodnocené MTT testem po 72 hodinách inkubace s kombinacemi BORT nebo KARF s DAU v koncentracích odpovídajících podílům a násobkům dříve zjištěných hodnot IC_{50} pro jednotlivé sledované látky.

Tyto testy prokázaly obecný trend postupné změny interakce inhibitorů proteazomu a DAU v závislosti na rostoucí koncentraci obou látek. Zatímco velmi nízké koncentrace IC_{50} látek se jevily spíše jako nevýhodné, vyšší koncentrace již vykazovaly aditivní či mírně synergický účinek. Hodnota kombinačního indexu byla u BORT i KARF menší než 1 (= synergický efekt) při dávkách větších než jejich IC_{50} . Synergie byla zjištěna v dávkách, které usmrtily více jak 65 % buněk u BORT a 75 % u KARF. Naše výsledky tak potvrzují výsledky některých dalších studií (Ma a kol. 2003, Mitsiades a kol. 2003, An a kol. 2004).

Inhibitory proteazomu umocňují protinádorovou účinnost antracyklinů *in vitro* i *in vivo* (Orlowski a kol. 2005). Ve studii Ma a kol. (2003) byly buňky mnohočetného myelomu hodnoceny za použití samotného DOX o různých koncentracích, a poté za přidání netoxických dávek BORT (o koncentraci 5 ng/ml). Inkubace s látkami trvala 48 hodin a experiment byl následně vyhodnocen MTT testem. Buňky s BORT vykazovaly až 100 000krát zvýšenou citlivost na DOX (Ma a kol. 2003). Mitsiades a kol. (2003) ve studii zkoumající vliv BORT na buňkách mnohočetného myelomu zjistili, že po 24 hodinách inkubace buněk s testovanými látkami BORT snížil apoptotický práh pro ANT a dokonce zvrátil rezistenci. IC_{50} pro DOX byla 150 nM za nepřítomnosti a 26 nM v přítomnosti BORT podávaného v koncentraci 2 nM (Mitsiades a kol. 2003). V klinické studii Orlowski a kol. (2005) byla podávána pacientům s pokročilými hematologickými malignitami kombinace látek BORT (v dávce 1,50 mg/m²) a pegylovaný lipozomální doxorubicin (v dávce 30 mg/m²). Přestože autoři sami upozorňují na nutnost opatrné interpretace výsledků

vzhledem k malému vzorku pacientů, výsledky naznačují možnost, že BORT může zvýšit citlivost na ANT a překonat antracyklinovou rezistenci i u pacientů (Orlowski a kol. 2005).

Již dříve bylo zjištěno, že výsledky lékových interakcí mezi inhibitory proteazomu a ANT jsou závislé na časovém schématu dávkování. Vzájemné synergistické působení bylo obecně pozorováno, když byly buňky ovlivňovány inhibitory proteazomu před ANT. Například ve studii An a kol. (2004) na buněčných liniích BCBL-1, BCP-1 a KS-1, mělo předběžné ovlivnění BORT 24 hodin před expozicí DOX za následek synergické působení s hodnotami kombinačního indexu menšími než 1 u většiny testovaných koncentrací. Naproti tomu při ovlivňování buněk ANT před přidáním inhibitorů nebo jejich souběžném podání bylo pozorováno pouze aditivní nebo antagonistické působení. Při testování jiných poměrů koncentrací BORT a DOX celkové výsledky analýzy zůstaly stejné (An a kol. 2004). Minderman a kol. (2007) ve své studii zkoumali mechanismus účinku. Buňky HL-60 byly vystaveny BORT o netoxické koncentraci (3 nM) nebo jeho přibližné koncentraci IC_{50} (10 nM). Po 24 hodinách byl přidán DAU o různých koncentracích a buňky byly inkubovány čtyři dny. BORT však citlivost buněk k DAU za těchto podmínek nezvýšil. Antagonismus pozorovaný u BORT při koncentracích nižších než jeho IC_{50} byl vysvětlován jeho inhibičním účinkem na NF- κ B, přičemž antiproliferační aktivita ANT se zdá být na NF- κ B závislá. Aditivní nebo synergické interakce pozorované při vyšších koncentracích byly nezávislé na změnách v buněčném cyklu, jelikož BORT v těchto koncentracích pouze indukoval jeho kompletní zástavu (Minderman a kol. 2007). Orlowski a kol. (2005) popisuje vzájemné působení látek v kombinaci tak, že ANT indukují antiapoptotické dráhy řízené NF- κ B, které jsou blokovány inhibitory proteazomu. Naopak ANT potlačují indukci antiapoptické funkce fosfatázy mitogenem aktivované kinázy zprostředkovanou inhibitory proteazomu (Orlowski a kol. 2005). Studie Ogiso a kol. (2000) provedená na buňkách kolorektálního karcinomu ukazuje, že rezistence vůči inhibitorům topoizomerázy II (jako jsou ANT), může být překonána inhibitory proteazomu před podáním chemoterapeutik a že tato senzibilizace na chemoterapii může být zprostředkována modulací hladiny proteinu topoizomerázy II (Ogiso a kol. 2000).

