

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd



**Vplyv tyrozínkinázového inhibítora tirabrutinibu na
antracyklínovú rezistenciu v nádorovej bunkovej línii**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Konzultant : Mgr. Lucie Čermáková

PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne a pod vedením vedúceho diplomovej práce a konzultanta. Knižná literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú všetky uvedené v priloženom zozname použitej literatúry a sú v práci aj riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu rovnakého ani iného titulu.“

V Hradci Králové, dňa

Nikola Lebeková

POĎAKOVANIE

Touto cestou chcem vyjadriť poďakovanie vedúcemu diplomovej práce prof. Ing. Vladimírovi Wsólovi, Ph.D., za odborné vedenie a pomoc pri spracovávaní diplomovej práce. Taktiež chcem poďakovať mojej školiteľke Mgr. Lucii Čermákovej za cenné rady, trpezlivosť, spoluprácu a predanie skúseností počas práce v laboratóriu. V neposlednom rade patrí poďakovanie mojej najbližšej rodine a priateľovi za veľkú podporu nielen počas spisovania predkladanej práce ale počas celého môjho štúdia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Nikola Lebeková

Školiteľ: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vplyv tyrozínkinázového inhibítora tirabrutinibu na antracyklínovú rezistenciu v nádorovej bunkovej línii

Nádorové ochorenia predstavujú širokú skupinu heterogénnych ochorení, ktoré sú spôsobené zmenami na genetickej a epigenetickej úrovni. Tieto zmeny nepriaznivo ovplyvňujú bunky rôznych ľudských tkanív, a tým prispievajú k rozvoju malignít. Chemoterapia je považovaná za jeden zo základných pilierov terapie nádorových ochorení. Antracyklínové chemoterapeutiká patria medzi extenzívne používané liečivá v tejto terapii. Avšak, výrazné obmedzenie v ich používaní predstavujú nežiaduce účinky vyplývajúce z mechanizmu ich účinku. Svoju rolu v rozvoji kardiotoxicity, ako jedného z nežiaducich účinkov terapie, majú aj enzýmy redukujúce karbonyl, ktoré procesom metabolickej redukcie antracyklínov produkujú toxické redukované metabolity. Zároveň tieto metabolity vykazujú mnohonásobne nižšiu protinádorovú aktivitu, čím sa podieľajú na vzniku a vývoji rezistencie, ktorá v klinickej praxi predstavuje ďalšiu významnú prekážku.

Predmetom tejto diplomovej práce bolo štúdium inhibičného účinku vybraného tyrozínkinázového inhibítora tirabrutinibu na úrovni bunkovej línie HCT116, ktorá bola prechodne transfekovaná plazmidom kódujúcim izoformu AKR1C3. Výsledky preukázali, že tirabrutinib v koncentrácii 10 μM inhiboval aktivitu AKR1C3 z 41,17 % a pri 50 μM z 76,56 % (IC_{50} 12,01 μM). Ďalším predmetom bolo skúmanie kombinácie daunorubicínu s tirabrutinibom na rakovinovej bunkovej línii HCT116 s nadmernou expresiou AKR1C3. Z výsledkov vyplýva, že kombinácia daunorubicínu s tirabrutinibom znižuje životnosť buniek HCT116 viac ako daunorubicín samostatne. Táto skutočnosť naznačuje, že inhibičná schopnosť tirabrutinibu môže byť využitá pre obnovenie citlivosti rezistentných nádorových buniek voči daunorubicínu, a tým zvýšiť jeho terapeutickú účinnosť a súčasne znížiť produkciu toxických redukovaných metabolitov.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Nikola Lebeková

Supervisor: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of tyrosine kinase inhibitor tirabrutinib on anthracycline resistance in a cancer cell line

Malignancies represent a broad spectrum of heterogeneous diseases caused by genetic and epigenetic alterations that negatively affect various human tissues, contributing to the development of malignancy. Chemotherapy is considered one of the main pillars in the treatment of malignant diseases. Anthracycline chemotherapeutics are widely used drugs in these indications. However, adverse effects resulting from their mechanism of action are a major obstacle. The role in the development of cardiotoxicity, as one of the adverse effects of therapy, is played by carbonyl reducing enzymes that produce toxic reduced metabolites by conferring metabolic reduction of anthracyclines. At the same time, these metabolites show significantly lower cytotoxic activity, thus contributing to the formation and further development of resistance, another severe obstacle in clinical practice.

This thesis aimed to investigate the inhibitory effect of a specific tyrosine kinase inhibitor tirabrutinib at the cellular level. The HCT116 cancer cell line was transiently transfected with a plasmid encoding the enzyme AKR1C3. Results demonstrated that the 10 and 50 μM concentrations of tirabrutinib reduced the activity of AKR1C3 by 41,17 % and 76,56 % (IC_{50} 12,01 μM), respectively. In addition, the study focused on the combination of daunorubicin with tirabrutinib in the AKR1C3 overexpressing cancer cell line HCT116. It follows, that combining daunorubicin with tirabrutinib reduces the viability of HCT116 cancer cells more than daunorubicin alone. This fact suggests that the inhibitory activity of tirabrutinib can be used to resensitize resistant cancer cells to daunorubicin, increasing its therapeutic effect while reducing the production of toxic reduced metabolites.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Antracyklínové antibiotiká	9
2.1.1	Chemická štruktúra	9
2.1.2	Mechanizmus účinku	11
2.1.3	Metabolizmus	12
2.1.4	Kardiotoxicita	14
2.1.5	Rezistencia	17
2.2	Enzýmy redukujúce karbonyl	20
2.2.1	Aldo-ketoreduktázy	21
2.2.1.1	AKR1A1	24
2.2.1.2	AKR1B1	24
2.2.1.3	AKR1B10	25
2.2.1.4	AKR1C1- 1C4	26
2.2.1.5	AKR7A2	27
2.2.2	Dehydrogenázy/ reduktázy s krátkym reťazcom	29
2.2.2.1	CBR1 (SDR21C1)	29
2.3	Proteínkinázové inhibítory	31
2.3.1	Tirabrutinib	34
3	CIELE PRÁCE	36
4	MATERIÁL A METODIKA PRÁCE	37
4.1	Materiál	37
4.1.1	Chemikálie a reagensy	37
4.1.2	Bunková línia, plazmidy a inhibítory	37
4.1.3	Prístroje a pomôcky	38
4.2	Metodika	40

4.2.1	Experimenty na bunkovej línii ľudského kolorektálneho karcinómu HCT116.	40
4.2.2	Stanovenie cytotoxicity tirabrutinibu v transfekovaných bunkách HCT116.....	41
4.2.3	Inhibičné štúdie.....	42
4.2.4	Kombinačné štúdie.....	44
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	46
5.1	Určenie vplyvu tirabrutinibu na viabilitu transfekovanej bunkovej línie HCT116 ..	46
5.2	Určenie inhibičného účinku tirabrutinibu na aktivitu enzýmu AKR1C3.....	48
5.3	Kombinačné štúdie.....	53
6	ZÁVER.....	57
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	58
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	62
9	INTERNETOVÉ ZDROJE	76

1 ÚVOD

Nádorové patologické stavy predstavujú širokú skupinu heterogénnych ochorení vychádzajúcich z genetických a epigenetických zmien, ktoré ovplyvňujú bunky ľudských tkanív a spejú tak k vývoju malignity. Rakovina zodpovedá približne za $\frac{1}{3}$ celkových úmrtí a podieľa sa tak na celkovej mortalite takmer rovnakou mierou ako srdcovo-cievne ochorenia (Bhatnagar et al., 2015). Tieto ochorenia sa celosvetovo, vrátane Českej republiky, radia k jedným z najčastejších príčin úmrtia. Vzhľadom k zvyšujúcej sa úmrtnosti nádorových ochorení naberajú na dôležitosť nepretržitý výskum, vývoj a implementácia nových terapeutických prístupov (Internet 1; ReFaey et al., 2021).

Jeden zo základných prístupov v terapii nádorových ochorení je chemoterapia. Antracyklínové chemoterapeutiká tvoria skupinu extenzívne používaných liečiv v terapii mnohých typov nádorov. Ich nežiaduce účinky vyplývajúce z mechanizmu účinku predstavujú významný limit v ich používaní. V rozvoji toxicity majú svoju rolu aj enzýmy zodpovedné za metabolickú redukciu karbonylu antracyklínov. Účelom biotransformácie liečiva je jeho inaktivácia a posun v smere exkrécie z organizmu. Avšak, v niektorých prípadoch môžu byť výsledné metabolity toxickejšie, čoho príkladom sú alkoholické metabolity redukcie antracyklínov. Vznik a rozvoj rezistencie je ďalším limitujúcim faktorom v používaní týchto látok. Za vznikom redukovaných metabolitov, ktoré sú viac toxické a zároveň vykazujú signifikantne nižšiu protinádorovú aktivitu v porovnaní s pôvodnou látkou, stoja enzýmy redukujúce karbonyl. Tieto enzýmy tak predstavujú atraktívne cieľové štruktúry pre látky so schopnosťou inhibovať ich aktivitu. Viaceré štúdie sa v posledných rokoch zaoberali možným inhibičným vplyvom proteínkinázových inhibítorov na aktivitu enzýmov redukujúcich antracyklíny. Napríklad, v prípade zanubrutinibu bola preukázaná jeho schopnosť inhibovať enzymatickú aktivitu AKR1C3, čím došlo k zníženiu tvorby redukovaného hydroxymetabolitu, čo zároveň prispelo k zvráteniu rezistencie a k obnoveniu citlivosti buniek voči podávaným antracyklínom (Čermáková et al., 2022).

Táto diplomová práca mala za cieľ stanovenie možného inhibičného účinku vybraného tyrozínkinázového inhibítora tirabrutinibu (TIR) na aktivitu enzýmu redukujúceho karbonyl AKR1C3 na úrovni bunkovej línie HCT116. Súčasne sme skúmali účinok pri použití kombinácie vybraného antracyklínu daunorubicínu (DAUN) so spomínaným inhibítorom.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Antracyklínové antibiotiká

Antracyklínové antibiotiká (ANTRA) predstavujú skupinu veľmi účinných protirakovinových látok používaných v terapii širokého spektra solídnych tumorov a hematologických malignít, kde častokrát predstavujú chemoterapiu prvej voľby (Cortés-Funes & Coronado, 2007; Marinello et al., 2018). Pôvodné ANTRA sú látky prírodného charakteru prvýkrát izolované z červeného pigmentu baktérie *Streptomyces peucetius* pred viac než 70 rokmi na území Talianska (Bayles et al., 2023; Capelôa et al., 2020).

V porovnaní s ostatnými cytotoxickými činidlami majú ANTRA najširší rozsah klinického použitia a sú súčasťou adjuvantnej, neoadjuvantnej, terapeutickkej ale aj paliatívnej terapie nádorových ochorení v režime monoterapie alebo v kombinácii s inými látkami s protinádorovou aktivitou. ANTRA sú najčastejšie aplikované intravenózne v podobe kontinuálnej infúzie (Edwardson et al., 2015; Saleh et al., 2021; Sallustio & Boddy, 2021).

Farmakodynamicky sa zaradzujú k tzv. nešpecifickým konvenčným genotoxickým cytostatikám a v súvislosti s ich mechanizmom účinku sa po ich administrácii predpokladá rozvoj multiorgánovej toxicity. V prípade ANTRA sa okrem výskytu klasických nežiaducich účinkov tejto skupiny liečiv ako sú napr. nauzea, zvracanie, alopecia, myelotoxicita alebo reprodukčná toxicita vyskytuje aj pre ANTRA charakteristická toxicita- kardiotoxicita. Práve kardiotoxicita je významným limitujúcim faktorom v klinickom použití ANTRA (Švihovec et al., 2018).

K pôvodným a zároveň klinicky najpoužívanejším ANTRA patria doxorubicín (DOX) a DAUN. Následným vývojom sa z viac ako 2000 ANTRA analógov dostalo do klinického použitia iba niekoľko syntetických štruktúrnych analógov, ako sú napr. epirubicín (EPI), idarubicín (IDA), valrubicín, aklarubicín a iné (Edwardson et al., 2015; Jin & Penning, 2007; Piska et al., 2017).

2.1.1 Chemická štruktúra

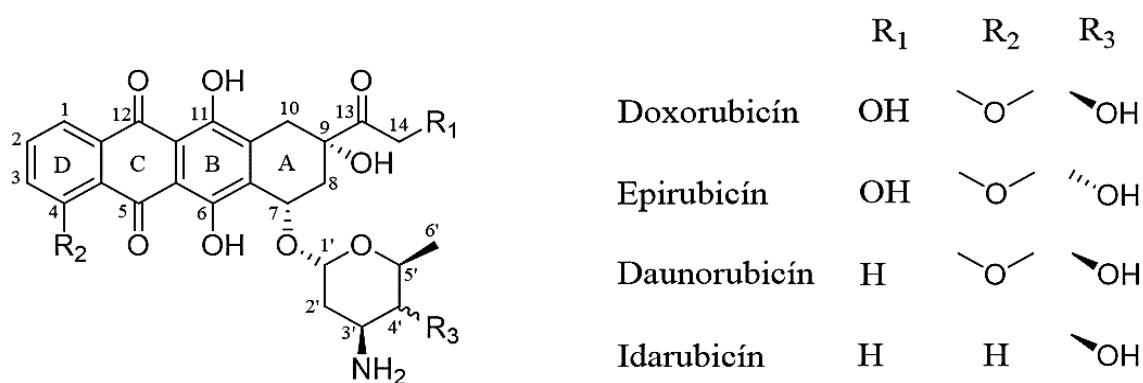
ANTRA sú si navzájom štruktúrne veľmi podobné a zdieľajú spoločný rigidný, planárny, tetracyklínových kruh, ktorý obsahuje chinónovú a hydrochinónovú skupinu. Na tento aglykón je glykozidickou väzbou v mieste C7 pripojený bazický aminocukor daunosamín. Na C13 sa nachádza karbonylová funkčná skupina a jednotlivé zlúčeniny

sa od seba líšia substitúciou na základnom kruhu, daunosamíne alebo aj v počte naviazaných cukrov, ako je to napr. u aklarubicínu (Cortés-Funes & Coronado, 2007).

Dve pôvodné ANTRA sa medzi sebou líšia iba v prítomnosti, resp. neprítomnosti jednej funkčnej skupiny (R1). DAUN vo svojej štruktúre na rozdiel od DOX neobsahuje v polohe C14 hydroxylovú skupinu –OH (Bayles et al., 2023; Piska et al., 2021).

EPI je polosyntetický derivát získaný procesom epimerizácie DOX a líši sa tak iba priestorovou orientáciou hydroxyskupiny –OH v mieste C4' na pripojenej cukrovej zložke. Aj takáto malá zmena štruktúry môže mať dopad na biologický účinok a toxicitu, čo bolo potvrdené práve u EPI, ktorý má zachovanú protinádorovú aktivitu a zároveň vykazuje menšiu kardiotoxicitu v porovnaní s DOX (Bayles et al., 2023; Cortés-Funes & Coronado, 2007; Edwardson et al., 2015).

IDA je derivát DAUN, ktorému v štruktúre v polohe C4 (R2) na základnom skelete chýba methoxyskupina –O-CH₃. Absencia tejto skupiny má za následok zvýšenie lipofily, zrýchlenú absorpciu, čo následne speje k zvýšenej cytotoxicite, v porovnaní s DAUN a DOX. Zároveň je IDA jediným ANTRA, ktorého administrácia je možná nielen intravenózne, ale aj perorálne (Edwardson et al., 2015).



Obr. 1 Chemická štruktúra vybraných ANTRA. Upravené podľa (Bayles et al., 2023; Piska et al., 2021).

2.1.2 Mechanizmus účinku

Presný mechanizmus pôsobenia ANTRA a ich štruktúrnych analógov v organizme nie je zatiaľ úplne objasnený a je v súčasnosti stále predmetom skúmania. Predpokladá sa, že na cytotoxickom účinku ANTRA sa podieľa spoločne viacero mechanizmov a ich účinok v terapii nádorových ochorení je multifaktoriálny (Shandilya et al., 2021). ANTRA prenikajú do buniek pasívnou difúziou a následne sú transportované na miesto svojho účinku, ktorým je jadro bunky (Edwardson et al., 2015). Novšie štúdie poukazujú na účasť aktívneho transportéru, presnejšie OCT1 (z ang. organic cation transporter 1) a v súčasnosti pribúdajú dôkazy, ktoré predstavujú hypotézu tohto typu transportu namiesto pasívnej difúzie (Andreev et al., 2016).

Medzi hlavné mechanizmy účinku patrí interkalácia (vmedzerenie) do deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) spolu s ich pôsobením ako enzymatické jedy topoizomerázy II (TOP2). Podiel na cytotoxickom účinku má aj ich schopnosť indukcie oxidačného stresu a tvorby reaktívnych kyslíkových foriem (ROS). Ďalšia navrhovaná teória mechanizmu účinku ANTRA je ich schopnosť tvorby aduktov DNA-ANTRA v prítomnosti formaldehydu.

Prvým popísaným mechanizmom účinku bola interkalácia do dvojzávitnice DNA, ktorá prebieha vsunutím planárneho tetracyklického chromofóru preferenčne v mieste páru bází guanín-cytozín, čo následne naruší priebeh transkripcie a translácie DNA (Cortés-Funes & Coronado, 2007; Shandilya et al., 2021).

Následne, po uplynutí 20 rokov v klinickom používaní, bol bližšie špecifikovaný ich cieľ pôsobenia, ktorým je enzým TOP2 (Cortés-Funes & Coronado, 2007). DNA topoizomerázy (TOP) sú enzýmy, zodpovedné za reguláciu topologickej štruktúry DNA, ktorá prechádza zmenami v procese replikácie, transkripcie alebo rekombinácie DNA. Tieto enzýmy dočasne vytvárajú v DNA reťazcoch zlomy, ktoré sú po úprave štruktúry znovu spojené (Den Boer et al., 1998; Okoro & Fatoki, 2023; Švihovec et al., 2018).

Ľudské TOP sú rozdelené do dvoch tried na základe ich štruktúry a funkcie na topoizomerázu I a TOP2. Topoizomeráza I je monomérna a katalyzuje, bez nutnosti kofaktorov, vznik jednovláknových zlomov dvojvláknovej DNA. TOP2 je dimérny enzým, ktorý vytvára zlomy na oboch reťazcoch DNA a pre svoje katalytické pôsobenie vyžaduje prítomnosť Mg^{2+} a adenzíntrifosfátu (ATP) (Okoro & Fatoki, 2023).

TOP2 sa u cicavcov vyskytuje vo forme dvoch štruktúrne podobných izoformiem a to TOP2 α a TOP2 β , ktoré sa ale líšia vo svojej funkcii a expresii (Vavrova & Simunek, 2012). ANTRA interagujú s oboma izoformami TOP2, čo má priamy súvis s ich cytotoxickým účinkom ale taktiež aj s rozvojom toxicity.

TOP2 α je nadmerne exprimovaná v proliferujúcich bunkách (rakovinových aj nerakovinových) a podieľa sa na replikácii a bunkovej proliferácii. V závislosti na bunkovom cykle sa miera expresie TOP2 α mení a nie je teda konštantná (Dos Santos Arruda et al., 2019; Vavrova & Simunek, 2012). Zároveň predstavuje molekulárny základ cytotoxického pôsobenia ANTRA, ktoré pôsobia ako enzymatické jedy tejto izoformy. ANTRA stabilizujú binárny štiepny komplex TOP2 α -DNA, čo zabraňuje následnej religácii rozštiepených vlákien DNA a vedie k irreverzibilným zlomom a následnej bunkovej smrti (Marinello et al., 2018; Shandilya et al., 2021).

TOP2 β izoforma sa zúčastňuje na procesoch, ako sú napr. génová transkripcia a bunková diferenciácia a typicky prevláda u kľudových buniek, ku ktorým patria aj kardiomyocyty. V jej prípade je miera expresie rovnaká v celom priebehu bunkového cyklu. Interakcia medzi TOP2 β a ANTRA je spájaná s mitochondriálnou dysfunkciou spôsobenou zvýšenými hladinami ROS, čo má za následok poškodenie buniek (Dos Santos Arruda et al., 2019). V tomto kontexte je TOP2 β spájaná s rozvojom neskorých nežiaducich účinkov (NÚ) a to kardiotoxicity a sekundárnych malignít. Tieto poznatky otvárajú dvere pre výskum orientovaný na vývoj nových analógov ANTRA špecifických pre TOP2 α , rovnako aj pre štúdium látok s cieľným inhibičným účinkom voči TOP2 β izoforme, s úmyslom predísť NÚ spôsobených interakciou s izoformou TOP2 β (Jirkovský et al., 2021; Marinello et al., 2018; Vavrova & Simunek, 2012).

2.1.3 Metabolizmus

Tak ako všetky látky či už endogénneho alebo exogénneho pôvodu, ani ANTRA sa nevyhnú metabolickej premene, ktorej primárna úloha je ich inaktivácia a následná exkrécia z organizmu. Pochopenie a znalosť týchto procesov má veľký význam pri porozumení ANTRA toxicity a ich účasti na rozvoji rezistencie proti týmto látkam.

