

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

2019

Bc. Lenka Hudáčová

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**VLIV INHIBICE BOSUTINIBU, NERATINIBU A IBRUTINIBU NA  
AKTIVITU VYBRANÝCH REDUKTAS Z NADRODINY AKR A SDR**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2019

Bc. Lenka Hudáčková

## **POĎAKOVANIE**

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcemu školiteľovi diplomovej práce Prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, Ph.D. za odborné usmernenie a dôležité pripomienky pri spracovávaní jednotlivých častí práce. Zároveň by som sa chcela poďakovať RNDr. Eve Novotnej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a čas pri práci v laboratóriu.

## **PREHLÁSENIE**

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

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Lenka Hudáčová

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

Názov diplomové práce: Vliv inhibice bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na aktivitu vybraných reduktaz z nadrodiny AKR a SDR

Antracyklínové antibiotiká (ANT) patria do skupiny antineoplastických liekov. Radíme k nim daunorubicin (DAUN), ktorý sa používa k liečbe akútnej leukémie. Enzýmy nadrodín aldo-ketoreduktáz (AKR) a reduktáz/dehydrogenáz s krátkym reťazcom (SDR) redukovujú DAUN na príslušný C-13 alkohol daunorubicinol (DAUNOL), ktorý má vyššiu kardiotoxickú, menšiu antineoplastickú aktivitu a podieľa sa tak na vzniku antracyklínovej rezistencie.

Hlavným cieľom predkladanej diplomovej práce bolo stanoviť potenciálne inhibičné účinky bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na aktivitu enzýmov z nadrodín SDR a AKR.

K stanoveniu špecifickej aktivity enzýmov a inhibičných účinkov sme využili systém ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC), v ktorom sme stanovili produkt *in vitro* enzýmovej reakcie (DAUNOL). K stanoveniu cytotoxických účinkov DAUN a ibrutinibu na bunkové línie HCT 116 sme použili MTT test.

*In vitro* nameraná špecifická aktivita rekombinantných enzýmov klesala v poradí CBR1 > AKR1C3 > AKR1B1 > AKR1A1 > AKR7A2 > AKR1B10 > AKR1C1 > AKR1C2 > AKR1C4 > CBR3. Najefektívnejším inhibítorom bol ibrutinib, ktorý najintenzívnejšie inhiboval enzým AKR1C3 ( $K_i = 2,1 \mu\text{M}$ , nekompetitívny typ inhibície;  $IC_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ ). V experimentoch na bunkových líniah HCT116 kombinácia DAUN a ibrutinibu znížila viabilitu buniek nadmerne exprimujúcich AKR1C3.

Z výsledkov vyplýva, že kombinácia DAUN a ibrutinibu má potenciál zvýšiť terapeutický účinok a bezpečnosť ANT inhibíciou enzýmu AKR1C3.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Lenka Hudáčová

Supervisor: Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of diploma thesis: The influence of bosutinib, neratinib and ibrutinib inhibition on the activity of selected reductases from AKR and SDR superfamilies

Anthracycline antibiotics (ANTs) are antineoplastic drugs. Daunorubicin (DAUN) is used in the treatment of acute leukaemia. Enzymes from aldo-keto reductase (AKR) and short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamilies mediate the reduction of DAUN to its C-13 alcohol metabolite daunorubicinol (DAUNOL), which is more cardiotoxic, less antineoplastic and is causing anthracycline resistance.

In my diploma thesis, I examined the inhibitory effect of bosutinib, neratinib and imatinib on the activity of enzymes from the SDR and AKR superfamilies.

The specific enzyme activity and inhibitory effect were estimated on the base of *in vitro* enzymatic production of DAUNOL by the ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system. MTT assay was used to measure DAUN and ibrutinib cytotoxicity effect on HCT116 cell culture.

*In vitro* enzymatic activities for recombinant enzymes were decreased in order CBR1 > AKR1C3 > AKR1B1 > AKR1A1 > AKR7A2 > AKR1B10 > AKR1C1 > AKR1C2 > AKR1C4 > CBR3. The most effective inhibitor was ibrutinib. It inhibited the most enzyme AKR1C3 (non-competitive mode of inhibition,  $K_i = 2,1 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ ). Furthermore, experiments on HCT116 demonstrated that the combination of DAUN with ibrutinib decreased viability in AKR1C3 overexpressing cells.

Based on these findings, it is possible to presume that combination of DAUN and ibrutinib may have the potential to enhance the therapeutic effectiveness and safety of ANT via inhibition of AKR1C3.

## OBSAH

Úvod.....	8
1 Antracyklínové antibiotiká.....	9
1.1 Mechanizmus účinku antracyklínových antibiotík .....	10
1.2 Metabolizmus antracyklínových antibiotík.....	11
1.3 Hlavné enzýmy 2-elektrónovej redukcie .....	12
1.4 Kardiotoxicita antracyklínových antibiotík .....	16
1.5 Daunorubicin.....	20
1.5.1 Indikácie pre podanie daunorubicinu.....	20
1.5.1.1 Akútne leukémie .....	21
1.5.1.2 Kaposiho sarkóm asociovaný so syndrómom získaného imunodeficitu ..	26
2 Farmakologická stratégia využitia inhibítorov tyrozínkináz k redukcii toxicity antracyklínových antibiotík .....	27
3 Cieľ práce.....	30
4 Materiál a metodika.....	31
4.1 Materiál .....	31
4.1.1 Chemikálie a reagensy .....	31
4.1.2 Rekombinantne pripravené enzýmy .....	31
4.1.3 Inhibítory .....	32
4.1.4 Bunkové línie .....	32
4.1.5 Pomôcky a prístroje .....	32
4.2 Prístroje .....	33
4.3 Princíp používanej reakcie .....	34
4.4 <i>In vitro</i> experimenty.....	34
4.4.1 Príprava roztokov.....	34
4.4.2 Príprava reakčných zmesí a preinkubácia.....	36
4.4.3 Vlastná enzýmová reakcia .....	38

4.4.4	Príprava vzorku a analýza UHPLC.....	39
4.4.5	Spracovanie nameraných dát .....	39
4.5	Experimenty na bunkových líniách.....	41
4.5.1	Príprava roztokov.....	41
4.5.2	Vlastná enzýmová reakcia a zmeranie viability buniek.....	42
4.5.3	Spracovanie nameraných dát .....	43
5	Výsledky a diskusia .....	44
5.1	Porovnanie špecifických aktivít vybraných karbonyl redukujúcich enzýmov voči substrátu DAUN.....	44
5.2	Skríning schopnosti vybraných TKi inhibovať aktívne DAUN redukujúce enzýmy. ....	46
5.2.1	Bosutinib.....	47
5.2.2	Neratinib .....	49
5.2.3	Ibrutinib .....	51
5.2.4	Súhrn inhibičných účinkov bosutinibu, neratinibu a ibritinibu .....	53
5.3	Stanovenie $IC_{50}$ , $K_i$ a typu inhibície pre inhibítor ibrutinib a enzým AKR1C3 .	54
5.3.1	Stanovenie hodnoty $IC_{50}$ pre inhibítor ibrutinib a enzým AKR1C3 .....	55
5.3.2	Stanovenie typu inhibície a hodnoty $K_i$ .....	56
5.4	Inhibičný účinok ibrutinibu na aktivitu enzýmu AKR1C3 v bunkových líniách	57
6	Záver .....	62
7	Zoznam skratiek a značiek .....	64
8	Literatúra.....	66



## ÚVOD

Antracyklínové antibiotiká (ANT) patria do skupiny antineoplastických liekov, ktoré sa používajú k liečbe nádorových ochorení. Mechanizmus ich účinku spočíva v interkalácii cytostatika do molekuly deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) a v inhibícii  $\alpha$  izoméru enzýmu topoizomeráza II (TOPOII $\alpha$ ). Tieto zásahy do nádorovej bunky spôsobia zástavu replikácie DNA, delenia bunky a jej zánik. Medzi nežiadúce účinky vysokých dávok a dlhotrvajúcej liečby ANT patrí život ohrozujúca kardiotoxicita. Jej vznik indukujú okrem iného aj príslušné alkoholové metabolity ANT, ktoré zároveň vykazujú menšiu antineoplastickú aktivitu. Oba faktory, tak prispievajú k zlyhaniu antineoplastickej liečby.

Medzi známymi zástupcami ANT patrí daunorubicin (DAUN), ktorý sa využíva najmä v hematológii k dosiahnutiu remisie u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (AML) a akútnou lymfoblastickou leukémiou (ALL).

Bosutinib, neratinib a ibrutinib patria do skupiny liekov inhibujúcich aktivitu tyrozínkináz (TKi), membránových adenosíntrifosfát viažucich transportérov (ABC transportéry) a špecifických enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme DAUN a ostatných ANT. Jedná sa o karbonyl redukujúce enzýmy z nadrodín aldo-keto reductáz (AKR) a dehydrogenáz/reduktáz s krátkym reťazcom (SDR), ktoré katalyzujú 2-elektrónovú redukciu ANT na ich príslušné alkoholy, teda premenu DAUN na daunorubicinol (DAUNOL).

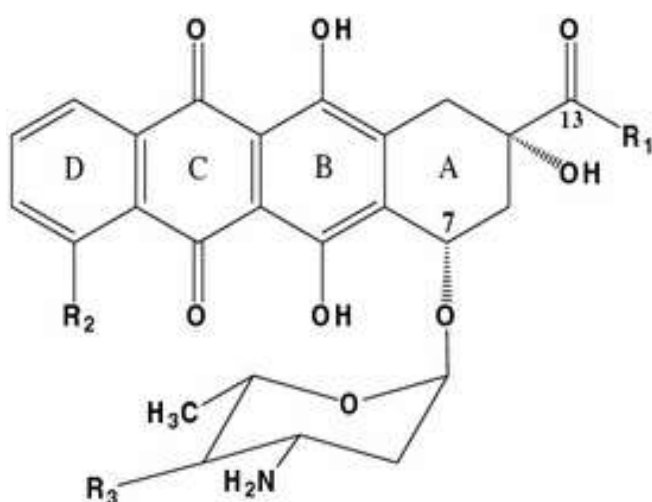
Hlavným cieľom predkladanej diplomovej práce bolo štúdium potenciálnych inhibičných účinkov vybraných TKi (bosutinib, neratinib, ibrutinib) na aktivitu DAUN redukujúcich enzýmov z nadrodín SDR (karbonylreduktázy (CBR) 1 a 3) a AKR (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2).

Získanie aktívneho inhibítora najaktívnejších enzýmov voči substrátu DAUN by mohlo viesť k zlepšeniu terapie. Inhibíciou enzýmov sa dosiahne zvýšenie antineoplastického účinku DAUN a zníži sa tak kardiotoxicita liečby.

# 1 ANTRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ

ANT patria do skupiny protinádorových liekov, ktoré sa používajú od roku 1960 k liečbe neoplastických ochorení (hematoonkologických i solídnych tumorov) v monoterapii alebo v kombinácii s inými liekmi. DAUN a doxorubicin (DOX) boli izolované z *Streptomyces peucetius*, ale aj ďalších druhov baktérií. Od ich štruktúry bolo následne odvodených množstvo analógov, napríklad idarubicín (IDA), epirubicin (EPI), karminomycin, pirarubicin, aclarubicin, valrubicin a zorubicin (Edwardson et al. 2015). Mechanizmus ich účinku spočíva v interkalácii cytostatika do molekuly DNA a v inhibícii  $\alpha$  izoméru enzýmu topoizoméráza II (TOPOII $\alpha$ ). Tieto zásahy do nádorovej bunky spôsobia zástavu replikácie DNA, delenia bunky a jej deštrukciu (Klener Pavel a jr. Klener Pavel 2009). ANT sú podávané intravenózne, metabolizované pečeňou, vylučované žľou a čiastočne močom (Puma et al. 2008). Počas liečby chemoterapeutikami v niektorých prípadoch vzniká rezistencia a vedľajšie toxické účinky, nie je tomu žiaľ inak ani pri liečbe ANT. Ich užívanie je značne limitované život ohrozujúcou kardiotoxicitou (Puchnerová et al. 2016).

Na obr. 1 je základná chemická štruktúra ANT. Sú to planárne molekuly obsahujúce rigidný hydrofóbny tetracyklínový kruh s daunosaminovým cukrom, ktorý je viazaný glykozidickou väzbou. Chinónové a hydrochinónové substituenty na dvoch zo 4 planárnych kruhov, zohrávajú dôležitú rolu pri ich metabolizme (Edwardson et al. 2015).

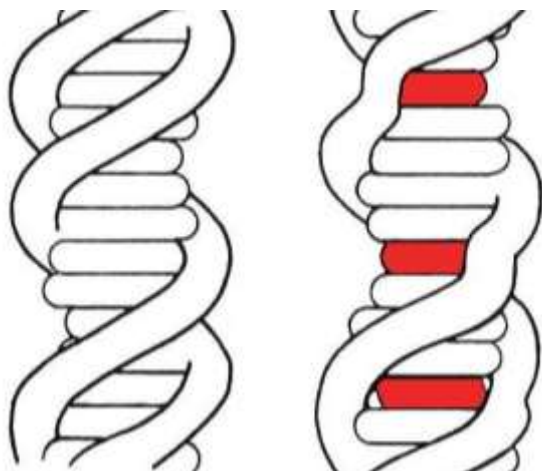


Obr. 1 Základná štruktúra ANT (Menna et al. 2007)

DOX: -R<sub>1</sub>: CH<sub>2</sub>OH, -R<sub>2</sub>: OCH<sub>3</sub>, -R<sub>3</sub>: OH<sub>ax</sub>; DAUN: -R<sub>1</sub>: CH<sub>3</sub>, -R<sub>2</sub>: OCH<sub>3</sub>, -R<sub>3</sub>: OH<sub>ax</sub>;  
EPI: -R<sub>1</sub>: CH<sub>2</sub>OH, -R<sub>2</sub>: OCH<sub>3</sub>, -R<sub>3</sub>: OH<sub>eq</sub>, IDA: -R<sub>1</sub>: CH<sub>3</sub>, -R<sub>2</sub>: H, -R<sub>3</sub>: OH<sub>ax</sub>

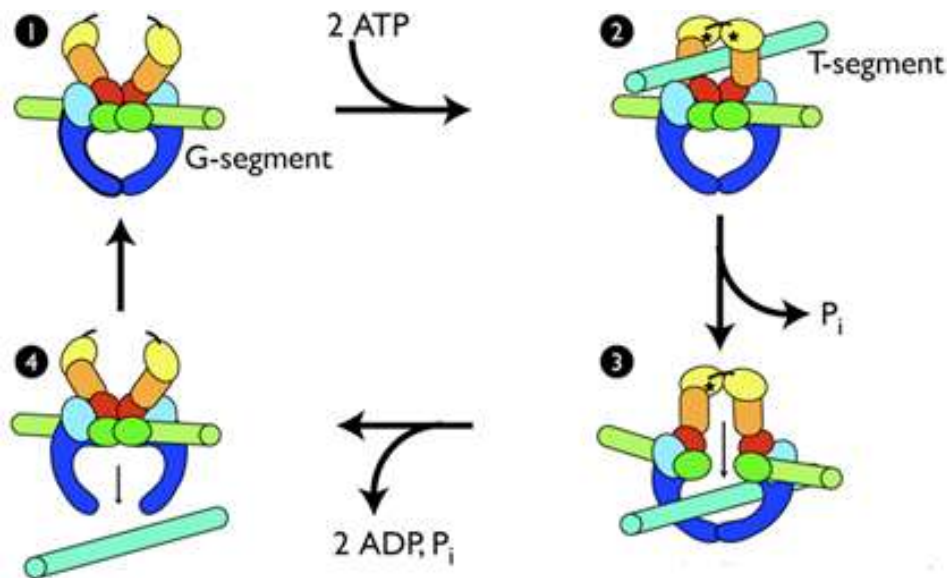
## 1.1 Mechanizmus účinku antracyklínových antibiotík

ANT sú schopné vytvárať nekovalentné, vodíkovými mostíkmi viazané komplexy s DNA. Inkorporujú sa medzi DNA bázičné páry (Obr. 2) a spôsobujú v molekule DNA nádorových buniek vznik zlomov, inhibíciu polymerázovej aktivity, procesov replikácie, transkripcie DNA a syntézy ribonukleovej kyseliny (RNA). Týmto spôsobom zasahujú do procesu génovej exprese (QUIGLEY et al. 1980, Klener Pavel a Klener jr. Pavel 2009).



Obr. 2 Interkalácia do molekuly DNA (Cytostatika 2018)

ANT sú okrem interkalácie do molekuly DNA schopné inhibície aktivity enzýmu  $\text{TOPOII}\alpha$  v nádorových bunkách. Topoizomeráza II ( $\text{TOPOII}$ ) je enzým potrebný pre priebeh replikácie a transkripcie DNA. Štiepi oba reťazce pravotočivej konformácie dvojvláknovej deoxyribonukleovej kyseliny (dsDNA) za spotreby dvoch molekúl adenosíntrifosfátu (ATP). Miestom prerušenia následne premiestni druhý neporušený dsDNA úsek a reťazce opäť zacíli, zavádza tak negatívne seperhelikálne otáčky (Hande 2008). Mechanizmus katalytickej aktivity  $\text{TOPOII}$  je zobrazený na obr. 3. ANT sa viaže a stabilizuje komplex DNA –  $\text{TOPOII}\alpha$ , čím znemožní priebeh procesov replikácie a transkripcie DNA (Lehmann et al. 2004; Vavrova et al. 2013).

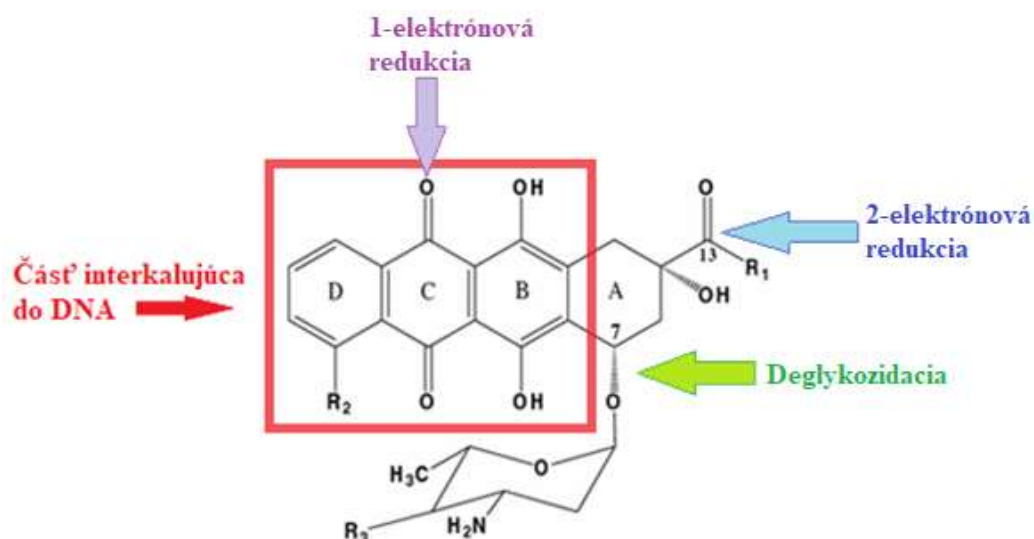


Obr. 3 Mechanizmus katalytickej aktivity TOPOII (Schoeffler a Berger 2005)

## 1.2 Metabolizmus antracyklínových antibiotík

U ľudí je istá časť ANT vylúčených z tela bez akýchkoľvek zmien v ich štruktúre, zvyšná časť je spracovaná v jednej z troch hlavných metabolických ciest (Obr. 4), ktorých metabolity podporujú alebo naopak potláčajú antineoplastický účinok ANT, niektoré sú zas príčinou nežiadúcich účinkov užívania lieku.

- 2-elektrónová redukcia na karbonylovej skupine uhlíku C-13 je katalyzovaná skupinou heterogénnych, ubikviterných cytozolických a nikotínadenín-dinukleotidfosfát (NADP(H))-dependentných reductáz. Do tejto skupiny patria enzýmy nadrodín SDR a AKR. Výsledkom tejto cesty biotransformácie je príslušný sekundárny alkohol, v prípade DAUN je to DAUNOL (Minotti et al. 2004).
- 1-elektrónová redukcia je katalyzovaná reductázou cytochrómu P450, NADP(H)-dehydrogenázov, syntázou oxidu dusnatého (NOs), xantínoxidázov a vedie k premene chinónov na semichinónový radikál (Edwardson et al. 2015).
- Redukčná deglykozidácia tvorí približne 1-2% metabolizmu ANT, je katalyzovaná NADP(H)-dependentnými hydrolázami a reductázami typu glykozidáz, NADP(H)-chinónoxidoreductázou, NADP(H)-cytochróm P450 reductázou a xantíndehydrogenázou (Mordente et al. 2003). Redukčnou deglykozidáciou sa odštiepi daunosamin za vzniku 7-deoxyglykonu (v mitochondriách) a hydroxyglykonu (v cytozole) (Licata et al. 2000).



Obr. 4 Metabolizmus ANT (Menna et al. 2007, s vlastnou úpravou)

### 1.3 Hlavné enzýmy 2-elektrónovej redukcie

SDR a AKR sú veľké nadrodiny reductáz aldehydov a ketónov. Katalyzujú 2-elektrónovú redukciu ANT za vzniku ich sekundárnych alkoholov.

SDR sú jednou z najrozsiahlejších nadrodín enzýmov. Doteraz bolo u človeka identifikovaných viac než 80 členov. Napriek spoločným štruktúrnym vlastnostiam, akými sú väzbové miesto pre kofaktor a katalytická tetráda, tak vzájomne zdieľajú približne len 20% aminokyselínovej (AK) sekvencie. Sú to nikotínamidadeninukleotid (NAD(H)) alebo NADP(H)-dependentné oxidoreduktázy, medzi ich substráty patria cukry, retinoidy, lipidy, steroidy a xenobiotika. Ovplyvňujú tak intermediárny metabolizmus, signálne molekuly a redoxný stav RNA signálizácie (Bhatia et al. 2015, Bray et al. 2009, Zemanová et al. 2019). Subcelulárne sú lokalizované v cytozole, mitochondriálnej matrix, hladkom endoplazmatickom retikule a peroxizómoch (Bhatia et al. 2015).

Z SDR nadrodiny premenu DOX na doxorubicinol (DOXOL) podľa výsledkov štúdií katalyzujú CBR1, CBR3 lokalizované v cytozole (Forrest et al. 2000, Schaupp et al. 2015, Bains et al. 2010, Kassner et al. 2008). Miernu aktivitu vykazuje aj enzým mitochondriálnej matrix CBR4 (Bains et al. 2010b).

