

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2019

BC. JAROSLAV MILAN

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

VLIV INHIBICE MIDOSTAURINU, VISTUSERTIBU A
TALAZOPARIBU NA AKTIVITU VYBRANÝCH REDUKTAS
Z NADRODINY AKR A SDR

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: prof. Ing. Vladimír Wsól, PhD.

Konzultant: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Bc. Jaroslav Milan

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

Bc. Jaroslav Milan

V Hradci Králové

.....

Dátum

Podpis

Pod'akovanie:

V prvom rade by som chcel poďakovať svojmu školiteľovi prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, PhD. za odbornú pomoc a cenné rady. RNDr. Eve Novotnej, PhD. za trpezlivosť, vedenie a obrovskú ochotu kedykoľvek poradiť. Moje poďakovanie patrí aj Mgr. Anselmovi Morellovi Garciovi, PhD. z oddelenia biochemických vied za ochotu, vedenie a predanie skúseností pri testoch na bunkových línách a western blote a tiež Mgr. Neslihan Büküm z oddelenia biochemických vied, za pomoc, rady a asistenciu pri western blote.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Jaroslav Milan

Školitel: prof. Ing. Vladimír Wsól, PhD.

Konzultant: RNDr. Eva Novotná, PhD.

Názov diplomovej práce: Vliv inhibice midostaurinu, vistusertibu a talazoparibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR.

Klíčové slová: reduktázy, AKR, inhibitory, midostaurín, vistusertib, talazoparib, antracyklíny, KG1a

Mnohočetná lieková rezistencia je už mnoho rokov stále veľkým problémom pri terapii nádorových ochorení. Antracyklínové antibiotiká sú využívané v terapií s vysokou účinnosťou, ale spomínaná rezistencia a závažné nežiadúce účinky niekedy zabraňujú ich používaniu a vedú k zlyhaniu terapie. Jedným z najzávažnejších nežiadúcich účinkov je kardiotoxicita. Podľa starších teórií bol vznik kardiotoxicity založený na vznikajúcich reaktívnych formách kyslíka (ROS). Mnohokrát bol potvrdený negatívny účinok ROS na bunky srdcového svalu, avšak dnešné poznatky otvárajú aj iné, komplexnejšie mechanizmy jej vzniku.

Predmetom tejto práce bolo štúdium enzýmov, ktoré metabolizujú antracyklíny, konkrétne daunorubicín. Vznikajúce metabolity majú nižšiu účinnosť a vyššiu toxicitu a môžu byť jednou z príčin zlyhania terapie a už spomenutej kardiotoxicity.

V našej práci sme použili 3 inhibitory, midostaurín, vistusertib, talazoparib a testovali sme ich inhibičný vplyv na enzýmy AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2, CBR1, ktoré redukujú daunorubicín. Podľa našich zistení, je najviac inhibovaný enzým AKR1C3 a to zo všetkými inhibítormi. Z vybraných inhibítorov je pre neho najúčinnější midostaurín (93 % pri 50 μ M). Inhibícia enzýmu AKR1B10 bola najviac účinná s vistusertibom (38 % pri 50 μ M). Zvyšné inhibitory ho inhibovali len do 18 % pri 50 μ M. Podobne na tom bol aj AKR1A1 a najúčinnější bol midostaurín (28 % pri 50 μ M). Najmenšiu mieru inhibície vykazoval AKR7A2 s maximálnou

inhibíciou 27 % pri vistusertibe. Ostatné inhibítory neboli pre AKR7A2 účinné. Pre CBR1 sa nám vysoko účinný inhibítor nepodarilo nájsť, ale najlepšie ho inhiboval vistusertib (52 % pri 50 μ M).

Na in vitro experimenty sme naviazali ex vivo experimentom s enzýmom AKR1C3 exprimovaným na bunkovej línii KG1a a midostaurínom. Experimentom sme potvrdili vyšší cytotoxický efekt daunorubicínu v kombinácií s midostaurínom.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical sciences

Candidate: Bc. Jaroslav Milan

Supervisor: prof. Ing. Vladimír Wsól, PhD.

Consultant: RNDr. Eva Novotná, PhD.

Title of diploma thesis: The influence of midostaurin, vistusertib and talazoparib inhibition on the activity of selected reductases from AKR and SDR superfamilies.

Key words: reductase, AKR, inhibitors, midostaurin, vistusertib, talazoparib, anthracyclines, KG1a

Multi drug resistance is for a lot of years still a big problem in therapy of cancer. Anthracycline antibiotics are highly efficient for treating cancers but multi drug resistance and severe side effects sometimes restrain the use of them and lead therapy to fail. One of the worst adverse effect is a cardiotoxicity. By older studies, the mechanism of a cardiotoxicity was because of formation of reactive oxygen species (ROS). Many times, the negative effects of ROS on cardiac muscle cells was confirmed but nowadays the evidence opens some other and more complex mechanisms of its damage.

The main point of this work was examination of enzymes which metabolize anthracyclines, mainly daunorubicin. Metabolites which are formed are less potent than parent drug and they have bigger toxicity. This can have an impact on therapy and can cause a cardiotoxicity.

In our study we used 3 inhibitors, midostaurin, vistusertib, talazoparib and we tested their inhibition potential on daunorubicin reducing enzymes AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 and CBR1. On the base of our results, the most inhibited enzyme is AKR1C3, which is valid for all 3 inhibitors tested. Most efficient inhibitor for AKR1C3 is midostaurin (93 % of inhibition with 50 μ M). Inhibition of AKR1B10 is most efficient with vistusertib (38 % of inhibition with 50 μ M). Others inhibit the enzyme only up to 18 % with 50 μ M. We have similar results with AKR1A1, for which the most efficient inhibitor is midostaurin (28 % of inhibition with 50 μ M). The weakest inhibition is shown

in AKR7A2 with maximal inhibition of 27 % with 50 μ M of vistusertib. Other inhibitors show no efficiency against AKR7A2. We have not found a significantly potent inhibitor for CBR1. The highest inhibition of CBR1 was found for vistusertib (52 % of inhibition with 50 μ M).

We finished this work by doing inhibition tests on cell line KG1a with midostaurin. By this test we confirmed higher cytotoxic effect of daunorubicin in presence with midostaurin.

Obsah

1. Úvod	11
2. Teoretická časť	12
2.1. Karbonyl redukujúce enzýmy (CRE).....	12
2.1.1. Aldo-Keto reductázy (AKR)	12
2.1.2. Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom (SDR)	16
2.1.3. Dehydrogenázy/reduktázy so stredne dlhým reťazcom (MDR).....	18
2.2. ANTRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ	19
2.2.1. Vývoj protinádorových liečiv	19
2.2.2. Daunorubicín a doxorubicín	20
2.3. INHIBÍTORY	23
2.3.1. Inhibítory tyrozín-kinázy	24
Midostaurín	25
2.3.2. Inhibítory mTOR	28
Rapamycín	28
Vistusertib.....	29
2.3.3. PARP inhibítory	30
Talazoparib.....	31
2.4. Mechanizmy vzniku liekovej rezistencie	33
2.4.1. Inaktivácia chemoterapeutika.....	34
2.4.2. Modifikácia cieľového miesta.....	35
2.4.3. Efflux liečiva	35
ABC transportéry	36
2.4.4. Oprava DNA poškodenia.....	37
2.4.5. Inhibícia bunkovej smrti	38
2.4.6. Epithelial-Mesenchymal transition (EMT).....	38
2.4.7. Úloha epigenetiky v rezistencií nádorových buniek.....	39

2.4.8.	Úloha miRNA	40
	Biosyntéza miRNA	41
3.	Cieľ práce	43
4.	Metodická časť	44
4.1.	Prístroje, pomôcky a chemikálie.....	44
4.2.	Metodika práce.....	50
4.2.1.	Príprava roztokov na inkubáciu	50
4.2.2.	Inkubácia vzoriek s daunorubicínom.....	52
4.2.3.	Práca s bunkovou líniou KG1a, XTT test	53
4.2.4.	SDS-PAGE elektroforéza	54
	Lýza bunkových línií a príprava vzoriek	55
	Elektroforéza	56
4.2.5.	Western blot.....	56
5.	Výsledky a diskusia	59
5.1.	Stanovenie a porovnanie špecifickej aktivity CRE voči daunorubicínu	59
5.2.	Testovanie inhibičných účinkov jednotlivých inhibítorov.....	62
5.2.1.	Inhibícia midostaurínom	62
5.2.2.	Inhibícia vistusertibom	64
5.2.3.	Inhibícia talazoparibom.....	66
5.2.4.	Stanovenie IC ₅₀ pre midostaurín.....	69
5.2.5.	Test životnosti bunkovej línie KG1a.....	72
6.	Záver	75
7.	Zoznam skratiek.....	77
8.	Zoznam literatúry	81

1. Úvod

Vznik nádorových ochorení si častokrát nevieme vysvetliť. Býva spojený so zložitými procesmi na úrovni bunkovej diferenciácie, kedy sa bunky vymykajú kontrole a regulačným mechanizmom. Pokiaľ sa niečo také stane, náš organizmus má mnoho spôsobov na odvrátenie poškodenia, či už reparáciou DNA alebo kontrolovanou smrťou bunky. Táto kontrola však nie je dokonalá a to dáva predpoklady pre vznik nádorového ochorenia.

Nádorové bunky majú často vysokú expresiu biotransformačných enzýmov, čo im dáva výhodu pri obrane voči chemoterapeutikám a potenciál k vytvoreniu liekovej rezistencie. Prvou voľbou liečby AML (akútna myeloidná leukémia) a niektorých iných nádorových ochorení sú antracyklíny. Lieková rezistencia nám zabraňuje v úspešnej liečbe a enzýmy zo skupiny karbonyl reductáz ich intenzívne metabolizujú na kardiotoxické a menej účinné sekundárne alkoholy.

Hlavnou ambíciou tejto diplomovej práce je otestovať 3 inhibítory karbonyl redukujúcich enzýmov. V prípade vysokej inhibičnej sily by sme mohli potenciálne znížiť množstvo a negatívny efekt vznikajúcich sekundárnych alkoholov, ak by sa tento inhibítor podával spolu s antracyklínmi.

Experimentálna časť bola zameraná na *in vitro* reakcie za použitia enzýmov AKR1A1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1 a CBR3 s vybranými inhibítormi. Ako špecifický substrát sme použili daunorubicín. U najaktívnejšieho enzýmu sme stanovili IC_{50} a výsledky *in vitro* experimentov sme overili *ex vivo* na bunkových AML líniiach KG1a.

2. Teoretická časť

2.1. Karbonyl redukujúce enzýmy (CRE)

Ako CRE sa označujú enzýmy schopné redukovať karbonylovú skupinu (aldehydy, ketóny a chinóny). Tieto enzýmy premieňajú svoje substráty na primárne alebo sekundárne alkoholy. Pre endogénne látky je redukcia týmito enzýmami často reverzibilný, oxido-redukčný proces. Zahrňuje aktiváciu alebo deaktiváciu dôležitých signálnych molekúl ako sú steroidy, prostaglandíny, retinoidy a biogénne amíny. Oproti tomu je redukcia xenobiotík častokrát proces ireverzibilný a ide len o detoxifikačnú reakciu. CRE sú NAD(P)H dependentné (Malátková, Maser, & Wsol, 2010). Väčšina z týchto enzýmov sa dá zaradiť do jednej z troch veľkých nadrodín. Aldo-keto reductázy (AKR), dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom (SDR) a dehydrogenázy/reduktázy so stredne dlhým reťazcom (MDR) (Rosemond & Walsh, 2004).

2.1.1. Aldo-Keto reductázy (AKR)

Pomerne široká nadrodina aldo-keto reductáz zahrňuje viac ako 190 členov (Penning, 2015). Tieto enzýmy potrebujú pre svoje fungovanie NAD(P)H ako kofaktor. Ide o skupinu monomérnych enzýmov, kde AKR2, AKR6 a AKR7 predstavujú výnimku a tvoria multimérne komplexy. Všetky žijúce organizmy, exprimujú viaceré gény kódujúce AKR enzýmy (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008).

Nomenklatúra AKR je podobná nadrodine CYP a triedi enzýmy na základe podobnosti aminokyselinovej sekvencie. Príklad **AKR7A2**, kde základ slova „AKR“ označuje aldo-keto reductázu, prvá číslica predstavuje rodinu, písmeno (A,B,C,D) podrodinu a druhé číslo predstavuje unikátnu aminokyselinovú sekvenciu. Podľa sekvencie aminokyselín sa delia do 16 rodín a 4 podrodín. Na to, aby AKRs patrili do rovnakej rodiny musia mať podobnosť vo viac ako 40 % a v prípade podrodiny je to viac ako v 60 %. U človeka bolo identifikovaných zatiaľ 15 zástupcov (Penning, 2015).

V nasledujúcej tabuľke je stručný prehľad jednotlivých rodín aj s ich katalytickými vlastnosťami.

Tab. 1 Prehľad jednotlivých rodín AKR enzýmov a stručný popis ich katalytických vlastností.

AKR1	Aldehyd reduktázy, hydroxysteroid dehydrogenázy, steroid 5 β -reduktázy
AKR2	Manóza a xylóza reduktázy
AKR3	Kvasinkové AKRs
AKR4	Reduktázy <i>Oryza sativa</i> (ryža siata)
AKR5	Reduktázy kyseliny glukónovej
AKR6	β -podjednotka Na/K pumpy
AKR7	Aflatoxín B1 aldehyd reduktázy
AKR8	Pyridoxal reduktázy
AKR9	Aryl-alcohol dehydrogenázy
AKR10	Reduktázy <i>Streptomyces sp.</i>
AKR11	Reduktázy <i>Bacillus sp.</i>
AKR12	Aldózo-reduktázy u <i>Streptomyces sp.</i>
AKR13	Reduktázy termotolerantných baktérií
AKR14	Reduktázy <i>E. Coli</i>
AKR15	Reduktázy <i>Mycobacterium sp.</i>
AKR16	Reduktázy <i>V. Cholerae</i>

Zdroj: Informácie čerpané z článku: *The aldo-keto reductases (AKRs): Overview*, Penning, 2015 a <https://www.uniprot.org/uniprot/O43488>.

Karbonylová skupina látok, špeciálne aldehydov má vysokú chemickú aktivitu a môže ľahko atakovať proteíny. Potrava, xenobiotiká a polutanty životného prostredia sú často reaktívne karbonylové zlúčeniny. Zistilo sa, že karbonyl redukujúce enzýmy zabraňujú toxicite týchto látok. Jednou detoxifikačnou cestou je premena aldehydov na alkoholy. Toto znižuje ich chemickú reaktivitu, ale biologickú aktivitu primárne znižovať nemusí (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008). Niektoré z AKR enzýmov sa zúčastňujú

aj na metabolizme antracyklínov. Táto práca sa zaoberá enzýmami, ktoré majú najväčšiu úlohu v metabolizovaní daunorubicínu a doxorubicínu a preto sa budem v ďalšej časti venovať len vybraným AKR enzýmom.

AKR1A1 (aldehyd reduktáza)

Jedným z prvých objavených AKR. Bol identifikovaný ako jeden z kľúčových enzýmov zapájaných do syntézy kyseliny askorbovej, nie však u ľudí. Je to cytozolický, NAD(P)H dependentný, monomérený enzým, katalyzujúci oxidačno-redukčné reakcie (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008). Exprimuje sa vo veľkej miere v obličkách, slinných žľazách a pečeni. Bol detekovaný aj v trachei, žalúdku, mozgu, pľúcach, prostate, placentе, tenkom čreve a v prsnej žľaze (<https://www.uniprot.org/uniprot/P14550>). AKR1A1 vykazuje širokú substrátovú aktivitu. Preferuje karboxylovú skupinu obsahujúcu negatívne nabitú substancie, avšak aromatické aldehydy, steroidy a malé 3-uhlíkaté aldehydy sú taktiež redukované s vysokou afinitou (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008).

AKR1B1 (Aldózo reduktáza)

AKR1B1 katalyzuje predovšetkým redukciu mnohých fyziologických substrátov, medzi ktoré patria napríklad produkty pokročilej glykolyzácie (AGEs), produkty peroxidácie lipidov, 4-hydroxynonenal (HNE) a polutanty životného prostredia. Hrá dôležitú úlohu v proliferácii hladkého svalstva v priebehu aterosklerózy (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008). Enzýmová aktivita je spojená s výskytom sekundárnych diabetických komplikácií. Je známe, že izoforma AKR1B1 dokáže premeniť glukózu na sorbitol, pokiaľ sa v krvi nachádza dostatočné množstvo. Deje sa to pri nekompenzovanom diabete. Kvôli tomuto fenoménu sa aktivita AKR1B1 spája s výskytom hyperglykemickej retinopatie, neuropatie a nefropatie. Inhibítory cieleňé proti AKR1B1 sa využívajú terapeuticky na zvrátenie sekundárnych príznakov dlhodobej hyperglykémie (Penning, 2015).

AKR1B10

Na rozdiel od početne exprimovanej AKR1B1 je táto reductáza exprimovaná hlavne v tenkom a hrubom čreve, pečeni a nadobličkách. S AKR1B1 sa zhoduje v 70 % aminokyselinovej sekvencie. Jeho fyziologickými substrátmi sú retinové izoméry. Enzým je overexprimovaný u karcinómu pľúc. Zo xenobiotík AKR1B10 najúčinnjšie redukuje dolasteron (antiemetické liečivo) hoci premieňa aj iné xenobiotiká, napríklad daunorubicín a oracín (Martin, et al., 2005).

AKR1C

Na rozdiel od podrodiny AKR1A a AKR1B, ktoré ako substráty využívajú iba aldehydy, enzýmy podrodiny AKR1C pracujú ako s aldehydmi, tak aj s ketónmi. Ich fyziologickými substrátmi sú steroidy a prostaglandíny. Všetky 4 enzýmy boli objavené v pečeni, avšak každý má individuálnu extrahepatálnu distribúciu. Aj keď AKR1C4 je exprimovaný hlavne v pečeni, AKR1C2 a AKR1C3 sú zastúpené predovšetkým v prostate a prsnej žľaze (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008). Zo xenobiotík metabolizujú doxorubicín, daunorubicín, oracín, naloxon, dolasterol, ketotifen. Enzýmy podrodiny 1C hrajú zásadnú úlohu v metabolizme androgénov a estrogénov a podieľajú sa tak na progresii hormón-dependentných ochorení, ako je karcinóm prsníka, karcinóm prostaty alebo benígnej hyperplázií prostaty (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008).

AKR7A (aflatoxín reductázy)

Aflatoxín reductázy boli po prvý krát objavené u potkanov, kvôli ich schopnosti metabolizovať aflatoxín B1 dialdehyd na netoxický alkohol. U ľudí sa našli 2 zástupcovia tejto rodiny. AKR7A2 je hojne distribuovaný v extrahepatálnych orgánoch, zatiaľ čo AKR7A3 je lokalizovaný hlavne v žalúdku, pankrease, obličkách a pečeni (Barski, Tipparaju, & Bhatnagar, 2008). AKR7A2 má vysokú katalytickú efektivitu a afinitu k sukcinyl semialdehydu, čo je metabolit kyseliny γ -aminomaslovej (GABA). Produkt tejto reakcie je γ -hydroxybutyrát (GHB) (Penning, 2015).

2.1.2. Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom (SDR)

Nadrodina SDR je doposiaľ najrozsiahljšou skupinou enzýmov, ktorá zahrňuje v súčasnosti viac ako 679 520 proteínov a databáza sa postupne rozširuje objavom nových (Jörnvall, Landreh, & Östberg, 2015). SDRs je veľká a vysoko divergentná nadrodina a väčšina z nich si je len vzdialene podobná. Podľa UniProt databázy sa u človeka nachádza 65 potvrdených ľudských SDR proteínov (UniProt, 2019). Ich aminokyselinová podobnosť býva 15-30% (Hoffmann & Maser, 2007). Je tvorená jednotlivcami dlhými okolo 250-350 aminokyselín. Bývajú voľne rozpustené v cytozole alebo v niektorých prípadoch ako membránovo viazané proteíny (Hoffmann & Maser, 2007). Redukčná aktivita voči xenobiotickým substrátom je dobre známa u karbonylreduktázy 1 (CBR1), karbonylreduktázy 3 (CBR3) a 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy 1 (11 β HSD1).

CBR 1 (karbonylreduktáza 1)

Ľudská CBR1 má veľkosť 30 kDa a skladá sa z 227 aminokyselín. Tento monomérny enzým je u človeka exprimovaný vo väčšine tkanív. Vysoké hladiny boli nájdené v pečeni, gastrointestinálnom, urogenitálnom trakte a v nervovom systéme (Wirth & Wermuth, 1992). Katalyzuje NADPH-dependentnú redukciu viacerých karbonylových zlúčenín vrátane xenobiotík, produktov peroxidácie lipidov a premieňa 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) na ešte karcinogénnejší 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanol (Matsunaga, Shintani, & Hara, 2006). Existuje podozrenie, že CBR1 sa môže zúčastňovať apoptózy a kancerogénnych procesov, avšak nie sú priame dôkazy o konkrétnych látkach, ktoré by to mohli spôsobovať. Okrem toho bolo zistené, že CBR1 efektívne odbúrava aldehyd 4-oxononenal. Tento fakt indikuje, že CBR1 sa tiež zúčastňuje na eliminácii metabolitov produkujúcich kyslíkové radikály (Pilka, et al., 2009). Mozog je bohatý zásobený nenasýtenými masnými kyselinami, ktoré sú za určitých okolností náchylné ku lipidovej peroxidácii. Zvýšená peroxidácia sa spája s neurodegeneratívnymi ochoreniami, ako sú Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova chorea. Karbonyl

redukujúce enzýmy dokážu tieto nebezpečné aldehydy degradovať a tým pomáhajú ku fyziologickej ochrane nervového tkaniva. Expresia CBR1 bola zvýšená pri nádoroch pľúc a hrubého čreva v porovnaní s tkanivami bez nádoru (Malátková, Maser, & Wsol, 2010).

