

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**VLIV INHIBICE BELINOSTATU NA AKTIVITU  
VYBRANÝCH REDUKTAS Z NADRODINY AKR A SDR**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Adéla Slámová

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné připomínky při zpracování této práce. Ráda bych poděkovala také Mgr. Lence Laštovičkové za pomoc při práci v laboratoři a s hodnocením naměřených dat. Velké díky patří také mé rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Adéla Slámová

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

Název diplomové práce: Vliv inhibice belinostatu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR

Antracyklinová antibiotika (ANT) jsou významná protinádorová léčiva. Jedním z nich je daunorubicin (DAUN), který se používá v léčbě akutních leukémií a jiných malignit u dětí i dospělých. Mezi faktory limitující jeho klinické použití patří rezistence a kardiotoxicita. Enzymy z nadrodiny aldo-ketoreduktáz (AKR) a dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) katalyzují redukci DAUN na C-13 alkoholový metabolit daunorubicinol (DAUNOL). Ten má vyšší kardiotoxicitu, menší antineoplastickou aktivitu a je zodpovědný mimo jiné za ANT rezistenci. Cílem této diplomové práce bylo zjistit inhibiční účinek belinostatu na aktivitu AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1. Specifická enzymová aktivita a inhibiční potenciál byly posouzeny na úrovni *in vitro* pomocí rekombinantních enzymů a enzymatická tvorba DAUNOL byla hodnocena pomocí kapalinové chromatografie (UHPLC). Míra inhibice klesala v pořadí AKR1C3 > AKR1B10 > AKR1A1 > AKR1B1 > CBR1. Nejvíce inhibovaný enzym AKR1C3 vykazoval 50,7% inhibici 10 $\mu$ M belinostatem a 89,2% inhibici 50 $\mu$ M belinostatem. V porovnání s podobnými publikacemi můžeme říct, že belinostat má poměrně silný inhibiční potenciál vůči AKR1C3 ( $IC_{50} = 9,5 \pm 0,6 \mu M$ ,  $K_i = 8,9 \pm 0,4$  s kinetikou blízkou nekompetitivním inhibitorům). Na základě našich výsledků lze předpokládat, že kombinace DAUN a belinostatu může inhibicí AKR1C3 zlepšit terapeutický účinek a bezpečnost ANT. Možné je také využití inhibitoru jako chemoterapeutika u různých onemocnění souvisejících s upregulací AKR1C3.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Adéla Slámová

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

Title of diploma thesis: The influence of belinostat inhibition on the activity of selected reductases from AKR and SDR superfamilies

Anthracycline antibiotics (ANTs) are important antineoplastic agents. One of them, daunorubicin (DAUN), is used for the treatment of acute leukaemia and other malignancies in children and adults. Factors limiting its clinical use include mainly resistance and cardiotoxicity. Enzymes from aldo-keto reductase (AKR) and short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamilies mediated the reduction of DAUN to its C-13 alcohol metabolite daunorubicinol (DAUNOL). The metabolite is more cardiotoxic, less antineoplastic, and is causing anthracycline resistance. This diploma thesis aimed to examine the inhibitory effect of belinostat on the activity of AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3, and CBR1. The specific enzyme activity and inhibitory potential were estimated *in vitro* using recombinant enzymes, and the enzymatic production of DAUNOL was evaluated by the liquid chromatography (UHPLC) system. The inhibition was decreased in order AKR1C3 > AKR1B10 > AKR1A1 > AKR1B1 > CBR1. The most inhibited enzyme, AKR1C3, expressed 50,7% inhibition by 10 $\mu$ M belinostat and 89,2% inhibition by 50 $\mu$ M belinostat. In comparison with other similar publications, we can conclude that belinostat is relatively strong inhibitor against AKR1C3 ( $IC_{50} = 9,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ,  $K_i = 8,9 \pm 0,4$  and acts as a non-competitive one). Based on these findings, we can presume that the combination of DAUN and belinostat may potentially enhance the therapeutic effectiveness and safety of ANT via inhibition of AKR1C3. It can also be designed like a chemotherapeutic agent for many diseases associated with upregulation of AKR1C3.

## OBSAH

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Antracyklinová antibiotika/cytostatika .....	8
2.1.1	Daunorubicin .....	9
2.1.2	Léčba akutní myeloidní leukémie .....	9
2.2	Toxicita .....	10
2.3	Rezistence .....	12
2.4	Metabolismus .....	13
2.4.1	Enzymy .....	14
2.4.2	Inhibice .....	22
2.5	Belinostat .....	23
3	Cíl práce .....	25
4	Materiál a metodika .....	26
4.1	Materiál .....	26
4.1.1	Chemikálie a reagenty .....	26
4.1.2	Enzymy .....	26
4.1.3	Inhibitor .....	27
4.1.4	Pomůcky .....	27
4.1.5	Přístroje .....	28
4.2	Metodika <i>in vitro</i> experimentu .....	28
4.2.1	Příprava roztoků .....	29
4.2.2	Příprava reakční směsi a preinkubace .....	31
4.2.3	Vlastní enzymová reakce .....	32
4.2.4	Příprava vzorku a analýza UHPLC .....	32
4.2.5	Výpočet specifické aktivity, IC <sub>50</sub> , K <sub>i</sub> a určení typu inhibice .....	33
5	Výsledky a diskuze .....	37
5.1	Stanovení a porovnání specifické aktivity AKR a SDR vůči daunorubicinu ...	37
5.2	Sledování inhibičního účinku belinostatu na testované enzymy .....	39
5.3	Stanovení IC <sub>50</sub> pro belinostat .....	42
5.4	Stanovení K <sub>i</sub> belinostatu a typu inhibice .....	44
6	Závěr .....	47
7	Seznam zkratk .....	49
8	Literatura .....	50

# 1 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou stále jednou z nejčastějších příčin úmrtí na světě, neboť se jedná o heterogenní skupinu onemocnění s často složitými mechanismy patogeneze a rychlou progresí. Probíhá řada studií hledající nová protinádorová léčiva, zkoumající možnosti nových cílů léčby, apod. Stejně intenzivně vědci pracují na pochopení mechanismů účinku stávajících chemoterapeutik, případně možnostech jejich kombinovaného využití.

Antracyklinová antibiotika (ANT) patří mezi velmi významná cytostatika a jsou standardní volbou v léčbě mnoha nádorových onemocnění, jako jsou akutní leukémie, lymfomy, mnohočetný myelom, karcinomy plic, vaječníků, prsu, štítné žlázy a mnoho dalších. (Kizek et al. 2012) Limity jejich klinického užití představují především nežádoucí účinky a rozvoj lékové rezistence nádorových buněk k léčivům. Velký vliv na tyto limitující faktory má metabolismus ANT, především redukce karbonylové skupiny katalyzovaná redukcujícími enzymy z nadrodin AKR a SDR. V této diplomové práci byly zkoumány aktivity vybraných enzymů AKR1A1, 1B1, 1B10 a 1C3 a z nadrodiny SDR CBR1.

Díky často nezastupitelné roli ANT v terapii je velká snaha zkoumat látky s inhibičním potenciálem vůči enzymům. Následné podání inhibitoru spolu s ANT by mělo vést k žádoucímu snížení metabolické přeměny ANT na kardiotoxičtější a méně účinné metabolity a také předcházet rozvoji rezistence. Hlavní náplní této diplomové práce bylo zkoumání *in vitro* inhibičního vlivu belinostatu na enzymy katalyzující redukci ANT. Jako substrát byl v práci použit daunorubicin a změny aktivit enzymů byly hodnoceny na základě měřeného množství redukováného metabolitu vzniklého přeměnou původního léčiva.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

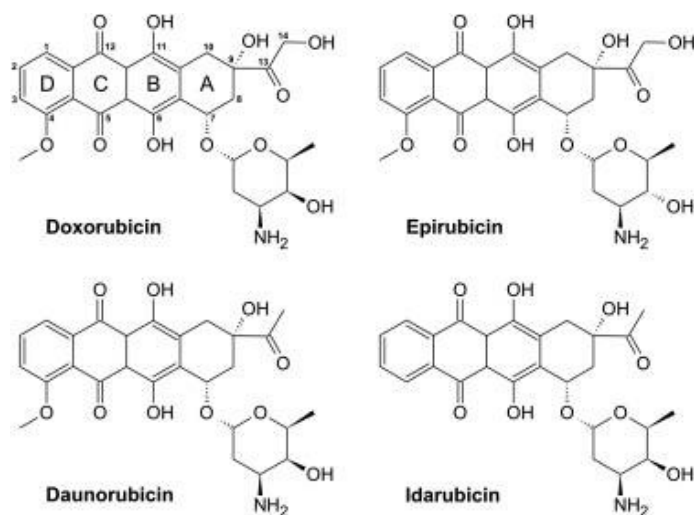
### 2.1 Antracyklinová antibiotika/cytostatika

ANT patří mezi nejúčinnější protinádorová léčiva a mají často nezastupitelné postavení v léčbě širokého spektra malignit u dětí i dospělých. (Plebuch et al. 2007, Mladosičová et al. 2014) Především jsou zaměřena proti hematologickým malignitám a řadě solidních nádorů, konkrétně pak například proti rakovině prsu, gynekologickým, urogenitálním nebo endokrinním nádorům, rakovině žaludku nebo Kaposiho sarkomu. (Hortobagyi 1997, Wallace et al. 2020)

Mechanismus antineoplastického účinku ANT nebyl známý ještě dlouhou dobu po jejich zavedení. Dnes je za hlavní cíl jejich protinádorového působení považována topoisoméráza 2 $\alpha$  a její inhibice díky interkalaci (reverzibilní vložení) antracyklinu mezi sousední pár bází DNA. Oddělená vlákna DNA jsou kovalentně napojena na tyrosinová rezidua topoisomérázy 2, to brání opětovnému vytvoření DNA a dochází k blokaci replikace a transkripce DNA, čímž inhibují progresi nádoru. Antracykliny mohou účinkovat proti nádoru také tvorbou volných hydroxylových radikálů, indukci apoptózy, poškozením určité signální dráhy nebo mitochondriální dysfunkcí. (Stěrba et al. 2013, Plebuch et al. 2007, Mladosičová et al. 2014)

Do této skupiny léčiv patří doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAUN), idarubicin (IDA), epirubicin (EPI), aj. (Plebuch et al. 2007, Wallace et al. 2020) Všechny tyto antracykliny mají strukturu, která je tvořena z tzv. aglykonu a cukerné části. Aglykon se skládá z tetracyklické struktury s přilehlými chinonovými a hydrochinonovými kruhy. Cukerná část je připojena glykosidickou vazbou na uhlíku 7 tetracyklického kruhu A (Obr. 1). Cukernou část tvoří 3-amino-2,3,6-trideoxy-L-fukosyl, nazývaný jako daunosamin. DAUN je charakteristický postranním řetězcem s karbonylem (C-13) ukončeným methylem. DOX tento řetězec končí primárním alkoholem. DOX se od DAUN tak liší jen hydroxylovou skupinou na C-14. EPI je epimer DOX lišící se pouze v orientaci hydroxylové skupiny na daunosaminu. IDA je analog DAUN, který postrádá 4-methoxy skupinu v kruhu D (Obr. 1). Tyto malé rozdíly mají významné důsledky na spektrum aktivity a účinnosti jednotlivých ANT. (Kizek et al. 2012, Stěrba et al. 2013)





**Obr. 1:** Struktury vybraných ANT (Převzato z: Kizek et al. 2012)

### 2.1.1 Daunorubicin

DAUN (daunomycin, rubidomycin, rubomicin C, aj.) byl prvním identifikovaným léčivem ze skupiny ANT. (Meriwether & Bachur 1972, Wallace et al. 2020) Byl úspěšně izolován z kultur *Streptomyces peucetius* v Itálii roku 1963 (Grein 1987). Následné studie v 60. letech vedly k izolaci DOX ze *Streptomyces peucetius var. caesius*. (Arcamone et al. 1969) Ostatní deriváty byly vyvinuty později v průběhu několika dalších let a to vč. EPI k léčbě karcinomu prsu, žaludku a močových cest nebo IDA s vylepšenou účinností proti akutní myeloidní leukémii (AML). Vyvinut byl také mitoxantron, který má s ANT mnoho společných rysů včetně kardiotoxicity a využívá se především v chemoterapii rakoviny prsu, prostaty, non-Hodgkinova lymfomu nebo AML. (Stěrba et al. 2013) DAUN prokázal v preklinických a klinických studiích výraznou účinnost především proti akutním leukémiím, Kaposiho sarkomu souvisejícího s AIDS a proti některým dalším solidním nádorům. (Anonym 2021c) Byl prvním antineoplastikem s působivou klinickou aktivitou v léčbě akutních dětských leukémií. (Kizek et al. 2012)

### 2.1.2 Léčba akutní myeloidní leukémie

AML je agresivní hematopoetická malignita charakteristická především nekontrolovatelnou proliferací, abnormálním přežíváním a přerušeným vyzríváním leukemických buněk v kostní dřeni. Kvůli tomu dochází k výraznému snížení hemopoézy a ztrátě normálně funkčních neutrofilů, krevních destiček a erytrocytů. Jde o onemocnění

značně molekulárně heterogenní. Je spojené s relativně špatnou prognózou. Pětileté přežití se s věkem pacientů (> 60 let) ještě snižuje, nicméně i u mladších je díky častému relapsu velmi nízké, kolem asi 25 %. Ke špatné prognóze onemocnění kromě relapsu přispívá i snížení účinnosti léčby v důsledku rezistence na použítá chemoterapeutika. (Varatharajan et al. 2016, Khanim et al. 2009) Zvláště u starších pacientů je rozvoj mnohočetné lékové rezistence (MDR) velkým problémem terapie. Expresí P-glykoproteinu (Pgp), související s MDR, bývá u těchto pacientů spojována s nižší mírou úplné remise. (Craig & Schiller 2008)

Obecným cílem chemoterapie AML je snaha o obnovení normální funkce kostní dřeně. (Craig & Schiller 2008) V současné době je standardem léčby AML volba ANT, především DAUN, kombinovaného s cytarabinem (Ara-C). Ara-C je považován za nezbytnou součást léčebných režimů AML díky schopnosti působit na více úrovní. Napomáhá apoptóze, díky změnám ve struktuře membrán zlepšuje přístup přirozeným imunitním mechanismům a působí i na DNA. (Bashir et al. 2015) ANT neselektivně inhibuje syntézu DNA a RNA, kvůli čemuž může být jeho antileukemická aktivita spojená se systémovou toxicitou. I z toho důvodu je vedle této konvenční chemoterapie snaha o vyvíjení nových terapeutických látek a přístupů. Takovými novými přístupy může být použití pohlavního steroidu medroxyprogesteron acetátu (MPA). Další možností je kombinovaná léčba s využitím více léků a jejich účinky se tak synergují. (Varatharajan et al. 2016, Khanim et al. 2009)

