



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας
Εργαστήριο Φαρμακολογίας

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΗΣ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΤΟΝ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΡΦΙΛΖΟΜΙΜΠΗ:
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΦΟΡΜΙΝΗΣ ΩΣ ΚΑΡΔΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Γεώργιος Κρεμαστιώτης

A.M. 160322

Φαρμακοποιός

ΑΘΗΝΑ 2018

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ανδρεάδου Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα)

Δρακούλης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Παπαπετρόπουλος Ανδρέας, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας για την απόκτηση του *Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης “Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων στην Κατεύθυνση Φαρμακολογία”*.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Αν. Καθηγήτριας Φαρμακολογίας κ. Ιωάννας Ανδρεάδου, την οποία και ευχαριστώ θερμά για την άριστη συνεργασία, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, και την καθοδήγηση που είχα συνολικά σε όλες τις εκφάνσεις της επιστημονικής έρευνας.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά τον Αν. Καθηγητή Αιματολογίας κ. Ευάγγελο Τέρπο για την ενεργή συμμετοχή στη διεξαγωγή της μελέτης και την πολύτιμη κλινική σκοπιά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Νικόλαο Δρακούλη, Επικ. Καθηγητή Φαρμακολογίας και κ. Ανδρέα Παπαπετρόπουλο, Καθηγητή Φαρμακολογίας για τα εποικοδομητικά σχόλια επί της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλη την επιστημονική ομάδα για την καθοριστική συμβολή τους στη μελέτη καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας και ιδιαίτερα τον Παναγιώτη Εφεντάκη για την εργαστηριακή εκπαίδευση και καθοδήγηση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	<u>Σελίδα</u>
Περίληψη	6
Abstract	7
Συνοπτομογραφίες	8
<u>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	9
<i>1.1 Πολλαπλό μυέλωμα</i>	9
<i>1.2 Σύστημα ουβικοιτίνης – πρωτεασώματος</i>	12
<i>1.2.1 Φαρμακολογικές παρεμβάσεις επί του συστήματος ουβικοιτίνης – πρωτεασώματος</i>	17
<i>1.3 Αναστολείς πρωτεασώματος στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος</i>	22
<i>1.3.1 Νεώτεροι αναστολείς σε κλινικές μελέτες φάσης I/II</i>	24
<i>1.4 Καρδιοτοξικότητα αναστολέων πρωτεασώματος</i>	26
<i>1.5 Προκλινικά δεδομένα για την επαγόμενη από C_{fz} καρδιοτοξικότητα</i>	27
<i>1.6 Σηματοδοτικό μονοπάτι Akt/eNOS και αναστολή πρωτεασώματος</i>	29
<i>1.7 Αυτοφαγία και αναστολή πρωτεασώματος</i>	30
<i>1.8 Μετφορμίνη</i>	32
<u>ΣΚΟΠΟΣ</u>	34
<u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	35
<i>2.1 Φαρμακολογικοί παράγοντες</i>	35
<i>2.2 Επιλογή δόσεων</i>	36
<i>2.3 Ζωικό πρότυπο μυών</i>	37
<i>2.3.1 Πρωτόκολλο 1 – Οξεία χορήγηση</i>	38
<i>2.3.2 Πρωτόκολλο 2 – Υποχρόνια χορήγηση</i>	39
<i>2.3.3 Πρωτόκολλο 3 – Διακοπτόμενη χορήγηση (οξεία και υποχρόνια)</i>	39
<i>2.3.4 Πρωτόκολλο 4 – Φαρμακολογική παρέμβαση</i>	39
<i>2.4 Υπερηχογραφική αξιολόγηση</i>	40
<i>2.5 Συλλογή ιστών</i>	40
<i>2.5.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος</i>	40

2.6 Μέτρηση ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών	41
2.7 Ιστολογία	41
2.8 Ανοσοαποτόπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)	42
2.9 Μέτρηση ενεργότητας της PP2A φωσφατάσης	51
2.10 Στατιστική ανάλυση	51
<u>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	54
3.1 Η προτεινόμενη δόση Cfz προκάλεσε ικανοποιητική αναστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας στην καρδιά και στα PBMCs των μυών	54
3.2.1 Η οξεία χορήγηση Cfz (Πρωτόκολλο 1) μείωσε το FS% χωρίς μείζονες ιστολογικές βλάβες	54
3.2.2 Η υποχρόνια χορήγηση Cfz (Πρωτόκολλο 2) οδήγησε σε διάταση της αριστερής κοιλίας	57
3.2.3 Η διακοπτόμενη χορήγηση Cfz (Πρωτόκολλο 3) δεν άσκησε καρδιακή δυσλειτουργία στους μύες	58
3.3.1 Το Cfz εμφάνισε οξεία καρδιοτοξικότητα μέσω αναστολής του άξονα PI3K/Akt/eNOS	61
3.3.2 Το Cfz εμφάνισε οξεία καρδιοτοξικότητα μέσω απενεργοποίησης της AMPKα κινάσης και αναστολής της αυτοφαγίας	63
3.4.1 Η Met ανέστειλε την οξεία καρδιακή δυσλειτουργία που επάγει το Cfz	65
3.4.2 Η Met δεν επηρέασε την ικανότητα του Cfz να αναστέλλει την πρωτεασωμική λειτουργία στην καρδιά και στα PBMCs των μυών	69
3.5.1 Η χορήγηση Cfz αύξησε την ενεργότητα της PP2A φωσφατάσης, ανεξάρτητα της χορήγησης Met	70
3.5.2 Η συγχορήγηση Met ενεργοποίησε την Akt	70
3.5.3 Η συγχορήγηση της Met δεν επηρέασε την ομοιόσταση του NO	71
3.5.4 Η συγχορήγηση Met οδήγησε σε φωσφορυλίωση της AMPKα και αποκατάσταση της αυτοφαγίας	72
<u>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	74
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	81

Περίληψη

Εισαγωγή: Η καρφιλζομίμη (Cfz) είναι ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας του πρωτεασώματος ο οποίος χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος και ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος και έχει συσχετιστεί με σημαντικά φαινόμενα καρδιοτοξικότητας. **Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι** i) η καθιέρωση ενός πρωτοκόλλου το οποίο θα αξιολογεί την καρδιακή δυσλειτουργία, ii) η μελέτη του μοριακού μηχανισμού καρδιοτοξικότητας και η αναγνώριση φαρμακολογικών στόχων, και iii) βάσει των αποτελεσμάτων του μηχανισμού καρδιοτοξικότητας, η διερεύνηση της πιθανής καρδιοπροστατευτικής δράσης της μετοφομίνης (Met).

Υλικά και Μέθοδοι: Μύες τυχαιοποιήθηκαν ως εξής: Πρωτόκολλο 1 (οξύ): Control (n=7), Cfz (n=8), για 6 ημέρες. Πρωτόκολλο 2 (υποχρόνιο): Control (n=5), Cfz (n=8), για 14 ημέρες. Πρωτόκολλο 3 (διακοπτόμενο, οξύ και υποχρόνιο): Control (n=6), Cfz (n=5), συνεχόμενες χορηγήσεις τις ημέρες 0, 1, 7 και 8, για 13 ημέρες. Πρωτόκολλο 4 (φαρμακολογική παρέμβαση): Control (n=8), Cfz (n=8), Cfz+Met (n=8), Met (n=4), για 6 ημέρες. Το Cfz (8 mg/kg, ip) χορηγήθηκε κάθε 48 ώρες (Πρωτόκολλα 1, 2, 4) και η Met (140 mg/kg, po) κάθε 24 ώρες. Η καρδιακή λειτουργία αξιολογήθηκε σε όλα τα πρωτόκολλα. Λήφθηκαν δείγματα μυοκαρδιακού ιστού για ανάλυση της ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών, της PP2A και του μοριακού μηχανισμού σηματοδότησης εστιάζοντας στα μονοπάτια Akt/eNOS και της μεσολαβούμενης από AMPKα αυτοφαγίας.

Αποτελέσματα: Το Cfz (8 mg/kg) προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στην καρδιά και τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος. Η υπερηχογραφική αξιολόγηση παρουσίασε σημαντική μείωση του κλάσματος βράχυνσης (fractional, shortening, FS%) στην ομάδα Cfz στο Πρωτόκολλο 1. Η υποχρόνια χορήγηση Cfz οδήγησε σε ήπια διάταση της αριστερής κοιλίας και οριακή μείωση του FS%. Οι διαδοχικές δόσεις Cfz δεν επηρέασαν την καρδιακή λειτουργία σε οξεία και υποχρόνια χορήγηση. Ο μοριακός μηχανισμός μελετήθηκε στο Πρωτόκολλο 1: το Cfz αναστέλλει το μονοπάτι PI3K/Akt/eNOS και την AMPKα/mTORC1-μεσολαβούμενη αυτοφαγία, μέσω αύξησης της ενεργότητας της PP2A φωσφατάσης. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, η Met, ένας AMPKα ενεργοποιητής, όταν συγχορηγήθηκε με το Cfz απέτρεψε την μείωση του FS%, αύξησε την φωσφορυλίωση των Akt και AMPKα και ενεργοποίησε την αυτοφαγία. Η συγχορήγηση Met και Cfz προκάλεσε επίσης μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στην καρδιά και στα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος.

Συμπεράσματα: Το Cfz επάγει καρδιακή δυσλειτουργία μέσω αυξημένης ενεργότητας της PP2A και αναστολής των PI3K/Akt/eNOS και της AMPKα-μεσολαβούμενης αυτοφαγίας. Η Met ανέστειλε την καρδιακή δυσλειτουργία και παρουσιάζεται ως ικανή φαρμακολογική παρέμβαση για τη διαχείριση της επαγόμενης από Cfz καρδιοτοξικότητας.

Abstract

Introduction: Carfilzomib (Cfz) is an irreversible proteasome inhibitor indicated for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma, which has been associated with severe cardiotoxicity. *The aim of this study was to* i) establish a protocol evaluating the cardiac dysfunction, ii) investigate the molecular mechanisms of Cfz-induced cardiotoxicity and identify molecular targets, and iii) based on the results of the cardiotoxicity mechanism, investigate the potential cardioprotective mechanisms of metformin (Met).

Materials and Methods: Mice were randomized into: Protocol 1 (acute): Control (n=7); Cfz (n=8), for 6 days. Protocol 2 (sub-chronic): Control (n=5); Cfz (n=8), for 14 days. Protocol 3 (intermittent, acute and sub-chronic): Control (n=6); Cfz (n=5), consecutive doses on days 0, 1 and 7, 8 for 13 days. Protocol 4 (pharmacological intervention): Control (n=8); Cfz (n=8); Cfz+Met (n=8); Met (n=4), for 6 days. Cfz (8 mg/kg, ip) was administered every 48h (Protocols 1, 2, 4) and Met (140 mg/kg, po) every 24h. Cardiac function was assessed in all protocols. Myocardial tissue samples were obtained for the analysis of proteasome peptidases activity, PP2A activity and molecular mechanisms focused in Akt/eNOS axis, AMPK α pathway and autophagy.

Results: Cfz (8 mg/kg) resulted in significant reduction of proteasome activity in heart and peripheral blood mononuclear cells. Echocardiography demonstrated FS% reduction in Cfz group following Protocol 1. Sub-chronic administration resulted in moderate left ventricular dilation and borderline reduction of FS. Cfz did not impair cardiac function after intermittent acute and sub-chronic administration. Molecular mechanisms were investigated in Protocol 1: Cfz inhibited PI3K/Akt/eNOS pathway and AMPK α /mTORC1-mediated autophagy by increasing PP2A activity. Based on the above results, Met an AMPK α activator, when co-administered with Cfz prevented FS% reduction, increased phosphorylation of Akt and AMPK α , and restored autophagy. Additionally, Met co-administration with Cfz resulted in significant reduction of proteasome activity in heart and peripheral blood mononuclear cells.

Conclusion: Cfz induced cardiac dysfunction through increased PP2A activity and inhibition of PI3K/Akt/eNOS and AMPK α -mediated autophagy. Met prevented cardiac dysfunction, emerging as a potent pharmacological intervention for the management of Cfz-induced cardiotoxicity.

Συντομογραφίες

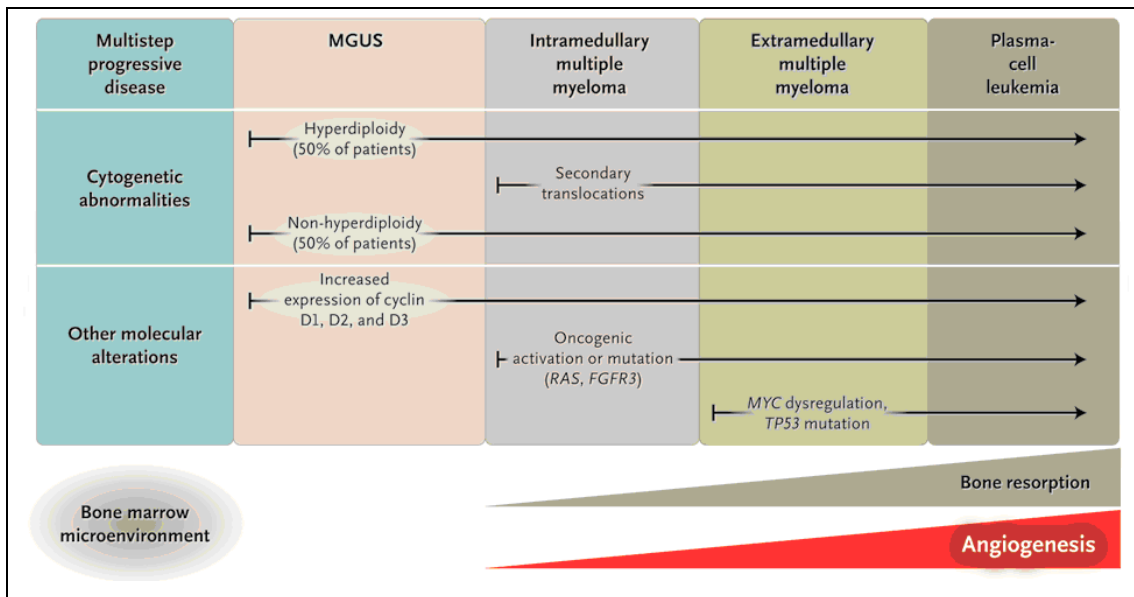
AC: Adenylate cyclase, Ado: Adenosine, Ado-R: Adenosine receptor, ASCT: autologous stem Cell Transplantation, ATP: adenosine triphosphate, AMPK α : AMP-activated protein kinase, AP: apremilast, APS: ammonium persulfate, Btz: bortezomib, BSA: bovine serum albumin, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, CDKs: cyclin-dependent kinases, CRAB (criteria): hyperCalcemia, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions, CRBN: cereblon, Cfz: carfilzomib, DUB: deubiquitinating enzymes, Dex: dexamethasone, Dxr: dexrazoxane, Dlz: delanzomib, Dox: doxorubicin, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, EGTA: ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, eNOS: endothelial NO synthase, FS%: fractional shortening %, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, GFR: glomerular filtration rate, GSH: glutathione, HRP: horseradish peroxidase, HECT (E3 enzyme): homologous to E6-AP carboxyl terminus, IMWG: international myeloma working group, ip: intraperitoneal, iNOS: inducible NO synthase, Ixz: ixazomib, Len: lenalidomide, LC3B: light chain 3, LVEDD: left ventricular end-diastole diameter, LVESD: left ventricular end-systole diameter, LVPWs: left ventricular posterior wall systole, LVPWd: left ventricular posterior wall diastole, MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance, MDA: malondialdehyde, MDM: murine double minute, Met: metformin, mPTP: mitochondrial permeability transition pore, Mrz: marizomib, mTOR: mammalian target of rapamycin, NCT: National Clinical Trial (clinicaltrials.gov identifier), ¹NMR: nuclear magnetic resonance, NT-proBNP: N-terminal pro b-type natriuretic peptide, NS: normal saline, NO: nitric oxide, Opz: oprozomib, p: phosphorylated, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PBS: phosphate-buffered saline, PDE: phosphodiesterase, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, PKA: protein kinase A, PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, po: per os, PP2A: protein phosphatase type 2A, PTEN: phosphatase and tensin homolog, PVDF: poly(vinylidene fluoride), Raptor: regulatory-associated protein of mTOR, r/h: radius to thickness ratio, RING (E3 enzyme): really interesting new gene, ROS: Reactive oxygen species, Rp: regulatory particles, SDS (PAGE): sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, TRIS: tris(hydroxymethyl)aminomethane, t: total, TEMED: N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine, TBS: tris-buffered saline, TBST: TBS – Tween, UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study, UPS: ubiquitin – proteasome system

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολλαπλό μυέλωμα

Το πολλαπλό μυέλωμα είναι μία νεοπλασματική ασθένεια η οποία, μαζί με το λέμφωμα, συγκαταλέγεται στις κακοήθειες που αναπτύσσονται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το πολλαπλό μυέλωμα αναπτύσσεται στα πλασματοκύτταρα τα οποία αποτελούν πλήρως διαφοροποιημένα Β-λεμφοκύτταρα με την ικανότητα να συνθέτουν ανοσοσφαιρίνες και εντοπίζονται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών [1]. Ο επιπολασμός της νόσου αφορά το 1.6% όλων των εμφανιζόμενων καρκίνων και ως το 13% των αιματολογικών μορφών. Η μέση ηλικία των ασθενών στην πρώτη διάγνωση είναι 70 ετών, ενώ το 37% έχει ηλικία μεγαλύτερη των 75 ετών [1-3].

Η εμφάνιση της νόσου προκύπτει όταν ένας κλώνος πλασματοκυττάρων ο οποίος, ενώ πολλαπλασιάζεται φυσιολογικά, υπό γενετικά ερεθίσματα αλλά και ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος μεταλλάσσεται σε νεοπλασματικό κλώνο. Ο κλώνος αυτός χαρακτηρίζεται από συνεχή και γρήγορο πολλαπλασιασμό, χωρίς να επάγεται κυτταρικός θάνατος· ενώ διατηρώντας τη φύση των πλασματοκυττάρων, συνθέτει ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες προερχόμενες από τον ίδιο κλώνο, είναι πανομοιότυπες και καλούνται μονοκλωνικές πρωτεΐνες (Μ-πρωτεΐνες). Το εύρημα αυτό (Μ-κορυφή η οποία παρατηρείται στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του ορού) χαρακτηρίζεται ως μονοκλωνική γαμμοπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) [4]. Η εξέλιξη της νόσου από την μονοκλωνική γαμμοπάθεια προς πολλαπλό μυέλωμα με ενδομυελικό ή εξωμυελικό όγκο ή την πλασματοκυτταρική λευχαιμία ορίζεται από πληθώρα παραμέτρων (*Εικόνα 1*) [1, 4, 5].



Εικόνα 1. Παθογένεση πολλαπλού μυελώματος. Το πολλαπλό μυέλωμα εξελίσσεται συνήθως από μονοκλωνική γαμμοπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (MGUS) σε έρπον μυέλωμα (smoldering) το οποίο τελικά γίνεται συμπτωματικό [1].

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομάδα Εργασίας για το Μυέλωμα (International Myeloma Working Group, IMWG) το συμπτωματικό πολλαπλό μυέλωμα διαγιγνώσκεται από την παρουσία του μεταλλαγμένου κλώνου πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών (παρουσία κυττάρων $\geq 10\%$ / βιοψία) και τα κριτήρια **CRAB**, τα οποία υποδηλώνουν βλάβη σε όργανα στόχους και είναι τα εξής: υπερκαλιαιμία (hyperCalcemia: ασβέστιο ορού 0.25 mmol/L πάνω από το ανώτατο φυσιολογικό όριο ή $>2.75 \text{ mmol/L}$), νεφρική ανεπάρκεια (**R**enal insufficiency: $\text{GFR} < 40 \text{ mL/min}$ ή κρεατινίνη ορού $>177 \text{ } \mu\text{mol/L}$), αναιμία (Anemia: 2.0 g/dL κάτω από το κατώτατο φυσιολογικό όριο αιμοσφαιρίνης $<10 \text{ g/dL}$) και οστικές βλάβες (**B**one lesions: ≥ 1 επιβεβαιωμένη βλάβη μέσω ακτινογραφίας, αξονικής τομογραφίας ή τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων) [6]. Παράλληλα χρησιμοποιούνται και επικουρικές εργαστηριακές αναλύσεις καθώς και αναλύσεις του μυελού των οστών (Εικόνα 2) [7].

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του πολλαπλού μυελώματος αρχικά καθορίζεται από τη δυνατότητα ή μη πραγματοποίησης αυτόλογης μεταμόσχευσης στελεχιαίων κυττάρων (autologous stem cell transplantation, ASCT) στον ασθενή. Συγκεκριμένα, οι νεώτεροι ασθενείς χωρίς σημαντικές συννοσηρότητες που κρίνονται κατάλληλοι για ASCT εμφανίζουν σημαντική βελτίωση της ελεύθερης από νόσο συνολικής επιβίωσης [8, 9].

Διάγνωση πολλαπλού μυελώματος

- **Εργαστηριακές αναλύσεις στον ορό**

- λευκοκυτταρικός τύπος, ηλεκτρολύτες, κρεατινίνη, γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), αντιδρώσα πρωτεΐνη C, β2-μικροσφαιρίνη
- χρόνος πήξης αίματος, ολική πρωτεΐνη, αλβουμίνη
- ηλεκτροφόρηση και προσδιορισμός M-πρωτεϊνών
- ποσοτικός προσδιορισμός ανοσοσφαιρινών (IgG, IgA, IgM, IgD)
- ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες

- **Εργαστηριακές αναλύσεις στα ούρα**

- ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες (24h συλλογή)
- ανοσοκαθήλωση ούρων

- **Αξιολόγηση μυελού των οστών**

- κυτταρολογία ή/και ιστολογία
- διερεύνηση χρωμοσωμικών ανωμαλιών

- **Διαγνωστική απεικόνιση**

- χαμηλής δόσης ολόσωμη αξονική τομογραφία
- μαγνητική τομογραφία
- τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων

Εικόνα 2. Διάγνωση πολλαπλού μυελώματος. Σύνοψη εξετάσεων χρήσιμων για την αρχική διάγνωση του πολλαπλού μυελώματος [7].

Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα έχουν ως βασικό πυλώνα τους αναστολείς πρωτεασώματος τόσο σε θεραπείες πρώτης γραμμής όσο και για τη θεραπεία της υποτροπιάζουσας και ανθεκτικής νόσου, όπως υποδεικνύεται στις πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ιατρικής Ογκολογίας (ESMO, European Society for Medical Oncology) (Εικόνα 3) [10]. Παράλληλα, η χρήση υποστηρικτικών θεραπειών είναι απαραίτητη για τη συμπτωματική αντιμετώπιση κλινικών εκδηλώσεων οι οποίες σχετίζονται με τη νόσο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται αναλγητικά φάρμακα για την αντιμετώπιση άλγους το οποίο οφείλεται κυρίως στις σκελετικές αλλοιώσεις και τη νευροπάθεια· ειδικότερα για τις σκελετικές αλλοιώσεις χορηγούνται διφωσφονικά (παμιδρονάτη, ζολεδρονικό οξύ, κλοδρονικό οξύ) ενώ για την περιφερική νευροπάθεια προτείνεται φυσικοθεραπεία και τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά. Παρά τον υψηλό κίνδυνο λοιμώξεων δεν συστήνεται η τακτική χορήγηση αντιβιοτικών - σε περιπτώσεις παρατεταμένης ουδετεροπενίας ή επαναλαμβανόμενων βακτηριακών λοιμώξεων χρησιμοποιούνται ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor) και ανοσοσφαιρίνες ενδοφλέβια. Επιπλέον, τα εντατικά θεραπευτικά σχήματα και οι υψηλές δόσεις στεροειδών πρέπει να συνοδεύονται από χορήγηση co-trimoxazole για την αποφυγή πνευμονίας από *Pneumocystis jiroveci*. Τέλος για την πρόληψη της φλεβικής θρόμβωσης χορηγούνται ασπιρίνη, ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους ή ανταγωνιστές της βιταμίνης K [7].

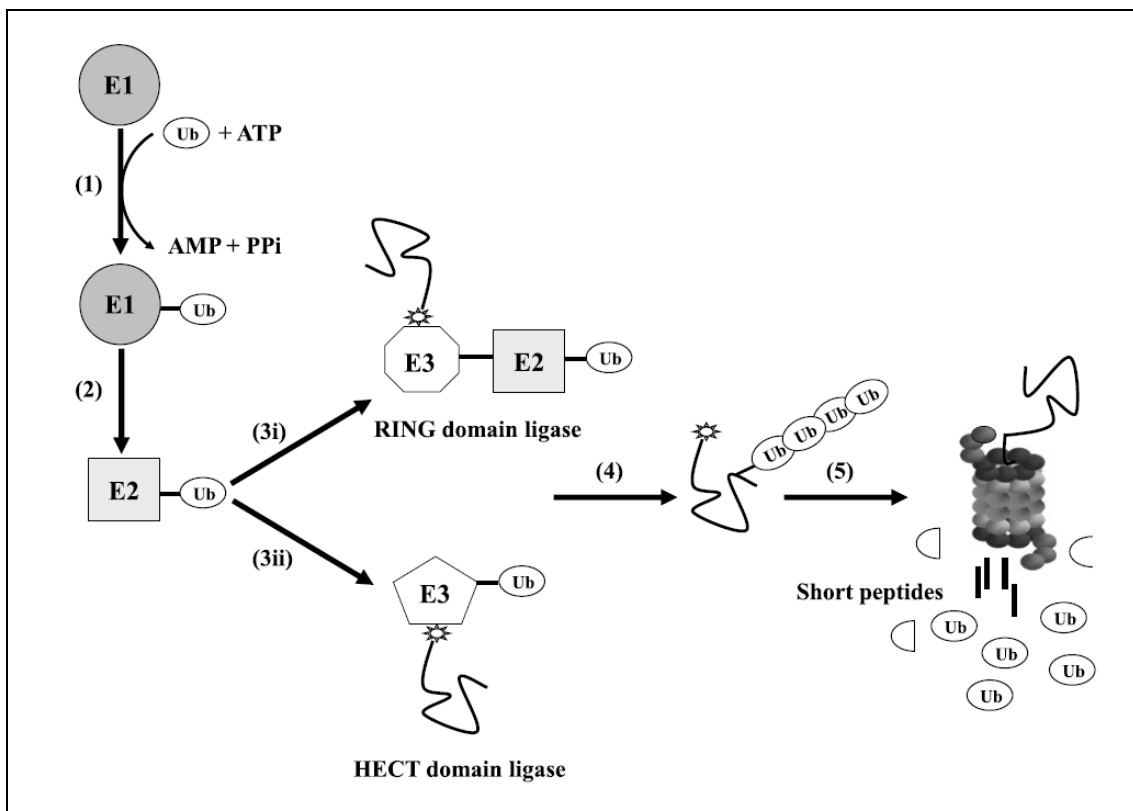
Regimen	Usual dosing schedule
Front-line:	
Bortezomib/melphalan/prednisone (MMP) [11]	Bortezomib 1.3 mg/m ² subcutaneously days 1, 8, 15, 22; melphalan 9 mg/m ² orally days 1–4; prednisone 60 mg/m ² oral days 1–4; repeated every 35 days
Lenalidomide/low-dose dexamethasone (Rd) [12]	Lenalidomide 25 mg orally days 1–21 every 28 days; dexamethasone 40 mg orally days 1, 8, 15, 22 every 28 days; repeated every 4 weeks
Melphalan/prednisone/thalidomide (MPT) [13]	Melphalan 0.25 mg/kg orally days 1–4 (use 0.20 mg/kg/day orally days 1–4 in patients over the age of 75); prednisone 2 mg/kg orally days 1–4; thalidomide 100–200 mg orally days 1–28 (use 100 mg dose in patients >75); repeated every 6 weeks
Bortezomib/cyclophosphamide/dexamethasone (VCD) [14]	Cyclophosphamide 300 mg/m ² orally days 1, 8, 15 and 22; bortezomib 1.3 mg/m ² i.v. on days 1, 8, 15, 22; dexamethasone 40 mg orally on days 1, 8, 15, 22; repeated every 4 weeks
Bortezomib/thalidomide/dexamethasone (VTd) [14]	Bortezomib 1.3 mg/m ² subcutaneously days 1, 8, 15, 22; thalidomide 100–200 mg orally days 1–21; dexamethasone 20 mg on day of and day after bortezomib (or 40 mg days 1, 8, 15, 22); repeated every 4 weeks × four cycles as pre-transplant induction therapy
Bortezomib/lenalidomide/dexamethasone (VRd) [14]	Bortezomib 1.3 mg/m ² subcutaneously days 1, 8, 15; lenalidomide 25 mg orally days 1–14; dexamethasone 20 mg on day of and day after bortezomib (or 40 mg days 1, 8, 15, 22); repeated every 3 weeks
Relapse/refractory disease:	
Carfilzomib/lenalidomide/dexamethasone KRd [24, 32]	Carfilzomib 20 mg/m ² (cycle 1) and 27 mg/m ² (subsequent cycles) i.v. on days 1, 2, 8, 9, 15, 16; lenalidomide 25 mg orally days 1–21; dexamethasone 20 mg on day of and day after bortezomib (or 40 mg days 1, 8, 15, 22); repeated every 4 weeks
Bortezomib/dexamethasone/panobinostat (VD-Pano) [31]	Bortezomib 1.3 mg/m ² subcutaneously days 1, 8, 15, 22; dexamethasone 20 mg on day of and day after bortezomib; panobinostat 20 mg orally days 1, 3, 5 week 1 and 2; repeated every 3 weeks (cycles 1–8)
Carfilzomib/dexamethasone (Kd) [33]	Carfilzomib 56 mg/m ² i.v. days 1, 2, 8, 9, 15, 16 (20 mg/m ² days 1, 2, cycle 1 only); dexamethasone 20 mg days 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22, 23; 28-day cycles
Lenalidomide/dexamethasone/elotuzumab (Rd-Elo) [34]	Lenalidomide 25 mg orally days 1–21; dexamethasone 40 mg weekly; elotuzumab 10 mg/kg i.v. weekly cycle 1 and 2, every other week cycles 3+; repeated every 28 days
Lenalidomide/dexamethasone/ixazomib (IRd) [35]	Lenalidomide 25 mg orally days 1–21; dexamethasone orally 40 mg days 1, 8, 15, 22; ixazomib 4 mg orally days 1, 8, 15; repeated every 28 days
Bortezomib/dexamethasone/daratumumab (DVd) [38]	Bortezomib 1.3 mg/m ² subcutaneously days 1, 4, 8, 11 (cycles 1–8); dexamethasone 20 mg orally days 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12 (cycles 1–8); daratumumab 16 mg/kg i.v. every week (cycles 1–3), every 3 weeks (cycles 4–8), every 4 weeks (cycles 9+); cycles 1–8: repeated every 21 days; cycles 9+: repeated every 28 days
Lenalidomide/dexamethasone/daratumumab (DRd) [39]	Lenalidomide 25 mg orally days 1–21; dexamethasone 40 mg orally weekly; daratumumab 16 mg/kg i.v. weekly (cycles 1–2), every other week (cycles 3–6), q4w (cycles 7+); cycles: 28 days

Εικόνα 3. Σημαντικότερα θεραπευτικά σχήματα στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος. Η θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος βάσει των κατευθυντήριων οδηγιών της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ιατρικής Ογκολογίας [10].

1.2 Σύστημα ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος

Το πρωτεάσωμα – συμμετέχοντας στο σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system, UPS) – αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη ρύθμιση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών (πρωτεόσταση). Η πρωτεόσταση αφορά στο συνολικό έλεγχο της πρωτεϊνικής σύνθεσης (μετάφρασης), μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, μεταφοράς, αναδίπλωσης, σχηματισμού πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και αποικοδόμησης αυτών [11]. Η πρωτεϊνική αποικοδόμηση πραγματοποιείται μέσω του πρωτεασώματος ή των λυσοσωμάτων (αυτοφαγία) – λειτουργίες οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της πρωτεόστασης και, αν και επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες, βρίσκονται υπό συνεχή αλληλεπίδραση. Το πρωτεάσωμα αποικοδομεί κυτταρικές πρωτεΐνες μέσω αυστηρής ρύθμισης από το UPS, ενώ η λυσοσωμική αποικοδόμηση αφορά στοιχεία του κυτταροπλάσματος, συσσωματώματα πρωτεϊνών ή κυτταρικά οργανίδια [12].

Η ουβικουιτινυλίωση των υποστρωμάτων του UPS είναι μία περίπλοκη διαδικασία η οποία εκτελείται από τρία βασικά ένζυμα: E1, E2, E3 – τα οποία αντιπροσωπεύουν κατηγορίες ενζύμων (Εικόνα 4).

