

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

**VLIV VYBRANÝCH INHIBITORŮ TYROSINKINAS  
NA AKTIVITU LIDSKÝCH ENZYMŮ REDUKUJÍCÍCH  
KARBONYLOVOU SKUPINU**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Hradec Králové 2019

**Alžbeta Tomanová**

## **PREHLÁSENIE**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá ku získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

Alžbeta Tomanová

## **POĎAKOVANIE**

Moja vďaka patrí predovšetkým RNDr. Eve Novotnej, Ph.D., ktorá odborne viedla moju prácu, za jej veľmi hodnotné rady a pripomienky, vlídnosť, ústretivosť a hlavne venovaný čas. Takisto ďakujem celej Katedre biochemických vied, kde mi bolo umožnené na tomto zadaní pracovať.

Poďakovanie by som chcela venovať aj svojej rodine a priateľom, ktorí ma podporovali v priebehu celého štúdia.

## **ABSTRAKT**

### **Univerzita Karlova**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Kandidát:** Alžbeta Tomanová

**Školitel:** RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vliv vybraných inhibitorů tyrosinkinás na aktivitu lidských enzymů redukujících karbonylovou skupinu

**Klíčová slova:** tyrosinkinasy, testování, karbonyl, daunorubicin, inhibice

Tyrozínkinázy sú podtriedou proteínkináz, katalyzujúcou prenos fosfátového zvyšku ATP na proteín, čím zohrávajú významnú úlohu v bunkovej signalizácii. Abnormálna aktivita tyrozínkináz býva prítomná u rôznych malignít. V určitých prípadoch je možné inhibíciou ich funkcie zabrániť proliferácií nádorových buniek a eventuálne indukovať apoptózu. Niektoré inhibítory tyrozínkináz zároveň preukázali schopnosť inhibovať efluxné transportéry, ktoré sa často podieľajú na vzniku rezistencie voči protinádorovej liečbe.

V tejto diplomovej práci bol sledovaný inhibičný vplyv imatinibu, nilotinibu, dasatinibu a acalabrutinibu (tyrozínkinázových inhibitorov) na karbonylredukujúce enzýmy, ktorých zvýšená expresia bunkami nádoru môže viesť k rezistenciám na chemoterapiu. Konkrétne, v prípade antracyklínov, redukcia karbonylu na C-13 vedie k metabolitom nielen s nižšou cytotoxickou účinnosťou, ale zároveň aj s vyššou kardiotoxicitou.

Porovnaním špecifickej aktivity vybraných karbonylredukujúcich enzýmov voči antracyklínovému substrátu sme zistili, že schopnosť metabolizovať daunorubicin na daunorubicinol majú enzýmy CBR1, AKR1C3, AKR1A1, AKR7A2, AKR1B10 a v menšej miere AKR1B1. Následne boli skúmané interakcie aktívnych enzýmov s potenciálnymi inhibítormi. Dasatinib v koncentrácií 50  $\mu$ M efektívne znížil aktivitu AKR1B10 na 9,3 % a v prípade AKR1C3 na 39,1 %. V rovnakej koncentrácií znížil acalabrutinib aktivitu AKR1C3 až na 3,7 %. Na záver bola stanovená s AKR1C3 hodnota  $IC_{50}$  dasatinibu a  $IC_{50}$  a  $K_i$  acalabrutinibu.

## ABSTRACT

### Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

**Candidate:** Alžbeta Tomanová

**Supervisor:** RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Effect of selected tyrosine kinase inhibitors on the activity of human carbonyl reducing enzymes

**Key words:** tyrosin kinases, screening, carbonyl, daunorubicin, inhibition

Tyrosine kinases are a subclass of protein kinases, catalysing the transfer of ATP phosphate residue to a protein, thereby playing an important role in cellular signaling. Abnormal tyrosine kinase activity is present in various malignancies. In certain cases, inhibition of their function can prevent tumor cell proliferation and eventually induce apoptosis. At the same time, some tyrosine kinase inhibitors have demonstrated the ability to inhibit efflux transporters, which are often involved in the development of resistance to anticancer treatment.

In this diploma thesis, the inhibitory effect of imatinib, nilotinib, dasatinib and acalabrutinib (tyrosine kinase inhibitors) has been studied on carbonyl reducing enzymes, whose overexpression by tumor cells may lead to resistance to chemotherapy. In particular, in the case of anthracyclines, the reduction of carbonyl group on C-13 results in not only lower cytotoxic activity, but also increased cardiotoxicity of metabolites.

By comparing the specific activity of selected carbonyl reducing enzymes with anthracycline substrate, we found that CBR1, AKR1C3, AKR1A1, AKR7A2, AKR1B10 and to a lesser extent AKR1B1 have the ability to metabolize daunorubicin to daunorubicinol. Subsequently, the interactions between active enzymes and potential inhibitors were investigated. Dasatinib at 50  $\mu\text{M}$  effectively reduced AKR1B10 activity to 9.3 % and AKR1C3 to 39.1 %. At the same concentration, acalabrutinib reduced AKR1C3 activity up to 3.7 %. Finally, the  $\text{IC}_{50}$  of dasatinib and the  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{K}_i$  of acalabrutinib were determined with AKR1C3.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. ANTRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ</b> .....	<b>9</b>
2.1.1. CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA .....	9
2.1.2. INDIKÁCIE .....	10
2.1.3. MECHANIZMUS ÚČINKU .....	11
2.1.4. KARDIOTOXICITA.....	14
2.1.5. REZISTENCIA VOČI ANTRACYKLÍNOVEJ TERAPIÍ.....	17
<b>2.2. KARBONYLREDUKUJÚCE ENZÝMY</b> .....	<b>18</b>
2.2.1. NADRODINA AKR.....	20
2.2.1.1. AKR1A1 - aldehydreduktáza .....	22
2.2.1.2. AKR1B1 - aldózareduktáza.....	23
2.2.1.3. AKR1B10 – aldózareduktáza tenkého čreva .....	24
2.2.1.4. AKR1C1-C4 - hydroxysteroiddehydrogenázy .....	26
2.2.1.5. AKR7A2 – aflatoxínreduktáza.....	29
2.2.2. NADRODINA SDR.....	29
2.2.2.1. CBR1 .....	30
2.2.2.2. CBR3 .....	31
2.2.2.3. CBR4 .....	32
<b>2.3. TYROZÍNKINÁZY</b> .....	<b>33</b>
2.3.1. INHIBÍCIA TYROZÍNKINÁZ.....	36
2.3.1.1. IMATINIB.....	38
2.3.1.2. NILOTINIB.....	40
2.3.1.3. DASATINIB .....	42
2.3.1.4. ACALABRUTINIB .....	43
<b>3. CIEĽ PRÁCE</b> .....	<b>44</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1. MATERIÁL</b> .....	<b>45</b>
4.1.1. CHEMIKÁLIE.....	45
4.1.2. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A POMÔCKY.....	46

<b>4.2. METODIKA</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.1. PRÍPRAVA ROZTOKOV</b> .....	<b>47</b>
4.2.1.1. Príprava enzýmov .....	47
4.2.1.2. Príprava inhibítorov .....	48
4.2.1.3. Príprava substrátu .....	49
4.2.1.4. Príprava NADPH-regeneračného systému .....	49
4.2.1.5. Príprava mobilnej fázy na UHPLC .....	50
<b>4.2.2. PRINCÍP REAKCIE</b> .....	<b>50</b>
<b>4.2.3. PROCES INKUBÁCIE</b> .....	<b>50</b>
<b>4.2.4. PRÍPRAVA VZORIEK NA UHPLC</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.5. ANALÝZA POMOCOU UHPLC</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.6. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV MERANIA</b> .....	<b>55</b>
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1. POROVNANIE ŠPECIFICKEJ AKTIVITY VYBRANÝCH CRE VOČI DAUNORUBICINU</b> .....	<b>56</b>
<b>5.2. TESTOVANIE INHIBIČNÉHO POTENCIÁLU TKI</b> .....	<b>57</b>
5.2.1. CBR1 .....	58
5.2.2. AKR1A1 .....	59
5.2.3. AKR1B1 .....	61
5.2.4. AKR1B10 .....	62
5.2.5. AKR1C3 .....	64
5.2.6. AKR7A2 .....	66
<b>5.3. STANOVENIE HODNOTY IC<sub>50</sub></b> .....	<b>67</b>
<b>5.4. STANOVENIE K<sub>i</sub></b> .....	<b>70</b>
<b>6. DISKUSIA</b> .....	<b>72</b>
<b>7. ZÁVER</b> .....	<b>76</b>
<b>8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK</b> .....	<b>78</b>
<b>9. LITERATÚRA</b> .....	<b>82</b>

## 1. ÚVOD

Antracyklínové antibiotiká (ANT) zastávajú významné miesto v liečbe nádorových ochorení. Majú pomerne široké indikačné spektrum – od solídnych tumorov až k hematologickým malignitám. Ako však takmer každá antineoplastická terapia, aj terapia antracyklínmi prináša so sebou určité obmedzenia. V prípade antracyklínov ide prevažne o nežiaduce účinky v podobe kardiotoxicity a o postupne narastajúcu rezistenciu (Hortobágyi 1997).

Svoj podiel na tom majú enzýmy, ktoré v organizme redukovávajú karbonylovú skupinu. Karbonylredukovávajúce enzýmy (CRE) neraz plnia ochrannú funkciu, sprostredkovaním biotransformácie xenobiotík na ich menej toxické metabolity. Avšak, ako je to aj u antracyklínov, redukcia karbonylu vedie k metabolitom s nižšou cytotoxickou účinnosťou a naopak vyšším kardiotoxickým potenciálom (Maser 1995, Piska et al. 2017).

Nekontrolovateľná proliferácia a rast buniek býva často nádorom umožnená vďaka zmenám v aktivite tyrozínkináz – enzýmov spojených so signalizačnými kaskádami, vedúcimi k regulácii mnohých procesov v bunke. Terapeutickou alternatívou sa preto stali inhibítory tyrozínkináz (TKI), ktoré viac alebo menej selektívne mieria na tyrozínkinázovú doménu, zabraňujú fosforylácii enzýmu, a tým prerušia ďalšiu transdukciu signálu (Jiao et al. 2018).

V tejto práci boli skúmané interakcie štyroch inhibítorov tyrozínkináz (imatinibu, nilotinibu, dasatinibu a acalabrutinibu) s karbonylredukovujúcimi enzýmami, aktívnymi voči daunorubicínu (DAU) – nami zvolenému antracyklínovému substrátu.

Objavenie TKI s inhibičnou aktivitou voči týmto karbonylredukovujúcim enzýmom môže predstavovať spôsob, ako potenciálne (kombináciou TKI-ANT) redukovať negatívny dopad metabolitov na srdce, a zároveň potencovať protinádorový účinok antracyklínu.



## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1. ANTRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ

Antracyklíny, ako skupina chemoterapeutík, patria významným spôsobom do súčasnej protinádorovej terapie – solídnych tumorov či rôznych hematologických malignít. Prvýkrát izolované boli z rodu baktérií *Streptomyces* v 60. rokoch 20. storočia a do dnešnej doby sú stále predmetom mnohých výzkumov (Hortobágyi 1997, Minotti 2004).

Prvými použitými v klinickej praxi boli doxorubicin a jeho prekurzor daunorubicin, medzi štyri najčastejšie používané sa ďalej radia ich semisyntetické deriváty, idarubicin – lipofilnejší derivát daunorubicinu a stereoizomér doxorubicinu – epirubicin, s dlhším biologickým polčasom (doxorubicin  $t_{1/2} = 1-3$  h, epirubicin  $t_{1/2} = 31-35$  h) a väčším distribučným objemom (McGowan et al. 2017, Minotti et al. 2004).

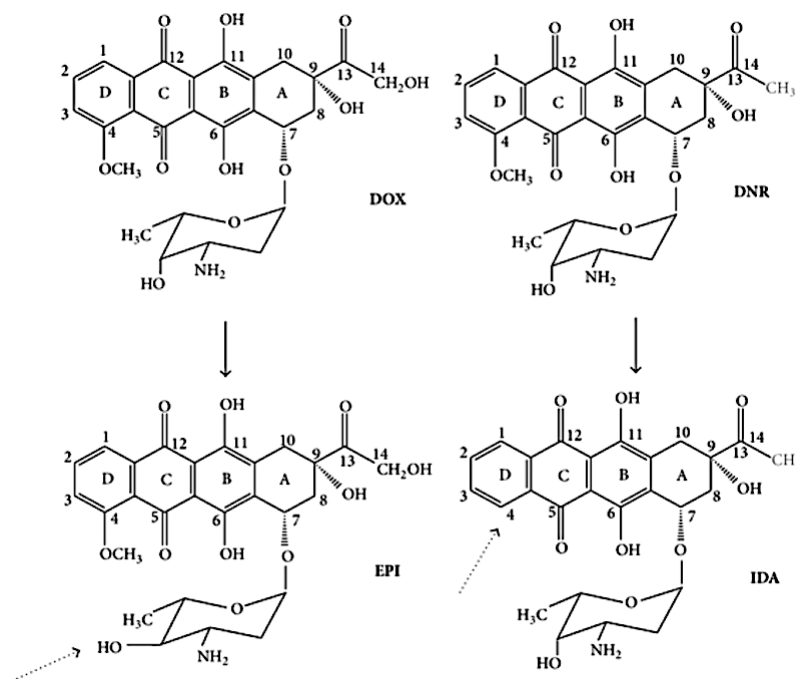
Podanie antracyklínových antibiotík je možné len parenterálne (výnimkou je idarubicin), metabolizované sú pečeňou a primárne vylučované žľou, čiastočne močom (Minotti et al. 2004, Puchnerová et al. 2016).

Ich nepopierateľný prínos v terapiách, na druhej strane, prináša so sebou významné nežiaduce účinky – obzvlášť kardiotoxicita limituje použité dávky a vystavuje pacienta po chemoterapiách zvýšenému riziku kardiovaskulárnej morbidity a mortality (McGowan et al. 2017).

#### 2.1.1. CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA

Chemická štruktúra antracyklínových antibiotík (Obr. 1) je tvorená tetracyklickým aglykonom s daunosamínovou cukornou zložkou pripojenou na uhlíku C7 a susedným chinon-hydrochinonovým zoskupením na kruhoch B a C. Krátky postranný reťazec sa nachádza na C9 kruhu A a na C13 nájdeme karbonylovú funkčnú skupinu. V polohe C14 má doxorubicin, oproti daunorubicinu, primárny alkohol. Okrem idarubicinu, inak identického s daunorubicinom, nájdeme na uhlíku C4 kruhu D methoxylové funkčné zoskupenie. Hydroxylovou skupinou v axiálnej polohe daunosaminovej zložky sa líši doxorubicin od jeho epimérneho derivátu

epirubicinu, s hydroxylom viazaným naopak v ekvatoriálnej polohe (McGowan et al. 2017, Minotti et al. 2004).



Obr. 1 Štruktúra antracyklínov – *doxorubicin* (DOX), *daunorubicin* (DNR), *epirubicin* (EPI), *idarubicin* (IDA) (prevzaté z McGowan 2017)

### 2.1.2. INDIKÁCIE

Dôkazom dôležitého postavenia antracyklínov ako cytostatík je aj ich zaradenie do zoznamu esenciálnych liekov (WHO, 2017). Vo všeobecnosti majú široké indikačné spektrum. Na podanie doxorubicinu najlepšie reagujú nádory prsníka, pažeráku, Hodgkinov aj non-Hodginov lymfóm, nádory mäkkých tkanív, osteosarkómy. Rozdiel v chemickej štruktúre daunorubicinu spôsobil posunutie účinného spektra prevažne k akútnym myeloidným a lymfocytovým leukémiám. Idarubicin je, okrem akútnej myeloidnej leukémie, využívaný aj na liečbu non-Hodgkinovho lymfómu, mnohopočetného myelómu a sčasti nádorov prsníka. Práve na terapiu pokročilejších štádií prsníkových tumorov sa používa epirubicin (Cutts et al. 2007, Minotti et al. 2004).

### 2.1.3. MECHANIZMUS ÚČINKU

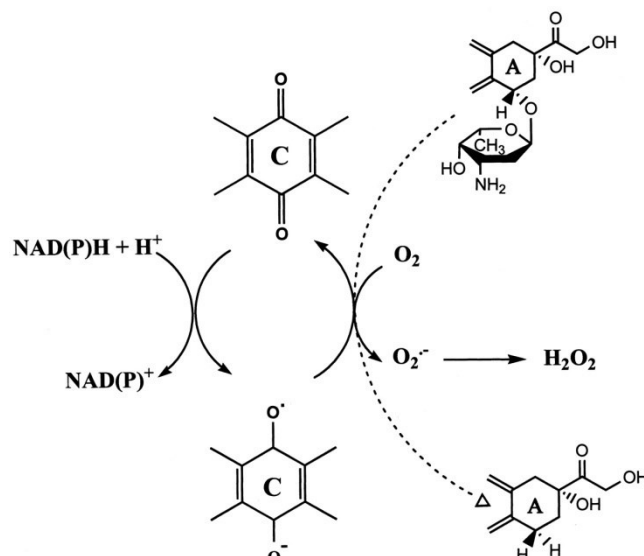
Napriek tomu, že antracyklíny sa používajú v klinickej praxi už niekoľko rokov, mechanizmus ich protinádorového účinku ostáva nie úplne objasnený. Pravdepodobne sa primárne jedná o inhibíciu funkcie enzýmu topoizomeráza II (Top2) a s ňou súvisiacu DNA-interkaláciu, tvorbu aduktov s DNA a ďalšie mechanizmy, ako je poškodenie buniek voľnými radikálmi (Hortobágyi 1997, Minotti et al. 2004).

Pôvodne bol účinok antracyklínov pripisovaný tvorbe voľných radikálov, ktoré môžu vznikáť viacerými spôsobmi. Antracyklíny vo svojej štruktúre obsahujú chinonové zoskupenie, ktoré je náchylné na redukciu cytozolickými enzýmami (oxidoreduktázami) na semichinon. Semichinon v prítomnosti kyslíka regeneruje pôvodný antracyklín a stáva sa donorom elektrónu pre kyslík – tým následne vzniká reaktívny superoxidový radikál a jeho konverziou peroxid vodíka, či hydroxylový radikál (Lipshultz et al. 2008, McGowan et al. 2017, Minotti et al. 2004).

Tento nepretržitý cyklus (Obr. 2), podporovaný oxidoreduktázami, ako sú cytochróm P450-reduktáza, NADH-dehydrogenáza a xantínoxidáza, má za následok tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), reagujúcich s nukleovými kyselinami (NK), lipidmi a proteínmi. Tento oxidačný stres teda vedie ku peroxidácií lipidov, deplécii peptidov obsahujúcich sulfhydrylovú skupinu a poškodeniu DNA (Lipshultz et al. 2008, Minotti et al. 2004).

Druhým, neenzymatickým spôsobom zvýšenia hladiny ROS je väzba antracyklínu s intracelulárnym železom - tento komplex následne premieňa superoxidový radikál a peroxid vodíka na potentnejší hydroxylový radikál. Výsledkom môže byť poškodenie membrány buniek a funkcie mitochondrií (Hahn et al. 2014, Minotti et al. 2004).

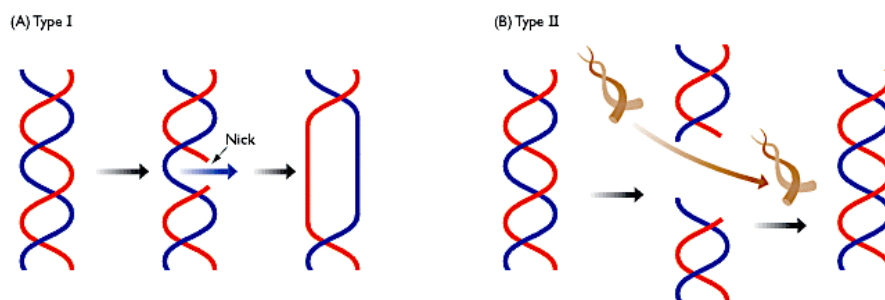
Poškodenie buniek vyvolané tvorbou ROS sa však viac ako s cytotoxickým protinádorovým účinkom, pravdepodobne spája s kardiotoxickými nežiaducimi účinkami antracyklínov (Hortobágyi 1997).



Obr. 2 Priebeh redoxného cyklu v molekule antracyklínu – vedľajším produktom je peroxid vodíka (prevzaté z Minotti et al. 2004)

Topoizomerázy sú enzýmy, ktoré sú schopné v priebehu DNA transkripcie, replikácie a remodelácie chromatinu katalyzovať potrebné adenozíntrifosfát (ATP) – dependentné topologické zmeny v dvojvlákne DNA a ich inhibícia predstavuje jeden z cieľov protinádorovej terapie. Katalyzujú rozštiepenie a opätovné spojenie fosfodiesterovej väzby, čím umožňujú prechodne vytvoriť vo vlákne DNA zlomy, cez ktoré sa prevlečie komplementárna časť DNA a rozpojené konce sa znovu spoja (Bollimpelli et al. 2017, McGowan et al. 2017).

Topoizomerázy môžeme rozdeliť do skupín I a II. Topoizomeráza I je schopná vytvoriť zlom len v jednom vlákne, čím sa líši od topoizomerázy II, schopnej rozštiepiť obe vlákna DNA súčasne (Obr. 3) (Minotti et al. 2004). Rozoznávame dva typy topoizomerázy II - Top2 $\alpha$  a jej izoenzým Top2 $\beta$ . Prvý z nich nájdeme prevažne v proliferatívnych bunkách, často nádorových; druhý typ topoizomerázy II v bunkách v latentných štádiách. Expresia Top2 $\beta$  v priebehu bunkového cyklu je konštantná, kdežto množstvo exprimovanej Top2 $\alpha$  býva najvyššie počas G2/M fázy cyklu a je dôležitým enzýmom v procese oddelenia chromozómov (Marinello et al. 2018, McGowan et al. 2017).



Obr. 3 Schématicky znázornený rozdiel v štiepení vlákna DNA topoizomerázou I (zlom v jednom vlákne) a topoizomerázou II (zlomy v oboch vláknach) (prevzaté z Internet 1)

Antracyklínové antibiotiká inhibujú funkciu topoizomerázy II tým, že majú schopnosť naviazať sa na Top2 aj na DNA a vytvoriť tak komplexy spúšťajúce bunkovú smrť (McGowan et al. 2017). Na kovalentnú väzbu využívajú tyrozínové zvyšky tohto enzýmu, a tým v konečnom dôsledku zabránia opätovnému uzavretiu vlákien nukleovej kyseliny. Vytvorenie komplexu závisí na štruktúre antracyklínov, pre interkaláciu je dôležité planárne usporiadanie kruhov; pri tvorbe a stabilizácii zohrávajú úlohu neinterkalujúce vonkajšie skupiny molekuly antracyklínu, ako sú cukorný zvyšok a cyklohexánový kruh A. Práve daunosamínová cukorná zložka udáva aj miesto interkalácie (špecifickú sekvenciu DNA) a zmenami v jej štruktúre je možné dosiahnuť aj zmeny v interkalačnej polohe a inhibičnej účinnosti. Odstránenie methoxyskupiny na C4 kruhu D alebo aminosubstituentov na C3 cukru, vedie ku efektívnejšej inhibícii Top2 (Binaschi et al. 2001, Minotti et al. 2004).

Ternárny komplex Top2 $\alpha$ -doxorubicin-DNA inhibuje DNA replikáciu; bunkový cyklus ostáva zastavený vo fáze G1/G2 a v proliferujúcich malígnych bunkách sa indukuje apoptóza. Väzbou s Top2 $\beta$  dôjde cez potlačenie receptorov aktivovaných proliferátormi peroxizómov (PPAR), regulujúcich oxidatívny metabolizmus, ku aktivácii pozmenenej p53 tumorsupresorovej dráhy, mitochondriálnej dysfunkcií a zvýšeniu apoptózy v bunkách (McGowan et al. 2017, Minotti et al. 2004).

Okrem vyššie uvedených mechanizmov účinku, antracyklíny vykazujú taktiež schopnosť formácie aduktov s DNA. To vedie eventuálne k apoptóze, nezávisle od poškodenia spôsobeného inhibíciou Top2. DNA adukty majú vlastnosti podobné krížovej väzbe (cross-link), akými je stabilizácia dvojvlákna, pretože sa kovalentnou väzbou viažu k jednému z vlákien DNA a vodíkovými väzbami k druhému vláknu nukleovej kyseliny. Tvorba DNA aduktov ale vyžaduje prítomnosť formaldehydu - predaktivácia derivátov

antracyklínov formaldehydom zvyšuje ich aktivitu proti viacerým bunkovým líniam. Antracyklíny navyše, vďaka tvorbe týchto spojení, nie sú v takej miere k dispozícii P-glykoproteínu, transportéru sprostredkujúcemu eflux z buniek (Cutts et al. 2007, Forrest et al. 2012).

Alternatívne je možné antracyklíny kombinovať s intracelulárne pôsobiacimi proliečivami uvoľňujúcimi formaldehyd, napríklad pivaloyloxymetylbutyrátom. Pri skúmaní účinnosti tvorby aduktov jednotlivých antracyklínov (doxorubicinu, daunorubicinu, idarubicinu a epirubicinu), v prítomnosti formaldehyd-uvolňujúceho pivaloyloxymetylbutyrátu (AN-9), na citlivých a rezistentných líniah baktérií, sa zistilo, že s výnimkou epirubicinu, všetky tri antracyklíny úspešne tvoria adukty v oboch líniah. Idarubicin bol najúčinnnejším v citlivej aj rezistentnej skupine; výrazne menej aktívne boli adukty doxorubicinu a daunorubicinu v rezistentnej línii (Cutts et al. 2007).

Tieto tri zároveň ukázali aj rovnakú DNA-sekvenčnú špecifitu a v testoch inhibície rastu, v kombinácii s AN-9, synergický účinok. Účinok kombinácie epirubicin a AN-9 sa ukázal ako aditívny (Cutts et al. 2007).

#### **2.1.4. KARDIOTOXICITA**

Aj keď antracyklíny predstavujú v rámci cytostatickej liečby významný pokrok, spájajú sa, ako takmer všetky liečivá, s nežiaducimi účinkami – medzi najvýznamnejšie patrí ich toxické pôsobenie na srdce. Nejaká forma srdcovej dysfunkcie, v nasledujúcich 20 rokoch po liečbe antracyklínovými antibiotikami, postihne viac ako 50 % pacientov a u okolo 5 % pacientov sa rozvinie srdcové zlyhanie (Lipshultz et al. 2014).

Miera škodlivého pôsobenia závisí na kumulatívnej dávke jednotlivých liečiv a individuálnych charakteristikách pacienta. Pri kumulatívnej dávke 550 mg/m<sup>2</sup> doxorubicinu sa ukázala incidencia srdcového zlyhania u pacientov približne 26 %, epirubicin s rovnakou celkovou kumulatívnou dávkou vykazuje nižšiu kardiotoxicitu. Dôležitým faktorom zvyšujúcim riziko je aj vek nad 65 rokov (Ryberg et al. 2008, Swain et al. 2003).

Za ďalšie rizikové faktory sa považuje naopak detský vek, ženské pohlavie, trizómia 21 (Downov syndróm), terapia antracyklínmi spoločne s radiačnou terapiou a inými protinádorovými liečivami (napr. trastuzumabom), dĺžka infúzie či čierna rasa (Giantris et al. 1998, Krischer et al. 1997, Lipshultz et al. 1995).

Podľa klinických prejavov môže byť kardiotoxicita rozdelená na akútnu, subakútnu a chronickú. Poškodenie srdca pri akútnej a subakútnej forme prichádza takmer ihneď po podaní antracyklínov alebo do týždňa od začiatku liečby. Je charakterizované prevažne prechodnými elektrofyziologickými abnormalitami, zriedkavejšie až fatálnymi arytmiami. Chronickú môžeme ďalej rozdeliť na včasnú progresívnu, v priebehu prvého roka terapie a na chronickú progresívnu neskorú, ktorá sa rozvíja až po tomto období - okrem dlhodobej srdcovej dysfunkcie sa vyznačuje aj poruchou rastu kardiomyocytov (Lipschultz et al. 2015, Puma et al. 2008).

