

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**VLIV AKALABRUTINIBU A IBRUTINIBU NA ÚČINEK  
DAUNORUBICINU V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH**

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.  
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Bc. Lucie Čermáková

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

V Hradci Králové, dne

Bc. Lucie Čermáková

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce paní RNDr. Evě Novotné, Ph.D. za ochotu, cenné rady poskytnuté při konzultacích, trpělivé a odborné vedení při zpracování této diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Anselmu Morell García, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas při práci v laboratoři.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Lucie Čermáková

Školitel: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv akalabrutinibu a ibrutinibu na účinek daunorubicinu v nádorových buňkách

Leukémie představují maligní onemocnění krvev tvorby, jehož podstatou je maligní transformace hematopoetické kmenové buňky na různém stupni vyžívání a zvýšená proliferační aktivita. Zlatým standardem v léčbě leukémií je chemoterapie. Jedním z mnoha léčebných postupů je využití antracyklinových chemoterapeutik, především daunorubicinu (DAU). V klinické praxi jsou antracykliny hojně využívány, avšak mají vysoké kardiotoxické účinky, které omezují jejich dávkování. Jednou z hlavních příčin vzniku nežádoucích účinků je redukce antracyklinového chemoterapeutika na příslušný toxický metabolit, který se hromadí v srdci. Do této redukce jsou zapojeny karbonylredukující enzymy z nadrodiu aldo-ketoreduktáz (AKR) a dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR). Zároveň bylo prokázáno, že karbonylredukující enzymy jsou zapojeny do mechanismů způsobujících rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům, čímž dochází ke snížení inhibice růstu těchto buněk.

V rámci diplomové práce jsme zjistili, že vybrané inhibitory tyrosinkináz (akalabrutinib, ibrutinib) inhibují aktivitu enzymu AKR1C3 na buněčné úrovni. Pro stanovení inhibičního účinku jsme zvolili buněčnou linii HCT116 přechodně transfekovanou plazmidem kódujícím enzym AKR1C3. Výsledky prokázaly schopnost akalabrutinibu a ibrutinibu inhibovat AKR1C3 a tím redukcii DAU na daunorubicinol. Dále jsme stanovovali vliv kombinace DAU s akalabrutinibem a ibrutinibem na buněčnou linii KG1 $\alpha$  s přirozenou expresí AKR1C3. Z výsledků vyplývá, že kombinace DAU s ibrutinibem snižuje viabilitu KG1 $\alpha$  více než samotný DAU nebo ibrutinib. Tato skutečnost naznačuje, že schopnost ibrutinibu inhibovat redukcii DAU lze využít ke zvýšení terapeutického účinku DAU a zároveň snížení vzniku nežádoucích účinků DAU. U akalabrutinibu jsme neprokázali významný vliv na viabilitu KG1 $\alpha$  buněčné linie.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Lucie Čermáková

Supervisor: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of acalabrutinib and ibrutinib on the efficacy of daunorubicin in cancer cells

Leukemia presents malignant diseases of hematopoiesis, which essence is the malignant transformation of a hematopoietic stem cell at various levels of maturation and increased proliferative activity. Chemotherapy is the gold standard in the treatment of leukemia. One of the many treatments is the use of anthracycline chemotherapeutics, especially daunorubicin (DAU). Anthracyclines are widely used in clinical practice but have high cardiotoxic effects that limit their dosage. One of the main causes of side effects is the reduction of an anthracycline chemotherapeutic to the appropriate toxic metabolite, which accumulates in the heart. Carbonyl, reducing enzymes from the superfamily aldo-ketoreductase (AKR), and short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) are involved in this reduction. At the same time, carbonyl reducing enzymes, has been shown to be involved in the mechanisms that cause tumor cells to be resistant to anthracyclines, thereby reducing the inhibition of the growth of these cells.