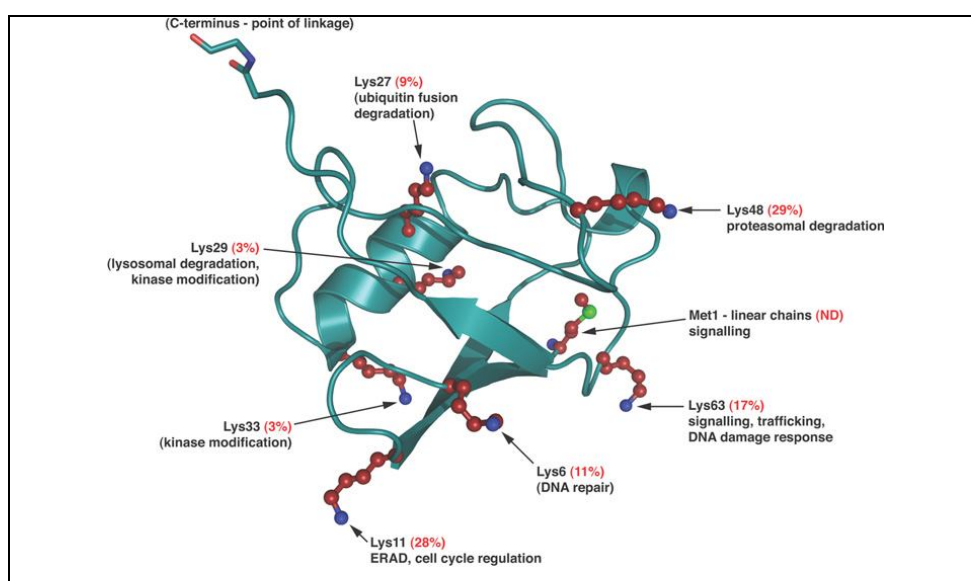


Εικόνα 4. Βασικά στάδια ουβικουιτινυλίωσης. (1) Ενεργοποίηση ενός μορίου ουβικουιτίνης από το E1, (2) Μεταφορά της ουβικουιτίνης σε ένζυμο – σύζευξης E2. (3i) Η ουβικουιτίνη μεταφέρεται απευθείας στο υπόστρωμα ή (3ii) μεταφέρεται σε πρώτο χρόνο στο ένζυμο E3 και μετά στο υπόστρωμα, (4) Δημιουργία αλυσίδας ουβικουιτίνης, (5) Αποικοδόμηση του ουβικουιτινυλιωμένου υποστρώματος [13].

Το αρχικό στάδιο είναι η ενεργοποίηση ενός μορίου ουβικουιτίνης από το ένζυμο E1 (8 διαφορετικά γνωστά ένζυμα E1). Η διαδικασία αυτή είναι εξαρτώμενη από το ATP και οδηγεί στη σύνδεση του καρβοξυτελικού άκρου της ουβικουιτίνης (Gly76) στο υπόλοιπο κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του E1 μέσω θειοεστερικού δεσμού. Το δεύτερο στάδιο αφορά στη μεταφορά της ενεργοποιημένης ουβικουιτίνης στα ένζυμα σύζευξης E2 (ubiquitin-conjugating enzymes) με τη δημιουργία αντίστοιχων δεσμών. Τέλος, η ουβικουιτινυλίωση πραγματοποιείται από πρωτεϊνικό σύμπλεγμα το οποίο αποτελείται από το E2 που φέρει την ουβικουιτίνη, ένα ένζυμο E3 ειδικό ως προς το υπόστρωμα και το υπόστρωμα. Η μεταφορά της ουβικουιτίνης γίνεται με δύο τρόπους: είτε απευθείας μεταφορά από το E2 στο υπόστρωμα (RING E3 ένζυμο) είτε

με ενδιάμεση μεταφορά από το E2 στα E3 ένζυμα και κατόπιν στο υπόστρωμα (HECT E3 ένζυμα). Τέλος τα ένζυμα E2 και E3 απομακρύνονται [14]. Η τοποθέτηση του πρώτου μορίου ουβικουιτίνης είναι το πιο αργό στάδιο και συνεπώς το καθοριστικό για το ρυθμό. Η διαδικασία επιμήκυνσης της αλυσίδας ουβικουιτίνης πραγματοποιείται με επανάληψη των παραπάνω σταδίων, ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει και μία νέα ομάδα ενζύμων, E4, τα οποία αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο με μη ειδικό τρόπο επιτρέποντας την επανάληψη της διαδικασίας [14, 15].

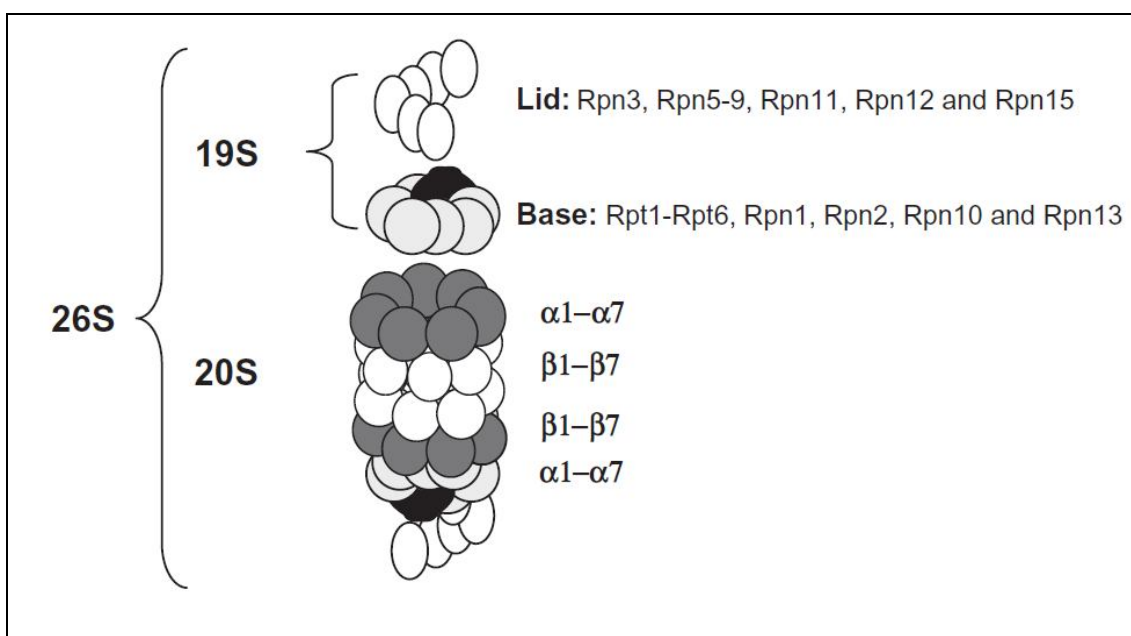
Η πολυπλοκότητα στη ρύθμιση του UPS οφείλεται εν μέρει στην ικανότητα της ουβικουιτίνης να σχηματίζει πολυμερείς αλυσίδες μέσω σύνδεσης σε ένα από τα επτά υπόλοιπα λυσίνης (lysine, K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) ή το αμινοτελικό άκρο της μεθειονίνης (methionine, M1) (Εικόνα 5). Οι αλυσίδες αυτές μπορεί να είναι ομοιογενείς ή ετερογενείς στη σύστασή τους. Η καλύτερα μελετημένη αλυσίδα ουβικουιτίνης είναι η K48, η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα (29%) και τα υποστρώματα που σημαίνονται με K48 αλυσίδες οδηγούνται προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα [16]. Επιπλέον, μία ή περισσότερες μονο-ουβικουιτινυλίωσεις οδηγούν επίσης σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση [17]. Συχνά παρατηρούνται ουβικουιτινυλίωσεις με αλυσίδες K11 (28%) και K63 (17%), οι οποίες σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωση βλαβών στο DNA. Ο ρόλος όλων των πιθανών αλυσίδων ουβικουιτίνης δεν είναι πλήρως μελετημένος, αν και ενδεικτικές λειτουργίες έχουν καταγραφεί (Εικόνα 5) [18].



Εικόνα 5. Δομή ουβικουιτίνης. Εμφανίζονται τα επτά υπόλοιπα Lys και το N-τελικό άκρο της μεθειονίνης καθώς και ενδεικτικά η σηματοδότηση την οποία ορίζουν [18].

Το 26S πρωτεάσωμα είναι ένα πρωτεολυτικό σύμπλοκο το οποίο επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες, καθώς μέσω της πρωτεόλυσης και αποκοπής ομάδων ουβικουτίνης, ρυθμίζει την πρωτεϊνική αποικοδόμηση και την κυτταρική φυσιολογία. Αποτελείται από έναν κυλινδρικό, πολυμερή πυρήνα, το 20S πρωτεάσωμα, και από δύο ρυθμιστικές υπομονάδες εκατέρωθεν του κυλινδρικού πυρήνα, τις 19S υπομονάδες. Τα υποστρώματα του πρωτεασώματος αποικοδομούνται στον 20S πυρήνα, ενώ οι 19S υπομονάδες είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση, την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τη μετατόπισή τους εντός του καταλυτικού πυρήνα [19].

Το 20S πρωτεάσωμα, με συνολικό μοριακό βάρος 700 kDa, αποτελείται από 28 υπομονάδες οι οποίες σχηματίζουν 4 δακτυλίους: δύο πανομοιότυποι α-δακτύλιοι εσωκλείουν τους 2 β-δακτυλίους. Κάθε δακτύλιος αποτελείται από 7 υπομονάδες (α_{1-7} και β_{1-7} αντίστοιχα) (Εικόνα 6). Οι υπομονάδες β_1 , β_2 και β_5 αποτελούν τις καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος οι οποίες είναι για τη διάσπαση πεπτιδικών δεσμών επί όξινου (caspase-like activity, C-L), ουδέτερου (trypsin-like activity, T-L) και υδρόφοβου (chymotrypsin-like activity, CT-L) υποστρώματος αντίστοιχα [14].



Εικόνα 6. Δομή του 26S πρωτεασώματος. Παρουσιάζονται οι δομικές υπομονάδες του 20S καταλυτικού πυρήνα και του 19S πρωτεασώματος [14]

Το 19S πρωτεάσωμα συνίσταται από το «καπάκι» (lid) και τη «βάση» (base) (Εικόνα 6). Το «καπάκι» αποτελείται από 9 διαφορετικά ρυθμιστικά μόρια (Rp: Regulatory particle) ανεξάρτητα του ATP (Rpn3, Rpn5–9, Rpn11, Rpn12 και Rpn15) τα οποία συμμετέχουν στην πρόσληψη και απο-ουβικουιτινυλίωση του υποστρώματος. Ενώ η βάση αποτελείται από 6 υπομονάδες ATPάσης (Rpt1–Rpt6) καθώς και 4 ρυθμιστικά μόρια ανεξάρτητα του ATP (Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13) τα οποία εμπλέκονται στην αναγνώριση, αποδιάταξη και μετακίνηση της πρωτεΐνης στον καταλυτικό πυρήνα [20].

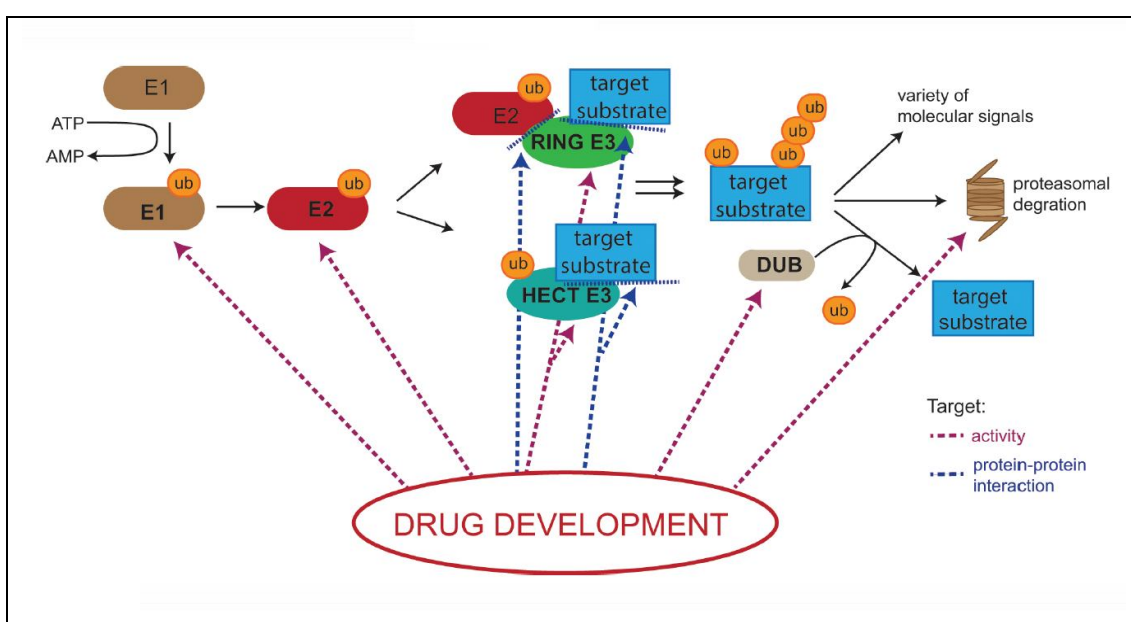
Συγκεκριμένα στο 19S πρωτεάσωμα, οι πρωτεασωμικές υπομονάδες Rpn1, Rpn10 και Rpn13 είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και πρόσδεση των ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνών [21]. Επιπλέον, οι υπομονάδες Rpt5 και Rpn15 έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν μόρια ουβικουιτίνης, χωρίς να είναι πλήρως διευκρινισμένο αν αναγνωρίζουν ουβικουιτινυλιωμένα υποστρώματα [22]. Οι υπομονάδες αναγνώρισης των προς αποικοδόμηση υποστρωμάτων προσδένουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία του UPS· σημαντικότερες εξ αυτών είναι τα ένζυμα απομάκρυνσης των ομάδων ουβικουιτίνης (deubiquitinating enzymes, DUBs). Τα DUBs αποτελούν ένα επιπλέον ρυθμιστικό επίπεδο στη λειτουργία του πρωτεασώματος, ελέγχοντας – μέσω της απομάκρυνσης μορίων ουβικουιτίνης – τις πρωτεΐνες που θα απελευθερωθούν ή θα προχωρήσουν προς αποικοδόμηση [23]. Η Rpn13 υπομονάδα προσδένει τα ουβικουιτινυλιωμένα υποστρώματα μέσω του αμινοτελικού άκρου της, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο προσδένει και ενεργοποιεί ένζυμα DUB [24].

Τα DUBs δρουν με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς:

- 1) συμμετέχοντας στη *de novo* σύνθεση ουβικουιτίνης, απελευθερώνοντας τα μεμονωμένα μόρια από το γραμμικό σύμπλεγμα μορίων ουβικουιτίνης που παράγεται από το ριβόσωμα
- 2) αποκόπτοντας μόρια ουβικουιτίνης από τις πολυμερείς αλυσίδες των υποστρωμάτων· ανάλογα με τη θέση από την οποία θα απομακρυνθεί το μόριο της ουβικουιτίνης αλλάζει και η σηματοδότηση της πρωτεΐνης
- 3) απομακρύνοντας ολόκληρες αλυσίδες ουβικουιτίνης· γεγονός το οποίο συνήθως συνεπάγεται και σταθεροποίηση της πρωτεΐνης, ενώ ενδέχεται να επηρεαστεί η διαμερισματοποίηση αυτής [25]

1.2.1 Φαρμακολογικές παρεμβάσεις επί του συστήματος ουβικουιτίνης - πρωτεασώματος

Το UPS αποτελεί ένα βασικό ρυθμιστή του μεταβολισμού, της πρωτεόστασης και της κυτταρικής φυσιολογίας, ο οποίος ελέγχει τα επίπεδα πολλών πρωτεϊνών με τρόπο ειδικό ώστε να βελτιστοποιεί την κυτταρική λειτουργία. Η φαρμακολογική στόχευση του UPS έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην αντικαρκινική θεραπεία, με ιδιαίτερη χρήση έναντι του πολλαπλού μυελώματος. Πιθανές φαρμακολογικές παρεμβάσεις μελετούνται έναντι όλων των επιμέρους στοιχείων του UPS (Εικόνα 7) [26].



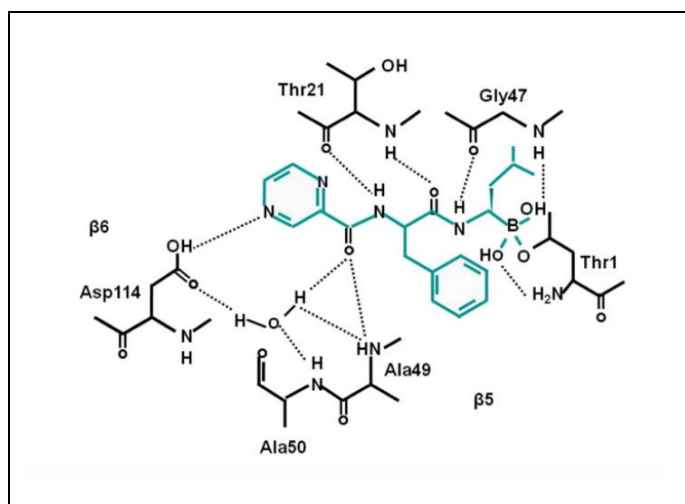
Εικόνα 7. Μοριακοί στόχοι στο UPS. Η φαρμακολογική στόχευση περιλαμβάνει τα ένζυμα E1, E2, E3 τα DUBs καθώς και το 26S πρωτεάσωμα [27].

Η πιθανή αναστολή της δράσης των ενζύμων E1, αν και δεν είναι ιδανική λόγω της απουσίας εκλεκτικότητας, έχει μελετηθεί και έχει οδηγήσει σε δύο φαρμακολογικούς παράγοντες: MLN7243 και MLN4924, οι οποίοι είναι αναστολείς των ενζύμων-ενεργοποιητών της ουβικουιτίνης UBA1 και NAE1 αντίστοιχα, και βρίσκονται σε κλινικές μελέτες φάσης I για την αξιολόγηση της ασφάλειας, φαρμακοκινητικής-φαρμακοδυναμικής και αντικαρκινικής δράσης έναντι συμπαγών, κακοήθων όγκων (NCT02045095 και NCT02122770 αντίστοιχα) [28]. **Αναφορικά με τα ένζυμα E2 υπάρχουν δυο φαρμακολογικοί παράγοντες** σε στάδια προκλινικών μελετών: ο NSC697923 (Leucettamol A, προερχόμενος από το θαλάσσιο σπόγγο *Leucetta aff. Microrhaphis*) και ο CC0651 [29]. Ο παράγοντας Leucettamol A παρεμποδίζει την

αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ των Ubc13 και Uev1A, αναστέλλοντας ουσιαστικά το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμων E1-E2. Ομοίως δρουν οι ουσίες manadosterols A και B του σπόγγου *Lissodendryx fibrosa*. Ο δεύτερος φαρμακολογικός παράγοντας, CC0651, συνδέεται επί του ενζύμου σύζευξης της ουβικουιτίνης E2, Cdc34, το οποίο ευθύνεται για την αποικοδόμηση πληθώρας πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p27 [28, 30]. **Τα ένζυμα E3 είναι υπεύθυνα για την εξειδίκευση των αντιδράσεων ουβικουιτινολίωσης** και έχουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορες παθήσεις συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου· αποτελούν συνεπώς χρήσιμο μοριακό στόχο του UPS. Οι δύο σημαντικότερες κατηγορίες είναι τα ανοσορρυθμιστικά φάρμακα, παράγωγα της θαλιδομίδης, και οι ενισχυτές της δράσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Η θαλιδομίδη και τα παράγωγα λεναλιδομίδη (lenalidomide, Len) και πομαλιδομίδη δρουν αναστέλλοντας τη λειτουργία του E3 ενζύμου, cereblon (CRBN). Όσον αφορά την p53 έχουν ταυτοποιηθεί πολλά ένζυμα E3 που σχετίζονται με τη ρύθμισή της, σημαντικότερο εξ αυτών είναι το MDM2 (Murine Double Minute 2) το οποίο δεσμεύει και σηματοδοτεί την πρωτεΐνη προς αποικοδόμηση. Ο πρωταρχικός φαρμακολογικός παράγοντας nutlin-3a που βρέθηκε ότι δρα ως αναστολέας του MDM2, είχε σημαντικό μειονέκτημα καθώς δεν εμφάνιζε δράση έναντι της ισομορφής MDMX. Οι επόμενοι παράγοντες που αναπτύχθηκαν (ATSP-7041 και NSC207895) είναι ισχυροί αναστολείς και των δύο ισομορφών. Οι p53 ενισχυτές βρίσκονται σε προκλινικά στάδια ή κλινικές μελέτες φάσης I (nutlin-3a, NCT01143519 και RG7112, NCT00623870) [29, 30]. **Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικό μοριακό στόχο αποτελούν τα ένζυμα DUBs**, τα οποία απομακρύνουν ομάδες ουβικουιτίνης από τις πρωτεΐνες, και σε συνδυασμό με τα ένζυμα E3 ρυθμίζουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που οι κινάσες και οι φωσφατάσες ρυθμίζουν την πρωτεϊνική ενεργοποίηση. Αρκετοί φαρμακολογικοί παράγοντες μελετούνται για τη δράση τους επί των DUBs, χωρίς να έχουν φτάσει στα στάδια των κλινικών μελετών [28, 29]. Επιπλέον, υπάρχουν προκλινικές μελέτες με ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες προσεγγίσεις επί της αναστολής των DUBs, οι οποίες χρησιμοποιούν – πέρα από χημικούς παράγοντες – siRNA και πρωτεϊνικά παράγωγα ουβικουιτίνης με βινυλο-σουλφονυλο-ομάδα η οποία δεσμεύει και αναστέλλει το ένζυμο, καθώς και πρωτεάσες ειδικές ως προς τους δεσμούς που δημιουργεί η ουβικουιτίνη με άλλες πρωτεΐνες ή πεπτίδια [25].

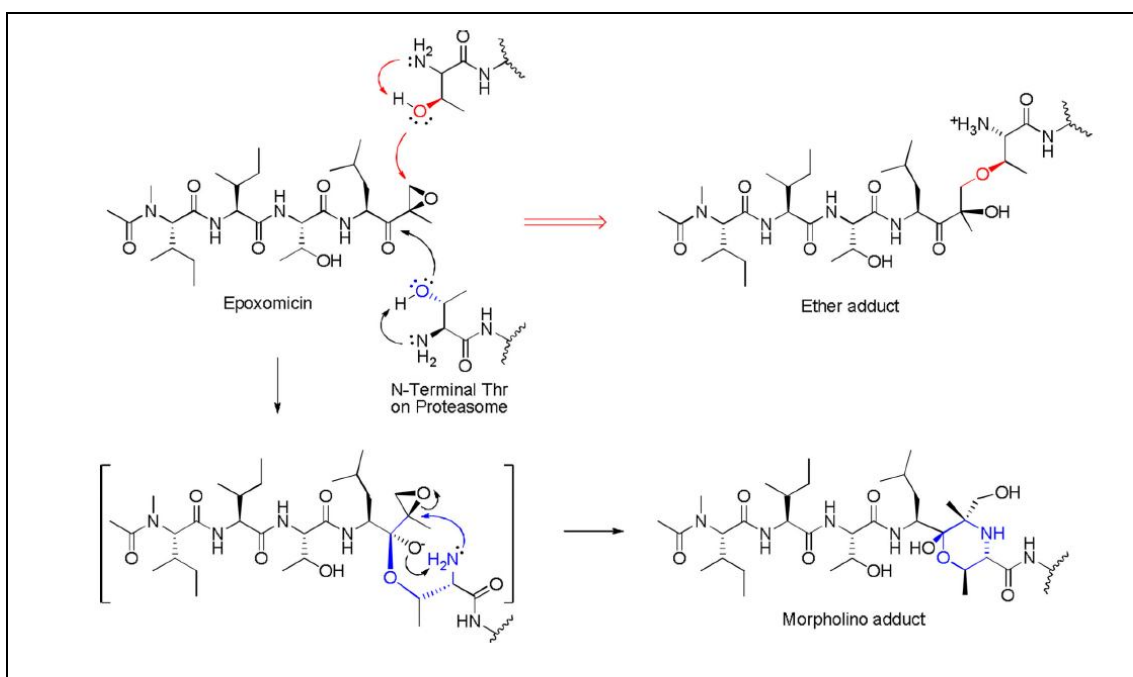
Το ίδιο το πρωτεάσωμα αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο του UPS· οι αναστολείς πρωτεασώματος, όπως προαναφέρθηκε, έχουν ιδιαίτερα διαδεδομένη χρήση στην κλινική πράξη έναντι του πολλαπλού μυελώματος. Αξίζει να διευκρινιστεί ότι τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι αναστολείς του 20S πρωτεασώματος, καθώς έχουν αναπτυχθεί σε προκλινικές μελέτες και αναστολείς του 19S πρωτεασώματος. Συγκεκριμένα, οι ubistatin A και B είναι αναστολείς οι οποίοι παρεμβαίνουν στην αναγνώριση των υποστρωμάτων από τη 19S υπομονάδα. Επιπλέον, ο παράγοντας b-AP15 αλληλεπιδρά με τη 19S υπομονάδα και παρεμποδίζει την απομάκρυνση των K48-αλυσίδων ουβικουιτίνης από τα DUBs, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών [28]. Οι αναστολείς του 20S πρωτεασώματος (αναφερόμενοι “αναστολείς πρωτεασώματος” στην παρούσα εργασία) κατατάσσονται, βάσει χημικής δομής, σε πεπτιδικά παράγωγα βορονικού οξέος (βορτεζομίμη (bortezomib, Btz), δελνλαζομίμη (delanzomib, Dlz), ιξαζομίμη (ixazomib, Ixz)), α,β-εποξυκετόνης (καρφιλζομίμη (carfilzomib, Cfz), οπροζομίμη (oprozomib, Opz), ONX-0914, PR-924), αλδεϋδών (MG132, IPSI-001), και μη πεπτιδικά παράγωγα β-λακτόνης (μαριζομίμη (marizomib, Mrz)). Εκ των οποίων, εγκεκριμένα φάρμακα είναι τα Btz, Cfz και Ixz.

Τα Btz και Ixz είναι βορονικά παράγωγα τα οποία σχηματίζουν τετραεδρικά σύμπλοκα με το αμινοτελικό άκρο της Thr1 στην καταλυτική υπομονάδα β5 του ενεργού κέντρου (σύνδεση με τις καταλυτικές υπομονάδες: β5 > β1 >> β2) και δρουν ως αργά αναστρέψιμοι αναστολείς (Εικόνα 8) [28, 29].



Εικόνα 8. Μηχανισμός δράσης των παραγώγων βορονικού οξέος. Θέσεις αλληλεπίδρασης του Btz με τη β5 καταλυτική υπομονάδα του πρωτεασώματος [31].

Το Cfz είναι παράγωγο εποξυκετόνης, το οποίο αλληλεπιδρά επίσης με τη Thr1 στην καταλυτική υπομονάδα β5 είτε σχηματίζοντας άμεσα αιθερικό δεσμό με το υδροξύλιο είτε έμμεσα με σχηματισμό παραγώγου μορφολίνης με το υδροξύλιο και την ελεύθερη αμινομάδα της θρεονίνης, οδηγώντας σε μη αναστρέψιμη σύνδεση (σύνδεση με τις καταλυτικές υπομονάδες: $\beta 5 \gg \beta 1 > \beta 2$) (Εικόνα 9) [19, 28, 32].



Εικόνα 9. Μηχανισμός δράσης των παραγώγων εποξυκετόνης. Το Cfz αλληλεπιδρά μη αντιστρεπτά με τη β5 καταλυτική υπομονάδα του πρωτεασώματος σχηματίζοντας παράγωγο μορφολίνης [32].

Λόγω ανωμαλιών στην λειτουργία του UPS, τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο ευάλωτα στη δράση των αναστολέων πρωτεασώματος σε σχέση με τα υγιή κύτταρα [33]. Σε συγκριτική μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε μεταξύ ασθενών με διαγνωσμένο πολλαπλό μυέλωμα και υγιών εθελοντών φάνηκε ότι οι ασθενείς εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη ενεργότητα στη CT-L πρωτεασωμική πεπτιδάση έναντι της ομάδα ελέγχου – κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η αυξημένη ενεργότητα, η οποία συχνά συνοδεύεται και από αυξημένη έκφραση των δομικών υπομονάδων του πρωτεασώματος, είναι απαραίτητη για την επιβίωση του νεοπλασματικού κυττάρου και για τον ταχύ πολλαπλασιασμό [34]. Σε καταστάσεις αναστολής του πρωτεασώματος επηρεάζεται η λειτουργία πολλών ρυθμιστικών πρωτεϊνών: ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB και η ανασταλτική αυτού πρωτεΐνη, IκB, είναι ένα

σημαντικό παράδειγμα. Σε αδυναμία αποικοδόμησης της IκB από το πρωτεάσωμα, η συσσώρευση της IκB οδηγεί σε αναστολή του NF-κB και μειωμένη παραγωγή αντιαποπτωτικών και αγγειογενετικών παραγόντων. Επιπλέον, το μονοπάτι του NF-κB συχνά ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, οπότε η συγχορήγηση αναστολέων πρωτεασώματος μπορεί να εμφανίσει επιπρόσθετα οφέλη [35]. Καθοριστικής σημασίας είναι και η επίδραση που παρατηρείται σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου όπως οι κυκλίνες (cyclins) και οι εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες (cyclin-dependent kinases, CDKs), διαταράσσοντας την κυτταρική διαίρεση και σταθεροποιώντας προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bax – αποπτωτικό μονοπάτι μιτοχονδρίων. Τέλος, η δράση των αναστολέων πρωτεασώματος σχετίζεται με την επαγωγή οξειδωτικού στρες και την παραγωγή συσσωματωμάτων (aggresomes), καθώς και με απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου στην παρουσία μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (unfolded protein response) [36].

1.3 Αναστολείς πρωτεασώματος στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος

Το Btz ήταν ο πρώτος αναστολέας πρωτεασώματος ο οποίος έλαβε έγκριση μέσω επιταχυσμένων διαδικασιών το 2003 για τη θεραπεία πολλαπλού μυελώματος με προοδευτικά επιδεινούμενη κατάσταση κατόπιν προηγούμενης θεραπείας. Η έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) δόθηκε βάσει δύο κλινικών μελετών φάσης II στο συγκεκριμένο πληθυσμό ασθενών, στις οποίες εμφανίστηκαν σημαντικά οφέλη στη συνολική επιβίωση [37] – ένα χρόνο αργότερα εγκρίθηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA). Πράγματι το ποσοστό ανταπόκρισης των ασθενών ήταν 35% και η συνολική επιβίωση 16 μήνες, εκ των οποίων στους πρώτους 12 μήνες υπήρχε καλή ανταπόκριση [38]. Ακολούθησε η μελέτη φάσης III APEX, η οποία επιβεβαίωσε την ικανότητα του Btz [ενδοφλέβια χορήγηση, σε δόση 1.3 mg/m^2 , ημέρες 1, 4, 8 και 11 για 8 κύκλους τριών εβδομάδων, ακολουθούμενος από χορήγηση στις ημέρες 1, 8, 15 και 22 για 3 κύκλους πέντε εβδομάδων] να βελτιώνει σημαντικά την ανταπόκριση και τη συνολική επιβίωση των ασθενών με υποτροπιάζον πολλαπλό μυέλωμα έναντι θεραπείας με υψηλή δόση δεξαμεθαζόνης (dexamethasone, Dex) [39]. Εν συνεχεία, εδραιώθηκε η χρήση του Btz ως φάρμακο πρώτης γραμμής σε νεοδιαγνωσθέν πολλαπλό μυέλωμα σε ασθενείς ακατάλληλους για μεταμόσχευση στελεχιαίων κυττάρων – σε θεραπευτικό σχήμα με μελφαλάνη, πρεδνιζόνη [VISTA phase III trial, NCT00111319] [40].

Το Btz εμφανίζει συχνά φαινόμενα αντοχής κατά τη θεραπεία των αιματολογικών διαταραχών – ο μηχανισμός της αντοχής που παρατηρείται δεν είναι πλήρως μελετημένος. Σημαντικές παράμετροι αποτελούν οι μεταλλάξεις στην καταλυτική β5 υπομονάδα, πολυμορφισμοί οι οποίοι παρουσιάζονται στη δομή του 20S πυρήνα του πρωτεασώματος, καθώς και η αυξορρυθμική της έκφρασης των δομικών στοιχείων του πρωτεασώματος (*de novo* σύνθεση) [41]. Επιπλέον, η λειτουργία αντλιών εκροής, όπως η p-γλυκοπρωτεΐνη, συνεισφέρει στους παραπάνω μηχανισμούς· η p-γλυκοπρωτεΐνη εμφανίζει υψηλή συγγένεια με μικρά γραμμικά πεπτίδια όπως ο βασικός σκελετός αρκετός αναστολέων πρωτεασώματος [35]. Η ανάπτυξη αντοχής ευνοεί την εμφάνιση υποτροπιάζοντος ή / και ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος με σημαντικά μειωμένη επιβίωση με θεραπείες διάσωσης [42, 43].

