

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv zanubrutinibu na rezistenci nádorových buněk
k daunorubicinu způsobenou karbonyl redukujícími
enzymy.**

Lucie Havlíčková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Chtěla bych poděkovat školiteli své diplomové práce prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D., za odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce. Velké díky patří hlavně Mgr. Lence Laštovičkové a Mgr. Ivoně Špringrové za cenné rady a připomínky při práci v laboratoři. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Prohlášení

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

V Hradci Králové 15. 5. 2022

Lucie Havlíčková

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lucie Havlíčková

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

Název diplomové práce: Vliv zanubrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou karbonyl redukujícími enzymy.

Antracyklinová antibiotika (ANT) patří mezi léčiva první volby používaná na onkologická onemocnění, včetně akutní myeloidní leukémie. V chemoterapeutické léčbě se především využívá daunorubicin (DAUN) s karbonylovou skupinou v poloze 13. Působením nikotinamidadeninukleotid-fosfát dependentních karbonyl redukujících enzymů (CRE) vzniká jeho hydroxylový metabolit. Daunorubicinol (DAUN-ol) vykazuje vyšší toxicitu na srdeční tkáň a nižší cytotoxicitu na rakovinotvorné buňky, které získávají odolnost k jeho účinkům. Nadměrná exprese enzymů, které katalyzují přeměnu antineoplasticky účinného DAUN, způsobuje postupný rozvoj rezistence na podané ANT. Z toho důvodu se hledají nové farmakoterapeutické možnosti, jak tomuto procesu zabránit, aby se podané léčivo udrželo v cílové buňce po co nejdéle. Jedním způsobem je použití inhibitorů, které snižují enzymatickou aktivitu CRE a tím zabraňují nežádoucímu metabolismu DAUN na kardiotoxický a neúčinný DAUN-ol. Cílem diplomové práce bylo studium inhibice zanubrutinibu (ZANIB) na aktivitu enzymů z nadrodiny aldo-keto reductáz (AKR) a dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR). Vybrané enzymy byly inkubovány se substrátem DAUN a inhibitorem ZANIB. Za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) bylo změřeno množství vznikajícího produktu DAUN-ol, které bylo přepočteno na specifickou aktivitu enzymu. Z testovaných CRE byl nejvíce inhibován enzym AKR1C3 s mírou inhibice 79,1 % (ZANIB 10 μM) a 88,5 % (ZANIB 50 μM), který byl použitý v dalších částech experimentální práce. Byla stanovena hodnota $\text{IC}_{50} = 4,90 \pm 2,06 \mu\text{M}$ a hodnota $\text{K}_i = 4,56 \pm 0,35 \mu\text{M}$. Následně byl určen typ inhibice a typ vazby na enzym. Podle naměřených výsledků je ZANIB nekompetitivní inhibitor, který se váže k AKR1C3 reversibilně. Z provedené studie vyplývá, že by použití ZANIB mohlo snížit nežádoucí účinky a zvýšit terapeutickou účinnost současně podávaných ANT v onkologické terapii.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Lucie Havlíčková

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

Title of diploma thesis: The effect of zanubrutinib on tumor cell resistance to daunorubicin due to carbonyl reducing enzymes

Anthracycline antibiotics (ANT) are considered the first-line medication for oncologic diseases, including acute myeloid leukemia. Daunorubicin (DAUN) with a carbonyl group in position 13 is often used in chemotherapeutic treatments. Nicotinamidadeninucleotide-phosphate dependent carbonyl reducing enzymes (CRE) create its hydroxyl metabolite daunorubicinol (DAUN-ol), which demonstrates higher toxicity on myocardial tissue and lower cytotoxicity on cancer cells, which acquire tolerance towards its effects. Overexpression of enzymes catalyzing the conversion of effective antineoplastic DAUN causes the gradual development of resistance to administered ANT. For this reason, the new pharmacotherapeutic options for preventing this process are being searched for to maintain the drug in the target cell as long as possible. One option is to use inhibitors, which lower enzymatic activity CRE and prevent unfavorable DAUN metabolism on cardiotoxic and ineffective DAUN-ol. This diploma thesis aimed to study the inhibition of zanubrutinib (ZANIB) on the activity of the enzymes from aldo-keto reductase (AKR) and short-chain dehydrogenase/reductase superfamilies (SDR). Selected enzymes were incubated with substrate DAUN and inhibitor ZANIB. The amount of created product DAUN-ol, recalculated on specific enzyme activity, was measured by ultra-high performance liquid chromatography. AKR1C3 was the most inhibited enzyme from all tested CREs, with inhibition potentials of 79.1 % (ZANIB 10 μM) and 88.5 % (ZANIB 50 μM), and was the only enzyme used for the following parts of the experimental work. The value of inhibitory concentration IC_{50} was $4.90 \pm 2.10 \mu\text{M}$, and the value of kinetic constant K_i was $4.56 \pm 0.40 \mu\text{M}$. Then were defined the type of inhibition and the type of bonding with the enzyme. Based on the measured results, ZANIB is a non-competitive inhibitor that binds non-reversibly with AKR1C3. We can conclude from the study that using ZANIB in oncological therapy could lower adverse effects and improve the therapeutical effect of ANT administered at the same time

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Brutonova tyrosinkináza	9
2.2. Leukémie	10
2.3. Inhibitory BTK	12
2.3.1. Ibrutinib	13
2.3.2. Acalabrutinib	16
2.3.3. Zanubrutinib	17
2.3.4. Podání společně s Antracykliny	18
2.4. Antracykliny	19
2.4.1. Mechanismus účinku	20
2.4.2. Metabolismus	21
2.4.3. Kardiotoxicita	22
2.4.4. Nádorová rezistence	24
2.5. Enzymové reductázy	27
2.5.1. Aldo-ketoreduktázy	27
2.5.2. Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem	30
3. CÍL PRÁCE	32
4. MATERIÁL A METODIKA	33
4.1. Materiál	33
4.1.1. Pomůcky	33
4.1.2. Přístroje a programy	33
4.1.3. Chemikálie	33
4.2. Metodika	34
4.2.1. Příprava regeneračního systému	34

4.2.2.	Příprava substrátu	34
4.2.3.	Příprava enzymu	35
4.2.4.	Příprava inhibitoru	35
4.2.5.	Preinkubace	36
4.2.6.	Inkubace	36
4.2.7.	Příprava vzorku pro nástřik	37
4.2.8.	UHPLC a vyhodnocení výsledků	37
4.2.9.	Stanovení specifické aktivity	38
4.2.10.	Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50}	38
4.2.11.	Stanovení inhibiční konstanty K_i a typu inhibice	39
4.2.12.	Stanovení tight binding inhibice	41
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
5.1.	Základní screening inhibiční aktivity ZANIB	43
5.2.	Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50}	50
5.3.	Stanovení inhibiční konstanty K_i	55
5.4.	Tight binding inhibice	59
6.	ZÁVĚR	61
7.	SEZNAM ZKRATEK	62
8.	LITERATURA	64

1. ÚVOD

Nádorové onemocnění patří mezi skupinu různorodých chorob, jejichž společným znakem je nekontrolovatelné množení buněk, které se vymknou kontrole regulačních mechanismů. Za normálních okolností je poškozená buňka buďto opravená, nebo v případě nevratného poškození odstraněna apoptózou (přirozená smrt). Rakovinotvorné bujení může být benigní (nezhoubné) nebo maligní (zhoubné) povahy, kdy karcinom infiltruje do okolní tkáně a rozsévá po těle další ložiska tzv. metastázy. Leukemie představuje velmi závažnou formu nádorového onemocnění krvetvorné tkáně a lymfatických uzlin. Podle rychlosti progresu se leukemie dělí na akutní a chronické formy. Akutní leukemie je přirozeně nebezpečnější, protože buňky nejsou schopné vývoje a diferenciaci. U chronické leukemie nedochází k apoptóze buněk a jejich odstranění z tělesných tkání. Podle krvetvorných buněk může leukemie probíhat u lymfocytů (bílé krvinky) nebo myelocytů (buňky kostní dřeně).

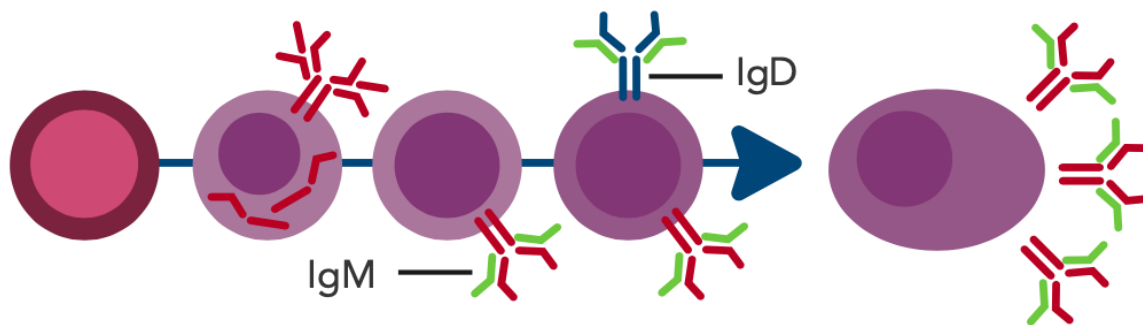
Antracyklinová antibiotika neboli antracykliny (ANT) představují nezastupitelnou součást terapie nádorových onemocnění včetně leukémie. Rezistence nádorových buněk na ANT způsobuje zásadní problém v úspěšné terapii. Snaha porozumět blíže mechanismům nádorové buňky a najít způsob, jak takovému chování zabránit je náplní mnoha vědeckých studií. Příčinou nádorové rezistence může být zvýšená exprese karbonyl redukujících enzymů (CRE) v nádorových buňkách. Z toho důvodu se podané cytostatikum metabolizuje na produkt, který má menší účinnost a více nežádoucích účinků. Pokud by se podařilo najít způsob, jak omezit přeměnu ANT na produkt, vedlo by to k vyšší koncentraci účinné formy cytostatika a dosažení lepších terapeutických výsledků. Jedním způsobem je použití inhibitoru, který působí na enzym katalyzující redukci karbonylové skupiny.

V této diplomové práci je zkoumán inhibiční vliv zanubrutinibu (ZANIB) na enzymy z nadrodiny aldo-keto reductáz (AKR) a dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR), které katalyzují přeměnu ANT. Konkrétně se jedná o redukci daunorubicinu (DAUN) na daunorubicinol (DAUN-ol) katalyzovaná enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a karbonylreduktázou 1 (CBR1). Změny aktivit enzymu, inhibiční potenciál ZANIB, byly hodnoceny změřením množství vzniklého metabolitu. Pro úspěšnou terapii je žádoucí, aby bylo v buňce co největší množství podaného léčiva. K tomu bude docházet, pokud se ZANIB osvědčí jako spolehlivý a účinný inhibitor enzymů katalyzujících přeměnu DAUN.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Brutonova tyrosinkináza

Gen pro Brutonovu tyrosinkinázu (BTK), kódující normální vývoj B-buněk, byl objeven roku 1993 Dr. Brutonem. Pokud se vyskytuje mutace nebo změna na BTK genu, vzniká onemocnění Agamaglobulinémie. Pacienti s X-vázanou Agamaglobulinémií (popsána roku 1952 Dr. Brutonem) mají normální počet prekurzorů pro B-buňky, ale jen velmi málo z nich je schopných dozrát. Protilátky jsou vytvářeny speciálními buňkami v těle, zvanými plazmatické buňky. Plazmatické buňky vznikají z B-buněčných lymfocytů v postupném vývoji několika kroků. První krok začíná z kmenové buňky v kostní dřeni. Kmenová buňka dává vzniknout lymfocytům včetně T-buněk, B-buněk a NK buněk z nezralých lymfocytů. Z pro B-lymfocytů se vyvinou nejdříve pre B-lymfocyty, ze kterých se potenciálně vyvinou dospělé B-lymfocyty.



Obr. 1 Přeměna kmenové buňky na zralé lymfocyty (SLACK a LAWRENCE 2019).

Každý B-lymfocyt má protilátky na buněčném povrchu. Každá B-buňka má trochu odlišné protilátky nebo imunoglobuliny, aby bylo možné odpovídat na tisíce různých neznámých látek např. na antigeny z vakcíny, bakterie nebo viry. Specifické protilátky jsou vytvořeny tak, aby rozpoznaly příslušný antigen. Když B-buňka přijde do kontaktu s antigenem, přemění se na plazmatickou buňku. Plazmatické buňky vytvářejí a uvolňují velké množství specifických protilátek. Základní porucha při Agamaglobulinémii je neschopnost pacienta tvořit protilátky. Protilátky jsou nedílnou součástí obranného mechanismu těla proti mikroorganismům. Když se např. bakterie vyskytne na mukózní membráně nebo vstoupí do těla, molekuly protilátky rozeznají mikroorganismy a přilnou na jeho povrch. Protilátky na povrchu mikroorganismů mohou navíc aktivovat další obranné mechanismy těla, jako sérový komplement (skupina krevních proteinů), které přímo zabíjí bakterii nebo virus. Navíc bakterie s protilátkami je mnohem snadnější cíl fagocytózy pro bílé krvinky než neobalená bakterie. Všechny zmíněné

děje brání mikroorganismům napadení tělních tkání, kde mohou způsobovat závažné infekce (SLACK a LAWRENCE 2019).

BTK je členem rodiny kináz, kam kromě toho patří tyrosinkináza exprimovaná v karcinomu jaterních buněk (TEC); interleukin 2-induktibilní T-buněčná kináza (ITK); klidová lymfocytární kináza a kináza exprimovaná v kostní dřeni. Enzymy BTK, TEC a ITK sdílí podobnou strukturu, kterou tvoří pět různých proteinových domén: amino-terminální plektin homologní doména; na prolin bohatá TEC homologní doména; sarkom (SRC) homologní (SH) doména SH2 a SH3; kinázová doména s enzymatickou aktivitou. Enzym BTK leží na cytoplazmatické straně membrány, na kterou může být přechodně navázán skrz interakci PH domény a fosfatidylinositolem-3,4,5-fosfátem (PIP3). Po navázání na membránu nastává aktivace BTK ve dvou krocích. Zaprvé je BTK fosforylována v pozici Y551 na kinázové doméně prostřednictvím slezinové tyrosin kinázy (SYK) nebo SRC kinázové rodiny. Zadruhé nastává autofosforylace v pozici Y223 na SH doméně, které stabilizuje konformaci a plně aktivuje kinázovou aktivitu.

B-buněčný receptor (BCR) má velmi krátkou cytoplazmatickou doménu, takže nemůže přenášet signál přímo, ale pomocí přidružených heterodimerů Ig- α /Ig- β . Tyto transmembránové proteiny obsahují tyrosinový motiv aktivující imunoreceptor v jejich cytoplazmatické doméně. Po spojení BCR a antigenu nastane fosforylace tohoto motivu pomocí Lck/Yes novel (LYN) tyrosin kinázou, čímž vytváří vazebná místa pro SYK. Fosfatidylinositol-3-kináza fosforyluje fosfatidylinositol-2-fosfát (PIP2) na PIP3, který působí jako druhý posel pro aktivaci následné kaskády. Jak bylo popsáno výše, BTK je aktivována fosforylací pozice Y551 pomocí SYK nebo LYN, následně ještě autofosforylací v pozici Y223. Plně aktivovaná BTK fosforyluje fosfolipázu C γ 2 v pozici Y753 a Y759, důležité pro lipázovou aktivitu. Aktivovaná fosfolipáza hydrolyzuje PIP2 na inositol-3-fosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). IP3 reguluje vnitrobuněčné hladiny vápníku, čímž aktivuje transkripci nukleárního faktoru aktivující T-buňky pomocí kalcineurinu a kalmodulinu. Mediátor DAG aktivuje proteinkinázu C β , která vyvolává aktivitu několika složek rodiny mitogenem aktivované fosfokinázy, včetně mimobuněčných regulačních kináz 1,2 a dalších cílů této kinázy (PAL SINGH et al. 2018).

2.2. Leukémie

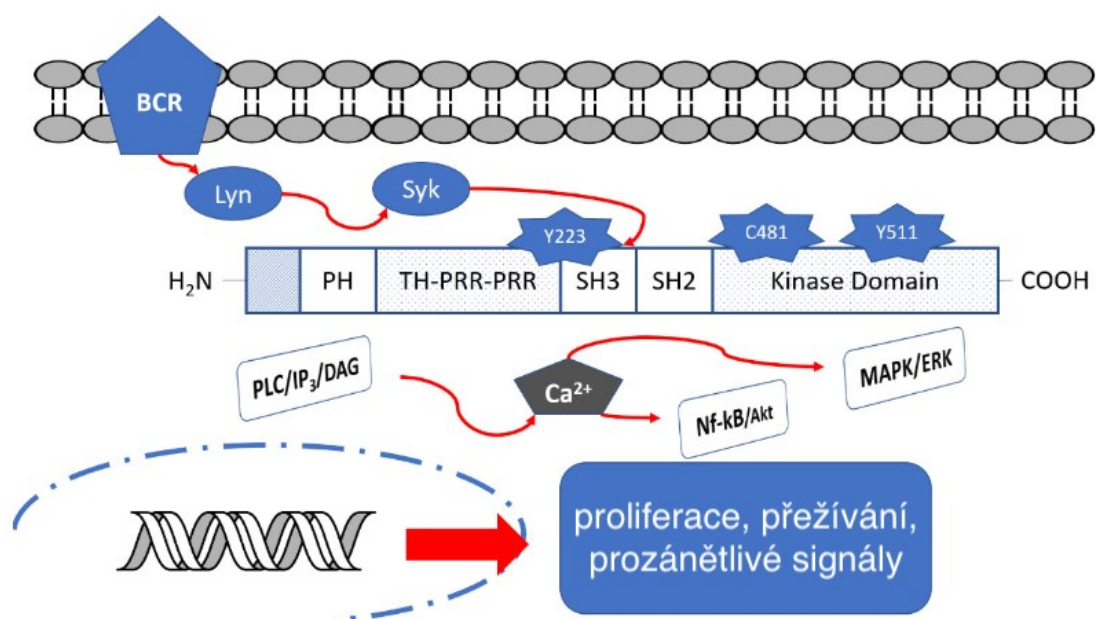
Výběr úvodní terapie pro pacienty záleží převážně na věku pacienta a dalších komorbiditách. Cílem indukční terapie je odstranit leukemické buňky z krve a kostní dřeni, aby mohla kostní dřeň produkovat zdravé krvinky. Vlastní indukční léčbě většinou předchází prefáze, která zahrnuje podání kortikosteroidů, někdy v kombinaci s nízkými dávkami chemoterapie.

Umožňuje tím redukci počtu nádorových buněk před zahájením intenzivní chemoterapie a poskytuje čas na provedení specializovaných vyšetření k určení diagnózy a stanovení rizika. Základem prvního indukčního cyklu jsou vinkristin, cyklofosfamid a ANT (DAUN, adriamycin, idarubicin), které bývají kombinovány s kortikosteroidy (prednison, dexamethason). Pokud lymfoblasty nesou na povrchu znak CD20, může být do kombinace k chemoterapii přidána monoklonální protilátka rituximab. Indukční léčba vyčistí kostní dřeň od leukemických buněk, ale zároveň utlumí zbytkovou krevtvorbu (obnova krevtvorby nastává cca za 4 týdny). Rozmezí mezi skončením prvního a začátkem druhého cyklu chemoterapie by měla být minimální, aby se snížilo riziko časného relapsu leukémie. Složení chemoterapie během druhého indukčního cyklu je jiné než v předchozím cyklu. Zároveň probíhá preventivní podávání chemoterapie do mozkomíšního moku, někdy kombinované s ozářením. Cílem konsolidační léčby je udržení remise a odstranění zbylých leukemických buněk. Samotná konsolidační léčba pacientů ve standardní rizikové skupině sestává z 6-8 cyklů vysokodávkované chemoterapie (metotrexát, cytarabin a asparagináza). Každý cyklus trvá cca 1 týden a následuje po nich období bez krvinek a 2-3 týdenní pauza. Konsolidační terapie může být následovaná autologní (vlastní) nebo alogenní (od dárce) transplantací krevtvorných buněk. Odběr krevtvorných buněk pro transplantaci probíhá na separátoru krevních buněk, který oddělí kmenové buňky od ostatních krevních elementů. Alogenní transplantace se provádí v období kompletní remise onemocnění navozené předchozí chemoterapií u pacientů do 65 let s vysokým rizikem relapsu onemocnění. Samotné transplantaci předchází 1-2 cykly konsolidační terapie, po které následuje 5-7 dní trvající přípravný režim. Podávají se vysoké dávky chemoterapie, kombinované s radioterapií, aby došlo odstranění stávající krevtvorby a přípravě dřeně na přijetí dárcovského štěpu. Vlastní transplantace krevtvorných kmenových buněk probíhá formou transfuze na lůžku. Po skončení konsolidační léčby následuje 1-2 roky trvající udržovací terapie. Cílem je udržení remise a snížení rizika relapsu. Perorální podání merkaptopurinu nebo metotrexátu, může být periodicky posíleno intravenózním podáním chemoterapie nebo kortikosteroidy. Podpůrné terapeutické postupy pomáhají ke zvládnutí vedlejších účinků a komplikací chemoterapie, patří mezi ně: transfuze červených krvinek (léčba anémie), transfuze krevních destiček (prevence krvácení), antibiotika a antimykotika (prevence infekce), růstové faktory (podpora tvorby bílých krvinek), antiemetika (potlačení pocitu na zvracení), hydratace (ochrana ledvin před poškozením toxickými zplodinami, které se po chemoterapii uvolňují z rozpadlých nádorových buněk) a výplach úst (prevence mukositivity na sliznici dutiny ústní) (ŠÁLEK et al. 2013).

2.3. *Inhibitory BTK*

Od té doby, co je známo, že abnormální aktivace B-buněk je úzce spojena s různými druhy rakoviny, byla vynaložena velká snaha na vývoj BTK inhibitorů. Měly by poskytovat zajímavou terapeutickou alternativu na hematologické malignity a autoimunitní onemocnění. Konkrétně první BTK inhibitor této skupiny ibrutinib (IBR) má výbornou terapeutickou účinnost pro řadu B-buněčných malignit. Je to ireverzibilní inhibitor, který se kovalentně váže na Cys48 v adenosin-3-fosfátu (ATP) vazebném místě BTK, a tím zastavuje transdukcii signálu přes BCR. Přestože IBR představuje průlomovou terapii pro B-buněčné malignity, brzy na něj vznikla získaná rezistence. Právě mutace na molekule BTK v místě Cys48 a Thr474 souvisí se získanou rezistencí. Kromě rezistence je bezpečnostní hledisko při používání IBR další problém posledních let. Proto je nezbytné využít inhibitorů BTK druhé generace, které jako nekovalentní inhibitory neinteragují s mutujícími místy na molekule BTK, a tak dostatečně inhibují rezistentní BTK a vyznačují se navíc zvýšenou selektivitou (FENG et al. 2019).

Informace o struktuře kinázy jsou nezbytné pro optimální design inhibitoru. Když je proteinová struktura tvárná, odlišné ligandy mohou vyvolat různé postavení kinázy. BTK inhibitory dělíme podle mechanismu účinku a vazby na dva typy: ireverzibilní inhibitory schopné kovalentní vazby na zbytek Cys48 v ATP vazebném místě, a reversibilní inhibitory schopné pouze slabé vazby na speciální místo SH3 na struktuře BTK, čímž vyvolají neaktivní konformaci kinázy. Většina momentálně schválených inhibitorů (IBR, acalabrutinib a zanubrutinib) jsou ireverzibilní. Avšak nástup rezistentních mutací snížil jejich terapeutické používání. Konkrétně izosterní záměna Cys48 za serin snižuje reaktivitu BTK vůči kovalentním inhibitorům (IBR vykazuje šesti násobné snížení inhibice vůči BTK s mutací na Cys48). I přesto, že může být IBR navázán na mutaci Cys48 ireverzibilně, jeho reversibilní mechanismus nezaručuje terapeutickou účinnost u pacientů s tímto problémem (BRULO et al. 2021).