Z SDR nadrodiny premenu DAUN na DAUNOL podľa výsledkov štúdií katalyzujú CBR1, CBR3 a v menšej miere aj CBR4 (Bains et al. 2010b).

CBR1 (SDR21C1) je jeden z najdôležitejších cytozolických NADP(H)-dependentných reductáz katalyzujúcich redukciu rôznych endogénnych (prostaglandíny, S-nitrozoglutation,) a xenobiotických (o-chinony a p-chinóny, ANT, DOX, DAUN, haloperidol, warfarin,) ketónov a chinónov (UniProtKB 2019). Tento enzým je exprimovaný vo väčšine ľudského tkaniva. Najmä v pečeni, obličkách, vaječníkoch, prsníkoch a vaskulárnych endoteliárnych bunkách. Znížená expresia CBR1 je asociovaná so zvýšenou proliferáciou a tumorgenézou spojenou so stratou expsie E-kadherínu a aktiváciou metaloproteináz matrixu. Znížená expresia sa už typicky vyskytuje pri rakovine maternice, vaječníkoch, krčku maternice a rakovine dlaždicových buniek ústnej dutiny. Nízka expresia CBR1 sa stala ukazateľom zlej prognózy a vysokej pravdepodobnosti vzniku metastáz do lymfatických uzlín (Nishimoto et al. 2018; Yamanouchi et al. 2018).

CBR3 (SDR21C2) je taktiež cytozolická NADP(H)-dependentná reductáza. Napriek tomu, že s CBR1 zdieľa 72% AK sekvencie, tak má ďaleko vyššiu substrátovú selektivitu (o-chinóny, isatin, oracin, doxorubicin, DAUN), a väčšinou vykazuje len malú afinitu k substrátom CBR1. Príčinou je predovšetkým odlišný tvar aktívnych miest a vlastnosti povrchov (Rotondo et al. 2016; Pilka et al. 2009).

AKR sú nadrodinou cytozolických oxidoreduktáz využívajúcich NAD(H)/NADP(H) ako kofaktor pri redukcii ketónov a aldehydov na ich sekundárne a primárne alkoholy. Pre ich priestorové usporiadanie je charakteristická prítomnosť  $(\alpha/\beta)_8$  alebo triosafosfátizomerázový súdkového motívu. V ich nomenklatúre prvá arabská číslica predstavuje zaradenie do jednej zo 16 rodín (zhoda minimálne v 40% AK sekvencie), nasledujúce písmeno predstavuje zaradenie do príslušnej podrodiny (minimálne 60% zhoda v AK sekvencii), posledná arabská číslica reprezentuje unikátnu proteínovú sekvenciu jedného zo 190 členov nadrodiny. AKR sú charakteristické nízkou substrátovou selektivitou, majú schopnosť katalyzovať ako premenu endogénnych (sacharidy, ketosteroidy, ketoproglandíny), tak i exogénnych látok (nikotinové nitrozamíny, polycyklické aromatické uhl'ovodíky, trans-dihydrodioly) (Edwardson et al. 2015; Penning 2015).

Z AKR premenu DOX na DOXOL podľa výsledkov štúdií katalyzujú AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, AKR1C4 (Bains et al. 2010, Kassner et al. 2008),

a v menšej miere aj AKR1C1, AKR1C2, AKR7A2 (Bains et al. 2010b; Takanashi et al. 2008; Kassner et al. 2008).

Z AKR premenu IDA na idarubicinol (IDAOL) podľa výsledkov štúdií katalyzujú AKR1B10 a AKR1C3 (Hofman et al. 2014; Zhong et al. 2011).

Z AKR premenu DAUN na DAUNOL podľa výsledkov štúdií katalyzujú AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2 (Bains et al. 2010b; Kassner et al. 2008; Takanashi et al. 2008; Breyer-Pfaff et al. 2004; Zhong et al. 2011; Hofman et al. 2014), a miernu aktivitu prejavujú AKR1C1, AKR1C2 (Bains et al. 2010b).

AKR1A1 je ubikviterný cytozolický enzým, najviac zastúpený v mozgu, obličkách, hrubom a tenkom čreve, pečeni a štítnej žľaze. Katalyzuje redukciu širokého spektra aromatických a alifatických aldehydov so stredne dlhým reťazcom na ich príslušné alkoholy. Vysokú afinitu má k p-karboxybenzaldehydom, p-nitrobenzaldehydom, pyridin-3-aldehydom, pyridin-4-aldehydom, D-glukuronátu a chemoterapeutiku DAUN. Z fyziologických substrátov katalyzuje redukciu mevaldátu na mevalónovú kyselinu, glyceraldehydu na glycerol, čím sa zapája do biosyntézy cholesterolu a triacylglycerolov. Enzým AKR1A1 je však schopný aj oxidácie trans-dihydrodiolových metabolitov polycyklických aromatických uhl'ovodíkov na o-chinóny, ktoré predstavujú vysoko karcinogénne aktívne látky (Palackal et al. 2001). Taktiež vykazuje aktivitu prostaglandín-F-syntázy v endometriu. Podobne ako AKR1C3 sa môže podieľať na vzniku patologických stavoch asociovaných so ženským reprodukčným systémom a ischemickým stavom (Lacroix Pépin et al. 2013).

AKR1B1 katalyzuje redukciu aldehydov vznikajúcich pri peroxidácii lipidov, steroidov a ich derivátov, retinoidov, xenobiotik a prostaglandínov. Zohráva hlavnú úlohu pri vzniku komplikácií u diabetes mellitus. Katalyzuje prvý krok v polyolovej cesty, redukuje glukózu na sorbitol za spotreby kofaktora NADPH, sorbitol je sorbitoldehydrogenázou (využíva  $\text{NAD}^+$  ako kofaktor) premenený na fruktózu. Za normoglykemických podmienok sú len 3% z glukózy premenené na sorbitol. Za hyperglykemických podmienok môže dôjsť k premene až 30% glukózy na sorbitol a dochádza k jeho hromadeniu. Výsledkom je osmotický stres bunky a nerovnováha piridín nukleotid redoxného stavu. Dôjde k poklesu antioxidantných schopností bunky. U diabetes mellitus je tento dej príčinou vzniku konečných produktov pokročilej neenzýmovej glykácie, tzv. AGEs. Vedú ku vzniku mikroangiopatie, neuropatie,

retinopatie, periférnej neuropatie a katarakty (Seliger et al. 2018). Vysoká expresia enzýmu AKR1C3 sa tiež spája s rakovinou hrubého čreva, kataraktou, mnohočetným myelómom, akútnou leukémiou (TCF3-PBX1; 11q23 MLL) (Laffin a Petrash 2012). Enzým AKR1B1 disponuje funkciou prostaglandín-F-syntázy a podieľa sa na vzniku patologických stavoch asociovaných so ženským reprodukčným systémom, ischemickými a zápalovými stavmi (Bresson et al. 2012).

AKR1B10 je enzým exprimovaný v žľaze nadobličiek, tenkom a hrubom čreve. Zvýšená expresia AKR1B10 bola zachytená už v prekanceróznych tkanivách a následne u rakoviny pľúc, pankreasu a hepatocelulárneho karcinómu. Naopak znížená expresia enzýmu bola zachytená pri rakovine gastrointestinálneho traktu (Huang et al. 2016). Enzým AKR1B10 reguluje procesy bunkovej proliferácie a diferenciácie cez prenyláciu onkoproteínov (proteín Ras) a metabolizmus retinoidov. Membránové proteíny ako Ras a proteínu Ras príbuzné guanosíntrifosfát-viažúce proteíny sa zapájajú do procesov bunkového rastu a diferenciácie. Táto ich funkcia je závislá od prenylácie. V tomto kroku zohráva veľkú rolu enzým AKR1B10, ktorý redukuje farnesol a geranylgeraniol na farnesol a geranylgeraniol. Ďalej sú fosforylované na farnesyl a geranylgeranyl pyrofosfáty, dva hlavné intermediáty syntézy cholesterolu a prenylácie proteínov. Zvýšená expresia AKR1B10 v neoplastických bunkách zintenzívni prenyláciu protoonkoproteínov a akceleruje sa vznik nádorového ochorenia. (Seliger et al. 2018). Ďalšou úlohou enzýmu AKR1B10 je redukcia retinaldehydov na ich príslušné retinoly. Pričom sa znižuje bunková koncentrácia retinovej kyseliny, signálnej molekuly zapojenej do bunkovej proliferácie a diferenciácie (Huang et al. 2016). AKR1B10 taktiež podporuje rast buniek a ich prežívanie cez moduláciu syntézy lipidov a funkcií membrán. Znižuje degradáciu acetylkoenzým-A-carboxylázy- $\alpha$ , enzýmu, ktorým je regulovaná syntéza mastných kyselín cez ubiquitín – proteasómovú cestu, napríklad mastné kyseliny, ktoré sú esenciálnym komponentom bunkových membrán rakovinových buniek prsníka (Ma et al. 2008; Wang et al. 2009).

AKR1C3 má dôležitú úlohu v premene androstendionu na testosterón a estrónu na estradiol. Je exprimovaný v pečeni, prostate a v mliečnej žľaze (Edwardson et al. 2015). Enzým AKR1C3 je zároveň exprimovaný aj pri patologických stavoch, napríklad rakovine prostaty, prsníka, maternice, krvi, pľúc, mozgu a obličiek. Hladina zvýšenej expresie väčšinou koreluje so stupňom invázie a agresie tumoru. Podieľa sa na vzniku hormón dependentných a independentných typov rakovín. U rakoviny prostaty AKR1C3



v úlohe 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázy konvertuje androstendion na testosterón, ktorý aktivuje androgenové receptory a podporuje rast tumoru. U rakoviny prsníka je zvýšená expresia AKR1C3 dôvodom zvýšenej produkcie testosterónu, ktorý je aromatázou konvertovaný na 17 $\beta$  – estradiol. Ten stimuluje proliferáciu rakovinových buniek prsníka a endometria. Navyše enzým AKR1C3 je schopný priamo redukovať estrón a progesterón na 17 $\beta$  – estradiol a 20 $\alpha$  – hydroxyprogesterón. AKR1C3 v úlohe prostaglandín-F-syntázy katalyzuje premenu prostaglandínu H<sub>2</sub> na prostaglandín F<sub>2 $\alpha$</sub>  a redukcii prostaglandínu D<sub>2</sub> na 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -prostaglandín F<sub>2</sub>. U oboch izomérov prostaglandínu F<sub>2</sub> boli potvrdené proliferatívne a prozápalové účinky. Navyše ich produkciou dochádza k zníženiu produkcie protizápalového, antineoplasticky pôsobiaceho a diferenciáciu podporujúceho prostaglandínu J<sub>2</sub> z prostaglandínu D<sub>2</sub>. (Byrns et al. 2011). Práve tento metabolizmus prostaglandínov je príčinou zastavenia diferenciácie leukemických buniek (Khanim et al. 2009). Enzým AKR1C3 je zároveň ako enzým prvej fázy biotransformácie zodpovedný za vznik rezistencie pri liečbe rôznych nádorových ochorení. Podieľa sa na premeňe antineoplasticky aktívnych aldehydov a ketónov na ich príslušné hydroxy metabolity so zvýšenou rozpustnosťou vo vode a urýchlenou elimináciou z tela. K takto eliminovaným liekom napríklad patria DAUN, idarubicín, cisplatin (Hofman et al. 2014; Matsunaga et al. 2013).

AKR7A2 je enzým najviac exprimovaný v mozgu, pečeni, obličkách. Plní predovšetkým fyziologickú funkciu. Účastní sa na metabolizme  $\gamma$ -aminomaslovej kyseliny v centrálnom nervovom systéme (Picklo et al. 2001). Vykazuje aktivitu voči produktom lipoperoxidácie, chráni organizmus pred ROS a plní dôležitú úlohu pri chorobách spojených s oxidatívnym stresom. Interaguje s cytoglobínom, globínovou bielkovinou podieľajúcou sa rovnako na ochrane buniek pred ROS, reaktívnymi formami dusíka, stavom hypoxie a oxidačným stresom (Li et al. 2016).

#### **1.4 Kardiotoxicita antracyklínových antibiotík**

Počas liečby ANT dochádza k štruktúrnym a funkčným zmenám v srdci, ku vzniku akútnej a chronickej kardiotoxicity (Singal a Iliskovic 1998; Bristow et al. 1978). Ich toxické pôsobenie narúša progenitorové bunky srdca, fibroblasty, vedie k poškodeniu mikrovaskulárnej štruktúry a kontraktility srdcového svalu. Pre oslabené srdce je náročné sa zotaviť z toxického poškodenia o to viac ak sa u pacienta vyskytujú niektoré rizikové faktory:

- prekročenie odporúčanej hodnoty kumulatívnej dávky ANT
- vek: deti mladšie ako 4 roky a dospelý nad 65 rokov
- pohlavie: viac ohrozené sú ženy
- rizikové faktory vzniku kardiovaskulárnych ochorení: hypertenzia, hypelipidemia, nadváha, diabetes, životospráva (nedostatok pohybu, fajčenie, požívanie alkoholu, stres, nezdravá strava)
- choroby pečene
- čierna rasa
- Downov syndrom (trizómia 21)
- kombinovanie chemoterapie s rádioterapiou
- súčasné podávanie iných chemoterapeutík (cyklofosfamid, fluorouracil, bleomycin, vinkristin, mitoxantron, trastuzumab).
- jednonukleotidové polymorfizmy (SNP), ktoré interindividuálne ovplyvňujú aktivitu enzýmov metabolizujúcich ANT (Puma et al. 2008; Singal a Iliskovic 1998; Reinbolt et al. 2016; Sadurska 2015).
- SNP, ktoré interindividuálne ovplyvňujú prenos liečiv cez membránové ABC transportéry (Megías-Vericat et al. 2017).

Akútna kardiotoxicita manifestuje zmenami v elektrokardiografe, miernou hypotenziou, srdcovou arytmiou, perikarditídou a myokarditídou. Subakútna kardiotoxicita sa prejavuje ako zníženie ejekčnej frakcie ľavej komory srdca.. Medzi chronické príznaky už väčšinou ireverzibilného poškodenia srdcového svalu patrí spočiatku vďaka kompenzačným mechanizmom asymptomatická kardiomyopatia, ktorá prechádza do zlyhania systolických a diastolických funkcií srdca až náhleho infarktu myokardu (Sadurska 2015; Puchnerová et al. 2016).

Zvláštnu pozornosť by mal onkológ venovať minimalizácii vzniku chronickej kardiotoxicity zvlášť pri liečbe pacientov detského veku, nakoľko po dosiahnutí remisie musia s následkami poškodenia srdca žiť po celý život (Puma et al. 2008). Napriek tomu výsledky štatistických prieskumov hovoria, že akútne príznaky (1-1,6%) kardiotoxicity sa počas liečby ANT u detí prejavujú menej často ako subakútne (57%) a chronické (16%) príznaky. Celkovo sú kardiovaskulárne problémy až 8-krát častejšou príčinou smrti u pacientov liečených ANT v porovnaní s bežnou populáciou (Puma et al. 2008).

Patofyziológia ANT kardiotoxicity je zložitým a komplexným mechanizmom, ktorý nie je dodnes úplne objasnený. Vďaka rozsiahlym vedeckým štúdiám *in vitro* a *in vivo* vedci navrhli niekoľko mechanizmov, ktorými kardiotoxicita môže vznikat'.

### **Hypotéza oxidačného stresu**

1-elektrónovou redukciou ANT sa tvorí semichinónový radikál, ktorý je stabilný v neoxigenačných podmienkach. V prítomnosti kyslíka ľahko reoxiduje na parentný chinón za tvorby superoxidu, ktorý môže byť ďalej konvertovaný na peroxid vodíka alebo hydroxilový anión, čo sú vysoko reaktívne formy kyslíka (ROS). Výsledkom ich vzájomného pôsobenia je peroxidácia lipidov bunkových membrán, degradácia proteínov, poškodenie DNA (Reinbolt et al. 2016).

Srdce je orgánom bohatým na mitochondrie a žiaľ najviac subcelulárne poškodenou organelou kardiomyocytov sú mitochondrie, a to z dôvodu že obsahujú málo metabolicky aktívnych antioxidantov (peroxidáza, kataláza, superoxid dizmutáza, glutationperoxidáza) a nedokážu sa brániť pred ROS. Poškodením energetického centra dôjde k deštrukcii bunky, pri väčšom počte i srdcového svalu a samotného srdca (Ghigo et al. 2016).

### **Ovplyvňovanie signalizačných dráh voľného železa**

Alkoholy ANT (-ol metabolity) tvoria komplexy s voľným trojmocným iónom železa a spoločne sa podieľajú na tvorbe ROS (Fentonová reakcia, tvorba hydroxylového radikálu), ktoré sú pravdepodobne schopné narušiť štruktúru feritínu a uvoľniť z neho ďalšie železo. Ďalej interferujú s proteínmi, ktoré regulujú transkripciu hlavných Fe transportných a viažucich proteínov. Znižujú tak syntézu feritínu a zvyšujú expresiu transferinového receptora. Výsledkom je zvýšenie koncentrácie voľného železa v bunke a poškodenie bunky (Ghigo et al. 2016; Menna et al. 2007).

### **Vplyv na NOs**

NOs katalyzuje premenu AK L-arginínu na L-citrulín za uvoľnenia radikálu oxidu dusnatého. Endoteliárna NOs je lokalizovaná v endoteliálnych koronárnych bunkách. Hlavnou úlohou vyprodukovaného oxidu dusnatého je vazodilatácia, teda regulácia krvného tlaku. ANT sa viaže na reduktázovú doménu endoteliálnej NOs. V prítomnosti NADPH dôjde k 1-elektrónovej redukcii ANT za vzniku semichinónu, ktorého toxickú úlohu sme už popísali v kapitole 1.4. ANT indukujú tiež transkripciu endoteliálnej NOs.

Vo výsledku dochádza k zníženej syntéze oxidu dusnatého (narušenie regulácie krvného tlaku), zvýšenej syntéze endotelialnej NOs a k produkcii ROS (Vásquez-Vivar et al. 1997, Jang et al. 2013).

### **Degradácia kontraktilných proteínov srdca**

Titín je veľký elastický proteín sarkomer, dôležitý pre správne fungovanie svalového sťahu. Jeho degradáciou (najmä v dôsledku pôsobenia ROS) sa spustí postupná degradácia myofilamentov srdca, ktorá vedie až k dysfunkcii diastoly a systoly. Ďalším potencionálnym cieľom pôsobenia ANT je dystrofin. Jeho degradácia by mohla byť príčinou vzniku dilatáčnej kardiomyopatie (Chen et al. 2011).

### **Vplyv na fyziológiu bunkových a organelových membrán**

Lipofilné metabolity ANT, aglykony, sa vmedzerujú do bunkových a organelových membrán (napríklad do mitochondrií bohatých na kardiolipín) a ovplyvňujú ich tvar i permeabilitu. Navyše ANT tak môžu pasívne prechádzať do intracelulárneho priestoru bunky/organely a zvyšovať svoje toxické pôsobenie (Neidle a Sanderson 1984).

### **Narušenie $\text{Ca}^{2+}$ homeostázy**

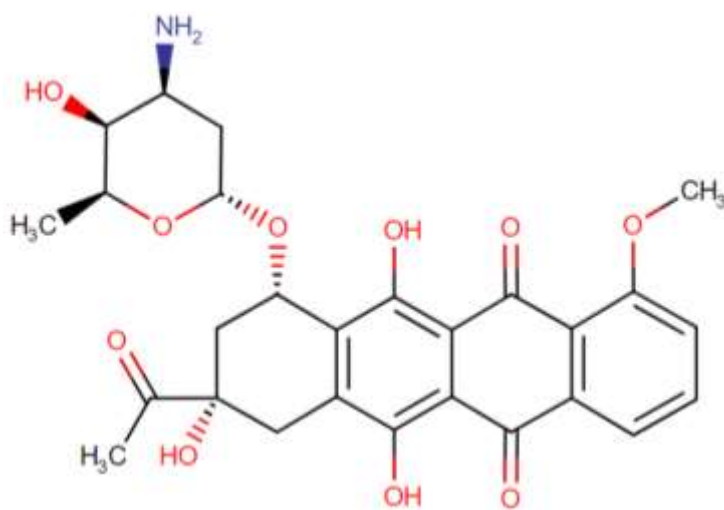
ANT metabolity 2-elektrónovej redukcie, alkoholy ako napríklad DAUNOL inhibujú uvoľnenie  $\text{Ca}^{2+}$  zo sarkoplazmatického retikula a potlačajú expresiu  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov sarkoplazmatického retikula (Menna et al. 2007). V kardiomyocyte sa naruší pravidelne prebiehajúca fyziologická zmena koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$ , ktorá je potrebná na priebeh svalovej kontrakcie, naruší sa inotropný a lusitropný stav (pozitvne inotropný a negativne lusitropný) (Piska et al. 2017).

### **Inhibícia $\beta$ izoméru topoizomerázy II (TOPOII $\beta$ )**

Antineoplastický účinok ANT spočíva v interakcii s TOPOII $\alpha$  a DNA v nádorovej bunke. V jadre a v mitochondriách kardiomyocytov sa však nachádza TOPOII $\beta$ , na ktorú sa ANT viaže a iniciuje poškodenie mitochondrií, tvorbu ROS, a zánik kardiomyocytov (Marinello et al. 2018; Ghigo et al. 2016; Cappetta et al. 2017; Vavrova et al. 2013).

## 1.5 Daunorubicin

(8*S*,10*S*)-8-acetyl-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- $\alpha$ -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracen-5,12-dion-hydrochlorid (Obr. 5), s molekulovým vzorcom  $C_{27}H_{30}ClNO_{10}$  a molekulovou hmotnosťou 563,99 g/mol. Patrí medzi ANT, ktoré sa využívajú najmä k liečbe hematologických ochorení. Liek je dostupný v podobe oranžovočerveného prášku alebo už pripraveného roztoku na intravenózne podanie. Dávkovanie lieku závisí od indikácie, veku pacienta, renálnych a hepatálnych funkcií (Drug record daunorubicin 2018). Medzi vedľajšími účinkami liečby sa najčastejšie vyskytuje supresia krvotvornej funkcie kostnej drene (KD), nevoľnosť, zvracanie, hnačky, alopecia, podráždenie kože, červená farba moču, horúčka. Niekedy môže dôjsť k zvýšeniu hladiny sérových transamináz, vzniku veno-oklúznej choroby pečene a akútnemu zlyhaniu pečene. Vysoké dávky a dlhotrvajúca liečba môžu spôsobiť závažnú kardiotoxicitu, vid' kapitolu 1.4 (Drug report daunorubicin 2018). V našej diplomovej práci sa budeme venovať práve inhibícii vzniku kardiotoxického metabolitu DAUNOLU.