Kardiovaskulární bezpečnost kombinace ANT s inhibitory proteazomu také ještě není dostatečně prozkoumána a zprávy o vlivu inhibitorů proteazomu na srdeční funkce jsou nejednoznačné.

Ačkoli velké klinické studie s BORT nenaznačují nadměrné srdeční poškození (Laubach a kol. 2013), některé *in vitro* a *in vivo* studie naznačují opak (Nowis a kol. 2010, Herrmann a kol. 2013). Laubach a kol. (2013) v retrospektivní analýze dat z II. a III. fáze klinických studií užívání BORT u pacientů s mnohočetným myelomem uvádí, že BORT byl spojen pouze s nízkou mírou výskytu srdečního selhání, jak u nově diagnostikovaných (2 %), tak relapsujících (1,9 %) pacientů. V porovnání s pacienty neléčenými pomocí BORT byl výskyt srdečního selhání jen nepatrně vyšší (Laubach a kol. 2013).

Ve studii Herrmanna a kol. (2013) byla tříměsíčním prasnicím podávána dvakrát týdně subkutánní injekce inhibitoru proteazomu MLN-273 (což je peptidový boronát, podobně jako BORT). Výsledky ukázaly, že inhibice proteazomu u těchto zvířat může vést k vaskulopatii a kardiomyopatii, projevující se hypertrofií levé komory, diastolickou dysfunkcí a snížením ejekční frakce (Herrmann a kol. 2013). Nowis a kol. (2010) ve studii zaměřené na srdeční funkce u potkanů naznačuje, že opakované podávání vyšších dávek BORT vede ke kontraktální dysfunkci levé komory, projevující se výrazným poklesem ejekční frakce. Zároveň v této studii BORT potencoval kardiotoxické účinky DOX (Nowis a kol. 2010). Tento závěr byl následně potvrzen i několika kazuistikami pacientů (Orciuolo a kol. 2007, Hacıhanefioglu a kol. 2008).

Ale bylo i zjištěno, že inhibitory proteazomu působí na srdeční tkáň pozitivně - potlačují hypertrofii (Meiners a kol. 2008), snižují remodelaci srdce a předchází poškození kardiomyocytů vyvolané hypertermickým nebo oxidačním stresem (Lüss a kol. 2002). Meiners a kol. (2008) prokázali, že inhibice proteazomu nízkými dávkami BORT potlačuje hypertrofický růst NVCM buněk *in vitro*, ale také snižuje srdeční hypertrofii *in vivo* u hypertenzních potkanů. Hypertrofii podle nich způsobuje NF- κ B. Jeho aktivace, což je proces zahrnující proteazomovou degradaci inhibitoru κ B, vede ke zvýšené genové expresi a hypertrofickému růstu kardiomyocytů. Proto předpokládají, že inhibice funkce proteazomu by mohla poskytnout ochranu v rozvoji hypertrofie nebo selhání srdce (Meiners a kol. 2008). Lüss a kol. (2002) ve své studii navrhl možný mechanismus kardioprotektivního účinku. Inhibitor

proteazomu může aktivovat signální dráhu mitogenem aktivovaných kináz, jejichž aktivace umožní fosforylaci dalších substrátů, které zprostředkují kardioprotektivní účinek. Zároveň při inhibici funkce proteazomu se v buňce hromadí některé regulační a poškozené proteiny, a to jsou indukční signály pro chaperony (HSP72, HSP60 a HSP32), které pomáhají skládat většinu bílkovin do jejich správného prostorového uspořádání (Lüss a kol. 2002).

V této práci jsme využili pro hodnocení vlivu inhibitorů proteazomu na ANT kardiotoxicitu již dříve zavedený model primárních potkaních kardiomyocytů. Časové schéma podání a dávka DAU byla optimalizována již dříve pomocí studia protekce pomocí dexrazoxanu, který je jediným schváleným kardioprotektivem proti ANT kardiotoxicitě. Toxicita hodnocených látek byla stanovena jako změna aktivity LDH po 48 hodinách inkubace. Nejdříve byla hodnocena maximální toxicita inhibitorů proteazomu. Kultura NVCM byla vystavena relativně širokému rozmezí koncentrací BORT a KARF (1 nM – 10 μ M) kontinuálně po dobu 48 hodin.

V případě BORT vyvolaly koncentrace, kterým je myokard vystaven v relativně dlouhé eliminační fázi léčiva (1–5 nM), poměrně nízkou toxicitu u NVCM. Významnější toxicita byla zjištěna při koncentracích nad 10 nM. Maximální koncentrace BORT po *i.v.* podání dosahují asi 250 nM (až o řád nižší jsou po *s.c.* podání při srovnatelném AUC a protinádorové aktivitě), nicméně těmito koncentracím jsou kardiomyocyty vystaveny pouze několik málo minut, což u reverzibilního inhibitoru nemusí hrát tak významnou roli.

