

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**ROLE ALDO-KETOREDUKTAS V REZISTENCI  
K ANTRACYKLINOVÝM ANTIBIOTIKŮM**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Eliška Voříšková

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou vyjádřila nesmírné díky mé vedoucí práce Mgr. Lence Laštovičkové, PhD. za její cenné rady a trpělivost při psaní práce, příjemnou spolupráci a čas, který mi věnovala. Také chci poděkovat paní laborantce Bc. Kláře Gruzovské za hladký průběh práce v laboratoři. Velké díky patří také mému manželovi a rodině, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou.

## **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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 14.5.2024

.....

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Eliška Voříšková

Školitel: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Název bakalářské práce: Role aldo-ketoreduktas v rezistenci k antracyklinovým antibiotikům

Nádorová onemocnění patří celosvětově na první příčku příčin úmrtí. Pro léčbu onkologických pacientů se solidními či hematologickými malignitami se využívají antracyklinová antibiotika. Jejich nevýhodou jsou však kardiotoxické účinky a rozvoj multifaktoriální rezistence. Jednou z příčin rozvoje rezistence je zvýšená exprese enzymů z nadrodiny AKR. Enzymy jsou zodpovědné za nežádoucí redukci cytotoxického antibiotika na alkoholový derivát, který nejen že je méně účinný, ale také je více toxický pro srdce. Efektivnější terapie by mohlo být dosaženo kombinací antracyklinů s bezpečným inhibítorem enzymů AKR.

V práci byl v rámci *in vitro* experimentu testován inhibiční účinek inhibitoru tipifarnib. Veškeré experimenty byly provedeny s daunorubicinem jako substrátem pro AKR1B10. Pro měření vzorků byla využita UHPLC analýza.

Při základní screeningu s využitím inhibitoru o koncentracích 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  byla u reakcí prokázána  $58,94 \pm 5,55\%$  a  $81,41 \pm 4,07\%$  inhibice. Následně bylo provedeno stanovení inhibiční koncentrace  $\text{IC}_{50}$ , (8,38  $\mu\text{M}$ ) a inhibiční konstanty  $\text{K}_i$  (9,95  $\mu\text{M}$ ). Dále bylo stanoveno, že TIP vykazuje vůči AKR1B10 pravděpodobně smíšený typ inhibice a zároveň upřednostňuje vazbu na komplex enzym-substrát (hodnota  $\alpha = 0,56$ ).

Na základě získaných výsledků možno přepokládat, že TIP nevykazuje vůči AKR1B10 inhibiční potenciál v takové míře, aby se jednalo o podstatný mechanismus působení TIP v nádorové tkáni.

## Abstract

Charles University  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Eliška Voříšková

Supervisor: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Title of bachelor thesis: The role of aldo-keto reductases in an anthracycline resistance

A cancer is the most frequent cause of death worldwide. Anthracycline antibiotics are used to treat cancer patients with solid or haematological malignancies. However, cardiotoxicity and development of multifactorial resistance are the disadvantage of their usage. The increased expression of enzymes from the AKR superfamily is one of the reasons of the resistance development. These enzymes are responsible for the unwanted reduction of the cytotoxic antibiotic to its alcohol derivative, which is not only less effective but also more toxic for the heart. Combining anthracyclines with a safe AKR inhibitor could result in a more effective therapy.

In this study, the inhibitory effect of the inhibitor tipifarnib was evaluated *in vitro*. All experiments were performed with daunorubicin as a substrate for AKR1B10. UHPLC analysis was used to measure samples.

The inhibitors of 10 and 50  $\mu\text{M}$  in a basic screening showed inhibition of  $58.94 \pm 5.55\%$  and  $81.41 \pm 4.07\%$ , respectively. Subsequently, the inhibitory concentration  $\text{IC}_{50}$  was determined to 8.38  $\mu\text{M}$  and the inhibition constant  $K_i$  to 9.95  $\mu\text{M}$ . Further, it was determined that TIP probably exhibited mixed type of inhibition towards AKR1B10 while preferentially binding to the enzyme-substrate complex ( $\alpha = 0.56$ ).

Based on these results it can be assumed that TIP does not exhibit enough inhibitory potential towards AKR1B10 so that this mechanism of action could be considered essential in tumour tissue.

# Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Nádorová onemocnění.....	9
2.2	Antracyklinová antibiotika.....	11
2.2.1	Mechanismus účinku.....	13
2.2.2	Rezistence.....	15
2.2.3	Kardiotoxicita.....	18
2.3	Aldo-ketoreduktasy.....	20
2.3.1	Funkce vybraných aldo-ketoreduktas.....	23
2.4	Farnesyltransferasa.....	28
2.5	Tipifarnib.....	30
3	CÍL PRÁCE.....	32
4	MATERIÁL A METODIKA.....	33
4.1	Materiál.....	33
4.1.1	Chemikálie.....	33
4.1.2	Pomůcky.....	33
4.1.3	Přístroje.....	34
4.2	Metodika <i>in vitro</i> inkubací.....	35
4.2.1	Základní screening.....	35
4.2.2	Stanovení IC <sub>50</sub> .....	39
4.2.3	Stanovení Ki a typu inhibice.....	40
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	43
5.1	Základní screening.....	43
5.2	Stanovení IC <sub>50</sub> .....	45

5.3	Stanovení $K_i$ a typu inhibice.....	46
6	ZÁVĚR .....	48
7	SEZNAM ZKRATEK.....	49
8	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	51
9	SEZNAM TABULEK.....	52
10	LITERATURA.....	53

# 1 ÚVOD

Dlouhodobým celosvětovým problémem je výskyt nádorových onemocnění. Jedná se o velmi komplexní onemocnění, která jsou nebezpečná nejen kvůli jejich agresivitě a rychlosti růstu, ale i kvůli tomu, že jsou dlouho bezpříznaková. Právě rychlá a správná diagnóza již v časných stádiích je jeden z faktorů, který významně ovlivňuje prognózu pacienta. Ačkoliv incidence se v průběhu let neustále zvyšuje, dobrou zprávou je, že mortalita klesá, především díky novým způsobům léčby i prováděným screeningovým programům pro včasné odhalení. I tak je však třeba neustále zkoumat jejich mechanismy a hledat účinnější, a přitom bezpečnější, způsoby terapie.

Již od minulého století se k terapii solidních i hematologických malignit využívají antracyklinová antibiotika daunorubicin, doxorubicin a jejich deriváty idarubicin a epirubicin. Jejich použití je však omezeno kardiotoxickým působením a schopností buněk odolávat cytotoxickému působení rozvojem rezistence.

Jedním z mechanismů inaktivace parentního léčiva je redukce antracyklinů na alkoholový derivát pomocí enzymů nadrodiny aldo-ketoreduktas, které jsou v nádorových buňkách upregulovány. Za účelem zlepšení terapie dochází k vývoji inhibitorů těchto enzymů, které mají pomoci k překonání zmíněné rezistence.

Bakalářská práce je součástí rozsáhlého výzkumu, jehož cílem je nalezení bezpečných a účinných inhibitorů aldo-ketoreduktas, které by mohly zlepšit terapii onkologických onemocnění při jejich použití v kombinaci s antracyklinovými antibiotiky.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nádorová onemocnění

Maligní (zhoubná) nádorová onemocnění jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí, v ČR se pak řadí na 2. místo hned za kardiovaskulární onemocnění. Jedná se o skupinu mnoha nemocí, které postihují různé části těla. V podstatě dochází k přeměně normální zdravé buňky na nádorovou a následné nekontrolované proliferaci těchto abnormálních buněk. Nejčastějším důvodem úmrtí na rakovinu však mnohdy není výskyt samotného nádoru, ale postupné rozšiřování nádorově změněných buněk po těle i do dalších tkání a orgánů a vznik metastáz (Foretová *et al.* 2022; SZÚ 2023; ÚZIS ČR 2024c).

Za rozvojem maligního nádorového onemocnění nestojí jedna konkrétní příčina, ale mechanismus vzniku nádorů je velmi komplexní a podílí se na něm mnoho faktorů. Především jde o souhru genetické predispozice a vnějších vlivů, kam spadají fyzikální karcinogeny (ultrafialové a ionizující záření), chemické karcinogeny (tabák, alkohol, aflatoxiny, azbest) a biologické karcinogeny (bakterie, viry i parazité). Dalším rizikovým faktorem je věk, kdy s postupným zvyšováním věku se riziko rozvoje nádorového onemocnění také zvyšuje. Naopak snížit riziko lze například omezením kouření, snížením příjmu alkoholu, redukcí váhy u obézních jedinců, zařazením dostatečné fyzické aktivity i očkovaním (např. proti lidskému papilomaviru způsobujícímu rakovinu děložního čípku či viru hepatitidy B a C způsobujícím hepatocelulární karcinom) (Foretová *et al.* 2022; SZÚ 2023; ÚZIS ČR 2024b).

Pokud již ke vzniku nádorových onemocnění dojde, je velmi důležitá včasná diagnóza a zahájení cílené terapie, protože při jejich včasném odhalení lze řadu z nich zcela vyléčit. Jelikož rané stádium rakoviny je mnohdy naprosto bezpříznakové, ale na rozdíl od pozdních fází snadněji léčitelné a s lepší prognózou, existuje několik screeningových programů, které mají zajistit objevení těchto časných stádií (i prekanceróz). V České republice fungují 3 konkrétní programy, které lze využívat, a to každoroční screening na rakovinu děložního čípku u gynekologa od 15 let věku, mamografický screening pro zachycení rakoviny prsu u žen od 45 let každé dva roky a screening karcinomu tlustého střeva u pacientů nad 50 let, kde se nejčastěji provádí test okultního krvácení ze stolice (možno každý rok). Ve chvíli, kdy se nádor odhalí, existují různé možnosti terapie. Mezi první patří chirurgický zákrok,

kterým lze získat vzorek k histologickému vyšetření a určení správné diagnózy nebo lze nádor částečně či úplně odstranit. Další možností je radioterapie neboli ozařování, které je účinné díky tomu, že nádorové buňky jsou vůči záření citlivější než zdravé. Může se použít buď teleradioterapie, kdy dochází k zevnímu ozáření postižené tkáně; nebo brachyterapie, při které je zdroj záření zaveden do těla, nejlépe přímo do samotného nádoru (např. rakovina prostaty či děložního čípku); nebo se intravenózně podávají radionuklidy, které putují cévním řečištěm k nádoru a ničí ho, to se označuje jako systémová radioterapie. Třetím způsobem léčby je chemoterapie, u které se do těla intravenózně vpravuje chemická látka, která toxicky působí na nádorové buňky, a tím může zpomalit růst nádoru, zmenšit ho nebo ho naprosto zlikvidovat. A v posledních letech se začíná také využívat biologická léčba, v rámci které se podávají například speciální protilátky modulující imunitní kaskádu (SZÚ 2023; ÚZIS ČR 2024a; Veselský *et al.* 2004).

Pro výše zmíněnou chemoterapii se používají například antracyklinová antibiotika, a to konkrétně především doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI), daunorubicin (DAUN) a idarubicin (IDA) (Tab. 1) (Capelôa *et al.* 2020).

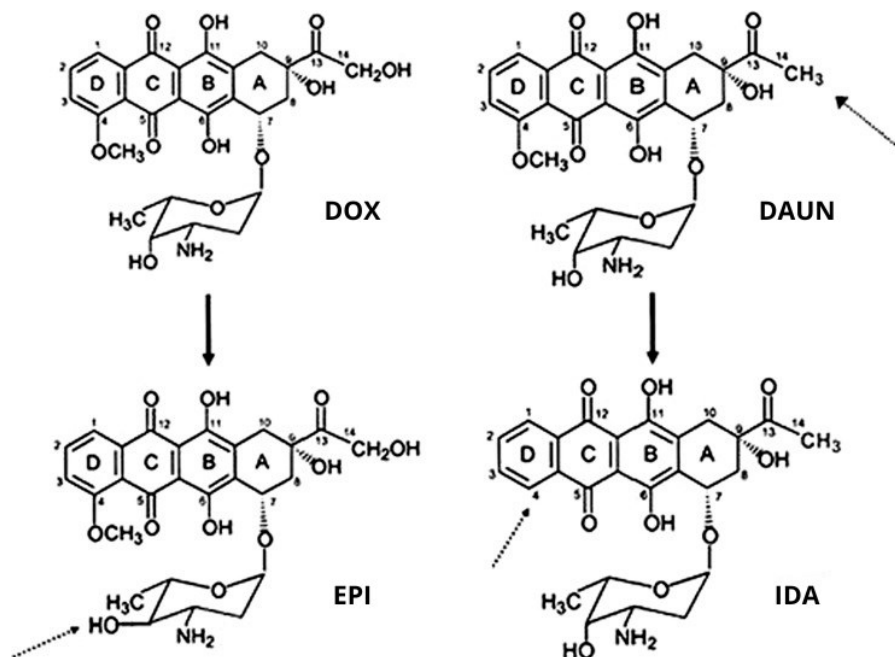
**Tab. 1** Využití antracyklinových antibiotik v terapii nádorů

<b>Antracykliny</b>	<b>Nádorové onemocnění</b>	<b>Zdroje</b>
<b>Doxorubicin</b>	Hodgkinův lymfom, non-Hodgkinovy lymfomy, akutní leukémie, rakovina prsu, plic, vaječnicků, prostaty, žaludku, dělohy, močového měchýře, sarkomy měkkých tkání, Wilmsův tumor	(Takahashi a Naganuma 2009; Rivankar 2014; Cortés-Funes a Coronado 2007)
<b>Epirubicin</b>	Rakovina prsu, plic, žaludku, močového měchýře, vaječnicků, prostaty, endometria sarkomy měkkých tkání, karcinoid	(UpToDate [b.r.]; Cortés-Funes a Coronado 2007; Plosker a Faulds 1993)
<b>Daunorubicin</b>	Akutní myeloidní leukémie (AML), akutní lymfoblastická leukémie (ALL)	(Cortés-Funes a Coronado 2007; Saleem a Kasi 2023; Murphy a Yee 2017)
<b>Idarubicin</b>	AML, ALL, rakovina prsu	(Cortés-Funes a Coronado 2007; Betcher a Burnham 1990; Hollingshead a Faulds 1991)

## 2.2 Antracyklinová antibiotika

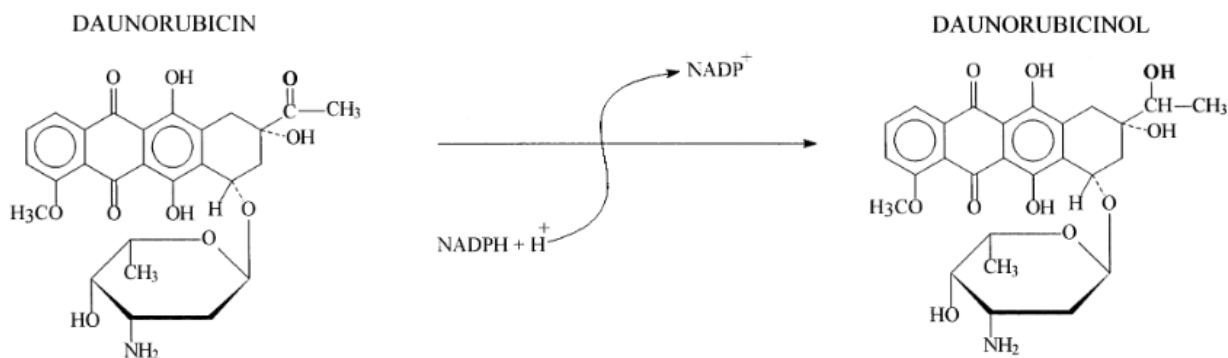
Antracyklinová antibiotika byla objevena díky svému antimikrobiálnímu účinku již v roce 1939, avšak až v průběhu 50.-60. let byly postupně charakterizovány jejich chemické vlastnosti. Stalo se tak poté, co jeden italský tým prokázal jejich protinádorový účinek u myši. Jako první ze skupiny antracyklinů byl izolovaný DAUN, a to z červeného pigmentu produkovaného bakterií *Streptomyces peucetius varcaesitue*. Jeho klinická účinnost byla prokázána u pacientů s akutní leukémií, na druhé straně se ale ukázalo, že má také kardiotoxickou aktivitu. To vedlo k výrobě dalších antracyklinů pomocí genetických a chemických modifikací s nadějí, že by se u nich mohlo snížit riziko toxického působení na srdce. Těchto derivátů bylo syntetizováno více než 2000, avšak pouze pár z nich bylo pro klinické použití schváleno (Capelôa *et al.* 2020; Hortobágyi 1997; Rabbani *et al.* 2005).