Στα πλαίσια αυτά, το Cfz έλαβε επίσης έγκριση από τον FDA μέσω επιταχυμένων διαδικασιών το 2013 οπότε και πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες κλινικές μελέτες φάσης I/II στις οποίες παρουσιάστηκε συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης 23% σε ασθενείς με υποτροπιάζον και ανθεκτικό πολλαπλό μυέλωμα, οι οποίοι είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία με Btz και κάποιο ανοσορρυθμιστικό φάρμακο [44]. Παράλληλα εμφανίστηκαν καρδιαγγειακές ανεπιθύμητες ενέργειες (συνολικά ~5%), ενώ σημειώθηκαν και δύο θάνατοι (0.8%) από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη μελέτη ήταν μίας ομάδας (single-arm study), δεν ήταν εφικτό να αποδοθούν με σαφήνεια οι ανεπιθύμητες ενέργειες στο Cfz ή στο ιστορικό των ασθενών οι οποίοι είχαν λάβει εντατικά θεραπευτικά σχήματα. Λόγω και της σημαντικής βελτίωσης στην ανταπόκριση, η σχέση οφέλους – κινδύνου αξιολογήθηκε θετικά και οδήγησε στην έγκριση του φαρμάκου [NCT00511238] [45]. Η πρώτη κλινική μελέτη φάσης III σε ασθενείς με υποτροπιάζον πολλαπλό μυέλωμα, με ομάδα ελέγχου [ASPIRE, Cfz+Len+Dex (Cfz group) vs. Len+Dex (Control group), NCT01080391] εμφάνισε επίσης μεγαλύτερα ποσοστά καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών στην ομάδα Cfz (26.6%) έναντι της ομάδας ελέγχου (15.6%). Παρουσιάστηκαν ισάριθμοι θάνατοι (3 σε κάθε ομάδα) από καρδιαγγειακά αίτια. Σε κάθε περίπτωση, η σχέση οφέλους – κινδύνου αξιολογείται προς όφελος του Cfz [46]. Η μεγαλύτερη πολυκλινική μελέτη φάσης III που πραγματοποιήθηκε για τους αναστολείς πρωτεασώματος [ENDEAVOR, NCT01568866] συνέκρινε τη θεραπεία Cfz σε συνδυασμό με Dex έναντι Btz σε συνδυασμό με Dex σε ασθενείς με υποτροπιάζον και ανθεκτικό πολλαπλό μυέλωμα· 929 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν στις δύο ομάδες, Cfz (n=464) ή Btz (n=465). Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα, η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (progression-free survival, PFS) βρέθηκε σημαντικά βελτιωμένη στην ομάδα Cfz έναντι της ομάδας Btz (διάμεση τιμή 18.7 μήνες έναντι 9.4 μήνες αντίστοιχα, $p < 0.0001$). Η χορήγηση του Cfz [ενδοφλέβια έγχυση 30 min, σε δόση 20 mg/m² τις ημέρες 1 και 2 του κύκλου 1 και 56 mg/m² στις ακόλουθες χορηγήσεις – οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 1, 2, 8, 9, 15 και 16 – και Dex, σε δόση 20 mg από του στόματος ή ενδοφλέβια έγχυση, τις ημέρες 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22 και 23 του κύκλου 28 ημερών] εμφάνισε σημαντικά θεραπευτικά οφέλη. Η ανωτερότητα αυτή του Cfz παρατηρήθηκε ανεξαρτήτως του αν οι ασθενείς είχαν εκτεθεί σε Btz σε προηγούμενα θεραπευτικά σχήματα. Καρδιακή ανεπάρκεια – ανεπιθύμητη ενέργεια βαθμού ≥ 3 – εμφανίστηκε στο 5% των ασθενών στην ομάδα Cfz έναντι <2% στην ομάδα Btz. Οι θάνατοι οι οποίοι σχετίστηκαν με καρδιαγγειακά

αίτια κατά τη διάρκεια της θεραπείας ήταν ίδιοι και για τις δύο ομάδες (Cfz: 5 και Btz: 6) (Εικόνα 10) [47].

	Carfilzomib group (n=463)				Bortezomib group (n=456)			
	Grade 1 or 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5	Grade 1 or 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
Περιφερική νευροπάθεια ^a	77 (17%)	10 (2%)	0	0	198 (43%)	36 (8%)	1 (<1%)	0
Οξεία νεφρική ανεπάρκεια [†]	19 (4%)	15 (3%)	3 (<1%)	1 (<1%)	10 (2%)	11 (2%)	1 (<1%)	0
Καρδιακή ανεπάρκεια [‡]	16 (3%)	17 (4%)	3 (<1%)	2 (<1%)	5 (1%)	5 (1%)	1 (<1%)	2 (<1%)
Πνευμονία	9 (2%)	30 (6%)	1 (<1%)	1 (<1%)	12 (3%)	33 (7%)	1 (<1%)	2 (<1%)
Ισχαιμική καρδιακή νόσος [§]	4 (<1%)	5 (1%)	3 (<1%)	0	2 (<1%)	3 (<1%)	1 (<1%)	3 (<1%)
Πνευμονική υπέρταση	3 (<1%)	3 (<1%)	0	0	0	1 (<1%)	0	0

Παρουσίαση αποτελεσμάτων n (%). ^a Η περιφερική νευροπάθεια συμπεριλαμβάνει (κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας): περιφερική νευροπάθεια, περιφερική αισθητική νευροπάθεια, νευραλγία, μειωμένη δονητική αίσθηση, πολυνευροπάθεια, απώλεια αισθήσεων, αμυοτροφία, περιφερική κινητική νευροπάθεια, περιφερειακή αισθητηριοκινητική νευροπάθεια, αισθητηριακή διαταραχή και τοξική νευροπάθεια. [†] Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια συμπεριλαμβάνεται (κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας): οξεία νεφρική ανεπάρκεια, νεφρική ανεπάρκεια, νεφρική δυσλειτουργία, προνεφρική οξεία νεφρική ανεπάρκεια, ανουρία, ολιγουρία και προνεφρική ανεπάρκεια. [‡] Η καρδιακή ανεπάρκεια συμπεριλαμβάνεται (κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας): καρδιακή ανεπάρκεια, μειωμένο κλάσμα εξώθησης, πνευμονικό οίδημα, οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, οξύ πνευμονικό οίδημα, οξεία ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας, χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιοπνευμονική ανεπάρκεια, ανεπάρκεια δεξιάς κοιλίας, και ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας. [§] Η ισχαιμική καρδιακή νόσος συμπεριλαμβάνει (κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας): στηθάγχη, οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, έμφραγμα του μυοκαρδίου, αυξημένη τροπονίνη T, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, μυοκαρδιακή ισχαιμία, μυοκαρδιοπάθεια εκ στρες. ^{||} Η πνευμονική υπέρταση συμπεριλαμβάνεται (κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας): πνευμονική υπέρταση, ανεπάρκεια δεξιάς κοιλίας και πνευμονική αρτηριακή υπέρταση.

Εικόνα 10. Σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Ανεπιθύμητες ενέργειες (βαθμός ≥ 3) όπως υπέρταση, δύσπνοια, καρδιακή ανεπάρκεια, οξεία νεφρική ανεπάρκεια και πνευμονική υπέρταση παρατηρήθηκαν σε υψηλότερα ποσοστά στην ομάδα Cfz έναντι Btz [47].

Ο τελευταίος αναστολέας πρωτεασώματος που έλαβε έγκριση είναι το Ixz – ο πρώτος από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας [48]. Το Ixz εμφανίζει ευνοϊκή σχέση οφέλους – κινδύνου χορηγούμενο μία φορά την εβδομάδα [από του στόματος χορήγηση, σε δόση 4.0 mg, τις ημέρες 1, 8, 15 του μηνιαίου κύκλου] [κλινική μελέτη φάσης I/II, NCT01217957] [49]. Στη μελέτη TOURMALINE-MM1 [NCT01564537] στην οποία βασίστηκε η έγκριση του φαρμάκου η προσθήκη του Ixz (4 mg, po) στο θεραπευτικό σχήμα Len+Dex βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου και οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου ήταν περιορισμένες [50]. Παρόλη τη μικρή κλινική εμπειρία στη χρήση του Ixz, ενδέχεται να παρουσιάζει, κατά αντιστοιχία με τους άλλους αναστολείς πρωτεασώματος, φαινόμενα καρδιοτοξικότητας [51].

1.3.1 Νεώτεροι αναστολείς σε κλινικές μελέτες φάσης I/II

Το Opz είναι ένα δομικό ανάλογο του Cfz, το οποίο σε αντίθεση με το Cfz είναι διαθέσιμο για από του στόματος χορήγηση [52]. Το Opz εμφανίζεται ως 5 φορές λιγότερο ισχυρός αναστολέας του πρωτεασώματος· παρόλο αυτά, με θεραπευτικά σχήματα συχνότερης χορήγησης παρουσιάζει παρόμοια κυτταροτοξικότητα λόγω της

μη αναστρέψιμης δράσης του [53]. Οι κλινικές μελέτες φάσης I που έχουν πραγματοποιηθεί υποδεικνύουν ότι το Orz είναι καλώς ανεκτός αναστολέας του πρωτεασώματος – χωρίς φαινόμενα εμφάνισης ή επιδείνωσης περιφερικής νευροπάθειας – ενώ οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες φαίνεται να αφορούν στο γαστρεντερικό σύστημα, συμπεριλαμβάνοντας διάρροια, ναυτία και έμετο [NCT01416428, NCT01832727] [52, 54]. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα των κλινικών μελετών φάσης I υποδεικνύουν ικανοποιητική ανταπόκριση των ασθενών οι οποίοι έχουν προηγουμένως λάβει εντατικά θεραπευτικά σχήματα – απαιτούνται μεγαλύτερες κλινικές μελέτες για την επιβεβαίωση του ευρήματος [54, 55].

Το Mrz είναι ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας του πρωτεασώματος, παράγωγο β-λακτόνης, ο οποίος συνδέεται και στις 3 καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) [56]. Εμφανίζει μακρά διάρκεια δράσης και αυξημένη κυτταροτοξικότητα, ακόμα σε κυτταρικές σειρές οι οποίες έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο Btz. Επιπλέον, εμφανίζει σημαντική συνεργιστική *in vitro* δράση με ανοσορρυθμιστικά φάρμακα [57], καθώς επίσης και με το Btz. Λαμβάνοντας υπόψη τα προκλινικά δεδομένα συνεργιστικής δράσης και το διαφορετικό προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών των Mrz και Btz, η συγχορήγησή τους ενδέχεται να αποτελέσει μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση [58]. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το Mrz περιλαμβάνουν κόπωση, γαστρεντερικές διαταραχές, ζάλη και κεφαλαλγία· ενώ δεν παρατηρούνται περιστατικά περιφερικής νευροπάθειας ή θρομβοκυτταροπενίας [59]. Ωστόσο, τα μέχρι στιγμής κλινικά δεδομένα είναι περιορισμένα.

Ο αναστρέψιμος αναστολέας Dlz – βορονικό παράγωγο, δομικό ανάλογο του Btz – σε προκλινικές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχει εμφανίσει αντικαρκινικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του Btz [57]. Επιπλέον, σε κλινικές μελέτες φάσης I βρέθηκε καλώς ανεκτό στους ασθενείς, με κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια το δερματικό εξάνθημα, χωρίς φαινόμενα νευροτοξικότητας [60]. Ωστόσο, σε πολυκλινική μελέτη φάσης I/II, η οποία αποσκοπούσε στον καθορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης και του προφίλ ασφάλειας και αποτελεσματικότητας σε ασθενείς με υποτροπιάζον πολλαπλό μυέλωμα, διακόπηκε η φάση II, λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας του φαρμάκου [61].

1.4 Καρδιοτοξικότητα αναστολέων πρωτεασώματος

Σύμφωνα με τις πρόσφατες παρατηρήσεις που έγιναν για φαινόμενα οξείας καρδιακής ανεπάρκειας από τη χρήση του Ixz, ενδέχεται οι αναστολείς πρωτεασώματος να εμφανίζουν καρδιοτοξικότητα η οποία σχετίζεται με τη φαρμακευτική κατηγορία (class effect) – γεγονός το οποίο όμως παραμένει να αποδειχθεί [51, 62]. Το Cfz είναι ο αναστολέας πρωτεασώματος ο οποίος σχετίζεται σε σημαντικά ποσοστά με φαινόμενα καρδιακής ανεπάρκειας: ο όρος που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία είναι γενικός και ομαδοποιεί φαινόμενα καρδιακής ανεπάρκειας, μειωμένου κλάσματος εξώθησης, πνευμονικού οιδήματος, οξείας καρδιακής ανεπάρκειας, συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας, οξέος πνευμονικού οιδήματος, οξείας ανεπάρκειας της αριστερής κοιλίας, χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, καρδιοπνευμονικής ανεπάρκειας [47, 63].

Στα πλαίσια της διαχείρισης των καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών προτείνεται ότι οι ασθενείς με προϋπάρχουσα καρδιαγγειακή νόσο και όσοι βρίσκονται σε ηλικία μεγαλύτερη των 75 ετών, οι οποίοι αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρδιοτοξικότητας, θα πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη ιατρική αξιολόγηση πριν την έναρξη της θεραπείας, συμπεριλαμβανομένης καταγραφής της αρτηριακής πίεσης, η οποία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 140 mm Hg. Η χορήγηση του Cfz συνίσταται να πραγματοποιείται σε έγχυση 30 min – χορήγηση του φαρμάκου σε μικρότερο χρόνο (10 min) μπορεί να εξεταστεί μετά από 1 ή 2 κύκλους θεραπείας εφόσον δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Σε περίπτωση εμφάνισης καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών (ιδιαίτερα βαθμού ≥ 3) οι επόμενες χορηγήσεις Cfz αναβάλλονται μέχρι ανάρρωσης. Η εκ νέου χορήγηση Cfz μπορεί να εξεταστεί, σε μειωμένη δόση, ύστερα από αξιολόγηση της σχέσης οφέλους – κινδύνου και με τη συνεχή παρακολούθηση από καρδιολόγο [64, 65].

Σε υπομελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της ENDEAVOR, έγιναν κατά σειρά υπερηχογραφήματα σε 75 ασθενείς από την ομάδα Cfz και 76 από την ομάδα Btz. Στο συγκεκριμένο υποπληθυσμό εμφανίστηκαν ανάλογα ποσοστά εκδήλωσης καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών (καρδιακή ανεπάρκεια, Cfz: 10.8%, Btz: 4.1%). Πρωτεύον τελικό σημείο ορίστηκε η σημαντική μείωση του κλάσματος

εξώθησης από την έναρξη της θεραπείας – μείωση $\geq 10\%$ για τους ασθενείς με κλάσμα εξώθησης $\leq 55\%$ στο αρχικό σημείο ή πτώση $< 45\%$ για τους ασθενείς με κλάσμα εξώθησης $> 55\%$ στην έναρξη της θεραπείας. Παρόλο αυτά, με την υπερηχογραφική αξιολόγηση των ασθενών έγινε πρόωμη αναγνώριση μόλις ενός ασθενή από την ομάδα Btz υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη στρατηγική αποτυγχάνει να ανιχνεύσει δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας που προκαλείται από το Cfz πριν από την κλινική παρουσίαση του συμπτώματος [66].

Φαίνεται ότι η πιθανότητα ή η χρονική στιγμή εμφάνισης της καρδιοτοξικότητας από τη χρήση Cfz δεν είναι προβλέψιμες βάσει υπερηχογραφικής αξιολόγησης, ενώ και η χρήση του NT-proBNP ως προγνωστικό βιοδείκτη δεν έχει δείξει καλή συσχέτιση καθώς επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους όπως η ενυδάτωση του οργανισμού, η χρήση στεροειδών και η νεφρική λειτουργία [67]. Συνεπώς, οι προκλινικές μελέτες για την επαγόμενη από Cfz καρδιοτοξικότητα οι οποίες θα διαλευκάνουν τον υποκείμενο μοριακό μηχανισμό και θα αναγνωρίσουν μοριακούς βιοδείκτες αλλά και στόχους για καρδιοπροστατευτικές παρεμβάσεις αποτελούν αναγκαιότητα.

1.5 Προκλινικά δεδομένα για την επαγόμενη από Cfz καρδιοτοξικότητα

Μελέτες τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν σε νεογνικά καρδιομυοκύτταρα επίμυων για τους αναστολείς πρωτεασώματος, Btz και Cfz, παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξικότητα, η οποία εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης στα φάρμακα. Το Cfz, ανεξάρτητα από τη μη αναστρέψιμη δέσμευση στο πρωτεάσωμα, εμφανίζει κυτταροτοξική δράση στο συγκεκριμένο *in vitro* μοντέλο σε υψηλότερες συγκεντρώσεις έναντι του Btz. Πράγματι, όπως επιβεβαιώνεται από την ενεργότητα των κασπασών 3/7, το Btz εμφανίζει σημαντική ενεργοποίηση των κασπασών 3/7 σε συγκεντρώσεις από 0.1 μM και μεγαλύτερες, ενώ το Cfz απαιτεί συγκέντρωση τουλάχιστον 1 μM [68].

Όσον αφορά τις *in vivo* μελέτες σε πειραματικά μοντέλα μεταφραστικής σημασίας, η μοναδική μελέτη για την επίδραση των αναστολέων πρωτεασώματος στην καρδιακή λειτουργία με υπερηχογραφική παρακολούθηση της καρδιακής λειτουργίας έχει πραγματοποιηθεί για το Btz. Συγκεκριμένα, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε επίμυες και μύες, και αναφέρεται ότι παρατηρείται σημαντική μείωση της συσταλτικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας (με μείωση του κλάσματος εξώθησης) καθώς και ιστολογικές βλάβες [69].

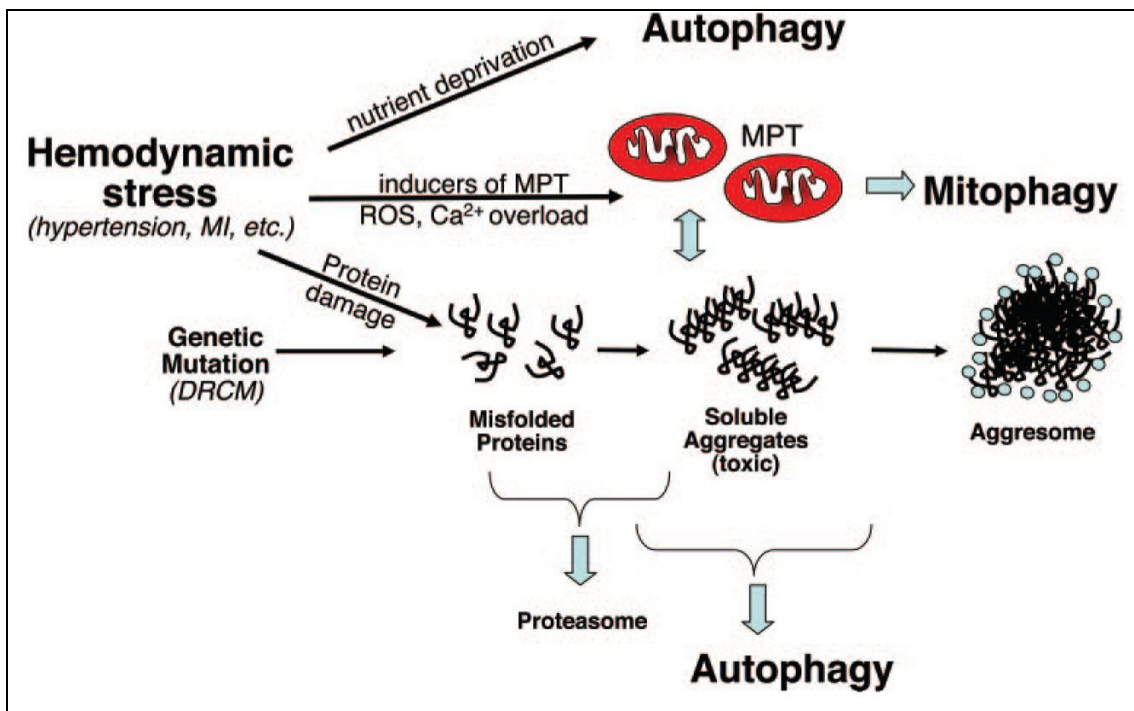
Αντιθέτως στις *in vivo* μελέτες της επαγόμενης από Cfz καρδιοτοξικότητας που έχουν πραγματοποιηθεί δεν έχει γίνει υπερηχογραφική αξιολόγηση ώστε να υπάρχει εύρημα το οποίο να επιβεβαιώνει την καρδιακή δυσλειτουργία, όπως αυτή παρατηρείται στους ασθενείς [70-72]. Οι δύο εκ των παραπάνω μελετών επικεντρώθηκαν κυρίως στη διερεύνηση δεικτών οξειδωτικού στρες (MDA, GSH) και ενζύμων τα οποία αποτελούν δείκτες μυοκαρδιακής βλάβης και νέκρωσης [73]. Η φαρμακολογική παρέμβαση στις συγκεκριμένες μελέτες περιελάμβανε παράγοντες οι οποίοι κυρίως δρουν μέσω μείωσης του οξειδωτικού στρες: το dexrazoxane (Dzr) και το βιοφλαβονοειδές παράγωγο rutin (vitamin P). Το Dzr δεσμεύει μέσω χηλικών συμπλόκων το σίδηρο που απελευθερώνεται κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση και μειώνει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου, ενώ ο rutin ασκεί επίσης αντιοξειδωτικές δράσεις λόγω της πολυφαινολικής του δομής [70, 72]. Μία ακόμη μελέτη έχει πραγματοποιηθεί εστιάζοντας στις ίδιες παραμέτρους και μελετώντας επιπλέον τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB, με τη χρήση της apremilast (AP) ως προστατευτικού παράγοντα [71]. Συγκεκριμένα, η AP ως αναστολέας φωσφοδιεστερασών (PDE4) μέσω αύξησης των επιπέδων cAMP ενδέχεται να εμφανίζει δράσεις μεσολαβούμενες από την PKA κινάση, οι οποίες χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης ως προς τη συσχέτιση με τον μηχανισμό καρδιοτοξικότητας από Cfz [74]. Στις παραπάνω μελέτες, οι προστατευτικοί παράγοντες (Dzr, rutin, AP) οδήγησαν πράγματι σε βελτίωση των δεικτών οι οποίοι μελετήθηκαν. Παρόλο αυτά, οι συγκεκριμένοι παράγοντες ασκούν κυρίως μη ειδικές δράσεις έναντι δεικτών του οξειδωτικού στρες και συνεπώς δεν είναι εφικτό να υπάρξει κάποια διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού καρδιοτοξικότητας.

1.6 Σηματοδοτικό μονοπάτι Akt/eNOS και αναστολή πρωτεασώματος

Η Akt είναι μία αντι-αποπτωτική κινάση η οποία έχει καθοριστικό ρόλο στη μοριακή σηματοδότηση των μυοκαρδιακών κυττάρων [75]. Όσον αφορά τους καθοδικούς στόχους της Akt, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η eNOS. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί *in vitro* ότι η αναστολή του πρωτεασώματος μειώνει σημαντικά τόσο τον αριθμό όσο και τη φυσιολογική λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει τη μείωση της eNOS και της ακόλουθης παραγωγής NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα [76]. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι κατά την αναστολή του πρωτεασώματος μειώνεται σημαντικά – περίπου στο 50% - η ικανότητα των φαρμακολογικών αγωνιστών της eNOS να αυξάνουν την ενεργότητά της [77]. Η αναστολή της eNOS και η διαταραχή στην ομοίωση του NO οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και μειωμένη ικανότητα αγγειοδιαστολής. Πράγματι, έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα ισχαιμικής καρδιακής νόσου κατά τη θεραπεία με Btz [78], αλλά και φαινόμενα υπέρτασης με τη χρήση Btz και Cfz [67]. Τέλος, για την πληρέστερη περιγραφή της πιθανής διαταραχής της ομοίωσης του NO προσδιορίστηκε και η iNOS, η οποία σχετίζεται με την παρουσία μονοκυττάρων και την ύπαρξη φλεγμονής. Τα μονοκύτταρα εντείνουν το αγγειακό οξειδωτικό στρες μέσω αυξημένης έκφρασης της iNOS και απορρύθμισης της eNOS/NO σύνθεσης [79]. Η διατήρηση της ομοίωσης του NO είναι καθοριστικής σημασίας για τη λειτουργία του ενδοθηλίου και τη διατήρηση του φυσιολογικού αγγειακού τόνου. Η σύνθεση του NO πραγματοποιείται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα με την μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτροουλίνη από την eNOS – απαραίτητο συνένζυμο για τη διαδικασία αυτή είναι η τετραϋδροβιοπτερίνη (BH4) [80]. Η επαγωγή της έκφρασης της iNOS, η οποία σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις και την παρουσία φλεγμονής, οδηγεί σε μείωση της διαθεσιμότητας της BH4 για την eNOS και επακόλουθη μείωση του παραγόμενου από της eNOS NO. Παράλληλα, σχετίζεται και με την επαγωγή οξειδωτικού στρες [81]. Η αύξηση της iNOS έχει συσχετιστεί με κυτταρικές βλάβες, μειωμένη σύνθεση DNA και επαγωγή κυτταρικού θανάτου κατά την εκδήλωση καρδιοτοξικότητας· η φαρμακολογική καταστολή της iNOS βελτιώνει τις ιστολογικές και λειτουργικές βλάβες [82].

1.7 Αυτοφαγία και αναστολή πρωτεασώματος

Τα μυοκαρδιακά κύτταρα στηρίζουν σε σημαντικό βαθμό την επιβίωσή τους στη λειτουργία του πρωτεασώματος, ώστε να διατηρήσουν την πρωτεόσταση και να πραγματοποιηθεί η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών με λάθος στην αναδίπλωση, οι οποίες οδηγούν σε καρδιακό στρες και σχετίζονται με την εμφάνιση μυοκαρδιοπάθειας. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί σε in vivo μοντέλο μυών ότι η αδυναμία του πρωτεασώματος να ανταπεξέλθει στις καταβολικές διεργασίες του κυττάρου οδηγεί σε καρδιακή δυσλειτουργία με διάταση της αριστερής κοιλίας και προοδευτική εξέλιξη της καρδιακής αναδιαμόρφωσης [83]. Η αυτοφαγία είναι μία διαδικασία λυσοσωμικής αποικοδόμησης η οποία έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στην καρδιακή πρωτεόσταση. Επιτελεί αποικοδόμηση πρωτεϊνών, συσσωματωμάτων πρωτεϊνών και κυτταρικών οργανιδίων, τα οποία δεν δύναται να αποικοδομηθούν στο πρωτεάσωμα (Εικόνα 11) [84].



Εικόνα 11. Διατήρηση πρωτεόστασης από τη λειτουργία του πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας [84].

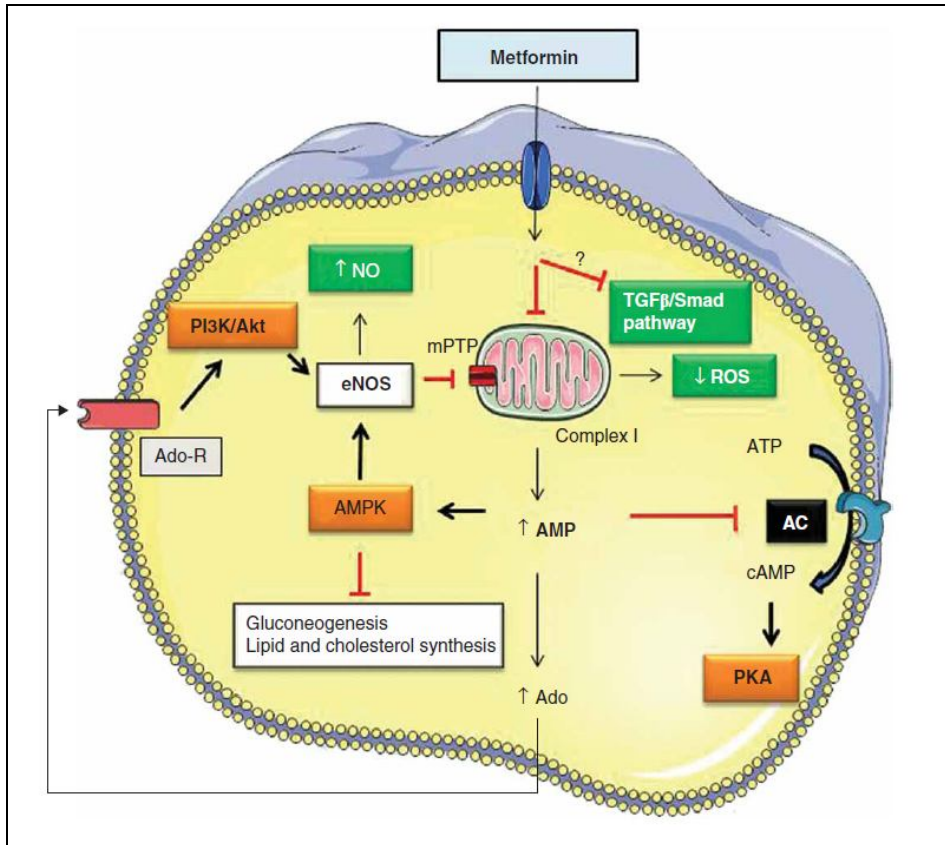
Καθοριστική για τη ρύθμιση της αυτοφαγίας στον μυοκαρδιακό ιστό είναι η AMPKα κινάση, η οποία ρυθμίζει το σύμπλεγμα mTORC1. Η ενεργοποίηση της AMPKα οδηγεί σε φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης Raptor στο σύμπλεγμα mTORC1. Η φωσφορυλίωση του Raptor προκαλεί αναστολή του mTOR και κατά συνέπεια διατήρηση της αυτοφαγίας [85]. Πράγματι, σε *in vivo* μοντέλα διαβητικών μυών, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση της AMPKα οδηγεί σε ενίσχυση της αυτοφαγίας στον μυοκαρδιακό ιστό, όπως αυτή παρατηρείται από την αύξηση του αυτοφαγικού δείκτη LC3-II, και βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας [86].

Η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών έχει καθοριστικό ρόλο στις φυσιολογικές λειτουργίες της καρδιάς. Στη ρύθμιση αυτή συμμετέχουν οι φωσφατάσες, οι οποίες αποκόπτουν τις φωσφορυλιώσεις που κάνουν οι κινάσες [87]. Η PP2A είναι μία φωσφατάση που εκφράζεται στον μυοκαρδιακό ιστό και έχει βρεθεί ότι η ρύθμισή της, κυρίως σε επίπεδο έκφρασης των υπομονάδων της, διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ φυσιολογικής καρδιακής λειτουργίας και σε καταστάσεις καρδιακής ανεπάρκειας [88]. Επιπλέον, η έκφραση αλλά και η ενεργότητα της PP2A σε *in vivo* μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας φαίνεται να σχετίζεται με τη συσταλτική ικανότητα της καρδιάς [89]. Τόσο η Akt όσο και η AMPKα αποτελούν υποστρώματα της PP2A η οποία μειώνει τη φωσφορυλίωσή τους, οδηγώντας σε αναστολή [87, 90].

1.8 Μετφορμίνη

Η μετφορμίνη (metformin, Met) είναι ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φάρμακα για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Στην προοπτική μελέτη UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) για πρώτη φορά αποδείχθηκε ότι η Met ασκεί προστατευτικές δράσεις επί του καρδιαγγειακού συστήματος πέραν της ρύθμισης της γλυκόζης. Συγκεκριμένα η έγκαιρη χορήγηση Met στη θεραπεία του διαβήτη μείωσε σημαντικά τις σχετιζόμενες με τον διαβήτη αγγειακές βλάβες, την εμφάνιση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου καθώς και τη θνησιμότητα που σχετίζεται με τον διαβήτη [91]. Η μελέτη UKPDS υπήρξε η αφορμή για την πραγματοποίηση πολλών τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών σε ασθενείς χωρίς διαβήτη τύπου 2 προς μελέτη των επιδράσεων της Met στην καρδιαγγειακή νόσο. Παρόλο που το συνολικό αποτέλεσμα των μελετών είναι αμφιλεγόμενο, υπάρχουν σημαντικές μελέτες στις οποίες εμφανίζονται καρδιαγγειακά οφέλη από τη μακροχρόνια χορήγηση της Met [92]. Συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η Met εμφανίζει προστατευτικές δράσεις επί του καρδιαγγειακού συστήματος, οδηγώντας σε μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου και της θνησιμότητας ύστερα από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σε σύγκριση με άλλες αντιδιαβητικές θεραπείες – όπως π.χ. τις σουλφονουλουρίες [93, 94].

Σε προκλινικό επίπεδο – όπου υπάρχει ισχυρή ένδειξη σχετικά με τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις – αποδεικνύεται πως ο σημαντικότερος μοριακός στόχος της Met είναι η AMPKα κινάση, η οποία έχει καθοριστικό ρόλο επί της ρύθμισης του ενεργειακού μεταβολισμού του κυττάρου (Εικόνα 12). Έχει αποδειχθεί ότι η Met μέσω ενεργοποίησης της AMPKα προστατεύει το μυοκάρδιο έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης τόσο σε υγιείς όσο και διαβητικούς μύες [95]. Επιπλέον, η Met μέσω – της μεσολαβούμενης από την AMPKα – ενεργοποίησης της αυτοφαγίας προστατεύει έναντι της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων [96] και βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία *in vivo* [86].



Εικόνα 12. Μηχανισμός δράσης της Met και βασικοί μοριακοί στόχοι. AC: Adenylate cyclase, Ado: Adenosine, Ado-R: Adenosine receptor, AMPK: AMP kinase, eNOS: Endothelial nitric oxide synthase, mPTP: Mitochondrial permeability transition pore, NO: Nitric oxide, PI3K: Phosphoinositide-3-kinase, PKA: Protein kinase A, ROS: Reactive oxygen species [97].

Η Met διαθέτει επίσης προστατευτικές δράσεις για το ενδοθήλιο μέσω βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας του NO και αγγειοδιαστολής, ενώ παράλληλα μπορεί να σχετίζεται και με μείωση της αρτηριακής πίεσης – δράση η οποία δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως στην κλινική πράξη [97]. Συγκεκριμένα, μέσω της μεσολαβούμενης από AMPK/eNOS αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας του NO, η Met βρέθηκε ότι βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία σε αορτές επίμυων καθώς επίσης και ότι μειώνει το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή τόσο σε υγιή όσο και σε πειραματόζωα που λάμβαναν υπερχοληστερολαιμική διαίτα [98].

ΣΚΟΠΟΣ

Οι αναστολείς πρωτεασώματος αποτελούν τη ραχοκοκαλιά της θεραπείας του πολλαπλού μυελώματος – ενός αιματολογικού τύπου καρκίνου με σημαντικό επιπολασμό στον πληθυσμό, που αφορά στο 1.6% της εμφάνισης καρκίνου και σε ηλικιωμένους ασθενείς. Συγκεκριμένα το Cfz έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών και ενδείκνυται για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος και ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος.