In the diploma thesis we found that selected tyrosine kinase inhibitors (acalabrutinib, ibrutinib) inhibit the activity of the enzyme AKR1C3 at the cellular level. To determine the inhibitory effect, we selected the HCT116 cell line transiently transfected with a plasmid encoding the AKR1C3 enzyme. The results demonstrated the ability of acalabrutinib and ibrutinib to inhibit AKR1C3 and thus reduce DAU to daunorubicinol. We further determined the effect of the combination of DAU with acalabrutinib and ibrutinib on the KG1 $\alpha$  cell line with natural AKR1C3 expression. The results show that the combination of DAU with ibrutinib reduces the viability of KG1 $\alpha$  more than DAU or ibrutinib alone. This suggests that the ability of ibrutinib to inhibit DAU reduction can be used to increase the therapeutic effect of DAU while reducing the incidence of DAU side effects. We did not show a significant effect on the viability of the KG1 $\alpha$  cell line with acalabrutinib.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	LEUKEMIE .....	10
2.1.1	Akutní leukémie .....	10
2.1.1.1	Akutní myeloidní leukémie.....	11
2.1.1.2	Akutní lymfoblastická leukemie .....	15
2.1.2	Chronická leukémie.....	19
2.1.2.1	Chronická myeloidní leukémie .....	19
2.1.2.2	Chronická B-lymfocytární leukémie.....	20
2.1.2.3	Vlasatobuněčná leukémie.....	21
2.1.2.4	Prolymfocytární leukémie .....	21
2.2	KARBONYLREDUKUJÍCÍ ENZYMY .....	22
2.2.1	Aldo-ketoreduktázy (AKR).....	24
2.2.1.1	AKR1A1 ( <i>aldehydreduktáza</i> ).....	25
2.2.1.2	AKR1B1 ( <i>aldózareduktáza</i> ).....	26
2.2.1.3	AKR1B10 ( <i>aldózareduktáza tenkého střeva</i> ).....	26
2.2.1.4	AKR1C1-1C4 ( <i>hydroxysteroiddehydrogenázy</i> ).....	27
2.2.1.5	AKR7A2 ( <i>aflatoxinreduktáza</i> ).....	28
2.2.2	Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR).....	29
2.2.2.1	CBR1 .....	30
2.3	ANTRACYKLINOVÁ CHEMOTERAPEUTIKA .....	32
2.3.1	Chemická struktura.....	32
2.3.2	Metabolismus antracyklinů .....	33
2.3.3	Mechanismus účinku.....	35
2.3.4	Kardiotoxicita.....	36
2.4	VYBRANÉ INHIBITORY TYROSINKINÁZ .....	38

2.4.1	Ibrutinib .....	41
2.4.2	Akalabrutinib .....	42
3	CÍL PRÁCE .....	44
4	MATERIÁL A METODIKA .....	45
4.1	MATERIÁL .....	45
4.1.1	Chemikálie a reagenty .....	45
4.1.2	Inhibitory .....	45
4.1.3	Buněčné linie .....	46
4.1.4	Pomůcky a přístroje .....	46
4.2	METODIKA .....	48
4.2.1	Experimenty na buněčné linii HCT116 .....	48
4.2.1.1	Kultivace .....	48
4.2.1.2	Pasážování .....	48
4.2.1.3	Transfekce .....	49
4.2.1.4	Příprava inhibitorů .....	50
4.2.1.5	Proces inkubace .....	50
4.2.1.6	Příprava vzorku na UHPLC .....	51
4.2.1.7	Analýza pomocí UHPLC .....	51
4.2.2	Experimenty na buněčné linii KG1 $\alpha$ .....	52
4.2.2.1	Kultivace .....	52
4.2.2.2	Pasážování .....	52
4.2.2.3	Test cytotoxicity na buněčné linii KG1 $\alpha$ .....	52
5	VÝSLEDKY .....	56
5.1	Vliv akalabrutinibu a ibrutinibu na redukci daunorubicinu u buněčné linie HCT116 exprimující AKR1C3 .....	56
5.2	Stanovení vlivu daunorubicinu, akalabrutinibu a ibrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ .....	58
5.2.1	Daunorubicin .....	58

5.2.2	Akalabrutinib.....	59
5.2.3	Ibrutinib.....	60
5.3	Kombinační studie .....	62
5.3.1	Akalabrutinib.....	62
5.3.2	Ibrutinib.....	65
6	DISKUZE .....	67
7	ZÁVĚR.....	71
8	SEZNAM ZKRATEK .....	72
9	ZDROJE .....	75
10	INTERNETOVÉ ZDROJE .....	87