V dnešní době jsou antracykliny nejvíce využívanými chemoterapeutikami při léčbě solidních tumorů (rakoviny prsu, plic, žaludku a lymfomy), a taky při léčbě leukémií (hematologických nádorů). Mezi 4 nejpoužívanější látky z rodiny antracyklinů patří deriváty DOX, DAUN, EPI a IDA. Tyto deriváty mají stejnou chemickou strukturu, jejímž základem je tetracyklický kruh s chinon-hydrochinonovými strukturami (aglykon) spojený glykosidickou vazbou s dausaminovanou cukernou částí. Mezi sebou se zmíněné deriváty liší různými substituenty na popsáném základu (Obr. 1), přičemž EPI je stereoizomer DOX s větším distribučním objemem a delším poločasem rozpadu a IDA, derivát DAUN, je oproti DAUN lipofilnější a má tedy vyšší buněčnou absorpci. Lze tedy říci, že i když se tato antibiotika liší pouze drobně ve své chemické struktuře, ovlivňuje to významně jejich poločasy rozpadu, dále také schopnost vázat se na DNA, jejich toxicitu a vazbu na různé druhy nádorů (Capelôa *et al.* 2020; Hortobágyi 1997; McGowan *et al.* 2017).



**Obr. 1** Struktury antracyklinových derivátů DOX, DAUN, EPI a IDA (upraveno McGowan *et al.* 2017)

Jak již bylo na začátku této kapitoly zmíněno, jako první byl syntetizován DAUN. Ten se v dnešní době používá při léčbě AML i ALL, avšak je vysoce kardiotoxický, proto je důležité před jeho nasazením pečlivě zvážit benefity a rizika pro pacienta a v průběhu léčby nasadit kardioprotekci. Při chemoterapii se podává intravenózně a je distribuován nejvíce do sleziny, jater, srdce a plic. Váže se na spoustu buněčných komponent, nejvíce však na nukleové kyseliny, které svým mechanismem účinku ničí. Je metabolizován nejvíce v játrech (méně i v ostatních tkáních) nejčastěji pomocí enzymů aldo-ketoreduktas na daunorubicinol (DAUN-ol) (Obr. 2) s antineoplastickou aktivitou, která je však nižší než aktivita DAUN a současně je kardiotoxický. Zároveň je prokázáno, že neprostupuje přes hematoencefalickou bariéru, proto nehrozí poškození mozku, avšak je schopný procházet placentou a způsobovat poškození plodu a kvůli tomu je těhotenství kontraindikací pro podání DAUN. Zatím nejsou provedené výzkumy, zda se dostává i do mateřského mléka, i tak je však doporučeno ženám v průběhu onkologické léčby nekojit (Murphy a Yee 2017; Penning *et al.* 2021; Saleem a Kasi 2023).



**Obr. 2** Redukce DAUN na DAUN-ol aldo-ketoreduktasami (Ax et al. 2000)

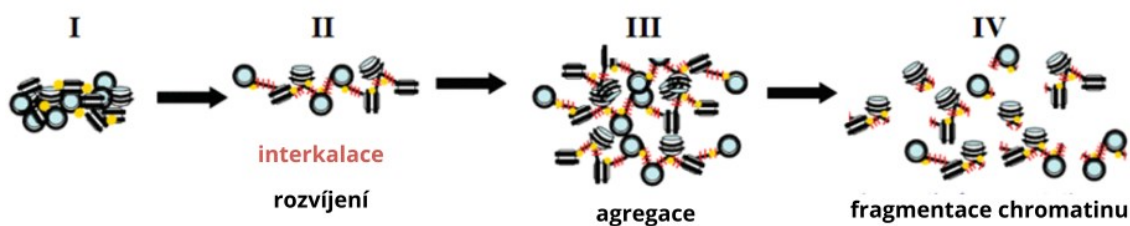
### 2.2.1 Mechanismus účinku

Primárním cílem antracyklinů v organismu je DNA. Léčiva se do buňky i k samotné DNA dostávají prostřednictvím pasivní difúze přes plazmatickou, a následně i jadernou, membránu. Toto však neplatí pro DOX, který se do jádra dostane díky vazbě na proteazom, se kterým vytvoří komplex. Proteazom ho pomocí translokačních signálů, za spotřeby ATP, přenesse přes jadernou membránu. Důsledkem toho, že DOX má v jádře vysokou afinitu k DNA, dojde k rozpojení komplexu DOX-proteazom a léčivo může začít interagovat s DNA. Tímto přenosem se však sníží aktivita proteazomu, což vede ke snížení degradace regulačních proteinů, které řídí buněčný růst a již v tento moment může dojít k odstartování apoptózy dané buňky (Capelôa *et al.* 2020; Rabbani *et al.* 2005).

Hlavním, již popsaným, mechanismem účinku antracyklinových antibiotik je interkalace, při které dochází k vkládání planárních chromoforů mezi jednotlivé báze DNA. Mimo vkládání chromoforů a hydrofobní interakce také dochází ke stabilizaci této reakce díky tvorbě vodíkových vazeb mezi bázemi, a cukerná část DNA tak může interagovat s chromoforem léčiva. Toto vede k deformaci DNA, zastavení aktivity DNA a RNA polymeráz (čímž se přeruší syntéza nové DNA a RNA), a tím se zahájí apoptóza. Vlivem interkalace také může docházet k inhibici topoizomerasy II (TOPO II), což v důsledku taktéž vede k apoptóze (Capelôa *et al.* 2020; Hortobágyi 1997; Rabbani *et al.* 2005).

V rámci výzkumů jsou však cíle antibiotik a jejich mechanismy odvozovány z jejich afinity k volné DNA v roztoku (*in vitro*). *In vivo* se ale DNA nevyskytuje ve volné formě

ale v chromatinu, jehož součástí jsou i další proteiny (např. histony), čímž jsou cíle antibiotik i mechanismy ovlivňovány. Mechanismy účinku založené čistě na interakci antracyklinů s DNA tedy nejsou podle Rabbaniho *et al.* (2005) dostačující. Prokázali, že síla vazby DAUN je závislá na tom, zda je DNA volná či navázaná. Jejich výzkum síly vazby DAUN s nukleozomem (oktamer histonů s ovinutou DNA), bez histonů H1 a H5, ukázal, že je oproti vazbě s volnou DNA snižena. Lze tedy afinitu DAUN k DNA seřadit v tomto pořadí: volná DNA > nukleozom bez histonů H1 a H5 > nukleozom. Zároveň se jim podařilo určit, jak by mohla interakce DNA s nukleozomem vypadat. Podle výzkumu DAUN interkaluje na linkeru DNA mezi jednotlivými nukleozomy, čímž dochází ke zkroucení linkeru, rozšiřování tohoto procesu blíže a blíže k nukleozomům a vzniku nesloženého chromatinu, který následně začne agregovat, což může usnadnit či ještě podpořit fragmentaci DNA specifickými apoptickými endonukleasami (Obr. 3) (Rabbani *et al.* 2005).



**Obr. 3** Ilustrace interakce DAUN s chromatinem (upraveno Rabbani *et al.* 2005)

(I) normálně složený chromatin s histonem H1 (žlutá) (II) interkalace DAUN (červená) na linker DNA způsobuje postupné rozvíjení chromatinu (III) agregace nesloženého rozvinutého chromatinu (IV) agregace rozvolněného chromatinu mnohdy předchází jeho fragmentaci, která je typická pro buňky s probíhající apoptózou.

Jak již bylo zmíněno výše, cytotoxický efekt antracyklinů může být taktéž způsoben inhibicí a blokadí katalytické aktivity TOPO II, která je zodpovědná za rozvíjení dvoušroubovice DNA při replikaci. Vlivem změny konformace DNA při interkalaci dochází k inhibici tohoto enzymu pomocí stabilizace komplexu TOPO II-DNA, který je za normálních okolností reverzibilní, a to způsobí tvorbu dvouřetězcových zlomů, zastavení replikace a v konečném důsledku to vede ke smrti buňky (Capelôa *et al.* 2020; Hortobágyi 1997; Rabbani *et al.* 2005).

Významným mechanismem účinku je také produkce toxických hydroxylových volných radikálů a reaktivních forem kyslíku (ROS), které vznikají 2 způsoby. První z nich je, že probíhají redoxní reakce mezi chinonovou skupinou antracyklinu s cytochromem P450

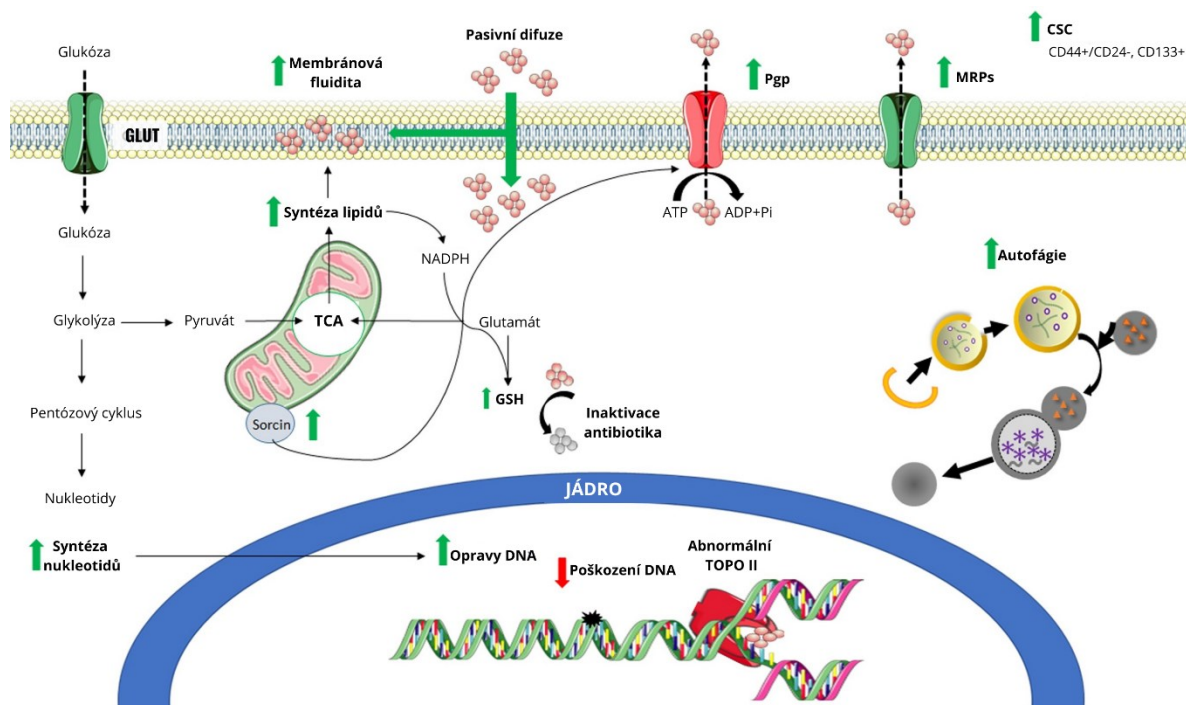
a NADH dehydrogenasou, při kterých se vytváří semichinonový volný radikál, který za přítomnosti kyslíku či železa vede k produkci hydroxylových volných radikálů. Druhá cesta tvorby volných radikálů je, že dochází ke konjugaci hydrochinonu antibiotika s intracelulárním železem, a tímto způsobem probíhá neenzymatická produkce volných radikálů. Pro buňky pak tyto produkty představují velkou hrozbu, protože jsou velmi škodlivé. Přítomnost hydroxylových volných radikálů poškozuje DNA, pro kterou jsou toxické, a vlivem volných radikálů a ROS probíhá peroxidace lipidů, čímž dochází k poškození membrány a zániku buňky (Capelôa *et al.* 2020; Hortobágyi 1997; Rabbani *et al.* 2005).

Poslední, a jednou z nejmladších drah, je antracyklinová cytotoxicita z důvodu nadměrné tvorby ceramidu. Jedná se o důležitý sfingolipid regulující signální dráhy zahrnující buněčný cyklus, diferenciaci a apoptózu, který vzniká tvorbou kovalentní vazby aminoskupiny sfingosinu s mastnými kyselinami pomocí ceramid syntasy a serin palmitoyltransferasy (SPT). Bylo zjištěno, že DAUN i DOX v buňce aktivují ceramid syntasu a SPT, což má za účinek *de novo* syntézu ceramidu. Díky tomu dojde k nahromadění většího množství ceramidu v endoplazmatickém retikulu a spuštění štěpení transmembránového proteinu vázajícího element cAMP (CREB), konkrétně CREB3L1, proteasami. Jeho fragment s NH<sub>2</sub>-koncem je uvolněn do cytosolu a transportován do jádra, kde slouží jako transkripční faktor pro inhibitory cyklin-dependentní kinasy (CDK), čímž se inhibuje funkce CDK regulace buněčného cyklu, což v konečném důsledku zablokuje proliferaci buněk. Tato dráha probíhá u všech buněk léčených DOX, k jejímu zablokování došlo až po podání inhibitorů ceramid syntasy nebo SPT (Capelôa *et al.* 2020; Carnero 2006; Denard *et al.* 2012).

### **2.2.2 Rezistence**

Antracyklinová rezistence je v dnešní době problém, který komplikuje průběh chemoterapie a může stát za selháním léčby či zkrácením doby života pacienta. Ačkoliv již desítky let jsou známé mechanismy, které zmíněnou rezistenci způsobují, stále je zde mnoho nejasností (např. součinnost těchto mechanismů a případná vzájemná kompenzace). Bylo zjištěno, že záleží na typu léčeného tumoru, průběhu a nastavení léčby a další spoustě faktorů. Mechanismus účinku může být na úrovni rezistence buněčné kinetiky (růst nádoru), farmakokinetické rezistence (špatná absorpce léčiva, nadměrný metabolismus, léková difúze

atd.) a buněčné lékové rezistence (snížená intracelulární akumulace díky efluxu, snížené vychytávání léčiva, změna cíle léčiva, aktivace detoxikačních systémů, zvýšená oprava poškození DNA či zablokovaná apoptóza). Vzhledem k tomu, že se na rezistenci podílí vícero mechanismů (Obr. 4), říká se jí také multifaktoriální rezistence (Capelôa *et al.* 2020; Filipits 2004; Nielsen *et al.* 1996).



**Obr. 4** Mechanismy účinků uplatňující se při rezistenci vůči antracyklinovým antibiotikům (upraveno Capelôa *et al.* 2020)

Prvním mechanismem je mnohočetná léková rezistence (=multirezistence). Je to druh rezistence, který není závislý na chemické struktuře látek a při kterém dochází ke snížení akumulace léčiv v buňce díky tzv. ABC transportérům (ATP-binding cassette). Jedná se o transmembránové proteiny, které za spotřeby ATP přemísťují substráty přes buněčné membrány. První variantou je, že u nádorových buněk dochází k expresi genu multilékové rezistence (MDR1/Pgp), který slouží jako efluxní pumpa pro protinádorová léčiva a hydrofobní sloučeniny. Jeho fyziologická funkce zatím není zcela jasná, ale pravděpodobně souvisí s detoxikací buňky, transportem hormonů a vylučováním xenobiotik. Běžně se vyskytuje na epiteliálních buňkách (gastrointestinální trakt, játra, ledviny) a v kapilárách (mozek, varlata, vaječníky, nadledviny), jejichž nádory (pravděpodobně) díky tomu jsou



přirozeně rezistentní. Avšak bylo zjištěno, že u nádorů solidních (prsy, malobuněčný karcinom plic) a hematologických (AML, ALL, chronická myeloidní leukémie (CML), chronická lymfocytární leukémie), tedy v místech, kde se běžně nenachází, se jeho exprese po chemoterapii zvyšuje a je spojená s kratším přežitím pacienta a se selháním léčby. Také bylo *in vitro* experimentálně prokázáno, že sorcin (onkoprotein vázající  $\text{Ca}^{2+}$ ) má přímou spojitost se zvýšenou expresí MDR1/Pgp skrze aktivaci CREB dráhy. Ovšem ne u všech nádorových buněčných linií byl prokázán Pgp, ale jiné proteiny z ABC transportérů, a to MRP 1-9 (multidrug resistance protein 1-9), které mají také schopnost vytlačovat chemoterapeutika a metabolity, avšak jejich přímý vliv na rezistenci zatím nebyl prokázán (Capelôa *et al.* 2020; Filipits 2004; Nielsen *et al.* 1996; Yamagishi *et al.* 2014).

Dalším mechanismem rezistence je schopnost buňky opravovat poškozenou DNA. Jelikož hlavním cílem antracyklinů je DNA, do které se vmezeřují a způsobují dvouřetězcové zlomy, mohou některé buňky s vysoce účinným mechanismem opravy DNA překonávat toto cytotoxické působení antracyklinů a stát se tak vůči nim rezistentní (Capelôa *et al.* 2020; Nielsen *et al.* 1996).

Rezistence může být způsobena také změnami TOPO II, a to jak kvantitativními (snížená hladina, zvýšená degradace), tak kvalitativními (mutace, posttranslační modifikace). U toho nedochází ke změnám akumulace léčiva, ale k rozdílné interakci DNA-antibiotikum-TOPO II. Často je u nádorových buněk zachycena snížená aktivita TOPO II spojená s jejími mutacemi, čímž dochází k tomu, že se sníží interakce antracyklinů s DNA, jelikož není schopná se na TOPO II navázat. Druhou často zachytávanou situací je, že je normální hladina TOPO II, avšak vlivem posttranslačních modifikací, jako je fosforylace či ubikvitinace, se ovlivní účinnost antibiotik (Capelôa *et al.* 2020; Nielsen *et al.* 1996).