Presné mechanizmy kardiotoxického pôsobenia stále nie sú známe, ale predpokladá sa súvislosť s mechanizmom ich protinádorového účinku popísaným vyššie. Podiel má tvorba vysoko reaktívnych kyslíkových radikálov, na ktorých pôsobenie sú kardiomyocyty náchyľnejšie. Jedným z dôvodov sa ukazuje byť menšie množstvo ochranných antioxidantných enzýmov ako je glutathionperoxidáza. Ďalšiu úlohu zohrávajú pravdepodobne mitochondrie v kardiomyocytoch – ich vnútorná membrána obsahuje vo vysokých koncentráciách fosfolipid kardiolipin, s vysokou afinitou k antracyklínom. Antracyklíny majú schopnosť pasívne difundovať do buniek, a práve kardiolipin môže ich intracelulárne koncentrácie ešte zvýšiť. Tým je negatívne ovplyvnená stabilita membrány, antracyklíny môžu následne pôsobiť interkalačne v mitochondriálnej DNA, a zároveň môže byť narušená produkcia energie vo forme ATP, a tým zvládanie pridaného oxidačného stresu (Franco et al. 2011, Puchnerová et al. 2016).

Ďalšie poškodenie vyplýva z pôsobenia na enzým Top2 $\beta$ , exprimovaného v kardiomyocytoch. Naviazaním doxorubicínu na Top2 $\beta$  dochádza ku supresii PPAR, regulujúceho oxidatívny metabolizmus, mitochondriálnej dysfunkcií, aktivácií p53-tumorsupresorovej cesty a zvýšeniu apoptózy (McGowan et al. 2017).

Biotransformácia doxorubicínu či daunorubicínu, dvojelektrónovou redukciou na ich primárny metabolit doxorubicinol/daunorubicinol, môže takisto patriť k príčinám kardiotoxického pôsobenia. Doxorubicinol sa ukázal ako výrazne potentnejší v inhibícii Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-dependentných púmp v kardiomyocytoch, v porovnaní s doxorubicínom. Ca<sup>2+</sup> je významným regulátorom funkcie svalových buniek srdca, zohráva významnú úlohu pri ich kontrakciách a aj menšia odchýlka v Ca<sup>2+</sup> signalizačnom systéme môže mať negatívne dôsledky na srdcovú činnosť (Fearnley et al. 2011, Olson et al. 1988, Piska et al. 2017).

Metabolickú premenu antracyklínov na ich sekundárne alkoholy, katalyzujú ANT-redukujúce enzýmy (hlavne karbonylreduktázy CBR1 a CBR3 a niektoré aldo-ketoreduktázy) a ich inhibítory sú skúmané ako perspektívne kardioprotektívne liečivá (Piska et al. 2017).

Niektoré experimenty ukazujú, že premena doxorubicinu a daunorubicinu, na príslušné alkoholy v myokarde, prebieha v závislosti na čase, teplote a pH (Mordente et al. 2001).

Medzi pacientami liečenými doxorubicinom či daunorubicinom však existuje značná variabilita vo výskyte nežiaducich účinkov. Prispievajú k tomu aj mutácie v génoch kódujúcich karbonylredukujúce enzýmy, ako sú nesynonymné jednonukleotidové polymorfizmy (ns-SNPs). Štúdia ukázala, že ns-SNPs v ľudských enzýmoch AKR1C3, AKR1C4 a AKR7A2 výrazne znižuje *in vitro* metabolizmus doxorubicinu a daunorubicinu (Bains et al. 2010).

Prirodzene, existuje snaha o zníženie kardiotoxických účinkov, pri súčasnom zachovaní účinnosti antracyklínovej liečby. Jednou z možností sa ukázalo byť kontinuálne podanie infúzie liečiva namiesto bolusového. Tento postup je však pravdepodobne účinný len na zníženie akútnej kardiotoxicity u dospelých pacientov (Lipschultz et al. 2012 , Puchnerová et al. 2016).

Úspešnou stratégiou sa javí aj lipozomálna enkapsulácia antracyklínov, meniaci ich farmakokinetické vlastnosti. Prednostne by v tejto formulácii mali pôsobiť na nádorové tkanivo, a to z dôvodu, že lipozómy nemôžu uniknúť z priestorov ciev v oblastiach s tesnými kapilárnymi spojeniami - ako má aj srdcový sval. Naopak, cirkuláciu môžu opustiť tam, kde sú medzi bunkami spojenia voľnejšie, t.j. v tkanive tumoru (Theodoulou a Hudis 2004).

Kardioprotektívny účinok súčasného podania dexrazoxanu s ANT pravdepodobne spočíva v chelatacii voľného železa. Tým sa zabráni vytvoreniu jeho komplexov s antracyklínmi, ktoré by eventuálne viedli k tvorbe toxických voľných kyslíkových radikálov. Benefit dexrazoxanu však ostáva sporný hlavne u detských pacientov, kde existuje možné spojenie so zvýšeným rizikom výskytu sekundárnych malignít (Tebbi et al. 2007).

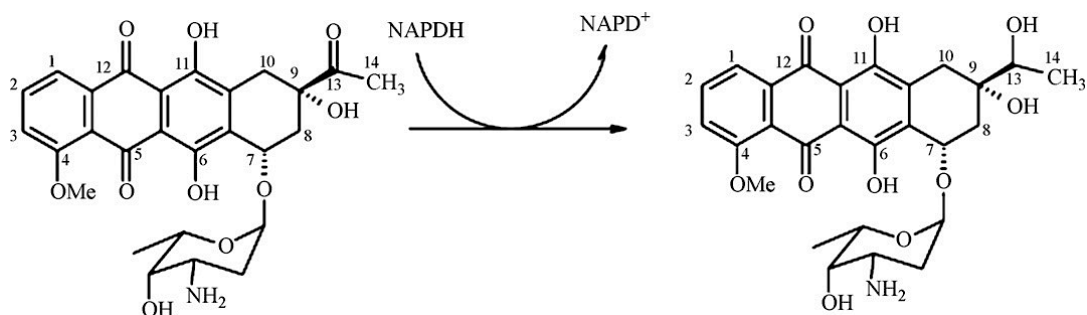


### 2.1.5. REZISTENCIA VOČI ANTRACYKLÍNOVEJ TERAPIÍ

Za zlyhanie protinádorovej terapie je často zodpovedná vrodenná či získaná rezistencia nádorových buniek voči chemoterapeutickým liečivám. Prejaviť sa môže buď izolovane, kedy nádorové bunky neodpovedajú na liečbu jedným konkrétnym liečivom, alebo skrížene – na celý rad liečiv. O mnohopočetnej liekovej rezistencii (MDR<sup>1</sup>) sa dá hovoriť v prípade, že sa vyskytuje voči chemoterapeutikám rôznej štruktúry a s rôznymi bunkovými cieľmi. Tento dej výrazne obmedzuje účinnosť terapie a nedá sa prekonať ani zvýšením dávok – naopak by sa tým vystupňovala rezistencia a nežiaduce účinky. Medzi cytotoxické liečivá často spájané s MDR<sup>1</sup> patria aj antracyklíny (Ozben 2006).

Kľúčovú úlohu pri vzniku rezistencie zohráva zvýšená expresia určitých transmembránových proteínov. Medzi takéto proteíny patria aj ABC-transportéry, prítomné vo všetkých živých organizmoch. Na svoju činnosť využívajú ATP-dependentné efluxné pumpy – vďaka energií uvoľnenej hydrolýzou ATP umožňujú transport širokého spektra molekúl cez bunkovú membránu. Jednotlivé podtypy (ABC-A po ABC-G) sú okrem zdravých buniek, vo zvýšenej miere exprimované práve nádorovými bunkami - zvyšujú z nich eflux cytotoxických liečiv, a tým znižujú účinné intracelulárne koncentrácie. Medzi významné ABC-transportéry, spájané s MDR<sup>1</sup>, ktorých substrátmi sú aj antracyklíny, patria ABCB1 (P-glykoproteín), ABCC1, ABCC2 či ABCG2 (Ozben 2006).

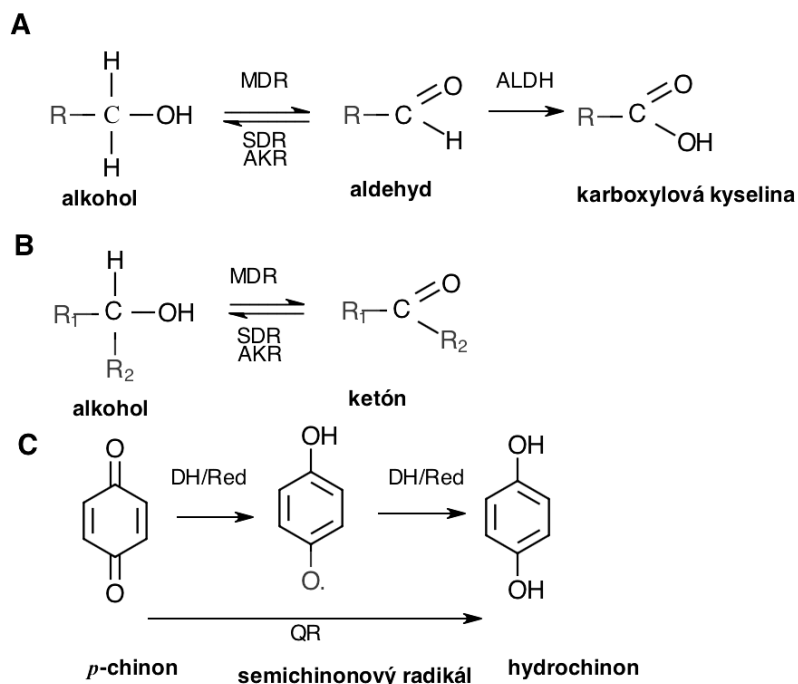
Hlavnou cestou biotransformácie antracyklínov je dvojelektrónová redukcia C-13 karbonylovej skupiny (Obr. 4). Jej produktom sú sekundárne alkoholy (doxorubicinol, daunorubicinol a pod.) – tieto metabolity sú považované za jednu z možných príčin kardiotoxicity a zároveň majú nižšie cytotoxické účinky. Metabolická premena antracyklínov je katalyzovaná cytozolickými NADPH-dependentnými karbonylredukujúcimi enzýmami, hlavne karbonylreduktázami (CBRs) a aldo-ketoreduktázami (AKRs). V bunkách tumorov býva zmenená ich expresia oproti zdravým bunkám, čo môže prispievať k ďalšiemu rozvoju rezistencie (Mordente et al. 2001, Piska et al. 2017).



Obr. 4 Redukcia C-13 karbonylovej skupiny daunorubicinu NADPH-dependentným enzýmom (prevzaté z Carlquist et al. 2008)

## 2.2. KARBONYLREDUKUJÚCE ENZÝMY

Karbonylová skupina je bežnou súčasťou molekúl endogénneho aj xenobiotického pôvodu. Aldehydy majú dobré elektrofilné vlastnosti, sú reaktívne a schopné interakcie s bunkovými nukleofilnými centrami. Metabolicky sa môžu premieňať buď oxidáciou na príslušné karboxylové kyseliny alebo sa aldehydické skupiny redukujú na primárny alkohol. Naopak, ketóny sú vo všeobecnosti menej reaktívne a ich biotransformácia prebieha redukciami na sekundárne alkoholy. Špeciálny toxikologický význam majú chinony a ich metabolizmus. Medziproduktom ich redukcie je semichinonový radikál, ktorý sa môže ďalej redukovať na hydrochinon alebo sa opäť regeneruje na pôvodný chinon, pričom vznikajú reaktívne kyslíkové zlúčeniny, schopné následného poškodenia buniek (Obr. 5) (Oppermann a Maser 2000).



Obr. 5 Možnosti metabolickej premeny karbonylovej skupiny a zúčastnené enzýmové systémy – *alkoholdehydrogenáza* (ADH) a *aldehyddehydrogenáza* (ALDH) sa podieľajú na oxidačných procesoch, redukciu katalyzujú *aldo-ketoreduktázy* (AKR) a *dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom* (short-chain dehydrogenases/reductases, SDR) či *chinonreduktázy* (QR) (upravené podľa Oppermann a Maser 2000)

Produkcia karbonylredukujúcich enzýmov predstavuje pre organizmus cestu metabolickej redukcii karbonylu, s významnou ochrannou funkciou, často vedúcou k tvorbe menej toxických metabolitov. Táto funkcia je dôležitá hlavne pri kontakte so vznikajúcimi reaktívnymi karbonylmi a xenobiotickými chinonmi, schopnými modifikovať DNA kovalentnou väzbou či zvyšovať nepriaznivý oxidačný stres. Na druhej strane, môže ale viesť ku zvýšeniu toxického pôsobenia liečiv, ako je to napríklad v prípade daunorubicinu či doxorubicinu (Maser 1995, Oppermann 2007).

Medzi xenobiotické zlúčeniny podliehajúce karbonylovej redukcii patria aj liečivá ako sú warfarín, haloperidol, kyselina etakrynová či fenofibrát; z toxikologicky významných napríklad aflatoxin B1 (Maser 1995). Vďaka ich širokej substrátovej špecifite sa karbonylredukujúce enzýmy ďalej zúčastňujú metabolizmu endogénnych steroidných hormónov, kyseliny arachidonovej alebo žľčových kyselín (Oppermann a Maser 2000).

V závislosti na konkrétnej zlúčenine, môže redukcia karbonylu vyústiť v aktívne aj inaktívne metabolity. Inaktiváciu liečiva karbonylovou redukciou môžeme sledovať napríklad u haloperidolu, naopak aktiváciu u naloxonu či pentoxifylínu. Je možné aj predĺženie farmakodynamického účinku liečiva, napríklad karbinoly si aj po biotransformácií zachovávajú svoju terapeutickú účinnosť. Väčšinou sú výsledkom vzniknutej hydroxylovej skupiny hydrofilnejšie produkty I. fázy metabolizmu, ktoré môžu byť po konjugácií ľahšie vylúčené z organizmu (Maser 1995, Oppermann a Maser 2000).

U cicavcov sú hlavnými cytozolickými karbonylredukujúcimi enzýmami karbonylreduktázy, aldózareduktázy, aldehydreduktázy a dihydrodioldehydrogenázy. Väčšina týchto enzýmov je zaradená do dvoch skupín enzýmových nadrodín – nadrodiny aldo-ketoreduktáz (AKR) a nadrodiny krátkoreťazcových dehydrogenáz/reduktáz (SDR). K SDR patrí niekoľko foriem karbonylreduktáz; aldehydreduktázy spolu s aldózareduktázami a dihydrodioldehydrogenázami patria k nadrodine AKR (Oppermann a Maser 2000).

V oboch skupinách nájdeme okrem toho radu pluripotentných hydroxysteroiddehydrogenáz (HSDs), katalyzujúcich redoxné reakcie selektívne v rôznych polohách steroidov, a zároveň (skôr neselektívne) redukcie rozličných karbonylových nesteroidných zlúčenín. Medzi HSDs sa zaraďujú aj niektoré dihydrodioldehydrogenázy (Hoffmann a Maser 2007, Maser 1995).

Ďalej rozlišujeme nadrodinu dehydrogenáz/reduktáz so stredne dlhým reťazcom (medium-chain dehydrogenases/reductases, MDR<sup>2</sup>), kam sa začleňuje väčšina alkoholdehydrogenáz. Poslednú významnú skupinu tvoria chinonreduktázy, katalyzujúce jedno/dvojelektrónovú metabolickú redukciu chinonov (Oppermann a Maser 2000).

Okrem substrátov (a z nich vyplývajúcej enzýmovej funkcie), sa jednotlivé skupiny enzýmov navzájom líšia koenzýmami, mechanizmom pôsobenia, štruktúrou, veľkosťou a aktívnym miestom (Oppermann a Maser 2000).

### **2.2.1. NADRODINA AKR**

Medzi NAD(P)(H)-dependentné oxidoreduktázy patria aldo-ketoreduktázy, zodpovedné za redukciu aldehydov a ketónov na ich príslušné primárne a sekundárne alkoholy. To môže viesť k bioaktivácií zlúčenín, či k ich detoxikácií – z exogénnych látok detoxikujú napríklad reaktívne aldehydy aflatoxínu, ďalej niektoré endogénne látky

a toxické zlúčeniny, vznikajúce pri rozklade lipidových peroxidov. Rovnako sú dôležité v bunkovej odpovedi na elektrofilný, osmotický a oxidačný stres a zohrávajú úlohu v rezistenciách na protinádorovú liečbu (Jin a Penning 2007).

Nomenklatúrne sú názvy enzýmov zložené z koreňového symbolu „AKR“, označujúceho aldo-ketoreduktázy, nasleduje arabské číslo patriace enzymatickej rodine, ďalej písmeno konkrétnej podrodiny a posledné v názve je číslo určujúce jedinečnú sekvenciu proteínu (Hyndman et al. 2003).

Väčšina enzýmov AKR má molekulovú hmotnosť približne 37 kDa a monoméru štruktúru, výnimku predstavujú niektorí členovia rodiny AKR2, AKR6 a AKR7, schopní tvorby multimérov (Kavanagh et al. 2002, Kozma et al. 2002, Penning 2015). Typická je pre ne  $(\alpha/\beta)_8$  barelová štruktúra, pričom na jej C-konci sa nachádzajú variácie sľučiek s aktívnym miestom, určujúcim substrátovú špecifitu. Zároveň majú navzájom všetky AKR podobné väzbové miesto pre nikotinamidové kofaktory, od ktorých je závislá ich katalytická schopnosť (Jez et al. 1997, Penning 2015).

Celkovo nadrodina AKR obsahuje viac ako 190 rôznych enzýmov roztriedených do 16 rodín a ďalších podrodín (Penning 2015). Všetky sa pravdepodobne vyvinuli zo spoločného multifunkčného predka, vďaka duplikáciám génu a následným evolučným odchýlkám vo väzbe a preferenciách substrátov. Tieto proteíny je možné nájsť od prokaryotov, protozoí, cez kvasinky a rastliny, až po živočíchy a v neposlednom rade, ľudí (Barski et al. 2008, Jez et al. 1997).

Doteraz bolo identifikovaných 15 typov aldo-ketoreduktáz vyskytujúcich sa v ľudskom organizme – AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1B15, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR1D1, AKR1E2, AKR6A3, AKR6A5, AKR6A9, AKR7A2 a AKR7A3 (Penning 2015).

I keď aldo-ketoreduktázy patria medzi oxidoreduktázy a *in vitro* majú schopnosť oxidácie, *in vivo* sa pravdepodobne správajú hlavne ako reduktázy. NADPH je aldo-ketoreduktázami preferované oproti NADH a v metabolicky aktívnych bunkách je NADP<sup>+</sup> väčšinou v redukovanej forme, takže redukcia je uprednostňovaná pred oxidáciou (Barski et al. 2008, Penning 2015).

Samotný mechanizmus redukčnej katalýzy prebieha v dvoch krokoch – najskôr sa preniesie hydridový ión z NAD(P)H na karbonylový substrát a v druhom kroku sa naviaže protón z rozpúšťadla, čím dôjde k redukcii karbonylu na alkohol. Tieto dva kroky môžu prebiehať buď postupne, alebo spoločne – časová medzera medzi nimi môže byť jedným

z rozdielov, predurčujúcim katalytické vlastnosti a substrátové preferencie jednotlivých enzýmov (Penning 2015).

AKR u ľudí majú veľký počet ns-SNPs. Mutácie v enzýmoch AKR1D1 a AKR1C zohrávajú úlohu v deficite žľových kyselín, či napríklad v defektoch mužských genitálií. AKR1D1 katalyzuje jeden z krokov biosyntézy žľovej kyseliny – mutácie zabraňujú konverzií 7 $\alpha$ -hydroxycholestenonu na ďalšie prekurzory žľových kyselín, čím je zároveň narušená negatívna spätná väzba tvorby enzýmu zodpovedného za rýchlosť ich biosyntézy. Tým pádom je na jednej strane narušená schopnosť organizmu emulgovať tuky a absorbovať vitamíny, a súčasne dochádza k produkcii hepatotoxických izomérnych žľových kyselín (Penning 2015).

Ns-SNPs v ľudských enzýmoch AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2 a AKR1A1 ukázali schopnosť výrazne znížiť biotransformáciu doxorubicinu a daunorubicinu *in vitro* (Bains et al. 2008, Bains et al. 2010a). Štúdia na 151 pacientoch s karcinómom prsníka naznačila častejší výskyt IVS4–212 C>G mutácie AKR1C3 u pacientov ázijskeho pôvodu, a s ňou spojenú väčšiu hematologickú toxicitu, dlhšie prežitie pacientov bez progresie ochorenia a ich celkové prežitie po podaní doxorubicinu (Voon et al. 2013).

Okrem týchto aldo-ketoreduktáz katalyzujú metabolickú redukcii doxorubicinu i daunorubicinu ďalšie enzýmy, ako sú AKR1B1, AKR1C2 a AKR1B10. Daunorubicin sa ukazuje byť lepším substrátom pre aldo-ketoreduktázy ako doxorubicin, s výnimkou AKR1C2, s rovnakou afinitou k obom antracyklínom (Bains et al. 2010a).

Ľudské AKR predstavujú potenciálny cieľ pre liečivá, akými sú ich špecifické inhibítory, ale existujúca podobnosť týchto enzýmov naprieč nadrodinou spôsobuje komplikácie v hľadaní selektívnych štruktúr (Jez et al. 1997).

### **2.2.1.1. AKR1A1 - aldehydreduktáza**

Aldo-ketoreduktáza 1A1 (AKR1A1) je cytozolickou monomérou oxidoreduktázou, závislou na NADPH. Tento enzým je exprimovaný ubikvitérne vo väčšine tkanív, najvyššie hladiny však má v proximálnych tubuloch obličiek. Od ostatných členov nadrodiny aldo-ketoreduktáz sa odlišuje preferenciou negatívne nabitých substrátov, obsahujúcich karboxylovú skupinu. S vysokou afinitou sú redukované aj aromatické aldehydy (ako je *p*-karboxybenzaldehyd, *p*-nitrobenzaldehyd, pyridin-3-aldehyd a pyridin-4-aldehyd), steroidné a malé trojuhlíkové aldehydy. Významným substrátom je aj antracyklín daunorubicin (Barski et al. 2005, Barski et al. 2008).

V prípade proximálnych *trans*-dihydrodiolov, katalyzuje AKR1A1 ich oxidáciu na *o*-chinony, ktoré majú vysoký karcinogénny potenciál. Tým má pravdepodobne kľúčovú úlohu v aktivácii prokarcinogénnych polycyklických aromatických uhlovodíkov (PAH) *in vivo* (Palackal et al. 2001).

V kôre obličiek sa ukazuje ďalšie možné pôsobenie AKR1A1, konkrétne v katabolizme myoinozitolu. Inozitoloxigenáza, prvý enzým katabolickej dráhy, produkuje D-glukuronát, ktorý je ďalej konvertovaný touto aldehydreduktázou na L-gulonát (Reddy et al. 1981).

Ďalšou fyziologickou úlohou AKR1A1 je katalýza redukcie mevaldátu na mevalonovú kyselinu a glyceraldehydu na glycerol (ktorý je následne glycerolkinázou konvertovaný na triacylglycerol), a tým má svoj podiel v biosyntéze triacylglycerolov a cholesterolu (Palackal et al. 2001).

#### **2.2.1.2. AKR1B1 - aldózareduktáza**

Aldo-ketoreduktáza 1B1 (AKR1B1) patrí medzi značne skúmané enzýmy nadrodiny aldo-ketoreduktáz. Dôvodom je jeho potenciálne sprostredkovanie hyperglykemického poškodenia a následných sekundárnych komplikácií diabetu. Je to podmienené faktom, že u diabetikov sú často prítomné vysoké hladiny cirkulujúcej glukózy a tá môže následne vstupovať vo veľkých množstvách do polyolovej dráhy, kde sa v prvom kroku konvertuje pomocou AKR1B1 na hyperosmotický cukor sorbitol (Penning 2015).

Primárne je táto aldózareduktáza lokalizovaná v epitelových bunkách šošovky, preto sa v nich poškodenie, vyvolané akumuláciou cukrových alkoholov, odzrkadlí ako prvé. Počas sledovania epitelových buniek psích šošoviek, kultivovaných v médiu obsahujúcom galaktózu, dochádzalo k rýchlej akumulácii galaktitolu, pričom po pridaní inhibítora AKR1B1 sa jeho hladiny redukovali a zároveň sa znížila apoptóza buniek. To naznačuje, že osmotická nerovnováha spôsobená akumuláciou cukrových alkoholov môže viesť ku apoptóze šošovkových epiteliálnych buniek a potenciálne ku kataraktu (Murata et al. 2001).

Metaanalýza klinických skúšok poukázala na možnú prospešnosť inhibítorov AKR1B1 (ako sú epalrestat, tolrestat, fidalrestat, zenarestat) u diabetickej kardiovaskulárnej autonómnej neuropatie, pričom účinnosť preukázali hlavne v asymptomatickom a miernom štádiu ochorenia (Hu et al. 2014).

Okrem konverzie glukózy, ďalšia funkcia enzýmu spočíva v redukcii aldehydov vytvorených lipoperoxidáciou, steroidov a ich derivátov, retinoidov, prostaglandínov (PG) a rôznych xenobiotík vrátane daunorubicinu (Bains et al. 2010a, Pastel et al. 2012).

Zvýšená expresia AKR1B1 má podiel na zvýšení rezistencie voči daunorubicinu a na vývoji kardiotoxicity. Inhibítory tohto enzýmu môžu byť užitočným prostriedkom na zvýšenie antineoplastickej účinnosti daunorubicinu, pri súčasnom znížení kardiotoxických účinkov jeho metabolitu daunorubicinolu (Plebuch et al. 2007).

Svoje miesto má aj v procese aterosklerózy pri proliferácii buniek hladkého svalstva (Ramana et al. 2002).

AKR1B1 môže takisto zohrávať úlohu v ochrane tenkého čreva proti elektrofilným karbonylom pochádzajúcim z potravy, rovnako ako AKR1B10. Pravdepodobne je AKR1B10 účinnejší v eliminácii voľných elektrofilných karbonylových zlúčenín, no AKR1B1 môže mať významnejšiu funkciu pri ďalšej detoxikácii karbonylov, ktoré sú už konjugované s glutathionom (Shen et al. 2011).

### **2.2.1.3. AKR1B10 –aldózareduktáza tenkého čreva**

Medzi členov nadrodiny aldo-ketoreduktáz patrí aj ďalší cytozolický NADPH-dependentný enzým aldo-ketoreduktáza 1B10 (AKR1B10). Exprimovaný je hlavne v gastrointestinálnom trakte - tenkom a hrubom čreve, či pečeni. To naznačuje jeho úlohu, pravdepodobne spočívajúcu v detoxikácii reaktívnych aldehydov v prijímanej potrave (Cao et al. 1998, Huang et al. 2016).

Zúčastňuje sa okrem toho redukcie karbonylu u xenobiotík, ako sú antiemetikum dolasetron a protinádorové liečivá oracin a daunorubicin. Tým má schopnosť prispieť ku chemorezistencii nádorov voči daunorubicinu, nesúcemu v štruktúre karbonylovú skupinu (Martin et al. 2006).

Kyselina retinová predstavuje dôležitý prvok vo veľkom počte biologických procesov. Podieľa sa na vývoji plodu, proliferácii a diferenciácii buniek, či kontrole expresie génov. Prvým krokom v jej biosyntéze je oxidácia retinolu na retinaldehyd. Práve v opačnom smere, katalyzuje AKR1B10, spolu s ďalšími členmi nadrodiny AKR (ako je AKR1C3), redukciiu retinaldehydu späť na alkohol, pričom tento enzým je selektívnejší k *all-trans*-retinalu. Podľa všetkého, up-regulácia AKR1B10 v nádorových bunkách je spojená so znížením hladín kyseliny retinovej. To môže následne viesť ku



strate schopnosti diferenciacie buniek a k ďalšiemu nádorovému bujneniu (Crosas et al. 2003, Gallego et al. 2007).

Zvýšená expresia AKR1B10 bola zaznamená u niekoľkých typov kanceróz a prekanceróznych lézií. Jedným z nich je hepatocelulárny karcinóm (Scuric et al. 1998). Nadexpresia sa týka aj karcinómu z dlaždicových buniek a adenokarcinómu spojeného s fajčením. AKR1B10 sa teda môže účastniť karcinogenézy súvisiacej s tabakom – ukazuje sa ako potenciálny diagnostický marker, špecifický pre nemalobunkový pľúcny karcinóm, s typickým výskytom u fajčiarov (Fukumoto et al. 2005).