## 2.2 Toxicita

Využití antracyklinových cytostatik je díky vysoké účinnosti velmi přínosné, nicméně s sebou přináší řadu rizik. Asi nejzávažnějším z nich je kardiotoxicita jako nežádoucí účinek ANT léčby limitující její klinické využití. Mezi další nežádoucí účinky, obecně zpravidla reverzibilní a již společné pro většinu cytostatik, patří stomatitida, nevolnost, zvracení, alopecie nebo horečka. (Hortobagyi 1997, Wallace et al. 2020)

Už po první dávce ANT může docházet k poškození srdce na subcelulární úrovni - poškození buněčných membrán a struktur. Kardiomyocyty mohou po podání některých ANT vykazovat zvýšenou autofagickou aktivitu. V důsledku autofagie běžně dochází k odstranění nebo recyklaci poškozených proteinů buňky. Problém nastává, když se

schopnost autofagie stane nekontrolovatelnou a způsobuje nežádoucí buněčnou smrt. (Mladosievičová et al. 2014)

Některé hypotézy při popisu mechanismů toxicity mluví také o mitochondriální dysfunkci nebo tvorbě „komplexů železa“ vlivem působení ANT na srdeční tkáň. (Plebuch et al. 2007) ANT interagují s ionty železa, kdy se redoxní stav iontů přeměňuje mezi Fe(II) a Fe(III). Vznikají tím toxické reaktivní formy kyslíku (ROS), které způsobují apoptózu a poškozují DNA. Tkáň myokardu je k poškození volnými radikály zvláště náchylná kvůli nízké aktivitě antioxidantních enzymů v kardiomyocytech. (Hortobagyi 1997, Kizek et al. 2012)

Postupným účinkem dochází často až k ireverzibilnímu zániku myocytů a poškození i jiných srdečních buněk. I přes ireverzibilní zánik je množství myocytů díky značným rezervám srdce schopno do určité míry kompenzovat poškození bez klinických projevů srdeční dysfunkce. (Mladosievičová et al. 2014) Pokud kompenzace nejsou schopné nebo je zásah příliš velký, dochází k různým klinickým projevům od akutní srdeční příhody až po chronické městnavé srdeční selhání. (Plebuch et al. 2007) Obecně mluvíme o akutní kardiotoxicitě nebo následně o progresi v pozdní neboli chronickou kardiotoxicitu. Akutní kardiotoxicita se projevuje arytmií, myokarditidou nebo perikarditidou. Mezi projevy subakutní a pozdní kardiotoxicity řadíme kardiální dysfunkci, srdeční selhání a kardiomyopatii. (Mladosievičová et al. 2014)

Antracyklinem navozená kardiotoxicita je kumulativní, závislá na dávce. (Zhang et al. 2016) Projevy akutní kardiotoxicity na dávce podaného antracyklinu tolik závislé nejsou, ale v rozvoji chronické kardiotoxicity má dávka zásadní vliv. S ohledem na to je snaha snížit nebo zabránit kardiotoxicitě takovým dávkovacím schématem, který „vytváří nízké maximální plazmatické koncentrace léku.“ (Hortobagyi 1997) Jsou i další faktory, které přispívají k progresi antracyklinové kardiotoxicity. Dochází k ní například díky postupnému působení zátěžových stresorů jako operace, virové infekce, toxické účinky, aj. (Mladosievičová et al. 2014)

Byl prokázán také významný vliv alkoholových metabolitů ANT v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity. Z větší míry jsou zodpovědné za chronickou a pozdní toxicitu. Potvrzuje to i fakt, že rozvoj chronické kardiomyopatie obvykle doprovází výrazné hromadění těchto sekundárních alkoholových metabolitů ANT. (Plebuch et al. 2007) V kardiomyocytech se kumulují více než primární léčivo kvůli vyšší polaritě.

Jejich mechanismy poškození srdečních buněk jsou obdobné s působením samotných ANT. Mohou navíc vést k inaktivaci proteinů účastnících se na metabolismu kalcia a tím narušovat jeho homeostázu. Často také inaktivují regulátory energetického metabolismu a iontové kanály. Jednotlivé ANT se liší v úrovni tvorby těchto metabolitů. „Například EPI má až 50× menší schopnost tvorby sekundárních metabolitů než DOX.“ (Mladosievičová et al. 2014)

### 2.3 Rezistence

Další výraznou překážkou v úspěšné chemoterapii nádorů ANT i chemoterapeutik obecně je léková rezistence, často MDR proti celé řadě antineoplastických léčiv. Bylo zkoumáno několik mechanismů, které jsou zodpovědné za rozvoj rezistence nádorových buněk k podávaným lékům, vč. ANT. (Wolfram et al. 2000) Rezistence nádorových buněk bývá obecně spojována s poklesem koncentrací léčiva v intracelulárních cílech a tím logickým snížením účinnosti celé léčby. (Meschini et al. 2002)

K poklesu koncentrací dochází prostřednictvím ATP-dependentního efluxu (odčerpání) množství nemodifikovaného léčiva z buňky. V rozvoji MDR se uplatňují především efluxní transportéry z ABC rodiny transportérů (z angl. ATP Binding Cassette), především pak ABCB1, neboli Pgp. Tento glykoprotein s povrchovou membránovou permeabilitou se vyznačuje širokou substrátovou specifikou. (Plebuch et al. 2007) Všechny ANT jsou pro transportér Pgp kompatibilními substráty. (Kizek et al. 2012) Jeho nadměrná exprese je tak považována za jeden z mechanismů rozvoje rezistence. Tuto souvislost dokazují i záznamy Boosera & Hortobagya (1994) o nadměrné expresi Pgp u pacientek s ovariálním karcinomem z roku 1985, které prokazatelně trpěly klinickou multilékovou rezistencí.

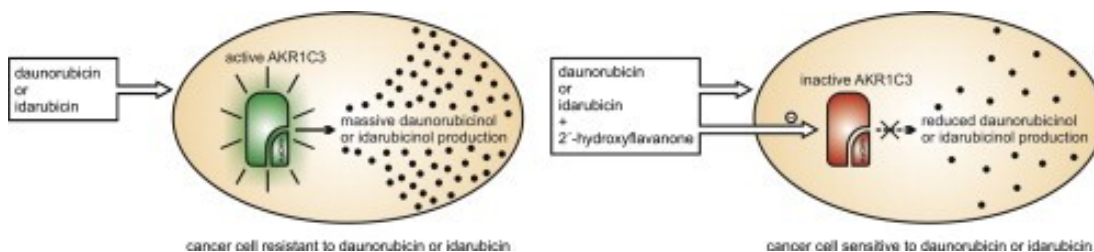
V multirezistentních buňkách bývá také často exprimován LRP (the lung resistance-related protein), který je schopný v době diagnózy částečně predikovat odpověď na chemoterapii u různých typů nádorů. (Wolfram et al. 2000)

K získané rezistenci silných antracyklinových chemoterapeutik, jako i DAUN, přispívá kromě ATP-řízených efluxů také metabolická inaktivace ANT redukcí karbonylu. Souvisí tedy přímo s indukovanou expresí a zvýšenými hladinami enzymů metabolizujících/detoxikujících léčivo, jako je aldehyd dehydrogenáza, konjugující

enzymy glukuronyltransferáza a glutathiontransferáza nebo karbonyl redukující enzymy ze skupiny AKR a SDR. (Plebuch et al. 2007, Wolfram et al. 2000)

Možným řešením rizika vzniku rezistence mohou být léčiva blokující pumpu Pgp. (Booser & Hortobagyi 1994) Další možností je podávání ANT v lipozomální formě, kdy rezistentní nádory mohou být výrazně citlivější k ANT podaným v této formě. Enkapsulace léčiva do lipozomu mění celkovou tkáňovou distribuci a farmakokinetické vlastnosti tak, že distribuce v nádorech je zvýšená, oběh léčiva prodloužený a volná koncentrace v plazmě nižší. Díky tomu se může zvýšit jejich protinádorová aktivita. Dnes patří enkapsulace mezi nejúspěšnější strategie na snížení mimo jiné i kardiotoxicity ANT. (Kizek et al. 2012, Hortobagyi 1997)

Také modulace enzymů redukujících antracykliny může znamenat zlepšení citlivosti buněk k danému léčivu. Dochází tím k ovlivnění farmakokinetických a farmakodynamických vlastností léku. Příkladem takové regulace je společné podání ANT a specifického AKR1C3 inhibitoru 2'-hydroxyflavanonu, díky kterému byla reverzibilní rezistence buněk vůči DAUN a IDA zvrácena, jak ukazuje obr. 2. (Hofman et al. 2014).

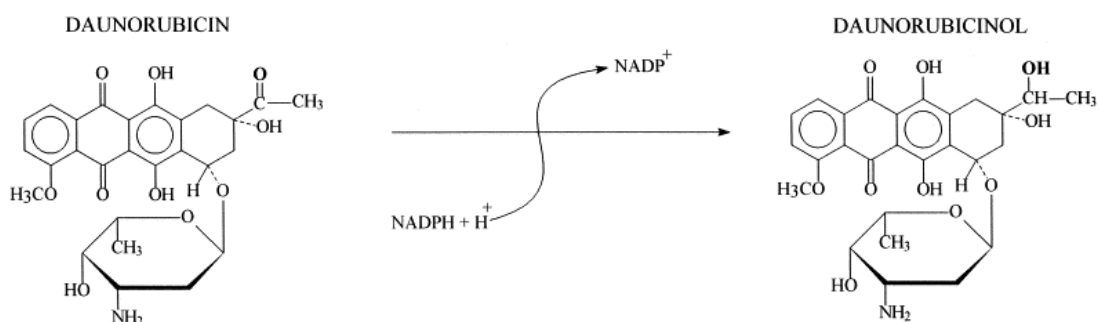


**Obr. 2:** Reverzibilní rezistence nádorových buněk k DAUN a IDA (Převzato z: Hofman et al. 2014)

## 2.4 Metabolismus

Metabolismus léčiva zahrnuje, vedle vlastních biotransformačních reakcí I. a II. fáze biotransformace, také procesy transportní. Většina ANT je podávána intravenózní infuzí. Do buněk vstupují pasivní difúzí. Typické jsou pro ně velké distribuční objemy díky široké distribuci do tkání a vazbě v nitrobuněčném prostoru. Tato intracelulární akumulace může vést k 10 – 500× vyšším koncentracím léčiva. Účinnost tkáňového vychytávání ovlivňuje i jejich lipofilita. Metabolizují se převážně v játrech a vylučovány jsou žlučí. (Kizek et al. 2012, Stěrba et al. 2013)

Hlavní metabolickou cestou ANT je redukce karbonylu v jejich struktuře. U DAUN probíhá na postranním řetězci na uhlíku C-13 (Obr. 3). Obecně se redukce řadí mezi reakce I. fáze biotransformace. (Plebuch et al. 2007) Jejím principem je u karbonylových sloučenin přeměna reaktivní aldehydové nebo ketonové části na hydroxy skupinu. Výsledný metabolit je snadněji konjugován v následné fázi biotransformace a tím i lépe eliminován. Mluvíme proto o tzv. detoxikačním nebo inaktivačním kroku metabolismu. (Wolfram et al. 2000, Hoffmann & Maser 2007) Z toxikologického pohledu je však redukce karbonylu u léčiv, jako je DAUN nebo DOX, nežádoucí, protože má významný vliv na zvýšení jejich toxicity. (Hoffmann & Maser 2007) Odpovídající hydroxy metabolit, v případě metabolismu DAUN 13-hydroxy metabolit daunorubicinol (DAUNOL), je významně méně účinný v inhibici růstu nádorových buněk. Je ale především toxicitější k srdečním buňkám. Považuje se tak za hlavní příčinu život ohrožující kardiotoxicity, která limituje klinické použití DAUN. (Wolfram et al. 2000, Plebuch et al. 2007)



**Obr. 3:** Schéma redukce karbonylu DAUN (Převzato z: Wolfram et al. 2000)

#### 2.4.1 Enzymy

Existuje velká škála enzymů, které katalyzují metabolické reakce karbonylů. Karbonyl redukující enzymy byly po dlouhou dobu velmi málo prozkoumané oproti oxidačnímu systému cytochromu P450 (CYP). Postupný pokrok od počátku 70. let 20. století umožnil několik karbonyl redukujících enzymů purifikovat, identifikovat a blíže charakterizovat jejich substrátovou specificitu a kinetické parametry. A to včetně popsání tzv. pluripotentních hydroxysteroidních dehydrogenáz (HSD), které se také podílí na metabolismu mnoha xenobiotických karbonylových sloučenin. (Hoffmann & Maser

2007) Mimo to se HSD účastní regulace účinku steroidního hormonu a mají zásadní roli v produkci steroidů lokálně v cílové tkáni. (Penning et al. 2018)

Obecně je většina karbonyl redukujících enzymů členěna do tří velkých proteinových nadrodin, a to do aldo-ketoreduktáz (AKR), dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) a dehydrogenáz/reduktáz se středně dlouhým řetězcem. (Wsól 2017) Většina HSD je dnes zařazena do podskupiny AKR1C. (Hoffmann & Maser, 2007) Dle mezinárodní nomenklatury má každý enzym přiděleno odpovídající EC číslo (z angl. Enzyme Commission number). AKR a SDR nadrodiny mají překrývající se širokou substrátovou specifitu a působí kromě ANT na mnoho dalších endogenních a xenobiotických aldehydů a ketonů. Hned u několika enzymů AKR a SDR byl popsán potenciál působení vůči karbonylové skupině DAUN a DOX. (Wsól 2017, Plebuch et al. 2007)

#### **2.4.1.1 Aldo-ketoreduktázy**

Jedná se o nadrodinu rozpustných cytosolických oxidoreduktáz, které metabolizují sloučeniny obsahující karbonyl na primární a sekundární alkoholy a využívají při tom NADP(H) jako kofaktor. (Jin & Penning 2007, Wsól 2017) Jsou tkáňově specifické s poměrně nízkou substrátovou selektivitou. Tyto enzymy redukují jak endogenní látky (především steroidní hormony, ale i prostaglandiny, monosacharidy, retinal nebo AGE prekurzory), tak xenobiotika (léčiva – vč. DAUN, polycyklické aromatické uhlovodíky, aflatoxiny aj. toxické látky). (Hofman et al. 2014)