Velmi zajímavé bylo zjištění, že ireverzibilní inhibitor KARF vykazoval ve stejném uspořádání nižší toxicitu. Signifikantní zvýšení aktivity LDH uvolněné do kultivačního média způsobila až koncentrace stokrát vyšší než u BORT. Je možné, že tento rozdíl by mohl být způsoben vyšší selektivitou KARF. Není také vyloučeno, že roli v takto dramatickém rozdílu toxicit hraje i rozdíl v expresi specifických izoform součástí proteazomu v neonatálních kardiomyocytech.

Kardiotoxicitní pokusy byly dále doplněny o hodnocení buněčné morfologie pomocí fluorescenční mikroskopie. Snímky byly pořízeny po 48 hodinách inkubace buněk NVCM s BORT nebo KARF o koncentracích stejných jako při hodnocení cytotoxicity. Na snímcích je jasně viditelné nejen zvýšení počtu pozdně

apoptotických nebo nekrotických buněk obarvených propidium jodidem, ale také značná změna morfologie v koncentracích, které ještě zvýšenou toxicitu nevyvolaly.

U kontrolních vzorků je patrný velký počet živých buněk obarvených pouze sondou Hoechst 33342, která se jeví jako modrá fluorescence. Na fotografiích buněk, které byly vystaveny vlivu látek, je s rostoucí koncentrací BORT i KARF jednoznačně patrný úbytek živých buněk a naopak přibývající počet nekrotických buněk obarvených propidium jodidem, který se projevuje červenou fluorescencí. Dále lze pozorovat větší rozvolněnost a protaženější tvar buněk. Nowis a kol. (2010), ve studii zabývající se morfologií srdeční tkáně u BORT léčených potkanů, pozorovali rozptýlené hypertrofické oblasti, zvětšené kardiomyocyty s invaginací kapilár a vakuolizaci kardiomyocytů (Nowis a kol. 2010).

Vedle celkové buněčné morfologie byla vyhodnocena i spontánní kontraktilní aktivita buněk. U kardiomyocytů ovlivněných BORT byla stažlivost pozorována pouze při koncentracích nižších než 1 nM, u KARF byly kontrakce pozorovány až do koncentrace 100 nM (včetně).

Po zjištění toxicity samotných inhibitorů proteazomu jsme tyto látky použili i pro sledování ovlivnění toxicity DAU na našem modelu ANT kardiotoxicity *in vitro*. Kombinační testy byly provedeny ve dvou různých intervalech, při kterých byla zjišťována závislost toxicity na schématu vzájemného podání. BORT i KARF byly podány v koncentracích odpovídajících jejich IC_{50} zjištěných v předchozích antiproliferačních experimentech, které se na NVCM ukázaly jako relativně netoxické a v zásadě odpovídají plazmatickým koncentracím po podání BORT a KARF. V experimentech, kde byla kultura NVCM nejprve vystavena působení BORT nebo KARF po dobu 3 hodin a následně byl přidán 1,2 μ M DAU na další 3 hodiny, nebylo pozorováno signifikantní zvýšení toxicity. Velmi mírné, avšak signifikantní ($p \leq 0,05$) zvýšení toxicity však bylo pozorováno ve druhém schématu, kdy byly BORT nebo KARF podány do kultivačního média současně s DAU. Tento rozdíl zatím neumíme vysvětlit a v tomto ohledu budou potřeba další doplňující údaje, např. o inhibici UPS v buňkách a také zhodnocení jiných schémat inkubace vycházejících více z farmakokinetiky studovaných látek.

Toxicita inhibitorů proteazomu byla v rámci grantového projektu IGA NT/13457-4-2012 a výzkumného centra UNCE 204019/304019/2012 hodnocena také na *in vivo*

modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka kolegy z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Podávání samotných inhibitorů proteazomu nevedlo k předčasným úhynům či významnému poklesu tělesné hmotnosti. Při kombinaci těchto léčiv s DAU nebyla pozorována významně zvýšená mortalita oproti samotné DAU skupině. Avšak obě kombinační skupiny vykazovaly výrazně nižší hmotnostní přírůstek, což by mohlo být první známkou zvýšené toxicity kombinací inhibitorů proteazomu a DAU.

V současné době nejsou k dispozici žádné údaje porovnávací rozsah a dobu trvání inhibice proteazomu v kardiomyocytech s použitím BORT proti KARF. Konkrétní vliv inhibice proteazomu na srdeční strukturu a funkci může záviset na dávce, rozsahu, délce trvání a načasování vzhledem k dalším srdečním stresorům (Grandin a kol. 2015) a je proto nutné, aby tato kombinace byla dále hodnocena za použití co nejvíce klinicky relevantních modelů.