Ωστόσο, παρά το σημαντικό θεραπευτικό όφελος από τη χρήση του Cfz, ο συγκεκριμένος αναστολέας πρωτεασώματος έχει συσχετιστεί με σημαντικά ποσοστά καρδιοτοξικότητας, η οποία εκδηλώνεται συχνότερα ως καρδιακή ανεπάρκεια με μειωμένο κλάσμα εξώθησης από τις πρώτες κιόλας χορηγήσεις του φαρμάκου. Στην τρέχουσα κλινική πράξη υπάρχει αδυναμία πρόβλεψης της εμφάνισης καρδιοτοξικότητας καθώς και στοχευμένης αντιμετώπισης.

Συνεπώς, παρά το επιβεβαιωμένο θεραπευτικό όφελος του Cfz, υπάρχει ανάγκη για τη διεξαγωγή προκλινικών μελετών προς διαλεύκανση του μηχανισμού καρδιοτοξικότητας και εύρεση φαρμακολογικής προστασίας.

Τα μέχρι στιγμής *in vivo* πειραματικά δεδομένα μελετούν την επαγόμενη από Cfz καρδιοτοξικότητα και προτείνουν παρεμβάσεις βάσει δεικτών οξειδωτικού στρες και ιστικής βλάβης, χωρίς να λαμβάνουν υπόψη ή να επιβεβαιώνουν την καρδιακή δυσλειτουργία καθώς και χωρίς να παρέχουν λεπτομερή περιγραφή του μοριακού μηχανισμού καρδιοτοξικότητας.

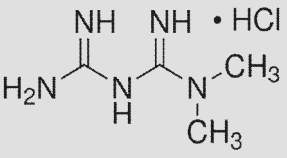
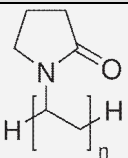
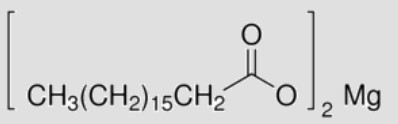
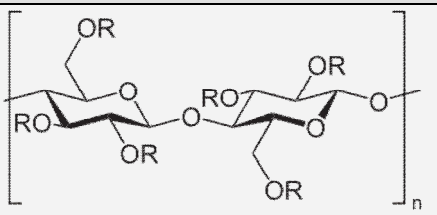
Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ⁽¹⁾ η καθιέρωση ενός *in vivo* πειραματικού μοντέλου επαγόμενης από Cfz καρδιοτοξικότητας, ⁽²⁾ η διερεύνηση του μηχανισμού καρδιοτοξικότητας και η αναγνώριση φαρμακολογικών στόχων καρδιοπροστασίας, ⁽³⁾ η διερεύνηση της πιθανής προστατευτικής δράσης και του μηχανισμού καρδιοπροστασίας από Met, όπως αυτή πρόέκυψε από τα αρχικά αποτελέσματα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

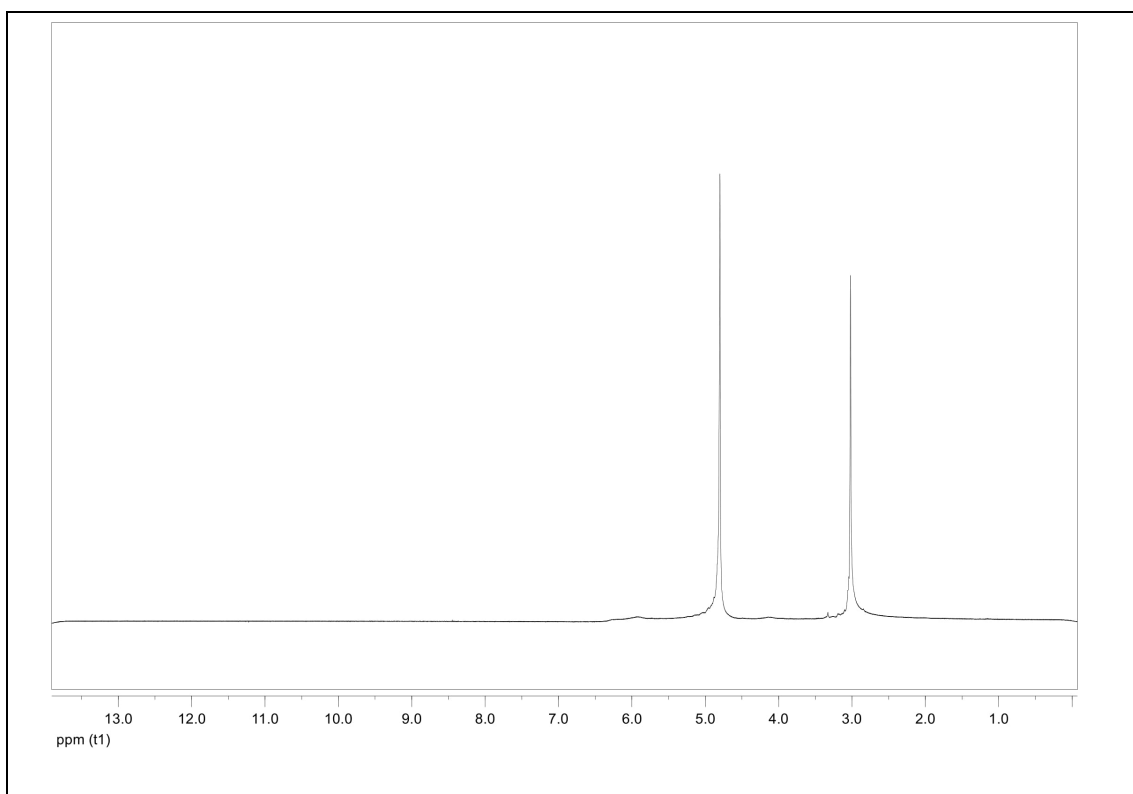
2.1 Φαρμακολογικοί παράγοντες

Το Cfz (Kyprolis® PD.SOL.INF 60MG/VIAL, Amgen) παραχωρήθηκε ευγενικά από τον Τομέα Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η υδροχλωρική Met απομονώθηκε από το εμπορικό σκεύασμα Glucophage® (F.C.TAB 1000MG/TAB, Merck) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Σύσταση δισκίου Glucophage®. Συστατικά και χημικές δομές συστατικών βάσει των οποίων πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της Met.

Συστατικό	Χημική δομή
<i>metformin hydrochloride</i>	
<i>povidone K30</i>	
<i>magnesium stearate</i>	
<i>hypromellose</i>	 <p>R = -H, -CH₃, -CH₂-CHOH-CH₃</p>

Κονιοποιημένα δισκία διαλυτοποιήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη (-80°C), το διάλυμα διηθήθηκε μέσω ηθμού τύπου Buchner και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε (15 min, 4000 rpm, 4°C). Το ίζημα ξηράθηκε και λήφθηκε δείγμα, διαλυτοποιήθηκε σε δευτεριωμένο νερό (D2O) και έγινε ταυτοποίηση με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹NMR). Το φάσμα ¹NMR (Εικόνα 13) λήφθηκε χρησιμοποιώντας φασματόμετρο 600 MHz Avance III (Bruker Co.) και επιβεβαιώθηκε βάσει βιβλιογραφίας.



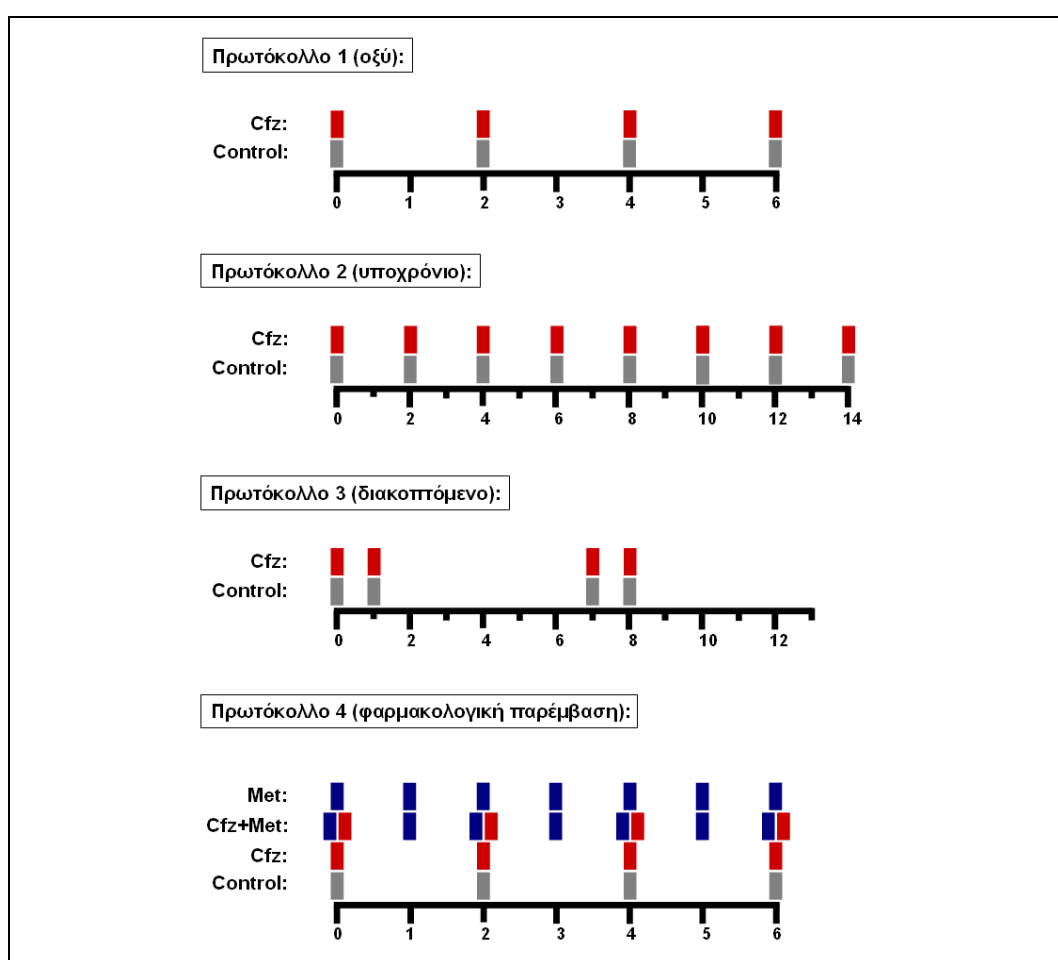
Εικόνα 13. Φάσμα ^1NMR υδροχλωρικής Met. Η μέθοδος απομόνωσης υδροχλωρικής Met από το σκεύασμα Glucophage® οδήγησε σε καθαρή υδροχλωρική Met, όπως αποδεικνύεται από το φάσμα ^1NMR που λήφθηκε σε D_2O με την χρήση φασματόμετρου 600 MHz Avance III (Bruker Co.).

2.2 Επιλογή δόσεων

Για την επιλογή δόσεων που χορηγήθηκαν στους μύες λήφθηκαν υπόψη τόσο *in vivo* πειραματικά δεδομένα από υπάρχουσες μελέτες σε επίμυες (4 mg/kg, ip) [70, 71] όσο και δόσεις οι οποίες χορηγούνται στην κλινική πράξη στους ασθενείς (27 mg/m², 56 mg/m²) [47, 99]. Οι μετατροπές δόσεων μεταξύ των πειραματοζώων και των ασθενών πραγματοποιήθηκαν με καθορισμένες εξισώσεις αλλομετρικής κλιμάκωσης [100]. Το Cfz χορηγήθηκε στους μύες σε δόση 8 mg/kg, ip. Οι κλινικές μελέτες που διερευνούν τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις της Met χρησιμοποιούν δόσεις 850 mg και 500 mg υδροχλωρικής Met δύο φορές την ημέρα στους ασθενείς [101, 102]. Κατ' αντιστοιχία, υδροχλωρική Met χορηγήθηκε στους μύες σε δόση 140 mg/kg po, κάθε 24 ώρες (με τη μέθοδο ορογαστρικής σίτισης με καθετήρα – gavage)· δόση ισοδύναμη με 1000 mg υδροχλωρικής Met στον άνθρωπο. Όταν Cfz και Met χορηγούνταν την ίδια μέρα, η χορήγηση της Met προηγούταν κατά 30 min. Οι ομάδες Control έλαβαν 100 μL ή / και 200 μL φυσιολογικού ορού 0.9% (NS, normal saline) για την ενδοπεριτοναϊκή και από του στόματος χορήγηση αντίστοιχα.

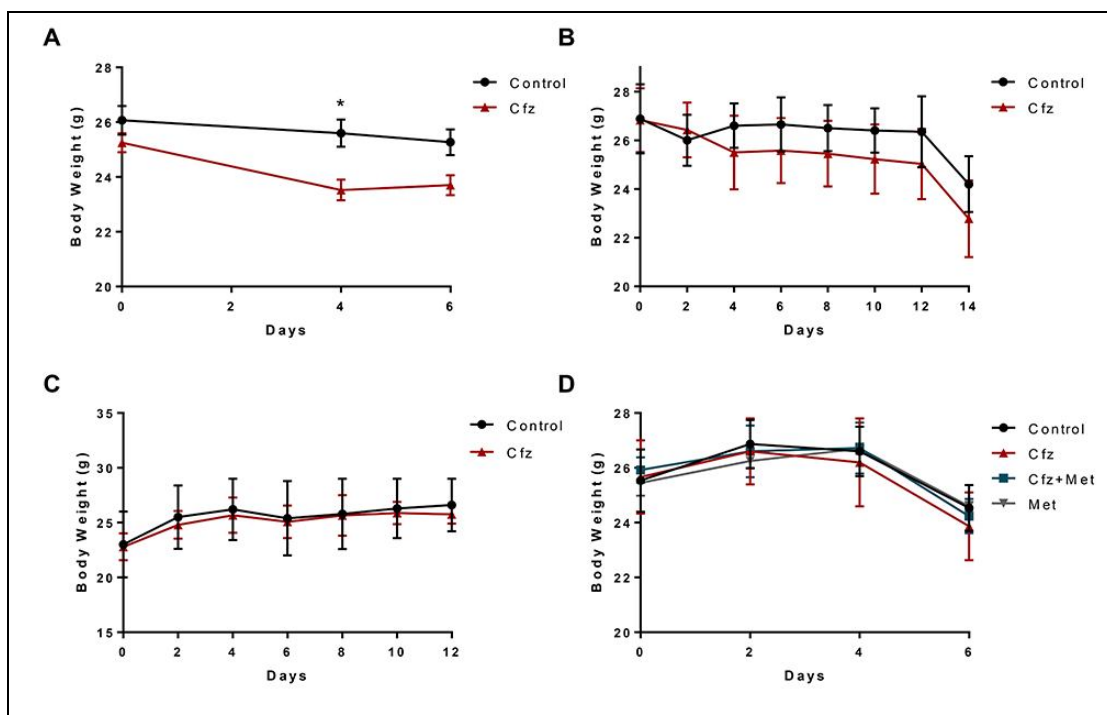
2.3 Ζωικό πρότυπο μυών

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας σε όλα τα πειράματα – χρησιμοποιήθηκε ζωικό πρότυπο μυών της φυλής C57BL/6 (Εικόνα 14). Οι μύες είναι τα θηλαστικά ζώα με τον κατώτερο βαθμό νευροφυσιολογικής ευαισθησίας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το μοντέλο καρδιοτοξικότητας, και κρίνονται απαραίτητοι ώστε να προκύψουν αξιόπιστα επιστημονικά αποτελέσματα για τη χρήση νέων φαρμακολογικών παρεμβάσεων (αντικατάσταση – replacement).



Εικόνα 14. Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα εργασίας των πειραματικών πρωτοκόλλων.

Αρσενικοί C57BL/6 μύες, ηλικίας 12 εβδομάδων (νεαροί ενήλικοι), (24.29 ± 0.2893 g), στεγάστηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες, με ελεγχόμενη θερμοκρασία δωματίου ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), υγρασία ($55 \pm 10\%$) και στο συνήθη κύκλο έκθεσης σε φως/σκοτάδι (12 ωρών). Πραγματοποιήθηκε καθημερινή καταγραφή του σωματικού βάρους για τη χορήγηση της ακριβούς δοσολογίας των φαρμάκων (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Διακυμάνσεις σωματικού βάρους. Το σωματικό βάρος των μυών δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων. **A.** Πρωτόκολλο 1 ($p < 0.05$) **B.** Πρωτόκολλο 2 **C.** Πρωτόκολλο 3 **D.** Πρωτόκολλο 4.

Στα κλουβιά υπήρχε διαθέσιμη τροφή και νερό με ελεύθερη πρόσβαση κατά βούληση (*ab libitum*). Χρησιμοποιήθηκε στατιστικό πρόγραμμα ώστε να προσδιοριστεί ο μικρότερος δυνατός αριθμός πειραματοζώων χωρίς να επηρεαστούν τα ερευνητικά αποτελέσματα (*μείωση – reduction*). Τέλος, οι μύες παρακολουθούνταν και γινόταν καθημερινή αξιολόγηση της ευζωίας των πειραματοζώων, ώστε να επιτευχθεί η μικρότερη δυνατή ταλαιπωρία (*βελτίωση – refinement*). Όλες οι πειραματικές διαδικασίες έλαβαν την έγκριση του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών όπου στεγάστηκαν τα πειραματόζωα (*Αρ. Πρωτ. 1757, Αθήνα 04/04/2017*).

2.3.1. Πρωτόκολλο 1 – Οξεία χορήγηση

Μύες τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control ($n=7$) και Cfx ($n=8$). Χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και Cfx (8 mg/kg, *ip*) αντίστοιχα, κάθε 48 ώρες για διάστημα 6 ημερών λαμβάνοντας συνολικά 4 χορηγήσεις. Σκοπός του Πρωτοκόλλου 1 ήταν α) η επιβεβαίωση της καταλληλότητας της χορηγούμενης δόσης, β) η παρακολούθηση της καρδιακής λειτουργίας προς έλεγχο επίδρασης της οξείας χορήγησης.

2.3.2 Πρωτόκολλο 2 – Υποχρόνια χορήγηση

Μύες τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control (n=5) και Cfz (n=8). Χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και Cfz (8 mg/kg, ip) αντίστοιχα, κάθε 48 ώρες για διάστημα 14 ημερών, λαμβάνοντας συνολικά 8 χορηγήσεις. Σκοπός του *Πρωτοκόλλου 2* ήταν η πληρέστερη περιγραφή και εξέλιξη της καρδιακής βλάβης η οποία επάγεται από το Cfz σε υποχρόνια χορήγηση, όπως έχει πραγματοποιηθεί σε μελέτες του εργαστηρίου μας για την επαγόμενη από δοξορουβικίνη (doxorubicin, Dox) καρδιοτοξικότητα [82].

2.3.3 Πρωτόκολλο 3 – Διακοπτόμενη χορήγηση (οξεία και υποχρόνια)

Μύες τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control (n=6) και Cfz (n=5). Χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και Cfz (8 mg/kg, ip) αντίστοιχα στις ημέρες 0, 1 και 7, 8. Οι μύες πέρασαν περιόδους έκπλυσης (washout) τις ημέρες 1-7 και 8-13. Υπερηχογραφική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 0, 6 και 13. Σκοπός του *Πρωτοκόλλου 3* ήταν η εξέταση της διακοπτόμενης χορήγησης δύο συνεχόμενων δόσεων· δεδομένου ότι η θεραπεία των ασθενών απαιτεί χορηγήσεις τις ημέρες 1, 2, 8, 9, 15 και 16 κάθε μηνιαίου κύκλου [46].

2.3.4 Πρωτόκολλο 4 – Φαρμακολογική παρέμβαση

Μύες τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες Control (n=8), Cfz (n=8), Cfz+Met (n=8) και Met (n=4). Χορηγήθηκε Cfz (8 mg/kg, ip) κάθε 48 ώρες και Met (140 mg/kg, po) κάθε 24 ώρες για διάστημα 6 ημερών. Τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας καταγράφηκαν τις ημέρες 0 και 6. Σκοπός του *Πρωτοκόλλου 4* – σύμφωνα με το μοριακό μηχανισμό καρδιοτοξικότητας, όπως αυτός μελετήθηκε στο *Πρωτόκολλο 1* – ήταν α) η μελέτη της προστατευτικής δράσης της Met μέσω της υπερηχογραφικής αξιολόγησης και β) η μελέτη του μοριακού μηχανισμού καρδιοπροστασίας.

2.4 Υπερηχογραφική αξιολόγηση

Στην έναρξη και το τέλος των χορηγήσεων των παραπάνω πρωτοκόλλων, οι μύες υποβλήθηκαν σε αναισθησία (ketamine, 100 mg/kg ip) και πραγματοποιήθηκε υπερηχογραφική αξιολόγηση της καρδιακής λειτουργίας χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υπερήχων (Vivid 7, GE Healthcare, USA) με γραμμικό μετατροπέα 13-MHz [103]. Υπολογίστηκαν οι εξής παράμετροι: καρδιακός ρυθμός (heart rate, HR), τελοδιαστολική και τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας (left ventricular end-diastole and end-systole diameter, LVEDD, LVESD), πάχος οπίσθιου τοιχώματος της αριστερής κοιλίας στη διαστολή και συστολή (left ventricular posterior wall thickness at diastole and systole, LVPWd, LVPWs), επί τοις εκατό κλάσμα συστολικής βράχυνσης (fractional shortening, FS % = (LVEDD - LVESD) / LVEDD * 100%) και ο λόγος της ακτίνας της αριστερής κοιλίας προς το πάχος του οπίσθιου τοιχώματος (left ventricular radius to posterior wall thickness ratio, r/h).

2.5 Συλλογή ιστών

Οι μύες υποβλήθηκαν σε βαθιά αναισθησία (ketamine, 300 mg/kg ip), θανατώθηκαν ακαριαία και πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος, μέσω παρακέντησης του περικαρδίου, για τη μέτρηση της ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών. Δείγματα μυοκαρδιακού ιστού λήφθηκαν για ιστοπαθολογική αξιολόγηση και περαιτέρω ανάλυση των μοριακών μηχανισμών σηματοδότησης.

2.5.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος

Τα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) απομονώθηκαν με τη χρήση Lymphosep (πυκνότητας 1.077 g/ml, Biosera) από το ολικό αίμα, το αίμα αραιώθηκε (1:1) με PBS (phosphate-buffered saline). Το αραιωμένο αίμα απλώθηκε προσεκτικά στο διαχωριστικό μέσο (1/2 επί τον όγκο του δείγματος). Αφού διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (400 g, 30 min, 20°C). Τα PBMCs συλλέχθηκαν με απομάκρυνση των υπερκείμενων στοιβάδων. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και ακολούθησε η μέτρηση ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών.

2.6 Μέτρηση ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών

Με σκοπό την επιβεβαίωση της δόσης που επιλέχθηκε για το Cfz, η ενεργότητα της CT-L (LLVY/β5, καθοριστική ρυθμού αποικοδόμησης πρωτεϊνών) πρωτεασωμικής πεπτιδάσης προσδιορίστηκε στον μυοκαρδιακό ιστό και στα PBMCs, με τη χρήση μεθόδου πεπτιδίου φθορισμού [104]. Για τη μέτρηση της ενεργότητας των πρωτεασωμικών πεπτιδασών, μυοκαρδιακός ιστός ή απομονωμένα PBMCs (από μύες που έλαβαν Cfz και μύες ελέγχου) ομογενοποιήθηκαν υπό ψύξη σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την απομόνωση του 26S πρωτεασώματος. Προσδιορίστηκε η ολική πρωτεΐνη των δειγμάτων και ακολούθησε η προσθήκη του πεπτιδίου φθορισμού προς προσδιορισμό της ενεργότητας της CT-L πρωτεασωμικής πεπτιδάσης. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός καταγράφηκε με σύστημα φθορισμόμετρου VersaFluor Fluorometer System (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) στο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής, 350 nm και 440 nm αντίστοιχα.

2.7 Ιστολογία

Τα δείγματα για την ιστοπαθολογική αξιολόγηση μονιμοποιήθηκαν σε 4% ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλδεΐδης για 24 ώρες και στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε κερι παραφίνης. Τομές (3 μm) πραγματοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα και χρωματίστηκαν με χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης για ιστολογική αξιολόγηση. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse 80i, Nikon Corp, Tokyo) από δύο παθολόγους ξεχωριστά, λαμβάνοντας υπόψη τρεις παραμέτρους: παρατυπία πυρηνικού σχήματος, αγγειακή συμφόρηση και οίδημα. Από κάθε παράμετρο δόθηκε βαθμολογία από 0 έως 3 (απουσία, ήπια, μέτρια και σοβαρή) [105].

2.8 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)

Οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί μελετήθηκαν στα δείγματα μυοκαρδιακού ιστού με την τεχνική Western Blot [106] και η σχετική οπτική πυκνότητα προσδιορίστηκε μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ 1.49v (National Institutes of Health, USA) [107]. Πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν για τις παρακάτω πρωτεΐνες: p-PI3K (p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199)), PI3K, PTEN, p-Akt (S473), Akt, p-eNOS (S1177), p-mTOR (S2448), mTOR, p-Raptor (S792), Raptor, p-AMPKα (Thr172), AMPKα, iNOS, β-actin (Cell Signaling Technology, Inc.), eNOS (AbboMax, Inc.), Beclin 1, β-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), LC3-II (Novus Biologicals), PP2A (Merck S.A. Hellas). Χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα anti-mouse και anti-rabbit (Cell Signaling Technology, Inc.).

Western blot: αρχή μεθόδου και αναλυτικά τα βήματα της μεθόδου

Η τεχνική Western Blot είναι μία αναλυτική μέθοδος κατά την οποία ένα δείγμα πρωτεϊνών ηλεκτροφορείται σε γέλη ακρυλαμιδίου και κατόπιν μεταφέρεται σε σταθερή μεμβράνη. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες της μεμβράνης ανιχνεύονται με τη χρήση πρωτογενούς αντισώματος και στη συνέχεια συζευγμένου με ένζυμο δευτερογενούς αντισώματος. Τα αντισώματα έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων, οι οποίες καλούνται επίτοπος. Δεδομένου ότι η αλληλουχία των αμινοξέων διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των πρωτεϊνών, τα αντισώματα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη μεταξύ πολλών. Επομένως, από ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα, με τη χρήση της Western blot μπορεί να αναγνωριστεί και προσδιοριστεί ημι-ποσοτικά μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη [108]. Αναλυτικά τα βήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν:

1. Παρασκευή δειγμάτων Western Blot

1.1 Ομογενοποίηση ιστών

Η ομογενοποίηση των ιστών γίνεται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer, Πίνακας 2) για 10 sec με ηλεκτρικό ομογενοποιητή ιστών. Η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο για τη διατήρηση του δείγματος.

Πίνακας 2. Σύσταση διαλύματος λύσης (lysis buffer)

Συστατικό	Συγκέντρωση	Χρήση
triton-X	1%	Ήπιος μη ιοντικός επιφανειοδραστικός παράγοντας, διαλυτοποίηση κυτταρικών μεμβρανών προς απομόνωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών
TRIS	20 mM	Ρυθμιστικός παράγοντας, διατήρηση συνθηκών παρόμοιων του κυττάρου, pH 7.4
NaCl	150 mM	Ρύθμιση ωσμωτικής πίεσης και αναστολή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών
KF	50 mM	Αναστολέας φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης
EDTA	1 mM	Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης μετάλλων, αναστολή φωσφατασών Mg^{2+}/Mn^{2+}

EGTA	1 mM	Χηλικός παράγοντας συμπλοκοποίησης ασβεστίου, αναστολή φωσφατασών Ca^{2+}
SDS	1%	Ιονικό επιφανειοδραστικό, αποδιάταξη πρωτεϊνών, γραμμική μορφή για ηλεκτροφόρηση
sodium deoxycholate	0.5%	Ιονικό επιφανειοδραστικό, διαταραχή πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων
PMSF	100 mM	Αναστολέας πρωτεασών
μίγμα αναστολέων πρωτεασών/φωσφατασών	0.1%	Αναστολή πρωτεασών / φωσφατασών

Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 15 min, στα 13000 g (4°C). Μετά τη φυγοκέντριση γίνεται προσεκτική λήψη του υπερκείμενου διαλύματος (lysate), το οποίο περιέχει διαλυμένες τις πρωτεΐνες του δείγματος, ενώ στο ίζημα παραμένει ο μη ομογενοποιημένος ιστός καθώς και υπολείμματα πυρήνων και μεμβρανών. Το lysate αποθηκεύεται στους -80°C και δύναται να χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα.

1.2 Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης δείγματος

Ακολουθεί προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης αναφοράς του δείγματος με τη μέθοδο Lowry και τη χρήση καμπύλης αναφοράς με BSA (Bovine Serum Albumin) [109]. Με BSA, και χρησιμοποιώντας το διάλυμα λύσης, κατασκευάζεται καμπύλης αναφοράς 7 σημείων, με τελικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 και 0 mg/mL. Μετράται η απορρόφηση των σημείων της καμπύλης αναφοράς και των δειγμάτων στα 750 nm και μέσω της συνάρτησης συγκέντρωσης – απορρόφησης γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων. Τα δείγματα που μετρώνται θα πρέπει να έχουν ολική πρωτεΐνη η οποία θα βρίσκεται εντός του εύρους της καμπύλης αναφοράς. Τα δείγματα του μυοκαρδιακού ιστού συνήθως είναι πυκνά οπότε και απαιτείται επιπλέον αραιώση και εκ νέου μέτρηση. Δεδομένης της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων, θα παρασκευαστούν δείγματα Western Blot στα οποία θα εξασφαλίζεται i) ότι κάθε δείγμα θα έχει την ίδια ποσότητα ολικής πρωτεΐνης – και συνεπώς πρωτεΐνης αναφοράς – ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους, και ii) ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης που θα φορτωθεί θα είναι εντός των ορίων ανίχνευσης του πρωτογενούς αντισώματος

1.3 Παρασκευή δειγμάτων Western Blot

Με τη χρήση κατάλληλου υπολογιστικού φύλλου (Excel) υπολογίζονται οι απαραίτητοι όγκοι ⁽¹⁾ ομογενοποιημένου δείγματος (lysate) ⁽²⁾ ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) και ⁽³⁾ ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (sample buffer / Dave's buffer) που απαιτούνται για την παρασκευή των δειγμάτων με επιθυμητή ολική πρωτεΐνη (protein load, 50 µg/lane) και όγκο (volume load, 42 µL/lane). Το sample buffer έχει σύσταση: 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenyl blue και 0.125 M Tris-HCl, και είναι απαραίτητο για την αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών και τη διάσπαση των δισουλφιδικών ομοιοπολικών δεσμών. Ακολουθεί βρασμός για 10 min (100°C) προς αποδιάταξη της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Τα δείγματα που προκύπτουν είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση και φυλάσσονται στους -80°C.

2. Ηλεκτροφόρηση

2.1 Γέλες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε γέλη ακρυλαμίδιου, η οποία αποτελείται από τη γέλη στοίβαξης (stacking gel) και τη γέλη διαχωρισμού (running / resolving gel) (Πίνακας 3). Όταν εφαρμοστεί τάση κατά μήκος της γέλης οι πρωτεΐνες, λόγω του ιοντικού φορτίου τους, μετακινούνται σε αυτή με διαφορετική ταχύτητα· η ταχύτητα ανάπτυξης της κάθε πρωτεΐνης εξαρτάται από το μοριακό βάρος της και έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να χωρίζονται σε ζώνες βάσει του μοριακού βάρους. Ο διαχωρισμός βελτιστοποιείται με τη διακύμανση της περιεκτικότητας ακρυλαμίδιου στη γέλη διαχωρισμού και εξαρτάται από το μοριακό βάρος της προς προσδιορισμό πρωτεΐνης. Ενδεικτικά, για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών με μοριακό βάρος <60 kDa χρησιμοποιείται γέλη 9-12% ακρυλαμίδιο, για μοριακό βάρος 60-90 kDa 7.5-9% ακρυλαμίδιο, ενώ για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος >90 kDa χρησιμοποιείται γέλη 6-7.5% ακρυλαμίδιο. Οι γέλες ηλεκτροφορήθηκαν σε πλάκες πάχους 1.5 mm οι οποίες απαιτούν όγκο ~8 mL γέλης διαχωρισμού. Παρατίθεται η σύσταση γέλης 7.5% και 10% και η γέλη στοίβαξης, η οποία έχει σταθερή σύσταση (4% ακρυλαμίδιο) και ανεξάρτητη από το μοριακό βάρος των προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών.