Zvýšená miera expresie bola pozorovaná aj v prípadoch karcinómu krčka maternice a endometria, pričom AKR1B10 môže byť jedným z rizikových faktorov vzniku recidívy endometriálneho karcinómu (Yoshitake et al. 2007).

AKR1B10 účinne redukuje alifatické aldehydy s dlhým reťazcom, vrátane *trans*-2-alkénov pochádzajúcich z peroxidácie lipidov. Vykazuje aktivitu aj voči substrátom ako sú farnesal a geranylgeranial, redukuje ich na farnesol a geranylgeraniol. Tie sa následne fosforylujú na farnesyl a geranylgeranyl pyrofosfáty, ktoré sú substrátmi pre prenyláciu proteínov a medziprodukty pre syntézu cholesterolu. Prenylácia je post-translačnou úpravou, významnou pre biologickú aktivitu mnohých proteínov, ktoré majú úlohu pri transdukcií signálu, bunkovej proliferácii či apoptóze (Endo et al. 2009).

Tento enzým je zároveň citlivý na inhibíciu rôznymi endogénnymi steroidmi, čo môže predstavovať spätnoväzbovú reguláciu intracelulárnych hladín cholesterolu. Veľké množstvo steroidných hormónov a ich metabolitov v bunke naznačuje vyššiu koncentráciu cholesterolu, a teda potrebu znížiť jeho biosyntézu – to je možné dosiahnuť inhibíciou AKR1B10 steroidmi, čím sa zníži množstvo farnesolu. Takáto možnosť regulácie má potenciálny význam hlavne v nadobličkách, kde je enzým vysoko exprimovaný (Endo et al. 2009).

Z exogénnych inhibítorov je možné spomenúť deriváty *N*-fenylantranilovej kyseliny (kyselina mefenámová, flufenámová, meklofenámová), diklofenak, kyselinu glycyrrhetinovú (Endo et al. 2010), bisdemethoxykurkumín (Matsunaga et al. 2009), spoločný inhibítor s AKR1B1 tolrestat (Endo et al. 2009) a oleanolovú kyselinu (Takemura et al. 2011).

#### 2.2.1.4. *AKR1C1-C4 - hydroxysteroiddehydrogenázy*

Enzýmy podrodiny aldo-ketoreduktáz 1C (AKR1C) zdieľajú vzájomne cez 86 % aminokyselinovej sekvencie. Okrem toho majú spoločnú (v rôznej miere) 3-, 17-, 20-ketosteroidreduktázovú a 3 $\alpha$ -, 17 $\beta$ -, a 20 $\alpha$ -hydroxysteroidoxidázovú NAD(P)(H)- dependentnú aktivitu. Od enzýmov AKR1A a AKR1B sa odlišujú tým, že vykazujú afinitu nielen k aldehydom, ale aj ku ketómom - ich endogénnymi substrátmi sú hlavne steroidy a prostaglandíny (Penning et al. 2000, Penning et al. 2004).

Všetky sú exprimované bunkami pečene, kde sa zúčastňujú biosyntézy žlčových kyselín. Líšia sa práve extrahepatálnou expresiou – AKR1C4 je prakticky pre pečeň špecifická, zatiaľ čo v prostate a prsnej žľaze sú dominantne exprimované AKR1C2 a AKR1C3. AKR1C1 a AKR1C2 sú navyše exprimované v mozgu, kde sa zúčastňujú syntézy anxiolytických steroidov (Penning et al. 2000, Penning et al. 2004).

Expresia AKR1C1 a AKR1C3 pravdepodobne riadi pomer estradiolu a progesterónu u karcinómu endometria. To je významné z hľadiska korelácie jeho incidencie so zvýšenou estrogénovou stimuláciou, súčasne nevyváženou progesterónom či syntetickými progestínmi. Progesterón je vďaka AKR1C1 inaktivovaný premenou na 20 $\alpha$ -hydroxyprogesterón, a teda jeho zvýšená expresia malígnymi bunkami endometria, môže znamenať zníženie progesterónovej ochrany. Súčasne AKR1C3 katalyzuje redukciu estrónu na estradiol, prispievajúc tak k vystupňovaným estrogénovým účinkom (Rižner et al. 2006).

Naopak znížená expresia AKR1C1 a AKR1C2 je preukázaná v prsníkových nádorových tkanivách. Progesterón je pomocou AKR1C metabolizovaný na 3 $\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-20-ón (3 $\alpha$ HP) a 20 $\alpha$ -dihydroprogesterón (20 $\alpha$ DHP) – metabolity so schopnosťou potlačiť bunkovú proliferáciu a adhéziu. Zmenené hladiny enzýmov môžu preto vysvetľovať modifikovaný progesterónový metabolizmus, typický pre karcinóm prsníka (Lewis et al. 2004).

Spinocelulárny karcinóm hlavy a krku je štandardne liečený chemoterapeutikom cisplatinou. Problémom je už primárna rezistencia nádorových buniek, korelujúca s expresiou AKR1C1. Jednou z príčin zvýšenej expresie enzýmu môžu byť toxické pôsobky cigaretového dymu. AKR1C1 v tomto prípade ovplyvňuje signálnu dráhu prenášača signálu a transkripčného aktivátora 1/3 (STAT1/3) a pre pacientov predstavuje

zlý prognostický faktor recidívy a úmrtia. Inhibítor Janusovej kinázy (JAK), ruxolitinib, predstavuje potenciálne spôsob, ako túto rezistenciu prekonať (Chang et al. 2019).

AKR1C2 katalyzuje metabolickú premenu  $5\alpha$ -dihydrotestosterónu, ktorého výsledkom je inaktívny androgén  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol a tiež konverziu  $5\beta$ -dihydroprogesterónu na anxiolytický  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -pregnan-20-ón (allopregnanolon). Allopregnanolon je alosterickým modulátorom GABA<sub>A</sub> receptoru a zníženie jeho hladín je pozorované u žien s predmenštruačným syndrómom (Penning 2015, Rapkin et al. 1997).

AKR1C3 v úlohe  $17\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázy katalyzuje redukciiu  $\Delta 4$ -androsten- $3,17$ -diónu na testosterón,  $5\alpha$ -androsten- $3,17$ -diónu na  $5\alpha$ -dihydrotestosterón a estrónu na  $17\beta$ -estradiol. Preto je inhibícia funkcie tohto enzýmu vhodným cieľom terapie hormón-dependentných karcinómov prostaty a prsníka, kde je sledovaná zvýšená expresia AKR1C3 (Byrns et al. 2010, Penning et al. 2015).

Karcinóm prostaty a karcinóm prostaty rezistentný na kastráciu (CRPC) bývajú často závislé na biosyntéze androgénov nádorovými bunkami a AKR1C3 prispieva tvorbou testosterónu, ktorý sa viaže na androgénové receptory, k ďalšej proliferácii a stimulácii nádorového rastu cez signalizačnú kaskádu androgénového receptoru (AR) (Byrns et al. 2012).

Okrem vyššie spomínaných účinkov, katalyzuje AKR1C3 aj redukciiu prostaglandínu H<sub>2</sub> na PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  a prostaglandínu D<sub>2</sub> na  $9\alpha,11\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Prostredníctvom ovplyvnenia metabolizmu prostaglandínov a steroidných hormónov, môže dochádzať ku progresii nádorového bujnenia v prsnom tkanive; vzniknuté izoméry PGF<sub>2</sub> stimulujú proliferáciu, angiogénu a invazivitu nádoru. Okrem toho AKR1C3 obmedzuje vznik PGJ<sub>2</sub> z PGD<sub>2</sub>, ktorý má naopak antiproliferatívne účinky (Byrns et al. 2010, Penning et al. 2015).

Nadmerná expresia AKR1C3 je pozorovaná aj v prípade akútnej myeloidnej leukémie (AML) a T-lymfocytovej akútnej leukémie (ALL), kde prispieva k rezistencii voči antracyklínom (Verma et al. 2019).

Medzi xenobiotiká metabolizované pomocou AKR1C patrí aj protinádorové liečivo oracin. AKR1C2 a AKR1C4 ho metabolizujú stereošpecificky na (+)-dihydrooracin (DHO), vďaka AKR1C1 je z malej časti metabolizovaný na (-)-DHO. (Wsól et al. 2007).

Naloxon a naltrexon patria medzi ďalšie liečivá metabolizované vďaka AKR1C. Naloxon je v pečeni redukovaný na  $6\beta$ -naloxol – katalýza je najúčinnjšia u AKR1C4,

ale účinnými enzýmami sú takisto AKR1C1 a AKR1C2. Rovnako naltrexon je stereošpecificky redukovaný na 6 $\beta$ -naltrexol (Ohara et al. 1995).

Ďalším dôležitým substrátom AKR je daunorubicin (Ohara et al. 1995). Up-regulácia AKR1C1 a AKR1C3, v ľudských leukemických bunkách línie U937, znížila ich citlivosť na protinádorové liečivo daunorubicin, čím sa preukázala úloha týchto enzýmov v nadobudnutí rezistencie (Matsunaga et al. 2014).

Sledovaním redukčnej účinnosti AKR1C3 na troch antracyklínoch sa zistilo, že daunorubicin je enzýmom metabolizovaný najefektívnejšie, nasleduje idarubicin a za ním doxorubicin. Túto katalytickú funkciu AKR1C3 je schopný inhibovať 2'-hydroxyflavanón. Súčasne boli pozorované zmeny v expresii AKR1C3 v bunkách tumoru po podaní daunorubicinu a idarubicinu, ktoré korelujú s ich pôvodnými endogénnymi hladinami. Indukcia AKR1C3 teda môže vystupňovať primárnu rezistenciu nádorových buniek, danú endogénnou expresiou tohto enzýmu (Hofman et al. 2014).

Objavená bola aj súvislosť zvýšenej expresie AKR1C3 so stratou tumorsupresoru PTEN a aktiváciou anti-apoptotickej dráhy PTEN/proteínkináza B (Akt). To môže mať potenciálne vplyv na rezistenciu karcinómu prsníka voči doxorubicinu (Zhong et al. 2015).

Za jeden z terapeutických cieľov sa považuje objavenie špecifických inhibítorov AKR1C. Pôsobenie AKR1C1 je možné inhibovať salicylátmi a ich derivátmi, ako sú 3-bróm-5-fenylsalicylát či 3-chlór-5-fenylsalicylát (El-Kabbani et al. 2010).

Známymi inhibítormi AKR1C sú nesteroidné antiflogistiká (NSAID), ktoré sa navzájom líšia špecifitou k rôznym izoformám enzýmu. Sulindak, kyselina meklofenámová, ibuprofen či flurbiprofen sú pomerne nešpecifickými inhibítormi AKR1C; naproxen preferenčne inhibuje AKR1C2 a AKR1C3 oproti AKR1C1. Indometacín a jeho methylester sa zdajú byť jedinými výrazne preferujúcimi AKR1C3 nad ostatnými izoformami. *N*-(4-chlórbenzoyl)-melatonín, analóg indometacínu, sa javí ako selektívny inhibítor AKR1C3, ktorý zároveň neinhibuje cyklooxygenázy (Byrns et al. 2008).

Ďalším objaveným, pomerne špecifickým inhibítorom AKR1C3, je 4-methyl(de-dimethylamin)-tetracyklín (4-MDDT), so štruktúrou odvodenou od tetracyklínu, ktorého inhibičná aktivita však nie je dostatočná na vyvolanie adekvátneho antileukemického účinku. Klinicky využívaným v liečbe leukémií je iný účinný inhibítor AKR1C3, 6-medroxy-progesterónacetát (Khanim et al. 2014).

### 2.2.1.5. AKR7A2 – aflatoxínreduktáza

Aldo-ketoreduktáza 7A2 (AKR7A2) je NADP(H)-dependentným enzýmom exprimovaným v tkanivách mnohých orgánov, ako sú pankreas, obličky, kostrové svalstvo, tenké črevo, pečeň, srdce či mozog (Ireland et al. 1998).

Je známy aj ako aflatoxínreduktáza, pretože katalyzuje redukciu hepatotoxického dialdehydového metabolitu aflatoxínu B1 na príslušný dialkohol s nižšou toxicitou (Ireland et al. 1998).

V CNS má AKR7A2 funkciu sukcinát-semialdehydreduktázy. Sukcinátsemialdehyd je metabolickým produktom GABA, ktorý je ďalej konvertovaný pomocou AKR7A2 na  $\gamma$ -hydroxybutyrát – metabolit s potenciálnymi neuromodulačnými vlastnosťami. U pacientov s niektorými neurodegeneratívnymi ochoreniami, ako je Alzheimerova choroba, je možné pozorovať zvýšené hladiny tohto AKR enzýmu (Picklo et al. 2001).

Štúdie naznačujú, že AKR7A2 je hlavným enzýmom metabolizujúcim antracyklíny v ľudskom myokarde, kde prispieva k syntéze kardiotoxických alkoholových metabolitov. Terapia doxorubicinom zároveň modifikuje expresiu AKR7A2 a vedie k zmenám vo fosforylácií (Quiñones-Lombraña et al. 2019).

Metabolizmus antracyklínových antibiotík a ich následné kardiotoxické pôsobenie, závisí aj na interindividuálnej variabilite v expresii génov AKR7A2. Jednou z príčin variabilnej farmakodynamiky antracyklínov sa zdá byť metylácia DNA v špecifických polohách AKR7A2 génového lokusu (Hoefler et al. 2016).

### 2.2.2. NADRODINA SDR

Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom (SDR) sú veľkou, divergentnou skupinou, prevažne zloženou z NAD(P)(H)-dependentných oxidoreduktáz. Táto enzýmová vetva zdieľa štruktúrne znaky, ako sú vzorec skladania  $\alpha/\beta$ , s väzbovým miestom pre nukleotidový kofaktor (tzv. Rossmanov zhyb) a typickú katalytickú tetradu aktívneho miesta Asn-Ser-Tyr-Lys (Kavanagh et al. 2008). V sekvenciách aminokyselín sú však identické len z približne 15-20 % (Oppermann et al. 2001).

U ľudí bolo doposiaľ identifikovaných cez 80 génov SDR (Bhatia et al. 2015). Majú v organizme rozličné funkcie, medzi inými sa podieľajú na metabolizme aminokyselín, lipidov, mastných kyselín, cukrov, retinoidov, prostaglandínov či steroidných hormónov. Okrem toho sa zúčastňujú biotransformácie rôznych xenobiotík a podskupina atypických

SDR má svoje uplatnenie v kontrole metabolických dráh (Bhatia et al. 2015, Oppermann et al. 2001).

Týmto rôznorodým metabolickým úlohám zodpovedá aj ich subcelulárne umiestnenie – nájdeme ich v mitochondriách, cytoplazme, jadre, v ER, Golgiho aparáte, aj v peroxizónoch (Bhatia et al. 2015).

V rámci nadrodiny SDR rozoznávame základných 5 rodín enzýmov, označovaných ako „divergentné“, „komplexné“, „intermediárne“, a tie najpočetnejšie rodiny, „rozšírené“ a „klasické“, kam patria aj dôležité ľudské karbonylreduktázy a 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza 1 (11 $\beta$ -HSD1) (Hoffmann a Maser 2007). K týmto hlavným piatim rodinám môžeme priradiť ešte ďalšie dve, tzv. enzýmy „atypické“ a „nepripradené“. Toto rozdelenie sa prejavuje aj v nomenklatúre, pričom každá z rodín má priradené písmeno, ktoré sa premietne aj v názve jednotlivých enzýmov (Persson et al. 2009).

Enzýmy SDR nadrodiny takisto zohrávajú úlohu v metabolizme doxorubicinu a daunorubicinu, pričom sa ukázalo, že CBR1 má vyššiu špecifitu pre daunorubicin a CBR3 pre doxorubicin. Mutácie v génoch, kódujúcich tieto enzýmy, môžu mať podiel vo variabilite výskytu nežiaducich účinkov medzi pacientami liečenými doxorubicinom a daunorubicinom (Bains et al. 2009, Bains et al. 2010b).

### **2.2.2.1. CBR1**

Výnimočnou vlastnosťou karbonylreduktázy 1 (CBR1) je to, že pravdepodobne ako jediná z SDR existuje zároveň v troch izoformách s podobnou katalytickou aktivitou. To je dané schopnosťou autokatalýzy, pričom dochádza ku chemickej modifikácii na lyzíne-239, reakciou s 2-oxokarboxylovými kyselinami (ako sú pyruvát a 2-oxoglutarát). Tento proces je podľa všetkého fyziologický a závisí od metabolického stavu buniek (Sciotti et al. 2000, Wirth a Wermuth 1992).

Karbonylreduktáza 1 je cytozolická, ubikvitérne exprimovaná, monomérou NADPH-dependentnou oxidoreduktázou, s najvyššou mierou expresie identifikovanou v pečeni a centrálnom nervovom systéme. Okrem toho CBR1 nájdeme v epitelových bunkách žalúdka a tenkého čreva, obličkách, epiderme a v menšom množstve v cievnom endoteli a vo vláknach hladkého svalstva. Orgánovému umiestneniu zodpovedajú funkcie tohto enzýmu v organizme, spočívajúce jednak v detoxikácii exogénnych látok, ako aj

metabolizme endogénnych zlúčenín – prostaglandínov či rôznych steroidov (Wermuth 1981, Wirth a Wermuth 1992).

CBR1 plní úlohu chinonreduktázy, účinne katalyzuje redukciu substrátov ako sú menadion, tokoferolchinon, fenantrénchinon či ubichinon. Ďalšími substrátmi sú aromatické aldehydy, napríklad 4-nitrobenzaldehyd a rozličné biogénne aldehydy, ku ktorým patrí aj indol-3-acetaldehyd (Wermuth 1981, Wermuth et al. 1986).

Rovnako 4-oxonon-2-enal, vysoko reaktívny produkt peroxidácie lipidov, vznikajúci pri oxidačnom strese, sa ukázal ako jeden z dôležitých substrátov CBR1 (Doorn et al. 2004).

Tento enzým ďalej disponuje 9-ketoreduktázovou aktivitou, vďaka čomu zohráva úlohu v regulácii prostaglandínov - katalyzuje konverziu prostaglandínu E<sub>2</sub> na prostaglandín F<sub>2α</sub>, a zároveň oxidáciu PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> a PGD<sub>2</sub> na ich zodpovedajúce 15-keto metabolity, ktoré sú biologicky neaktívne. To môže mať nepriamo vplyv na tumorigénny potenciál buniek, keďže prostaglandín E<sub>2</sub> preukázal schopnosť inhibovať bunkovú smrť (Schieber et al. 1992, Sheng et al. 1998).

Štúdie naznačujú význam CBR1 v modulácii rastu a metastáz nádorových buniek. V porovnaní s normálnymi epitelovými bunkami prostaty sa zistilo, že časť buniek adenokarcinómu v menšej miere, alebo dokonca vôbec CBR1 neexprimuje. Strata expresie tohto enzýmu v metastatických bunkách je pravdepodobne príčinou ich vyššej malignity a metastatickej kapacity (Ismail et al. 2000).

CBR1 sa takisto podieľa na vzniku rezistencie voči antracyklínom. Up-regulácia enzýmu v bunkách gastrointestinálneho tumoru predstavuje prognostický a diagnostický ukazovateľ vývoja ich rezistencie na doxorubicin. Čiastočná obnova citlivosti DOX-rezistentných nádorových buniek bola sledovaná po podaní inhibítora CBR1, kvercetínu (Matsunaga et al. 2015).

#### **2.2.2.2. CBR3**

Ďalšou z NADP(H)-dependentných oxidoreduktáz je karbonylreduktáza 3 (CBR3). Objavená bola pri hľadaní génov prispievajúcich k Downovmu syndrómu, pričom jej gén bol lokalizovaný 62 kb za génom CBR1 (Pilka et al. 2009, Watanabe et al. 1998).

Tieto dva enzýmy zdieľajú spoločne až 70 % aminokyselinovej sekvencie, ale líšia sa v štruktúre aktívneho miesta. Výsledkom ich vzájomných odlišností je užšie substrátové spektrum – CBR3 katalyzuje prevažne metabolickú premenu *o*-chinonov

(jedným z najlepších substrátov sa ukázal 1,2-naftochinon); ďalšími nájdenými boli liečivo oracin, acetohexamid či isatín. Vo všeobecnosti CBR3 katalyzuje premenu týchto substrátov s nižšou účinnosťou ako CBR1. Rozdielom je aj to, že nevykazuje aktivitu voči prostaglandínom a 4-oxonon-2-enalu (Pilka et al. 2009).

Pri štúdiu významu alelických variant ľudskej CBR3, bol pozorovaný bežne sa vyskytujúci polymorfizmus V244M, zodpovedný za kódovanie izoforiem proteínu CBR3 s charakteristickými katalytickými vlastnosťami (Lakhman et al. 2005).

CBR3 je tiež jedným z enzýmov, katalyzujúcich premenu antracyklínov na ich kardiotoxické metabolity. Génový polymorfizmus CBR3, ktorý spôsobuje zvýšenie redukčnej aktivity, môže u pacientov viesť ku zlyhaniu srdca po nižších dávkach doxorubicinu, ako sú podávané štandardne. Pri liečbe daunorubicinom a idarubicinom toto riziko ešte stúpa – tvorba toxických metabolitov v myokarde bola v ich prípade výraznejšia, a zároveň dochádzalo k ich hromadeniu. U epirubicinu sa zvýšené riziko srdcového zlyhania neprejavilo (Salvatorelli et al. 2018).

### 2.2.2.3. *CBR4*

Do nadrodiny SDR patrí aj enzým karbonylreduktáza 4 (CBR4). Od predchádzajúcich karbonylreduktáz sa líši vo viacerých aspektoch, jedným z nich je substrátová špecificita. CBR4 katalyzuje NADP(H)-dependentne konverziu *o*- a *p*-chinonov, avšak tento enzým nie je pravdepodobne schopný redukcie iných karbonylových zlúčenín, ako sú alifatické a aromatické aldehydy či ketosteroidy. Takisto v opačnom smere, nebola preukázaná schopnosť oxidácie aromatických a alifatických alkoholov, čo naznačuje, že CBR4 je výlučne chinonreduktázou. Rovnako aj subcelulárna lokalizácia v mitochondriách signalizuje, že by úloha CBR4 mohla spočívať v ochrane pred exogénnymi chinonmi (Endo et al. 2008).

Bains et al. (2010a) však uvádza, že CBR4 je schopná katalyzovať premenu doxorubicinu a daunorubicinu, pričom doxorubicin sa ukázal ako výrazne lepší substrát.

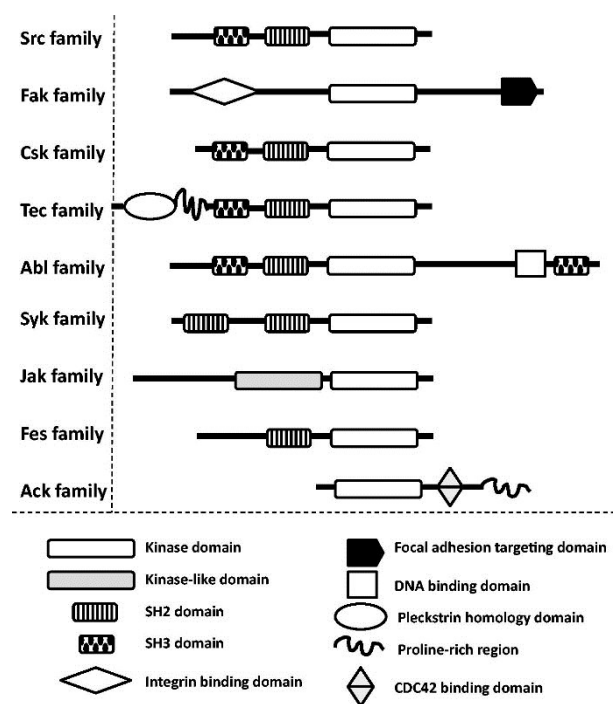


## 2.3. TYROZÍNKinÁZY

Jednými z hlavných signalizačných enzýmov sú proteín-tyrozínkinázy (PTK). Katalyzujú prenos ATP- $\gamma$ -fosfátu na tyrozínové zvyšky proteínového substrátu. Tým dochádza k jeho fosforylácií a vďaka signalizačnej kaskáde, následne k ďalším biochemickým a fyziologickým reakciám – reguluje sa tak rast buniek, ich proliferácia, diferenciácia, migrácia, apoptóza, či reakcie na extracelulárne stimuly. Podľa štruktúry rozlišujeme tyrozínkinázy na receptorové a nereceptorové, ktoré sa vzhľadom na štruktúrnu homológiu jednotlivých enzýmov, delia ešte na ďalšie skupinové celky (Jiao et al. 2018, Madhusudan a Ganesan 2004).

Receptorové tyrozínkinázy sa skladajú z extracelulárnej domény, z transmembránovej časti a intracelulárnej domény, s vlastnou kinázovou aktivitou. Receptorové tyrozínkinázy zahŕňajú receptory ako sú receptor epidermálneho rastového faktoru (EGFR), receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru (VEGFR), receptor pre doštičkový rastový faktor (PDGFR), protoonkogén c-KIT či inzulínový receptor (InsR). Naviazaním špecifického ligandu na extracelulárnu doménu dochádza ku dimerizácií, autofosforylácií receptoru a následne ku fosforylácií substrátu. Informácie sú ďalej prenášané prostredníctvom signálnych dráh PI3K/Akt/mTor, PLC $\gamma$ /PKC, prípadne RAS/RAF/MEK/ERK (Jiao et al. 2018, Regard 2015).

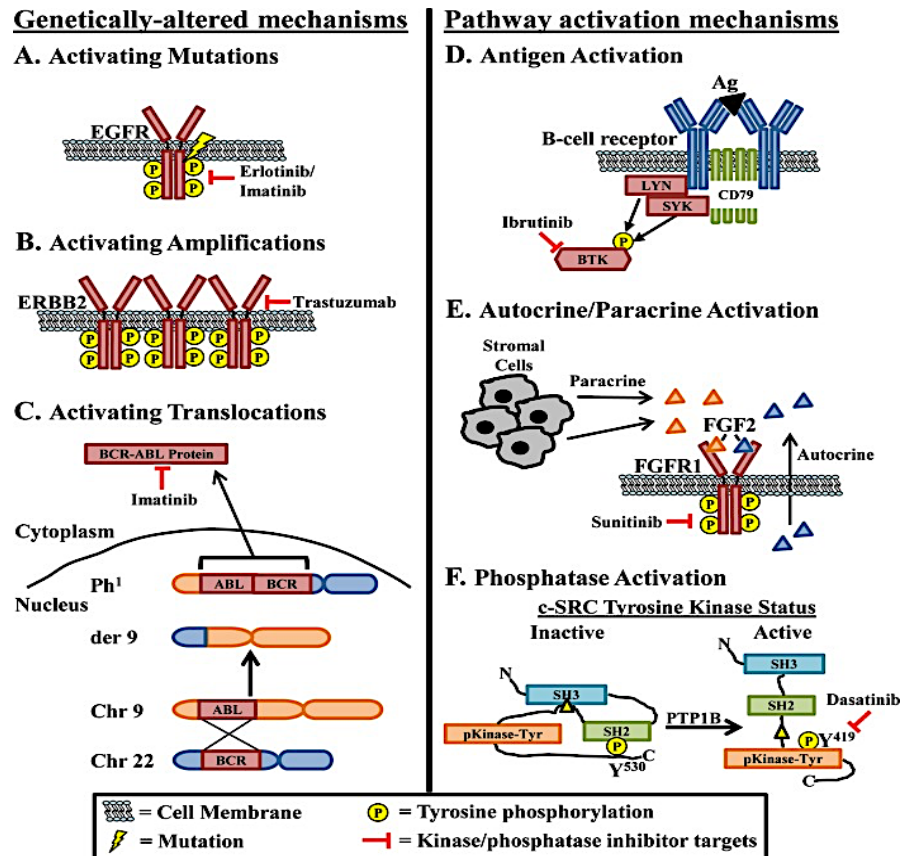
Súčasťou nereceptorových PTK, naopak nie je extracelulárna doména, spravidla sú naviazané na membránu bunky alebo sa nachádzajú v cytozole a majú rovnako katalytickú doménu ako receptorové tyrozínkinázy. Transdukcia signálu prebieha spravidla cez cytokínové receptory či receptory T-buniek. Podľa podobností v štruktúre domény sa rozdeľujú na 9 hlavných rodín - konkrétne je to rodina sarkómovej protoonkogénovej proteín-tyrozínkinázy (Src), fokálnej adhéznej kinázy (Fak), c-terminálnej sarkómovej proteín-tyrozínkinázy (Csk), tyrozínkinázy exprimovanej hepatocelulárnym karcinómom (Tec), Abelsonovej tyrozínkinázy (Abl), slezinovej tyrozínkinázy (Syk), Janusovej kinázy (Jak), kinázy mačacieho sarkómu (Fes) a aktivovanej CDC42 kinázy (Ack) (Obr. 6). Nereceptorové tyrozínkinázy by sa zároveň dali považovať za súčasť dráh aktivovaných pomocou receptorových PTK (Gocek et al. 2014, Jiao et al. 2018, Wu a Fu 2018).