Predpokladá sa, že po administrácii ANTRA sa takmer polovica bude vylučovať v nezmenenej podobe cestou hlavne biliárnej a v menšom podiele aj renálnej exkrécie (Sallustio & Boddy, 2021). ANTRA podstupujú 3 hlavné cesty biotransformácie, ktorými

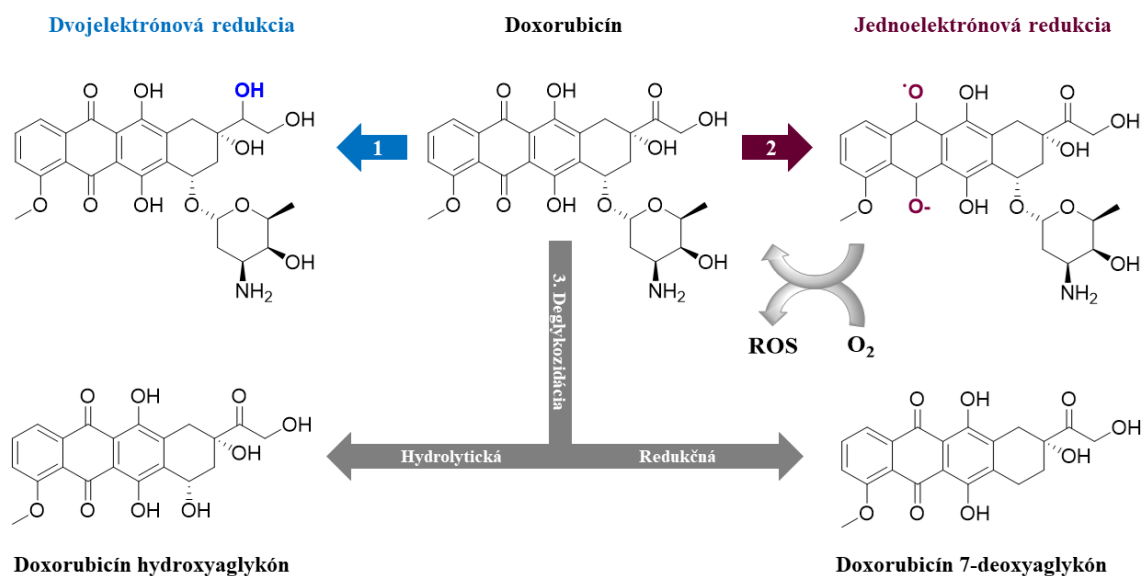
sú: hydroxylácia C13 karbonylu (dvojelektrónová redukcia), jedoelektrónová redukcia a minoritná cesta deglykozylácie (Edwardson et al., 2015).

Za hlavnú cestu biotransformácie je považovaná dvojelektrónová redukcia karbonylovej skupiny v mieste C13 na korešpondujúci sekundárny alkohol. Táto premena je závislá na prítomnosti nikotínamidadenínindinukleotidfosfát (NADPH)-dependentných enzýmov redukujúcich karbonyl (z ang. carbonyl reducing enzymes [CRE]) z nadrodín aldo-ketoreduktáz (AKR) a dehydrogenáz/ reduktáz s krátkym reťazcom (z ang. short-chain dehydrogenases/ reductases [SDR]). Redukované hydroxymetabolity, napr. doxorubicinol (DOXOL) a daunorubicinol (DAUNOL), sú viac polárne a napriek očakávanej rýchlejšej eliminácii majú naopak tendenciu sa akumulovať v srdcovom tkanive, vytvárať dlhodobý rezervoár, a preto sú tieto metabolity spájané s vývojom chronickej (neskorej) kardiotoxicity. DOXOL a DAUNOL sú spájané aj s rozvojom rezistencie, pretože tieto redukované metabolity majú oproti parentným látkam významne nižší cytotoxický účinok (Mordente et al., 2009). Enzýmy podieľajúce sa na tejto detoxikačnej ceste majú širokú tkanivovú distribúciu a môžeme teda predpokladať, že významné množstvo do tela dodaných ANTRA bude redukciu podstupovať veľmi rýchlo (Edwardson et al., 2015).

Ďalšia cesta metabolizmu predstavuje jedoelektrónovú redukciu chinónovej skupiny nachádzajúcej sa na C kruhu ANTRA aglykónu. Antrachinónový farmakofór vystupuje ako akceptor elektrónov a enzýmy katalyzujúce túto reakciu predstavujú donory elektrónov. Medzi kľúčové enzýmy tejto reakcie patria NADPH cytochróm P450 reduktáza, endoteliálna syntáza oxidu dusnatého, NADH (ubichinón) dehydrogenáza Fe-S a xantínoxidáza. V tomto procese vzniká v aeróbnom prostredí voľný semichinónový radikál, ktorý je v rámci tohto redoxného cyklu následne stabilizovaný premenou na hydrochinón. Tieto reakcie prebiehajú v prítomnosti kyslíka, ktorý sa súčasne v dôsledku elektrónových transferov redukuje. Pôvodný chinón sa regeneruje a v procese sa vytvárajú ROS, ako sú napr. peroxid vodíka a superoxidový anión. V konečnom dôsledku dochádza k alterácii DNA a jej poškodeniu, lipidovej peroxidácii a eventuálne k apoptóze buniek (Edwardson et al., 2015; Mordente et al., 2009).

Alternatívne môžu ROS vznikáť aj bez účasti enzýmov cestou tvorby komplexov ANTRA so železitými iónmi Fe^{3+} . Železo môže v prítomnosti kyslíka podstupovať zmenu oxidačného stavu a prechádzať z Fe^{3+} na Fe^{2+} a *vice versa*, za súčasnej produkcie toxických ROS (Dos Santos Arruda et al., 2019; Edwardson et al., 2015; Mordente et al., 2009; Shandilya et al., 2021).

Minoritnú cestu metabolizmu (1-2 %) predstavuje hydrolytická a redukčná deglykozidácia, ktorej produktom je hydroxyaglykón, resp. 7-deoxyaglykón. V tejto reakcii dochádza k odstráneniu cukru z A kruhu ANTRA štiepením glykozidickej väzby a zároveň k štiepeniu karbonylovej skupiny postranného reťazca v prítomnosti NADPH- dependentných glykozidáz hydrolytického alebo redukčného typu (hydrolázy/reduktázy) (Edwardson et al., 2015; Mordente et al., 2009).



Obr. 2 Cesty biotransformácie ANTRA. Upravené podľa (Mordente et al., 2009).

2.1.4 Kardiotoxicita

Typickým závažným NÚ liečby ANTRA je vývoj akútnej a chronickej kardiotoxicity, ktorá významne obmedzuje ich použitie v klinickej praxi. Tento stav je považovaný za jednu z hlavných príčin morbidity a mortality u pacientov, ktorí prekonali rakovinu po liečbe ANTRA (Saleh et al., 2021).

Symptómy akútnej toxicity, najčastejšie v podobe arytmií (supraventrikulárna tachykardia) a zmien na elektrokardiografii, sa môžu objaviť už bezprostredne pár hodín po ich podaní. ANTRA navodená myokarditída sa môže prejsť v časovom rámci dní až týždňov. Oneskorene však môže dôjsť k dilatačnej kardiomyopatii, ktorá sa prejavuje dysfunkciou ľavej komory a znížením ejekčnej frakcie. Následne dochádza k rozvinutiu mestnavého srdcového zlyhávania (z ang. congestive heart failure), postupnej terminálnej strate kardiomyocytov a fibrotizácii srdcového svalu. Po rozvinutí srdcového zlyhávania

je tento stav už irreverzibilný a nedá sa vyliečiť. To môže pacienta priamo ohrozovať na živote a významne skracovať dĺžku a kvalitu života. Tento stav sa vyvíja mesiace až roky po podaní ANTRA, a je preto dôležité pacientov sledovať pred, počas ale aj dlhodobo po liečbe ANTRA (Bayles et al., 2023; Piska et al., 2017; Saleh et al., 2021; Švihovec et al., 2018).

Presný patofyziologický mechanizmus vzniku ANTRA kardiotoxicity nie je stále plne pochopený a je tak predmetom intenzívneho výskumu. V minulosti sa považoval za jeden zo základných mechanizmov rozvoja kardiotoxicity vznik ROS. Detailne bol ich vznik popísaný v kapitole 2.1.2 Mechanizmus účinku. ROS sú vysoko reaktívne a toxické zlúčeniny pre veľké množstvo bunkových štruktúr. Pre kardiomyocyty je charakteristické nízke množstvo antioxidantných enzýmov a ROS tak nie sú dostatočne neutralizované, čím prevládne ich toxický účinok. Ich vplyvom dochádza k degradácii sarkomér, poškodeniu DNA, lipidovej peroxidácii, mitochondriálnej dysfunkcii až k smrti a nevratnej strate kardiomyocytov. Avšak, táto teória nie je dostačujúca pre objasnenie celkovej ANTRA kardiotoxicity a indukcia oxidačného stresu a tvorba ROS sú skôr spájané s akútnou formou kardiotoxicity (Edwardson et al., 2015; Menna et al., 2012).

Ďalším mechanizmom spájaným s kardiotoxicitou je dvojelektrónová redukcia a vznik toxických alkoholických metabolitov DOXOLu a DAUNOLu. Tieto metabolity vznikajú vyššie spomínaným procesom priamo v srdcovom tkanive. Oproti pôvodným látkam majú zníženú clearance a dochádza tak k ich hromadeniu, čo má za následok vývoj chronickej kardiotoxicity. K tvorbe rezervoáru dochádza postupne, a preto je ich podávanie limitované na maximálnu celoživotnú kumulatívnu dávku (Bayles et al., 2023; Edwardson et al., 2015).

Z ďalšieho pohľadu majú DOXOL a DAUNOL oproti pôvodným látkam silný inhibičný účinok na iónové pumpy ako sú napr. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPáza sarkoplazmatického retikula (SR), Na^+/K^+ ATPáza alebo $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ iónový výmenník sarkolémy. Taktiež majú schopnosť inhibovať alebo znižovať expresiu Ca^{2+} ATPázy, ktorá v SR reguluje hladiny Ca^{2+} iónov. Okrem toho môžu meniť Ca^{2+} hladiny narušením otvárania kanálov Ca^{2+} -dependentných ryanodínových receptorov (RyR2) SR, ktoré sa podieľajú na svalovej kontrakcii. Tieto procesy spejú k narušeniu energetického metabolizmu srdca, presunu iónov a zmene ich gradientov, čo vyústí do narušenia kontraktility srdca, vývoja myopatie až smrti kardiomyocytov. Tieto hydroxymetabolity sa vyznačujú vysokou kardiotoxicitou a oproti pôvodným ANTRA majú mnohonásobne nižšiu protinádorovú aktivitu (Edwardson et al., 2015; Menna et al., 2012; Mordente et al., 2009).

V súčasnosti sa za hlavný mechanizmus kardiotoxicity ANTRA považuje ich interakcia s TOP2. Inhibícia izoformy TOP2 α , ktorá je charakteristická pre proliferujúce bunky, bola popísaná v kapitole 2.1.2 Mechanizmus účinku, a stojí za očakávaným a žiadaným protirakovinovým účinkom. TOP2 β je izoforma preferenčne exprimovaná v kardiomyocytoch (klúdových bunkách) a je spájaná s vývojom kardiotoxicity a sekundárnej rakoviny po terapii ANTRA. Tvorba komplexov ANTRA-TOP2 β -DNA stojí za irreverzibilným poškodením DNA a mitochondriálnych funkcií v bunkách myokardu, čo následne vedie k energetickému vyčerpaniu, oxidačnému stresu, tvorbe ROS až samotnej programovanej smrti buniek, apoptóze. Táto teória je ďalej podporovaná aj skutočnosťou, že deplécia TOP2 β , poprípade jej cielená inhibícia, viedla k významne zníženej kardiotoxicite a môže tak predstavovať cestu pre objavenie látok s kardioprotektívnym účinkom v terapii ANTRA (Jirkovský et al., 2021; Sallustio & Boddy, 2021).

Riziko kardiotoxicity je priamo úmerné aplikovanej celoživotnej kumulatívnej dávke ANTRA, čo významne obmedzuje celkovú kumulatívnu dávku a rovnako aj celkovú dĺžku terapie. Maximálna celoživotná dávka je pre DOX stanovená na 450-550 mg/ m². Pre porovnanie je v prípade menej kardiotoxického analógu EPI kumulatívna dávka približne dvojnásobná, až 900 mg/ m². Voľba ANTRA a stanovenie dávky sa odvíja od typu malignity a jej štádia, rovnako aj od rizikových faktorov (RF) daného pacienta, ktoré by mohli ovplyvniť toxicitu podávanej chemoterapie. Medzi RF pre vývoj kardiotoxicity patrí vek (<18 a >65 rokov), ženské pohlavie, ožarovanie hrudníka, stav pečene, obličiek, kardiovaskulárneho systému (KVS), poprípade už existujúce KVS ochorenie alebo aj súčasné podávanie iných kardiotoxických liečiv (Bayles et al., 2023; Saleh et al., 2021; Sallustio & Boddy, 2021; Švihovec et al., 2018).

V rámci prevencie kardiotoxicity je možné ANTRA podávať v podobe kontinuálnej infúzie (min. 6 hodín a viac) alebo napr. v lipozomálnej forme s cielenou distribúciou do nádorového tkaniva (Cortés-Funes & Coronado, 2007; Saleh et al., 2021). V súčasnosti je jediným registrovaným liečivom pre prevenciu ANTRA kardiotoxicity dexrazoxan (DEX). Mechanizmus jeho účinku sa dlhú dobu opieral o teóriu, v ktorej vystupoval jeho metabolit (ADR-925) ako chelátor voľného železa v kardiomyocytoch, čím bránil tvorbe ROS. DEX bol teda považovaný za preliečivo. Avšak, novšie štúdie naznačujú, že DEX svoj kardioprotektívny účinok sprostredkuje interakciou s TOP2 β a teda jej inhibíciou a nie cestou chelatácie železa. Túto novú teóriu potvrdzuje aj skutočnosť, že viaceré štúdie zaoberajúce sa výskumom rôznych chelátorov železa či antioxidantov, neboli schopné produkovať nové látky

s kardioprotektívnymi vlastnosťami podobnými DEX (Bayles et al., 2023; Bures et al., 2017; Jirkovský et al., 2021; Saleh et al., 2021).

2.1.5 Rezistencia

Významnou prekážkou vo farmakoterapii nádorov je vývoj rezistencie nielen voči konvenčným (klasickým) ale aj novším, cieleným protinádorovým liečivám. Okrem kardiotoxicity je tak ďalším významne limitujúcim faktorom v klinickom použití ANTRA vývoj rezistencie.

Prirodzená (vrodená) chemorezistencia je založená na vopred existujúcich genetických mutáciach, heterogenite nádorových buniek alebo zvýšenej aktivácii obranných mechanizmov proti xenobiotikám, ktoré spejú k zníženej koncentrácii a detoxifikácii týchto látok. Jej vznik teda nie je naviazaný na predchádzajúce podanie liečiva. Naopak získaná rezistencia sa vyvíja počas alebo po aplikácii liečiva a vyznačuje sa postupnou stratou citlivosti nádorových buniek voči podávaným antineoplastikám. To má za následok prežívanie rakovinových buniek aj napriek farmakoterapii, čo v konečnom dôsledku speje k zlyhaniu liečby, relapsu, rýchlejšej progresii rakoviny alebo až smrti pacienta (Liu et al., 2023; Wang et al., 2019).

Vývoj rezistencie je multifaktoriálny, komplexný proces zahŕňajúci široké spektrum mechanizmov. Špecifické mechanizmy vzniku rezistencie voči ANTRA zahŕňajú napr. mutácie a zmeny aktivity cieľovej TOP2, zvýšenú mieru opravy poškodenej DNA, zmeny v expresii a aktivite efluxných a influxných membránových transportérov, metabolizmus ANTRA a ich zvýšenú enzymatickú detoxikáciu (Capelôa et al., 2020; Den Boer et al., 1998; Chien & Moasser, 2008; Otter et al., 2022; Tavares et al., 2020).

Mechanizmus pôsobenia ANTRA zahŕňa ich interakciu s izoformou TOP2 α . Preto ak je táto kľúčová cieľová štruktúra zmutovaná alebo došlo k zmene jej expresie, potlačeniu proapoptických signálov, ktoré sprostredkuje, poprípade je lokalizovaná vo vyššej miere v cytosóle než v jadre, tak všetky tieto spomenuté skutočnosti majú svoj podiel a prispievajú k vývoju rezistencie na ANTRA. Viaceré štúdie potvrdili koreláciu medzi mierou expresie TOP2 α ako predpoklad dobrej citlivosti nádorových buniek voči terapii ANTRA. Avšak to neplatí u pacientov, kde aj napriek vyššej TOP2 α expresii reagujú na liečbu nedostatočne, v dôsledku aktivácie iných bunkových systémov opravy DNA. Tento mechanizmus zvýšenej miery opravy DNA antagonizuje mechanizmus účinku ANTRA, znižuje ich protinádorový účinok a prispieva tak k rezistencii (Capelôa et al., 2020).

Ďalším významným mechanizmom rezistencie je zmena expície alebo aktivity influxných a efluxných membránových transportérov, čo následne ovplyvňuje transport látok cez membránu bunky a ich farmakokinetiku (FK). Rodina solute carrier (SLC) tzv. uptake transportérov hydrofilných látok má schopnosť látky transportovať bez priamej spotreby ATP. Energiu na transport čerpajú z gradientu, ktorý vzniká pri kotransporte alebo antiporte iných látok (Morris et al., 2017; Skálová & Boušová, 2011). Viaceré štúdie potvrdili, že DAUN a DOX sú substráty transportérov SLC nadrodiny konkrétne OCT1, OCT2, OCT3 a OATP1A2, ktoré zodpovedajú za uptake ANTRA do buniek. Okrem toho poukázali aj na fakt, že pri zmene ich expície alebo aktivity (v smere zníženia expície/ inhibície) došlo k zníženiu ich intracelulárnej koncentrácie, čo následne prispelo k významne zníženej ANTRA cytotoxicite voči rakovinovým bunkám a prispievalo tak k vývoju rezistencie (Andreev et al., 2016; Otter et al., 2022).

Nadrodina aktívnych efluxných liekových transportérov ABC (z ang. ATP-binding cassette) a jej členovia P-glykoproteín (P-gp), MRPs (z ang. multidrug resistance associated proteins) a BCRP (z ang. breast cancer resistance protein) sa tiež podieľajú na vývoji rezistencie. Prvým identifikovaným a zároveň najviac preskúmaným je P-gp (tiež známy ako MDR1/ ABCB1), ktorý je kódovaný génom mnohopočetnej liekovej rezistencie MDR1 (z ang. multidrug resistance gene 1) (Den Boer et al., 1998; Skálová & Boušová, 2011). Tieto transmembránové proteíny majú schopnosť exportovať veľké množstvo štruktúrne rozdielnych substrátov (lipofilných aj hydrofilných) von z buniek proti gradientu, pričom využívajú energiu z hydrolýzy ATP (Chen & Tiwari, 2011). Ich nadmerná expícia bola viacerými štúdiami potvrdená v nádorových tkanivách a je spájaná s rozvojom rezistencie a horších výsledkov farmakoterapie. Dôsledkom ich efluxnej aktivity je znížená koncentrácia liečiv vo vnútri bunky, čo prispieva k vývoju rezistencie širokého spektra ich substrátov, ku ktorým patria napr. ANTRA, ale aj vinka alkaloidy, epipodofylotoxíny, taxany alebo aj kinázové inhibítory (Andreev et al., 2016; Den Boer et al., 1998; Capelôa et al., 2020; Housman et al., 2014; Chien & Moasser, 2008; Lin et al., 2015).

Posledným rozoberaným mechanizmom podieľajúcim sa na vývoji získanej FK rezistencie voči ANTRA bude podiel ich metabolickej inaktívácie, ktorá je sprostredkovaná viacerými CRE z nadrodín AKR a SDR (Bortolozzi et al., 2018; Malátková & Wsól, 2014). Ich hlavná metabolická cesta (dvojelektrónová redukcia) zahŕňa účasť spomínaných antracyklínreduktáz, ktoré redukujú karbonylovú skupinu postranného reťazca ANTRA a produkujú tak korešpondujúce alkoholické metabolity DOXOL a DAUNOL. Tieto

metabolity sa v *in vitro* podmienkach vyznačujú vyššou kardiotoxicitou a hlavne významne nižším cytotoxickým účinkom v porovnaní s pôvodnými ANTRA (Jin & Penning, 2007; Novotná et al., 2020; Piska et al., 2017; Zeng et al., 2017).

Tieto CRE sú v mnohých prípadoch exprimované vo zvýšenej miere v nádorových tkanivách a svojím pôsobením znižujú koncentrácie účinných foriem protinádorových liečiv, znižujú citlivosť (zvyšujú odolnosť) rakovinových buniek voči podávanej terapii a prispievajú tiež k zvýšenej toxicite. Štúdiami bola potvrdená aj indukcia expresie týchto redukujúcich enzýmov po samotnej aplikácii ANTRA, čo spôsobuje ich overexpresiu a aktivitu a následne tak prispieva k rezistencii (Bortolozzi et al., 2018; Hofman et al., 2014; Matsunaga et al., 2014).

Medzi hlavné antracyklínreduktázy, ktoré sa podieľajú na inaktivácii a sprostredkovaní rezistencie voči ANTRA, radíme viaceré izoformy z AKR enzymatickej nadrodiny a to AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3 a AKR7A2. Z nadrodiny SDR sa to týka hlavne izoformy CBR1 (Hofman et al., 2014; Novotná et al., 2020; Piska et al., 2017; Tavares et al., 2020).

Ich významnú účasť na vývoji rezistencie potvrdzujú mnohé publikované štúdie, v ktorých boli testované látky so selektívnym inhibičným účinkom voči spomenutým reduktázam. Tieto látky boli schopné inhibovať vznik toxických, protinádorovo menej účinných, sekundárnych hydroxymetabolitov, ale hlavne sa touto inhibíciou podarilo zvrátiť rezistenciu sprostredkovanú AKR/ SDR a tak vrátiť rezistentným bunkám senzitivitu voči podávaným antineoplastikám (Bortolozzi et al., 2018; Čermáková et al., 2022; Hofman et al., 2014; Morell et al., 2020; Verma et al., 2016; Verma et al., 2019).

V súčasnosti je predmetom výskumu využitie AKR inhibítorov v kombinačnej terapii s konvenčnými cytotoxickými liečivami kvôli ich potenciálnemu synergickému účinku, ktorý by stál nielen za zníženou toxicitou či zvýšeným účinkom samotných ANTRA, ale aj za resenzitizáciou už rezistentných nádorových buniek. Táto kombinačná terapia by tak predstavovala ďalší významný míľnik v zlepšení farmakoterapie nádorových ochorení a zvýšení jej bezpečnosti (He et al., 2022; Liu et al., 2020; Liu et al., 2023; Morell et al., 2021; Novotná et al., 2008; Penning, 2017; Piska et al., 2017; Verma et al., 2016; Verma et al., 2019).