Obr. 5 DAUN (Daunorubicin 2019)

### 1.5.1 Indikácie pre podanie daunorubicinu

DAUN je široko využívaný v hematológii k dosiahnutiu remisie u dospelých pacientov s AML (myeloidnej, monocytárnej, erytroidnej vývojovej rady) (Gong et al. 2015), u detí a dospelých s ALL (Du et al. 2017). Liposomálna forma DAUN je dostupná ako liek prvej voľby u Kaposiho sarkómu asociovaného so syndrómom získaného imunodeficitu (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) (American Academy of HIV Medicine 2017).

### 1.5.1.1 Akútne leukémie

Akútne leukémie sú klonálne zhubné nádorové chorenia ľudského organizmu. Vznikajú malígnou transformáciou hematopoetickej kmeňovej bunky. Podľa toho, či malígna transformácia postihuje bunky myeloidného alebo lymfoidného radu, delíme akútne leukémie do dvoch základných skupín AML a ALL. Občas môže leukemický klon vykazovať znaky oboch línií vtedy hovoríme o tzv. akútnych leukémiách nejasnej línie. Každá z týchto základných skupín následne podlieha osobitnému deleniu, ktoré je zhrnuté v tab. 1 (Kubisz et al. 2006).

Tab.1 Klasifikácia akútnych leukémii podľa Svetovej zdravotnickej organizácie (Šustková a Ráčil 2016)

<b>AML</b>
1. AML s rekurentnými genetickými abnormalitami
AML s t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
AML s inv(16)(p13.1q22) alebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
Akútna promyelocytárna leukémia s t(15;17)(q22;q12) (PML-RAR $\alpha$ )
AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
AML s t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
AML s inv(3)(q21.3q26.2) alebo t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
AML (mekaryoblastová) s t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
AML s mutovaným NPM1
AML s biálelickou mutáciou CEBPA
2. AML s myelodysplastickými zmenami
3. AML vzniknutá v súvislosti s liečbou
4. Akútne leukémie inak nekategorizované
AML minimálne diferencovaná
AML bez mutácie
AML s mutáciou
Akútna myelomonocytárna leukémia
Akútna monoblastová a monocytárna leukémia
Akútna erytroidná leukémia
Akútna bazofilná leukémia
Akútna panmyelosis s myelofibrózou
5. Myelosarkóm
6. Myeloidné proliferácie súvisjúce s Downovým syndrómom
tranzientná abnormálna myelopoéza
myeloidná leukémia asociovaná s Downovým syndrómom
<b>ALL</b>
1. B-ALL bližšie nešpecifikované
2. B-ALL s rekurentnými genetickými abnormalitami

B-ALL s t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1

B-ALL s t(v;11q23.3);KMT2A prestavba

B-ALL s t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1

B-ALL s hyperdiploidiou

B-ALL s hypodiploidiou

B-ALL s t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH

B-ALL s t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1

### 3. T-ALL

#### AKUTNÉ LEUKEMIE NEJASNEJ LÍNIE

akútna nediferencovaná leukémia

akútna leukémia so zmiešaným fenotypom s t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1

akútna leukémia so zmiešaným fenotypom s t(v;11q23.3); MLL

prestavba akútnej leukémie so zmiešaným fenotypom B/myeloidná bližšie nešpecifikovaná

akútna leukémia so zmiešaným fenotypom T/myeloidná bližšie nešpecifikovaná

#### Akútna myeloidná leukémia

AML sú širokou skupinou malígnych ochorení krvotvorby, ktoré vznikajú malígnou transformáciou kmeňovej hematopoetickej bunky diferencovanej v myeloidné alebo myelomonocytárne blasty, menej často v blasty erytroidené či megakaryocytárne. Typické je ukončenie diferenciácie buniek na úrovni blastov, ktoré sa akumulujú v KD (tvoria >20% jadrových buniek v KD) utláčajú fyziologickú krvotvorbu a vyplávajú sa do periférnej krvi.

Tvorí 80% všetkých akútnych leukémií dospelých, ALL tvoria zvyšných 20% (Krejčí et al. 2008). Vekový priemer výskytu AML je 67 rokov, zatiaľ čo v detskom veku incidencia dosahuje hodnoty rozmedzí 2 – 3/100 000, po 70. roku života incidencia stúpa až k hodnotám 15/100 000 (Šustková a Ráčil 2016).

Etiológia AML nie je úplne objasnená. Vznik ochorenia môže indukovať radiačné žiarenie, kancerogénne chemikálie (cytostatika, herbicídy, pesticídy, deriváty benzénu, tricyklické uhľovodíky). Zvýšené riziko vzniku AML je spojené s niektorými hereditárnymi chorobami s vyššou fragilitou chromatinu (Downov syndróm (trizómia 21), Klinefelterov sy (XXY), Patauov syndróm (trizómia 13), Bloomov syndróm, Fanconiho anémia, Wiskottov-Aldrichov syndróm). Vo vlastnej patofyziológii majú zásadný význam chromozomálne prestavby – vznik translokácii, fúziých génov, zmena transkripčných faktorov až dysregulácia vývoju kmeňovej hematopoetickej bunky a vznik leukémie (Kubisz et al. 2006; Krejčí et al. 2008).

Klinické príznaky súvisia najmä s nedostatkom funkčných buniek v cirkulácii:

- nedostatok erytrocytov: slabosť, dušnosť, malátnosť, manifestácia ischemickej choroby srdca
- nedostatok trombocytov: krvácanie, hematómy, petechie, epistaxe, metroragie, intenzívnejšie krvácanie po poranení
- insuficiencia imunitnej obrany: ťažká angína, stomatitída, pneumónia
- môžeme pozorovať aj prejavy leukostázy pri počte leukocytov nad  $100 \cdot 10^9/l$  (Adam et al. 2007a).

Stanovenie diagnózy začína vyšetrením mikroskopického diferenciálneho krvného obrazu, kde sa nachádza  $>5\%$  blastov a nie sú prítomné vývojové štádia granulocytov – myelocyty a metamyelocyty. Ďalej je znížený počet erytrocytov, počet leukocytov nebýva diagnostický nakoľko môže byť zvýšený či znížený. Lekár môže pristúpiť aj k cytologickému vyšetreniu KD, kde je  $>20\%$  blastov. Na klasifikáciu leukémie slúžia cytochemické vyšetrenia aspirátu KD (pozitívna myeloperoxidáza, lipidy, nešpecifická esteráza). V súčasnej dobe je táto metóda nahradzovaná flow-cytometrickou analýzou diferenciačných znakov (CD) na povrchu leukemických blastov (Pecka 2006).

### **Akútna lymfoblastická leukémia**

ALL vzniká malígnou transformáciou hematopoetickej kmeňovej bunky, ktorá sa diferencuje do lymfoblastov. Ku vzniku malígneho klonu dochádza v rôznych štádiách diferenciácie lymfoidného blastu. Postupne utláčajú fyziologickú krvotvorbu a infiltrujú ďalšie orgány, najčastejšie pečeň, slezinu, lymfatické uzliny (Pecka 2006).

Ochorenie sa častejšie vyskytuje v detskom veku. Najvyššia incidencia je u detí okolo 4 rokov ( $>7/100\ 000$ ), potom klesá a znova sa zvyšuje u osôb nad 50 rokov ( $1,0 - 1,5/100\ 000$ ). Biologický charakter ALL u detí a dospelých je rozdielny. Svedčia o tom aj výsledky liečby. Až 90% dlhodobých remisii sa dosiahne u detí a 30-40% u dospelých (Šustková a Ráčil 2016; Krejčí et al. 2008). Približne 75% ALL dospelých tvoria leukémie B-radu (Pecka 2006).

Vznik ochorenia indukujú podobné faktory ako AML. K najsilnejším kancerogénom patria alkylačné cytostatiká, organické rozpušťadlá typu benzén či toulén a radioaktívne žiarenie. Taktiež sa vznik ALL popisuje v súvislosti s vírusom Epstein a Barrové, zrelo



B-bunkovou ALL, vírusom nedostatku ľudskej imunity (HIV), endemickou T-bunkovou leukémiou a s humánnym lymfotropným vírusom I (Doubek 2001).

Zdravotné ťažkosti vyplývajú z anemického a hemoragického syndróm. Humorálna a bunková imunita je oslabená, nakoľko blastické bunky majú veľmi obmedzenú funkčnú maturáciu. Časté sú prítomné infekčné komplikácie s atypickým priebehom nereagujúce na liečbu ATB (Kubisz et al. 2006). U detí býva prítomná bolesť kĺbov a kostí (Adam et al. 2008). Často sa objavujú príznaky infiltrácie tkanív a orgánov leukemickými bunkami (hepatosplenomegália, lymfadenopatia), vo výnimočných prípadoch môže dôjsť až k syndrómu leukostázy (postihnutie CNS, semenníkov a kože) (Kubisz et al. 2006).

K stanoveniu diagnózy sa vyšetruje mikroskopicky diferenciálny krvný rozpočet leukocytov v perifernej krvi, až u 90% chorých sú prítomné lymfoblasty. Z odberu sternálnej punkcie sa stanoví myeogram, v ktorom býva patrná infiltrácia KD blastami (počet blastov tvorí >25% zo všetkých bunkových elementov) so znakmi potlačenia fyziologickej krvotvorby. Flow-cytometrické vyšetrenie pomáha priradiť blasty do B alebo T radu (Adam et al. 2007b).

### **Prognostické faktory akútneho leukémie**

Na plánovanie terapeutického postupu má veľký vplyv stanovenie prognózy. Jeden z hlavných nezávislých prognostických faktorov je vyšší vek pacientov v období stanovenia diagnózy. Celkové prežitie pacientov z 50 – 60% klesá vo vekovej skupine nad 60 rokov na 15% (Šustková a Ráčil 2016). Cytogenetické a molekulárno-biologické vyšetrenie aspirátu z KD určí prítomnosť/nepítomnosť prognosticky závažných translokácií, ktoré tvoria základ pre stanovenie prognózy pacienta, vid' tab. 2 a 3.

Tab. 2 Delenie AML na základe prognózy (Šustková a Ráčil 2016)

AML		
Riziko	5-ročné prežitie (%)	Cytogenetické a molekulárno-genetické vyšetrenia
Nízke	55-65	inv(16) alebo t(16;16) bez c-KIT mutácie t(8;21) bez c-KIT mutácie t(15;17) NK + mutácie NPM1 bez FLT3-ITD Mutácie CEBPA
Stredné	25-40	NK +8 t(9;11) inv(16); t(16;16) s mutáciou c-KIT iné cytogenetické zmeny
Vysoké	5-14	t(6;9) (p23;q34) t(9;22) translokácia 11q23 okrem t(9;11) -5 alebo del(5q); -7 del (7q) Komplexný karyotyp ( $\geq 3$ klonálne abnormality) NK + mutácia FLT3-ITD

Tab.3 Delenie ALL na základe prognózy (Šustková a Ráčil 2016)

ALL			
Riziko	5-ročné prežitie (%)	B-ALL	T-ALL
Štandardné	56	Remisia po I. indukcii Leukocytóza pri diagnóze $<30 \times 10^9/l$ Common-B fenotyp (CD10+) Neprítomnosť t(4;11)/MLL-AF4 Neprítomnosť t(9;22)/BCR-ABL	Remisia po I. indukcii Tymická T-ALL
Vysoké	36	Remisia až po II. indukcii Leukocytóza pri diagnóze $>30 \times 10^9/l$ Pro-B fenotyp ev.t(4;11)/MLL/AF4 Neprítomnosť t(9;22)/BCR-ABL	Remisia až po II. indukcii Včasná T-ALL Zrelá T-ALL
Veľmi vysoké	18	T(9;22)/BCR-ABL	

### **1.5.1.2 Kaposiho sarkóm asociovaný so syndrómom získaného imunodeficitu**

Infekcia vírusom získanej ľudskej imunodeficiencie vrcholí chorobou AIDS, počas ktorého často manifestujú rôzne oportúnne infekcie a Kaposiho sarkóm. (Krejsek et al. 2016).

Kaposiho sarkóm je vo svojej klasickej podobe indolentnou malignitou, ktorá postihuje predovšetkým kožu a najmä mužov nad 60 rokov s etnickým pôvodom na Stredozemí (Židovská populácia) (Krejsek et al. 2016). Kaposiho sarkóm u ľudí s AIDS je naopak agresívne maligné ochorenie, ktoré môže postihovať nielen kožu ale aj iné orgány. Dochádza k tvorbe mnohopočetných cievnych uzlov v koži a iných orgánoch. Vznik ochorenia sa spojuje s ľudským herpes vírusom typu 8 (HHV-8). Pôvod bunky je nejasný, predpokladá sa že ide o pluripotentnú mezenchýmovú kmeňovú bunku alebo viac diferencovanú endoteliálnu bunku (najpravdepodobnejšie) krvného alebo lymfatického systému.

Charakteristickým morfológickým rysom je tvorba cievnych priestorov, medzi ktorými sú lymfoplazmocyárne infiltráty a vretenovité nádorové bunky. Ich počet a hustota sa zvyšuje s progresiou nádorového ochorenia. Krvácanie do alebo z dôležitých orgánov býva smrteľnou komplikáciou (Zdeněk et al. 2002, American Academy of HIV Medicine 2017).

Vyskytuje sa u 15% všetkých chorých s AIDS. Vznik Kaposiho sarkómu je 300x vyšší než u inak imunosuprimovaných pacientov. Prežitie pacientov s AIDS a Kaposiho sarkómov nebýva dlhšie ako 24 mesiacov (Zdeněk et al. 2002).

## 2 FARMAKOLOGICKÁ STRATÉGIA VYUŽITIA INHIBÍTOROV TYROZÍNKINÁZ K REDUKCII TOXICITY ANTRACYKLÍNOVÝCH ANTIBIOTIK

Tyrozínkinázy (TK) katalyzujú prenos fosfátovej skupiny z nukleotidtrifosfátu na AK tyrozín, ktorá je súčasťou proteínov. Fosforyláciou proteínu sa zmení jeho konformácia, čo môže vyvolať zmenu jeho katalytickej aktivity a umožní interakciu s inými proteínmi. Zapojujú sa tak do signálnych dráh prenosu extracelulárneho signálu cez membránu do jadra bunky, kde aktiváciou alebo inhibíciou transkripčných faktorov ovplyvňujú expresiu cieľových génov. Cez jednotlivé signálne dráhy sa TK podieľajú na riadení bunkového cyklu, procesov proliferácie a diferenciácie buniek, anti-apoptickej signalizácie a programovanej smrti bunky. Abnormality v štruktúre alebo funkcií signálnych dráh TK vedú k dysregulácii. Výsledkom je zvýšenie bunkovej proliferácie, výhybanie sa apoptóze, iniciácia onkogenickej transformácie bunky a vznik nádorového ochorenia (Shukla et al. 2012). Terapeutickým cieľom pri liečbe takýchto nádorových ochorení sa preto stali malé molekuly, ktoré sú schopné inhibovať katalytickú aktivitu TK, tzv. TKi (Özvegy-Laczka et al. 2005).

Liečba TKi, však nebola vždy účinná, dôvodom bol vznik rezistencie. Jedným z hlavných mechanizmov podieľajúcich sa na jej vzniku je interindividuálne zvýšená expresia membránových ABC transportérov, ktoré využívajú energiu z ATP k transportu TKi cez membránu proti koncentračnému gradientu von z nádorovej bunky (Kathawala et al. 2015; Neul et al. 2016).

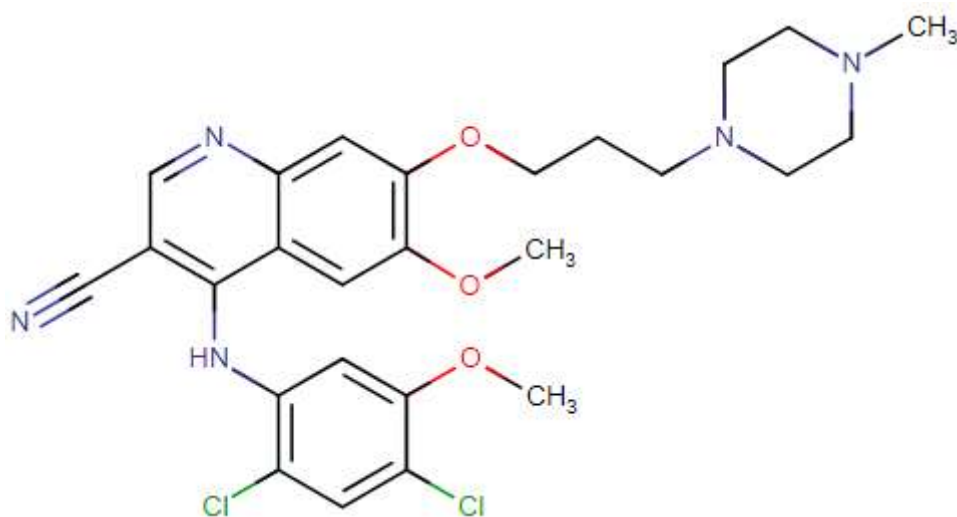
Počas štúdií, ktoré sa snažili priradiť jednotlivým TKi špecifický ABC transportér sa zistilo že niektoré TKi sú zároveň schopné inhibovať niektoré ABC transportéry. Táto ich vlastnosť sa začala využívať v kombinácii s inými liekmi, napr. s cytostatikmi, ktorých koncentrácia v bunke sa vďaka inhibícii pre nich špecifického ABC transportéru zvýšila. Zabránilo sa efluxu cytostatík z nádorových buniek a zvýšil sa ich cytotoxický účinok (Kathawala et al. 2015). Napríklad TKi imatinib sa pôvodne používal k liečbe CML (inhibuje BCR-ABL TK). Neskoršie štúdie ukázali že je schopný inhibovať eflux sprostredkovaný ABCC10 a zvýšiť tak koncentráciu liekov, ktoré sú ABCC10 transportované von z bunky, napr. paklitaxel a vinkristine (Shen et al. 2009).

Štúdie liekových interakcií ukázali, že TKi ovplyvňujú účinok liekov aj iným spôsobom, ako len inhibíciou ABC transportérov a to inhibíciou špecifických enzýmov,

ktoré sa podieľajú priamo na ich metabolizme. Jedná sa o inhibíciu enzýmov z nadrodín AKR a SDR, ktoré katalyzujú metabolizmus ANT, premenu DAUN na jeho kardiotoxický a antineoplasticky menej aktívny metabolit DAUNOL, vid'. kapitolu 1.4 (Piska et al. 2017). Oba faktory prispievajú k zlyhaniu antineoplastickej liečby. TKi sa z tohto dôvodu stali cieľom nášho štúdia nakoľko ide o skupinu liekov, ktorá má potenciál inhibovať enzýmy katalyzujúce premenu DAUN na DAUNOL.

### **Bosutinib (SKI-606)**

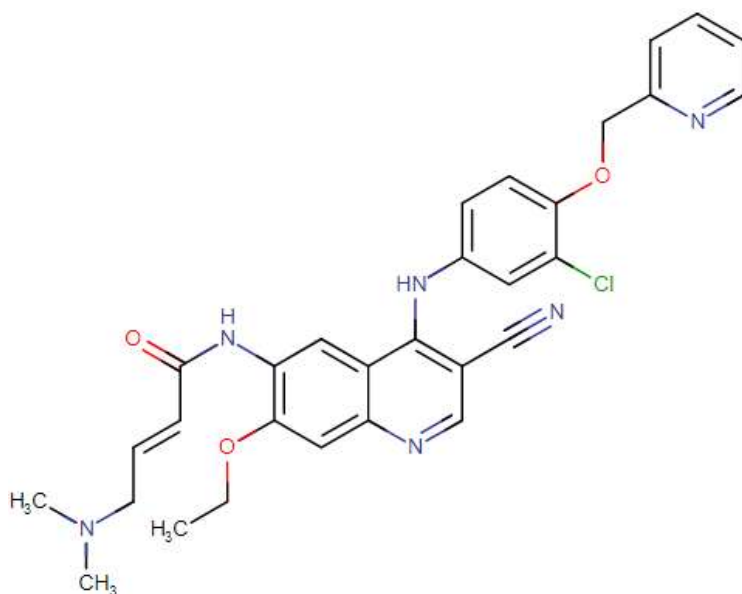
Patrí medzi druhú generáciu TKi. Primárne bol syntetizovaný k perorálnej liečbe na imatinib rezistentných pacientov s CML typickou somatickou mutáciou v *BCR-ABL*. Okrem BCR-ABL TK, inhibuje aj Src, HCK a LYN TK (Neul et al. 2016).



Obr. 6 Bosutinib - chemický vzorec (Bosutinib 2019)

### **Neratinib (HKI-272)**

Patrí medzi perorálne užívaný inhibítor TK receptora epidermálneho rastového faktora (HER), ktorý ireverzibilne inhibuje HER1 (alebo EGFR), HER2, HER4, čo vedie k redukcii fosforylácie a aktivácie signálnych dráh podieľajúcich sa na vzniku karcinómu pľúc, kolorektálneho karcinómu, rakoviny prsníka (Tiwari et al. 2016).



Obr. 7 Neratinib - chemický vzorec (Neratinib 2019)

### Ibrutinib (PCI-32765)

Perorálne podávaný ireverzibilný inhibítor Brutonovej tyrozínkinázy (BTK), ktorý sa používa k liečbe B-lymfoproliferatívnych ochorení. vytvára kovalentnú väzbu s cysteinovým reziduom BTK (Cys 481), bráni tak jej fosforylácii a blokuje signálne dráhy B-bunkového receptora a ďalších receptorov. Zumožňuje prežívanie a proliferáciu nádorových B-lymfocytov, brzdí ich migráciu a inhibuje sekréciu niektorých cytokínov (CCL3, CCL4). Jeho chemická štruktúra je na obr. 8.



Obr. 8 Ibrutinib – chemický vzorec (Ibrutinib 2019)

### 3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo štúdium potencionalného účinku vybraných TKi, na aktivitu ľudských karbonylreduktáz CBR a AKR s využitím DAUN ako substrátu.

Cieľ experimentálnej časti možno rozdeliť do niekoľkých častí:

1. Stanovenie a porovnanie hodnôt špecifickej aktivity enzýmov AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2, CBR1, CBR3 voči substrátu DAUN.
2. Skríning schopnosti vybraných TKi (bosutinib, neratinib, ibrutinib) inhibovať aktívne DAUN redukujúce enzýmy.
3. Stanovenie inhibičnej konštanty ( $K_i$ ), polovičnej maximálnej inhibičnej koncentrácie ( $IC_{50}$ ) a typu inhibície u najviac aktívneho inhibítora.
4. Overenie inhibičného účinku najaktívnejšieho inhibítora v experimentoch in vitro na bunkové úrovni.