Okrem xenobiotických substrátov, CBR1 katalyzuje redukciiu prostaglandínov, chinónov, syntézu tetrahydrobiopterínu (Malátková, Maser, & Wsol, 2010). Zo xenobiotických substrátov sú farmakologicky najvýznamnejšie: daunorubicín, doxorubicín, metyrapone, haloperidol, bromperidol. (Matsunaga, Shintani, & Hara, 2006). Podľa zistení má CBR 1 dominantnú úlohu v metabolizme antracyklínov, aj keď za ich redukciiu sú zodpovedné viaceré enzýmy (Kassner, et al., 2008).

CBR1 prezentuje vysokú interindividuálnu variabilitu v množstve expresie v pečeni a v reduktázovej aktivite. Tieto zistenia môžu viesť ku nepredvídateľnej farmakodynamike substrátov, ktoré táto reduktáza premieňa, napríklad spomínané antracyklíny (Gonzales-Covarrubias, Zhang, Kalabus, Reilling, & Blanco, 2009).

CBR 3

Gén kódujúci tento enzým bol prvýkrát identifikovaný 62 kb vzdialený od CBR1 na chromozóme 21. CBR3 sa skladá z 277 aminokyselín a jeho sekvencia je s CBR1 je zhodná na 71 %. So zvieracou CBR2 sa zhodujú iba v 23 %. Enzým sa nachádza v rôznych tkanivách, aj keď je jeho expresia omnoho menšia, ako CBR1 (Matsunaga, Shintani, & Hara, 2006). Rovnako ako CBR1, aj CBR3 je cytozolická NADPH-dependentná reduktáza patriaca do skupiny SDR. Najvyššia expresia mRNA sa našla vo vaječníkoch a pankrease. Čo sa katalytických vlastností týka, CBR3 vykazuje menšiu aktivitu ako CBR1 a chýba mu prostaglandín 9-keto reduktázová a prostaglandín 15-hydroxy dehydrogenázová aktivita. CBR3 má iba slabú 3-keto steroid reduktázovú aktivitu. Medzi najlepšie substráty pre CBR3 patria chinóny (Malátková, Maser, & Wsol, 2010).

11 β -HSD 1

11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typ 1 je mikrozomálny proteín, exprimovaný v hojnom počte tkanív. Je to NADPH – dependentná oxidoreduktáza. Hrajú dôležitú úlohu v biosyntéze a inaktivácii steroidných hormónov. Steroidné hormóny sa naviažu na receptor v cieľových bunkách a táto aktivácia vedie k transkripčnej regulácii rôznych génových produktov a ku fyziologickej odpovedi. V cieľových orgánoch 11 β -HSD konvertuje aktívny kortizon na neaktívny kortizol (alebo naopak) a tým reguluje obsadenosť glukokortikoidového receptora (Hoffmann & Maser, 2007).

Rovnako ako ostatné karbonyl redukujúce enzýmy aj mikrozomálne 11 β -HSD majú úlohu pri 1. fáze biotransformácie xenobiotík a takisto ochraňujú organizmus pred pôsobením toxických karbonylových zlúčenín, ktoré premieňajú na menej lipofilné a viac rozpustné metabolity (Maser, 1995). Tiež metabolizuje oracín, ketoprofen, metyrapon, NNK a tiež niektoré aromatické aldehydy a ketóny (Matsunaga, Shintani, & Hara, 2006).

V syncytiotrofoblaste sa nachádza vysoké množstvo 11 β -HSD, ktorého funkcia je ochraňovať plod pred vysokou koncentráciou glukokortikoidov v obehovom systéme matky (Krozowski, 1999).

2.1.3. Dehydrogenázy/reduktázy so stredne dlhým reťazcom (MDR)

Rozsiahla skupina proteínov s veľmi rôznorodou enzýmovou aktivitou. Zvyčajne sa skladajú z 350 aminokyselín. Podieľajú sa na metabolizme, ochrane pred bunkovým poškodením a regulačných procesoch. Táto skupina zahŕňa viac ako 155 000 proteínov (Jörnvall, Landreh, & Östberg, 2015). U človeka bolo identifikovaných 25 génov a 40 zástupcov (Knoll & Pleiss, 2008). Medzi najznámejšie enzýmy tejto skupiny patria alkohol dehydrogenázy (ADH), chinón oxidoreduktázy (QOR), polyol dehydrogenázy a leukotrien-B₄-dehydrogenázy (Hedlund, Jörnvall, & Persson, 2010). Najlepšie preštudovanou skupinou sú alkohol dehydrogenázy. U človeka boli identifikované 4 typy. ADH 1 až ADH 4. Majú širokú substrátovú špecificitu voči mnohým alkoholom, ktoré metabolizujú na príslušné aldehydy. ADH 1 a ADH 2 sú hlavnými enzýmami, ktoré zabezpečujú detoxikáciu etanolu (Estonius, Svensson, & Höög, 1996). ADH 3 sa

nezúčastňuje detoxifikácie etanolu. Ako glutation-dependentná dehydrogenáza hrá úlohu v eliminácii formaldehydu (Thompson, Freitas, & Salzano, 2018). Prvé 4 ADH sa podarilo identifikovať aj izolovať. ADH 5 nebola doteraz identifikovaná, ani izolovaná na úrovni proteínu v žiadnom tkanive, avšak v proteomických štúdiách sa identifikovala jej sekvencia. Niekoľko vedeckých skupín sa pokúšalo rekombinantne vytvoriť proteín in vitro. Podarilo sa vytvoriť fúzny enzým so zeleným fluorescenčným proteínom (GFP) a glutation-S-transferázou, lenže tento enzým nevykazoval enzýmovú aktivitu (Östberg, Persson, & Höög, 2016). Chinón reduktázy sa zúčastňujú detoxifikácie reaktívnych chinónov, z ktorých hlavnými zástupcami v ľudskom organizme môžu byť polycyklické aromatické uhľovodíky. Redukujú ich a zabraňujú tvorbe reaktívnych kyslíkových radikálov (Razis, Konsue, & Ioannides, 2018).

2.2. ANTRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ

2.2.1. Vývoj protinádorových liečiv

Približne 3 dekády prebiehala snaha o vývoj protinádorových liekov. Najprv empirickým pozorovaním, potom racionálnym vývojom nových zlúčenín. Vyvíjané liečivá sú niekoľkokrát testované na mnohých, jasne charakterizovaných zvieracích modeloch nádorov, ktoré sa dajú transplantovať. Jednoduché in vitro meranie potom stanovuje senzitivitu rôznych ľudských nádorových buniek na testovaný liek. Potom, čo je u novej látky zistená protinádorová aktivita sa podstupujú predklinické toxikologické a farmakologické štúdie na zvieratách. Ak nie je nová, nádejná látka príliš toxická, pokračuje do 1. fázy klinického testovania, kde je jej antikancerózne efekt testovaný na pacientoch trpiacich pokročilou formou rakoviny (Katzung B. G., 2006). Výber chorých pre túto fázu je ťažká úloha. Cytostatiká sa nesmú podávať zdravým dobrovoľníkom a zásadne sa vyberajú pacienti s pokročilou formou rakoviny u ktorých je predpokladaná doba prežitia 2-3 mesiace (Klener, 1987). Ďalšie fázy klinických testov sú podobné ako 1. fáza, no v niektorých prípadoch môžu prebiehať zrýchlene (Katzung B. G., 2006).

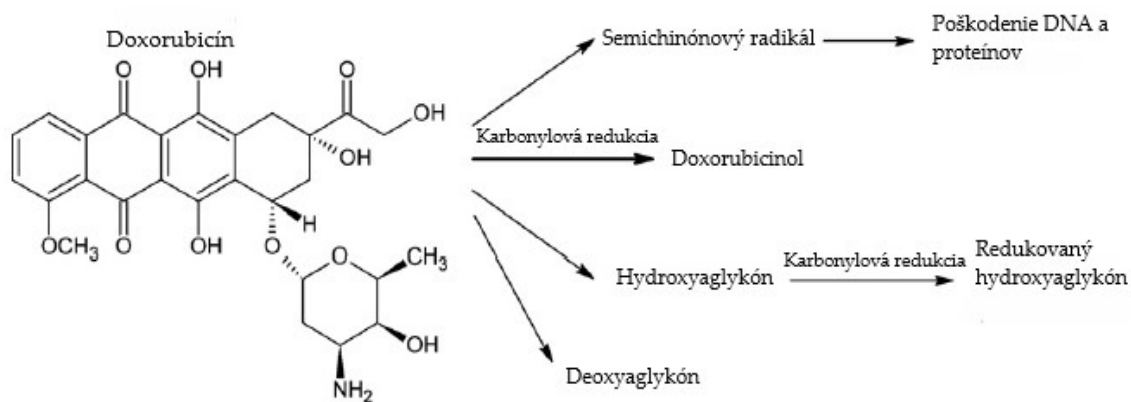
2.2.2. Daunorubicín a doxorubicín

Prvý krát izolovaný v roku 1962 vo Francúzsku z plesne *Streptomyces ceruleorubidus* a takmer súčasne v Taliansku z plesne *Streptomyces peuceutius*. Neskôr bolo potvrdené, že sa jedná o rovnaké substancie a bol im udelení spoločný názov daunorubicín (Klener, 1987).

Boli popísané 3 hlavné mechanizmy toxického účinku na orgány a nádory. Prvý z nich je interkalačná väzba na DNA, ktorá blokuje syntézu DNA vplyvom na topoizomerázu II- α a topoizomerázu II- β , ktoré fyziologicky spôsobujú dočasné zlomy a následné spojenie DNA a majú dôležitú úlohu pri mitóze a meióze pre správne rozdelenie sesterských chromozómov (<https://www.drugbank.ca>). Druhý mechanizmus je väzba na bunkové membrány a ovplyvnenie ich iónovej priepustnosti a tretí mechanizmus účinku je tvorba semichinónových voľných radikálov, kvôli redukčným procesom a následné poškodenie buniek (Beretta & Zunino, 2007). Aj keď bola tvorba ROS (reactive oxygen species) spájaná s protinádorovým účinkom, novšie štúdie tvrdia, že ROS produkované redukciami antracyklínov sú príčinou kardiotoxicity (Skarka, Škarydová, Štambergová, & Wsól, 2011). Bolo zistené, že antracyklínové antibiotiká takisto interferujú s transkripčnými faktormi. Je známe, že aj ROS môžu aktivovať transkripčný faktor NF- κ B, ktorý hrá dôležitú úlohu v imunitnej odpovedi, reguluje embryogenézu a hematopoézu. Na základe ROS pôsobenia ho môžu antracyklíny aktivovať. Zistilo sa však, že aj negenotoxické protinádorové lieky, ako sú vinca alkaloidy a taxány tiež aktivujú NF- κ B. Týmto sa zistilo, že nielen DNA poškodenie vedie ku aktivácii NF- κ B (Laurent & Jaffrézou, 2001). I keď bol izolovaný z baktérie ako antibiotikum a bola u neho nájdená antimikrobiálna aktivita, použitie v klinickej praxi je nemožné kvôli jeho vysokej toxicite. 97% sa viaže na albumín a metabolizmus prebieha v pečeni (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00694> ; 11/2018).

Asi 50 % prijatého liečiva sa vylúči v nezmenenej forme. Zvyšok sa metabolizuje hlavne redukčnými enzýmami na alkoholy a vylučuje z tela v takejto forme (Anzenbacher & Zanger, 2012). Metabolizmus obvykle prebieha 2-elektrónovou redukciami na C-13 uhlíku, kedy vznikajú sekundárne alkoholy ako metabolity. Reakcia je katalyzovaná niekoľkými CRE. Biotransformácia doxorubicínu (DOX) na

doxorubicinol (DOXOL), prebieha za pomoci CBR1, CBR3, AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3 a AKR1C4. Redukcia daunorubicínu (DAU) na daunorubicinol (DAUNOL) je katalyzovaná CBR1, CBR3, AKR1A1, AKR1B1 a AKR1B10. Okrem alkoholov vznikajú aj iné metabolity. Medzi ne patria semichinónové radikály, hydroxyaglykóny (ktoré sú ďalej metabolizované reductázami) a deoxyaglykóny. Aj keď bola tvorba ROS (reactive oxygen species) spájaná s protinádorovým účinkom, novšie štúdie tvrdia, že ROS produkované redukciou antracyklínov sú príčinou kardiotoxicity. Úloha aglykónov tiež nie je úplne známa a je možné, že aj tieto metabolity sa zúčastňujú na kardiotoxicite (Skarka, Škarydová, Štambergová, & Wsól, 2011). Redukované metabolity DOXOL a DAUNOL majú menšiu antiproliferačnú aktivitu v nádorových bunkách a takisto majú vyššiu kardiotoxicitu. Bolo zistené, že CRE sa indukujú v nádorových bunkách, v ktorých sa nachádzajú antracyklíny. Detoxifikačné vlastnosti karbonyl redukujúcich enzýmov, ktoré budú indukované v nádorových bunkách môže nepriaznivo zvýšiť kardiotoxicitu a viesť ku rezistencii na terapiu doxorubicínom a daunorubicínom (Skarka, Škarydová, Štambergová, & Wsól, 2011). Na obrázku 1 je znázornený metabolizmus doxorubicínu CRE.



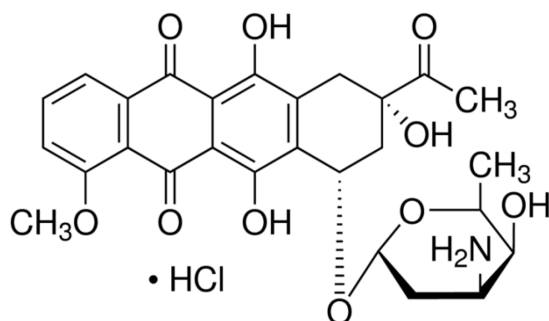
Obr. 1. Metabolické cesty doxorubicínu. Obrázok použitý z článku *Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase*, Skarka et. al., 2011.

Jediný rozdiel medzi daunorubicínom a doxorubicínom je, že vedľajší reťazec u DOX končí primárnym alkoholom a u DAU metylovým zvyškom. Doxorubicín je jedným z najdôležitejších protinádorových liekov. Používa sa na liečbu rakoviny prsníka, nádorov mäkkých tkanív, neuroblastómu, osteosarkómu a agresívnym lymfómom (Katzung B. G., 2006). Daunorubicín má lepšiu účinnosť pri liečbe akútnych lymfoblastických a akútnych myeloblastických leukémií (Minotti, Menna, Salvatorelli, Cairo, & Gianni, 2004).

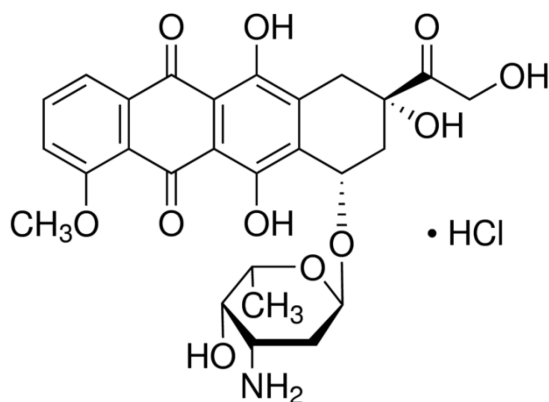
Liečba antracyklínovými antibiotikami sa spája s nežiadúcimi účinkami. Ako väčšina chemoterapeutík spôsobujú dreňový útlm, ktorý je ale reverzibilný a trvá relatívne krátko. Výraznejšia toxicita sa prejavuje v ireverzibilnej kardiotoxicite. Toto poškodenie je závislé na dávke a kumuluje sa (Katzung B. G., 2006). Antracyklínmi vyvolaná kardiomyopatia sa často vyskytuje u pacientov, ktorým je podaná celková dávka väčšia ako 500 mg/m^3 . Samostatný rizikový faktor v pacientovej anamnéze je akákoľvek srdcová porucha alebo hypertenzia. U týchto pacientov sa spomínaná kardiomyopatia môže vyskytovať aj pri celkovej dávke menšej, ako 500 mg/m^3 (Minotti, Menna, Salvatorelli, Cairo, & Gianni, 2004). Kardiomyopatia môže byť chronická alebo akútna. Akútna vzniká krátko po podaní kumulatívnej dávky, zvyčajne za týždeň. Prejavuje sa arytmiami, hypotenziou a miernou depresiou kontraktilnej funkcie srdca. S dnešnými liečebnými protokolmi sa akútna toxicita vyskytuje ojedinele. Chronická sa prejavuje približne rok po liečbe, ale boli zaznamenané prípady s oveľa neskorším nástupom. Chronická toxicita sa fyziologicky prejavuje zmenami na srdci, ktoré boli prvý krát pozorované pri pitve. Jedná sa o stratu myofibríl, dilatáciu sarkoplazmatického retikula, vakuolizáciu cytoplazmy a zvýšenie počtu lyzozómov. Incidencia kardiotoxicity býva väčšia u žien (Minotti, Menna, Salvatorelli, Cairo, & Gianni, 2004).

Aj keď sa zvyčajne nevyskytuje pri liečbe DAU a DOX akútne preťaženie železom, bolo potvrdené, že narúšajú bunkovú homeostázu železa. Antikancerózný efekt antracyklínov je komplexný a nie vždy je bunkovo-spezifický. Hlavná charakteristika antracyklínov je, že dokážu vyvolať produkciu ROS a toto môže ale nemusí byť katalyzované železom. Oxidatívny stres potom poškodzuje akékoľvek bunky

nešpecificky (zdravé bunky srdca, ale aj nádorové). Zvýšené poškodenie buniek srdca, je dané ich slabou antioxidantnou ochranou a/alebo chýbaním mitochondrií, ako cieľ pre ROS. Jednou z možností zníženia kardiotoxicity je chelácia železa dexrazonátom, u ktorého boli zistené kardioprotektívne vlastnosti na základe chelácie redoxne-aktívneho železa a tým zníženiu tvorby DOX/DAU-indukovaného oxidačného stresu (Kaiserová, et al., 2007). Ďalším nežiadúcim účinkom pri liečbe nádorov je vzniknutá rezistencia na ich liečbu, ktorá bude popísaná ďalej. Obrázky 2 a 3 obsahujú štruktúrne vzorce antracyklínov.



Obr. 2. Štruktúrny vzorec daunorubicín-hydrochloridu



Obr. 3. Štruktúrny vzorec doxorubicín-hydrochloridu

2.3. INHIBÍTORY

Inhibícia je označenie procesu, ktorý obmedzuje, tlmí alebo spomaľuje iný proces. V biochémií znamená väzbu určitej látky, ktorá spôsobí zníženie aktivity daného

enzýmu. Týmto dochádza ku obmedzeniu správneho priebehu enzymatickej reakcie. Veľa liečiv v medicíne sú inhibítory enzýmových dráh. Podľa rôzneho mechanizmu účinku, môžu byť využívané ako liečivá rôzneho pôvodu. Napríklad enzým cyklooxygenáza je inhibovaný nesteroidnými protizápalovými liekmi. Veľký význam má inhibícia bunkového cyklu v liečbe nádorových ochorení. Tieto látky boli syntetizované, aby zasiahli konkrétne ciele v bunkovom cykle a znemožnili ďalšie delenie. V tabuľke 2 sú vypísané skupiny protinádorových liečiv s niektorými zástupcami a ich stručný mechanizmus účinku.

Tab. 2. Skupiny protinádorových liečiv so stručným mechanizmom účinku.

Názov skupiny	Cieľ pôsobenia (mechanizmus účinku)
Alkylačné látky (cyklofosamid, chlorambucil)	Vytváranie DNA crosslinks a bunková smrť
Deriváty platiny (cisplatina, carboplatina)	Vytváranie DNA crosslinks, väzba na nukleárne a cytoplazmatické proteíny
Antimetabolity (methotrexát, 5-fluorouracil, cytarabín)	Inhibícia syntézy DNA a RNA, inhibícia de-novo syntézy purínov
Látky získané z prírodných zdrojov (vinca alkaloidy, daunorubicín, etoposid, paclitaxel, mitomycín)	Vytváranie voľných radikálov, ktoré poškodzujú DNA, inhibícia topoizomerázy, interkalácia do DNA, inhibícia mitózy
Nezaradené protirakovinové látky (imatinib, cetuximab, bevacizumab, sorafenib)	Tyrozín-kinázové inhibítory, inhibícia receptorov pre rastové faktory

Zdroj: Údaje v tabuľke boli použité z knihy: (*Basic & clinical pharmacology*, Katzung et al., 2012).