Obr. 2 Struktura BTK a její signální kaskáda. BCR – B-buněčný receptor; Lyn - Lck/Yes novel tyrosinová kináza; Syk - slezinová tyrosin kináza; PH - plektinová homologie; SH2/3 - SRC homologie 2/3; PLC/IP₃/DAG – druhý posel transdukce signálu, Y223/Y511 - fosforylace domény; C481 - vazba butynamidové skupiny; MAPK - mitogenem aktivovaná fosfokináza; Nf-kB – nukleární faktor-kappa B (BRULLO et al. 2021).

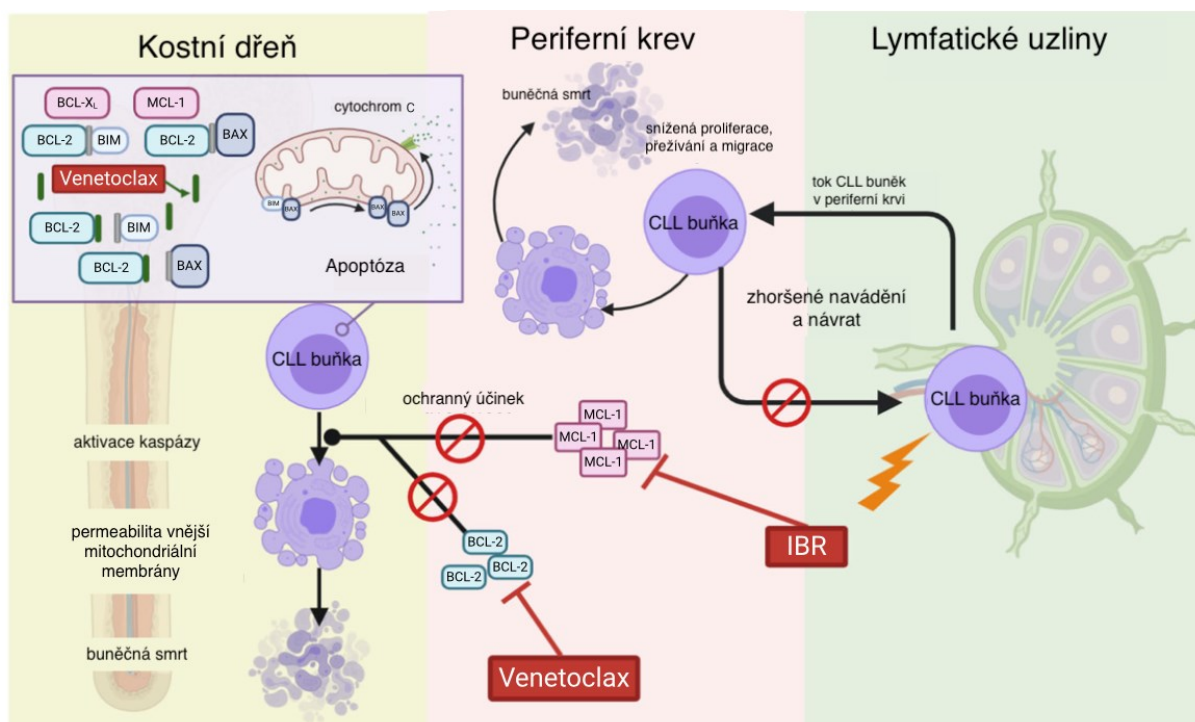
2.3.1. Ibrutinib

IBR je první ireversibilní inhibitor BTK k léčbě chronické lymfocytární leukemie (CLL)¹ a lymfomu z malých lymfocytů², který je podáván perorálně. Díky IBR se změnila možnost terapie CLL a došlo k výzkumu kináza-cílených léků (acalabrutinib, tirabrutinib, ZANIB) u tohoto onemocnění. V současnosti zůstává IBR nejvíce studovaný a předvídatelný BTK inhibitor (TIMOFEEVA a GANDHI 2021). Významná omezení včetně nízké celkové odpovědi na terapii, rozvoje tolerance na BTK a další mutace kaskády následující aktivaci BCR, riziko nežádoucích účinků a potřeba dlouhodobého užívání spojená s finančními výdaji, vedly k zájmu o kombinaci IBR s dalšími látkami. Existují čtyři možnosti kombinační terapie: imunoterapie (anti-CD20 monoklonální protilátky); chemoimunoterapie (fludarabin, bendamustin); buněčná terapie pomocí chimerického antigenního receptoru T buněk (CARt); další cílená terapie (venetoclax). IBR vede k mobilizaci CLL buněk, čímž je dělá přístupnější v periferní krvi při chemoterapii a imunoterapii. Zmíněná terapie může ovlivnit nežádoucím

¹ Pomalu rostoucí rakovina, která se vyskytuje převážně v krvi a kostní dřeni.

² Pomalu rostoucí rakovina, která se vyskytuje převážně v lymfatických uzlinách.

způsobem T-buňky, a ještě zvýraznit nedostatky T-buněk. Naproti tomu má IBR minimální nebo žádný efekt na T-buněčný kompartment a má potenciál zlepšit protinádorovou T-buněčnou imunitu. Mimocílený účinek IBR na ITK, ovlivňuje přeměnu T-buněk směrem k cytokinu Th1. Proto může podání IBR před nebo po autologní transplantaci krvetvorných buněk přeměřovat T-buněčnou imunitní odpověď na Th1 místo Th2, což je přínosnější k proliferaci a udržení buněčné populace exprimující chimerický receptor (LONG et. al. 2017). Jedna z nejdůležitějších podmínek pro účinnou terapii je schopnost T-buněk dostat se do mikroprostředí tumoru. U pacientů CLL je snižená schopnost infiltrace T-buněk z uzlinových kompartmentů, a tudíž snižená protinádorová aktivita. Schopnost mobilizace IBR spustí vstup buněk CLL do periferní krve, což je dělá více přístupné během CART (RUELLA et al. 2019). Další možností terapie CLL je kombinace IBR s venetoclaxem, což je inhibitor regulačního proteinu B-buněčného lymfomu 2. V maligních lymfocytech dochází ke ztrátě mikro-RNA a nadměrné expresi proteinu B-buněčného lymfomu-2 (BCL-2), který reguluje buněčnou smrt prostřednictvím indukce nebo inhibice apoptózy (PEKARSKY et al. 2018). K hromadění CLL lymfomů v těle dochází vlivem přítomnosti anti-apoptického proteinu z rodiny BCL-2. Proto by mohlo být přínosné zacílení na BCL-2 zároveň s kaskádou, která následuje BCR. Navíc IBR ovlivňuje CLL v lymfatických uzlinách, zatímco venetoclax cílí na CLL v krvi a kostní dřeni. Došlo dokonce k potlačení proteinu diferenciací buněk myeloidní leukémie MCL-1 z rodiny BCL-2, způsobující rezistenci pro BCL-2 inhibitor venetoclax v lymfatických tkání. Z toho vyplývá, že kombinace IBR s venetoclaxem by mohla být racionální v terapii CLL (CERVANTES-GOMEZ et al. 2015). Stejně terapeutické kombinace jsou očekávané u druhé generace inhibitorů BTK.



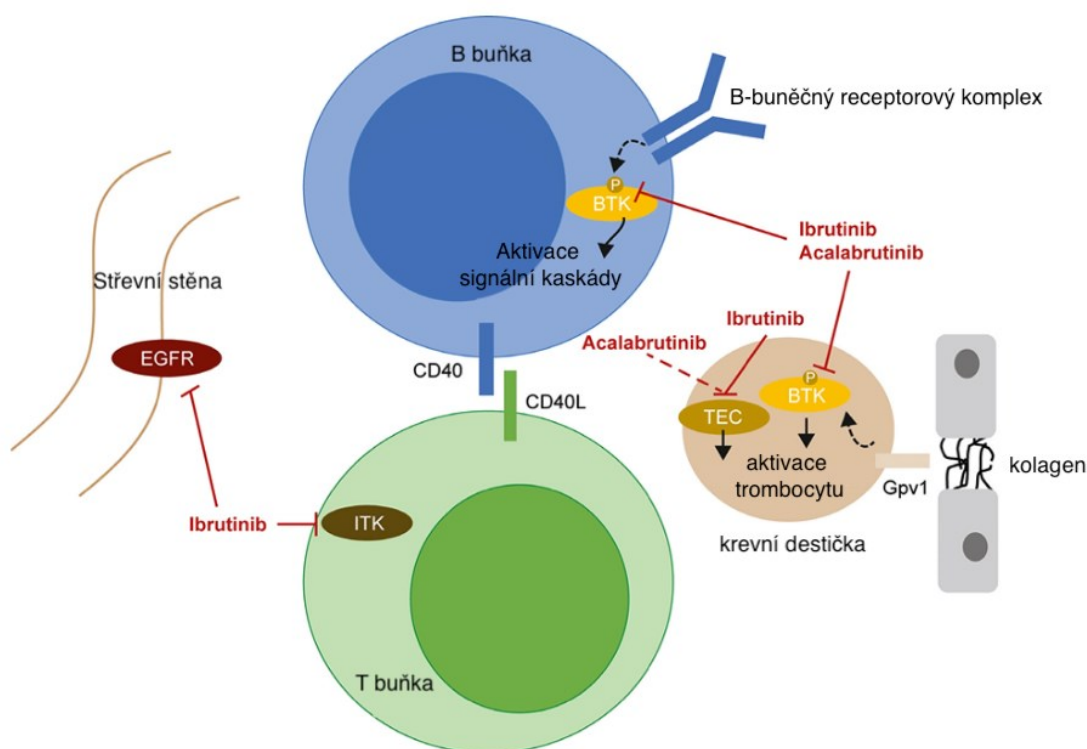
Obr. 3 Kombinace IBR s venetoclaxem. IBR mobilizuje buňky CLL z protektivních výklenků v lymfatických uzlinách, zatímco venetoclax ovlivňuje CLL buňky sídlící v krvi a kostní dřeni. Venetoclax cílí na BCL-2, ale MCL-1 by mohl chránit maligní buňky před mitochondriální smrtí. Léčba IBR snižuje hladinu MCL-1 a působí synergicky v kombinaci s venetoclaxem; BCL-2 – protein B-buněčného lymfomu 2; MCL – protein diferenciacce buněk myeloidní leukémie; BAX – protein X asociovaný s BCL-2; BIM – protein podobný BCL-2. (TIMOFEEVA a GANDHI 2021).

BTK je potencionální terapeutický cíl akutní myeloidní leukémie (AML)³ a inhibitor BTK IBR by měl potencovat cytotoxickou aktivitu ANT DAUN v AML buňkách. Kombinace IBR s první linií AML chemoterapeutik DAUN a cytarabinem, zvyšuje smrt buněk a snižuje tvorbu kolonií v napadených buňkách. IBR je potencionální kandidát do kombinace tohoto onemocnění. Zda je synergie mezi IBR a DAUN zprostředkovaná anti-BTK aktivitou IBR zjišťoval ROTIN et al. (2016). Ze studie vyplývá, že synergický mechanismus je nezávislý na BTK a nesouvisí s potenciálem IBR zvyšovat hromadění DAUN v buňce. Tím se vysvětluje zapojení IBR do terapeutického režimu pro AML pacienty nezávisle na exprese BTK a stavu aktivace.

³ Rychle postupující rakovina, u které dochází k proliferaci a akumulaci nezralých myeloidních prekurzorů (blastů) v kostní dřeni a periferní krvi.

2.3.2. Acalabrutinib

Postupně byla vyvinuta další generace inhibitorů BTK s lepší selektivitou a nižším potenciálem k toxicitě oproti IBR. Acalabrutinib (ACA) je schválený agenturou US FDA⁴ od roku 2017 pro terapii lymfomu z pláštěvých buněk u pacientů s alespoň jednou předchozí terapií, od roku 2019 pro terapii CLL/SLL pro terapii dospělých pacientů. Byl vytvořený jako účinnější, vysoce selektivní, kovalentní inhibitor BTK s menším zásahem na jiné struktury než IBR. ACA neinhibuje mimo-cílené kinázy jako např. receptor epidermálního růstového faktoru, ITK, ERB-B2 receptorová kináza a B-lymfocytární. Ve srovnání s ostatními inhibitory BTK, vykazuje ACA sníženou vnitřní reaktivitu butynamidové skupiny, která se váže na BTK v místě C481. V důsledku toho je selektivnější, takže vykazuje méně nežádoucích účinků a větší toleranci u pacientů (DANILOV a PERSKY 2020).



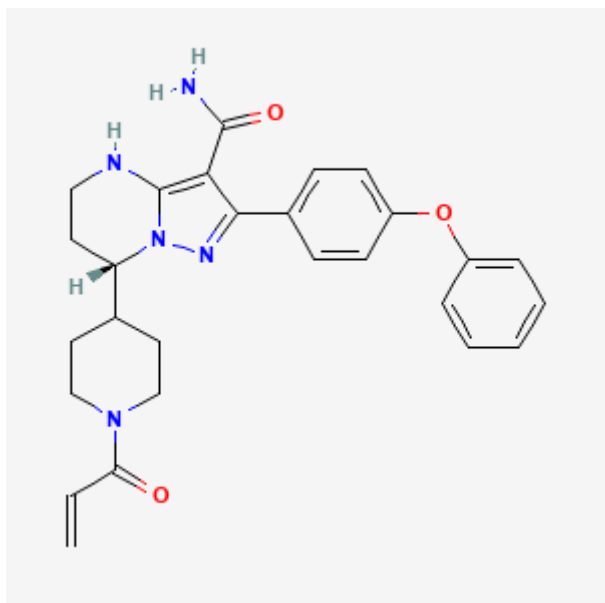
Obr. 4 Funkce ACA a IBR v rozdílných tkání. ACA a IBR inhibují fosforylaci BTK, takže zastavují aktivaci následné aktivační kaskády. IBR vykazuje mimo-cílený účinek na inhibici dalších kináz, včetně TEC, ITK a EGFR. ACA vykazuje slabou inhibici TEC. Gp1b - Glycoprotein V1; BTK – brutonova tyrosinkináza; TEC – tyrosinkináza exprimovaná v karcinomu jaterních buněk; EGFR - receptor epidermálního růstového faktoru; ITK - Interleukin 2-induktibilní T-buněčná kináza; CD40 – receptor na antigen prezentujících buňkách imunitního systému (DANILOV a PERSKY 2020).

⁴ Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (United States FOOD and Drug Administration)

Výsledky ze studie MORELL et al. (2020) dokazují, že ACA a IBR selektivně inhibují AKR1C3 zprostředkovanou inhibici DAUN in vitro v nádorové buněčné linii, která exprimovala AKR1C3. Z toho vyplývá, že zmíněné inhibitory působí synergicky s cytotoxickým DAUN k překonání ANT rezistence.

2.3.3. Zanubrutinib

ZANIB (BRUKINSA, BGB-3111) patří mezi inhibitory BTK, které blokují abnormální proteiny signalizující množení rakovinotvorných buněk, čímž napomáhají zastavit šíření rakovinotvorných buněk. Na rozdíl od IBR vykazuje ZANIB lepší selektivitu k BTK než k dalším kinázám a tím pádem méně mimo-cílených nežádoucích účinků (TAM et al. 2019). Výsledky ASPEN studie ukazují lepší odpověď na léčbu u Waldenströmovy makroglobulinémie⁵ (WM), navíc má ZANIB nižší kardiotoxicitu oproti IBR (TAM et al. 2020).



Obr. 5 Strukturální vzorec ZANIB (PubChem 2022).

Mechanismus účinku ZANIB spočívá v kovalentní vazbě na zbytek cytosinu v aktivním místě BTK, což vede k inhibici aktivity. BTK je signální molekula dráhy B-buněčného antigenního a

⁵ Pomalu rostoucí rakovina, která začíná v bílých krvinkách kostní dřeně.

cytokinového receptoru. Výsledkem aktivace dráhy je B-buněčná proliferace, migrace, chemotaxe a adheze. ZANIB inhibuje maligní B-buněčnou proliferaci a redukuje růst tumoru.

Používá se k terapii lymfomu z pláštěvých buněk⁶ u pacientů léčených alespoň jednou další chemoterapeutickou medikací (schválen US FDA v listopadu 2019). Dále se používá k terapii WM (srpen 2021) a lymfomu marginální zóny⁷ (září 2021) u pacientů s relapsem rakoviny nebo rezistencí na chemoterapeutickou léčbu (AHFS 2022).

ZANIB se užívá perorálně ve formě kapsulí. Doporučená dávka je buď 1x denně 320 mg nebo 2x denně 160 mg. U pacientů s jaterní nedostatečností je nutná redukce dávky (2x denně 80 mg). V kombinaci se středními nebo silnými inhibitory cytochromu P450 (CYP) 3A je nutné snížit dávku (1x denně 80 mg), protože dochází ke zvýšení rizika toxicity. Současné užívání induktorů CYP3A snižuje účinnost ZANIB, proto by se mu mělo předejít.

Přítomnost léčiva v mononukleárních buňkách periferní krve byla dosažena za 24 hodin na 100 % při celkové denní dávce 320 mg u pacientů s B-buněčnými malignitami. V lymfatických uzlinách bylo dosaženo přítomnost léčiva na 94 - 100 % (DRUG LABEL INFO 2022).

Nežádoucí účinky při užívání ZANIB jsou hemorrhagie (35 % petegie a purpura), infekce horních cest dýchacích (závažná pneumonie), cytopenie (neutropenie, trombocytopenie), sekundární malignity (8% nemelanomový kožní tumor) a srdeční arytmie (3,2% atriální flutter a fibrilace). Dále se může vyskytovat zvětšení lymfatických uzlin, vyrážka, bolest kloubů a svalů. ZANIB se nesmí podávat dětem, těhotným (zvýšený výskyt fetálních srdečních malformací u těhotných potkanů) a ženám v období laktace pro potenciální závažné nežádoucí účinky u kojenců (DRUG LABEL INFO 2022).

2.3.4. Podání společně s Antracykliny

ANT chemoterapeutika patří k jedněm z nejúčinnějším látkám k léčbě rakoviny. Způsobují zlomy ve dvoušroubovici DNA v rychle se množících buňkách. Účinnost ANT je limitována dvěma hlavními faktory. Zaprvé množstvím podané dávky kvůli jejich toxicitě na zdravé tkáně. Zadruhé lékovou rezistencí, kterou mohou způsobovat mutace topoizomerázy 2 (Top2), rakovinotvorné bujení, opravy DNA, zvýšená exprese P-glykoproteinu (P-glp) nebo efluxních pump a metabolismus. Hlavní mechanismus rezistence ANT je redukce na méně účinné C13-metabolity doxorubicinol (DOX-ol) a DAUN-ol. CRE představují skupinu cytosolických nebo

⁶ Rychle rostoucí rakovina, která začíná v buňkách imunního systému.

⁷ Pomalu rostoucí rakovina, která začíná v bílých krvinkách bojující s infekcí.

mikrosomálních enzymů zahrnující dvě nadrodiny: SDR a AKR. Nadměrně exprimované CRE v nádorových tkáních, snižují vnitrobuněčnou koncentraci farmakologicky aktivní formy ANT DOX a DAUN. Dochází ke snížení terapeutické účinnosti a zvýšení kardiotoxických nežádoucích účinků. Nejaktivnější z hlavních ANT reduktáz (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3 a CBR1) je enzym AKR1C3, u kterého byla potvrzena rezistence. Nadměrný výskyt AKR1C3 byl zaznamenán u mnoha nádorových onemocnění, takže by mohl sloužit při diagnostice onemocnění jako indikátor rakoviny. Je důležité zmínit, že AKR1C3 je s dalšími CRE nadměrně exprimován u onkologických pacientů rezistentních na ANT, což potvrzuje rozhodující roli redukujícího metabolismu v rezistenci ANT (TAVARES et al. 2020).

2.4. Antracykliny

ANT jsou nejvyužívanější protinádorová léčiva, která byla kdy vynalezena. Většina pacientů na systémové chemoterapii dostane v průběhu léčby ANT. První izolovaná ANT antibiotika DOX a DAUN byla získána na začátku šedesátých let 19. století z bakterie *Streptomyces* spp. produkující červený pigment. Po chemické stránce obsahují všechny ANT chinonové jádro a amino-cukry. ANT analogy jsou vyvíjeny ve snaze zlepšit protinádorovou aktivitu a snížit toxicitu (HORTOBÁGYI 1997). DOX a DAUN mají stejný aglykon a cukerné skupiny. Aglykon se skládá z tetra-cyklického jádra s přilehlými (hydroxy) chinonovými skupinami. Na jádře je navázaná methoxy skupina a krátký postranní řetězec s karbonylovou skupinou. Cukernou část molekuly ANT tvoří daunosamin (3-amino-2,3,6-trideoxy-L-fucosylový zbytek) připojený glykosidickou vazbou na jeden kruh. Jediný rozdíl mezi nimi představuje postranní řetězec. Zatímco u DOX končí primární alkoholovou skupinou, u DAUN končí methylovou skupinou (MINOTTI et al. 2004). Ve snaze najít lepší ANT bylo provedeno několik chemických úprav na tetracyklickém jádře, postranním řetězci nebo amino-cukru. Epirubicin (EPI) je semisyntetický derivát DOX získaný epimerizací hydroxylové skupiny daunosaminu. Tato změna pozice má nepatrný efekt na spektrum účinku a antineoplastickou aktivitu EPI ve srovnání s DOX, ale výrazný efekt na farmakokinetické a metabolické změny např. zvýšený distribuční objem, lepší clearance a kratší poločas rozpadu. Díky tomu je EPI používán ve 2x vyšších dávkách než DOX bez kardiotoxických nežádoucích účinků (ROBERT a GIANNI 1993; DANESI et al. 2002). Idarubicin hydrochlorid je analog DAUN získaný odstraněním 4-methoxy skupiny na kruhu D. Díky absenci methoxy skupiny v ANT struktuře je sloučenina vysoce lipofilní a proniká lépe do buněk. Lepší stabilizace komplexu s Top2 a molekulou DNA vede k širšímu spektru účinku např. AML, mnohočetný myelom, ne Hodgkinské lymfomy nebo rakovinu prsu (BORCHMANN et al. 1997). Valrubicin je semisyntetický analog DOX k terapii

rakoviny močového měchýře. Aplikaci přímou infuzí do močového měchýře mohou doprovázet nežádoucí účinky např. krvácení nebo obtíže při močení, inkontinence, bolestivost (PERABO a MULLER 2005). Strukturální účinek udává: jaké množství látky pronikne do jádra nádorové buňky, jaká vznikne konformace komplex léčivo-cílová struktura, jak specifická bude interakce léčivo-DNA. Proto jsou poznatky studie specifických strukturálních modifikací ANT molekul velmi důležité k pochopení mechanismu účinku ANT a jejich toxicity. Studie vzájemného působení léčiva na DNA jsou nezbytné k vývinu nových látek s vyšší protinádorovou aktivitou (KIZEK et. al 2012).

2.4.1. Mechanismus účinku

Vzhledem k rozmanitému spektru molekul můžou ANT působit cytotoxicky několika různými způsoby viz. Tab. 1. Složitost těchto dějů komplikuje určení přesného mechanismus účinku.

Tab. 1 Farmakologický efekt ANT (MINOTTI et al. 2004).

Interkalace DNA -> inhibice syntézy makromolekul (DNA, RNA a proteiny)
Inhibice Top1 a Top2, DNA helikázy, DNA a RNA polymerázy
Produkce volných radikálů -> poškození DNA nebo peroxidace lipidů
Přímý účinek na membránu buňky

Hlavním účinkem ANT je interkalace aglykonu mezi přilehlé báze DNA. Chinonové jádro se vmezeří mezi sousední báze DNA svou dlouhou osou kolmou k ose dvoušroubovice. Jedno jádro funguje jako kotva a stabilizuje komplex pomocí vodíkových vazeb. Kvůli interkalaci dochází k deformaci DNA (stabilizující komplex Top2-DNA), což má za následek dvouvláknové zlomy ve šroubovici DNA. K vazbě navíc elektrostaticky přispívá jeden pozitivní náboj DAUN (RABBANI et al. 2005). Další důležitý mechanismus účinku je tvorba volných radikálů. Enzymatickou redukcí chinonového jádra dochází ke vzniku semichinonu a následně k produkci volných hydroxylových radikálů. Navíc konjugace hydroxychinonové části ANT molekuly s trojmocným železem může vyústit v neenzymatickou produkci volných radikálů. K lipidové peroxidaci, spojované s kardiotoxickým efektem, dochází při poškození tkáně volnými radikály. Normální tkáň obsahuje enzymy, které vycytávají volné radikály a chrání tak buňky před jejich poškozením. Srdeční tkáň obsahuje poměrně málo takových enzymů, proto je náchylnější k poškození volnými radikály (DORR 1996).