Většina enzymů z této nadrodiny jsou monomerní proteiny. V prostorovém uspořádání (Obr. 4) obsahují soudkový motiv, v němž se střídají  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -vlákna. (Penning & Drury 2007) Aktivní místo AKR se nachází na dně soudku, na C-konci proteinu. Zde probíhá vlastní katalýza a v místě dochází i k interakci s nukleotidovými kofaktory pyridinu. (Barski et al. 2008, Penning et al. 2018) V aktivním místě se nachází seskupení 4 aminokyselin, a to Tyr, His, Asp a Lys. (Hoffmann & Maser 2007)





## AKR1A1

Isoforma AKR1A1, označená jako aldehydreduktáza, je jedním z prvně objevených AKR. Jde se o cytosolický enzym, který je nejvíce exprimovaný v proximálních tubulech ledvin. (Wsól 2017)

Na začátku byl identifikován jako klíčový enzym v biosyntéze kyseliny askorbové. Na myších liniích bylo prokázáno, že při absenci genu pro tento enzym, mohou nízké sérové hladiny kyseliny askorbové vést k nefyziologickému vývoji kostí a osteoporóze. U lidí zahrnuje širokou škálu jiných substrátů s preferencí negativně nabitých sloučenin obsahujících karboxylovou skupinu. Je ale účinný i při redukcích aromatických a steroidních aldehydů. (Barski et al. 2008) V biochemických procesech podílejících se na redukcí D-glyceraldehydu na glycerol a mevaldátu na kyselinu mevalonovou. (Kim et al. 2012). Ve studiích byla prokázána také účast na redukcí DAUN. (Plebuch et al. 2007)

Je spojován s radiorezistencí nádorových buněk, tj. vyšší odolností před zářením. Mechanismem regulace radiační citlivost je potlačení aktivity proteinu p53 dané výraznou expresí AKR1A1. Takto podpořená radiorezistence byla popsána v radiorezistentních buňkách karcinomu hrtanu. Jde o ochranný mechanismus buněk před smrtí po ozáření. Absence tohoto enzymu po depleci v nádorových buňkách znamenala inhibici růstu buněk. (Kim et al. 2012)

## AKR1B1

Tento cytosolický enzym nese označení aldosareduktáza. Řadí se do B1 podrodiny AKR enzymů a je považován za nejvíce prostudovanou isoformu AKR. Chromozomová lokalizace genu pro tento enzym je 7q33. (Khayami et al. 2020) Je exprimován ve všech tkáních těla, včetně ledvin a varlat. Jeho hlavní rolí v těle je redukce cytotoxických aromatických i alifatických aldehydů nebo toxických produktů peroxidace lipidů apod. (Lee et al. 2001)

Vedle redukce karbonylu DAUN je AKR1B1 díky významné roli v hyperglykemickém poškození tkání důležitým cílem v prevenci druhotných projevů diabetu jako jsou neuropatie, nefropatie nebo retinopatie. (Plebuch et al. 2007, Wsól 2017) U diabetických pacientů katalyzuje v tzv. polyolové cestě redukcí glukózy na

sorbitol při současné spotřebě NADPH a přeměně na NADP<sup>+</sup>. Vznikající sorbitol v nadměrné míře mění osmolalitu buněk v ledvinách. Následně může dojít k přeměně až na fruktózu. Tuto cestu jako jeden z mechanismů poškození tkáně indukované hyperglykemií popsal poprvé Hers 1956. Zvýší se tvorba konečných produktů pokročilé glykace (AGEs) spolu s nimi ROS, což má za následek rozvoj různých výše zmíněných diabetických komplikací. (Lee et al. 2001, Khayami et al. 2020)

Bylo prokázáno, že se AKR1B1 podílí na procesu kancerogeneze díky aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NFκB). Aldehydy konjugované s glutathionem, především pak GS-4-hydroxynonenal, jsou účinně redukovány enzymem. Má také podíl na metabolismu prostaglandinů a tvorbě prostaglandinu F2α, který podporuje zánět a může zvýšit karcinogenezi mnoha nádorů. Enzym je spojován s mechanismy karcinogenity u rakoviny prsu, pankreatu nebo u kolorektálního karcinomu. (Khayami et al. 2020, Shen et al. 2011)

### AKR1B10

Enzym AKR1B10 byl identifikovaný až roku 1998. Je podobný AKR1B1 (shodnost 71 % v aminokyselinové sekvenci) především selektivitou k substrátům a senzitivitou k inhibitorům, liší se však místy výskytu. Je nazýván „aldosareduktázou tenkého střeva“ díky výrazné expresi právě v tenkém a také tlustém střevě. Dále je exprimován v játrech, nadledvinách nebo brzlíku. (Barski et al. 2008, Wsól 2017, Seliger et al. 2018) Ve velké míře byl prokázán u nádorů jater, plic (nemalobuněčný karcinom plic), prsu i u leukemických buněk. Existuje několik mechanismů, kterými napomáhá tvorbě a rozvoji nádoru vč. regulace syntézy mastných kyselin a metabolismu lipidů. (Huang et al. 2016) AKR1B10 v rakovinných buňkách také redukuje toxické karbonylové sloučeniny produkované nádorem. Tím napomáhá snadnější proliferaci a růstu nádoru. (Shen et al. 2011) Podílí se i na *in vitro* přeměně all-trans-retinalu na retinol. Tím blokuje cestu přeměny retinalu na kyselinu retinovou a dochází ke snížení schopnosti buněk regulovat diferenciaci a proliferaci a k zesílení karcinogeneze. (Seliger et al. 2018, Penning 2015)

Enzym vykazuje v porovnání s AKR1B1 až 100× vyšší účinnost katalýzy v redukcii retinalu a množství ketonů na odpovídající alkoholy, vč. DAUN. (Barski et al. 2008) Oproti AKR1B1, který katalyzuje redukcii spíše konjugovaných karbonylů, je

AKR1B10 aktivnější v přeměně volných karbonylových sloučenin. Tato rozdílná substrátová specifita vychází z odlišné struktury aktivní kapsy enzymů. (Shen et al. 2011)

### AKR1C3

Tato isoforma se řadí mezi enzymy skupiny AKR1C. Se třemi příbuznými isoformami (1C1, 1C2 a 1C4) sdílí více než 84% „sekvenční homologii“. Vyskytuje se téměř výhradně v jaterní tkáni a prostatě, exprimována je také v prsní tkáni. (Zeng et al. 2017)

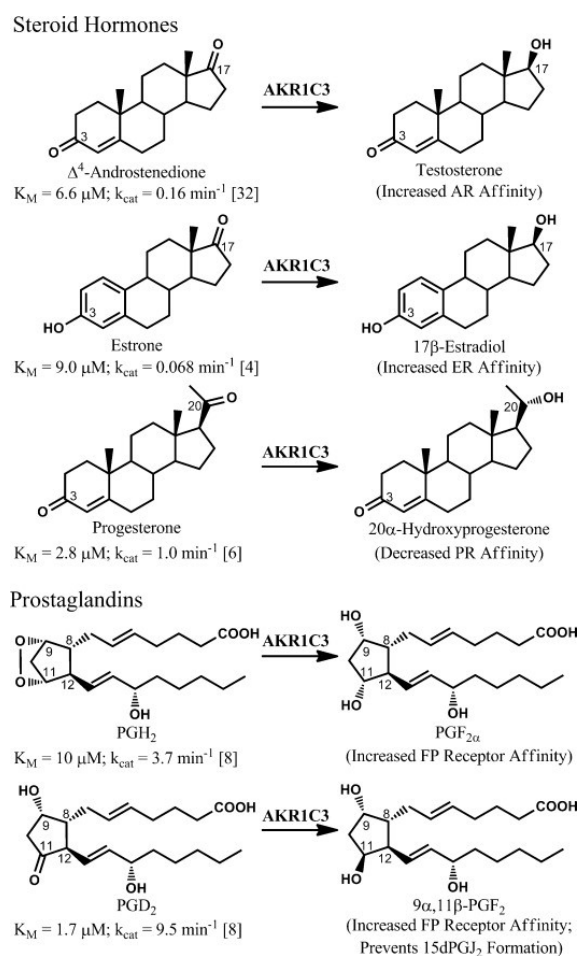
Je známá také jako prostaglandin F syntáza (PGF syntáza) nebo 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza typ 5 (17 $\beta$ -HSD Type 5). Zahrnuje několik aktivit, díky čemuž je pluripotentní a schopná tak regulace velké množství androgenů, estrogenů i progesteronů na příslušném receptoru. (Barski et al. 2008, Penning 2015, Penning 2018) Přirozeně katalyzuje endogenní steroidy a prostaglandiny. (Barski et al. 2008) Má ale také schopnost vlastní produkce androgenů v nádorové tkáni, kde je nadměrně exprimovaná. Jedná se o adaptaci na nízké hladiny sérových androgenů, kdy si je nádorová tkáň tudíž začne vytvářet sama. (Penning et al. 2018) K tomu dochází u hormonálně závislého karcinomu prostaty, kdy je nadměrnou aktivací androgenů podpořen růst nádoru. Aktivace je způsobena redukcí androstendionu na testosteron. Obdobně u karcinomu prsu a endometria dochází v důsledku nadměrně produkovaného testosteronu k tvorbě 17 $\beta$ -estradiolu, který podněcuje proliferaci nádorových buněk. (Hofman et al. 2014)

Dalšími nádory, u kterých je nadměrně exprimovaná AKR1C3, jsou nádory krve, plic, mozku nebo ledvin. Tato „upregulace“ může souviset i s agresivitou a invazivitou daného nádoru. (Hofman et al. 2014) Různorodost jejích účinku umožňuje objevení inhibitorů malých molekul, které mohou představovat potenciální terapeutikum léčby hormonálně závislých i nezávislých nádorů prostaty, prsu, endometria, AML aj. (Penning et al. 2018)

Má velký vliv na metabolické cesty uvnitř buňky. V ledvinách mění 11-deoxykortikosteron na 20- $\alpha$ -hydroxy metabolit a tím snižuje jeho aktivitu jako mineralokortikoidu. Hlavní katalyzované metabolické dráhy prostaglandinů a steroidů jsou zobrazeny na obr. 6. AKR1C3 redukuje estron a progesteron, vznikají 17 $\beta$ -estradiol

a 20 $\alpha$ -hydroxyprogesteron. Jako prostaglandin-F-syntáza vytváří prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  přeměnou z prostaglandinu H<sub>2</sub> a 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -prostaglandin F<sub>2</sub> z prostaglandinu D<sub>2</sub>.

Díky účasti na metabolismu prostaglandinů a této přeměně dochází v leukemických buňkách k omezení diferenciaci. I zde tak může inhibitor potenciálně zlepšit účinnost léčby. (Byrns et al. 2011)



**Obr. 6:** Přehled metabolických drah katalyzovaných steroidů a prostaglandinů katalyzovaných AKR1C3 (Převzato z: Byrns et al. 2011)

### 2.4.1.2 Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem

Nadrodina SDR jsou zřejmě nejrozsáhlejší skupinou enzymů zahrnující širokou škálu prokaryotických a eukaryotických enzymů. Jsou to NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktázy. Volba NAD(P) či NAD(P)H závisí na zrovna převažující funkci dehydrogenázy nebo reduktázy. Ve struktuře SDR se pro vazbu těchto nukleotidových

kofaktorů nachází tzv. Rossmannův záhyb. (Penning et al. 2018) Vyskytují se ve většině živých organismech jako rozpustné nebo některé jako membránově vázané proteiny. Jejich funkce je především fyziologická, kdy se podílí na metabolismu steroidů, prostaglandinů, cukrů, aromatických uhlovodíků, ale metabolizují i několik xenobiotik. Přeměna signalizačních molekul do aktivního nebo neaktivního stavu je zásadní funkcí těchto enzymů. Jsou zapojené také do fixace dusíku nebo syntézy antibiotik. Působí nezávisle na kovech fungujících jako kofaktor. Těmi nejvýznamnějšími z této skupiny enzymů jsou lidské karbonylreduktázy 1 a 3 (CBR1, 3). V našem experimentu byl použitý CBR1. (Hoffmann & Maser 2007, Wsól 2017)

### CBR1

CBR1 je především cytosolický enzym, podle konkrétní produkce odpovídajícího genu však může být také v hladkém endoplazmatickém retikulu nebo dalších subcelulárních strukturách. (Penning et al. 2018) V přírodě je téměř všudypřítomný. V lidském těle se exprimuje ve většině tkání, především v játrech, placentě, žaludku, hladkosvalových vláknech, ledvinách a CNS. CNS je díky němu chráněná před vlivy toxických karbonylů. Má terapeuticky velký potenciál, nicméně je poměrně málo propustný, což jeho užití limituje. (Kim et al. 2015, Wsól 2017)

Podílí se na redukci řady biologicky a farmakologicky aktivních karbonylových sloučenin jako jsou steroidy, prostaglandiny, reaktivní produkty peroxidace lipidů, toxické látky, karcinogeny nebo některé léky. (Hoffmann & Maser 2007) Kromě ANT katalyzuje redukci i např. warfarinu nebo haloperidolu. (Wsól 2017) Reaktivní lipidové aldehydy (4-oxonon-2-enal, 4-hydroxynon-2-enal, akrolein) mají schopnost měnit proteiny, což může vést k poškození DNA v buňkách. CBR1 je schopen tyto sloučeniny účinně detoxikovat a tím zabránit poškození. Obecně bylo prokázáno, že chrání buňky před oxidačním stresem a hraje tak zásadní roli v přežití buněk. (Yun et al. 2018) Byl také uznán jako základní enzym při detoxikaci chinonů u člověka. (Plebuch et al. 2007) Z o-chinonů vznikajících z polycyklických aromatických uhlovodíků metabolizuje benzo(a)anthracen, benzo(a)pyren nebo menadion. (Hoffmann & Maser 2007)

V souvislosti s prokázanou ochranou před ROS produkovanými při oxidačním stresu má inhibice CBR1 vliv na zvýšení radiosenzitivity nádorových buněk, např. u karcinomu krku a hlavy. Cílená inhibice enzymu byla navržena jako terapeutický přístup

také u leukémií, kde podaný inhibitor poráží rezistenci buněk AML vůči oxidu arsenitému ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) a tím zlepšuje účinnost léčby. (Varatharajan et al. 2016) Ve studii Kassnera et al. (2008) byl jako specifický inhibitor CBR1 popsán 4-amino-1-tert-butyl-3-(2-hydroxyphenyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin (hydroxy-PP).