2.3.1. Inhibítory tyrozín-kinázy

Proteínové kinázy hrajú nezastupiteľnú úlohu v bunkovej proliferácii, diferenciácii a riadia dôležité regulačné mechanizmy počas fyziologického bunkového cyklu, ale aj počas nekontrolovanej proliferácie (Traxler, et al., 2001). Tyrozín kinázy sú enzýmy, ktoré prenášajú fosfátovú skupinu z ATP na cieľové proteíny. Rozdeľujú sa na receptorové a nereceptorové. Receptorové patria medzi transmembránové proteíny, ktoré prenášajú extracelulárne signály do cytoplazmy buniek. Kvôli účasti na bunkovej

proliferácií sa tieto enzýmy stali vhodnými kandidátmi pre molekulárne cieleňú terapiu rakoviny (Arora & Scholar, 2005). Pri mnohých nádorových ochoreniach sú porušené hladiny jednotlivých proteín kináz, overexprimované rastové faktory alebo receptory pre rastové faktory. Stručné rozdelenie základných tyrozín kinázových inhibítorov sa nachádza v tabuľke 3.

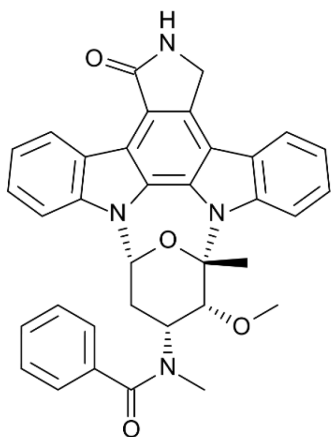
Tab. 3. Rozdelenie tyrozín kinázových inhibítorov podľa cieľového účinku.

Názov inhibítora	Cieľové miesto
Imatinib	BCR-ABL proteín pri CML
Cetuximab, Gefitinib	EGF receptor
Semaxinib, sorafenib	VEG factor
Leflunomid	PDGF receptor
Midostaurín	FLT 3 pri AML

Zdroj: Informácie v tabuľke od (Arora & Scholar, 2005).

Midostaurín

V roku 1978, bol po prvýkrát z baktérie *Streptomyces staurosporeus* izolovaný indolokarbazol staurosporín. Vykazoval veľký potenciál stať sa hlavnou zlúčeninou spomedzi inhibítorov proteín-kinázy C (PKC). Neskôr sa zistilo, že je účinný, ale proti PKC neselektívny. Preto mnohé spoločnosti začali hľadať selektívnejší a účinnejší derivát, ktorý bude mať väčší inhibičný potenciál. Syntetizovali sa mnohé deriváty. Medzi nimi bol napríklad 7-hydroxy-staurosporín a nám známy N-benzoyl staurosporín (midostaurín, PKC412) (Gescher, 1998). Vzorec midostaurínu je znázornený na druhej strane na obrázku 4.



Obr. 4. Štruktúrny vzorec midostaurínu

Je doteraz jediným FLT3 inhibítorom, ktorý bol schválený FDA (U.S. Food and Drug Administration) na liečbu FLT3-mut AML (akútnej myeloidnej leukémie) a systémovej mastocytózy v kombinácii s inými systémovými chemoterapeutikami (Gallogly, Lazarus, & Cooper, 2017).

Midostaurín je multikinázový inhibítor. Molekulová hmotnosť je 570,65 g/mol. Distribuuje sa ako mäkká kapsula a užíva sa perorálne (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/207997s000lbl.pdf). Publikované terapeutické dávky bývajú od 12,5 mg do 100 mg 3 krát denne (Gallogly, Lazarus, & Cooper, 2017).

Najčastejšie nehematologické nežiadúce účinky zahrňujú nauzeu, nevoľnosť, vracanie a hnačku. Z hematologických účinkov to sú neutropénia, anémia a trombocytopenia (Gotlib, et al., 2016). Midostaurín nebol asociovaný s pečňovou alebo obličkovou toxicitou (Gallogly, Lazarus, & Cooper, 2017).

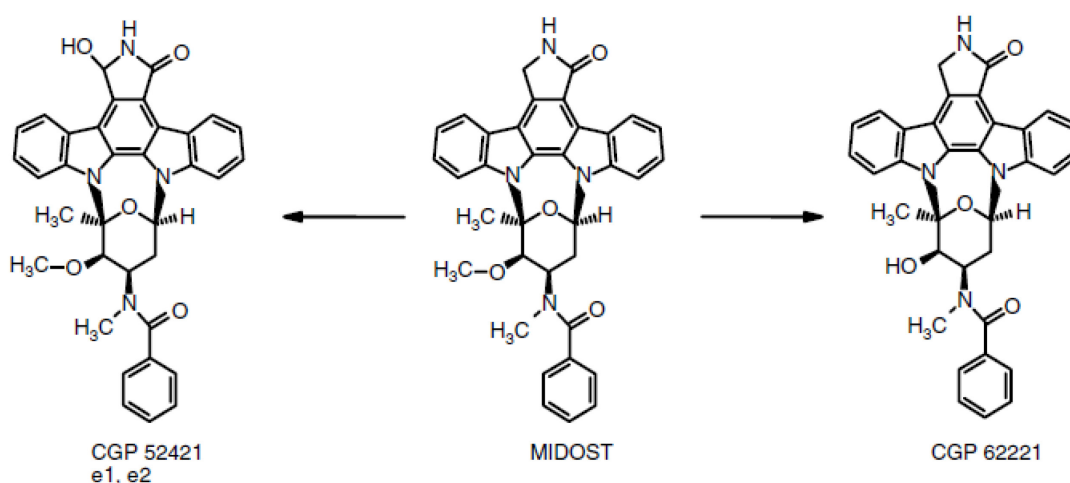
Aj keď sa najskôr myslelo, že midostaurín bude špecifický len pre jednu špecifickú PKC, má inhibičnú aktivitu voči širokému spektru klinicky významných proteín-kináz typu 3. Tieto zahrňujú KIT (CD117), FLT 3 (CD135), PDGFR (receptor pre doštičkový rastový faktor), VEGF (vaskulárny, endoteliálny rastový faktor), KDR (CD309) a FES. Na rozdiel od ďalších inhibítorov má midostaurín schopnosť inhibovať

nie len tyrozín-kinázovú aktivitu u wild-type génov, ale aj u mutovaných verzií (Valent, et al., 2017).

Bolo zistené, že midostaurín má synergický efekt, ak je podávaný spoločne s inými liečivami napríklad s cladribínom. Tiež blokuje IgE-dependntné uvoľnenie histamínu z bazofilov. Oplatí sa poznamenať, že imunologické nežiadúce účinky midostaurínu ako sú imunopresia, lymfopénia alebo hyperaktivácia imunitných buniek sú malé až zanedbateľné. Tieto zistenia z neho robia sľubný liek pri neoplasticknej proliferácii buniek, ako aj pri IgE-dependntnej aktivácii bazofilov u pacientov so systémovou mastocytózou (Valent, et al., 2017).

Správna funkcia proteín-kinázy C je porušená u niektorých neoplázií a táto porucha vedie k nadmernej proliferácii buniek. Dôvodom nekontrolovaného množenia buniek môže byť porucha v štruktúre enzýmu, ako aj prílišná aktivácia proteínu alebo chyba v signálnej dráhe kontrolujúcej funkciu PKC (Gescher, 1998).

Metabolizmus midostaurínu prebieha v pečeni za pomoci CYP 3A4. 2 najviac zastúpené metabolity sú CGP 62221, kde metabolizmus prebieha O-demetyláciou a CGP52421, pri ktorom prebieha 7-hydroxylácia (Fischer, et al., 2010). Oba tieto metabolity sú farmakologicky aktívne (Gallogly, Lazarus, & Cooper, 2017). Metabolizmus midostaurínu je znázornený na obrázku 5.



Obr. 5. Metabolizmus midostaurínu. V strede je parentná látka a po boku metabolity. Vľavo 7-hydroxylácia, vpravo O-demetylácia. Obrázok použitý z článku *The multikinase*

inhibitor midostaurin (PKC412A) lacks activity in metastatic melanoma: a phase IIA clinical and biologic study, Millward et al., 2006.

2.3.2. Inhibítory mTOR

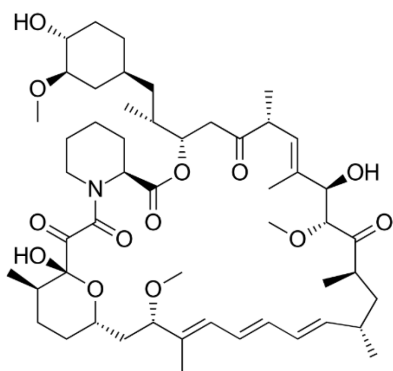
mTOR, z angličtiny *mammalian Target Of Rapamycin* je vysoko konzervovaná serín-threonínová kináza patriaca do skupiny proteínových kináz. Hrá významnú úlohu pri delení, metabolizme a prežívaní buniek. Aktivácia signálnej kaskády riadená mTOR je častou príčinou bunkovej proliferácie v ľudských nádoroch (Zaytseva, Valentino, Gulhati, & Evers, 2012). mTOR receptor je základnou jednotkou 2 multiproteínových komplexov mTORC1 a mTORC2. Proteínový komplex mTORC1 má kľúčovú rolu v regulácii translácie v bunke. Aktivácia mTORC1 je vyvolaná nutričnými faktormi, koncentráciou aminokyselín a rastovými faktormi. mTORC2 bol spájaný s cytoskeletárnou organizáciou a bunkovým prežívaním. Nadmerná aktivácia spôsobená mutáciou v géne, vedie k upregulácii mTORC1 a mTORC2 v rakovinovom bujení (Jhanwar-Uniyal, et al., 2017).

Mnoho komponentov mTOR signalizácie je exprimovaných v jadre, rovnako ako aj v cytoplazme. Kvôli funkcií mTORC1 pri translácii alebo transkripcii je väčšina týchto proteínov lokalizovaná v ribozómoch. mTOR je jediným proteínom, ktorý sa dá nájsť aj v nukleárnej aj v cytoplazmatickej frakcii (Jhanwar-Uniyal, et al., 2017).

Vďaka tomu, že tieto proteíny regulujú transláciu, bunkovú proliferáciu a prežívanie sú vhodným terapeutickým cieľom protinádorových liečiv.

Rapamycín

Prvý krát izolovaný z baktérie *Streptomyces hygroscopicus* v pôdnej vzorke z Eastern Island (tiež známa ako Rapa Nui, odtiaľ názov). Pôvodné plány boli použiť rapamycín ako antifungicídum. Neskôr sa objavili jeho imunosupresívne a antiproliferatívne účinky u cicavcov. Na obrázku 6 sa nachádza vzorec rapamycínu.

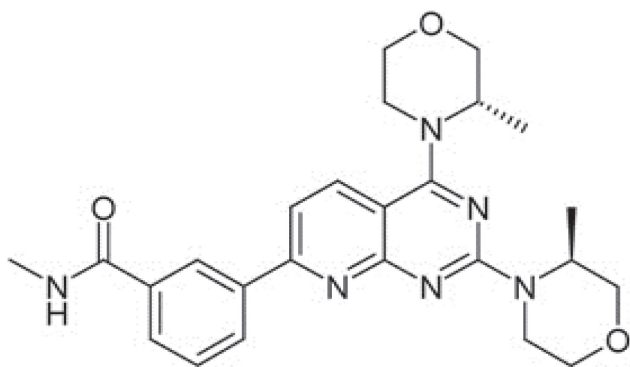


Obr. 6. Štruktúrny vzorec rapamycínu (sirolimus)

Mechanizmus účinku je alosterická inhibícia mTORC1. Jeho potenciálne využitie môžeme nájsť napríklad pri liečení niektorých nádorov. Zvýšená aktivácia mTORC1 v nádorových bunkách často vedie ku zvýšenej aktivácii niektorých onkogénov a ku zníženej aktivácii/funkcií niektorých tumor-supresorov. Tieto mutácie dávajú rakovinovým bunkám výhody v porovnaní s nemutovanými. Na zabezpečenie vysokého levelu proliferácie, majú rakovinové bunky veľké nároky na odčerpávanie energie a bunkový metabolizmus a tieto procesy sú priamo kontrolované mTORC1. Rapamycín sa ďalej používa proti rejekcii štepov po transplantáciách, pri metabolických a degeneratívnych ochoreniach (Li, Kim, & Blenis, 2014). Predklinické štúdie dokazujú, že selektívna alosterická inhibícia mTORC1 rapalogmi (rapamycín, temsirolimus, everolimus), môže viesť ku vzniku rezistencie na tieto inhibítory (Basu, et al., 2015).

Vistusertib

Duálne inhibítory, ktoré dokážu inhibovať mTORC1 aj mTORC2 sa prejavujú lepšími klinickými benefitmi oproti rapamycínu (Pike, et al., 2013). Vistusertib (AZD2014) je účinný, perorálne podávaný duálny mTOR kinázový inhibítory. Udávaná IC_{50} u citlivých bunkových línií je medzi 100 – 200 nM (Langdon, et al., 2018). Vzorec vistusertibu je znázornený na obrázku 7.



Obr. 7. Štruktúrny vzorec vistusertibu

Po perorálnom podaní sa vistusertib rýchlo vstrebáva a prahovú koncentráciu dosahuje po 0,5 až 1 hodine. Eliminačný polčas je približne 3 hodiny. Metabolizmus prebieha primárne v pečeni pomocou CYP3A5 a CYP2C8 s čiastočnou pomocou od CYP3A5.

Nežiadúce účinky sa vyskytovali u viac ako 15 % pacientov. Najčastejšia bola slabosť a malátnosť (78 % pacientov). Gastrointestinálne symptómy, ako nauzea, mukositóza, hnačka a vracanie sa vyskytovali približne u 47 % pacientov. Nauzea a vracanie sa dali ľahko kontrolovať anti-emetikami. Mukositóza dobre reagovala na používanie ústnej vody a nebolo potrebné kvôli nej prerušiť liečbu alebo znížiť dávku. Makulo-papulárny vred sa objavil u 42 % pacientov. U 17 % pacientov sa objavili infekcie dolných dýchacích ciest, ale pneumónia sa nevyskytla u nikoho. Najčastejšou laboratórnou abnormalitou bola anémia (u 17 %) (Basu, et al., 2015).

2.3.3. PARP inhibítory

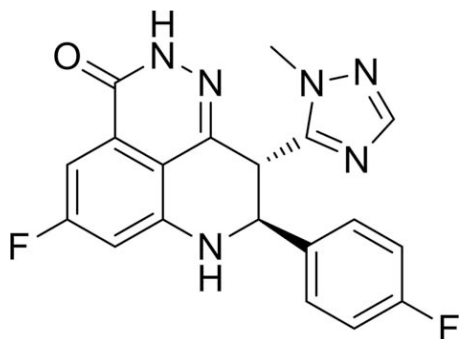
Poly-(ADP-ribóza) polymeráza (PARP) patrí do rodiny enzýmov, ktoré hrajú dôležitú úlohu v detekcii a oprave poškodenej DNA, bunkovej proliferácii, diferenciácií a transformácií. Existencia PARP bola objavená pred viac ako 40 rokmi (Tangutoori, Baldwin, & Sridhar, 2015).

Single-strand breaks (SSB) a double-strand breaks (DSB) sú poškodenia DNA, ktoré vzniknú vplyvom chemických faktorov, UV žiarenia, ionizujúceho žiarenia alebo

bunkovým metabolizmom. PARP sa naviaže na poškodenú DNA, čím sa aktivuje a produkuje PAR reťazce, ktoré sa môžu predlžovať. Tento proces sa nazýva PAR-ylácia. Toto „privolá“ DNA reparačné faktory a po oprave sa PAR-polyméry odpoja od DNA a proces je hotový (Murai, et al., 2012). Okrem PARP majú bunky ešte ďalší mechanizmus opravy poškodenej DNA. BRCA1 a BRCA2 sú proteíny kódované tumor-supresorovými génmi a sú tiež zodpovedné za opravu poškodenej DNA alebo za smrť bunky, ak oprava nie je možná. Rakovinové bunky s mutáciou v BRCA1/2 majú o jednu DNA-opravnú dráhu menej, keďže štruktúra týchto proteínov je zmenená. Kvôli absencii tejto cesty, sú mutované bunky závislé iba na PARP oprave. Inhibíciou PARP cieľnými inhibítormi sa budú v bunkách hromadiť DNA zlomy a to vedie k bunkovej smrti. Týmto spôsobom je možné selektívne eliminovať rakovinové bunky prsníka, ktoré budú pozitívne na spomínanú mutáciu (Litton, et al., 2018).

Talazoparib

Označuje sa aj ako BMN-673, je zatiaľ najúčinnjší PARP inhibítor v klinických testoch. Má vysokú účinnosť v eliminácii rakovinových buniek in vitro. Táto vlastnosť je pravdepodobne spôsobená „znefunkčnením“ PARP-DNA komplexov (PARP-DNA trapping) a jeho relatívne malou toxicitou (Aoyagi-Scharber, et al., 2014). Na obrázku 8 je znázornený vzorec talazoparibu. V texte na obrázku 8 je vyznačené väzobné miesto pre talazoparib na PARP enzýmoch.



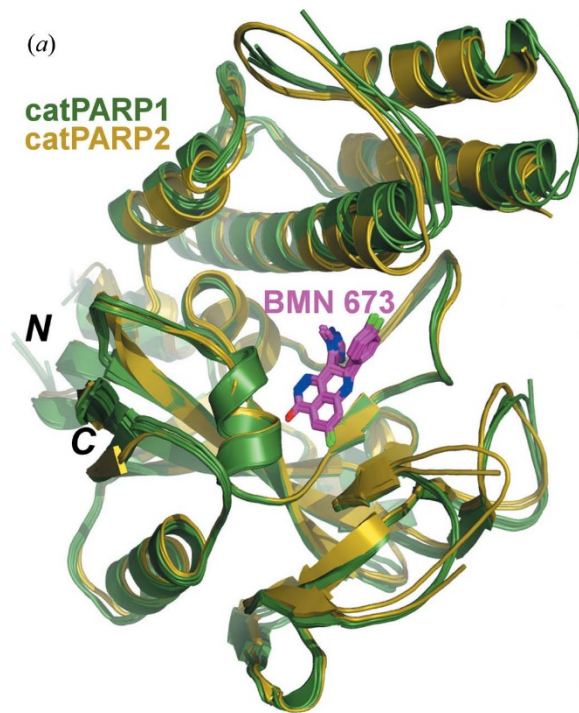
Obr. 8. Štruktúrny vzorec talazoparibu

Talazoparib inhibuje PARP s účinnosťou podobnou olaparibu, ale zistilo sa, že má asi 100x vyššiu účinnosť PARP-DNA trappingu a vyššiu cytotoxicitu v kombinácií

s alkylačnými látkami alebo rádioterapiou. Vykazuje vyššiu selektívnu cytotoxicitu voči bunkám s defektmi v génoch BRCA 1/2 a PTEN oproti ostatným inhibítorom (Hunsa, Tan, Mohamud, Polk, & Wong, 2018).

Talazoparib, známy pod obchodným názvom TALZENNA sa podáva perorálne v dávke 1 mg raz denne, podávaný s alebo bez jedla. Na trhu sú aj 0,25 mg kapsuly, ktoré sú vhodné pre prípadné zníženie dávky. U pacientov s obličkovými poruchami a u pacientov, ktorí používajú p-glykoproteínové inhibítory sa musia dávky upraviť (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/211651s000lbl.pdf, 25.12.2018).

Najčastejšie nežiadúce účinky sú anémia a nauzea. Vyskytujú sa u viac ako 50 % pacientov. U približne 37 % pacientov, boli sprevádzané slabosťou a malátnosťou. 50-70 % pacientov malo hematologické odchýlky najčastejšie v podobe anémie, ale objavili sa aj neutropénia a trombocytopénia (Hunsa, Tan, Mohamud, Polk, & Wong, 2018). U 0,3 % pacientov boli potvrdené prípady prepuknutia myelodysplastického syndrómu alebo akútnej myeloidnej leukémie. Aj napriek nežiadúcim účinkom, je risk progresie ochorenia alebo smrti znížené o 46 %, keď sa talazoparib užíva s tradične používanou chemoterapiou (Litton, et al., 2018). Na základe klinických testov 3 fázy, FDA rozhodla, že dňa 16.10.2018 schválila talazoparib na liečbu BRCA-mutovanej a HER2-negatívne pokročilej nemetastázujúcej a metastázujúcej formy rakoviny prsníka. Pacienti na terapiu musia byť starostlivo vybraní a kritériom je pozitivita na danú mutáciu (<https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm623540.htm>, 24.12.2018).



Obr. 9. Pozícia väzobného miesta pre talazoparib (BMN 673) na PARP enzýme

Zdroj: Obrázok vzatý z článku *Structural basis for the inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 by BMN 673, a potent inhibitor derived from dihydropyridophthalazinone*, Aoyagi-Scharber et. al., 2014.

2.4. Mechanizmy vzniku liekovej rezistencie

Chemoterapia je liečbou voľby proti mnohým typom nádorov. Jej efektivita je však limitovaná prítomnosťou mnohočetnej liekovej rezistencie (MDR) rakovinových buniek, ktoré sú necitlivé nielen voči primárnemu chemoterapeutiku, ale aj pre látky štruktúrne podobné (Alisi, Cho, Locatelli, & Fruci, 2013). MDR je najčastejšou príčinou zlyhania chemoterapie. Liekovou rezistenciou sa rozumie stav, ktorý v konečnom dôsledku spôsobí zníženie účinnosti liečby. Prvý krát to bolo pozorované pri baktériách, ktoré postupne získali rezistenciu na antibiotiká. Avšak podobné mechanizmy sa našli aj pri iných ochoreniach vrátane nádorov. Zatiaľ čo niektoré mechanizmy rezistencie sú špecifické pre určité ochorenie, iné sú evolučne konzervované (Housman, et al., 2014). Rezistencia na liečbu sa nemusí prejaviť hneď, ale až neskôr. Zvyšujúca sa génová

nestabilita vplyvom progresie ochorenia môže byť častou príčinou genetických zmien a je možné, že sa bunka bude môcť vysporiadať s blokáciou určitej patologickej dráhy a obísť ju (Bouchalová, 2016). Boli popísané 3 hlavné mechanizmy rezistencie. Prvým je znížená absorpcia (uptake) vo vode rozpustných liekov, ktoré potrebujú transportéry na vstup do bunky. Druhým je zmena vnímavosti bunky na cytotoxické účinky liečiv a tretí mechanizmus je aktívne vyčerpanie (efflux) hydrofóbných liečiv, ktoré do buniek prešli difúziou (Alisi, Cho, Locatelli, & Fruci, 2013).