Prokázán byl také zásadní vliv kmenových buněk rakoviny (CSC), které tvoří menšinu nádoru. Na solidních tumorech jsou specifické exprese povrchových molekul, tzv. CD znaků, konkrétně CD133 a CD44. CSC jsou schopny sebeobnovy, iniciace nádoru, diferenciaci a udržování nádoru a stojí za heterogenitou buňky. Jejich populace jsou rezistentní vůči chemoterapeutikům, a dokonce ještě při chemoterapii paradoxně dochází ke zvyšování počtu subpopulací, které vykazují podobné rysy jako CSC (Capelôa *et al.* 2020).

I metabolické změny buňky mohou hrát roli v rozvoji rezistence. V rezistentních nádorových buňkách dochází k nadměrné glykolýze, která je zdrojem ATP, čímž je buňka schopnější odolávat stresu vyvolanému antibiotiky, zvýší se tím její proliferace a taky exprese ABC transportérů, které díky tomu mají dostatek substrátu, zvýší se eflux antibiotika. Zároveň z glykolýzy vychází také pentózofosfátový cyklus, který produkuje ribózu, a dochází tak k větší syntéze nukleotidů, čímž se zvýší i opravy DNA. Antracykliny jsou též známé produkcí ROS, které jsou pro buňky toxické a způsobují oxidační stres, ale ty jsou zneškodňovány pomocí redukce glutathionem. Ten se při této reakci sám oxiduje za vzniku glutathion disulfidu. NADPH získané v průběhu pentózofosfátového cyklu poté pomáhá k recyklaci oxidovaného glutathion disulfidu zpět na glutathion, který opět může redukovat ROS a detoxikovat buňku. Mimo jiné produkce ROS také vede k indukci genů aldo-ketoreduktas (AKR), které se podílí na metabolismu antracyklinů (viz kapitola 2.3 Aldo-ketoreduktasy) (Capelôa *et al.* 2020; Penning *et al.* 2021).

Posledními změnami, které napomáhají rozvoji rezistence, jsou zvýšená syntéza lipidů a autofágie. Zmíněná zvýšená syntéza lipidů způsobuje změny ve složení cytoplazmatické membrány, které způsobí větší membránovou fluiditu a tím dojde k zesílené retenci antracyklinů v membráně, takže se část z nich do buňky ani nedostane. A díky autofágii dochází k degradaci poškozených organel a proteinů vlivem antibiotik a poskytnutí živin buňce, díky čemuž se stává opět odolnější vůči stresu, a tím se zvýší její šance na přežití (Capelôa *et al.* 2020).

### **2.2.3 Kardiotoxicita**

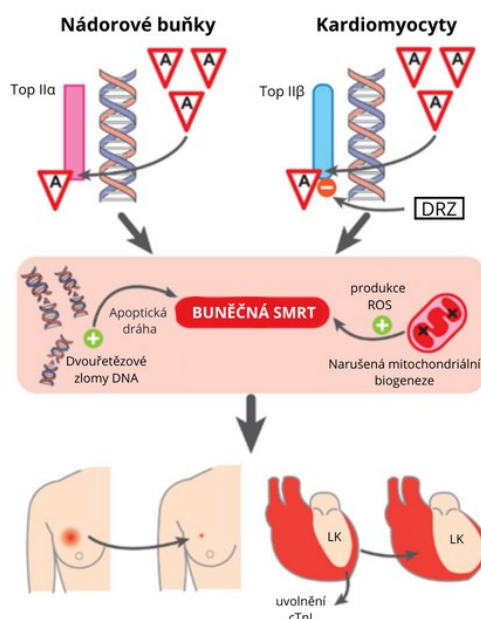
Limitací léčby pomocí antracyklinů je jejich toxický efekt na kardiomyocyty, jehož mechanismus ještě není přesně zcela znám. Právě kvůli jejich toxickému působení je třeba již před terapií zvážit u pacienta rizikové faktory rozvoje kardiomyopatie v průběhu léčby a zaměřit se případně na protekci. Mezi rizikové faktory patří věk (méně než 4 roky nebo více než 65 let), pohlaví (ženy jsou náchylnější), kumulativní dávka, genetické predispozice, komorbidity (obezita, *diabetes mellitus*, hypertenze, ischemická choroba srdeční) a typ podávaného antibiotika. Avšak i u pacientů, které rizikové faktory mívají, může dojít ke kardiotoxicitě, proto je obecně důležité zaměřit se i na obranu kardiomyocytů. V dnešní době jsou již známé způsoby kardioprotekce, kam spadá například podávání

dexrazoxanu, bránícímu tvorbě kyslíkových radikálů, kontinuální podávání infuze nebo podávání antibiotik uzavřených v lipozomálním obalu, který sníží jejich vstup do kardiomyocytů přes jejich těsné spoje. Pokud se již u pacienta kardiotoxicita rozvine, projevuje se nejčastěji dysfunkcí levé srdeční komory způsobující arytmiie, hypotenzi, abnormality na EKG a přinejhorším vede k srdečnímu selhání (Henriksen 2018; Neilan *et al.* 2023; Puchnerová *et al.* 2016; Volkova a Russell 2011).

Podle typu účinku látky na kardiomyocyty můžeme rozdělit toxicitu na kardiotoxicitu I. a II. typu. U I. typu látka způsobuje buněčnou smrt, apoptózu či nekrózu, a tím se její působení stává ireverzibilním. II. typ je charakteristický vyvolanou dysfunkcí srdečních buněk, která ovšem může být v některých případech reverzibilní. Naneštěstí, antracyklinová kardiotoxicita spadá do I. typu a různými mechanismy tedy zapříčiňuje smrt buňky (Volkova a Russell 2011).

Hlavním mechanismem účinků antracyklinů je inhibice TOPO II (viz kapitola 2.2.1 Mechanismus účinku). U rychle se množících buněk, tedy nádorových, je toxicita způsobená vazbou antibiotika na TOPO II $\alpha$ , čímž dojde k zastavení replikace DNA a spuštění buněčné apoptózy. Avšak u klidových neproliferujících buněk, jak tomu je i v případě kardiomyocytů, je přítomná TOPO II $\beta$ , na kterou se cytostatikum také váže, ale buňka je ničena jiným mechanismem. Podle starších teorií dochází k nadměrné tvorbě volných radikálů, ať už redukcí antracyklinu na semichinonový volný radikál až superoxidový volný radikál, nebo vazbou na Fe a probíhající Fentonovou reakcí, vznikají ROS. Jelikož kardiomyocyty mají na rozdíl od jiných buněk méně enzymů, které je chrání před oxidačním stresem, a zároveň jsou závislé na oxidačním metabolismu (mají mnoho mitochondrií), dochází u nich vlivem vzniklých ROS k apoptóze. Novější teorie se zaměřují spíše na samotnou inhibici TOPO II $\beta$ , kdy dojde vlivem inhibice ke stabilizaci komplexu TOPO II-DNA, tvorbě dvouřetězcových zlomů a spuštění apoptózy, která ovšem zasáhne do biogeneze mitochondrií, a tím způsobí mitochondriální dysfunkci a akumulaci ROS. Zvýšená koncentrace ROS je pak pro buňku toxická, přivodí jí poškození DNA, peroxidaci membránových lipidů a vakuolizaci. To v konečném důsledku vede k zániku kardiomyocytu a jeho nahrazení vazivovou tkání (Obr. 5) (Henriksen 2018; Neilan *et al.* 2023; Puchnerová *et al.* 2016; Volkova a Russell 2011).

Důležité je pro pacienta také včasné zjištění, že se kardiotoxicita rozvíjí, což může vést ke změně terapie nebo jejímu ukončení. K tomu nám slouží biomarker cTnI (srdeční troponin), který se uvolňuje do krve při poškození myokardu. Prokázat ho krevními testy a kvantifikovat ho můžeme již pár hodin poté (Henriksen 2018; Neilan *et al.* 2023).



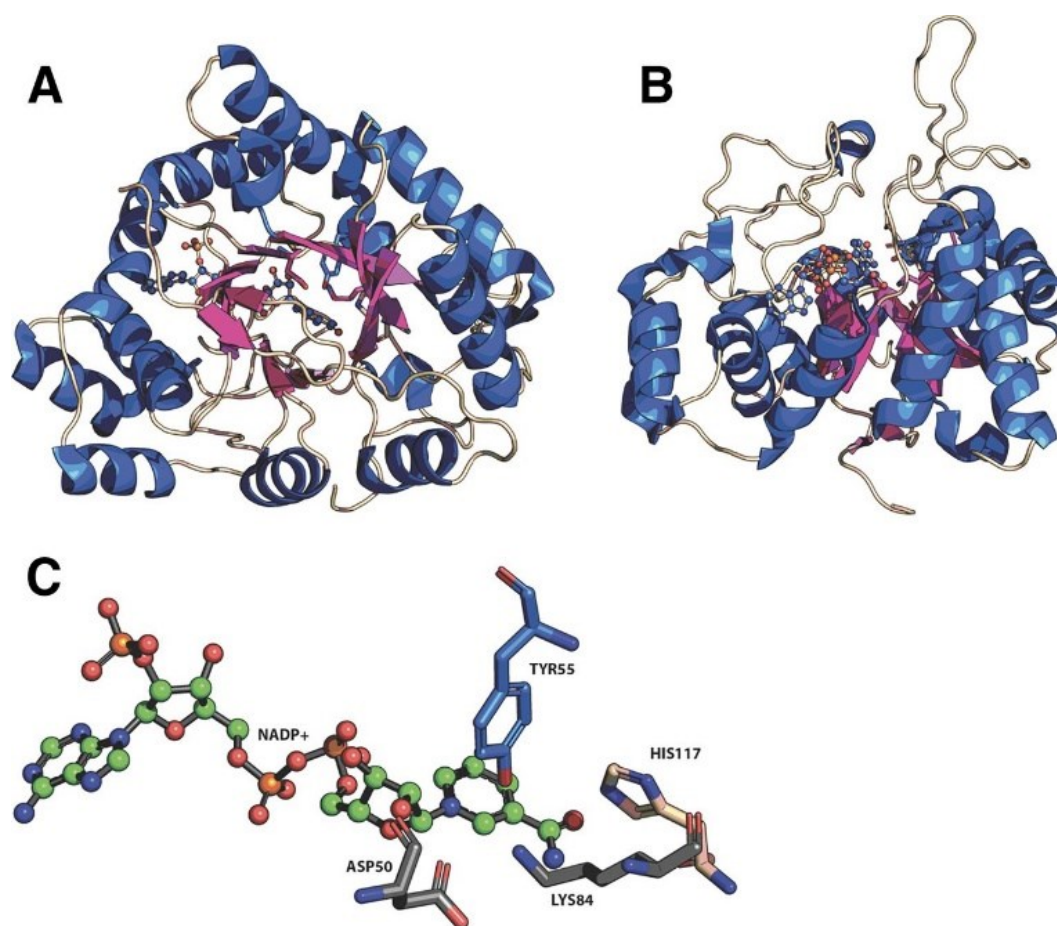
**Obr. 5** Znárodnění působení antracyklinů v rakovinových buňkách a kardiomyocytech a jejich dopad na velikost nádoru a poškození srdce (upraveno Henriksen 2018)

A – antracykliny; DRZ – dexrazoxan; cTnI – srdeční troponin; LK – levá komora ROS – reaktivní kyslíkové radikály.

### 2.3 Aldo-ketoreduktasy

AKR jsou NAD(P)(H)-dependentní oxireduktasy, které tvoří velkou nadrodinu čítající více než 190 proteinů rozdělených do 16 rodin dle jejich sekvencí a funkcí. Ve většině případů se jedná o cytosolické rozpustné monomery s molekulovou hmotností 34 – 37 kDa se schopností redukce karbonylu, výjimkou jsou podrodiny tvořící multimery AKR2, AKR6 (tetramery) a AKR7 (funkční dimery). Jejich primární funkcí je redukce aldehydů na primární alkoholy a ketonů na sekundární alkoholy. Právě díky této enzymatické schopnosti se řadí do 1. fáze metabolismu endogenních látek i xenobiotik s aldehydickými a ketonickými funkčními skupinami, které se následně mohou konjugovat s kyselinou glukuronovou či sulfátem a být tak eliminovány pryč z těla. Jejich nomenklatura se odvíjí od jejich sekvenční podobnosti (a funkcí). Všechny enzymy z této nadrodiny mají ve svém

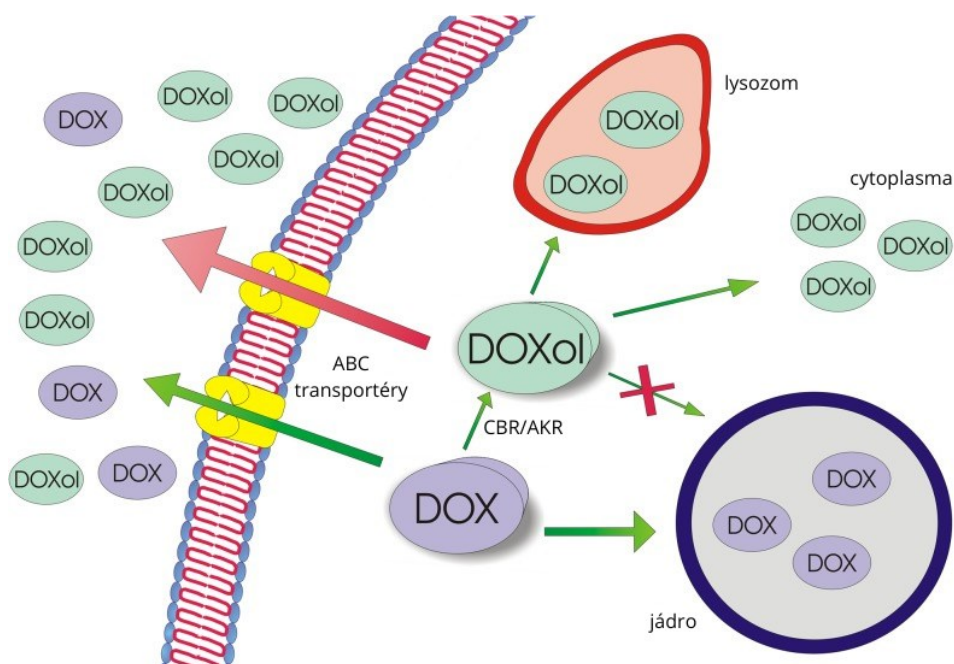
názvu kořen AKR. Za kořenem následuje číslo, které označuje konkrétní rodinu (proteiny, které mají více jak 40 % sekvence stejné). Dále je písmeno představující podrodinu enzymu (přes 60 % sekvenčně identické proteiny) a poslední je opět číslo značící již konkrétní proteinovou sekvenci. Co se týká struktury, všechny AKR mají  $(\alpha/\beta)_8$  barelovou strukturu, ve které se střídají  $\alpha$ -šroubovice a  $\beta$ -listy. V jejich zadní části se nachází 3 velké smyčky, které zajišťují substrátovou specifitu enzymů. Jedná se vlastně o vazebnou kapsu, která v závislosti na povaze substrátu je schopná vázat různé aminokyseliny. A nakonec v jejich centru na C-konci najdeme aktivní místo, které obsahuje katalytickou tetrádu skládající se z tyrosinu, lysinu, histidinu a aspartátu (Obr. 6) (Fujii *et al.* 2021; Penning 2015; Penning *et al.* 2021; Skálová 2018).



**Obr. 6** Umístění  $NADP^+$  a katalytické tetrády v rámci molekuly AKR (Penning *et al.* 2021)

(A)  $\alpha/\beta_8$ -barelová struktura, (B) smyčková struktura v zadní části barelu, (C) katalytická tetráda.  $\alpha$ -šroubovice (modrá),  $\beta$ -listy (fialová).