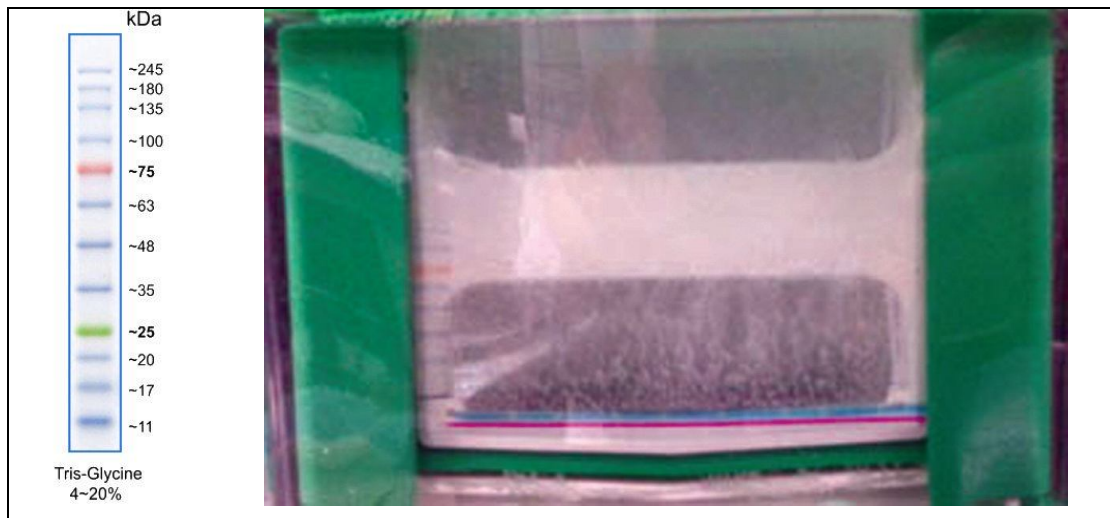
Πίνακας 3. Σύσταση γέλης διαχωρισμού και γέλης στοίβαξης

Running gel			Stacking gel	
1 gel	7.5%	10%	2 gel	4%
<i>acrylamide</i>	1.88 mL	2.5 mL	<i>acrylamide</i>	650 μ L
<i>running gel buffer</i>	1.88 mL	1.88 mL	<i>stacking gel buffer</i>	1.25 mL
<i>d. H2O</i>	3.75 mL	3.13 mL	<i>d. H2O</i>	3.0 mL
<i>APS</i>	75 μ L	75 μ L	<i>APS</i>	70 μ L
<i>TEMED</i>	7.5 μ L	7.5 μ L	<i>TEMED</i>	7 μ L
			<i>bromophenol blue</i>	12 μ L

Τα ρυθμιστικά διαλύματα *running gel buffer* και *stacking gel buffer* που χρησιμοποιούνται για τις γέλες έχουν σύσταση 4*Tris-HCl/SDS (pH 8.8) και 4*Tris-HCl/SDS (pH 6.8) αντίστοιχα. Τα αντιδραστήρια TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine) και APS (Ammoniumpersulfate) 10% χρησιμοποιούνται για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και προστίθενται τελευταία. Αφού προστεθούν τα APS και TEMED, τοποθετείται αρχικά στις πλάκες η γέλη διαχωρισμού μέχρι επιθυμητού και σταθερού ύψους και συμπληρώνονται οι πλάκες με νερό ώστε να πολυμεριστεί ομοιόμορφα η γέλη. Όταν πολυμεριστεί η γέλη διαχωρισμού, αφαιρείται το νερό, προστίθεται η γέλη στοίβαξης και τοποθετούνται τα χτενάκια ώστε να σχηματιστούν τα κελιά.

2.2 Προετοιμασία συσκευής ηλεκτροφόρησης

Οι πλάκες, με την πολυμερισμένη γέλη, τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και συμπληρώνεται ο χώρος ανάμεσά τους καθώς και η συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (*running buffer 1X*) [*Running buffer, stock 10X*: 30.2 g TRIS, 142 g glycine, 10 g SDS / 1 L d. H₂O]. Οι πλάκες πρέπει να καλύπτονται με το ρυθμιστικό διάλυμα καθ' όλη τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Αφαιρούνται τα χτενάκια και εγχέεται μικρός όγκος ρυθμιστικού διαλύματος σε κάθε κελί ώστε να απομακρυνθεί το μη πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο. Στο πρώτο αριστερά κελί κάθε γέλης τοποθετείται πρωτεΐνη-ιχνηθέτης (*marker*) και στη συνέχεια τα δείγματα διαδοχικά στα επόμενα κελιά (*Εικόνα 16*). Η πρωτεΐνη-ιχνηθέτης είναι ένα μείγμα πρωτεϊνών με καθορισμένα μοριακά βάρη, οι οποίες είναι έγχρωμες και διαμορφώνουν ορατές μπάντες που βοηθούν στην αναγνώριση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών που αναπτύσσονται στα δείγματά.



Εικόνα 16. Πρωτεΐνη-ιχνηθέτης (marker). Προκαθορισμένα μοριακά βάρη και εμφάνιση της πρωτεΐνης-ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκε. Εμφάνιση της πρωτεΐνης-ιχνηθέτη στη γέλη κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

2.3 Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε χαμηλότερη τάση (~80 V) καθ' όλη τη διάρκεια που τα δείγματα βρίσκονται στη γέλη στοίβαξης ώστε να γίνει σωστή στοίβαξη των πρωτεϊνών και μεταφορά στη γέλη διαχωρισμού. Όταν τα δείγματα βρίσκονται στη γέλη διαχωρισμού η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε υψηλότερη τάση (~120 V) μέχρι του επιθυμητού διαχωρισμού, ο οποίος εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που θέλουμε να προσδιορίσουμε και επιβεβαιώνεται από την πρωτεΐνη-ιχνηθέτη.

3. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, αφαιρείται η γέλη από τις πλάκες και αποκόπτεται το κομμάτι της γέλης στοίβαξης. Η γέλη – στην οποία πλέον έχουν ηλεκτροφορηθεί και διαχωριστεί οι πρωτεΐνες – επώάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) ίδιας σύστασης με αυτό που χρησιμοποιείται για την μεταφορά των πρωτεϊνών (transportation) (Πίνακας 4). Η επώαση διαρκεί 10 min και αποσκοπεί στην εξισορρόπηση της διαφοράς pH και περιεκτικότητας σε SDS μεταξύ των ρυθμιστικών διαλυμάτων διαχωρισμού και μεταφοράς.

Πίνακας 4. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer)

Συστατικό	Συγκέντρωση
<i>TRIS</i>	1.5 g
<i>glycine</i>	7.5 g
<i>d. H2O</i>	0.9 L
<i>methanol</i>	0.1 L

Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε μεμβράνες φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (polyvinylidene fluoride, PVDF). Οι PVDF μεμβράνες έχουν μεγάλη ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνών καθώς και μηχανική αντοχή· είναι ιδανικές για χρήση σε εφαρμογές Western blot όπου απαιτείται απομάκρυνση των αντισωμάτων και εκ νέου σήμανση. Καθώς οι PVDF μεμβράνες είναι πολύ υδρόφοβες, απαιτείται επώαση σε μεθανόλη (10 min) πριν τη χρήση, ώστε να καταστούν συμβατές με υδατικά διαλύματα. Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στις PVDF μεμβράνες μέσω συνδυασμού υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δυνάμεων διπόλου. Ακολουθεί επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (10 min), ώστε να εξασφαλιστεί ομαλή μετάβαση στη διαδικασία.

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών, η PVDF μεμβράνη τοποθετείται μεταξύ της γέλης και του θετικού ηλεκτροδίου της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Η μεταφορά πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρικό πεδίο προσανατολισμένο κάθετα προς την επιφάνεια της γέλης, προκαλώντας την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τη γέλη και στη μεμβράνη (ηλεκτροφορητική μεταφορά). Απαιτείται στενή επαφή της γέλης με την PVDF μεμβράνη ώστε να μεταφερθούν και να δεσμευτούν ποσοτικά οι πρωτεΐνες στην μεμβράνη – χρησιμοποιούνται δύο διηθητικά χαρτιά και ένα μαξιλαράκι εκατέρωθεν. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και η διαδικασία της μεταφοράς πραγματοποιείται σε σταθερή τάση (100 V) για 90 min. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, αφαιρείται η γέλη και η PVDF μεμβράνη κόβεται στην πάνω, αριστερά γωνία – με αυτό τον τρόπο σημαίνεται σε ποια πλευρά της μεμβράνης έχουν δεσμευτεί οι πρωτεΐνες.

4. Αποκλεισμός της PVDF μεμβράνης

Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται αποκλεισμός (blocking) των θέσεων πρόσδεσης της PVDF μεμβράνης στις οποίες δεν έχουν δεσμευτεί πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο γίνεται πρόληψη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της μεμβράνης και των

αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται – παρεμποδίζεται η μη ειδική σύνδεση. Ο αποκλεισμός πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού (blocking buffer) για 60 min· το διάλυμα αποτελείται από 5% w/v σκόνη αποβουτυρωμένου γάλατος σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένου pH με TRIS και την προσθήκη Tween (TRIS-buffered saline – Tween, TBST, Πίνακας 5). Ακολουθεί έκπλυση της PVDF μεμβράνης με TBS. Οι εκπλύσεις στα επόμενα στάδια πραγματοποιούνται με TBST και αποσκοπούν στην απομάκρυνση των αδέσμευτων αντιδραστηρίων· ανεπαρκείς εκπλύσεις οδηγούν σε αυξημένο σήμα υπόβαθρου (background), ενώ εκτεταμένες εκπλύσεις ενδέχεται να μειώσουν την ευαισθησία λόγω απομάκρυνσης πρωτεϊνών ή/και αντισώματος από την PVDF μεμβράνη. Τέλος οι PVDF μεμβράνες κόβονται σε λωρίδες βάσει του μοριακού βάρους των προς προσδιορισμό πρωτεϊνών και βάσει της πρωτεΐνης-ιχνηθέτη.

Πίνακας 5. Σύσταση διαλύματος TBS(10X) και TBST

TBS (10X)		TBST	
<i>NaCl</i>	80.0 g	<i>TBS (10X)</i>	100 mL
<i>TRIS</i>	30.0 g (pH 7.4)	<i>d. H₂O</i>	900 mL
<i>d. H₂O</i>	1 L	<i>Tween 20</i>	1 mL

5. Πρωτογενές αντίσωμα

Τα πρωτογενή αντισώματα (primary antibody) παρασκευάζονται σε διάλυμα 5% BSA σε TBST, με αραιώση του αντισώματος συνήθως 1:1000. Η αραιώση αυτή προσαρμόζεται βάσει της ποσότητας της πρωτεΐνης στο δείγμα, την ποιότητα του αντισώματος και προηγούμενης εμπειρίας – για πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται πολύ στον ιστό, όπως οι δομικές, χρησιμοποιείται αραιώση 1:2000. Η BSA εξυπηρετεί τη βελτίωση της συγγένειας αντισώματος – αντιγόνου. Οι PVDF μεμβράνες επωάζονται σε πλαστικούς σωλήνες (τύπου falcon) υπό συνεχή περιστροφή για τουλάχιστον 16 ώρες (overnight) στους 4°C.

6. Δευτερογενές αντίσωμα

Οι PVDF μεμβράνες εκπλένονται (10 min) και τοποθετούνται στο δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody). Το δευτερογενές αντίσωμα (anti-rabbit/mouse) εξαρτάται από την προέλευση του πρωτογενούς, παρασκευάζεται σε 5% w/v σκόνη

γάλατος σε TBST με αραιώση 1:2000 και οι PVDF μεμβράνες επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις (10 min).

7. Εμφάνιση σήματος

Οι PVDF μεμβράνες επωάζονται (5 min) με το αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας το οποίο περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου που φέρουν τα δευτερογενή αντισώματα (HRP-conjugated – horseradish peroxidase). Οι PVDF μεμβράνες μεταφέρονται μέσα σε κασέτα εμφάνισης φωτογραφίας σε σκοτεινό θάλαμο. Τοποθετείται φιλμ πάνω στις μεμβράνες για χρόνο κατάλληλο προς την εμφάνιση του σήματος που παράγεται. Ο χρόνος αρχικά είναι ~40" ενώ κατά περίπτωση και βάσει προηγούμενης εμπειρίας μπορεί να κυμαίνεται από 2" ως 30 min. Τα φιλμ επωάζονται κατά σειρά στο αντιδραστήριο ανάπτυξης του σήματος (developer) και στο αντιδραστήριο μονιμοποίησης του φιλμ (fixer). Οι PVDF μεμβράνες εκπλένονται και φυλάσσονται στους -20°C ή ακολουθεί διαδικασία απομάκρυνσης του αντισώματος.

8. Απομάκρυνση αντισώματος

Η διαδικασία απομάκρυνσης του αντισώματος (stripping) παρέχει τη δυνατότητα χρήσης των ίδιων μεμβρανών για τον προσδιορισμό άλλης πρωτεΐνης ή διαφορετικής μορφής (ολική, φωσφορυλιωμένη). Πραγματοποιείται με το ρυθμιστικό διάλυμα απομάκρυνσης (stripping buffer, 50°C) ή με ήπιο ρυθμιστικό διάλυμα απομάκρυνσης (mild stripping buffer, θερμοκρασία δωματίου) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Ρυθμιστικά διαλύματα απομάκρυνσης αντισώματος

Stripping buffer		Mild stripping buffer	
TRIS	7.6 g (pH 6.8)	glycine (25 mM)	9 mL
SDS	20.0 g	SDS (10%)	1 mL
d. H ₂ O	1 L	Tween 20	50 μL
mercaptoethanol	175 μL / 20 mL		

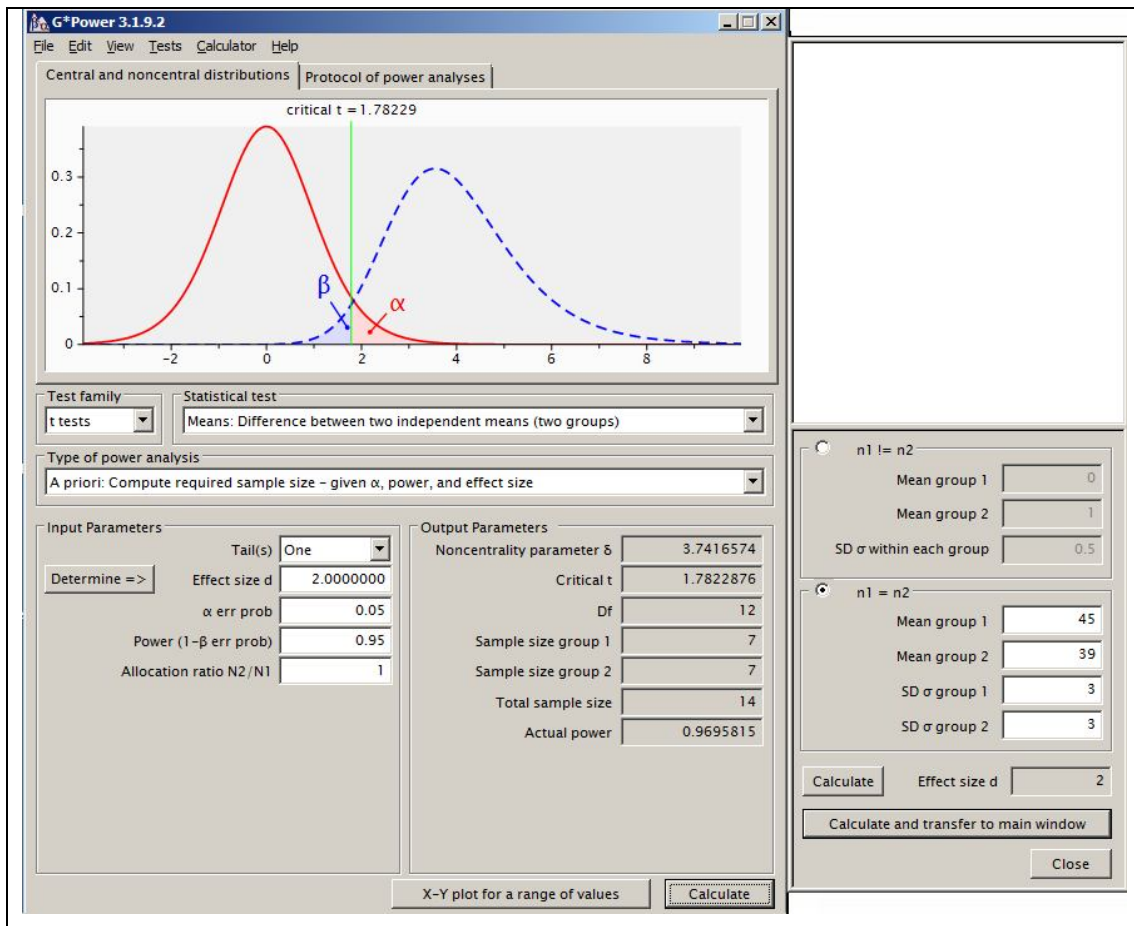
Η επώση πραγματοποιείται για ~20 min – ο χρόνος κυμαίνεται αναλόγως του σήματος που έδωσε η προηγούμενη πρωτεΐνη και πόσο εύκολα προσδιορίζεται η επόμενη. Οι PVDF μεμβράνες εκπλένονται (5 min) 5 φορές. Η έκπλυση της mercaptoethanol απαιτεί προσοχή – χρήση απαγωγού, χημικά απόβλητα. Ακολουθεί αποκλεισμός της PVDF μεμβράνης και εκ νέου πρωτογενές αντίσωμα.

2.9 Μέτρηση ενεργότητας της PP2A φωσφατάσης

Η ενεργότητα της PP2A φωσφατάσης προσδιορίστηκε με τη χρήση κατάλληλης δοκιμασίας ανοσοκαθίζησης της PP2A φωσφατάσης (Merck S.A. Hellas) [110]. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε 20 mM imidazole·HCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA και 1 δισκίο cOmplete Mini Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich) σε 10 mL για την εκχύλιση της φωσφατάσης. Τα δείγματα ρυθμιστικού διαλύματος με 500 µg κονιοποιημένου δείγματος μυοκαρδιακού ιστού επώαστηκαν με 4 µg anti-PP2A αντισώματος (C subunit, clone 1D6) και 40 µL Protein A agarose slurry σε pNPP Ser/Thr ρυθμιστικό διάλυμα της δοκιμασίας, για 2 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και έκπλυση 3 φορές. Το υπόστρωμα threonine phosphopeptide (750 µM) προστέθηκε και επώαστηκε για 12 min στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση. Τα υπερκείμενα από το μίγμα αντίδρασης μεταφέρθηκαν σε 96-well microtiter plate με την προσθήκη διαλύματος ανίχνευσης malachite green phosphate για 10 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 650 nm.

2.10 Στατιστική ανάλυση

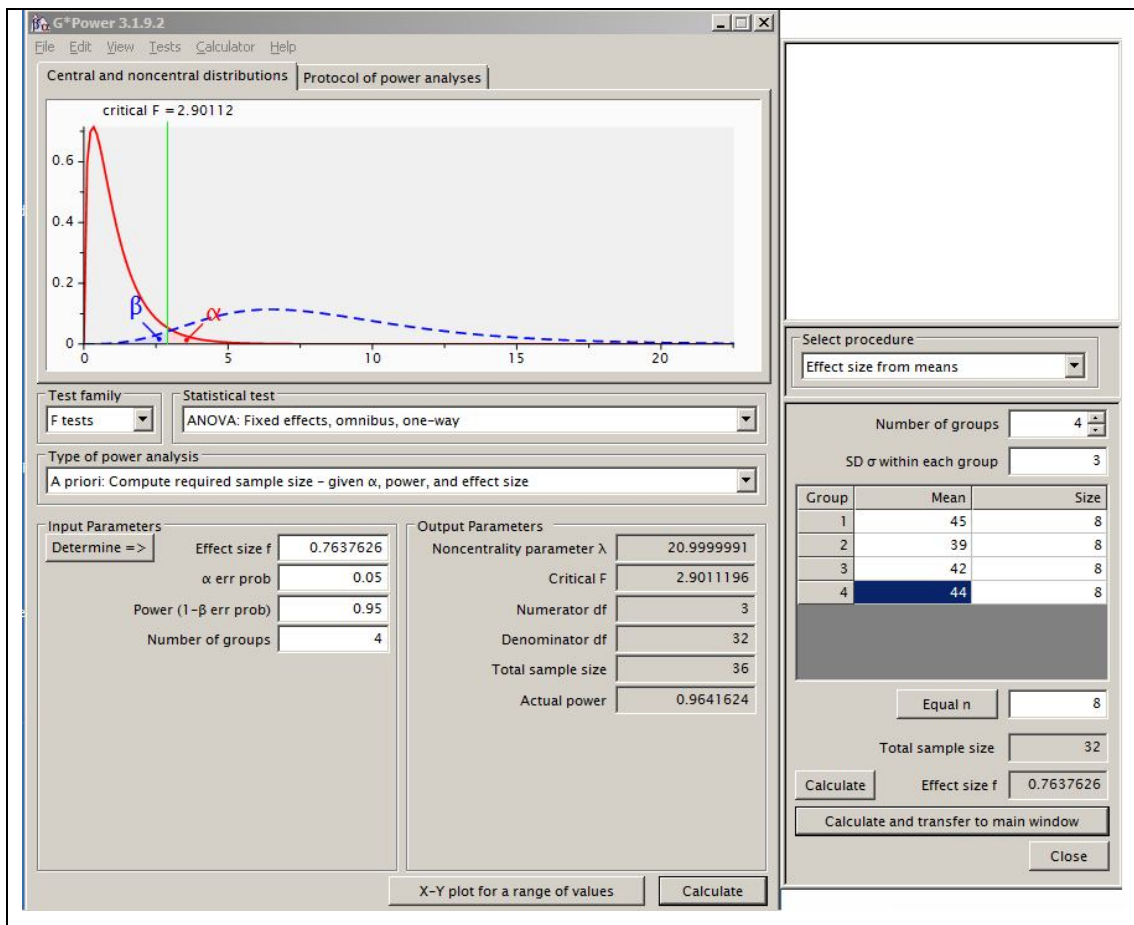
Για τον υπολογισμό του μικρότερου δυνατού αριθμού πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε Power Analysis με τη χρήση του λογισμικού G*Power (version 3.1.9.2), και χρησιμοποιήθηκε ένα μέσο στατιστικό λάθος δηλαδή 0.05 και η ισχύς ήταν 0.90. Η πρόβλεψη του μεγέθους του δείγματος των *Πρωτοκόλλων 1, 2 και 3* πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας επί της επαγόμενης από Dox καρδιοτοξικότητας [82, 111] καθώς και τα αρχικά αποτελέσματα των *πρωτοκόλλων* – ως παράμετρος χρησιμοποιήθηκε το FS%. Ως απόκλιση των τιμών χρησιμοποιήθηκε SD=3 που θεωρείται αποδεκτή για την υπερηχογραφική αξιολόγηση της καρδιακής λειτουργίας. Ως εκ τούτου ο αριθμός πειραματόζωων ανά ομάδα ανέρχεται στα 7 πειραματόζωα (*Εικόνα 17*).



Εικόνα 17. Ενδεικτικός υπολογισμός μεγέθους δείγματος. Power analysis για τα Πρωτόκολλα 1, 2, 3.

Αντιστοίχως, για την πρόβλεψη του μεγέθους του δείγματος του Πρωτοκόλλου 4 χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από τα προηγούμενα πρωτόκολλα και ως παράμετρος χρησιμοποιήθηκε το FS% και SD=3. Ως εκ τούτου ο αριθμός πειραματοζώων ανά ομάδα ανέρχεται στα 8 πειραματόζωα (Εικόνα 18).

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 6 και τα αποτελέσματα αναπαρίστανται γραφικά ως μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα του μέσου (Mean \pm SEM). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση One-Way ANOVA (συγκρίνοντας του μέσους μεταξύ των ομάδων και με τη χρήση post-hoc δοκιμασίας, Tukey ή Bonferroni, για πολλαπλές συγκρίσεις) ή two-sided t test κατά περίπτωση. Τιμές p με $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

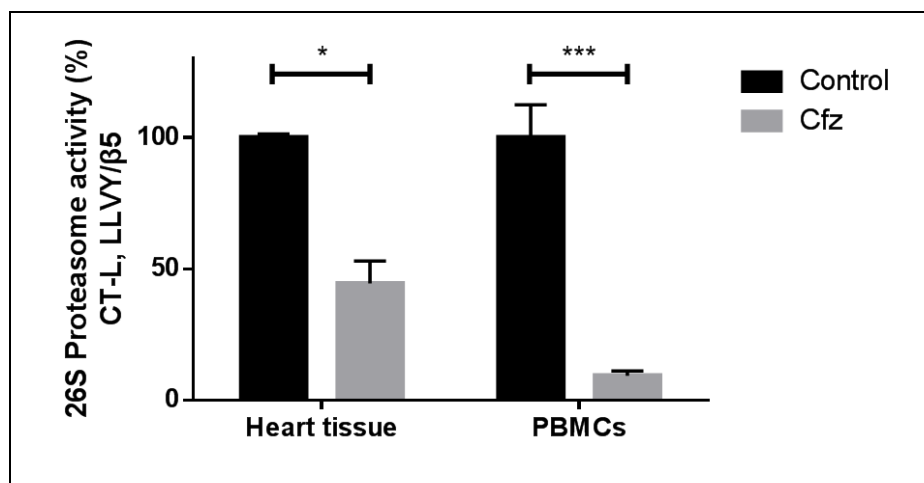


Εικόνα 18. Ενδεικτικός υπολογισμός μεγέθους δείγματος. Power analysis για το Πρωτόκολλο 4.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η προτεινόμενη δόση Cfz προκάλεσε ικανοποιητική αναστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας στην καρδιά και στα PBMCs των μυών

Η χορήγηση του Cfz στην προτεινόμενη δόση (8 mg/kg) οδήγησε σε σημαντική αναστολή λειτουργίας της CT-L πρωτεασωμικής πεπτιδάσης τόσο στον μυοκαρδιακό ιστό ($p < 0.05$) όσο και στα PBMCs ($p < 0.001$) έναντι των Control (Εικόνα 19). Συγκεκριμένα, η αναστολή στην πρωτεολυτική CT-L υπομονάδα ήταν αντίστοιχη με την αναστολή που παρατηρείται στους υπό θεραπεία ασθενείς [112].



Εικόνα 19. Δοκιμασία ενεργότητας (26S) πρωτεασώματος. Η χορήγηση του Cfz οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση ενεργότητας της υπό μελέτη chymotrypsin-like (CT-L, LLVY/β5) πρωτεασωμικής πεπτιδάσης στο μυοκάρδιο ($*p < 0.05$) και τα PBMCs ($***p < 0.001$) μεταξύ των ομάδων Cfz και Control.

3.2.1 Η οξεία χορήγηση Cfz (Πρωτόκολλο 1) μείωσε το FS% χωρίς μείζονες ιστολογικές βλάβες

Η υπερηχογραφική αξιολόγηση την 6^η ημέρα έδειξε σημαντική μείωση του FS% στην ομάδα Cfz έναντι Control (39.87 ± 0.47 vs. 43.03 ± 0.50 αντίστοιχα, $p < 0.001$) (Πίνακας 7B) (Εικόνα 20). Πέραν της μείωσης του FS%, στην ομάδα Cfz παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πάχους του οπίσθιου τοιχώματος της αριστερής κοιλίας (LVPWd (mm): 0.69 ± 0.01 vs. 0.76 ± 0.01 · LVPWs (mm): 1.17 ± 0.01 vs. 1.24 ± 0.02 , $p < 0.01$) σε σύγκριση με την ομάδα Control (Πίνακας 7B).

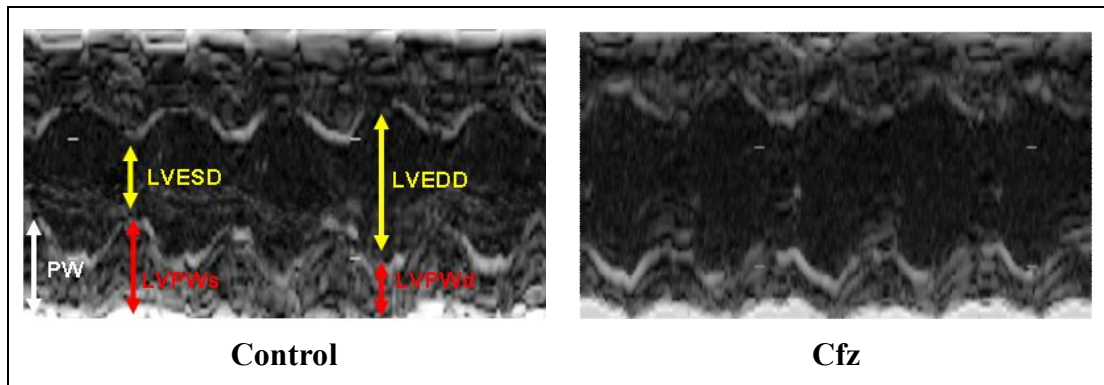
Πίνακας 7. Πρωτόκολλο 1: Υπερηχογραφική αξιολόγηση.

A.	Ημέρα 0	Control (n=7)	Cfz (n=8)
	HR	596.90±15.85	613.21±7.25
	LVEDD (mm)	3.12±0.07	3.06±0.05
	LVESD (mm)	1.74±0.04	1.68±0.03
	LVPWd (mm)	0.77±0.01	0.77±0.01
	LVPWs (mm)	1.24±0.01	1.25±0.01
	FS (%)	44.37±0.57	44.99±0.31
	r/h	2.00±0.05	1.98±0.05

B.	Ημέρα 6	Control (n=7)	Cfz (n=8)
	HR	636.28±14.66	585.92±10.58*
	LVEDD (mm)	3.03±0.07	3.08±0.09
	LVESD (mm)	1.73±0.04	1.86±0.06
	LVPWd (mm)	0.76±0.01	0.69±0.01**
	LVPWs (mm)	1.24±0.02	1.17±0.01**
	FS (%)	43.03±0.50	39.87±0.47***
	r/h	2.01±0.05	2.21±0.09

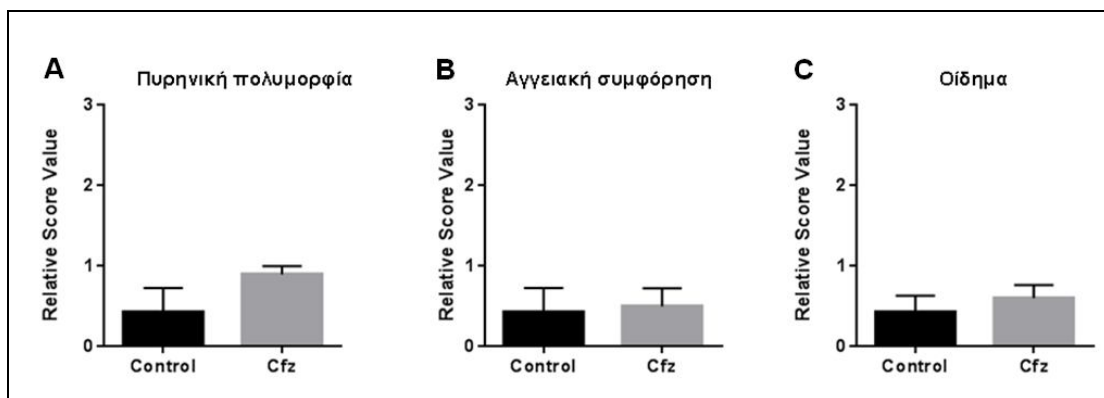
C.	Control (n=7)	Ημέρα 0	Ημέρα 6
	HR	596.90±15.85	636.28±14.66
	LVEDD (mm)	3.12±0.07	3.03±0.07
	LVESD (mm)	1.74±0.04	1.73±0.04
	LVPWd (mm)	0.77±0.01	0.76±0.01
	LVPWs (mm)	1.24±0.01	1.24±0.01
	FS (%)	44.37±0.57	43.03±0.50
	r/h	2.00±0.05	2.01±0.05

D.	Cfz (n=8)	Ημέρα 0	Ημέρα 6
	HR	613.21±7.25	585.92±10.58
	LVEDD (mm)	3.06±0.05	3.08±0.09
	LVESD (mm)	1.68±0.03	1.86±0.06
	LVPWd (mm)	0.77±0.01	0.69±0.01*
	LVPWs (mm)	1.25±0.01	1.17±0.01*
	FS (%)	44.99±0.31	39.87±0.47**
	r/h	1.98±0.05	2.21±0.09



Εικόνα 20. Αντιπροσωπευτικές εικόνες M-Mode (Πρωτόκολλο 1) την 6^η ημέρα.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν καρδιακή δυσλειτουργία η οποία σχετίζεται με μυοκαρδιοπάθεια διατακτικής φύσης, όπως έχει περιγραφεί και σε περιπτώσεις ασθενών [113]. Η ιστολογική αξιολόγηση, όπως αυτή μελετήθηκε ως προς την πυρηνική πολυμορφία, την αγγειακή συμφόρηση και το οίδημα, δεν έδειξε σημαντικές αλλαγές μεταξύ των ομάδων Control και Cfz (Εικόνα 24 A,B)· οι σχετικές τιμές βαθμολογίας κυμαίνονταν από την απουσία έως την ήπια εμφάνιση (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Αντιπροσωπευτικά γραφήματα ιστολογίας (Πρωτόκολλο 1). Παραμετροποίηση της πυρηνικής πολυμορφίας (A), αγγειακής συμφόρησης (B) και οιδήματος (C) (0: απουσία, 1: ήπια, 2: μέτρια, 3:σοβαρή).

3.2.2 Η υποχρόνια χορήγηση Cfz (Πρωτόκολλο 2) οδήγησε σε διάταση της αριστερής κοιλίας

Η υποχρόνια χορήγηση Cfz οδήγησε σε σημαντική διάταση της αριστερής κοιλίας σε σύγκριση με την ομάδα Control, όπως φαίνεται από τη μείωση του πάχους του οπίσθιου τοιχώματος της αριστερής κοιλίας (LVPWd (mm) 0.70 ± 0.01 vs. 0.76 ± 0.01 , $p < 0.01$ · LVPWs (mm) 1.18 ± 0.01 vs. 1.23 ± 0.01 , $p < 0.001$) και την αύξηση του LVEDD (mm) (3.24 ± 0.03 vs. 3.04 ± 0.03 , $p < 0.01$) και LVESD (mm) (1.88 ± 0.02 vs. 1.71 ± 0.02 , $p < 0.01$) καθώς της παραμέτρου r/h (2.32 ± 0.05 vs. 2.01 ± 0.02 , $p < 0.01$) (Πίνακας 8B).

Πίνακας 8. Πρωτόκολλο 2: Υπερηχογραφική αξιολόγηση.