Závěrem by tedy bylo možno říci, že nejednoznačné výsledky vzájemných interakcí v našich *in vitro* testech nevyklučují léčebný přínos kombinace léků *in vivo*. Vliv dalších podmínek vyskytujících se *in vivo* se při *in vitro* testování neměří. Důležité také je, že plazmatické koncentrace inhibitorů proteazomu i ANT v terapeutických dávkách jsou spíše vyšší než koncentrace IC_{50} pozorované v našich experimentech, a dá se tedy předpokládat, že v praxi bude převažovat účinek synergický. Díky aditivě nebo synergismu inhibitorů proteazomu by se mohly snížit terapeutické dávky ANT, čímž by se snížila i jejich toxicita. Z našich experimentů hodnotících vliv kombinace ANT s inhibitory proteazomu v *in vitro* podmínkách na neonatálních kardiomyocytech i *in vivo* na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka se výrazně negativní ovlivnění antracyklinové toxicity neprojevovalo, ale jisté náznaky zhoršení toxicity pozorovány byly. Doposud provedené studie nebyly designovány pro studium kardiovaskulární bezpečnosti těchto léčiv, takže opravdový rozměr tohoto problému zůstává neznámý. Existuje také minimum experimentálních prací, které by umožnily lépe pochopit tyto děje a proto je další výzkum v této oblasti nutný.

7 Závěry

- U všech testovaných látek (BORT, KARF, DOX, DAU) bylo pozorováno dávkově závislé a statisticky významné snížení proliferace buněčné linie HL-60 vůči kontrolní skupině. ANT projevily slabší antiproliferační účinek v porovnání s inhibitory proteazomu.
- Hodnocení účinků kombinace inhibitorů proteazomu a ANT podle Chou-Talalay ukázalo postupnou změnu interakcí v závislosti na rostoucí lékové hladině. Nízké koncentrace vykazovaly účinky antagonistické, při vyšších koncentracích byly účinky aditivní až mírně synergické.
- Inhibitory proteazomu vykazovaly *in vitro* poměrně nízkou toxicitu vůči kardiomyocytům. Mezi BORT a KARF nebyly pozorovány zásadní rozdíly.
- Při kombinaci inhibitorů proteazomu s DAU nedocházelo k významnému zhoršení kardiovaskulární toxicity ANT.
- Výsledky experimentů s preinkubací buněk s inhibitory proteazomu byly velmi podobné uspořádání koinkubace. V obou pokusech nedocházelo k významnému zvýšení toxicity samotného DAU. BORT i KARF vykazovaly podobné trendy.

8 Seznam zkratek

| | |
|----------------|--|
| ANT | antracyklinová antibiotika |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BORT | bortezomib |
| DAU | daunorubicin |
| DOX | doxorubicin |
| FDA | Food and drug administration |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonová kyselina |
| HSP | heat shock protein |
| KARF | karfilzomib |
| LDH | laktátdehydrogenáza |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid |
| NF- κ B | nukleární faktor kappa B |
| NVCM | neonatální ventrikulární kardiomyocyty |
| UPS | ubikvitin–proteazomový systém |

9 Literatura

Adam Z., Maisnar V. (2008). "Mnohočetný myelom, jak včas rozpoznat tuto nemoc a jak s ní žít. Informace pro nemocné a jejich blízké." Brno, Masarykova univerzita.

Adams J. (2002). "Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer." *Curr Opin Chem Biol* 6(4): 493-500.

Adams J. (2004). "The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs." *Cancer Cell* 5(5): 417-421.

Adams J. (2004). "The proteasome: a suitable antineoplastic target." *Nat Rev Cancer* 4(5): 349-360.

Adams V. R., Leggas M. (2007). "Sunitinib malate for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors." *Clin Ther* 29(7): 1338-1353.

Adib R., Patel K., Abdelghany S. (2012). "Carfilzomib: A second-generation proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma." *Formulary* 47(8): 282.

Almond J. B., Cohen G. M. (2002). "The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy." *Leukemia* 16(4): 433-443.

An J., Sun Y., Fisher M., Rettig M. B. (2004). "Antitumor effects of bortezomib (PS-341) on primary effusion lymphomas." *Leukemia* 18(10): 1699-1704.

Ao L., Wu Y., Kim D., Jang E. R., Kim K., Lee D. M., Kim K. B., Lee W. (2012). "Development of peptide-based reversing agents for p-glycoprotein-mediated resistance to carfilzomib." *Mol Pharm* 9(8): 2197-2205.

Apetoh L., Mignot G., Panaretaki S T., Kroemer G., Zitvogel L. (2008). "Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine." *Trends in Molecular Medicine* 14(4): 141-151.

Balducci L., Extermann M. (2000). "Management of cancer in the older person: a practical approach." *Oncologist* 5(3): 224-237.