2.4.1. Inaktivácia chemoterapeutika

Niektoré chemoterapeutiká sa potrebujú najskôr v organizme aktivovať. Zahŕňa to komplexné mechanizmy, keď liečivá reagujú s proteínmi. Tieto reakcie môžu modifikovať, čiastočne degradovať alebo vytvárať komplexy s ďalšími molekulami a tým aktivovať ešte neaktívne liečivo (pro-drug). Mnoho chemoterapeutík musí podstúpiť takúto metabolickú aktiváciu pre získanie potrebného terapeutického účinku. Jedným z možných spôsobov rezistencie je znížená metabolická aktivácia pro-drug. Ako príklad môžeme uviesť liečbu akútnej myeloidnej leukémie cytarabínom (AraC), ktorý je aktivovaný po viacnásobnej fosforylácii až vznikne AraC-trifosfát. Down-regulácia alebo mutácia v tejto dráhe vedie k nedostatočnej aktivácii a neúčinnosti chemoterapeutika. Rezistencia na deriváty platiny je často zapríčinená inaktiváciou liečiv metalothioneínom a thiol-glutatiónom. Vyššia expresia detoxifikačných enzýmov v bunkách býva tiež častou príčinou rezistencie (Housman, et al., 2014). V predošlých výskumoch sa potvrdilo, že antracyklínová rezistencia nie je podmienená iba effluxom liečiv a ABC transportérmi, ale aj eleváciou detoxifikačných AKR enzýmov v nádorových bunkách. Metabolity antracyklínov, ako sú daunorubicinol a doxorubicinol majú menšiu antiproliferačnú aktivitu a vysokú kardiotoxicitu. Z tohto dôvodu je zvýšená expresia týchto enzýmov v nádoroch dôležitý faktor rezistencie a predmet ďalších výskumov (Ax, Soldan, Koch, & Maser, 2000).

2.4.2. Modifikácia cieľového miesta

Účinnosť liečiv je tiež ovplyvňovaná v mieste ich účinku. Mutácie, modifikácie alebo zmena expresie cieľových miest môže znížiť prípadne eliminovať účinok chemoterapeutík. U rakoviny môžu tieto zmeny vyvolať MDR. Ako príklad môžeme uviesť tyrozín-kinázové inhibítory. Komplex medzi topoizomerázou II a DNA je normálne dočasný, tieto látky ho stabilizujú a to vedie ku poškodeniu DNA, inhibícií DNA syntézy a zastavenie mitotických procesov. Rakovinové bunky si môžu vyvinúť rezistenciu voči tyrozín-kinázovým inhibítorm na základe mutácie v géne kódujúcom topoizomerázu II. Ďalší cieľ proti-nádorových liečiv sú rodina EGFR receptorov (epidermal growth factor receptor). Mutácie spôsobia prehnanú aktiváciu receptorov a to vedie k nekontrolovateľnému deleniu buniek. Tyrozín-kinázový receptor HER 2 (human epidermal growth factor receptor 2) je overexprimovaný u približne 30 % nádorov prsníka. Ďalší príklad modifikácie cieľového miesta je rezistencia rakoviny prsníka na tamoxifen. Tamoxifen sa správa ako antagonist estrogénového receptora. Mutáciou receptora môže tamoxifen stratiť svoju aktivitu antagonistu a naberie novú aktivitu agonistu na danom receptore. Čo vedie ku rezistencií na liečbu a stimulácií nádorového rastu (Housman, et al., 2014).

2.4.3. Efflux liečiva

Na ochranu buniek pred ich poškodením alebo smrťou, kvôli následkom toxických poškodení si organizmus vyvinul ochranu pred akumuláciou toxínov v bunkách. Jeden z najčastejšie študovaných mechanizmov, ktorý znižuje akumuláciu liečiva v bunkách je jeho aktívne odčerpávanie pomocou expresie multifunkčných effluxných transportérov. Tieto transportéry sú známe viac ako 25 rokov a bolo zistené, že hrajú dôležitú úlohu v rezistencií na nádorovú terapiu (Dean, 2009). Podľa Transport Classification System (<http://www.tcdb.org>) sú transportéry rozdelené do 5 skupín.

- Kanály / membránové póry
- Transportéry riadené elektrochemickým potenciálom
- Aktívne transportéry

- Skupinové translokátory
- Elektronové prenášače (nosiče)

Okrem týchto skupín do transportérov takisto patria aj doplňujúce faktory podieľajúce sa na transporte (pomocné transportné proteíny) a doteraz presne nepopísané transportné systémy (<http://www.tcdb.org>, 2019).

ABC transportéry

Patria do rodiny transmembránových proteínov, ktoré nachádzame u väčšiny živočíchov. Zaradujeme ho medzi aktívne transportéry. Ich úlohou je transport látok cez bunkovú membránu na čo využívajú energiu z ATP. Odčerpávanie látok z buniek hrá dôležitú úlohu v prevencii akumulácie toxínov v bunkách. Vďaka tomuto sú tieto transportéry hojne exprimované v epitéliu čreva a v pečeni, kde odčerpávajú liečivá a ďalšie škodlivé molekuly do žlčovodu. Má tiež dôležitú funkciu pri udržiavaní funkcie hematoencefalickej bariéry, kde zabezpečuje jej permeabilitu (Housman, et al., 2014).

Aj keď je efflux normálny a dôležitý fyziologický dej, je tiež známy svojou schopnosťou vyvolať MDR. P-glykoproteín, kódovaný génom *ABCB1* je prvým objaveným transportným proteínom, identifikovaným v rezistentných bunkových líniiach, kde bol exprimovaný vo väčšej miere. MDR1 (multidrug resistance protein 1, P-glykoproteín), MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) a BCRP (breast cancer resistance proteín) sú tiež prehnane exprimované v nádorových bunkách. Normálna expresia P-glykoproteínu (MDR1) v hrubom čreve, pečeni a obličkách býva zvýšená, pokiaľ sú tieto tkanivá rakovinové. Všetky 3 transportéry majú širokú substrátovú špecificitu a sú schopné vyhadzovať mnohé xenobiotiká vrátane vinca alkaloidov, antracyklínov, taxánov a tyrozín-kinázových inhibítorov z buniek. U človeka je zatiaľ známych 49 zástupcov ABC transportérov (Housman, et al., 2014, Dean, 2009). V nasledujúcej tabuľke je prehľad ABC transportérov zapojených do liekovej rezistencie.

Tab. 4. Prehľad ABC transportérov a ich substrátov

Gén	Proteín	Prenášané liečivá
<i>ABCA2</i>	ABCA2	Estramustín
<i>ABCB1</i>	P-gp/MDR1	Kolchicín, doxorubicín, etoposid, vinblastín, paclitaxel
<i>ABCC1</i>	MRP1	Doxorubicín, daunorubicín, vincristín, etoposid, kolchicín, methotrexát
<i>ABCC2</i>	MRP2	Vinblastín, cisplatina, doxorubicín, methotrexát
<i>ABCC3</i>	MRP3	Methotrexát, etoposid
<i>ABCC4</i>	MRP4	6-merkaptopurín, 6-thioguanín a ich metabolity, methotrexát
<i>ABCC5</i>	MRP5	6-merkaptopurín, 6-thioguanín a ich metabolity
<i>ABCC6</i>	MRP6	Etoposid
<i>ABCC11</i>	MRP8	5-flourouracil
<i>ABCG2</i>	MXR/BCP	Mitoxantron, topotecan, irinotecan, doxorubicín, daunorubicín, imatinib, methotrexát

Zdroj: Informácie čerpané z článku *ABC transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells*, Dean, 2009.

2.4.4. Oprava DNA poškodenia

Oprava poškodenej DNA hrá významnú úlohu v rezistencií na nádorovú terapiu. V odpovedi na chemoterapeutiká, ktorá priamo alebo nepriamo navodzujú poškodenie DNA, môže DDR mechanizmus (DNA damage-response) zvrátiť poškodenie DNA, ktoré by v prípade neopravenia poškodenej DNA vyvolalo apoptózu a smrť nádorových buniek. Napríklad deriváty platiny, spôsobujú pre bunky nebezpečné „DNA crosslinks“, ktoré vedú ku programovanej smrti bunky a k potenciálnej deštrukcii nádoru. Táto metóda chemoterapie sa spolieha na neúspech DDR mechanizmu. Avšak rezistencia na deriváty platiny vzniká často a to z dôvodu opravných mechanizmov ako je napríklad nukleotidová excízná oprava. Inhibícia reparačných mechanizmov používaná v spojení

s DNA-poškodzujúcimi látkami môže oddialiť rezistenciu a zvýšiť účinnosť chemoterapie (Housman, et al., 2014). Jedným z výborných príkladov je použitie derivátov platiny, alkylačných látok alebo rádioterapie, spolu s PARP inhibítorom na BRCA-mutovanú rakovinu prsníka. Podrobnejšie informácie o PARP inhibítoroch sú v kapitole 1.3.3.

2.4.5. Inhibícia bunkovej smrti

Apoptóza a autofágia sú 2 dôležité regulačné mechanizmy. Aj keď sú voči sebe antagonistické, oba sa podieľajú na programovanej smrti buniek. Apoptóza má 2 cesty aktivácie. Vnútorú a vonkajšiu. Vnútorá cesta je riadená proteínmi BCL-2 (B-cell lymphoma), kaspázou-9 a PI3K/AKT dráhou. Vonkajšia cesta zahŕňa receptory smrti na bunkových povrchoch. Obe cesty v konečnom dôsledku aktivujú kaspázu-3, čo spôsobí apoptózu. V mnohých nádoroch sú anti-apoptické proteíny vysoko exprimované a toto vedie k inhibícii bunkovej smrti. Inhibítory BCL-2 sú efektívne v indukovaní apoptózy v nádorových bunkách, ale dlhšie používanie môže spôsobiť rezistenciu (Housman, et al., 2014). Jedna možnosť terapie rezistentných nádorových buniek je použitie liečiva, ktoré „zruší“ inhibíciu bunkovej smrti blokovaním expresie apoptických proteínov (BCL-2, PI3K/AKT) a/alebo reguláciou dráhy apoptózy v kombinácii s cytotoxickými látkami. Výsledkom je eliminácia buniek v ich zraniteľnej fáze (Hasan, Taha, & Omri, 2018).

2.4.6. Epithelial-Mesenchymal transition (EMT)

EMT je mechanizmus, ktorým sa z nezhubných, solídnych nádorov stanú metastatické. Metastáza je komplexný proces, ktorý zahŕňa zmeny v rakovinových a väzivových bunkách, ktoré tvoria ich prostredie. Pre metastázy je typická angiogenéza, čiže tvorba nových žíl v okolí nádoru. Počas EMT, rakovinové bunky znižujú expresiu integrínov a kadherínov a zvyšujú expresiu adhézných receptorov, ktoré zvyšujú bunkovú motilitu. Systém integrínov a kadherínov drží bunky pokope a nedovolí im „vycestovať“ inde, čo je pre metastatické bunky nevýhodné. Bunková motilita závisí aj

od cytokínov a chemokínov, ktoré môžu byť vytvárané nádorovými bunkami alebo bunkami v okolí nádoru. Zvýšená expresia metaloproteáz na povrchu nádorov pomáha „čistiť“ cestu bunkám a uľahčuje ich pohyb po organizme. Týmto pozitívne ovplyvňuje metastatický proces (Hasan, Taha, & Omri, 2018).

2.4.7. Úloha epigenetiky v rezistencií nádorových buniek

Epigenetické mechanizmy sú neoddeliteľnou súčasťou normálneho vývoja a zachovania orgánovo špecifickej génovej expresie. Alterácia epigenetických procesov môže viesť ku malígnym procesom. Existujú 4 hlavné typy epigenetických mechanizmov a to sú metylácia DNA, kovalentná modifikácia histónov, nekovalentná modifikácia histónov a mikro RNAs (mRNAs). Tieto modifikácie spolu spolupracujú a regulujú funkciu genómu pomocou modifikácie štruktúrnej dynamiky chromatínu. Primárne regulujú dostupnosť chromatínu ostatným transkripčným mechanizmom (Sharma, Kelly, & Jones, 2010).

Metylácia DNA je najaktívnejšie študovaný epigenetický mechanizmus u cicavcov. Navodzuje deaktiváciu génov a je dôležitým faktorom v správnom vývoji organizmov. Pozostáva z kovalentnej modifikácie cytozínu, pomocou pridávania metylových skupín, ktoré sa viažu na cytozín. CpG dinukleotidy nie sú rovnomerne zastúpené v ľudskom genóme, ale sú koncentrované v krátkych úsekoch DNA, ktoré sa nazývajú CpG ostrovy a obsahujú mnoho repetitívnych sekvencií. Väčšina CpG lokácií v ľudskom genóme zostáva metylovaná a počas diferenciácie buniek je mnoho CpG ostrovov demetylovaných a tým sú dôležité gény aktivované. Príkladom dlhodobej metylácie génu je deaktivácia jedného X-chromozómu u žien. Metylácia DNA vedie ku zabráneniu aktivácie transkripcie tým, že zabraňuje transkripčným faktorom naviazať sa na aktivačné miesta. DNA metylácia je u cicavcov zabezpečovaná aktivitou metyltransferáz DNMT3A a DNMT3B. Úloha metylácie na CpG ostrovoch je dobre známa, avšak metylácia génov sa odohráva aj mimo nich a často reguluje expresiu orgánovo-špecifických génov (Sharma, Kelly, & Jones, 2010).

Nádorový epigenóm sa vyznačuje generalizovanou hypo-metyláciou a zároveň hyper-metyláciou špecifických CpG ostrovov. Hypo-metylácia hrá dôležitú úlohu v karcinogéze, vďaka zvyšovaniu génovej nestability. U pacientov s ICF syndrómom (immunodeficiency - centromeric instability - facial anomalies syndrome), je v géne kódujúcom enzým DNMT3B mutácia a následná hypo-metylácia, kvôli znefunkčnenému enzýmu, je zdrojom génovej nestability. Hypo-metylácia DNA môže viesť ku aktivácii proto-onkogénov. Podobný princíp straty metylácie a génovej nestability je u mnohých nádorov. (Sharma, Kelly, & Jones, 2010).

Aj keď hypo-metylácia vedie ku génovej nestabilite a aktivácii proto-onkogénov, hyper-metylácia takisto prispieva ku progresii karcinogézy deaktiváciou niektorých tumor-supresorových génov. Mnoho tumor-supresorových génov vrátane BRCA1 sa pri nádorových ochoreniach našlo hyper-metylovaných (Sharma, Kelly, & Jones, 2010).

Niektoré štúdie dokazujú, že metylácia DNA a acetylácia histónov hrajú rolu pri vzniku liekovej rezistencie. Demetylácia MDR1 v nádorových bunkových líniiach bola asociovaná so získaním rezistentného fenotypu týchto buniek. Metylácia MDR1 zvyšuje rezistenciu a znižuje akumuláciu liečiva v bunkách. Stala sa preto výborným cieľom pre epigenetickú terapiu anti-metylačnými látkami (Housman, et al., 2014).

V roku 1964, 5-azatidín (AZA) a 2'-deoxy-5-azacitidín (DAC) boli vyvíjané, ako klasické cytostatiká. 16 rokov neskôr boli preukázané ich vlastnosti inhibovať DNA metyláciu a boli označované ako hypometylačné agens (HMAs). Toto naštartovalo mnohé výskumy a o 35 rokov neskôr bolo potvrdené zvýšené prežívanie pacientov s myeloidnými malignitami. Pri malých koncentráciách AZA a DAC spôsobujú demetyláciu DNA a reaktivujú tumor-supresorové gény. Vo vysokých koncentráciách sa správajú ako klasické cytostatiká (Pleyer & Greil, 2015).

2.4.8. Úloha miRNA

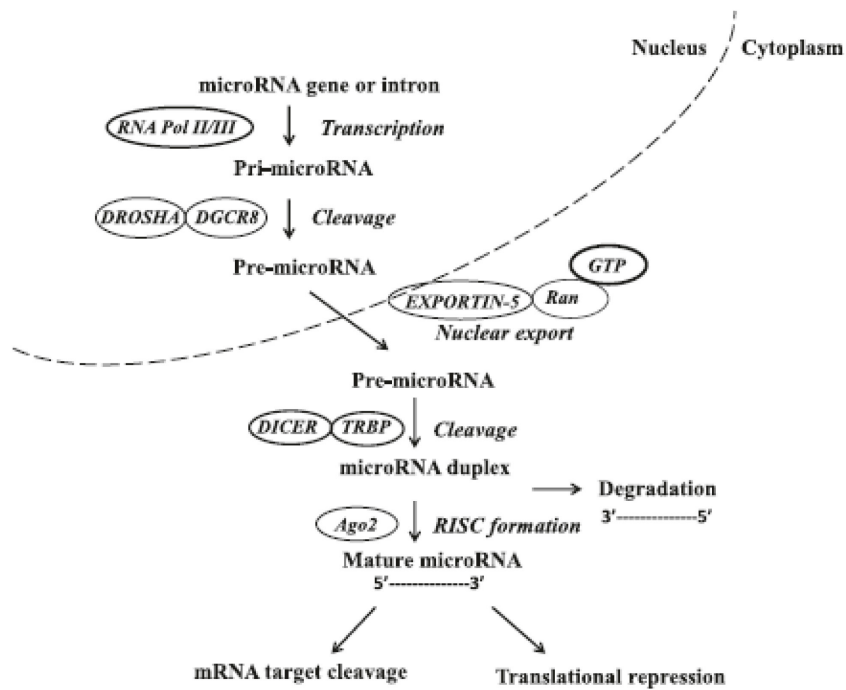
MikroRNA (miRNA) sú malé nekódujúce sekvencie v RNA, s veľkosťou okolo 20-22 nukleotidov. Hrajú dôležitú úlohu vo všetkých biologických dráhach. Niektoré miRNA sú vysoko konzervované čo značí, že post-transkripčné regulácie pomocou

miRNA, sú hlavné regulačné mechanizmy v rámci viacerých mnohobunkových organizmov. Za fyziologických podmienok majú za úlohu dozerať na biologické procesy ako sú bunková proliferácia, diferenciácia a apoptóza (Reddy, 2015).

Prvý dôkaz zapojenia miRNA v ľudských nádoroch bol objavený pri pokusoch o identifikáciu tumor-supresorov na chromozóme 16q14 u B-bunkovej chronickej lymfoidnej leukémie. Neskôr sa zistilo, že tento región obsahuje 2 miRNA gény, *miR-15* a *miR-16-1*. Oba gény sa našli opakovane deletované alebo down-regulované vo väčšine prípadov chronickej lymfoidnej leukémie. Ďalšie výskumy ukázali, že obe miRNA sú tumor-supresormi a navodzujú apoptózu. Knock-out týchto génov u myší, na nich rekapituluje chronickú lymfoidnú leukémiu, čo dokazuje úlohu týchto miRNA v supresii nádorov. Tiež sa v posledných rokoch objavujú dôkazy o súvisi dlhých nekódujúcich RNA (lncRNA) s vývojom a progresiou rakoviny (Peng & Croce, 2016).

Biosyntéza miRNA

Biosyntéza v prvom rade zahŕňa transkripciu pri-miRNA pomocou RNA polymerázy II. Nukleáza *droscha* a proteín *dgcr8* zmenia pri-miRNA na pre-miRNA, ktorá má dĺžku od 80-100 nukleotidov. Transportný proteín *exportin-5* prenesie pre-miRNA z jadra do cytoplazmy, kde ju cytoplazmatická ribonukleáza *dicer* „postrihá“ do podoby dvojzávitnicovej miRNA. miRNA sa naviaže na *argonaut* proteíny a vytvorí RISC (RNA-induced silencing complex). Tento potom môže regulovať mRNA. Druhé vlákno (3'-5') z dvojzávitnice je degradované (Reddy, 2015). Na nasledujúcom obrázku číslo 10 je schéma syntézy miRNA a vytvorenie komplexu RISC.



Obr. 10. Schéma syntézy miRNA s vyznačením enzýmov, ktoré sa na nej podieľajú.

Obrázok použitý z článku *MicroRNA (miRNA) in cancer*, Reddy, 2015.

3. Cieľ práce

Cieľom tejto práce bolo otestovať spomedzi palety inhibítorov tie, ktoré by najúčinnnejšie inhibovali vybrané AKR enzýmy. Zvýšená expresia AKR enzýmov bola zistená v mnohých typoch nádorových buniek. Je možné, že vyššia expresia enzýmov v malígnych bunkách spôsobuje liekovú rezistenciu a je príčinou vyššej kardiotoxicity, kvôli zvýšenej produkcii metabolitov.