2.4.2. Metabolismus

ANT vstupují do buňky pasivní difuzí, která závisí na jejich lipofilitě (rychlost difuze je přímo úměrná jejich rozpustnosti v tucích). Všechny ANT jsou substráty P-glp, který patří mezi ATP-vázající (ABC) transportéry⁸ s rozmanitou substrátovou specifitou. Na rozdíl od klasických ABC transportérů, které reagují pouze s úzkým spektrem substrátů, jsou P-glp schopné transportovat velké množství rozmanitých látek. Vlastní transport probíhá vazbou substrátu z vnitřní strany membrány na P-glp, který pumpuje substrát do extracelulárního prostoru. Substrátová specifita záleží především na schopnosti látky vmezeřit se do lipidové dvojvrstvy (MW >400 D, hydrofilní nebo amfifilní vlastnosti, planární struktura, NH₂ skupina v postranním řetězci). Nádorové buňky exprimují na svém povrchu velké množství P-glp a tím pádem neodpovídají na farmakoterapii ANT, protože jsou exkretovány mimo buňku (FICKOVÁ et al. 2002).

Hlavní metabolické cesty ANT jsou hydroxylace, vznik semichinonu nebo deoxyaglykonu. Hydroxylace karbonylové skupiny na C13 tzv. dvou-elektronová redukce ANT, probíhá za vzniku sekundárních alkoholů prostřednictvím CRE (CBR1 a AKR) závislých na nikotinamidadenindinukleotid-fosfátu (NADPH). ANT hydroxylované na C13 jsou polárnější a více rozpustné ve vodě oproti mateřské látce. Jsou vylučovány pomaleji, mají menší antineoplastickou aktivitu a vyšší kardiotoxicitu vzhledem k větší schopnosti akumulace v srdeční tkáni. Díky rozsáhlé distribuci CRE ve tkáních je podstatné množství ANT u pacientů s rakovinou hydroxylováno.

Druhou metabolickou cestu představuje redukce elektronu na uhlíku chinonového kruhu ANT za vzniku semichinonového radikálu tzv. jednoelektronová redukce ANT. Přeměnu katalyzují NADPH závislé oxidoreduktázy jako CYP reduktáza, NADH dehydrogenáza (NDUFS), syntáza oxidu dusnatého a xantin oxidáza. V přítomnosti kyslíku dochází k re-oxidaci semichinonového radikálu na chinon za vzniku superoxidového aniontu nebo peroxidu vodíku. Volné radikály mohou způsobit peroxidaci lipidů v buněčných membránách, agregaci proteinů a buněčnou smrt.

Poslední nejméně zastoupená cesta metabolismu je reduktivní deglykosidace ANT na 7-deoxyaglykony (mikrosomálními a mitochondriálními enzymy) a hydroxyaglykony (cytosolickými enzymy), při které dochází k odstranění cukerné části molekuly. Reakce probíhá za přítomnosti NADPH chinon oxidoreduktázy, CRP a xantin dehydrogenázy v anaerobním

⁸ Transmembránový protein, který aktivně přenáší látky skrze membránu za spotřeby ATP.

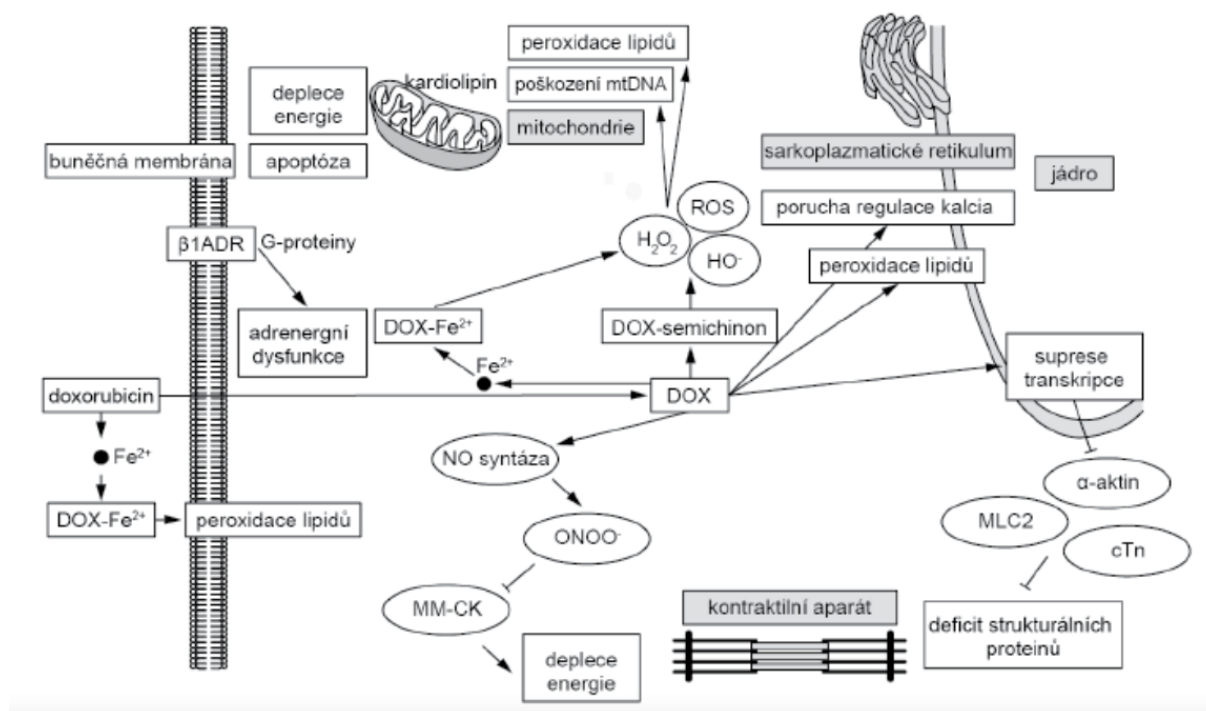
prostředí (EDWARDSON et al. 2015). DOX obsahuje cukernou část napojenou na tetracyklinové jádro obsahující chininovou strukturu. Přesměrování elektronů z elektron transportního systému může nastat pouze po redukci chinonu na semichinon. DOX je hydrofilní a nemůže přejít přes vnější membránu mitochondrie a být redukován NDUFS, která se nachází ve vnitřní matrix. Struktura srdeční mitochondrie je specifická tím, že obsahuje NDUFS na vnějším povrchu. V srdečním svalu proto DOX přechází přes vnější membránu mitochondrie do cytosolu, kde je redukován NDUFS. Následně dojde ke vzniku lipofilního deoxyaglykonu, který přejde přes vnitřní membránu, kde soutěží s koenzymem Q10 o elektrony. Přesměrováním elektronů na molekulární kyslík vytváří superoxidové radikály (CONKLIN 2004).

2.4.3. Kardiotoxicita

Protinádorová terapie onkologických pacientů pomocí ANT je omezena jejich kardiotoxicitou. Nepříznivý účinek ANT na srdeční sval závisí na kumulativní dávce podaného léčiva. Před začátkem léčby je potřeba zvážit individuálně rizikové faktory a komorbidity. Zároveň je vhodné zapojit kardioprotektivní strategie jako prevence pozdních nežádoucích účinků a pacienta po ukončení léčby sledovat. Cílem je dosáhnout maximalizace účinku protinádorové terapie a minimalizace rizik spojených s poškozením srdečního svalu (PUCHNEROVÁ 2016).

Hlavní patologická cesta vede jednak ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a dále k lipidové peroxidaci buněčné membrány kardiomyocytů během expozice ANT. Chinonová část molekuly ANT je cytosolickými enzymy redukována na semichinon, poskytující elektron pro kyslík, ze kterého vznikne superoxidový anion. Nastává buďto přímé subcelulární poškození nebo nepřímé poškození buněčných struktur tvorbou ROS (např. peroxid vodíku, hydroxylový anion). Kardiomyocyty obsahují málo antioxidantních enzymů, které vychytávají volné radikály. Kromě enzymatického mechanismu dochází ke vzniku ROS také formováním komplexu ANT se železem. Kardiolipin je fosfolipid s vysokou afinitou k ANT. Nachází se ve zvýšené koncentraci ve vnitřní membráně mitochondrií. Další patologická cesta nastává po vstupu ANT do mitochondrie, kde dochází k inhibici dýchacího řetězce a snížení produkce ATP. (LIPSHULTZ 2008). DOX ničí nádorové buňky vazbou na enzym Top2, která reguluje množství nadobrátek ve dvoušroubovici tím, že štěpí obě vlákna DNA. Její podtypy Top2 α se vyskytují v nádorových buňkách, zatímco Top2 β u zdravých buněk. Pokud se DOX naváže na Top2 α , dojde k žádoucí apoptóze nádorových buněk. Zánik zdravých buněk po navázání na Top2 β probíhá rozdílným mechanismem, při kterém dochází k poškození volnými radikály, poškození DNA a mitochondrií v kardiomyocytech. ANT poškozují srdeční tkáň uvolňováním

TNF- α a IL-1 (kardioinhibiční účinek). Dále inaktivací genů kódujících přežívání myocytů. Enzymy potřebnými k produkci energie v myocyty. Proteinem p53 zprostředkovanou inhibicí savčí TOR (mTOR). Snížením exprese mRNA pro ATP působící v sarkoplazmatickém retikulu. A také účinkem na nonmyocytární kompartment (MLADOSIEVIČOVÁ et al. 2014).



Obr. 6 Subcelulární mechanismy antracyklinové toxicity. ANT jako DOX vstupují do kardiomyocytů pasivní difuzí a vyvolávají tvorbu ROS, která vede ke škodlivému účinku na buňku. Navíc ANT narušují mitochondriální funkci, inhibují transkripci genu a produkci energie v buňce. β 1ADR - beta-1 adrenergní receptor; cTn - srdeční troponin; MLC2 - myosinový lehký řetězec; MM-CK - svalová kreatinkináza; MT-CK - mitochondriální kreatinkináza; NO – oxid dusnatý; ONOO $^-$ - peroxynitrit; H₂O₂ – peroxid vodíku; HO $^\bullet$ hydroxyd (TRACHTENBERG 2011).

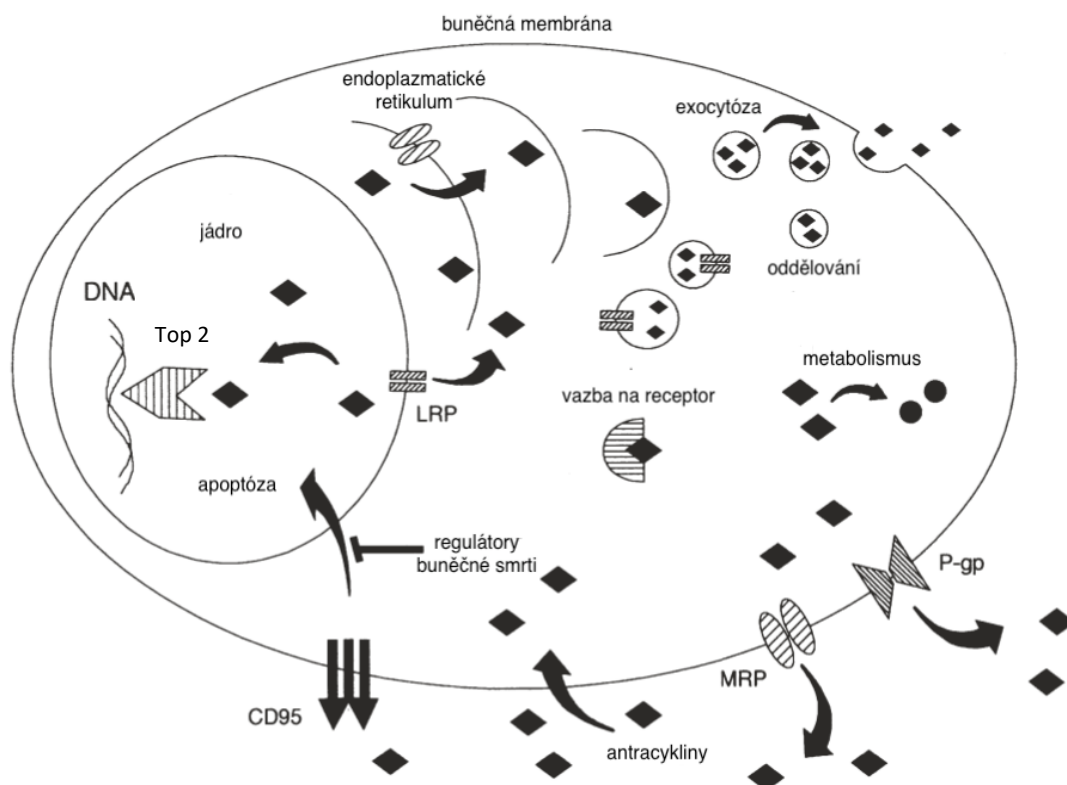
Závažnost a rozsah poškození srdečního svalu je individuální u každého pacienta. Existují rizikové faktory, které zvyšují pravděpodobnost vzniku kardiotoxicity. Mezi charakteristiky pacienta patří: věk <18 nebo >65 let v době zahájení léčby; ženské pohlaví; hypertenze; preexistující onemocnění srdce (ischemická choroba srdeční, komorová dysfunkce, chlopenní vady); gravidita; extrémní kompetitivní sportování a izotermická zátěž. Mezi charakteristiky související s léčbou patří: kumulativní dávka >300 mg/m² DOX nebo >600 mg/m² EPI; ozáření mediastina; kombinovaná chemoterapie (trastuzumab, cyklofosfamid, etoposid, melfalan, paklitaxel, mitoxantron, idarubicin) a delší časový interval po léčbě. Kardiotoxicita DOX je ireversibilní, může dojít ke stabilizaci s následným relapsem po několika měsících. Nastává

globální funkční porucha srdce na echokardiografii a ventrikulografii. Předcházení komplikacím lze pomocí monitorování a případně včasného přerušení kardiotoxické terapie.

Kardiotoxicitu lze snížit redukcí oxidačního stresu v době expozice, změnou struktury ANT nebo modifikací schématu podávání. Nejúčinnější kardioprotektivní látka dexrazoxan, působí intracelulárně jako chelatační látka. Nedochází ke vzniku komplexu molekul ANT a železa v buňkách, které způsobují vznik ROS. Od roku 2011 je dexrazoxan kontraindikován pro pacienty >18 let vzhledem k vyššímu riziku výskytu AML a myelodysplastického syndromu. Výbor pro humánní léčivé přípravky EMA došel k závěru, že přínos léku převyšuje jeho riziko u pacientů s pokročilou metastatickou formou karcinomu prsu, kteří již dostali minimální kumulativní dávku 300 mg/m² DOX nebo 540 mg/m² EPI. Zároveň by měl být poměr dávek redukován na 10 dílů dexrazoxanu a 1 díl DOX nebo EPI. Dalším způsobem v prevenci poškození srdečního svalu je vazba ANT na lipozomy (pegylovaná nebo nepegylovaná forma). Lipozomální ANT pronikají snáze skrze propustnější cévy nádorové tkáně. Na druhou stranu snižují průnik skrze pevné spoje kardiomyocytů ve zdravé tkáni, což snižuje kardiotoxický účinek. U dospělých pacientů lze snížit akutní kardiotoxicitu modifikací způsobu podávání. Náhradou bolusového podávání ANT pomalými infuzemi (48-96 hod.) dojde ke snížení nejvyšší koncentrace léčiva v krvi. Prolongované podávání kontinuální infuze není účinnější u pediatrických onkologických pacientů ani u pomalu metabolizovaných ANT (idarubicin), protože může zvyšovat jeho toxicitu (MLADOSIEVIČOVÁ et al. 2014).

2.4.4. Nádorová rezistence

Hlavní problém chemoterapie je rezistence na protinádorová léčiva, která souvisí s nežádoucím klinickým výsledkem. Existuje několik mechanismů ANT rezistence znázorněných na Obr. 7) např. porušený transport přes plazmatickou membránu, zvýšený eflux léčiva ven z buňky, zvýšená intracelulární detoxikace léčiva, schopnost enzymů cílených na ANT, nebo snížená schopnost buňky vyvolat apoptózu. Nejdůležitější příčina selhání chemoterapie je metabolická inaktivace redukcí karbonylové skupiny.



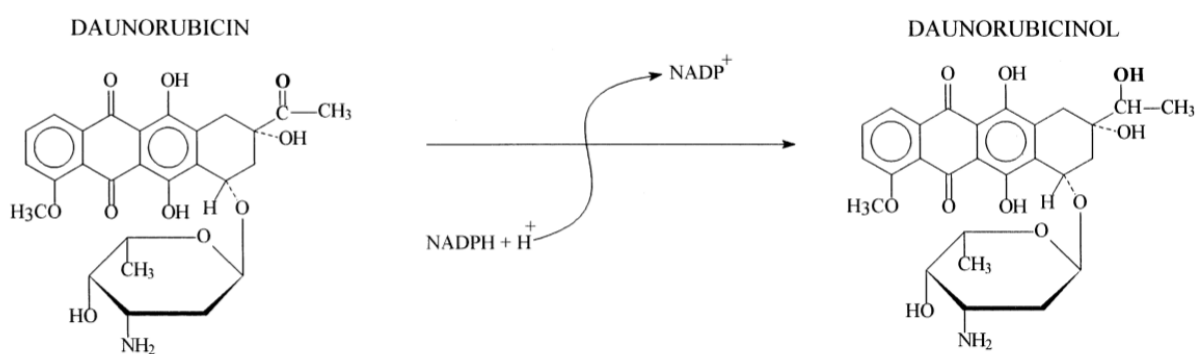
Obr. 7 Mechanismy buněčné rezistence na ANT. 1) Proteiny lékové rezistence: P-gp – P-glykoprotein, MRP - Protein mnohočetné lékové rezistence, LRP – rezistentní plicní protein; 2) Detoxikace: metabolismus ANT pomocí GSTs - glutathion S-transferázy; 3) Vnitrobuněčné cíle ANT: DNA Top2 - topoizomeráza 2, telomeráza; 4) Vyvolání buněčné smrti: CD95 programovaná buněčná smrt, regulační proteiny; pozn. symbol diamantu označuje ANT (BOER et al. 1998).

Porušený transport přes plazmatickou membránu: ANT vstupují do buňky pasivní difúzí jako elektronegativní molekuly. Lipofilní ANT (idarubicin) se akumulují uvnitř buňky mnohem rychleji než relativně hydrofilní sloučeniny (DAUN, DOX), ale mohou být z buňky vypuzeny mnohem rychleji pokud nedojde k jejich protonizaci (BOER et al. 1998).

Zvýšený eflux léčiva ven z buňky: Transmembránové proteiny přenášejí mnoho látek přes extracelulární a intracelulární membrány za současné hydrolyzy ATP. Mají důležitou roli v adsorpci, distribuci a eliminaci léčiv z organismu a nadměrná exprese těchto proteinů vede k rychlejšímu exportu toxických látek z buňky a snížení intracelulární akumulace mnohých léčiv včetně ANT (HOLČÁKOVÁ et al. 2014). P-gp neboli permeability-glycoprotein patří do rodiny přenašečů vázajících ATP tzv. ABC transportéry. Způsobuje odolnost buněk k látkám jako ANT, taxany nebo epipodophyllotoxiny. Jejich eflux může být snížen inhibitory P-gp jako verapamil, cyklosporin A nebo PSC 833 neboli vaspodar. Dalším ABC transportérem je protein

spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí. Jeho výskyt na plazmatické membráně zvyšuje eflux léčiv z buňky. Vzhledem k jeho výskytu na endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu se předpokládá souvislost s intracelulárním tříděním a oddělováním léčiva. Rezistentní plicní protein nepatří do rodiny ABC přenašečů. Nachází se na jaderné membráně nebo na buněčných vezikulách, proto má pravděpodobně souvislost s jaderným a cytoplazmatickým transportem. Předpokládá se, že snižuje množství ANT v jádru tvorbou vezikul, vazbou léčiva nebo přenosem léčiva z buňky (BOER et al. 1998).

Zvýšená intracelulární detoxikace léčiva: Hlavní metabolická cesta ANT je redukce ketonické skupiny na C13-hydroxy alkoholy v reakci katalyzované aldehyd nebo karbonyl reduktázami. Vzniklý alkoholový metabolit DAUN-ol vykazuje mnohem menší protinádorovou aktivitu a navíc život ohrožující kardiotoxicitu, která omezuje klinické použití DAUN. Zvýšená hladina CRE v nádorových buňkách proto může souviset s rozvojem ANT rezistence a ovlivnit klinický výsledek léčby (PLEBUCH et al. 2007). Druhá cesta detoxikace ANT katalyzovaná Glutathion S-transferázou probíhá třemi různými způsoby: 1) konjugací redukovaného glutathionu (GSH) na léčivo, čímž se zvyšuje rozpustnost ve vodě a exkrece ANT z buňky, 2) eliminací volných radikálů, které vytvořilo léčivo, 3) přímou vazbou léčiva, čímž se snižuje biodostupnost ANT v buňce.



Obr. 8 Karbonylová redukce DAUN na DAUN-ol (AX et al. 2000).

Schopnost enzymů cílených na ANT: Top2 vytváří zlomy ve dvoušroubovici DNA, což je důležité pro transkripci, replikaci a rekombinaci molekuly DNA. Navíc je Top2 potřeba při segregaci sesterských chromozomů během dělení buňky. Cytotoxicita závisí na množství štěpitelných míst, která mohou být stabilizována ANT a neschopností buňky opravit zlomy v molekule DNA. Rezistence na ANT nastává při snížené schopnosti Top2 α , naopak tomu je v případě Top2 β . Další důležitý enzym Telomeráza doplňuje specifické sekvence DNA na

koncové části chromozomů. Díky tomu nedochází ke zkracování telomer během replikace DNA a schopnost proliferace buňky zůstává zachována. Zvýšená exprese a aktivita telomerázy souvisí s horší prognózou dospělých pacientů AML (BOER et al. 1998).

Snížená schopnost buňky vyvolat apoptózu: Přežívání leukemických buněk během léčby může záviset na snížené schopnosti odpovídat na smrtící signály. ANT mohou přímo vyvolat programovanou buněčnou smrt. V hematopoetické buňce může být apoptóza vyvolaná vazbou ligandu CD95 na příslušný receptor. Interakce ligand/receptor CD95 je důležitá k regulaci množství lymfocytů v normální krvi. Mutace CD95 receptoru vede k nekontrolovatelné proliferaci lymfocytů, která je způsobená poruchou apoptózy tzv. Canale-Smith syndrom neboli autoimunitní lymfoproliferativní syndrom. Exprese ligandu a receptoru CD95 je nižší u ANT rezistentních buněk. Míra rezistence koreluje s neschopností buněk vyvolat CD95 zprostředkovanou apoptózu. V každé buňce se nachází regulační proteiny, které podporují buněčnou smrt (p53) a proteiny, které snižují buněčnou smrt. Rovnováha mezi nimi je důležitá při rozhodování buňky, zdali mají následovat programovanou buněčnou smrt. Mutace tumor supresorového genu p53 souvisí s horší prognózou AML (BOER et al. 1998).

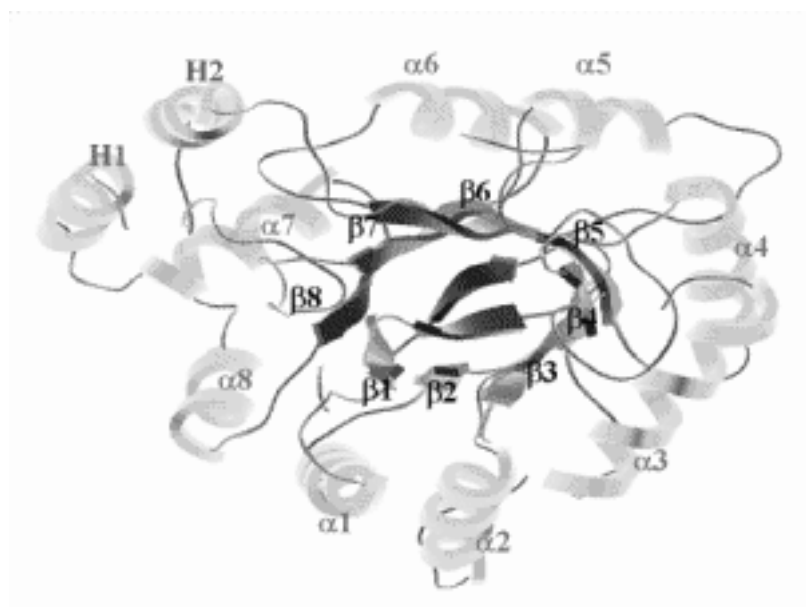
2.5. Enzymové reduktázy

Porozumění biotransformace léčiv je nezbytné k rozvoji klinického použití ANT. Nejvíce jsou zastoupené oxidativní reakce, katalyzovány enzymy CYP a redukční reakce, katalyzované enzymy z nadrodiny AKR a SDR.