Birnie G. D. (1988). "The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation." *Br J Cancer Suppl* 9: 41-45.

Brooks P., Fuertes G., Murray R. Z., Bose S., Knecht E., Rechsteiner M. C., Hendil K. B., Tanaka K., Dyson J., Rivett J. (2000). "Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells." *Biochem J* 346 Pt 1: 155-161.

Callus B. A., Mathey-Prevot B. (1998). "Interleukin-3-induced activation of the JAK/STAT pathway is prolonged by proteasome inhibitors." *Blood* 91(9): 3182-3192.

Ciapetti G., Cenni E., Pratelli L., Pizzoferrato A. (1993). "In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay." *Biomaterials* 14(5): 359-364.

- CMG. (2015). "Myeloma." Přístup 8 Dec, 2015. <http://www.myeloma.cz/>.
- Collins S. J. (1987). "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." *Blood* 70(5): 1233-1244.
- Collins S. J., Gallo R. C., Gallagher R. E. (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." *Nature* 270(5635): 347-349.
- Cortes-Funes H., Coronado C. (2007). "Role of anthracyclines in the era of targeted therapy." *Cardiovasc Toxicol* 7(2): 56-60.
- Davies K. J. A. (2001). "Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome." *Biochimie* 83(3-4): 301-310.
- Decker T., Lohmann-Matthes M. L. (1988). "A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity." *J Immunol Methods* 115(1): 61-69.
- Demo S., Kirk C., Aujay M., Buchholz T., Dajee M., Ho M., Jiang J., Laidig G., Lewis E., Parlati F., Shenk K., Smyth M., Sun C., Vallone M., Woo T., Molineaux C., Bennett M. (2007). "Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome." *Cancer Research* 67(13): 6383-6391.
- Fally B. N., Schlieman M. G., Virudachalam S., Bold R. J. (2003). "Schedule-dependent molecular effects of the proteasome inhibitor bortezomib and gemcitabine in pancreatic cancer." *Journal of Surgical Research* 113(1): 88-95.
- Fekete M. R., McBride W. H., Pajonk F. (2005). "Anthracyclines, proteasome activity and multi-drug-resistance." *Bmc Cancer* 5.
- Fernandez H. F. (2015). "Beyond the first glance: anthracyclines in AML." *Blood* 125(25): 3828-+.
- Ferrington D. A., Gregerson D. S. (2012). "Immunoproteasomes: Structure, Function, and Antigen Presentation." *The Proteasomal System in Aging and Disease* 109: 75-112.
- Glickman M., Rubin D., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V., Finley D. (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." *Cell* 94(5): 615-623.
- Glickman M. H., Ciechanover A. (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction." *Physiological Reviews* 82(2): 373-428.
- Grandin E. W., Ky B., Cornell R. F., Carver J., Lenihan D. J. (2015). "Patterns of cardiac toxicity associated with irreversible proteasome inhibition in the treatment of multiple myeloma." *J Card Fail* 21(2): 138-144.

Groll M., Huber R. (2004). "Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach." *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 33-44.

Hacihanefioglu A., Tarkun P., Gonullu E. (2008). "Acute severe cardiac failure in a myeloma patient due to proteasome inhibitor bortezomib." *Int J Hematol* 88(2): 219-222.

Hájek R., Krejčí M., Pour L., Adam Z. (2011). "Multiple myeloma." *Klin Onkol* 24 Suppl: S10-13.

Hamilton A. L., Eder J. P., Pavlick A. C., Clark J. W., Liebes L., Garcia-Carbonero R., Chachoua A., Ryan D. P., Soma V., Farrell K., Kinchla N., Boyden J., Yee H., Zeleniuch-Jacquotte A., Wright J., Elliott P., Adams J., Muggia F. M. (2005). "Proteasome inhibition with bortezomib (PS-341): a phase I study with pharmacodynamic end points using a day 1 and day 4 schedule in a 14-day cycle." *J Clin Oncol* 23(25): 6107-6116.

Hande K. R. (1998). "Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II." *Biochim Biophys Acta* 1400(1-3): 173-184.

Herrmann J., Wohler C., Saguner A. M., Flores A., Nesbitt L. L., Chade A., Lerman L. O., Lerman A. (2013). "Primary proteasome inhibition results in cardiac dysfunction." *Eur J Heart Fail* 15(6): 614-623.

Hideshima T., Richardson P., Chauhan D., Palombella V. J., Elliott P. J., Adams J., Anderson K. C. (2001). "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells." *Cancer Res* 61(7): 3071-3076.

Highsmith K. N., Chen S. E., Horowitz S. (2014). "Carfilzomib and Pomalidomide: Recent Advances in the Treatment of Multiple Myeloma." *Pharmacotherapy* 34(9): 927-940.