U (pediatrických) leukemických pacientů s Downovým syndromem je výrazně zvýšená exprese enzymu CBR1 a vyšší riziko kardiotoxicity spojené s podáváním ANT. Je to zřejmě dáno blízkostí genu pro CBR1 na 21. chromozomu v trisomii u Downova syndromu. (Quiñones-Lombraña et al. 2014)

## 2.4.2 Inhibice

Jak již bylo zmíněno, redukce DAUN katalyzovaná karbonyl redukujícími enzymy vede k nežádoucí tvorbě toxického metabolitu. Tyto enzymy jsou proto výrazným faktorem rozvoje kardiotoxicity a rezistence buněk vůči tomuto léčivu. Je proto velkým klinickým zájmem vyvinout látky, které by měly potenciál modulovat tyto enzymy. Inhibitory by měly být silné, ale zároveň dostatečně specifické k danému enzymu. Specifita inhibitorů vychází z přítomnosti kapes, které jsou identifikovány krystalickou strukturou enzymu. Jsou zapojené do vazby ligandu a u jednotlivých isoform se značně liší. Předpokládá se, že farmakologická inhibice enzymů může znamenat řešení výše zmíněných limitů chemoterapie ANT. (Plebuch et al. 2007, Penning et al. 2006, Byrns et al. 2011)

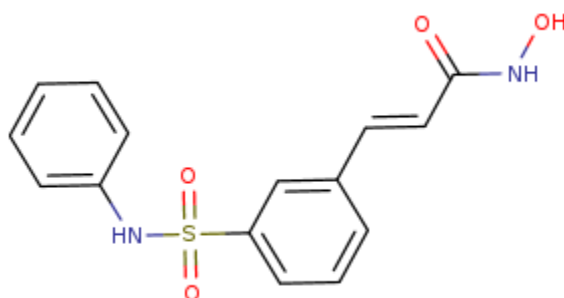
### 2.4.2.1 Inhibice AKR1C3

Kvůli významné expresi a indukci AKR1C3 v mnoha nádorových tkáních se inhibitory AKR ukazují jako potenciální terapeutikum řady hormonálně dependentních i hormonálně independentních nádorů. Byla prokázána hlavní role AKR1C3 při tvorbě testosteronu v nádorové tkáni a její inhibice se tak ukazuje jako potenciálně užitečná při léčbě rakoviny prostaty u mužů a rakoviny prsu a endometria u žen. (Penning et al. 2018) Využití inhibice AKR1C3 se předpokládá také v léčbě AML. Buňky AML prokazatelně exprimují enzym AKR1C3, který zde mimo jiné zprostředkovává metabolismus prostaglandinu a tím brání diferenciaci leukemických buněk. (Khanim et al. 2009, Byrns et al. 2011)

Obecně se mezi látky inhibující AKR1C3 řadí nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID), kyselina skořicová, steroidní hormonální analogy, flavonoidy, cyklopentany, progestiny, benzoové kyseliny, benzodiazepiny, rutheniové komplexy, antidiabetikum sulfonylurea aj. Jedná se o několik strukturálně odlišných tříd sloučenin, pro které je většinou společný jeden a více kruhů a nejméně jedna karbonylová skupina. Problémem této skupiny látek je, že se zpravidla jedná o karboxylové kyseliny, které mají omezený transport do buněk pouze s využitím nosiče. Je tedy snaha o vývoj nekarboxylových inhibitorů. (Zeng et al., 2017, Byrns et al. 2011)

## 2.5 Belinostat

Belinostat (PXD101, Beleodaq) je inhibitor histonové deacetylázy (HDAC) s sulfonamid-hydroxamidovou strukturou (Obr. 7). Byl primárně vyvinutý jako léčivo pro pacienty s relabující nebo refrakterní formou periferního T-buněčného lymfomu (PTCL). (Anonym 2014)



**Obr. 7:** Struktura belinostatu (Převzato z: Anonym 2021b)

PTCL je vzácné a heterogenní onemocnění patřící do skupiny non-Hodgkinových lymfomů. Je poměrně agresivní formou lymfomu, kdy dochází k abnormálnímu růstu lymfocytů v lymfatických uzlinách. (Anonym 2014) Vychází ze zralých T-buněk a NK-buněk. Je diagnostikován ve větší míře u pacientů nad 60 let s větší prevalencí u mužů. Medián celkového přežití PTCL (< 2 roky) je stejně jako pětileté přežití (33 %) poměrně nízký. Jako léčba v první linii byla nedávno schválená kombinovaná terapie belinostatu s cyklofosfamidem, DOX, vinkristinem a prednisonem (Bel-CHOP). Díky kombinaci většího množství léčiv se mohl uplatnit jejich vzájemný synergický účinek a tento

terapeutický přístup se ukázal jako velice účinný. I nadále jsou zkoumány různé modifikace a další možná léčiva, která by potenciálně mohla být zařazena do této kombinace. (Johnston et al. 2021)

Mezi mechanismy působení belinostatu v nádorových buňkách patří především inhibice proliferace a indukce programované buněčné smrti v těchto buňkách. *In vitro* i *in vivo* byla sledována inhibice deacetylase histonů a některých nehistonových sloučenin. (Kaminskas 2014)

Během klinických studií byl objeven také účinek belinostatu proti řadě pokročilých solidních nádorů a hematologických malignit. Studie Plumba et al. (2003) prokázala významnou inhibici růstu lidských nádorových xenograftů u myši po podání léčiva. Belinostat byl také schválen pro léčbu nádorů thymu. V naší studii byl zkoumán jako potenciální inhibitor karbonyl redukujících enzymů.



### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium *in vitro* inhibičního vlivu belinostatu na vybrané karbonyl redukující enzymy s využitím substrátu DAUN.

Experimentální část zahrnuje několik dílčích kroků:

- \* Stanovení a zhodnocení/porovnání aktivity enzymů AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 vůči DAUN
- \* Sledování potenciálního inhibičního vliv belinostatu na enzymy snížením tvorby DAUNOL
- \* Stanovení kinetických parametrů belinostatu ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ ) u nejvíce inhibovaného enzymu
- \* Určení typu inhibice u nejvíce inhibovaného enzymu

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie a reagentie

NADP<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich, USA)

Glukosa-6-fosfát (Roche Diagnostics, Německo)

Glukosa-6-fosfátdehydrogenáza (Roche Diagnostics, Německo)

MgCl<sub>2</sub> (0,1M; Katedra biochemických věd Farmaceutické fakulty, Hradec Králové)

Na-fosfátový pufr (0,1M; pH 7,4; Katedra biochemických věd Farmaceutické fakulty, Hradec Králové)

DMSO (Honeywell, USA)

Daunorubicin hydrochlorid (Mw = 563,98; Toronto research chemicals INC, Kanada)

NH<sub>3</sub> (25-29%, VWR Chemicals, USA)

Ethylacetát (Fluca, USA)

Kyselina mravenčí (0,1%; Lachema, ČR)

Acetonitril (VWR Chemicals, USA)

Metanol (VWR Chemicals, USA)

Destilovaná voda (Katedra biochemických věd Farmaceutické fakulty, Hradec Králové)

#### 4.1.2 Enzymy

Rekombinantně připravené enzymy z nadrovin AKR a SDR byly získané v expresním systému *E. coli* a naředěné na požadovanou zásobní koncentraci v 0,1M K-fosfátovém pufru a 20% glycerolu. Připravené na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové o zásobních koncentracích, které jsou uvedeny v závorkách pro jednotlivé enzymy.

AKR1A1 (1,7 mg/ml)

AKR1B1 (1,5 mg/ml)

AKR1B10 (1,555 mg/ml)

AKR1C3 (1,3 mg/ml; 1,5 mg/ml)

CBR1 (2,11 mg/ml)

#### 4.1.3 Inhibitor

Inhibitor o zásobní koncentraci 10 mM byl připravený na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Takto je uložen pro dlouhodobé skladování v mrazicím boxu při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro experimenty na diplomové práci byl využit alikvot inhibitoru o menším objemu, který byl následně skladován v laboratoři v mrazáku při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Belinostat (MedChem Express, USA)

#### 4.1.4 Pomůcky

Automatické pipety

Pipetovací špičky

Stojan na zkumavky

Zkumavky Eppendorf (1,5; 2 ml)

Popisovací fix

Navažovací lžičky

Rukavice

Stopky

Nádoba na led

Plastová injekční stříkačka

Injekční jehla

Stříkačkový filtr s membránou (0,2 µm PTFE, Whatman, UK)

Kádinky

Skleněné vialky (1 ml)

Inserty (400 µl)

Těsnící septa k vialkám

Šroubovací víčka k vialkám

#### 4.1.5 Přístroje

Analytické váhy

Vortex - třepačka

Centrifuga

ThermoMixer

Ultrazvuková lázeň

Výrobník ledu

Digestoř

Koncentrátor

UHPLC přístroj (Agilent 1290 Infinity, Agilent 1260 Infinity II)

Kolona (2,1 x 50 mm; 1,8 µm, ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, Agilent)

## 4.2 Metodika *in vitro* experimentu

V experimentu byly použity vybrané reduktázy z nadrodin AKR a SDR, konkrétně pak enzymy AKR1C3, 1B1, 1B10, 1A1 a CBR1. Specifická aktivita enzymů a inhibiční efekt inhibitoru na tuto aktivitu byly stanoveny na základě *in vitro* enzymatické reakce, při které dochází k redukci substrátu a tvorbě odpovídajícího metabolitu. Množství nezměněného substrátu a množství metabolitu ve vzorku po reakci jsou měřeny pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie (UHPLC).

#### 4.2.1 Příprava roztoků

Pro vlastní enzymatickou reakci/inkubaci karbonyl redukujících enzymů je nutné připravit regenerační systém (RS) a roztok substrátu dle počtu inkubovaných vzorků. K enzymatické reakci je také zapotřebí správně koncentrovaného enzymu a pro experimenty sledující míru inhibice i inhibitoru o odpovídajících koncentracích.

##### 4.2.1.1 Regenerační systém

RS je složený z několika chemikálií a jeho účelem je především regenerace NADPH. Enzym glukosa-6-fosfátdehydrogenáza přítomný v regeneračním systému katalyzuje redukci  $\text{NADP}^+$  na NADPH. Vstupující látkou do této reakce je glukosa-6-fosfát. Hořčičnaté ionty pak zvýší katalytickou aktivitu enzymů.

Složení RS ukazuje základní poměrová tabulka (Tab. 1), ze které lze přepočtem na počet inkubovaných reakcí přepočítat daná množství jednotlivých složek. Vždy je nutné počítat s navýšením množství o rezervu minimálně jedné reakce. Na analytických vahách se do 1,5ml eppendorfky naváží odpovídající navážky  $\text{NADP}^+$  a glukosy-6-fosfát. Přidá se Na-fosfátový pufr, ve kterém se obě látky rozpustí. Dále k tomu pipetujeme  $\text{MgCl}_2$  a glukosu-6-fosfátdehydrogenázu. Nakonec řádně vortexujeme do úplného rozpuštění všech složek. Do reakční směsi se pipetuje 20  $\mu\text{l}$  RS.

Tab. 1: Složení regeneračního systému pro 1 reakci

NADP <sup>+</sup>	0,2 mg	rozpustit v 10 $\mu\text{l}$ pufru
Glukosa-6-fosfát	0,6 mg	
MgCl <sub>2</sub> (0,1M)	10 $\mu\text{l}$	
Glukosa-6-fosfátdehydrogenáza	0,5 $\mu\text{l}$	

##### 4.2.1.2 Enzymy

Zásobní roztoky rekombinantní připravených enzymů jsou uchované v mrazáku při teplotě  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Ze své zásobní koncentrace jsou naředěné Na-fosfátovým pufrem dle jednoduchého vzorce směšovací rovnice (4.1).

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2 \quad (4.1.)$$

$c_1$  = zásobní koncentrace enzymu v mg/ml,  $V_1$  = množství enzymu ze zásobního roztoku v  $\mu\text{l}$  – neznámá hodnota,  $c_2$  = koncentrace enzymu v reakční směsi v mg/ml (koncentrace 10 $\times$  menší než výsledná koncentrace enzymu v reakci, jelikož do reakční směsi pipetováno pouze 10  $\mu\text{l}$  enzymu),  $V_2$  = celkové množství zředěného enzymu do reakcí v  $\mu\text{l}$  (množství enzymu pipetované do reakční směsi vynásobené počtem inkubovaných reakcí)

Před ředěním se enzym vyndá z mrazáku a nechá volně rozpustit, krátce promíchá a odebírá odpovídající množství k zředění. Množství přidávaného pufru odpovídá rozdílu hodnot  $V_2$  a  $V_1$  ze vzorce (4.1). Množství enzymu na reakci se pro jednotlivé enzymy lišilo takto: AKR1C3 (1,5  $\mu\text{g}$  v reakci), 1B1 (5  $\mu\text{g}$  v reakci), 1B10 (5  $\mu\text{g}$  v reakci), 1A1 (1  $\mu\text{g}$  v reakci) a CBR1 (1  $\mu\text{g}$  v reakci). Do reakční směsi bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  zředěného enzymu.

#### 4.2.1.3 Substrát – daunorubicin

V reakcích na porovnání enzymové aktivity jednotlivých enzymů a stanovení  $\text{IC}_{50}$  byl použitý pracovní roztok DAUN o koncentraci 5 mM připravený rozpuštěním odpovídající navážky v destilované vodě. Do reakční směsi bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  takto koncentrovaného roztoku, finální koncentrace substrátu v 100  $\mu\text{l}$  reakční směsi tak byla 500  $\mu\text{M}$ .

V reakcích na stanovení inhibiční konstanty  $K_i$  byl DAUN naředěný na pracovní roztoky o koncentracích 20, 10, 8, 6, 4 a 2 mM. Finální koncentrace v 100  $\mu\text{l}$  reakce byla následně 2 000, 1 000, 800, 600, 400 a 200  $\mu\text{M}$  v daném pořadí.

#### 4.2.1.4 Inhibitor – belinostat

Pro inkubace na porovnání aktivity enzymů byl inhibitor ze zásobní koncentrace 10 mM naředěný dimethylsulfoxidem (DMSO) na dvě pracovní koncentrace inhibitoru, a to 500 a 2 500  $\mu\text{M}$ . Do reakční směsi se pipetovaly 2  $\mu\text{l}$  inhibitoru, finální koncentrace v reakci 100  $\mu\text{l}$  tak byla 10 a 50  $\mu\text{M}$ .

V reakcích na stanovení  $IC_{50}$  byly použity roztoky inhibitoru o koncentracích 5, 10, 25, 50, 250, 500, 2 500 a 10 000  $\mu\text{M}$ , jejichž finální koncentrace v reakcích byla 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 50 a 200  $\mu\text{M}$ .