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie a reagencie

NADP<sup>+</sup> (Roche Diagnostics, Nemecko)

Glukóza-6-fosfát (Applichem, Nemecko)

Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (Roche Diagnostics, Nemecko)

MgCl<sub>2</sub> (0,1M, Sigma-Aldrich, Nemecko)

NaP pufor (pH=7,4; 0,1M, Sigma-Aldrich, Nemecko)

Daunorubicin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Destilovaná voda (Braun, ČR)

Metanol (Penta, ČR)

DMSO (MP Biomedicals, Čína)

Kyselina mravčia, 0,1% (Penta, ČR)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, Nemecko)

API voda (Braun, ČR)

PBS (Sigma-Aldrich, Nemecko)

MTT (Sigma-Aldrich, Nemecko)

DMEM (BioWhittaker, Canada)

#### 4.1.2 Rekombinantne pripravené enzýmy

Rekombinantné enzýmy boli pripravené pomocou expresného systému *E. coli* *BL21(DE3)* a rozpustené v 0,1M NaP pufore a 20% glycerole, pH 7,4. Pripravené na Katedre biochemických vied Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové.

AKR1A1 (1,7 mg/ml)

AKR1B1 (1,63 mg/ml)

AKR1B10 (1,61 mg/ml)

AKR1C1 (1,84 mg/ml)



AKR1C2 (1,96 mg/ml)

AKR1C3 (1,3 mg/ml)

AKR1C4 (1,77mg/ml)

AKR7A2 (1,13 mg/ml)

CBR1 (2,11 mg/ml)

CBR3 (1,93 mg/ml)

#### **4.1.3 Inhibítory**

V mraziacom boxe skladované v zásobnej koncentrácii 10mM. Pripravené na Katedre biochemických vied Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové.

neratinib (Sigma-Aldrich, Nemecko)

bosutinib (Sigma-Aldrich, Nemecko)

ibrutinib (Sigma-Aldrich, Nemecko)

#### **4.1.4 Bunkové línie**

Bunky HCT116 boli dodané firmou Sigma-Aldrich (Nemecko). Na katedre biochemických vied Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové boli transfekované plazmidom s AKR1C3 (pAKR1C3), a prázdny plazmidom (pCI). Obe bunkové línie boli nasadené do 96 jamkovej doštičky v počte 15 000 na jednu jamku v 0,1ml rastového média.

HCT116 transfekované pAKR1C3

HCT116 transfekované pCI

#### **4.1.5 Pomôcky a prístroje**

##### **Pomôcky**

Automatické pipety (0,5 – 1000 µl, Eppendorf, Nemecko)

pipetovacie špičky (Sartorius Biohit)

nádoba na ľad

stojan na skúmavky (Eppendorf, Nemecko)

skúmavky (1,5 ml, 2ml, 5ml, Eppendorf, Nemecko)

navážovacie lyžičky (Thermo Fisher Scientific, USA)

rukavice (Vulcan Medical, ČR)

stopky (Thermo Fisher Scientific, USA)

plastové injekčná striekačka (Terumo, Japonsko)

injekčná ihla (0,9 x 40 mm, Braun, ČR)

striekačkový filter s membránou (0,2 $\mu$ M PTFE, UK)

inserty (Agilent, Technologies, Kalifornia USA)

sklenené vialky 1 ml (Agilent Technologies, Kalifornia, USA)

viečka k vialkam so závitom (Agilent Technologies, Kalifornia, USA)

septa k vialkam (Agilent Technologies, Kalifornia, USA)

Sterilné pomôcky pre prácu v laminárnom boxe: špičky, automatické pipety, stojany na skúmavky, pinzeta, vanička (Eppendorf, Nemecko)

#### **4.2 Prístroje**

Prístroj na výrobu ľadovej triešte (Scotsman, UK)

Analytické váhy (T-Scale, Taiwan)

Centrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Nemecko)

Termomixer (Thermomixer compact, Eppendorf)

Třepačka (Biotech, ČR)

UHPLC Agilent 1290 Series (Agilent Technologies, USA)

Kolona (2.1 x 50 mm, 1.8  $\mu$ m, Zorbax Eclipse Plus C18)

Inkubátor (Biotech, ČR)

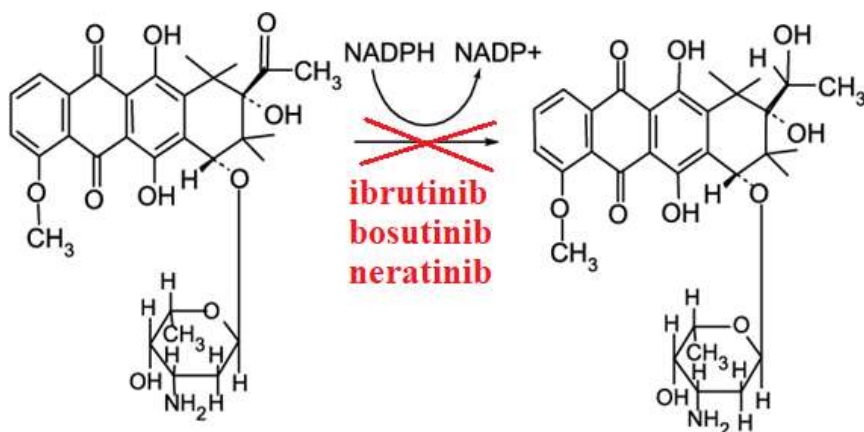
Laminárny box (Euroclone, Taliansko)

Odsávací pumpa (P-Lab, ČR)

Čítačka kultivačných doštičiek (Tecan, Švajčiarsko)

### 4.3 Princíp používanej reakcie

DAUN podlieha 2-elektrónovej redukcii na karbonylovej skupine uhlíku C-13. Reakcia je katalyzovaná karbonyl redukujúcimi enzýmami, NADPH-dependentnými CBR a AKR (Obr. 9). Výsledkom reakcie je sekundárny alkohol DAUNOL.



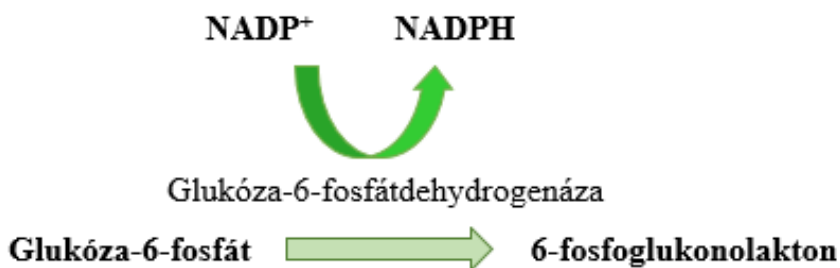
Obr. 9 Schéma 2-elektrónovej redukcii katalyzovanej cytozolickými CBR/AKR, z DAUN vzniká sekundárny alkohol DAUNOL (Kaiserová a Kvasničková 2005, s vlastnou úpravou)

### 4.4 *In vitro* experimenty

#### 4.4.1 Príprava roztokov

##### Regeneračný systém

Regeneračný systém (RS) zaisťuje regeneráciu NADPH (Obr. 10), ktorý je potrebný k správnej katalytickej funkcii testovaných karbonylreduktáz. RS obsahuje NADP<sup>+</sup>, MgCl<sub>2</sub>, NaP pufor, enzým glukóza-6-fosfátdehydrogenáza a jeho substrát glukózu-6-fosfát.



Obr. 10 Mechanizmus RS

Navážky NADP<sup>+</sup> a glukózy-6-fosfát boli najprv kompletne rozpustené v NaP pufre. Následne boli pridané MgCl<sub>2</sub> a glukóza-6-fosfátdehydrogenáza. Tab. 4 popisuje množstvá jednotlivých zložiek RS potrebných pre jednu 100 μl reakčnú zmes. Hotová

zmes RS bola uchovávaná na ľade. Z pripravenej zmesi RS bolo do reakčnej zmesi pipetovaných 20  $\mu$ l RS.

Tab. 4 Príprava RS pre jednu 100  $\mu$ l reakciu

<b>NADP<sup>+</sup></b>	0,2 mg	rozpustiť v 10 $\mu$ l pufru
<b>Glukóza-6-fosfát</b>	0,6 mg	
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	10 $\mu$ l	
<b>Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza</b>	0,5 $\mu$ l	

### **Roztoky enzýmov**

Rekombinantne pripravené enzýmy boli nariadené NaP pufrom zo zásobnej koncentrácie na pracovnú koncentráciu 0,1; 0,15; a 0,5 mg/ml. Do reakčnej zmesi sa pipetovalo 10  $\mu$ l čo zodpovedá príslušným 1; 1,5; 5  $\mu$ g enzýmu na reakčnú zmes 100  $\mu$ l. Hotové pracovné roztoky enzýmov boli uchovávané na ľade.

V inkubáciách pre porovnanie aktivity enzýmov sa použilo množstvo 5  $\mu$ g pre AKR1A1, AKR7A2, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1, CBR3 .

V inkubáciách pre skríning schopnosti vybraných TKi (bosutinib, neratinib, ibrutinib) inhibovať aktívne DAUN redukujúce enzýmy bolo použité množstvo 1  $\mu$ g enzýmu na reakčnú zmes 100  $\mu$ l u AKR1A1, AKR1C3 a CBR1, množstvo 3  $\mu$ g u AKR1B10, AKR7A2 a množstvo 5  $\mu$ g u AKR1B1.

V inkubáciách pre stanovenie IC<sub>50</sub> a K<sub>i</sub> bolo použité množstvo 1,5  $\mu$ g AKR1C3 na 100  $\mu$ l reakčnú zmes.

### **Roztok substrátu DAUN**

V reakciách na porovnanie enzýmovej aktivity a stanovenie IC<sub>50</sub> bol pracovný roztok DAUN o koncentrácii 5mM pripravený rozpusteným odpovedajúcej navážky v destilovanej vode. Do reakčnej zmesi bolo pipetovaných 10  $\mu$ l, jeho finálna koncentrácia v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi tak bola 500  $\mu$ M.

V inkubáciách pre stanovenie inhibičnej konštanty K<sub>i</sub> bol DAUN nariadený na pracovné roztoky o koncentráciách 20 000; 10 000; 8000; 6000; 4000; 2000  $\mu$ M, jeho finálna koncentrácia v reakčnej zmesi 100  $\mu$ l tak bola 2000; 1000; 800; 600; 400 a 200  $\mu$ M.

### Roztoky inhibítorov

Zásobné roztoky inhibítorov (10mM, skladované v mraziacom boxe) boli v skríningu ich inhibície nariadené roztokom DMSO na pracovnú koncentráciu 500  $\mu$ M a 2500  $\mu$ M. Do reakčnej zmesi bolo pipetovaných 2  $\mu$ l, ich finálna koncentrácia v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi tak bola 10 a 50  $\mu$ M.

V inkubáciách pre stanovenie hodnoty  $IC_{50}$  bol ibrutinib nariadený na pracovné roztoky o koncentráciách 5000; 2500; 500; 250; 50; 37,5; 25; 12,5; 5; 0,5  $\mu$ M. Do reakčnej zmesi bolo pipetovaných 2  $\mu$ l, ich finálna koncentrácia v 100  $\mu$ l reakčnej zmesi bola 100; 50; 10; 5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1; 0,01  $\mu$ M.

V inkubáciách pre stanovenie inhibičnej konštanty  $K_i$  bol ibrutinib nariadený na pracovné roztoky o koncentráciách 500; 250 a 50  $\mu$ M. Do reakčnej zmesi bolo pipetovaných 2  $\mu$ l, jeho finálna koncentrácia v reakčnej zmesi 100  $\mu$ l bola 10; 5; a 1  $\mu$ M.

#### 4.4.2 Príprava reakčných zmesí a preinkubácia

Až na kontrolné reakčné zmesi bez enzýmu a substrátu, ktoré sa pripravili v duplikáte, všetky ostatné reakčné zmesi sa pripravili a merali v triplikáte. Ako prvé bolo do 1,5 ml eppendorf skúmaviek napipetovaný NaP pufor, následoval RS a prenesenie skúmaviek na ľad. Následne sa pripipetoval analyzovaný AKR/CBR, u inhibovaných reakcií i inhibítor. Substrát slúžil k spusteniu enzýmovej reakcie a pipetoval sa až po 10 min preinkubácii pri 37°C. U kontrolných reakčných zmesí bez substrátu, bol DAUN nahradený vodou, u kontrolných reakčných zmesí bez enzýmu, bol daný objem CBR/AKR náhradný zvýšením objemu NaP pufru, u kontrolných reakčných zmesí s DMSO bol namiesto inhibítora pipetovaný DMSO. V tab. 5, 6, 7 a 8 sú popísané objemy reagensov pipetovaných do jednotlivých reakčných zmesí.

Tab. 5 Všeobecné pipetovacie schéma pre prípravu neinhibovaných reakčných zmesí

Reakčná zmes		Pufor ( $\mu$ l)	RS ( $\mu$ l)	Enzým ( $\mu$ l)	Substrát (500 $\mu$ M) ( $\mu$ l)
Neinhibovaná reakcia		60	20	10	10
Kontrola	Bez substrátu	60	20	10	10 (destil.voda)
	Bez enzýmu	70	20	-	10

Tab. 6 Všeobecné pipetovacie schéma pre prípravu inhibovaných reakčných zmesí

Reakčná zmes	Pufor ( $\mu\text{l}$ )	RS ( $\mu\text{l}$ )	Enzým ( $\mu\text{l}$ )	Inhibitor (10/50 $\mu\text{M}$ ) ( $\mu\text{l}$ )	Substrát (500 $\mu\text{M}$ ) ( $\mu\text{l}$ )	
<b>Neinhibovaná reakcia</b>	60	20	10	-	10	
<b>Kontrola</b>	DSMO	58	20	10	2 (DMSO)	10
	Bez substrátu	60	20	10	-	10 (destil.voda)
	Bez enzýmu	70	20	-	-	10
<b>Inhibitor</b>	50 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10

Tab. 7 Všeobecné pipetovacie schéma pre stanovenie  $\text{IC}_{50}$

Reakčná zmes	Pufor ( $\mu\text{l}$ )	RS ( $\mu\text{l}$ )	Enzým ( $\mu\text{l}$ )	Inhibitor (0,01-100 $\mu\text{M}$ ) ( $\mu\text{l}$ )	Substrát (500 $\mu\text{M}$ ) ( $\mu\text{l}$ )	
<b>Neinhibovaná reakcia</b>	60	20	10	-	10	
<b>Kontrola</b>	DSMO	58	20	10	2 (DMSO)	10
	Bez substrátu	60	20	10	-	10 (destil.voda)
	Bez enzýmu	70	20	-	-	10
<b>Inhibitor</b>	100 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	50 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	0,75 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	0,5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	0,25 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	0,1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	0,01 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10

Tab. 8 Všeobecne pipetovacie schéma pre stanovenie  $K_i$

Reakčná zmes		Pufor ( $\mu\text{l}$ )	RS ( $\mu\text{l}$ )	Enzým ( $\mu\text{l}$ )	Inhibítor (1-10 $\mu\text{M}$ ) ( $\mu\text{l}$ )	Substrát (2000 – 100 $\mu\text{M}$ ) ( $\mu\text{l}$ )	
Neinhibovaná reakcia		60	20	10	-	10	
Kontrola	DMSO	58	20	10	2 (DMSO)	10	
	Bez substrátu	60	20	10	-	10 (destil.voda)	
	Bez enzýmu	70	20	-	-	10	
Substrát	2000 $\mu\text{M}$	inhibítor 1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	1000 $\mu\text{M}$	inhibítor 1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	800 $\mu\text{M}$	inhibítor 1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	600 $\mu\text{M}$	inhibítor 1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	400 $\mu\text{M}$	inhibítor 1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
	200 $\mu\text{M}$	inhibítor 1 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 5 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10
		inhibítor 10 $\mu\text{M}$	58	20	10	2	10

#### 4.4.3 Vlastná enzýmová reakcia

*In vitro* reakcie boli spustené substrátom DAUN. Vlastná inkubácia pri 37°C v termomixeru trvala 30min, výnimkou bol enzým AKR1B1, ktorý sa inkuboval

s inhibítormi 120 minút. Priebeh enzýmových reakcií bol ukončený pridaním 300  $\mu$ l metanolu a uchovávaním skúmaviek ešte aspoň po dobu 10 min na ľade.

#### 4.4.4 Príprava vzorku a analýza UHPLC

Kvôli ochrane separačnej kolóny v systéme UHPLC sa všetky vzorky prefiltrovali cez injekčný filter do sklenených inžertov vo vialkách. Na systéme UHPLC bol stanovený produkt enzýmovej reakcie – DAUNOL vyhodnotený kvalitatívne na základe špecifickej hodnoty retenčného času a kvantitatívne na základe porovnania hodnoty plochy chromatografického piketu s kalibračnou krivkou.

Parametre UHPLC analýzy: izokratická elúcia, prietok 0,8ml/min, mobilná fáza 0,1% kyselina mravčia a acetonitril a objemovom pomere 74:26, teplota 40 °C, tlak: 535 bar, stacionárna fáza: kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8  $\mu$ m), detektor: fluorescenčný detektor (excitačná vlnová dĺžka 480 nm, emisná vlnová dĺžka 560nm).

#### 4.4.5 Spracovanie nameraných dát

Množstvo DAUNOL v ng získané analýzou reakčnej zmesi v UHPLC bolo použité pre výpočet špecifickej aktivity vzťahujúcej sa na hmotnosť príslušného enzýmu, vyjadrenej ako nmol (DAUNOL)/1 mg (enzýmu)/1 min. V programe Microsoft Excel boli spracované všetky výsledky vzoriek z UHPLC podľa postupu uvedeného v tab.9.

Tab. 9 Postup pre výpočet špecifickej aktivity jednotlivých enzýmov

1.	Priemerné množstvo DAUNOL (ng) v celom objeme vzorky (400 $\mu$ l)	Hodnota DAUNOL v ng je vynásobená koeficientom riedenia K (K=80; podiel objemu celej reakčnej zmesi 400 $\mu$ l a objemu nastrekovaného na kolonu 5 $\mu$ l).
2.	Množstvo DAUNOL v prepočte na ng/mg/30min	Množstvo DAUNOL (ng) vypočítané v prvom kroku je prepočítané na množstvo DAUNOLU získaného 1mg enzýmu.
3.	Špecifická aktivita enzýmu vyjadrená nmol/mg/30min	Množstvo DAUNOL v ng je prepočítané na látkové množstvo. $N=m/M_r$ ; $M_r(\text{DAUNOL})=529,54 \text{ g/mol}$
4.	Špecifická aktivita enzýmu vyjadrená v nmol/mg/min	Množstvo DAUNOL vypočítané v treťom kroku sa vydelením počtom minút trvania inkubácie. Výsledkom je hodnota špecifickej aktivity enzýmu.



Pre výpočet a grafické vyhodnotenie  $IC_{50}$ ,  $K_i$ , a typu inhibície bol použitý počítačový program GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Kalifornia, USA).

Hodnotu  $IC_{50}$  definujeme ako koncentráciu látky (v našom prípade ibrutinib), ktorá zníži aktivitu daného enzýmu na polovičnú hodnotu. Pre jej stanovenie sa zvolilo koncentračné rozpätie (0,01  $\mu$ M až 100 $\mu$ M ibrutinib) tak, aby bol zahrnutý celý inhibičný rozsah ibrutinibu.

Inhibičná konštanta  $K_i$  charakterizuje vzťah medzi enzýmom a inhibítorom, je to vlastne disociačná konštanta komplexu enzým – inhibitor  $K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$ . Čím je hodnota  $K_i$  menšia tým je afinita inhibítora k enzýmu vyššia a opačne.

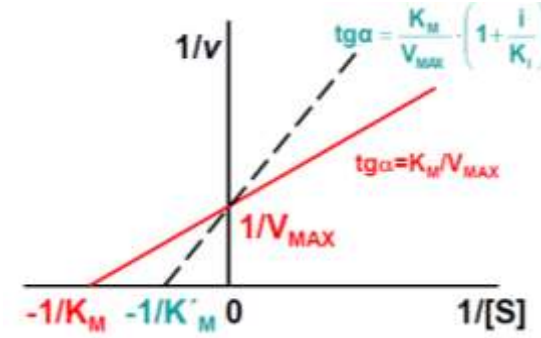
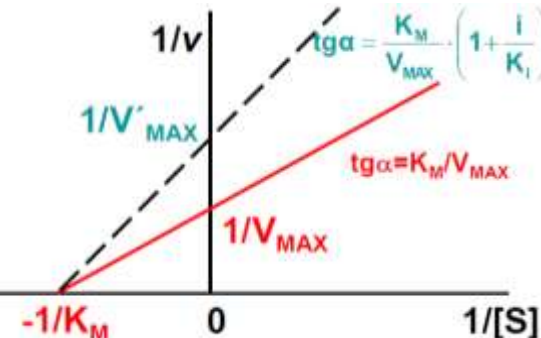
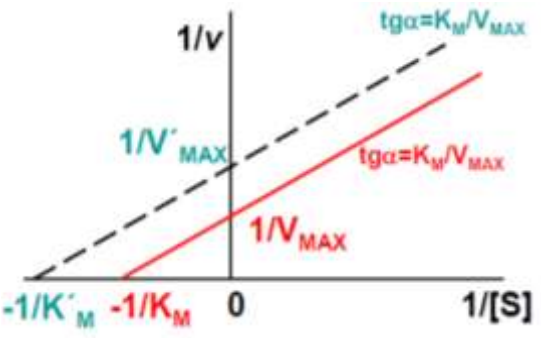
Z hľadiska mechanizmu pôsobenia inhibítorov na katalytickú účinnosť enzýmových reakcií rozoznávame štyri typy inhibície, ktoré môžeme rozlíšiť kinetickým meraním – porovnaním veľkosti Michaelisovej konštanty a medznej rýchlosti nameranej bez ( $K_M$ ,  $V$ ) a za prítomnosti inhibítora ( $K_M'$ ,  $V'$ ).

Kineticky odlišiteľné typy inhibície sú:

1. Kompetitívna, kedy inhibítor neovplyvňuje meznú rýchlosť ( $V=V'$ ), ale zvyšuje Michaelisovu konštantu ( $K_M' > K_M$ ).
2. Nekompetitívna, kedy inhibítor nevyvolá zmenu Michaelisovej konštanty ( $K_M'=K_M$ ), ale znižuje meznú rýchlosť ( $V < V'$ ).
3. Akompetitívna, kedy inhibítor znižuje meznú rýchlosť i Michaelisovú konštantu, ale tak že sa nemení ich pomer ( $K_M'/K_M=V'/V$ ).
4. Zmiešaná, kedy inhibítor mení Michaelisovú konštantu, meznú rýchlosť a ich pomer.