Chauhan D., Catley L., Li G., Podar K., Hideshima T., Velankar M., Mitsiades C., Mitsiades N., Yasui H., Letai A., Ova H., Berkers C., Nicholson B., Chao T. H., Neuteboom S. T., Richardson P., Palladino M. A., Anderson K. C. (2005). "A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib." *Cancer Cell* 8(5): 407-419.

Chou T. C. (2006). "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies." *Pharmacological Reviews* 58(3): 621-681.

Chou T. C. (2010). "Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method." *Cancer Res* 70(2): 440-446.

Jirkovska-Vavrova A., Roh J., Lencova-Popelova O., Jirkovsky E., Hruskova K., Potuckova-Mackova E., Jansova H., Haskova P., Martinkova P., Eisner T., Kratochvil M., Sus J., Machacek M., Vostatkova-Tichotova L., Gersl V., Kalinowski D. S., Muller M. T., Richardson D. R., Vavrova K., Sterba M., Simunek T. (2015). "Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring

hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo." *Toxicology Research* 4(4): 1098-1114.

Kisselev A. F., Goldberg A. L. (2001). "Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates." *Chem Biol* 8(8): 739-758.

Korzeniewski C., Callewaert D. M. (1983). "An enzyme-release assay for natural cytotoxicity." *J Immunol Methods* 64(3): 313-320.

Kozuch P. S., Rocha-Lima C. M., Dragovich T., Hochster H., O'Neil B. H., Atiq O. T., Pipas J. M., Ryan D. P., Lenz H. J. (2008). "Bortezomib with or without irinotecan in relapsed or refractory colorectal cancer: Results from a randomized phase II study." *Journal of Clinical Oncology* 26(14): 2320-2326.

Kuhn D. J., Chen Q., Voorhees P. M., Strader J. S., Shenk K. D., Sun C. M., Derno S. D., Bennett M. K., Van Leeuwen F. W. B., Chanan-Khan A. A., Orlowski R. Z. (2007). "Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma." *Blood* 110(9): 3281-3290.

Kumatori A., Tanaka K., Inamura N., Sone S., Ogura T., Matsumoto T., Tachikawa T., Shin S., Ichihara A. (1990). "Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7071-7075.

Kupperman E., Lee E. C., Cao Y., Bannerman B., Fitzgerald M., Berger A., Yu J., Yang Y., Hales P., Bruzzese F., Liu J., Blank J., Garcia K., Tsu C., Dick L., Fleming P., Yu L., Manfredi M., Rolfe M., Bolen J. (2010). "Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer." *Cancer Res* 70(5): 1970-1980.

Laubach J., San Miguel J., Sonneveld P., Orlowski R. (2013). Quantifying the risk of heart failure associated with proteasome inhibition. A retrospective analysis of heart failure reported in phase 2 and 3 studies of Bortezomib in Multiple myeloma, *Blood Journal*. **122**: 3187.

Lenz H. J. (2003). "Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors." *Cancer Treatment Reviews* 29: 41-48.

Limat S., Daguindau E., Cahn J. Y., Nerich V., Brion A., Perrin S., Woronoff-Lemsi M. C., Deconinck E. (2014). "Incidence and risk-factors of CHOP/R-CHOP-related cardiotoxicity in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma." *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 39(2): 168-174.

Lincová D., Farghali H. (2007). "Základní a aplikovaná farmakologie." Praha, Galén.

Lüss H., Schmitz W., Neumann J. (2002). "A proteasome inhibitor confers cardioprotection." *Cardiovasc Res* 54(1): 140-151.

Lyu Y. L., Kerrigan J. E., Lin C. P., Azarova A. M., Tsai Y. C., Ban Y., Liu L. F. (2007). "Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in

doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane." *Cancer Res* 67(18): 8839-8846.

Ma M. H., Yang H. H., Parker K., Manyak S., Friedman J. M., Altamirano C., Wu Z. Q., Borad M. J., Frantzen M., Roussos E., Neeser J., Mikail A., Adams J., Sjak-Shie N., Vescio R. A., Berenson J. R. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents." *Clin Cancer Res* 9(3): 1136-1144.

Mearini G., Schlossarek S., Willis M. S., Carrier L. (2008). "The ubiquitin-proteasome system in cardiac dysfunction." *Biochim Biophys Acta* 1782(12): 749-763.

Meiners S., Dreger H., Fechner M., Bieler S., Rother W., Günther C., Baumann G., Stangl V., Stangl K. (2008). "Suppression of cardiomyocyte hypertrophy by inhibition of the ubiquitin-proteasome system." *Hypertension* 51(2): 302-308.

Minderman H., Zhou Y., O'Loughlin K. L., Baer M. R. (2007). "Bortezomib activity and in vitro interactions with anthracyclines and cytarabine in acute myeloid leukemia cells are independent of multidrug resistance mechanisms and p53 status." *Cancer Chemother Pharmacol* 60(2): 245-255.

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004). "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." *Pharmacol Rev* 56(2): 185-229.