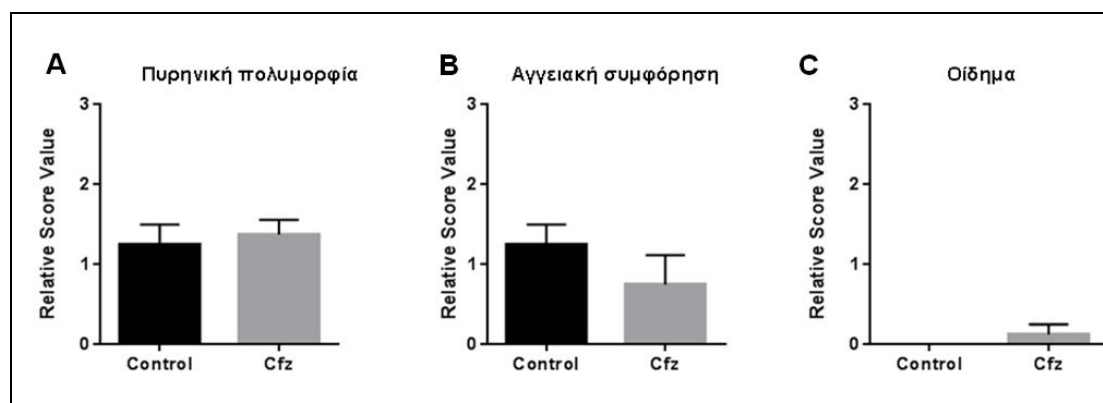
A.	Ημέρα 0	Control (n=5)	Cfz (n=8)
	HR	622.93±6.50	618.75±5.09
	LVEDD (mm)	3.02±0.13	3.09±0.08
	LVESD (mm)	1.69±0.09	1.74±0.05
	LVPWd (mm)	0.75±0.01	0.76±0.01
	LVPWs (mm)	1.26±0.01	1.25±0.01
	FS (%)	44.34±0.88	43.92±0.49
	r/h	2.01±0.09	2.04±0.05

B.	Ημέρα 14	Control (n=5)	Cfz (n=8)
	HR	605.20±20.85	612.12±6.77
	LVEDD (mm)	3.04±0.04	3.24±0.03**
	LVESD (mm)	1.71±0.02	1.88±0.02**
	LVPWd (mm)	0.76±0.01	0.70±0.01**
	LVPWs (mm)	1.23±0.01	1.18±0.01***
	FS (%)	43.52±0.25	42.07±0.46*
	r/h	2.01±0.02	2.32±0.05**

C.	Control (n=5)	Ημέρα 0	Ημέρα 14
	HR	622.93±6.50	605.20±20.85
	LVEDD (mm)	3.02±0.13	3.04±0.04
	LVESD (mm)	1.69±0.09	1.71±0.02
	LVPWd (mm)	0.75±0.01	0.76±0.01
	LVPWs (mm)	1.26±0.01	1.23±0.01
	FS (%)	44.34±0.88	43.52±0.25
	r/h	2.01±0.09	2.01±0.02

D.	Cfz (n=8)	Ημέρα 0	Ημέρα 14
	HR	618.75±5.09	612.12±6.77
	LVEDD (mm)	3.09±0.08	3.24±0.03
	LVESD (mm)	1.74±0.05	1.88±0.03***
	LVPWd (mm)	0.76±0.01	0.70±0.01*
	LVPWs (mm)	1.25±0.01	1.18±0.01**
	FS (%)	43.92±0.49	42.07±0.46*
	r/h	2.04±0.05	2.32±0.05**

Ωστόσο, η συνολική καρδιακή λειτουργία δεν επηρεάστηκε σημαντικά δεδομένου ότι παρατηρήθηκε οριακή μείωση της συσταλτικής ικανότητας σε σύγκριση με την ομάδα Control (FS%: Cfz vs. Control, 42.07 ± 0.46 vs. 43.52 ± 0.25 , $p < 0.05$). Κατ' αντιστοιχία με το Πρωτόκολλο 1, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις από την υποχρόνια χορήγηση Cfz (Εικόνα 22, Εικόνα 24 A,C).



Εικόνα 22. Αντιπροσωπευτικά γραφήματα ιστολογίας (Πρωτόκολλο 2). Παραμετροποίηση της πυρηνικής πολυμορφίας (A), αγγειακής συμφόρησης (B) και οιδήματος (C) (0: απουσία, 1: ήπια, 2: μέτρια, 3:σοβαρή).

3.2.3 Η διακοπτόμενη χορήγηση Cfz (Πρωτόκολλο 3) δεν άσκησε καρδιακή δυσλειτουργία στους μύες

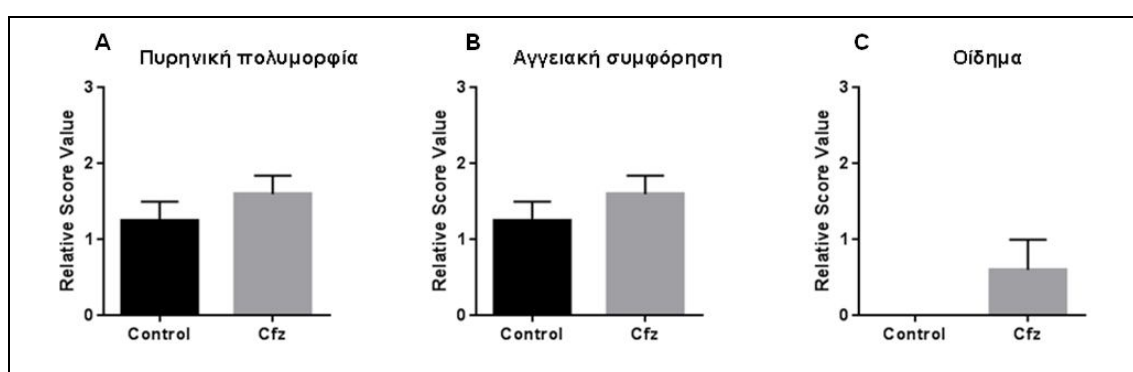
Η υπερηχογραφική αξιολόγηση των μυών δεν έδειξε εμφάνιση καρδιακής δυσλειτουργίας στους μύες στο Πρωτόκολλο 3. Η χορήγηση δύο συνεχόμενων δόσεων τις ημέρες 0, 1 και 7, 8 δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές στις υπερηχογραφικές παραμέτρους μετά την περίοδο έκπλυσης, όπως παρουσιάζεται από την υπερηχογραφική αξιολόγηση στις ημέρες 6 και 13 (Πίνακας 9B, 9C). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς την πυρηνική πολυμορφία, την αγγειακή συμφόρηση και το οίδημα μεταξύ των Cfz και Control την ημέρα 13 (Εικόνα 23, Εικόνα 24 A,D).

Πίνακας 9. Πρωτόκολλο 3: Υπερηχογραφική αξιολόγηση.

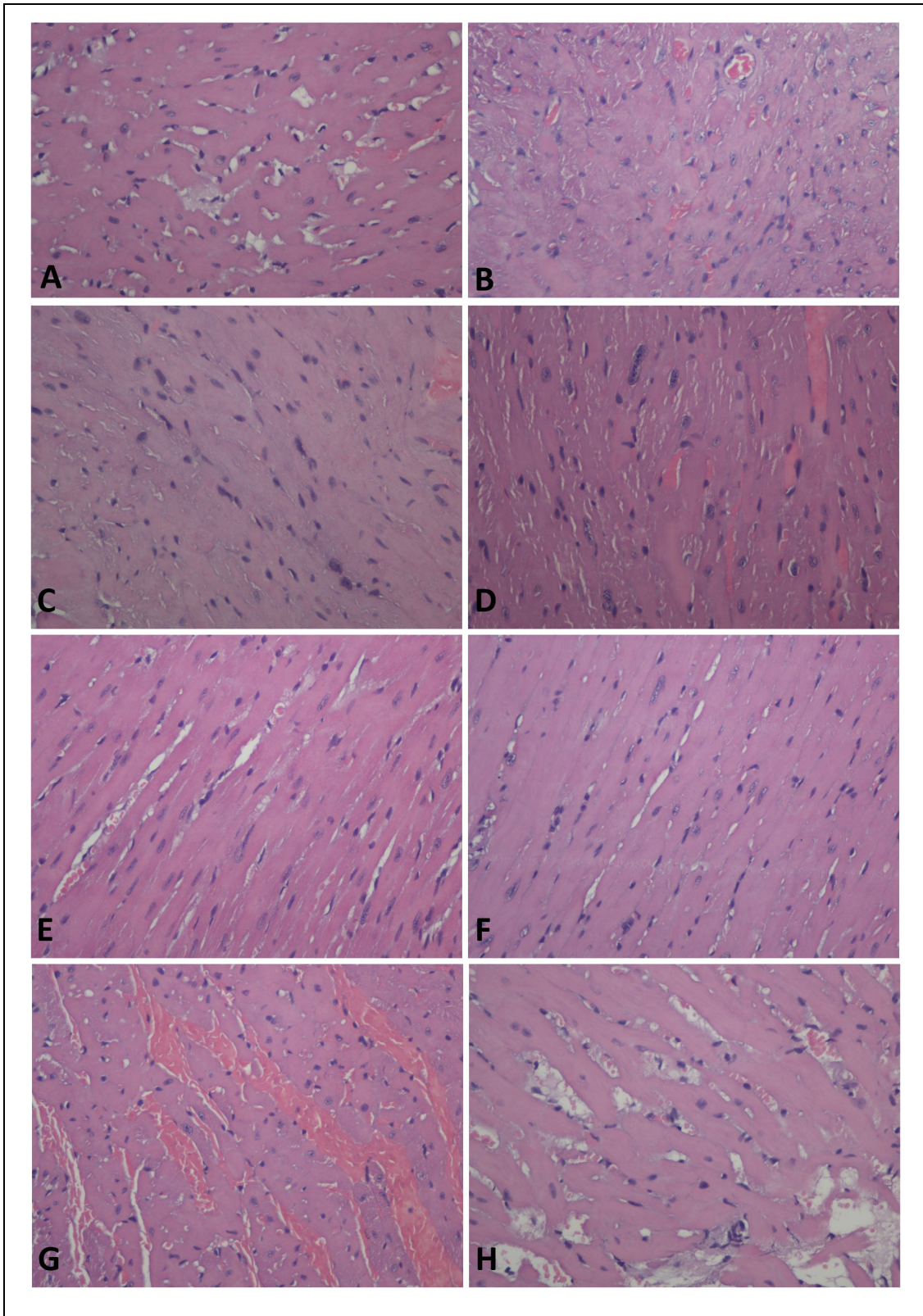
A.	Ημέρα 0	Control (n=6)	Cfz (n=5)
	HR	601.88±11.45	612.80±7.07
	LVEDD (mm)	3.14±0.15	3.09±0.08
	LVESD (mm)	1.71±0.09	1.69±0.05
	LVPWd (mm)	0.75±0.01	0.76±0.01
	LVPWs (mm)	1.24±0.01	1.20±0.09
	FS (%)	45.65±0.57	45.17±0.39
	r/h	2.09±0.09	2.02±0.06

B.	Ημέρα 6	Control (n=6)	Cfz (n=5)
	HR	637.50±15.85	649.33±10.88
	LVEDD (mm)	2.92±0.10	2.95±0.05
	LVESD (mm)	1.65±0.06	1.64±0.03
	LVPWd (mm)	0.73±0.01	0.76±0.01 *
	LVPWs (mm)	1.21±0.02	1.26±0.01
	FS (%)	43.54±0.37	44.31±0.94
	r/h	2.00±0.05	1.93±0.03

C.	Ημέρα 13	Control (n=6)	Cfz (n=5)
	HR	609.33±17.52	637.33±10.06
	LVEDD (mm)	3.12±0.09	3.05±0.05
	LVESD (mm)	1.80±0.06	1.70±0.04
	LVPWd (mm)	0.76±0.01	0.74±0.01
	LVPWs (mm)	1.23±0.01	1.24±0.01
	FS (%)	42.40±0.47	44.34±1.09
	r/h	2.05±0.05	2.04±0.04



Εικόνα 23. Αντιπροσωπευτικά γραφήματα ιστολογίας (Πρωτόκολλο 3). Παραμετροποίηση της πυρηνικής πολυμορφίας (A), αγγειακής συμφόρησης (B) και οιδήματος (C) (0: απουσία, 1: ήπια, 2: μέτρια, 3:σοβαρή).

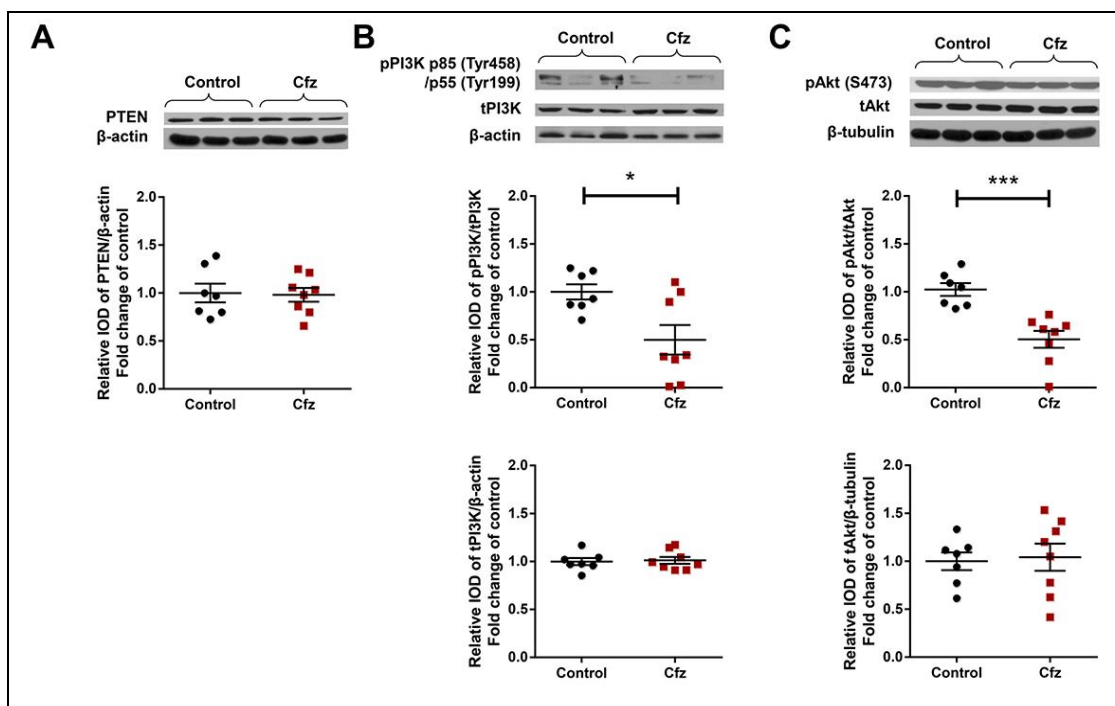


Εικόνα 24. Αντιπροσωπευτικές εικόνες τομών μυοκαρδιακού ιστού με χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης (μεγέθυνση 200x). **A-D:** Δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων Control (A) και Cfz στα Πρωτόκολλα 1 (B), 2 (C) και 3 (D) όσον αφορά την πυρηνική πολυμορφία, την αγγειακή συμφόρηση και το οίδημα. **E-H:** Η αγγειακή συμφόρηση ήταν περισσότερο εμφανής στις ομάδες Cfz+Met (G) και Met (H) έναντι των ομάδων Control (E) και Cfz (F).

3.3.1 Το Cfz εμφάνισε οξεία καρδιοτοξικότητα μέσω αναστολής του άξονα PI3K/Akt/eNOS

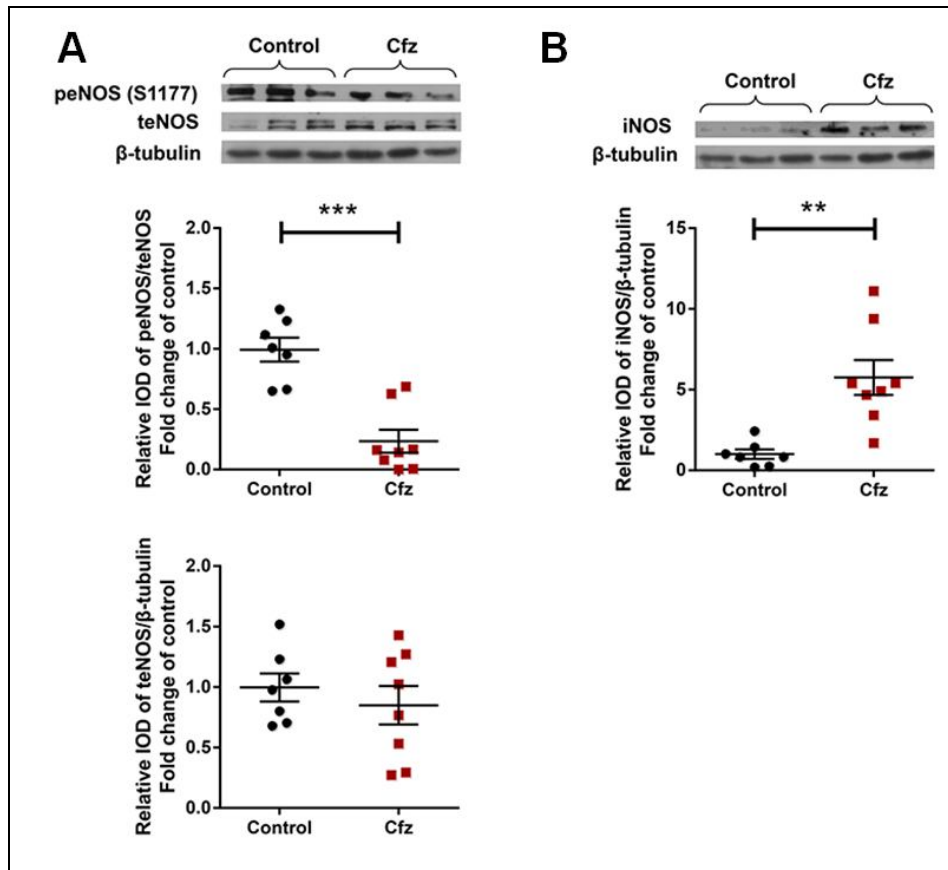
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της υπερηχογραφικής αξιολόγησης στα Πρωτόκολλα 1, 2 και 3, φαίνεται ότι η επαγόμενη από Cfz καρδιοτοξικότητα περιγράφεται καλύτερα στο Πρωτόκολλο 1, όπου ανιχνεύεται μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα με την υπερηχογραφική αξιολόγηση (σημαντικά μειωμένο FS%). Επομένως, διερευνήσαμε περαιτέρω τον μηχανισμό καρδιοτοξικότητας στο Πρωτόκολλο 1.

Η μελέτη του μοριακού μηχανισμού – η οποία διενεργήθηκε με Western Blot σε δείγματα μυοκαρδιακού ιστού – υπέδειξε ότι το Cfz μείωσε την φωσφορυλίωση των PI3K ($p < 0.05$), Akt ($p < 0.001$) χωρίς να επάγει αλλαγές στην έκφραση της PTEN φωσφατάσης (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Αντιπροσωπευτικές western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των Α. PTEN/ β -actin Β. pPI3K/tPI3K και tPI3K/ β -actin C. pAkt/tAkt και tAkt/ β -tubulin.

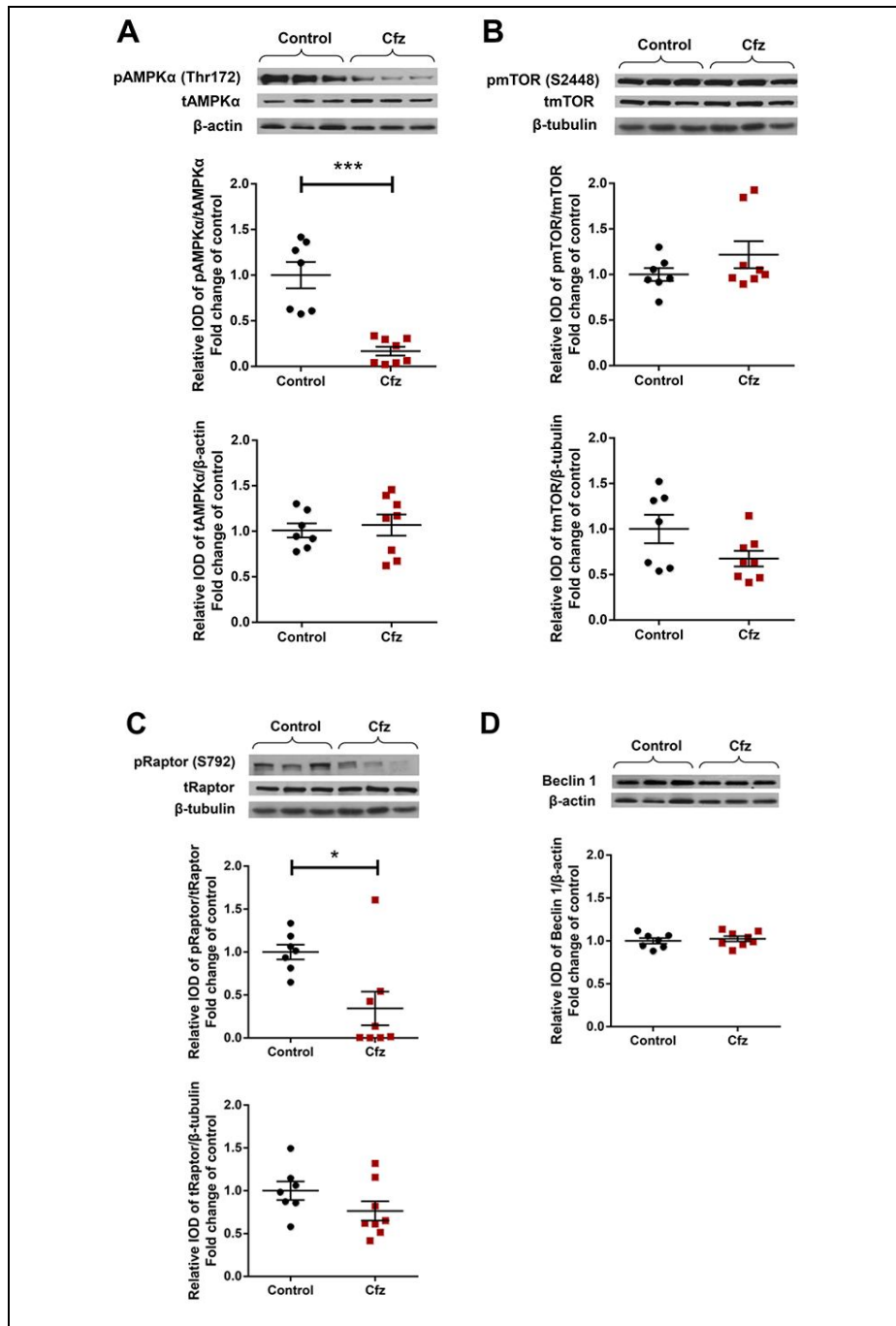
Επιπλέον υπήρξε μειωμένη φωσφορυλίωση της eNOS ($p < 0.001$) η οποία αποτελεί καθοδικό στόχο της Akt. Παράλληλα με τη μειωμένη φωσφορυλίωση της eNOS, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της επαγόμενης συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου, iNOS ($p < 0.01$) (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Αντιπροσωπευτικές western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των **A.** peNOS/teNOS και teNOS/ β -tubulin **B.** iNOS/ β -tubulin

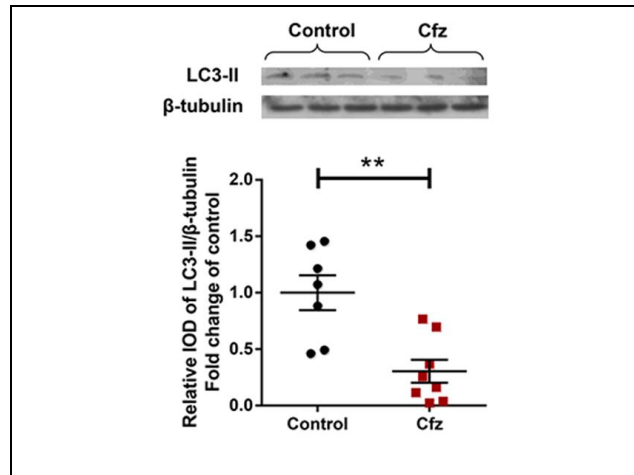
3.3.2 Το Cfz εμφάνισε οξεία καρδιοτοξικότητα μέσω απενεργοποίησης της AMPKα κινάσης και αναστολής της αυτοφαγίας

Επιπλέον, το Cfz μείωσε τη φωσφορυλίωση της AMPKα ($p < 0.001$) και του καθοδικού της στόχου Raptor ($p < 0.05$), χωρίς να επηρεάσει την φωσφορυλίωση του mTOR ή την έκφραση της Beclin 1 (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Αντιπροσωπευτικές western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των **A.** pAMPKα/tAMPKα και tAMPKα/β-actin **B.** pmTOR/tmTOR και tmTOR/β-tubulin **C.** pRaptor/tRaptor και tRaptor/β-tubulin **D.** Beclin 1/β-actin

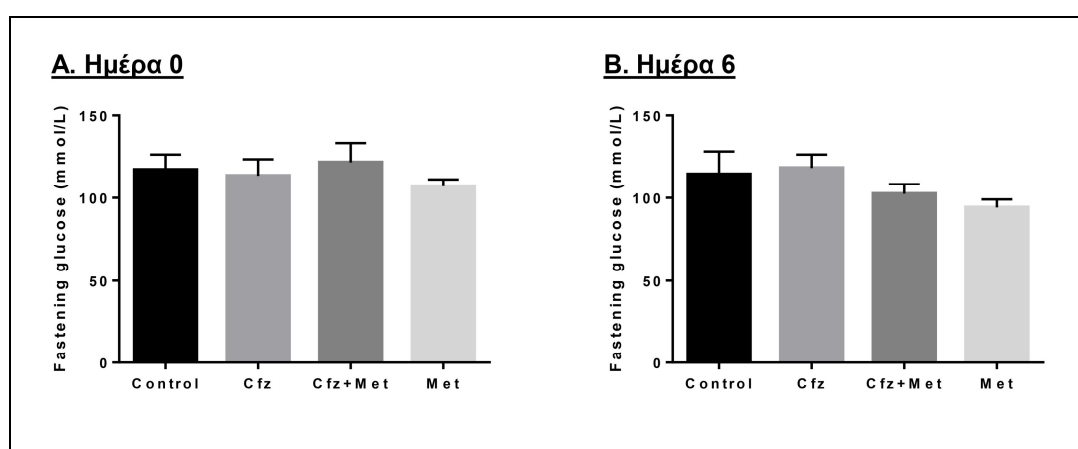
Ο Raptor αποτελεί ρυθμιστική πρωτεΐνη επί του συμπλέγματος mTORC1· φωσφορυλίωση του Raptor οδηγεί σε αναστολή του mTORC1 το οποίο μειώνει την αυτοφαγία. Η μειωμένη φωσφορυλίωση που παρατηρείται στον Raptor οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTORC1 και αναστολή της αυτοφαγίας, όπως αποδεικνύεται από τον αυτοφαγικό δείκτη, LC3-II ($p < 0.01$) (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Αντιπροσωπευτική western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση του LC3-II/β-tubulin.

3.4.1 Η Met ανέστειλε την οξεία καρδιακή δυσλειτουργία που επάγει το Cfz

Η AMPKα κινάση φαίνεται να κατέχει καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό καρδιοτοξικότητας, ως κινάση με καθοδικούς στόχους τόσο την eNOS όσο και τη ρυθμιζόμενη μέσω mTORC1 αυτοφαγία. Δεδομένης της αναστολής της AMPKα χορηγήθηκε Met προς ενδεχόμενη αναστροφή της τοξικότητας. Η συγχορήγηση της Met οδήγησε σε κατάργηση των αλλαγών που επάγει το Cfz όπως αυτές περιγράφονται με την υπερηχογραφική αξιολόγηση, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας (Εικόνα 29B).



Εικόνα 29. Μέτρηση επιπέδων γλυκόζης νηστείας. Α. Ημέρα 0 Β. Ημέρα 6.

Η ομάδα Cfz είχε σημαντικά μειωμένο FS% σε σύγκριση με τις ομάδες Control και Cfz+Met (FS%: 41.55 ± 0.43 vs. 43.24 ± 0.50 και 43.39 ± 0.56 αντίστοιχα, $p < 0.05$). Το οπίσθιο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας εμφάνισε στατιστικά σημαντική λέπτυνση στην ομάδα Cfz+Met σε σχέση με την ομάδα Control (LVPWd (mm): 0.74 ± 0.01 vs. 0.77 ± 0.01 · LVPWs (mm) 1.23 ± 0.01 vs. 1.26 ± 0.01 , $p < 0.05$) (Πίνακας 10B). Ωστόσο, σε σύγκριση με την ημέρα 0, η ομάδα Cfz+Met δεν εμφάνισε σημαντικές αλλαγές στην υπερηχογραφική αξιολόγηση (Πίνακας 10E, Εικόνα 30).

Πίνακας 10. Πρωτόκολλο 4: Υπερηχογραφική αξιολόγηση των ομάδων.

A.	Ημέρα 0	Control (n=8)	Cfz (n=8)	Cfz+Met (n=8)	Met (n=4)
	HR	596.29±14.21	622.46±9.2	603.46±9.21	614.67±14.75
	LVEDD (mm)	3.25±0.08	3.15±0.08	3.03±0.07*	3.02±0.03
	LVESD (mm)	1.83±0.04	1.78±0.04	1.70±0.03*	1.70±0.02
	LVPWd (mm)	0.76±0.01	0.75±0.01	0.75±0.01	0.77±0.01
	LVPWs (mm)	1.24±0.01	1.24±0.01	1.24±0.01	1.26±0.01
	FS (%)	43.31±0.44	43.55±0.73	43.82±0.51	44.31±0.21
	r/h	2.15±0.07	2.10±0.06	2.01±0.04	1.98±0.03

(*p<0.05 vs. Control)

B.	Ημέρα 6	Control (n=8)	Cfz (n=8)	Cfz+Met (n=8)	Met (n=4)
	HR	630.04±8.60	622.87±9.66	609.75±7.14	609.17±15.98
	LVEDD (mm)	3.10±0.07	3.07±0.07	3.09±0.05	3.09±0.05
	LVESD (mm)	1.76±0.05	1.79±0.05	1.75±0.04	1.76±0.01
	LVPWd (mm)	0.77±0.01	0.74±0.01*	0.74±0.01*	0.75±0.01
	LVPWs (mm)	1.26±0.01	1.24±0.01	1.23±0.01*	1.23±0.02
	FS (%)	43.24±0.50	41.55±0.43*†	43.39±0.56	43.03±0.53
	r/h	2.02±0.06	2.06±0.06	2.08±0.06	2.04±0.01

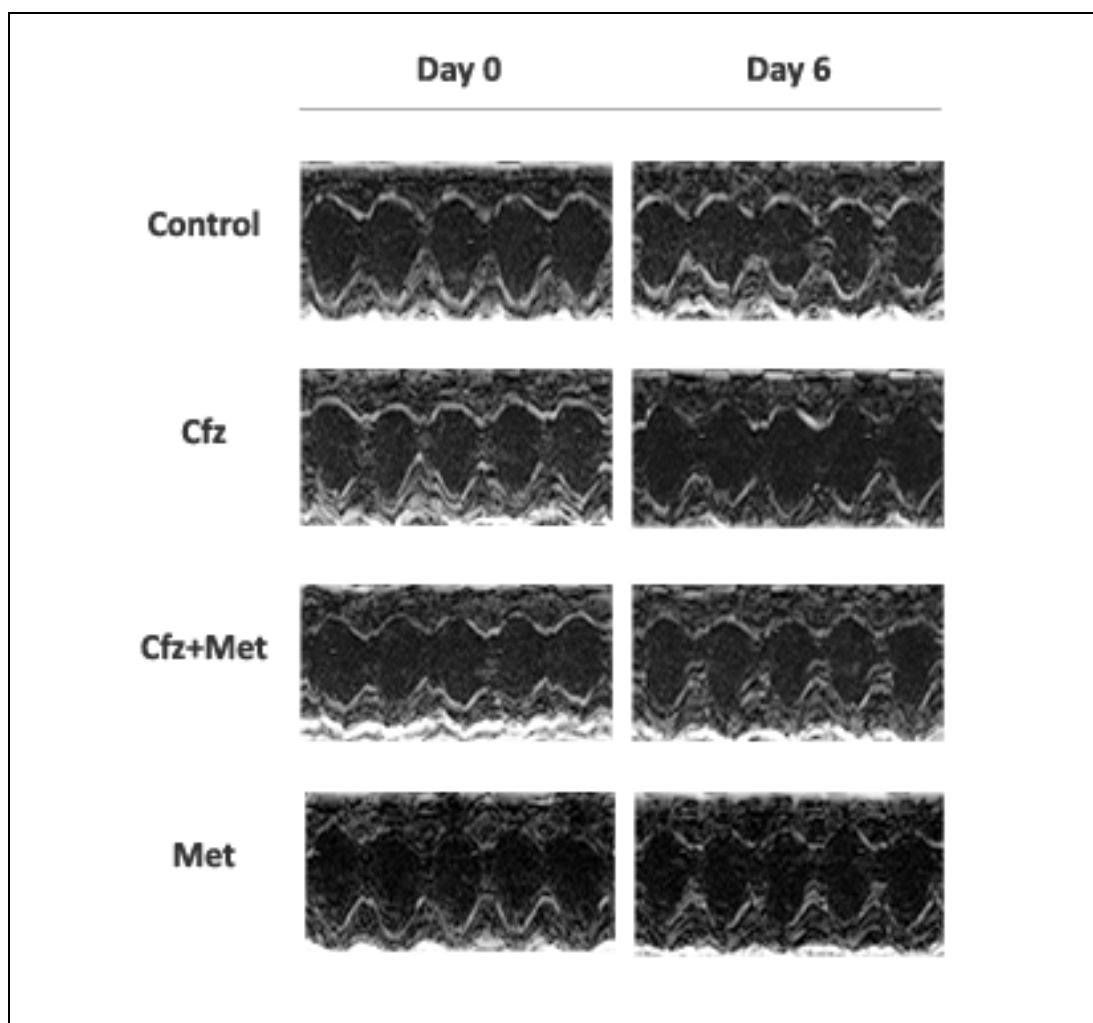
(*p<0.05 vs. Control, †p<0.05 vs. Cfz+Met)

C.	Control (n=8)	Ημέρα 0	Ημέρα 6
	HR	596.29±14.21	630.04±8.60*
	LVEDD (mm)	3.25±0.08	3.10±0.07
	LVESD (mm)	1.83±0.04	1.76±0.05
	LVPWd (mm)	0.76±0.01	0.77±0.01
	LVPWs (mm)	1.24±0.01	1.26±0.01
	FS (%)	43.31±0.44	43.24±0.50
	r/h	2.15±0.07	2.02±0.06

D.	Cfz (n=8)	Ημέρα 0	Ημέρα 6
	HR	622.46±9.2	622.87±9.66
	LVEDD (mm)	3.15±0.08	3.07±0.07
	LVESD (mm)	1.78±0.04	1.79±0.05
	LVPWd (mm)	0.75±0.01	0.74±0.01
	LVPWs (mm)	1.24±0.01	1.24±0.01
	FS (%)	43.55±0.73	41.55±0.43*
	r/h	2.10±0.06	2.06±0.06

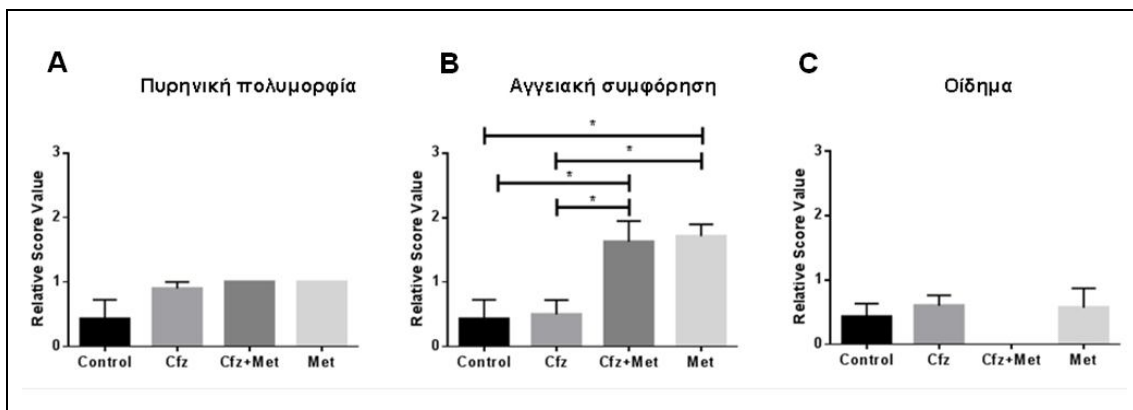
E.	Cfz+Met (n=8)	Ημέρα 0	Ημέρα 6
	HR	603.46±9.21	609.75±7.14
	LVEDD (mm)	3.03±0.07	3.09±0.05
	LVESD (mm)	1.70±0.03	1.75±0.04
	LVPWd (mm)	0.75±0.01	0.74±0.01
	LVPWs (mm)	1.24±0.01	1.23±0.01
	FS (%)	43.82±0.51	43.39±0.56
	r/h	2.01±0.04	2.08±0.06

F.	Met (n=4)	Ημέρα 0	Ημέρα 6
	HR	614.67±14.75	609.17±15.98
	LVEDD (mm)	3.02±0.03	3.09±0.05
	LVESD (mm)	1.70±0.02	1.76±0.01
	LVPWd (mm)	0.77±0.01	0.75±0.01
	LVPWs (mm)	1.26±0.01	1.23±0.02
	FS (%)	44.31±0.21	43.03±0.53
	r/h	1.98±0.03	2.04±0.01



Εικόνα 30. Αντιπροσωπευτικές εικόνες M-Mode από την υπερηχογραφική αξιολόγηση στο Πρωτόκολλο 4.