Rovnice, ktoré platia pre rýchlosť inhibovaných reakcií a tvar závislosti  $1/v$  na  $1/S$  udáva tab. 10. Z tvaru získanej závislosti nameranej pri rôznych koncentráciách inhibítora a substrátu je možné rozhodnúť o aký typ inhibície ide (Vodrážka et al. 1998).

Tab. 10 Vyhodnotenie typu inhibície katalytickej aktivity enzýmov podľa Lineweaver-Burka

<p style="text-align: center;"><b>Kompetitívna</b></p> $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{MAX}}$	
<p style="text-align: center;"><b>Nekompetitívna</b></p> $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{MAX}} \cdot \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)$	
<p style="text-align: center;"><b>Akompetitívna</b></p> $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{MAX}} \cdot \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)$	

#### 4.5 Experimenty na bunkových líniách

Pri všetkých experimentoch sa pracovalo s bunkovými líniami HCT116 pAKR1C3 a HCT116 pCI.

##### 4.5.1 Príprava roztokov

###### Roztok média s DAUN

Zásobný roztok DAUN o koncentrácii 5mM sa pripravil rozpusteným odpovedajúcej navážky v API vode. Následne sa zriedil médiom DMEM na pracovné koncentrácie 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1; 0,01; 0,001  $\mu$ M. Do jednej jamky s bunkami HCT116 bolo pipetovaných 100  $\mu$ l.

### **Roztok média s inhibítorom**

Zásobný 10mM roztok inhibítora ibrutinibu bol nariadený médiom DMEM na pracovnú koncentráciu 5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1; 0,01  $\mu\text{M}$ . Do jednej jamky s bunkami HCT116 bolo pipetovaných 100  $\mu\text{l}$ .

### **Roztok média pre kombinácie**

Médium pre kombinácie obsahuje substrát DAUN a zároveň aj inhibítor ibrutinib. Pripravuje sa zriedením zásobného roztoku ibrutinibu (10mM, skladovaný v mraziacom boxe) roztokom DMSO na koncentrácie 125; 250 a 1250  $\mu\text{M}$ . Tieto pracovné koncentrácie sa ďalej zriedia médiom DMEM na finálne koncentrácie ibrutinibu 0,5; 1; 5  $\mu\text{M}$ . Ako ďalší sa pripravil rozpustením odpovedajúcej navážky v API vode 5 mM DAUN. Následne sa použili roztoky finálnych koncentrácií ibrutinibu (0,5; 1; 5  $\mu\text{M}$ ) k nariadeniu troch stúpajúcich radov koncentrácií DAUN:1,000; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1; 0,01; 0,001  $\mu\text{M}$ . Do jednej jamky s bunkami HCT116 bolo pipetovaných 100  $\mu\text{l}$ .

### **Roztok negatívnej kontroly viability buniek**

Pracovný roztok negatívnej kontroly sa pripravil ako 10% roztok DMSO, k riedeniu sa použilo médium DMEM. Do jednej jamky s bunkami HCT116 bolo pipetovaných 100 $\mu\text{l}$ .

### **Roztok MTT**

Pracovný roztok MTT o koncentrácii 3mg/ml bol pripravený rozpusteným odpovedajúcej navážky v PBS. Do jednej jamky s bunkami HCT116 bolo pipetovaných 50  $\mu\text{l}$ .

#### **4.5.2 Vlastná enzýmová reakcia a zmeranie viability buniek**

Z jednotlivých jamiek na doštičke sa odsalo médium a k bunkám bolo pridaných 100  $\mu\text{l}$  pripravených roztokov média s látkami. Každý roztok sa pipetoval v triplikáte a na každej doštičke sa urobila negatívna i pozitívna kontrola (pridanie čistého média) viability buniek. Po 72 hod v inkubátore sa k bunkám pridalo 50  $\mu\text{l}$  roztoku MTT. Žltý sfarbený roztok MTT je mitochondriálnymi enzýmami dýchacieho reťazca redukovaný na fialový formazánový derivát, ktorý zostáva vo vnútri buniek vo forme nerozpustných granúl. Po 15min inkubáci sa médium s MTT odsaje a bunky sa zlyzujú pridaním 100  $\mu\text{l}$  DMSO. Dôjde k uvoľneniu farebných granúl z buniek. Po 15minútach na trepačke

vznikne číri roztok vhodný k fotometrickému stanoveniu viability buniek. Absorbancia sa merala na čítačke kultivačných doštičiek (570nm a 690 nm ako referenciu).

#### **4.5.3 Spracovanie nameraných dát**

Pre výpočet a grafické zobrazenie hodnôt  $IC_{50}$  (vyjadruje hodnotu koncentrácie ibrutinibu, ktorá zníži viabilitu buniek na ich polovicu) a viability bunkových línií za rôznych inkubačných podmienok bol použitý počítačový program GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Kalifornia, USA).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jednou z hlavných ciest metabolizmu DAUN je 2-elektrónová redukcia karbonylovej skupiny uhlíku C-13. Výsledným produktom je metabolit DAUNOL, ktorý môže viesť ku vzniku rezistencie, zlyhaniu liečby a vzniku život ohrozujúceho poškodenia srdca (Zhong et al. 2011). Práve preto som sa zamerala na enzýmy, ktoré katalyzujú túto metabolickú cestu, enzýmy nadrodín AKR a SDR a možnosť ich inhibície vybranými TKi (bosutinib, neratinib, ibrutinib).

### 5.1 Porovnanie špecifických aktivít vybraných karbonyl redukujúcich enzýmov voči substrátu DAUN

K zisteniu a k vzájomnému porovnaniu špecifickej aktivity karbonyl redukujúcich enzýmov voči substrátu DAUN boli z nadrodiny AKR vybrané enzýmy AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2 a z nadrodiny SDR enzýmy CBR1 a CBR3..

Tab. 11 obsahuje prepočet nameraného množstva produktu enzýmovej reakcie DAUNOL v ng na špecifickú enzýmovú aktivitu v nmol/mg/min a to podľa postupu uvedeného v kapitole 4.4.5. Priemerná špecifická aktivita enzýmov je následne uvedená v tab. 12 a ich grafické porovnanie na obr 11. Podľa výsledkov enzým CBR3 nekatalyzoval enzýmovú reakciu alebo množstvo vytvoreného produktu DAUNOL bolo pod detekčným limitom detektoru UHPLC. Enzýmy AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C4 vykazovali veľmi nízku aktivitu 2,5 - 3,1 nmol/mg/min. U ostatných enzýmov už boli namerané podstatne vyššie hodnoty špecifických aktivít. Najviac aktívnymi enzýmami v podmienkach *in vitro* boli CBR1 (938,7 nmol/mg/min) a AKR1C3 (703,1 nmol/mg/min), ďalej nasledovali AKR1B1 (547,9 nmol/mg/min), AKR1A1 (485,0 nmol/mg/min), AKR7A2 (183,3 nmol/mg/min) a AKR1B10 (137,5 nmol/mg/min). Na týchto šiestich enzýmoch s najvyššími priemernými hodnotami špecifickej aktivity boli ďalej skúmané inhibičné účinky bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu.

Podobné výsledky dosiahli aj Bains et al. (2010a) a Bains et al. (2010b), ktorí namerali taktiež najvyššiu aktivitu v skupine testovaných enzýmov u CBR1 a AKR1C3, následne špecifická enzýmová aktivita klesala v poradí AKR7A2 > AKR1A1 > AKR1B10 > a u enzýmov AKR1B1 > AKR1C4 > CBR3 > AKR1C1 > AKR1C2 > CBR4 špecifická aktivita dosahovala minimálne hodnoty.

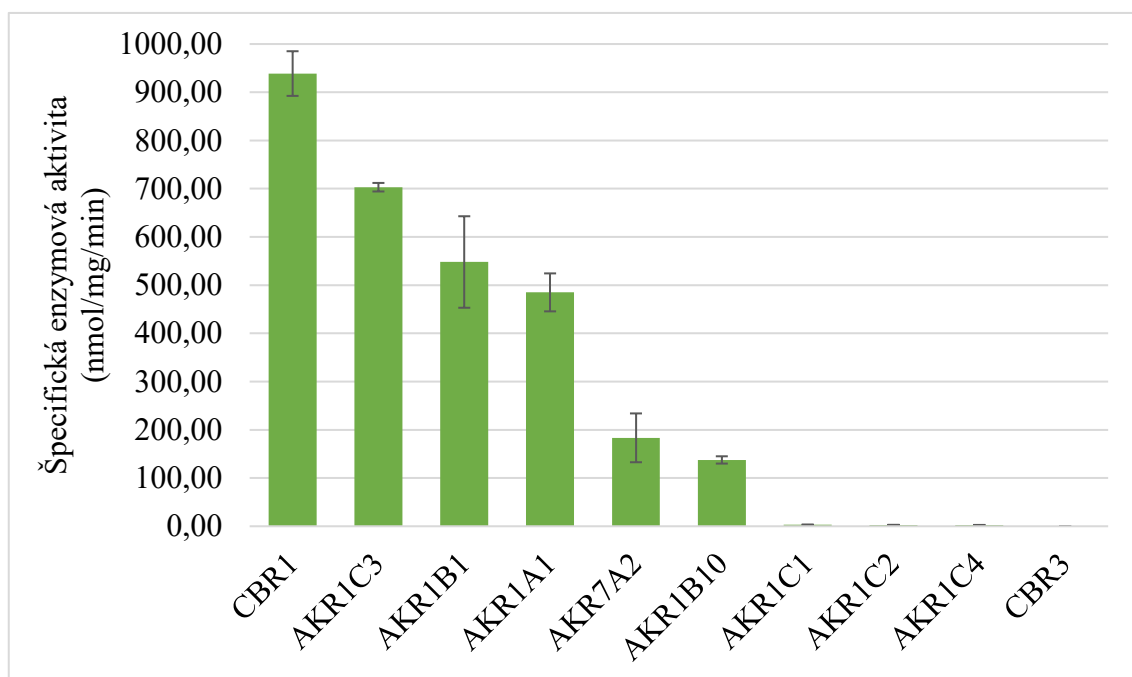
Tab. 11 Porovnanie špecifickej enzýmovej aktivity

Vzorka	v nástreku UHPLC [ng]	Množstvo DAUNOL		Špecifická aktivita enzýmu	
		V 400 $\mu$ l vzorke [ng]	v prepočte na ng/1mg/30min	nmol/mg/30min	nmol/mg/min
CBR1/1	867	69375	13875088	26202,2	873,4
CBR1/2	969	77489	15497744	29266,4	975,5
CBR1/3	960	76833	15366640	29018,8	967,3
CBR3/1	0	0	0	0,0	0,0
CBR3/2	0	0	0	0,0	0,0
CBR3/3	0	0	0	0,0	0,0
AKR1A1/1	530	42406	8481296	16016,3	533,9
AKR1A1/2	480	38419	7683792	14510,3	483,7
AKR1A1/3	434	34752	6950368	13125,3	437,5
AKR1B1/1	416	33271	6654176	12566,0	418,9
AKR1B1/2	577	46148	9229648	17429,6	581,0
AKR1B1/3	640	51163	10232592	19323,5	644,1
AKR1B10/1	136	10886	2177184	4111,5	137,0
AKR1B10/2	146	11679	2335824	4411,0	147,0
AKR1B10/3	128	10210	2042032	3856,2	128,5
AKR1C1/1	3	223	44576	84,2	2,8
AKR1C1/2	2	191	38144	72,0	2,4
AKR1C1/3	3	204	40880	77,2	2,6
AKR1C2/1	58	4619	923888	1744,7	58,2
AKR1C2/2	86	6863	1372672	2592,2	86,4
AKR1C2/3	85	6779	1355712	2560,2	85,3
AKR1C3/1	3	262	52384	98,9	3,3
AKR1C3/2	4	283	56560	106,8	3,6
AKR1C3/3	3	210	42064	79,4	2,6
AKR1C4/1	3	222	44352	83,8	2,8
AKR1C4/2	3	210	42048	79,4	2,6
AKR1C4/3	3	240	47952	90,6	3,0
AKR7A2/1	253	20227	4045392	7639,4	254,6
AKR7A2/2	152	12185	2437040	4602,2	153,4
AKR7A2/3	141	11287	2257376	4262,9	142,1

Tab. 12 Priemerná špecifická aktivita enzýmov voči substrátu DAUN

Vzorka n=3	Priemerná špecifická aktivita enzýmu nmol/mg/min
CBR1	938,7 ± 46,3
AKR1C3	703,1 ± 8,8
AKR1B1	547,9 ± 94,8
AKR1A1	485,0 ± 39,3
AKR7A2	183,3 ± 50,6
AKR1B10	137,5 ± 7,5
AKR1C1	3,1 ± 0,3
AKR1C2	2,8 ± 0,1
AKR1C4	2,5 ± 0,1
CBR3	0,0 ± 0,0

Dvojitou čiarou je oddelených šesť najaktívnejších enzýmov, ktoré boli ďalej použité v skríningu inhibičných účinkov bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu.



Obr. 11 Grafické porovnanie priemernej špecifickej aktivity enzýmov voči substrátu DAUN

## 5.2 Skríning schopnosti vybraných TKi inhibovať aktívne DAUN redukuje enzýmy.

Vysoké hodnoty špecifickej enzýmovej aktivity predstavujú problém u nádorových ochorení, kde sú príslušné enzýmy nadmieru exprimované a podieľajú sa na zlyhaní liečby. Tento problém nie je možné vykompenzovať zvýšením dávky DAUN,

nakoľko je vznikajúci metabolit kardiotoxický. Riešenie ponúkajú inhibítory aktívnych DAUN redukujúcich enzýmov.

TKi sú lieky používané pri liečbe nádorových ochorení, ktoré vznikli z dysregulácie TK signálnych dráh. Pri ich bližšom skúmaní sa ukázalo že sú schopné inhibície aj niektorých enzýmov z nadrodín AKR a SDR. V podkapitolách 5.2.1, 5.2.2 a 5.2.3 popisujem vplyv TKi bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na špecifickú aktivitu šiestich najaktívnejších enzýmov. Každý typ enzýmovej reakcie bol meraný v triplikáte, jednotlivé tabuľky a obrázky obsahujú už priemerné hodnoty nameraných výsledkov. Špecifická aktivita enzýmu nameraná v kontrolnej reakčnej zmesi s DMSO (roztoky inhibítorov boli pripravené zriedením s roztokom DMSO, ktorý mohol následne ovplyvniť aktivitu enzýmov) bola považovaná za maximálnu hodnotu špecifickej aktivity daného enzýmu a slúžila k porovnaniu a kvantifikácii inhibičných účinkov. Nízka špecifická aktivita v reakčnej zmesi AKR1B1 (DMSO) nebola spôsobená inhibíciou roztokom DMSO ale poruchou na UHPLC, ktorý detekoval falošne nízke množstvo (ng) DAUN.

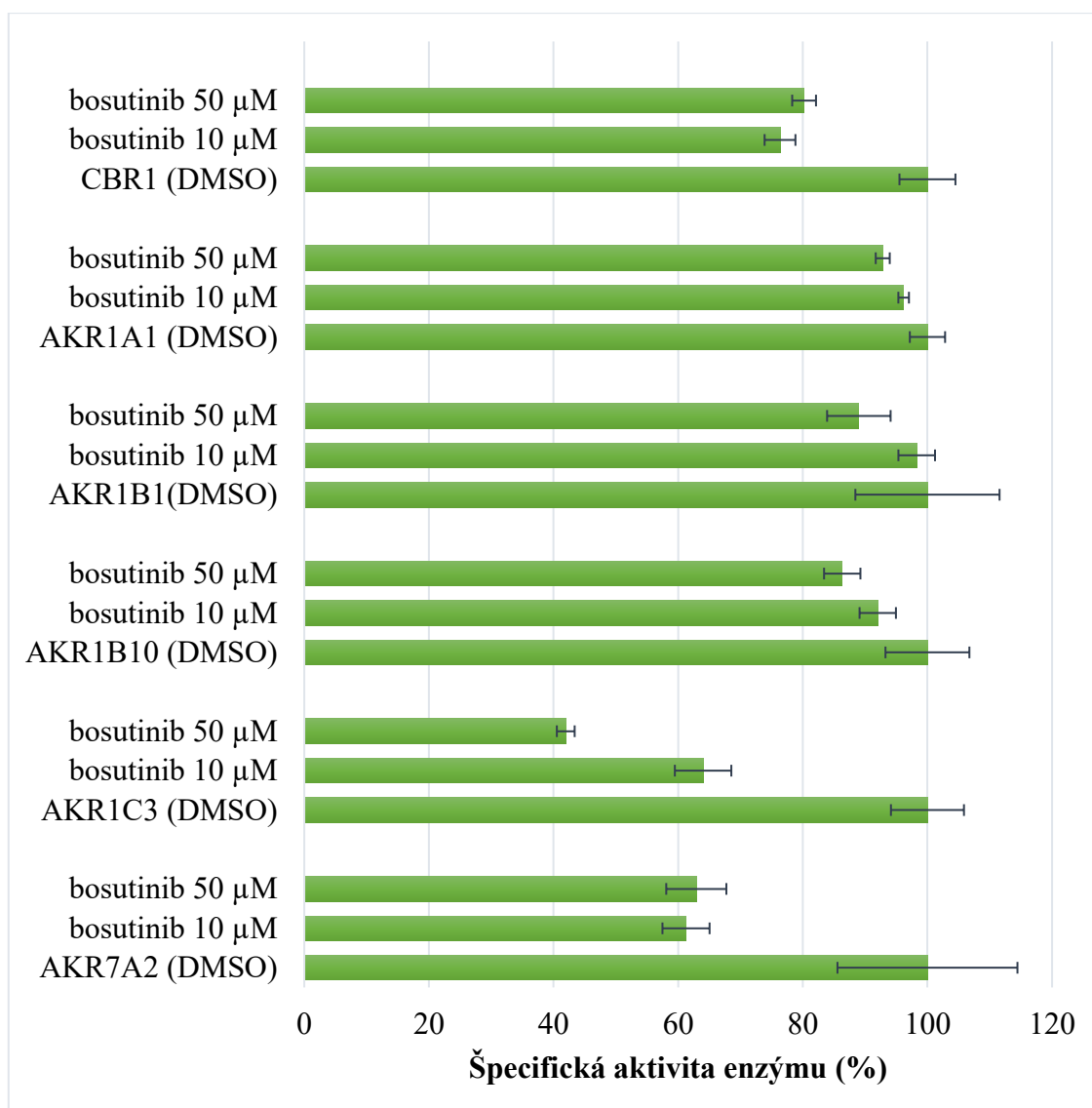
### **5.2.1 Bosutinib**

Bosutinib preukázal inhibičné účinky a znížil špecifickú aktivitu všetkých testovaných enzýmov, vid'. tab 13. Najviac znížil aktivitu AKR1C3 a to na 64% (bosutinib 10  $\mu$ M) a 42% (bosutinib 50  $\mu$ M), druhým najviac ovplyvneným enzýmom bol AKR7A2, tu došlo k zníženiu na 61,3% (bosutinib 10  $\mu$ M) a 62,9% (bosutinib 50 $\mu$ M) Aktivity ostatných enzýmov z nadrodiny AKR (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10) neboli znížené pod 86%. Z nadrodiny SDR bola u enzýmu CBR1 znížená aktivita na 76,3% (bosutinib 10  $\mu$ M) a 80,2% (bosutinib 50  $\mu$ M) (Obr. 12). Bosutinib má teda najlepšie inhibičné účinky voči AKR1C3 kedy znížil špecifickú aktivitu enzýmu o 36 % (226,1 mmol/mg/min, bosutinib 10 $\mu$ M) a 58% (364,5 mmol/mg/min, bosutinib 50 $\mu$ M).