2.2 Enzýmy redukujúce karbonyl

Metabolizmus môžeme vo všeobecnosti rozdeliť na tri fázy, ktoré zahŕňajú biotransformačné reakcie I. fázy (nesyntetické/ konverzné), reakcie II. fázy (syntetické/ konjugačné) a III. fáza predstavuje transportné procesy xenobiotík a ich metabolitov (Croom, 2012; Skálová & Boušová, 2011). Do I. fázy metabolizmu zaraďujeme napr. enzýmy redukčné, oxidačné a hydrolytické. V tomto procese sú v štruktúre xenobiotika odkryté alebo novo zavedené polárnejšie funkčné skupiny ako sú napríklad -COOH, -OH, -O- , -SH alebo -NH₂ (Benedetti et al., 2009; Kvasničková, 1995). V rámci II. fázy prebiehajú konjugačné reakcie, kde produkty I. fázy reagujú s polárnymi, endogénnymi zlúčeninami za účasti transferáz, ktoré vystupujú ako konjugačné činidlá (Almazroo et al., 2017; Skálová & Boušová, 2011). Konjugačné reakcie môžu prebiehať aj na pôvodnej molekule xenobiotika za podmienky, že obsahuje hydrofilnú skupinu dostupnú pre konjugačné reakcie. Z toho vyplýva, že nie každé xenobiotikum musí nutne podstupovať reakcie I. aj II. fázy metabolizmu zároveň (Benedetti et al., 2009; Kvasničková, 1995).

CRE sú všadeprítomné enzýmy I. fázy metabolizmu. Katalyzujú NAD(P)(H)-dependentné oxidoredukčné reakcie na širokej palete substrátov s karbonylovou funkčnou skupinou, za vzniku príslušných primárnych alebo sekundárnych alkoholov. Okrem ich role v metabolizme endogénnych substrátov, majú svoju rolu aj v procese biotransformácie xenobiotík, ktoré vo väčšine prípadov predstavujú látky lipofilného charakteru a je preto nutné, aby v organizme podstúpili proces biotransformácie za účelom ich exkrécie. V tomto prípade CRE katalyzujú prevažne jednosmerný redukčný proces smerujúci k ich inaktivácii a detoxifikácii v rámci I. fázy metabolizmu. Následne sú tieto vzniknuté metabolity, s odkrytou alebo novo vzniknutou hydrofilnejšou skupinou, pripravené podstúpiť konjugačné reakcie II. fázy metabolizmu a dochádza tak k ich ľahšiemu vylúčeniu z organizmu (Malátková et al., 2010; Penning, 2015; Skarydová & Wsól, 2012; Westermann et al., 2022).

Väčšinu enzýmov s redukčnou aktivitou voči karbonylovej skupine môžeme zaradiť do troch enzýmových nadrodín a to AKR, SDR alebo dehydrogenázy/ reduktázy so stredne dlhým reťazcom (MDR) (Skálová & Boušová, 2011).

2.2.1 Aldo-ketoreduktázy

AKR sú katalyticky aktívne proteíny, ktoré tvoria enzýmovú nadrodinu s doposiaľ viac ako 190 identifikovanými členmi nielen u človeka ale taktiež aj u zvierat, rastlín, húb alebo prokaryot (Barski et al., 2008; Internet 2).

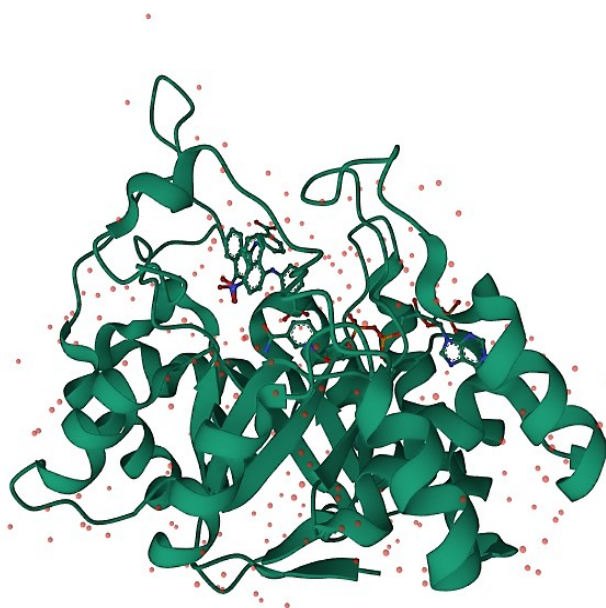
Veľká časť AKR enzýmov má charakter monomérnych proteínov, ale vyskytujú sa medzi nimi aj diméry ako napr. enzýmy AKR7 alebo tetraméry ako sú napr. enzýmy AKR6 rodiny (Barski et al., 2008). Sú to rozpustné, cytosolické proteíny s približnou molekulovou hmotnosťou 34- 37 kDa a približnou dĺžkou reťazca 320 aminokyselín (AMK), ktoré zdieľajú nielen spoločný katalytický reakčný mechanizmus ale taktiež aj štruktúrny motív (Mindnich & Penning, 2009; Penning, 2015).

Tieto NAD(P)(H)- dependentné oxidoreduktázy majú širokú substrátovú špecificitu, ktorú sprostredkujú tri flexibilné ‚slučky‘ (z ang. loops) nachádzajúce sa na C- terminálnom konci. Tieto štruktúry sa líšia vo veľkosti a sekvenciách naprieč AKR enzýmovou nadrodinou a podieľajú sa na rozpoznávaní a väzbe veľkého množstva substrátov AKR v ich aktívnom mieste na C- terminálnom konci. Substráty AKR enzýmov tak predstavujú širokú paletu zlúčenín, ktoré zahŕňajú aldehydy, ketóny, monosacharidy, ketosteroidy, ketoprostaglandíny, prekursor žlčových kyselín, retinaly, chemické karcinogény a ich metabolity a v neposlednej rade aj liečivá. Podieľajú sa teda na ich biotransformácii, ktorá vedie k detoxikácii, no v niektorých prípadoch aj k bioaktivácii týchto látok (Jez et al., 1997b; Jin & Penning, 2007; Mindnich & Penning, 2009).

Úloha väčšiny AKR enzýmov je katalýza redukcie aldehydov a ketónov na ich príslušné alkoholy s využitím NAD(P)(H) kofaktora. Tieto reakcie prebiehajú tzv. usporiadaným bi-bi kinetickým mechanizmom, kde sa bude vždy prvý viazať kofaktor a zároveň bude z reakcie aj posledný odchádzať. Tieto enzýmy môžu v *in vitro* podmienkach katalyzovať redoxné deje a fungovať tak v oboch smeroch redukcie aj oxidácie. Na rozdiel v *in vivo* prostredí fungujú preferenčne ako reduktázy, pretože v bunkách s aktívnym metabolizmom je vysoký pomer NADPH/ NADP⁺ (Penning, 2015).

Okrem spomenutého kinetického mechanizmu spolu zdieľajú aj charakteristický štruktúrny motív, ktorý pre AKR nadrodinu enzýmov predstavuje (α/β)₈-súdok, kde sa pravidelne strieda 8 antiparalélnych α -helixov s 8 paralelnymi β vláknami. Tento súdkový motív je známy aj ako TIM-súdok pomenovaný podľa triázafosfátizomerázy (TIM), u ktorej bol pôvodne pozorovaný (Jez et al., 1997b; Mindnich & Penning, 2009). V centrálnej časti

súdkovej kostry sa nachádza katalytická tetráda zložená zo 4 AMK a to Tyr55, Asp50, His117 a Lys84. Práve Tyr55 plní funkciu tzv. všeobecnej kyseliny alebo zásady. V procese redukcie predstavuje Tyr55 donora protónu a vystupuje ako všeobecná kyselina. Transfer hydridu z kofaktoru NAD(P)(H) na karbonyl prebieha v smere 4-*pro-R*. Následne dochádza k protonizácii kyslíka karbonylovej skupiny všeobecnou kyselinou (Tyr55). V prípade oxidácie je proces opačný a Tyr55 vystupuje pre zmenu ako všeobecná báza (Jez et al., 1997b; Mindnich & Penning, 2009).



Obr. 3 Kryštalická štruktúra AKR1C3 v komplexe s NADP⁺. Upravené podľa (Internet 3).

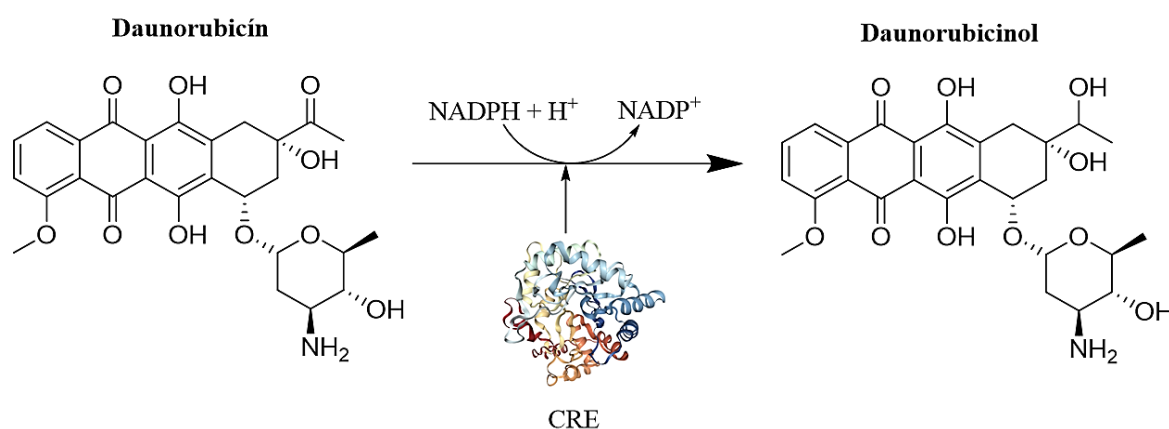
Vzhľadom k neustálemu napredovaniu a identifikácii nových členov stále sa rozrastajúcej AKR nadrodiny, viedol starý klasifikačný systém k problémom v procese priradzovania názvov jednotlivým členom AKR. Nový systém nomenklatury nasledoval predlohu systému nadrodiny cytochrómu CYP450 s rozdielom, že systém pre priradzovanie názvov AKR sa opiera o porovnávanie AMK sekvencií. Bol vyvinutý s úmyslom zjednotenia a zavedenia systematického vytvárania názvov enzýmov (Jez et al., 1997a).

Všetkým členom je pridelený spoločný koreňový základ ‚AKR‘ ako skratka aldo-ketoreduktáza, za ktorým nasleduje arabská číslica definujúca rodinu (AKR1-16). Potom je pridelené písmeno charakterizujúce podrodinu v prípade, že v rámci danej rodiny existuje viacero podrodín. V podrodine sú jednotlivé enzýmy číslované chronologicky podľa doby

zaslania sekvencií na webovú stránku AKR. Na konci sa nachádza arabská číslica reprezentujúca unikátnu proteínovú sekvenciu (Jez et al., 1997a; Mindnich & Penning, 2009).

AKR enzýmovú nadrodinu tvorí 16 rodín, do ktorých sú jednotliví členovia zaradení v prípade >40 % sekvenčnej zhody v ich AMK sekvenciách. Enzýmy so sekvenčnou identitou $\geq 60\%$ sú spolu radené do jednej podrodiny. Za alely sú považované dve sekvencie AKR zdieľajúce $\geq 97\%$ sekvenčnej identity a v názve sa budú označovať dodatočným malým písmenom napr. AKR1C10a a AKR1C10b (Jez et al., 1997a; Mindnich & Penning, 2009; Penning, 2015).

K dnešnému dňu bolo identifikovaných 15 ľudských AKR, ktoré patria do troch rodín AKR1, AKR6 a AKR7 (Penning & Drury, 2007; Penning et al. 2021). Okrem ich fyziologickej funkcie biokatalyzátorov je predpoklad ich role aj v širokej škále patologických procesov. Veľké množstvo štúdií potvrdzuje rolu AKR enzýmov nielen v rozvoji nádorových ochorení ale taktiež poukazujú na ich rolu vo vývoji rezistencie a produkcii toxických metabolitov, tak ako je to napr. v prípade ANTRA. Táto skutočnosť ešte viac naberá na dôležitosti vzhľadom k tomu, že niektoré z enzýmov sú vo zvýšenej miere exprimované v nádorovom tkanive (Barski et al., 2008; Penning et al., 2015; Penning et al., 2021). V rakovinových bunkách vykazujúcich rezistenciu voči ANTRA bola pozorovaná vyššia hladina enzýmov ako sú napr. AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2. Tieto enzýmy sa okrem vzniku rezistencie podieľajú aj na vývoji kardiotoxicity sprostredkovaním metabolickej premeny ANTRA na menej účinné a zároveň viac kardiotoxické sekundárne alkoholy ako sú DOXOL a DAUNOL (Morell et al., 2020; Piska et al., 2017).



Obr. 4 Schéma redukcie DAUN na DAUNOL v prítomnosti kofaktora za účasti CRE. Upravené podľa (Ax et al., 2000).

2.2.1.1 AKR1A1

Aldehydoreduktáza (AKR1A1) je cytosolický NADPH-dependný enzým monoméneho charakteru s redoxnou aktivitou a patrí k jedným z prvých objavených v rámci AKR enzymatickej nadrodiny (Barski et al., 2008; Skálová & Boušová, 2011). Má širokú substrátovú aktivitu, ale uprednostňuje substráty s prítomným negatívnym nábojom na karboxylovej kyseline. Tiež má schopnosť redukovať aromatické ale aj alifatické aldehydy rovnako aj steroidné aldehydy na ich príslušné alkoholy. V opačnom smere sa podieľa na oxidácii *trans*-dihydrodiolov na *o*-chinóny (Barski et al., 2008; Takahashi et al., 2012). Má širokú tkanivovú distribúciu, ale charakteristická pre AKR1A1 je expresia hlavne v proximálnych tubuloch obličiek a v nižšej miere sa nachádza aj v pečeni.

Zvýšená expresia AKR1A1 je spájaná s moduláciou proteínu p53, ktorý sa podieľa na kontrole bunkového cyklu a apoptóze, čo má za následok vývoj rezistencie na rádioterapiu u buniek rakoviny hrtnu. Svoju rolu má AKR1A1 aj v rámci metabolizmu DAUN a DOX a podieľa sa tak na vývoji rezistencie a toxicity ANTRA (Kim et al., 2012; Plebuch et al., 2007). Bolo preukázané, že sa aktivita AKR1A1 v metabolizme ANTRA líši v dôsledku existencie genetického polymorfizmu tejto izoformy. Dve prirodzene sa vyskytujúce alelické variácie N52S a E55D majú oproti pôvodnej AKR1A1 približne o polovicu nižšiu aktivitu voči metabolizmu DAUN, čo môže viesť k jeho zníženej eliminácii a následnému vzniku reaktívnych medziproduktov alebo toxických metabolitov (Bains et al., 2008).

2.2.1.2 AKR1B1

AKR1B1 predstavuje cytosolický monomérený enzým s molekulovou hmotnosťou 36 kDa, ktorý vykazuje širokú substrátovú špecifitu, za ktorú vďačí vysokej plasticite svojho aktívneho miesta (Quattrini & Motta, 2019; Singh et al., 2015). AKR1B1, tiež známa ako aldózareduktáza, katalyzuje redukciiu fyziologických, ale aj aldehydov xenobiotického pôvodu na príslušné alkoholy s využitím NADPH kofaktoru. V organizme má širokú tkanivovú distribúciu s najväčšou expresiou v nadobličkách a ďalších endokrinných tkanivách ako je napr. placenta alebo semenníky (Banerjee, 2021).

AKR1B1 je spomedzi ostatných enzýmov tejto nadrodiny najviac skúmanou izoformou. Dôvodom tohto veľkého záujmu je rola AKR1B1 vo vývoji hyperglykemického poškodenia tkanív a sekundárnych komplikácií diabetu mellitu. Je súčasťou polyolovej dráhy, ktorá sa aktivuje za hyperglykemických podmienok. AKR1B1 katalyzuje redukčnú premenu glukózy na sorbitol, ktorý sa akumuluje v bunkách kvôli svojej polarite, čím dochádza

k zvýšeniu osmolarity. Podieľa sa tak na rozvoji nie len osmotického, ale aj oxidačného stresu a stojí tak za vývojom chronických komplikácií diabetu, ku ktorým patria napr. retinopatie, nefropatie a neuropatie (Penning, 2015; Quattrini & Motta, 2019; Singh et al., 2015). AKR1B1 plní aj funkciu detoxifikačného enzýmu a katalyzuje redukciu toxických aldehydov (napr. metylglyoxal, 4-hydroxy-2,3-nonenal, 3-deoxyglukosón) a produktov lipidovej peroxidácie a predstavuje tak významnú súčasť antioxidantného obranného systému organizmu (Quattrini & Motta, 2019). Taktiež, sa podieľa na regulácii viacerých zápalových bunkových dráh, kde cieleňá inhibícia AKR1B1 zabraňuje rozvoju zápalových procesov (Barski et al., 2008).

Zvýšená expresia AKR1B1 je spájaná s možným vývojom rezistencie mechanizmom redukcie a inaktívácie protirakovinových liečiv (ANTRA). Nadmerná expresia tejto izoformy bola nájdená u viacerých typov rakoviny a to v prípade rakoviny pečene, hrubého čreva, prsníkov alebo aj krčka maternice a bola spájaná s horšou prognózou (Banerjee, 2021; Sing et al., 2015).

Inhibítory AKR1B1 tak predstavujú možnosť prevencie a terapie diabetických komplikácií, poprípade bude možné ich využitie v kombináčnej terapii s protirakovinovými liečivami pre zvýšenie ich efektivity a bezpečnosti terapie. V súčasnosti je jediným schváleným AKR1B1 inhibítorom epalrestat v terapii diabetickej neuropatie v Japonsku, Číne a Indii (Banerjee, 2021; Quattrini & Motta, 2019; Sing et al., 2015).

2.2.1.3 AKR1B10

Ďalším členom AKR1B podrodiny je cytosolická NADPH- dependentná aldózareduktáza tenkého čreva (AKR1B10), ktorej objav je datovaný v roku 1998. S AKR1B1 okrem vysokej AMK sekvenčnej identity (až 71 %) zdieľajú aj podobné substrátové spektrum a citlivosť voči látkam s inhibičným účinkom (Barski et al., 2008). Na rozdiel od širokej tkanivovej expresie AKR1B1, je expresia AKR1B10 tkanivovo selektívnejšia a sústreďuje sa predovšetkým v tráviacom trakte (tenké a hrubé črevo, žalúdok) s menším výskytom v pečeni, nadobličkách a týmuse (Skálová & Boušová, 2011; Zemanova et al., 2015). Ďalším rozdielom je významne zvýšená katalytická aktivita AKR1B10 (až 100x vyššia) voči substrátom ako sú *all-trans*-retinály a vybraným liečivám s ketónovou skupinou, ku ktorým patrí napr. DAUN alebo aj dolasetron (Barski et al., 2008; Skálová & Boušová, 2011).

Podieľa sa na redukcii pre bunky toxických, vysoko reaktívnych karbonylových zlúčenín na ich príslušné a menej škodlivé hydroxymetabolity, čím ochraňuje bunky

pred ich nepriaznivými vplyvmi (Huang et al., 2016). Na druhej strane sa AKR1B10 viacerými mechanizmami podieľa na aktivácii prokarcinogénov, karcinogenéze a indukcii rezistencie voči protirakovinovým liečivám (Huang et al., 2016; Liu et al., 2022).

V prípade hepatocelulárneho karcinómu, ale aj rakoviny pľúc, pankreasu, prs, rakoviny endometria, krčka maternice alebo aj cholangiokarcinómu, bola zaznamenaná vysoká expresia proteínu AKR1B10. Naopak u kolorektálneho karcinómu bola zaznamenaná downregulácia expresie AKR1B10. Z uvedeného vyplýva významná dôležitosť vyváženej expresie tejto izoformy a jej podiel na karcinogenéze. Vývoj cielených inhibítorov AKR1B10 môže ponúkať nový terapeutický a strategický prístup v liečbe rakoviny, rovnako aj potencionálnu cestu pre prekonanie rezistencie voči vybraným antineoplastikám (Banerjee, 2021; Huang et al., 2016; Liu et al., 2022; Zemanova et al., 2015).

2.2.1.4 AKR1C1- 1C4

Podrodinu AKR1C tvoria 4 ľudské izoformy AKR1C1, 1C2, 1C3 a 1C4, ktoré sú tiež známe pod názvom 3 α -hydroxysteroiddehydrogenázy (3 α -HSDs). Sú to NAD(P)(H)-dependentné enzýmy, ktoré katalyzujú v polohách 3-, 17- a 20- redukciu ketosteroidov. V opačnom smere vystupujú ako 3 α -, 17 β - a 20 α -hydroxysteroidoxidázy, avšak to platí v *in vitro* podmienkach. *In vivo* budú preferenčne vykazovať redukčnú aktivitu (Penning et al., 2000; Penning & Byrns, 2009).

V porovnaní so zástupcami vyššie spomenutých podrodín sú schopné pracovať s ketónmi aj aldehydmi. Tieto enzýmy vykazujú rozličnú tkanivovú distribúciu, substrátové spektrum, ale aj citlivosť voči inhibítorom, a to aj napriek vysokej zdieľanej homológii v sekvencii AMK, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 84 až 98 % (Skálová & Boušová, 2011; Zeng et al., 2017). Prítomnosť všetkých izoforiem môžeme detekovať v pečeni, ale ich extrahepatálna distribúcia je odlišná. AKR1C1 a AKR1C2 sú v mozgovom tkanive exprimované vo vyššej miere než ostatné izoformy. Pre pečeň je špecifická izoforma AKR1C4. V prostate, maternici a mliečnych žľazách prsníkov prevládajú izoformy AKR1C2 a AKR1C3. V pľúcach sú exprimované všetky okrem AKR1C4 (Barski et al., 2008; Penning et al., 2000; Skálová & Boušová, 2011).