Obr. 6 Rozdelenie nereceptorových tyrozínkináz podľa doménovej homológie (prevzaté z Gocek et al. 2014)

Dôsledkom abnormálnej expzie PTK môžu byť poruchy, ktoré eventuálne vedú ku tumorigenéze. Miera invazivity, metastázovania, vaskularizácie nádoru a takisto rezistencie voči chemoterapeutikám, často súvisí práve s chybami vo funkciách tyrozínkináz. Napríklad, vďaka mutáciám PTK, môže v bunkách tumoru dochádzať ku spontánnej aktivácii dráh bez vonkajšieho stimulu. Okrem toho sa podieľajú na rôznych iných ochoreniach, ako sú imunodeficiencie, diabetes mellitus nezávislý na inzulíne, psoriáza, ateroskleróza či niektoré vrodené anomálie (kraniosynostóza) (Jiao et al. 2018, Madhusudan a Ganesan 2004, Prickett et al. 2009).

Rast nádorových buniek býva v mnohých prípadoch závislý na hyperaktivovaných signálnych dráhach, ktoré sú poháňané geneticky zmutovanými aj nezmutovanými tyrozínkinázami. Zvýšenie (geneticky zmenenej) aktivity tyrozínkináz, môže byť dôsledkom prítomných mutácií, DNA translokácií či amplifikácií. Bez genetických zmien dochádza k aktivácii tyrozínkináz inými mechanizmami (Obr. 7D-F). V oboch prípadoch je výsledkom zvýšená proliferácia a prežitie nádorových buniek závislých na činnosti signálnych dráh (Drake et al. 2014).



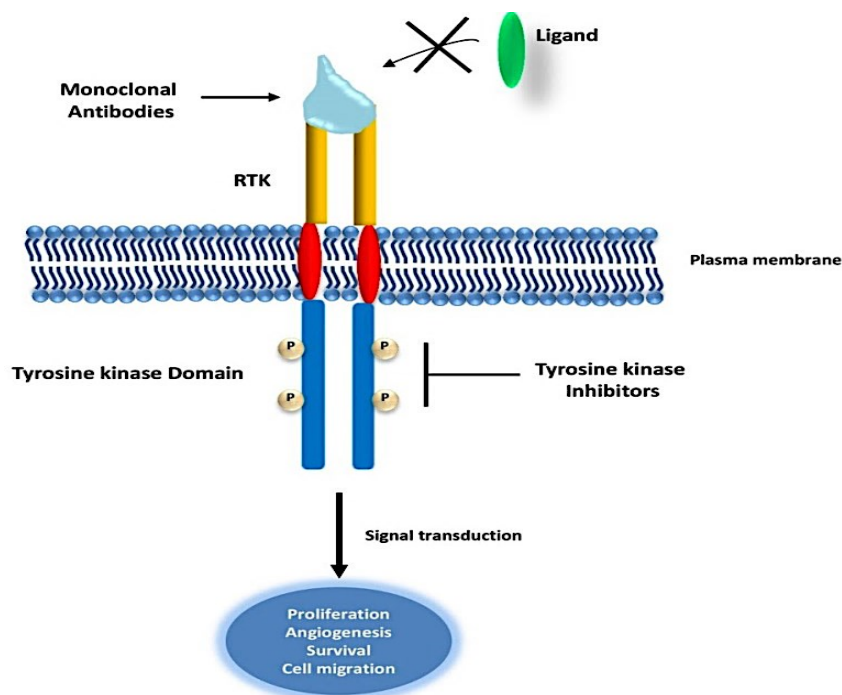
Obr. 7 Mechanizmy aktivácie tyrozínkináz v nádorových bunkách – príklady mutácií (A), amplifikácií (B), translokácií (C) a aktivácie bez genetických alterácií; antigénom (D), autokrinne/parakrinne (E), fosfatázou (F) (prevzaté z Drake et al. 2014)

Príkladom aktivácie signalizačných dráh, prostredníctvom *nadmernej expresie/amplifikácie* PTK, je receptor ľudského epidermálneho rastového faktoru 2 (HER-2) a Erb-B2 receptorová tyrozínkináza (ERBB2) (Obr. 7B); bežne sa vyskytujúce proteíny u niekoľkých typov nádorov, vedúce ku kvalitatívnej aj kvantitatívnej zmene signalizácie. Fúzia proteínu zlomového miesta génu (BCR) a ABL (Obr. 7C) je výsledkom *chromozómovej translokácie* a tento fúzny proteín je často prítomný

u chronickej myeloidnej leukémie. *Mutantný* EGRF (Obr. 7A), s depléciou aminokyselín v extracelulárnej doméne, je pozorovaný v rade solídnych tumorov. Dlhodobá stimulácia tyrozínkinázy môže byť takisto výsledkom *autokrinného/parakrinného* pôsobenia nadmerného množstva ligandov (napr. tumor nekrotizujúceho faktora  $\alpha$ ) (Madhusudan a Ganesan 2004).

### 2.3.1. INHIBÍCIA TYROZÍNKINÁZ

Inhibícia tyrozínkináz (receptorových či nereceptorových) a ich príslušných signálnych dráh, je významným cieľom protinádorovej terapie. Na receptorové PTK je možné zacieliť dvoma spôsobmi. Prvou z možností sú monoklonálne protilátky, ktoré bránia ligandu naviazať sa, vďaka čomu nedôjde k aktivácii signalizačnej dráhy. Druhým, spoločným spôsobom, sú inhibítory tyrozínkináz, ktoré pôsobia na tyrozínkinázovú doménu, a tak inhibujú transdukciu signálu (Obr. 8) (Jiao et al. 2018, Regad 2015).



Obr. 8 Dva spôsoby inhibície funkcie receptorových tyrozínkináz – monoklonálne protilátky aj TKI zabraňujú signálovej transdukcií (prevzaté z Regad 2015)

Mechanizmus účinku inhibítorov tyrozínkináz spočíva v konkurencii s ATP o väzbové miesto, čím sa redukuje fosforylácia tyrozínkinázy a v konečnom dôsledku aj proliferácia buniek. Takýmto pôsobením na signálne dráhy, je možné v nádorových bunkách dosiahnuť inhibíciu angiogenézy, opravy a delenia buniek, či indukciu apoptózy. Je to značne selektívna reakcia, s nízkou mierou nežiaducich účinkov (Jiao et al. 2018, Madhusudan a Ganesan 2004).

TKI môžeme rozdeliť podľa ich primárnych cieľových miest, ako sú napríklad inhibítory VEGFR, EGFR, BCR-ABL, c-KIT, Src a mnohé ďalšie. Vyvíjané sú takisto malé molekuly, schopné inhibície viacerých signálnych dráh súčasne (EGFR a HER-2; BCL-ABL, c-KIT, PDGFR a pod.), čím sa dá docieľiť zosilneného protinádorového účinku (Jiao et al. 2018, Madhusudan a Ganesan 2004).

Problémom v terapiách pomocou TKI je vznikajúca rezistencia nádorových buniek, vyžadujúca vývoj nových stratégií a generácií inhibítorov - napríklad v kombináciách s ďalšími protilátkami. Rezistencia vzniká na základe farmakologických (liečivo sa nedostane k cieľovej štruktúre) alebo biologických mechanizmov, ktoré vyplývajú z evolučnej selekcie nádorov. Konkrétne spočíva najčastejšie v sekundárnych mutáciách, v pozmenení či aktiváciách alternatívnych signálnych dráh a vo zvýšení expresie a aktivity ABC-transportérov (Camidge et al. 2014, Huang a Fu 2015).

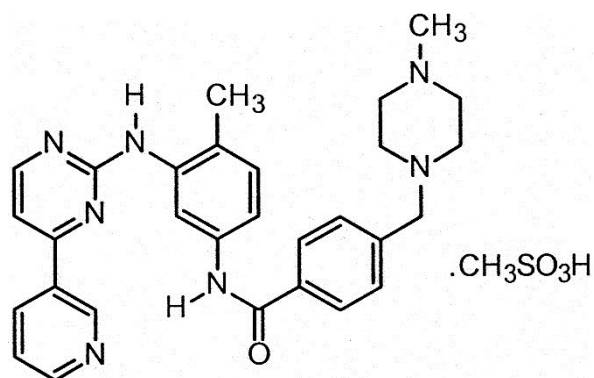
Okrem rezistencie, terapeutickú účinnosť ohrozuje aj vysoká interindividuálna variabilita reakcie na terapiu TKI. V tom takisto môžu zohrávať úlohu ABC-transportéry, ktoré sa zúčastňujú biotransformačných procesov. Veľká časť inhibítorov tyrozínkináz predstavuje vhodný substrát pre P-glykoproteín či proteín rezistencie rakoviny prsníka (BCRP, známy aj ako ABCG2). Ich inhibíciou, pri súčasnom podaní TKI, je možné zvýšiť biologickú dostupnosť a efektivitu liečby (Deng et al. 2014).

Ukázalo sa, že väčšina inhibítorov tyrozínkináz nie je len vhodným substrátom (v nižších koncentráciách), ale zároveň má schopnosť ABC efluxné transportéry inhibovať (spravidla vo vysokých koncentráciách) (Beretta et al. 2017). V klinickej praxi je pomerne bežné spoločné podanie TKI s konvenčnými cytotoxickými liečivami, kvôli ich rozdielnemu mechanizmu účinku na nádorové bunky. Zistenie, že majú aj takéto inhibičný potenciál, ešte zvyšuje opodstatnenosť tejto kombinácie – TKI dokážu do istej miery zvrátiť efluxom navodenú rezistenciu na cytostatiká. Z tohto dôvodu vyzerá byť perspektívna takisto kombinácia viacerých TKI (Brózik et al. 2011, Deng et al. 2014, Wu a Fu 2018).

Inhibícia efluxných transportérov však nie je jediným spôsobom, ktorým inhibítory tyrozínkináz účinkujú proti rezistenciám. Imatinib pôsobí proti získanej rezistencii na doxorubicin znížením up-regulácie ABC-transportéra a priamou inhibíciou jeho funkcie; súčasne indukuje zastavenie bunkového cyklu v G2/M a apoptózu. Má takisto schopnosť zvrátiť vnútornú rezistenciu, pôsobí inhibične na aktivovanú alternatívnu STAT signalizačnú dráhu v nádorových bunkách (Sims et al. 2013).

Účinok TKI na karbonylredukujúce enzýmy nie je ešte dostatočne preskúmaný. Avšak, pri štúdiu roskovitinu a purvalanolu A (inhibítory cyklín-dependentných kináz, ktoré patria spoločne s tyrozínkinázami do skupiny proteínkináz) sa zistilo, že majú schopnosť inhibovať AKR1C3, a tým potenciál zvrátiť rezistenciu na antracyklíny (Hanks a Hunter 1995, Novotná et al. 2018a). Ďalším inhibítorom cyklín-dependentných kináz, so silným inhibičným účinkom na AKR1C3, je dinaciclib (Novotná et al. 2018b). Podobne na AKR1C3 pôsobí buparlisib, inhibítor fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI3K) (Bukum et al. 2019), ktorá je súčasťou signálnej dráhy spojennej s receptorovými PTK (Liu et al. 2009). Preto je namieste zaoberať sa takisto inhibičným potenciálom TKI voči CRE.

### 2.3.1.1. IMATINIB



Obr. 9 Chemická štruktúra imatinib mesylátu (prevzaté z Cohen et al. 2002)

Chronická myeloidná leukémia (CML) je hematologickým ochorením, charakterizovaným abnormálnou proliferáciou buniek myeloidnej rady. Recipročnou translokáciou chromozómov 9 a 22 dochádza ku vzniku charakteristického Philadelphského chromozómu (Ph). Na molekulárnej úrovni je dôsledkom translokácie fúzny gén BCR-ABL, hlavný faktor v patofyziológii CML, ktorého produkt vedie ku vzniku konštitutívne aktívnej tyrozínkinázy (Druker a Lydon 2000, Laurent et al. 2001).

Revolúciu v terapii CML priniesol inhibítor tyrozínkináz imatinib (Obr. 9), dobre absorbovaný aj po perorálnom podaní. Blokuje fosforyláciu PTK, inhibuje expresiu BCR-ABL, čím eventuálne zabraňuje proliferácii zvrhnutých myeloidných buniek, exprimujúcich tento fúzny proteín. Imatinib bol schválený v roku 2001 americkým Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) na Ph+ CML so štatisticky aj klinicky lepšími výsledkami v porovnaní s terapiou interferonom  $\alpha$  a takisto s lepšou toleranciou pacientami (Jiao et al. 2018, Johnson et al. 2003, Madhusudan a Ganesan 2004).

Štandardná odporúčaná denná dávka u pacientov v chronickej fáze CML je 400 mg denne (Petzer et al. 2012). Medzi nežiaduce účinky, okrem hematologických (neutropénia, trombocytopenia) patrí bolesť brucha, hnačka, nevoľa, edémy či retencia tekutín (Kantarjian et al. 2007).

Imatinib neinhibuje len BCR-ABL, ale taktiež PDGFR a c-KIT. Mutácie v génoch PDGFR boli nájdené u niekoľkých typov nádorových ochorení - leukémií, karcinóme spinocelulárnych buniek pažeráka či multiformného glioblastómu (Madhusudan a Ganesan 2004, Regad 2015). Genetické mutácie v protoonkogéne c-KIT ako aj v PDGFR- $\alpha$  sú zase kľúčové v patogenéze gastrointestinálneho stromálneho tumoru (GIST). Aktivované tyrozínkinázy spôsobujú následne nekontrolovateľnú stimuláciu signálnych kaskád a vedú k bunkovej proliferácii rezistentnej voči apoptóze. Výrazný úžitok bol zaznamenaný u pacientov v pokročilom štádiu GIST po podaní imatinib mesylátu, pretože ako TKI je schopný selektívne inhibovať transdukciu signálu a vyvolať apoptózu buniek tumoru (Corless et al. 2005, Demetri 2002).

Účinnosť imatinibu bola skúmaná aj u pacientov s malobunkovým pľúcnym karcinómom, avšak pravdepodobne vďaka nečakane nízkej expresii KIT nádorovými bunkami, nepreukázal dostatočný účinok (Soria et al. 2003).

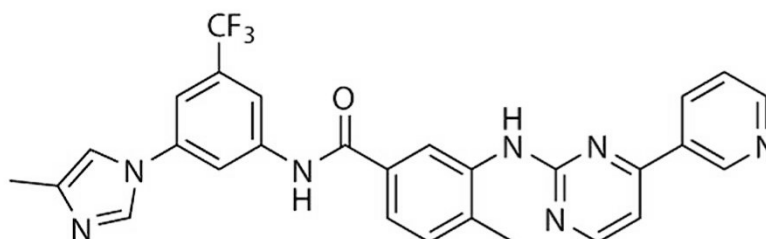
Okrem nádorových ochorení sa imatinib ukázal ako potenciálne vhodné liečivo v prípade vzácnej pľúcnej venookluzívnej choroby a pľúcneho kapilárneho hemangiómu, kde existuje len málo iných terapeutických možností (Ogawa et al. 2017).

Problémom v liečbe pomocou imatinibu je častá rezistencia. V prípade GIST sa pravdepodobne jedná o kombináciu rôznych mechanizmov, ako sú sekundárne mutácie v c-KIT a PDGFR- $\alpha$ , amplifikácia c-KIT, aktivácia iného spôsobu transdukcie signálu, nezávislého od c-KIT a PDGFR- $\alpha$  a zvýšená expresia efluxných púmp (Sleijfer et al. 2007).

U CML závisí rezistencia takisto na viacerých faktoroch – amplifikácia génu BCR-ABL, mutácia vo väzbovom mieste pre ATP alebo zvýšenie množstva ABC-transportérov, hlavne P-glykoproteínu (Illmer et al. 2004, Madhusudan a Ganesan 2004). Riešením na prekonanie rezistencie bol vývoj ďalších generácií TKI, ako sú nilotinib či dasatinib. Stále však existujú mutácie (ako T315I), ktoré sú príčinou rezistencie naprieč spektrom TKI (Drake et al. 2014).

Súčasne sa ukázalo, že imatinib a nilotinib sú schopné zvrátiť rezistenciu na paklitaxel a vinkristin, vďaka inhibícií efluxného transportéru MRP-7 (ABCC10). S doxorubicinom sa ale táto schopnosť nepotvrdila, podľa všetkého viac interaguje s inými transportérmi (P-glykoproteínom, BCRP, MRP-1) (Shen et al. 2009).

### 2.3.1.2. NILOTINIB



Obr. 10 Chemická štruktúra nilotinibu (prevzaté z Hussain et al. 2019)

Nilotinib (Obr. 10), rovnako ako imatinib, je inhibítorom tyrozínkinázy indikovaným na liečbu Ph<sup>+</sup> CML<sup>-</sup> v roku 2007 bol schválený FDA ako liečivo druhej línie u dospelých pacientov. Bol vyvinutý ako potentnejšia alternatíva pre ľudí s neznášanlivosťou alebo rezistenciou na imatinib, aktivitu preukázal aj v prípade mutácie v géne kódujúcom ABL kinázu. Tento aminopyrimidínový derivát takisto inhibuje transdukciu signálu sprostredkovanú BCR-ABL, avšak je selektívnejší k ABL kináze a viaže sa na väzbové miesto pre ATP s vyššou afinitou (Garland a Apperley 2011, Kantarjian et al. 2006, Sýkora 2009).

Podobne ako imatinib má dobrú absorpciu aj po perorálnom podaní, maximálna tolerovaná dávka bola stanovená na 600 mg dvakrát denne, avšak lepší bezpečnostný profil má odporúčaná dávka 400 mg dvakrát denne, s podobnou terapeutickou odozvou. Limitujúcim nežiaducim účinkom sa ukázala byť myelosupresia (Kantarjian et al. 2006, Sýkora 2009).



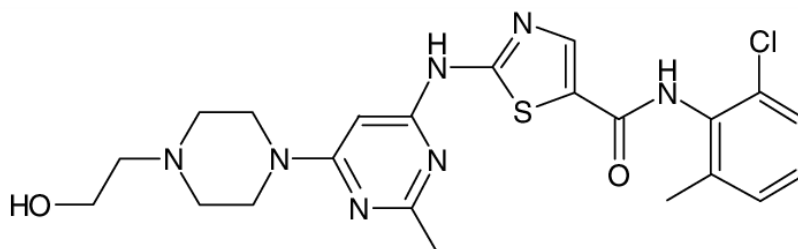
Aj keď miera rezistencie na nilotinib je v porovnaní s imatinibom nižšia, oba TKI patria medzi substráty ABC-transportérov, zvyšujúcich eflux liečiv z bunky a prispievajúcich tak čiastočne k MDR<sup>1</sup>. Skúmaním ich interakcií s ABCG2 a ABCB1 (P-glykoproteínom) sa zistilo, že sa správajú ako substráty prevažne v nižších koncentráciách. Potenciál inhibovať transportéry nadobúdajú vo vyššej koncentrácii, pričom platí, že nilotinib je významne účinnejším inhibítorom ABCB1 a ABCG2 ako imatinib (Dohse et al. 2010).

Súčasným podaním nilotinibu a doxorubicinu sa dosiahla vyššia protinádorová odpoveď, daná inhibíciou ABCG2 a ABCB1 nilotinibom. Inhibícia efluxných transportérov, v spojení s iným cytotoxickým liečivom, môže mať v organizme dvojaký účinok – zvýšenie biologickej dostupnosti po perorálnom podaní/zníženie vylučovania žlčou, a tým zvýšenie systémových hladín liečiva; a ďalej lokálne inhibičné pôsobenie nilotinibu na transportéry (Tiwari et al. 2013).

Bohužiaľ, vďaka zmenám v expresii ABC-transportérov, kombinované podanie doxorubicinu s nilotinibom ukázalo na xenografických modeloch zvýšenie hladín doxorubicinu (a jeho metabolitu doxorubicinolu) nielen v sére a tumore, ale aj v pečeni a srdci. V srdcovom tkanive bolo dokonca sledované neúmerne zvýšenie akumulácie doxorubicinolu a potencované kardiotoxické účinky, súčasne so zvýšenou expresiou CBR1 a AKR1A1 (Zhou et al. 2016).

Sledovalo sa aj pôsobenie nilotinibu na bakteriálne infekcie, konkrétne na *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, pôvodcov tuberkulózy hovädzieho dobytku. Nilotinib reguloval imunitnú reakciu hostiteľa, došlo ku degradácii mykobaktérií makrofágmi vďaka inhibícií tyrozínkinázy c-ABL a s ňou spojenou signálnej dráhy PI3k/Akt/mTOR (Hussain et al. 2019).

### 2.3.1.3. DASATINIB



Obr. 11 Chemická štruktúra dasatinibu (prevzaté z Kamath et al. 2008)

Inhibítor tyrozínkináz druhej generácie, dasatinib (Obr. 11), je takisto indikovaný u pacientov s CML Ph+ po zlyhaní predchádzajúcej terapie, a zároveň u pacientov s rezistenciou/netoleranciou predchádzajúcej liečby s ALL Ph+. Je až 325krát účinnejší ako imatinib a 16krát ako nilotinib – je jedným z najpotentnejších inhibítorov fúzneho proteínu BCR-ABL, účinnosť preukázal aj u pacientov s mutáciou v BCR-kinázovej doméne. Okrem toho inhibuje ďalšie kinázy, ako sú c-KIT, PDGF- $\beta$ , Src a kinázy efrinového receptora (Klamová 2011). Schválený FDA je od roku 2006 (Brave et al. 2008).

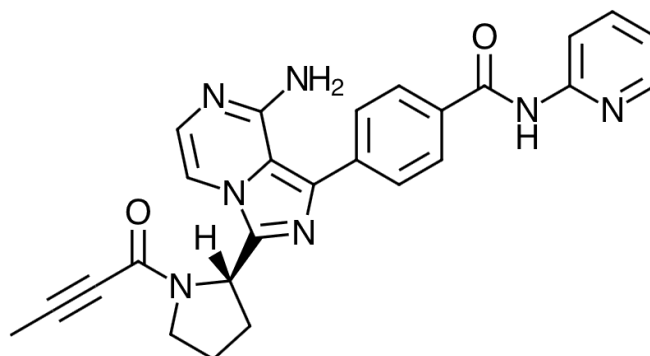
Odporúčaná dávka, v prípade chronickej fázy CML, je 100 mg jedenkrát denne. Jeho biologická dostupnosť po perorálnom podaní nie je úplná, na čom sa podieľa znížená miera absorpcie a efekt prvého prechodu pečeňou. Nežiaduce účinky sa ukázali ako tolerovateľné, dominuje takisto hematologická toxicita, z nehematologických účinkov nauzea a hnačka (Kamath et al. 2008, Klamová 2011).

Dasatinib je substrátom efluxných transportérov ABCB1 a ABCG2 (Hiwase et al. 2008). Narozdiel od nilotinibu a imatinibu, u dasatinibu sa nepreukázala významná schopnosť inhibovať tieto transportéry, a tým potenciálne ovplyvniť farmakokinetiku súčasne podávaných liečiv; no istý inhibičný potenciál bol pozorovaný vo vysokých koncentráciách (Dohse et al. 2010, Hegedús et al. 2009).

V terapii nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC) majú svoje miesto TKI inhibujúce EGFR. Častá rezistencia spočívajúca v mutácií T790M EGFR, viedla ku vývoju TKI selektívnych na túto mutáciu, avšak aj ich účinnosť je obmedzená. Spolu s mutáciou T790M, boli ako koonkogénne faktory objavené kinázy rodiny Src. Dasatinib,

ako inhibítor Src, ukázal synergický účinok s EGFR-TKI a zvýšil cytotoxickú aktivitu voči NSCLC pozitívnemu na T790M (Watanabe et al. 2017).

#### 2.3.1.4. ACALABRUTINIB



Obr. 12 Chemická štruktúra acalabrutinibu (upravené podľa Markham a Dhillon 2018)

Iný typ inhibítora tyrozínkináz predstavuje acalabrutinib. (Obr. 12) V roku 2017 bol FDA schválený na liečbu refraktérneho či relapsujúceho lymfómu plášťových buniek a v súčasnosti je v procese schvalovania na liečbu chronickej lymfocytovej leukémie (CLL). Je to inhibítor Brutonovej kinázy (BTK) druhej generácie, inhibujúci jej funkciu vďaka kovalentnej väzbe na Cys481 (Khan a O'Brien 2019).

Brutonova kináza je nereceptorovou tyrozínkinázou, patriacou do rodiny Tec. Podieľa sa na proliferácií, diferenciácií, migrácií či apoptóze B-buniek – má dôležitú úlohu v progresii B-bunkových lymfoproliferatívnych porúch. Inhibícia signálnej kaskády spojennej s týmto enzýmom preto predstavuje vhodný cieľ terapie B-bunkových malignít (Owen et al. 2019).

Acalabrutinib je potentnejším a selektívnejším TKI v porovnaní s ďalším známym inhibítorom BTK – ibrutinibom, ktorý okrem BTK vykazuje inhibičnú aktivitu aj voči ďalším kinázam (napr. EGFR, Tec), čo môže v konečnom dôsledku viesť k nežiaducim účinkom. Acalabrutinib má vo všeobecnosti lepší bezpečnostný profil, narozdiel od ibrutinibu pravdepodobne nespôsobuje dysfunkciu krvných doštičiek. Najčastejšie nežiaduce účinky po podaní sa prejavili vo forme bolesti hlavy, hnačky a prírastku hmotnosti. Dobre sa absorbuje po perorálnom podaní a optimálne dávkovanie je 100 mg dvakrát denne (Barf et al. 2017, Byrd et al. 2016).

### 3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo otestovanie inhibičného potenciálu vybraných inhibítorov tyrozínkináz, na karbonylredukujúcich enzýmoch z nadrodín AKR a SDR, schopných aktívne metabolizovať daunorubicin na daunorubicinol.

Stanovený cieľ môžeme rozdeliť na jednotlivé časti:

- Určenie a porovnanie špecifickej aktivity vybraných karbonylredukujúcich enzýmov (CBR1, CBR3, AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR7A2) voči antracyklínovému substrátu (DAU),
- Screening inhibičnej aktivity zvolených TKI (imatinibu, nilotinibu, dasatinibu a acalabrutinibu) na CRE enzýmoch aktívnych voči daunorubicinu,
- Stanovenie polovičnej maximálnej inhibičnej koncentrácie ( $IC_{50}$ ) a inhibičnej konštanty ( $K_i$ ) u inhibítora s vysokou inhibičnou aktivitou.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. MATERIÁL

#### 4.1.1. CHEMIKÁLIE

##### Chemikálie a reagensy:

Acetonitril	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
Amoniak	(Lachema, Česká republika)
Ethylacetát	(Merck KGaA, Nemecko)
Destilovaná voda	
DMSO	(MP Biomedicals, Čína)
Glukóza-6-fosfát	(Applichem, Nemecko)
Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza	(Roche Diagnostics, Nemecko)
Chlorid horečnatý hexahydrát	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
Kyselina mravčia	(Penta, Česká republika)
Methanol	(Penta, Česká republika)
NADP <sup>+</sup>	(Roche Diagnostics, Nemecko)
Sodno-fosfátový pufo Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	(Penta, Česká republika)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	

##### Substrát:

Daunorubicin hydrochlorid	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
---------------------------	--------------------------

##### Enzymy:

CBR1	2,11 mg/ml	(KBV)
CBR3	1,93 mg/ml	(KBV)
AKR1A1	1,7 mg/ml	(KBV)
AKR1B1	1,63 mg/ml	(KBV)
AKR1B10	1,61 mg/ml	(KBV)
AKR1C1	1,84 mg/ml	(KBV)
AKR1C2	1,96 mg/ml	(KBV)

AKR1C3	1,3 mg/ml	(KBV)
AKR7A2	1,13 mg/ml	(KBV)

Tieto enzýmy boli rekombinantne pripravené na Katedre biochemických vied FAF UK v HK pomocou expresného systému *E. coli*. Základným princípom prípravy je vloženie požadovaného fragmentu NK (cDNA), tzv. inzertu, do klonovacieho vektoru (plazmidu) a jeho následná ligácia, čoho výsledkom je rekombinantná molekula DNA. Ďalším krokom je prenos (transformácia) rekombinovaného vektoru do hostiteľskej bunky (*E. coli*) a replikácia prenesenej genetickej informácie (o enzýme) v bunkovej kultúre. Po kultivácii sa získaný rekombinantný proteín vyseparuje a purifikuje (Beránek 2016). K purifikácii týchto rekombinantných proteínov bola využitá afinitná chromatografia založená na interakcii iontov Ni<sup>2+</sup> s His-tagom. Všetky nami použité rekombinantné enzýmy teda obsahujú His-tag (6 histidínov). Na Katedre biochemických vied sa porovnávala aktivita týchto enzýmov s His-tagom a bez neho a nebol v nej nájdený významný rozdiel (Navrátil 2014). Samotná príprava enzýmov bola súčasťou iných diplomových prác (Košínková 2013, Lundová 2011 a ďalšie).