# 1 ÚVOD

Maligní onemocnění představují jeden z hlavních problémů současné medicíny. Z hlediska epidemiologie patří Česká republika mezi nejzatíženější státy Evropy i světa. Nejčastěji pozorujeme zhoubné novotvary v zažívacím traktu, plicích, dále karcinomy prsu u žen a karcinomy prostaty u mužů (Krška et al., 2014). Stoupající trend v incidenci maligních onemocnění vyžaduje neustálý pokrok v diagnostice i léčbě.

Leukémie představují maligní onemocnění krvevotvorby, jehož podstatou je maligní transformace hematopoetické kmenové buňky na různém stupni vyžívání a dále zvýšená proliferativní aktivita nově vzniklých patologických buněk. Tvoří se více leukemických buněk, než jich zaniká a dochází tak k jejich nadměrnému hromadění. Narůstající počet leukemických buněk způsobuje narušení a potlačení normální krvevotvorby.

Základem léčby hematologických maligních onemocnění je chemoterapie. Jedním z mnoha léčebných postupů je využití antracyklinových chemoterapeutik. Předpokládá se, že antracykliny inhibují proliferaci rychle se dělících buněk. V klinické praxi jsou antracyklinová chemoterapeutika hojně využívána, avšak mechanismus účinku má přímou souvislost s jejich nežádoucími účinky, které omezují jejich dávkování. Na vzniku nežádoucích účinků se podílí přítomné karbonylredukující enzymy, které metabolizují antracykliny na jejich příslušné metabolity. Obecně se tato reakce považuje za inaktivační nebo detoxikační krok, protože výsledný alkohol se snadněji eliminuje z organismu. Avšak některá léčiva se po redukci stávají více toxickými pro organismus.

V protinádorové terapii často vzniká na chemoterapeutická léčiva rezistence. Vlivem výše zmíněných karbonylredukujících enzymů dochází k redukci antracyklinů na alkoholy, které jsou významně méně účinné v inhibici růstu nádorových buněk. Jednou z možností ke zvýšení účinku antracyklinových chemoterapeutik a zároveň snížení jejich kardiotoxických účinků je využití inhibitorů antracyklinreduktáz. Některé nedávné studie poukázaly na schopnost inhibitorů tyrosinkináz inhibovat karbonylredukující enzymy podílející se na přeměně antracyklinových chemoterapeutik na jejich sekundární alkoholy. Jako příklad lze uvést buparlisib, u kterého bylo prokázáno, že inhibuje také enzym AKR1C3 (Bukum et al., 2019).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit potenciální inhibiční účinek vybraných inhibitorů tyrosinkináz (akalabrutinib, ibrutinib) na aktivitu karbonylredukujícího enzymu AKR1C3 na buněčné úrovni a dále stanovit účinek antracyklinového chemoterapeutika daunorubicinu v kombinaci s těmito inhibitory.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 LEUKEMIE

Leukémie představuje maligní onemocnění krvetvorby. Podstatou maligní transformace je chromozomální aberace hematopoetické kmenové buňky na různém stupni vyžívání a dále zvýšená proliferační aktivita nově vzniklých patologických buněk. Tento defekt se dále přenáší do dalších buněčných generací (Pecka 2006, Šafránková & Nejedlá 2006).

Onemocnění vzniká přestavbou DNA. Vlivem této změny dochází k přeměně genu. Takto změněný gen je zodpovědný za přeměnu buňky. K maligní transformaci může dojít na jakékoliv úrovni zralosti buněčné populace nejčastěji z neznámé příčiny. Z hematopoetické kmenové buňky, která je společná všem budoucím buněčným populacím, vznikají další dvě základní populace:

- a) myeloidní, která dává vznik granulocytům, erytrocytům a trombocytům
- b) lymfocytární, která dává vznik lymfocytům (Pecka 2006, Šafránková & Nejedlá 2006).