Tab. 13 Vplyv bosutinibu na špecifickú aktivitu enzýmov

Vzorka (n=3)	nmol/mg/min	Špecifická aktivita enzýmu (%)	Inhibícia enzýmovej aktivity (%)
CBR1 (DMSO)	2002,6 ± 90,0	100,0 ± 4,5	
bosutinib 10 µM	1528,7 ± 49,5	76,3 ± 2,5	23,7
bosutinib 50 µM	1606,2 ± 38,3	80,2 ± 2,0	19,8
AKR1A1 (DMSO)	736,2 ± 20,8	100,0 ± 2,8	
bosutinib 10 µM	708,0 ± 6,3	96,2 ± 0,9	3,8
bosutinib 50 µM	683,3 ± 8,3	92,8 ± 1,1	7,2
AKR1B1(DMSO)	10,4 ± 1,2	100,0 ± 11,6	
bosutinib 10 µM	10,2 ± 0,3	98,3 ± 2,9	1,7
bosutinib 50 µM	9,3 ± 0,5	89,0 ± 5,1	11,0
AKR1B10 (DMSO)	191,1 ± 12,9	100,0 ± 6,7	
bosutinib 10 µM	175,9 ± 5,6	92,0 ± 3,0	8,0
bosutinib 50 µM	165,0 ± 5,5	86,3 ± 3,0	13,7
AKR1C3 (DMSO)	628,0 ± 36,8	100,0 ± 5,9	
bosutinib 10 µM	401,9 ± 28,5	64,0 ± 4,5	36,0
bosutinib 50 µM	263,5 ± 9,0	42,0 ± 1,4	58,0
AKR7A2 (DMSO)	203,4 ± 29,4	100,0 ± 14,4	
bosutinib 10 µM	124,6 ± 7,7	61,3 ± 3,8	38,7
bosutinib 50 µM	127,9 ± 9,8	62,9 ± 4,8	37,1



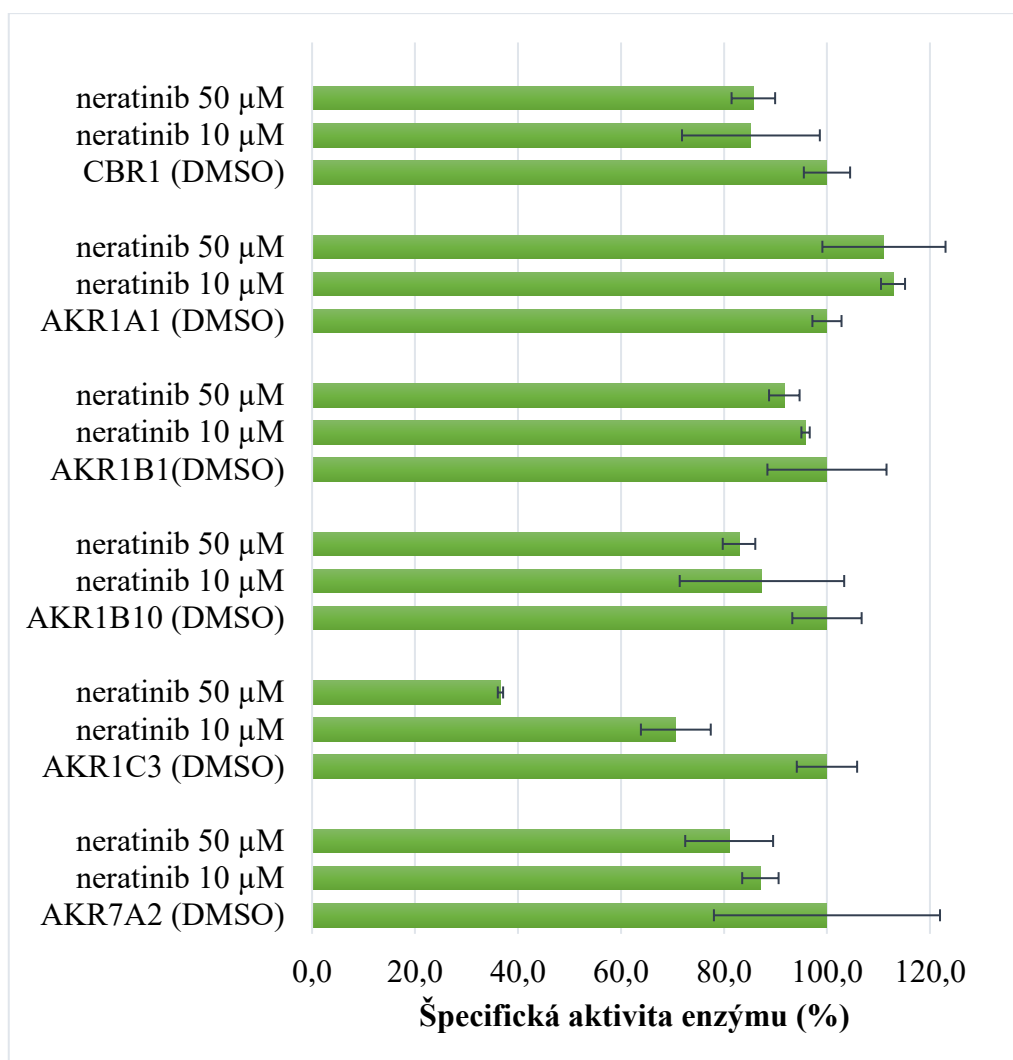
Obr. 12 Grafické vyhodnotenie účinku bosutinibu na špecifickú aktivitu enzýmov

### 5.2.2 Neratinib

Neratinib preukázal inhibičné účinky a znížil špecifickú aktivitu takmer u všetkých enzýmov, vid' tab. 14. Výnimkou bol enzým AKR1A1, u ktorého naopak došlo k zvýšeniu jeho špecifickej aktivity o 12,8% (neratinib 10 μM) a 11,1% (neratinib 50 μM), vid' obr. 13. Neratinib najviac znížil aktivitu AKR1C3 a to na 70,6% (neratinib 10 μM) a 36,6% (neratinib 50 μM). U ostatných enzýmov (CBR1, AKR1B1, AKR1B10, AKR7A2) neboli špecifické aktivity znížené pod 81%. Neratinib mal teda najlepšie inhibičné účinky voči enzýmu AKR1C3 kedy znížil špecifickú aktivitu enzýmu o 29,4 % (184,3 mmol/mg/min, neratinib 10μM) a 63,4% (398,2 mmol/mg/min, bosutinib 50μM).

Tab. 14 Vplyv neratinibu na špecifickú aktivitu enzýmov

Vzorka (n=3)	nmol/mg/min	Špecifická aktivita enzýmu (%)	Inhibícia enzýmovej aktivity (%)
CBR1 (DMSO)	2002,6 ± 90,0	100 ± 4,5	
neratinib 10 µM	1706,8 ± 268,0	85,2 ± 13,4	14,8
neratinib 50 µM	1716,3 ± 85,7	85,7 ± 4,2	14,3
AKR1A1 (DMSO)	736,2 ± 20,8	100,0 ± 2,8	
neratinib 10 µM	830,6 ± 17,2	112,8 ± 2,3	-12,8
neratinib 50 µM	817,6 ± 88,0	111,1 ± 12,0	-11,1
AKR1B1(DMSO)	10,4 ± 1,2	100 ± 11,6	
neratinib 10 µM	10,0 ± 0,1	95,8 ± 0,8	4,2
neratinib 50 µM	9,6 ± 0,3	91,7 ± 3,0	8,3
AKR1B10(DMSO)	191,2 ± 12,9	100 ± 6,7	
neratinib 10 µM	167,0 ± 30,5	87,4 ± 16,0	12,6
neratinib 50 µM	158,5 ± 6,0	82,9 ± 3,2	17,1
AKR1C3 (DMSO)	628,0 ± 36,8	100 ± 5,9	0,0
neratinib 10 µM	443,7 ± 42,6	70,6 ± 6,8	29,4
neratinib 50 µM	229,8 ± 3,3	36,6 ± 0,5	63,4
AKR7A2 (DMSO)	181,0 ± 39,7	100 ± 22,0	
neratinib 10 µM	157,6 ± 6,4	87,1 ± 3,5	12,9
neratinib 50 µM	146,6 ± 15,4	81,0 ± 8,5	19,0



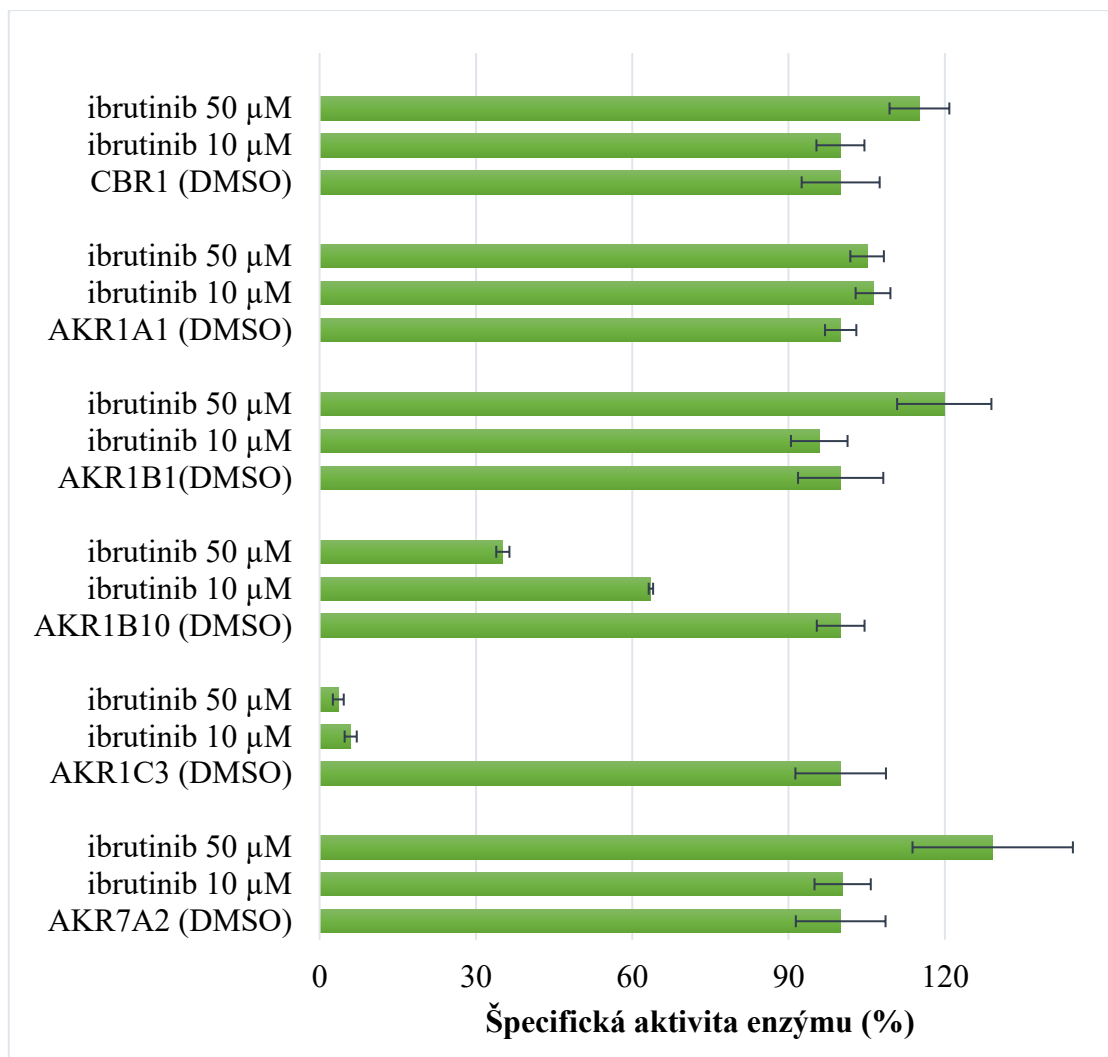
Obr. 13 Grafické vyhodnotenie účinku neratinibu na špecifickú aktivitu enzýmov

### 5.2.3 Ibrutinib

Ibrutinib preukázal inhibičné účinky *in vitro* podmienkach len u dvoch (AKR1B10, AKR1C3) z testovaných enzýmov. U ostatných enzýmov CBR1, AKR1A1, AKR1B1 AKR7A2 došlo naopak k zvýšeniu ich enzýmovej aktivity vid'. Tab. 15 a obr. 14. Z toho vyplýva, že ibrutinib má aj účinky slabého aktivátora na niektoré enzýmy. Avšak odporúčame zopakovať jednotlivé enzýmové reakcie, nakoľko mohlo dôjsť k neznámej preanalytickej chybe. Ibrutinib inhiboval enzým AKR1B10, znížil jeho špecifickú enzýmovú aktivitu na 95,9% (ibrutinib 10 µM) a 35,2% (ibrutinib 50 µM). Veľmi významne inhiboval enzým AKR1C3 až na hodnotu 6% (ibrutinib 10 µM) a 3,6% (ibrutinib 50 µM) čo zodpovedá inhibícii až 94% (575,4 mmol/mg/min, ibrutinib 10µM) a 96,4% (589,9 mmol/mg/min, ibrutinib 50µM) pôvodnej špecifickej enzýmovej aktivity.

Tab. 15 Vplyv ibrutinibu na špecifickú aktivitu enzýmov

Vzorka (n=3)	nmol/mg/min	Špecifická aktivita enzýmu (%)	Inhibícia enzýmovej aktivity (%)
CBR1 (DMSO)	2252,5 ± 168,5	100,0 ± 7,5	
ibrutinib 10 µM	2251,5 ± 103,8	100,0 ± 4,6	0,0
ibrutinib 50 µM	2593,0 ± 129,3	115,1 ± 5,7	-15,1
AKR1A1 (DMSO)	761,4 ± 22,9	100,0 ± 3,0	
ibrutinib 10 µM	808,7 ± 25,4	106,2 ± 3,3	-6,2
ibrutinib 50 µM	800,0 ± 24,5	105,1 ± 3,2	-5,1
AKR1B1(DMSO)	20,9 ± 1,7	100,0 ± 8,2	
ibrutinib 10 µM	20,1 ± 1,1	95,9 ± 5,4	4,1
ibrutinib 50 µM	25,1 ± 1,9	119,9 ± 9,0	-19,9
AKR1B10 (DMSO)	172,5 ± 7,9	100,0 ± 4,6	
ibrutinib 10 µM	109,7 ± 0,7	63,6 ± 0,4	36,4
ibrutinib 50 µM	60,7 ± 2,2	35,2 ± 1,3	64,8
AKR1C3 (DMSO)	611,9 ± 53,2	100,0 ± 8,7	
ibrutinib 10 µM	36,5 ± 7,1	6,0 ± 1,2	94,0
ibrutinib 50 µM	22,0 ± 6,4	3,6 ± 1,1	96,4
AKR7A2 (DMSO)	162,9 ± 14,0	100,0 ± 8,6	
ibrutinib 10 µM	163,5 ± 8,8	100,4 ± 5,4	-0,4
ibrutinib 50 µM	210,4 ± 25,1	129,2 ± 15,4	-29,2

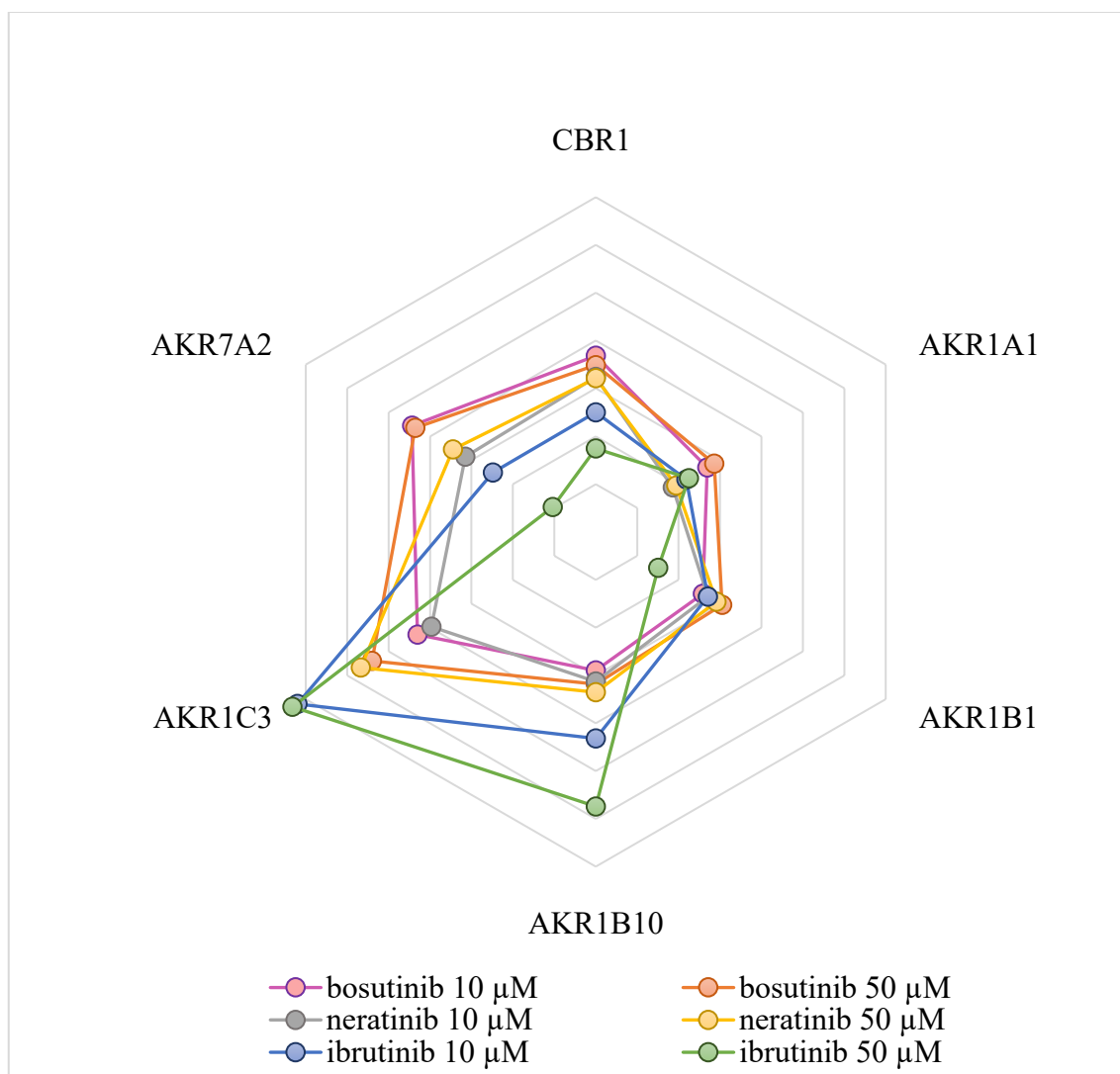


Obr. 14 Grafické vyhodnotenie účinku ibrutinibu na špecifickú aktivitu enzýmov

#### 5.2.4 Súhrn inhibičných účinkov bosutinibu, neratinibu a ibritinibu

Spomedzi testovaných enzýmov boli najintenzívnejšie inhibované AKR1C3, AKR1B10 a AKR7A2, u ostatných enzýmov (CBR, AKR1A1, AKR1B1) nedošlo ku výraznej inhibícii, vid' obr. 15. Enzýmu AKR7A2 sa špecifická aktivita znížila na 61,3 a 62,9 % vplyvom inhibičných účinkov bosutinibu (bosutinib 10; 50 μM), enzýmu AKR1B10 na 63,6 a 35,2 % inhibítorom ibrutinib (10; 50 μM). Enzým AKR1C3 bol inhibovaný najčastejšie a najintenzívnejšie všetkými troma inhibítormi. Najviac inhibovaný bol ibrutinibom (10; 50 μM) na hodnoty 6% a 3,6%, jeho aktivita bola teda znížená až o 94,0 a 96,4 %. V hodnotách špecifickej aktivity enzýmu to predstavuje rozdiel až 575,4 mmol/mg/min a 589,9 mg/mg/min. Veľmi prínosným výsledkom je vysoký inhibičný účinok ibrutinibu až 94% špecifickej enzýmovej aktivity AKR1C3 už pri nízkej koncentrácii inhibítora, len 10 μM. Pre klinickú prax by to mohlo znamenať nízke účinné dávky a minimálne zaťažovanie organizmu ďalším liekom.

Zatiaľ nie sú dostupné štúdie, ktoré by dané inhibítory použili na rovnaký účel ako my v našej práci. Nakoľko sa doterajšie štúdie zameriavajú skôr na pôvodné indikácie padania jednotlivých TKi súvisiace s ich účinkami na TK a ABC transportéry. Preto namerané dáta nemáme s čím porovnať. Odporúčame sa zamerať na ďalšie lieky zo skupiny TKi nakoľko sa medzi nimi môžu nachádzať ďalšie potencionálne inhibítory. Využívať *in silico* metódy na vyhľadávania ďalších potencionálnych štruktúrne príbuzných inhibítorov.



Obr. 15 Porovnanie inhibičných účinkov bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na špecifickú aktivitu enzýmov. Grafické znázornenie inhibície enzýmovej aktivity (%) zo štvrtého stĺpca tab.13, 14 a 15.

### 5.3 Stanovenie $IC_{50}$ , $K_i$ a typu inhibície pre inhibítora ibrutinibu a enzým AKR1C3

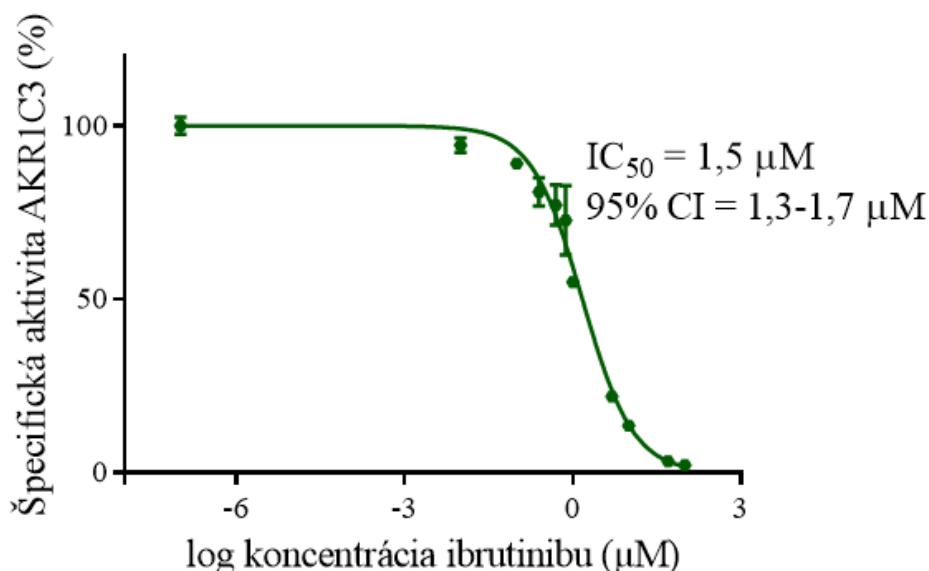
Podrobnejší pohľad na priebeh a charakter samotnej inhibície prinieslo stanovenie hodnôt  $IC_{50}$ ,  $K_i$  a typu inhibície.

### 5.3.1 Stanovenie hodnoty $IC_{50}$ pre inhibítor ibrutinib a enzým AKR1C3

Pre inhibítor ibrutinib a enzým AKR1C3 sa hodnota  $IC_{50} = 1,5 \mu M$  (tab. 16, obr. 16). Táto nízka hodnota indikuje vysoký inhibičný účinok ibrutinibu na enzým AKR1C3 už pri nízkych koncentráciách inhibítora v podmienkach in vitro.