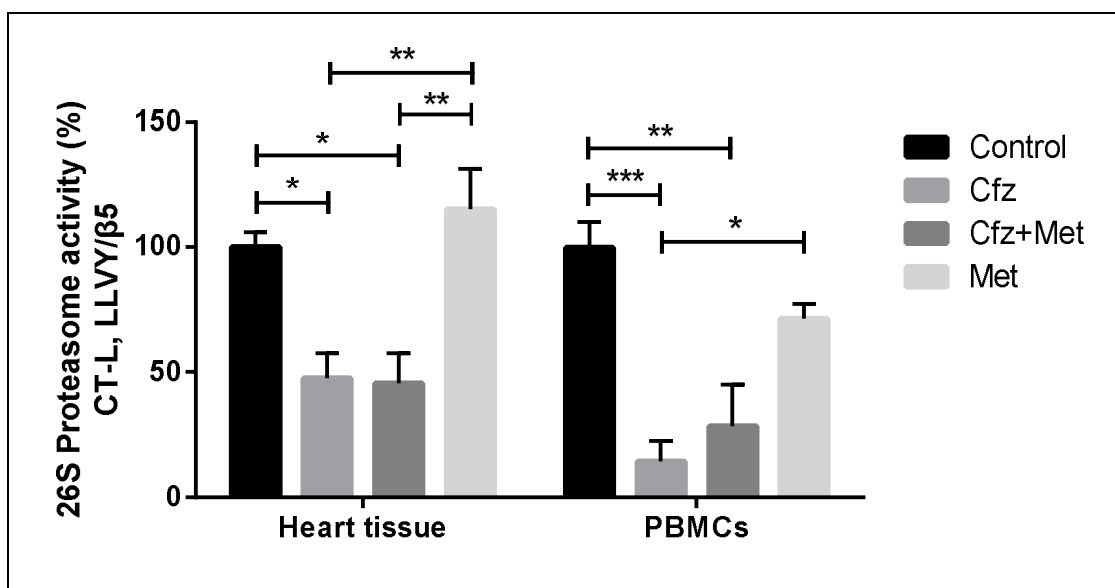
Η ιστοπαθολογική εξέταση εμφάνισε ήπια ως μέτρια αγγειακή συμφόρηση στις ομάδες Cfz+Met και Met σε σύγκριση με τις ομάδες Control και Cfz ($p < 0.05$) (Εικόνα 31B). Η αύξηση αυτή δεν σχετίζεται με μόνιμη κυτταρική βλάβη. Κατά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο δεν βρέθηκαν ενδείξεις αιμορραγίας ή αγγειακής απόφραξης. Η αγγειακή συμφόρηση που παρατηρείται στις ομάδες Cfz+Met και Met αποτελεί υπεραιμία, η οποία στην προκειμένη περίπτωση δεν μπορεί να συσχετιστεί με την ύπαρξη φλεγμονής, καθώς δεν παρατηρήθηκαν φλεγμονώδη κύτταρα, και αποτελεί μη ειδικό εύρημα (Εικόνα 24 E-H).



Εικόνα 31. Αντιπροσωπευτικά γραφήματα ιστολογίας (Πρωτόκολλο 4). Παραμετροποίηση της πυρηνικής πολυμορφίας (A), αγγειακής συμφόρησης (B) και οιδήματος (C) (0: απουσία, 1: ήπια, 2: μέτρια, 3:σοβαρή).

3.4.2 Η Met δεν επηρέασε την ικανότητα του Cfz να αναστέλλει την πρωτεασωμική λειτουργία στην καρδιά και στα PBMCs των μυών

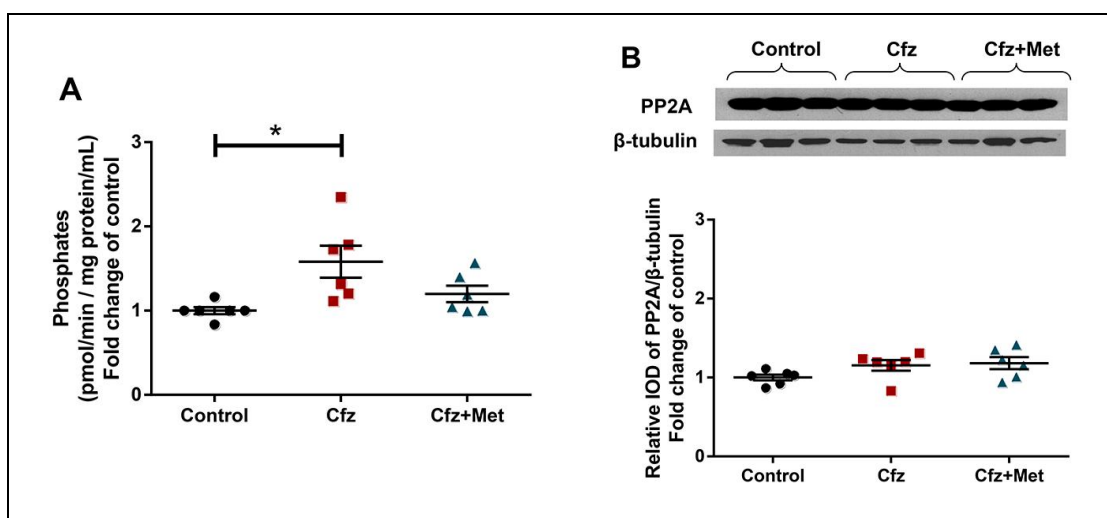
Η χορήγηση της Met βελτίωσε την καρδιακή λειτουργία στους μύες που έλαβαν Cfz, χωρίς να επηρεάζει την ικανότητα του Cfz να αναστέλλει την πρωτεασωμική λειτουργία. Οι ομάδες Cfz και Cfz+Met εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα Control τόσο στον μυοκαρδιακό ιστό ($p < 0.05$) όσο και στα PBMCs ($p < 0.001$ και $p < 0.01$, οι ομάδες Cfz και Cfz+Met αντίστοιχα) (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Δοκιμασία ενεργότητας (26S) πρωτεασώματος. Η χορήγηση Met δεν παρεμβαίνει στην αναστολή του πρωτεασώματος που επάγεται από το Cfz στο μυοκάρδιο και τα PBMCs (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.5.1 Η χορήγηση Cfz αύξησε την ενεργότητα της PP2A φωσφατάσης, ανεξάρτητα της χορήγησης Met

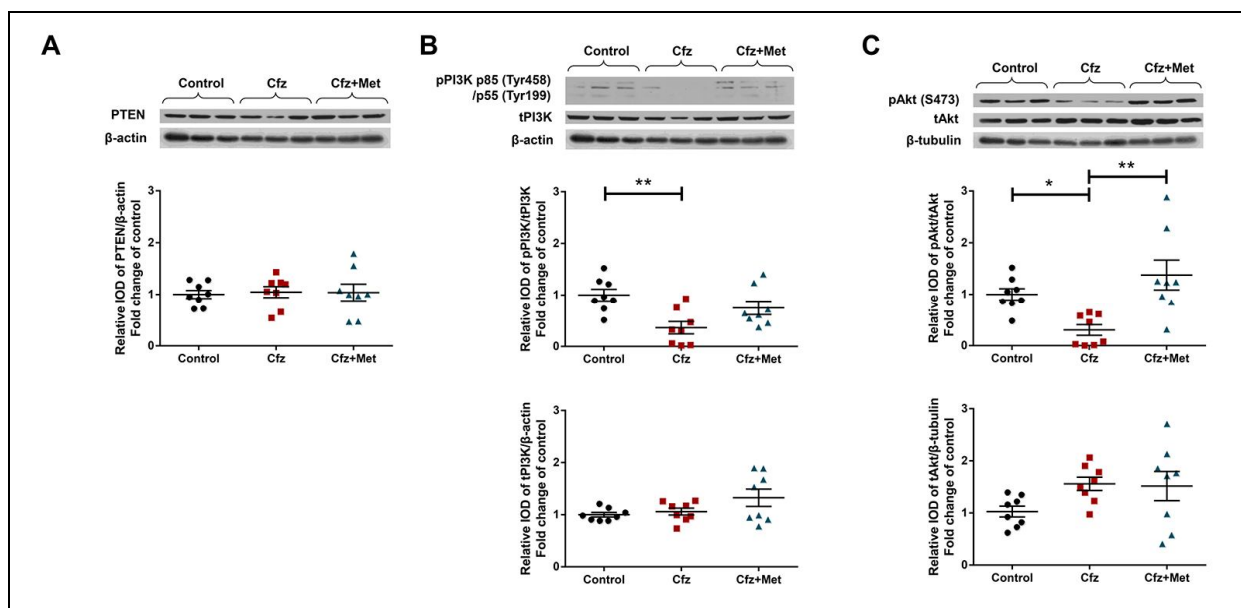
Στα πλαίσια της μελέτης των μοριακών μηχανισμών, μελετήθηκε η ενεργότητα της PP2A φωσφατάσης. Η PP2A είναι μία φωσφατάση η οποία απο-φωσφορυλιώνει, μεταξύ άλλων, τις κινάσες Akt και AMPKα, και έχει βρεθεί *in vitro* σε κυτταρικές σειρές λευχαιμίας ότι η ενεργότητά της επάγεται από το Cfz [114]. Πράγματι, αποδείχθηκε ότι το Cfz επάγει και *in vivo* αύξηση στην ενεργότητα της PP2A φωσφατάσης σε σύγκριση με την ομάδα Control ($p < 0.05$) (Εικόνα 33 A), χωρίς να επηρεάζει την έκφραση της PP2A όπως φαίνεται από την Western Blot (Εικόνα 33 B). Η συγχορήγηση Met δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντικές διαφορές έναντι των ομάδων Control και Cfz.



Εικόνα 33. Δοκιμασία της PP2A φωσφατάσης. **A.** Ενεργότητα της PP2A ως παραγωγή phosphates (pmol/min / mg protein/mL) ($p < 0.05$) **B.** Αντιπροσωπευτική western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση της έκφρασης της PP2A.

3.5.2 Η συγχορήγηση Met ενεργοποίησε την Akt

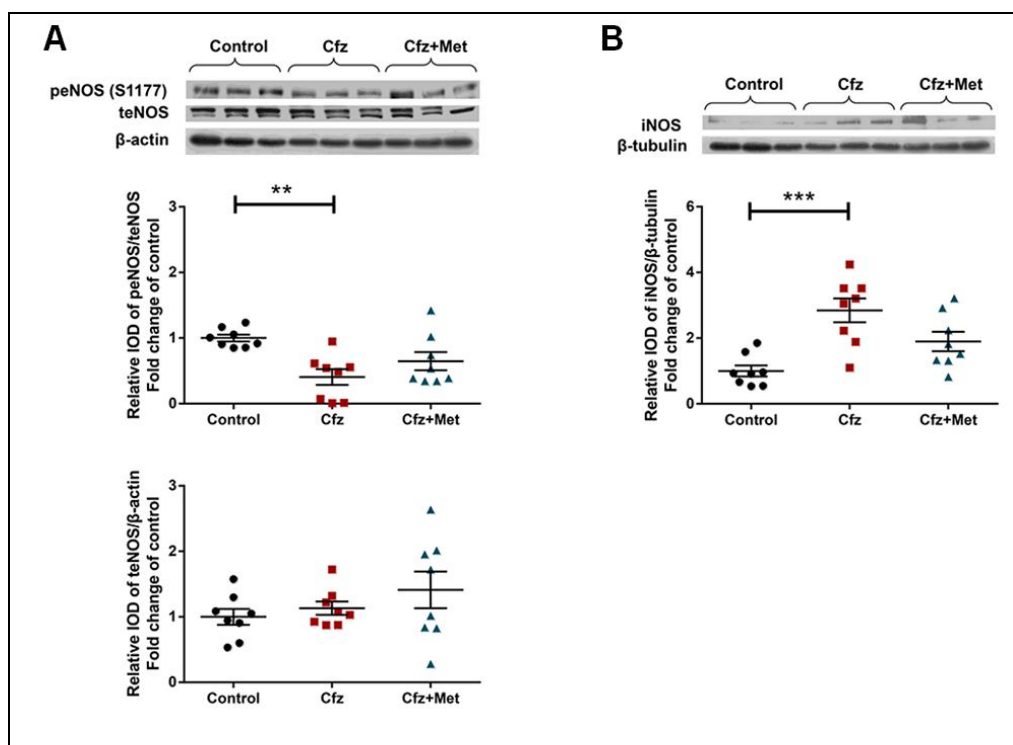
Η συγχορήγηση Met οδήγησε σε ενεργοποίηση της Akt, καθώς η φωσφορυλίωσή της είχε στατιστικά σημαντική μείωση στην ομάδα Cfz έναντι των ομάδων Control και Cfz+Met ($p < 0.05$ και $p < 0.01$ αντίστοιχα). Η ενεργοποίηση της Akt έγινε με μηχανισμό ανεξάρτητο της PTEN, η οποία δεν εμφάνισε αλλαγές στην έκφρασή της. Η pPI3K παρουσίασε μία αύξηση στην ομάδα Cfz+Met έναντι της ομάδας Cfz, η οποία όμως δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική (Εικόνα 34).



Εικόνα 34. Αντιπροσωπευτικές western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των Α. PTEN/β-actin Β. pPI3K/tPI3K και tPI3K/β-actin C. pAkt/tAkt και tAkt/β-tubulin.

3.5.3 Η συγχορήγηση της Met δεν επηρέασε την ομοιόσταση του NO

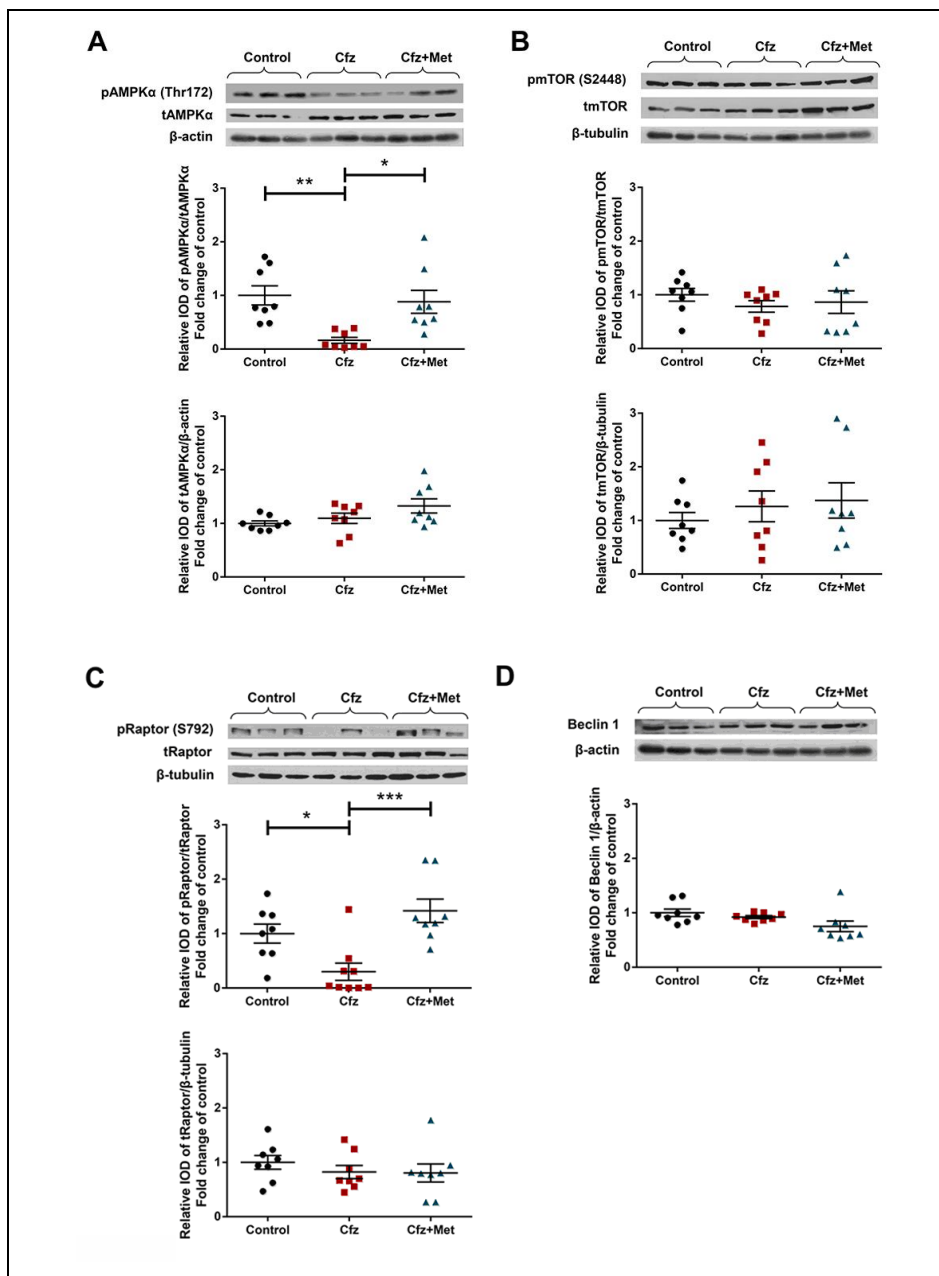
Στην ομάδα Cfz+Met δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική αλλαγή στις peNOS, iNOS έναντι των ομάδων Control και Cfz. Παρόλο αυτά, η peNOS εμφάνισε μη σημαντική αύξηση, ακολουθώντας το ίδιο μοτίβο με την pPI3K και pAkt. Η έκφραση της iNOS δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων Cfz και Cfz+Met (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Αντιπροσωπευτικές western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των Α. peNOS/teNOS και teNOS/β-actin Β. iNOS/β-tubulin

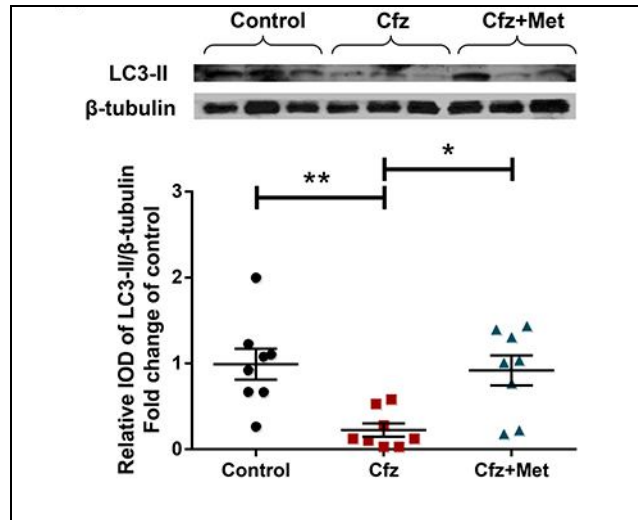
3.5.4 Η συγχρόνηση Met οδήγησε σε φωσφορυλίωση της AMPKα και αποκατάσταση της αυτοφαγίας

Η συγχρόνηση Met αύξησε τη φωσφορυλίωση της AMPKα στην ομάδα Cfz+Met έναντι της ομάδας Cfz ($p < 0.05$). Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση του Raptor (Cfz+Met vs. Cfz, $p < 0.001$), χωρίς να εντοπίζονται αλλαγές στις πρωτεΐνες pmTOR και Beclin 1 μεταξύ των ομάδων (Εικόνα 36).



Εικόνα 36. Αντιπροσωπευτικές western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση των **A.** pAMPKα/tAMPKα και tAMPKα/β-actin **B.** pmTOR/tmTOR και tmTOR/β-tubulin **C.** pRaptor/tRaptor και tRaptor/β-tubulin **D.** Beclin 1/β-actin

Η φωσφορυλίωση του Raptor οδηγεί σε αναστολή του συμπλέγματος mTORC1 και προαγωγή της αυτοφαγίας, όπως υποδεικνύεται από την αυξημένη έκφραση του LC3-II (Cfz+Met vs. Cfz, $p < 0.05$) (Εικόνα 37).



Εικόνα 37. Αντιπροσωπευτική western blot και σχετική πυκνομετρική ανάλυση του LC3-II/β-tubulin.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι αναστολείς πρωτεασώματος αποτελούν βασικό πυλώνα στη θεραπεία τόσο του νεοδιαγνωσθέντος όσο και υποτροπιάζοντος / ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος και συγκεκριμένα οι αναστολείς Btz, Cfz, Ixz. Σύμφωνα με τις πρόσφατες αναφορές κλινικών περιστατικών από τη χρήση του Ixz, φαίνεται ότι όλοι οι αναστολείς εμφανίζουν καρδιοτοξικότητα – διαφορετικής δριμύτητας – υποδεικνύοντας ότι η δράση αυτή ενδέχεται να σχετίζεται συνολικά με την κατηγορία φαρμάκων [115]. Μεταξύ των φαρμάκων Btz και Cfz, στα οποία υπάρχει μεγαλύτερη κλινική εμπειρία, το Cfz παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών σε σύγκριση με το Btz ή άλλη ομάδα ελέγχου στις μελέτες· αυτό επαληθεύεται τόσο σε νεοδιαγνωσθέν πολλαπλό μύελωμα (CYKLONE, κλινική μελέτη φάσης Ib/II) αλλά και σε υποτροπιάζουσα (ASPIRE, κλινική μελέτη φάσης III) και υποτροπιάζουσα / ανθεκτική νόσο (ENDEAVOR, κλινική μελέτη φάσης III) [62, 115]. Επομένως, η διερεύνηση του μηχανισμού της επαγόμενης από Cfz καρδιοτοξικότητας είναι ιδιαίτερης σημασίας προς την εύρεση προφυλακτικών θεραπειών, οι οποίες θα στηρίζονται στο μηχανισμό καρδιοτοξικότητας. Η παρούσα *in vivo* μελέτη καθιέρωσε ένα οξύ πρωτόκολλο για την επαγόμενη από Cfz καρδιοτοξικότητα, κατά το οποίο εκδηλώνεται μειωμένη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας. Το Cfz επηρέασε το μυοκάρδιο τόσο μέσω απενεργοποίησης του PI3K/Akt/eNOS μονοπατιού και διαταραχής της ομοιόστασης του NO όσο και μέσω αναστολής της αυτοφαγίας. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο της AMPKα στην καρδιοτοξικότητα. Με σκοπό να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της αναστολής της AMPKα στην επαγόμενη από το Cfz καρδιοτοξικότητα, χορηγήθηκε η Met, ένας AMPKα ενεργοποιητής, και παρατηρήθηκε πως η Met ανέστρεψε τις επαγόμενες από το Cfz μοριακές αλλαγές και διατήρησε την καρδιακή λειτουργία.

Η μοναδική δημοσιευμένη *in vivo* μελέτη για την επαγόμενη από αναστολείς πρωτεασώματος καρδιοτοξικότητα η οποία χρησιμοποιεί υπερηχογραφική αξιολόγηση για την επιβεβαίωση εγκαθίδρυσης καρδιακής δυσλειτουργίας αφορά στο Btz και αποδεικνύει ότι το φάρμακο επάγει συσταλτική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας σε επίμυες, η οποία συνοδεύεται από σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις και κατά τόπους εμφάνιση υπερτροφίας των καρδιακών κυττάρων [69]. Όσον αφορά το Cfz, για πρώτη φορά, στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι η οξεία χορήγηση του

φαρμάκου (8 mg/kg, ip) κάθε 48 ώρες για διάστημα 6 ημερών επάγει οξεία καρδιοτοξικότητα με μειωμένο FS% σε μύες. Η καρδιακή δυσλειτουργία δεν συνοδεύεται από ιστολογικές βλάβες στο μυοκάρδιο.

Η δόση του Cfz (8 mg/kg) που χορηγήθηκε στους μύες είναι αντίστοιχη με δόση 27 mg/m² στους ασθενείς. Σύμφωνα με τις πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, όπως αυτές προέκυψαν από τη μελέτη ENDEAVOR, προτείνεται η δόση που χορηγείται στους ασθενείς να φτάνει ως τα 56 mg/m² [47, 116]. Το Cfz χορηγήθηκε κάθε δεύτερη μέρα ώστε να προσομοιάσει μία αντίστοιχη δόση με αυτή των 56 mg/m² και να αυξηθεί η μεταφραστική ικανότητα της μελέτης. Η δόση που επιλέχθηκε οδήγησε σε ικανοποιητική αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος τόσο στο μυοκαρδιακό ιστό, όσο και στα PBMCs. Συγκεκριμένα, η αναστολή που επιτεύχθηκε στα PBMCs ήταν ανάλογη της αναστολής που παρατηρείται στους ασθενείς [112, 117]: το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει την επιλογή της δόσης, αλλά και ενισχύει τις κλινικές προεκτάσεις των ευρημάτων.

Η οξεία χορήγηση του Cfz (*Πρωτόκολλο 1*) στην παραπάνω δόση οδηγεί σε συσταλτική δυσλειτουργία και διάταση της αριστερής κοιλίας. Παρόμοιες αλλαγές παρατηρούνται και στους ασθενείς, οι οποίοι στην υπερηχογραφική αξιολόγηση εμφανίζουν μειωμένο κλάσμα εξώθησης από τις πρώτες κιόλας χορηγήσεις του φαρμάκου [118]. Επιπλέον υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών στους οποίους εμφανίστηκε διάταση της αριστερής κοιλίας κατά τη θεραπεία υποτροπιάζοντος / ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος με Cfz [113]. Κατά την ιστολογική αξιολόγηση δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές ιστολογικές αλλοιώσεις στον μυοκάρδιο των μυών που έλαβαν Cfz. Οι υπάρχουσες πληροφορίες από μελέτες οι οποίες περιελάμβαναν ιστολογική αξιολόγηση είναι αντικρουόμενες: σε κάποιες περιπτώσεις υποδεικνύουν καταστροφή του μυοκαρδιακού ιστού με παράλληλη αύξηση βιοδεικτών [70, 72], ενώ η χορήγηση Cfz δεν επάγει βλάβες ή αλλαγές στο πάχος του τοιχώματος των πνευμονικών αρτηριών ή νέκρωση, ακόμα και σε υψηλότερες δόσεις [119]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία και με τις παρατηρήσεις στην κλινική πράξη, όπου οι ασθενείς εμφανίζουν αναστρέψιμη καρδιακή δυσλειτουργία χωρίς να παρατηρείται νέκρωση ή αύξηση των επιπέδων τροπονίνης στον ορό [67].

Σχετικά με το μοριακό μηχανισμό της επαγόμενης από Cfz καρδιοτοξικότητας (Εικόνα 38), στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία έχουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση των μυοκαρδιακών κυττάρων, όπως ο άξονας PI3K/Akt [75], και αποδείχθηκε ότι το Cfz αναστέλλει το μονοπάτι PI3K/Akt. Για την περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου το Cfz επιδρά στο μονοπάτι PI3K/Akt μελετήθηκε η έκφραση της PTEN. Σε αντίθεση με το Btz το οποίο έχει βρεθεί ότι αυξάνει την έκφραση της PTEN [120], το Cfz δεν οδήγησε σε αλλαγές στα επίπεδά της. Όσον αφορά τους καθοδικούς στόχους του PI3K/Akt μονοπατιού, βρέθηκε ότι το Cfz μειώνει τη φωσφορυλίωση της eNOS. Επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση του Cfz στην έκφραση της iNOS, δεδομένου ότι παράλληλη αύξηση της έκφρασης της iNOS οδηγεί σε απορρύθμιση της παραγωγής του NO [81], καθώς και ότι η διαταραχή της ισορροπίας eNOS/iNOS, προς όφελος της iNOS, αποτελεί γνωστό μηχανισμό καρδιοτοξικότητας, ο οποίος μεσολαβείται μέσω νιτρο-οξειδωτικού στρες και έχει περιγραφεί λεπτομερώς στην επαγόμενη από Dox καρδιοτοξικότητα [82, 121]. Παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση της iNOS, και τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αναφορές στη βιβλιογραφία ότι οι αναστολές πρωτεασώματος σχετίζονται με διαταραχές στην λειτουργία της eNOS/NO [78].

Ακολούθως μελετήθηκαν σηματοδοτικά μόρια τα οποία σχετίζονται με τη ρύθμιση της αυτοφαγίας, καθώς είναι γνωστό ότι η κατάργηση της αυτοφαγίας στο μυοκάρδιο οδηγεί στην εμφάνιση καρδιομυοπάθειας σε μύες [122]. Επίσης, ειδικότερα σε καταστάσεις στις οποίες αναστέλλεται η λειτουργία του πρωτεασώματος είναι γνωστό ότι η αυτοφαγική αποικοδόμηση έχει σημαντική δράση επί της διατήρησης της ομοιόστασης στα μυοκαρδιακά κύτταρα και έχει περιγραφεί μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του UPS και της αυτοφαγίας [123]. Ιδιαίτερα σε *in vivo* μελέτες με επαγόμενη κατάργηση της αυτοφαγίας αναδεικνύεται ότι η συγκεκριμένη ανεπάρκεια οδηγεί σε συσταλτική δυσλειτουργία και διάταση της αριστερής κοιλίας [122] – ευρήματα κατά αντιστοιχία με την υπερηχογραφική αξιολόγηση των μυών. Η κινάση AMPKα, εκτός από τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού της καρδιάς, ρυθμίζει την αυτοφαγική αποικοδόμηση μέσω αναστολής του συμπλέγματος mTORC1 [124, 125]. Η επαγόμενη από το Cfz αναστολή της AMPKα οδήγησε σε μειωμένη φωσφορυλίωση του Raptor. Ο Raptor, υπό φυσιολογικές συνθήκες

αναστέλλει το σύμπλεγμα mTORC1, δράση η οποία οδηγεί σε διατήρηση της αυτοφαγίας [86]. Επιπλέον, το Cfz οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του αυτοφαγικού δείκτη, LC3-II. Σε πρόσφατη μελέτη έχει αναφερθεί ότι το Cfz επάγει απόπτωση σε κυτταρική σειρά λευχαιμίας μέσω ενεργοποίησης της PP2A και αποφωσφορυλίωση της pAkt, ανεξάρτητα από την αναστολή του πρωτεασώματος. Συγκεκριμένα, το Cfz ενεργοποιεί την PP2A μέσω διαταραχής της ογκοπρωτεΐνης KIAA1524, η οποία αναστέλλει την PP2A [114]. Επομένως, εξετάστηκε αν το Cfz ενεργοποιεί την PP2A, λαμβάνοντας υπόψη ότι η PP2A έχει ως καθοδικούς στόχους την Akt και AMPKα. Το Cfz προκάλεσε αύξηση στην ενεργότητα της PP2A· επομένως μπορεί να οδηγεί στη μειωμένη φωσφορυλίωση της Akt και της AMPKα.