2.5.1. Aldo-ketoreduktázy

AKR jsou NAD(P)H závislé oxidoreduktázy, primárně redukující aldehydy a ketony na primární nebo sekundární alkoholy. Je známo 15 lidských AKR enzymů, které mají zásadní roli v metabolismu širokého spektra látek, včetně léčiv, karcinogenů a reaktivních aldehydů. Existuje více než 190 členů nadrodiny AKR, která se dělí na 16 rodin. Členové jednotlivých rodin mají méně než 40 % společné sekvence oproti členům jiných rodin. Proteiny s více než 60 % společné sekvence patří do stejné nadrodiny. Nomenklaturní systém začíná kořenem AKR, který označuje protein jako aldo-ketoreduktázu. Poté následuje první číslo identifikující rodinu, písmeno označující nadrodinu a druhé číslo identifikující konkrétní protein. Savčí AKR zahrnují rodiny AKR1 (největší), AKR6 a AKR7. Osm ze třinácti lidských AKR patří do rodiny AKR1, která zahrnuje aldehydoreduktázy (AKR1A1), aldózareduktázy (AKR1B1, 1B10), hydroxysteroid dehydrogenázy (AKR1C1-1C4) a steroid-5 β -reduktázy (AKR1D1). Mezi další lidské AKR patří aflatoxin aldehydoreduktázy (AKR7A2 a AKR7A3) a napětově řízené

draselné kanály β -podjednotky (AKR6). Většina AKR jsou monomerní proteiny (34-37 kDa), které mají $(\beta/\alpha)_8$ soudkový motiv se třemi velkými smyčkami viz. Obr. 9. Komplex kofaktor a substrát/inhibitor se váže do dvou různých míst proteinu. Aktivní vazné místo obsahuje katalytickou tetradu: Tyr, Asp, Lys a His. Velké množství léčiv nebo jejich metabolitů, které obsahují karbonylovou skupinu podléhá karbonylové redukci. Lidské AKR enzymy metabolizují syntetické hormony (tibolon), léčiva působící na CNS (naltrexone, nortriptylin) a protinádorová chemoterapeutika (DAUN, DOX). Karbonylová redukce na sekundární alkoholy je hlavní metabolická přeměna zmíněných ANT. Enzymy AKR1A1, AKR1C2 a CBR jsou neúčinnější při redukci DAUN. Život ohrožující kardiotoxicita a snížená protinádorová účinnost výsledných alkoholů omezuje klinické použití ANT. Proto jsou vyhledávány ANT rezistentní ke karbonylové redukci např. EPI (JIN a PENNING 2007; PENNING 2014).



Obr. 9 $(\beta/\alpha)_8$ soudkový motiv enzymu AKR (PERELMAN SCHOOL OF MEDICINE, 2019).

AKR1A1: Aldehydoreduktáza byla jedním z prvních objevených enzymů. NADPH závislá monomerní oxidoreduktáza se nachází v cytosolu mnoha tkání, především v proximálním tubulu ledvin. AKR1A1 je enzym se širokou substrátovou aktivitou. Redukuje negativně nabitě substráty s karboxylovou skupinou např. aromatické a steroidní aldehydy. Naopak oxiduje trans-dihydrodioly na ortho-chinony. U hlodavců zastupuje důležitou roli při syntéze kyseliny askorbové. Lidé musí přijímat vitamín C ze stravy, protože v jejich těle neprobíhá syntéza kyseliny askorbové. Zachovalá aktivita AKR1A1 u lidí předpokládá dosud neobjasněnou funkci zmíněného enzymu. V ledvinách je enzym AKR1A1 zapojený do katabolické přeměny myoinositolu na D-glukuronát (BARSKI et al. 2009).

AKR1B1: Aldozareduktáza je dosud nejvíc prostudovaný enzym díky potenciálnímu účinku v hyperglykemickém poškození tkání a rozvoji sekundárních diabetických komplikací. Za normálních okolností katalyzuje redukci malého množství glukózy. Zvýšená redukce glukózy během hyperglykémie souvisí s tkáňovým poškozením, čemuž lze zabránit inhibicí AKR1B1 (DVORNIK et al. 1973). Enzym katalyzuje redukci mnoha substrátů např. AGE prekurzory, isokortikosteroidy, produkty peroxidace lipidů (oxidované fosfolipidy), konjugáty glutathionu s nenasycenými aldehydy, polutanty z prostředí (akrolein). Je zapojený během restenózy a aterosklerózy v proliferaci hladkého vaskulárního cévního svalstva (RAMANA et al. 2002).

AKR1B10: Aldozareduktáza tenkého střeva se vyskytuje především v tenkém a tlustém střevě, játrech, brzlíku a adrenálních žlázách na rozdíl od všudypřítomné aldozareduktázy. Enzymy AKR1B1 a AKR1B10 sdílí 71 % aminokyselinové sekvence a vykazují téměř stejnou substrátovou specifitu a selektivitu k inhibitorům (CAO et al. 1998). AKR1B10 vykazuje oproti AKR1B1 asi 10x větší katalytickou účinnost vůči all-trans-retinalu (GALEGO et al. 2006) a některým ketonům např. DAUN a dolasetron (MARTIN et al. 2006). Stejně jako AKR1B1 působí také enzym AKR1B10 protektivně před elektrofilním poškozením aldehydy z cigaretového kouře např. akrolein nebo krotonaldehyd (YAN et al. 2007).

AKR1C1-C4: Hydroxysteroid dehydrogenázy (HSD) tzv. dihydrodioldehydrogenázy vzhledem k jejich schopnosti katalyzovat NADP⁺ závislou oxidaci trans-dihydrodiolů na příslušné katecholy. Geny pro čtyři enzymy z nadrodiny AKR1C sdílí 86 % homologie. Všechny se nachází v játrech, ale mají rozdílnou extrahepatickou distribuci. Zatímco se AKR1C4 nachází převážně v játrech, AKR1C2 a AKR1C3 se vyskytují převážně v prostatě a prsní tkáni. Na rozdíl od enzymů z rodiny AKR1A a AKR1B, katalyzují enzymy AKR1C přeměnu aldehydů i ketonů. AKR1C4 je 10 až 30x účinnější než ostatní enzymy rodiny AKR1C (PENNING et al. 2000). AKR1C3 známý jako PGF syntetáza, katalyzuje přeměnu prostaglandinů H₂ a D₂. Vzhledem k jeho 17β-HSD aktivitě má zásadní roli v přeměně estrogenů a testosteronů (DEYASHIKI et al. 1995). AKR1C2 známý jako protein vázající žlučovou kyselinu má schopnost transportovat žlučovou kyselinu z kanalikulů jaterní buňky (STOLZ et al. 1993). AKR1C1 má zásadní roli v přeměně progesteronu vzhledem k 20α-HSD aktivitě (PIEKORZ et al. 2005).

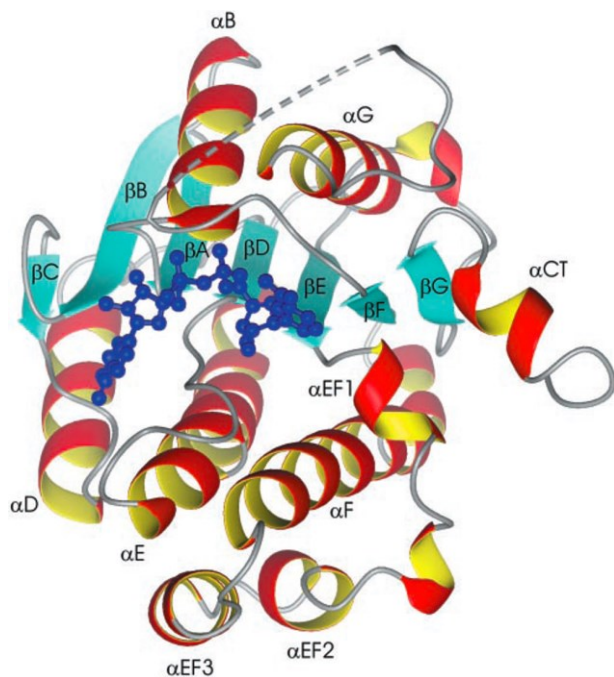
AKR1D1: Delta 4-3-ketosteroid 5β-reduktáza je enzym získaný z jater, který jako jediný katalyzuje 5β-stereospecifickou redukci nezbytnou pro syntézu žlučové kyseliny. Výsledné 5β-dihydrosteroidy jsou následně redukovány v játrech pomocí AKR1C4 na (deoxy)cholovou

kyselinu. Enzym AKR1D1 dále vykazuje enzymatickou aktivitu pro steroidní hormony např. pro testosteron, progesteron, kortizol a kortizolon (OKURDA a OKURDA 1984).

AKR7A2-A3: Aflatoxinreduktázy jsou funkčními dimery na rozdíl od monomerních AKR1. Enzym AKR7A3 se vyskytuje v žaludku, slinivce, ledvinách a játrech, zatímco AKR7A2 je široce distribuován v extrahepatocelulárních tkáních (KNIGHT et al. 1999; IRELAND et al. 1998). AKR7A2 má hlavní úlohu v buňkách neuronu, protože redukuje sukcinyl semialdehyd, metabolit neurotransmiteru GABA, na γ -hydroxybutyrát (LYON et al. 2007). Druhý enzym AKR7A3 má detoxikační úlohu při redukci aflatoxin B₁-dialdehydu na netoxické alkoholy (GUENGERICH et al. 2001).

2.5.2. Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem

Druhá nadrodina SDR je přítomná v buňkách prokaryotických i eukaryotických organismů, kde se podílí na metabolismu alkoholů, cukrů, aromatických uhlovodíků, steroidů, prostaglandinů a xenobiotik. SDR tvoří velmi rozsáhlou skupinu rozdílných enzymů, které mezi sebou sdílí pouze 15 až 30 % sekvenční homologie. Jejich společným znakem je specifická struktura tzv. Rossmannův záhyb, která určuje prostorové uspořádání molekuly. Primární strukturu tvoří N-terminus (končí NH₂ skupinou) vázající kofaktor, katalyticky aktivní centrální část a C-terminus (končí COOH skupinou) nezbytný pro oligomerizaci. Navzdory malé sekvenční identitě je kromě koncové části prostorová struktura velmi podobná. Enzymy nadrodiny SDR, NAD(P)H dependentní oxidoreduktázy, byly původně rozděleny do dvou skupin: klasické (classical, C) a prodloužené (extended, E). Skupiny mají odlišné místo pro vazbu kofaktoru, odlišné místo na β 4 řetězci (enzymy ze skupina E mají méně zachovalé původní uspořádání než enzymy ze skupiny C) a jiné skupiny přilehlé na aktivní místo enzymu. Později byly přidány další skupiny: střední (intermediate, I), divergentní (divergent, D) a komplexní (komplex, X). Při tvorbě názvu konkrétního enzymu se používá nejdříve číslo udávající rodinu a následně písmeno (C, E, I, D nebo X) označující skupinu (PERSON et al. 2003; HOFFMAN a MASSER 2007).



Obr. 10 Trojrozměrná struktura 3 α -HSD *Comamonas testosteroni* (bakterie). Navázaný NAD⁺ kosubstrát je na obrázku vyznačen modrou barvou. Neuspořádané vlákno vázající substrát je vyznačeno přerušovanou linií (GRIMM et al. 2000).

CBR1, SDR21C1: Karbonylreduktáza I je monomerní cytosolická NADPH dependentní reduktáza, která se vyskytuje u člověka především v játrech, epidermis, žaludku, tenkém střevě, ledvinách, neuronálních a gliových buňkách CNS a vláknech hladkého svalů. Menší množství se nachází v mozečku, ústní dutině, jícnu, ledvinách a kosterním svalstvu. Mezi nejčastější substráty CBR1 patří chinony, které mají důležitou roli při oxido-redukční katalýze biologických procesů např. ubichinon (koenzym Q) součástí dýchacího řetězce, nebo tokoferol chinon (vitamín E) při ochraně biologických membrán před lipidovou peroxidací. Existují tři isoformy enzymu CBR1, které mají stejnou katalytickou aktivitu k menadionu. Vznikají pouze u lidské CBR1 autokatalyckou modifikací Lysinu v poloze 239, který může reagovat s 2-oxokarboxylátem. Nic podobného nebylo pozorováno u jiných oxidoreduktáz, ani u CBR1 jiných organismů např. u králíka, myši ani prasete (WERMUTH 1981).

CBR3, SDR21C2: Karbonylreduktáza 3 je také monomerní cytosolická NADPH dependentní oxidoreduktáza, která sdílí s CB1 okolo 70 % sekvenční homologie. Rozdíly v selektivitě jsou dané jiným tvarem vazebných míst a vlastnostmi povrchů. Mezi substráty redukované CBR3 patří např. chinony, isatin (derivát indolu) a oracin (derivát isochinolinu) (WSOL 2017).

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit inhibiční potenciál ZANIB, který je klasifikován jako inhibitor BTK. K tomu účelu byly použity enzymy, které katalyzují přeměnu DAUN na DAUN-ol. Konkrétně se jedná o enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 z nadrodiny AKR a CBR1 z nadrodiny SDR. Jednotlivé dílčí cíle zahrnují:

- 1) Základní screening inhibiční aktivity ZANIB pro vybrané rekombinantní reduktázy;
- 2) Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} pro enzym, který vykazuje nejsilnější inhibici;
- 3) Stanovení inhibiční konstanty K_i pro tento enzym a určení typu inhibice;
- 4) V případě nekompetitivní inhibice určení, jestli se jedná o pevně vázající inhibitor.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

4.1.1. Pomůcky

Rukavice, navažovací lžičky, automatické pipety (0,5 - 1000 μ l), pipetovací špičky, nádoby na led, stopky, zkumavky Eppendorf (1,5; 2 ml), stojan na zkumavky, lihový fix, plastová injekční stříkačka, injekční jehla, filtr s membránou na stříkačku, kádinky, skleněné vialky (1 ml), inserty na vialky (400 μ l), těsnící septa a šroubovací víčka k vialkám.

4.1.2. Přístroje a programy

Analytické váhy (Sartorius)

Centrifuga (Mini Spin Plus, Eppendorf)

GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software, California, USA)

Inkubátor (Thermomixer compact, Eppendorf)

Třepačka (Vortex Genius 3, IKA)

Přístroj pro výrobu ledové tříště (BREMA Ice Maker)

Vakuový koncentrátor (Concentrátor Plus, Eppendorf)

UHPLC přístroj (Agilent 1290 Infinity II, Agilent)

UHPLC kolona (Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, Agilent)

Ultrazvuková lázeň (Ultrasonic cleaner 120T, Ultrazvuk s.r.o.)

4.1.3. Chemikálie

Acetonitril (VWR Chemicals)

Amoniak (25 %, VWR Chemicals)

DAUN (Toronto Research Chemicals)

Destilovaná voda (Katedra BCH věd)

Dimethylsulfoxid (Honeywell)

Ethylacetát (Sigma-Aldrich)

Glukosa-6-fosfát (Roche Diagnostics)

Glukosa-6-fosfát dehydrogenáza (Roche Diagnostics)

Kyselina mravenčí (0,1 %, Lachema)

Metanol (VWR Chemicals)

MgCl₂ (0,1 M, Katedra BCH věd)

NADP⁺ (Sigma-Aldrich)

Na-fosfátový pufr (0,1 M, pH = 7,4, KBV)

Inhibitor ZANIB (zásobní koncentrace 10 nM, MedChemExpress): uchováván v mrazícím boxu (-80 °C), případně v mrazáku laboratoře (-20 °C).

4.2. Metodika

Reakce inhibitoru ZANIB s vybranými enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 probíhala 10 minut v inkubátoru při 37 °C. Jako substrát byl použitý DAUN, který se působením CRE metabolizuje na DAUN-ol. Inhibiční potenciál ZANIB byl zjištěn na základě množství vznikajícího produktu DAUN-ol v reakční směsi. Měření vzorků probíhalo za využití UHPLC. Z výsledků byla vypočítána specifická aktivita enzymu a následně inhibiční aktivita inhibitoru.

4.2.1. Příprava regeneračního systému

Pro vlastní enzymatickou reakci je potřeba připravit regenerační systém podle počtu inkubovaných vzorků. V následujícím postupu přípravy je uvedeno složení regeneračního systému pro přípravu jedné reakce. Při přepočtu jednotlivých složek na požadovaný počet reakcí je nutno zohlednit možné ztráty během pipetování, proto raději počítáme s určitou rezervou. Do eppendorfky se naváže 0,2 mg NADP⁺ a 0,6 mg glukóza-6-fosfátu (Glp-6-P). Následně se látky rozpustí v 10 µl Na-fosfátovém pufru. Přidá se 10 µl chloridu hořečnatého (0,1M), který je v reakci potřeba pro dehydrogenaci Glp-6-P. Předpřipravená směs se uchovává v lednici a těsně před samotnou reakcí se přidá 0,5 µl Glp-6-P-dehydrogenázy.

4.2.2. Příprava substrátu

Základní screening, stanovení hodnoty IC₅₀: Na jednu reakci je potřeba roztok substrátu DAUN o koncentraci 5 000 µM v množství 10 µl. Příprava probíhá smícháním 1,27 mg DAUN (M = 563,98 g/mol) a 450 µl destilované vody. Finální koncentrace substrátu v 100 µl reakční směsi tak byla 500 µM.

Stanovení inhibiční konstanty K_i : Nejprve je potřeba připravit roztok substrátu DAUN o koncentraci 20 000 μl . Příprava probíhá smícháním 4,07 mg DAUN ($M = 563,98 \text{ g/mol}$) a 360 μl destilované vody. Z roztoku o nejvyšší koncentraci se postupně naředí další koncentrace 10 000; 8 000; 6 000; 4 000 a 2 000 μM . Finální koncentrace substrátu ve 100 μl reakční směsi tak byla 2 000; 1 000; 800; 600; 400 a 200 μM .

4.2.3. Příprava enzymu

Rekombinantní enzymy byly získané v expresním systému *E. coli* na Katedře biochemických věd Faf UK v HK. Před ředěním se enzym vyndal z mrazicího zařízení a po rozmrazení se pouze krátce promíchal. Na jednu reakci je potřeba 10 μl zředěného roztoku enzymu. Požadovaná koncentrace jednotlivých enzymů na reakci je uvedena v Tab. 2. Ředění enzymů probíhalo ze zásobních koncentrací pomocí Na-fosfátového pufru. Jaké množství enzymu ze zásobního roztoku je potřeba na přípravu, vypočteme podle směšovací rovnice na Obr. 11. Množství Na-fosfátového pufru vypočteme z rozdílu hodnot V_2 a V_1 .

Obr. 11

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

C_1 – koncentrace zásobního roztoku enzymu (mg/ml); V_1 – objem enzymu ze zásobního roztoku (μl); C_2 – požadovaná koncentrace enzymu v reakční směsi (mg/ml); V_2 – celkový objem enzymu a pufru (μl).

Tab. 2 Přehled zásobních koncentrací a požadovaných koncentrací pro jednotlivé enzymy.

	Zásobní koncentrace enzymu (mg/ml)	Požadovaná koncentrace enzymu ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)
AKR1A1	0,49	3,00 a 1,00
AKR1B1	1,50	5,00
AKR1B10	1,56 a 1,60	5,00
AKR1C3	1,00 a 1,30	1,50
CBR1	1,47	1,50 a 1,00

Pozn. pro některé enzymy probíhalo měření s různou koncentrací (druhá hodnota v tabulce).

4.2.4. Příprava inhibitoru

Zásobní koncentrace inhibitoru v mrazicím zařízení je 10 000 μM .

Základní screening: Do jedné reakce je potřeba roztok inhibitoru o finální koncentraci 10 μM a 50 μM v množství 2 μl . Příprava roztoku o pracovní koncentraci 500 μM probíhala smícháním 2 μl zásobního roztoku a 38 μl dimethylsulfoxidu (DMSO). Příprava roztoku o pracovní koncentraci 2 500 μM probíhala smícháním 4 μl zásobního roztoku a 12 μl DMSO.

Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} , tight binding inhibice: Roztok inhibitoru ZANIB byl naředěný na pracovní koncentrace 5; 25; 50; 125; 250; 500; 1000; 2500 a 5000 μM , aby finální koncentrace inhibitoru v 100 μl reakční směsi byla 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 50 a 100 μM .

Stanovení inhibiční konstanty K_i : Roztok inhibitoru ZANIB byl naředěný na pracovní koncentrace 50, 250 a 500 μM , aby finální koncentrace inhibitoru v 100 μl reakční směsi byla 1, 5 a 10 μM .

4.2.5. Preinkubace

Připravíme si eppendorf zkumavky (1,5 ml), do kterých rozpipetujeme jednotlivé složky viz. Tab. 3. Začneme regeneračním systémem, následuje pufr s enzymem, nakonec přidáme inhibitor ZANIB nebo DMSO u kontrolní neinhibované reakce. Směs v eppendorfci krátce protřepeme pomocí vortexu a dáme na 10 minut do inkubátoru při 37 °C.

Tab. 3 Množství jednotlivých složek pro danou reakční směs.

Reakce	Pufr (μl)	Enzym (μl)	Regenerační systém (μl)	Inhibitor (μl)	Substrát (μl)
Neinhibovaná reakce	60	10	20	0	10
Kontrola DMSO	58	10	20	2*	10
ZANIB 50 μM	58	10	20	2	10
ZANIB 10 μM	58	10	20	2	10

Každá sada vzorků byla měřena v triplicátech, případně kvadruplicátech. Pro ZANIB 10 μM byla použita zásobní koncentrace inhibitoru 500 μM . Pro ZANIB 50 μM byla použita zásobní koncentrace inhibitoru 2 500 μM . Pozn. symbol * - kontrolní vzorek zastoupený DMSO.

4.2.6. Inkubace

Přidáním DAUN do předem připravené směsi zahájíme enzymovou reakci. Směs ponecháme na dalších 30 minut v inkubátoru při 37 °C. Po uplynutí stanoveného času zastavíme reakci přidáním 40 μl NH_3 (26 %) anebo 300 μl methanolu a vložíme na 10 minut do ledu.

4.2.7. Příprava vzorku pro nástřík

Zastavení reakce pomocí NH₃: Následně je přidán do každé zkumavky 1 ml ethylacetátu a vzorky nechají 15 minut vytřepávat na vortexu. Po extrahování vzorků na třepačce se ještě nechají stočit 2 minuty na centrifuze při 13 400 rpm. Směs se rozdělí na dvě vrstvy. Pomocí pipety se opatrně odebere horní organická vrstva a celý proces se zopakuje se spodní vrstvou, aby se dosáhlo většího výtěžku z reakce. Na závěr se dají obě organické vrstvy odpařit do vakuového kondenzátoru při 30 °C. Je výhodné nechat odpařovat první vrstvu, mezitím co opakujeme celý postup extrakce s druhou vrstvou. Ve chvíli, kdy je přidána druhá vrstva do kondenzátoru, je už první částečně odpařená a množství se bez problému vejde do eppendorfky. Odpařené vzorky lze uchovávat při -20 °C anebo se rovnou rozpustí ve 400 µl mobilní fáze. Vzorky se nechají dle potřeby v ultrazvukové lázni, než dojde k úplnému rozpuštění. Je vhodné vzorky cca každých 10 minut protřepat na vortexu a vrátit opět na ultrazvuk. Před pipetováním do vialek se vzorky krátce stočí na centrifuze.