Pro inkubace na zjištění inhibiční konstanty  $K_i$  byly pracovní koncentrace inhibitoru 250, 500 a 1 250  $\mu\text{M}$ , finální koncentrace 100  $\mu\text{l}$  reakcích tak byla 5, 10 a 25  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.2 Příprava reakční směsi a preinkubace

Kontrola s DMSO (DMSO) a reakce s inhibitorem dané koncentrace (Belx) byly prováděny vždy s počtem opakování každé 4 $\times$ , neinhibovaná reakce (NI) byla prováděna pouze v triplikátech. U inkubací na stanovení  $IC_{50}$  i inkubací na zjištění inhibiční konstanty  $K_i$  jsou pak všechny reakce prováděny již pouze v triplikátech.

Do připravených eppendorfků o objemu 1,5 ml a řádně označených typem reakce a číslem opakování byly postupně přidávány jednotlivé složky reakční směsi dle rozpisu v pořadí Na-fosfátový pufr, RS, následně do všech s výjimkou neinhibované reakce inhibitor, příp. DMSO pro kontrolní reakce a nakonec enzym. Vzorky byly následně řádně promíchány a krátce stočeny na centrifuze.

##### Rozpis složení reakční směsi (100 $\mu\text{l}$ ):

Na-fosfátový pufr: 60  $\mu\text{l}$  (NI), 58  $\mu\text{l}$  (kontroly s DMSO a inhibované reakce)

Regenerační systém: 20  $\mu\text{l}$

Enzym: 10  $\mu\text{l}$

Inhibitor (belinostat)/DMSO: 2  $\mu\text{l}$

Substrát (daunorubicin): 10  $\mu\text{l}$

Substrát byl do reakční směsi přidáván až po tzv. preinkubaci připravené směsi v termostatu při 37 °C 10 minut. V čase preinkubace je vhodné dát DAUN do ultrazvukové lázně a teprve pak pipetovat.

#### 4.2.3 Vlastní enzymová reakce

Po uplynutí doby preinkubace směsi byl ke vzorkům postupně pipetován substrát s odstupem přesně 30 sekund mezi jednotlivými vzorky. Směs byla krátce promíchána a ihned vrácena do termostatu. Přidání substrátu značí start enzymatické reakce a reakci je třeba měřit na stopkách. Inkubace trvala 30 minut a po uplynutí této doby byla reakce ukončena přidáváním činidla k vzorkům opět postupně s odstupem 30 sekund. Vzorek byl s činidlem promíchán a vložen do ledu. Činidly použitými k zastavení enzymatické reakce byli v našem experimentu  $\text{NH}_3$  (26%) nebo metanol. S odlišným výběrem činidla se liší i následný postup přípravy vzorku k analýze UHPLC.

#### 4.2.4 Příprava vzorku a analýza UHPLC

Při porovnávání aktivity enzymů byly reakce ukončeny přidáním 40  $\mu\text{l}$  26%  $\text{NH}_3$  a umístěny na 10 minut do ledu. Po uplynutí této doby byl v digestoři do každé mikrozkušavky přidán 1 ml ethylacetátu. Vzorky byly umístěny na třepačku a 15 minut extrahovány. Po extrahování na třepačce se stočily po dobu 2 minut na centrifuze při 13 400 rpm. Opět v digestoři se do celé řady nově připravených prázdných mikrozkušavek opatrně odebrala z každého vzorku horní organická vrstva a dala odpařovat do kondenzátoru při 30 °C. Při odebírání horní organické vrstvy je třeba dbát na to, aby nedošlo k narušení spodní vrstvy, která obsahuje nečistoty. Ke zbylému obsahu mikrozkušavek bylo znovu přidáno po 1 ml etylacetátu a celý proces extrakce se zopakoval. Horní organická vrstva z této druhé extrakce byla následně přidána k odpovídajícím výparkům. Otevřené mikrozkušavky byly opět vloženy do kondenzátoru do úplného odpaření. Odpařené vzorky lze uchovávat při -20 °C, lze je ale stejně tak hned po odpaření připravit k proměření na UHPLC přístroje. K výslednému výparku se přidává 400  $\mu\text{l}$  mobilní fáze. V ultrazvuku a pomocí vortexu jsou vzorky rozpouštěny, sleduje se vizuálně přítomnost nerozpuštěných látek a pokračuje do doby, než je vzorek zcela rozpuštěn. Před pipetováním do řádně popsaných vialek, jejichž objem je zmenšen přidáním insertů, se vzorky ještě znovu promíchají a krátce (6 sekund) stočí na centrifuze.

Druhý způsob ukončení reakce byl použit v případě experimentů pro stanovení  $\text{IC}_{50}$  a  $\text{K}_i$ , kdy bylo k zastavení reakce použito 300  $\mu\text{l}$  metanolu. Vzorky byly z ledu přesunuty na 1 hodinu do lednice, příp. na 30 minut do mrazáku (-20 °C). Poté se stočily



na centrifuze (10 minut, 13 400 rpm). Při pipetování do připravených a řádně popsaných vialek byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr za pomoci injekční jehly a stříkačky. Ze vzorků tak byly odstraněny nečistoty a tím se výrazně zvýšila ochrana separační kolony v systému UHPLC. Mezi jednotlivými opakováními stejné reakce byl filtr, stříkačka a jehla pouze vyklepávány od zbytků vzorku. Mezi přechodem na vzorek s jinou reakcí byly promývány destilovanou vodou. Filtrovat je třeba vždy plynule a pomalu, zvláště když promýváme vodou, aby nedošlo k uvolnění filtru ze stříkačky.

Z mikrozkušavek se do skleněných vialek s inserty odebírá pouze určité množství vzorku. Je třeba odebírat vždy opatrně bez nasátí usazenin na dně. Vialky jsou následně uzavřeny víčkem se septem a takto jsou připraveny k proměření v systému UHPLC.

Vzorky byly měřeny za použití kapalinové chromatografie (UHPLC) s fluorescenčním detektorem (FLD) na přístrojích Agilent 1290 Infinity a Agilent 1260 Infinity II. Systém obou přístrojů byl nastaven na průtok 0,700 ml/min, nástřik na kolonu 5  $\mu$ l, mobilní fáze byla směsí 0,1% HCOOH s acetonitrilem v objemovém poměru 74:26. Pro separaci byla využita kolona firmy Agilent (2,1 x 50 mm; 1,8  $\mu$ m, ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18), eluce izokratická. Parametry FLD - excitační vlnová délka 480 nm a emisní vlnová délka 560 nm.

Díky použití směšného standardu DAUN + DAUNOL mohl být stanoven produkt enzymové reakce DAUNOL. Jeho kvalitativní vyhodnocení vychází ze specifické hodnoty retenčního času, kvantitativně je pak vyhodnocený na základě srovnání plochy jeho chromatografického píku s kalibrační křivkou a vyjádřený jako množství v ng na nástřik, resp. koncentrace v ng/ $\mu$ l.

#### 4.2.5 Výpočet specifické aktivity, $IC_{50}$ , $K_i$ a určení typu inhibice

Výsledky jednotlivých měření byly ukládány vždy pod názvem tvořeným danými informacemi: rok, měsíc a den měření/iniciály osoby/název enzymu/množství enzymu na reakci/látka ukončující reakci. Z průměrů naměřených hodnot (množství v ng na nástřik) bylo možné vypočítat specifickou aktivitu příslušného enzymu v reakci, vyjádřené jako nmol DAUNOL/ 1 ng enzymu/ 1 minutu reakce. Enzymová aktivita obecně udává, jaké látkové množství látky enzym přemění za jednotku času. Specifická aktivita je pak vypočítaná pomocí programu Microsoft Excel dosazením do obecného vztahu (4.2).

$$a = \frac{m \cdot K \cdot 1000}{t \cdot c \cdot M_r} \quad (4.2)$$

$a$  = specifická aktivita (nmol/mg/min),  $m$  = hmotnost DAUNOL (ng),  $K$  = koeficient zředění (objem celé reakční směsi 400  $\mu$ l, na kolonu nástřík pouze 5  $\mu$ l – naměřena jen 1/80 celkové hmotnosti DAUNOL ve vzorku, koeficient 80),  $t$  = čas inkubace (30 minut),  $c$  = koncentrace enzymu v reakci ( $\mu$ g),  $M_r$  = molární hmotnost DAUN (529,54 g/mol), hodnota 1000 = převod na  $\mu$ g

K sestavení grafů a výpočtu parametrů  $IC_{50}$ ,  $K_i$  a všech dalších parametrů pro stanovení typu inhibice byl použitý počítačový program GraphPad Prism 9.

#### 4.2.5.1 Stanovení $IC_{50}$ pro belinostat

Hodnota  $IC_{50}$  odpovídá koncentraci inhibující látky (belinostatu), která sníží aktivitu daného enzymu na poloviční hodnotu. Abychom mohli najít odpovídající koncentraci látky, která má tento účinek, bylo třeba v měření zvolit koncentrační rozpětí (0,1 až 200  $\mu$ M) tak, aby byl pokrytý celý inhibiční rozsah belinostatu.

#### 4.2.5.2 Stanovení inhibiční konstanty $K_i$ a typu inhibice

Inhibiční konstanta  $K_i$  vyjadřuje vztah mezi enzymem a inhibitorem a kvantitativně charakterizuje účinek inhibitoru. Udává koncentraci inhibitoru, při které je dosaženo 50% inhibice enzymu, tzn. 50 % enzymu je navázaného v komplexu enzym-inhibitor. Nižší hodnota  $K_i$  značí účinnější inhibitor, jelikož je jeho afinita k enzymu vyšší.

Při inkubacích na stanovení  $K_i$  byly použité rozdílné koncentrace substrátu, konkrétně v rozsahu od 200 do 2 000  $\mu$ M. To umožnilo získat data pro vynesení závislosti rychlosti reakce, resp. aktivity enzymu na koncentraci substrátu. Tato závislost má tvar hyperboly. Jednotlivé koncentrace substrátu byli navíc proměřeny s několika koncentracemi inhibitoru.

Matematickým vyjádřením výše zmíněné hyperbolické závislosti je základní kinetická rovnice dle Michaelise a Mentenové. Vyjadřuje vztah mezi okamžitou rychlostí enzymové reakce a koncentrací substrátu vzorcem (4.3).

$$v = \frac{V_{MAX} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (4.3)$$

$v$  = reakční rychlost,  $K_M$  = Michaelisova konstanta (mol/l),  $V_{MAX}$  = maximální (mezní) rychlost (mol/s),  $[S]$  = koncentrace substrátu

Maximální rychlost ( $V_{MAX}$ ) a Michaelisova konstanta ( $K_M$ ) jsou dvě základní kinetické konstanty pro dvojici enzym a substrát.  $K_M$  značí takovou koncentraci substrátu, při které enzymová reakce probíhá rychlostí srovnatelnou s poloviční hodnotou maximální rychlosti.  $K_M$  je reciprokou hodnotou afinity enzymu k substrátu a platí, že čím je její nižší, tím je afinita enzymu k substrátu větší. Maximální rychlost je nejvyšší dosažená rychlost enzymové reakce při dané koncentraci enzymu.

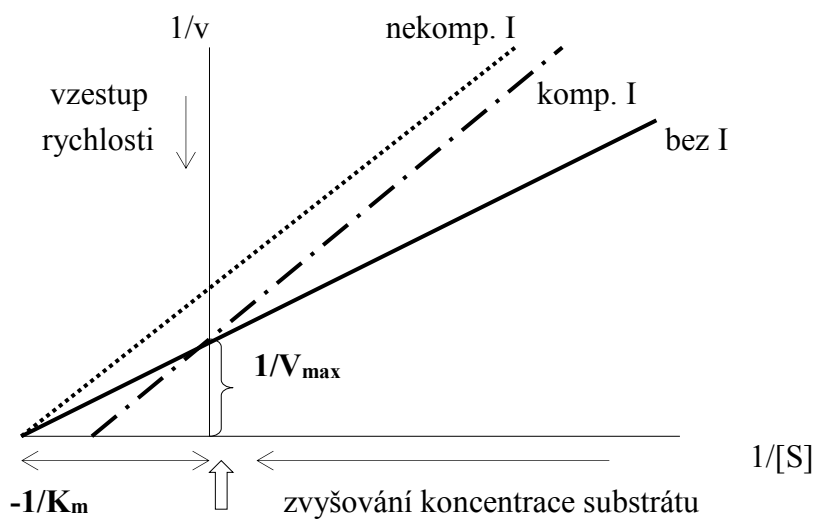
Ke stanovení  $K_M$  a  $V_{MAX}$  je ideální použít linearizovaný výnos grafického vyjádření rovnice Michaelise a Mentenové, tzv. linearizaci podle Lineweavera a Burka pomocí převrácených hodnot. Z té lze také zjistit velikost inhibiční konstanty  $K_i$  použitého inhibitoru.

Z hlediska mechanismu působení inhibitoru na enzym se rozlišují čtyři základní typy inhibice. Jednotlivé typy jsou navzájem dobře rozpoznatelné srovnáním velikosti Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti naměřených bez inhibitoru ( $K_M$ ,  $V_{MAX}$ ) a v jeho přítomnosti ( $K_M'$ ,  $V_{MAX}'$ ). Rozlišení pak vypadá následovně:

- Kompetitivní inhibice, kde maximální rychlost není inhibitorem ovlivněna ( $V_{MAX} = V_{MAX}'$ ), ale je zvýšená Michaelisova konstanta ( $K_M' > K_M$ ).
- Nekompetitivní inhibice, kde inhibitorem snižena maximální rychlost ( $V_{MAX}' < V_{MAX}$ ), ale nevyvolá změnu Michaelisovy konstanty ( $K_M' = K_M$ ).
- Akompetitivní inhibice, kde je snížena jak maximální rychlost, tak Michaelisova konstanta, jejich poměr tak nicméně zůstává zachován ( $K_M'/K_M = V_{MAX}'/V_{MAX}$ ).
- Smíšená inhibice, kde inhibitor mění oba parametry i jejich poměr, ale tuto změnu nelze popsat jednoduchým kinetickým modelem.

Všechny typy inhibice lze také rozeznat podle křivek závislosti koncentrace substrátu na rychlosti, resp. specifické aktivitě enzymu katalyzující reakci. Právě dvojité

reciproké vynesení podle Lineweavera a Burka je pro tento účel ideální. Rozlišení nekompetitivního a kompetitivního typu inhibice znázorňuje Obr. 8.