Práca pozostáva z niekoľkých čiastkových krokov:

- Stanovenie a porovnanie hodnôt špecifickej aktivity enzýmov AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2, CBR1, CBR3 voči substrátu DAU
- Screening schopnosti vybraných inhibítorov (midostaurín, vistusertib, talazoparib) inhibovať aktívne daunorubicín redukujúce enzýmy
- Stanovenie polovičnej maximálnej inhibičnej koncentrácie (IC50) u najviac aktívneho inhibítora
- Overenie inhibičného účinku najaktívnejšieho inhibítora v experimentoch *ex vivo* na bunkovej línii KG1a

4. Metodická časť

4.1. Prístroje, pomôcky a chemikálie

4.1.1. Prístroje a pomôcky

Analytické váhy	(Scaltec, USA)
Automatické pipety	(Biohit, Veľká Británia)
Blotovacia aparátúra Trans-Blot Turbo	(Bio-Rad, USA)
ChemiDoc™ XRS+ System	(Bio-Rad, USA)
Elektroforetická aparátúra	(Bio-Rad, USA)
Mikroskúmavky	(Eppendorf, Nemecko)
Minicentrifúga MiniSpin Plus	(Eppendorf, Nemecko)
Prístroj na výrobu ľadu	(Scotsman, Veľká Británia)
PVDF blotovacia membrána	(GE Healthcare, Uppsala, Švédsko)
Thermomixér Compact	(Eppendorf, Nemecko)
Trepačka	(IKA, Nemecko)
UHPLC systém	(Agilent Technologies, USA)
Ultrazvuk	(Ultrazvuk s.r.o., Česká republika)
Zdroj napätia PowerPac universal	(Bio-Rad, USA)

4.1.2. Chemikálie

2-merkaptoetanol	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Akrylamid	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Amersham ECL Prime Reagent	(GE Healthcare, UK)

Bis-akrylamid	(Lachema)
Bovine Sérum Albumín (BSA)	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Bromfenolová modrá	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Daunorubicín hydrochlorid	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Destilovaná voda	
DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Dodecylsírán sodný (SDS)	(Erba Lachema, Brno, Česká republika)
Etanol	(Penta, Česká republika)
Ethylacetát	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Fetálne boviné sérum	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (Švajčiarsko)	(F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Švajčiarsko)
Glukóza-6-fosfát	(AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemecko)
Glycerol	(Lach-Ner, Česká republika)
Glycín	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
Hmotnostný proteínový marker (ladder)	(Bio-Rad Laboratories, USA)
Metanol	(Penta, Česká republika)
MgCl ₂ (0,3 mM)	
NADP(H) ⁺ (Švajčiarsko)	(F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Švajčiarsko)
Na-fosfátový pufer (pH 7,4; 0,1 M)	
Peroxodisírán amónny (APS)	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	(Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)

4.1.3. Zloženie roztokov potrebných na SDS-PAGE a western blot

Podrobné zloženia roztokov sú znázornené v tabuľkách 5 a 6.

Tab. 5. Zloženie roztokov potrebných pre SDS-PAGE.

Názov roztoku	Množstvo a chemikálie
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	18,5 g Tris, 75 ml ultračistá voda, pomocou HCL upraviť pH na hodnotu 8,8 a doplniť ultračistou vodou do 100 ml.
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	6,0 g Tris, 75 ml ultračistá voda, pomocou HCL upraviť pH na 6,8 a doplniť ultračistou vodou do 100 ml.
10% SDS	10 g SDS rozpustiť v 80 ml, doplniť do 100 ml.
10% APS	0,1 g APS rozpustiť v 1000 µl ultračistej vody.
30% akrylamid (AA) + 0,8% bis-akrylamid (bis-AA)	30,0 g AA + 0,8 g bis-AA rozpustiť v 100 ml ultračistej vody.
5x zásobný elektródový pufer	15,1 g Tris, 72,0 g Glycín, 5,0 g SDS, pridať 900 ml ultračistej vody, s HCL upraviť pH na 8,3 a doplniť ultračistou vodou do 1000 ml.

Zdroj: Pracovní návody AKR/SDR research group, FaF UK Hradec Králové.

Tab. 6. Zloženie roztokov potrebných pre western blot.

Názov roztoku	Množstvo a chemikálie
10x zásobný TBS pufer	24 g Tris, 88 g NaCl, pridať 900 ml ultračistej vody, upraviť pH pomocou HCL na 7,6 a doplniť ultračistou vodou do 1000 ml.
1x TBS-T pufer	100 ml 10x zásobného TBS pufru doplniť do 1000 ml ultračistou vodou, 1,0 ml TWEEN 20
Blotovací pufer	1,51 g 25mM Tris, 7,21 g 192 mM Glycín, 100 ml 20% metanol. Doplniť ultračistou vodou do 500 ml, pH sa neupravuje.
5 % Blokovací pufer	5 g blokovacieho mlieka alebo 5 g BSA rozpustiť v 100 ml TBS-T.
Detekčný systém	Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent. Roztok A zmiešať s roztokom B v pomere 1:1.

Zdroj: Pracovní návody AKR/SDR research group, FaF UK Hradec Králové.

4.1.4. Enzýmy

Enzýmy boli pripravené rekombinantne pomocou expresného systému *E. Coli* na katedre biochemických vied FAF UK v Hradci Králové. Ako rozpúšťadlo sme použili 0,2 M draselno-fosfátový pufer s pH 7,4 a glycerol. Zásobné koncentrácie boli uchovávané pri – 20 °C. Prehľad enzýmov aj s ich zásobnými koncentraciami sú uvedené v kapitole 3.2.1. v texte, v tabuľke číslo 9.

4.1.5. Inhibítory

V Tejto práci sme použili nízkomolekulárne inhibítory (Midostaurín, Vistusertib a Talazoparib), všetky 3 s rozdielnym mechanizmom účinku. Inhibítory boli dodané od firmy Selleck Chemicals, Mníchov, Nemecko.

4.1.6. Protilátky na western blot a ich riedenie

Primárna králičia protilátka proti AKR1C3, Ab 84327	(Abcam, UK)
Primárna kozia protilátka proti AKR1A1, Ab 11802	(Abcam, UK)
Primárna králičia protilátka proti AKR1B10, Ab 96417	(Abcam, UK)
Primárna králičia protilátka proti CBR1, Ab 174852	(Abcam, UK)
Primárna králičia protilátka proti AKR7A2, Ab 175295	(Abcam, UK)
Primárna myšacia protilátka proti β -aktínu, Ab 8226	(Abcam, UK)
Sekundárna prasacia protilátka proti králičej protilátke, P0217	(Dako, Dánsko)
Sekundárna králičia protilátka proti kozej protilátke, P0160	(Dako, Dánsko)
Sekundárna králičia protilátka proti myšacej protilátke, P0260	(Dako, Dánsko)

Tab. 7. Riedenie a charakteristika primárnych a sekundárnych protilátok.

Cieľový proteín	Typ Ab	Riedenie v 3% BSA	Označenie Ab
AKR1C3	Králičia	1 : 5000	Ab 84327
AKR1A1	Kozia	1 : 10 000	Ab 11802
AKR1B10	Králičia	1 : 3000	Ab 96417
CBR1	Králičia	1 : 5000	Ab 174852
AKR7A2	Králičia	1 : 2000	Ab 175295
β-AKTÍN	Myšacia	1 : 10 000	Ab 8226
AKR1C3, AKR1B10, CBR1, AKR7A2	Prasacia	1: 20 000	P0217
AKR1A1	Králičia	1 : 20 000	P0160
β – AKTÍN	Králičia	1 : 20 000	P0260

4.2. Metodika práce

4.2.1. Príprava roztokov na inkubáciu

V prvom rade bolo potrebné zistiť, akú aktivitu majú jednotlivé CRE voči testovanému antracyklínu. Ako špecifický substrát bol použitý daunorubicín. V tomto kroku sme vylúčili málo aktívne, prípadne neaktívne CRE a ďalej pokračovali len s tými významne aktívnymi.

Príprava regeneračného systému (RS)

Regeneračný systém je zmes látok, ktorá je nesmierne dôležitá pre fungovanie reakcie. NADPH slúži v reakcii ako kofaktor. Samotná zmes sa skladá z NADPH, MgCl₂, glukózy-6-fosfát, glukózy-6-fosfát-dehydrogenázy a 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4. Navážky jednotlivých látok na 1 reakciu sú vypísané v tabuľke 8.

Tab. 8 Navážka regeneračného systému pre 1 reakciu.

Látka	Množstvo potrebné na 1 reakciu
NADPH	0,2 mg
Glukóza-6-fosfát	0,6 mg
Glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza	0,5 µl
MgCl ₂	10 µl
0,1 M Na-fosfátový pufer, pH=7,4	10 µl

Po navážení jednotlivých súčastí sme NADPH a glukózu-6-fosfát rozpustili s odpovedajúcim množstvom Na-fosfátového pufru. Po zvortexovaní sme do zmesi pridali glukózu-6-fosfát-dehydrogenázu a nakoniec MgCl₂. Zmes sme zvortexovali a uložili na ľad. Do reakcie bolo neskôr pridávaných 20 µl takto pripraveného RS.

Príprava roztokov enzýmov

Enzýmy boli pripravené v zásobných koncentráciách a do reakcií sme si ich museli nariediť na pracovnú koncentráciu 0,5 mg/ml. Do reakcie bolo pipetované 10 µl pracovného roztoku enzýmu, čo odpovedá 5 µg enzýmu. Enzýmy boli nariedené Na-fosfátovým pufrom v objeme, ktorý zodpovedá pracovnej koncentrácii 0,5 mg/ml. Pri porovnávaní aktivity, boli použité enzýmy: AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2, CBR1 a CBR3.

Tab. 9. Prehľad enzýmov použitých ku screeningu a ich zásobných koncentrácií.

Enzým	Zásobná koncentrácia
AKR1A1	1,70 mg/ml
AKR1B1	1,63 mg/ml
AKR1B10	1,61 mg/ml
AKR1C1	1,84 mg/ml
AKR1C2	1,96 mg/ml
AKR1C3	1,30 mg/ml
AKR1C4	1,77 mg/ml
AKR7A2	1,13 mg/ml
CBR1	2,11 mg/ml
CBR3	1,93 mg/ml

Príprava substrátu

Na prípravu substrátu pre reakciu bol použitý daunorubicín hydrochlorid. Zásobný vodný roztok o koncentrácii 5mM sme pripravili rozpustením 1,27 mg práškoveho substrátu v 450 µl destilovanej vody. Zo zásobného roztoku sa do reakcie pipetovalo 10 µl.

Príprava inhibítorov

Finálna koncentrácia inhibítora v reakcii mala byť 50 μM a 10 μM . Zásobné roztoky inhibítorov sa skladovali v mrazničke a ich koncentrácia bola 10 mM. Na dosiahnutie požadovanej koncentrácie sme použili riedenie v tabuľke 10.

Tab. 10. Objemy potrebné pre nariadenie inhibítorov na potrebnú koncentráciu.

Finálna koncentrácia	DMSO (rozpúšťadlo)	Inhibítor
50 μl	38 μl	2 μl
10 μl	12 μl	4 μl

4.2.2. Inkubácia vzoriek s daunorubicínom

Príprava vzoriek na inkubáciu

Do označených Eppendorf mikroskúmaviek sme napipetovali 20 μl predpripraveného regeneračného systému. Ku regeneračnému systému sme do každej mikroskúmavky pridali 60 μl 0,1 M Na-fosfátového pufru a skúmavky sme umiestnili na ľad. Potom sme pridali 10 μl enzýmu, vzorky sme zvortexovali a znova uložili na ľad. Všetky vzorky boli merané v tripletoch pre vyššiu spoľahlivosť výsledkov. Pripravené vzorky ostali 10 minút v ľade.

Inkubácia

Eppendorf skúmavky so vzorkami sme vložili na preinkubáciu do termomixéra dopredu vyhriateho na 37 °C. Preinkubácia bežala 10 minút a po nej sme začali s inkubáciou.

Štartovanie reakcie prebiehalo pridávaním 10 μl substrátu (5mM daunorubicín) ku každému vzorku v intervale 30 sekúnd. Po pridaní substrátu sa skúmavka na chvíľu dala do vortexu a potom prebiehala 30 minútová inkubácia. Po uplynutí daného času sa vzorky v rovnakom poradí postupne zastavili pridaním 300 μl metanolu a vzorky sme uložili na ľad. Po tomto kroku bola prevedená centrifugácia pri 13 400 otáčok za minútu

po dobu 8 minút. Pre inkubáciu vzoriek s inhibítormi bol použitý rovnaký postup, ale do reakčnej zmesi sme pridali navyše 2 μ l roztoku daného inhibítora. Keďže sme používali DMSO ako rozpúšťadlo pre inhibítory, museli sme ho použiť aj ako kontrolu prípadnej inhibície enzýmu.

Príprava vzoriek na meranie (filtrácia)

Počas centrifugácie sme skompletovali prázdne, čisté vialky a popísali ich rovnakým spôsobom ako vzorky. Pripravili sme si 2 kusy sterilných injekčných ihliel, injekčnú striekačku a striekačkový filter Whatman s 0,2 μ m PTFE membránou (GE Healthcare, UK). Vzorky z Eppendorf skúmaviek sme nabrali do injekčnej striekačky, nasadili filter a stlačením piestu prefiltrovali do označených, skompletovaných vialiek. Vialky sme nakoniec uzatvorili a zmerali sme ich UHPLC systémom.

UHPLC analýza

Nástrek vzorku bol nastavený na meranie množstva daunorubicinolu v 5 μ l vzorku. Meranie prebiehalo prístrojom Agilent 1290 Series. Ako kolónu sme používali Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 x 50 mm; 1,8 μ m) s Infinity 1290 filtrom. Parametre merania boli nasledujúce: izokratická elúcia, prietok 0,8 ml/min, mobilná fáza metanol, teplota 40 °C, FLDA detektor (480 nm excitačná a 560 nm emisná vlnová dĺžka).

4.2.3. Práca s bunkovou líniou KG1a, XTT test

Bunková línia KG1a pochádza od 59 ročného muža kaukazského pôvodu s erytroleukémiou, ktorá sa transformovala v akútnu myeloidnú leukémiu (http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-246.aspx?geo_country=sk#characteristics, 13.03.2019). Bunky boli kultivované v Iscove's Modified Dulbecco's médiu s prídavkom 20 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % prídavku antibiotík a 2mM L-glutamínu. Bunková línia patrí medzi neadherentné, takže nebolo potrebné použiť nijakú techniku na ich oddelenie od stien.

Na vykonanie testu životnosti buniek boli KG1a bunky kultivované v triplikáte v 96 jamkovej platni (približne 20 000 buniek na jamku) s DMSO (neinhibovaná reakcia)

a midostaurínom v koncentráciách 0,01 μM a 0,1 μM v kombinácií s daunorubicínom v koncentráciách 0 μM (kontrola), 0,25 μM , 0,5 μM a 0,75 μM . Bunky boli inkubované 72 hodín v inkubátore pri 37°C a 5 % koncentrácií CO_2 . Následne sme bunky inkubovali s XTT médiom (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide).

Po 4 hodinách inkubácie s XTT, mitochondriálne reductázy v živých bunkách produkujú oranžový formazan, ktorý za použitia ELISA čítačky kvantifikujeme spektrofotometricky. Hodnoty absorbancie boli nastavené podľa blanku (absorbancia čistého bunkového média) a kontrolné bunky, kde bola životnosť 100 %. Dáta boli prezentované ako percento živých KG1a buniek v prítomnosti rôznych koncentrácií midostaurínu, daunorubicínu alebo ich kombinácií.

4.2.4. SDS-PAGE elektroforéza

Príprava gélu

Pred samotnou prípravou gélu si musíme najskôr pripraviť nalievací stojan, spodné sklo so spacerom, krycie sklo, zelený držiak skiel a hrebeň. Pri vkladaní držiaku si musíme dať pozor, akú hrúbku gélu ideme pripravovať. Pre naše experimenty sme pripravovali gél o hrúbke 0,75 mm. Sklá sme pripevnili do nalievacieho držiaku a naliali medzi ne destilovanú vodu. Vodu sme po vyskúšaní tesnosti vyliali.

Samotný gél sa skladal sa z dvoch roztokov, ktorých zloženia sú vypísané v tabuľkách 11 a 12. Po tomto kroku sme pripravili separačný gél a ihneď ho naliali medzi už pripravené sklá. Vrchnú vrstvu sme prevrstvili 200 μl izopropanolu a nechali polymerizovať 30 až 40 minút. Po zatvrdnutí gélu sme zliali izopropanol a pripravili zaostrovací gél. Po zamiešaní sme ho vyliali opäť medzi sklá a vložili hrebeň do gélu, aby sa vytvorili jamky pre pipetovanie vzoriek. Potom sme gél s hrebeňom nechali polymerizovať.

Tab. 11. Pipetované chemikálie a ich objemy na prípravu 1 separačného gélu.

Zložky separačného gélu	
Ultračistá voda	1,6 ml
1,5 M Tris-HCL, ph 8,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
30% roztok akrylamidu	2,1 ml
Zahájenie polymerizácie	
10% APS	50 µl
TEMED	2,5 µl

Zdroj: Pracovní návody AKR/SDR research group, FaF UK Hradec Králové.

Tab. 12. Pipetované chemikálie a ich objemy pre prípravu 1 zaostrovacieho gélu.

Zložky zaostrovacieho gélu	
Ultračistá voda	953 µl
0,5 M Tris-HCL, ph 6,8	391 µl
10% SDS	16 µl
30% roztok akrylamidu	203 µl
Zahájenie polymerizácie	
10% APS	32 µl
TEMED	1,6 µl

Zdroj: Pracovní návody AKR/SDR research group, FaF UK Hradec Králové.

Lýza bunkových línií a príprava vzoriek

Pomocou western blot analýzy sme kvantifikovali expresiu AKR proteínov v KG1a bunkových líniách. Do troch 15 ml skúmaviek falcon sme dali 5×10^6 buniek z rovnakého rezervoára. Bunky sme neskôr dali centrifugovať pri 1500 rpm na 5 minút a po odstránení supernatantu sme bunky zlyzovali pridaním 50 µl komerčne pripraveného lyzačného roztoku. Lyzáty boli centrifugované pri 13 400 otáčok za minútu počas 5 minút pri 4 °C. Hornú vrstvu sme prepipetovali do nových eppendorf skúmaviek a vo vzorkách bol kvantifikovaný proteín, aby sa dosiahlo jeho rovnaké množstvo vo všetkých vzorkách.

20 µg množstvo proteínu vo všetkých vzorkách sme denaturovali v prítomnosti loading bufferu (0,5 M Tris-HCL, 40% glycerol, 1% SDS, 0,025% Brom-fenolová modrá a 12,5% 2-merkaptotanol) pri 96 °C, 4 minúty.

Elektroforéza

Z gélu sme odstránili hrebeň. Sklo s gélom, bolo presunuté do elektroforéznej komory, a otočené smerom dovnútra. Komora bola po rysku naplnená elektródovým pufrom. Vzorky spolu s markerom (weight protein marker / ladder) boli postupne napipetované do jamiek. Elektroforetická aparátúra bola pripojená ku zdroju jednosmerného prúdu. Najskôr sme na prístroji nastavili 100 V a nechali sme prístroj bežať. Po 20 minútach sme napätie prepli na 150 V na ďalších 75 minút. Po skončení elektroforézy sme vybrali sklo s gélom a opatrne ho otvorili. Vrchnú časť zaostrovacieho gélu sme odstránili a gél sme vložili do blotovacieho pufru. Elektródový pufer sme vrátili späť do fľaše na opätovné použitie.

4.2.5. Western blot

Pred samotným blotovaním sme si museli pripraviť „blotovaci sendvič“, ktorý sa skladá zo 4 vrstiev. Veľkosť komponentov musí byť rovnaká ako veľkosť gélu. Pred skladaním sendviča sme museli blotovaciu membránu aktivovať namočením do metanolu.

Všetky komponenty boli pred vložením do kazety blotovacieho zariadenia namočené do blotovacieho pufru. Na spodok sme dali poréznu hubičku, na ňu išli 3 vrstvy filtračného papiera, potom sme pinzetou s tupým koncom preniesli blotovaciu membránu, na sme položili gél, 3 vrstvy filtračného papiera a prekryli sme ich poréznu hubičkou. Po skončení sme sendvič uhladili valčekom, aby sa vytlačili vzduchové bubliny. Prebytočný blotovací pufer bol odsatý buničinou. Western blotting prebiehal pri napätí 25 V po dobu 30 minút. Po skončení blottingu bola membrána prenesená do nádoby s TBS-T pufrom.

Blokovanie membrány a naviazanie protilátok

Po oplachu membrány sme do nádoby pridali 5 % roztok odtučneného mlieka rozpusteného TBS-T pufre. Membránu sme nechali blokovat' na orbitálnej trepačke 1 hodinu. Neskôr bola zablokovávaná membrána premývaná 10 minút v TBS-T pufre.