Zastavení reakce pomocí metanolu: Po inkubaci se ke vzorkům přidá 300 ml metanolu a vloží se na 10 minut do ledu. Následně se vzorky nechají 30 minut v mrazícím zařízení, případně 1 hodinu v lednici. Před filtrací se vzorky ještě stočí 10 minut na centrifuze při 13 400 rpm. Objem z eppendorfky se přepipetuje do předem připravené vialky za použití stříkačky s injekční jehlou, nebo s filtrem (membrána 0,2 µm PTFE). Nejdříve se nasají 2/3 objemu do injekční jehly. Na dně se drží precipitované proteiny, proto se neodebírá celé množství vzorku. Stříkačka se obrátí dnem vzhůru a sklepají se vzduchové bublinky. Injekční jehla se vymění za filtr, stříkačka se obrátí zpátky do pracovní polohy a pomalu se stlačuje píst stříkačky. Dáváme pozor, aby se neuvolnil filtr a nedošlo k vylití vzorku mimo připravené vialky s inzerty. Mezi jednotlivými triplikáty stejného vzorku stačí jehlu a filtr pouze vyklepat od zbytků tekutiny, při změně triplikátu je nutné použít destilovanou vodu k propláchnutí jehly a následně filtru. U prvního vzorku je vhodné první 2-3 kapky odstříknout stranou, aby nedošlo k ovlivnění výsledné koncentrace destilovanou vodou. Vialky se uzavřou těsnícím septem a označí se odpovídajícím popiskem.

4.2.8. UHPLC a vyhodnocení výsledků

Nejprve je potřeba vypsát sekvenci, která určuje pozici vialek při měření UHPLC. Následně jsou vialky srovnány na odpovídající místa do stojanu UHPLC zařízení. Pořadí vzorků je následující: blank (mobilní fáze ve složení acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí v objemovém poměru 26:74), směsný standard (DAUN-DAUN-ol), dva vzorky kontroly kvality (zajišťují

správný výpočet kalibrační křivky) a nakonec vlastní vzorky. Z celkového množství 400 μl reakční směsi bylo použito jako nástřík na kolonu pouze 5 μl . Po měření získáme hodnoty: Retenční čas RT (min); Plochu pod píkem tzv. Area; Retenční faktor RF; Množství tzv. Amount (ng na nástřík); Koncentraci (ng/ μl). Z chromatografických píků byl podle kalibrační křivky vypočten obsah vzniklého produktu DAUN-ol (ng na nástřík, respektive ng/ μl).

4.2.9. Stanovení specifické aktivity

Výsledky byly uloženy do souboru Microsoft Excel, kde byla následně vypočtená specifická aktivita viz. Obr. 12. Hodnoty specifické aktivity se zpracují v programu GraphPad. Ve stejném programu se následně vytvoří grafy pro výpočet specifické aktivity, pro stanovení inhibiční koncentrace, inhibiční konstanty a určení typu inhibice. Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad pomocí testu one-way ANOVA. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při p-hodnotě $<0,05$. V kontrolním vzorku byl místo inhibitoru použit DMSO. Data představují průměr ze tří měření.

$$a = \frac{m * K * 1000}{t * c * Mr}$$

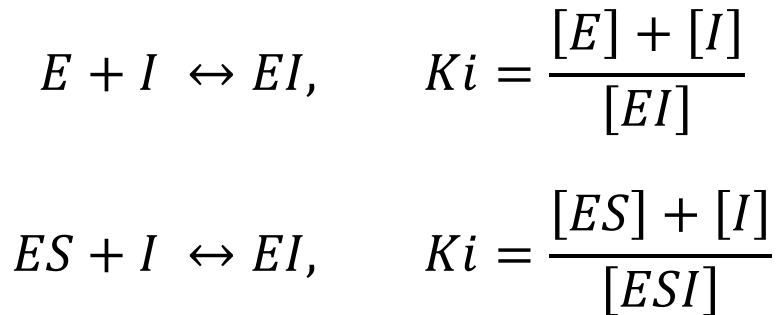
Obr. 12 Obecný vzorec specifické aktivity; a - specifická aktivita (nmol/mg/min), m – množství DAUN-ol (ng), K – koeficient zředění (Nástřík na UHPLC je 400 μL , ale nástřík na kolonu je pouze 5 μL . Získáme 1/80 celkové hmotnosti DAUN-ol. $K = 80$), t – čas inkubace (30 min), c – koncentrace enzymu v jednom vzorku (μg), Mr – molární hmotnost DAUN-ol (529,24 g/mol), hodnota 1000 – převod jednotek (1mg = 1000 μg).

4.2.10. Stanovení inhibiční koncentrace IC₅₀

Hodnota IC₅₀ udává koncentraci inhibitoru ZANIB, která sníží aktivitu enzymu o 50 %. K určení IC₅₀ musíme znát celý inhibiční potenciál 0–100 %, proto naředíme ZANIB na 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 50 a 100 μM . Byly měřeny různé koncentrace inhibitoru při zachování koncentrace enzymu i substrátu. Pomocí grafu závislosti specifické aktivity enzymu na logaritmu koncentrace inhibitoru určíme výslednou hodnotu IC₅₀.

4.2.11. Stanovení inhibiční konstanty K_i a typu inhibice

Hodnota K_i popisuje vztah mezi enzymem a inhibitorem pomocí disociační konstanty komplexu enzym-inhibitor viz. Obr. 13. Udává koncentraci inhibitoru, při které dojde k 50 % inhibici enzymu (50 % enzymu je navázáno v komplexu enzym-inhibitor). Čím nižší je hodnota K_i , tím je inhibitor účinnější, protože má vyšší afinitu k enzymu.



Obr. 13 Obecný vzorec inhibiční konstanty; [E] - koncentrace enzymu, [I] - koncentrace inhibitoru, [EI] - koncentrace komplexu enzym-inhibitor, [ES] - koncentrace komplexu enzym-substrát, [ESI] - koncentrace komplexu enzym-substrát-inhibitor.

Na základě vratnosti děje, rozlišujeme inhibici vratnou a nevratnou. Při ireversibilní inhibici vzniká kovalentní vazba mezi inhibitorem a enzymem, případně komplexem substrát-enzym, která je velmi pevná a tedy nevratná. Při reversibilní inhibici vzniká nekovalentní vazba, která umožňuje zpětnou disociaci komplexu enzym-inhibitor na volný enzym a inhibitor.

Kompetitivní inhibice: Inhibitor se váže do aktivního místa enzymu. Inhibitor a substrát soutěží o volný enzym díky jejich podobné struktuře. Z toho vyplývá, že zvýšením koncentrace substrátu, lze zvýšit rychlost reakce. Maximální rychlost se nemění $V_{max}' = V_{max}$, zatímco Michaelisova konstanta roste $K_m' > K_m$.

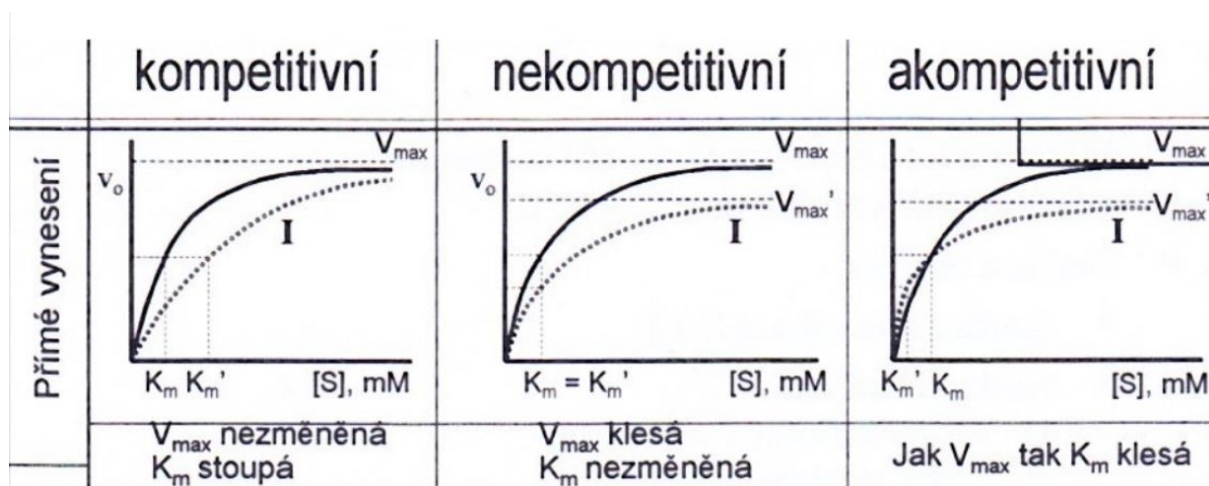
Nekompetitivní inhibice: Inhibitor se váže na jiné než aktivní místo enzymu. Dojde ke změně konformace enzymu, což znemožní vazbu substrátu na enzym. Z toho vyplývá, že zvýšením koncentrace substrátu se nezmění rychlost reakce. Michaelisova konstanta se nemění $K_m' = K_m$, maximální rychlost klesá $V_{max}' < V_{max}$.

Akompetitivní inhibice: Inhibitor nereaguje s volným enzymem, ale váže se na komplex enzym-substrát. Změna koncentrace substrátu nemá vliv na rychlost reakce. Klesá jak Michaelisova konstanta, tak maximální rychlost, proto zůstává jejich poměr nezměněný $V_{max}'/V_{max} = K_m'/K_m$.

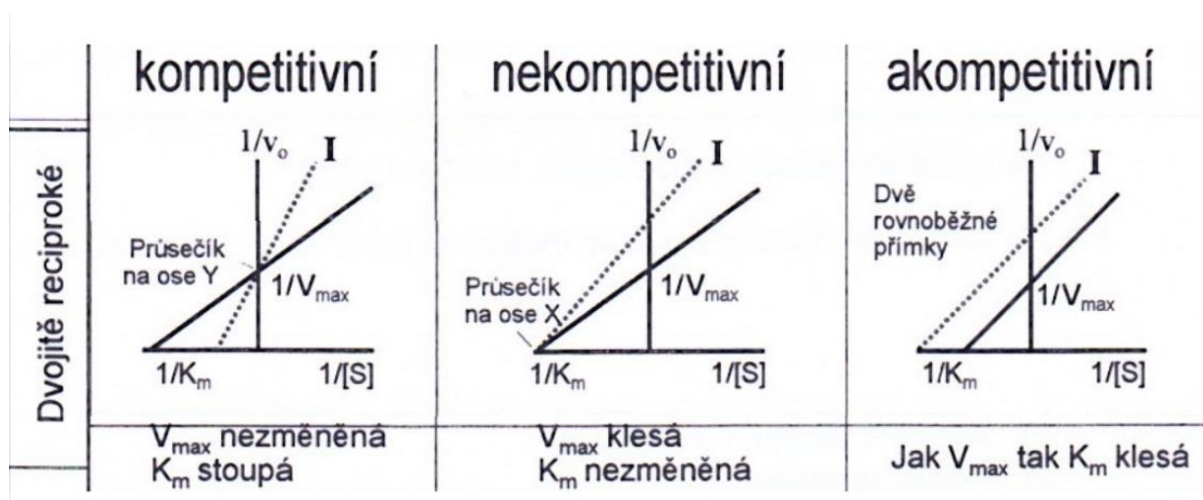
Jednotlivé inhibice lze odlišit podle maximální rychlosti dosažitelné při dané koncentraci enzymu tzv. maximální rychlost (V_{max}), a podle konstanty polovičního nasycení tzv. Michaelisova konstanta (K_m), která udává koncentraci substrátu, při které je reakční rychlost rovna polovině maximální rychlosti. K popisu enzymové kinetiky slouží rovnice Michaelise a Mentenové viz. Obr. 14, jejíž grafem je pravoúhlá hyperbola viz Obr. 15. Pro určení kinetických konstant K_m a V_{max} se v praxi využívá metoda linearizace dle Lineweavera a Burka viz Obr. 16.

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m * [S] + V_{max}}$$

Obr. 14 Rovnice Michaelise a Mentenové; v - okamžitá rychlost enzymu, $[S]$ - koncentrace substrátu; V_{max} – maximální rychlost; K_m – Michaelisova konstanta.



Obr. 15 Grafické vynesení rovnice Michealise a Mentonové; K_m , V_{max} - Michaelisova konstanta a maximální rychlost bez inhibitoru; K_m' , V_{max}' - Michaelisova konstanta a maximální rychlost v přítomnosti inhibitoru; $[S]$ - koncentrace substrátu; I – inhibitor (PRŮŠA 2014).

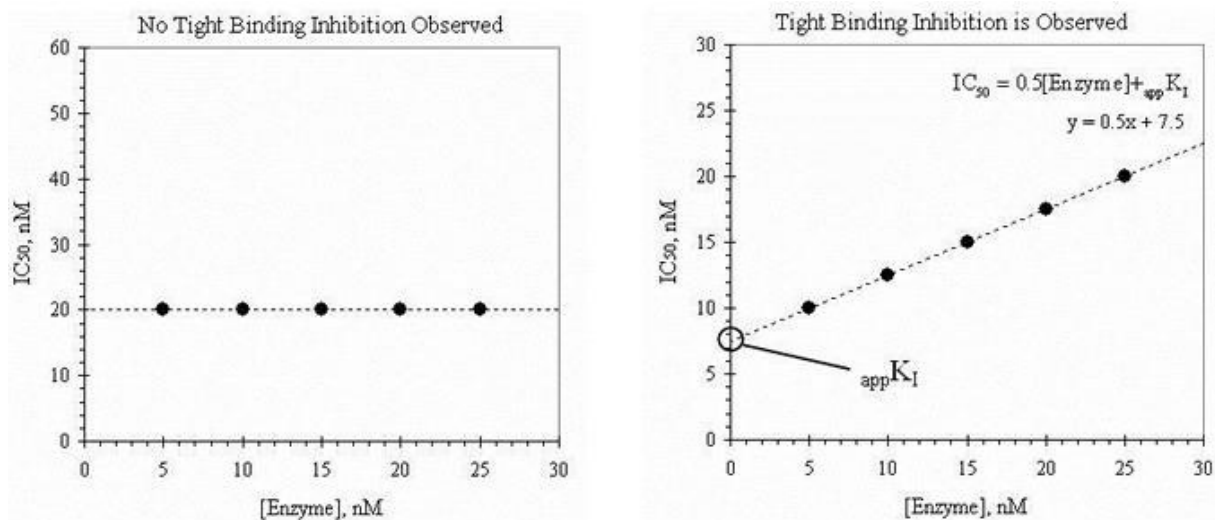


Obr. 16 Grafické vynesení rovnice Lineweavera a Burka; K_m , V_{max} - Michaelisova konstanta a maximální rychlost bez inhibitoru; K_m' , V_{max}' - Michaelisova konstanta a maximální rychlost v přítomnosti inhibitoru (PRŮŠA 2014).

Při inkubaci byly použité rozdílné koncentrace substrátu (DAUN 2000; 1000; 800; 600; 400 a 200 μM), které byly jednotlivě měřeny s rozdílnými koncentracemi inhibitoru (ZANIB 10; 5; 1 a 0 μM). Změřená data se vynesou do grafu závislosti specifické aktivity enzymu na koncentraci substrátu. První přímku získáme stanovením specifické aktivity enzymu při šesti koncentracích substrátu a nulové koncentraci inhibitoru. Další tři přímky získáme měřením v přítomnosti tří vhodně zvolených koncentrací inhibitoru. V případě kompetitivní inhibice se přímky protnou na ose y v bodě ($1/V_{max}$), zatímco u nekompetitivní inhibice se protnou na ose x v bodě ($-1/K_i$). Pro akompetitivní inhibici je charakteristický graf rovnoběžných přímek, které se neprotínají.

4.2.12. Stanovení tight binding inhibice

Při potvrzení nekompetitivní inhibice se provádí experiment k ověření tight binding neboli pevně vázající inhibice. Zjišťuje se typ vazby inhibitoru na enzym. Byly měřeny různé koncentrace inhibitoru ZANIB (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 50 a 100 μM) při změnách koncentrace enzymu AKR1C3 (0,05 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,3 mg/ml a 0,5 mg/ml). Získané hodnoty IC_{50} se vynesou do grafu závislosti IC_{50} na koncentraci enzymu a vyhodnotí se sklon přímky. „V tomto případě, by koncentrace inhibitoru v roztoku, měla být mnohem větší než koncentrace enzymu. Při určování tight binding inhibice se zjišťuje závislost hodnoty IC_{50} na koncentraci enzymu, za použití stálé koncentrace substrátu (K_m). Pokud se IC_{50} významně mění s rostoucí koncentrací enzymu, jedná se tight binding inhibici a je potřeba dalšího upřesnění. Pokud se IC_{50} významně nezmění, nejedná se tight binding.“ (STRELOW 2012).



Obr. 17 Graf závislosti koncentrace enzymu na IC_{50} k určení tight binding inhibice. Jak je ukázáno na levé straně, na ose IC_{50} nenastala žádná změna, proto se nejedná o pevně vázající inhibici. Jak je ukázáno na pravé straně, hodnota IC_{50} roste (sklon 0,5), proto se jedná o pevně vázající inhibici a bude potřeba ještě dalšího upřesnění. IC_{50} – inhibiční koncentrace (nM); $[Enzyme]$ – koncentrace enzymu (nM). (STRELOW 2012).

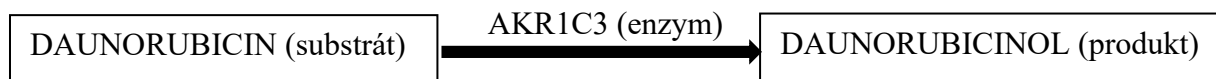
„Tight binding inhibitory reagují s enzymy téměř stechiometrickým způsobem. Čím vyšší koncentrace enzymu je přítomna, tím vyšší koncentrace inhibitoru je potřeba, aby došlo k nasycení poloviny vazných míst inhibitoru. Rovnice na Obr. 18 dokazuje, že mezi hodnotou IC_{50} pro tight binding inhibitor a celkovou koncentrací enzymu je lineární vztah. Graf závislosti IC_{50} na koncentraci enzymu (při jedné stabilní koncentraci substrátu) bude vypadat jako přímka se sklonem 0,5 a průsečík y bude K_i^{app} . V závislosti na způsobu interakce a enzymu, zahrnuje hodnota K_i^{app} koncentraci substrátu a K_m oproti hodnotě K_i “ (COOPELAND 2000).

$$IC_{50} = \frac{1}{2} [E] + K_i^{app}$$

Obr. 18 Rovnice IC_{50} pro tight binding nekompetitivní inhibici. IC_{50} – inhibiční koncentrace (nM); $[E]$ – koncentrace enzymu (nM); $[K_i^{app}]$ – zahrnuje $[S]$ a K_m oproti hodnotě K_i ; $[S]$ – koncentrace substrátu (nM) (COOPELAND 2000).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části diplomové práce, jsem ověřovala inhibiční aktivitu ZANIB na enzymy z nadrodiny AKR (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3) a jeden enzym z nadrodiny SDR (CBR1). Jako substrát byl použit DAUN, který se působením enzymu přemění na produkt DAUN-ol. Nejaktivnější CRE ovlivňující popsanou reakci je AKR1C3. Pokud by ZANIB inhibičně ovlivňoval enzymové reduktázy, produktu (DAUN-ol) bude vznikat signifikantně méně.



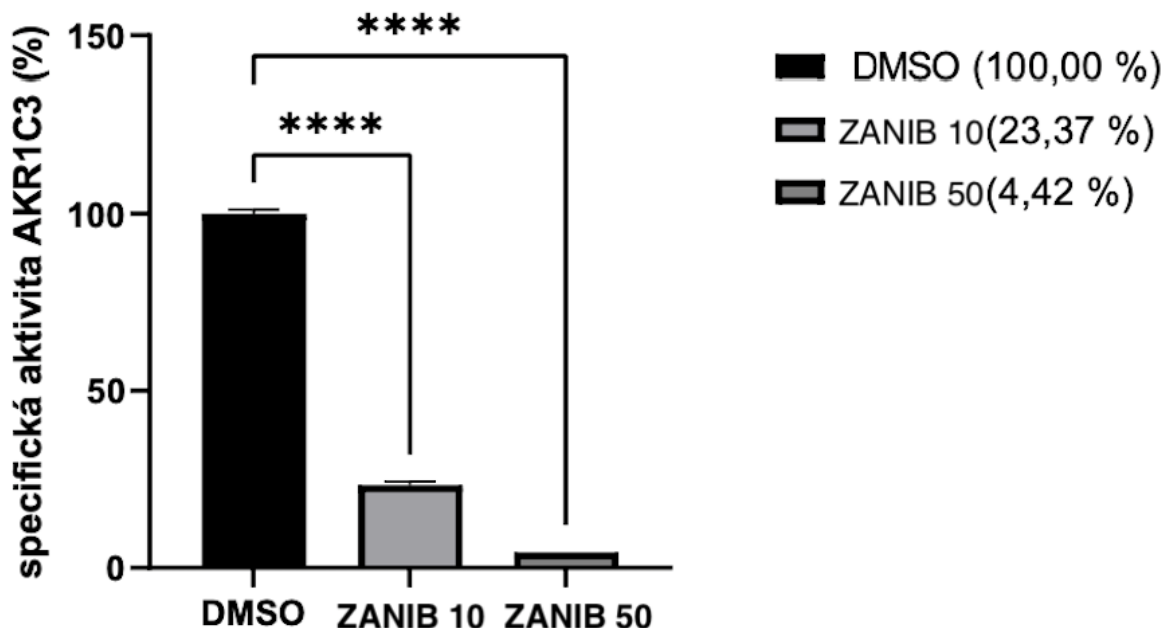
Obr. 19 Grafické znázornění přeměny DAUN na DAUN-ol.

5.1. Základní screening inhibiční aktivity ZANIB

Pro tento experiment byl zvolen jako substrát DAUN, který se nechal postupně reagovat s enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1, aby se zjistila hodnota specifické aktivity. Inkubace enzymů proběhla s inhibitorem, který byl nařazen na koncentraci 50 μM a 10 μM . DMSO slouží jako kontrolní reakce, kde se předpokládá nulová aktivita s enzymem. Hodnota specifické aktivity byla zjištěna ze tří různých měření, které proběhlo pro každý enzym v triplicátech. Do tabulky Tab. 2 je zaznamenána průměrná hodnota specifické aktivity v jednotkách, její odchylka a procentuální vyjádření specifické aktivity a enzymové inhibice. Pro přehlednější znázornění slouží graf na Obr. 24, který porovnává inhibiční aktivitu ZANIB (%) na jednotlivé enzymy.

- **Základní screening ZANIB s enzymem AKR1C3**

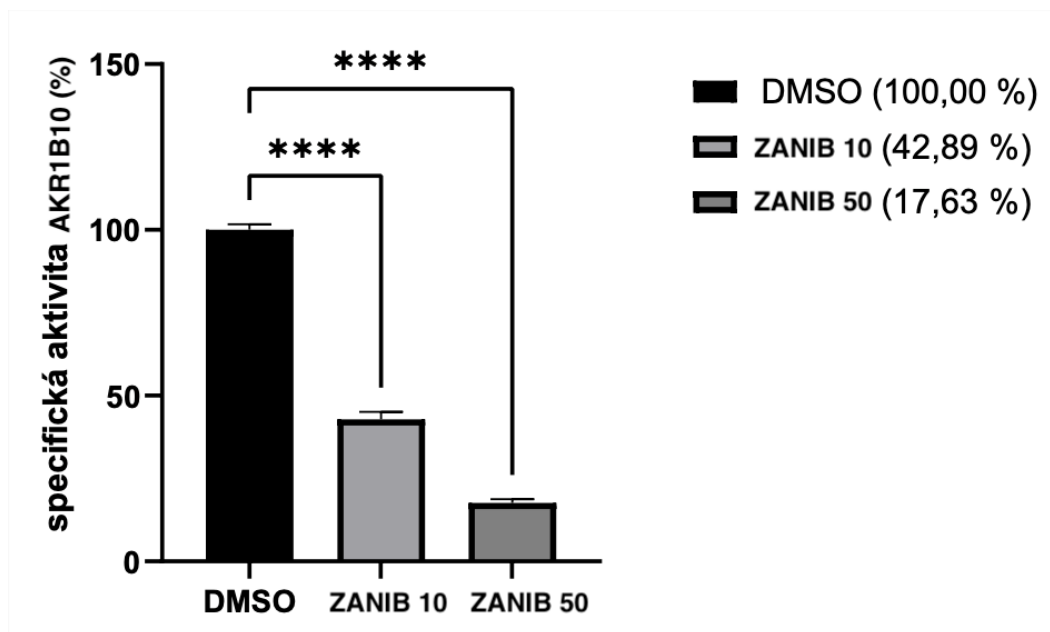
Z testovaných CRE vykazoval ZANIB nejvyšší inhibiční aktivitu vůči enzymu AKR1C3. Při nižší koncentraci 10 μM inhiboval enzym AKR1C3 průměrně 79,1 %, při vyšší koncentraci 50 μM inhiboval enzym AKR1C3 průměrně 88,5 % viz. Tab. 2, Obr. 24. Množství enzymu na reakci odpovídalo 1,5 μg .