V dnešní době je známo 15 lidských AKR, z nichž 10 je součástí AKR1 rodiny, kam se řadí aldehydreduktasa (AKR1A1), aldosareduktasy (AKR1B1, 1B10, 1B15), hydroxysteroid dehydrogenasy (AKR1C1-1C4), steroid-5 $\beta$ -reduktasa (AKR1D1) a 1,5-anhydro-D-fruktozo-reduktasa (AKR1E2). Z dalších rodin patří do lidských AKR  $\beta$ -podjednotky draslíkových napětově řízených kanálů (AKR6A3, 6A5, 6A9) a aflatoxin aldehydreduktasa (AKR7A2, 7A3). Bylo zjištěno, že lidské AKR jsou nadměrně exprimovány u spousty lidských nádorů (prostata, prsy, gliom, neuroblastom, plíce, tenké střevo, AML), tudíž je možné je využívat jako nádorové markery. Díky své funkci se podílejí například na biosyntéze androgenů a estrogenů či metabolismu léků, různých karcinogenů a reaktivních aldehydů a pomáhají tak detoxikaci organismu. Právě kvůli jejich metabolické aktivitě hrají roli i v rezistenci na antracyklinová antibiotika, jelikož dochází k přeměně parentního léčiva na alkoholy (např. DOX na doxorubicinol (DOX-ol) nebo DAUN na DAUN-ol), které jsou však pro buňky méně cytotoxické, jsou náchylnější k efluxu a jsou více kardiotoxické. Například u DOX-olu byla prokázána vyšší afinita k ABC transportérům podílejících se na efluxu léčiva, čímž se sníží jeho intracelulární koncentrace (možná souvislost s menší aktivitou), zároveň má nižší vazebnou aktivitu vůči DNA a je zadržován především v cytoplasmě a lyzozomech, na rozdíl od DOX, který se hromadí v jádře (Obr. 7). Navíc jedním z mechanismů působení antracyklinů je tvorba ROS způsobujících buněčný stres a působících cytotoxicky, avšak ROS i buněčný stres vedou k indukci genů AKR, čímž následně může docházet k rychlejšímu metabolismu na alkoholy, opětovnému snížení aktivity a rezistenci. Díky tomu, že známe tento faktor rezistence, existují již některé inhibitory (a další jsou předměty výzkumů), které by mohly léčbu zefektivnit. V tomto případě však je třeba myslet na to, že antracyklinová rezistence je multifaktoriální, a tudíž její léčba cílená pouze na jeden mechanismus se pravděpodobně setká s neúspěchem, jelikož se nádor může přizpůsobit, obejít inhibitorovou léčbu a nahradit ji jiným mechanismem (Jin a Penning 2007; Penning 2015; Penning *et al.* 2021; Piska *et al.* 2017).



**Obr. 7** Snížená aktivita DOX-ol vlivem zvýšeného efluxu ABC transportéry a rozdílné intracelulární distribuce DOX a DOX-ol (Piska *et al.* 2017)

### 2.3.1 Funkce vybraných aldo-ketoreduktas

#### AKR1A1

Jedním z prvních objevených enzymů nadrodiny AKR byl protein AKR1A1 neboli aldehydreduktasa, a to díky své klíčové roli při biosyntéze glukózy u hlodavců. Vyskytuje se hojně v různých tkáních, především v játrech a proximálních tubulech ledvin. Vykazuje aktivitu u široké škály substrátů, avšak upřednostňuje záporně nabitě substráty s karboxylovou skupinou. Vysokou aktivitu má ale i u aromatických, steroidních a tříuhlíkatých aldehydů. Podílí se na detoxikaci karbonylových sloučenin a byla prokázána i jeho role v metabolismu DOX a DAUN. Také je schopný redukovat sloučeniny 3-deoxyglukosonu a methylglyoxalu, které představují reaktivní meziproducty účastnící se glykace látek, čímž brání tvorbě koncových produktů pokročilé glykace, a může tak sloužit jako prevence diabetických komplikací (Barski *et al.* 2008; Fujii *et al.* 2021; Skálová 2018; Takahashi *et al.* 2012).

## **AKR1B1**

Izoforma AKR1B1, zvaná též aldosaireduktasa, je v těle hojně exprimována ve všech tkáních. Jedná se zatím o nejvíce prozkoumanou AKR, a to hlavně díky její úloze při hyperglykémii a diabetických komplikacích (katarakta, retinopatie, nefropatie a neuropatie). Při vysokých koncentracích glukózy dochází vlivem AKR k její konverzi na sorbitol, což je však spojené s hyperglykemickým poškozením tkání. Tento fakt potvrzují i studie, ve kterých bylo prokázáno, že inhibicí AKR1B1 lze toto poškození oddálit či úplně zastavit. Mimo jiné se enzym podílí na fyziologických a metabolických procesech, jako je redukce produktů peroxidace lipidů a prekursorů koncových produktů glykace, syntéza prostaglandinů, účast při regulaci zánětlivé dráhy či redukce xenobiotik (např. akroleinu). Z mnoha studií také vyplývá, že se účastní nádorových onemocnění, avšak jeho role při rakovině stále zůstává nejasná, a proto i nadále zůstává předmětem výzkumů. Prozatím byla prokázána jeho nadměrná exprese u některých druhů invazivních kolorektálních karcinomů, rakoviny prsu, vaječníků, děložního čípku, pankreatu a plic. Na druhou stranu, například u rakoviny endometria (především u pacientek po menopauze) a pacientů s adrenokortikálním karcinomem, byla exprese oproti zdravé tkáni snižena. U hepatocelulárního karcinomu byla také již v minulém století zjištěna zvýšená exprese AKR1B10, avšak výzkum Yamady *et al.* (2016) ukázal opak. Vědci totiž zjistili, že oproti zdravé tkáni zde dochází k downregulaci AKR1B10 kvůli hypermethylaci promotoru DNA (Barski *et al.* 2008; Fujii *et al.* 2021; Khayami *et al.* 2020; Penning 2015; Skálová 2018; Yamada *et al.* 2016).

## **AKR1B10**

Enzym AKR1B10, známý též jako aldosaireduktasa tenkého střeva či ARL-1 (aldose reductase-like-1), je exprimován především v gastrointestinálním traktu, a to v tenkém a tlustém střevě a žaludku, dále také v játrech, brzlíku či nadledvinkách. Vykazuje vysokou katalytickou aktivitu k antibiotikům DAUN a oracinu, antiemetiku dolasteronu, cytotoxickým intracelulárním karbonylům (např. produkty oxidačního stresu či léčiv) a k aldehydům pocházejícím z tabákového kouře (akrolein, krotonaldehyd), které zároveň enzym i indukují. Hraje tedy důležitou roli v redukci vysoce reaktivních a toxických karbonylů na méně nebezpečné, čímž chrání buňky před jejich škodlivým působením. Tato vlastnost se uplatňuje například při ochraně sliznice gastrointestinálního traktu



před karbonylovými sloučeninami produkovanými střevní mikroflórou či pocházejícími z potravy a při rozvoji rezistence na chemoterapeutika, kdy redukuje parentní léčivo na jeho neúčinnou formu a chrání tak rakovinové buňky před jejich cytotoxickými účinky. Chemorezistence však není jedinou spojitostí mezi AKR1B10 a nádorovými onemocněními. Enzym se mimo jiné účastní aktivace prokarcinogenů a četné studie dokázaly, že u tumorů podporuje proliferaci, inhibuje apoptózu a reguluje expresi onkogenů. Tato fakta potvrdily i výzkumy využívající inhibitorů proteinu, což vedlo k útlumu růstu nádorů s menší mírou ložisek a inhibici progresu rakoviny. V praxi se pak AKR1B10 využívá jako diagnostický i prognostický marker mnohých nádorů a střevních onemocnění. To je možné hlavně díky průkazu zvýšené exprese u některých nádorových onemocnění, především u tumorů mimo trávicí trakt, jako karcinomy plic, jater, kolorekta, dělohy, pankreatu a prsu. U nádorů v gastrointestinálním traktu, kde se hojně fyziologicky vyskytuje, byla naopak zjištěna downregulace (Barski *et al.* 2008; Huang *et al.* 2016; Skálová 2018).

#### **AKR1C1-AKR1C4**

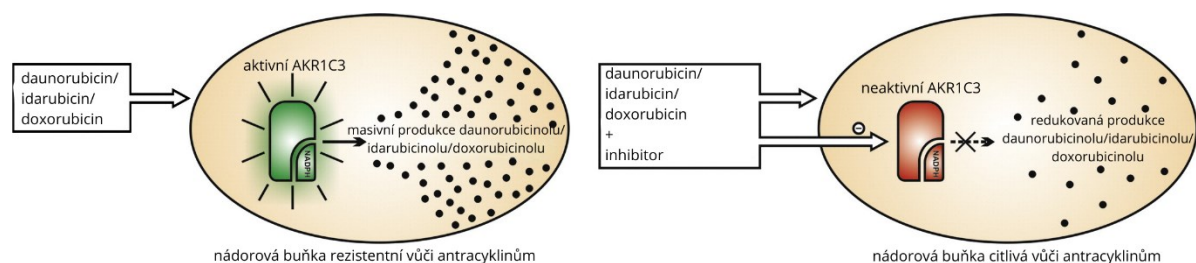
Lidské proteiny podrodiny AKR1C sdílí 84-98 % sekvenční identity, avšak jejich distribuce v tkáních, biochemické vlastnosti i citlivost k inhibitorům jsou značně rozlišné. Všechny enzymy jsou přítomné v játrech, což naznačuje jejich účast na detoxikaci organismu i metabolismu různých látek. Mají schopnost, na rozdíl od podrodin AKR1A a AKR1B, redukovat jak aldehydy, tak i ketony, což předurčuje jejich širokou substrátovou aktivitu. Mohou redukovat různé exogenní sloučeniny, endogenní steroidy a prostaglandiny. Konkrétně se podílí například na metabolismu tabákového nitrosaminu, který přeměňují na méně toxický a snadněji eliminovatelný metabolit (AKR1C1, 1C2 a 1C4) či přeměně a inaktivaci cytostatik DOX a oracinu. Také se účastní metabolismu androgenů a estrogenů, díky čemuž hrají roli při vzniku nádorů závislých na hormonech (karcinomy prostaty a prsu a benigní hyperplazie prostaty). Zároveň byl prokázán i vliv AKR1C1, 1C2 a 1C4 při metabolismu naltrexonu a dolasteronu (Liu *et al.* 2020; Skálová 2018; Zeng *et al.* 2017).

AKR1C1 je mimo játra významně exprimována také u rakoviny prsu, endometria a kolorekta. Její důležitou funkcí je inaktivace progesteronu přeměnou na neaktivní produkt 20 $\alpha$ -hydroxyprogesteron. Udržování hladiny progesteronu ve správné míře je důležité nejen pro správné načasování porodu (nízká hladina by vedla k předčasnému porodu), ale i kvůli

jeho schopnosti tlumit účinky estrogenů při endometrióze a karcinomu endometria (Barski *et al.* 2008; Penning 2015; Zeng *et al.* 2017).

AKR1C2 je mimo játra distribuována fyziologicky také v prostatě a prsní tkáni. Stejně jako AKR1C1 je významně exprimována také u nádorů prsu, endometria a kolorektálního karcinomu. Je zapojená do přeměny  $5\alpha$ -dihydrotestosteronu na  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol a  $5\beta$ -dihydroprogesteronu za vzniku alopregnanolonu (neuroaktivního steroidu), jehož nedostatek je spojován s premenstruačním syndromem. Díky své účasti na metabolických přeměnách se podílí i na rozvoji androgenní nedostatečnosti. Inhibice tohoto enzymu vede k proliferaci nádorů prostaty (Liu *et al.* 2020; Penning 2015; Skálová 2018; Zeng *et al.* 2017).

AKR1C3 se nachází v prostatě, kde reguluje hladiny androgenů, prsou, nadledvinkách a děloze. Účastní se syntézy steroidů v nadledvinách a nádorech, testosteronu a estradiolu. Je známa také jako PGF2 syntasa (prostaglandin-2 syntasa), která zajišťuje přeměnu prostaglandinů. Díky tomu je schopna regulovat buněčnou proliferaci nezávislou na hormonech. Je významně zvýšená u rakoviny prostaty, prsu, kolorekta, endometria, krve, mozku, plic, ledvin a jater. Zároveň zmíněná upregulace většinou souvisí s větší agresivitou nádoru, a tedy i špatnou prognózou a kratší dobou přežití pacientů, což bylo prokázáno např. u rakoviny prsu či hepatocelulárního karcinomu. Významně se také podílí na inaktivaci antracyklinů jejich přeměnou na alkoholy (Obr. 8), a tím i na chemorezistenci, přičemž nejlepším substrátem je DAUN (oproti DOX či IDA) a zároveň je jejich použitím indukována, což vede k prohloubení rezistence. Její inhibice vede ke zlepšení průběhu terapie nádorových onemocnění (Liu *et al.* 2020; Hofman *et al.* 2014; Skálová 2018; Zeng *et al.* 2017; Zhu *et al.* 2021).



**Obr. 8** Inaktivace antracyklinů v nádorové buňce (upraveno Hofman *et al.* 2014)

AKR1C4, na rozdíl od ostatních členů této podrodiny, je distribuována pouze v játrech a je ze všech členů nejúčinnější. Fyziologicky hraje významnou roli při biosyntéze žlučových kyselin a jejich transportu z kanálků do hepatocytů, a také při transformaci prostaglandinů, estronu na estradiol a androstendionu na testosteron. Spojována je také s patologickými procesy, jako je například paranoia či manická/hypomanická podrážděnost u mužů (Barski *et al.* 2008; Liu *et al.* 2020; Skálová 2018; Zeng *et al.* 2017).

### **AKR1D1**

Jedná se o jediný 5 $\beta$ -stereospecifický enzym. Poprvé byl získán z jater potkanů. Lidská AKR1D1 se kromě jater nachází ještě v mozku a močopohlavním ústrojí. Zajímavé je, že její hladina v játrech je rozdílná u mužů a žen, avšak důvod je stále zatím nejasný. Hlavní fyziologickou, klinicky významnou, funkcí enzymu je redukce nepostradatelná při biosyntéze žlučových kyselin, přičemž nedostatečná aktivita enzymu může být příčinou cholestázy, selhání jater a neonatálního selhání jater a neléčení tohoto defektu může být smrtelné. AKR1D1 je též zapojená do metabolismu a degradace hormonů jako testosteron, progesteron, kortizol či kortizon a spolupracuje tak s podrodinou AKR1C na hormon-dependentních procesech. Zároveň by podle studie Zhu *et al.* (2021) mohla být významným biomarkerem pro diagnostiku hepatocelulárního karcinomu, u kterého je její exprese snižená, na rozdíl od AKR1C3, která je upregulována. Společně pak mohou tvořit specifický indikátor nejen pro diagnózu, ale i prognózu. Čím menší exprese AKR1D1 a vyšší zastoupení AKR1C3 oproti zdravé tkáni, tím horší prognóza pro pacienta. Avšak důvod, proč tomu tak je, zatím nebyl zcela objasněn. Vzhledem k specifické aktivitě tohoto enzymu nebylo zatím zjištěno, že by ovlivňoval metabolismus xenobiotik a nepodílí se tak ani na rozvoji chemorezistence (Barski *et al.* 2008; Mindnich *et al.* 2011; Skálová 2018; Zhu *et al.* 2021).

### **AKR7A2 a AKR7A3**

Lidské AKR7 tvoří funkční dimery, mají z 88 % identické sekvence a jejich přesná funkce, metabolismus či úloha při onemocněních stále není objasněna a proto je předmětem dalšího výzkumu (Skálová 2018; Zhao *et al.* 2024).

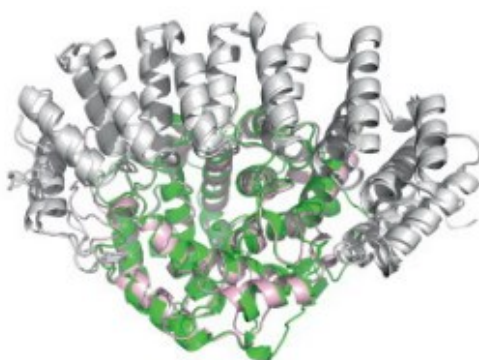
Prvním objeveným v lidském těle byl enzym AKR7A2, který je hojně exprimován v ledvinách, pankreatu, tenkém střevě a kosterních svalech. Částečně se nachází také v játrech, srdci, varlatech a vaječnicích a nízkou hladinu můžeme najít i v mozku, tlustém střevě, prostatě, plicích a thymu. Indukován může být exogenními sloučeninami jako methylglyoxal, kumarin či paracetamol. Jeho hlavní, fyziologickou, úlohou je účast při přeměně kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné na  $\gamma$ -hydroxybutyrát jako sukcinát-semialdehydreduktasa. Má také ochrannou funkci, kdy chrání organismus před karcinogenním aflatoxinem a toxickým akroleinem. Byla prokázána jeho spojitost mezi Alzheimerovou chorobou, u které je nadměrně exprimován v mozku, a deficitem sukcinát-semialdehyddehydrogenasy. Při deficitu sukcinát-semialdehyddehydrogenasy totiž dochází k neurologickým problémům zejména kvůli zvýšeným hladinám  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny a  $\gamma$ -hydroxybutyrátu, proto inhibice AKR7A2 vykazuje potenciál k terapii tohoto onemocnění (Barski *et al.* 2008; Skálová 2018; Zhao *et al.* 2024).

AKR7A3 se vyskytuje v játrech, žaludku, pankreatu, ledvinách, střevech a žlučníku a indukována je chemickou sloučeninou paracetamolem. Její úloha je zřejmě detoxikační, ať už se jedná o metabolismus hormonů, tak i léčiv a karcinogenů. Chrání organismus před toxickými aldehydy i ketony (aflatoxin, akrolein, methylglyoxal, alfatoxin-dialdehyd) tím, že je redukuje na neškodné alkoholy, oxidačním stresem způsobeným paracetamolem a hepatotoxicitou. Reguluje nádorovou apoptózu a tlumí proliferaci a migraci nádorově změněných buněk žaludku. Používá se též pro diagnostiku a prognózu hepatocelulárního karcinomu. Její zvýšená exprese u tumorů, například rakoviny prsu, souvisí s delším přežitím pacientů (Barski *et al.* 2008; Skálová 2018; Zhao *et al.* 2024).