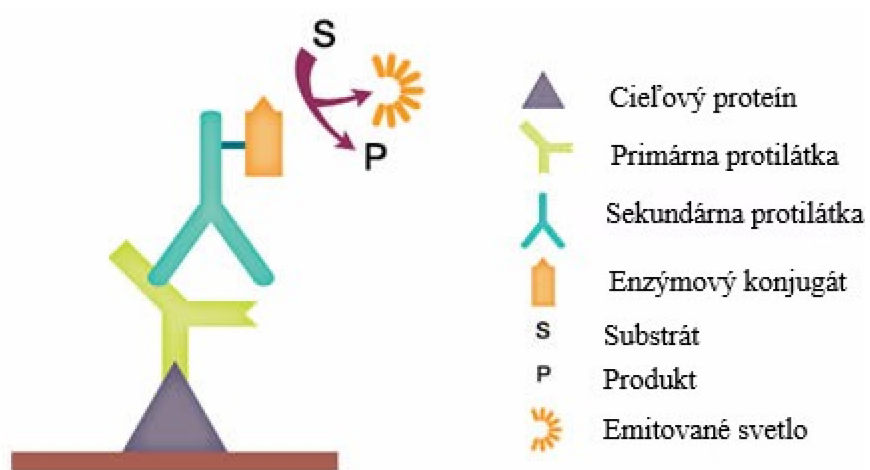
Primárna protilátka bola pred aplikovaním rozpustená v 3 % BSE (Bovinný Sérový Albumín) za stanoveného pomeru dilúcie. Riedenie a jednotlivé použité protilátky sú vypísané v predchádzajúcej kapitole v tabuľke 5. Na membránu bol aplikovaný roztok primárnej protilátky, ktorý bol inkubovaný cez noc v chladiacej miestnosti na orbitálnej trepačke. Po naviazaní bola protilátka zozbieraná do nádoby a uschovaná v chladničke na opakované použitie.

Následne bola membrána premývaná 3 × po 8 minút TBS-T pufrom, aplikovali sme roztok sekundárnej protilátky a nechali 1 hodinu inkubovať. Po skončení sme membránu znova 3 x premývali v TBS-T pufre.

Vizualizácia membrány a štatistické vyhodnotenie

Detekcia prebiehala v tmavej komore za použitia chemiluminiscencie. Detekčný systém (Amersham ECL prime reagent) bol pripravený zmiešaním 2 roztokov v pomere 1:1. Membrána bola vložená do prístroja ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, USA) a bol na ňu aplikovaný detekčný systém. Následne bola na membránu vložená fólia a prístroj bol nastavený na snímanie snímku po rôzne dlhú dobu. Na získanie najkvalitnejšieho snímku sme expozičné časy menili exponenciálne (15, 30, 60, 120, 240,... sekúnd) a vybrali sme najlepší snímok.

Výsledky expresie cieľového proteínu sme vyhodnocovali na základe denzitometrie ako percento expresie endogénneho β -aktínu (kontrola). Ku vytvoreniu výsledného grafu sme použili program GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, CA, USA). Na obrázku 11 je znázornený princíp detekcie membrány za použitia chemiluminiscencie.



Obr. 11. Princíp chemiluminiscencie. Obrázok použitý z webu <http://www.bio-rad.com/en-cz/product/chemidoc-xrs-system?ID=NINJHRKG4> a upravený autorom.

5. Výsledky a diskusia

5.1. Stanovenie a porovnanie špecifickej aktivity CRE voči daunorubicínu

Vedecké skupiny po celom svete sa snažia obmedziť vplyv mnohočetnej liekovej rezistencie na minimum rôznymi spôsobmi. Mechanizmy vzniku liekovej rezistencie sú podrobnejšie popísané v predchádzajúcej časti diplomovej práce a my sme sa experimentálne zamerali na inaktiváciu chemoterapeutika karbonyl redukujúcimi enzýmami. V publikácií od Rosemonda a Walsha z roku 2004 je uverejnený zoznam liečiv, ktoré karbonyl redukujúce enzýmy používajú ako substrát. Medzi nimi sa nachádzajú látky ako R-warfarín, metylprednison, naltrexon a nami testovaný daunorubicín (Rosemond & Walsh, 2004).

Našou prvou úlohou bolo zistiť, ktoré CRE daunorubicín efektívne premieňajú a s akou aktivitou. Ak daunorubicín nepremieňali alebo premieňali s veľmi malou aktivitou, vyradili sme ich z ďalších experimentov. Screening bol vykonaný s AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2, CBR1 a CBR3. Z analýzy na UHPLC sme zistili hmotnosť (ng) daunorubicinolu v 5 μ l (nástreku). Bolo treba vypočítať výslednú hodnotu špecifickej aktivity a vyjadriť ju v **nmol/mg/min**.

Pre výpočet špecifickej aktivity si ukážeme ako príklad **CBR/1** v tabuľke 13. Pre získanie celkového množstva daunorubicinolu (DAUN-OL) vo vzorke sme vynásobili koeficient riedenia **K = 80** (podiel nástreku voči celému objemu vzorku) s hodnotou z UHPLC (**1642,771 \times 80**). Vynásobením tejto hodnoty 1000 a vydelením koncentráciou enzýmu v reakcii (**1000 \div 5**), získame množstvo DAUN-OL, ktoré vytvorí 1000 μ g = 1 mg enzýmu. (**131421,68 \times 1000/5**). V ďalšom kroku sme prepočítali ng na nmol. $M_r(\text{daunol}) = 529,54$. (**26284336 \div 529,54**). Doba inkubácie trvala 30 minút, tak aktivitu v nmol/mg/30min vydelením 30 a získame špecifickú aktivitu v nmol/mg/min. Týmto spôsobom sme vypočítali všetky aktivity v práci.

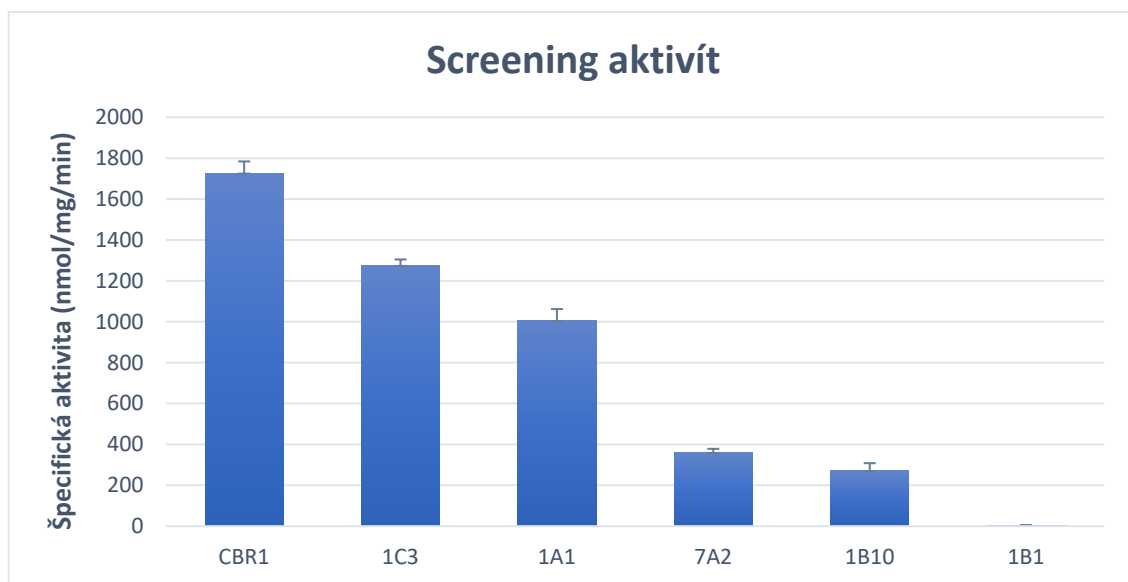
Tab. 13. Vzorová tabuľka pre výpočet špecifickej aktivity.

Enzým	DAUN-OL v 5 μ l vzorku z UHPLC (ng)	DAUN-OL vo vzorke 400 μ l (ng)	Špecifická aktivita (ng/1mg/30min)	Špecifická aktivita (nmol/mg/30min)	Špecifická aktivita (nmol/mg /min)
CBR1/1	1642,77	131421,68	26284336	49636	1655
CBR1/2	1711,52	136921,36	27384272	51713	1724
CBR1/3	1785,40	142831,92	28566384	53946	1798

V tabuľke 14 a na obrázku 12 sú vypísané priemerné špecifické aktivity CRE.

Tab. 14. Priemerné špecifické aktivity karbonyl redukujúcich enzýmov.

Špecifická aktivita enzýmu (nmol/mg/min)	Smerodajná odchýlka
CBR1	$\pm 58,66$
AKR1C3	$\pm 30,74$
AKR1A1	$\pm 58,03$
AKR7A2	$\pm 20,43$
AKR1B10	$\pm 37,92$
AKR1B1	$\pm 0,48$



Obr. 12. Grafické znázornenie aktivity jednotlivých CRE voči daunorubicínu.

Okrem spomínaných enzýmov sme testovali aj AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 a CBR3 špecifické aktivity týchto enzýmov voči daunorubicínu vyšli zanedbateľné alebo nulové, preto sme ich do výsledkov neuvádzali a boli vyradené z nasledujúcich experimentov. Ako najaktívnejšie enzýmy sa ukazovali CBR1, AKR1C3 a AKR1A1. AKR7A2 a AKR1B10 boli tiež pomerne aktívne a AKR1B1 bol aktívny len málo a tak sme aj tento enzým vylúčili z ďalších experimentov.

Publikácia od (Kassner, et al., 2008) sa zaoberala testovaním enzýmových aktivít CBR1, CBR3, AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4 za použitia doxorubicínu ako substrátu. Najväčšia aktivita sa zaznamenala pri AKR1C3 (183,5 nmol/mg/min) a CBR1 (20,6 nmol/mg/min). Stredná aktivita bola zaznamenaná pri AKR1B10 (2,8 nmol/mg/min), AKR1A1 (1,1 nmol/mg/min) a AKR1C4 (1,2 nmol/mg/min). Takmer žiadnu aktivitu vykazovali AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2 a CBR3. Aj keď táto výskumná skupina pracovala s doxorubicínom s ostatnými výsledkami meraní sa zhodujú a medzi najaktívnejšie antracyklínreduktázy patria CBR1 a AKR1C3.

Autori v publikácií od (Bains, Grigliatti, Reid, & Riggs, 2010) porovnávali aktivity ľudských CRE v prítomnosti daunorubicínu a doxorubicínu. Najvyššiu aktivitu v prítomnosti daunorubicínu zaznamenali s CBR1, AKR1C3, AKR7A2, AKR1A1 a nakoniec AKR1B10 (enzýmy zoradené zostupne podľa nameranej aktivity). Nízku aktivitu namerali u AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4, CBR3 a CBR4, čo sa zhoduje aj s našimi výsledkami. S doxorubicínom mal najvyššiu AKR1C3 a CBR3. Aktívne boli aj CBR1 a AKR7A2, avšak menej. V štúdií autori testovali aj vplyv SNPs (single nucleotide polymorphism) na metabolizmus antracyklínov a u 27 testovaných alelických variant bol u 5 signifikantne znížený metabolizmus daunorubicínu v porovnaní s wild-type.

Ďalšia štúdia od (Hofman, Skarka, Havranková, & Wsol, 2015), kde autori testovali redukciu doxorubicínu. Výsledky meraní boli AKR1C3, CBR1, AKR1A1, AKR1B10 a CBR3 (aktivity enzýmov sú radené zostupne). Podľa toho predpokladáme, že práve tieto enzýmy sa zúčastňujú aj na metabolizme antracyklínov *in vivo*. AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 mali v testoch veľmi malú aktivitu. Podobné výsledky

sme dosiahli aj my v našej práci. Metabolizmus daunorubicínu a doxorubicínu v organizme je veľmi podobný a zúčastňujú sa na ňom aj rovnaké enzýmy, čo sme podporili aj našimi výsledkami.

5.2. Testovanie inhibičných účinkov jednotlivých inhibítorov

Viacere štúdie potvrdzujú zúčastnenie karbonyl redukujúcich enzýmov na kancerogéne a tiež pri rozvoji antracyklínovej kardiotoxicity. V niektorých ľudských nádoroch sú CRE overexprimované a to často vedie ku vyššej deaktivácii liečiva, horšej liečiteľnosti ochorenia, vyššej toxicite a navodzovaniu MDR. Napríklad zvýšená expresia AKR1B1 bola asociovaná so zhoršenou prognózou AML (Laffin & Petrash, 2012). Toto bol dôvod na hľadanie účinných inhibítorov týchto enzýmov a tým zvýšiť účinnosť liečby a znížiť nežiaduce účinky.

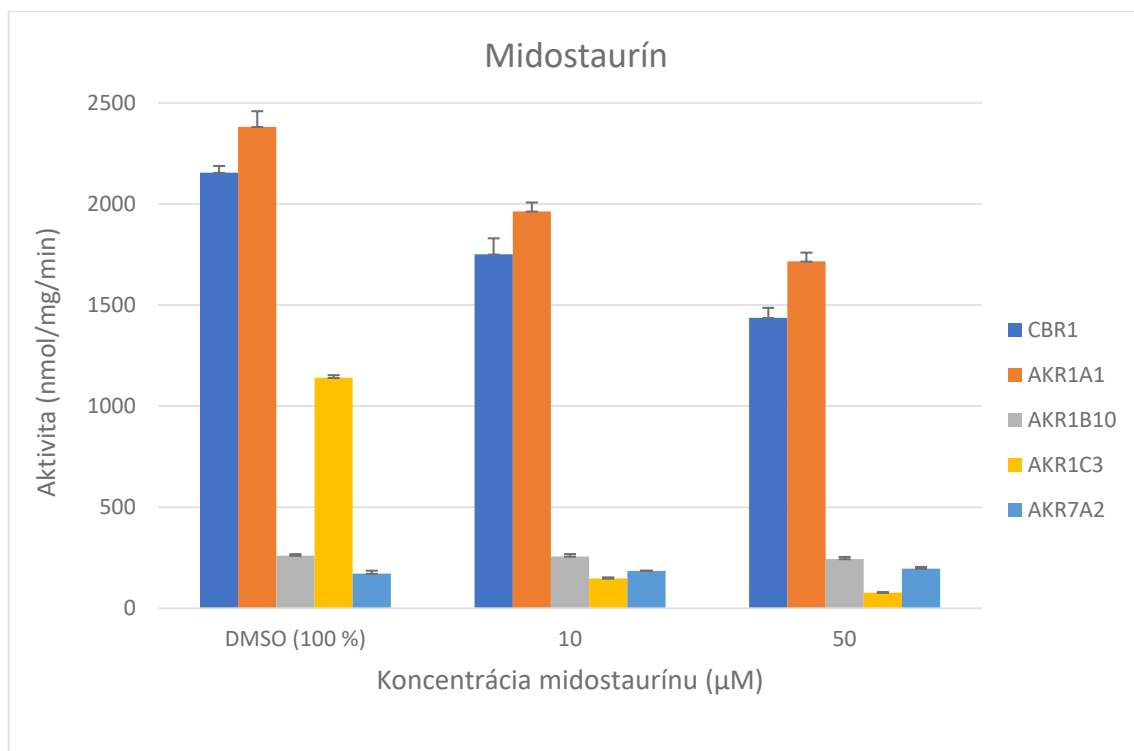
Na náš ďalší experiment sme z predchádzajúcej úlohy vybrali najviac aktívne enzýmy (CBR1, AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3 a AKR7A2) a tie sme podrobili testu. Každý enzým sme otestovali s 3 rôznymi inhibítormi a sledovali inhibičný účinok. Meranie prebiehalo v tripletoch a z jednotlivých výsledkov sme urobili aritmetický priemer. Výsledky sú uvedené v kapitolách 4.2.1, 4.2.2 a 4.2.3.

5.2.1. Inhibícia midostaurínom

Ako substrát sme použili 5 mM daunorubicín. Screening inhibítorov sme vykonávali podľa rovnakého postupu ako pri screeningu enzýmov s tým rozdielom, že sme do reakcie pridali midostaurín ako inhibítor v dvoch koncentráciách 50 a 10 μ M (príprava v kapitole 3.2.1.) Vzorky boli merané v triplikátoch a výsledné hodnoty sú spriemerované. Výsledky enzýmov sú uvedené na nasledujúcej strane v tabuľke 15 a v grafe na obrázku 13.

Tab. 15. Priemerné hodnoty aktivít a inhibície testovaných enzýmov s midostaurínom.

CBR1	Aktivita (nmol/mg/min) ± odchýlka	Aktivita (%)	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (%)
CBR1	2308,29 ± 55,21			2,39
CBR1 (DMSO)	2154,50 ± 33,16	100	0	1,54
10	1750,37 ± 79,47	81,24	18,76	4,54
50	1436,44 ± 49,64	66,67	33,33	3,46
AKR1A1				
AKR1A1	2961,05 ± 62,99			2,13
AKR1A1 (DMSO)	2381,11 ± 77,16	100	0	3,24
10	1963,04 ± 43,99	82,44	17,56	2,24
50	1715,61 ± 43,57	72,05	27,95	2,54
AKR1B10				
AKR1B10	348,21 ± 26,24			7,54
AKR1B10 (DMSO)	260,62 ± 7,461	100	0	2,86
10	256,36 ± 11,91	98,37	1,63	4,65
50	243,76 ± 10,35	93,53	6,47	4,25
AKR1C3				
AKR1C3	1403,66 ± 25,68			1,83
AKR1C3 (DMSO)	1140,13 ± 12,10	100	0	1,14
10	147,51 ± 5,56	12,94	87,06	3,77
50	77,64 ± 2,07	6,81	93,19	2,67
AKR7A2				
AKR7A2	216,02 ± 13,79			6,38
AKR7A2 (DMSO)	171,50 ± 14,66	100	0	8,5
10	185,22 ± 1,67	107,99	-7,99	0,90
50	196,32 ± 8,35	114,47	-14,47	4,25



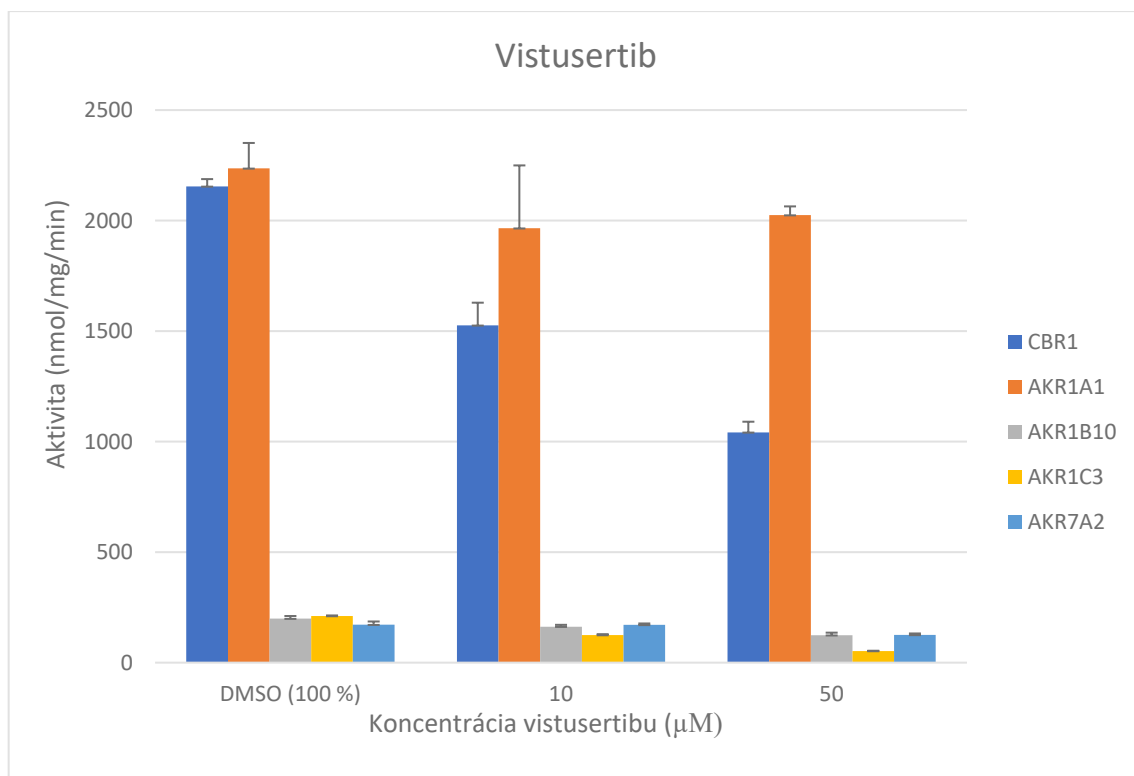
Obr. 13. Grafické znázornenie inhibície CRE midostaurínom. Prvý stĺpec ukazuje 100 % aktivitu (iba DMSO), v druhom sme použili 10 μM inhibítor a v treťom 50 μM inhibítor.

5.2.2. Inhibícia vistusertibom

Ako substrát sme použili 5 mM daunorubicín. Screening inhibítorov sme vykonávali podľa rovnakého postupu ako pri screeningu enzýmov s tým rozdielom, že sme do reakcie pridali vistusertib ako inhibítor (príprava v kapitole 3.2.1.). Výsledky enzýmov sú uvedené na nasledujúcej strane v tabuľke 16 a v grafe na obrázku 14.

Tab. 16. Priemerné hodnoty aktivít a inhibície testovaných enzýmov s vistusertibom.