Leukemie se rozděluje do mnoha druhů. Podle buněčné populace, kterou postihují, označujeme leukemie jako myeloidní či lymfoidní. Myeloidní leukemie vycházejí z pluripotentní kmenové buňky, která směřuje vývoj k myeloidní řadě, jejíž konečnými stádii jsou například granulocyty, monocyty, které působí jako obrana proti infekcím. Druhým typem jsou lymfoidní leukemie, které postihují tvorbu lymfocytů. Dále se leukemie dělí podle rychlosti průběhu onemocnění na akutní či chronické. Akutní leukemie jsou charakteristické především maturační a diferenciační poruchou, dochází k akumulaci nezralých hematopoetických buněk v kostní dřeni. Mají rychlý průběh a neléčeny vedou velmi rychle ke smrti nemocného. Chronická leukemie postupuje pomaleji a umožňuje produkci vyvíjejících forem prekurzorových buněk, avšak tyto buňky nejsou schopny plnit svou funkci správně (Alsalem et al. 2018, Penka & Tesařová 2011).

#### 2.1.1 Akutní leukemie

Akutní leukemie představují značně heterogenní skupinu maligních onemocnění krvetvorby. U pacienta pak existují v organismu dvě buněčné populace. Jedna vychází

ze zdravých kmenových buněk a druhá z leukemických, které vznikly maligní transformací normálních kmenových buněk. Tato maligní transformace se nazývá *blastický zvrát*, neboť obvykle převažují nezralé buňky označovány jako blasty, a to v kostní dřeni i periferní krvi (Pecka 2006, Šafránková & Nejedlá 2006).

Hlavním defektem je porucha ve vyzrávání, která je způsobena blokádou diferenciací, jejíž příčina není dosud objasněna. Pravděpodobně zde hrají roli faktory zevního prostředí (ionizující záření, chemikálie, cytostatika či viry). V rámci hematopoézy dochází ke zvýšené proliferaci. Tvoří se více leukemických buněk, než jich zaniká a dochází tak k jejich nadměrnému hromadění. Narůstající počet leukemických buněk způsobuje narušení a potlačení normální krvetvorby (Pecka, 2006).

Z pohledu dnešních poznatků lze vyčlenit řadu podskupin. K podrobnému dělení akutních leukémií se využívá Francouzsko-Americko-Britská klasifikace (FAB) či klasifikace dle Světové zdravotnické organizace (WHO). FAB klasifikace rozlišuje leukémie na základě vyšetření nátěru periferní krve a kostní dřene pod světelným mikroskopem na sedm různých forem akutní myeloidní leukémie, ale pro klasifikaci akutní lymfoblastové leukémie se nehodí. Pro potvrzení diagnózy akutní leukémie vyžaduje nález alespoň 30 % leukemických blastů. Klasifikace WHO klade důraz především na genetické, molekulárně genetické odchylky a imunofenotypové vlastnosti (Klener 2003, Penka & Tesařová 2011).

### **2.1.1.1 Akutní myeloidní leukémie**

Akutní myeloidní leukémie (AML) představuje maligní onemocnění hematopoézy. Progenitorové buňky ztrácejí schopnost diferenciací na zralé krvinky a mají nekontrolovatelnou proliferaci. Důsledkem tohoto procesu dochází k akumulaci nezralých prekurzorů a selhání krvetvorby s následnou neutropenií, anemií a trombocytopenií. Nediferencované myeloblasty tedy ve velké míře přecházejí do periferní krve, čímž je zvýšen celkový počet leukocytů (Bloomfield et al. 2008, Mayer 2016).

Diagnóza AML podle FAB klasifikace vyžaduje přítomnost  $\geq 30$  % myeloidních blastů v aspirátu kostní dřene nebo v periferní krvi. FAB využívá vyšetření krevního obrazu s mikroskopicky hodnoceným diferenciálním rozpočtem. Identifikace je založena na morfologii a stanovení počtu myeloblastů. Dále se provádí cytochemická vyšetření, která využívají k průkazu specifické chemické reakce. Zahrnují reakce pro průkaz

myeloperoxidázy (MPO), nescifických esteráz (NE), kyselá fosfatázy či PAS (Periodic Acid-Schiff) reakci. Nedílnou součástí diagnostiky je histologické vyšetření sternální punkce kostní dřeně. Avšak FAB klasifikace je dnes již zastaralá a mnoho se nevyužívá. Francouzsko-Americko-Britský systém klasifikoval AML do sedmi subtypů, FAB M0 až M7 (Tab. 1) (Narayanan & Weinberg 2019, Pecka, 2006).