Συνολικά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι σε μοριακό επίπεδο η οξεία επαγόμενη από το Cfz καρδιοτοξικότητα μεσολαβείται από αυξημένη ενεργότητα της PP2A φωσφατάσης, η οποία οδηγεί σε απενεργοποίηση του Akt/eNOS μονοπατιού – σε συνδυασμό από αύξηση στην έκφραση της iNOS – και απενεργοποίηση της AMPKα. Η απενεργοποίηση της AMPKα οδηγεί σε μειωμένη φωσφορυλίωση του Raptor, ο οποίος είναι απαραίτητος για την αναστολή του mTORC1 και την επαγωγή της αυτοφαγίας.

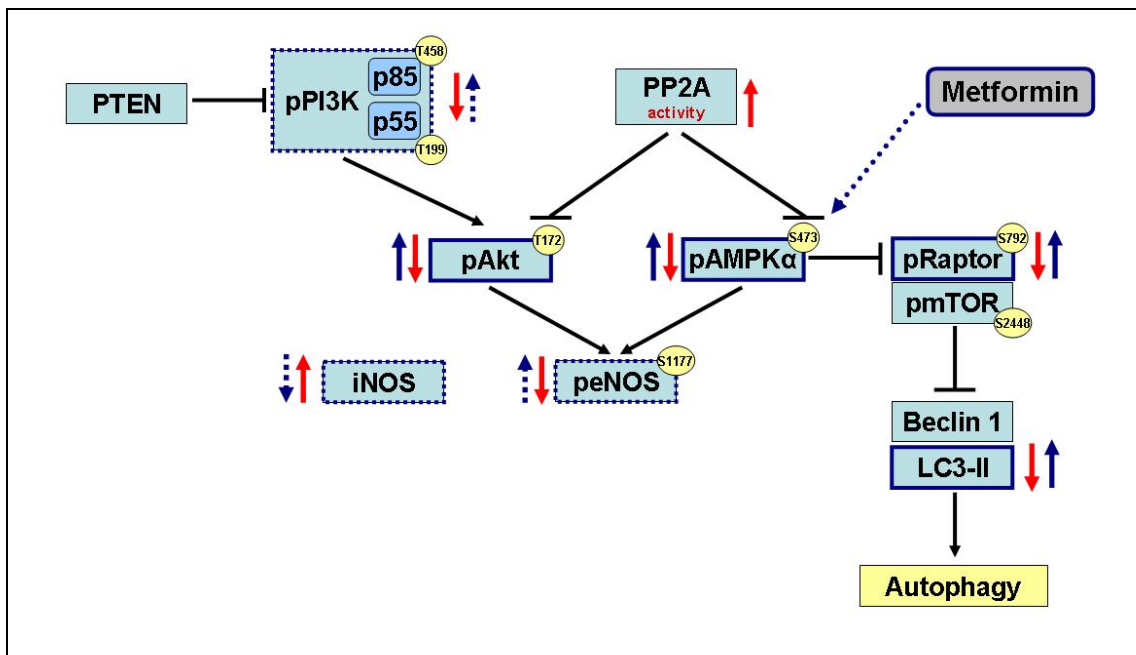
Το επόμενο βήμα ήταν να επιβεβαιωθεί αν η μειωμένη φωσφορυλίωση της AMPKα και κατά συνέπεια η μειωμένη φωσφορυλίωση του Raptor και η μείωση του LC3-II είναι απαραίτητοι μοριακοί στόχοι της επαγόμενης από το Cfz καρδιοτοξικότητας. Η Met είναι ένας ευρέως γνωστός ενεργοποιητής της AMPKα [126] και μέσω αυτής της ενεργοποίησης ασκεί πληθώρα καρδιοπροστατευτικών δράσεων, οι οποίες μεσολαβούνται από ρύθμιση της αυτοφαγίας και αναστολή της απόπτωσης [95, 96]. Η Met οδηγεί σε ενίσχυση της αυτοφαγίας στην καρδιά και προστατεύει τα καρδιομυοκύτταρα έναντι της απόπτωσης, οδηγώντας σε συνολική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας *in vivo* [85, 86]. Η συγχορήγηση της Met αναστρέφει την επαγόμενη από το Cfz συσταλτική δυσλειτουργία, σε δόση η οποία δεν ασκεί δράσεις μέσω μείωσης της γλυκόζης, καθώς επίσης δεν παρεμβαίνει στην αναστολή του πρωτεασώματος. Ο μοριακός μηχανισμός καρδιοπροστασίας της Met ασκείται μέσω της διατήρησης της φωσφορυλίωσης της AMPKα (Εικόνα 38). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι η επαναφορά στην ενεργότητα της AMPKα – και η επακόλουθη αναστολή του mTORC1 – οδηγεί σε ενίσχυση της αυτοφαγίας στο

μυοκάρδιο, όπως υποδεικνύεται από τον αυτοφαγικό δείκτη LC3-II. Η ενίσχυση της αυτοφαγίας στα μυοκαρδιακά κύτταρα είναι σημαντική τόσο για την παρεμπόδιση της επαγόμενης από αναστολή του πρωτεασώματος τοξικότητας όσο και για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης στην καρδιακή ανεπάρκεια [127, 128]. Σε περιπτώσεις αδυναμίας του πρωτεασώματος να αποικοδομήσει τις πρωτεΐνες με λάθος στην αναδίπλωση (misfolded proteins) ή τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates) που δημιουργούνται, η αυτοφαγία προάγει την κυτταρική επιβίωση. Ιδιαίτερα στα μυοκαρδιακά κύτταρα, η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της συσταλτικότητας των κυττάρων, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα που δημιουργούνται μπορούν να επηρεάσουν τα μηχανικά χαρακτηριστικά ολόκληρου του κυττάρου [84, 129]. Εκτός από τη βελτίωση μέσω αυτοφαγίας της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης και διατήρηση της ομοιόστασης στα μυοκαρδιακά κύτταρα, η χορήγηση Met οδηγεί επιπλέον στην προστασία της ενδοθηλιακής λειτουργίας· καθώς ασκεί και δράσεις μεσολαβούμενες της PI3K και ενεργοποιεί την Akt κινάση στην καρδιά – ανεξάρτητα από την AMPKα [130]. Η ενεργοποίηση του Akt/eNOS μονοπατιού οδηγεί σε επακόλουθη αποκατάσταση της παραγωγής του NO και έχει παρατηρηθεί σε ζωικά πρότυπα μελέτης του διαβήτη ότι η Met προστατεύει το ενδοθήλιο και αποκαθιστά την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή μέσω ενίσχυσης της σηματοδότησης της eNOS [98, 131]. Στην παρούσα μελέτη, οι δράσεις που σχετίζονται με το ενδοθήλιο δεν επαληθεύτηκαν καθώς η συγχορήγηση της Met δεν ενεργοποίησε σημαντικά την eNOS. Επομένως, η προστασία της ενδοθηλιακής λειτουργίας από την επαγόμενη από Czf καρδιοτοξικότητα χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η μέχρι στιγμής κλινική εμπειρία από τη χορήγηση Met σε μη διαβητικούς ασθενείς εστιάζει στις δυνητικά ευεργετικές δράσεις στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου ή συναφών επιπλοκών [101, 102]. Φυσικά, για την κλινική εφαρμογή της παρούσας *in vivo* μελέτης πρέπει επιπλέον να ληφθούν υπόψη τόσο η παθοφυσιολογία του πολλαπλού μυελώματος όσο και οι βασικές αρχές της αντικαρκινικής θεραπείας. Η Met έχει αναφερθεί ως ένα από τα μοναδικά αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα τα οποία μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου [132]. Πράγματι, πέρα από προκλινικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση, υπάρχουν αρκετές κλινικές μελέτες οι οποίες ερευνούν την αντικαρκινική δράση της Met [133]. Σχετικά με το πολλαπλό μυέλωμα, έχει βρεθεί ότι οι ασθενείς που είχαν παράλληλα διαβήτη και

λάμβαναν Met εμφάνισαν αυξημένη συνολική επιβίωση ως και 74.3 μήνες έναντι 60.1 μήνες στους ασθενείς που δεν λάμβαναν Met [134]. Επιπροσθέτως, η Met αναστέλλει την εξέλιξη της νόσου από τη μονοκλωνική γαμμοπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας και τη μετατροπή σε πολλαπλό μυέλωμα στους διαβητικούς ασθενείς [135]. Ο μηχανισμός δράσης εστιάζει στη μεσολαβούμενη από AMPKα επαγωγή της αυτοφαγίας και διαταραχή του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας σε αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων τόσο σε κυτταρικές σειρές πολλαπλού μυελώματος όσο και σε διαγονιδιακούς μύες μυελώματος [136]. Παρά το γεγονός ότι η συνεργιστική δράση της Met με το Btz δεν έχει εδραιωθεί, υπάρχουν ενδείξεις ότι η Met μπορεί να συνεισφέρει στην κάμψη των κυττάρων που εμφανίζονται ανθεκτικά στο Btz μέσω επίδρασης στην απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου στην παρουσία μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (unfolded protein response) και στην αυτοφαγία [137, 138]. Επομένως, οι ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν θεραπευτικά σχήματα τα οποία περιλαμβάνουν Cfz ενδέχεται να επωφεληθούν τόσο από την καρδιοπροστατευτική όσο και από την αντικαρκινική δράση· οι παραπάνω δράσεις θα πρέπει να διερευνηθούν και να αποδειχθούν σε *in vivo* μελέτες καθώς υπάρχει μία πολυπαραγοντική σχέση ισορροπίας μεταξύ της υποστηρικτικής καρδιαγγειακής αγωγής και της αντικαρκινικής θεραπείας [139, 140].

Συμπερασματικά, η παρούσα *in vivo* μελέτη είναι η πρώτη η οποία μελετά πειραματικά πρωτόκολλα της επαγόμενης από το Cfz καρδιακής δυσλειτουργίας και εδραιώνει ένα οξύ πρωτόκολλο καρδιοτοξικότητας σε υγιείς μύες. Ο μηχανισμός καρδιοτοξικότητας μεσολαβείται από ενεργοποίηση της PP2A φωσφατάσης και αναστολή του PI3K/Akt/eNOS μονοπατιού – με παράλληλη απορρύθμιση της ομοιόστασης του NO – καθώς και αναστολή της AMPKα/mTOR-ρυθμιζόμενης αυτοφαγίας. Η AMPKα έχει καθοριστικό ρόλο καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση και των δύο μονοπατιών.



Εικόνα 38. Προτεινόμενος μοριακός μηχανισμός: επαγόμενης από Cfz καρδιοτοξικότητας (αναπαρίστανται με κόκκινα βέλη) και επαγόμενης από Met καρδιοπροστασίας (αναπαρίστανται με μπλε βέλη, οι διακεκομμένες γραμμές ορίζουν μη στατιστικά σημαντικές αλλαγές).

Τέλος η χορήγηση της Met οδηγεί σε ενεργοποίηση της AMPKα και αντιρρόπηση της καρδιακής δυσλειτουργίας – μέσω ενεργοποίησης της αυτοφαγίας, χωρίς να επαναφέρει πλήρως την ομοιόσταση του NO. Η χορήγηση της Met, η οποία στηρίζεται στον μοριακό μηχανισμό καρδιοτοξικότητας, είναι μία υποσχόμενη θεραπευτική παρέμβαση για την αντιμετώπιση των επαγόμενων από το Cfz καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Palumbo, A. and K. Anderson, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 1046-60.
2. Mina, R., et al., *New pharmacotherapy options for multiple myeloma*. Expert Opin Pharmacother, 2016. **17**(2): p. 181-92.
3. Elsayed, H.G. and A.S. Alabdulwahab, *Upfront treatment of elderly myeloma patients: an overview and update*. Expert Rev Hematol, 2018. **11**(2): p. 99-108.
4. Chesi, M. and P.L. Bergsagel, *Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates*. Int J Hematol, 2013. **97**(3): p. 313-23.
5. Mahindra, A., T. Hideshima, and K.C. Anderson, *Multiple myeloma: biology of the disease*. Blood Rev, 2010. **24 Suppl 1**: p. S5-11.
6. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. Lancet Oncol, 2014. **15**(12): p. e538-48.
7. Gerecke, C., et al., *The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(27-28): p. 470-6.
8. Lahuerta, J.J., et al., *Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5775-82.
9. van de Velde, H.J., et al., *Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma*. Haematologica, 2007. **92**(10): p. 1399-406.
10. Moreau, P., et al., *Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2017. **28**(suppl_4): p. iv52-iv61.
11. Powers, E.T. and W.E. Balch, *Diversity in the origins of proteostasis networks--a driver for protein function in evolution*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(4): p. 237-48.
12. Wang, X. and J. Robbins, *Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **71**: p. 16-24.
13. Chondrogianni, N., et al., *Protein damage, repair and proteolysis*. Mol Aspects Med, 2014. **35**: p. 1-71.
14. Chondrogianni, N. and E.S. Gonos, *Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: modulation of components*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **109**: p. 41-74.
15. Jung, T., B. Catalgol, and T. Grune, *The proteasomal system*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(4): p. 191-296.
16. Petroski, M.D. and R.J. Deshaies, *Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34*. Cell, 2005. **123**(6): p. 1107-20.
17. Grice, G.L. and J.A. Nathan, *The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(18): p. 3497-506.
18. Komander, D., *The emerging complexity of protein ubiquitination*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 937-53.

19. Borissenko, L. and M. Groll, *20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development*. Chem Rev, 2007. **107**(3): p. 687-717.
20. Tsakiri, E.N. and I.P. Trougakos, *The amazing ubiquitin-proteasome system: structural components and implication in aging*. Int Rev Cell Mol Biol, 2015. **314**: p. 171-237.
21. Shi, Y., et al., *Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome*. Science, 2016. **351**(6275).
22. Lam, Y.A., et al., *A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal*. Nature, 2002. **416**(6882): p. 763-7.
23. Livneh, I., et al., *The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death*. Cell Res, 2016. **26**(8): p. 869-85.
24. Schreiner, P., et al., *Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 548-52.
25. Farshi, P., et al., *Deubiquitinases (DUBs) and DUB inhibitors: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2015. **25**(10): p. 1191-1208.
26. Amelio, I., et al., *Polypharmacology of small molecules targeting the ubiquitin-proteasome and ubiquitin-like systems*. Oncotarget, 2015. **6**(12): p. 9646-56.
27. Landre, V., et al., *Screening for E3-ubiquitin ligase inhibitors: challenges and opportunities*. Oncotarget, 2014. **5**(18): p. 7988-8013.
28. Shen, M., et al., *Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(9): p. 1091-108.
29. Morrow, J.K., et al., *Targeting ubiquitination for cancer therapies*. Future Med Chem, 2015. **7**(17): p. 2333-50.
30. Weathington, N.M. and R.K. Mallampalli, *Emerging therapies targeting the ubiquitin proteasome system in cancer*. J Clin Invest, 2014. **124**(1): p. 6-12.
31. Lu, S. and J. Wang, *The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib*. Biomark Res, 2013. **1**(1): p. 13.
32. Kim, K.B. and C.M. Crews, *From epoxomicin to carfilzomib: chemistry, biology, and medical outcomes*. Nat Prod Rep, 2013. **30**(5): p. 600-4.
33. Sahasrabudhe, A.A. and K.S. Elenitoba-Johnson, *Role of the ubiquitin proteasome system in hematologic malignancies*. Immunol Rev, 2015. **263**(1): p. 224-39.
34. Oldziej, A., et al., *Assessment of proteasome concentration and chymotrypsin-like activity in plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Leuk Res, 2014. **38**(8): p. 925-30.
35. Kale, A.J. and B.S. Moore, *Molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance*. J Med Chem, 2012. **55**(23): p. 10317-27.
36. Crawford, L.J. and A.E. Irvine, *Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies*. Blood Rev, 2013. **27**(6): p. 297-304.
37. Kane, R.C., et al., *Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy*. Oncologist, 2003. **8**(6): p. 508-13.
38. Richardson, P.G., et al., *A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma*. N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2609-17.
39. Richardson, P.G., et al., *Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma*. N Engl J Med, 2005. **352**(24): p. 2487-98.
40. San Miguel, J.F., et al., *Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 906-17.
41. Niewerth, D., et al., *Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies*. Drug Resist Updat, 2015. **18**: p. 18-35.

42. Dimopoulos, M.A., et al., *Current treatment landscape for relapsed and/or refractory multiple myeloma*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(1): p. 42-54.
43. Kumar, S.K., et al., *Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study*. Leukemia, 2012. **26**(1): p. 149-57.
44. Herndon, T.M., et al., *U.s. Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(17): p. 4559-63.
45. Siegel, D.S., et al., *A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma*. Blood, 2012. **120**(14): p. 2817-25.
46. Stewart, A.K., et al., *Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma*. N Engl J Med, 2015. **372**(2): p. 142-52.
47. Dimopoulos, M.A., et al., *Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study*. Lancet Oncol, 2016. **17**(1): p. 27-38.
48. Shirley, M., *Ixazomib: First Global Approval*. Drugs, 2016. **76**(3): p. 405-11.
49. Gupta, N., et al., *Dose and Schedule Selection of the Oral Proteasome Inhibitor Ixazomib in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Clinical and Model-Based Analyses*. Target Oncol, 2017. **12**(5): p. 643-654.
50. Moreau, P., et al., *Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma*. N Engl J Med, 2016. **374**(17): p. 1621-34.
51. Jouni, H., et al., *Ixazomib cardiotoxicity: A possible class effect of proteasome inhibitors*. Am J Hematol, 2017. **92**(2): p. 220-221.
52. Vij, R., et al., *Clinical Profile of Single-Agent Oprozomib in Patients (Pts) with Multiple Myeloma (MM): Updated Results from a Multicenter, Open-Label, Dose Escalation Phase 1b/2 Study*. Blood, 2014. **124**(21).
53. Terpos, E., et al., *The Novel Proteasome Inhibitors Carfilzomib and Oprozomib Induce Milder Degenerative Effects Compared To Bortezomib When Administered Via Oral Feeding In An In Vivo Drosophila Experimental Model: A Biological Platform To Evaluate Safety/Efficacy Of Proteasome Inhibitors*. Blood, 2013. **122**(21).
54. Hari, P.N., et al., *Oprozomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma: Initial Results from the Dose Escalation Portion of a Phase 1b/2, Multicenter, Open-Label Study*. Blood, 2014. **124**(21).
55. Lonial, S., *Treatment of MM: Upcoming Novel Therapies*. Cancer Treat Res, 2016. **169**: p. 195-205.
56. Dou, Q.P. and J.A. Zonder, *Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system*. Curr Cancer Drug Targets, 2014. **14**(6): p. 517-36.
57. Allegra, A., et al., *New orally active proteasome inhibitors in multiple myeloma*. Leuk Res, 2014. **38**(1): p. 1-9.
58. Chauhan, D., et al., *Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1654-64.

59. Richardson, P.G., et al., *Phase I study of marizomib in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: NPI-0052-101 Part 1*. Blood, 2016. **127**(22): p. 2693-700.
60. Gallerani, E., et al., *A first in human phase I study of the proteasome inhibitor CEP-18770 in patients with advanced solid tumours and multiple myeloma*. Eur J Cancer, 2013. **49**(2): p. 290-6.
61. Vogl, D.T., et al., *Phase I/II study of the novel proteasome inhibitor delanzomib (CEP-18770) for relapsed and refractory multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2017. **58**(8): p. 1872-1879.
62. Koulaouzidis, G. and A.R. Lyon, *Proteasome Inhibitors as a Potential Cause of Heart Failure*. Heart Fail Clin, 2017. **13**(2): p. 289-295.
63. Li, W., et al., *Cardiovascular and Thrombotic Complications of Novel Multiple Myeloma Therapies: A Review*. JAMA Oncol, 2017. **3**(7): p. 980-988.
64. Chari, A. and D. Hajje, *Case series discussion of cardiac and vascular events following carfilzomib treatment: possible mechanism, screening, and monitoring*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 915.
65. Jakubowiak, A.J., J.M. DeCara, and K. Mezzi, *Cardiovascular events during carfilzomib therapy for relapsed myeloma: practical management aspects from two case studies*. Hematology, 2017. **22**(10): p. 585-591.
66. Russell, S.D., et al., *Serial Echocardiographic Assessment of Patients (Pts) with Relapsed Multiple Myeloma (RMM) Receiving Carfilzomib and Dexamethasone (Kd) Vs Bortezomib and Dexamethasone (Vd): A Substudy of the Phase 3 Endeavor Trial (NCT01568866)*. Blood, 2015. **126**(23).
67. Dimopoulos, M.A., et al., *Cardiac and renal complications of carfilzomib in patients with multiple myeloma*. Blood Adv, 2017. **1**(7): p. 449-454.
68. Hasinoff, B.B., D. Patel, and X. Wu, *Molecular Mechanisms of the Cardiotoxicity of the Proteasomal-Targeted Drugs Bortezomib and Carfilzomib*. Cardiovasc Toxicol, 2017. **17**(3): p. 237-250.
69. Nowis, D., et al., *Cardiotoxicity of the anticancer therapeutic agent bortezomib*. Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2658-68.
70. Al-Harbi, N.O., *Carfilzomib-induced cardiotoxicity mitigated by dexrazoxane through inhibition of hypertrophic gene expression and oxidative stress in rats*. Toxicol Mech Methods, 2016. **26**(3): p. 189-95.
71. Imam, F., et al., *Apremilast reversed carfilzomib-induced cardiotoxicity through inhibition of oxidative stress, NF-kappaB and MAPK signaling in rats*. Toxicol Mech Methods, 2016. **26**(9): p. 700-708.
72. Imam, F., et al., *Rutin Attenuates Carfilzomib-Induced Cardiotoxicity Through Inhibition of NF-kappaB, Hypertrophic Gene Expression and Oxidative Stress*. Cardiovasc Toxicol, 2017. **17**(1): p. 58-66.
73. Mythili, S. and N. Malathi, *Diagnostic markers of acute myocardial infarction*. Biomed Rep, 2015. **3**(6): p. 743-748.
74. Cauli, A., et al., *Clinical potential of apremilast in the treatment of psoriatic arthritis*. Immunotargets Ther, 2014. **3**: p. 91-6.
75. Sussman, M.A., et al., *Myocardial AKT: the omnipresent nexus*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 1023-70.
76. Hu, X.S., et al., *Proteasome inhibitor MG132 suppresses number and function of endothelial progenitor cells: involvement of nitric oxide synthase inhibition*. Int J Mol Med, 2010. **25**(3): p. 385-92.

77. Govers, R., P. de Bree, and T.J. Rabelink, *Involvement of the proteasome in activation of endothelial nitric oxide synthase*. Life Sci, 2003. **73**(17): p. 2225-36.
78. Takamatsu, H., et al., *Ischemic heart disease associated with bortezomib treatment combined with dexamethasone in a patient with multiple myeloma*. Int J Hematol, 2010. **91**(5): p. 903-6.
79. Kossmann, S., et al., *Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II*. J Biol Chem, 2014. **289**(40): p. 27540-50.
80. Zhao, Y., P.M. Vanhoutte, and S.W. Leung, *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS*. J Pharmacol Sci, 2015. **129**(2): p. 83-94.
81. Forstermann, U., N. Xia, and H. Li, *Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Circ Res, 2017. **120**(4): p. 713-735.
82. Andreadou, I., et al., *Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **69**: p. 4-16.
83. Tang, M., et al., *Proteasome functional insufficiency activates the calcineurin-NFAT pathway in cardiomyocytes and promotes maladaptive remodelling of stressed mouse hearts*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(3): p. 424-33.
84. Rothermel, B.A. and J.A. Hill, *Autophagy in load-induced heart disease*. Circ Res, 2008. **103**(12): p. 1363-9.
85. Xie, Z., C. He, and M.H. Zou, *AMP-activated protein kinase modulates cardiac autophagy in diabetic cardiomyopathy*. Autophagy, 2011. **7**(10): p. 1254-5.
86. Xie, Z., et al., *Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice*. Diabetes, 2011. **60**(6): p. 1770-8.
87. Lubbers, E.R. and P.J. Mohler, *Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **101**: p. 127-133.
88. DeGrande, S.T., et al., *Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart*. J Biol Chem, 2013. **288**(2): p. 1032-46.
89. Lei, M., et al., *Regulation of Ca(2+) transient by PP2A in normal and failing heart*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 13.
90. Omar, M.A., S. Verma, and A.S. Clanachan, *Adenosine-mediated inhibition of 5'-AMP-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase during reperfusion enhances recovery of left ventricular mechanical function*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(6): p. 1308-18.
91. *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 854-65.
92. Rena, G. and C.C. Lang, *Repurposing Metformin for Cardiovascular Disease*. Circulation, 2018. **137**(5): p. 422-424.
93. Lexis, C.P., et al., *The effect of metformin on cardiovascular risk profile in patients without diabetes presenting with acute myocardial infarction: data from the Glycometabolic Intervention as adjunct to Primary Coronary Intervention in ST Elevation Myocardial Infarction (GIPS-III) trial*. BMJ Open Diabetes Res Care, 2015. **3**(1): p. e000090.
94. Jorgensen, C.H., et al., *Effects of oral glucose-lowering drugs on long term outcomes in patients with diabetes mellitus following myocardial infarction*

- not treated with emergent percutaneous coronary intervention--a retrospective nationwide cohort study.* Cardiovasc Diabetol, 2010. **9**: p. 54.
95. Calvert, J.W., et al., *Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling.* Diabetes, 2008. **57**(3): p. 696-705.
 96. He, C., et al., *Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes.* Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1270-81.
 97. Ladeiras-Lopes, R., et al., *Novel therapeutic targets of metformin: metabolic syndrome and cardiovascular disease.* Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(7): p. 869-77.
 98. Sena, C.M., et al., *Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats.* Br J Pharmacol, 2011. **163**(2): p. 424-37.
 99. Hajek, R., et al., *Design and rationale of FOCUS (PX-171-011): a randomized, open-label, phase 3 study of carfilzomib versus best supportive care regimen in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (R/R MM).* BMC Cancer, 2012. **12**: p. 415.
 100. Nair, A.B. and S. Jacob, *A simple practice guide for dose conversion between animals and human.* J Basic Clin Pharm, 2016. **7**(2): p. 27-31.
 101. Lexis, C.P., et al., *Effect of metformin on left ventricular function after acute myocardial infarction in patients without diabetes: the GIPS-III randomized clinical trial.* JAMA, 2014. **311**(15): p. 1526-35.
 102. Preiss, D., et al., *Metformin for non-diabetic patients with coronary heart disease (the CAMERA study): a randomised controlled trial.* Lancet Diabetes Endocrinol, 2014. **2**(2): p. 116-24.
 103. Mavroidis, M., et al., *Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy.* Basic Res Cardiol, 2015. **110**(3): p. 27.
 104. Tsakiri, E.N., et al., *Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of Drosophila during aging or oxidative stress.* FASEB J, 2013. **27**(6): p. 2407-20.
 105. Marinou, K.A., et al., *Differential effect of Pistacia vera extracts on experimental atherosclerosis in the rabbit animal model: an experimental study.* Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 73.
 106. Andreadou, I., et al., *Empagliflozin Limits Myocardial Infarction in Vivo and Cell Death in Vitro: Role of STAT3, Mitochondria, and Redox Aspects.* Front Physiol, 2017. **8**: p. 1077.
 107. Efentakis, P., et al., *Ranolazine triggers pharmacological preconditioning and postconditioning in anesthetized rabbits through activation of RISK pathway.* Eur J Pharmacol, 2016. **789**: p. 431-438.
 108. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting.* N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
 109. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
 110. Cheng, G., et al., *Cytoskeletal role in protection of the failing heart by beta-adrenergic blockade.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(3): p. H675-87.
 111. Andreadou, I., et al., *Metabonomic identification of novel biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity and protective effect of the natural antioxidant oleuropein.* NMR Biomed, 2009. **22**(6): p. 585-92.
 112. Papadopoulos, K.P., et al., *Phase I study of 30-minute infusion of carfilzomib as single agent or in combination with low-dose dexamethasone in patients*

- with relapsed and/or refractory multiple myeloma.* J Clin Oncol, 2015. **33**(7): p. 732-9.
113. Grandin, E.W., et al., *Patterns of cardiac toxicity associated with irreversible proteasome inhibition in the treatment of multiple myeloma.* J Card Fail, 2015. **21**(2): p. 138-44.
 114. Liu, C.Y., et al., *Carfilzomib induces leukaemia cell apoptosis via inhibiting ELK1/KIAA1524 (Elk-1/CIP2A) and activating PP2A not related to proteasome inhibition.* Br J Haematol, 2017. **177**(5): p. 726-740.
 115. Cole, D.C. and W.H. Frishman, *Cardiovascular Complications of Proteasome Inhibitors Used in Multiple Myeloma.* Cardiol Rev, 2018. **26**(3): p. 122-129.
 116. Dimopoulos, M.A., et al., *Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2017. **18**(10): p. 1327-1337.
 117. Alsina, M., et al., *A phase I single-agent study of twice-weekly consecutive-day dosing of the proteasome inhibitor carfilzomib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma or lymphoma.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4830-40.
 118. Atrash, S., et al., *Cardiac complications in relapsed and refractory multiple myeloma patients treated with carfilzomib.* Blood Cancer J, 2015. **5**: p. e272.
 119. Wang, X., et al., *Carfilzomib reverses pulmonary arterial hypertension.* Cardiovasc Res, 2016. **110**(2): p. 188-99.
 120. Fujita, T., et al., *Proteasome inhibitor bortezomib increases PTEN expression and enhances trastuzumab-induced growth inhibition in trastuzumab-resistant cells.* Anticancer Drugs, 2006. **17**(4): p. 455-62.
 121. Akolkar, G., et al., *Vitamin C mitigates oxidative/nitrosative stress and inflammation in doxorubicin-induced cardiomyopathy.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017. **313**(4): p. H795-H809.
 122. Nakai, A., et al., *The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress.* Nat Med, 2007. **13**(5): p. 619-24.
 123. Calise, J. and S.R. Powell, *The ubiquitin proteasome system and myocardial ischemia.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(3): p. H337-49.
 124. Horman, S., et al., *AMP-activated protein kinase in the control of cardiac metabolism and remodeling.* Curr Heart Fail Rep, 2012. **9**(3): p. 164-73.
 125. Zaha, V.G. and L.H. Young, *AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart.* Circ Res, 2012. **111**(6): p. 800-14.
 126. Cho, K., et al., *Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXRalpha/POMC pathway.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 8145.
 127. Nishida, K., M. Taneike, and K. Otsu, *The role of autophagic degradation in the heart.* J Mol Cell Cardiol, 2015. **78**: p. 73-9.
 128. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Eat your heart out: Role of autophagy in myocardial ischemia/reperfusion.* Autophagy, 2008. **4**(4): p. 416-21.
 129. McLendon, P.M. and J. Robbins, *Proteotoxicity and cardiac dysfunction.* Circ Res, 2015. **116**(11): p. 1863-82.
 130. Bhamra, G.S., et al., *Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening.* Basic Res Cardiol, 2008. **103**(3): p. 274-84.
 131. Yu, J.W., et al., *Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice.* Cardiovasc Diabetol, 2016. **15**: p. 88.

132. Badrick, E. and A.G. Renehan, *Diabetes and cancer: 5 years into the recent controversy*. Eur J Cancer, 2014. **50**(12): p. 2119-25.
133. Rizos, C.V. and M.S. Elisaf, *Metformin and cancer*. Eur J Pharmacol, 2013. **705**(1-3): p. 96-108.
134. Wu, W., et al., *The association of diabetes and anti-diabetic medications with clinical outcomes in multiple myeloma*. Br J Cancer, 2014. **111**(3): p. 628-36.
135. Chang, S.H., et al., *Association between metformin use and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma in US veterans with diabetes mellitus: a population-based retrospective cohort study*. Lancet Haematol, 2015. **2**(1): p. e30-6.
136. Wang, Y., et al., *Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 63.
137. Abdel Malek, M.A., et al., *Molecular chaperone GRP78 enhances aggresome delivery to autophagosomes to promote drug resistance in multiple myeloma*. Oncotarget, 2015. **6**(5): p. 3098-110.
138. Jagannathan, S., et al., *Pharmacologic screens reveal metformin that suppresses GRP78-dependent autophagy to enhance the anti-myeloma effect of bortezomib*. Leukemia, 2015. **29**(11): p. 2184-91.
139. Ewer, M.S. and S.M. Ewer, *Cardiotoxicity of anticancer treatments*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(9): p. 547-58.
140. Suter, T.M. and M.S. Ewer, *Cancer drugs and the heart: importance and management*. Eur Heart J, 2013. **34**(15): p. 1102-11.