Významne sa podieľajú na metabolizme steroidných hormónov, konjugovaných steroidov, žlčových kyselín, neurosteroidov, ale aj iných karbonylových zlúčenín, ako sú napr. produkty lipidovej peroxidácie a sú tiež aktívne v redoxnej premene veľkej rady xenobiotík (Matsunaga et al., 2014; Skálová & Boušová, 2011; Tian et al., 2016). Vzhľadom

k ich významnej enzymatickej aktivite a ich ostatným funkciám, môžu zmeny v expresii AKR1C3 izoformiem stáť za vývojom maligných, ale aj nemaligných ochorení. Okrem toho sprostredkujú aj metabolickú inaktiváciu protinádorových liečiv, čím sa podieľajú na vývoji rezistencie proti podávanej chemoterapii (Barski et al., 2008; Penning & Byrns, 2009; Penning, 2019; Penning et al., 2021).

Príkladom je nadmerná expresia izoformy AKR1C3 zistená u viacerých typov rakoviny, ako sú hormonálne závislé karcinómy prostaty a prsníka, ale aj u rakoviny pľúc, obličiek, mozgových nádorov a rakoviny krvi. Aj z tohto dôvodu môže vystupovať ako diagnostický marker nádorových ochorení (Tavares et al., 2020). Zvýšená aktivita a expresia tejto izoformy je spájaná s invazivitou, agresivitou a progresiou nádorového ochorenia. AKR1C3 tiež plní funkciu prostanglandín (PG) $F_{2\alpha}$ syntázy. Zodpovedá za katalytickú premenu PG H₂ a D₂ na PG $F_{2\alpha}$ a $9\alpha,11\beta$ -PG $F_{2\alpha}$, čím následne dochádza k potlačeniu tvorby ligandov pre PPAR γ (z ang. peroxisome proliferator-activated receptor) receptor a výsledkom je potlačenie bunkovej diferenciácie a rozvoj pro-proliferáčného stavu (Hofman et al., 2014; Liu et al., 2023; Penning, 2019; Zeng et al., 2017; Zhong et al., 2015).

Jej redukčná aktivita a miera expresie koreluje s rozvojom chemorezistencie významnej skupiny protinádorových liečiv, ako sú napr. ANTRA. AKR1C3 je významne účinná a dominantná antracyklínreduktáza, katalyzuje redukčnú premenu DAUN/DOX na menej účinný a zároveň viac kardiotoxický DAUNOL/DOXOL. Táto izoforma je považovaná za hlavnú reduktázu DOX (Hofman, 2015; Piska et al., 2017; Piska et al., 2021).

AKR1C3 je v posledných rokoch predmetom intenzívneho výskumu, pretože predstavuje príležitosť pre zlepšenie terapie nádorových ochorení. Cielená inhibícia špecifickými inhibítormi môže byť cesta na prekonanie ANTRA rezistencie v rámci kombináčnej terapie klasickej triedy protinádorových liečiv so špecifickými inhibítormi AKR1C3. Predpokladom tejto interakcie je resenzitizácia rezistentných buniek rakoviny na terapiu, zmiernenie kardiotoxicity ANTRA a synergizmus tejto kombinácie (Morell et al., 2020; Piska et al., 2021; Tavares et al., 2020).

2.2.1.5 AKR7A2

V enzýmovej rodine AKR7 nájdeme dve ľudské izoformy AKR7A2 a AKR7A3, tiež známe pod názvom aflatoxínreduktázy (Internet 2; Skálová & Boušová, 2011). Proteíny AKR7 predstavujú funkčné diméry závislé na prítomnosti NAD(P)(H) kofaktoru, ktorý je potrebný

pre vykonávanie ich katalytickej aktivity oxidoreduktáz. Výsledkom ich redukčnej aktivity je detoxifikácia reaktívnych a toxických aldehydov a ketónov za vzniku príslušných alkoholov.

Katalyzujú vznik netoxických mono- a dialkoholov sprostredkovaním redukcie hepatotoxických aflatoxínaldehydov. Podieľajú sa na metabolizme produktov lipidovej peroxidácie, prispievajú k znižovaniu hladiny ROS a chránia bunky pred oxidačným stresom. Tieto skutočnosti poukazujú na ich cytoprotektívnu funkciu v organizme (Barski et al., 2008; Li et al., 2012; Penning et al., 2015).

AKR7A2 má veľmi širokú tkanivovú distribúciu a okrem mozgu nájdeme túto izoformu aj v srdci, pečeni, ale aj obličkách (Li et al., 2012; Quiñones-Lombraña et al., 2019). V centrálnom nervovom systéme (CNS) funguje ako sukcinylsemialdehydreduktáza a podieľa sa na metabolizme kyseliny γ - aminomaslovej (GABA). Má širokú substrátovú špecificitu a metabolizuje veľké množstvo zlúčenín s karbonylovou skupinou vrátane ANTRA DOX a DAUN. Izoforma AKR7A2 predstavuje viac než $\frac{1}{3}$ z celkového množstva reduktáz prítomných v srdcovom tkanive a je tak najviac zastúpenou antracyklínreduktázou myokardu. Priamo sa podieľa na intrakardiálnej tvorbe kardiotoxických hydroxymetabolitov ANTRA a prispieva tak svojou redukčnou aktivitou k vývoju chronickej kardiotoxicity. Tiež bolo preukázané, že DNA metylácia ovplyvňuje expresiu AKR7A2 a rovnako aj tvorbu kardiotoxických metabolitov ANTRA (Hoefler et al., 2016; Quiñones-Lombraña et al., 2019).

2.2.2 Dehydrogenázy/ reduktázy s krátkym reťazcom

Členovia nadrodiny SDR tvoria jednu z najväčších, stále sa rozrastajúcich enzýmových nadrodín, ktoré vykazujú vysokú divergenciu, funkčnú diverzitu a vzájomne nízku celkovú podobnosť v rozmedzí 15-30 %. Proteíny tejto nadrodiny fungujú ako oxidoreduktázy a sú závislé na prítomnosti kofaktoru NAD(P)(H). Približne 25 % všetkých identifikovaných dehydrogenáz patria do tejto nadrodiny. Vyskytujú sa v cytosóle a v niektorých prípadoch sú viazané na membrány (Hoffman & Maser, 2007; Kavanagh et al., 2008; Malátková & Wsól, 2014).

S nadrodinou AKR vykazujú prelínajúce sa spektrum substrátov, ale ich štruktúra je významne odlišná nielen od nadrodiny AKR ale aj MDR. Pre SDR je charakteristický motív tzv. Rossmanovho záhybu, ktorý pozostáva zo striedajúcich sa $\beta\alpha\beta$ podjednotiek. V tomto mieste enzýmu dochádza k naviazaniu kofaktoru NAD(H) alebo NAD(P)(H) na N-terminálny koniec, zatiaľ čo väzba substrátov prebieha na C-konci (Hoffman & Maser, 2007; Persson et al., 2009).

V organizme plnia predovšetkým fyziologickú úlohu a podieľajú sa na metabolizme steroidných hormónov, PG, retinoidov, AMK, lipidov ale aj mnohých xenobiotík, ako sú napr. ANTRA (DOX/ DAUN), haloperidol, warfarín a iné (Kavanagh et al., 2008; Persson et al., 2009). Práve redukčná aktivita členov tejto nadrodiny, ako sú napr. cytosolické izoformy CBR1, CBR3 alebo mikrosomálna 11β -HSD1 a jej cieľená inhibícia predstavuje potencionálne nový prístup v terapii nádorových ochorení. Najmä CBR1 vykazuje významnú redukčnú aktivitu voči ANTRA, čím sprostredkuje vývoj rezistencie na tieto protinádorové liečivá a je preto predmetom intenzívneho skúmania (Hoffman & Maser, 2007; Škarydová & Wsól, 2012; Skálová & Boušová, 2011).

2.2.2.1 CBR1 (SDR21C1)

Karbonyl reduktáza 1 (CBR1) je NAD(P)(H)- dependentný cytosolický enzým monoméneho charakteru, ktorý je súčasťou enzýmovej nadrodiny SDR. CBR1 je tvorená 277 AMK a jej molekulová hmotnosť je približne 30 kDa. Tento enzým je exprimovaný naprieč celým ľudským organizmom, ale jeho vyššie hladiny boli detekované napr. v pečeni, obličkách, gastrointestinálnom trakte, koži, ale aj v CNS či placente. Patrí k enzýmom I. fázy metabolizmu a podieľa sa na oxidoredukčnej premene veľkého množstva biologicky aj farmakologicky aktívnych látok. CBR1 je ale považovaná za jednu z najvýznamnejších cytosolických reduktáz (Malatkova et al., 2010; Skálová & Boušová, 2011).

K jej endogénnym substrátom patria napr. PG, kde sa CBR1 podieľa na regulácii metabolizmu PG prostredníctvom svojej aktivity ako 9- ketoreduktáza a 15- hydroxyprostaglandín-dehydrogenáza. Taktiež sa podieľa na syntéze tetrahydrobiopterínu alebo aj na regulácii biologicky aktívnej molekuly isatínu. Medzi najlepšie substráty však patria chinóny v podobe skupiny vitamínov K a ubichinónov (koenzýmu Q1 a tokoferolchinón) (Malatkova et al., 2010).

Z xenobiotických substrátov CBR1 majú dôležité postavenie protinádorové liečivá zo skupiny ANTRA (DOX a DAUN), voči ktorým vykazuje CBR1 významnú redukčnú aktivitu a podieľa sa tak na ich metabolizme. Sprostredkuje vznik redukovaných C13 hydroxymetabolitov DAUNOLu a DOXOLu, ktoré majú oproti pôvodným látkam výrazne zníženú protinádorovú aktivitu, podieľajú sa na vývoji chemorezistencie a okrem toho vykazujú vyššiu kardiotoxicitu. CBR1 vykazuje aktivitu voči DAUN aj DOX, ale redukčná aktivita CBR1 voči DAUN je vyššia, a je preto považovaná za jednu z najúčinnjších DAUN reductáz. V pečeni vystupuje CBR1 ako prevládajúca reductáza DOX. CBR1 tak svojou aktivitou významne prispieva k vývoju rezistencie a zvýšeniu toxicity ANTRA a jej cielená inhibícia môže prispieť k významnému zlepšeniu farmakoterapie nádorových ochorení a môže tiež predstavovať cestu k prekonaniu rezistencie voči ANTRA (Malatkova et al., 2010; Seliger et al., 2019; Tavares et al., 2020).

2.3 Proteínkinázové inhibítory

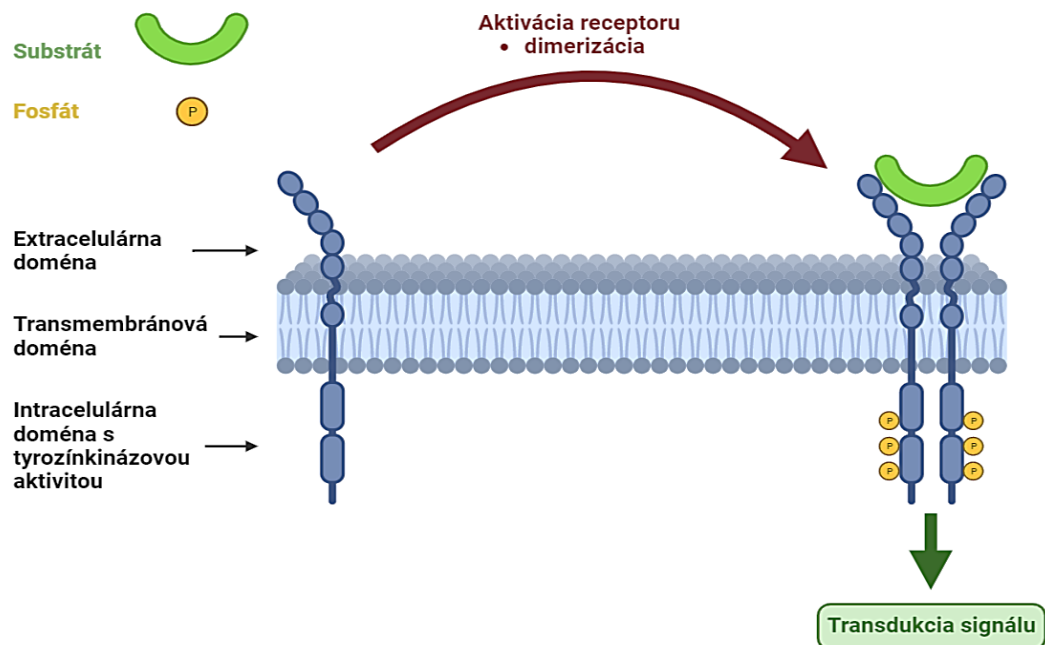
Správne fungovanie biologických procesov v organizme vyžaduje komunikáciu a spoluprácu medzi jednotlivými bunkami za účelom špecifickej odpovede na daný stimulus. Bunková signalizácia je komplexný proces, pri ktorom vo všeobecnosti dochádza k prenosu informácie pomocou extracelulárnych signálnych molekúl za účelom intracelulárnej odpovede. Práve táto modulácia jedného alebo viacerých intracelulárnych signálnych proteínov vedie k aktivácii alebo inhibícii tzv. efektorových proteínov a častokrát vedie k zmenám v génovej expresii (Internet 4; Intrenet 5).

Na transdukcii bunkových signálov sa významne podieľajú proteínkinázy (PK) sprostredkovaním fosforylácie. PK sú fosfotransferázy zodpovedné za prenos γ - fosfátovej skupiny z molekuly ATP na špecifické AMK zbytky substrátov charakteru proteínov. Proces fosforylácie je dynamický a reverzibilný a v opačnom smere defosforylácie (t.j. odstránenie fosfátovej skupiny) plnia svoju funkciu fosfatázy (Bhanumathy et al., 2021; Bhullar et al., 2018; Hunter, 1991; Internet 6).

K jednej z podskupín PK patrí enzýmová rodina tyrozínkináz (TK), ktoré selektívne katalyzujú fosforyláciu Tyr zbytkov v štruktúre proteínov. Proces TK fosforylácie predstavuje významný mechanizmus podieľajúci sa na bunkovom signálnom prenose a regulácii širokej škály bunkových procesov, ktoré zahŕňajú bunkové delenie, proces bunkovej diferenciácie a rastu buniek, migráciu buniek, metabolizmus ale aj programovanú smrť buniek (apoptózu). Je zrejmé, že TK preto predstavujú dôležité mediátory v signálnej kaskáde, a preto je ich aktivita v bunkách významne pod kontrolou tyrozínfosfatáz s antagonistickou aktivitou voči TK (Bhanumathy et al., 2021; Paul & Mukhopadhyay, 2004).

Primárne sú TK klasifikované ako: receptorové TK (RTK) a nereceptorové TK (NRTK). Okrem ich funkcie transmembránových proteínov, ktoré sa podieľajú na prenose extracelulárnych signálov do vnútra bunky, majú RTK aj enzýmovú- kinázovú aktivitu. Štruktúra RTK pozostáva z 3 hlavných častí: extracelulárna doména zodpovedná za väzbu ligandov (= extracelulárne signálne molekuly), transmembránový hydrofóbny α -helix a cytoplazmatická doména s vlastnou TK aktivitou. Inaktívna RTK má charakter monoméru. Aktivácia prebieha po naviazaní ligandu na extracelulárnu doménu, dochádza k vzniku aktívneho diméru, konformačným zmenám a následne sa aktivuje aj intracelulárna kinázová doména a proces transfosforylácie Tyr zbytkov. Týmto mechanizmom dochádza k nahromadeniu signálnych komplexov, aktivácii ďalších signálnych dráh, čo má za následok

aktiváciu alebo potlačenie (inhibíciu) rôznych génových podskupín a v konečnom dôsledku tak predstavuje dráhu bunkovej odpovede na pôvodný signál (t.j. väzby ligandu) (Paul & Mukhopadhyay, 2004; Pottier et al., 2020; Ségaliny et al., 2015).



Obr. 5 Štruktúra a aktivácia RTK. Upravené podľa (Pottier et al., 2020).

NRTK sú naopak cytoplazmatické proteíny s významnou štruktúrnou variabilitou. Väčšina je lokalizovaná v cytosóle bunky, ale môžu byť aj zakotvené v lipidovej membráne, poprípade sa niektoré môžu vyskytovať aj v jadre bunky (Siveen et al., 2018). Na rozdiel od RTK sa v ich štruktúre nenachádza extracelulárna ani transmembránová doména. Proces ich aktivácie je tiež veľmi komplexný a zahŕňa cytoplazmatické aj membránové faktory. Ich funkciou je prenos intracelulárnych signálov smerom do jadra bunky. RTK sú ďalej členené do 20 podrodín, zatiaľ čo v prípade NRTK je to skupina 10 podrodín (Arora & Scholar, 2005; Bhanumathy et al., 2021; Paul & Mukhopadhyay, 2004).

Vzhľadom k významnému postaveniu PK v rámci bunkovej signalizácie v role kľúčových signálnych proteínov dochádza, v prípade narušenia ich funkcie, k následnému ovplyvneniu viacerých bunkových procesov vrátane delenia, rastu, migrácie, diferenciácie, metabolizmu buniek, ale aj programovej bunkovej smrti. Novšie štúdie preto poukazujú na významnú účasť PK v patofyziologickom procese vzniku nádorov. K deregulácii ich fyziologických funkcií dochádza v prípade vzniku mutácie, ich nadmernej/ abnormálnej expresii alebo v prípade

aktivácie autokrinnej/ parakrinnej stimulácie. Nadmerná signalizácia PK má potom za následok defekt v signálnych dráhach, častokrát v prospech rakovinových buniek a vedie nielen k zvýšenej bunkovej proliferácii, diferenciácii, angiogenéze a onkogenéze, ale aj k rezistencii buniek voči apoptóze (Bhanumathy et al., 2021; Bhullar et al., 2018; Paul & Mukhopadhyay, 2004; Yang et al., 2022).

V logickej nadväznosti na tieto skutočnosti je v posledných rokoch výskum intenzívne zameraný na vývoj malých molekúl s inhibičným účinkom voči PK s cieľom blokovania fosforylácie, ktorú sprostredkujú. Inhibítory proteínkináz (PKI) patria k prostriedkom cielenej protinádorovej terapie a predstavujú skupinu tzv. malých molekúl. Mechanizmus účinku väčšiny tyrozínkinázových inhibítorov (TKI) zahŕňa kompetíciu inhibítora o väzbové miesto na katalytickej doméne kinázy s molekulou ATP. Tým pádom dochádza k zníženiu kinázovej funkcie, resp. fosforylácie a rovnako aj následnej bunkovej signalizácie. Výsledkom je inhibícia bunkovej proliferácie, zástava angiogenézy a zvýšená citlivosť buniek voči apoptóze (Pottier et al., 2020; Yang et al., 2022).

Aj táto skupina liečiv má svoje limity v klinickom použití, ktoré môžu viesť k zníženiu dávok, poprípade až k úplnému pozastaveniu liečby TKI. K hlavným limitujúcim faktorom patrí hlavne vývoj rezistencie a významná toxicita týchto látok, ktorá súvisí s ich nízkou selektivitou a inhibíciou viacerých PK okrem tej cieľovej. Rezistencia na TKI je veľmi komplexný proces veľkého množstva faktorov a okrem iného zahŕňa vznik mutácii v mieste väzby inhibítora alebo aktiváciu alternatívnych kináz v rámci signálnej dráhy, ktoré majú za úlohu kompenzovať práve blokovanú kinázu (Pottier et al., 2020; Yang et al., 2022).

Navyše viaceré štúdie v posledných rokoch preukázali, že sa TKI podieľajú na inhibícii CRE, ktoré sprostredkujú metabolickú premenu ANTRA na ich redukované hydroxymetabolity. Inhibičná schopnosť TKI voči týmto enzýmom, tak môže byť potencionálne využitá v kombinačnej terapii pre zlepšenie účinnosti a bezpečnosti ANTRA, zníženiu ich kardiotoxicity a zároveň aj ako cesta k prekonaniu rezistencie voči ANTRA (Čermáková et al., 2022; Morell et al., 2020).

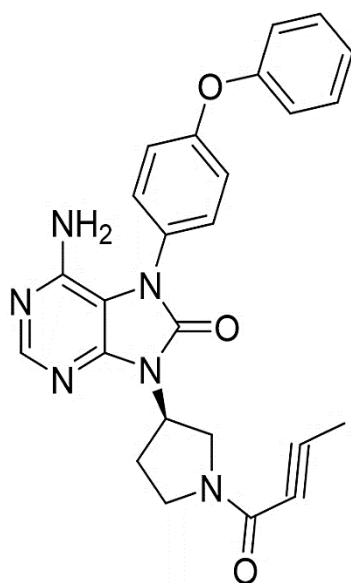
2.3.1 Tirabrutinib

TIR (Obr. 6) je predstaviteľom druhej generácie inhibítorov Brutónovej tyrozínkinázy (BTK). Je to vysokoúčinný, selektívny, perorálny inhibítor s predpokladaným lepším bezpečnostným profilom v porovnaní s predstaviteľom prvej generácie ibrutinibom (IBR). BTK patrí do Tec podrodiny NRTK a má významnú rolu v signálnej dráhe B- bunkového receptora (BCR). BTK sa podieľa na regulácii aktivácie, proliferácie, diferenciácie a prežitia B- buniek, a preto predstavuje veľmi atraktívny terapeutický cieľ s predpokladaným účinkom v liečbe hematologických malignít (leukémii a lymfómov) vychádzajúcich z B-buniek (Feng et al., 2019; Kozaki et al., 2023; Liclican et al., 2020; Wang et al., 2021).

Mechanizmus účinku spočíva v irreverzibilnej, kovalentnej väzbe TIR v mieste cysteínu (Cys- 481) v štruktúre BTK. To má za následok blokovanie nadmernej enzymatickej aktivity BTK, čím dochádza k inhibícii BCR signálnych dráh a je tak terapeuticky výhodne potlačená proliferácia a prežívanie rakovinových B- buniek (Dhillon, 2020; Feng et al., 2019; Shirley, 2022).