**Obr. 8:** Vliv inhibitoru (I) na enzymatickou reakci (dvojitě reciproký výnos dle Lineweavera a Burka) (Převzato z: Ledvina et al. 2006)

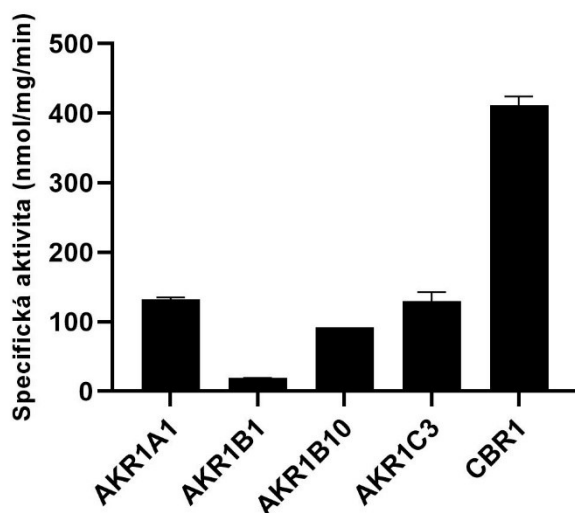
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Stanovení a porovnání specifické aktivity AKR a SDR vůči daunorubicinu

V první části experimentu této práce byla porovnána aktivita pěti vybraných karbonyl redukujících enzymů z nadrodin AKR (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3) a SDR (CBR1) vůči DAUN, použitému v pracovním roztoku o koncentraci 5 mM. V *in vitro* inkubacích (NI reakce) prokázaly enzymy různou míru katalýzy dané reakce. Specifická aktivita enzymu byla vypočítána vždy z množství/hmotnosti vzniklého DAUNOL podle vzorce (4.2). Množství bylo měřeno na UHPLC přístroji proměřením jednotlivých vzorků a vychází z kalibrační křivky sestavené proměřením odpovídající standardů. Průměrné specifické aktivity jednotlivých enzymů vyjádřené v jednotkách nmol/mg/min porovnává Tab. 2. Grafické srovnání aktivit enzymů znázorňuje Obr. 9.

Tab. 2: Specifické aktivity testovaných karbonyl redukujících enzymů vůči DAUN

Enzym	Průměrná specifická aktivita (nmol/mg/min)	Směrodatná odchylka
AKR1A1	132,3	3,1
AKR1B1	19,0	0,6
AKR1B10	92,6	0,0
AKR1C3	129,8	13,3
CBR1	411,3	13,0



Obr. 9: Graf průměrných specifických aktivit testovaných enzymů vůči DAUN

Nejvyšší aktivitu v *in vitro* podmínkách prokázal enzym CBR1 z nadrodiny SDR ( $411,3 \pm 13,0$  nmol/mg/min). Ostatní enzymy již projevovaly nižší hodnoty specifických aktivit. Poměrně vysokou aktivitu v reakcích měly AKR1A1 ( $132,3 \pm 3,1$  nmol/mg/min) a 1C3 ( $129,8 \pm 13,3$  nmol/mg/min). Příbuzné enzymy AKR1B10 a 1B1 byly v porovnání s předchozími výrazně méně aktivní, AKR1B10 dosahoval hodnoty specifické aktivity 92,6 nmol/mg/min. U enzymu AKR1B1 byla naměřena nejnižší aktivita z pětice vybraných, a to  $19,0 \pm 0,6$  nmol/mg/min. Specifická aktivita enzymů tak klesala v pořadí CBR1, AKR1A1, 1C3, 1B10 a 1B1.

S našimi výsledky korespondují poznatky vycházející ze studie Varatharajana et al. (2016), která prokázala největší schopnost katalýzy DAUN ze všech jaterních enzymů právě u CBR1. Také AKR1A1 je považována za jeden z hlavních enzymů v metabolismu ANT (Mordente et al. 2009) i samotného DAUN (Wolfram et al. 2000). Nejvíce studovaným aktivním enzymem kvůli prokázané spojitosti s riziky klinického použití ANT je AKR1C3. Aktivita enzymů u Hudáčové (2019) klesala v pořadí CBR1, AKR1C3, 1B1, 1A1, 7A2 a 1B10. Podobných výsledků dosáhl také Milan (2019), který mimo jiné potvrdil námi naměřenou velice malou aktivitu AKR1B1. Vedle toho AKR1C1, 1C2, 1C4 a také CBR3 byli popsány jako enzymy s žádnou nebo velmi malou aktivitou v *in vitro* přeměně DAUN a DAUNOL. (Takahashi et al. 2008, Hudáčová 2019).

DAUN a další ANT jsou pouze jednou skupinou ze širokého spektra substrátů karbonyl redukujících enzymů. Mezi další léčiva, v jejichž metabolismu se uplatňují tyto enzymy, patří např. oracin (především pro enzym CBR3), warfarin, ketoprofen (Pilka et al. 2009), mitomycin (substrát AKR1B10), aj. (Matkowskyj et al. 2014) Publikováno bylo mnoho článků zabývajících se účastí jednotlivých enzymů v metabolismu těchto léčiv.

Hojně studovaným ze skupiny ANT je vedle DAUN také DOX. Studie Hofmana et al. (2014) porovnávala DOX a DAUN jako substráty enzymu AKR1C3. Prokázala však výrazně lepší substrátovou specifitu k DAUN. Možným důvodem zhoršené schopnosti katalyzovat redukci karbonylu u DOX je zřejmě hydroxyl v postranním řetězci na uhlíku C14 v jeho struktuře, který u DAUN nahrazuje vodík (Obr. 1 v kapitole 2.1.). Zhong et al. (2011) potvrdili podobnou myšlenku také u enzymu AKR1B10, kdy u DOX neprokázali znatelnou katalytickou aktivitu AKR1B10 v porovnání s DAUN a IDA.

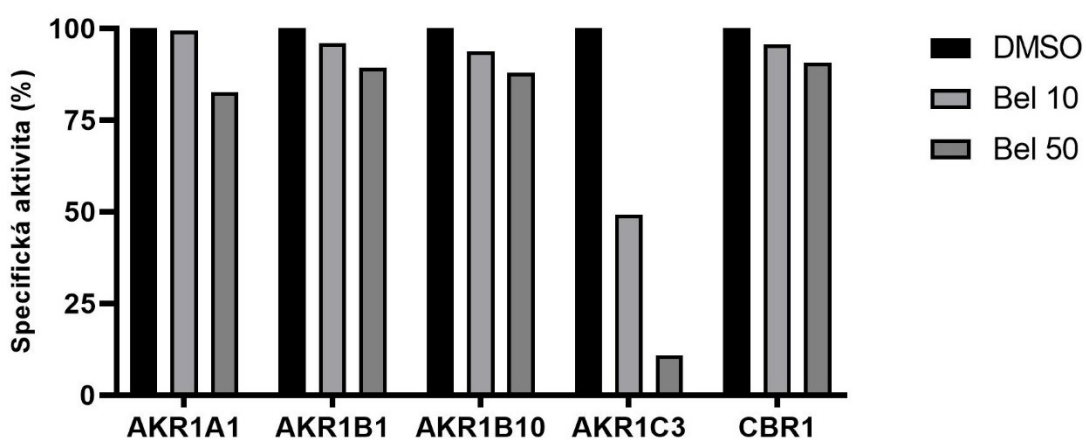
## 5.2 Sledování inhibičního účinku belinostatu na testované enzymy

Pokles aktivity enzymů redukujících karbonyl ANT se ukazuje jako žádoucí z důvodu snížení rizika rozvoje rezistence a kardiotoxicity při léčbě ANT. Je mnoho studií zkoumajících velké množství látek s potenciálním inhibičním efektem. V této diplomové práci byl zkoumán inhibiční účinek belinostatu.

Všechny testované enzymy byly podrobeny inkubacím v přítomnosti belinostatu o koncentracích v reakci 10 a 50  $\mu\text{M}$  (Bel 10 a Bel 50) a inkubaci s DMSO místo inhibitoru (DMSO). Reakce s DMSO byla zvolena jako kontrola místo neinhibované reakce z důvodu možného vlivu DMSO (použitý při ředění inhibitoru) na aktivitu enzymů. Reakce byly měřeny pro každý enzym a koncentraci inhibitoru v triplicátu a průměrné výsledky jsou zobrazeny v tab. 3. spolu se směrodatnou odchylkou výsledku a také procentuálním vyjádřením aktivity i míry inhibice vztahované k 100% aktivitě v kontrolní DMSO reakci. Specifická aktivita je počítána stejně jako při stanovení aktivit enzymů v neinhibované reakci, tj. z množství DAUNOL ve vzorku dle vzorce (4.2). Grafické znázornění změn v aktivitách enzymů působením belinostatu ukazuje obr. 10.

Tab. 3: Specifické aktivity enzymů vůči DAUN v kontrolní reakci s DMSO (DMSO) a v reakcích s belinostatem o koncentracích v reakci 10  $\mu\text{M}$  (Bel 10) a 50  $\mu\text{M}$  (Bel 50)

Enzym/Reakce	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Směrodatná odchylka	Specifická aktivita (%)	Míra inhibice (%)
<b>AKR1A1</b>				
DMSO	123,0	0,6	100,0	
Bel 10	122,3	0,2	99,4	0,6
Bel 50	101,7	6,8	82,7	17,3
<b>AKR1B1</b>				
DMSO	14,3	0,3	100,0	
Bel 10	13,8	0,3	96,0	4,0
Bel 50	12,8	0,2	89,3	10,7
<b>AKR1B10</b>				
DMSO	57,5	2,2	100,0	
Bel 10	53,9	0,7	93,7	6,3
Bel 50	50,5	1,9	87,9	12,1
<b>AKR1C3</b>				
DMSO	100,4	8,9	100,0	
Bel 10	49,5	10,2	49,3	50,7
Bel 50	10,8	2,4	10,8	89,2
<b>CBR1</b>				
DMSO	390,1	3,5	100,0	
Bel 10	372,8	3,1	95,6	4,4
Bel 50	353,4	8,3	90,6	9,4



**Obr. 10:** Grafické znázornění inhibičního účinku belinostatu na testované enzymy



Z grafu a tabulky vyplývá, že belinostat měl inhibiční účinek na všechny testované enzymy a vždy došlo v jeho přítomnosti ke snížení aktivity. Avšak u všech s výjimkou AKR1C3 nebyla míra inhibice (ani u jedné z koncentrací inhibitoru) větší než 20 %. AKR1C3 byl tak nejvíce inhibovaným karbonyl redukujícím enzymem z testované pětice enzymů, a to s mírou inhibice 50,7 % (belinostat 10  $\mu$ M) a 89,2 % (belinostat 50  $\mu$ M). Vzájemně podobnou měrou byly pak inhibovány i další enzymy z nadrodiny AKR. U AKR1B10 došlo k inhibici 6,3 % (belinostat 10  $\mu$ M) a 12,1 % (belinostat 50  $\mu$ M), aktivita AKR1A1 byla snížena minimální inhibicí 0,6 % v případě 10  $\mu$ M belinostatu v reakci a trochu vyšší inhibicí 17,3 % v případě silnějšího 50  $\mu$ M belinostatu. AKR1B1 vykazovala míru inhibice 4,0 % (belinostat 10  $\mu$ M) a 10,7 % (belinostat 50  $\mu$ M). Průměrně nejnižší inhibice belinostatem byla zaznamenána u enzymu CBR1, a to 4,4 % (belinostat 10  $\mu$ M) a 9,4 % (belinostat 50  $\mu$ M). Silněji koncentrovaný inhibitor vykazoval logicky vyšší inhibice. Pořadí enzymů (od nejvíce inhibovaného) je AKR1C3, 1B10, 1A1, 1B1 a CBR1.

Prozatím nejsou žádné studie zkoumající belinostat jako inhibitor karbonyl redukujících enzymů, nicméně je možné porovnat jeho inhibiční aktivitu s jinými inhibitory s inhibičním potenciálem k AKR1C3. Podobně vysokou inhibici prokázal například 50 $\mu$ M olaparib (91 %) nebo 50 $\mu$ M inhibitor protein-kinázy C midostaurin (85 %). (Tavares et al. 2020, Milan 2019) Ibrutinib vykazoval > 90% inhibici již při koncentraci 10  $\mu$ M v reakci. Jsou nicméně inhibitory vykazující nižší inhibiční potenciál k AKR1C3 s inhibicí < 60 % i při vyšší koncentraci 50  $\mu$ M, například inhibitory tyrosinové kinázy bosutinib a neratinib. (Hudáčová 2019)

Belinostat jako inhibitor HDAC je ve většině studií zkoumán spíše podle původní indikace, tj. jako léčivo T-buněčného lymfomu, ale i řady dalších malignit. Jeho vzájemný účinek s DOX – analogem DAUN je využíván v léčebném přístupu Bel-CHOP, nicméně o jeho vlivu na karbonyl redukující enzymy se dosud neuvažovalo. V *in vitro* podmínkách dle výsledků prokázal poměrně významnou % míru inhibice u enzymu AKR1C3 a v porovnání s jinými výše zmíněnými inhibitory ho lze pokládat za jeden ze silnějších inhibitorů AKR1C3.

Pro potvrzení jeho vlivu na tento enzym je však vhodné doplnit výsledky experimentem provedeným na buněčných liniích. Další možné pokusy by následně mohly

být na leukemických či jiných nádorových buňkách, které by dokázaly více zohlednit vliv exprese AKR1C3 a další charakteristiky vycházející z odlišné (patologické) povahy buněk.

### 5.3 Stanovení $IC_{50}$ pro belinostat

Pro stanovení  $IC_{50}$  belinostatu, tj. koncentrace, která sníží aktivitu enzymu na polovinu, byl zvolen enzym AKR1C3, který na základě předběžných měření prokázal nejvyšší míru inhibice. Sledování účinku různých koncentrací belinostatu na enzym AKR1C3 nám umožnilo sledovat kinetiku inhibice a více porozumět parametrům a průběhu inhibiční reakce. Byly zvolené koncentrace inhibitoru v reakci 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 50 a 200  $\mu$ M. Obr. 11 znázorňuje závislost logaritmické hodnoty koncentrace inhibitoru na procentuálním vyjádření aktivity enzymu. Hodnota  $IC_{50}$  je inflexním bodem dané křivky. V tabulce 4 jsou všechny průměrné aktivity (%) při daných koncentracích inhibitoru ze třech měření, kde každá reakce byla prováděná v triplikátu. Jako 100% aktivita byla zvolená aktivita enzymu v reakci s DMSO místo inhibitoru (DMSO). Tyto hodnoty slouží pro výpočet  $IC_{50}$  pomocí programu GraphPad Prism 9. Jednotlivé hodnoty  $IC_{50}$ , průměrnou  $IC_{50}$  a směrodatnou odchylku hodnoty ukazuje tab. 5.