#### **Inhibítory:**

Acalabrutinib	(Selleck Chemicals, Nemecko)
Dasatinib	(Selleck Chemicals, Nemecko)
Imatinib	(Selleck Chemicals, Nemecko)
Nilotinib	(Selleck Chemicals, Nemecko)

#### **4.1.2. PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A POMÔCKY**

##### **Pomôcky:**

Automatické (mikro)pipety 0,5-1000 µl	(Sartorius Biohit, Fínsko)
Filtre s membránou	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
Injekčné ihly	(Braun, Česká republika)
Injekčné plastové striekačky	(Terumo, Japonsko)
Inzerty k vialkám	(Agilent Technologies, USA)
Kadičky	
Kopistky	
Mikroskúmavky	(Eppendorf, Nemecko)

Nádoba s ľadom	
Navařovacie lodičky	
Odmerné valce	
Parafilm	(Bemis, USA)
Pipetovacie špičky	(Santorius Biohit, Fínsko)
Rukavice	(Vulkan Medical, Česká republika)
Septá do vialiek	(Agilent Technologies, USA)
Sklenené vialky	(Agilent Technologies, USA)
Stojan na skúmavky	
Stopky	
Viečka na vialky	(Agilent Technologies, USA)

### **Prístroje:**

Analytické váhy Scaltec SBC22	(Scaltec, USA)
Centrifúga MiniSpin plus	(Eppendorf, Nemecko)
Koncentrátor vákuový Concentrator plus	(Eppendorf, Nemecko)
Prístroj na výrobu ľadu Scotsman AF80	(Scotsman, UK)
Termomixér Thermomixer compact	(Eppendorf, Nemecko)
Trepačka IKA Vortex Genius 3	(IKA, Nemecko)
UHPLC Agilent 1290 Series	(Agilent Technologies, USA)
Ultrazvuková čistička ACV613T	(Activ, Poľsko)

## **4.2. METODIKA**

### **4.2.1. PRÍPRAVA ROZTOKOV**

#### **4.2.1.1. Príprava enzýmov**

Z rekombinantne pripravených CRE enzýmov, uchovávaných v mrazničke (enzýmy a koncentrácie ich zásobných roztokov uvedenné v 4.1.1.), bolo potrebné nariadením získať požadovanú pracovnú koncentráciu roztoku. Na riedenie enzýmov bol použitý sodno-fosfátový pufor (0,1M; pH 7,4).

Pri porovnávaní aktivity enzýmov voči DAU ako substrátu, bol zásobný roztok enzýmu nariadený na koncentráciu 0,5 mg/ml. Do reakcie sa pridávalo 10  $\mu$ l takto nariadeného pracovného roztoku, čo predstavuje 5  $\mu$ g enzýmu v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi.

Pri screeningu inhibičnej aktivity acalabrutinibu, imatinibu, nilotinibu a dasatinibu bola požadovaná koncentrácia pracovného roztoku 0,1; 0,3 a 0,5 mg/ml, v závislosti na jednotlivých enzýmoch a ich aktivite, čo znamenalo 1, 3 a 5  $\mu$ g enzýmu v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi.

Pri stanovení  $IC_{50}$  a  $K_i$  inhibítora bol pripravený pracovný roztok enzýmu AKR1C3 v koncentrácií 0,15 mg/ml a vo výsledku bolo 1,5  $\mu$ g enzýmu v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi.

#### **4.2.1.2. Príprava inhibítorov**

Zásobné roztoky inhibítorov boli uchovávané v mrazničke v koncentrácií 10 mM. Na požadovanú koncentráciu pracovného roztoku boli riedené pomocou DMSO.

Pri screeningu inhibičnej aktivity bola požadovaná finálna koncentrácia inhibítorov v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. Zo zásobných roztokov boli preto pripravené ich pracovné roztoky s koncentráciou 500 a 2500  $\mu$ M a do reakčnej zmesi bolo pridané 2  $\mu$ l pracovného roztoku.

Pri stanovení  $IC_{50}$  dasatinibu bola jeho výsledná koncentrácia v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi 200; 150; 100; 50; 10; 5; 1 a 0,1  $\mu$ M. Pripravený bol teda pracovný roztok s koncentraciami 10000; 7500; 5000; 2500; 500; 250; 50 a 5  $\mu$ M, z ktorého bolo pridané 2  $\mu$ l do reakčnej zmesi.

Pri stanovení  $IC_{50}$  acalabrutinibu bola jeho výsledná koncentrácia v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi 100; 50; 10; 5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1 a 0,01  $\mu$ M. Pripravený bol pracovný roztok s koncentraciami 5000; 2500; 500; 250; 50; 37,5; 25; 12,5; 5 a 0,5  $\mu$ M, z ktorého bolo pridané 2  $\mu$ l do reakčnej zmesi.

Pri stanovení  $K_i$  acalabrutinibu bola jeho výsledná koncentrácia v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 1  $\mu$ M. Pripravený bol teda pracovný roztok s koncentraciami 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M a 50  $\mu$ M, z ktorého bolo pridané 2  $\mu$ l do reakčnej zmesi.



#### 4.2.1.3. Príprava substrátu

Substrátom vo všetkých reakciách bol daunorubicin hydrochlorid.

Roztok s požadovanou koncentráciou 5 mM bol pripravený rozpustením príslušného množstva navážky práškovaného DAU v destilovanej vode (na 1,27 mg DAU 450  $\mu$ l vody). Z tohto roztoku bolo do 100  $\mu$ l reakčnej zmesi následne pridané 10  $\mu$ l, výsledná koncentrácia DAU teda bola 500  $\mu$ M.

Len pri stanovení  $K_i$  inhibítora bolo potrebné substrát nariediť na koncentrácie 20 000, 10 000, 8000, 6000, 4000 a 2000  $\mu$ M, pričom výsledné koncentrácie DAU v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi boli 2000, 1000, 800, 600, 400 a 200  $\mu$ M.

#### 4.2.1.4. Príprava NADPH-regeneračného systému

NADPH-regeneračný systém (NRS), zložený z  $\text{NADP}^+$ , glukóza-6-fosfátdehydrogenázy a jej substrátu glukóza-6-fosfátu,  $\text{MgCl}_2$  a sodno-fosfátového pufru (Tab. 1), je významnou súčasťou reakčnej zmesi, regeneruje NADPH redukciou  $\text{NADP}^+$  na NADPH. NADPH v reakcii vystupuje ako kofaktor.

Tab. 1 Zloženie NADPH-regeneračného systému potrebného na 1 reakciu

$\text{NADP}^+$	0,2 mg
glukóza-6-fosfát	0,6 mg
$\text{MgCl}_2$ (0,1M)	10 $\mu$ l
glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (34 U)	0,5 $\mu$ l
sodno-fosfátový pufor <sup>1</sup> (0,1M; pH 7,4)	10 $\mu$ l

Roztok NRS bol pripravený pred inkubáciou v čase potreby.  $\text{NADP}^+$  a glukóza-6-fosfát boli navážené na analytických váhach a rozpustené v príslušnom množstve 0,1 M sodno-fosfátového pufru s pH 7,4. Po rozpustení bola pridaná glukóza-6-fosfátdehydrogenáza a na záver  $\text{MgCl}_2$ . Zmes bola dôkladne zhomogenizovaná. Do reakčnej zmesi bolo následne pridané 20  $\mu$ l roztoku NRS.

<sup>1</sup> **Príprava sodno-fosfátového pufru (0,1 M; 7,4 pH):** Prvý roztok, získaný rozpustením 7,16 g  $\text{Na}_2\text{HP0}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  v 200 ml vody je zmiešaný vo vhodnom pomere s druhým

roztokom, ktorý je pripravený rozpustením 3,12 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tak, aby bolo výsledné pH 7,4.

#### **4.2.1.5. Príprava mobilnej fázy na UHPLC**

Mobilná fáza, ktorú sme použili na meranie pomocou UHPLC, bola pripravená zmiešaním 0,1% kyseliny mravčej s acetonitrilom v pomere 74:26 (v/v). V prípade porovnávania aktivity CRE bol takto pripravený roztok použitý v množstve 400  $\mu\text{l}$  na rozpustenie odparených vzoriek.

#### **4.2.2. PRINCÍP REAKCIE**

Antracyklínové antibiotikum daunorubicin je NADPH-dependentnými karbonylredukujúcimi enzýmami redukované na uhlíku C-13, za vzniku sekundárneho metabolitu daunorubicinolu.

Objavenie inhibičného potenciálu vybraných inhibítorov tyrozínkináz (imatinibu, nilotinibu, dasatinibu a acalabrutinibu) voči niektorým z aktívnych CRE enzýmov, by sa odzrkadlilo v zníženom množstve vznikajúceho daunorubicinolu.

#### **4.2.3. PROCES INKUBÁCIE**

Prvým krokom, pred samotnou inkubáciou, bolo napipetovanie predpripraveného NADPH-regeneračného systému a sodno-fosfátového pufru do označených eppendorf mikroskúmaviek, ktoré boli následne prenesené do ľadu. Ďalej bol do reakčnej zmesi pridaný príslušný CRE enzým a u reakcií, v ktorých sa skúmala inhibičná aktivita, bol v tomto kroku pridaný inhibítor. Zmes bola dôkladne zhomogenizovaná. Medzičasom bol termomixér vyhriaty na 37 °C a bolo možné začať s preinkubáciou vzoriek, na ktorú bolo potrebné 10 minút.

Po uplynutí tohto času bol k jednotlivým pripraveným vzorkám pridaný substrát daunorubicin (v 30 sekundových intervaloch), ktorý naštartoval enzymatickú reakciu. Dĺžka trvania inkubácie závisela od konkrétneho enzýmu, pri väčšine z nich išlo o 30 minút, výnimku predstavoval enzým AKR1B1, ktorý bol inkubovaný s inhibítormi 120 minút. Proces inkubácie bol zastavený prídavkom 300  $\mu\text{l}$  methanolu (alebo 40  $\mu\text{l}$  26% amoniaku pri porovnávaní aktivity CRE) a uložením do ľadu aspoň na 10 minút.

Pripravené boli takisto kontrolné reakčné zmesi – bez enzýmu (nahradený pufrom), bez substrátu (nahradený destilovanou vodou) a bez inhibítora (nahradený DMSO). Presné zloženie reakčných zmesí jednotlivých stanovení bude uvedené v tabuľkách nižšie (Tab. 2, 3, 4 a 5)

Tab. 2 Zloženie jednotlivých reakčných vzoriek pri porovnaní aktivity enzýmov

	<b>Sodno- fosfátový pufo r (μl)</b>	<b>NRS (μl)</b>	<b>Enzým (μl)</b>	<b>Daunorubicin (μl)</b>
Neinhibovaná r.	60	20	10	10
Kontrola bez substrátu	60	20	10	- (10 μl voda)
Kontrola bez enzýmu	60	20	- (10 μl pufo r)	10

Reakčné zmesi s obsahom enzýmov boli pre vyššiu presnosť merané v triplikáte, kontrolné v duplikáte.

Tab. 3 Zloženie jednotlivých reakčných vzoriek pri screeningu inhibičnej aktivity TKI

	<b>Sodno- fosfátový pufo r (μl)</b>	<b>NRS (μl)</b>	<b>Inhibít or (μ)</b>	<b>Enzým (μl)</b>	<b>Daunorubicin (μl)</b>
Neinhibovaná r.	60	20	-	10	10
Kontrola bez substrátu	60	20	-	10	- (10 μl voda)
Kontrola bez enzýmu	60	20	-	- (10 μl pufo r)	10
Kontrola DMSO	58	20	2 (DMSO)	10	10
Inhibít or 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibít or 50 μM	58	20	2	10	10

Inhibované reakčné vzorky boli merané v triplikáte, kontrolné v duplikáte.

Tab. 4 Zloženie jednotlivých reakčných vzoriek pri stanovení IC<sub>50</sub> inhibítora

	<b>Sodno- fosfátový pufor (μl)</b>	<b>NRS (μl)</b>	<b>Inhibítor (μ)</b>	<b>Enzým (μl)</b>	<b>Daunorubicin (μl)</b>
Neinhibovaná r.	60	20	-	10	10
Kontrola bez substrátu	60	20	-	10	- (10 μl voda)
Kontrola bez enzýmu	60	20	-	- (10 μl pufor)	10
Kontrola DMSO	58	20	2 (DMSO)	10	10
Inhibítor 100 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 50 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 1 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 0,75 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 0,5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 0,25 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 0,1 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 0,01 μM	58	20	2	10	10

Inhibované reakčné vzorky boli merané v triplikáte, kontrolné v duplikáte.

Tab. 5 Zloženie jednotlivých reakčných vzoriek pri stanovení  $K_i$  inhibítora

	<b>Sodno- fosfátový pufor (μl)</b>	<b>NRS (μl)</b>	<b>Inhibítor (μ)</b>	<b>Enzým (μl)</b>	<b>DAU (μl)</b>
Neinhibovaná r.	60	20	-	10	10
Kontrola bez substrátu	60	20	-	10	- (10 μl voda)
Kontrola bez enzýmu	60	20	-	- (10 μl pufor)	10
Kontrola DMSO	58	20	2 (DMSO)	10	10
DAU 2000 μM					
Inhibítor 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 1 μM	58	20	2	10	10
DAU 1000 μM					
Inhibítor 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 1 μM	58	20	2	10	10
DAU 800 μM					
Inhibítor 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 1 μM	58	20	2	10	10
DAU 600 μM					
Inhibítor 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 1 μM	58	20	2	10	10
DAU 400 μM					
Inhibítor 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 1 μM	58	20	2	10	10
DAU 200 μM					
Inhibítor 10 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 5 μM	58	20	2	10	10
Inhibítor 1 μM	58	20	2	10	10

Inhibované reakčné vzorky boli merané v triplicate, kontrolné v duplicate.

#### 4.2.4. PRÍPRAVA VZORIEK NA UHPLC

Pri screeningu inhibičného účinku TKI, meraní  $IC_{50}$  a  $K_i$ , boli po zastavení reakcie metanolom a uložení do ľadu vzorky prenesené do centrifúgy, kde boli pri 13 400 rpm centrifugované 8 minút. Následne boli pomocou injekčnej striekačky s ihlou prefiltrované cez membránový filter Whatman do inzerov označených vialiek. Uzatvorením vialiek boli vzorky pripravené na analýzu pomocou UHPLC.

Alternatívnym, časovo náročnejším spôsobom, bolo zastavenie enzymatickej reakcie pridaním 26% amoniaku (40  $\mu$ l) a uložením do ľadu. Po 10 minútach sme ku vzorkám pridalí ethylacetát (1 ml) a následne 15 minút vytrepávali. Ďalším krokom bola centrifugácia 2 minúty pri 13 400 rpm a prenesenie hornej organickej vrstvy (v ktorej sa nachádzal daunorubicinol) do prázdnych eppendorf mikroskúmaviek. K spodnej vrstve bol opäť pridaný ethylacetát (1 ml) a postup extrakcie sme zopakovali. Vzorky s organickou vrstvou boli následne zakoncentrované odparením rozpúšťadla pri 30 °C v koncentrátore. K odparkom bola pridaná pripravená UHPLC mobilná fáza (400  $\mu$ l) a po pretrepaní boli ešte vložené do ultrazvuku. Z mikroskúmaviek boli prepipetované do vialiek a pripravené na UHPLC. Táto metóda bola využitá pri porovnávaní aktivít jednotlivých CRE enzýmov.

#### 4.2.5. ANALÝZA POMOCO UHPLC

Ako prístroj na UHPLC analýzu bol využitý Agilent 1290 Series, s kolónou Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 x 50 mm; 1,8  $\mu$ l) a Infinity 1290 filtrom.

Parametre merania: izokratická elúcia, prietoková rýchlosť 0,8 ml/min, teplota 40 °C, mobilná fáza 0,1% kyselina mravčia/acetonitril 74:26 (v/v), tlak 535 barov a fluorescenčný detektor (excitačná vlnová dĺžka 480 nm a emisná vlnová dĺžka 560 nm).

Prístroj bol nastavený na kvalitatívne (špecifický retenčný čas) a kvantitatívne (porovnanie plochy píku s kalibračnou krivkou) meranie metabolitu daunorubicinolu.

#### 4.2.6. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV MERANIA

Výsledkom analýzy prostredníctvom UHPLC bolo zistenie množstva metabolitu daunorubicinolu (v ng) v objeme nástreku na kolónu (5  $\mu$ l). Špecifická aktivita enzýmu, vyjadrená v nmol/mg/minbola vypočítaná nasledovne:

- hodnota získaná z UHPLC bola vynásobená koeficientom riedenia (podiel nástreku a celého objemu vzorky),  $K = 400 \mu\text{l}/5 \mu\text{l} = 80$
- tento výsledok bol prepočítaný na množstvo daunorubicinolu, ktoré vytvorí 1 mg enzýmu (vynásobenie 1000 a vydelenie koncentráciou enzýmu v reakcii)
- nasledoval prepočet ng na nmol (vydelenie výsledku predchádzajúceho kroku  $M_r$  daunorubicinolu;  $M_{r\text{DAU-ol}} = 529,54 \text{ g/mol}$ )
- posledným krokom, na získanie špecifickej aktivity, bolo vydelenie výsledku počtom minút inkubácie enzýmu

Tieto výpočty boli získané za pomoci programu Microsoft Excel 16.25.

Pri grafickom hodnotení  $IC_{50}$  (koncentrácia inhibítora znižujúca aktivitu enzýmu na polovicu) a inhibičnej konštanty  $K_i$  (konštantu charakterizujúca afinitu inhibítora k enzýmu) bol využitý program GraphPad Prism 8.2.0.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. POROVNANIE ŠPECIFICKEJ AKTIVITY VYBRANÝCH CRE VOČI DAUNORUBICINU

Špecifická aktivita enzýmov voči daunorubicinu ako substrátu, bola stanovená u karbonylredukujúcich enzýmov CBR1, CBR3, AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR7A2 z nadrodín AKR a SDR.

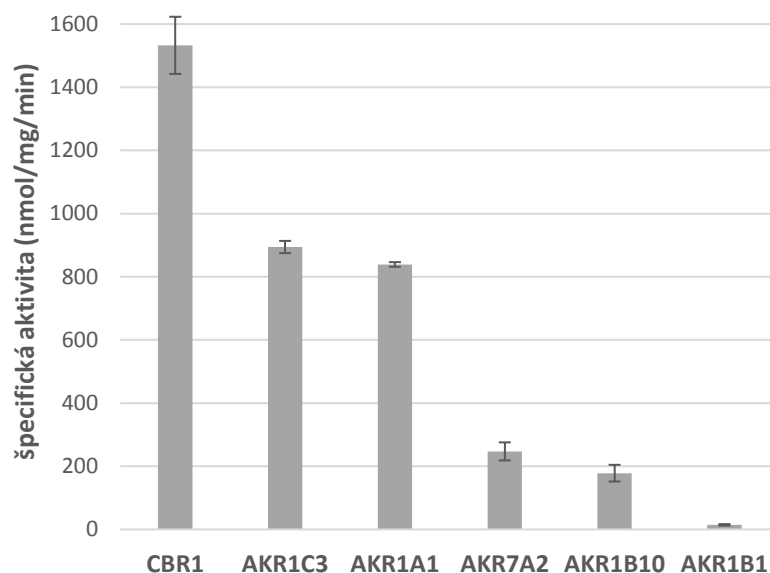
Množstvo vznikajúceho metabolitu daunorubicinolu v ng v 5  $\mu$ l nástreku, získané z analýzy vzoriek pomocou UHPLC, bolo prepočítané na špecifickú aktivitu enzýmu v nmol/mg/min. Aktivita jednotlivých enzýmov bola meraná v triplikátoch a uvádzaný je aritmetický priemer z týchto meraní (Tab. 6).

Tab. 6 Porovnanie špecifickej aktivity vybraných CRE voči DAU

ENZÝM	ŠPECIFICKÁ AKTIVITA (nmol/mg/min)
CBR1	1532,70 $\pm$ 90,48
CBR3	-
AKR1A1	838,90 $\pm$ 7,36
AKR1B1	14,47 $\pm$ 2,33
AKR1B10	178,10 $\pm$ 26,47
AKR1C1	-
AKR1C2	-
AKR1C3	894,15 $\pm$ 19,36
AKR7A2	247,08 $\pm$ 28,6



Najvyššia špecifická aktivita voči substrátu DAU bola zaznamenaná u CBR1, AKR1C3 a AKR1A1 (Obr. 13). U CBR3, AKR1C1 a AKR1C2 sa aktivita nepreukázala, preto boli tieto enzýmy vyradené z ďalšieho testovania inhibičného potenciálu imatinibu, nilotinibu, dasatinibu a acalabrutinibu.



Obr. 13 Grafické porovnanie aktivity CRE enzýmov voči DAU – CRE sú zoradené podľa klesajúcej špecifickej aktivity, neaktívne enzýmy neboli do grafu zaznamenané

## 5.2. TESTOVANIE INHIBIČNÉHO POTENCIÁLU TKI

Na enzýmoch s aktivitou voči daunorubicinu sme otestovali inhibičné vlastnosti vybraných inhibítorov tyrozínkináz – acalabrutinibu, imatinibu, nilotinibu a dasatinibu. Každý z týchto CRE enzýmov bol inkubovaný s potenciálnym inhibítorom v dvoch koncentráciách – 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. Špecifická aktivita enzýmu po pridaní inhibítora bola následne porovnávaná so špecifickou aktivitou v kontrolnej vzorke. Táto kontrolná vzorka (pokladaná za neinhibovanú reakciu s maximálnou špecifickou aktivitou) obsahovala namiesto inhibítora DMSO, ktorý slúžil na nariadenie inhibítorov a mohol by ovplyvniť samotnú enzýmovú aktivitu.

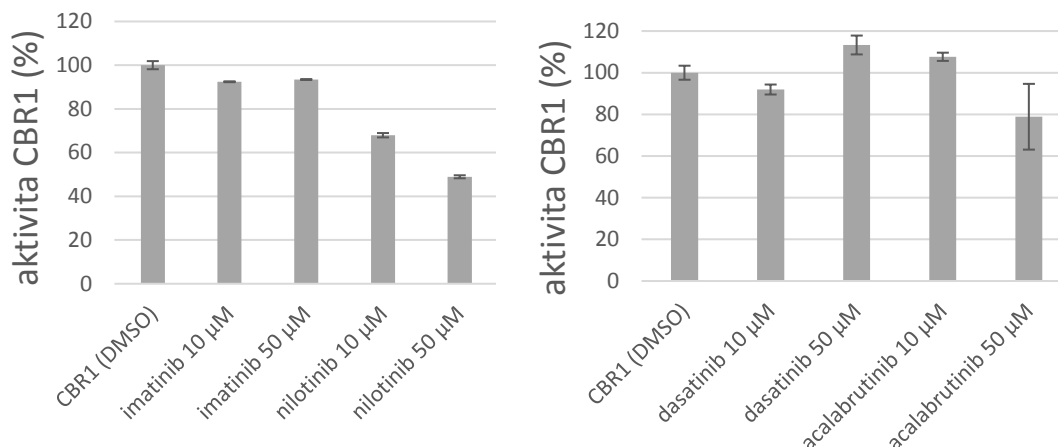
Imatinib a nilotinib boli merané spoločne v rámci jedného pokusu, preto sa odlišujú v kontrole DMSO od dasatinibu a acalabrutinibu.

### 5.2.1. CBR1

CBR1 (1 µg na 100 µl reakciu) bol preinkubovaný s inhibítormi 10 minút, následne inkubovaný s DAU 30 minút a enzymatická reakcia bola zastavená prídavkom methanolu. Meranie bolo uskutočnené v tripletoch a uvedené sú aritmetické priemery vypočítaných hodnôt špecifickej aktivity, percentuálnej aktivity a inhibície enzýmu (Tab. 7). Grafické znázornenie vplyvu inhibítorov na aktivitu CBR1 je na obrázku 14.

Tab. 7 Vplyv inhibítorov na aktivitu CBR1

<b>CBR1</b>	Špecifická aktivita v nmol/mg/min	Aktivita v %	Inhibícia v %
DMSO	2417,75 ± 45,04	100,00 ± 1,86	-
<b>IMATINIB</b>			
10 µM	2234,20 ± 4,53	92,41 ± 0,19	8
50 µM	2258,72 ± 0,97	93,42 ± 0,04	7
<b>NILOTINIB</b>			
10 µM	1642,84 ± 24,13	67,95 ± 1,00	32
50 µM	1183,31 ± 16,70	48,94 ± 0,69	51
<b>DMSO</b>			
DMSO	2362,52 ± 79,58	100,00 ± 3,37	-
<b>DASATINIB</b>			
10 µM	2171,96 ± 56,43	91,93 ± 2,39	8
50 µM	2677,02 ± 107,00	113,31 ± 4,53	-
<b>ACALABRUTINIB</b>			
10 µM	2543,11 ± 46,56	107,64 ± 1,97	-
50 µM	1863,08 ± 372,75	78,86 ± 15,78	21



Obr. 14 Grafické znázornenie účinku inhibítorov na aktivitu CBR1

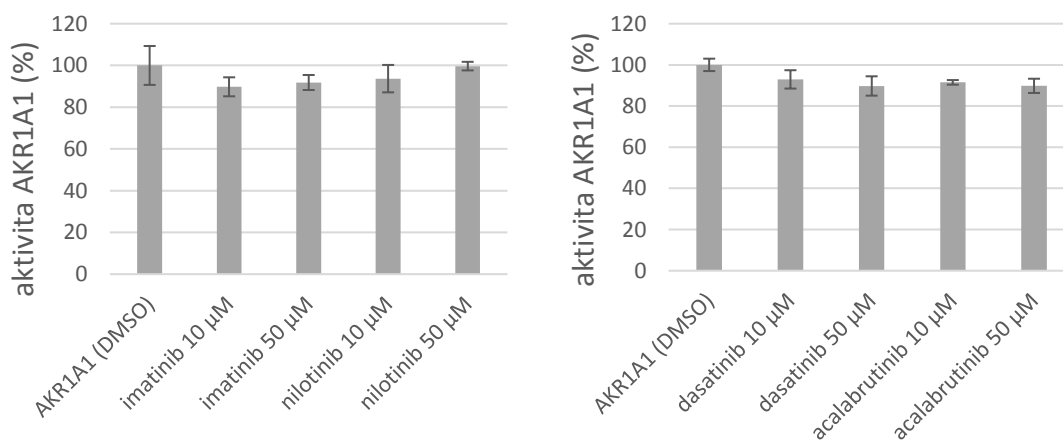
Zo skúmaných inhibítorov bola sledovaná inhibícia enzýmu CBR1 nad 30 % len u nilotinibu, ktorý v koncentrácií 10 µM znížil aktivitu CBR1 na 68,0 % a v 50 µM až na 48,9 %. U ďalších inhibítorov bola zaznamenaná len nízka inhibičná aktivita.

### 5.2.2. AKR1A1

AKR1A1 (1 µg na 100 µl reakciu) bol preinkubovaný s inhibítormi 10 minút, následne inkubovaný s DAU 30 minút a enzymatická reakcia bola zastavená prídavkom methanolu. Meranie bolo uskutočnené v tripletoch a uvedené sú aritmetické priemery vypočítaných hodnôt špecifickej aktivity, percentuálnej aktivity a inhibície enzýmu (Tab. 8). Grafické znázornenie vplyvu inhibítorov na aktivitu AKR1A1 je na obr. 15.