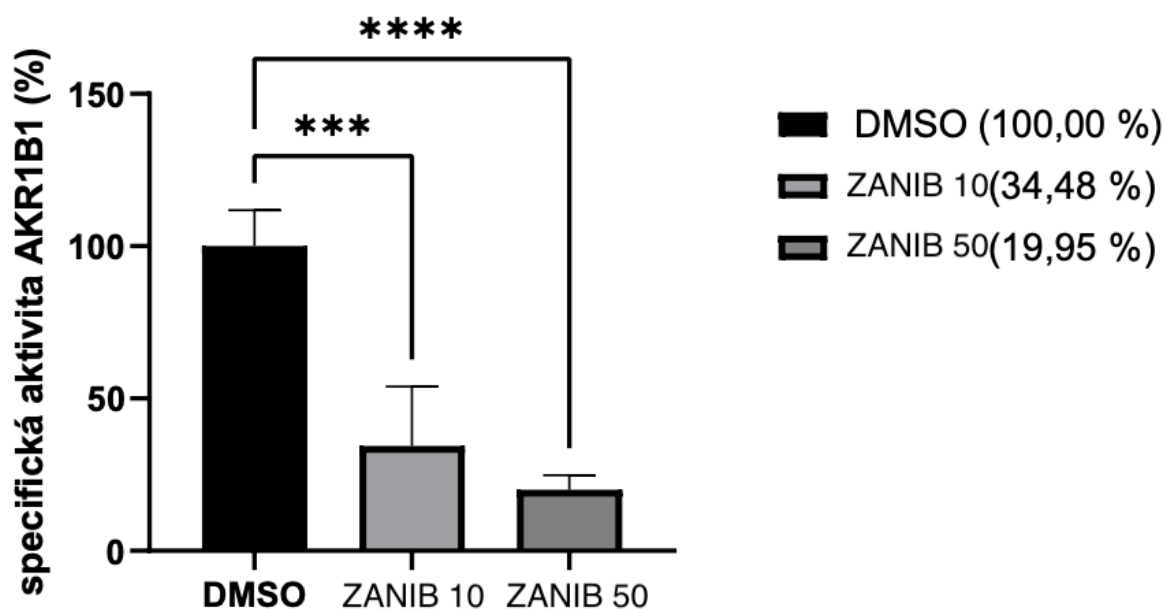
Obr. 20 Specifická aktivita enzymu AKR1C3 v procentech pro jednotlivé reakce. DMSO – kontrola DMSO s nulovou koncentrací ZANIB, ZANIB 10 – reakce se ZANIB o koncentraci 10 μ M, ZANIB 50 – reakce se ZANIB o koncentraci 50 μ M. Graf znázorňuje jedno ze dvou měření, každá sada vzorků byla měřena v triplicátech. Pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů byl použitý test one-way ANOVA. **** $p < 0,0001$.

- **Základní screening ZANIB s enzymem AKR1B10 a AKR1B1**

O něco méně byly inhibovány enzymy AKR1B1 a AKR1B10. Aktivita enzymu AKR1B1 byla snížena průměrně o 53,3 % (ZANIB 10 μ M) a 65,5 % (ZANIB 50 μ M), zatímco u AKR1B10 došlo k průměrné inhibici 41,7 % (ZANIB 10 μ M) a 74,8 % (ZANIB 50 μ M) viz. Tab. 2, Obr. 24. Výsledná koncentrace AKR1B10 bylo 5 μ g na reakci. Enzym AKR1B1 byl použitý také v koncentraci 5 μ g na reakci.



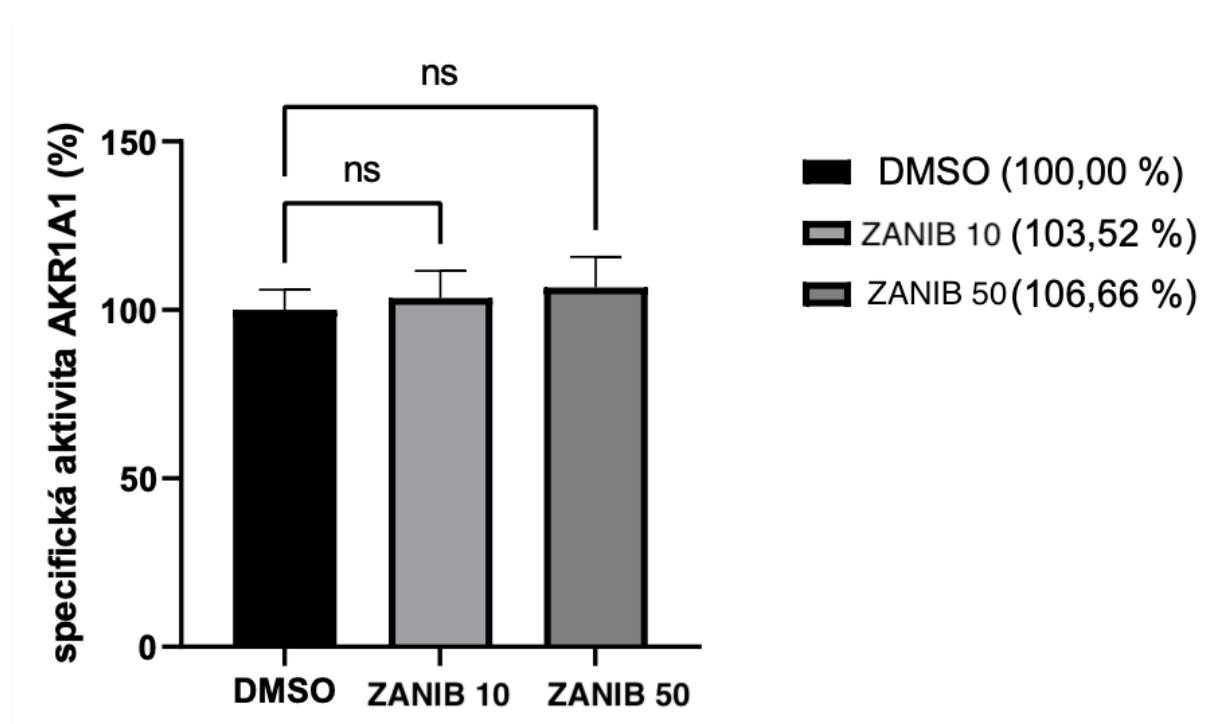
Obr. 21 Specifická aktivita enzymu AKR1B10 v procentech pro jednotlivé reakce. DMSO – kontrola DMSO s nulovou koncentrací ZANIB, ZANIB 10 – reakce se ZANIB o koncentraci 10 μ M, ZANIB 50 – reakce se ZANIB o koncentraci 50 μ M. Graf znázorňuje jedno ze dvou měření, každá sada vzorků byla měřena v triplikátech. Pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů byl použitý test one-way ANOVA. **** $p < 0,0001$.



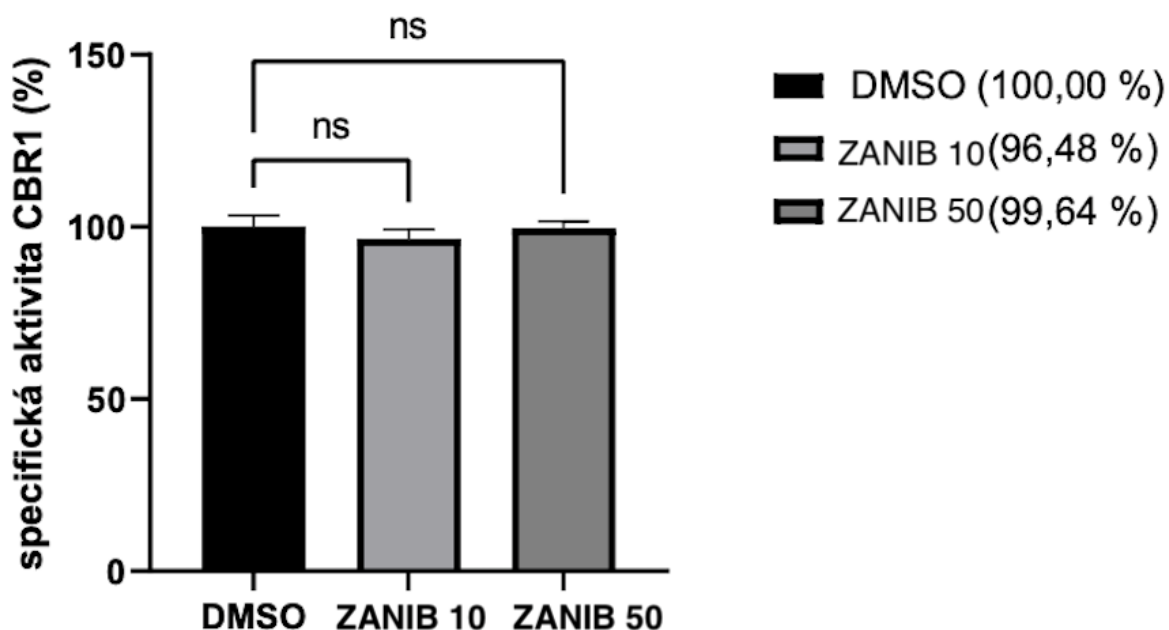
Obr. 22 Specifická aktivita enzymu AKR1B1 v procentech pro jednotlivé reakce. DMSO – kontrola DMSO s nulovou koncentrací ZANIB, ZANIB 10 – reakce se ZANIB o koncentraci 10 μ M, ZANIB 50 – reakce se ZANIB o koncentraci 50 μ M. Graf znázorňuje jedno ze dvou měření, každá sada vzorků byla měřena v triplikátech. Pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů byl použitý test one-way ANOVA. **** $p < 0,0001$, *** $p = 0,0001$.

- **Základní screening ZANIB s enzymem AKR1A1 a CBR1**

Inhibitor ZANIB nevykazuje statisticky významný účinek vůči enzymu AKR1A1 a CBR1. Aktivita enzymu AKR1A1 byla snížena průměrně o 2,8 % (ZANIB 10 μ M) a 5,6 % (ZANIB 50 μ M), zatímco u CBR1 došlo k průměrné inhibici 3,6 % (ZANIB 10 μ M) a 4,7 % (ZANIB 50 μ M) viz. Tab. 2, Obr. 24. Oba enzymy byly měřeny při dvou různých koncentracích. Enzym AKR1A1 byl použit v koncentraci 1 μ g na reakci, následně 3 μ g na reakci. Enzym CBR1 byl použit v koncentraci 1,5 μ g na reakci, potom 1 μ g na reakci.



Obr. 23 Specifická aktivita enzymu AKR1A1 v procentech pro jednotlivé reakce. DMSO – kontrola DMSO s nulovou koncentrací ZANIB, ZANIB 10 – reakce se ZANIB o koncentraci 10 μ M, ZANIB 50 – reakce se ZANIB o koncentraci 50 μ M. Graf znázorňuje jedno ze dvou měření, každá sada vzorků byla měřena v triplicátech. Pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů byl použitý test one-way ANOVA. ns – statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0,5$).



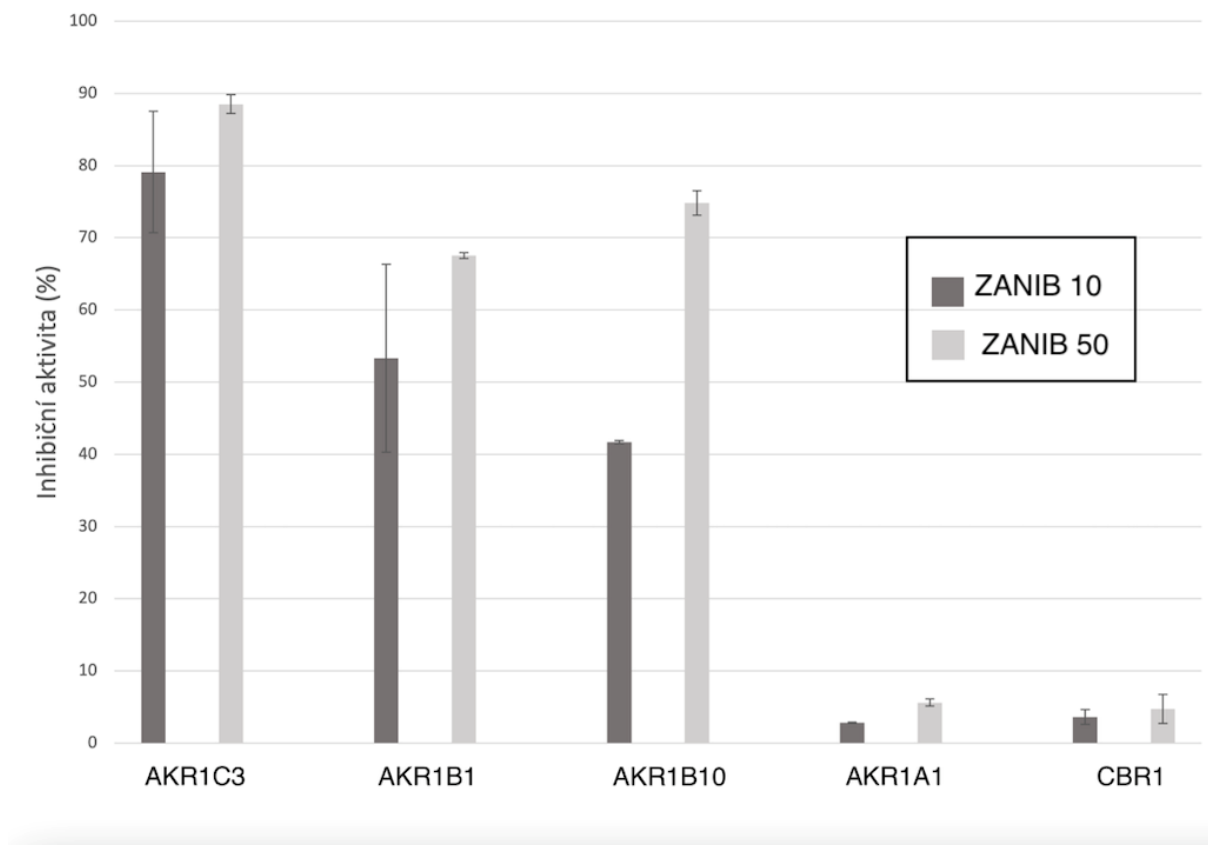
Obr. 24 Specifická aktivita enzymu CBR1 v procentech pro jednotlivé reakce. DMSO – kontrola DMSO s nulovou koncentrací ZANIB, ZANIB 10 – reakce se ZANIB o koncentraci 10 μ M, ZANIB 50 – reakce se ZANIB o koncentraci 50 μ M. Graf znázorňuje jedno ze dvou měření, každá sada vzorků byla měřena v triplicátech. Pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů byl použitý test one-way ANOVA. ns – statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0,5$).

Nezbytným předpokladem pro průběh reakce je katalytická aktivita enzymů vůči substrátu. V praxi probíhalo zjišťování specifické aktivity in vitro pomocí UHPLC analýzy a výsledek byl vyjádřen v nmol na 1 mg enzymu za 1 minutu inkubace (nmol/mg/min). K této práci byly vybrány enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 s vyšší aktivitou k substrátu DAUN. Specifická aktivita enzymů AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 vůči substrátu DAUN už byla potvrzena v mnoha experimentech (KRTILOVÁ 2020; MILAN 2019; SLÁMOVÁ 2021).

Ve studii BAINS et al. (2010) byla porovnávána aktivita CRE vůči substrátu DAUN a DOX. V přítomnosti DAUN klesala aktivita enzymů v pořadí: CBR1, AKR1C3, AKR7A2, AKR1A1, AKR1B10, AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4, CBR3 a CBR4. Nejvyšší aktivitu v přítomnosti DOX vykazoval enzym CBR1 a AKR7A2. Podobných výsledků bylo dosaženo ve studii HOFMAN et al. (2015), kde autoři testovali aktivitu CRE v přítomnosti DOX. Enzymy AKR1C3, CBR1, AKR1A1, AKR1B10 a CBR3 vykazovaly nejvyšší aktivitu. Podle vysoké aktivity CRE v experimentech in vitro můžeme předpokládat, že se vybrané enzymy podílí také na metabolismu ANT in vivo.

Tab. 4 Průměrné hodnoty specifické aktivity daných enzymů a inhibiční aktivity ZANIB.

Koncentrace vzorku (μM)	Specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min)	Specifická aktivita enzymu (%)	Inhibiční aktivita ZANIB (%)
AKR1A1 (DMSO)	81,46 ± 0,49	100,00	
ZANIB 10	79,17 ± 0,08	97,19	2,81
ZANIB 50	76,93 ± 0,38	94,44	5,56
AKR1B1 (DMSO)	2,55 ± 2,20	100,00	
ZANIB 10	1,19 ± 0,33	46,67	53,33
ZANIB 50	0,83 ± 0,01	32,55	67,45
AKR1B10 (DMSO)	18,79 ± 9,65	100,00	
ZANIB 10	10,96 ± 0,03	58,33	41,67
ZANIB 50	4,73 ± 0,31	25,17	74,83
AKR1C3 (DMSO)	25,96 ± 8,00	100,0	
ZANIB 10	5,43 ± 1,73	20,92	79,08
ZANIB 50	2,98 ± 2,18	11,48	88,52
CBR1 (DMSO)	475,25 ± 6,26	100,0	
ZANIB 10	457,99 ± 4,69	96,37	3,63
ZANIB 50	453,02 ± 9,40	95,32	4,68



Obr. 25 Grafické porovnání inhibiční aktivity ZANIB (%) na jednotlivé enzymy; ZANIB 10 – reakce enzymu s inhibitorem o koncentraci 10 μM ; ZANIB 50 – reakce enzymu s inhibitorem o koncentraci 50 μM .

Z grafu na Obr. 24 je patrné, že ZANIB vykazoval významný účinek na enzymy AKR1C3, AKR1B1 a AKR1B10, které průměrně inhiboval o více než 40 %. Platí, že čím silnější koncentrace inhibitoru, tím vyšší inhibiční aktivita na enzym. Pořadí enzymů podle jejich inhibičního potenciálu klesá v pořadí: AKR1C3, AKR1B1, AKR1B10, AKR1A1 a CBR1.

Specifickou aktivitu ZANIB k enzymu AKR1C3 lze porovnat s dalšími inhibitory. Ve studii TAVARES et al. (2020) vykazoval inhibitor poly(ADP ribóza) polymerasy olaparib podobné hodnoty: $76,0 \pm 0,32$ % inhibice při 10 μM koncentraci a $91,4 \pm 0,97$ % inhibice při koncentraci 50 μM na enzym AKR1C3. MILAN (2019) zkoumal účinky inhibitoru proteinkinázyC (midostaurin), inhibitoru mTOR (vistusertib) a inhibitoru poly(ADP ribóza) polymerasy (talazoparib) na enzymy CRE. Nejlepší výsledky prokazoval midostaurin: 87,1 % inhibice při 10 μM koncentraci a inhibice 93,2 % při 50 μM koncentraci na enzym AKR1C3. Ve studii MORELL et al. (2020) vykazovaly BTK inhibitory ACA a IBR taktéž vysokou inhibiční aktivitu (>90 %) na enzym AKR1C3 (při 10 μM i 50 μM koncentraci).

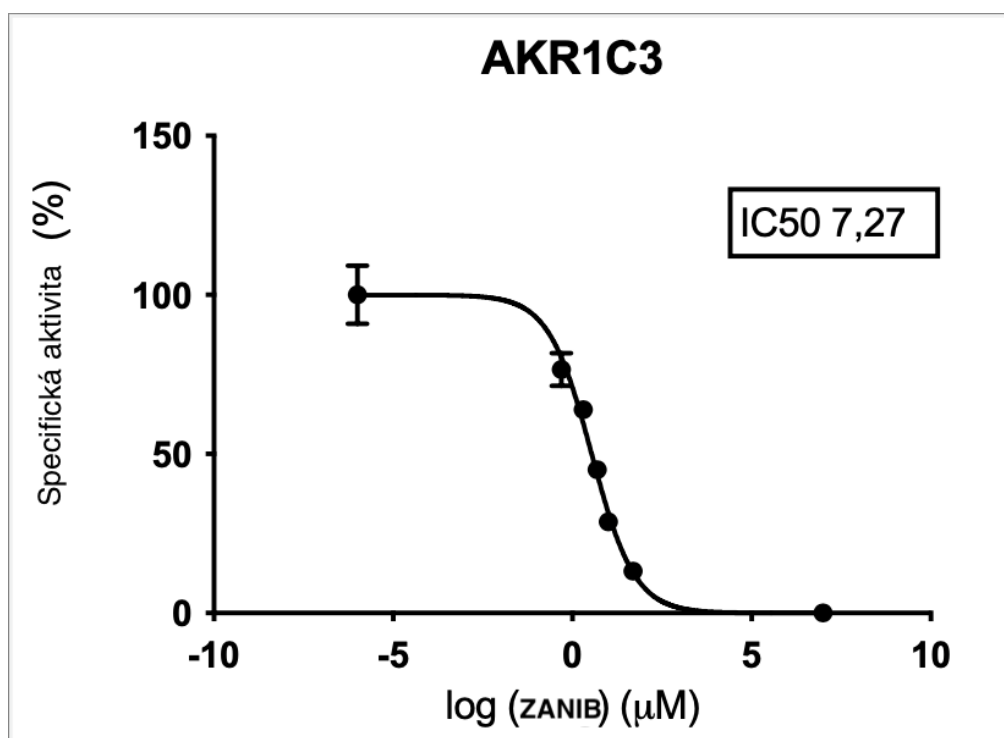
5.2. Stanovení inhibiční koncentrace IC₅₀

Pro stanovení kinetických parametrů byl zvolen pouze jeden enzym ze všech předchozích. ZANIB vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu s enzymem AKR1C3, proto byl zvolen pro stanovení inhibiční koncentrace a poté inhibiční konstanty. Hodnota IC₅₀ byla zjištěna ze tří různých měření, které proběhlo pro enzym AKR1C3 v triplikátech. Při prvním měření byla změřena specifická aktivita enzymu s kontrolou a různými koncentracemi inhibitoru (50; 10; 5; 2 a 0,5 μM ZANIB).

Tab. 5 Výsledky specifické aktivity enzymu AKR1C3 s kontrolou DMSO a inhibitorem ZANIB o koncentraci 50; 10; 5; 2 a 0,5 μM (1. měření).