Mirabella A. C., Pletnev A. A., Downey S. L., Florea B. I., Shabaneh T. B., Britton M., Verdoes M., Filippov D. V., Overkleeft H. S., Kisselev A. F. (2011). "Specific Cell-Permeable Inhibitor of Proteasome Trypsin-like Sites Selectively Sensitizes Myeloma Cells to Bortezomib and Carfilzomib." *Chemistry & Biology* 18(5): 608-618.

Mitsiades N., Mitsiades C. S., Richardson P. G., Poulaki V., Tai Y. T., Chauhan D., Fanourakis G., Gu X., Bailey C., Joseph M., Libermann T. A., Schlossman R., Munshi N. C., Hideshima T., Anderson K. C. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications." *Blood* 101(6): 2377-2380.

Moreau P. (2014). "The emerging role of carfilzomib combination therapy in the management of multiple myeloma." *Expert Review of Hematology* 7(2): 265-290.

Nowis D., Maczewski M., Mackiewicz U., Kujawa M., Ratajska A., Wieckowski M. R., Wilczynski G. M., Malinowska M., Bil J., Salwa P., Bugajski M., Wojcik C., Sinski M., Abramczyk P., Winiarska M., Dabrowska-Iwanicka A., Duszynski J., Jakobisiak M., Golab J. (2010). "Cardiotoxicity of the anticancer therapeutic agent bortezomib." *Am J Pathol* 176(6): 2658-2668.

Oeffinger K. C., Mertens A. C., Sklar C. A., Kawashima T., Hudson M. M., Meadows A. T., Friedman D. L., Marina N., Hobbie W., Kadan-Lottick N. S., Schwartz C. L., Leisenring W., Robison L. L., Childhood Cancer Survivor S. (2006).

"Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer." *N Engl J Med* 355(15): 1572-1582.

Ogiso Y., Tomida A., Lei S., Omura S., Tsuruo T. (2000). "Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs." *Cancer Res* 60(9): 2429-2434.

Orciuolo E., Buda G., Ceconi N., Galimberti S., Versari D., Cervetti G. (2007). "Unexpected cardiotoxicity in haematological bortezomib treated patients." *Br J Haematol* 138(3): 396-397.

Orlowski R. Z., Voorhees P. M., Garcia R. A., Hall M. D., Kudrik F. J., Allred T., Johri A. R., Jones P. E., Ivanova A., Van Deventer H. W., Gabriel D. A., Shea T. C., Mitchell B. S., Adams J., Esseltine D. L., Trehu E. G., Green M., Lehman M. J., Natoli S., Collins J. M., Lindley C. M., Dees E. C. (2005). "Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies." *Blood* 105(8): 3058-3065.

Papadopoulos K. P., Burris H. A., Gordon M., Lee P., Sausville E. A., Rosen P. J., Patnaik A., Cutler R. E., Wang Z. P., Lee S., Jones S. F., Infante J. R. (2013). "A phase I/II study of carfilzomib 2-10-min infusion in patients with advanced solid tumors." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 72(4): 861-868.

Pitzer F., Dantes A., Fuchs T., Baumeister W., Amsterdam A. (1996). "Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death." *FEBS Lett* 394(1): 47-50.

Piva R., Ruggeri B., Williams M., Costa G., Tamagno I., Ferrero D., Gai V., Coscia M., Peola S., Massaia M., Pezzoni G., Allievi C., Pescalli N., Cassin M., di Giovine S., Nicoli P., de Feudis P., Streponi I., Roato I., Ferracini R., Bussolati B., Camussi G., Jones-Bolin S., Hunter K., Zhao H., Neri A., Palumbo A., Berkers C., Ova H., Bernareggi A., Inghirami G. (2008). "CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib." *Blood* 111(5): 2765-2775.

Powell S. R., Herrmann J., Lerman A., Patterson C., Wang X. (2012). "The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease." *Prog Mol Biol Transl Sci* 109: 295-346.

PubChem. (2015)a. "Bortezomib." Přístup 2 Dec, 2015.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/93860>.

PubChem. (2015)b. "Daunorubicin." Přístup 23 Nov, 2015.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11556711>.

PubChem. (2015)c. "Doxorubicin." Přístup 23 Nov, 2015.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/30323>.

PubChem. (2015)d. "Karfilzomib." Přístup 2 Dec, 2015.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31703>.