Tab. 8 Vplyv inhibítorov na aktivitu AKR1A1

<b>AKR1A1</b>	Špecifická aktivita v nmol/mg/min	Aktivita v %	Inhibícia v %
DMSO	1358,59 ± 126,61	100,00 ± 9,32	-
<b>IMATINIB</b>			
10 µM	1219,48 ± 61,76	89,76 ± 4,55	10
50 µM	1247,59 ± 48,86	91,83 ± 3,60	8
<b>NILOTINIB</b>			
10 µM	1272,64 ± 89,22	93,67 ± 6,57	6
50 µM	1354,22 ± 27,95	99,68 ± 2,06	-
<b>DMSO</b>			
DMSO	761,40 ± 22,90	100,00 ± 3,01	-
<b>DASATINIB</b>			
10 µM	707,61 ± 33,97	92,94 ± 4,46	7
50 µM	683,34 ± 35,81	89,75 ± 4,70	10
<b>ACALABRUTINIB</b>			
10 µM	696,68 ± 8,52	91,50 ± 1,12	9
50 µM	683,80 ± 26,31	89,81 ± 3,46	10



Obr. 15 Grafické znázornenie účinku inhibítorov na aktivitu AKR1A1

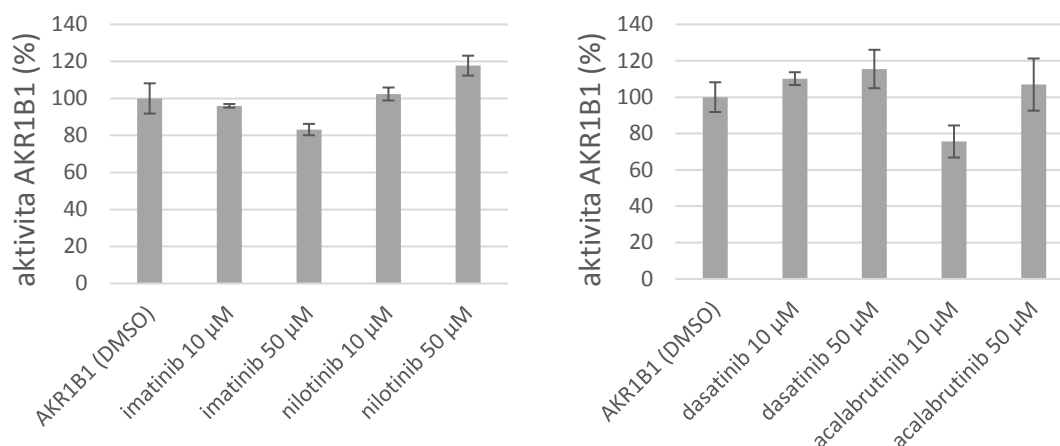
Úroveň inhibície enzýmu AKR1A1 bola veľmi nízka. Špecifickú aktivitu sa nepodarilo znížiť žiadnym z inhibítorov o viac ako 15 %.

### 5.2.3. AKR1B1

AKR1B1 (5 µg na 100 µl reakciu) bol preinkubovaný s inhibítormi 10 minút, následne inkubovaný s DAU 120 minút a enzymatická reakcia bola zastavená prídavkom methanolu. Meranie bolo uskutočnené v tripletoch a uvedené sú aritmetické priemery vypočítaných hodnôt špecifickej aktivity, percentuálnej aktivity a inhibície enzýmu (Tab. 9). Grafické znázornenie vplyvu inhibítorov na aktivitu AKR1B1 je na obr. 16.

Tab. 9 Vplyv inhibítorov na aktivitu AKR1B1

<b>AKR1B1</b>	Špecifická aktivita v nmol/mg/min	Aktivita v %	Inhibícia v %
DMSO	37,70 ± 3,28	100,00 ± 8,69	-
<b>IMATINIB</b>			
10 µM	36,20 ± 0,37	96,02 ± 0,98	4
50 µM	31,37 ± 1,16	83,20 ± 3,08	17
<b>NILOTINIB</b>			
10 µM	38,61 ± 1,32	102,42 ± 3,50	-
50 µM	44,39 ± 2,03	117,74 ± 5,38	-
<b>DMSO</b>			
DMSO	418,83 ± 34,26	100,00 ± 8,18	-
<b>DASATINIB</b>			
10 µM	461,58 ± 14,71	110,21 ± 3,51	-
50 µM	483,72 ± 44,25	115,49 ± 10,57	-
<b>ACALABRUTINIB</b>			
10 µM	316,67 ± 36,92	75,61 ± 8,82	24
50 µM	447,82 ± 60,09	106,92 ± 14,35	-



Obr. 16 Grafické znázornenie účinku inhibítorov na aktivitu AKR1B1

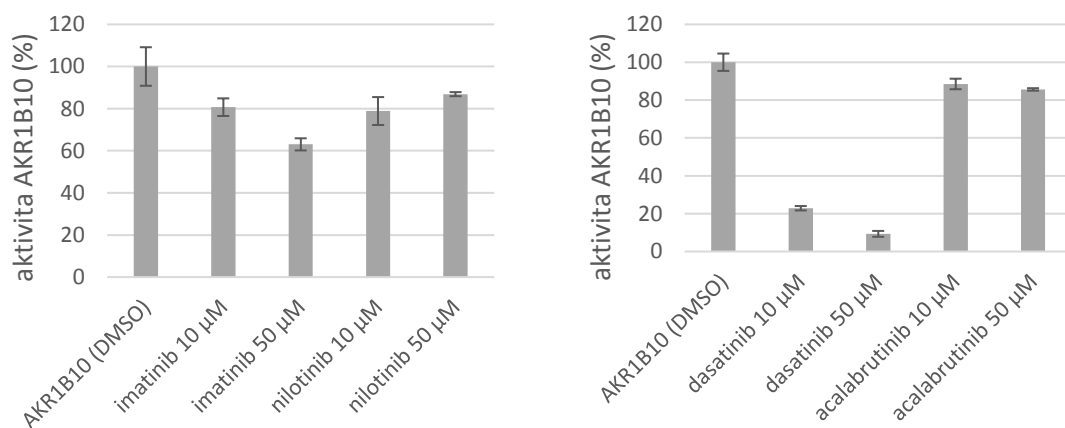
Ani v prípade AKR1B1 sme nezaznamenali zníženie aktivity niektorým z inhibítorov o viac ako 30 %. Inhibičný účinok imatinibu a acalabrutinibu neprekročil 25 %; vďaka nilotinibu a dasatinibu dokonca došlo k miernej aktivácii enzýmu.

#### 5.2.4. AKR1B10

AKR1B10 (3 µg na 100 µl reakciu) bol preinkubovaný s inhibítormi 10 minút, následne inkubovaný s DAU 30 minút a enzymatická reakcia bola zastavená prídavkom methanolu. Meranie bolo uskutočnené v tripletoch a uvedené sú aritmetické priemery vypočítaných hodnôt špecifickej aktivity, percentuálnej aktivity a inhibície enzýmu (Tab. 10). Grafické znázornenie vplyvu inhibítorov na aktivitu AKR1B10 je na obr. 17.

Tab. 10 Vplyv inhibítorov na aktivitu AKR1B10

AKR1B10	Špecifická aktivita v nmol/mg/min	Aktivita v %	Inhibícia v %
DMSO	282,31 ± 25,83	100,00 ± 9,15	-
<b>IMATINIB</b>			
10 µM	227,78 ± 11,84	80,68 ± 4,19	19
50 µM	177,93 ± 8,14	63,03 ± 2,88	37
<b>NILOTINIB</b>			
10 µM	222,88 ± 18,73	78,85 ± 6,63	21
50 µM	245,23 ± 2,72	86,87 ± 0,96	13
<b>DMSO</b>			
DMSO	172,54 ± 7,91	100,00 ± 4,58	-
<b>DASATINIB</b>			
10 µM	39,44 ± 2,00	22,86 ± 1,16	77
50 µM	16,09 ± 2,68	9,32 ± 1,55	91
<b>ACALABRUTINIB</b>			
10 µM	152,72 ± 4,79	88,51 ± 2,78	11
50 µM	147,76 ± 1,13	85,63 ± 0,65	14



Obr. 17 Grafické znázornenie účinku inhibítorov na aktivitu AKR1B10

Potentným inhibítorom AKR1B10 sa ukázal byť dasatinib – v koncentrácií 10 µM došlo ku zníženiu špecifickej aktivity na 22,9 % a v koncentrácií 50 µM na 9,3 %. Druhým najúčinnnejším bol imatinib, ktorý znížil aktivitu AKR1B10 na 80,7 % v koncentrácií 10 µM a na 63,0 % v koncentrácií 50 µM. Miera inhibície ostatných inhibítorov nepresiahla 25 %.

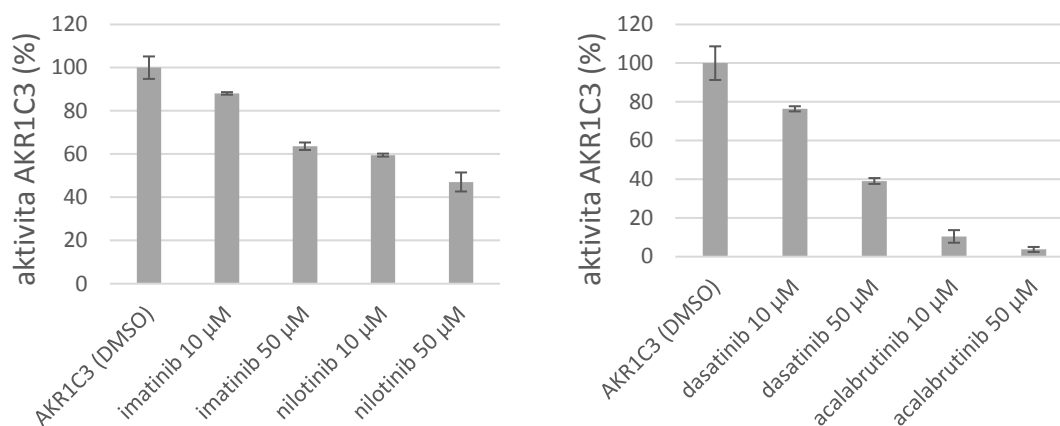
### 5.2.5. AKR1C3

AKR1C3 (1  $\mu\text{g}$  na 100  $\mu\text{l}$  reakciu) bol preinkubovaný s inhibítormi 10 minút, následne inkubovaný s DAU 30 minút a enzymatická reakcia bola zastavená prídavkom methanolu. Meranie bolo uskutočnené v tripletoch a uvedené sú aritmetické priemery vypočítaných hodnôt špecifickej aktivity, percentuálnej aktivity a inhibície enzýmu (Tab. 11). Grafické znázornenie vplyvu inhibítorov na aktivitu AKR1C3 je na obr. 18.

Tab. 11 Vplyv inhibítorov na aktivitu AKR1C3

<b>AKR1C3</b>	Špecifická aktivita v nmol/mg/min	Aktivita v %	Inhibícia v %
DMSO	1392,51 $\pm$ 72,40	100,00 $\pm$ 5,20	-
<b>IMATINIB</b>			
10 $\mu\text{M}$	1226,54 $\pm$ 8,08	88,08 $\pm$ 0,58	12
50 $\mu\text{M}$	886,05 $\pm$ 24,21	63,63 $\pm$ 1,74	36
<b>NILOTINIB</b>			
10 $\mu\text{M}$	828,90 $\pm$ 9,45	59,53 $\pm$ 0,68	40
50 $\mu\text{M}$	655,52 $\pm$ 61,21	47,08 $\pm$ 4,40	53
<b>DMSO</b>			
DMSO	611,87 $\pm$ 53,19	100,00 $\pm$ 8,69	-
<b>DASATINIB</b>			
10 $\mu\text{M}$	467,39 $\pm$ 8,15	76,39 $\pm$ 1,33	24
50 $\mu\text{M}$	239,24 $\pm$ 9,27	39,10 $\pm$ 1,52	61
<b>ACALABRUTINIB</b>			
10 $\mu\text{M}$	63,94 $\pm$ 19,92	10,45 $\pm$ 3,26	90
50 $\mu\text{M}$	22,77 $\pm$ 7,92	3,72 $\pm$ 1,29	96





Obr. 18 Grafické znázornenie účinku inhibítorov na aktivitu AKR1C3

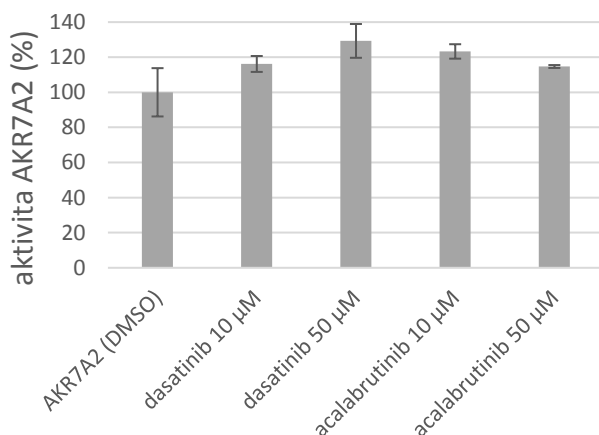
Enzým AKR1C3 bol aktívne inhibovaný všetkými testovanými TKI. Dá sa konštatovať, že najúčinnjším inhibítorom bol acalabrutinib, ktorý spôsobil zníženie aktivity v koncentrácií 10 μM na 10,5 % a v 50 μM na 3,7 %. Inhibičný účinok preukázal takisto dasatinib, v 10 μM bola aktivita znížená na 76,4 % a v koncentrácií 50 μM na 39,1 %. V 50 μM koncentrácií znížil aktivitu nilotinib na 47,1 % a imatinib na 63,3 %.

### 5.2.6. AKR7A2

AKR7A2 (3 µg na 100 µl reakciu) bol preinkubovaný s inhibítormi 10 minút, následne inkubovaný s DAU 30 minút a enzymatická reakcia bola zastavená prídavkom methanolu. Meranie bolo uskutočnené v tripletoch a uvedené sú aritmetické priemery vypočítaných hodnôt špecifickej aktivity, percentuálnej aktivity a inhibície enzýmu (Tab. 7). Grafické znázornenie vplyvu inhibítorov na aktivitu AKR7A2 je na obr. 14.

Tab. 12 Vplyv inhibítorov na aktivitu AKR7A2

<b>AKR7A2</b>	Špecifická aktivita v nmol/mg/min	Aktivita v %	Inhibícia v %
DMSO	414,32 ± 57,02	100,00 ± 13,76	-
<b>DASATINIB</b>			
10 µM	481,23 ± 18,78	116,15 ± 4,53	-
50 µM	535,66 ± 39,91	129,29 ± 9,63	-
<b>ACALABRUTINIB</b>			
10 µM	510,82 ± 17,03	123,29 ± 4,11	-
50 µM	475,27 ± 3,89	114,71 ± 0,94	-



Obr. 19 Grafické znázornenie účinku inhibítorov na aktivitu AKR7A2

Na AKR7A2 boli z dôvodu nedostatku enzýmu, otestované inhibičné účinky len u dasatinibu a acalabrutinibu. Merania s imatinibom a nilotinibom budú prevedené neskôr. Ani jeden z daných inhibítorov AKR7A2 neinhiboval, naopak sme zaznamenali zvýšenie aktivity, v prípade dasatinibu v koncentrácií 50 µM stúpla na 129,3 %.

### 5.3. STANOVENIE HODNOTY IC<sub>50</sub>

Najvyššia inhibičná aktivita bola nameraná u acalabrutinibu s AKR1C3 a u dasatinibu s AKR1C3 a takisto AKR1B10. V rámci tejto diplomovej práce sme sa ďalej zamerali na AKR1C3 a s týmto enzýmom bola stanovená IC<sub>50</sub> najúčinnějších inhibítorov.

#### DASATINIB A AKR1C3

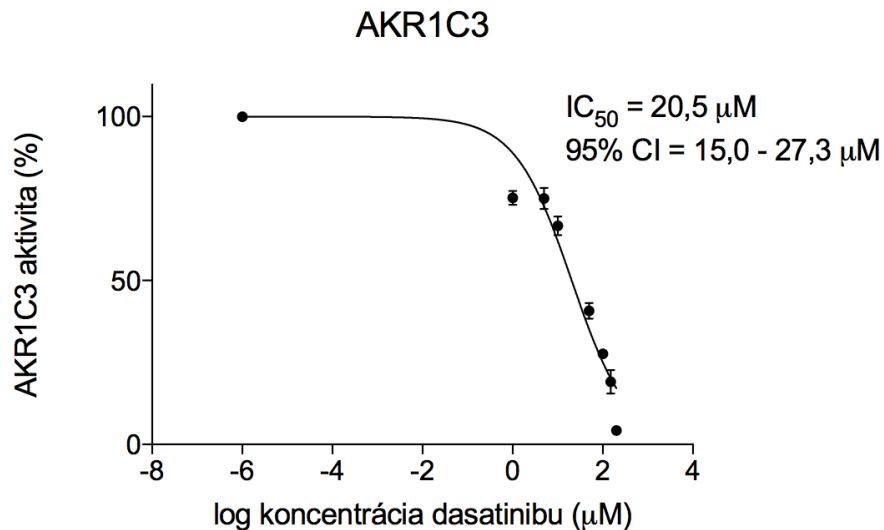
Hodnota IC<sub>50</sub> bola stanovená u dasatinibu, ktorý preukázal pomerne vysoký inhibičný potenciál na AKR1C3. Na určenie tejto hodnoty bolo potrebné zistiť, aká je špecifická aktivita AKR1C3 voči DAU v danom rozsahu koncentrácií dasatinibu (200; 150; 100; 50; 10; 5; 1 a 0,1 μM). V tabuľke 13 sú uvedené aritmetické priemery nameraných hodnôt.

Pomocou programu GraphPad Prism 8.2.0. sme získali graf závislosti špecifickej aktivity AKR1C3 na log koncentrácie dasatinibu a príslušnú hodnotu IC<sub>50</sub> (20,5 μM). CI vyjadruje konfidenčný interval (interval spoľahlivosti) (Obr. 20).

Čím nižšia je koncentrácia inhibítora, pri ktorej klesne aktivita enzýmu na 50 % (IC<sub>50</sub>), tým sa dá predpokladať jeho vyššia účinnosť voči enzýmu.

Tab. 13 Špecifická aktivita AKR1C3 vo vybranom koncentračnom rozmedzí dasatinibu

	Špecifická aktivita (mmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibícia (%)
AKR1C3	169,05 ± 43,39	-	-
DMSO	143,59 ± 2,13	100,00 ± 1,48	-
0,1 μM	108,65 ± 19,01	75,67 ± 13,24	24
1 μM	108,05 ± 3,08	75,25 ± 2,14	25
5 μM	107,73 ± 4,59	75,03 ± 3,20	25
10 μM	95,82 ± 4,08	66,73 ± 2,84	33
50 μM	58,48 ± 3,50	40,73 ± 2,44	59
100 μM	39,73 ± 2,16	27,67 ± 1,50	72
150 μM	27,45 ± 5,16	19,12 ± 3,59	81
200 μM	6,13 ± 0,21	4,27 ± 0,15	96



Obr. 20 Grafické znázornenie stanovenia  $IC_{50}$  dasatinibu na AKR1C3

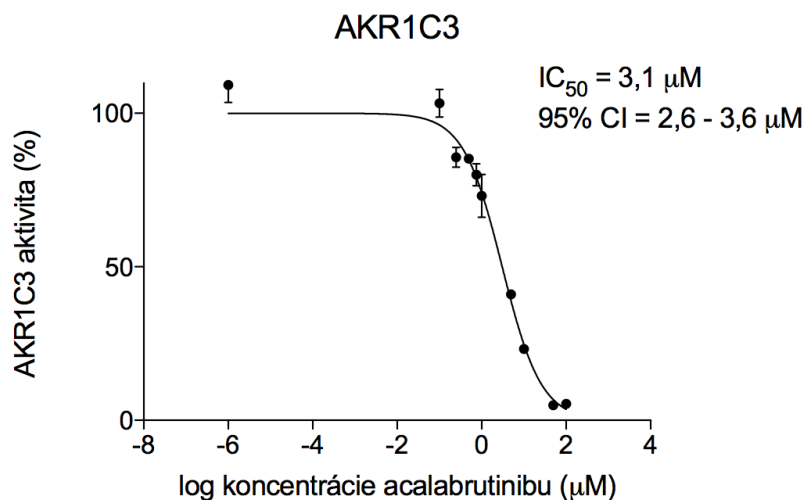
### **ACALABRUTINIB A AKR1C3**

Hodnota  $IC_{50}$  bola rovnakým postupom stanovená u acalabrutinibu s enzýmom AKR1C3. Špecifická aktivita AKR1C3 bola meraná v koncentračnom rozmedzí 100; 50; 10; 5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1 a 0,01  $\mu\text{M}$  acalabrutinibu. V tabuľke 14 sú uvedené aritmetické priemery nameraných hodnôt.

Výsledkom merania je graf závislosti špecifickej aktivity AKR1C3 na log koncentrácie acalabrutinibu a príslušná hodnota  $IC_{50}$  (3,1  $\mu\text{M}$ ). CI vyjadruje konfidenčný interval (Obr. 21).

Tab. 14 Špecifická aktivita AKR1C3 nameraná vo vybranom koncentračnom rozmedzí acalabrutinibu

	Špecifická aktivita (mmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibícia (%)
AKR1C3	224,58 ± 30,60	-	-
DMSO	156,89 ± 8,28	100,00 ± 5,28	-
0,01 μM	152,60 ± 5,11	97,27 ± 3,26	3
0,1 μM	148,30 ± 6,53	94,52 ± 4,16	5
0,25 μM	123,02 ± 4,69	78,41 ± 2,99	22
0,5 μM	122,31 ± 1,37	77,96 ± 0,87	22
0,75 μM	114,89 ± 5,13	73,23 ± 3,27	27
1 μM	105,03 ± 10,05	66,94 ± 6,41	33
5 μM	58,93 ± 1,49	37,56 ± 0,95	62
10 μM	33,43 ± 0,68	21,31 ± 0,43	79
50 μM	7,07 ± 0,15	4,63 ± 0,10	95
100 μM	7,64 ± 2,27	5,15 ± 1,45	95



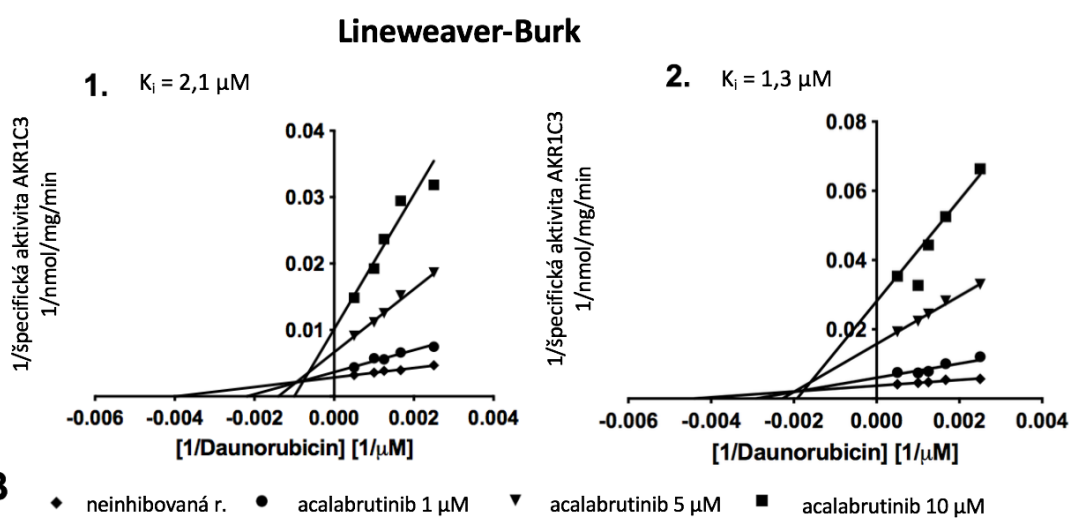
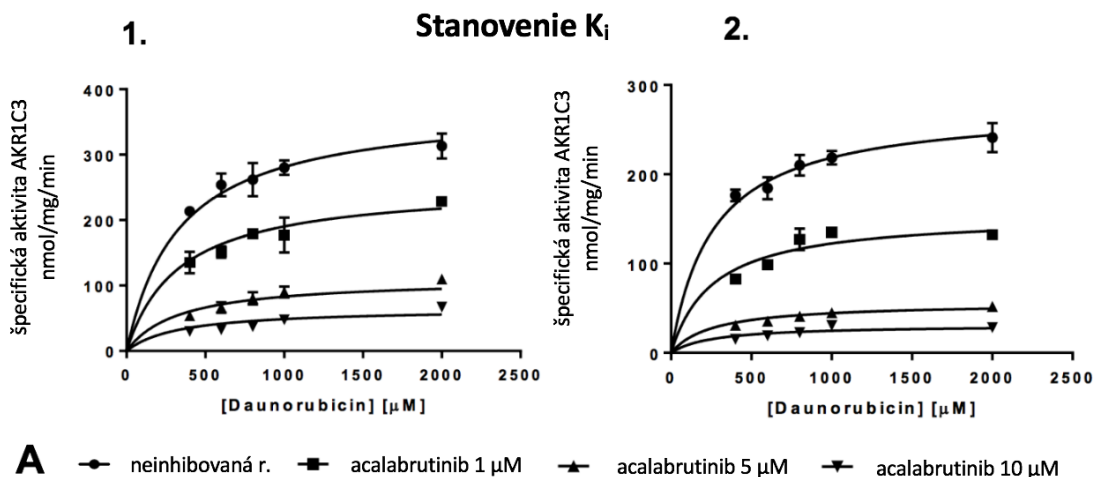
Obr. 21 Grafické znázornenie stanovenia IC<sub>50</sub> acalabrutinibu na AKR1C3

Na základe nízkej zistenej hodnoty IC<sub>50</sub> (3,1 μM), sme sa následne rozhodli s acalabrutinibom pokračovať v meraniach stanovením inhibičnej konštanty K<sub>i</sub>, ktorá nám poskytla podrobnejšie informácie o charaktere inhibície.

#### 5.4. STANOVENIE $K_i$

Stanovenie  $K_i$  acalabrutinibu s enzýmom AKR1C3 prebehlo v dvoch nezávislých meraniach. Pomocou programu GraphPad Prism 8.2.0. sme získali graf závislosti špecifickej aktivity AKR1C3 na meniacej sa koncentrácii DAU (200; 400; 600; 800; 1000 a 2000  $\mu\text{M}$ ) a acalabrutinibu (1; 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) (Obr. 22A).

Grafickým znázornením je tzv. Michaelis–Mentenovej hyperbola, ktorú je možné podľa Lineweavera a Burka previesť na priamku – výsledkom je závislosť recipročnej hodnoty špecifickej aktivity AKR1C3 na recipročnej hodnote koncentrácie DAU, pri rôznych koncentráciách acalabrutinibu (Obr. 22B). Zo smernice priamky je odvoditeľná Michaelisova konštanta ( $K_m$ , miera afinity enzýmu k substrátu) a maximálna rýchlosť reakcie ( $V_{\text{max}}$ ) – porovnaním ich zmeny medzi inhibovanou a neinhibovanou reakciou sa dá odhadnúť typ reverzibilnej inhibície (kompetitívna, nekompetitívna, akompetitívna). Získaná hodnota  $K_i$  predstavuje disociačnú konštantu komplexu enzým-inhibitor a charakterizuje relatívnu účinnosť reverzibilného inhibítora (Copeland 2000).



Obr. 22 Grafické znázornenie stanovenia  $K_i$  acalabrutinibu s enzýmom AKR1C3 – v prvom stĺpci výsledky 1. merania, v druhom stĺpci výsledky 2. merania

Napriek miernym odchýlkam medzi výsledkami prvého a druhého merania sa dá usúdiť, že v prípade acalabrutinibu dochádza ku nekompetitívnej inhibícii AKR1C3, kedy sa pridaním inhibítora znižuje  $V_{\max}$  enzýmovej reakcie, ale  $K_m$  sa nemení. Nízke hodnoty  $K_i$  (2,1  $\mu\text{M}$  a 1,3  $\mu\text{M}$ ) naznačujú vysokú afinitu acalabrutinibu k AKR1C3. Pre nekompetitívny typ reverzibilnej inhibície platí, že sa inhibítor viaže mimo aktívneho miesta a má afinitu ako k voľnému enzýmu, tak aj ku komplexu enzým-substrát. Tým, že nekompetuje so substrátom o aktívne miesto, nie je možné jednoduchým zvýšením koncentrácie substrátu znížiť inhibičný účinok (Copeland 2000).