**Tab. 1 FAB klasifikace akutních myeloidních leukémií.** Upraveno dle (Pecka 2006, Penka & Tesařová 2011, Schiffer & Stone 2003).

Typ AML	FAB subtyp	Kritéria pro klasifikaci
AML s minimální diferenciací	M0	Nález $\geq 30\%$ nediferencovaných myeloidních blastů, blasty jsou $< 3\%$ MPO nebo SBB pozitivní, lze nahradit specifickou protilátkou proti MPO, od akutní lymfoblastové leukémie je rozlišena negativitou na lymfoidní markery.
AML bez vyzrání	M1	Nález $\geq 90\%$ blastů a $< 10\%$ promyelocytů, pozitivní reakce na MPO nebo SBB ( $\geq 3\%$ ), některé blasty mohou obsahovat granulaci, ojedinele Auerovy tyče.
AML s vyzráním	M2	Populace vyzrává do promyelocytů ( $\geq 10\%$ ), někdy i vyzrálějších forem, hojný výskyt Auerových tyčí, zřetelnější granulace (často abnormálně), translokace mezi chromozomy 8 a 21 (přibližně 20 % případů).
Akutní promyelocytární leukémie (APL)	M3 / M3v	Typický abnormální počet promyelocytů, atypická velikost a hypergranularita, Auerovy tyče uspořádané do snopců, silná pozitivita na MPO, charakteristická translokace t(15;17) = fúzní gen PML/RARA.
Akutní myelomonocytární leukémie	M4	Nález $\geq 30\%$ blastů, vykazují znaky z obou řad, nález $\geq 20\%$ buněk z monocytární linie, nález $\geq 20\%$ buněk z granulocytární linie, pozitivita na MPO, NE (lze snížit přidáním NaF, pouze u monocytů)

**Tab. 1 Pokračování**

Akutní monoblastická/ monocytární leukémie	M5A málo diferencovaná	Nález > 80 % monoblastů	Výrazná pozitivita NE (blokovatelná NaF), translokace t(9;11), výrazná erytrofagocytóza.
	M5B vyžívající	Nález < 80 % monoblastů	
Akutní erytroleukémie	M6	Převyšuje erytroidní řada, vysoký podíl erytroblastů (≥ 50 %), pozitivní PAS reakce a protilátky proti glykoforinu A, častý nález prstenčitých sideroblastů, negativní MPO, SBB.	
Akutní megakaryoblastická leukémie	M7	Blasty převážně megakaryocytárního původu, pozitivní PAS reakce, negativní MPO a SBB	
MPO = myeloperoxidáza SBB = sudanová čerň B NE = nespecifická esteráza NaF = fluorid sodný PAS = Periodic acid Schiff (reakce s kyselinou jodistou a Schiffovým činidlem)			

V současné době umožňuje podrobnější zařazení AML klasifikační systém WHO z roku 2001, který vychází z klasických cytochemických a imunofenotypických znaků, dále jsou v něm zohledněny cytogenetické a molekulárně biologické znaky. Pro zařazení využívá metod průtokové cytometrické analýzy exprese CD povrchových antigenů, dále polymerázové řetězové reakce, nebo využívá fluorescenční *in situ* hybridizaci k detekci numerických odchylek (Adam et al. 2008, Mayer 2016).

Klasifikace dle WHO také snížila práh pro identifikaci na přítomnost ≥ 20 % myeloidních blastů v aspirátu kostní dřeně nebo v periferní krvi. Diagnóza AML však může být stanovena i při nižších hodnotách, pokud se prokáže přítomnost charakteristických cytogenetických abnormalit (Mayer 2016, Narayanan & Weinberg 2019). Přehled jednotlivých typů AML dle WHO je uveden v Tabulce 2.