CBR1	Aktivita (nmol/mg/min) ± odchýlka	Aktivita (%)	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (%)
CBR1	2308,29 ± 55,20			2,39
CBR1 (DMSO)	2154,50 ± 33,16	100	0	1,54
10	1525,91 ± 102,60	70,82	29,18	6,72
50	1041,75 ± 48,28	48,35	51,65	4,63
AKR1A1				
AKR1A1	2534,55 ± 114,04			4,50
AKR1A1 (DMSO)	2236,13 ± 115,06	100	0	5,15
10	1965,31 ± 284,27	87,89	12,11	14,46
50	2024,62 ± 39,59	90,54	9,46	1,96
AKR1B10				
AKR1B10	230,14 ± 22,76			9,89
AKR1B10 (DMSO)	198,97 ± 11,97	100	0	6,01
10	162,56 ± 8,52	81,70	18,30	5,24
50	123,85 ± 11,77	62,25	37,75	9,51
AKR1C3				
AKR1C3	260,11 ± 25,86			9,94
AKR1C3 (DMSO)	210,92 ± 2,548	100	0	1,21
10	124,75 ± 4,02	59,15	40,85	3,22
50	52,62 ± 1,19	24,95	75,05	2,26
AKR7A2				
AKR7A2	216,02 ± 13,79			6,38
AKR7A2 (DMSO)	171,50 ± 14,66	100	0	8,55
10	170,76 ± 6,47	99,57	0,43	3,79
50	125,36 ± 6,63	73,10	26,90	5,29



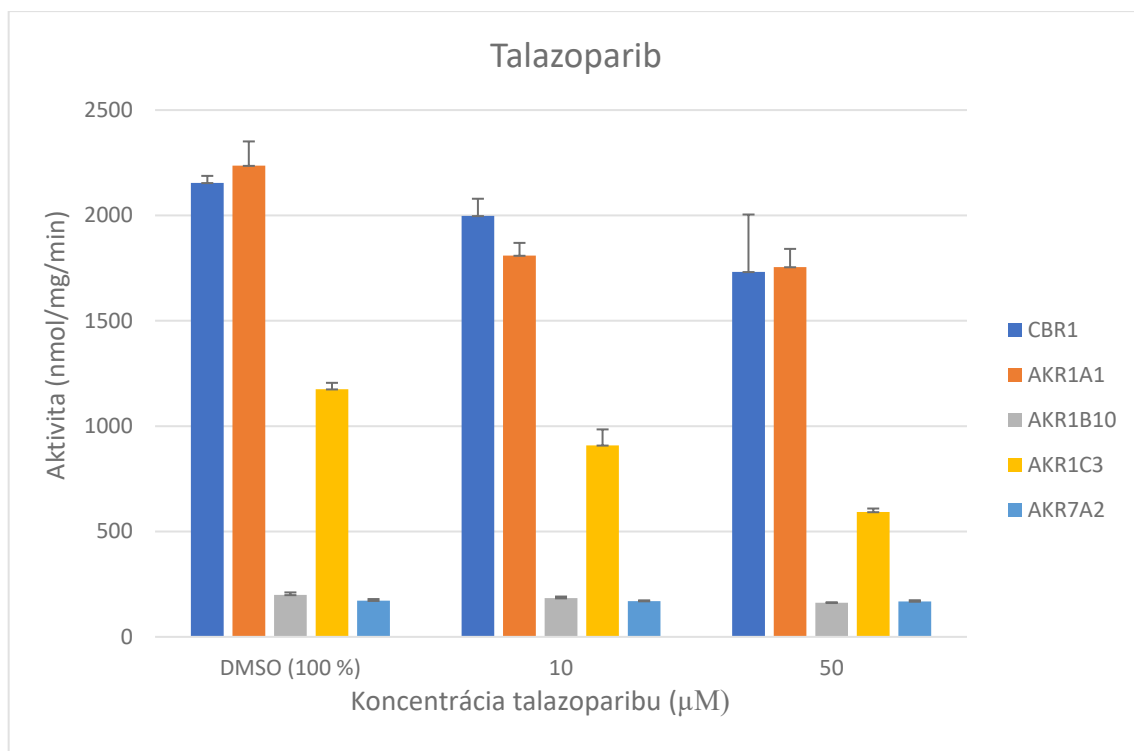
Obr. 14. Grafické znázornenie inhibície CRE vistusertibom. Prvý stĺpec ukazuje 100 % aktivitu (iba DMSO), v druhom sme použili 10 μM inhibítor a v treťom 50 μM inhibítor.

5.2.3. Inhibícia talazoparibom

Ako substrát sme použili 5 mM daunorubicín. Screening inhibítorov sme vykonávali podľa rovnakého postupu ako pri screeningu enzýmov s tým rozdielom, že sme do reakcie pridali talazoparib ako inhibítor (príprava v kapitole 3.2.1.). Výsledky enzýmov sú uvedené na nasledujúcej strane v tabuľke 17 a v grafe na obrázku 15.

Tab. 17. Priemerné hodnoty aktivít a inhibície testovaných enzýmov s talazoparibom.

CBR1	Aktivita (nmol/mg/min) ± odchýlka	Aktivita (%)	Inhibícia (%)	Smerodajná odchýlka (%)
CBR1	2308,29 ± 55,20			2,39
CBR1 (DMSO)	2154,50 ± 33,16	100	0	1,54
10	1997,74 ± 81,41	92,72	7,28	4,08
50	1732,16 ± 272,22	80,40	19,60	15,72
AKR1A1				
AKR1A1	2534,55 ± 114,04			4,50
AKR1A1 (DMSO)	2236,13 ± 115,06	100	0	5,15
10	1809,39 ± 60,26	80,92	19,08	3,33
50	1755,06 ± 86,18	78,49	21,51	4,91
AKR1B10				
AKR1B10	230,14 ± 22,76			9,89
AKR1B10 (DMSO)	198,97 ± 11,97	100	0	6,01
10	183,80 ± 7,58	92,37	7,63	4,13
50	161,63 ± 2,59	81,23	18,77	1,60
AKR1C3				
AKR1C3	1623,48 ± 98,89			6,09
AKR1C3 (DMSO)	1175,27 ± 30,27	100	0	2,58
10	908,75 ± 75,82	77,32	22,68	8,34
50	592,56 ± 16,49	50,42	49,58	2,78
AKR7A2				
AKR7A2	216,02 ± 13,79			6,38
AKR7A2 (DMSO)	171,50 ± 7,94	100	0	4,63
10	169,72 ± 3,54	98,96	1,04	2,09
50	167,84 ± 5,98	97,86	2,14	3,56



Obr. 15. Grafické znázornenie inhibície CRE talazoparibom. Prvý stĺpec ukazuje 100 % aktivitu (iba DMSO), v druhom sme použili 10 μM inhibítor a v treťom 50 μM inhibítor.

V tejto časti práce sme porovnávali účinok inhibítora proteín-kinázy C (midostaurín), inhibítora mTOR (vistusertib) a PARP inhibítora (talazoparib). Z nameraných výsledkov sme zistili, že všetky inhibítory výrazne inhibovali AKR1C3. Aktivitu AKR1C3 najlepšie znižoval midostaurín, ktorý pri koncentrácií 10 μM mal 87,062 % inhibičnú aktivitu a pri 50 μM sme namerali 93,190 %. Aktivitu CBR1 sa nám nepodarilo inhibovať silno. Najefektívnejší inhibítor tu bol vistusertib s inhibičnou aktivitou 29,176 % pri 10 μM a 51,648 % pri 50 μM. Ostatné enzýmy sa nám podarilo inhibovať od 1 – 40 %, čo bola väčšina. AKR1B10 a AKR7A2 sa nám podarilo inhibovať len málo. Na základe nameraných výsledkov môžeme konštatovať, že inhibítory a koncentrácie použité v tejto práci sú voči nim neefektívne. U midostaurínu pri AKR7A2 dochádzalo skôr ku aktivácii enzýmu pri zvyšujúcej sa koncentrácií inhibítora. Pri inkubácií sa postupovalo podľa rovnakej metodiky ako pri ostatných. Tieto výsledky mohli byť zapríčinené chybou merania. Porovnanie inhibície AKR1C3 a CBR1 je uvedený v tabuľke 17.

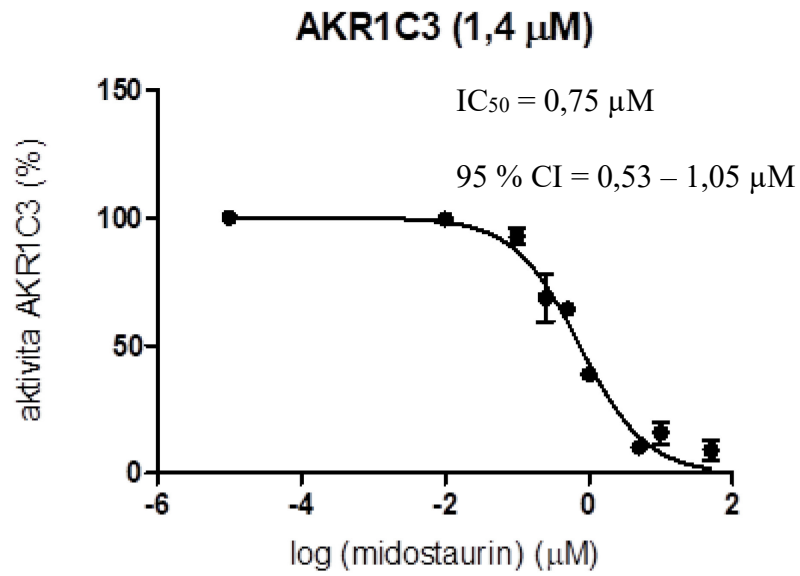
Tab. 17. Súhrn nameraných hodnôt inhibície jednotlivých inhibítorov k enzýmom AKR1C3 a CBR1.

AKR1C3	Midostaurín	Vistusertib	Talazoparib
50 μ M	93,19 %	75,05 %	49,38 %
10 μ M	87,06 %	40,85 %	22,68 %
CBR1			
50 μ M	33,33 %	51,65 %	19,60 %
10 μ M	18,76 %	29,18 %	7,28 %

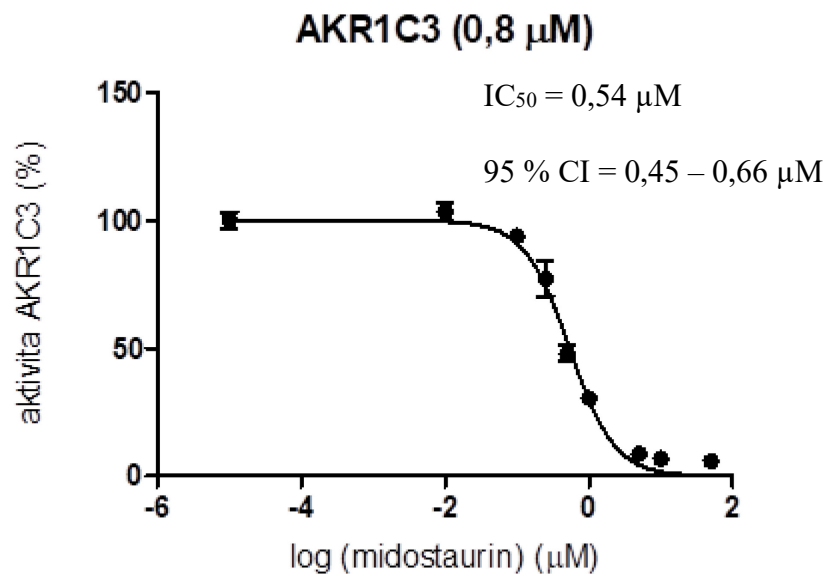
Substancie s ktorými sme pracovali majú okrem mierneho inhibičného účinku na CRE funkciu v blokovaní určitej fázy bunkového cyklu a práve na to sú primárne určené a boli vyvinuté. 28.04.2017 FDA schválila midostaurín na liečbu FLT3 pozitívnej AML v kombinácii s cytarabínom alebo daunorubicínom. 16.10.2018 bol schválený talazoparib na liečbu určitého typu metastatickej rakoviny prsníka. Vistusertib podľa najnovších údajov ešte stále čaká na schválenie od FDA (<https://www.fda.gov>, 15.4.2019).

5.2.4. Stanovenie IC₅₀ pre midostaurín

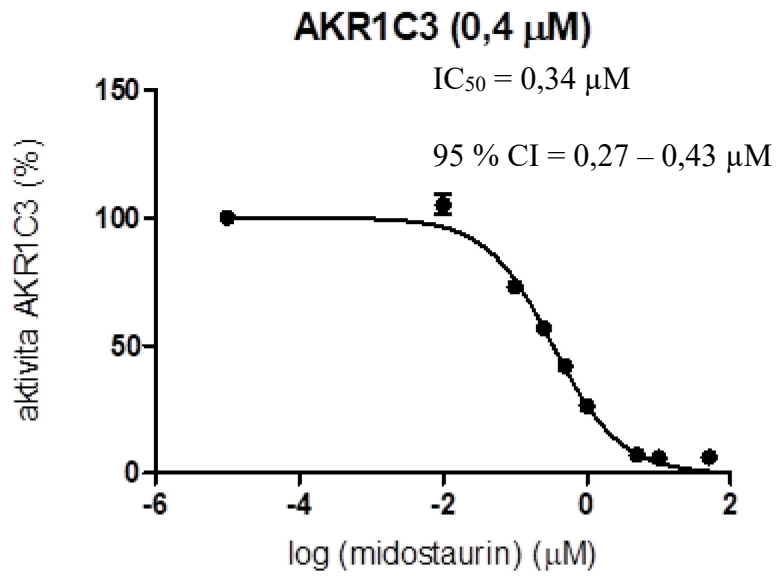
Pre tento experiment sme vybrali enzým AKR1C3 s midostaurínom. Na základe nameraných výsledkov bola táto kombinácia najefektívnejšia. Koncentrácie inhibítora boli zvolené nasledovne: 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M, 0,1 μ M a 0,01 μ M. Pri inkubáciách sme použili nasledovné koncentrácie enzýmu: 1,4 μ M, 0,8 μ M, 0,4 μ M a 0,1 μ M a sledovali sme závislosť hodnôt IC₅₀ na koncentrácií AKR1C3. Rozdielne koncentrácie enzýmu sme použili na preukázanie, či sa jedná o pevne sa viažuci (tight-binding) inhibítor. Výsledné hodnoty IC₅₀ boli vypočítané pomocou programu GraphPad Prism 8. Výsledky sú zhrnuté na obrázkoch 16 až 19.



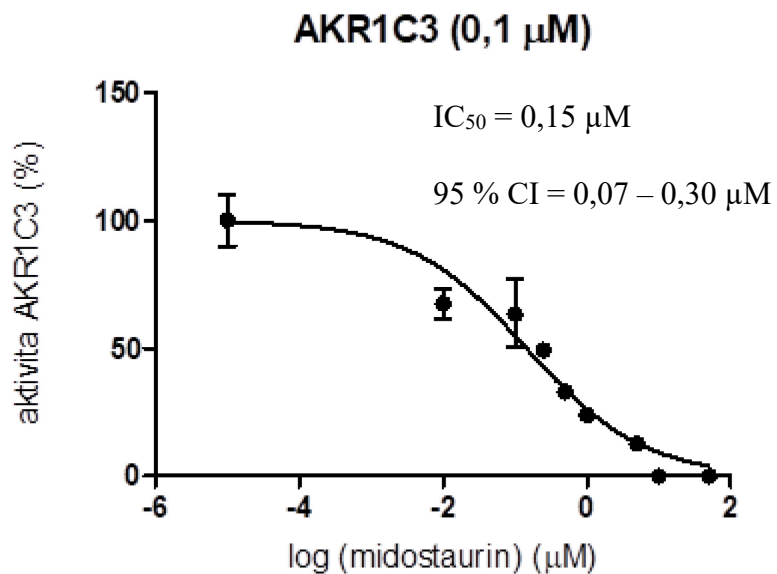
Obr. 16. Grafické znázornenie stanovenia IC_{50} midostaurínu na enzýme AKR1C3. Hodnota (CI = konfidenčný interval) vyjadruje v ktorom rozmedzí sa presná hodnota IC_{50} môže nachádzať.



Obr. 17. Grafické znázornenie stanovenia IC_{50} midostaurínu na enzýme AKR1C3. Hodnota (CI = konfidenčný interval) vyjadruje v ktorom rozmedzí sa presná hodnota IC_{50} môže nachádzať.

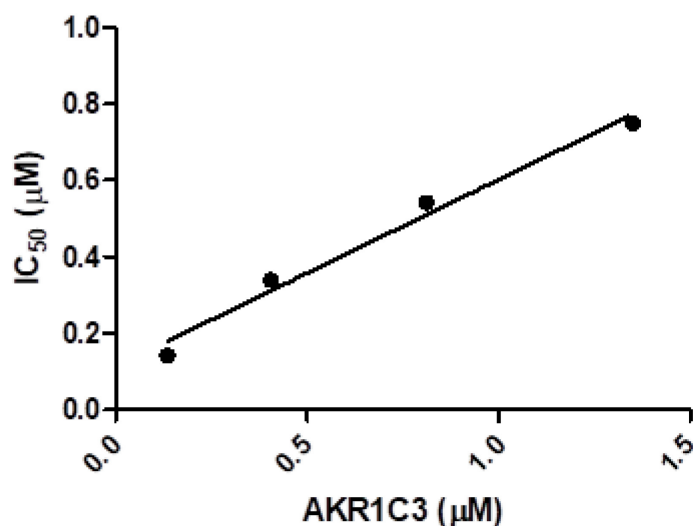


Obr. 18. Grafické znázornenie stanovenia IC_{50} midostaurínu na enzýme AKR1C3. Hodnota (CI = konfidenčný interval) vyjadruje v ktorom rozmedzí sa presná hodnota IC_{50} môže nachádzať.



Obr. 19. Grafické znázornenie stanovenia IC_{50} midostaurínu na enzýme AKR1C3. Hodnota (CI = konfidenčný interval) vyjadruje v ktorom rozmedzí sa presná hodnota IC_{50} môže nachádzať.

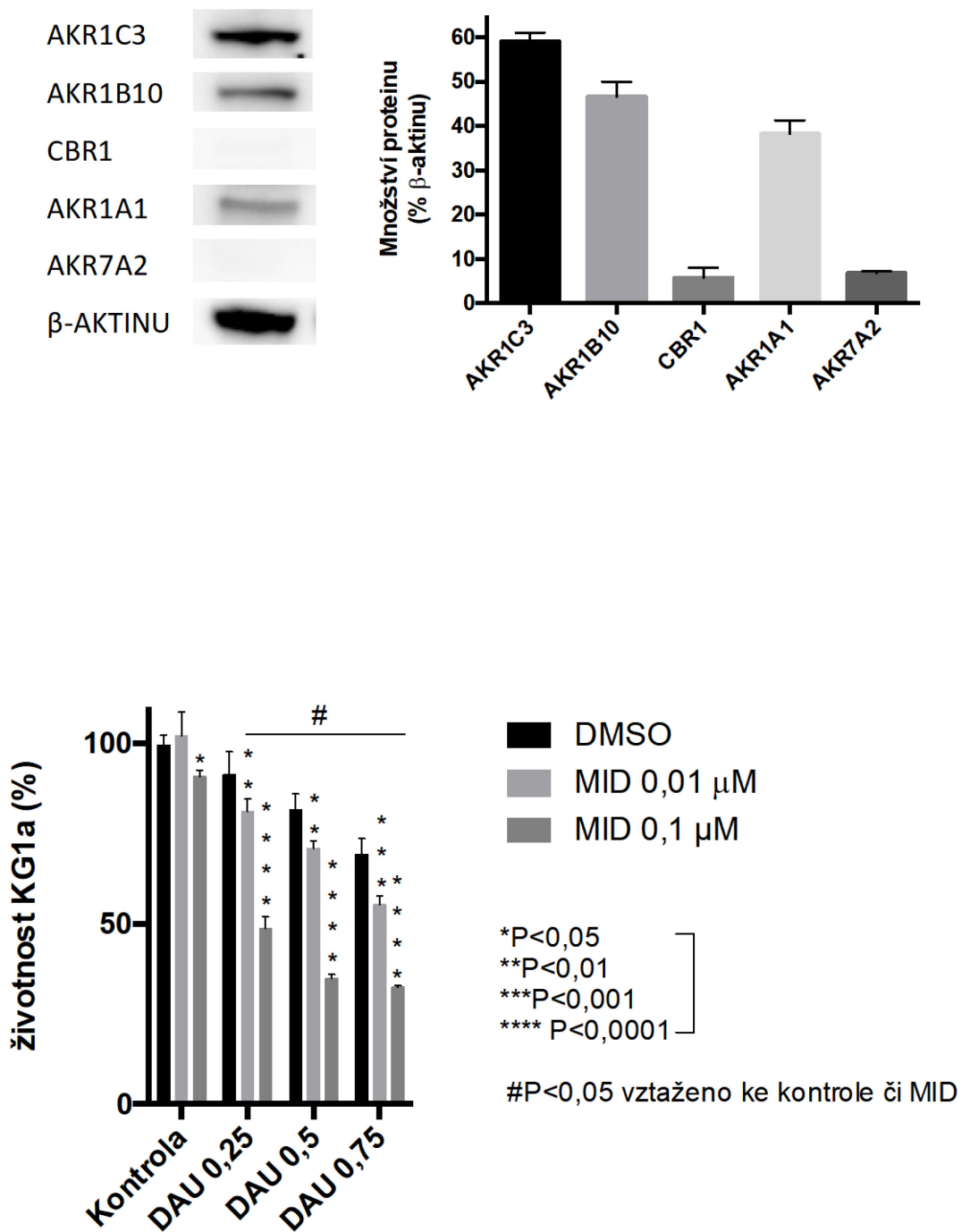
Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že hodnota IC_{50} sa zvyšuje, so zvyšujúcou sa koncentráciou enzýmu v reakcii. Na základe tohto experimentu sme zistili, že sa jedná o tight-binding inhibitor. V grafe na obrázku 20 je znázornená závislosť IC_{50} na koncentrácií AKR1C3.