## 2.4 Farnesyltransferasa

Farnesyltransferasa (FTasa) je metaloenzym nacházející se v buněčném cytosolu. Strukturně se jedná o heterodimer skládající se z  $\alpha$ -podjednotky a  $\beta$ -podjednotky. Složený je především z alfa-šroubovic uspořádaných do tvaru půlměsíce, zatímco  $\beta$ -podjednotka má barelovou strukturu (Obr. 9). Na průsečíku těchto dvou podjednotek se nachází aktivní místo enzymu. Jeho hlavní funkcí je prenylace (posttranslační modifikace) proteinů s CAAX motivem (C-cystein, AA-alifatická aminokyselina, X-aminokyselina) na C-konci. Jinak řečeno, zajišťuje přenos izoprenoidních lipidů z farnesyldifosfátu na intracelulární proteiny s CAAX

motivem. Pro plnění své biologické funkce potřebuje FTasa přítomné  $Mg^{2+}$ , a zároveň musí mít ve svém aktivním centru navázaný  $Zn^{2+}$ , který pomáhá navazování již zmíněného CAAX motivu. Právě díky schopnosti prenylace hraje tento enzym klíčovou roli při rozvoji některých nádorových onemocnění. V posledních letech však byla prokázána jeho úloha i u dalších onemocnění, jako je syndrom Hutchinson-Gilfordovy progerie (smrtelná genetická porucha předčasného stárnutí), chronická hepatitida D, kardiovaskulární onemocnění (ateroskleróza, kalcifikace cév) či neurodegenerativní poruchy (Gilardi *et al.* 2020; Klochkov *et al.* 2019; Shen *et al.* 2015; Wang *et al.* 2017).



**Obr. 9** Struktura farnesyltransferasy (upraveno Shen *et al.* 2015)

Šedá –  $\alpha$ -podjednotka; zeleno-růžová –  $\beta$ -podjednotka.

Jedním z nejdůležitějších intracelulárních proteinů s CAAX motivem, uplatňujícím se při rozvoji maligních onemocnění, je Ras protein se třemi izoformami H-Ras, K-Ras a N-Ras. Je to onkoprotein s guanosin trifosfátovou aktivitou, což znamená, že je aktivní, pokud je na něm navázan guanosin trifosfát a neaktivní, když je spojený s guanosin difosfátem. Aby vůbec mohl být aktivován, podléhá po syntéze posttranslačním modifikacím, mezi kterými je i prenylace probíhající na endoplazmatickém retikulu, vedoucím k jeho zabudování do buněčné membrány. Až v tuto chvíli může navázat guanosin trifosfát a plnit svou roli. Účastní se kaskády při přenosu extracelulárních signálů růstových faktorů a cytokinů, čímž se stává důležitým pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. Za fyziologických podmínek přechází z aktivovaného do neaktivovaného stavu (a naopak), avšak jeho mutace mohou vést k neschopnosti deaktivovat se, což souvisí s rozvojem maligních onemocnění. Spousta mechanismů aktivovaného Ras se podílí na proliferaci nádorových buněk (indukce transkripce růstových faktorů, exprese receptorů

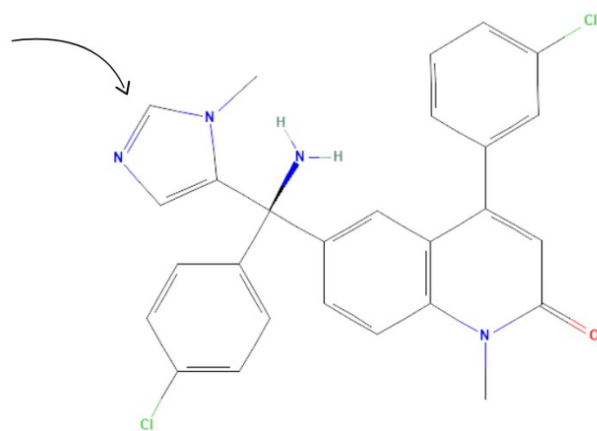
růstových faktorů, spouštění replikace DNA supresí CDK), schopnosti vyhnout se apoptóze (zvýšení počtu inhibitorů apoptózy), nádorové angiogenezi (dostatek živin a kyslíku pro nádorové buňky) a metastazování nádorů (narušení polarizace buněk vedoucí k uvolnění z primárního nádoru). Onkogenní Ras byl objevený například u rakoviny tlustého střeva, plic, slinivky břišní, kolorektálního karcinomu a hematologických malignit, a to především myeloproliferativní onemocnění jako AML nebo myelodysplastický syndrom (MDS) (Klochkov *et al.* 2019; Shen *et al.* 2015; Wang *et al.* 2017).

Slibnými experimentálními léky, které by mohli zvrátit maligní transformaci způsobenou FTasou, jsou inhibitory FTasy (FTIs). FTIs fungují na principu zablokování funkce FTasy, čímž zabrání aktivaci onkogenního Ras a jeho škodlivých efektů pro rozvoj nádorového onemocnění. Pár FTIs se již dostalo i do fáze klinického testování u různých typů nádorů. Patří mezi ně antrochinol (rakovina plic), lonafarnib (metastatická rakovina močového měchýře, CML, MDS), tipifarnib (AML, rakovina plic, prsu, pankreatu), BMS-214662 (AML, MDS, CML, nespecifikované solidní tumory) a L778123 (rakovina hlavy a krku, lymfomy). Velký potenciál mají především u nádorových onemocněních s aktivní izoformou H-Ras, jelikož izoformy K-Ras a N-Ras mohou FTIs obejít a být prenylovány geranylgeranyltransferasou, na rozdíl od H-Ras, který je substrátem pouze pro FTasu. Zároveň byla prokázána účinnost FTIs i u dalších onemocnění, jako již zmíněná kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní poruchy (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, schizofrenie, *myasthenia gravis*, roztroušená skleróza), avšak přesné cíle a mechanismy jsou stále předmětem výzkumů. Několik FTIs bylo také vyvinuto se záměrem terapie parazitických onemocnění, zejména pak malárie způsobené parazitem *Plasmodium falciparum*, který vykazuje FTasovou aktivitu a bylo zjištěno, že FTIs jsou pro něho toxické. Funkčnost u výše uvedených nemocí syndromu Hutchinson-Gilfordovy progerie a chronické hepatitidy D se již prokazuje při klinických studiích, především s inhibitorem lonafarnibem (Klochkov *et al.* 2019; Shen *et al.* 2015; Wang *et al.* 2017).

## 2.5 Tipifarnib

Tipifarnib (TIP) je silný a velmi selektivní inhibitor FTasy, který byl původně syntetizován se záměrem využívat ho jako antimykotikum. Jako první z FTIs se dostal do klinického testování nádorů plic, prsu, pankreatu a AML a jeho účinky se zkoumají také u kolorektálního

karcinomu a dalších nespecifikovaných solidních nádorů. Díky inhibici FTasy má pozitivní účinky u H-Ras mutovaných nádorů, to znamená, že brání jejich proliferaci, nádorové angiogenezi, tvorbě metastáz a sníží inhibici apoptózy. Ve své struktuře obsahuje imidazolový kruh (Obr. 10), díky kterému je schopný připoutat  $Zn^{2+}$ , a vázat tak CAAX motiv intracelulárních proteinů, díky čemuž zabrání vazbě FTasy na protein. V roce 2021 byl schválený k léčbě pacientů s metastazujícím nebo recidivujícím H-Ras mutovaným epitelálním zhoubným nádorem hlavy a krku (Avendaño a Menéndez 2023; DrugBank 2023; EMA 2021; Gilardi *et al.* 2020; Shen *et al.* 2015; Wang *et al.* 2017).



**Obr. 10** Chemická struktura TIP (upraveno DrugBank 2023)

Šipka – imidazolový kruh.

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo určení *in vitro* inhibičního potenciálu inhibitoru TIP vůči enzymu AKR1B10, který redukuje DAUN na DAUN-ol za přítomnosti NADPH.

Experiment zahrnoval tyto kroky:

1. Základní screening inhibice AKR1B10 inhibitorem TIP.
2. Určení inhibiční koncentrace  $IC_{50}$ .
3. Stanovení inhibiční konstanty  $K_i$  a typu inhibice.



## **4 MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Chemikálie**

Acetonitril (HPLC LC-MS grade, VWR, USA)

Daunorubicin (MedChemExpress, USA)

Destilovaná voda (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, ČR)

Dimethylsulfoxid (DMSO; Research grade, Serva, Německo)

Enzym AKR1B10 (1,5 mg/ml; Katedra biochemických věd UK, Hradec Králové, ČR)

Glukosa-6-fosfát (Glc-6-P; Roche, Německo)

Glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa (Glc-6-P-dehydrogenasa; Roche, Německo)

Inhibitor TIP (MedChemExpress, USA)

Kyselina mravenčí (LC-MS grade, VWR, USA)

Methanol (HPLC gradient grade, Honeywell, USA)

MgCl<sub>2</sub> (0,1M; Lachema, ČR)

NADP<sup>+</sup> (Roche, Německo)

Sodno-fosfátový pufr (NaPB; 0,1M, pH 7,4; Katedra biochemických věd UK, Hradec Králové, ČR)

#### **4.1.2 Pomůcky**

Automatické pipety (0,5-1000 µl; Biohit, Finsko)

Eppendorf zkumavky (0,5; 1,5; 2 ml)

Injekční jehla (Terumo, Japonsko)

Injekční stříkačka (1 ml; Terumo, Japonsko)

Inserty do vialek (400 µl; Agilent, USA)

Kádinky

Membránový filtr na injekční stříkačku (0,2 µm PTFE membrána; Cytiva – Danaher, USA)

Nádoba na led

Navazovací lžičky

Pipetovací špičky (Biohit, Finsko)

Popisovací fix

Rukavice

Septa na vialky (LabStore, ČR)

Stojánek na zkumavky

Stopky

Vialky (2 ml; Agilent, USA) a víčka na vialky (LabStore, ČR)

### **4.1.3 Přístroje**

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)

Inkubátor (Thermomixer C, Eppendorf, Německo)

Inkubátor (Thermcell Mixing Block, Bioer, Japonsko)

Přístroj na výrobu ledu

Třepačka (ÚOCHB, ČR; Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA)

UHPLC Agilent Series 1290 Infinity (Agilent Technologies, USA)

- binární pumpa (1290 Bin Pump VL, G4220B)
- autosampler (1290 Sampler, G4226A)
- termostatovaná kolona (1290 TCC, G1316C)
- detektor diodového pole (1260 DAD, G4212B)
- fluorescenční detektor (1260 FLD, G1321B)

UHPLC Agilent Series 1260 Infinity II (Agilent Technologies, USA)

- pumpa (1260 Flexible Pump, G7104C)
- autosampler (1260 Viasampler, G7129C)
- fluorescenční detektor (1260 FLD, G7121A)
- detektor diodového pole (DAD, G1315B)
- UV-VIS detektor (1260VWD, G7114A)

Ultrazvuková lázeň (Ultrasoniccleaner120T, Anonkia Ultrasonic, Čína)

## 4.2 Metodika *in vitro* inkubací

Substrát DAUN je přeměňován pomocí enzymů rodiny AKR na produkt DAUN-ol. Pro terapii je však tato reakce nežádoucí, protože produkt je méně cytotoxický a více kardiotoxický. Tento proces lze potlačit použitím vhodného inhibitoru, vznikne tak méně DAUN-ol a terapie bude účinnější. Pro kvantifikaci při experimentech je možno využít UHPLC analýzu, při které se substrát a produkt od sebe oddělí. Množství vzniklého produktu se poté stanovuje výpočtem z kalibrační křivky.

### 4.2.1 Základní screening

Prvním krokem experimentální části práce bylo ověření inhibičního potenciálu TIP na enzym AKR1B10. Základní screening byl celkově složen ze 16 reakcí (Tab. 2). Všechny reakce byly připravovány v triplicátech, vyjma kontroly bez enzymu a bez substrátu, ty byly připraveny v duplikátech. Příprava roztoků potřebných k provedení *in vitro* inkubace je rozepsána dále.

**Tab. 2** Příprava reakcí na *in vitro* inkubaci

	NaPB (μl)	TIP (μl)	Regenerační systém (μl)	AKR1B10 (μl)	DAUN (μl)
Neinhibovaná reakce	60	0	20	10	10
DMSO kontrola	58	2 (DMSO)	20	10	10
TIP 10 μM/reakci	58	2	20	10	10
TIP 50 μM/reakci	58	2	20	10	10
Kontrola bez enzymu	70	0	20	0	10
Kontrola bez substrátu	60	0	20	10	10 (vody)

NaPB – sodno-fosfátový pufr, DAUN – daunorubicin, DMSO – dimethylsulfoxid, TIP – tipifarnib

## Sodno-fosfátový pufr

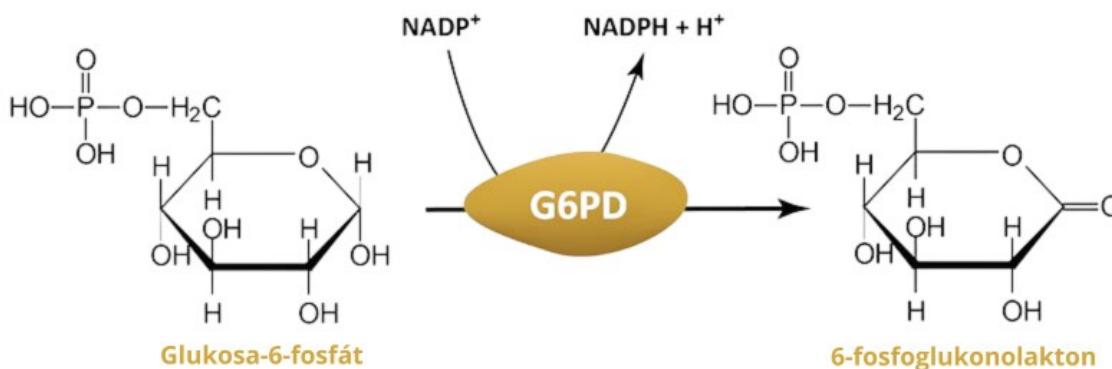
Sodno-fosfátový pufr o koncentraci 0,1M byl připraven ve dvou krocích. První krok zahrnoval přípravu roztoku, který vznikl rozpuštěním 3,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ve 100 ml ultračisté vody. Druhým krokem bylo rozpuštění 0,39 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 25 ml ultračisté vody. Oba roztoky byly nakonec smíchány tak, aby výsledné pH bylo 7,4.

## Chlorid hořečnatý

0,1M  $\text{MgCl}_2$  byl připraven rozpuštěním 1,02 g této sloučeniny v 50 ml ultračisté vody.

## Regenerační systém

Regenerační systém je důležitou součástí *in vitro* experimentu. Jeho hlavní funkcí je regenerace  $\text{NADP}^+$  na  $\text{NADPH}$ , na kterém jsou enzymy AKR závislé. Děje se tak oxidací glukosy-6-fosfátu pomocí glukosa-6-fosfát-dehydrogenasy (Obr. 11).



**Obr. 11** Reakce katalyzovaná glukosa-6-fosfát-dehydrogenasou (upraveno The Medical Biochemistry Page 2024)

G6PD – glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa

Připravuje se vždy čerstvý před samotnou inkubací dle schématu (Tab. 3), Nejprve se do zkumavky odváží na analytických vahách  $\text{NADP}^+$  a glukosa-6-fosfát. To se rozpustí v NaPB a  $\text{MgCl}_2$ . Enzym glukosa-6-P-dehydrogenasa se přidává až těsně před pipetováním regeneračního systému do *in vitro* reakce.

**Tab. 3** Příprava regeneračního systému pro jednu reakci

NADP <sup>+</sup>	0,2 mg
Glukosa-6-fosfát	0,6 mg
NaPB	10,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	10,0 µl
Glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa	0,5 µl

### Tipifarnib

Zásobní roztok TIP byl připraven rozpuštěním 2,45 mg standardu ve 100 µl DMSO. Tento 50mM zásobní roztok byl uchováván na -80 °C. Následně byl naředěn na koncentraci 10 mM a uchováván dlouhodobě na -80 °C, případně krátkodobě na -20 °C. Před inkubací byl zásobní roztok dále naředěn DMSO na pracovní roztoky o koncentracích 2500 µM a 500 µM. Ředění bylo vypočítáno dle vzorce:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

ve kterém  $c_1$  = koncentrace zásobního roztoku (µM),  $V_1$  = objem zásobního roztoku (µl),  $c_2$  = koncentrace pracovního roztoku (50x koncentrace inhibitoru v reakci) (µM),  $V_2$  = objem pracovního roztoku (požadovaný objem dle počtu reakcí) (µl).