Koncentrace (μM)/ pořadí vzorku	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
DMSO 1	22,04	24,49 ± 2,26	100,00	
2	23,14			
3	26,74			
4	26,06			
ZANIB 50/1	3,21	3,22 ± 0,08	13,15	86,85
50/2	3,15			
50/3	3,34			
50/4	3,19			
ZANIB 10/1	7,08	7,04 ± 0,39	28,75	71,25
10/2	6,69			
10/3	6,81			
10/4	7,56			
ZANIB 5/1	9,17	10,56 ± 1,01	43,12	56,88
5/2	11,58			
5/3	10,64			
5/4	10,86			
ZANIB 2/1	15,49	15,89 ± 0,49	64,88	35,12
2/2	15,72			
2/3	15,74			
2/4	16,60			
ZANIB 0,5/1	17,68	17,93 ± 1,93	73,21	26,79
0,5/1	20,16			

0,5/1	18,39			
0,5/1	15,48			

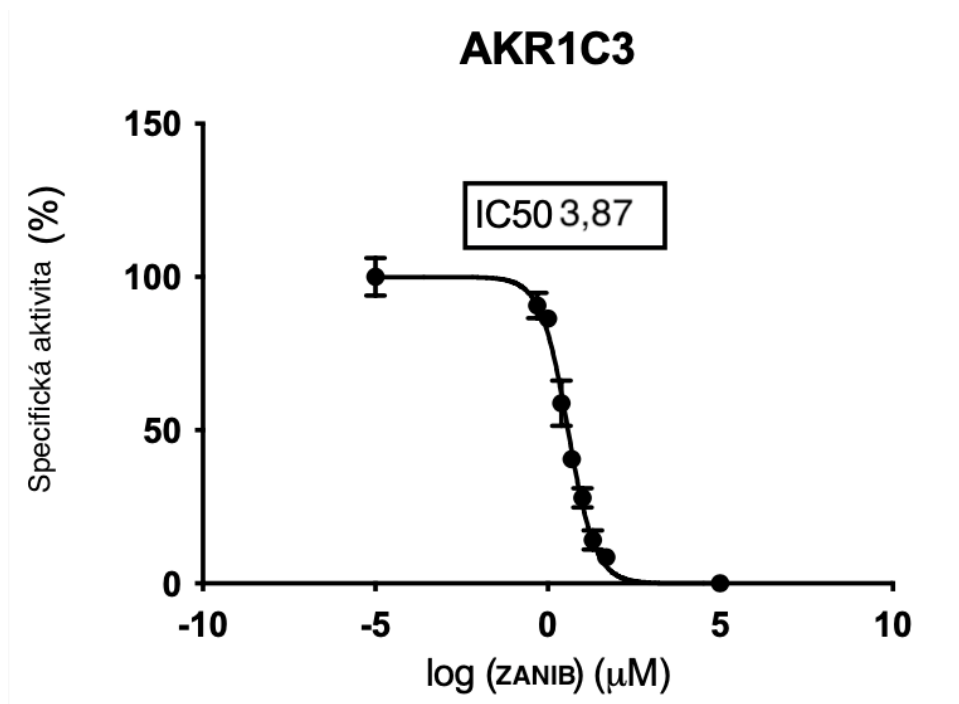


Obr. 26 Graf závislosti specifické aktivity AKR1C3 na log koncentrace ZANIB (1. měření).

Na základě prvního měření se přidaly další koncentrace pro druhé měření (50; 20; 10; 5; 2,5; 1 a 0,5 μM ZANIB), které nebyly na křivce v grafickém znázornění předtím přesně vidět.

Tab. 6 Výsledky specifické aktivity enzymu AKR1C3 s kontrolou DMSO a inhibitorem ZANIB o koncentraci 50; 20; 10; 5; 2,5; 1 a 0,5 μM (2. měření).

Koncentrace (μM) / pořadí vzorku	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
DMSO 1	71,18	67,51 \pm 4,15	100,00	
2	63,00			
3	68,37			
ZANIB 50/1	5,42	5,77 \pm 0,54	8,55	91,45
50/2	6,40			
50/3	5,49			
ZANIB 20/1	10,59	9,55 \pm 2,15	14,15	85,85
20/2	7,07			
20/3	10,98			
ZANIB 10/1	18,00	18,87 \pm 2,14	27,95	72,05
10/2	17,31			
10/3	21,31			
ZANIB 5/1	26,23	27,37 \pm 0,49	64,88	35,12
5/2	28,32			
5/3	27,58			
ZANIB 2,5/1	34,71	39,71 \pm 4,95	73,21	26,79
2,5/2	44,60			
2,5/3	39,83			
ZANIB 15/1	58,25	58,34 \pm 0,57	86,41	13,59
1/2	57,82			
1/3	58,95			
ZANIB 0,5/1	58,05	61,26 \pm 2,80	90,74	9,26
0,5/2	63,15			
0,5/3	62,59			



Obr. 27 Graf závislosti specifické aktivity AKR1C3 na log koncentrace ZANIB (2. měření).

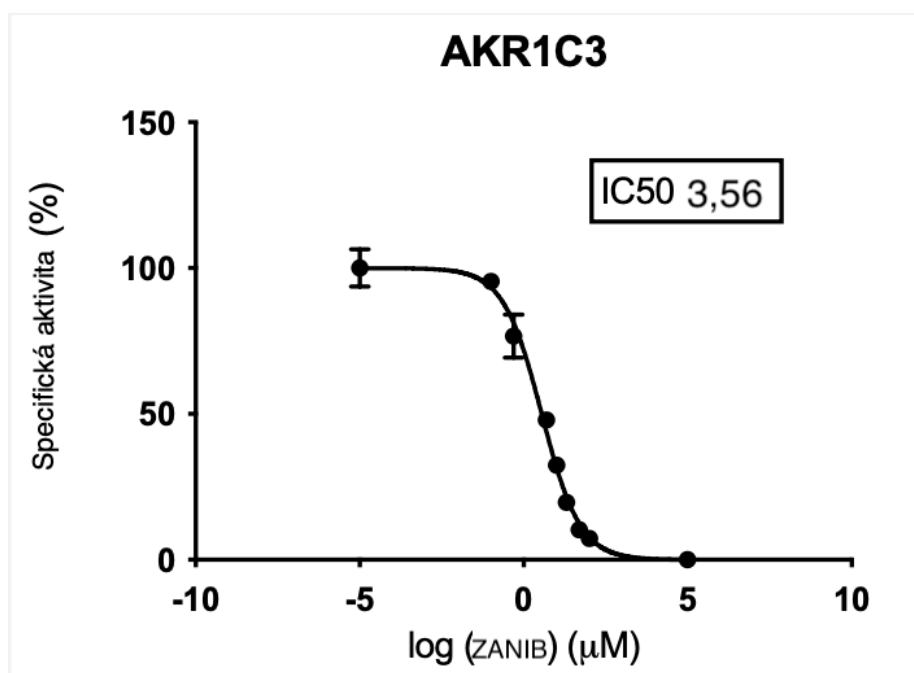
Při třetím měření zůstaly hodnoty stejné jako u druhého měření, akorát byla přidána nejvyšší a nejnižší koncentrace inhibitoru (100; 50; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 a 0,1 μM ZANIB), aby byla křivka kompletní.

Tab. 7 Výsledky specifické aktivity enzymu AKR1C3 s kontrolou DMSO a inhibitorem ZANIB o koncentraci 100; 50; 20; 10; 5; 2 a 0,5 μM (3. měření).

Koncentrace (μM) / pořadí vzorku	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
DMSO 1	46,28	49,47 \pm 3,21	100,00	
2	49,44			
3	52,69			
ZANIB 100/1	3,99	3,59 \pm 0,39	7,26	92,74
100/2	3,22			
100/3	3,55			
ZANIB 50/1	4,88	5,08 \pm 0,18	10,27	89,73
50/2	5,24			
50/3	5,11			
ZANIB 20/1	9,33	9,73 \pm 0,39	19,67	80,33

20/2	10,11			
20/3	9,75			
ZANIB 10/1	16,74	16,02 ± 0,63	32,38	67,62
10/2	15,73			
10/3	15,60			
ZANIB 5/1	23,57	23,70 ± 0,77	47,91	52,09
5/2	24,52			
5/3	23,00			
ZANIB 2,5/1	31,96	35,18 ± 3,31	71,11	28,89
2,5/2	38,57			
2,5/3	35,01			
ZANIB 1/1	26,51	26,84 ± 1,12	54,26	45,74
1/2	28,09			
1/3	25,92			
ZANIB 0,5/1	38,46	37,96 ± 3,69	76,73	23,27
0,5/2	41,37			
0,5/3	34,05			
ZANIB 0,1/1	46,22	47,19 ± 0,86	95,39	4,61
0,1/2	47,84			
0,1/3	47,51			

Do tabulky byla zaznamenána specifická aktivita v jednotkách, její odchylka a procentuální vyjádření specifické aktivity a enzymové inhibice.



Obr. 28 Graf závislosti specifické aktivity AKR1C3 na log koncentrace ZANIB (3. měření).

Pro určení hodnoty IC_{50} se sestrojil graf závislosti specifické aktivity enzymu na logaritmicke koncentraci inhibitoru. Z grafu je patrné, že specifická aktivita enzymu klesá s rostoucí koncentrací inhibitoru. Inflexní bod na křivce je hledaná hodnota IC_{50} .

Tab. 8 Průměrné hodnoty IC_{50} inhibitoru ZANIB.

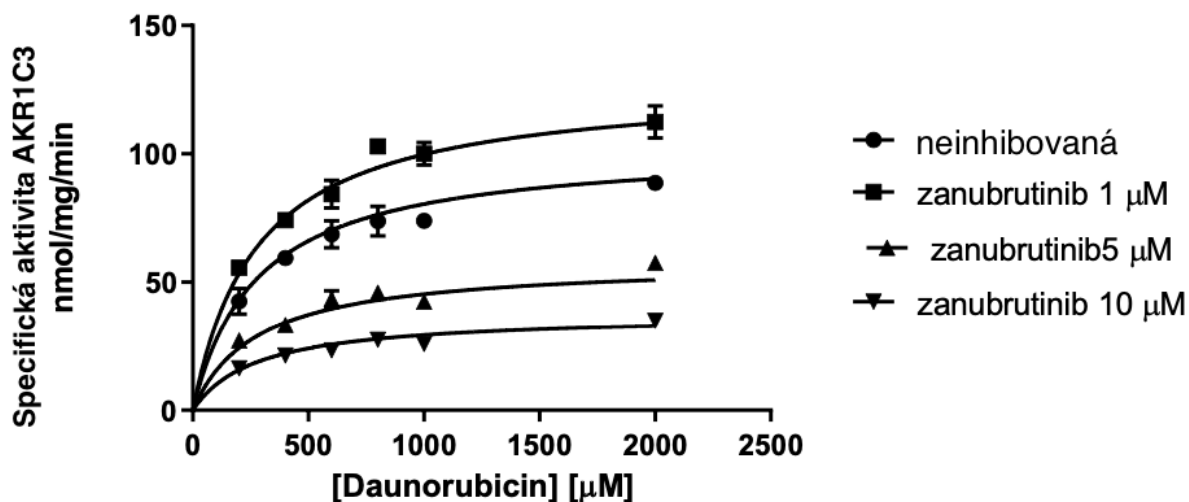
	1.měření	2.měření	3.měření	průměr	Směrodatná odchylka
IC_{50} (µM)	7,27	3,87	3,56	4,90	± 2,06

Výsledná hodnota $IC_{50} = 4,90 \pm 2,06$ pro ZANIB byla stanovena jako průměr ze tří měření. Platí, že čím vyšší je hodnota IC_{50} , tím nižší je vaznost enzymu vůči inhibitoru.

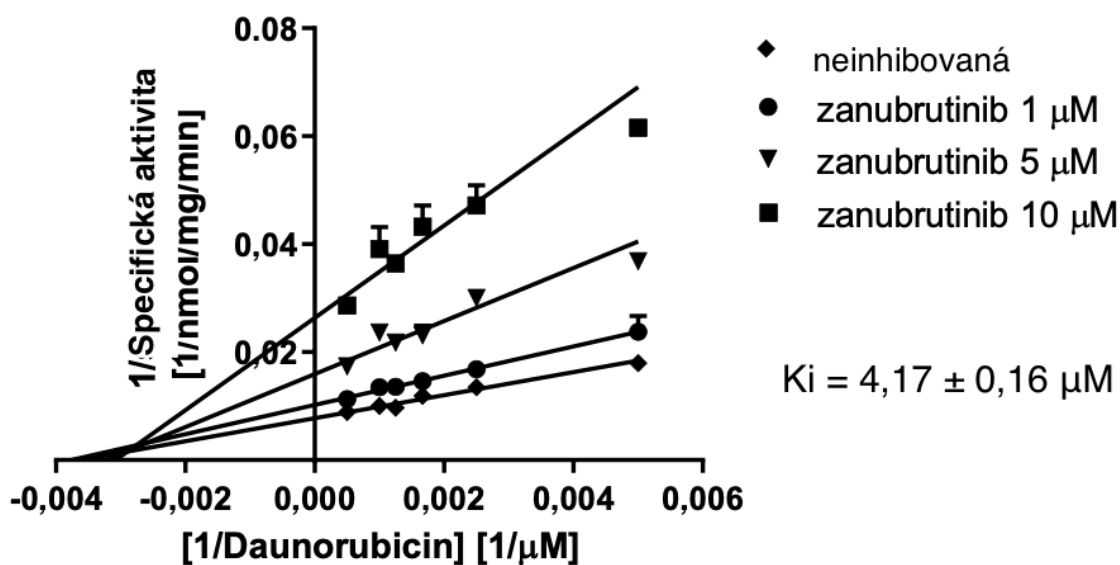
5.3. Stanovení inhibiční konstanty K_i

Při inkubaci enzymu AKR1C3 byl použitý DAUN o koncentraci 2000; 1000; 800; 600; 400 a 200 µM. Postupně byla změřená specifická aktivita s kontrolou DMSO a s inhibitorem (10, 5 a 1 µM ZANIB). Hodnota K_i byla zjištěna ze tří různých měření, které proběhlo pro DAUN v triplicátech. Výsledky byly zpracovány v programu GraphPad. Vynesením dvojité

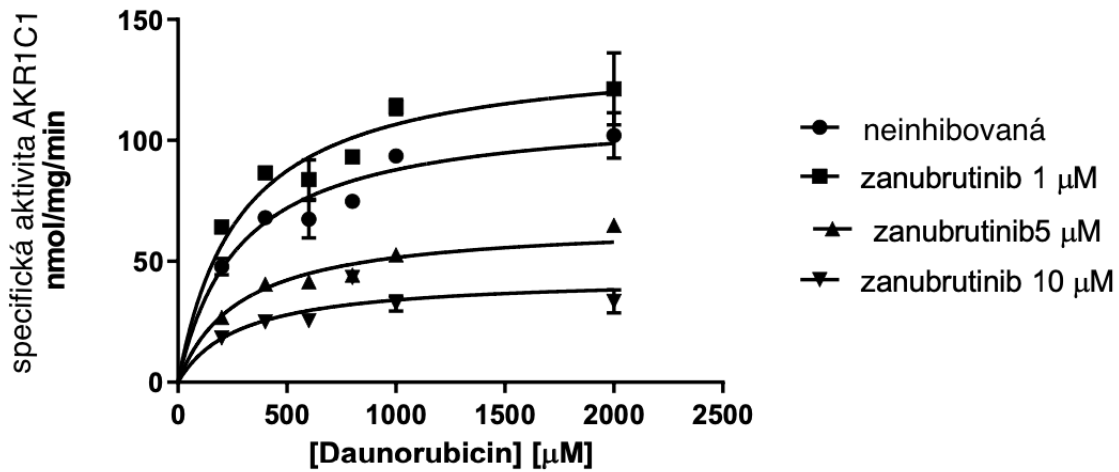
reciprokých hodnot dle rovnice Lineweavera a Burka, získáme grafické znázornění závislosti specifické aktivity enzymu na koncentraci DAUN v přítomnosti inhibitoru nebo bez inhibitoru.



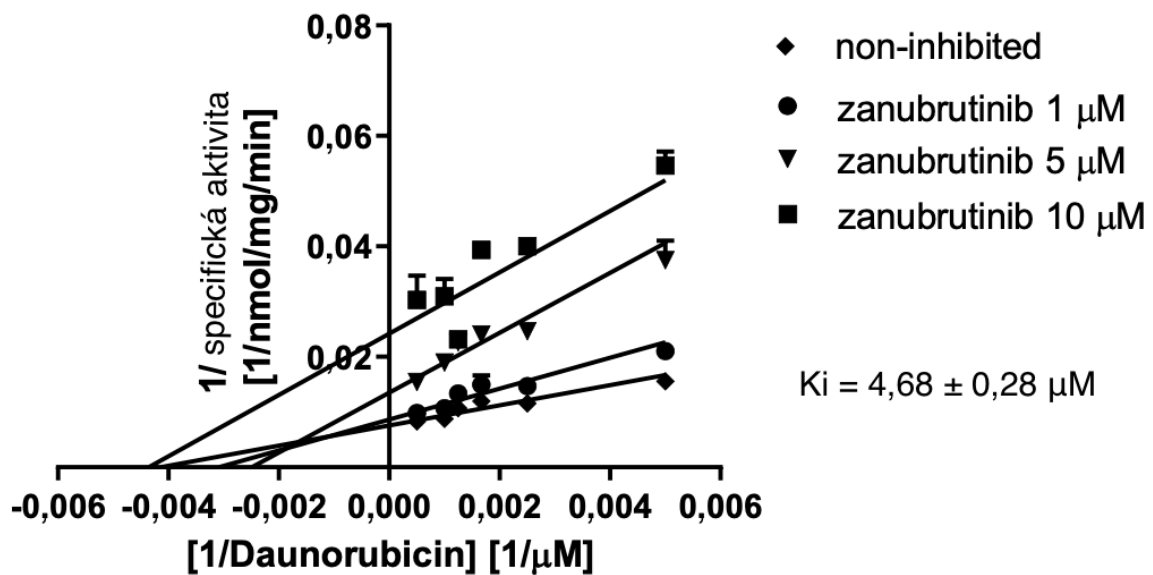
Obr. 29 Graf závislosti specifické aktivity AKR1C3 na koncentraci DAUN (1. měření).



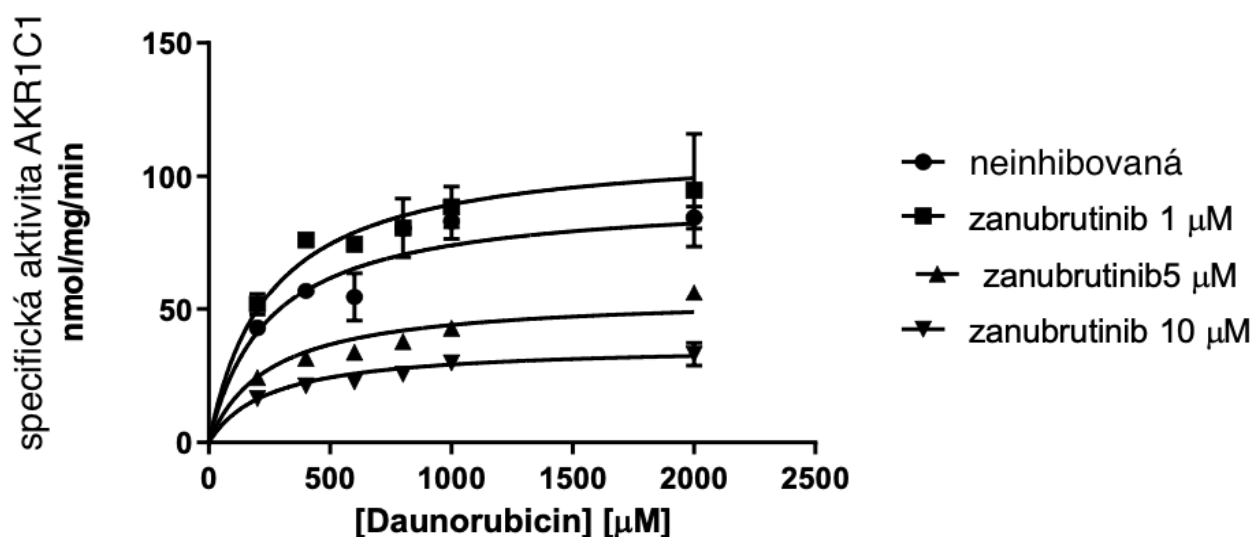
Obr. 30 Dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (1. měření).



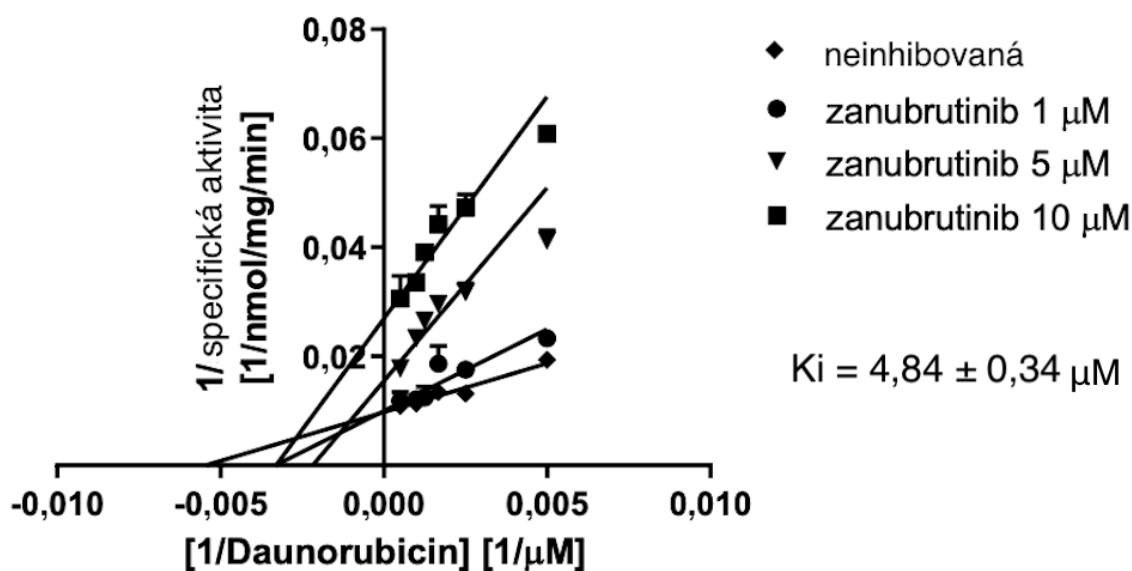
Obr. 31 Graf závislosti specifické aktivity AKR1C3 na koncentraci DAUN (2.měření).



Obr. 32 Dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (2.měření).



Obr. 33 Graf závislosti specifické aktivity AKR1C3 na koncentraci DAUN (3. měření).



Obr. 34 Dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (3.měření).

Přímky se střetávají na ose x v bodě $(-1/K_i)$. Hodnota V_{max} klesá, zatímco K_m se nemění. Pravděpodobně se jedná o nekompetitivní typ inhibice. Pro tento typ inhibice je typická vazba inhibitoru na enzym nebo komplex enzym-substrát nezávisle na substrátu. Inhibitor nesoutěží se substrátem o vazebné místo, proto nekompetitivní inhibice. Ani nadbytek substrátu neovlivní jeho inhibiční potenciál, protože se váže na jiné místo než samotný substrát.

Tab. 9 Průměrné hodnoty K_i inhibitoru ZANIB.

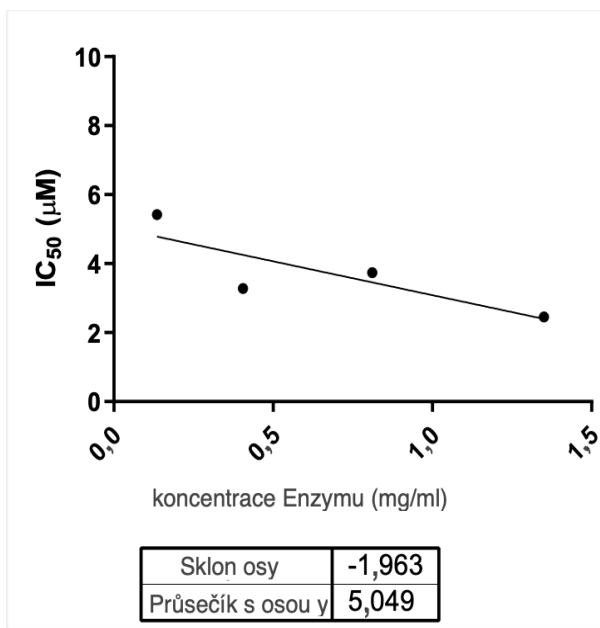
	1.měření	2.měření	3.měření	průměr	Směrodatná odchylka
K_i (μM)	$4,17 \pm 0,16$	$4,68 \pm 0,28$	$4,84 \pm 0,34$	4,56	$\pm 0,35$

Výsledná hodnota K_i byla vypočtena z hodnot V_{\max} a K_m pomocí programu GraphPad. Pro inhibitor ZANIB byla stanovena hodnota $K_i = 4,56 \pm 0,35$ jako průměr ze tří měření. Jde o disociační konstantu komplexu enzym-inhibitor, která popisuje jejich vzájemný vztah. Platí, že čím nižší je hodnota K_i , tím lepší má inhibitor afinitu k enzymu a tím je účinnější. Nízké hodnoty IC_{50} a K_i umožňují podávání nízkých terapeutických dávek, což je výhodné z hlediska bezpečnosti pacienta. Inhibitory BTK by mohly najít uplatnění v kombinační terapii nádorových onemocnění jako je lymfocytární leukémie, WM a lymfomu z plášťových buněk.