Tab. 16 Špecifická aktivita AKR1C3 vo vybraných koncentráciách ibrutinibu, ktoré slúžili k určení hodnoty  $IC_{50}$

Vzorka n=3	nmol/mg/min	Špecifická enzýmová aktivita (%)	Inhibícia enzýmovej aktivity (%)
<b>AKR1C3 (DMSO)</b>	1422 ± 37	100,00 ± 2,6	
ibrutinib ( $\mu M$ )	0,01	1343 ± 30	94,5 ± 2,1
	0,10	1268 ± 15	89,2 ± 6,3
	0,25	1151 ± 58	81 ± 4,1
	0,50	1097 ± 82	77,2 ± 5,8
	0,75	1034 ± 142	72,8 ± 10,0
	1,00	781 ± 20	54,9 ± 1,4
	5,00	313 ± 22	22 ± 1,6
	10,00	193 ± 12	13,5 ± 0,9
	50,00	46 ± 1	3,3 ± 0,1
	100	30 ± 3	2,1 ± 0,2



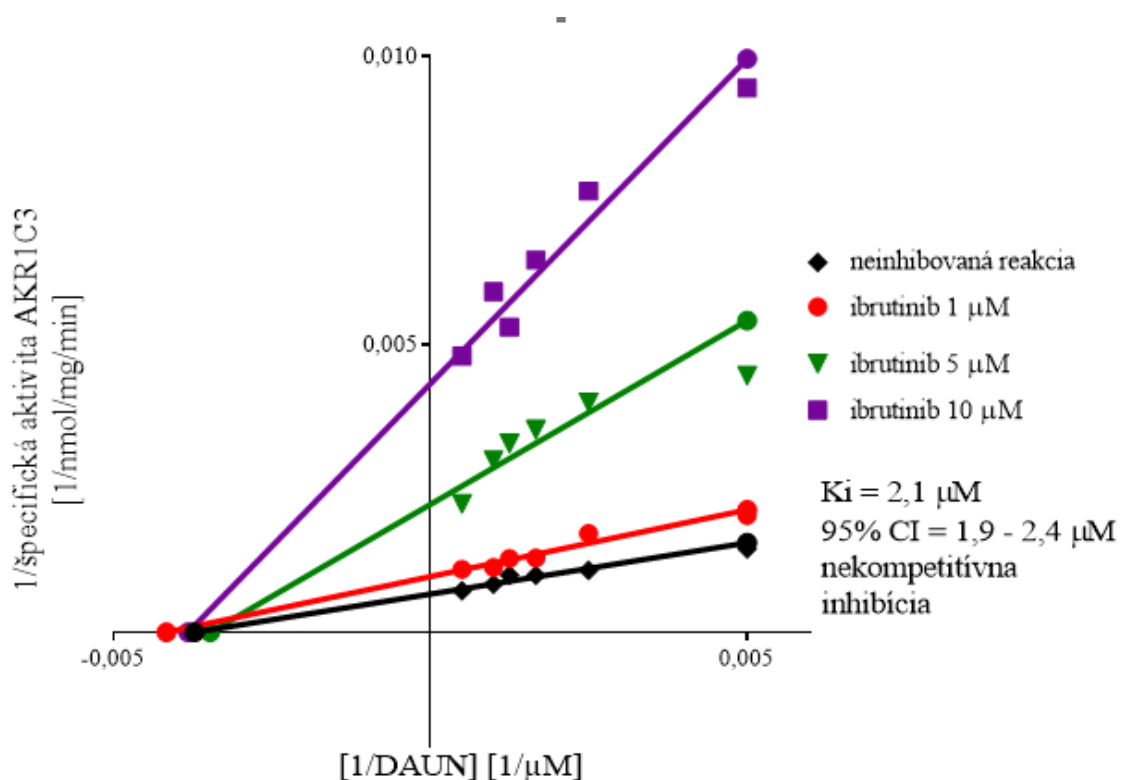
Obr. 16 Závislosť špecifickej aktivity enzýmu AKR1C3 (os y) na log koncentracii ibrutinibu (os x), z ktorej je určená hodnota  $IC_{50}$  (CI = konfidenčný interval)



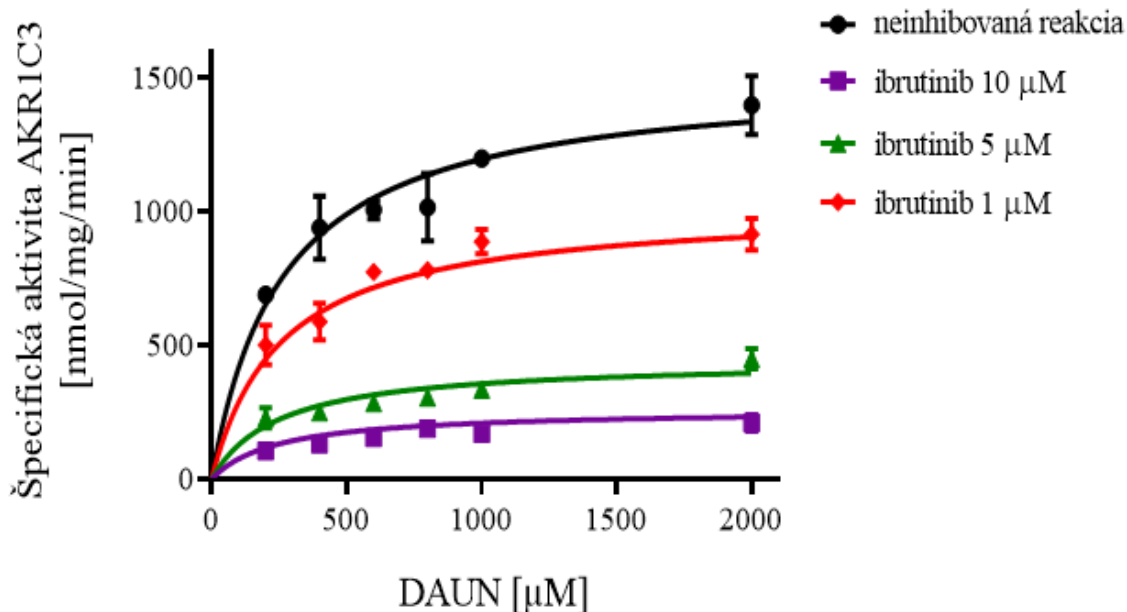
### 5.3.2 Stanovenie typu inhibície a hodnoty $K_i$

Výsledkom ďalších kinetických meraní bolo zistenie, že enzýmom AKR1C3 katalyzovaná redukcia DAUN je podľa Lineweaver-Burka inhibovaná nekompetitívne inhibítorom ibrutinib s hodnotou  $K_i = 2,1 \mu\text{M}$  (Obr. 17). Ibrutinib sa neviaže do aktívneho miesta AKR1C3 a neovplyvňuje ani väzbu DAUN do aktívneho miesta enzýmu, ale viaže sa na voľný AKR1C3 alebo na jeho komplex s DAUN. Zvýšenie koncentrácie DAUN inhibíciu neovplyvní (Obr. 18), čo predstavuje pre klinickú prax ďalšie pozitívum nakoľko navýšenie dávky DAUN neovplyvní inhibičný účinok ibrutinibu.

Nízka hodnota  $K_i$  a nekompetitívny typ inhibície podľa Lineweaver-Burka naznačujú žeby ibrutinib mohol byť neštandardným typom inhibítora, tzv. „tight binding inhibítor.“ Je preto potrebné ešte uskutočniť ďalšie doplňujúce merania a overiť či sa hodnota  $IC_{50}$  bude meniť s meniacou sa koncentráciou enzýmu AKR1C3 a stanoviť skutočný typ inhibície pre tight binding inhibítor sledovaním toho, ako sa  $IC_{50}$  inhibítora mení s meniacou sa koncentráciou DAUN (Copeland 2000).



Obr. 17 Určenie typu inhibície podľa Lineweaver-Burka



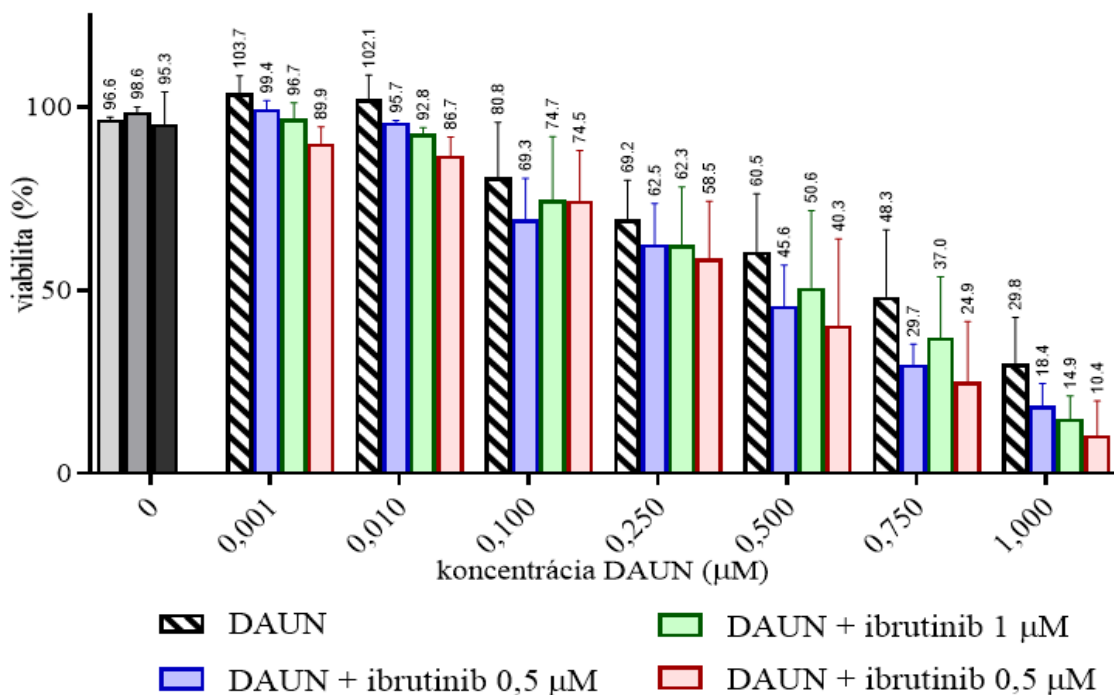
Obr. 18 Zmena špecifickej aktivity enzýmu (os y) v závislosti na roznej koncentrácii substrátu (os x) a inhibítora

Pre klinickú prax nízke hodnoty  $K_i$  (2,1  $\mu\text{M}$ ) a  $IC_{50}$  (1,5  $\mu\text{M}$ ) znamenajú nízke hodnoty efektívnej terapeutickojej dávky a minimálne zaťaženie organizmu ďalším liekom. Ibrutinib sa tak stáva potencionálne vyhovujúcou kombináciou pre liek DAUN.

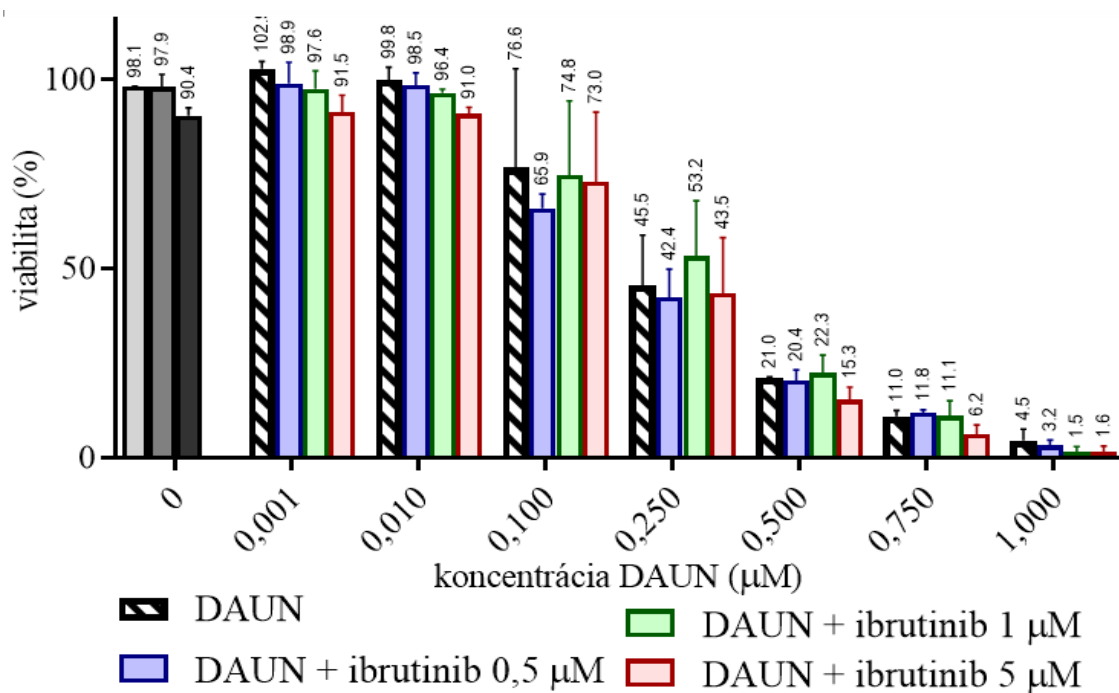
#### 5.4 Inhibičný účinok ibrutinibu na aktivitu enzýmu AKR1C3 v bunkových líniiach

Niektoré látky majú tendenciu sa správať odlišne v závislosti od podmienok, v ktorých sa nachádzajú. Ibrutinib inhiboval rekombinantný enzým AKR1C3 v podmienkach *in vitro*. Na úrovni bunkových línii nemusí vykazovať rovnaké výsledky. Ibrutinib môže byť cytotoxický alebo môže mať problém preniknúť do cieľových buniek. Preto sme schopnosť ibrutinibu inhibovať AKR1C3 otestovali na bunkových líniiach. Bunky kolorektálneho karcinómu človeka HCT116 za normálnych okolností exprimujú zanedbateľné množstvo AKR1C3, preto boli na katedre biochemických vied transfekované pAKR1C3 a pCI. Po 72 hodinách sme inkubáciu ukončili MTT cytotoxickým testom. Pre normalizáciu hodnôt absorbancie, bola hodnota absorbancie z buniek s čistým médiom považovaná za viabilitu 100% a hodnota absorbancie z buniek s negatívnou kontrolou za viabilitu 0%. Každý pokus bol vykonaný v triplicáte a jednotlivé uvedené obrázky a výsledky sa vzťahujú už na ich priemernú hodnotu.

Z porovnania výsledkov viability HCT116 pAKR1C3 (Obr. 19) a HCT116 pCI (Obr. 20) je zrejme že bunky HCT 116 pAKR1C3 boli schopné sa brániť cytotoxickému pôsobeniu samotného DAUN viac ako bunky HCT116 pCI. V bunkách HCT116 pAKR1C3 bol DAUN redukovaný enzýmom AKR1C3 na svoj menej cytotoxický metabolit DAUNOL, čo umožnilo bunkám prežiť.



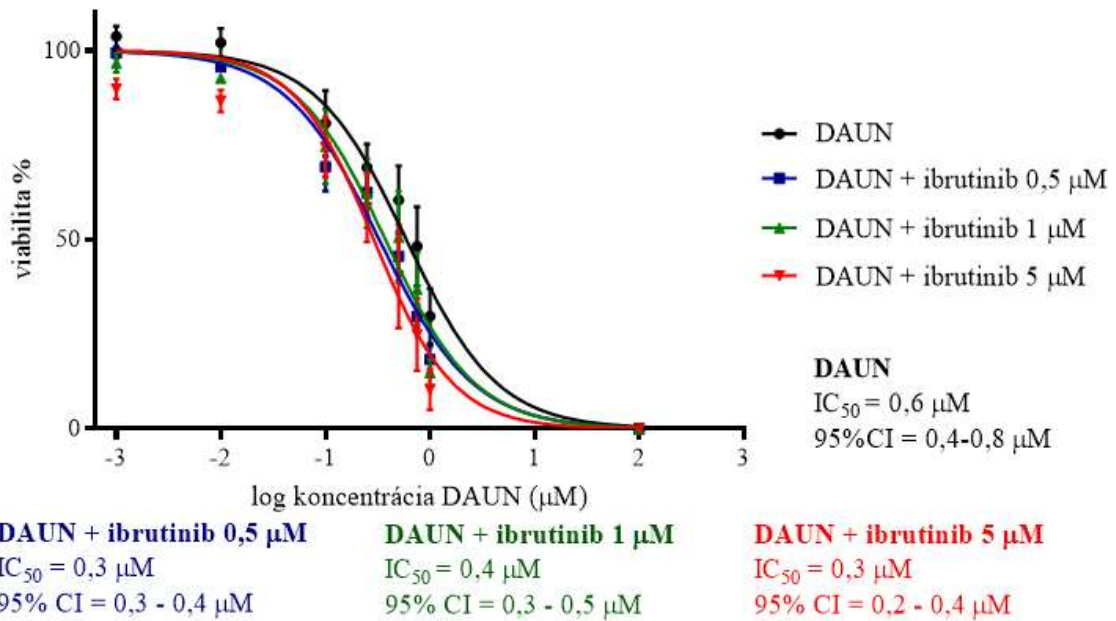
Obr. 19 Viabilita buniek HCT116 pAKR1C3 pri rôznej koncentrácii DAUN a ibrutinibu



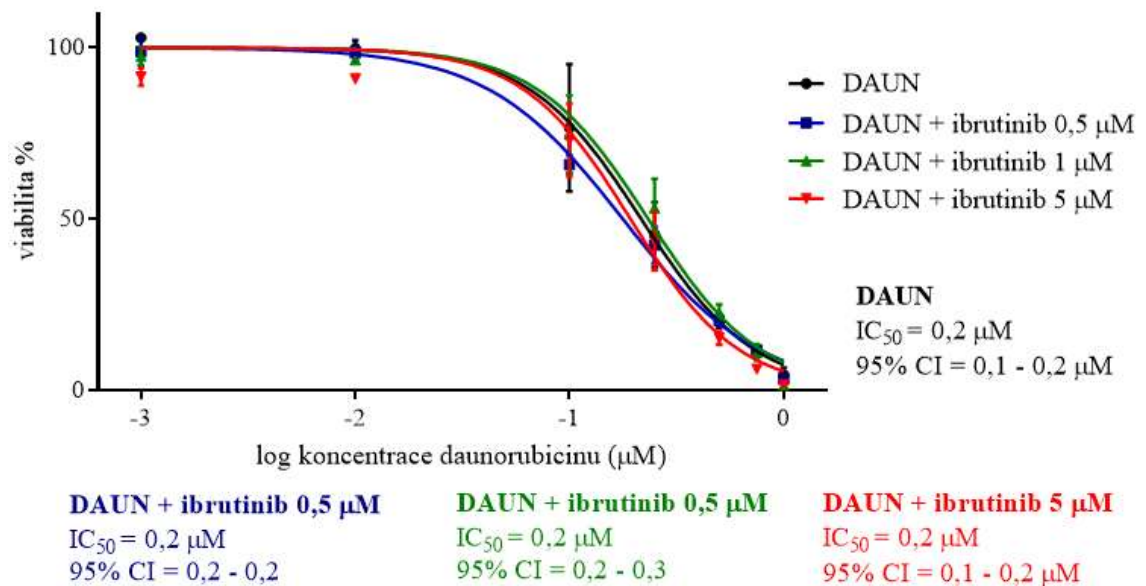
Obr. 20 Viabilita buniek HCT116 pCI pri rôznej koncentrácii DAUN a ibrutinibu

Porovnaním inkubácie HCT116 pAKR1C3 v médiu s kombináciou DAUN a ibrutinibu s inkubáciou buniek HCT116 pAKR1C3 v médiu len s DAUN je viditeľné, že viabilita buniek bola vždy nižšia u buniek s inhibítorom. Ibrutinib inhiboval AKR1C3 a došlo k kvantitatívnemu poklesu redukcie DAUN na DAUNOL.

Stanovené hodnoty  $IC_{50}$  sú pre HCT116 pAKR1C3 na obr. 21 a pre HCT116pCI na obr. 22. V inkubáciách HCT116 pAKR1C3 len s DAUN sa  $IC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$ , v kombinačných inkubáciách sa hodnota znížila na  $IC_{50} = 0,3; 0,4; 0,3 \mu\text{M}$  (pre koncentráciu ibrutinibu 0,5; 1; 5  $\mu\text{M}$ ). Na rozdiel od inkubácií buniek HCT116 pCI, u ktorých bola hodnota  $IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$  pre všetky inkubačné podmienky. Hodnota  $IC_{50}$  pre bunky HCT116 pAKR1C3 poklesla v prítomnosti ibrutinibu, pretože inhibítor úspešne vstúpil do buniek a inhiboval enzým AKR1C3 a inhiboval intracelulárny metabolizmus redukcie DAUN na DAUNOL a došlo k plnému využitiu cytotoxického účinku DAUN. Pravdepodobne ide o účinok aditívny, pre presné určenie musíme vykonať ďalšie merania (z troch inkubácií HCT116 pAKR1C3 s ibrutinibom sú dostupné validné dáta len z jedného pokusu. Preto nemôžeme porovnať samostatné účinky DAUN a ibrutinibu s ich účinkom v kombinácii). Pre presnejší pohľad na inhibíciu redukcie DAUN doporučujeme použiť rovnakú metódou ako pri *in vitro* experimentoch a stanoviť metabolit DAUNOL na UHPLC. Taktiež sme si vedomí veľkých odchýlok medzi jednotlivými pokusmi. Ich príčinou môže byť rozdielna úspešnosť transfekcie medzi jednotlivými pokusmi, od ktorej následne závisí miera expresia AKR1C3. Potrebné je uskutočniť ešte niekoľko opakovaní pokusov na bunkových líniiach, aby získané dáta boli štatisticky významné. Napriek tomu dosiahnuté výsledky v jednotlivých pokusoch už naznačujú prospešnosť kombinácia DAUN s ibrutinibom. V kombinácii zvyšujú antineoplastický účinok DAUN a znižujú viabilitu buniek účinnejšie ako samotný DAUN.



Obr. 21 Viabilita buniek HCT116 pAKR1C3 pri rôznej logaritmickej koncentrácii DAUN a ibrutinibu, ktoré slúžili k stanoveniu hodnoty  $IC_{50}$



Obr. 22 Viabilita buniek HCT116 pCI pri rôznej logaritmickej koncentrácii DAUN a ibrutinibu, ktoré slúžili k stanoveniu hodnoty  $IC_{50}$

Ďalej by sme pred klinickou štúdiou odporučili vykonať ďalšie pokusy už na leukemických bunkových líniah a otestovať inhibičné účinky ibrutinibu priamo na patologických bunkách, sledovať správanie buniek, zmeny expresie AKR1C3 a prípadnú snahu buniek o vznik rezistencie.

V roku 2012 skupina vedcov Endo et al. objavila u látky bacchrain, izolovanej z brazílskeho propolisu inhibičné účinky na enzým AKR1C3 v PC3 bunkách prostatickej rakoviny, s  $IC_{50} = 30 \mu\text{M}$  a  $K_i = 5,6 \text{ nM}$  pre kompetitívny inhibítor. V roku 2018 na katedre biochemických vied farmaceutickej fakulty Karlovej univerzity vedecký pracovníci Novotná et al. (2018) objavili u látok purvavol A a roscovitin nekompetitívne inhibičné účinky na enzým AKR1C3 potvrdené aj na bunkovej úrovni HCT116 pAKR1C3 s  $K_i = 5,5; 1,4 \mu\text{M}$  a  $IC_{50} = 6,4; 3,7 \mu\text{M}$ . Všetky tieto a mnohé ďalšie inhibítory spolu s ibrutinibom majú potenciál nie len v znížení vnútrobunkového metabolizmu 2-elektrónovej redukcie DAUN, ale aj pri liečbe iných AKR1C3 dependentných patologických stavov. Napríklad antineoplastikum cisplatín sa používa pri liečbe rakoviny hrubého čreva, jeho cytotoxické metabolity sú detoxifikované AKR1C3 a AKR1C1. Inhibíciou týchto enzýmov sa dosiahne zvýšenie antineoplastického účinku cisplatínu (Matsunaga et al. 2013). Ďalej na spomalenie rastu a k liečbe hormónálne závislých (inhibícia AKR1C3 vo funkcii 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy ktorá sa podieľa na vzniku rakoviny prsníka a prostaty) a hormónálne nezávislých malignít (inhibícia AKR1C3 vo funkcii PGF $2_{\alpha}$  syntázy) (Endo et al. 2012;). V neposlednom rade nesmieme zabudnúť na schopnosť ibrutinibu inhibovať ABCC1 transportér a možnosť využiť túto jeho schopnosť v kombinácii s liekmi, ktoré sú týmto transportérom prenášané (Wu a Fu 2018).