### AKR1B10

Zásobní roztok enzymu AKR1B10 byl připraven ve 20% glycerolu a pufru a skladován při -20 °C, případně -80 °C. Koncentrace zásobního roztoku byla 1,5 mg/ml. Před inkubací byl zásobní roztok naředěn 0,1M NaPB (pH 7,4) na pracovní roztok, jehož koncentrace odpovídala výslednému množství 5 µg AKR1B10 na reakci. Pro výpočet byl použit následující vzorec:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

kde  $c_1$  = koncentrace zásobního roztoku (mg/ml),  $V_1$  = objem zásobního roztoku (µl),  $c_2$  = koncentrace pracovního roztoku (mg/ml),  $V_2$  = objem pracovního roztoku (požadovaný objem dle počtu reakcí) (µl).

## DAUN

Zásobní roztok substrátu byl rozpuštěn v ultračisté vodě a uchováván v lednici při + 4 °C. Koncentrace zásobního roztoku byla 5 mM. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 1,41 mg DAUN v 500 µl ultračisté vody, podle výpočtu:

$$m = c \times V \times M$$

ve kterém  $m$  = hmotnost DAUN (g),  $c$  = koncentrace zásobního roztoku (mol/l),  $V$  = celkový objem zásobního roztoku (l),  $M$  = molární hmotnost DAUN (563,98 g/mol).

Před použitím byl zásobní roztok DAUN ponechán asi 4 minuty v ultrazvuku a následně pořádně promíchán.

### Průběh vlastní *in vitro* inkubace

Do plastových mikrozkuvek byl postupně pipetován NaPB, TIP, regenerační systém a enzym v množství podle Tab. 2 (str. 35). Následně byly mikrozkuvky promíchány a odstředěny 5-6 sekund pomocí funkce short spin. Poté byly vloženy do předem vytemperovaných inkubátorů (37 °C), kde byly z důvodu preinkubace ponechány minimálně 10 minut za stálého míchání při 300 rpm. Reakce byly odstartovány přidáním 10 µl substrátu a následným promícháním. Substrát byl takto přidán do všech mikrozkuvek s časovými rozestupy mezi jednotlivými vzorky 20/30 s. Vlastní inkubace probíhala za dodržení výše uvedených podmínek (teplota, míchání) přesně 30 minut. Reakce byla zastavena přidáním 300 µl methanolu. Mikrozkuvka byla okamžitě po přidání methanolu pořádně promíchána a ponechána na ledu po dobu minimálně 10 minut. Poté byly vzorky ponechány precipitovat minimálně 1 hodinu při +4 °C, eventuálně 30 minut při -20°C.

### UHPLC analýza

Zprecipitované vzorky byly odstředěny 10 minut při 12 100 × g. Před analýzou bylo nutné všechny přefiltrovat přes 0,2 µm PTFE membránu za použití injekční stříkačky, jehly a filtru do připravených a popsaných vialek s vloženými inserty. Připravené vzorky byly následně měřeny při reverzním uspořádání fází na přístrojích UHPLC Agilent Series 1290 Infinity a Agilent Series 1260 Infinity II. Analýza byla provedena izokratickou elucí při složení mobilní fáze 0,1% kyselina mravenčí s acetonitrilem v poměru 74:26 (v/v) na koloně RRHD

Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm; 1,8 µm). Analytické podmínky byly nastaveny na průtok mobilní fáze 0,7 ml/min a objem nástřiku 5 µl. Detekce probíhala při vlnových délkách 480 nm (excitační) a 560 nm (emisní). Kvalitativní vyhodnocení vycházelo z porovnání retenčních časů píků neznámých vzorků s retenčními časy standardů DAUN a DAUN-ol. Kvantitativní vyhodnocování neznámých vzorků bylo provedeno pomocí kalibrační křivky, která byla lineární v rozsahu 0,25-0,50 µg/ml s  $R^2 \geq 0,99$ .

### **Vyhodnocení výsledků**

Prvním krokem při vyhodnocení výsledků byl výpočet specifické aktivity v Excelu podle vzorce:

$$a = \frac{m \times k \times 1000}{t \times c \times Mr}$$

kde a = specifická aktivita (nmol/mg/min), m = množství DAUN-ol ve vzorku (ng/nástřik), k = koeficient ředění (=80), 1000 = převod jednotek, t = čas inkubace (min), c = množství enzymu na reakci (5 µg/reakci), Mr = molekulová hmotnost DAUN-ol (529,54 g/mol).

Pro tvorbu grafů a výpočet kinetických parametrů byl použitý program GraphPad Prism (verze 10.2.2).

### **4.2.2 Stanovení IC<sub>50</sub>**

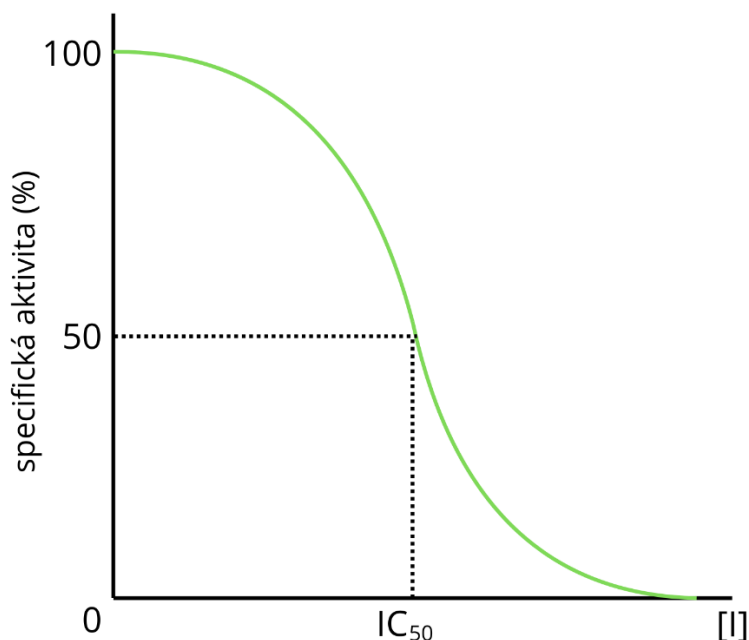
#### **Příprava reakcí**

Při přípravě reakcí pro stanovení IC<sub>50</sub> byl postup stejný jako u základního screeningu s tím rozdílem, že se připravovala pouze DMSO kontrola, inhibitory o různých koncentracích a kontrola bez enzymu. Neinhibovaná reakce a kontrola bez substrátu byly vynechány. Vše bylo opět provedeno v triplikátech, celkově tedy 27 reakcí.

Inhibitory byly připravovány v koncentraci 0,25; 0,50; 1; 2; 10; 50 a 100 µM/reakci. Jelikož zásobní roztok měl koncentraci 10 mM, bylo třeba provést ředění, konkrétně postupné ředění (od nejvyšší po nejnižší koncentraci), podle stejného vzorce jako u základního screeningu.

## Vyhodnocení výsledků

Inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  udává takovou koncentraci inhibitoru, při které dojde k poklesu enzymové aktivity přesně na polovinu (Obr. 12).



*Obr. 12 Grafické znázornění průběhu enzymatické aktivity při použití inhibitoru a stanovení  $IC_{50}$  z grafu*

Při vyhodnocení výsledků byl stejný postup jako v případě základního screeningu.

### 4.2.3 Stanovení $K_i$ a typu inhibice

#### Příprava reakcí

Postup přípravy byl opět stejný jako u základního screeningu. Vzorky byly připravovány o 6 koncentracích substrátu a 4 koncentracích inhibitoru. Vždy každá koncentrace substrátu s každou koncentrací inhibitoru. Neinhibovaná reakce, kontrola bez substrátu a kontrola bez enzymu byly vynechány. Všechny vzorky byly připraveny v triplikátech a celkem to bylo 72 reakcí.

Inhibitory byly připravovány v koncentracích 0 (DMSO), 5, 10 a 20  $\mu\text{M}$ /reakci postupným ředěním zásobního roztoku (Tab. 4).



**Tab. 4** Příklad ředění inhibitoru (pro 20 reakcí)

[TIP v reakci] ( $\mu\text{M}$ )	[prac. roztok TIP] ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{TIP}}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{DMSO}}$ ( $\mu\text{l}$ )
20,0	1000,0	7,5 (10 mM)	67,5
10,0	500,0	32,5 (1 mM)	32,5
5,0	250,0	20,0 (0,5 mM)	20,0

TIP – tipifarnib, DMSO – dimethylsulfoxid

Dále byly připravovány koncentrace substrátu 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000  $\mu\text{M}$ /reakci postupným ředěním ultračistou vodou (Tab. 5). Nejvyšší koncentrace pracovního roztoku (20 mM) byla připravena podle stejného výpočtu, jako při přípravě zásobního roztoku substrátu u základního screeningu.

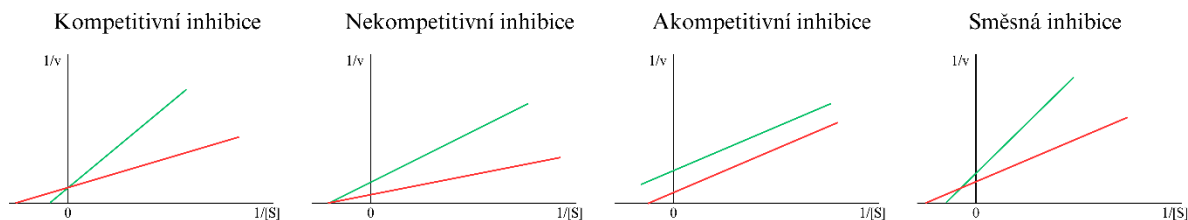
**Tab. 5** Příklad ředění substrátu (pro 15 reakcí)

[DAUN v reakci] (mM)	[prac. roztok] (mM)	$V_{\text{DAUN}}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{UHQ}}$ ( $\mu\text{l}$ )
2,0	20,0	-	-
1,0	10,0	240,0 (20,0 mM)	240,0
0,8	8,0	320,0 (10,0 mM)	80,0
0,6	6,0	240,0 (8,0 mM)	80,0
0,4	4,0	160,0 (6,0 mM)	80,0
0,2	2,0	75,0 (4,0 mM)	75,0

DAUN – daunorubicin, UHQ – ultračistá voda

### Vyhodnocení výsledků

Reversibilní inhibice jsou rozděleny do 4 skupin – kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a směsné. K odlišení těchto typů inhibice bylo využito grafického znázornění rovnice Michaelise a Mentenové a následná linearizace, tedy grafické vynesení rovnice Lineweavera a Burka (Obr. 13). Pro linearizaci bylo třeba získat Michaelisovu konstantu  $K_M$  a maximální rychlost enzymové reakce  $V_{\text{MAX}}$ , které byly opatřeny z grafu Michaelise a Mentenové.  $K_M$  udává takovou koncentraci substrátu, při které je enzym právě z poloviny nasycen a reakční rychlost je rovna polovině maximální rychlosti ( $V_{\text{MAX}}/2$ ).  $V_{\text{MAX}}$  je maximální dosažitelná rychlost reakce při dané koncentraci enzymu.



**Obr. 13** Rozlišení typů inhibice podle grafů Lineweavera a Burka

Červená – neinhibovaná reakce; zelená – inhibovaná reakce.

U kompetitivní inhibice inhibitor a substrát soutěží o volné vazebné místo na enzymu. Inhibitor se při tomto typu inhibice strukturně podobá substrátu a váže se do aktivního místa enzymu. Vzniká tak komplex inhibitor-enzym, který je katalyticky neúčinný. Zároveň platí, že se vzrůstající koncentrací substrátu se bude inhibice snižovat.

Při nekompetitivní inhibici neovlivňuje inhibitor vazbu substrátu na enzym, jelikož se neváže do aktivního místa, ale na volný enzym či komplex enzym-substrát. U tohoto typu není inhibice ovlivňována koncentrací substrátu.

Akompetitivní typ inhibice je podobný nekompetitivnímu typu s tím rozdílem, že se neváže na volný enzym, ale pouze na komplex enzym-substrát. Také pokud budeme zvyšovat koncentraci substrátu, bude se zvyšovat i stupeň inhibice.

Inhibiční konstanta  $K_i$  znázorňuje, jak silný daný inhibitor je. Jedná se vlastně o typ disociační konstanty vyjadřující míru afinity inhibitoru k ligandu. Konkrétně udává koncentraci inhibitoru potřebnou k dosažení poloviny maximální inhibice. Čím menší je hodnota  $K_i$ , tím větší má inhibitor vazebnou afinitu a stačí nižší koncentrace inhibitoru k inhibici enzymové reakce.

Stejně jako u předchozích experimentů, prvním krokem vyhodnocování byl výpočet specifické aktivity v programu Excel, a potom vytvoření grafů v programu GraphPad Prism.

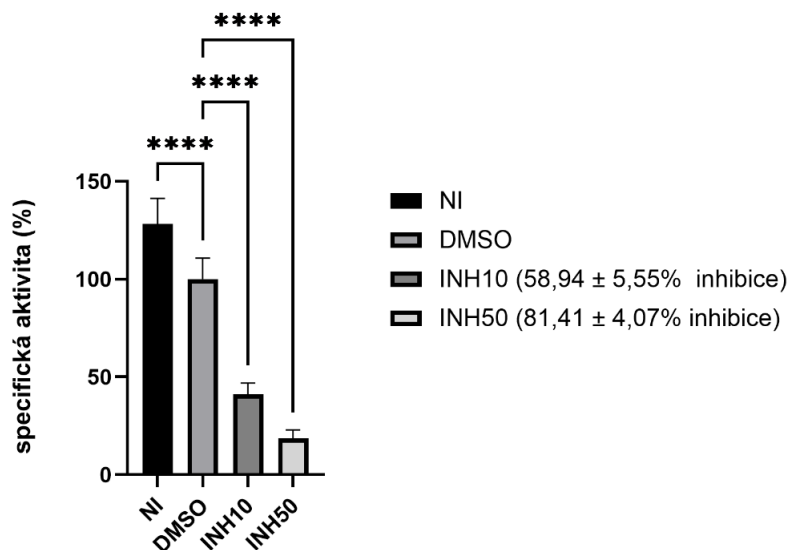
## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro veškeré experimenty byl použit substrát DAUN, který je v přítomnosti ATP přeměňován na DAUN-ol pomocí enzymů nadrodiny AKR. Práce se pak zaměřuje konkrétně na enzym AKR1B10. Inhibicí tohoto enzymu je možné ovlivnit množství vzniklého produktu, a tím zlepšit účinek antracyklinového antibiotika DAUN v terapii nádorových onemocnění.

### 5.1 Základní screening

Základní screening inhibice vybraných enzymů inhibitorem TIP byl součástí předešlé práce výzkumné skupiny. Konkrétně se jednalo o enzymy AKR1C3, 1B10, 1B1, 1A1 a CBR1. V tomto výzkumu nejvyšší míru inhibice vykazoval TIP u enzymu AKR1C3, čemuž se věnuje závěrečná práce s názvem „Potenciální role inhibitoru tipifarnibu v léčbě akutní myeloidní leukémie“ s předpokládaným datem obhajoby v roce 2024. Druhý nejvyšší inhibiční potenciál ukázal TIP s enzymem AKR1B10.

Prvním krokem této práce bylo ověření inhibičního potenciálu TIP v základním screeningu s enzymem AKR1B10. Cílem bylo získání a porovnání specifických aktivit neinhibované reakce, DMSO kontroly, reakce s koncentrací inhibitoru 10  $\mu\text{M}$ /reakci a reakce s koncentrací inhibitoru 50  $\mu\text{M}$ /reakci (Obr. 14). Inhibitor o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  inhiboval reakci z  $58,94 \pm 5,55 \%$ , inhibitor o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  inhiboval reakci z  $81,41 \pm 4,07 \%$ . Každý experiment byl proveden v triplicátu, přičemž prezentovaný graf je složený z hodnot tří experimentů. Statistické porovnání významnosti rozdílů jednotlivých výsledků vykazovalo ve všech případech hodnotu  $p < 0,0001$ , tudíž rozdíly mezi jednotlivými výsledky jsou považovány za statisticky významné.



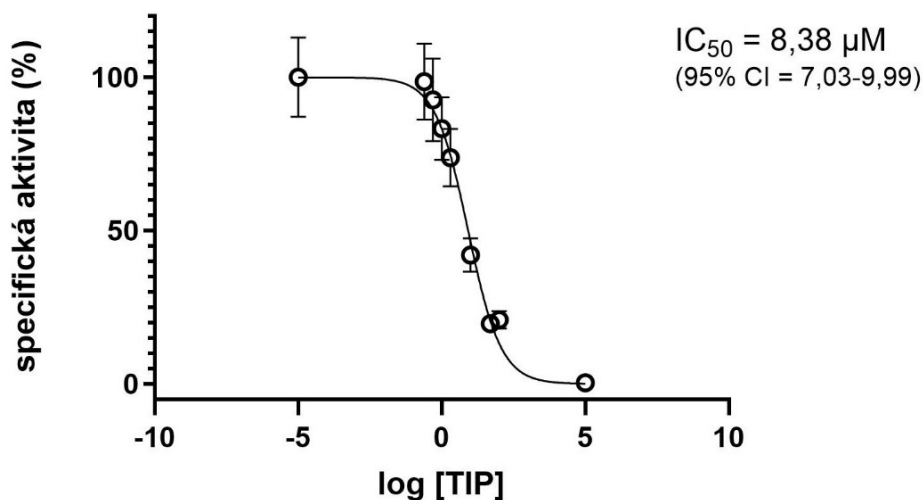
**Obr. 14** Základní screening TIP s AKR1B10

NI – neinhibovaná reakce; DMSO – kontrola; INH10 – inhibitor o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ /reakci; INH50 – inhibitor o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ /reakci; \*\*\*\* – hodnota  $p < 0,0001$ . Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Počet měření  $n = 3$ . Pro statistické vyhodnocení byla použita jednofaktorová ANOVA.