TIR bol uvedený na trh v roku 2020 a v súčasnej dobe je zatiaľ schválený v Japonsku, Južnej Kórei a Taiwane (Munakata et al., 2023). Medzi jeho indikácie patrí primárny lymfóm centrálného nervového systému a Waldenströмова makroglobulinémia (Kozaki et al., 2023; Shirley, 2022). V budúcnosti sa však pravdepodobne spektrum jeho použitia rozšíri hlavne o hematologické malignity, rovnako ako je to v prípade iných zástupcov BTK inhibítorov.

Podáva sa perorálne, preferenčne nalačno, jedenkrát denne v dávke 480 mg. Tieto látky sú všeobecne dobre tolerované, avšak aj tu sa počas terapie môžu vyskytnúť NÚ. Typické NÚ TIR sú napr. vyrážka, nauzea, zvracanie, bolesti hlavy a kĺbov, ale aj hematotoxicita v podobe neutropénie, leukopénie, trombocytopénie alebo anémie. Tieto myelosupresívne účinky budú pravdepodobne charakteristické pre BTK inhibítory ako ich tzv. 'class-efekt' a v terapii je nutné ich prejavom venovať dostatočnú pozornosť. V prípade výskytu NÚ a v závislosti na ich miere môže byť dávka TIR redukovaná alebo sa terapia preruší až úplne pozastaví (Rozkiewicz et al., 2023; Shirley, 2022; Wu et al., 2016).



Obr. 6 Štruktúra TIR. Upravené podľa (Internet 7).

3 CIELE PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium inhibičného účinku vybraného TKI TIR na úrovni bunkovej línie HCT116, ktorá bola rôzne transfekovaná buď plazmidom kódujúcim izoformu AKR1C3 alebo prázdny plazmidom.

Čiastkové ciele experimentálnej časti zahŕňali:

1. Určiť vplyv TIR na viabilitu bunkovej línie HCT116
2. Prechodne transfekovať HCT116 rakovinovú bunkovú líniu prázdny plazmidom a plazmidom kódujúcim AKR1C3 (pCI_EV/ pCI_AKR1C3)
3. Overiť inhibičný účinok skúmaného inhibítora TIR voči AKR1C3 na bunkovej línii s nadmernou expresiou AKR1C3 a následne stanoviť hodnotu IC_{50}
4. Určiť vplyv kombinácie DAUN s TIR na viabilitu buniek HCT116 a zároveň posúdiť vplyv tejto kombinácie na resenzitizáciu buniek rezistentných voči ANTRA

4 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie a reagensie

Acetonitril	(Sigma- Aldrich)
API voda	(Braun)
Daunorubicín hydrochlorid	(SelleckChem)
DMEM	(Sigma- Aldrich)
DMSO	(MP Biomedicals)
Etylacetát	(Sigma- Aldrich)
FBS	(Sigma- Aldrich)
JetPrime	(VWR)
JetPrime pufer	(VWR)
Kyselina mravčia	(Sigma-Aldrich)
Lyzačný pufer	(Katedra biochemických vied)
Trypsín	(Sigma- Aldrich)
PBS	(Sigma- Aldrich)
Trypanová modrá	(Sigma- Aldrich)
MTT	(BioTech)

4.1.2 Bunková línia, plazmidy a inhibítor

HCT116 (lína ľudského kolorektálneho karcinómu)	(Sigma-Aldrich, ECACC)
Tirabrutinib	(MedChemExpress LLC)
Plazmid pCI_EV	(Generi Biotech)
Plazmid pCI_AKR1C3	(Katedra biochemických vied)

4.1.3 Prístroje a pomôcky

Prístroje:

Analytické váhy Scaltec SBC 22	(Scaltec SBC 22)
Centrifúga MiniSpin Plus	(Eppendorf)
Inkubátor CO ₂	(BioTech)
Laminárny box	(Bioair)
Prístroj na výrobu ľadovej triešte Scotsman AF80	(Scotsman)
Spektrofotometer	(Tecan Schoeller)
Termomixér Thermomixer compact	(Eppendorf)
Trepačka a minitrepačka Vortex Genius 3	(IKA)
Trepačka	(Biosan)
Trepačka	(Heidolph)
UHPLC Agilent 1 290 Series	
(Ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia)	(Agilent Technologies)
Vákuový koncentrátor Concentrator plus	(Eppendorf)
Vodný kúpeľ	(NUVE)
Výveva	(P-LAB)

Pomôcky:

24-jamková doštička	(TPP)
96-jamková doštička	(TPP)
Automatické mikropipety (0,5µl – 1000µl)	(Sartorius Biohit)
Falkonky	(VWR)
UHPLC InfinityLab Inline Filter	(VWR)
Gumové septá	(Agilent Technologies)

Kultivačné fľašky (Fisherbrand)

Mikroskúmavky (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml) (Eppendorf)

Navažovacie lodičky

Nitrilové rukavice (VWR)

Pipety (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) (Eppendorf Research)

Plastové špičky (Sartorius Biohit)

Plastové viečka na vialky

Polystyrénový box na ľad

Stopky

Vialky sklenené (2 ml) (Agilent Technologies)

Sterilné pomôcky v laminárnom boxe: špičky, automatické pipety, stojany na skúmavky, pinzeta, vanička

4.2 Metodika

4.2.1 Experimenty na bunkovej línii ľudského kolorektálneho karcinómu HCT116

Kultivácia buniek

Na kultiváciu buniek ľudského kolorektálneho karcinómu HCT116 sme používali vhodné kultivačné médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) s prídavkom 10 % fetálneho bovinného séra (FBS). Takto pripravené médium predstavuje optimálne zloženie a prostredie pre podporu bunkového rastu. Použité médium neobsahovalo protimikróbne látky. Samotná kultivácia prebiehala za štandardných podmienok v inkubátore temperovanom na teplotu 37 °C a v prostredí 5 % CO₂.

Pasážovanie buniek

Pasážovanie buniek je proces prenosu určitého množstva bunkovej suspenzie starej pasáže do čerstvo vymeneného kultivačného média za účelom vytvorenia novej bunkovej pasáže. Výmena média je dôležitá z dôvodu stúpajúceho množstva buniek, ktoré pre svoj rast používajú živiny obsiahnuté v kultivačnom médiu a postupne tak dochádza k jeho deplécii. Pravidelné pasážovanie buniek sa riadi mierou bunkovej konfluencie (%) a je kľúčové v prevencii uhynutia bunkovej kultúry a zároveň umožňuje dlhodobé zachovanie bunkovej línie (Internet 8).

Celý proces pasážovania prebiehal v sterilnom prostredí laminárneho boxu. Kultivačná fľaška určená k pasážovaniu bola prenesená z inkubátora do laminárneho boxu. Tomu predchádzalo skontrolovanie bunkovej línie vizuálne (farba média), ale aj pod svetelným mikroskopom, kde sme sledovali optimálnu bunkovú konfluenciu. V prvom kroku sme odstránili staré médium odsávaním. Následne sme k bunkám adherovaným na dne kultivačnej fľašky pridali sterilný tlmivý roztok (pufer) PBS v objeme 5 ml, čím sme odstránili zostatkové množstvo starého média a pripravili sme tak bunky pre pôsobenie trypsínu. Po odsatí PBS sme k bunkám pridali 0,5 ml trypsínu a kultivačnú fľašku sme preniesli do inkubátora na dobu 5 min., počas ktorej adherované bunky disociovali enzymatickým pôsobením trypsínu. Pridaním vopred temperovaného média (37 °C) DMEM v objeme 4,5 ml došlo k inaktivácii trypsínu a zástave reakcie. FBS obsiahnuté v médiu je zodpovedné za ukončenie pôsobenia trypsínu.

Do novej kultivačnej fľašky (25 cm²) bolo prenesené určité množstvo bunkovej suspenzie, ku ktorej sme pridali množstvo kultivačného média pre dosiahnutie maximálneho

objemu (7 ml) použitej kultivačnej fľašky. Množstvo použitej bunkovej suspenzie pre novú bunkovú pasáž sme stanovili na základe miery konfluencie a spočítaného množstva buniek starej pasáže v Bürkerovej komôrke. Pre počítanie buniek sme si pripravili vzorku bunkovej suspenzie s trypanovou modrou (pomer 1:1), ktorý sme pipetovali do Bürkerovej komôrky. Bunky boli spočítané v počítačom poli komôrky na základe použitého farbiva, ktoré nám umožnilo rozlíšiť živé bunky od mŕtvych (živé bunky sa farbiva zbavujú aktívnym transportom). Na konci bola kultivačná fľaška mierne premiešaná a prenesená do inkubátora.

4.2.2 Stanovenie cytotoxicity tirabrutinibu v transfekovaných bunkách HCT116

V prvý deň experimentu sme bunky HCT116 nasadili na 96- jamkovú doštičku (približne 8000 buniek/ jamka). Tomu vždy predchádzalo pasážovanie starej bunkovej pasáže, z ktorej sme po spočítaní buniek získali potrebné množstvo bunkovej suspenzie pre zmiešanie s DMEM v objeme potrebnom pre sadenie buniek na danú doštičku. Po uplynutí 24 hod. inkubácie buniek za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂) v inkubátore nasledovala transfekcia. Skontrolovali sme bunkovú konfluenciu a pokračovali prípravou transfekčných roztokov. Jednotlivé transfekčné roztoky sme pripravili zmiešaním 0,1 µg plazmidov kódujúcich buď enzým AKR1C3 alebo prázdny plazmid (pCI_AKR1C3/ pCI_EV) s jetPRIME tlmivým roztokom. K zmesi sme potom pridali jetPRIME reagent v objeme 0,2 µl. Roztoky sme premiešali a nechali pri izbovej teplote (25 °C) po dobu 10 min. inkubovať. Po dobu inkubácie sme bunkám odsávaním vymenili staré médium za 100 µl čerstvého média. Následne prebehla samotná transfekcia, v ktorej sme k bunkám po kvapkách (5 µl) pipetovali do každej jednotlivej jamky určený transfekčný mix. Transfekované bunky sme preniesli do inkubátora, kde boli po dobu 24 hod. za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂) inkubované.

Následujúci deň sme pokračovali prípravou inkubačných roztokov zriedením zásobného roztoku TIR (10 mM) na 7 rôznych koncentrácií (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 µM). Do 7 vopred pripravených a označených Eppendorf skúmaviek sme najprv napipetovali určené množstvo DMEM. Do prvej skúmavky sme k 1276 µl DMEM pridali zásobný roztok TIR v objeme 6,4 µl. Z takto pripraveného roztoku s koncentráciou 50 µM sme do druhej skúmavky odobrali 582,4 µl a zmiešali s 582,4 µl DMEM, čím sme získali postupným riedením roztok s koncentráciou 25 µM. Všetky ostatné koncentrácie sme pripravovali týmto spôsobom tzv. riediacej rady (Tab. 1). Ako negatívnu kontrolu sme použili 10 % roztok dimetylsulfoxidu (DMSO) (dostatočná koncentrácia pre usmrtenie buniek) a roztok samotného média DMEM predstavoval pozitívnu kontrolu. Pokračovali sme postupným odsávaním starého média, ktoré

sme okamžite vymenili za 100 µl príslušného inkubačného roztoku/ kontroly. Takto pripravené bunky sme presunuli do inkubátora, kde boli inkubované za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂) po dobu 72 hod.

Tab. 1 Príprava vybraných koncentrácií TIR

Výsledná koncentrácia TKI (µM)	Faktor riedenia	Objem predchádzajúceho koncentrovanejšieho roztoku (µl)	Objem čistého média (µl)	Celkový objem (µl)
50	200,0	6,4	1276,0	700
25	2,0	582,4	582,4	700
10	2,5	464,8	697,2	700
5	2,0	462,0	462,0	700
1	5,0	224,0	896,0	700
0,5	2,0	420,0	420,0	700
0,1	5,0	140,0	560,0	700

Posledným krokom tohto experimentu bol samotný cytotoxický test MTT. Táto kolorimetrická metóda využíva schopnosť živých, metabolicky aktívnych buniek redukovať žlté tetrazoliové farbivo (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) za vzniku nerozpustných fialových kryštálov formazánu (Internet 9).

Po uplynutí 72 hod. inkubácie sme k bunkám po odsatí starého média napipetovali 100 µl vopred pripraveného detekčného roztoku. Ten sme pripravili zmiešaním sterilného puferu (PBS) s práškovým MTT podľa inštrukcií výrobcu kitu (3 mg MTT/ 1 ml PBS). Po uplynutí 30 min. inkubácie sme opatrne, bez narušenia kryštálov, odsali médium. Následne sme k bunkám pridali 100 µl 100 % DMSO, čím sme kryštály rozpustili za vzniku farebného roztoku. Následná kvantifikácia prebiehala pri vlnovej dĺžke 570 nm prostredníctvom Tecan spektrofotometra. Absorbanciu pozadia sme zmerali pri vlnovej dĺžke 690 nm a táto hodnota bola odčítaná. Množstvo živých buniek je priamo úmerné meranej intenzite absorbancie.

4.2.3 Inhibičné štúdie

Experiment sme začali nasadením buniek na 24-jamkovú doštičku (približne 300 000 buniek/ jamka), ktoré boli nasledujúcich 24 hod. inkubované za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂) v inkubátore. Pomocou zmiešavacej rovnice sme vypočítali potrebné množstvo bunkovej suspenzie a média. Po uplynutí stanovenej doby sme

skontrolovali bunkovú konfluenciu. Pokračovali sme prípravou transfekčného mixu zmiešaním jetPRIME puferu s prídavkom 0,25 µg plazmidov (pCI_AKR1C3/ pCI_EV) a 0,75 µl jetPRIME transfekčného reagentu. Takto pripravené transfekčné zmesi sme nechali po dobu 10 min. pri izbovej teplote (25 °C) inkubovať a v tomto čase sme vymenili staré médium za 500 µl čerstvého média. Po uplynutí inkubačnej doby sme bunky transfekovali postupným pipetovaním transfekčnej zmesi po kvapkách (37,5 µl) do jednotlivých jamiek doštičky. Transfekované bunky HCT116 boli prenesené do inkubátora pre následnú inkubáciu (24 hod.) za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂). Na druhý deň sme pokračovali prípravou inkubačných roztokov. Iniciačným krokom bolo pripraviť a nariediť 10 mM zásobný roztok TIR a 5 mM zásobný roztok DAUN. Z dôvodu možnej degradácie boli roztoky pripravované v deň experimentu. Zásobný roztok TIR (10 mM) bol pripravený rozpustením jeho práškovej formy v DMSO. Zásobný roztok DAUN (5 mM) bol pripravený rozpustením jeho práškovej formy v sterilnej vode pre injekcie (API).

V nasledujúcom kroku sme pomocou tzv. riediacej rady (t. j., pre prípravu roztoku TIR o požadovanej koncentrácii sa použije predchádzajúci koncentrovanejší roztok), pokračovali predriedením zásobného roztoku TIR (10 mM) v DMSO na 4 vopred stanovené koncentrácie (0,2; 1; 2; 10 mM). Takto pripravené roztoky TIR boli ďalej použité pri príprave pracovných roztokov s ešte nižšou koncentráciou TIR. Zásobný roztok DAUN (5 mM) bol zriedený stanoveným množstvom DMEM na pracovnú koncentráciu 5 µM. Roztok o tejto koncentrácii bol použitý pri príprave pracovných roztokov TIR (1; 5; 10; 50 µM).

Po odstránení starého média sme okamžite k bunkám transfekovaným plazmidom kódujúcim enzým (pCI_AKR1C3) pridali 800 µl čerstvého média s obsahom 5 µM DAUN bez (neinhibovaná reakcia) alebo s obsahom TIR v pracovných koncentráciách 1, 5, 10 a 50 µM (inhibovaná reakcia). K bunkám transfekovaným prázdny plazmidom (pCI_EV) sme pridali 800 µl čerstvého média s obsahom 5 µM DAUN bez TIR (negatívna kontrola). Nasledovala inkubácia za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂) po dobu 2 a 4 hod.

Po uplynutí definovanej doby (2 a 4 hod.) sme do vopred pripravených a označených Eppendorf skúmaviek preniesli médium z každej jednotlivej jamky a k bunkám sme následne pridali lyzačný pufer (pH 7,8; 25 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 % Triton X-100) v objeme 200 µl, ktorý sme nechali na bunky pôsobiť po dobu 10 min. Vzniknutý bunkový lyzáat sme preniesli do príslušných skúmaviek, kde bol zmiešaný s odobraným médiom. Nasledoval proces extrakcie vzniknutého metabolitu DAUNOLu, kde sme k bunkám pridali opakovane organickú

fázu v podobe etylacetátu (EA). V prvom prípade sme k bunkám pridali 1 ml EA a skúmavky boli následne po dobu 15 min. premiešavané na trepačke. Pokračovali sme premiestnením skúmaviek do centrifúgy na dobu 2 min. pri 14 500 rpm pre oddelenie organickej fázy odstredení. Následne sme do nových skúmaviek odobrali získaný supernatant (700 µl), znova sme pridali EA (700 µl) a proces popísaný vyššie sa zopakoval. Opakovanou extrakciou sme v konečnom dôsledku získali a odobrali 600 µl organickej fázy (EA), ktorú sme následne nechali odpariť v prostredí vákua pri teplote 30 °C. K získaným vzorkám bola následne pridaná mobilná fáza (40 µl), ktorá pozostávala z 0,1 % kyseliny mravčej a acetonitrilu (pomer 74:26 v/v). Vzorky boli zahriate na teplotu 37 °C, po dobu 5 min. vystavené pôsobeniu ultrazvuku a nakoniec stočené na centrifúge. Po každom spomenutom kroku boli poriadne premiešané (vortex). Následne sme do vialiek odobrali 30 µl roztoku zbaveného akýchkoľvek nečistôt. Pre nástrek na kolonu sa použil objem 10 µl.

Chromatografický systém detekoval redukciu produkovaný hydroxymetabolit DAUNOL, ktorý vznikol enzymatickým pôsobením AKR1C3. Pre samotnú analýzu sme použili UHPLC Agilent 1290 Series s kolónou Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 x 55 mm; 1,8 µm) a filtrom Infinity inline 1290. Podmienky použité pri analýze boli nasledovné: mobilná fáza 0,1 % kyselina mravčia/ acetonitril (v pomere 74:26 v/v), fluorescenčný detektor (excitačná/ emisná vlnová dĺžka- 480/ 560 nm), izokratická elúcia, prietoková rýchlosť 0,7 ml/ min, teplota 40 °C. Sledovaný parameter kvality bol retenčný čas DAUNOLu. Koncentrácia predstavovala parameter kvantity a bola vypočítaná na základe porovnania plochy pod píkom DAUNOLu s kalibračnou krivkou.

4.2.4 Kombinačné štúdie

Experiment sme začali nasadením buniek (približne 8 000 buniek/ jamka) na 96- jamkovú doštičku. Postup a výpočet potrebného množstva bunkovej suspenzie a média bol popísaný v predchádzajúcich experimentoch. Po 24 hod. inkubácii v inkubátore za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂), nasledovala bunková transfekcia (viď kapitola 4.2.2 Stanovenie cytotoxicity tirabrutinibu v transfekovaných bunkách HCT116). Po úspešnej transfekcii sme nasledujúci deň pokračovali prípravou inkubačných roztokov.

Pre potreby experimentu sme pomocou API zriedili zásobný roztok 5 mM DAUN na pracovnú koncentráciu 1 mM DAUN. Následne sme si pripravili 3 roztoky: jeden s obsahom čistého média DMEM s prídavkom DMSO a dva roztoky TIR o koncentrácii 5 a 10 µM. K takto pripraveným roztokom sme pridali predpísané množstvo pracovného roztoku

1 mM DAUN, ktorý sme následne riedili postupom riediacej rady na 7 vopred stanovených koncentrácií DAUN (0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 μ M). Získané roztoky tak boli buď bez inhibítora alebo s prídavkom inhibítora v dvoch rôznych koncentráciách 5 a 10 μ M v kombinácii s nariedeným zásobným roztokom DAUN na 7 koncentrácií. Kontrolný roztok 100 % bunkovej viability pozostával z čistého média s prídavkom DMSO (pozitívna kontrola) a kontrolný roztok 10 % DMSO predstavoval negatívnu kontrolu (0 % viabilita).

Po odstránení starého média sme k bunkám pipetovali takto pripravené inkubačné roztoky v objeme 100 μ l. Nasledovala inkubácia po dobu 72 hod. za štandardných podmienok (37 °C, 5 % CO₂). Po uplynutí predpísanej doby nasledoval cytotoxický test MTT pre stanovenie viability buniek (viď kapitola 4.2.2 Stanovenie cytotoxicity tirabrutinibu v transfekovaných bunkách HCT116).