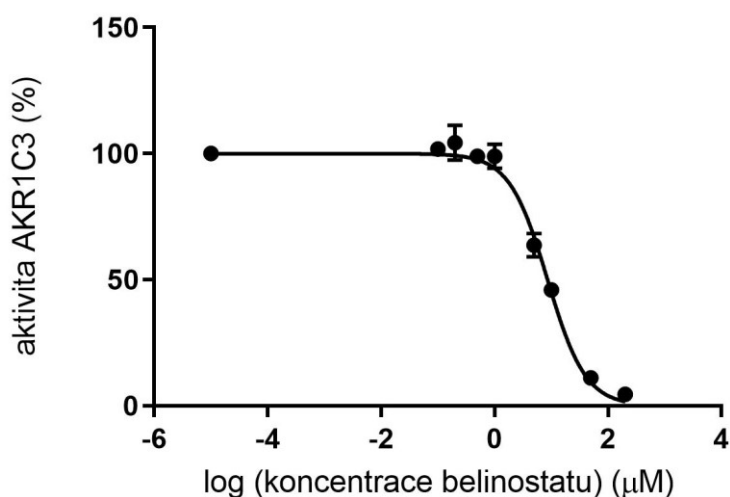
Tab. 4: Specifické aktivity enzymů v reakcích s různě koncentrovaným belinostatem

koncentrace belinostatu v reakci ( $\mu$ M)	Specifická aktivita 1. měření (%)	Specifická aktivita 2. měření (%)	Specifická aktivita 3. měření (%)	Průměrná specifická aktivita (%)	Směrodatná odchylka
200,0	4,6	3,9	4,5	4,3	0,3
50,0	11,0	10,9	11,0	11,0	0,1
10,0	48,7	51,0	45,9	48,5	2,1
5,0	71,7	67,6	63,6	67,6	3,3
1,0	103,7	102,9	98,9	101,8	2,1
0,5	96,9	104,2	98,9	100,0	3,1
0,2	-	89,3	104,3	96,8	7,5
0,1	109,5	106,6	101,9	106,0	3,1
0,00001*	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0

\* DMSO

Tab. 5: Hodnoty IC<sub>50</sub> belinostatu

	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr	Směrodatná odchylka
IC <sub>50</sub> (μM)	9,9	8,6	9,9	9,5	0,6

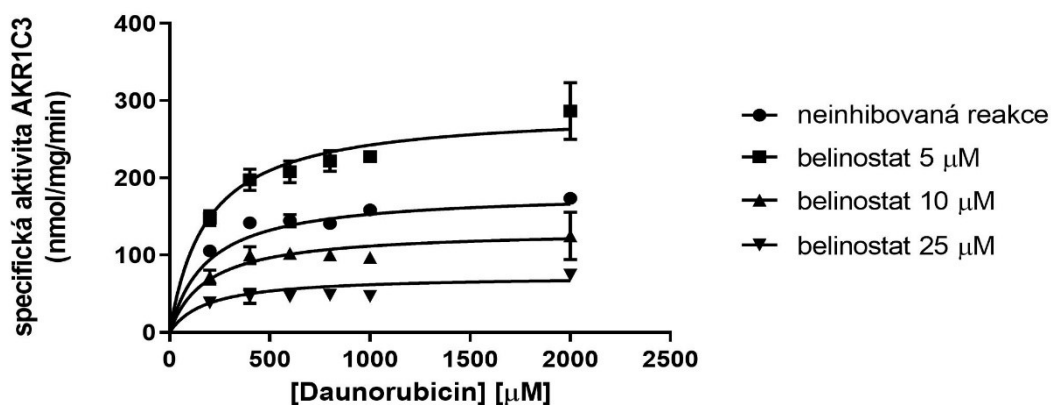


**Obr. 11:** Závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentrace belinostatu (pro stanovení IC<sub>50</sub>)

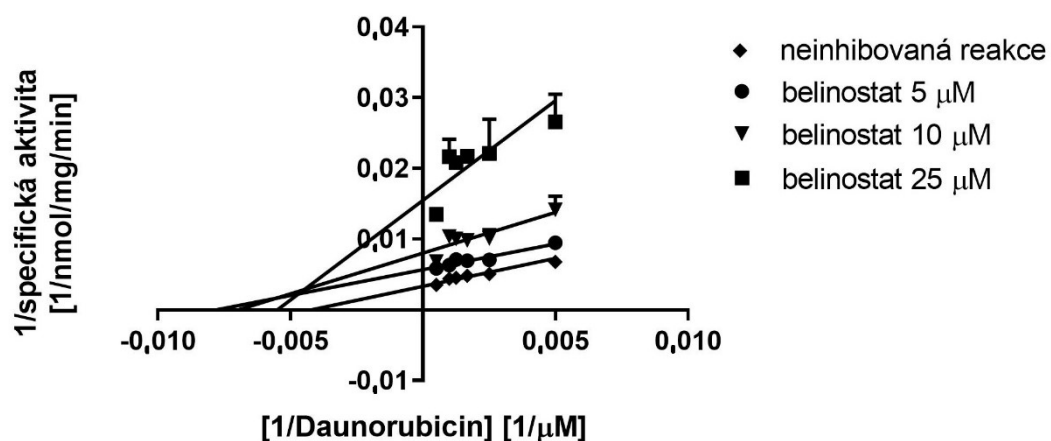
Výsledná hodnota IC<sub>50</sub> belinostatu stanovená *in vitro* je  $9,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Hodnota IC<sub>50</sub> inhibitorů koresponduje s mírou účinnosti inhibice. V případě nekompetitivní inhibice by se hodnota IC<sub>50</sub> měla rovnat parametru K<sub>i</sub>, u kompetitivní inhibice by se zvyšovala se zvyšující koncentrací substrátu. Hodnota IC<sub>50</sub> belinostatu s porovnáním s jinými inhibitory se ukazuje jako vyšší. Inhibitor midostaurin schválený k léčbě AML v kombinaci s DAUN/Ara-C dosahoval IC<sub>50</sub> < 1 μM. (Milan 2019) Nicméně například klinicky užívaný purvalanol A dosáhl IC<sub>50</sub> 6,4 μM. (Novotná et al. 2018) Vyšší IC<sub>50</sub> dosahuje klinicky používaný MPA (IC<sub>50</sub> = 5,6 μM) a baccharin (IC<sub>50</sub> = 7,0 μM). (Verma et al. 2016) Pro posouzení významnosti této hodnoty je vhodné provést experiment na buněčných liniích.

## 5.4 Stanovení $K_i$ belinostatu a typu inhibice

Při reakcích na stanovení inhibiční konstanty  $K_i$  a určení typu inhibice byl použitý DAUN o koncentracích v reakci 2 000, 1 000, 800, 600, 400 a 200  $\mu\text{M}$ . Zároveň byly proměřeny jednotlivé koncentrace substrátu se třemi koncentracemi belinostatu (5, 10 a 25  $\mu\text{M}$  v reakci). Získané hodnoty umožnily sestavení grafu (Obr. 12), který představuje hyperbolickou závislost dle Michaelise a Mentenové (viz kap. 4.2.5.2). Obr. 13 ukazuje vynesení převrácených hodnot aktivit enzymu a koncentrací DAUN. Toto grafické vyjádření, linearizace rovnice Michaelise a Mentenové dle Lineweavera a Burka, slouží k určení typu inhibice (viz. obr. 8 v kapitole 4.2.5.2) a lze z něj vyčíst i hodnotu  $K_i$ .



**Obr. 12:** Saturační křivka - závislost specifické aktivity enzymu AKR1C3 na různých koncentracích DAUN v reakcích s/bez přítomnosti belinostatu



**Obr. 13:** Dvojitě reciproký výnos závislosti specifické aktivity AKR1C3 na koncentraci DAUN (k určení typu inhibice dle Lineweavera a Burka)

Průměrná hodnota  $K_i$  belinostatu je  $8,9 \pm 0,4$ . Platí, že čím nižší je tato hodnota, tím lepší má inhibitor afinitu k enzymu a je v inhibici účinnější. Dvojitě reciprokový výnos dle Lineweavera a Burka je vhodný pro zjištění typu inhibice, rozdíly jsou zde zpravidla dobře viditelné. Platí, že nekompetitivní inhibice oproti kompetitivní snižuje  $V_{MAX}$ , nicméně nemění  $K_m$ , což je na tvaru křivek jasně patrné. Křivky by se měli protnout v jediném bodě ( $-1/K_i$ ) na ose x. Z grafu (Obr. 13) závislosti naměřených hodnot nevyplývá zcela jednoznačně nekompetitivní typ inhibice, nicméně se k němu nejvíce blíží. Může se také jednat o typ inhibice smíšené, ale převažuje typ nekompetitivní. Pro nekompetitivní typ inhibitoru je charakteristická vazba na enzym nebo přechodný komplex enzym-substrát nezávisle na substrátu. Váže se do jiného místa než substrát a po navázání negativně ovlivní tvorbu produktu. Jelikož je nezávislý na vazbě substrátu, ani nadbytek substrátu neumožní potlačení nekompetitivní inhibice. U kompetitivní inhibice je tomu naopak a nadbytek substrátu má schopnost potlačit inhibici.

Většina zkoumaných inhibitorů AKR1C3 jsou nekompetitivní inhibitory, například již zmíněný olaparib nebo ibrutinib. (Tavares et al. 2020, Hudáčková 2019) Jako účinné inhibitory s nekompetitivním účinkem potvrzeným na buněčných liniích se ukázaly také deriváty purinu, purvalanol A a roscovitin ( $K_i = 5,5$  a  $1,4 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50} = 6,4$  a  $3,7 \mu\text{M}$ ). (Novotná et al. 2018) Například baccharin se ukázal jako specifický kompetitivní inhibitor AKR1C3, nicméně tento typ není tak běžný. (Verma et al. 2016)

Inhibice AKR1C3 je velmi sledovaným krokem, podobně i její vliv na nádorová onemocnění, předně ty, ve kterých je prokázána vysoká exprese AKR1C3 (rakovina prostaty nebo prsu, rakoviny krve, aj.). Využití specifického inhibitoru AKR1C3 navrhuje skupina Vermy et al. (2018) v kombinované terapii kastročtě rezistentního karcinomu prostaty (CRPC). Inhibitor (E)-3-(4-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-(3-fenylpropanamido)fenyl)akrylová kyselina (KV-37), prokázal *in vitro* a *in vivo* antineoplastický účinek na buňky nádoru prostaty a senzibilizuje je k léčivu enzalutamidu. Zásadním poznatkem je, že není toxický ke zdravým buňkám prostaty.

Synergické působení inhibitoru AKR1C3 s DAUN/etoposidem značí strategii léčby leukémií. Přidáním inhibitoru se zvýší cytotoxicita DAUN až 10× a je pak účinnějším cytostatikem v terapii AML. Takto využitými inhibitory mohou být např. MPA ( $IC_{50} = 5,6 \mu\text{M}$ ) nebo již zmíněný baccharin ( $IC_{50} = 7,0 \mu\text{M}$ ). (Verma et al. 2016).

Za silné inhibitory karbonyl redukujících enzymů jsou pokládány flavonoidy (např. 2'-hydroxyflavanon), které snižují redukci na nepříznivý DAUNOL a zároveň zvyšují kumulaci nezměněného léčiva inhibicí Pgp. Snižují také volné radikály. (Wolfram et al. 2000, Hofman et al. 2014) Velkou specifitu vůči enzymům AKR1C prokázaly inhibitory založené na N-fenylanthranilových kyselinách, zastoupené NSAID. (Hofman et al. 2014, Penning et al. 2006)

Úsilí vyvinout účinný a značně specifický inhibitor AKR1C3 vychází i z předpokladu tlumení karcinogeneze v nádorových buňkách snížením signalizace k proliferaci indukované enzymem. (Penning et al. 2006) Předpokládanou vlastností inhibitorů by měla být kardioprotektivita. (Plebuch et al. 2007) Není však snadné ani po prokázání inhibičního potenciálu látek vůči AKR1C3 zavést inhibitor do klinického použití a má to svá omezení. Vyplývá to především z různorodosti funkcí enzymu *in vivo*. Účinek inhibitoru tak může být částečně odlišný od *in vitro* studií a způsobovat toxicitu. Je tedy nutné kombinované použití inhibitorů a protinádorových léčiv v praxi důkladně posoudit. (Hofman et al. 2014) Také různé vzorce inhibice enzymů jejich využití jako terapeutik komplikují. (Penning et al. 2018)

## 6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byl sledovaný inhibiční účinek belinostatu na enzymy z nadrodiny AKR a SDR redukující DAUN. DAUN je léčivo ze skupiny ANT indikovaný v léčbě akutních leukémií. Je však mnoho mechanismů, které snižují jeho účinnost a v důsledku vývoje možné rezistence a kardiotoxicity limitují klinické použití. Přispívá k tomu také samotná redukce DAUN na DAUNOL, katalyzovaná mnoha enzymy z nadrodiin AKR a SDR. DAUNOL pak vykazuje nižší protinádorový účinek, přispívá k rozvoji rezistence nádorových buněk k léčivu a je více toxický. Redukční přeměna DAUN není tedy příliš žádoucí, proto je snahou hledat látky s inhibičním účinkem vůči těmto enzymům k potlačení této přeměny.

Na základě *in vitro* inkubací s DAUN jsme prokázali aktivitu enzymů AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 v redukční přeměně DAUN na DAUNOL. Specifická aktivita u nich klesala v pořadí CBR1, AKR1A1, 1C3, 1B10 a 1B1. Tyto poznatky korespondují z velké míry s dostupnými publikacemi.

Přidáním belinostatu do reakcí došlo u všech enzymů ke snížení aktivity, nicméně s různou intenzitou/mírou inhibice. Belinostat byl identifikován jako inhibitor HDAC a primárně indikován pro terapii relabující nebo refrakterní formy PTCL. V této práci se zkoumal jeho potenciál v inhibici karbonyl redukujících enzymů. Největší inhibiční efekt belinostatu byl prokázán z námi testovaných enzymů u AKR1C3, kdy při nižší koncentraci inhibitoru v reakci (10  $\mu\text{M}$ ) došlo k více než 50% snížení aktivity, u koncentrace 50  $\mu\text{M}$  dosahovala inhibice téměř 90 %. U zbylých enzymů klesala míra inhibice v pořadí 1B10, 1A1, 1B1 a CBR1. V porovnání s údaji z publikací studující další inhibitory můžeme říct, že se jedná o jeden ze silnějších inhibitorů AKR1C3.