Z výsledků experimentu tedy možno shrnout, že TIP inhibiční potenciál vůči enzymu AKR1B10 vykazuje. Proto byly pro tuto dvojici enzym-inhibitor dále experimentálně stanoveny kinetické parametry – hodnota  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$ . Podobné výsledky vůči AKR1B10 vykazoval v základním screeningu také inhibitor branebrutinib, který inhiboval reakce z 62,97 % a 81,75 % (INH10 a INH50), ale lepší výsledky poskytoval k enzymu AKR1C3 (77,24% a 91,79% inhibice) (Fiklíková 2022). Mezi další *in vitro* zkoumané inhibitory, avšak s nižšími inhibičními potenciály k AKR1B10, patřily například zanubrutinib s 41,67% a 74,83% inhibicí (Havličková 2022), entrektinib s 40,73% a 61,52% inhibicí (Krtilová 2020), ibrutinib s 36,40% a 64,80% inhibicí (Hudáčová 2019) či evobrutinib s 33,02% a 51,00% inhibicí (Zenkerová 2021). Až na entrektinib, který o něco lépe inhiboval AKR1B1 než AKR1B10, ostatní zmíněné vykazovaly vyšší sílu inhibice s AKR1C3. Na druhou stranu výsledky dasatinibu poskytnuté studií Büküm *et al.* (2021) na buněčných liniích kolorektálního karcinomu a plicního adenokarcinomu ukazují, že dasatinib má inhibiční potenciál vyšší než TIP, a to 77,3 % a 89,1 %. Po porovnání výsledků s ostatními inhibitory lze říci, že TIP by mohl patřit k významným potenciálním inhibitorům, vzhledem k faktu, že má vysokou schopnost inhibice AKR1C3, zároveň poskytuje poměrně dobré výsledky i s AKR1B10.

## 5.2 Stanovení $IC_{50}$

Hodnota  $IC_{50}$  byla stanovena z grafické závislosti specifické aktivity na logaritmické koncentraci inhibitoru (Obr. 15). Experiment byl proveden celkově čtyřikrát.

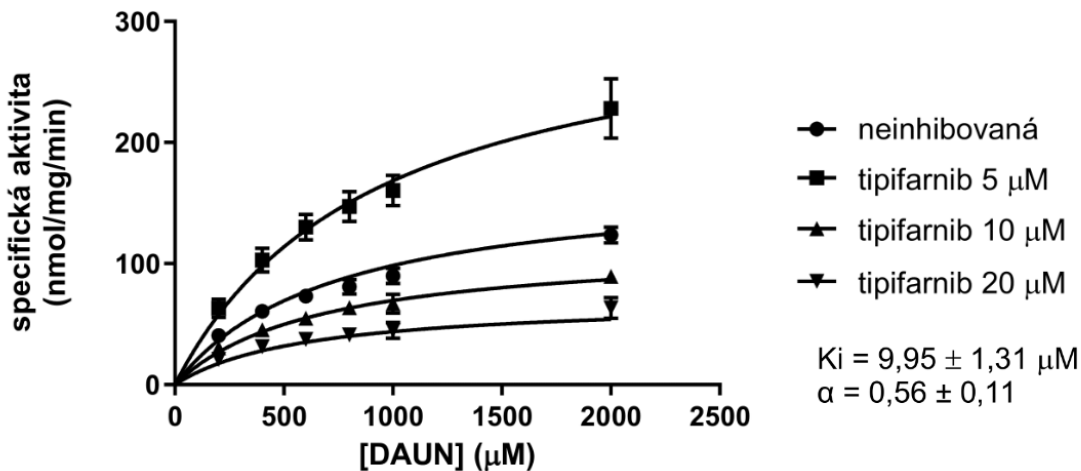


**Obr. 15** Stanovení  $IC_{50}$  z grafu závislosti specifické aktivity na logaritmické koncentraci inhibitoru TIP TIP – tipifarnib, CI – interval spolehlivosti. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Počet měření  $n = 4$ .

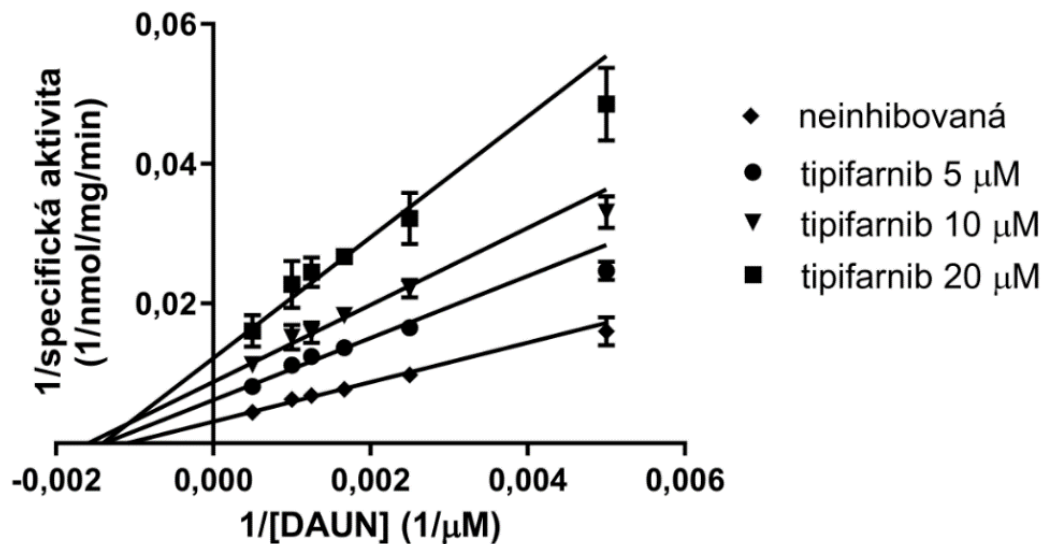
Obecně platí, že čím nižší hodnota  $IC_{50}$ , tím lepší pro pacienta, protože stačí menší množství inhibitoru, aby došlo k inhibici enzymu. Pro TIP byla  $IC_{50}$  stanovena na  $8,38 \mu M$  s 95% intervalem spolehlivosti  $7,03-9,99 \mu M$ . Ve studiích Gore *et al.* (2006) a Sparreboom *et al.* (2004) dosahovaly maximální koncentrace TIP v plazmě hodnot  $0,73 - 2,16 \mu M$  a  $0,70 - 2,81 \mu M$ . Jedná se o hodnoty výrazně nižší než v práci stanovená hodnota  $IC_{50}$ . Při zachování současných terapeutických dávek tedy není možné dosáhnout dostatečné koncentrace TIP ani v plazmě, natož pak v místě nádorového ložiska. Aby bylo možné pomocí TIP inhibovat AKR1B10 v organismu, bylo by třeba podat vyšší dávku, což by ale mohlo vést k většímu množství nežádoucích účinků, nebo změnit způsob podání inhibitoru a zajistit tak doručení dostatečné koncentrace v nádoru, například použitím nějakého specifického nosiče. Zároveň při použití TIP k inhibici FTázy byla  $IC_{50} = 0,86 \text{ nM}$  (Shen *et al.* 2015) a jeho inhibiční potenciál s AKR1B10 je tedy mnohem menší. Lepší výsledky vůči AKR1B10 poskytoval také výše zmíněný branebrutinib s  $5,62 \mu M$  (Fiklíková 2022) či emodin na buňkách karcinomu plic a jater, u kterého vycházela dokonce pouze  $0,59 \mu M$  (Hintzpeter *et al.* 2016).

### 5.3 Stanovení $K_i$ a typu inhibice

Experiment byl prováděn celkově třikrát a následně byly vytvořené souhrnné grafy. Z grafu Michaelise a Mentenové (Obr. 16) byla stanovena hodnota  $K_i = 9,95 \pm 1,31 \mu\text{M}$  a hodnota  $\alpha = 0,56 \pm 0,11$ . Afinita inhibitoru je tedy vyšší vůči komplexu enzym-substrát než k samotnému enzymu. Linearizace dle Lineweaver-Burka (Obr. 17) poskytla grafické znázornění, ze kterého vyplývá, že se pravděpodobně jedná o smíšený typ inhibice.



**Obr. 16** Grafické vyjádření rovnice Michaelise a Mentenové pro stanovení hodnoty  $K_i$  DAUN – daunorubicin,  $K_i$  – inhibiční konstanta,  $\alpha$  – určení typu inhibice. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Počet měření  $n = 3$ .



**Obr. 17** Lineweaver-Burkův graf pro určení typu inhibice

DAUN – daunorubicin. Počet měření  $n = 3$ .

Hodnota  $K_i$  určuje afinitu inhibitoru k enzymu. Opět, stejně jako v případě  $IC_{50}$  platí, že čím nižší je  $K_i$ , tím menší množství inhibitoru je třeba k dosažení inhibice enzymu, tím výhodnější je to tedy i pro pacienta. Při tomto *in vitro* experimentu byla stanovena hodnota  $K_i$  na  $9,95 \pm 1,31 \mu\text{M}$  a typ inhibice byl určen jako smíšený preferující vazbu na komplex enzym-substrát (podle hodnoty  $\alpha = 0,56 \pm 0,11$ ). Jedná se bohužel, v porovnání s výsledky jiných inhibitorů, o hodnoty relativně vysoké. Například inhibitor branebrutinib měl  $K_i = 5,98 \mu\text{M}$  s inhibitorem AKR1B10, a dokonce pouhých  $2,94 \mu\text{M}$  u AKR1C3, s nekompetitivním typem inhibice (Fiklíková 2022). Znamená to, že se inhibitor váže jak na komplex enzym-substrát, tak i na samotný enzym, což je pro terapii příhodnější. Při studiích na buněčných liniích, prováděných s AKR1B10, pak vykazovaly inhibitory dasatinib s  $K_i = 0,6 \mu\text{M}$  (Büküm *et al.* 2021) a emodin s  $0,68 \mu\text{M}$  (Hintzpeter *et al.* 2016) mnohem větší inhibiční potenciál. Ze zmíněných pouze dasatinib vykazoval také smíšený typ inhibice (Büküm *et al.* 2021). Nutno však připomenout, že inhibice AKR1B10 pravděpodobně není jediným mechanismem účinku TIP v terapii nádorových onemocnění.

## 6 ZÁVĚR

Enzymy z nadrodiny AKR způsobují komplikace při terapii onkologických onemocnění antracyklinovými antibiotiky. Kvůli jejich nadměrné expresi u rakovinových buněk stojí za rozvojem rezistence, tedy stavu, kdy se nádorově zvrhlé buňky jsou schopny bránit proti cytotoxickému působení antracyklinů. Děje se tak díky vlastnosti AKR redukovat parentní léčivo na méně účinné alkoholové deriváty. Vývoj inhibitorů AKR s vysokým inhibičním účinkem i při malých koncentracích by mohl být nástroj pro překonání zmíněné antracyklinové rezistence.

Práce byla zaměřena na zkoumání inhibičního účinku inhibitoru TIP vůči enzymu AKR1B10 při použití DAUN jako substrátu. Experiment tak navazuje na výsledky předešlého výzkumu pracovní skupiny, kdy TIP vykazoval největší sílu inhibice vůči AKR1C3, avšak relativně působivé výsledky prokazoval právě i s enzymem AKR1B10.

V první části bylo ze tří prováděných měření prokázáno, že TIP o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  inhibuje aktivitu enzymu AKR1B10 z  $58,94 \pm 5,55 \%$  a inhibitor o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  o  $81,41 \pm 4,07 \%$ . Hodnoty byly uznány za významné a pokračovalo se tedy stanovením dalších kinetických parametrů.

Druhým krokem experimentální části bylo určení hodnot  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{K}_i$  a typu inhibice. Průměrná hodnota pro  $\text{IC}_{50}$  byla stanovena na 8,38  $\mu\text{M}$  a pro  $\text{K}_i$  na 9,95  $\mu\text{M}$ . Z vytvořených grafů bylo prokázáno, že se pravděpodobně jedná o smíšený typ inhibice. Hodnota  $\alpha$  (0,56) naznačuje, že inhibitor preferuje vazbu na komplex enzym-substrát.

Ze získaných výsledků v porovnání s dalšími *in vitro* zkoumanými inhibitory vyplývá, že za současných podmínek dávkování TIP nevykazuje vůči AKR1B10 velký potenciál při léčbě malignit chemoterapeutikem DAUN. Ve výzkumech ale TIP pro léčbu rakoviny vykazuje dobré výsledky, nutno však podotknout, že zvrácení přeměny DAUN na méně účinný DAUN-ol pomocí AKR1B10 není jediným mechanismem jeho účinku. Do budoucna by námi zkoumána dráha mohla přispívat k celkovému mechanismu účinku, pokud by se podařilo v místě nádoru dosáhnout koncentrace TIP alespoň přibližné hodnotám  $\text{IC}_{50}$  či  $\text{K}_i$ , to znamená přibližně 10  $\mu\text{M}$ .



## 7 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-vázající kazeta ( <i>z angl. ATP-binding cassette</i> )
AKR	aldo-ketoreduktasa
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
CAAX	motiv proteinů (C-cystein, AA-alifatická aminokyselina, X-aminokyselina)
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CBR1	karbonyl reduktasa 1 ( <i>z angl. carbonyl reductase 1</i> )
CML	chronická myeloidní leukémie
CREB	protein vázající element cAMP ( <i>z angl. cAMP response element binding protein</i> )
CSC	kmenové buňky rakoviny ( <i>z angl. cancer stem cells</i> )
DAUN	daunorubicin
DAUN-ol	daunorubicinol
DMSO	dimethylsulfoxid
DOX	doxorubicin
DOX-ol	doxorubicinol
EPI	epirubicin
FTasa	farnesyltransferasa
FTIs	inhibitory farnesyltransferasy
Glc-6-P	glukosa-6-fosfát
Glc-6-P-dehydrogenasa	glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa

GSSG	glutathion disulfid
IDA	idarubicin
MDR1	gen multilékové rezistence <i>(z angl. multidrug resistance 1 product P-glycoprotein)</i>
MDS	myelodysplastický syndrom
MRP	protein mnohočetné lékové rezistence <i>(z angl. multidrug resistance protein)</i>
NaPB	sodno-fosfátový pufr
Pgp	P-glykoprotein
ROS	reaktivní formy kyslíku <i>(z angl. reactive oxygen species)</i>
SPT	serin palmitoyltransferasy
TIP	tipifarnib
TOPO II	topoizomerasa II
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie <i>(z angl. ultrahigh-performance liquid chromatography)</i>

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Struktury antracyklinových derivátů DOX, DAUN, EPI a IDA .....	12
Obr. 2 - Redukce DAUN na DAUN-ol aldo-ketoreduktasami .....	13
Obr. 3 - Ilustrace interakce DAUN s chromatinem .....	14
Obr. 4 - Mechanismy účinků uplatňující se při rezistenci vůči antracyklinovým antibiotikům .....	16
Obr. 5 - Znázornění působení antracyklinů v rakovinových buňkách a kardiomyocytech a jejich dopad na velikost nádoru a poškození srdce .....	20
Obr. 6 - Umístění NADP <sup>+</sup> a katalytické tetrády v rámci molekuly AKR .....	21
Obr. 7 - Snížená aktivita DOX-ol vlivem zvýšeného efluxu ABC transportéry a intracelulární distribuce DOX a DOX-ol .....	23
Obr. 8 - Inaktivace antracyklinů v nádorové buňce .....	26
Obr. 9 - Struktura farnesyltransferasy .....	29
Obr. 10 - Chemická struktura TIP .....	31
Obr. 11 - Reakce katalyzovaná glukosa-6-fosfát-dehydrogenasou .....	36
Obr. 12 - Grafické znázornění průběhu enzymatické aktivity při použití inhibitoru a stanovení IC <sub>50</sub> z grafu .....	40
Obr. 13 - Rozlišení typů inhibice podle Lineweaver a Burka .....	42
Obr. 14 – Základní screening TIP s AKR1B10 .....	44
Obr. 15 - Stanovení IC <sub>50</sub> z grafu závislosti specifické aktivity na logaritmické koncentraci inhibitoru TIP .....	45
Obr. 16 - Grafické vyjádření rovnice Michaelise a Mentenové pro stanovení hodnoty K <sub>i</sub> .....	46
Obr. 17 - Lineweaver-Burkův graf pro určení typu inhibice .....	46

## 9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 - Využití antracyklinových antibiotik v terapii nádorů .....	10
Tab. 2 – Příprava reakcí na in vitro inkubaci .....	35
Tab. 3 - Příprava regeneračního systému pro jednu reakci .....	37
Tab. 4 - Příklad ředění inhibitoru (pro 20 reakcí) .....	41
Tab. 5 - Příklad ředění substrátu (pro 15 reakcí) .....	41