Tab. 2 Príprava inkubačných roztokov

Finálne koncentrácie DAUN (μ M)	Faktor riedenia	Predchádzajúci koncentrovanejší roztok (μ l)	Objem DMEM/ TIR (μ l)	Celkový objem (μ l)
1	1000,00	1,9	1860,1	700,0
0,75	1,33	1162,0	387,3	700,0
0,5	1,50	849,3	424,7	700,0
0,25	2,00	574,0	574,0	700,0
0,1	2,50	448,0	672,0	700,0
0,05	2,00	420,0	420,0	700,0
0,01	5,00	140,0	560,0	700,0

Spracovanie nameraných dát

Pre štatistické vyhodnotenie nameraných dát sme použili programy MS Excel a GraphPad Prism verzia 9.3.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

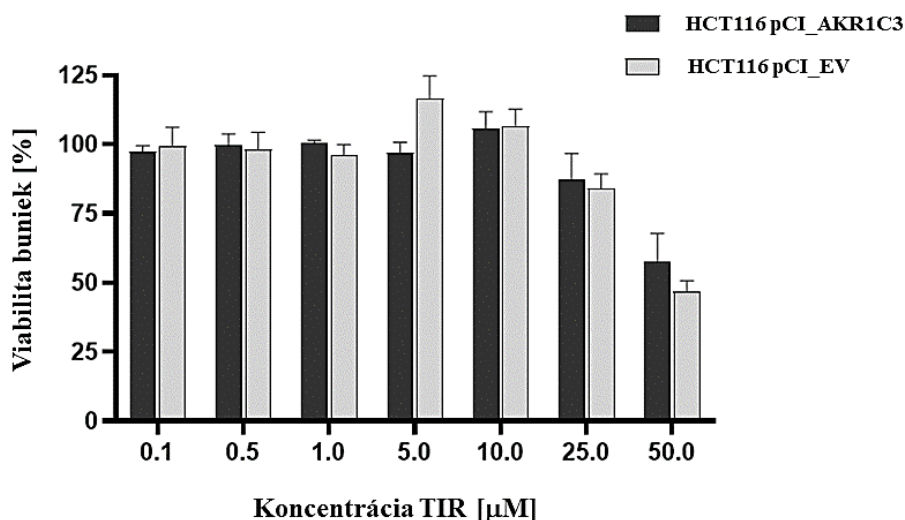
Vývoj rezistencie na podávanú terapiu je významnou prekážkou v liečbe nádorových ochorení, ktorá sa častokrát prejaví ako relaps alebo progresia ochorenia, poprípade úplným zlyhaním liečby vedúcej až k smrti pacienta (Liu et al., 2023; Wang et al., 2019).

Mechanizmy možného vzniku a vývoja rezistencie predstavujú široké spektrum pochodov, pričom aktivita a miera expresie enzýmov z nadrodín AKR a SDR má tiež svoj podiel v desenzitizácii buniek voči mnohým, inak veľmi účinným, protinádorovým liečivám. Viaceré CRE sa aktívne podieľajú na metabolizme ANTRA. Svojou aktivitou v rámci dvojelektrónovej redukcie sprostredkujú tvorbu hydroxymetabolitov (napr. DAUNOL), ktoré sú viac kardiotoxické než parentné látky a súčasne vykazujú mnohonásobne nižšiu protinádorovú aktivitu. Antracyklínreduktázy tak cestou metabolickej inaktivácie ANTRA prispievajú k vzniku a vývoju FK rezistencie voči týmto protinádorovým liečivám (Edwardson et al., 2015; Piska et al., 2017). Viaceré vedecké skupiny sa preto začali zaoberať otázkou využitia týchto enzýmov ako cieľových štruktúr, kde by inhibícia ich aktivity mohla predstavovať cestu k zmierneniu či prekonaniu rezistencie.

5.1 Určenie vplyvu tirabrutinibu na viabilitu transfekovanej bunkovej línie HCT116

Prostredníctvom MTT testu pre overenie metabolickej aktivity buniek sme stanovili vplyv študovaného TIR na životnosť buniek HCT116. Zvolené testované koncentrácie TIR boli v rozmedzí 0,1- 50 μM a na bunkovej línii boli testované v triplikáte. Po 72 hod. inkubácii buniek HCT116 so študovaným TIR nasledoval samotný MTT cytotoxický test. Ako 100 % kontrola bunkovej viability bolo k bunkám pridané čisté médium DMEM. V prípade 0 % kontroly viability sme k bunkám pipetovali 10 % DMSO. Výsledky uvedené v obr. 7 sú priemerom \pm smerodatná odchýlka (SD) z troch nezávislých experimentov.

Z prezentovaných výsledkov v obr. 7 je zrejmé, že vplyv TIR na viabilitu buniek HCT116 nebol významný. TIR teda nevykazoval významný cytotoxický efekt na študovanej bunkovej línii a IC_{50} preto nebola stanovená. Avšak najvyššia použitá koncentrácia 50 μM TIR už oproti ostatným viditeľne znížila bunkovú viabilitu, v prípade pCI_AKR1C3 buniek na 57,5 % a v prípade pCI_EV na 46,8 %. Na základe zistených dát sme pre nasledujúce kombinačné štúdie zvolili koncentrácie TIR 1, 5 a 10 μM , ktoré významne neovplyvňovali životnosť, ale vykazovali inhibičný účinok na AKR1C3.



Obr. 7 Vplyv TIR na viabilitu rôzne transfekovanej bunkovej línie HCT116 pCI_AKR1C3/ HCT116 pCI_EV. Získané dáta boli vyhodnotené prostredníctvom MTT testu. Uvedené výsledky sú priemerom \pm SD z troch nezávislých meraní.

Štúdium cytotoxicity skúmaného inhibítora TIR bolo prvým zo série navrhovaných experimentov v rámci tejto diplomovej práce. Tento experiment mal za cieľ screening potenciálnej toxicity, ale aj stanovenie možnej interakcie TIR s rakovinovými bunkami HCT116 do takej miery, ktorá by ovplyvnila ich viabilitu. V rámci svojej experimentálnej činnosti sa štúdiom cytotoxicity zaoberajú napr. štúdie Novotná et al. (2018a), Morell et al. (2021) alebo Čermáková et al. (2022).

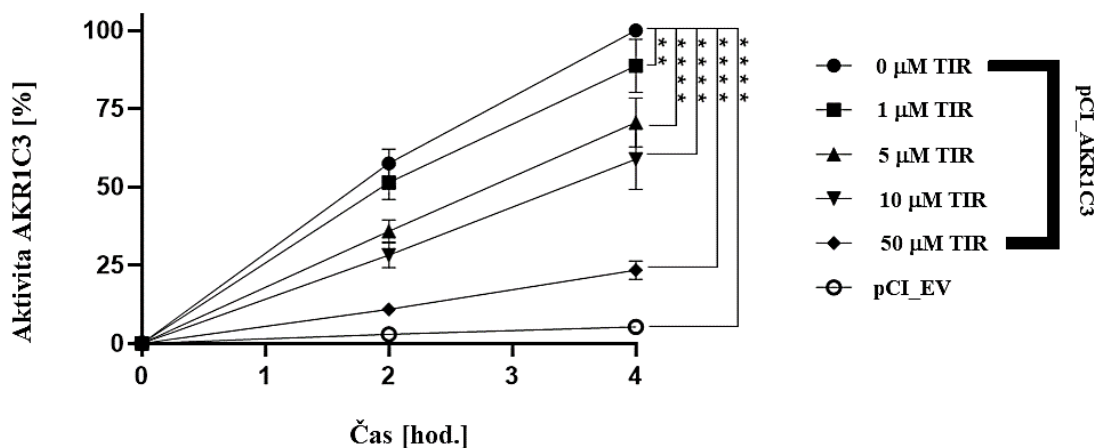
Novotná et al. (2018a), sa zaoberali štúdiom inhibítorov cyklín- dependentných kináz (CDKi) purvalanolom A a roscovitinom. Vo svojej štúdiu uvádzajú, že nimi testované CDKi neovplyvňovali životnosť bunkovej línie HCT116 ani po 6 hod. inkubácii so skúmanými látkami. Ďalej sa Morell et al. (2021) a Čermáková et al. (2022) tiež zaoberali aj štúdiom cytotoxicity nimi skúmaných látok a to midostaurínu (FLT3 receptorový inhibítor), resp. zanubrutinibu (BTK inhibítor). Podobne ako v predchádzajúcej štúdiu sledovali cytotoxicitu týchto látok prostredníctvom MTT cytotoxického testu a vo svojich štúdiách uvádzajú, že študované látky v použitých koncentráciách významne neovplyvnili bunkovú viabilitu. V rámci tejto diplomovej práce sme sa dopracovali k podobným výsledkom a teda, že nami skúmaný BTK inhibítor TIR tiež nevykazuje významný cytotoxický efekt a významne neovplyvňuje viabilitu buniek HCT116, s výnimkou najvyššej použitej koncentrácie 50 μ M.

5.2 Určenie inhibičného účinku tirabrutinibu na aktivitu enzýmu AKR1C3

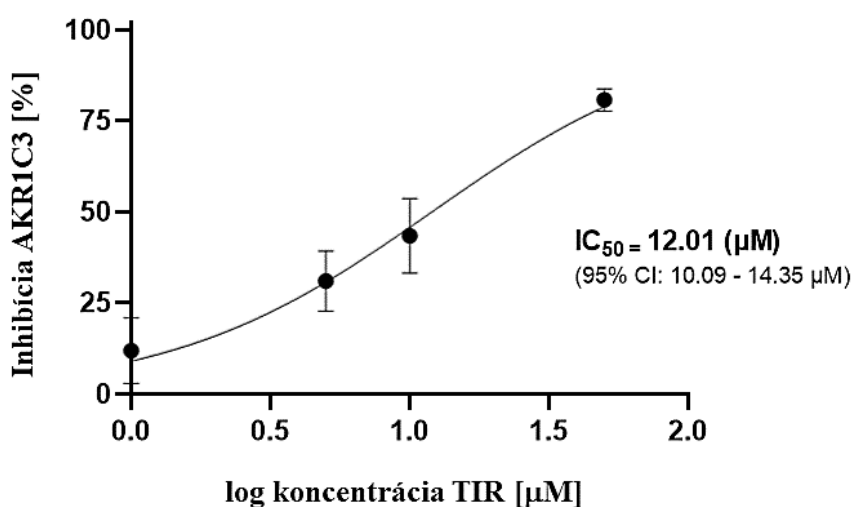
Preukazuje sa, že zníženie enzymatickej aktivity AKR1C3 a teda jej inhibícia, je javom žiadaným, pretože inhibícia redukčného účinku tohto enzýmu na karbonylovú skupinu má za následok zníženie produkcie nežiaducich a toxických alkoholických metabolitov. Inhibičný účinok na aktivitu AKR1C3 tak môže stáť za znížením rizika nielen kardiotoxicity, ale aj vzniku a vývoja rezistencie. Tiež môže byť cestou na prekonanie rezistencie ANTRA, hlavne v prípadoch jej overexpresie. Viaceré štúdie sa zaoberali skúmaním látok s možnou inhibičnou aktivitou. Predmetom tejto diplomovej práce bolo štúdium inhibičného účinku tirabrutinibu na úrovni rôzne transfekovanej rakovinovej bunkovej línie HCT116. Predkladaná práca je vypracovaná okrem iného aj v nadväznosti na získané poznatky v rámci diplomovej práce (Kašparová, 2022), ktorá tiež skúmala vplyv TIR na viaceré antracyklínreduktázy, avšak v prostredí *in vitro*. Dopracovala sa k záveru, že TIR vykazoval významný inhibičný účinok iba voči AKR1C3. V prípade ostatných skúmaných CRE TIR nevykazoval žiadajú aktivitu, a preto sme ďalej pokračovali v skúmaní TIR na bunkovej úrovni HCT116 s nadmernou expresiou AKR1C3.

Tento experiment mal za cieľ určenie inhibičného účinku TIR na metabolickú redukciu DAUN sprostredkovanú enzýmom AKR1C3 na bunkovej úrovni. Neinhibovaná reakcia predstavovala bunky HCT116 transfekované plazmidom pCI_AKR1C3, ktoré sme inkubovali s 5 μM DAUN a DMSO (namiesto inhibítora). Bunky HCT116 transfekované prázdny plazmidom pCI_EV (negatívna kontrola) boli inkubované roztokom 5 μM DAUN a DMSO (namiesto inhibítora). DMSO sme použili z dôvodu zachovania rovnakých reakčných podmienok vzhľadom k faktu, že použitý inhibítor bol v DMSO riedený a potenciálne by mohol mať určitý vplyv na aktivitu enzýmu. V prípade inhibovaných reakcií boli bunky inkubované po dobu 2 a 4 hod. roztokom 5 μM DAUN s TIR v určených koncentráciách 1, 5, 10 alebo 50 μM . Reakcie boli uskutočnené pre každú koncentráciu v duplikátoch.

Obr. 8 a 9 zobrazujú získané experimentálne dáta, ich priemery a SD z troch nezávisle uskutočnených experimentov. Stredná inhibičná koncentrácia IC_{50} bola stanovená v prípade 4 hod. inkubácie. Aktivita enzýmu AKR1C3 bola vypočítaná prevedením množstva DAUNOLu (ng) získaného z reakcie na percentá (%) a hodnota IC_{50} bola vypočítaná v programe GraphPad Prism 9.3.1.



Obr. 8 Vplyv TIR na metabolickú redukciu DAUN v rôzne transfekovaných bunkách HCT116 (pCI_AKR1C3/pCI_EV). Vzorok boli odoberané po 2 a 4 hod. 100 % aktivita enzýmu AKR1C3 predstavovala množstvo získaného DAUNOLu po 4 hod. inkubácii v prípade neinhibovanej reakcie (0 μM TIR) buniek transfekovaných pCI_AKR1C3. K tejto hodnote sme vzťahli ostatné namerané dáta. Pre posúdenie štatistickej významnosti sme použili vybraný štatistický test (jednosmerná ANOVA s následným post hoc Dunnettovým testom). ** $p < 0,01$ a **** $p < 0,0001$ v porovnaní s pCI_EV (negatívna kontrola).



Obr. 9 Závislosť miery AKR1C3 inhibície na log koncentrácii TIR, z ktorého bola určená IC_{50} a jej CI (konfidenčný interval).

Z obr. 8 je zrejmé, že v prípade inhibovaných reakcií, a teda po prídavku TIR, bolo množstvo vzniknutého DAUNOLu významne nižšie. So zvyšujúcou sa koncentráciou TIR klesalo množstvo vzniknutého DAUNOLu nepriamo úmerne. Vo všetkých použitých

koncentráciach vykazoval TIR štatisticky významný inhibičný účinok voči enzymatickej aktivite AKR1C3. V prípade 1 μM TIR bola štatistická významnosť nižšia v porovnaní s ostatnými reakciami, ktoré vykazovali najvyššiu možnú štatistickú významnosť. Presnejšie 1 μM TIR inhiboval aktivitu AKR1C3 po 4 hod. o 11,29 %, 5 μM TIR o 29,43 %, 10 μM TIR o 41,17 % a aktivitu najviac inhibovala najvyššia použitá koncentrácia 50 μM a to o 76,56 %.

V obr. 9 môžeme pozorovať, že so stúpajúcou koncentráciou TIR dochádza k priamo úmernej inhibícii aktivity AKR1C3. Inhibičná aktivita je teda závislá nielen na čase reakcie, ale závisí tiež od použitej koncentrácie inhibítora. IC_{50} je definovaná ako koncentrácia inhibítora, ktorá zníži pôvodnú aktivitu enzýmu na polovicu. Hodnota IC_{50} bola v našom prípade stanovená pre TIR a predstavovala hodnotu 12,01 μM s CI 95 % medzi hodnotami 10,09 až 14,35 μM . Klinicky výhodné je dosiahnutie čo najnižšej hodnoty IC_{50} , ktorá koreluje s vysokou inhibičnou účinnosťou danej látky. V takom prípade je možné inhibítor podávať v nižšej dávke, čo prispieva k minimalizácii výskytu NÚ. Žiadaný účinok je však zachovaný a zároveň je tak zvýšená bezpečnosť aplikovanej terapie.

Skúmaním látok s inhibičnou aktivitou voči významným antracyklínreduktázam z nadrodín AKR a SDR sa v posledných rokoch zaoberali viaceré štúdie ako napr. buparlisib (Bukum et al., 2019), roscovitin a purvalanol A (Novotná et al., 2018a), ACA a IBR (Morell et al., 2020), olaparib (OLA) (Tavares et al., 2020).

Bukum et al. (2019), sa zaoberala štúdiom inhibičného účinku buparlisibu (inhibítor PI3K) na aktivitu viacerých reduktáz z nadrodín AKR a SDR, vrátane AKR1C3, prebiehajúcich *in vitro*, ale aj na úrovni rakovinovej bunkovej línie HCT116. Štúdia prebiehajúca *in vitro* preukázala, že buparlisib vykazuje najväčšiu inhibičnú aktivitu voči izoforme AKR1C3. V použitej koncentrácii 10 μM buparlisib vykazoval 48,7 %; v prípade 50 μM 80,6 % inhibičný účinok na aktivitu AKR1C3, so stanovenou IC_{50} 9,51 μM . V prípade experimentov uskutočnených na prechodne transfekovanej bunkovej línii HCT116 pCI_AKR1C3, viedli výsledky k podobnému záveru a k významnej inhibícii dochádzalo aj na bunkovej úrovni. V ďalšej štúdii sa Novotná et al. (2018a), zamerali na štúdium inhibičnej aktivity roscovitinu a purvalanolu A (CDKi), ktoré boli označené za účinné inhibítory izoformy AKR1C3. Purvalanol A vykazoval pri 10 μM 67,63 % a pri 50 μM 89,36 % inhibičnú aktivitu s IC_{50} 6,58 μM . Roscovitin vykazoval pri 10 μM 78,27 % a pri 50 μM 93,67 % inhibičnú aktivitu s IC_{50} 2,15 μM , a bol teda účinnejší než druhá, súčasne skúmaná látka. K podobným výsledkom sa v tejto štúdii dopracovali aj na bunkovej úrovni.

Morell et al. (2020), študoval inhibičné účinky ACA a IBR (inhibítory BTK) voči rôznym CRE zapojených v metabolizme ANTRA. Oba inhibítory vykázali signifikantnú a rovnocennú inhibíciu len v prípade AKR1C3. V použitej koncentrácii 10 μM ACA vykazoval 89,55 %; v prípade 50 μM 96,28 %, zatiaľ čo IBR pri 10 μM 92,17 %; v prípade 50 μM 96,41 %. Pre porovnanie s hodnotami získanými v *in vitro* štúdiách, vykazovali inhibítory na bunkovej úrovni rozdielnu mieru inhibície, a to pri použitej koncentrácii 10 μM inhiboval aktivitu AKR1C3 po 5 hod. ACA z 65,56 %; IBR z 60,72 %. Z publikovaných výsledkov je zrejmé, že obidva inhibítory vykazovali významný inhibičný účinok voči aktivite AKR1C3, ktorý bol v závislosti od použitej koncentrácie inhibítora a času reakcie. Taktiež si môžeme všimnúť, že miera inhibície sa líšila v porovnaní s *in vitro* hodnotami. Na bunkovej línii bola dosiahnutá významná inhibícia aktivity enzýmu, avšak v porovnaní s *in vitro*, boli hodnoty znateľne nižšie. Ďalej, predmetom štúdie od Tavares et al. (2020), bolo skúmanie inhibičného účinku OLA na AKR1C3 tak na úrovni *in vitro*, ako aj na bunkovej úrovni. V *in vitro* štúdií vykazoval OLA pri použitej koncentrácii 10 μM inhibičnú aktivitu 76 %, zatiaľ čo pri 50 μM 91,4 % s IC_{50} 2,48 μM . Avšak, nameraná hodnota v prípade experimentov uskutočnených na bunkovej línii HCT116 bola vyššia, a to IC_{50} 5,91 μM . Z nameraných výsledkov je teda zrejmé, že v prípade experimentov na bunkovej línii, vykazoval OLA nižší inhibičný účinok oproti hodnotám získaným v *in vitro* štúdiách.

Látky tohto charakteru sú predmetom skúmania aj na katedre biochemických vied FaF UK ako súčasť práce vedeckej skupiny pod vedením prof. Ing. Vladimíra Wsóla, Ph.D. V nasledujúcich diplomových prácach sa zaoberali skúmaním vybraných inhibítorov na AKR1C3, menovite: OLA (inhibičná aktivita pri 10 μM 74,6 %; pri 50 μM 91,2 %), midostaurín (pri 10 μM 87,06 %; pri 50 μM 93,19 %), enasidenib (pri 10 μM 86,3 %; pri 50 μM 97 %), belostat (pri 10 μM 50,7 %; pri 50 μM 89,2 %), ale aj ďalšími inhibítormi, ktoré však vykazovali omnoho nižšiu inhibičnú aktivitu, ako napr. talazoparib, glasdegib či quizartinib, a to nielen v porovnaní s vyššie spomenutými inhibítormi, ale aj v porovnaní s TIR (Lekešová, 2021; Milan, 2019; Pěčková, 2021; Slámová, 2021). Kašparová (2022), sa v rámci svojej diplomovej práce zaoberala štúdiom aktivity a vplyvu TIR v *in vitro* podmienkach na viaceré antracyklínreduktázy. Svojimi výsledkami prezentuje, že TIR vykazoval významnú inhibičnú aktivitu iba voči AKR1C3, pričom voči ostatným skúmaným CRE (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10 a CBR1) vykazoval minimálny alebo žiadny účinok. Skúmaný TIR pri použitej koncentrácii 10 μM inhiboval aktivitu enzýmu AKR1C3 z 73,2 %; pri 50 μM z 90,25 %. Stanovená priemerná IC_{50} predstavovala hodnotu 3,59 μM .

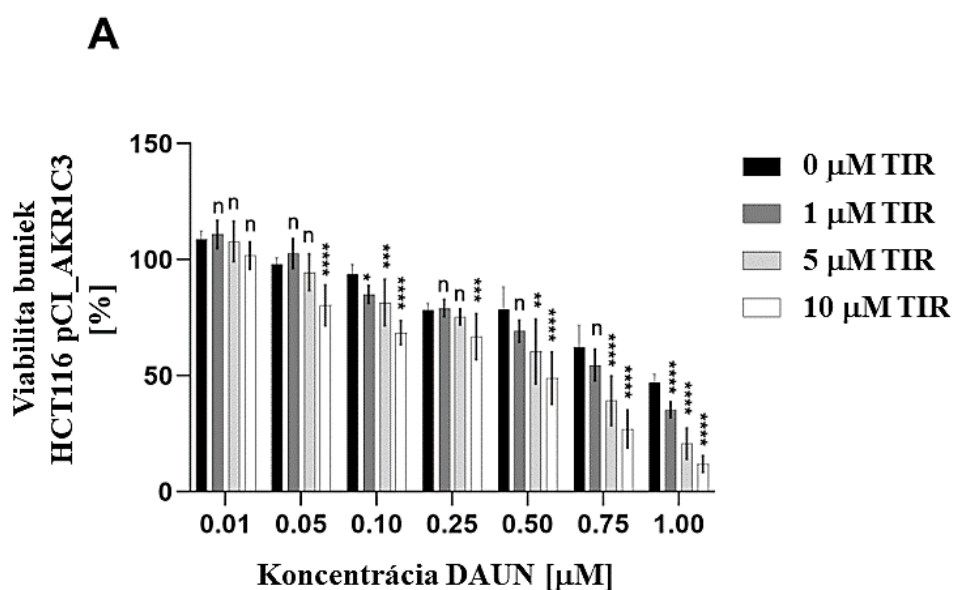
Z nameraných hodnôt je zrejmé, že inhibičný účinok bol významne nižší v prípade experimentov na bunkovej úrovni. Tento trend je popísaný aj vo vyššie spomínaných štúdiách.