Obr. 20. Závislosť IC_{50} midostaurínu na koncentrácií AKR1C3.

5.2.5. Test životnosti bunkovej línie KG1a

K tomuto experimentu boli použité bunky AML inkubované s midostaurínom v koncentráciách 0,01 μM a 0,1 μM v kombinácií s daunorubicínom v 0 μM (kontrola), 0,25 μM , 0,5 μM a 0,75 μM . Sledovala sa expresia jednotlivých AKR enzýmov a cytotoxický účinok samotného daunorubicínu, samotného midostaurínu a ich kombinácií pri rôznych koncentráciách. Na obrázku 21 sa nachádzajú výsledky cytotoxického testu a hladina expresie AKR proteínov v KG1a bunkovej línií.



Obr. 21. Výsledné hodnoty exprese jednotlivých proteínov (hore) a percentuálne vyjadrenie cytotoxického testu (dole). #P = hodnota, používaná na štatistické testovanie hypotéz.

Podľa získaných výsledkov môžeme usudzovať, že cytotoxický efekt daunorubicínu je väčší v prítomnosti koncentrovanejšieho (0,1 μ M) midostaurínu. Silnejší cytotoxický efekt je spôsobený pravdepodobne inhibíciou AKR1C3. V bunke tak prebieha menšia detoxifikácia daunorubicínu na menej účinný daunorubicinol a tým pádom je cytotoxický efekt silnejší. Bunky neprodukujú iba AKR1C3, ale aj v relatívne vysokom množstve AKR1B10 a AKR1A1. V našom prípade midostaurín inhibuje AKR1B10 len veľmi málo, takže nám neinterferoval s výsledkami. AKR1A1 sa v bunke nachádza v menšom množstve a midostaurín inhibuje AKR1A1 len 17,5 % pri koncentrácií 10 μ M, čo zďaleka presahuje nami použité množstvo. Enzýmy CBR1 a AKR7A2 sú v bunke exprimované len minimálne a ich účasť na metabolizme daunorubicínu je v tomto prípade zanedbateľná.

Autori v štúdií od Hofmana et. al. v roku 2014 testovali expresiu AKR1C3 na 4 nádorových bunkových líniiach (HCT 116, MCF7, HeLa a A549). HeLa a A549 bunky produkovali zvýšené množstvo AKR1C3, ktoré prekročilo pomer AKR1C3/ β -actin o 1,4 pri HeLa a 4,5 pri A549. Aj touto štúdiou sa potvrdila teória, že expresia CRE býva indukovaná pri niektorých nádorových ochoreniach.

V tej istej štúdií autori testovali indukciu endogénneho levelu AKR1C3 po liečbe antracyklínmi. Najväčšia miera indukcie sa zaznamenala pri bunkovej línii HCT 116. Počas 24 hodinového pôsobenia daunorubicínu vzrástla expresia AKR1C3 približne 10-násobne, naopak v bunkách s vysokou endogénnou expresiou AKR1C3 (HeLa a A549) sa indukcia nezaznamenala (Hofman et. al., 2014).

6. Záver

V teoretickej časti práce sme najskôr popisovali karbonyl redukujúce enzýmy, potom antracyklíny, ich mechanizmus účinku, metabolizmus a toxicitu. Boli predstavené mechanizmy vzniku liekovej rezistencie a aj niektoré možnosti jej ovplyvnenia.

Zo screeningu sme potvrdili, že najvyššiu aktivitu na redukcii antracyklínov majú CBR1, AKR1A1 a AKR1C3. U enzýmov AKR1B1, CBR3, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 bola aktivita *in vitro* veľmi nízka.

Pri testovaní inhibície s midostaurínom bolo zistené, že najviac inhibovaný enzým bol AKR1C3. Pri koncentracii 50 μ M bola inhibícia viac ako 85 %. Ostatné enzýmy ním boli inhibované menej. CBR1 do 33 %, AKR1A1 do 28 %. AKR1B10 bol inhibovaný veľmi málo (6 %) a u AKR7A2 sme zaznamenali skôr aktiváciu ako inhibíciu. Môže sa jednať o fenomén, ktorý zatiaľ nepoznáme, ale pravdepodobne to bolo spôsobené odchýlkami pri meraní.

Vistusertib bol najúčinnjší tiež voči AKR1C3, kde dosiahol inhibíciu 75 % pri 50 μ M. CBR1 bola inhibovaná na 52 % pri 50 μ M. AKR1B10 do 38 % (50 μ M) a AKR1A1 do 10 % (50 μ M). Pre AKR7A2 bol vistusertib najsilnejší spomedzi inhibítorov s 27 % inhibíciou pri 50 μ M.

Talazoparib najsilnejšie inhiboval AKR1C3 (50 % pri 50 μ M), ďalej AKR1A1 (22 % pri 50 μ M), CBR1 (20% pri 50 μ M) a AKR1B10 (19 % pri 50 μ M). U AKR7A2 bol talazoparib rovnako ako midostaurín neúčinný (2 % pri 50 μ M).

Na testovanie polovičnej inhibičnej koncentrácie (IC_{50}) sme vybrali AKR1C3 s midostaurínom, pretože midostaurín sa ukázal ako najaktívnejší voči AKR1C3. Podľa výsledkov sme zistili a potvrdili, že sa jedná o tight-binding inhibitor, lebo so zvyšujúcou sa koncentráciou enzýmu rástla aj IC_{50} .

Z experimentov na bunkových línách sme zistili, že cytotoxický efekt daunorubicínu je silnejší v bunkách s prítomnosťou midostaurínu. Inhibícia AKR1C3 midostaurínom pravdepodobne zvyšuje účinnosť daunorubicínu, kvôli jeho nižšej degradácii karbonyl redukujúcim enzýmom. Z midostaurínu, ale aj ďalších

nízkomolekulárnych inhibítorov robí práve inhibícia CRE sľubných kandidátov na doplnkové liečivá pre zefektívňovanie klasickej chemoterapie cytotoxickými látkami, ako sú napríklad antracyklíny, deriváty platiny, alkylačné látky a iné. Potvrdili sme to aj na úrovni bunkových línií v prítomnosti daunorubicínu.

Na záver môžem konštatovať, že ciele diplomovej práce sme splnili a prinajmenšom priniesli dáta o inhibícií enzýmov zo skupiny AKR a SDR novými potencionálnymi inhibítormi.

7. Zoznam skratiek

11 β -HSD1 – 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typ 1

ABC – ATP-binding cassette transporter

ADH – alkoholdehydrogenáza

AGE – produkty pokročilej glykácie (advanced glycation end products)

AKR – aldo-keto reduktázy

AML – akútna myeloidná leukémia

APS – peroxodisíran amónny

ATP – adenosín trifosfát

AZA – 5-azatidín

BCL-2 – b-cell lymphoma 2 protein

BCR-ABL – philadelphský chromozóm

BMN-673 – talazoparib

BRCA – breast cancer susceptibility protein

BSE – bovine serum albumin

CBR – karbonylreduktáza

CD – diferenciačný znak na povrchu buniek (cluster of differentiation)

CML – chronická myeloidná leukémia

CRE – karbonyl redukujúce enzýmy

CYP – cytochróm p

DAC – 2'-deoxy-5-azacitidín

DAU – daunorubicín

DAUNOL – daunorubicinol

DDR – odpoveď na poškodenie DNA (DNA damage response)

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DNMT3A – DNA (cytosine-5)-metyltransferáza 3A

DNMT3B – DNA (cytosine-5)-metyltransferáza 3B

DOX – doxorubicín

DOXOL – doxorubicinol

DSB – dvojreťazcové zlomy (double-strand breaks)

EGF – epidermálny rastový faktor (epidermal growth factor)

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

EMT – epithelial-mesenchymal transition

FAF UK – farmaceutická fakulta univerzity karlovy

FDA – organizácia na kontrolu kvality a bezpečnosti liečiv a potravín (Food and Drug Administration)

FES – typ tyrozín kinázového proteínu (feline sarcoma oncogene)

FLT3 – tyrozín kináza typ 3 (fms-like tyrosine kinase 3)

GABA – kyselina γ -aminomaslová

GFP – zelený fluorescenčný proteín (green fluorescence protein)

GHB – γ -hydroxybutyrát

HER2 – tyrozín kinázový receptor

HNE – 4-Hydroxynonenal

IC₅₀ – stredná hodnota inhibície

ICF – Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies syndrome

kb – kilo báza

kDa – kilodalton

KDR – typ tyrozín kinázového receptora (kinase insert domain receptor)

KIT – protoonkogén (mast/stem cell growth factor receptor)

lncRNA – dlhé nekódujúce RNA

MDR – mnohočetná lieková rezistencia alebo dehydrogenázy/reduktázy so stredne dlhým reťazcom

miRNA – mikro RNA

mRNA – mediátorova RNA

MRP1 – multidrug resistance-associated protein 1

mTOR – serín/threonínová kináza (mammalian target of rapamycin)

NADPH – nikotínamid dinukleotidfosfát

NNK – 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

PARP – poly (ADP-ribóza) polymeráza

PDGF – doštičkový rastový faktor (platelet derived growth factor)

PDGFR – receptor pre doštičkový faktor (platelet-derived growth factor receptor)

PKC – proteín kináza C

PKC412 – midostaurín

PTEN – typ tumor-supresorového génu

PTFE – polytetrafluoroetylén

PVDF – polyvinylidén fluorid

QOR – chinónreduktáza

RISC – RNA-induced silencing complex

RNA – ribonukleáza kyselina

ROS – reaktívne kyslíkové elementy (reactive oxygen species)

SDR – dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom

SDS – sodium-dodecyl sulfát

SSB – jednoreťazové zlomy (single-strand breaks)

TEMED – tetramethylethylenediamine

TWEEN 80 – polysorbát 80

UHPLC – vysoko účinná kvapalinová chromatografia (ultra-high performance chromatography)

UV – ultrafialový

VEGF – vaskulárny endoteliálny faktor (vascular endothelial growth factor)

8. Zoznam literatúry

- Alisi, A., Cho, W. C., Locatelli, F., & Fruci, D. (2013). *Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24706-24725.
- Anzenbacher, P., & Zanger, U. M. (2012). *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Weinheim, Nemecko: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Aoyagi-Scharber, M., Gardberg, A. S., Yip, B. K., Wang, B., Shen, Y., & Fitzpatrick, P. A. (2014). *Structural basis for the inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 by BMN 673, a potent inhibitor derived from dihydropyridophthalazinone*. *Structural Biology Communications*, 70(9), 1143-1149.
- Arora, A., & Scholar, E. M. (2005). *Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy*. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315(3), 971-979.
- Ax, W., Soldan, M., Koch, L., & Maser, E. (2000). *Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction*. *Biochemical Pharmacology*, 59(3), 293-300.
- Bains, O. S., Grigliatti, T. A., Reid, R. E., & Riggs, W. K. (2010). *Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin*. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 335(3), 533-45.
- Barski, O., Tipparaju, S., & Bhatnagar, A. (2008). *The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification*. *Drug Metabolism Reviews*, 4(40), 553-624.
- Basu, B., Dean, E., Puglisi, M., Greystoke, A., Ong, M., Burke, W., Banerji, U. (2015). *First-in-human pharmacokinetics and pharmacodynamic study of the dual m-torc 1/2 inhibitor AZD2014*. *Cancer Therapy: Clinical Cancer Research*, 21(15), 3412-3419.

- Beretta, G. L., & Zunino, F. (2007). *Molecular mechanisms of antracycline activity*. Topics in Current Chemistry, 283, 1-19.
- Dean, M. (2009). *ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 14(1), 3-9.
- Drug Bank [online]. <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00694>> [cit. 11/2018].
- Estonius, M., Svensson, S., & Höög, J. O. (1996). *Alcohol dehydrogenase in human tissues: localisation of transcripts coding for five classes of the enzyme*. FEBS Letters, 397, 338-342.
- FDA midostaurin [online]. <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/207997s000lbl.pdf> [cit. 11/2018].
- FDA talazoparib [online]. <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/211651s000lbl.pdf>; <<https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm623540.htm>> [cit. 25.12.2018].
- Fischer, T., Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Galinsky, I., Estey, E., Lanza, C., Giles, F. J. (2010). *Phase IIb trial of oral midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3*. Journal of Clinical Oncology, 28(28), 4339-4345.
- Gallogly, M. M., Lazarus, H. M., & Cooper, B. W. (2017). *Midostaurin: a novel therapeutic agent for patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis*. Therapeutic Advances in Hematology, 8(9), 245-261.
- Gescher, A. (1998). *Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs?* General Pharmacology, 31(5), 721-728.
- Gonzales-Covarrubias, V., Zhang, J., Kalabus, J. L., Reilling, M. V., & Blanco, J. G. (2009). *Pharmacogenetics of human carbonyl reductase 1 (CBR1) in livers from black and white donors*. Drug Metabolism and Disposition, 37(2), 400-407.

- Gotlib, J., Kluin-Nelemans, H. C., George, T. I., Akin, C., Sotlar, K., Hermine, O., Reiter, A. (2016). *Efficacy and safety of midostaurin in advanced systemic mastocytosis*. *The New England journal of medicine*, 374(26), 2530-2541.
- Guichard, S. M., Curwen, J., Bihani, T., Cruz, C. M., Yates, J. W., Grondine, M., Cosulich, S. C. (2015). *AZD2014, an inhibitor of MTORC1 and MTORC2, is highly effective in er+ breast cancer when administered using intermittent or continuous schedules*. *Small Molecule Therapeutics*, 14(11), 1-11.
- Hasan, S., Taha, R., & Omri, H. E. (2018). *Current opinions on chemoresistance: an overview*. *Biomedical Informatics*, 14(02), 80-85.
- Hedlund, J., Jornvall, H., & Persson, B. (2010). *Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement*. *BMC Bioinformatics*, 11, 1-16.
- Hoffmann, F., & Maser, E. (2007). *Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily*. *Drug Metabolism Reviews*, 39(1), 87-144.
- Hofman, J., Malcekova, B., Skarka, A., Novotna, E., & Wsol, V. (2014). *Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: The role of aldo-keto reductase IC3*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3), 238-248.
- Hofman, J., Skarka, A., Havranková, J., & Wsol, V. (2015). *Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases*. *Biochemical Pharmacology*, 96(3), 168-178.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). *Drug resistance in cancer: an overview*. *Open Access Cancers*, 6(3), 1769-1792.
- Hunsa, S. M., Tan, H.-T. T., Mohamud, R., Polk, A. D., & Wong, K. K. (2018). *Inhibitors targeting CDK4/6, PARP and PI3K in breast cancer: a review*. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 1-21.

- Jhanwar-Uniyal, M., Amin, A. G., Cooper, J. B., Das, K., Schmidt, M. H., & Murali, R. (2017). *Discrete signaling mechanisms of mTOR1 and mTOR2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects*. *Advances in Biological Regulation*, 64, 39-48.
- Jörnvall, H., Landreh, M., & Östberg, L. J. (2015). *Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era*. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 75-79.
- Kaiserová, H., Šimůnek, T., Štěřba, M., Gertjan, J. d., Schroterová, L., Popelová, O., Bast, A. (2007). *New iron chelators in antracycline-induced cardiotoxicity*. *Cardiovascular Toxicology*, 7, 145-150.
- Kassner, N., Huse, K., Martin, H. J., Armbrust, U. G., Metzger, A., Meineke, I., Wojnowski, L. (2008). *Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver*. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(10), 2113-2120.
- Katzung. (2012). In B. G. Katzung, S. B. Masters, & A. J. Trevor, *Basic & Clinical Pharmacology* (12 ed., pp. 953-968). San Francisco, United States: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Katzung, B. G. (2006). *Základní a klinická farmakologie*. San Francisco: H&H Vyšehradská.
- Klener, P. (1987). *Chemoterapie v komplexní léčbě zhoubných nádorů a hemoblastóz*. Praha: Avicenum.
- Knoll, M., & Pleiss, J. (2008). *The medium-chain dehydrogenase/reductase engineering database: a systematic analysis of a diverse protein family to understand sequence-structure-function relationship*. *Protein Science*, 17(10), 1689-1697.
- Krozowski, Z. (1999). *The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151(1-2), 121-127.
- Laffin, B., & Petrash, M. J. (2012). *Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers*. *Frontiers in pharmacology*, 3, 104.

- Langdon, S., Hughes, A., Taylor, M. A., Kuczynski, E. A., Mele, D. A., Delpuech, O., Sinclair, C. (2018). *Combination of dual mTORC1/2 inhibition and immune-checkpoint blockade potentiates anti-tumour immunity*. *OncoImmunology*, 7(1), 1-25.
- Laurent, G., & Jaffrézou, J.-P. (2001). *Signaling pathways activated by daunorubicin*. *Blood*, 98(4), 913-924.
- Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). *Rapamycin: One Drug, Many Effects*. *Cell Metabolism Perspective*, 19(3), 373-379.
- Litton, J. K., Rugo, H. S., Ettl, J., Hurvitz, S. A., Goncalves, A., Lee, K.-H., Blum, J. L. (2018). *Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation*. *The New England Journal of Medicine*, 379(8), 753-763.
- Malátková, P., Maser, E., & Wsol, V. (2010). *Human carbonyl reductases*. *Current Drug Metabolism*, 11(8), 639-658.
- Martin, H. J., Breyer-Pfaff, U., Wsol, V., Venz, S., Block, S., & Maser, E. (2005). *Purification and characterization of AKR1B10 from human liver: Role in carbonyl reduction of xenobiotics*. *Drug metabolism and disposition*, 34(3), 464-470.
- Maser, E. (1995). *Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction*. *Biochemical Pharmacology*, 49(4), 421-440.
- Matsunaga, T., Shintani, S., & Hara, A. (2006). *Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds*. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21(1), 1-18.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, C., & Gianni, L. (2004). *Antracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229.
- Murai, J., Huang, S.-y. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshov, J. H., Pommier, Y. (2012). *Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors*. *Therapeutics, Targets, and Chemical Biology*, 72(21), 5588-5599.

- Östberg, L., Persson, B., & Höög, J. O. (2016). *Computational studies of human class V alcohol dehydrogenase - the odd sibling*. BMC Biochemistry, 17(1), 1-9.
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). *The role of microRNAs in human cancer*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 1, 15004.
- Penning, T. M. (2015). *The aldo-keto reductases (AKRs): Overview*. Chemico-Biological Interactions, 234, 236-246.
- Persson, B., & Kallberg, Y. (2013). *Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)*. Chemico-Biological Interactions, 202(1-3), 111-115.
- Pike, K. G., Malagu, K., Hummersone, M. G., Menear, K. A., Duggan, H. M., Gomez, S., Pass, M. (2013). *Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: The discovery of AZD8055 and AZD2014*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23(5), 1212-1216.
- Pilka, E. S., Niesen, F. H., Lee, W. H., El-Hawari, Y., Dunford, J. E., Kochan, G., Oppermann, U. (2009). *Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases*. PLoS ONE, 4(10).
- Pleyer, L., & Greil, R. (2015). *Digging deep into "dirty" drugs - modulation of the methylation machinery*. Drug Metabolism Reviews, 47(2), 252-279.
- Razis, A. F., Konsue, N., & Ioannides, C. (2018). *Isothiocyanates and Xenobiotic Detoxification*. Molecular Nutrition Food Research, 62(18):1700916.
- Reddy, K. B. (2015). *MicroRNA (miRNA) in cancer*. Cancer cell international, 15(1), 38.
- Rosemond, C. M., & Walsh, J. S. (2004). *Human Carbonyl Reduction Pathways and a Strategy for Their Study In Vitro*. Drug Metabolism Reviews, 36(2), 335-361.
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). *Epigenetics in Cancer*. Carcinogenesis, 31(1), 27-36.
- Skarka, A., Škarydová, L., Štambergová, H., & Wsól, V. (2011). *Antracyklines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new*

microsomal carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 66-74.

Tangutoori, S., Baldwin, P., & Sridhar, S. (2015). *PARP inhibitors: A new era of targeted therapy*. *Maturitas*, 81(1), 5-9.

TCDB [online]. <<http://www.tcdb.org>> [cit. 01/2019].

Thompson, C., Freitas, L., & Salzano, F. (2018). *Molecular evolution and functional divergence of alcohol dehydrogenases in animals, fungi and plants*. *Genetics and Molecular Biology*, 41(1), 341-354.

Traxler, P., Bold, G., Buchdunger, E., Caravatti, G., Furet, P., Manley, P., Zimmermann, J. (2001). *Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials*. *Medicinal Research Reviews*, 21(6), 499-512.

Uetrecht, J. P., & Trager, W. (2007). *Drug metabolism: chemical and enzymatic aspects*. New York: Informa Healthcare.

Uniprot [online]. <<https://www.uniprot.org>> [cit. 2019].

Valent, P., Akin, C., Hartmann, K., George, T. I., Sotlar, K., Peter, B., Gotlib, J. (2017). *Midostaurin: a magic bullet that blocks mast cell expansion and activation*. *Annals of Oncology*, 28(10), 2367-2376.

Wirth, H., & Wermuth, B. (1992). *Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 40(12), 1857-1863.

Zaytseva, Y. Y., Valentino, J. D., Gulhati, P., & Evers, M. B. (2012). *mTOR inhibitors in cancer therapy*. *Cancer Letters*, 319(1), 1-7.