## 10 LITERATURA

AVENDAÑO, Carmen and J. Carlos MENÉNDEZ, 2023. Anticancer drugs acting on signaling pathways, part 2: Inhibitors of serine-threonine kinases and miscellaneous signaling pathways. In: *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. B.m.: Elsevier, 565–635. ISBN 978-0-12-818549-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818549-0.00011-X

AX, Wolfram, Michael SOLDAN, Lutz KOCH and Edmund MASER, 2000. Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochemical Pharmacology*. 59(3), 293–300. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-2952(99)00322-6

BARSKI, Oleg A., Srinivas M. TIPPARAJU and Aruni BHATNAGAR, 2008. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 40(4), 553–624. ISSN 0360-2532, 1097-9883. Dostupné z: doi:10.1080/03602530802431439

BETCHER, Donna L. and Nora BURNHAM, 1990. Idarubicin. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*. 7(3), 117–120. ISSN 1043-4542, 1532-8457. Dostupné z: doi:10.1177/104345429000700307

BÜKÜM, Neslihan, Eva NOVOTNÁ, Anselm MORELL, Jana ŽELAZKOVÁ, Lenka LAŠTOVIČKOVÁ, Lucie ČERMÁKOVÁ, Ramon PORTILLO, Petr SOLICH and Vladimír WSÓL, 2021. Inhibition of AKR1B10-mediated metabolism of daunorubicin as a novel off-target effect for the Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Biochemical Pharmacology*. 192, 114710. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2021.114710

CAPELÔA, Tânia, Zohra BENYAHIA, Luca X. ZAMPIERI, Marine C. N. M. BLACKMAN and Pierre SONVEAUX, 2020. Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 98, SI: Cancer Cells & Therapeutic Targets, 181–191. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2019.05.006

CARNERO, A., 2006. Cell cycle and cell-cycle checkpoints. In: Geoffrey J. LAURENT and Steven D. SHAPIRO, ed. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Oxford: Academic

Press, 347–355. ISBN 978-0-12-370879-3. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-370879-6/00064-8

CORTÉS-FUNES, Hernán and Cyntia CORONADO, 2007. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovascular Toxicology*. 7(2), 56–60. ISSN 1559-0259. Dostupné z: doi:10.1007/s12012-007-0015-3

DENARD, Bray, Ching LEE and Jin YE, 2012. Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *eLife*. 1. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.00090

DRUGBANK, 2023. *Tipifarnib* [online] [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB04960>

EMA, 2021. *EMEA-002871-PIP01-20 - paediatric investigation plan | European Medicines Agency* [online] [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/paediatric-investigation-plans/emea-002871-pip01-20>

FIKLÍKOVÁ, Barbora, 2022. *Vliv inhibice branebrutinibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. B.m. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.

FILIPITS, Martin, 2004. Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 1(2), 229–234. ISSN 17406765. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddmec.2004.10.001

FORETOVÁ, Lenka, Eva MACHÁČKOVÁ a Renata GAILLYOVÁ, 2022. *Hereditární nádorová onemocnění v klinické praxi*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-271-1293-7.

FUJII, Junichi, Takujiro HOMMA, Satoshi MIYATA and Motoko TAKAHASHI, 2021. Pleiotropic Actions of Aldehyde Reductase (AKR1A). *Metabolites*. 11(6), 343. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo11060343

GILARDI, Mara, Zhiyong WANG, Marco PROIETTO, Anastasia CHILLÀ, Juan Luis CALLEJA-VALERA, Yusuke GOTO, Marco VANONI, Matthew R. JANES, Zbigniew

MIKULSKI, Antonio GUALBERTO, Alfredo A. MOLINOLO, Napoleone FERRARA, J. Silvio GUTKIND and Francis BURROWS, 2020. Tipifarnib as a Precision Therapy for HRAS-Mutant Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Molecular Cancer Therapeutics*. 19(9), 1784–1796. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0958

GORE, L., S. N. HOLDEN, R. B. COHEN, M. MORROW, A. S. PIERSON, C. L. O'BRYANT, M. PERSKY, D. GUSTAFSON, C. MIKULE, S. ZHANG, P. A. PALMER and S. G. ECKHARDT, 2006. A phase I safety, pharmacological and biological study of the farnesyl protein transferase inhibitor, tipifarnib and capecitabine in advanced solid tumors. *Annals of Oncology*. 17(11), 1709–1717. ISSN 0923-7534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdl282

HAVLÍČKOVÁ, Lucie, 2022. *Vliv zanubrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou karbonyl redukujícími*. Hradec Králové. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.

HENRIKSEN, Peter A, 2018. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart*. 104(12), 971–977. ISSN 1355-6037, 1468-201X. Dostupné z: doi:10.1136/heartjnl-2017-312103

HINTZPETER, Jan, Jan Moritz SELIGER, Jakub HOFMAN, Hans-Joerg MARTIN, Vladimír WSOL and Edmund MASER, 2016. Inhibition of human anthracycline reductases by emodin — A possible remedy for anthracycline resistance. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 293, 21–29. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2016.01.003

HOFMAN, Jakub, Beata MALCEKOVA, Adam SKARKA, Eva NOVOTNA and Vladimír WSOL, 2014. Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: The role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 278(3), 238–248. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2014.04.027

HOLLINGSHEAD, Lisa M. and Diana FAULDS, 1991. Idarubicin. *Drugs*. 42(4), 690–719. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-199142040-00010

HORTOBÁGYI, G. N., 1997. Anthracyclines in the Treatment of Cancer. *Drugs*. 54(4), 1–7. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-199700544-00003

HUANG, Li, Rongzhang HE, Weihao LUO, Yuan-Shan ZHU, Jia LI, Tan TAN, Xi ZHANG, Zheng HU and Dixian LUO, 2016. Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10 Inhibitors: Potential Drugs for Cancer Treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 11(2), 184–196. ISSN 15748928. Dostupné z: doi:10.2174/1574892811888160304113346

HUDÁČOVÁ, Lenka, 2019. *Vliv inhibice bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. B.m. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.

JIN, Yi and Trevor M. PENNING, 2007. Aldo-Keto Reductases and Bioactivation/Detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47(1), 263–292. ISSN 0362-1642, 1545-4304. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105337

KHAYAMI, Reza, Seyyed Reza HASHEMI and Mohammad Amin KERACHIAN, 2020. Role of aldo-keto reductase family 1 member B1 (AKR1B1) in the cancer process and its therapeutic potential. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 24(16), 8890–8902. ISSN 1582-1838, 1582-4934. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.15581

KLOCHKOV, Sergey G., Margarita E. NEGANOVA, Nagendra Sastry YARLA, Madhukiran PARVATHANENI, Bechan SHARMA, Vadim V. TARASOV, George BARRETO, Sergey O. BACHURIN, Ghulam Md ASHRAF and Gjumrakch ALIEV, 2019. Implications of farnesyltransferase and its inhibitors as a promising strategy for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*. 56, Current Vision on Target Enzymes for Cancer Therapy, 128–134. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2017.10.010

KRTILOVÁ, Kamila, 2020. *Vliv inhibice tepotinibu, entrektinibu a sapanisertibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR*. B.m. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.

LIU, Yang, Siyu HE, Ying CHEN, Yijun LIU, Feng FENG, Wenyuan LIU, Qinglong GUO, Li ZHAO and Haopeng SUN, 2020. Overview of AKR1C3: Inhibitor Achievements and Disease Insights. *Journal of Medicinal Chemistry*. 63(20), 11305–11329. ISSN 0022-2623, 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.9b02138



MCGOWAN, John V, Robin CHUNG, Angshuman MAULIK, Izabela PIOTROWSKA, J Malcolm WALKER and Derek M YELLON, 2017. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 31(1), 63–75. ISSN 0920-3206, 1573-7241. Dostupné z: doi:10.1007/s10557-016-6711-0

MINDNICH, Rebekka, Jason E. DRURY and Trevor M. PENNING, 2011. The effect of disease associated point mutations on 5 $\beta$ -reductase (AKR1D1) enzyme function. *Chemico-Biological Interactions*. 191(1), Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism, 250–254. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2010.12.020

MURPHY, Tracy and Karen W. L. YEE, 2017. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 18(16), 1765–1780. ISSN 1744-7666. Dostupné z: doi:10.1080/14656566.2017.1391216

NEILAN, Thomas G, Aarti ASNANI, Debasish TRIPATHY and Marielle SCHERRER-CROSBIE, 2023. Risk and prevention of anthracycline cardiotoxicity. *UpToDate* [online] [cit. 2024-02-06]. Dostupné z: [https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/risk-and-prevention-of-anthracycline-cardiotoxicity?search=daunorubicin&source=search\\_result&selectedTitle=3~118&usage\\_type=default&display\\_rank=2](https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/risk-and-prevention-of-anthracycline-cardiotoxicity?search=daunorubicin&source=search_result&selectedTitle=3~118&usage_type=default&display_rank=2)

NIELSEN, Dorte, Christian MAARE and Torben SKOVSGAARD, 1996. Cellular resistance to anthracyclines. *General Pharmacology: The Vascular System*. 27(2), 251–255. ISSN 03063623. Dostupné z: doi:10.1016/0306-3623(95)02013-6

PENNING, Trevor M., 2015. The Aldo-Keto Reductases (AKRs): Overview. *Chemico-biological interactions*. 234, 236–246. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2014.09.024

PENNING, Trevor M., Sravan JONNALAGADDA, Paul C. TRIPPIER and Tea Lanišnik RIŽNER, 2021. Aldo-Keto Reductases and Cancer Drug Resistance. *Pharmacological Reviews*. 73(3), 1150–1171. ISSN 0031-6997, 1521-0081. Dostupné z: doi:10.1124/pharmrev.120.000122

PISKA, Kamil, Paulina KOCZURKIEWICZ, Adam BUCKI, Katarzyna WÓJCIK-PSZCZOŁA, Marcin KOŁACZKOWSKI and Elżbieta PEKALA, 2017. Metabolic carbonyl

reduction of anthracyclines — role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drugs*. 35(3), 375–385. ISSN 0167-6997. Dostupné z: doi:10.1007/s10637-017-0443-2

PLOSKER, Greg L. and Diana FAULDS, 1993. Epirubicin. *Drugs*. 45(5), 788–856. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-199345050-00011

PUCHNEROVÁ, Veronika, Zuzana NOVÁKOVÁ a Zdeněk WILHELM, 2016. Antracykliny – kardiotoxicita a kardioprotekce – se zaměřením na mechanismus účinku. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2016(15), 102–105.

RABBANI, Azra, Ron M. FINN and Juan AUSIÓ, 2005. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure: Review articles. *BioEssays*. 27(1), 50–56. ISSN 02659247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.20160

RIVANKAR, Sangeeta, 2014. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 10(4), 853. ISSN 0973-1482. Dostupné z: doi:10.4103/0973-1482.139267

SALEEM, Tabinda and Anup KASI, 2023. Daunorubicin. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559073/>

SHEN, Mingyun, Peichen PAN, Youyong LI, Dan LI, Huidong YU and Tingjun HOU, 2015. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling. *Drug Discovery Today*. 20(2), 267–276. ISSN 1359-6446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2014.10.002

SKÁLOVÁ, Lenka, 2018. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3762-4.

SPARREBOOM, Alex, Sharon MARSH, Ron H. J. MATHIJSEN, Jaap VERWEIJ and Howard L. MCLEOD, 2004. Pharmacogenetics of tipifarnib (R115777) transport and metabolism in cancer patients. *Investigational New Drugs*. 22(3), 285–289. ISSN 1573-0646. Dostupné z: doi:10.1023/B:DRUG.0000026254.97350.fe

SZÚ, 2023. Nádorová onemocnění. *SZÚ | Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze* [online]. [cit. 2024-02-06]. Dostupné z: <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/nemoci-a-jejich-prevence/neinfekcni-nemoci/nadorova-onemocneni/>

TAKAHASHI, Motoko, Satoshi MIYATA, Junichi FUJII, Yoko INAI, Shigemitsu UEYAMA, Motoko ARAKI, Tomoyoshi SOGA, Reiko FUJINAWA, Chiaki NISHITANI, Shigeru ARIKI, Takeyuki SHIMIZU, Tomomi ABE, Yoshito IHARA, Morimitsu NISHIKIMI, Yasunori KOZUTSUMI, Naoyuki TANIGUCHI and Yoshio KUROKI, 2012. In vivo role of aldehyde reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1820(11), 1787–1796. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2012.07.003

TAKAHASHI, Tsutomu and Akira NAGANUMA, 2009. Adriamycin. In: Manfred SCHWAB, ed. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer, 86–88. ISBN 978-3-540-47648-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-47648-1\_123

THE MEDICAL BIOCHEMISTRY PAGE, 2024. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency. *The Medical Biochemistry Page* [online]. [cit. 2024-05-06]. Dostupné z: <https://themedicalbiochemistrypage.org/glucose-6-phosphate-dehydrogenase-g6pd-deficiency/>

UPTODATE, [b.r.]. Epirubicin: Drug information. *UpToDate* [online] [cit. 2024-02-06]. Dostupné z: [https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/epirubicin-drug-information?search=epirubicin&source=panel\\_search\\_result&selectedTitle=1~112&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1%23F165582](https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/epirubicin-drug-information?search=epirubicin&source=panel_search_result&selectedTitle=1~112&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1%23F165582)

ÚZIS ČR, 2024a. Zhoubné nádory: léčba. *Národní zdravotnický informační portál* [online] [cit. 2024-02-06]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1166-zhoubne-nadory-lecba>. ISSN 2695-0340.

ÚZIS ČR, 2024b. Zhoubné nádory: vznik. *Národní zdravotnický informační portál* [online] [cit. 2024-02-06]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1163-zhoubne-nadory-vznik>. ISSN 2695-0340.

ÚZIS ČR, 2024c. Zhoubné nádory: základní informace. *Národní zdravotnický informační portál* [online] [cit. 2024-02-06]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/kategorie/172-zhoubne-nadory-zakladni-informace>. ISSN 2695-0340.

VESELSKÝ, Zbyněk, Petr MACEK, Petr MORÁVEK, Petr PROŠVIC, Lukáš HOLUB, Vladimír MAŤHA, Miroslav FÖRSTL, Peter VIŠŇOVSKÝ, Karel ODRÁŽKA a Miloslava VACULÍKOVÁ, 2004. Základy imunologie nádorových onemocnění. *Urologie pro praxi*. 2004(1), 17–19. ISSN 18035299.

VOLKOVA, Maria and Raymond RUSSELL, 2011. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Current Cardiology Reviews*. 7(4), 214–220. ISSN 1573403X. Dostupné z: doi:10.2174/157340311799960645

WANG, Jingyuan, Xue YAO and Jin HUANG, 2017. New tricks for human farnesyltransferase inhibitor: cancer and beyond. *MedChemComm*. 8(5), 841–854. ISSN 2040-2503, 2040-2511. Dostupné z: doi:10.1039/C7MD00030H

YAMADA, Nobuhisa, Kohichiroh YASUI, Osamu DOHI, Yasuyuki GEN, Akira TOMIE, Tomoko KITAICHI, Naoto IWAI, Hironori MITSUYOSHI, Yoshio SUMIDA, Michihisa MORIGUCHI, Kanji YAMAGUCHI, Taichiro NISHIKAWA, Atsushi UMEMURA, Yuji NAITO, Shinji TANAKA, Shigeki ARII and Yoshito ITOH, 2016. Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*. 35(4), 2228–2236. ISSN 1021-335X, 1791-2431. Dostupné z: doi:10.3892/or.2016.4619

YAMAGISHI, Nobuyuki, Ryota NAKAO, Rumi KONDO, Mai NISHITSUJI, Youhei SAITO, Takahisa KUGA, Takumi HATAYAMA and Yuji NAKAYAMA, 2014. Increased expression of sorcin is associated with multidrug resistance in leukemia cells via up-regulation of MDR1 expression through cAMP response element-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 448(4), 430–436. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.125

ZENG, Chen-Ming, Lin-Lin CHANG, Mei-Dan YING, Ji CAO, Qiao-Jun HE, Hong ZHU and Bo YANG, 2017. Aldo–Keto Reductase AKR1C1–AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 8, 119. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00119

ZENKEROVÁ, Katharina, 2021. *Vliv evobrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou enzymy redukujícími karbonylové skupiny*. B.m. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.

ZHAO, Mengli, Jiajin CHEN, Hongyu CHEN, Jingdong ZHANG and Dan LI, 2024. Aldo-keto reductases 7A subfamily: A mini review. *Chemico-Biological Interactions*. 391, 110896. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2024.110896

ZHU, Pengfei, Ruo FENG, Xu LU, Yuan LIAO, Zhicheng DU, Wenlong ZHAI and Kunlun CHEN, 2021. Diagnostic and prognostic values of AKR1C3 and AKR1D1 in hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 13(3), 4138–4156. ISSN 1945-4589. Dostupné z: doi:10.18632/aging.202380