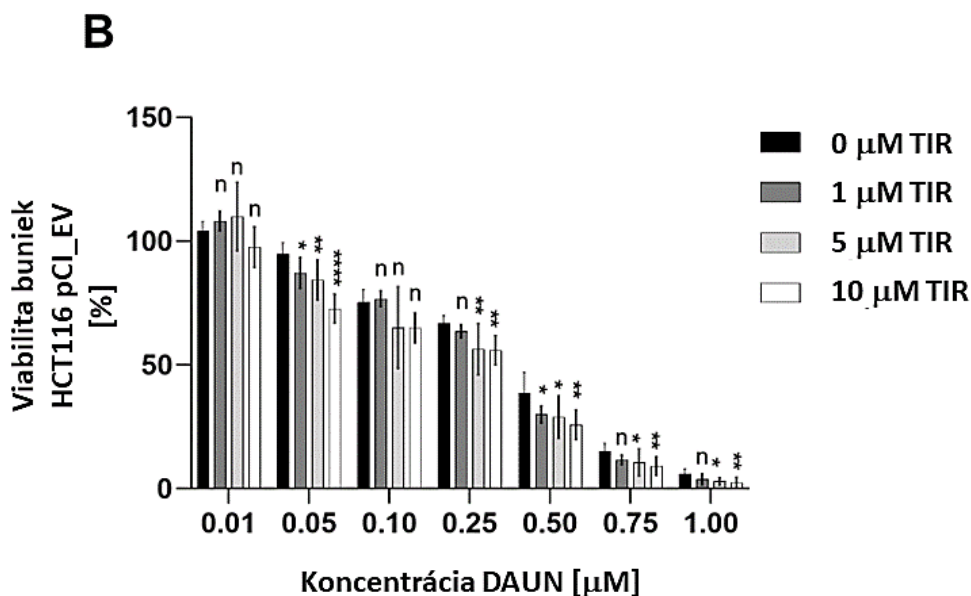
V porovnaní s vyššie uvedenými štúdiami vykazuje nami skúmaný inhibítor TIR nižšiu inhibičnú aktivitu ako OLA, ACA, IBR, purvalanol A a roscovitin. Avšak, podobnú inhibičnú aktivitu ako buparlisib. Nami získaná hodnota IC_{50} pre TIR predstavovala 12,01 μM a v porovnaní s vyššie uvedenými je výrazne vyššia ako nasledujúce hodnoty namerané pre OLA (IC_{50} 3,77 μM), midostaurín ($IC_{50} < 1 \mu\text{M}$), enasidenib (IC_{50} 1,035 μM), či belistat (IC_{50} 9,5 μM) (Lekešová, 2021; Milan, 2019; Pěčková, 2021; Slámová, 2021). Tieto dáta ďalej potvrdzujú fakt, že TIR vykazuje v porovnaní s uvedenými inhibítormi na bunkovej úrovni nižšiu inhibičnú aktivitu, a je teda slabším inhibítorom AKR1C3.

5.3 Kombinačné štúdie

Tento experiment mal za cieľ porovnanie vplyvu použitých kombinácií DAUN s TIR s vplyvom samotného DAUN v bunkovej línii HCT116 transfekovanou prázdny plazmidom pCI_EV alebo plazmidom kódujúcim enzým pCI_AKR1C3. V predošlom experimente sme zistili, že TIR vykazuje inhibičný účinok na metabolickú premenu DAUN na DAUNOL. Možno teda predpokladať, že použitie TIR v kombinácii s DAUN bude inhibovať enzymatickú aktivitu AKR1C3 a zároveň prispievať k zvyšovaniu cytotoxickej účinnosti DAUN (t. j., resenzitizácii rezistentných buniek voči DAUN) a môže tak predstavovať jednu z možných ciest pre prekonanie rezistencie voči ANTRA.

Na transfekovanej bunkovej línii sme porovnávali vplyv samotného DAUN (0,01-1 μM) a jeho kombinácie s TIR (1; 5; 10 μM) na viabilitu bunkovej línii HCT116, ktorú sme vyhodnocovali na základe MTT testu. Zvolené koncentrácie TIR vychádzali z výsledkov predošlého experimentu. Pre overenie bunkovej viability sme použili kontrolné roztoky 10 % DMSO (negatívna kontrola- 0 % viabilita) a DMEM s DMSO (pozitívna kontrola- 100 % viabilita). Pred uskutočnením MTT testu boli bunky HCT116 so študovanými látkami inkubované po dobu 72 hod. Obr. 10 A/ B zobrazuje prehľad použitých koncentrácií DAUN a TIR, ich kombinácie, pozorovaný inhibičný účinok a vplyv na životnosť rôzne transfekovanej bunkovej línii HCT116 (pCI_AKR1C3/ pCI_EV).





Obr. 10A a 10B Vplyv kombinácie zvolených koncentrácií DAUN s TIR na životnosť HCT116 buniek transfekovaných plazmidom kódujúcim pCI_AKR1C3 (10A) a buniek transfekovaných prázdny plazmidom pCI_EV (10B). Pre vyhodnotenie dát bol použitý MTT test. Uvedené výsledky sú priemerom \pm SD z troch nezávisle uskutočnených experimentov. Program GraphPad Prism 9.3.1 bol použitý pre štatistické vyhodnotenie získaných dát (n- štatisticky nesignifikantná zmena; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Pre posúdenie štatistickej významnosti sme použili vybraný štatistický test (jednosmerná ANOVA s následným post hoc Dunnettovým testom).

Grafy zobrazujú kombinačné štúdie uskutočnené na jednej bunkovej línii HCT116, ktorá síce prirodzene exprimuje enzým AKR1C3 ale iba minimálne (t. j. v zanedbateľnom množstve) (Hofman et al., 2014), a preto bola v prvom prípade bunková línia transfekovaná plazmidom kódujúcim enzým pCI_AKR1C3 (Obr. 10A) so suspekciou pre sprostredkovanie rezistencie. V druhom prípade boli bunky transfekované prázdny plazmidom pCI_EV (obr. 10B).

Z obr. 10A je zrejmé, že redukčná aktivita enzýmu AKR1C3 má svoju rolu v sprostredkovaní rezistencie voči DAUN. Viabilita buniek je výrazne vyššia v prípade samotného DAUN (neinhibovanej reakcie) než pri porovnaní rovnakej reakcie v prípade buniek HCT116 pCI_EV (negatívna kontrola) na obr. 10B. V prípade porovnávaných bunkových línii je jediným rozdielom práve schopnosť, resp. neschopnosť nadmernej expresie AKR1C3 enzýmu. HCT116 bunky pCI_AKR1C3 (Obr. 10A) s nadmernou expresiou enzýmu sú teda odolnejšie (t. j. rezistentné), voči pôsobeniu samotného DAUN. Redukciu

produkovaný DAUNOL je významne menej cytotoxicky účinný, čo sa prejaví ako zvýšená životnosť rakovinovej bunkovej línie. Po pridaní TIR v troch uvedených koncentráciách môžeme sledovať signifikantné zmeny viability kombinácie DAUN s TIR v smere resenzitizácie buniek voči pôsobeniu DAUN. So zvyšujúcou sa koncentráciou TIR bol vplyv ich kombinácie na obnovenie citlivosti buniek o to viac významnejší.

V druhom prípade, u buniek transfekovaných prázdny plazmidom pCI_EV, je na obr. 10B viditeľné, že viabilita buniek so zvyšujúcou sa koncentráciou DAUN klesá. Bunky sú voči DAUN citlivé, pretože v tomto prípade chýba faktor sprostredkujúci rezistenciu (t.j. nadmerná expresia AKR1C3). Bunky HCT116 pCI_EV tak nie sú rezistentné a DAUN vykazuje očakávaný cytotoxický účinok. Kombinácia TIR s DAUN v tomto prípade nevedla k zvýšeniu cytotoxického účinku DAUN. TIR nevykazoval inhibičný účinok, resp. neinhiboval metabolickú inaktiváciu DAUN cestou inhibície AKR1C3 enzýmu, pretože táto bunková línia AKR1C3 síce exprimuje, ale iba minimálne (t.j. zanedbateľne).

V štúdií sa Hofman et al. (2014), zaoberali úlohou izoformy AKR1C3 v sprostredkovaní vzniku rezistencie na DAUN a IDA mechanizmom redukcie spomínaných ANTRA na menej protinádorovo účinné, ale zároveň aj viac toxické hydroxymetabolity. Spomedzi skúmaných ANTRA sa ako najvhodnejší substrát pre AKR1C3 javil DAUN. Preukázali rolu AKR1C3 v smere zvýšenia rezistencie nádorových buniek schopnosťou tohto enzýmu svojou redukčnou aktivitou znižovať protinádorový účinok DAUN. Zároveň preukázali, že podanie špecifického inhibítora AKR1C3 2'-hydroxyflavanonu významne ovplyvnilo rezistenciu nádorových buniek smerom k jej zvráteniu a teda podanie špecifického inhibítora spelo k obnoveniu citlivosti buniek na podávané protinádorové liečivá. Táto skutočnosť naznačuje, že použitie ANTRA v kombinácii so špecifickými inhibítormi AKR1C3, by mohla byť jednou z efektívnejších stratégií pri liečbe nádorov s nadmernou expresiou AKR1C3 enzýmu.

Využitím tejto farmakologickej stratégie na ceste k prekonaniu rezistencie sa zaoberali viaceré štúdie, ktorých predmetom bolo skúmanie kombinácie ANTRA s vybraným inhibítorom na úrovni bunkovej línie s nadmernou expresiou AKR1C3. V štúdií od Novotná et al. (2018a; 2018b), pokračovali ďalej aj v študovaní využitia kombinácie DAUN s purvalanolom A/ roscovitinom a dinaciclibom. Ich výsledky preukázali synergizmus tejto kombinácie a teda, že tieto inhibítory nielen vykazovali inhibičný účinok na aktivitu AKR1C3, ale zároveň prispievali k zvýšenej cytotoxicite DAUN, čo viedlo k obnoveniu citlivosti buniek a prekonaniu rezistencie. Morell et al. (2020; 2021), v prípade študovaných kombinácií DAUN

s IBR, ACA alebo midostaurínom preukázali, že študované inhibítory potencoali cytotoxický účinok DAUN významnou inhibičnou aktivitou voči AKR1C3 nielen *in vitro*, ale aj na bunkovej úrovni. K podobným výsledkom synergického pôsobenia, v prípade bunkových línii s nadmernou expresiou AKR1C3, sa dopracovali aj v prípade štúdií Tavares et al. (2020), kde skúmali kombináciu DAUN s OLA alebo aj v prípade štúdie Čermáková et al. (2022), s kombináciou zanubrutinib (ZAN) / DAUN.

Keďže vo vyššie spomínaných štúdiách už preukázali synergický efekt u iných typov BTK inhibítorov (napr. IBR, ACA, ZAN), je teda predpoklad podobného účinku aj v prípade nášho skúmaného BTK inhibítora TIR. Výsledkom našich kombinačných štúdií sme potvrdili, že TIR významne inhibuje aktivitu AKR1C3, zvyšuje cytotoxický účinok DAUN, čím dochádza k obnoveniu citlivosti buniek, a teda k prekonaniu rezistencie v prípade HCT116 pCI_AKR1C3 bunkovej línii s nadmernou expresiou AKR1C3. Aj naše výsledky sa tak prikláňajú k ostatným štúdiám, ktoré naznačujú, že využitie spoločného podávania BTK inhibítorov môže slúžiť ako cesta pre zlepšenie terapeutickkej účinnosti ANTRA, za súčasnej možnosti zníženia podávanej dávky ANTRA a teda v konečnom dôsledku aj k zníženiu výskytu ostatných NÚ ANTRA. Avšak, pre potvrdenie či vyvrátenie tohto synergického účinku pre kombináciu DAUN/ TIR je nutné vykonanie ďalších potrebných experimentov.

6 ZÁVER

V rámci predkladanej diplomovej práce sme sa zaoberali štúdiom inhibičnej aktivity tyrozínkinázového inhibítora TIR voči vybranému enzýmu z nadrodiny AKR, menovite AKR1C3, na rakovinovej bunkovej línii HCT116. Ďalej sme sa zaoberali aj skúmaním kombinácie DAUN so spomínaným inhibítorom. Vzhľadom k získaným výsledkom môžeme skonštatovať, že stanovené ciele tejto diplomovej práce sme splnili.

- Pomocou cytotoxického testu MTT sme zistili, že TIR v použitých koncentráciách nevykazoval významný cytotoxický efekt na študovanej bunkovej línii a nemal teda významný vplyv na životnosť buniek HCT116. Avšak pri nami použitej najvyššej koncentrácii (50 μ M) sme už mohli pozorovať pokles bunkovej viability.
- Úspešnosť prechodnej transfekcie buniek HCT116 prázdny (pCI_EV) a plazmidom kódujúcim izoformu AKR1C3 (pCI_AKR1C3) bola potvrdená vzhľadom k nameraným dátam v následných experimentoch, ktoré poukázali na prítomnosť, resp. neprítomnosť skúmaného enzýmu.
- Študovaný inhibičný účinok TIR na aktivitu enzýmu AKR1C3, s využitím DAUN ako substrátu, bol potvrdený na rôzne transfekovanej bunkovej línii HCT116. Hodnota IC₅₀ TIR, pri ktorej klesla aktivita enzýmu AKR1C3 na polovicu, bola 12,01 μ M.
- Pomocou experimentov v rámci našich kombinačných štúdií sme preukázali, prostredníctvom cytotoxického testu MTT, že v prípade HCT116 pCI_AKR1C3 bunkovej línii s nadmernou expresiou AKR1C3, TIR významne inhibuje redukčnú aktivitu AKR1C3, čím dochádza k zvýšeniu (obnoveniu) citlivosti buniek voči DAUN, zvýšeniu cytotoxického účinku DAUN, a teda k prekonaniu rezistencie voči ANTRA.

Výsledky namerané v rámci tejto diplomovej práce ďalej nadväzujú na predchádzajúce poznatky a tiež sa prikláňajú k možnosti, že spoločné podávanie skúmaného inhibítora TIR s ANTRA môže predstavovať potencionálnu cestu pre prekonanie rezistencie, zvýšenie efektivity a bezpečnosti terapie ANTRA, a to najmä v prípadoch patologických stavov s nadmernou expresiou AKR1C3. V budúcnosti by bolo vhodné ďalej pokračovať v skúmaní kombinácie DAUN/ TIR pre potvrdenie alebo vyvrátenie možného synergického pôsobenia *in vivo*.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

3 α -HSDs	3 α - hydroxysteroiddehydrogenázy
ABC	(ang.) ATP- binding cassette
ACA	acalabrutinib
AKR	aldo-ketoreduktázy
AMK	aminokyselina
ANTRA	antracyklínové antibiotiká
API	ultračistá voda (voda pre injekcie)
ATP	adenozíntrifosfát
BCR	B- bunkový receptor
BCRP	(ang.) breast cancer resistance protein
BTK	Brutónová kináza
CBR	(ang.) carbonyl reductase
CDK	cyklín-dependentná kináza
CDKi	inhibítor cyklín-dependentnej kinázy
CI	konfidenčný interval
CNS	centrálny nervový systém
CRE	(ang.) carbonyl reducing enzymes
DAUN	daunorubicín
DAUNOL	daunorubicinol
DEX	dexrazoxan
DMEM	(ang.) Dullbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina

DOX	doxorubicín
DOXOL	doxorubicinol
EA	etylacetát
EPI	epirubicín
FBS	fetálne bovinné sérum
FK	farmakokinetika
FLT3	(ang.) FMS- like tyrosine kinase 3 receptor inhibitor
GABA	kyselina gama-aminomaslová
IBR	ibrutinib
IC ₅₀	polovičná inhibičná koncentrácia
IDA	idarubicín
KVS	kardiovaskulárny systém
MDR	dehydrogenázy/ reduktázy so stredne dlhým reťazcom
MDR1	(ang.) multidrug resistance gene 1
MRP	(ang.) multidrug resistance associated proteins
MTT	kolorimetrický test k určení bunkovej viability
NAD(H)	nikotínamidadeníninukleotid
NADP(H)	nikotínamidadeníninukleotidfosfát
NRTK	nereceptorová tyrozínkináza
ns	štatisticky nevýznamná zmena
NÚ	nežiaduce účinky
OATP1A2	(ang.) organic anion transporting polypeptide-A
OCT1	(ang.) organic cation transporter 1
OLA	olaparib

PG	prostaglandín
P- gp	P- glykoproteín
PBS	fosfátový pufer
pCI_AKR1C3	plazmid kódujúci enzým AKR1C3
pCI_EV	prázdny plazmid
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PK	proteínkináza
PPAR γ	(ang.) peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RF	rizikové faktory
ROS	(ang.) reactive oxygen species
RTK	receptorová tyrozínkináza
RYR2	ryanodínový receptor 2
SD	smerodatná odchýlka
SDR	(ang.) short- chain dehydrogenases/ reductases
SLC	(ang.) solute carrier transporters
SR	sarkoplazmatické retikulum
TIM	triózafosfátizomeráza
TIR	tirabrutinib
TK	tyrozínkináza
TKI	tyrozínkinázový inhibítor
TOP	topoizomeráza
TOP2	topoizomeráza II
TOP2 β	β -izomér topoizomerázy II
TOP2 α	α -izomér topoizomerázy II

UHPLC

ultravysokoučinná kvapalinová chromatografia

ZAN

zanubrutinib

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*, 21(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>
- Andreev, E., Brosseau, N., Carmona, E., Mes-masson, A. -marie, & Ramotar, D. (2016). The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. *Scientific reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep20508>
- Arora, A., & Scholar, E. M. (2005). Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315(3), 971-979. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084145>
- Ax, W., Soldan, M., Koch, L., & Maser, E. (2000). Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochemical Pharmacology: an international journal devoted to research into the development of biologically active substances and their mode of action at the biochemical and subcellular level*, 59(3), 293-300. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00322-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00322-6)
- Bains, O. S., Takahashi, R. H., Pfeifer, T. A., Grigliatti, T. A., Reid, R. E., & 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. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.018895>
- Banerjee, S., & Turksen, K. (2021). Aldo Keto Reductases AKR1B1 and AKR1B10 in Cancer: Molecular Mechanisms and Signaling Networks. In *Aldo Keto Reductases AKR1B1 and AKR1B10 in Cancer: Molecular Mechanisms and Signaling Networks* (Vol. 1347, pp. 65-82). Springer. https://doi.org/10.1007/5584_2021_634
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M., & Bhatnagar, A. (2008). The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug metabolism reviews*, 40(4), 553-624. <https://doi.org/10.1080/03602530802431439>
- Bayles, C. E., Hale, D. E., Konieczny, A., Anderson, V. D., Richardson, C. R., Brown, K. V., Nguyen, J. T., Hecht, J., Schwartz, N., Kharel, M. K., Amisshah, F., Dowling, T. C., & Nybo, S. E. (2023). Upcycling the anthracyclines: New mechanisms of action, toxicology, and pharmacology. *Toxicology and applied pharmacology*, 459, 116362. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116362>

- Benedetti, M. S., Whomsley, R., Poggesi, I., Cawello, W., Mathy, F. X., Delporte, M. L., Papeleu, P., & Watelet, J. B. (2009). Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug metabolism reviews*, *41*(3), 344-390. <https://doi.org/10.1080/10837450902891295>
- Bhanumathy, K., Balagopal, A., Vizeacoumar, F. S., Vizeacoumar, F. J., Freywald, A., & Giambra, V. (2021). Protein Tyrosine Kinases: Their Roles and Their Targeting in Leukemia. *Cancers*, *13*(2), 184–. <https://doi.org/10.3390/cancers13020184>
- Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Williams, J., Rayner, M., & Townsend, N. (2015). The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014. *Heart*, *101*(15), 1182-1189. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307516>
- Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular cancer*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>
- Bortolozzi, R., Bresolin, S., Rampazzo, E., Paganin, M., Maule, F., Mariotto, E., Boso, D., Minuzzo, S., Agnusdei, V., Viola, G., te Kronnie, G., Cazzaniga, G., Basso, G., & Persano, L. (2018). AKR1C enzymes sustain therapy resistance in paediatric T-ALL. *British journal of cancer*, *118*(7), 985-994. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0014-0>
- Bukum, N., Novotna, E., Morell, A., Hofman, J., & Wsol, V. (2019). Buparlisib is a novel inhibitor of daunorubicin reduction mediated by aldo-keto reductase 1C3. *Chemico-Biological Interactions*, *302*, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.026>
- Bures, J., Jirkovska, A., Sestak, V., Jansova, H., Karabanovich, G., Roh, J., Sterba, M., Simunek, T., & Kovarikova, P. (2017). Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite. *Toxicology (Amsterdam)*, *392*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.09.012>
- Capelôa, T., Benyahia, Z., Zampieri, L. X., Blackman, M. C. N. M., & Sonveaux, P. (2020). Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines. *Seminars in cell & developmental biology*, *98*, 181-191. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.006>