## 6. DISKUSIA

Výsledkom dvojelektrónovej redukcie antracyklínov na uhlíku C-13 sú alkoholové metabolity, ktoré sa od pôvodného liečiva líšia v dvoch základných vlastnostiach – v kardiomyocytoch pôsobia toxickéjšie, a súčasne sú menej efektívne v nádorových bunkách (Mordente et al. 2001). Prirodzene, tento jav pre pacienta a výsledok terapie nie je priaznivý. Metabolická redukcia karbonylu v organizme je katalyzovaná cytozolickými karbonylredukujúcimi enzýmami - ich selektívna inhibícia sa preto javí ako jeden zo spôsobov minimalizovania uvedených nežiaducich účinkov (Mordente et al. 2001, Piska et al. 2017).

Aby bolo objavenie dostatočne selektívnych inhibítorov možné, je podstatné vedieť, ktoré konkrétne karbonylredukujúce enzýmy sú zodpovedné za metabolickú premenu antracyklínov. V tejto práci bola porovnávaná špecifická aktivita vybraných enzýmov z nadrodín AKR a SDR voči antracyklínu daunorubicinu. Zistili sme, že potentné v tvorbe daunorubicinolu sú CBR1, AKR1C3 a AKR1A1. Menej intenzívne prebehla premena s AKR7A2, AKR1B10 a AKR1B1. S CBR3, AKR1C1 a AKR1C2 aktivita zaznamenaná nebola.

Úlohu CBR1 v metabolizme daunorubicinu preukázal aj Gonzalez et al. (1995), keď po transfekcii CBR1 génu u K562 leukemických buniek došlo k výraznému zníženiu cytotoxického pôsobenia daunorubicinu. Podobne Carlquist et al. (2008), pri skúmaní flavonoidov, ako potenciálnych inhibítorov CBR1, charakterizoval kinetiku CBR1-katalyzovanej redukcie so substrátom daunorubicinom.

Vzťah medzi rezistenciou na daunorubicin a enzýmami AKR1C3 a AKR1C1 bol skúmaný na leukemickej bunkovej línii U937 – ich zvýšená expresia bunkami znamenala zníženie citlivosti na daunorubicin (Matsunaga et al. 2014). Rovnako Hofman et al. (2014) prišiel k záveru, že up-regulácia AKR1C3 môže vystupňovať primárnu rezistenciu nádorových buniek na daunorubicin, danú endogénnou expresiou tohto enzýmu.

Štúdia Martina et al. (2006) preukázala schopnosť ďalšej aldo-ketoreduktázy, AKR1B10, metabolizovať daunorubicin. S podobnými výsledkami prišiel Zhong et al. (2011), pričom daunorubicin a idarubicin boli AKR1B10 výrazne preferované pred doxorubicinom a epirubicinom, čo je pravdepodobne dané prítomnosťou metylovej skupiny na C-14 u DAU a IDA.



Plebuch et al. (2007) sledoval zníženie citlivosti na daunorubicin u nádorových buniek exprimujúcich enzýmy CBR1, AKR1B1 a AKR1A1. Komplexnejší pohľad na enzýmy katalyzujúce redukciu DAU a DOX priniesli takisto štúdie od Bainsa et al. (2008, 2009, 2010a, 2010b), ktoré sledovali vplyv ns-SNPs v génoch kódujúcich tieto enzýmy, na variabilnú odpoveď na liečbu antracyklínmi. Aktivita voči daunorubicinu bola sledovaná u enzýmov CBR1, AKR1C3, AKR7A2, AKR1A1 a AKR1B10; nízka u AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2 a CBR3.

Inhibítory uvedených ANT-redukujúcich enzýmov sa preto dajú považovať za potenciálne kardioprotektívne a chemosenzibilizačné liečivá. Za účelom ich objavenia bolo študovaných mnoho látok prírodného aj syntetického pôvodu (Piska et al. 2017). Z prírodných zlúčenín je dôležité spomenúť flavonoidy (Carlquist et al. 2008), bisdemethoxykurkumín, honokiol a resveratrol (Matsunaga et al. 2009) či isochinolinové alkaloidy (Škarydová et al. 2014). Príkladom syntetických látok, s inhibičným účinkom voči karbonylredukujúcim enzýmom, je tolrestat, epalrestat, zopolrestat či flufenámová kyselina (Zhang et al. 2013).

V tejto práci sme hľadali inhibítory ANT-redukujúcich enzýmov medzi inhibítormi tyrozínkináz. Zmeny vo funkcií tyrozínkináz, spojených so signalizačnými kaskádami, bývajú prítomné u viacerých nádorových ochorení (Jiao et al. 2018).

Konkrétne sme sa zamerali na štyri z nich – imatinib, nilotinib, dasatinib a acalabrutinib. Všetky tieto látky už majú využitie v klinickej praxi. Imatinib, spolu s nilotinibom a dasatinibom, sú inhibítormi fúzneho proteínu BCR-ABL (Philadelphského chromozómu) a predstavujú preto terapeutickú alternatívu rôznych Ph+ hematologických malignít (Klamová 2011). Acalabrutinib je inhibítorom Brutonovej kinázy druhej generácie a má svoje miesto v liečbe lymfómu plášťových buniek (Khan Y. a O'Brien 2019).

Imatinib a nilotinib sú predmetom ďalších výskumov aj vďaka ich schopnosti (vo vyšších koncentráciách) inhibovať ABC-transportéry (Dohse et al. 2010). Tieto efluxné transportéry sú taktiež jednou z príčin vzniku rezistencie na protinádorovú liečbu (Ozben 2006).

Existuje však málo štúdií, ktoré by sa zameriavali na inhibičný potenciál inhibítorov tyrozínkináz voči karbonylredukujúcim enzýmom. Jedným TKI, ktorý je testovaný ako potenciálne selektívny inhibítor CBR1, je analóg Src-kinázového inhibítora PP2, substituovaný hydroxylom (hydroxy-PP) (Tanaka et al. 2005). Z podobnej kategórie, kategórie inhibítorov cyklín-dependentnýchkináz, boli objavené

inhibičné účinky voči AKR1C3 u roskovitínu, purvalanolu A (Novotná et al. 2018a) a dinaciclibu (Novotná et al. 2018b). Ďalšou novoobjavenou látkou, schopnou inhibície AKR1C3, je inhibítor PI3K – buparlisib (Bukum et al. 2019).

Istú mieru inhibičnej aktivity, voči niektorému z aktívnych ANT-redukujúcich enzýmov, sme objavili u všetkých skúšaných TKI.

Dá sa konštatovať, že najčastejším cieľom inhibície bol enzým AKR1C3. Najintenzívnejšie bol inhibovaný acalabrutinibom a dasatinibom. 50% inhibíciu v koncentrácií 50  $\mu\text{M}$  sme sledovali aj u nilotinibu. Imatinib ukázal o niečo nižšiu inhibičnú aktivitu voči AKR1C3, stále však prekročila v koncentrácií 50  $\mu\text{M}$  30 %.

S AKR1C3 bola takisto stanovená hodnota  $\text{IC}_{50}$  dasatinibu (20,5  $\mu\text{M}$ ) a acalabrutinibu (3,1  $\mu\text{M}$ ). Nižšia nameraná hodnota  $\text{IC}_{50}$  acalabrutinibu poukazuje na vyššiu účinnosť inhibície enzýmu. S týmto inhibítorom sme pokračovali v ďalších kinetických meraniach a stanovili sme inhibičnú konštantu  $K_i$ . Výsledkom oboch nezávislých meraní bola nízka hodnota (2,1  $\mu\text{M}$  a 1,3  $\mu\text{M}$ ), ktorá naznačuje vysokú afinitu k AKR1C3. Zároveň sa acalabrutinib správal ako nekompetitívny inhibítor – so zvýšením koncentrácie daunorubicinu by sa nemal znížiť jeho inhibičný účinok, pretože sa viaže mimo aktívneho miesta AKR1C3, a tým pádom s DAU o toto miesto nesúťažá. Ak by nám ďalšími meraniami podarilo zistiť, že hodnota  $\text{IC}_{50}$  acalabrutinibu rastie so stúpajúcou koncentráciou AKR1C3 v reakcii, mohlo by to znamenať, že sa acalabrutinib správa ako inhibítor s pevnou väzbou („tight-binding“) (Copeland 2000).

Farmakokinetickou analýzou bola zistená maximálna koncentrácia acalabrutinibu v plazme ( $c_{\text{max}}$ ) približne 2,1  $\mu\text{M}$  (Byrd et al. 2016). To znamená, že nameranú hodnotu  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$  by bolo možné v organizme dosiahnuť.

Výsledkom zvýšenej expresie AKR1C3 bunkami nie je len nárast rezistencie a kardiotoxicity po podaní antracyklínov, ale takisto samotný enzým zohráva úlohu v patogenéze nádorových ochorení, ako je karcinóm prsníka či prostaty. Preto by objavenie selektívneho inhibítora predstavovalo veľký prínos v liečbe týchto hormón-dependentných nádorov (Penning 2015).

Dasatinib navyše aktívne inhiboval enzým AKR1B10, stanovenie  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$  bude preto predmetom ďalších meraní. Aktívny, aj keď menej (v koncentrácií 50  $\mu\text{M}$  - inhibícia 37 %), bol aj imatinib. Rovnako aj v prípade AKR1B10 je up-regulácia enzýmu sledovaná u rôznych typov nádorov a prekancerózných lézií, ako je napríklad hepatocelulárny karcinóm (Scuric et al. 1998), karcinóm z dlaždicových buniek,

nemalobunkový pľúcny karcinóm (Fukumoto et al. 2005) a karcinóm endometria (Yoshitake et al. 2007).

Jediným z vybraných TKI, ktorý inhiboval CBR1, bol nilotinib. Inhibícia v koncentrácií 50  $\mu$ M prekročila 50 %. V bunkách gastrointestinálneho tumoru prispieva zvýšená expresia CBR1 k rozvoju rezistencie na antracyklíny (Matsunaga et al. 2015). Jednou z príčin vyššej malignity v metastatických bunkách adenokarcinómu prostaty, sa naopak zdá byť strata expresie CBR1 (Ismail et al. 2000).

Na základe týchto zistení by bolo vhodné pokračovať v ďalších meraniach. To, že viaceré inhibítory tyrozínkináz preukázali schopnosť inhibície niektorého z CRE enzýmov *in vitro*, nemusí nutne znamenať úspešnú inhibíciu na úrovni bunkových línií a nakoniec *in vivo*.

## 7. ZÁVER

Dôležité miesto v liečbe rôznych druhov malignít majú antracyklíny, ktorých použitie v klinickej praxi obmedzuje primárne kardiotoxicita metabolitov, vznikajúcich redukciou karbonylu na uhlíku C-13, a následne rezistencia (Piska et al. 2017). V teoretickej časti tejto diplomovej práce boli predstavené antracyklíny ako protinádorové liečivá, mechanizmus ich účinku, kardiotoxicity a vzniku rezistencie.

Redukcia karbonylu v organizme prebieha vďaka prítomnosti karbonylredukujúcich enzýmov (Oppermann a Maser 2000). Preto sme sa ďalej venovali jednotlivým enzýmovým skupinám a ich zástupcom, pričom dôraz bol kladený na ich funkciu a súvislosť s nádorovými ochoreniami a terapiou antracyklínmi.

Inhibícia tyrozínkináz patrí v súčasnosti medzi liečebné stratégie viacerých zhubných ochorení, ktoré sú spájané s abnormálnou tyrozínkinázovou aktivitou (Jiao et al. 2018). Pozornosť bola upriamená na štyri vybrané inhibítory tyrozínkináz – imatinib, nilotinib, dasatinib a acalabrutinib, ktorých potenciálne inhibičné vlastnosti voči karbonylredukujúcim enzýmom, aktívnym voči antracyklínovému substrátu, boli skúmané v praktickej časti diplomovej práce.

Prvým cieľom experimentálnej časti bolo zistiť, ktoré z vybraných enzýmov, redukujúcich karbonylovú skupinu, majú schopnosť metabolizovať daunorubicin na daunorubicinol. Na základe porovnania špecifickej aktivity sme zistili, že aktívnymi voči daunorubicinu sú CBR1, AKR1C3, AKR1A1, AKR7A2, AKR1B10 a v malej miere AKR1B1. Žiadna alebo minimálna aktivita bola zaznamenaná u CBR3, AKR1C1 a AKR1C2. S aktívnymi enzýmami sa pokračovalo v skúmaní inhibičného potenciálu tyrozínkinázových inhibítorov *in vitro*.

Imatinibom boli najviac inhibované enzýmy AKR1B10 (37 % v 50  $\mu$ M) a AKR1C3 (36 % v 50  $\mu$ M). Nilotinib, v rovnakej koncentrácii, inhiboval AKR1C3 (53 %) a ako jediný z inhibítorov, CBR1 (51 %). Dasatinib bol inhibične účinný na AKR1B10 (91 % v 50  $\mu$ M) a AKR1C3 (61 % v 50  $\mu$ M). Posledným testovaným inhibítorom bol acalabrutinib, s inhibičnou aktivitou voči AKR1C3 (96 % v 50  $\mu$ M).

Spoločným znakom všetkých testovaných inhibítorov bola inhibícia AKR1C3. Táto aldo-ketoreduktáza patrila súčasne k enzýmom s najvyššou špecifickou aktivitou voči daunorubicinu a boli s ňou prevedené ďalšie kinetické merania -  $IC_{50}$  a  $K_i$  účinných inhibítorov. Koncentrácia inhibítora, pri ktorej klesla aktivita AKR1C3 na polovicu, bola

stanovená na 20,5  $\mu\text{M}$  u dasatinibu a 3,1  $\mu\text{M}$  u acalabrutinibu. Platí, že čím nižšia je hodnota  $\text{IC}_{50}$ , tým je účinnosť inhibítora, už od nízkych koncentrácií, vyššia. Nízke zistené hodnoty  $K_i$  acalabrutinibu (2,1  $\mu\text{M}$  a 1,3  $\mu\text{M}$ ) zase naznačujú vysokú afinitu inhibítora k enzýmu. Dôležitým zistením bolo aj to, že v prípade acalabrutinibu dochádza ku nekompetitívnej inhibícii AKR1C3. Pri tomto type inhibície by sa zvýšením koncentrácie daunorubicinu, neznížil inhibičný účinok acalabrutinibu.

Je možné povedať, že zámer tejto diplomovej práce bol splnený. Všetky testované inhibítory tyrozínkináz (s rôznou intenzitou) inhibovali niektorý z vybraných karbonylredukujúcich enzýmov, aktívnych voči daunorubicinu. Bolo by preto vhodné pokračovať s nimi v ďalších kinetických meraniach a eventuálne previesť testy na úrovni bunkových línií, čo by prinieslo bližší pohľad na charakter a účinnosť inhibície.

## 8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABC	transportér viažuci kazety ATP
ABL	Abelsonova tyrozínkináza
Ack	aktivovaná CDC42 kináza
ADH	alkoholdehydrogenáza
AKR	aldo-ketoreduktázy
Akt	proteínkináza B
ALDH	aldehyddehydrogenáza
ALL	akútna lymfocytová leukémia
AML	akútna myeloidná leukémia
AN-9	formaldehyd uvoľňujúci pivaloyloxymetylbutyrát
ANT	antracyklíny
AR	androgénový receptor
ATP	adenozíntrifosfát
BCR	(ang.) breakpoint cluster region protein, proteín zlomového miesta génu
BCRP	proteín rezistencie rakoviny prsníka
BTK	Brutonova kináza
CBR	karbonylreduktázy
c-KIT	protoonkogén c-KIT, známy aj ako SCFR (receptor rastového faktora žírnych/kmeňových buniek)
CLL	chronická lymfocytová leukémia
CML	chronická myeloidná leukémia
CRE	karbonylredukujúce enzýmy

CRPC	karcinóm prostaty rezistentný na kastráciu
Csk	c-terminálna sarkómová proteín-tyrozínkináza
DAU	daunorubicin
DOX	doxorubicin
DHO	dihydrooracin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ERBB2	Erb-B2 receptorová tyrozínkináza
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktora
EPI	epirubicin
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	kináza regulovaná extracelulárnym signálom
Fak	fokálna adhézna kináza
FDA	(ang.) Food and Drug Administration, Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (USA)
Fes	kináza mačacieho sarkómu
GABA	$\gamma$ -aminomaslová kyselina
GIST	gastrointestinálny stromálny tumor
HER-2	receptor ľudského epidermálneho rastového faktoru 2
HSD	hydroxysteroiddehydrogenáza
IC <sub>50</sub>	polovičná maximálna inhibičná koncentrácia
IDA	idarubicin
InsR	inzulínový receptor
Jak	Janusová kináza
KBV	Katedra biochemických vied
K <sub>i</sub>	inhibičná konštanta

MDR <sup>1</sup>	mnohopočetná lieková rezistencia
MDR <sup>2</sup>	(ang.) medium-chain dehydrogenases/reductases, dehydrogenázy/reduktázy so stredne dlhým reťazcom
MEK	mitogénom aktivovaná proteínkináza fosforylujúca ERK
MRP	proteín mnohopočetnej liekovej rezistencie
mTOR	(ang.) mammalian target of rapamycin, cicavčia serin-threoninkináza
NAD(H)	nikotínamidadenindinukleotid
NADP(H)	nikotínadenindinukleotidfosfát
NK	nukleová kyselina
NSAID	nesteroidné antiflogistiká
NSCLC	nemalobunkový karcinóm pľúc
ns-SNP	nesynonymický jednonukleotidový polymorfizmus
NRS	NADPH-regeneračný systém
PAH	polycyklické aromatické uhľovodíky
PG	prostaglandín
Ph	Philadelphský chromozóm
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PKC	proteínkináza C
PLC $\gamma$	fosfolipáza C izoforma $\gamma$
PPAR	receptor aktivovaný proliferátormi peroxizómov
PTEN	fosfatáza a homológ tenzínu odstránený z chromozómu 10
PTK	proteín-tyrozín kináza
QR	chinónreduktázy
RAF	špecifická serin-threonin proteínová kináza



RAS	Ras proteín (protoonkogén)
ROS	reaktívne formy kyslíka
SDR	(ang.) short-chain dehydrogenases/reductases, krátkoreťazcové dehydrogenázy/reduktázy
Src	Protoonkogénová proteín-tyrozínkináza Src
STAT	prenášač signálu a transkripčný aktivátor
Syk	slezinová tyrozínkináza
T-ALL	akútna T-lymfocytová leukémia
Tec	tyrozínkináza exprimovaná hepatocelulárnym karcinómom
TKI	inhibítor tyrozínkinázy
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
VEGFR	receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora
WHO	svetová zdravotnícka organizácia
3 $\alpha$ HP	3 $\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-20-ón
4-MDDT	4-methyl(de-dimethylamin)-tetracyklín
11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza
20 $\alpha$ DHP	20 $\alpha$ -dihydroprogesterón

## 9. LITERATÚRA

Bains O. S., Takahashi R. H., Pfeifer T. A., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2008). Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced *in vitro* metabolism of daunorubicin. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(5), 904-910. doi: 10.1124/dmd.107.018895

Bains O. S., Karkling M. J., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2009). Two non-synonymous single nucleotide polymorphisms of carbonyl reductase 1 demonstrate reduced *in vitro* metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Drug Metabolism and Disposition*, 37, 1107-1114. doi: 10.1124/dmd.108.024711

Bains O. S., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2010a). Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced *in vitro* metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3), 533-45. doi:10.1124/jpet.110.173179

Bains O. S., Karkling M.J., Lubieniecka J. M., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2010b). Naturally occurring variants of human CBR3 alter anthracycline *in vitro* metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(3), 755-763. doi: 10.1124/jpet.109.160614

Barf T., Covey T., Izumi R., Van de Kar B., Gulrajani M., Van Lith B., Van Hoek M., De Zwart E., Mittag D., Demont D., Verkaik S., Krantz F., Pearson P. G., Ulrich R. a Kaptein A. (2017). Acalabrutinib (ACP-196): A covalent bruton tyrosine kinase inhibitor with a differentiated selectivity and *in vivo* potency profile. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 363(2), 240-252. doi: 10.1124/jpet.117.242909

Barski O. A., Papusha V. Z., Ivanova M. M., Rudman D. M. a Finegold M. J. (2005). Developmental expression and function of aldehyde reductase in proximal tubules of the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289, 200-207. doi: 10.1152/ajprenal.00411.2004

Barski O. A., Tipparaju S. M., a Bhatnagar A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40(4), 553–624. doi:10.1080/03602530802431439

Beránek M. (2016). Význam klonování pro molekulárně genetické laboratoře. In: Molekulární genetika pro bioanalytiku. 1. vydanie. *Karolinum, Praha*, 58-61. ISBN 978-80-246-3224-7

Beretta G. L., Cassinelli G., Pennati M., Zuco V. a Gatti L. (2017). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 271-289. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.062

Bhatia C., Oerum S., Bray J., Kavanagh K. L., Shafqat N., Yue W. a Oppermann U. (2015). Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 114-125. doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.013

Binaschi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi C. A., Capranico G. a Animati F. (2001). Anthracyclines: selected new developments. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 1(2), 113-130. doi:10.2174/1568011013354723

Bollimpelli V. S., Dholaniya P. S. a Kondapi A. K. (2017). Topoisomerase II $\beta$  and its role in different biological contexts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 633, 78-84. doi: 10.1016/j.abb.2017.06.021

Brave M., Goodman V., Kaminskas E., Farrell A., Timmer W., Pope S., Harapanhalli R., Saber H., Morse D., Bullock J., Men A., Noory C., Ramchandani R., Kenna L., Booth B., Gobburu J., Jiang X., Sridhara R., Justice R. a Pazdur R. (2008). Sprycel for chronic myeloid leukemia and philadelphia chromosome–positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clinical Cancer Research*, 14(2), 352-359. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4175

Brózik A., Hegedüs C., Erdei Z., Hegedüs T., Özvegy-Laczka C., Szakács G. a Sarkadi B. (2011). Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ATP binding cassette multidrug transporters: substrates, chemosensitizers or inducers of acquired multidrug resistance?. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(5), 623-642. doi: 10.1517/17425255.2011.562892

Bukum N., Novotna E., Morell A., Hofman J. a Wsol V. (2019). Buparlisib is a novel inhibitor of daunorubicin reduction mediated by aldo-keto reductase 1C3. *Chemico-Biological Interactions*, 302, 101-107. doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.026

Byrd J. C., Harrington B., O'Brien S., Jones J. A., Schuh A., Devereux S., Chaves J., Wierda W. G., Awan F. T., Brown J. R., Hillmen P., Stephens M.,... a Furman R. R. (2016). Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 374, 323-332. doi: 10.1056/NEJMoa1509981

Byrns M. C., Steckelbroeck S. a Penning T. M. (2008). An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3alpha-HSD, type 5 17beta-HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies. *Biochemical pharmacology*, 75(2), 484–493. doi: 10.1016/j.bcp.2007.09.008

Byrns M. C., Duan L., Lee S. H., Blair I. A. a Penning, T. M. (2010). Aldo-keto reductase 1C3 expression in MCF-7 cells reveals roles in steroid hormone and prostaglandin metabolism that may explain its over-expression in breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3), 177–187. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.12.009

Byrns M. C., Mindnich R., Duan L. a Penning T. M. (2012). Overexpression of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) in LNCaP cells diverts androgen metabolism towards testosterone resulting in resistance to the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor finasteride. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 130(1-2), 7–15. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.12.012

Cao D., Fan S. T. a Chung S. S. (1998). Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11429-35. doi: 10.1074/jbc.273.19.11429

Camidge D. R., Pao W. a Sequist L. V. (2014). Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 11(8), 473-81. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.104

Carlquist M., Frejd T. a Gorwa-Grauslund M. F. (2008). Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 98-108. doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.021

Cohen M. H., Williams G., Johnson J. R., Duan J., Gobburu J., Rahman A., Benson K., Leighton J., Kim S. K., Wood R., Rothmann M., Chen G., U K. M., Staten A. M. a Pazdur R. (2002). Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research*, 8(5), 935-942.

Corless C. L., Schroeder A., Griffith D., Town A., McGreevey L., Harrell P., Shiraga S., Bainbridge T., Morich J. a Heinrich M. C. (2005). PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and *in vitro* sensitivity to imatinib. *Journal of Clinical Oncology*, 23(23), 5357-64. doi: 10.1200/JCO.2005.14.068

Copeland R. A. (2000). Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. 2. vydanie, *Wiley*, 397 strán.

Crosas B., Hyndman D. J., Gallego O., Martras S., Parés X., Flynn T. G., a Farrés J. (2003). Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *The Biochemical journal*, 373(3), 973–979. doi: 10.1042/BJ20021818

Cutts S. M., Swift L. P., Pillay V., Forrest R. A., Nudelman A., Rephaeli A. a Phillips R. (2007). Activation of clinically used anthracyclines by the formaldehyde-releasing prodrug pivaloyloxymethyl butyrate. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1450-1459. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0551

Demetri G. D. (2002). Identification and treatment of chemoresistant inoperable or metastatic GIST: experience with the selective tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (STI571). *European Journal of Cancer*, 38(5), S52-S59. doi: 10.1016/S0959-8049(02)80603-7

Deng J., Shao J., Markowitz J.S. a An G. (2014). ABC transporters in multi-drug resistance and ADME-tox of small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Pharmaceutical Research*, 31(9), 2237-2255. doi: 10.1007/s11095-014-1389-0

Dohse M., Scharenberg C., Shukla S., Robey R. W., Volkmann T., Deeken J. F., Brendel C., Ambudkar S. V., Neubauer A. a Bates S. E. (2010). Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 38(8), 1371–1380. doi: 10.1124/dmd.109.031302

Doorn J. A., Maser E., Blum A., Claffey D. J. a Petersen D. R. (2004). Human carbonyl reductase catalyzes reduction of 4-oxonon-2-enal. *Biochemistry*, 43(41), 13106-14. doi: 10.1021/bi049136q

Drake J. M., Lee J. K. a Witte O. N. (2014). Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 34(10), 1722–1732. doi:10.1128/MCB.01592-13

Druker B. J. a Lydon N. B. (2000). Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(1), 3–7. doi:10.1172/JCI9083

El-Kabbani O., Scammells P. J., Day T., Dhagat U., Endo S., Matsunaga T., Soda M. a Hara A. (2010). Structure-based optimization and biological evaluation of human 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) salicylic acid-based inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), 5309-5317. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.08.052

Endo S., Matsunaga T., Kitade Y., Ohno S., Tajima K., El-Kabbani O. a Hara A. (2008). Human carbonyl reductase 4 is a mitochondrial NADPH-dependent quinone reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(4), 1326-1330. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.003

Endo S., Matsunaga T., Mamiya H., Ohta C., Soda M, Kitade Y., Tajima K., Zhao H., El-Kabbani O. a Hara A. (2009). Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: Endogenous substrates and inhibition by steroids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 487(1), 1-9. doi: 10.1016/j.abb.2009.05.009

Endo S., Matsunaga T., Soda M., Tajima K., Zhao H. T., El-Kabbani O., a Hara A. (2010). Selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by anti-inflammatory *N*-phenylanthranilic acids and glycyrrhetic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(5), 886-90. doi: 10.1248/bpb.33.886

Fearnley C. J., Roderick H. L. a Bootman, M. D. (2011). Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a004242. doi: 10.1101/cshperspect.a004242

Forrest R. A., Swift L. P., Rephaeli A., Nudelman A., Kimura K., Phillips R. aCutts S. M. (2012). Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochemical Pharmacology*, 83(12), 1602-1612. doi: 10.1016/j.bcp.2012.02.026

Franco V. I., Henkel J. M., Miller T. L. a Lipshultz S. E. (2011). Cardiovascular effects in childhood cancer survivors treated with anthracyclines. *Cardiology Research and Practice*, 2011, 134679. doi: 10.4061/2011/134679

Fukumoto S., Yamauchi N., Moriguchi H., Hippo Y., ... a Aburatani H. (2005). Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 11(5), 1776-1785. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1238

- Gallego O., Ruiz F. X., Ardèvol A., Domínguez M., Alvarez R., de Lera A. R., ... a Parés X. (2007). Structural basis for the high *all-trans*-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20764–20769. doi: 10.1073/pnas.0705659105
- Garland P. a Apperley J. (2011). Nilotinib: evaluation and analysis of its role in chronic myeloid leukemia. *Future Oncology*, 7(2), 201-18. doi: 10.2217/fon.10.174
- Giantris A., Abdurrahman L., Hinkle A., Asselin B. a Lipshultz S. E. (1998). Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 27(1), 53-68. doi: 10.1016/S1040-8428(97)10007-5
- Gocek E., Moulas A. N.a Studzinski G. P. (2014). Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 51(3), 125-137. doi: 10.3109/10408363.2013.874403
- Gonzalez B., Akman S., Doroshow J., Rivera H., Kaplan W. D. a Forrest G. L. (1995). Protection against Daunorubicin Cytotoxicity by Expression of a Cloned Human Carbonyl Reductase cDNA in K562 Leukemia Cells. *Cancer Research*, 55(20), 4646-4650.
- Hahn V. S., Lenihan D. J. a Ky B. (2014). Cancer therapy-induced cardiotoxicity: basic mechanisms and potential cardioprotective therapies. *Journal of the American Heart Association*, 3(2), e000665. doi: 10.1161/JAHA.113.000665
- Hanks S. K. a Hunter T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal*, 9(8), 576-96. doi: 10.1096/fasebj.9.8.7768349
- Hegedus C., Ozvegy-Laczka C., Apáti A., Magocsi M., Nemet K., Orfi L., Keri G., Katona M., Takats Z., Varadi A., Szakacs G.a Sarkadi B. (2009). Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *British Journal of Pharmacology*, 158(4), 1153–1164. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00383.x



Hiwase D. K., Saunders V., Hewett D., Frede A., Zrim S., Dang P., Eadie L., To L. B., Melo J., Kumar S., Hughes T. P. a White D. L. (2008). Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: Therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*, 14(12), 3881-3888. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5095

Hoefer C. C., Quiñones-Lombraña A., Blair R. H. a Blanco J. G. (2016). Role of DNA methylation on the expression of the anthracycline metabolizing enzyme AKR7A2 in human heart. *Cardiovascular Toxicology*, 16(2), 182–192. doi: 10.1007/s12012-015-9327-x

Hoffmann F. a Maser E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metabolism Reviews*, 39(1), 87-144. doi: 10.1080/03602530600969440

Hofman J., Malcekova B., Skarka A., Novotna E. a Wsol V. (2014). Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3), 238-48. doi: 10.1016/j.taap.2014.04.027

Hortobágyi G. N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*, 54(4), 1-7. doi: 10.2165/00003495-199700544-00003

Hu X., Li S., Yang G., Liu H., Boden G. a Li L. (2014). Efficacy and safety of aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 9(2), e87096. doi: 10.1371/journal.pone.0087096

Huang L. a Fu L. (2015). Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 5(5), 390–401. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.001

Huang L., He R., Luo W., Zhu Y., Li J., Tan T., Zhang X., Hu Z., Luo D. (2016). Aldo-keto reductase family 1 member B10 inhibitors: Potential drugs for cancer treatment.

*Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 11(2), 184-196. doi: 2212-3970/16  
\$100.00+.00

Hussain T., Zhao D., Shah S. Z. A., Sabir N., Wang J., Liao Y., Song Y., Dong H., Mangi M. H., Ni J., Yang L. a Zhou X. (2019). Nilotinib: A tyrosine kinase inhibitor mediates resistance to intracellular mycobacterium via regulating autophagy. *Cells*, 8(5), 506. doi: 10.3390/cells8050506

Hyndman D., Bauman D. R., Heredia V. V. a Penning T. M. (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, 621-631. doi: 10.1016/S0009-2797(02)00193-X

Chang W. M., Chang Y. C., Yang Y. C., Lin S. K., Chang P. M. a Hsiao M. (2019). AKR1C1 controls cisplatin-resistance in head and neck squamous cell carcinoma through cross-talk with the STAT1/3 signaling pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 38(1), 245. doi:10.1186/s13046-019-1256-2

Illmer T., Schaich M., Platzbecker U., Freiberg-Richter J., Oelschlägel U., von Bonin M., Pursche S., Bergemann T., Ehninger G. a Schleyer E. (2004). P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia*, 18(3), 401-8. doi: 10.1038/sj.leu.2403257

Ireland L. S., Harrison D. J., Neal G. E. a Hayes J. D. (1998). Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo-keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. *The Biochemical Journal*, 332(1), 21–34. doi: 10.1042/bj3320021

Ismail E., Al-Mulla F., Tsuchida S., Suto K., Motley P., Harrison P. R. a Birnie G. D. (2000). Carbonyl reductase: A novel metastasis-modulating function. *Cancer Research*, 60(5), 1173-1176.

Jez J. M., Bennett M. J., Schlegel B. P., Lewis M., a Penning T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The Biochemical Journal*, 326(3), 625–636. doi: 10.1042/bj3260625

Jiao Q., Bi L., Ren Y., Song S., Wang Q. a Wang Y. S. (2018). Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*, 17(1), 36. doi: 10.1186/s12943-018-0801-5

Jin Y. a Penning T. M. (2007). Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 263-92. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105337

Johnson J. R., Bross P., Cohen M., Rothmann M., Chen G., Zajicek A., Gobburu J., Rahman A., Staten A. a Pazdur R. (2003). Imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clinical Cancer Research*, 9(6), 1972-1979.

Kamath A. V., Wang J., Lee F. Y. a Marathe P. H. (2008). Preclinical pharmacokinetics and *in vitro* metabolism of dasatinib (BMS-354825): A potent oral multi-targeted kinase inhibitor against SRC and BCR-ABL. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61, 365-376. doi: 10.1007/s00280-007-0478-8

Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., Bhalla K., O'Brien S., Wassmann B., Tanaka C., Manley P., Rae P., Mietlowski W., Bochinski K., Hochhaus A., Griffin J. D., Hoelzer D., Albitar M., Dugan M., Cortes J., Alland L. a Ottmann O. G. (2006). Nilotinib in imatinib-resistant CML and philadelphia chromosome-positive ALL. *The New England Journal of Medicine*, 354, 2542-2551. doi: 10.1056/NEJMoa055104

Kantarjian H., Pasquini R., Hamerschlak N., Rousselot P., Holowiecki J., Jootar S., Robak T., Khoroshko N., Masszi T., Skotnicki A., Hellmann A., Zaritsky A., Golenkov A., Radich J., Hughes T., Countouriotis A. a Shah N. (2007). Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of first-line imatinib: a randomized phase 2 trial. *Blood*, 109(12), 5143-50. doi: 10.1182/blood-2006-11-056028

Kavanagh K. L., Klimacek M., Nidetzky B. a Wilson D. K. (2002). The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from *Candida tenuis*. *Biochemistry*, 41(28), 8785-8795. doi: 10.1021/bi025786n

Kavanagh K. L., Jörnvall H., Persson B. a Oppermann U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(24), 3895–3906. doi: 10.1007/s00018-008-8588-y

Khan Y. a O'Brien S. (2019). Acalabrutinib and its use in treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncology*, 15(6), 579-589. doi: 10.2217/fon-2018-0637

Khanim F., Davies N., Veliça P., Hayden R., Ride J., Pararasa C., Chong M. G., Gunther U., Veerapen N., Winn P., Farmer R., Trivier E., Rigoreau L., Drayson M. a Bunce C. (2014). Selective AKR1C3 inhibitors do not recapitulate the anti-leukaemic activities of the pan-AKR1C inhibitor medroxyprogesterone acetate. *British Journal of Cancer*, 110(6), 1506–1516. doi: 10.1038/bjc.2014.83

Klamová H. (2011). Dasatinib - léčba nemocných s CML rezistentních na imatinib a první zkušenosti z reálné klinické praxe v ČR. *Prezentácia. 2. pražské mezioborové onkologické kolokvium*, Praha

Kořínková P. (2013). Klonování a exprese lidské AKR1A1. *Diplomová práce*. Katedra biochemických vied FAF UK, Hradec Králové, 62 strán.

Kozma E., Brown E., Ellis E. M. a Laphorn A. J. (2002). The crystal structure of rat liver AKR7A1: a dimeric member of the aldo-keto reductase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16285-16293. doi: 10.1074/jbc.M110808200

Krischer J. P., Epstein S., Cuthbertson D. D., Goorin A. M., Epstein M.L. a Lipshultz S. E. (1997). Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *Journal of Clinical Oncology*, 15(4), 1544-52. doi: 10.1200/JCO.1997.15.4.1544

Lakhman S. S., Ghosh D. a Blanco J. G. (2005). Functional significance of a natural allelic variant of human carbonyl reductase 3 (CBR3). *Drug Metabolism and Disposition*, 33(2), 254-7. doi: 10.1124/dmd.104.002006

Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H. a Kurzrock R. (2001). The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Research*, 61(6), 2343-2355.

Lewis M. J., Wiebe J. P. a Heathcote J. G. (2004). Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC cancer*, 4(27). doi: 10.1186/1471-2407-4-27

Lipshultz S. E., Lipsitz S. R., Mone S. M., Goorin A. M., Sallan S. E., Sanders S. P., Orav E. J., Gelber R. D. a Colan S. D. (1995). Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *The New England Journal of Medicine*, 332(26), 1738–43. doi: 10.1056/NEJM199506293322602

Lipshultz S. E., Alvarez J. A. a Scully R. E. (2008). Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart*, 94, 525-533. doi: 10.1136/hrt.2007.136093

Lipshultz S. E., Miller T. L., Lipsitz S. R., Neuberg D. S., Dahlberg S. E., Colan S. D., ... a Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium (2012). Continuous versus bolus infusion of doxorubicin in children with ALL: long-term cardiac outcomes. *Pediatrics*, 130(6), 1003–1011. doi: 10.1542/peds.2012-0727

Lipshultz S. E., Franco V. I., Sallan S. E., Adamson P. C., Steiner R. K., Swain S. M., Gligorov J. a Minotti G. (2014). Dexrazoxane for reducing anthracycline-related cardiotoxicity in children with cancer: An update of the evidence. *Progress in Pediatric Cardiology*, 35(1-2), 39-49. doi: 10.1016/j.ppedcard.2014.09.007

Lipshultz S. E., Franco V. I., Miller T. L., Colan S. D., a Sallan S. E. (2015). Cardiovascular disease in adult survivors of childhood cancer. *Annual review of medicine*, 66, 161–176. doi: 10.1146/annurev-med-070213-054849

Liu P., Cheng H., Roberts T. M. a Zhao J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(8), 627–644. doi: 10.1038/nrd2926

Lundová T. (2011). Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1B1. *Diplomová práce*. Katedra biochemických věd FAF UK, Hradec Králové, 63 strán.

Madhusudan S. a Ganesan T. S. (2004). Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry*, 37(7), 618-635. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.05.006

Marinello J., Delcuratolo M. a Capranico G. (2018). Anthracyclines as topoisomerase II poisons: From early studies to new perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3480. doi: 10.3390/ijms19113480

Markham A. a Dhillon S. (2018). Acalabrutinib: First global approval. *Drugs*, 78(1), 139-145. doi: 10.1007/s40265-017-0852-8

Martin H. J., Breyer-Pfaff U., Wsol V., Venz S., Block S. a Maser E. (2006). Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(4), 464-70. doi: 10.1124/dmd.105.007971

Matsunaga T., Endo S., Soda M., Zhao H. T., El-Kabbani O., Tajima K. a Hara A. (2009) Potent and selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by bisdemethoxycurcumin: Probing the active site of the enzyme with molecular modeling and site-directed mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389 (1), 128-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.107

Matsunaga T., Yamaguchi A., Morikawa Y., Kezuka C., Takazawa H., Endo S., El-Kabbani O., Tajima K., Ikari A. a Hara A. (2014). Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells. *Anticancer Drugs*, 25(8), 868-77. doi: 10.1097/CAD.0000000000000112

Matsunaga T., Kezuka C., Morikawa Y., Suzuki A., Endo S., Iguchi K., Miura T., Nishinaka T., Terada T., El-Kabbani O., Hara A. a Ikari A. (2015). Up-regulation of carbonyl reductase 1 renders development of doxorubicin resistance in human gastrointestinal cancers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 1309-1319. doi: 10.1248/bpb.b15-00176

Maser, E. (1995). Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. *Biochemical Pharmacology*, 49(4), 421-440. doi: 10.1016/0006-2952(94)00330-o

McGowan J. V., Chung R., Maulik A., Piotrowska I., Walker J. M. aYellon D. M. (2017). Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(1), 63–75. doi: 10.1007/s10557-016-6711-0

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G. a Gianni L. (2004). Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 158–229. doi: 10.1124/pr.56.2.6

Mordente A., Meucci E., Martorana G. E., Giardina B. a Minotti G. (2001). Human heart cytosolic reductases and anthracyclinecardiotoxicity. *Life*, 52, 83-88. doi: 1521-6543/01

Murata M., Ohta N., Sakurai S., Alam S., Tsai J., Kador P. F. a Sato S. (2001). The role of aldose reductase in sugar cataract formation: aldose reductase plays a key role in lens epithelial cell death (apoptosis). *Chemico-Biological Interactions*, 130-132, 617-625. doi: 10.1016/S0009-2797(00)00289-1

Navrátil V. (2014). Enzymová aktivita rekombinantních enzymů. Vliv histidinové kotvy. *Diplomová práce*. Katedra biochemických vied FAF UK, Hradec Králové, 74 strán.

Novotná E., Büküm N., Hofman J., Flaxová M., Koukliková E., Louvarová D. a Wsól V. (2018a). Roscovitine and purvalanol A effectively reverse anthracycline resistance mediated by the activity of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): A promising therapeutic

target for cancer treatment. *Biochemical Pharmacology*, 156, 22-31. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.001

Novotná E., Büküm N., Hofman J., Flaxová M., Koukliková E., Louvarová D. a Wsól V. (2018b). Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinacliclib interaction profile. *Archives of toxicology*, 92(9), 2845-2857. doi: 10.1007/s00204-018-2258-0

Ogawa A., Miyaji K. a Matsubara H. (2017). Efficacy and safety of long-term imatinib therapy for patients with pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomas. *Respiratory Medicine*, 131, 215-219. doi: 10.1016/j.rmed.2017.08.032

Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K. a Hara A. (1995). Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. *Biochemical Pharmacology*, 50, 221–227. doi: 10.1016/0006-2952(95)00124-i

Olson R. D., Mushlin P. S., Brenner D. E., Fleischer S., Cusack B. J., Chang B. K. a Boucek R. J. (1988). Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(10), 3585–3589. doi:10.1073/pnas.85.10.3585

Oppermann U. a Maser E. (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonylmetabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144, 71-81. doi: 10.1016/S0300-483X(99)00192-4

Oppermann U., Filling C. a Jörnvall H. (2001). Forms and functions of human SDR enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132, 699-705. doi: 10.1016/S0009-2797(00)00301-X

Oppermann U. (2007). Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 293-322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105316



Owen C., Berinstein N. L., Christofides A. a Sehn L. H. (2019). Review of Bruton tyrosine kinase inhibitors for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Current oncology (Toronto, Ontario)*, 26(2), 233–240. doi: 10.3747/co.26.4345

Ozben T. (2006). Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters*, 580(12), 2903-9. doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.020

Palackal N. T., Burczynski M. E., Harvey R. G. a Penning T. M. (2001). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon *trans*-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chemico-Biological Interactions*, 130-132, 815-824. doi: 10.1016/S0009-2797(00)00237-4

Pastel E., Pointud J., Volat F., Martinez A. a Lefrançois-Martinez A. (2012). Aldo-keto reductases 1B in endocrinology and metabolism. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 148. doi: 10.3389/fphar.2012.00148

Penning T. M., Burczynski M. E., Jez J. M., Hung C. F., Lin H. K., Ma H., Moore M. a Ratnam K. (2000). Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *The Biochemical Journal*, 351(1), 67–77. doi: 10.1042/0264-6021:3510067

Penning T. M., Jin Y., Steckelbroeck S., Lanišnik Rižner T. a Lewis M. (2004). Structure–function of human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215(1-2), 63-72. doi: 10.1016/j.mce.2003.11.006

Penning T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 236–246. doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.024

Persson B., Kallberg Y., Bray J. E., Bruford E., Dellaporta S. L., Favia A. D., Duarte R. G., Jörnvall H., Kallberg Y., Kavanagh K. L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning T. M., Thornton J. M., Adamski J. a Oppermann U.

(2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1-3), 94–98. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.040

Petzer A. L., Fong D., Lion T., Dyagil I., Masliak Z., Bogdanovic A., Griskevicius L., Lejniece S., Goranov S., Gercheva L., Stojanovic A., Peytchev D., Tzvetkov N., Griniute R., Stanchev A., Grubinger T., Kwakkelstein M., Schuld P., Gastl G. a Wolf D. (2012). High-dose imatinib induction followed by standard-dose maintenance in pre-treated chronic phase chronic myeloid leukemia patients--final analysis of a randomized, multicenter, phase III trial. *Haematologica*, 97(10), 1562–1569. doi: 10.3324/haematol.2011.060087

Picklo M. J., Olson S. J., Hayes J. D., Markesbery W. R. a Montine T. J. (2001). Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. *Brain Research*, 916(1-2), 229-38. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02897-9

Pilka E. S., Niesen F. H., Lee W. H., El-Hawari Y., Dunford J. E., Kochan G., Wsol V., Martin H., Maser E. a Oppermann U. (2009). Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *PloS one*, 4(10), e7113. doi: 10.1371/journal.pone.0007113

Piska K., Koczurkiewicz P., Bucki A., Wójcik-Pszczola K., Kołaczkowski M. a Pękala E. (2017). Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines - role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drugs*, 35(3), 375–385. doi: 10.1007/s10637-017-0443-2

Plebuch M., Soldan M., Hungerer C., Koch L. a Maser E. (2007). Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. *Cancer Letters*, 255(1), 49-56. doi: 10.1016/j.canlet.2007.03.018

Prickett T. D., Agrawal N. S., Wei X., Yates K. E., Lin J. C., Wunderlich J. R., Cronin J. C., Cruz P., Rosenberg S. A. a Samuels Y. (2009). Analysis of the tyrosine kinome in

melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nature Genetics*, 41(10), 1127–1132. doi: 10.1038/ng.438

Puchnerová V., Nováková Z. a Wilhelm Z. (2016). Antracykliny - kardiotoxicita a kardioprotekce - se zaměřením na mechanismus účinku. *Intervenční a akutní kardiologie*, 15(2), 102–105.

Puma N., Ruggiero A., Ridola V., Maurizi P., Lazzareschi I., Attina G., Mastrangelo S., De Rosa G. a Riccardi R. (2008). Anthracycline- related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers. *Signa Vitae*, 3(1), 30- 34. doi: 10.22514/SV31.042008.4

Quiñones-Lombraña A., Intini A. a Blanco J. G. (2019). Insights into the transcriptional regulation of the anthracycline reductase AKR7A2 in human cardiomyocytes. *Toxicology letters*, 307, 11-16. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.02.015

Ramana K. V., Chandra D., Srivastava S., Bhatnagar A., Aggarwal B. B. a Srivastava S. K. (2002). Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32063–32070. doi: 10.1074/jbc.M202126200

Rapkin A. J., Morgan M., Goldman L., Brann D. W., Simone D. a Mahesh V. B. (1997). Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Obstetrics & Gynecology*, 90(5), 709-14. doi: 10.1016/S0029-7844(97)00417-1

Reddy C. C., Swan J. S. a Hamilton G. A. (1981). Myo-inositol oxygenase from hog kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 256(16), 8510-8518.

Regad T. (2015). Targeting RTK signaling pathways in cancer. *Cancers*, 7(3), 1758–1784. doi: 10.3390/cancers7030860

Rižner T. L., Šmuc T., Ruprecht R., Šinkovec J. a Penning T. (2006). AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer.

*Molecular and Cellular Endocrinology*, 248(1-2), 126-135. doi: 10.1016/j.mce.2005.10.009

Ryberg M., Nielsen D., Cortese G., Nielsen G., Skovsgaard T. a Andersen P. K. (2008). New insight into epirubicin cardiac toxicity: Competing risks analysis of 1097 breast cancer patients. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 100(15), 1058–1067. doi: 10.1093/jnci/djn206

Salvatorelli E., Menna P., Chello M., Covino E. a Minotti G. (2018). Low-dose anthracycline and risk of heart failure in a pharmacokinetic model of human myocardium exposure: Analog specificity and role of secondary alcohol metabolites. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, 364(2), 323-331. doi: 10.1124/jpet.117.246140

Sciotti M. A., Nakajin S., Wermuth B. a Baker M. E. (2000). Mutation of threonine-241 to proline eliminates autocatalytic modification of human carbonyl reductase. *The Biochemical Journal*, 350(1), 89–92.

Scuric Z., Stain S. C., Anderson W. F. a Hwang J. J. (1998). New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 27(4), 943-50. doi: 10.1002/hep.510270408

Shen T., Kuang Y. H., Ashby C. R., Lei Y., Chen A., Zhou Y., Chen X., Tiwari A. K., Hopper-Borge E., Ouyang J. a Chen Z. S. (2009). Imatinib and nilotinib reverse multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the efflux activity of the MRP7 (ABCC10). *PloS one*, 4(10), e7520. doi: 10.1371/journal.pone.0007520

Shen Y., Zhong L., Johnson S. a Cao D. (2011). Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: A comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 192-198. doi: 10.1016/j.cbi.2011.02.004

Sheng H., Shao J., Morrow J. D., Beauchamp D. a DuBois R. N. (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 58(2), 362-366.

Schieber A., Frank R. W. a Ghisla S. (1992). Purification and properties of prostaglandin 9-ketoreductase from pig and human kidney. Identity with human carbonyl reductase. *European Journal of Biochemistry*, 206(2), 491-502. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16952.x

Sims J. T., Ganguly S. S., Bennett H., Friend J. W., Tepe J. a Plattner R. (2013). Imatinib reverses doxorubicin resistance by affecting activation of STAT3-dependent NF- $\kappa$ B and HSP27/p38/AKT pathways and by inhibiting ABCB1. *PloS one*, 8(1), e55509. doi: 10.1371/journal.pone.0055509

Sleijfer S., Wiemer E., Seynaeve C. a Verweij J. (2007). Improved insight into resistance mechanisms to imatinib in gastrointestinal stromal tumors: A basis for novel approaches and individualization of treatment. *The Oncologist*, 12(6), 719-726. doi: 10.1634/theoncologist.12-6-719

Soria J., Johnson B. E. a Le Chevalier T. (2003). Imatinib in small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 41(1), 49-53. doi: 10.1016/S0169-5002(03)00142-9

Swain S. M., Whaley F. S. a Ewer M. S. (2003). Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*, 97(11), 2869-79. doi: 10.1002/cncr.11407

Sýkora J. (2009). Nilotinib – inhibítor tyrozínkinázy na liečbu chronickej myelocytovej leukémie (CML). *Onkológia*, 4(2), 116-118.

Škarydová L., Hofman J., Chlebek J., Havránková J., Kosanová K., Skarka A., Hošťálková A., Plucha T., Cáhliková L. a Wsól V. (2014). Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 250-258. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.005

Takemura M., Endo S., Matsunaga T., Soda M., Zhao H. T., El- Kabbani O., Tajima K., Iinuma M. a Hara A. (2011). Selective inhibition of the tumor marker aldo- keto reductase family member 1B10 by oleanolic acid. *Journal of Natural Products*, 74 (5), 1201-6. doi: 10.1021/np200118q

Tanaka M., Bateman R., Rauh D., Vaisberg E., Ramachandani S., Zhang C., Hansen K. C., Burlingame A. L., Trautman J. K., Shokat K. M. a Adams C. L. (2005). An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules. *PLoS Biology*, 3(5), e128. doi: 10.1371/journal.pbio.0030128

Tebbi C., London W., Friedman D., Villaluna D., De Alarcon P., Constine L., Mendenhall N., Sposto R., Chauvenet A. a Schwartz C. (2007). Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *Journal of Clinical Oncology*, 25(5), 493-500.

Theodoulou M. a Hudis C. (2004). Cardiac profiles of liposomal anthracyclines. *Cancer*, 100, 2052-2063. doi: 10.1002/cncr.20207

Tiwari A. K., Sodani K., Dai C. L., Abuznait A. H., Singh S., Xiao Z. J., Patel A., Talele T. T., Fu L., Kaddoumi A., Gallo J. M. a Chen Z. S. (2013). Nilotinib potentiates anticancer drug sensitivity in murine ABCB1-, ABCG2-, and ABCC10-multidrug resistance xenograft models. *Cancer letters*, 328(2), 307–317. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.001

Verma K., Zang T., Penning T. M. a Trippier P. C. (2019). Potent and Highly Selective Aldo-Keto Reductase 1C3 (AKR1C3) Inhibitors act as chemotherapeutic potentiators in acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(7), 3590–3616. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00090

Voon P. J., Yap H. L., Ma C. Y., Lu F., Wong A. L., Sapari N. S., ... a Lee S. C. (2013). Correlation of aldo-ketoreductase (AKR) 1C3 genetic variant with doxorubicin pharmacodynamics in asian breast cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(6), 1497–1505. doi: 10.1111/bcp.12021

Watanabe K., Sugawara C., Ono A., Fukuzumi Y., Itakura S., Yamazaki M., Tashiro H., Osoegawa K., Soeda E. a Nomura T. (1998). Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3, and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2. *Genomics*, 52, 95–100. doi: 10.1006/geno.1998.5380

Watanabe S., Yashida T., Kawakami H., Takegawa N., Tanizaki J., Hayashi H., Takeda M., Yonesaka K., Tsurutani J. a Nakagawa K. (2017). T790M-selective EGFR-TKI combined with dasatinib as an optimal strategy for overcoming EGFR-TKI resistance in T790M-positive non–small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(11), 2563-2571. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0351

Wsól V., Szotáková B., Martin H. a Maser E. (2007). Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology*, 238(2-3), 111-118. doi: 10.1016/j.tox.2007.05.021

Wemuth B. (1981). Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(3), 1206-1213.

Wermuth B., Platts K. L., Seidel A. a Oesch F. (1986). Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochemical Pharmacology*, 35(8), 1277-1282. doi: 10.1016/0006-2952(86)90271-6

Wirth H. a Wermuth B. (1992). Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 40, 1857–1863. doi: 10.1177/40.12.1453004

Wu S. a Fu L. (2018). Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Molecular cancer*, 17(1), 25. doi: 10.1186/s12943-018-0775-3

Yoshitake H., Takahashi M., Ishikawa H., Nojima M., Iwanari H., Watanabe A., Aburatani H., Yoshida K., Ishi K., Takamori K., Ogawa H., Hamakubo T., Kodama T. a Araki Y. (2007). Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *International*

*Journal of Gynecological Cancer*, 17(6), 1300-1306. doi: 10.1111/j.1525-1438.2007.00932.x

Zhang L., Zhang H., Zhao Y., Li Z., Chen S., Zhai J., Chen Y., Xie W., Wang Z., Li Q., Zheng X. a Hu X. (2013). Inhibitor selectivity between aldo–keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: Role of Trp112 (Trp111). *FEBS Letters*, 587, 3681-3686. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.031

Zhong L., Shen H., Huang C., Jing H. a Cao D. (2011). AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 255(1), 40–47. doi: 10.1016/j.taap.2011.05.014

Zhong T., Xu F., Xu J., Liu L. a Chen Y. (2015). Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) is associated with the doxorubicin resistance in human breast cancer via PTEN Loss. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 69, 317-325. doi: 10.1016/j.biopha.2014.12.022

Zhou Z., Wan L. Yang Q., Han Y., Li D., Lu J. a Guo C. (2016). Nilotinib reverses ABCB1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance but increases cardiotoxicity of doxorubicin in a MDR xenograft model. *Toxicology Letters*, 259, 124-132. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.07.710

## **INTERNETOVÉ ZDROJE**

*Internet 1. Modes of replication* [online]. [cit. 2019-07-04]. Dostupné z: <http://biosiva.50webs.org/rep2.htm>

*Internet 2. 20th WHO model lists of essential medicines* [online]. Geneva: World Health Organization, 2017 [cit. 2019-07-04]. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273826/EML-20-eng.pdf?ua=1>