## 6 ZÁVER

V predkladanej diplomovej práci sme sa zamerali na inhibíciu enzýmov z nadrodín AKR a SDR redukujúcich DAUN. Liek je zo skupiny ANT, ktorý sa používa k liečbe ALL a AML. Produktom enzýmami katalyzovanej redukcie je metabolit DAUNOL, ktorý vykazuje vyššiu kardiotoxickú a menšiu antineoplastickú aktivitu. Stojí tak za zlyhaním liečby. Za potenciálne inhibítory sme vybrali niektoré TKi (bosutinib, neratinib, ibrutinib). V tejto skupine liekov boli zistené inhibičné účinky na aktivitu enzýmov z nadrodín AKR a SDR.

Namerané hodnoty špecifickej aktivity DAUN redukujúcich enzýmov klesali v poradí CBR1 > AKR1C3 > AKR1B1 > AKR1A1 > AKR7A2 > AKR1B10 > AKR1C1 > AKR1C2 > AKR1C4 > CBR3.

Z najviac aktívnych enzýmov (CBR1, AKR1C3, AKR1B1, AKR1A1, AKR7A2, AKR1B10) boli najintenzívnejšie inhibované enzýmy AKR1C3, AKR1B10 a AKR7A2. Enzým AKR1C3 bol inhibovaný najčastejšie a najintenzívnejšie všetkými tromi inhibítormi. Najviac inhibovaný bol 10 a 50  $\mu\text{M}$  ibrutinibom. Aktivita AKR1C3 sa znížila o 94 a 96,4% z pôvodnej špecifickej enzýmovej aktivity.

Pri inhibícii enzýmu AKR1C3 ibrutinibom sa  $\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ . Táto nízka hodnota indikuje vysoký inhibičný účinok už pri nízkych koncentráciach inhibítora. Pre klinickú prax by to mohlo znamenať nízke hodnoty efektívnej terapeutickej dávky a minimálne zaťaženie organizmu ďalším liekom. Stanovením hodnoty  $\text{K}_i = 2,1 \mu\text{M}$  a z tvaru krivky Lineweaver-Burka sme zistili že sa jedná o nekompetitívny typ inhibície. Zvýšenie koncentrácie DAUN teda inhibíciu neovplyvní, čo pre klinickú prax predstavuje ďalšie pozitívum, modulácia dávky DAUN neovplyvní inhibičný účinok ibrutinibu.

Porovnaním experimentov na bunkových líniách HCT116 pAKR1C3 a HCT116 pCI sme potvrdili u buniek transfekovaných pAKR1C3 schopnosť brániť sa cytotoxickému pôsobeniu DAUN. Porovnaním inkubácie HCT116 pAKR1C3 v médiu s kombináciou DAUN a ibrutinibu s inkubáciou buniek HCT116 pAKR1C3 v médiu len s DAUN sme potvrdili zníženie viability u buniek s inhibítorom. Ibrutinib je teda aktívnym inhibítorom enzýmu AKR1C3 a vedie k inhibícii 2-elektrónovej redukcie DAUN. Toto zistenie rozširuje možnosti využitia ibrutinibu pri liečbe AKR1C3 dependentných patologických stavov.

Chceme pokračovať v testovaní TKi pre možnosť výskytu aj ďalších aktívnych inhibítorov enzýmov z nadrodín AKR a SDR. Taktiež sú v pláne kinetické merania s inhibítorom ibrutinib, ktoré budú zamerané na potvrdenie/vyvrátenie charakteru tzv. „tight binding inhibítor“. Pred zahájením klinických štúdií bude potrebné otestovať aj účinky kombinácie DAUN s ibrutinibom priamo na leukemických bunkách a sledovať správanie leukemických buniek.



## 7 ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

ABC transportér	Adenozíntrifosfát viažúce transportéry
AIDS	Syndrómom získaného imunodeficitu
AML	Akútna myeloidná leukémia
ANT	Antracyklínové antibiotiká
ALL	Akútna lymfoblastová leukémia
ATP	Adenozíntrifosfát
AKR	Aldo-ketoreduktázy
AK	Aminokyseliny
BTK	Brutonová tyrozínkináza
CD	Diferenciačné znaky „Cluster of differentiation“
CBR	Karbonylreduktázy
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DAUN	Daunorubicin
DAUNOL	Dounorubicinol
DOX	Doxorubicin
DOXOL	Doxorubicinol
dsDNA	Dvojvláknová deoxyribonukleová kyselina
EPI	Epirubicin
pAKR1C3	plazmid s genetickou informáciou pre syntézu AKR1C3
pCI	prázdny plazmid
IDA	Idarubicin
IDAOL	Idarubicinol
KD	Kostná dreň

NADP(H)	Nikotínadenínindinukleotidfosfát
NAD(H)	Nikotínamidadenindinukleotid
NOs	Syntáza oxidu dusnatého
TK	Tyrozínkináza
TKi	Inhibítory tyrozínkináz
TOPOII	Topoizomeráza II
TOPOII $\alpha$	$\alpha$ izomér topoizomerázy II
TOPOII $\beta$	$\beta$ izomér topoizomerázy II
ROS	Reaktívne formy kyslíka
RS	Regeneračný systém
RNA	Ribonukleová kyselina
SDR	Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom
SNP	Jednonukleotidový polymorfizmus

## 8 LITERATÚRA

Adam Z., Doubek M., Vorlíček J. a Pour L. (2007a) Akutní myeloidní leukémie. V: Hematologie pro praktické lékaře. Galén, Praha, str. 93–98. ISBN 978-80-726-24539.

Adam Z., Doubek M., Vorlíček J. a Pour L. (2007b) Akutní lymfatická leukémie dospělých. V: Hematologie pro praktické lékaře. Galén, Praha, str. 99–101. ISBN 978-80-726-24539.

Adam Z., Klabusay M., Šmardová J., Neubauer J., Staníček J. a Vorlíček J. (2008) Maligní non-hodgkinské lymfomy. V: Hematologie: Přehled maligních hematologických nemocí, 2. vyd. Grada, Praha, str. 105–118. ISBN 978-80-247-2502-4.

Hardy D. W (eds) (2017) Fundamentals of HIV medicine. Oxford university press, Oxford, str. 336–351. ISBN 978-01-904-9309-7.

Bains O. S., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2010) Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 335(3), 533–45.

Bains O. S., Karkling M. J., Lubieniecka J. M., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2010) Naturally occurring variants of human CBR3 alter anthracycline in vitro metabolism. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 332(3), 755–763.

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

*Bosutinib* [online]. Posledná revízia 18. február 2019 [cit. 2019-2-19]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06616>.

Bray J. E., Marsden B. D. a Oppermann U. (2009) The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chemico-biological interactions*. 178(1–3), 99–109.

Bresson E., Lacroix-Pépin N., Boucher-Kovalik S., Chapdelaine P. a Fortier M. A. (2012) The prostaglandin F synthase activity of the human aldose reductase AKR1B1 brings new lenses to look at pathologic conditions. *Frontiers in pharmacology*. 3, 98.

Breyer-Pfaff U., Martin H. J., Ernst M., Maser E., Block S. a Maser E. (2004) Enantioselectivity of carbonyl reduction of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone by tissue fractions from human and rat and by enzymes isolated from human liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 32(9), 915–22.

Bristow M. R., Billingham M. E., Mason J. W. a Daniels J. R. (1978) Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. *Cancer Treatment Reports*, 62(6), 873–879.

Byrns M. C., Jin Y. a Penning T. M. (2011) Inhibitors of type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 125(1–2), 95–104.

Cappetta D., De Angelis A., Sapio L., Prezioso L., Illiano M., Quaini F., Rossi F., Berrino L., Naviglio S. a Urbanek K. (2017). Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: A common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017, 1521020.

Copeland R. A. (2000) Tight binding inhibitors. V: *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*, 2. vyd. Wiley-VCH, New York, str. 305-317. ISBN 0-471-22063-9.

*Cytostatika*. [online]. Posledná revízia 10. november 2018 [cit. 2018-10-15]. Dostupné z: <<https://www.wikiskripta.eu/w/Cytostatika>>.

*Daunorubicin* [online]. Posledná revízia 18. február 2019 [cit. 2019-2-19]. Dostupné z: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00694>>.

Doubek M. (2001) Akutní lymfatická leukémie dospělých. V: *Hematologie II: Přehled maligních hematologických ochorení*. Grada, Praha, str. 51–64.

Du X., Tong J., Lu H., He C., Du S., Jia P., Zhao W., Xu H., Li J., Shen Z., Wu Y., Tong J. a Zhoh L. (2017) Combination of bortezomib and daunorubicin in the induction of apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular medicine reports*. 16(1), 101–108.

Edwardson D. W., Narendrula R., Chewchuk S., Mispel-Beyer K., Mapletoft J. P. J. a Parissenti A. M. (2015) Role of drug metabolism in the cytotoxicity and clinical efficacy of anthracyclines. *Current drug metabolism*, 16, 412–426.

Endoa S., Matsunaga T., Kanamori A., Otsuji Y., Nagai H., Sundaram K., El-Kabbani O., Toyooka N., Ohta S. a Hara A. (2012) Selective inhibition of human type-5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of brazilian propolis. *Journal of natural products*. 75(4), 716–721.

Fečková-Mihályová J., Ďuraš J., Zuchnická J., Kaščák M. a Hájek R. (2016) Ibrutinib v hematonekologii. *Klinická farmakologie a farmacie*. 30(3), 8-14.

Forrest G. L., Gonzalez B., Tseng W., Li X. a Mann J. (2000) Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer research*. 60(18), 5158–5164.

Ghigo A., Li M. a Hirsch E. (2016) New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochimica et biophysica acta - Molecular cell research*. 1863(7), 1916–1925.

Gong Q., Zhou L., Xu S., Li X., Zou Y. a Chen J. (2015) High doses of daunorubicin during induction therapy of newly diagnosed acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Public Library of Science*. 10(5), 0125612.

Hande K. R. (2008) Topoisomerase II inhibitors. *Update on cancer therapeutic*. 3, 13–26.

Hofman J., Malcekova B., Skarka A., Novotna E. a Wsol V. (2014) Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: The role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and applied pharmacology*. 278(3), 238–248.

Huang L., He R., Luo W., Zhu Y. S., Li J., Tan T., Zhang X., Hu Z. a Luo D. (2016) Aldo-keto reductase family 1 member B10 inhibitors: Potential drugs for cancer treatment. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 11(2), 184–96.

Chen M. H., Colan S. D. a Diller L. (2011). Cardiovascular disease: Cause od morbidity and mortality in adult survivors of childhood cancers. *Circulation research*. 108(5), 619–628.

*Ibrutinib* [online]. Posledná revízia: 18. február 2019 [cit. 2019-2-19]. Dostupné z: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB090537>>.

Jang W. J., Choi D. Y. a Jeon I.-S. (2013) Vascular endothelial dysfunction after anthracyclines treatment in children with acute lymphoblastic leukemia. *Korean journal of pediatrics*. 56(3), 130–4.

Kaiserová H. a Lvasníčková E. (2004) Inhibition study of rabbit liver cytosolic reductases involved in daunorubicin toxication. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 20(5), 477–483.

Kassner N., Huse K., Martin H. J., Gödtel-Armbrust U., Metzger A., Meineke I., Brockmöller J., Klein K., Zanger U. M., Maser E. a Wojnowski L. (2008) Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 36(10), 2113–20.

Kathawala R. J., Gupta P., Ashby C. R. a Chen Z. S. (2015) The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates*. 18, s. 1–17.

Khanim F. L., Hayden R. E., Birtwistle J., Lodi A., Tiziani S., Davies N. J., Ride J. P., Viant M. R., Gunther U. L., Mountford J. C., Schrewe H., Green R. M., Murray J. A., Drayson M. T. a Bunce C. M. (2009) Combined bezafibrate and medroxyprogesterone acetate: Potential novel therapy for acute myeloid leukaemia. *Plos one*. 4(12), 8147.

Klener P. a Klener P. (2009) Genotoxická cytostatika - inhibie replikace a transkripce. V: *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Grada, Praha, str. 38-40. ISBN 978-80-247-2808-7.

Krejčí M., Šmardová J. a Adam Z. (2008) Akutní myeloidní leukemie. V: *Hematologie: Přehled maligních hematologických nemocí*, 2. vyd. Grada, Praha, str. 29–38. ISBN 978-80-247-2808-7.

Krejsek J. (2016) Infekce virem HIV-1 a imunopatogeneze synromu získané imunitní nedostatečnosti AIDS. V: *Imunologie člověka*. Garamon. Hradec Králové, str. 410-416. ISBN 978-80-86472-74-4.

Kubisz, P., Staško, P., Dobrotová, M., Fedorová, J. a Flochová, E. (2006) *Hematológia a transfuziológia*. Grada, Praha, str. 324. ISBN 80-247-1779-4.

Lacroix P. N., Chapdelaine P. a Fortier M. A. (2013) Evaluation of the prostaglandin F synthase activity of human and bovine aldo-keto reductases: AKR1A1s complement AKR1B1s as potent PGF synthases. *Prostaglandins and other lipid mediators*. 106, s. 124–132.

Laffin B. a Petrash J. M. (2012) Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. *Frontiers in pharmacology*. 3, 104.

Lehmann M., Vilar K. D, Franco A., Reguly M. L. a Andrade H. R. (2004) Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the drosophila somatic mutation and recombination test. *Environmental and Molecular mutagenesis*. 43(4), 250–257.

Li X., Zou S., Li Z., Cai G., Chen B., Wang P. a Dong W. (2016) The identification of human aldo-keto reductase AKR7A2 as a novel cytoglobin-binding partner. *Cellular and molecular biology letters*. 21, 25.

Licata S., Saponiero A., Mordente A. a Minotti G. (2000) Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chemical research in toxicology*. 13(5), 414–20.

*Drug record daunorubicin* [online]. Posledná revízia 30. október 2018 [cit. 2018-12-19]. Dostupné z: <<https://livertox.nih.gov/Daunorubicin.htm#structure>>.

Ma J., Yan R., Zu X., Cheng J. M., Rao K., Liao D. F. a Cao D. (2008) Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$  in breast cancer cells. *Journal of biological chemistry*. 283(6), 3418–3423.

Marinello J., Delcuratolo M., Capranico G., Marinello J., Delcuratolo M. a Capranico G. (2018) Anthracyclines as topoisomerase II poisons: From early studies to new perspectives. *International journal of molecular sciences*. 19(11), 3480.

Matsunaga T., Hojo A., Yamane Y., Endo S., El-Kabbani O. a Hara A. (2013) Pathophysiological roles of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers. *Chemico-biological interactions*. 202(1–3), 234–242.

Megías-Vericat J. E., Montesinos P., Herrero M. J., Moscardó F., Bosó V., Rojas L., Martínez-Cuadrón D., Hervás D., Boluda B., García-Robles A., Rodríguez-Veiga R., Martín-Cerezuela M., Cervera J., Sendra L., Sanz J., Miguel A., Lorenzo I., Poveda J. L., Sanz M. Á. a Aliño S. F. (2017) Impact of ABC single nucleotide polymorphisms upon the efficacy and toxicity of induction chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 58(5), 1197–1206.

Menna P., Recalcati S., Cairo G. a Minotti G. (2007) An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular toxicology*. 7(2), 80–85.

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G. a Gianni L. (2004) Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*. 56(2), 185–229.

Mordente A., Minotti G., Martorana G. E., Silvestrini A., Giardina B. a Meucci E. (2003) Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: Biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochemical pharmacology*. 66(6), 989–998.

Neidle S. a Sanderson N. M. (1984) Molecular aspects of anti-cancer drug action. In: *Molecular aspects of anti-cancer drug action*. Palgrave, London, str. 35–55. ISBN 978-1-349-06010-8.

*Neratinib* [online]. Posledná revízia 18. február 2019 [cit. 2019-2-19]. Dostupné z: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB06616>>.

Neul C., Schaeffeler E., Sparreboom A., Laufer S., Schwab M. a Nies A. T. (2016) Impact of membrane drug transporters on resistance to small-molecule tyrosine kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*. 37(11), 904–932.

Nishimoto Y., Murakami A., Sato S., Kajimura T., Nakashima K., Yakabe K., Sueoka K. a Sugino N. (2018) Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinomas. *Reproductive medicine and biology*. 17(2), 173–181.



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

Özvegy-Laczka C., Cserepes J., Elkind N. B. a Sarkadi B. (2005) Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates*. 8 (1–2), 15–26.

Palackal N. T., Burczynski M. E., Harvey R. G. a Penning T. M. (2001) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chemico-biological interactions*. 130–132, 815–824.

Pecka M. (2006) *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Finidr, Český Těšín, str. 304. ISBN 80-86682-00-5.

Penning T. M. (2015) The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-biological interactions*. 234, 236–246.

Penning T. M. (2017) Aldo-Keto Reductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. 27(12), 1329–1340.

Picklo M. J., Olson S. J., Hayes J. D., Markesbery W. R. a Montine T. J. (2001) Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. *Brain research*. 916 (1–2), 229–238.

Pilka E. S., Niesen F. H., Lee W. H., El-Hawari Y., Dunford J. E., Kochan G., Wsól V., Martin H.-J., Maser E. a Oppermann U. (2009) Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases, *Plos one*. 4(10), 7113.

Piska K., Koczurkiewicz P., Bucki A., Wójcik-Pszczola K., Kołaczkowski M. a Pękala E. (2017) Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines - role in cardiotoxicity and cancer resistance, reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational new drugs*. 35(3), 375–385.

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

Puma N., Ruggiero A., Ridola V., Maurizi P., Lazzareschi I., Attinà G., Mastrangelo S., Rosa G. a Riccardi R. (2008) Anthracycline-related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers. *Signa vitae - a journal in intensive care and emergency medicine*, 3(1), 30–34.

Quigley G. J., Wan A., Ughetto G., Marel Gi., Boom J. H. a Richt A. (1980) Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: Daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Biochemistry*. 77(12), 7204-7208.

Reinbolt R. E., Patel R., Pan X., Timmers C. D., Pilarski R., Shapiro C. L. a Lustberg M. B. (2016) Risk factors for anthracycline-associated cardiotoxicity. *Supportive care in cancer*. 24(5), 2173–2180.

Rotondo R., Moschini R., Renzone G., Tuccinardi T., Balestri F., Cappiello M., Scaloni A., Mura U. a Del-Corso A. (2016) Human carbonyl reductase 1 as efficient catalyst for the reduction of glutathionylated aldehydes derived from lipid peroxidation. *Free radical biology and medicine*. 99, 323–332.

Sadurska E. (2015) Current views on anthracycline cardiotoxicity in childhood cancer survivors. *Pediatric cardiology*. 36(6), 1112–9.

Schaupp C. M., White C. C., Merrill G. F. a Kavanagh T. J. (2015) Metabolism of doxorubicin to the cardiotoxic metabolite doxorubicinol is increased in a mouse model of chronic glutathione deficiency: A potential role for carbonyl reductase 3. *Chemico-biological interactions*. 234, 154–161.

Schoeffler A. J. a Berger J. M. (2005) Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochemical society transactions*. 33(6), 1465-1470.

Seliger J. M., Misuri L., Maser E. a Hintzpeter J. (2018) The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 33(1), 607–614.

Shen T., Kuang Y.-H., Ashby C. R., Lei Y., Chen A., Zhou Y., Chen X., Tiwari A. K., Hopper-Borge E., Ouyang J. a Chen Z. S. (2009) Imatinib and nilotinib reverse multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the efflux activity of the MRP7 (ABCC10). *Plos one*. 4(10), 7520.

Shukla S., Chen Z.-S. a Ambudkar S. V. (2012) Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug resistance updates. churchill livingstone*, 15(1–2), 70–80.

Singal P. K. a Iliskovic N. (1998) Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *New England journal of medicine*. 339(13), 900–905.

Šustková Z. a Ráčil Z. (2016) Akutní leukemie - co by měl praktický lékař vědět. *Medicína pro praxi*. 13(4), 192–195.

Takanashi S., Bachur N. R., Pfeifer T. A., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2008) Adriamycin metabolism in man, evidence from urinary metabolites. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 4(1), s. 79–87.

Tiwari S. R., Mishra P. a Abraham J. (2016) Neratinib, a novel HER2-targeted tyrosine kinase inhibitor. *Clinical breast cancer*. 16(5), 344–348.

*UniProtKB - P16152 (CBRI\_HUMAN)* [online]. Posledná revízia 13. február 2019 [cit. 2019-2-14]. Dostupné z: <<https://www.uniprot.org/uniprot/P16152>>.

Vásquez-Vivar J., Martasek P., Hogg N., Masters B. S. S., Pritchard K. A. a Kalyanaraman B. (1997) Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*. 36(38), 11293–11297.

Vavrova A., Jansova H., Mackova E., Machacek M., Haskova P., Tichotova L., Sterba M. a Simunek T. (2013) Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *Plos one*. 8(10), 76676.

Vodrážka Z., Rauch P. a Káš J. (2003) *Enzymologie*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, str.170. ISBN 80-7080-330-4.

Wang C., Yan R., Luo D., Watabe K., Liao D. F. a Cao D. (2009) Aldo-keto reductase family 1 member B10 promotes cell survival by regulating lipid synthesis and eliminating carbonyls. *Journal of biological chemistry*. 284(39), 26742–26748.

Wu S. a Fu L. (2018) Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Molecular cancer*. 17(1), 25.

Yamanouchi R., Harada K., Ferdous T. a Ueyama Y. (2018) Low carbonyl reductase 1 expression is associated with poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Molecular and clinical oncology*. 8(3), 400–406.

Zdeněk A., Vorlíček J., Vaníček J. a Krupa P. (2002) Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Grada, Praha, str.696. ISBN 80-79169-792-3.

Zemanová L., Navrátilová H., Andrýs R., Šperková K., Andrejs J., Kozáková K., Meier M., Möller G., Novotná E., Šafr M., Adamski J. a Wsól V. (2019) Initial characterization of human DHRS1 (SDR19C1), a member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *The journal of steroid biochemistry and molecular Biology*. 185, 80–89.

Zhong L., Shen H., Huang C., Jing H. a Cao D. (2011) AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. *Toxicology and applied pharmacology*. 255(1), 40–47.