- Cortés-Funes, H., & Coronado, C. (2007). Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovascular toxicology*, 7(2), 56-60. <https://doi.org/10.1007/s12012-007-0015-3>
- Croom, E. (2012). Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. In *Metabolism of Xenobiotics of Human Environments* (Vol. 112, pp. 31-88). Elsevier/Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9>
- Čermáková, L., Hofman, J., Laštovičková, L., Havlíčková, L., Špringrová, I., Novotná, E., & Wsól, V. (2022). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Zanubrutinib Effectively Modulates Cancer Resistance by Inhibiting Anthracycline Metabolism and Efflux. *Pharmaceutics*, 14(10), 1994. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101994>
- Den Boer, M., Pieters, R., & Veerman, A. (1998). Mechanisms of cellular anthracycline resistance in childhood acute leukemia. *Leukemia*, 12(11), 1657-1670. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401175>
- Dhillon, S. (2020). Tirabrutinib: First Approval. *Drugs*, 80(8), 835-840. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01318-8>
- Dos Santos Arruda, F., Tomé, F. D., Miguel, M. P., de Menezes, L. B., Nagib, P. R. A., Campos, E. C., Soave, D. F., & Celes, M. R. N. (2019). Doxorubicin-induced Cardiotoxicity and Cardioprotective Agents: Classic and New Players in the Game. *Current pharmaceutical design*, 25(2), 109-118. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190312110836>
- Edwardson, D., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J., & Parissenti, A. (2015). Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current Drug Metabolism*, 16(6), 412-426. <https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>
- Feng, Y., Duan, W., Cu, X., Liang, C., & Xin, M. (2019). Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in treating cancer: a patent review (2010-2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(4), 217-241. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1594777>
- He, S., Liu, Y., Chu, X., Li, Q., Lyu, W., Liu, Y., Xing, S., Feng, F., Liu, W., Guo, Q., Zhao, L., & Sun, H. (2022). Discovery of Novel Aldo-Keto Reductase 1C3 Inhibitors as Chemotherapeutic Potentiators for Cancer Drug Resistance. *ACS medicinal chemistry letters*, 13(8), 1286-1294. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.2c00175>

- Hoefler, C. C., Quiñones-Lombraña, A., Blair, R. H., & 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. <https://doi.org/10.1007/s12012-015-9327-x>
- Hoffmann, F., & Maser, E. (2007). Carbonyl Reductases and Pluripotent Hydroxysteroid Dehydrogenases of the Short-chain Dehydrogenase/reductase Superfamily. *Drug metabolism reviews*, 39(1), 87-144. <https://doi.org/10.1080/03602530600969440>
- Hofman, J., Malcekova, B., Skarka, A., Novotna, E., & 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), 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.027>
- Hofman, J., Skarka, A., Havrankova, J., & Wsol, V. (2015). Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. *Biochemical Pharmacology: an international journal devoted to research into the development of biologically active substances and their mode of action at the biochemical and subcellular level*, 96(3), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.005>
- Huang, L., He, R., Luo, W., Zhu, Y. S., 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. <https://doi.org/10.2174/1574892811888160304113346>
- Hunter, T. (1991). [1] Protein kinase classification. In [1] *Protein kinase classification* (Vol. 200, pp. 3-37). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)00125-G](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)00125-G)
- Chen, Z. S., & Tiwari, A. K. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS journal*, 278(18), 3226-3245. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08235.x>
- Chien, A. J., & Moasser, M. M. (2008). Cellular Mechanisms of Resistance to Anthracyclines and Taxanes in Cancer: Intrinsic and Acquired. *Seminars in oncology*, 35, S1-S14. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2008.02.010>
- Jez, J. M., Flynn, T., & Penning, T. M. (1997a). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology: an international journal devoted*

to research into the development of biologically active substances and their mode of action at the biochemical and subcellular level, 54(6), 639-647. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)84253-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)84253-0)

Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., & Penning, T. M. (1997b). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The biochemical journal*, 326(3), 625-636. <https://doi.org/10.1042/bj3260625>

Jin, Y., & Penning, T. M. (2007). Aldo-Keto Reductases and Bioactivation/Detoxication. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47(1), 263-292. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105337>

Jirkovský, E., Jirkovská, A., Bavlovič-Piskáčková, H., Skalická, V., Pokorná, Z., Karabanovich, G., Kollárová-Brázdová, P., Kubeš, J., Lenčová-Popelová, O., Mazurová, Y., Adamcová, M., Lyon, A. R., Roh, J., Šimůnek, T., Štěrbová-Kovaříková, P., & Štěřba, M. (2021). Clinically Translatable Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity by Dexrazoxane Is Mediated by Topoisomerase II Beta and Not Metal Chelation. *Circulation. Heart failure*, 14(11), e008209. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.008209>

Kašparová, M. (2022). *Studium Vlivu Tirabrutinibu na aktivitu enzymů účastnících se anthracyklinové rezistence v Nádorové terapii*. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Digitální knihovna UPCE. <https://dk.upce.cz/handle/10195/80052>

Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., & 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 [electronic resource]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(24), 3895–3906. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8588-y>

Kim, J. S., Chang, J. W., Park, J. K., & Hwang, S. G. (2012). Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53. *Cancer biology & therapy*, 13(8), 638-646. <https://doi.org/10.4161/cbt.20081>

Kozaki, R., Yasuhiro, T., Kato, H., Murai, J., Hotta, S., Ariza, Y., Sakai, S., Fujikawa, R., Yoshida, T., & Salvi, M. (2023). Investigation of the anti-tumor mechanism of tirabrutinib, a highly selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor, by

- phosphoproteomics and transcriptomics. *PloS one*, *18*(3), e0282166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282166>
- Kvasničková, E. (1995). *Xenobiochemie*. Karolinum.
- Lekešová, A. (2021). *Vliv olaparibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou karbonyl redukujícími enzymy*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Wsól, Vladimír. Hradec Králové. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/148072>
- Li, D., Ferrari, M., & Ellis, E. M. (2012). Human aldo–keto reductase AKR7A2 protects against the cytotoxicity and mutagenicity of reactive aldehydes and lowers intracellular reactive oxygen species in hamster V79-4 cells. *Chemico-Biological Interactions*, *195*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.09.007>
- Licican, A., Serafini, L., Xing, W., Czerwieniec, G., Steiner, B., Wang, T., Brendza, K. M., Lutz, J. D., Keegan, K. S., Ray, A. S., Schultz, B. E., Sakowicz, R., & Feng, J. Y. (2020). Biochemical characterization of tirabrutinib and other irreversible inhibitors of Bruton's tyrosine kinase reveals differences in on - and off - target inhibition. *Biochimica et biophysica acta*, *1864*(4), 129531. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129531>
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature reviews*, *14*(8), 543-560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>
- Liu, Y., He, S., Chen, Y., Liu, Y., Feng, F., Liu, W., Guo, Q., Zhao, L., & Sun, H. (2020). Overview of AKR1C3: Inhibitor Achievements and Disease Insights. *Journal of medicinal chemistry*, *63*(20), 11305-11329. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02138>
- Liu, Y.-Y., Liu, Y.-W., Huang, G.-K., Hung, K.-C., Lin, Y.-H., Yeh, C.-H., Yin, S.-M., Tsai, C.-H., & Chen, Y.-H. (2022). Overexpression of AKR1B10 Predicts Poor Prognosis in Gastric Cancer Patients Undergoing Surgical Resection. *Current Oncology (Toronto)*, *30*(1), 85–99. <https://doi.org/10.3390/curroncol30010007>
- Liu, Y., Chen, Y., Jiang, J., Chu, X., Guo, Q., Zhao, L., Feng, F., Liu, W., Zhang, X., He, S., Yang, P., Fang, P., & Sun, H. (2023). Development of highly potent and specific

- AKR1C3 inhibitors to restore the chemosensitivity of drug-resistant breast cancer. *European journal of medicinal chemistry*, 247, 115013. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.115013>
- Malatkova, P., Maser, E., & Wsol, V. (2010). Human Carbonyl Reductases. *Current Drug Metabolism*, 11(8), 639-658. <https://doi.org/10.2174/138920010794233530>
- Malátková, P., & Wsól, V. (2014). Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug metabolism reviews*, 46(1), 96-123. <https://doi.org/10.3109/03602532.2013.853078>
- Marinello, J., Delcuratolo, M., & Capranico, G. (2018). Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3480. <https://doi.org/10.3390/ijms19113480>
- Matsunaga, T., Yamaguchi, A., Morikawa, Y., Kezuka, C., Takazawa, H., Endo, S., El-Kabbani, O., Tajima, K., Ikari, A., & Hara, A. (2014). Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells. *Anti-cancer drugs*, 25(8), 868-877. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000112>
- Menna, P., Gonzalez Paz, O., Chello, M., Covino, E., Salvatorelli, E., & Minotti, G. (2012). Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opinion on Drug Safety*, 11(sup1), S21-S36. <https://doi.org/10.1517/14740338.2011.589834>
- Milan, J. (2019). *Vliv inhibice midostaurinu, vistusertibu a talazoparibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Wsól, Vladimír. Hradec Králové. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/106723>
- Mindnich, R. D., & Penning, T. M. (2009). Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Human genomics*, 3(4). <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-4-362>
- Mordente, A., Meucci, E., Silvestrini, A., Martorana, G., & Giardina, B. (2009). New Developments in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Current medicinal chemistry*, 16(13), 1656-1672. <https://doi.org/10.2174/092986709788186228>
- Morell, A., Čermáková, L., Novotná, E., Laštovičková, L., Haddad, M., Haddad, A., Portillo, R., & Wsól, V. (2020). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib

- Counteract Anthracycline Resistance in Cancer Cells Expressing AKR1C3. *Cancers*, 12(12), 3731. <https://doi.org/10.3390/cancers12123731>
- Morell, A., Novotná, E., Milan, J., Danielisová, P., Büküm, N., & Wsól, V. (2021). Selective inhibition of aldo-keto reductase 1C3: a novel mechanism involved in midostaurin and daunorubicin synergism. *Archives of toxicology*, 95(1), 67-78. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02884-2>
- Morris, M. E., Rodriguez-Cruz, V., & Felmler, M. A. (2017). SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *The AAPS journal*, 19(5), 1317-1331. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0110-8>
- Munakata, W., Ando, K., Yokoyama, M., Fukuhara, N., Yamamoto, K., Fukuhara, S., Ohmachi, K., Mishima, Y., Ichikawa, S., Ogiya, D., Aoi, A., Hatsumichi, M., & Tobinai, K. (2023). Long-term safety profile of tirabrutinib: final results of a Japanese Phase I study in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies. *International journal of hematology*, 117(4), 553-562. <https://doi.org/10.1007/s12185-022-03514-6>
- Novotná, R., Wsól, V., Xiong, G., & Maser, E. (2008). Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicology letters*, 181(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.06.858>
- Novotná, E., Büküm, N., Hofman, J., Flaxová, M., Kouklíková, E., Louvarová, D., & 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: an international journal devoted to research into the development of biologically active substances and their mode of action at the biochemical and subcellular level*, 156, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.001>
- Novotná, E., Büküm, N., Hofman, J., Flaxová, M., Kouklíková, E., Louvarová, D., & Wsól, V. (2018b). Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile. *Archives of toxicology*, 92(9), 2845-2857. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2258-0>
- Novotná, E., Morell, A., Büküm, N., Hofman, J., Danielisová, P., & Wsól, V. (2020). Interactions of antileukemic drugs with daunorubicin reductases: could reductases

- affect the clinical efficacy of daunorubicin chemoregimens? *Archives of toxicology*, 94(9), 3059-3068. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02818-y>
- Okoro, C. O., & Fatoki, T. H. (2023). A Mini Review of Novel Topoisomerase II Inhibitors as Future Anticancer Agents. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2532. <https://doi.org/10.3390/ijms24032532>
- Otter, M., Csader, S., Keiser, M., & Oswald, S. (2022). Expression and Functional Contribution of Different Organic Cation Transporters to the Cellular Uptake of Doxorubicin into Human Breast Cancer and Cardiac Tissue. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 255. <https://doi.org/10.3390/ijms23010255>
- Paul, M. K., & Mukhopadhyay, A. K. (2004). Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *International journal of medical sciences*, 101-115. <https://doi.org/10.7150/ijms.1.101>
- Pěčková, A. (2021). *Vliv inhibice enasidenibu, glasdegibu a quizartinibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Wsól, Vladimír. Hradec Králové. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/126181>
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Jez, J. M., Hung, C. F., Lin, H. K., Ma, H., Moore, M., Palackal, N., & Ratnam, K. (2000). Human 3 α -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. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3510067>
- Penning, T. M., & Drury, J. E. (2007). Human aldo–keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464(2), 241-250. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.024>
- Penning, T. M., & Byrns, M. C. (2009). Steroid Hormone Transforming Aldo-Keto Reductases and Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155(1), 33-42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03700.x>
- Penning, T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>

- Penning, T. M. (2017). Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(12), 1329-1340. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1379503>
- Penning, T. M. (2019). AKR1C3 (type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders. *Molecular and cellular endocrinology*, 489, 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.07.002>
- Penning, T. M., Jonnalagadda, S., Trippier, P. C., Rižner, T. L., & Gottesman, M. (2021). Aldo-Keto Reductases and Cancer Drug Resistance. *Pharmacological Reviews*, 73(3), 1150-1171. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000122>
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J. E., Bruford, E., Dellaporta, S. L., Favia, A. D., Duarte, R. G., Jörnvall, H., Kavanagh, K. L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T. M., Thornton, J. M., Adamski, J., & Oppermann, U. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.040>
- Piska, K., Koczurkiewicz, P., Bucki, A., Wójcik-Pszczola, K., Kołaczkowski, M., & 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. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0443-2>
- Piska, K., Jamrozik, M., Koczurkiewicz-Adamczyk, P., Bucki, A., Żmudzki, P., Kołaczkowski, M., & Pękala, E. (2021). Carbonyl reduction pathway in hepatic in vitro metabolism of anthracyclines: Impact of structure on biotransformation rate. *Toxicology letters*, 342, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.02.001>
- Plebuch, M., Soldan, M., Hungerer, C., Koch, L., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.03.018>
- Pottier, C., Fresnais, M., Gilon, M., Jérusalem, G., Longuespée, R., & Sounni, N. E. (2020). Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers*, 12(3), 731. <https://doi.org/10.3390/cancers12030731>

- Quattrini, L., & La Motta, C. (2019). Aldose reductase inhibitors: 2013-present. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(3), 199-213. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1582646>
- Quiñones-Lombraña, A., Intini, A., & Blanco, J. G. (2019). Insights into the transcriptional regulation of the anthracycline reductase AKR7A2 in human cardiomyocytes. *Toxicology letters*, 307, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.015>
- ReFaey, K., Tripathi, S., Grewal, S. S., Bhargav, A. G., Quinones, D. J., Chaichana, K. L., Antwi, S. O., Cooper, L. T., Meyer, F. B., Dronca, R. S., Diasio, R. B., & Quinones-Hinojosa, A. (2021). Cancer Mortality Rates Increasing vs Cardiovascular Disease Mortality Decreasing in the World: Future Implications. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*, 5(3), 645-653. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2021.05.005>
- Rozkiewicz, D., Hermanowicz, J. M., Kwiatkowska, I., Krupa, A., & Pawlak, D. (2023). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors (BTKIs): Review of Preclinical Studies and Evaluation of Clinical Trials. *Molecules: a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry*, 28(5), 2400. <https://doi.org/10.3390/molecules28052400>
- Saleh, Y., Abdelkarim, O., Herzallah, K., & Abela, G. S. (2021). Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms of action, incidence, risk factors, prevention, and treatment. *Heart failure reviews*, 26(5), 1159-1173. <https://doi.org/10.1007/s10741-020-09968-2>
- Sallustio, B. C., & Boddy, A. V. (2021). Is there scope for better individualisation of anthracycline cancer chemotherapy? *British journal of clinical pharmacology: BJCP*, 87(2), 295-305. <https://doi.org/10.1111/bcp.14628>
- Seliger, J. M., Martin, H. J., Maser, E., & Hintzpeter, J. (2019). Potent inhibition of human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the prenylated chalconoid xanthohumol and its related prenylflavonoids isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chemico-Biological Interactions*, 305, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.02.031>
- Ségaliny, A. I., Tellez-Gabriel, M., Heymann, M. F., & Heymann, D. (2015). Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of bone oncology*, 4(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>

- Shandilya, M., Sharma, S., Prasad Das, P., & Charak, S. (2021). Molecular-Level Understanding of the Anticancer Action Mechanism of Anthracyclines. In H. Arnouk & B. Abdul Rasool Hassan (Ed.), *Advances in Precision Medicine Oncology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94180>
- Shirley, M. (2022). Bruton Tyrosine Kinase Inhibitors in B-Cell Malignancies: Their Use and Differential Features. *Targeted oncology*, 17(1), 69-84. <https://doi.org/10.1007/s11523-021-00857-8>
- Singh Grewal, A., Bhardwaj, S., Pandita, D., Lather, V., & Singh Sekhon, B. (2015). Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(2), 120-162. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150909143737>
- Siveen, K. S., Prabhu, K. S., Achkar, I. W., Kuttikrishnan, S., Shyam, S., Khan, A. Q., Merhi, M., Dermime, S., & Uddin, S. (2018). Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignances and its Targeting by Natural Products. *Molecular cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0788-y>
- Skálová, L., & Boušová, I. (2011). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum.
- Slámová, A. (2021). *Vliv inhibice belinostatu na aktivitu vybraných reductas z nadrodiny AKR a SDR*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Wsól, Vladimír. Hradec Králové. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/126047>
- Škarydová, L., & Wsól, V. (2012). Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug metabolism reviews*, 44(2), 173-191. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.638304>
- Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M., & Barták, M. (2018). *Farmakologie*. Grada Publishing.
- Tavares, T. S., Hofman, J., Lekešová, A., Želazková, J., & Wsól, V. (2020). Olaparib Synergizes the Anticancer Activity of Daunorubicin via Interaction with AKR1C3. *Cancers*, 12(11), 3127. <https://doi.org/10.3390/cancers12113127>

- Takahashi, M., Miyata, S., Fujii, J., Inai, Y., Ueyama, S., Araki, M., Soga, T., Fujinawa, R., Nishitani, C., Arika, S., Shimizu, T., Abe, T., Ihara, Y., Nishikimi, M., Kozutsumi, Y., Taniguchi, N., & Kuroki, Y. (2012). In vivo role of aldehyde reductase. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(11), 1787-1796. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.07.003>
- Tian, H., Chen, R., Huang, C., Sun, W., Jiang, W., Li, X., & Lv, C. (2016). High expression of AKR1C1 is associated with proliferation and migration of small-cell lung cancer cells. *Lung cancer: targets and therapy*, 53. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S90694>
- Vavrova, A., & Simunek, T. (2012). DNA topoisomerase II β : A player in regulation of gene expression and cell differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(6), 834–837. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.005>
- Verma, K., Zang, T., Gupta, N., Penning, T. M., & Trippier, P. C. (2016). Selective AKR1C3 Inhibitors Potentiate Chemotherapeutic Activity in Multiple Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines. *ACS medicinal chemistry letters*, 7(8), 774–779. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00163>
- Verma, K., Zang, T., Penning, T. M., & 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. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00090>
- Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer drug resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>
- Wang, X., Kokabee, L., Kokabee, M., & Conklin, D. S. (2021). Bruton's Tyrosine Kinase and Its Isoforms in Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.668996>
- Westermann, M., Adomako-Bonsu, A. G., Thiele, S., Çiçek, S. S., Martin, H.-J., & Maser, E. (2022). Inhibition of human carbonyl reducing enzymes by plant anthrone and anthraquinone derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, 354, 109823–109823. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109823>
- Wu, J., Liu, C., Tsui, S. T., & Liu, D. (2016). Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. *Journal of hematology & oncology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0313-y>

- Yang, Y., Li, S., Wang, Y., Zhao, Y., & Li, Q. (2022). Protein tyrosine kinase inhibitor resistance in malignant tumors: molecular mechanisms and future perspective. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01168-8>
- Zemanova, L., Hofman, J., Novotna, E., Musilek, K., Lundova, T., Havrankova, J., Hostalkova, A., Chlebek, J., Cahlikova, L., & Wsol, V. (2015). Flavones Inhibit the Activity of AKR1B10, a Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Journal of natural products*, 78(11), 2666-2674. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00616>
- Zeng, Chang, L.-L., Ying, M.-D., Cao, J., He, Q.-J., Zhu, H., & Yang, B. (2017). Aldo-Keto Reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 119–119. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00119>
- Zeng, C.-M., Chang, L.-L., Ying, M.-D., Cao, J., He, Q.-J., Zhu, H., & Yang, B. (2017). Aldo-Keto Reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 119–119. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00119>
- Zhong, T., Xu, F., Xu, J., Liu, L., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.12.022>

9 INTERNETOVÉ ZDROJE

Internet 1. 6 Úmrtnost - český statistický úrad (2019). [cit. 21.07.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://www.czso.cz/documents/10180/121768528/13006920a06.pdf/8c655ed8-4911-4dc2-93a9-603b080033ea?version=1.1>>

Internet 2. *Akr superfamily*. AKR Superfamily. (n.d.). [cit. 03.03.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://akrsuperfamily.org>>

Internet 3. Bank, R. P. D. (2021). *4DBS*. Crystal structure of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3) in complex with NADP+ and 3'-[(4-nitronaphthalen-1-yl)amino] benzoic acid. [cit. 20.3.2023] [online]. Dostupné z: <<https://www.rcsb.org/3d-view/4DBS>>

Internet 4. Cell signaling transduction related protein kinase | sino biological. (n.d.). [cit. 12.05.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://www.sinobiological.com/research/signal-transduction/protein-kinase>>

Internet 5. Cell signaling transduction | sino biological. (n.d.-a). [cit. 12.05.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://www.sinobiological.com/research/signal-transduction>>

Internet 6. *Protein kinases overview: Definition, types, function, diseases, treatment, etc..* CUSABIO. (n.d.). [cit. 14.05.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://www.cusabio.com/c-16643.html>>

Internet 7. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 54755438, Tirabrutinib. [cit. 24.05.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tirabrutinib>>

Internet 8. *Guidelines to maintain cultured cells*. Thermo Fisher Scientific - US. (n.d.). [cit. 03.06.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/maintaining-cultured-cells.html>>

Internet 9. MTT assay protocol for cell viability and proliferation. (n.d.). [cit. 08.06.2023]. [online]. Dostupné z: <<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>>