- Rayson D., Richel D., Chia S., Jackisch C., van der Vegt S., Suter T. (2008). "Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies." *Ann Oncol* 19(9): 1530-1539.
- Read M. A., Neish A. S., Luscinskas F. W., Palombella V. J., Maniatis T., Collins T. (1995). "The Proteasome Pathway Is Required for Cytokine-Induced Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule Expression." *Immunity* 2(5): 493-506.
- Reits E., Benham A., Plougastel B., Neeffjes J., Trowsdale J. (1997). "Dynamics of proteasome distribution in living cells." *Embo Journal* 16(20): 6087-6094.
- Screen M., Britton M., Downey S. L., Verdoes M., Voges M. J., Blom A. E., Geurink P. P., Risseuw M. D., Florea B. I., van der Linden W. A., Pletnev A. A., Overkleeft H. S., Kisselev A. F. (2010). "Nature of pharmacophore influences active site specificity of proteasome inhibitors." *J Biol Chem* 285(51): 40125-40134.
- Shah J. J., Baladandayuthapani V., Weber D. M., Thomas S. K., Alexanian R., Wang M., Qazilbash M. H., Champlin R. E., Shah N., Bashir Q., Popat U. R., Nieto Y., Ahmed S., Parmar S., Orlowski R. Z. (2013). "Phase II Study Of The Combination Of MLN 9708 With Lenalidomide As Maintenance Therapy Post Autologous Stem Cell Transplant In Patients With Multiple Myeloma." *Blood* 122(21).
- Shinohara K., Tomioka M., Nakano H., Tone S., Ito H., Kawashima S. (1996). "Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition." *Biochemical Journal* 317: 385-388.
- Schenkein D. (2002). "Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies." *Clin Lymphoma* 3(1): 49-55.
- Simunek T., Sterba M., Popelova O., Adamcova M., Hrdina R., Gersl V. (2009). "Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron." *Pharmacol Rep* 61(1): 154-171.
- Stewart A. K., Rajkumar S. V., Dimopoulos M. A., Masszi T., Spicka I., Oriol A., Hajek R., Rosinol L., Siegel D. S., Mihaylov G. G., Goranova-Marinova V., Rajnics P., Suvorov A., Niesvizky R., Jakubowiak A. J., San-Miguel J. F., Ludwig H., Wang M., Maisnar V., Minarik J., Bensinger W. I., Mateos M. V., Ben-Yehuda D., Kukreti V., Zojwalla N., Tonda M. E., Yang X. Q., Xing B., Moreau P., Palumbo A., Investigators A. (2015). "Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma." *New England Journal of Medicine* 372(2): 142-152.
- Sunwoo J. B., Chen Z., Dong G., Yeh N., Crowl Bancroft C., Sausville E., Adams J., Elliott P., Van Waes C. (2001). "Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 7(5): 1419-1428.
- Tan C., Waldmann T. A. (2002). "Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia." *Cancer Res* 62: 1083-1086.

- Teicher B. A., Ara G., Herbst R., Palombella V. J., and Adams J. (1999). "The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy." *Clin. Cancer Res* 5: 2638–2645.
- Voges D., Zwickl P., Baumeister W. (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." *Annu Rev Biochem* 68: 1015-1068.
- Von Hoff D. D., Layard M. W., Basa P., Davis H. L., Von Hoff A. L., Rozenzweig M., Muggia F. M. (1979). "Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure." *Ann Intern Med* 91(5): 710-717.
- Von Metzler I., Heider U., Mieth M., Lamottke B., Kaiser M., Jakob C., Sezer O. (2009). "Synergistic interaction of proteasome and topoisomerase II inhibition in multiple myeloma." *Exp Cell Res* 315(14): 2471-2478.
- Wójcik C., DeMartino G. N. (2003). "Intracellular localization of proteasomes." *Int J Biochem Cell Biol* 35(5): 579-589.
- Wouters K. A., Kremer L. C., Miller T. L., Herman E. H., Lipshultz S. E. (2005). "Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies." *Br J Haematol* 131(5): 561-578.
- Yeh E. T., Tong A. T., Lenihan D. J., Yusuf S. W., Swafford J., Champion C., Durand J. B., Gibbs H., Zafarmand A. A., Ewer M. S. (2004). "Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management." *Circulation* 109(25): 3122-3131.
- Young G. W., Wang Y., Ping P. (2008). "Understanding proteasome assembly and regulation: importance to cardiovascular medicine." *Trends Cardiovasc Med* 18(3): 93-98.
- Yu X., Patterson E., Kem D. C. (2009). "Targeting proteasomes for cardioprotection." *Curr Opin Pharmacol* 9(2): 167-172.
- Zangari M., Aujay M., Zhan F. (2011). "Alkaline phosphatase variation during carfilzomib treatment is associated with best response in multiple myeloma patients." *Eur J Haematol* 86(6): 484-487.
- Zhou H. J., Aujay M. A., Bennett M. K., Dajee M., Demo S. D., Fang Y., Ho M. N., Jiang J., Kirk C. J., Laidig G. J., Lewis E. R., Lu Y., Muchamuel T., Parlati F., Ring E., Shenk K. D., Shields J., Shwonek P. J., Stanton T., Sun C. M., Sylvain C., Woo T. M., Yang J. (2009). "Design and synthesis of an orally bioavailable and selective peptide epoxyketone proteasome inhibitor (PR-047)." *J Med Chem* 52(9): 3028-3038.