AKR1C3 jako nejvíce inhibovaný enzym byl použit pro stanovení dalších kinetických parametrů. Jejich účelem bylo lepší pochopení působení belinostatu a také popis kinetiky belinostatu jako inhibitoru. Stanovená  $IC_{50}$  odpovídá vyšší hodnotě  $9,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . K popisu kinetiky bude třeba dále doplnit pokus sledující závislost  $IC_{50}$  na koncentraci enzymu pro stanovení, zda-li se jedná o pevně se vázající inhibitor či nikoliv, tedy roste-li s rostoucí koncentrací enzymu také hodnota  $IC_{50}$ .

Z výpočtu  $K_i$  belinostatu ( $K_i = 8,9 \pm 0,4$ ) a z dvojité reciprokého výnosu dle Lineweavera a Burka vyplývá, že působení belinostatu na AKR1C3 se nejvíce blíží

kinetice nekompetitivních inhibitorů. Výhodou toho typu je v klinické praxi možnost měnit dávku DAUN bez obavy ze snížení inhibičního účinku. Aktivita nekompetitivního inhibitoru totiž není nadbytkem substrátu nijak potlačena.

Je vhodné v budoucích studiích doplnit tyto výsledky inhibice belinostatem v *in vitro* podmínkách dalším experimentem provedeným na buněčných liniích. To umožní prokázat inhibiční efekt i na enzym AKR1C3 exprimovaný v buňkách a může potvrdit hypotézu lepšího cytostatického účinku DAUN při použití spolu s inhibitorem. Poznatky experimentů na buněčných liniích umožní úvahy o reálné možnosti využití belinostatu jako doplňkového chemoterapeutika ke klasické chemoterapii u různých AKR1C3 dependentních onemocnění. Před samotnými klinickými studiiemi bude nutné pokračovat v experimentech na úrovni *in vitro* vybraných leukemických buněk.



## 7 SEZNAM ZKRATEK

17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
AGEs	Konečné produkty glykace
AML	Akutní myeloidní leukémie
ANT	Antracyklinová antibiotika
Ara-C	Cytarabin
DAUN	Daunorubicin
DAUNOL	Daunorubicinol
DOX	Doxorubicin
EPI	Epirubicin
HDAC	Histonová deacetyláza
HSD	Hydroxysteroidní dehydrogenázy
Hydroxy-PP	4-amino-1-tert-butyl-3-(2-hydroxyphenyl) pyrazolo [3,4-d] pyrimidin
IDA	Idarubicin
LRP	<i>The lung resistance-related protein</i>
MDR	Mnohočetná léková rezistence
MPA	Medroxyprogesteron acetát
NF $\kappa$ B	Nukleární faktor kappa B
NSAID	Nesteroidní protizánětlivá léčiva
PGF syntáza	Prostaglandin F syntáza
PgP	P-glykoprotein
PTCL	Periferní T-buněčný lymfom
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SDR	Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem

## 8 LITERATURA

Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C. and Spalla C. (1969) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*. 11(6), 1101-10.

Barski O. A., Tipparaju S. M. and Bhatnagar A. (2008) The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Review*. 40(4), 553-624.

Bashir Y., Geelani S., Bashir N., Mir S. A., Mushtaq M., Jan M. A. and Rasool J. (2015) Role of low dose cytarabine in elderly patients with acute myeloid leukemia: An experience. *South Asian Journal of Cancer*. 4(1), 4-6.

Booser D. J. and Hortobagyi G. N. (1994) Anthracycline Antibiotics in Cancer Therapy. *Drugs*. 47, 223-258.

Byrns M. C., Jin Y. and Penning T. M. (2011) Inhibitors of type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 125(1-2), 95-104.

*Clinical Trials Arena*. (2014) Belinostat (PXD 101) for the Treatment of Peripheral T-Cell Lymphoma (PTCL). [cit. 20. 3. 2021] Dostupné z: <https://www.clinicaltrialsarena.com/projects/belinostat-pxd-101-for-the-treatment-of-peripheral-t-cell-lymphoma-ptcl/>.

Craig C. M. and Schiller G. J. (2008) Acute myeloid leukemia in the elderly: Conventional and novel treatment approaches. *Blood Reviews*. 22(4), 221-234.

Grein A. (1987) Antitumor Anthracyclines Produced by *Streptomyces peucetius*. *Advances in Applied Microbiology*. 32, 203-214.

Hers H. G. (1956) The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochemica et Biophysica Acta*. 22(1), 202-203.

Hoffmann F. and Maser E. (2007) Carbonyl Reductases and Pluripotent Hydroxysteroid Dehydrogenases of the Short-chain Dehydrogenase/reductase Superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 39(1), 87-144.

Hofman J., Malcekova B., Skarka A., Novotna E. and 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.

Hortobágyi G. N. (1997) Anthracyclines in the Treatment of Cancer: An Overview. *Drugs*. 54, 1-7.

Hudáčová Lenka (2019): Vliv inhibice bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

Huang L., He R., Luo W., Zhu Y., Li J., Tan T., Zhang X., Hu Z. and 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.

Jin Y. and Penning T. M. (2007) Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47, 263-292.

Johnston P. B., Cashen A. F., Nikolinakos P. G., Beaven A. W., Barta S. K., Bhat G., Hasal S. J., Vos S. D., Oki Y., Deng Ch. and Foss F. M. (2021) Belinostat in combination with standard cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone as first-line treatment for patients with newly diagnosed peripheral T-cell lymphoma. *Experimental Hematology & Oncology*. 10(15).

Kaminskas E. (2014) *Food and Drug Administration Homepage*. Summary review, Belinostat. [cit. 12. 4. 2021] Dostupné z: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/206256Orig1s000SumR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/206256Orig1s000SumR.pdf).

Kassner N., Huse K., Martin H., Gödtel-Armbrust U., Metzger A., Meineke I., Brockmöller J., Klein K., Zanger U. M., Maser E. and Wojnowski L. (2008) Carbonyl

Reductase 1 Is a Predominant Doxorubicin Reductase in the Human Liver. *Drug Metabolism & Disposition*. 36(10), 2113-2120.

Khanim F. L., Hayden R. E., Birtwistle J., Lodi A., Tiziani S., Davies N. J., Ride J. P., Viant M. R., Gunther U. L., Mountford J. C., Schrewe H., Green R. M., Murray J. A., Drayson M. T. and Bunce Ch. M. (2009) Combined Bezafibrate and Medroxyprogesterone Acetate: Potential Novel Therapy for Acute Myeloid Leukaemia. *Public Library of Science*. 4(12).

Khayami R., Hashami S. R. and Kerachian M. A. (2020) Role of aldo-keto reductase family 1 member B1 (AKR1B1) in the cancer process and its therapeutic potential. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 24(16): 8890-8902.

Kim J., Chang J. W., Park J. K. and Hwang S. (2012) Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53. *Cancer Biology & Therapy*. 13(8), 638-46.

Kim Y. N., Kim D. W., Jo H. S., Shin M. J., Ahn E. H., Ryu E. J., Yong J. I., Cha H. J., Kim S. J., Yeo H. J., Youn J. K., Hwang J. H., Jeong J. Kim D., Cho S., Park J., Eum W. and Choi S. Y. (2015) Tat-CBR1 inhibits inflammatory responses through the suppressions of NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages and TPA-induced ear edema in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 286 (2): 124-134.

Kizek R., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Smutny S., Burda J. V., Frei E. and Stiborova M. (2012) Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacology & Therapeutics*. 133(1), 26-39.

Ledvina M., Stoklasová A. a Cerman J. (2006) *Biochemie pro studující medicíny I a II*. Karolinum, Praha. 270 str.

Lee K., Ko B., Jiang Z., Cao D. and Chung S. (2001) Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance, *Anti-Cancer Drugs*. 12(2), 129-132.

Matkowskyj K. A., Bai H., Liao J., Zhang W., Li H., Rao S., Omary R. and Yang G. (2014) Aldo-Ketoreductase Family 1B10 (AKR1B10) as A Biomarker to Distinguish

Hepatocellular Carcinoma from Benign Liver Lesions. *Human Pathology*. 45(4), 834-843.

Meriwether W. D. and Bachur N. R. (1972) Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L1210 mouse leukemia. *Cancer Research*. 32(6), 1137-42.

Meschini S., Marra M., Calcabrini A., Monti E., Gariboldi M., Dolfini E. and Arancia G. (2002) Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicology in Vitro*. 16(4), 389-398.

Milan Jaroslav (2019): Vliv inhibice midostaurinu, vistusertibu a talazoparibu na aktivitu vybraných reductas z nadrodiny AKR a SDR. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

Mladosičová B. et al. (2014) *Kardioonkologie: 2., přepracované a doplněné vydání*. Grada, Praha. Str. 29-49.

Mordente A., Meucci E., Silvestrini A., Martorana G. E. and Giardina B. (2009) New Developments in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Current Medicinal Chemistry*. 16(13), 1656-72.

*National Center for Biotechnology Information* (2021c) PubChem Compound Summary for CID 30323, Daunorubicin. [cit. 6. 5. 2021] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Daunorubicin>.

*National Institutes of Health, Health & Human Services* (2021b) Drug Information Portal. Belinostat. [cit. 30. 4. 2021] Dostupné z: <https://druginfo.nlm.nih.gov/m.drugportal/rn/866323-14-0>.

Novotná E., Büküm N., Hofman J., Flaxová M., Kouklíková E., Louvarová D. and Wsól V. (2018) Roscovitine and purvalanol A effectively reverse anthracycline resistance mediated by the activity of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): A promising therapeutic target for cancer treatment. *Biochemical Pharmacology*. 156, 22-31.

Penning T. M., Steckelbroeck S., Bauman D. R., Miller M. W., Jin Y., Peehl D. M., Fung K. and Lin H. (2006) Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: Role in prostate disease and the development of specific inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 248 (1-2), 182-191.

Penning T. M. and Drury J. E. (2007) Human aldo-keto reductases: function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 464, 241-250.

Penning T. M. (2015) The Aldo-Keto Reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. 243, 236-346.

Penning T. M., Wangtrakuldee P. and Auchus R. J. (2018) Structural and Functional Biology of Aldo-Keto Reductase Steroid-Transforming Enzymes. *Endocrine Reviews*. 40(2), 447-475.

Pilka E. S., Niesen F. H., Lee W. H., El-Hawari Y., Dunford J. E., Kochan G., Wsol V., Martin H., Maser E. and Oppermann U. (2009) Structural Basis for Substrate Specificity in Human Monomeric Carbonyl Reductases. *Public Library of Science*. 4(10).

Plebuch M., Soldan M., Hungerer Ch., Koch L. and 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.

Plumb J. A., Finn P. W., Williams R. J., Bandara M. J., Romero M. R., Watkins C. J., La Thangue N. B. and Brown R. (2003) Pharmacodynamic Response and Inhibition of Growth of Human Tumor Xenografts by the Novel Histone Deacetylase Inhibitor PXD101. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2(8), 721-728.

*Protein Data Bank* (2021a) 6GXX: Crystal structure of Aldo-Keto Reductase 1C3 (AKR1C3) complexed with inhibitor. [cit. 10. 5. 2021] Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/6GXX>.

Quiñones-Lombraña A., Ferguson D., Blair R. H., Kalabus J. L., Redzematovic A. and Blanco J. G. (2014) Interindividual Variability in the Cardiac Expression of

Anthracycline Reductases in Donors with- and without- Down Syndrome. *Pharmaceutical Research*. 31(7), 1644-1655.

Seliger J. M., Cicek S. S., Witt L. T., Martin H., Maser E. and Hintzpeter J. (2018) Selective Inhibition of Human AKR1B10 by n-Humulone, Adhumulone and Cohumulone Isolated from *Humulus lupulus* Extract. *Molecules*. 23(11), 3041.

Shen Y., Zhonga L., Johnson S. and Caoa D. (2011) Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: A comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chemico-Biological Interactions*. 191(1-3), 192-198.

Stěrba M., Popelková O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V. and Simůnek T. (2013) Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 18(8), 899-929.

Takahashi R. H., Bains O. S., Pfeifer T. A., Grigliatti T. A., Reid R. E. and Riggs K. W. (2008) Aldo-Keto Reductase 1C2 Fails to Metabolize Doxorubicin and Daunorubicin in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*. 36(6), 991-4.

Tavares T. S., Hofman J., Lekešová A., Želazkova J. and Wsól V. (2020) Olaparib Synergizes the Anticancer Activity of Daunorubicin via Interaction with AKR1C3. *Cancers*. 12(11), 3127. Varatharajan S. et al. (2016) Population pharmacokinetics of Daunorubicin in adult patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 78(5), 1051-1058.

Verma K., Zang T., Gupta N., Penning T. M. and Trippier P. C. (2016) Selective AKR1C3 Inhibitors Potentiate Chemotherapeutic Activity in Multiple Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines. *ACS Medical Chemistry Letters*. 7(8), 774-779.

Verma K., Gupta N., Zang T., Wangtrakuldee P., Srivastava S. K., Penning T. M. and Trippier P. C. (2018) AKR1C3 Inhibitor KV-37 Exhibits Antineoplastic Effects and Potentiates Enzalutamide in Combination Therapy in Prostate Adenocarcinoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 17(9), 1833-1845.

Wallace K. B., Sardão V. A. and Oliveira P. J. (2020) Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circulation Research*. 126(7), 926-941.

Wolfram A., Soldan M., Koch L. and Maser E. (2000) Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochemical Pharmacology*. 59(3), 293-300.

Wsól V. (2017) Reduktasy xenobiotik. In: Skálová L. a kol. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Karolinum, Praha. Str. 40-48.

Yun M., Choi A. J., Lee Y. CH., Kong M., Sung J., Kim S. S. and Eun Y. (2018) Carbonyl reductase 1 is a new target to improve the effect of radiotherapy on head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 37, 264.

Zeng Ch., Chang L., Ying M., Cao J. He Q., Zhu H. and Yang B. (2017) Aldo–Keto Reductase AKR1C1–AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers of Pharmacology*.

Zhang J., Cui X., Yan Y., Li M., Yang Y., Wang J. and Zhang J. (2016) Research progress of cardioprotective agents for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *American Journal of Translational Research*. 8(7), 2862-2875.

Zhong L., Shen H., Huang Ch., Jing H. and Cao D. (2011) AKR1B10 Induces Cell Resistance to Daunorubicin and Idarubicin by Reducing C13 Ketonic Group. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 255(1), 40-47.