I další inhibitory BTK se prokázaly být silnými inhibitory enzymu AKR1C3. Ve studii na buněčných liniích HCT116 byly naměřeny velmi nízké hodnoty $IC_{50} = 0,24 - 0,66 \mu\text{M}$ pro IBR a $IC_{50} = 0,23 - 0,66$ pro ACA (MORELL et al. 2020). Ve studii ZENKEROVÁ (2021) vykazoval evolubrutinib 82,64 % inhibici při $10 \mu\text{M}$ koncentraci na enzym AKR1C3. Pro tento inhibitor byly stanoveny nižší hodnoty $IC_{50} = 1,72 \mu\text{M}$ a $K_i = 1,81 \pm 0,07 \mu\text{M}$, než pro ZANIB.

5.4. Tight binding inhibice

Při posledním měření se ověřilo, zda se skutečně jedná o ireversibilní neboli tight-binding inhibici. Na základě předchozích výsledků byla navržena koncentrace pro inhibitor ZANIB: 100; 50; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; a $0 \mu\text{M}$. Ze čtyř koncentrací enzymu AKR1C3 (0,05 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,3 mg/ml a 0,5 mg/ml) a deseti koncentrací inhibitoru byly získány čtyři hodnoty IC_{50} pro jednotlivé koncentrace enzymu. Výsledky byly zpracovány v programu GraphPad.



Obr. 35 Grafické znázornění závislosti IC_{50} inhibitoru ZANIB na koncentraci enzymu AKR1C3. Měření proběhlo pro DAUN v triplicátech. Graf znázorňuje výsledky ze druhého měření.

Tab. 10 Hodnoty IC_{50} inhibitoru ZANIB pro dané koncentrace enzymu AKR1C3.

Koncentrace AKR1C3 (mg/ml)	0,05	0,15	0,30	0,50
IC_{50} inhibitoru ZANIB	5,42	3,28	3,74	2,45

Když s rostoucí hodnotou IC_{50} roste koncentrace enzymu, jedná se o tight binding inhibici. V uvedeném případě se o tento typ inhibice nejedná, protože křivka grafu neroste. ZANIB je nekompetitivní inhibitor, který nevykazuje tight-binding inhibici. Jeho inhibiční účinky by mohly být využity v léčbě leukemie, protože by prostřednictvím inhibice CRE mohl omezit vznik rezistence na současně podávaná cytostatika. Tuto teorii bude nutno ověřit pomocí experimentu na buněčných liniích, které napodobují fyziologické podmínky.

Podobných výsledků bylo dosaženo ve studii ZENKEROVÁ (2021), která zkoumala účinky evobrutinibu, který patří rovněž do skupiny BTK inhibitorů. Podle naměřených výsledků se jedná stejně jako v případě ZANIB o nekompetitivní inhibitor bez tight-binding inhibice. Naproti tomu studie MORELL et al. (2020) došla k výsledkům, že BTK inhibitory ACA a IBR patří mezi nekompetitivní pevně vázající inhibitory.

6. ZÁVĚR

Nejdříve byl proveden základní screening ZANIB. Na základě *in vitro* inkubace DAUN s enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 jsme prokázali jejich aktivitu v redukční přeměně DAUN na DAUN-ol. Po přidání ZANIB do reakční směsi došlo s různou mírou intenzity k inhibici CRE. Ze všech použitých CRE v této práci vykazoval ZANIB největší inhibiční účinek na enzym AKR1C3. Při koncentraci ZANIB 10 μM došlo k inhibici AKR1C3 o 79,1 %, vyšší koncentrace ZANIB 50 μM inhibovala AKR1C3 dokonce o 88,5 %. Inhibiční aktivita ZANIB u dalších použitých enzymů klesala v pořadí: AKR1C3, AKR1B1, AKR1B10, AKR1A1 a CBR1. Při porovnání naměřených výsledků s údaji z odborné literatury, lze ZANIB považovat za poměrně silný inhibitor AKR1C3.

K výpočtu kinetických parametrů a stanovení typu inhibice byl zvolen enzym AKR1C3, protože vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu v základním screeningu. Popis kinetiky ZANIB je důležitý k pochopení jeho inhibičního působení na CRE. Nejdříve byla stanovena hodnota IC_{50} , při které dojde ke snížení aktivity enzymu o 50 %. Hodnota IC_{50} pro ZANIB byla zjištěna ze tří různých měření: 7,27 μM ; 3,87 μM a 3,56 μM ($\text{IC}_{50} = 4,90 \pm 2,06$). Jako další krok byla stanovena hodnota K_i , která slouží k určení typu inhibice. Hodnota K_i byla opět zjištěna ze tří různých měření: $4,17 \pm 0,16 \mu\text{M}$; $4,68 \pm 0,28 \mu\text{M}$; $4,84 \pm 0,34 \mu\text{M}$ ($K_i = 4,56 \pm 0,35$). ZANIB vykazuje nekompetitivní inhibici k enzymu AKR1C3, což bylo určeno pomocí kinetických hodnot K_m a V_{\max} , a ověřeno grafickým znázorněním po vynesení dvojité reciprokých hodnot podle rovnice Lineweavera a Burka. Aktivita nekompetitivního inhibitoru není potlačena při nadbytku substrátu, což lze s výhodou využít v praxi. Při terapii lze měnit dávku DAUN, bez snížení inhibičního účinku ZANIB. Nakonec bylo stanoveno, jestli se jedná o pevně vázající tzv. tight binding inhibici či nikoliv. Z grafu závislosti IC_{50} na koncentraci enzymu bylo vyhodnoceno, že ZANIB tento typ inhibice nevykazuje.

Diplomová práce se zabývá možností, jak lze pozitivně ovlivnit chemoterapeutickou léčbu při použití cytostatika DAUN. Použitím inhibitoru ZANIB, lze zabránit nežádoucí přeměně DAUN na kardiotoxický a méně účinný DAUN-ol. Tím dojde k delšímu působení léčiva v cílových buňkách a lepší odpovědi na chemoterapeutickou léčbu leukémie. Vzhledem k tomu, že byl zkoumán inhibiční vliv pouze *in vitro*, bude potřeba ověřit účinky ZANIB ještě na úrovni *in vivo* za použití vhodných nádorových linií.

7. SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam (anglický název)
ABC	ATP-vázající přenašeče/transportéry (ATP-binding cassette)
ACA	Acalabrutinib
ANT	Antracykliny
AKR	Aldo-ketoreduktázy (Aldo-keto reductase)
AML	Akutní myeloidní leukémie (Acute myeloid leukemia)
ATP	Adenosin-3-fosfát
BCL-2	Protein B-buněčného lymfomu 2 (B-cell lymphoma 2 protein)
BCR	B-buněčný receptor (B-cell receptor)
BTK	Brutonova tyrosinkináza (Bruton tyrosine kinase)
CARt	Chimérický antigenní receptor T-buněk (Chimeric antigen receptor T-cells)
CBR1	Karbonylreduktáza 1 (Carbonyl reductase 1)
CLL	Chronická lymfocytární leukémie (Chronic lymphocytic leukemia)
CRE	Karbonyl redukující enzymy (Carbonyl reducing enzymes)
CYP	Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerol
DAUN	Daunorubicin
DAUN-ol	Daunorubicinol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Doxorubicin
DOX-ol	Doxorubicinol
EPI	Epirubicin
Glp-6-P	Glukóza-6-fosfát
GSH	Redukovaný glutathion
IBR	Ibrutinib

IP3	Inositol-3-fosfát (Inositol triphosphate)
ITK	Interleukin 2-induktibilní T-buněčná kináza (Interleucin 2-inducible T-cell kinase)
LYN	Lck/Yes novel tyrosinová kináza
mTOR	savčí TOR (mammalian target of rapamycin)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid-fosfát
NDUFS	NADH dehydrogenáza
P-glp	P-glykoprotein (Permeability-glykoprotein)
PIP2	Fosfatidylinositol-2-fosfát (Phosphatidylinositol-2-phosphate)
PIP3	Fosfatidylinositol-3,4,5-fosfát (Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)
SDR	Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (Short chain dehydrogenase/reductase)
SRC	Sarkom (Sarcoma)
SYK	Slezinová tyrosin kináza (Spleen tyrosin kinase)
SH	SRC homologie
TEC	Tyrosin kináza exprimovaná v jaterních buňkách (Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma)
Top2	Topoizomeráza 2
UHPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra high-performance liquid chromatography)
WM	Waldenströmova makroglobulinémie (Waldenström's macroglobulinemia)
ZANIB	Zanubrutinib

8. LITERATURA

AHFS Patient Medication Information. *Www.medlineplus.gov* [online]. Bethesda (MD): American Society of Health-System Pharmacists, 2022 [cit. 2022-03-23]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a620009.html>

AX, Wolfram, Michael SOLDAN, Lutz KOCH a Edmund MASER. Development of Daunorubicin Resistance in Tumour Cells by Induction of Carbonyl Reduction. *Elsevier: Biochemical Pharmacology* [online]. 2000, **59**, 293-300 [cit. 2022-04-03]. ISSN 0006-2952/00/.

BAINS, Onkar S, Thomas A GRIGLIATTI, Ronald E REID a K Wayne RIGGS. Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *J Pharmacol Exp Ther* [online]. 2010 Dec, **355**(3), 533-45 [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.110.173179

BARSKI, Oleg A., Srinivas M. TIPPARAJU a Aruni BHATNAGAR. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metab Rev* [online]. 2008, **40**(4), 553–624 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1080/03602530802431439

BOER, M L Den, R PIETERS a A J VEERMAN. Mechanisms of cellular anthracycline resistance in childhood acute leukemia. *Leukemia* [online]. 1998, **12**(11), 1657-70 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:10.1038/sj.leu.2401175

BORCHMANN, P, K HUBEL, R SCHNELL a A ENGERT. Idarubicin: a brief overview on pharmacology and clinical use. *Int J Clin Pharmacol Ther.* [online]. 1997, **35**(2), 80-83 [cit. 2022-04-06].

BRULLO, Chiara, Carla VILLA, Bruno TASSO, Eleonora RUSSO a Andrea SPALLAROSSA. Btk Inhibitors: A Medicinal Chemistry and Drug Delivery Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* [online]. **2021** [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22147641>

CAO, D, ST FAN a SM CHUNG. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem*[online]. 1998, **273**(19), 11429-11435 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.19.11429

CERVANTES-GOMEZ, F, B LAMOTHE, J A WOYACH, W G WIERDA a M J KEATING. Pharmacological and protein profiling suggest venetoclax (ABT-199) as optimal partner with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* [online]. 2015, **21**(16), 3705-3715 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2809.

CONKLIN, Kenneth A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *INTEGRATIVE CANCER THERAPIES* [online]. 2004, **3**(4), 294-300 [cit. 2022-04-01].

COPELAND, Robert A. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis[online]. Second edition. New York: Wiley-VCH, 2000, 306-307 [cit. 2022-03-23]. ISBN 0-471-35929-7. Dostupné z: <http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/Copelan000.pdf>

DANESI, Romano, Stefano FOGLI, Alessandra GENNARI, Pierfranco CONTE a Mario Del TACCA. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* [online]. 2002, **41**(6), 431-444 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200241060-00004

DANILOV, Alexey V. a Daniel O. PERSKY. Incorporating acalabrutinib, a selective next-generation Bruton tyrosine kinase inhibitor, into clinical practice for the treatment of

haematological malignancies. *British Journal of Haematology* [online]. 2020, **193**(1) [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: doi:0.1111/bjh.17184

DEYASHIKI, Y, K OHSHIMA, M NAKANISHI, K MATSUURA a A HARA. Molecular cloning and characterization of mouse estradiol 17 beta-dehydrogenase (A-specific), a member of the aldoketoreductase family. *J Biol Chem* [online]. 1995, **270**(18), 10461-10467 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.18.10461

DORR, R T. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol.* [online]. 1996, **4**(8), 23-34 [cit. 2022-04-07].

DRUG LABEL INFORMATION: BRUKINSA- zanubrutinib capsule. *Dailymed* [online]. 2022 [cit. 2022-03-23]. Dostupné z: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=3e08fe23-d70e-424c-bc51-1222e320f902#S2.3>

DVORNIK, E, N SIMARD-DUQUESNE, M KRAMI, K SESTANJ, KH GABBAY a JH KINOSHITA. Polyol Accumulation in Galactosemic and Diabetic Rats: Control by an Aldose Reductase Inhibitor. *Science* [online]. 1973, **182**, 1146-1148 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1126/science.182.4117.1146

EDWARDSON, Darek W., Rashmi NARENDRULA, Simon CHEWCHUCK, Kyle MISPEL-BEYER, Jonathan P. J. MAPLETOLF a Amadeo M. PARISENTI. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current drug metabolism* [online]. 2015, **16**(6) [cit. 2022-03-31].

FENG, Yifan, Weiming DUAN, Xiaochuan CU, Chengyuan LIANG a Xin MINHANG. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors in treating cancer: a patent review (2010-2018). *Taylor & Francis* [online]. **2019** [cit. 2022-03-25]. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1080/13543776.2019.1594777

FICKOVÁ, Daniela, Jiří VLČEK a Eva TOPINKOVÁ. Role P-glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích: Lékové interakce. *Remedia* [online]. 2002, **2002**(3) [cit. 2022-03-31].

GALLEGO, O, OV BELYAEVA, S PORTE, FX RUIZ, AV STETSENKO a EV SHABROVA. Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem J*[online]. 2006, **399**(1), 101-109 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20051988

GRIMM, C, E MASER, E MODUS, G KLEBEŠ, K REUTER a R FICNER. The Crystal Structure of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Carbonyl Reductase from *Comamonas testosteroni* Shows a Novel Oligomerization Pattern within the Short Chain Dehydrogenase/Reductase Family*. *J Biol Chem* [online]. 2000, **275**(52), 41335 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M007559200

GUENGERICH, FP, H CAI, M MCMAHON, JD HAYES, TR SUTTER a JD GROOPMAN. Reduction of aflatoxin B1 dialdehyde by rat and human aldo-keto reductases. *Chem. Res. Toxicol.* [online]. 2001, **14**(6), 727-737 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1021/tx010005p

HOFMAN, Jakub, Adam SKARKA, Jana HAVRANKOVA a Vladimír WSOL. Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. *Biochem Pharmacol* [online]. 2015 Aug, **96**(3), 168-78 [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2015.05.005

HOFFMANN, Frank a Edmund MASER. CARBONYL REDUCTASES AND PLURIPOTENT HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASES OF THE SHORTCHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE SUPERFAMILY. *Drug Metabolism Reviews*, [online]. 2007, **39**, 87-144 [cit. 2022-04-06]. ISSN 1097-9883. Dostupné z: doi:10.1080/03602530600969440

HORBÁGYI, GN. *Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview* [online]. 1997, **4**, 1-7 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-199700544-00003.

IRELAND, LS, DJ HARRISON, GE NEAL a JD HAYES. Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo-keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. *Biochem J* [online]. 1998, **332**(1), 21-34 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1042/bj3320021

KIZEK, Rene, Vojtěch ADAM, Jan HRABETA, Tomas ECKSCHLAGER, Svatopluk SMUTNY, Jaroslav V BURDA, Eva FREI a Marie STIBOROVA. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacol Ther.* [online]. Elsevire, **133**(1), 26-39 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2011.07.006

KNIGHT, LP, T PRIMIANO, JD GROOPMAN, TW KENSLER a TR SUTTER. CDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis* [online]. 1999, **20**(7), 1215-1223 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/20.7.1215

KRTILOVÁ, Kamila. Vliv inhibice tepotinibu, entrektinibu a sapanisertibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

LIPSHULTZ, Steven E., Jorge A. ALVAREZ a Rebecca E. SCULLY. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* [online]. 2008, **94**, 525-533 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: doi:10.1136/hrt.2007.136093

LONG, M, K BECKWITH, P DO, B L MUNDY a A GORDON. Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients. *J. Clin. Invest.* [online]. 2017, **127**(8), 3052-3064 [cit. 2022-04-07].

LYON, RC, SM JOHNSTON, DG WATSON, G MCGARVIE a EM ELLIS. Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *J Biol Chem* [online]. 2007, **282**(36), 25986-25992 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M702465200

MILAN, Bc. Jaroslav. Vliv inhibice Midostaurinu, Vistusertibu a Talozaparibu na aktivitu vybraných reduktáz z nadrodiny AKR a SDR. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v HK, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Prof. Ing. Vladimír Wsól, PhD.

MINOTTI, Giorgio, Pierantonio MENNA, Emanuela SALVATORELLI, Gaetano CAIRO a Luca GIANI. *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity* [online]. 2004, **56**(2), 185-229 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: doi:10.1124/pr.56.2.6

MLADOSIEVIČOVÁ, Beata, Ljuba BACHÁROVÁ a Silvia CINGELOVÁ. *Kardioonkologie* [online]. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2014 [cit. 2022-04-02]. ISBN 978-80-247-4838-2.

MORELL, Anselm, Lucie ČERMÁKOVÁ, Eva NOVOTNÁ, Lenka LAŠTOVIČKOVÁ, Melodie HADDAD, Andrew HADDAD, Ramon PORTILLO a Vladimír WSOL. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib Counteract Anthracycline Resistance in Cancer Cells Expressing AKR1C3. *Cancers* [online]. 2020 [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12123731

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem Compound Summary for CID 135565884, Zanubrutinib* [online]. 2022 [cit. 2022-03-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zanubrutinib>

PENNING, TM, ME BURCZYNSKI, JM JEZ, CF HUNG, HK LIN a HC MA. Human 3alpha-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. *Biochemical Journal* [online]. 2000, **351**(1), 67-77 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1042/0264-6021:3510067.

OKURDA, A a K OKURDA. Purification and characterization of delta 4-3-ketosteroid 5 beta-reductase. *J. Biol. Chem* [online]. 1984, **259**(12), 7519-7524 [cit. 2022-04-05].

PAL SINGH, Simar, Floris DAMMEIJER a Rudi W. HENDRIKS. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Molecular Cancer* [online]. 2018, **17**(57) [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/s12943-018-0779-z>

PEKARSKY, Y, V BALATTI a C M CROCE. BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. *Cell Death Differ* [online]. 2018, **25**, 21-26 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: www.nature.com/cdd

PENNING, Trevor M. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact.* [online]. June 2015, **234**, 236-246 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2014.09.024

PERABO, Frank G E a Stefan C MULLER. New agents in intravesical chemotherapy of superficial bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol.* [online]. 2005, **39**(2), 108-116 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: doi:10.1080/00365590510007676.

PERELMAN SCHOOL OF MEDICINE, University of Pennsylvania. AKR superfamily: ($\alpha\beta$)8-barrel motif. *Www.med.upenn.edu* [online]. 2019 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://hosting.med.upenn.edu/akr/barrel-motif/>

PERSSON, Bengt, Yvonne KALLBERG, Udo OPPERMANN a Hans JORNVALL. Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact.* [online]. Elsevier, 2003, **143-144**, 271-278 [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: doi:10.1016/s0009-2797(02)00223-5.

PIEKORZ, RP, B GINGRAS, A HOFFMEYER, JN IHLE a Y WEINSTEIN. Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and activator of transcription 5 and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol*[online]. 2005, **19**(2), 431-440 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1210/me.2004-030

PLEBUCH, Mariann, Michael SOLDAN, Christoph HUNGERER, Lutz KOCH a Edmund MASER. Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. *Cancer Letters* [online]. 2007, **255**, 49-56 [cit. 2022-04-03]. Dostupné z: www.sciencedirect.com

PRUŠA, Tomáš. Regulace enzymů. *Www.is.muni.cz* [online]. Brno, 2014, s. 5-6 [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2014/MNAF101p/um/Aplikovana_farmakologie_-_04_Regulace_enzymu_2014.pdf

PUCHNEROVÁ, Veronika, Zuzana NOVÁKOVÁ a Zdeněk WILHELM. Antracykliny – kardiotoxicita a kardioprotekce – se zaměřením na mechanismus účinku. *Interval Akut Kardiolog* [online]. 2014, **15**(2), 102-105 [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: www.iakardiologie.cz

RAMANA, KV, D CHANDRA, A BHATNAGAR, BB AGGARWAL a SK SRIVASTAVA. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *Journal of*

Biological Chemistry [online]. 2002, **277**(35), 32063-32070 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M202126200

RABBANI, Azra, Ron M. FINN a Juan AUSIO. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *BioEssays* [online]. Wiley Periodicals, **27**, 50-56 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/bies.20160

ROBERT, J a L GIANNI. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surv.* [online]. 1993, **17**, 219-252 [cit. 2022-04-06].

ROTIN, Lianne E., Marcela GRONDA, Rose HURREN, XiaoMing WANG, Mark D. MINDEN, Malik SLASSI a Aaron D. SCHIMMER. *Investigating the synergistic mechanism between ibrutinib and daunorubicin in acute myeloid leukemia cells* [online]. 2016 [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: doi:10.3109/10428194.2016.1138292

RUELLA, M, S S KENDERIAN, P SHESTOVA, J A FRAIETTA a S QAYYUM. The Addition of the BTK Inhibitor Ibrutinib to Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART19) Improves Responses against Mantle Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* [online]. 2016, **22**(11), 2684-2696 [cit. 2022-04-07].

SLACK, Maria a Monica LAWRENCE. Antibody Deficiency with Absent B Cells. *Immune Deficiency Foundation Patient & Family Handbook For Primary Immunodeficiency Diseases* [online]. Sixth edition. USA: Takedo, 2019, s. 11-12 [cit. 2022-03-23]. Dostupné z: www.primaryimmune.org

SLÁMOVÁ, Bc. Adéla. *Vliv inhibice belinostatu na aktivitu vybraných reductáz z nadrodiny AKR a SDR*. Hradec Králové, 2021. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v HK, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

STRELOW, John, Walther DEW a Phillip W IVERSEN. *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly and Company, 2012, s. 118-119 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92001/>

ŠÁLEK, Cyril, František FOLBER a Michael DOUBEK. *Akutní lymfoblastová leukemie: Informace pro pacienty a jejich blízké*. CELL, 2013. ISBN 978-80-260-4642-4.

TAVARES, Tássia S., Jakub HOFMAN, Alžběta LEKEŠOVÁ, Jana ŽELAZKOVÁ a Vladimír WSÓL. Olaparib Synergizes the Anticancer Activity of Daunorubicin via Interaction with AKR1C3. *Cancers*. 2020. doi:10.3390

TAM, Constantine S, Judith TROTAM a Stephen OPAT. Phase 1 study of the selective BTK inhibitor zanubrutinib in B-cell malignancies and safety and efficacy evaluation in CLL. *Blood* [online]. 2019, **134**(11) [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2019001160

TAM, Constantine S., Stephen OPAT a Shirley D'SA. A randomized phase 3 trial of zanubrutinib vs ibrutinib in symptomatic Waldenström macroglobulinemia: the ASPEN study. *Blood* [online]. 2020, **136**(18) [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2020006844: 10.1182/blood.2020006844

TIMOFEEVA, Natalia a Varsa GANDHI. Ibrutinib combinations in CLL therapy: scientific rationale and clinical results. *Blood Cancer Journal* [online]. 2021, (11:79) [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00467-7>

TRACHTENBERG, Barry H., Tracie L. MILLER, Elliot J. PEARSON, Jacqueline M. HENKEL, Vivian I. FRANCO, David C. LANDY, Steven E. LIPSHULTZ a . Anthracycline-Associated Cardiotoxicity in Survivors of Childhood Cancer. *Pediatr Cardiol* [online]. 2011, **32**(3), 342-353 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: doi:10.1007/s00246-010-9878-3

WERMUTH, Bendicht. Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain: Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J Biol Chem*. [online]. 1981, **256**(3), 1206-1213 [cit. 2022-04-06].

WSÓL, Vladimír. Reduktázy xenobiotik. SKÁLOVÁ, Lenka a kolektiv. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017, s. 40-48. ISBN 978-80-246-3733-4.

YAN, RL, XY ZU, J MA, ZW LIU, M AEYANJU a DL CAO. Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention. *International Journal of Cancer* [online]. 2007, **121**(10), 2301-2306 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.22933

ZENKEROVÁ, Mgr. Katharina. *Vliv evobrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou enzymy redukujícími karbonylové skupiny*. Hradec Králové, 2021. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta v HK, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.