**Tab. 2 WHO klasifikace akutních myeloidních leukémií.** Upraveno dle (Bain & Béné 2019, Penka & Tesařová 2011).

<b>Typ AML</b>	<b>Klasifikace</b>
AML s rekurentní genetickou abnormalitou	AML s t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
	AML s inv(16)(p13.1;q22) či t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	APL s t(15;17)(q24.1;q21.2); PML-RARA
	AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); KMT2A-MLLT3
	AML s t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
	AML s inv(3)(q21.3;q26.2) či t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
	AML megakaryoblastická s t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15-MKL1
	AML s t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	AML s mutovaným NPM1
	AML s bílelickými mutacemi CEBPA
	AML s mutovaným RUNX1
AML spojená s myelodysplastickými změnami	vývoj podobný s MDS či MDS/MPN provázená stejnou cytogenetickou abnormitou jako MDS s průkazem multi-lineární dysplazie
Myeloidní neoplazie spojené s léčbou	t-AML
	t-MDS
	t-MDS/MPN
AML jinak neurčené (NOS)	AML s minimální diferenciací
	AML bez vyzrávání
	AML s vyzráváním
	akutní myelomonocytární leukemie
	akutní monoblastická a monocytární leukémie
	akutní erytroidní leukémie
	akutní megakaryoblastická leukemie
	akutní bazofilní leukemie
	akutní panmyelóza s myelofibrózou

**Tab. 2 Pokračování**

myeloidní sarkom	z myeloblastů, myelomonocytární, monoblastický, trilineární, především z erytroblastů či megakaryoblastů
myeloidní proliferace spojené s Downovým syndromem	přechodná abnormální myelopoéza
	myeloidní leukémie spojená s Downovým syndromem
neoplazie z blastických plazmocytoïdních dendritických buněk	
MDS = myelodysplastický syndrom MPN = myeloproliferativní neoplazie t – translokace inv – inverze	

Akutní myeloidní leukémie je jednou z nejčastějších leukémií u dospělé populace. Představuje asi 80 % všech případů. U tohoto onemocnění mají větší převahu muži ve srovnání se ženami. AML se mohou vyskytovat v kterémkoliv věku, avšak jako u většiny onemocnění jejich incidence narůstá s vyšším věkem (Internet 11).

Přestože pokroky v léčbě AML vedly k významnému zlepšení výsledků u mladších pacientů, prognóza u starších pacientů, kteří představují většinu nových případů, zůstává nízká. I při současné léčbě zemře až 70 % pacientů starších 65let. (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016).

### 2.1.1.2 Akutní lymfoblastická leukemie

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) představuje agresivní maligní lymfoproliferativní onemocnění nezralých B nebo T lymfocytů. Řadí se mezi nejrozšířenější nádorové onemocnění v dětském věku (Mayer, 2016).

Onemocnění je charakterizováno nekontrolovatelnou proliferací abnormálních, nezralých lymfocytů a jejich progenitorů. Dochází k narušení krvetvorby a masivní infiltraci především kostní dřeně, jater, sleziny a lymfatických uzlin. Důvodem vzniku splenomegalie je snaha sleziny o odstranění lymfoblastů z krve (Roberts, 2018).

Akutní lymfoblastická leukémie byla rozdělena podle FAB klasifikace na základě morfolgie na podtypy L1, L2 a L3 (Tab. 3). Morfologické a cytochemické vyšetření odlišuje lymfoidní a myeloidní leukemie na základě velikosti buněk, cytoplazmy,

basofilie či pozitivní PAS reakce, která však může být pozitivní i pro AML (Adam et al., 2008).

**Tab. 3 FAB klasifikace ALL.** Upraveno dle (Adam et al. 2008, Internet 1).

<b>Podtypy ALL</b>	<b>Kritéria</b>
ALL - L1	Malé, uniformní blasty s velkým poměrem jádro/cytoplazma, pravidelným jádrem s homogenním jaderným chromatinem, bazofilní cytoplazmou a nenápadným jadérkem (především T-ALL a dětské ALL)
ALL - L2	Heterogenní blasty, různé velikosti, nepravidelný tvar jádra s variabilním jaderným chromatinem, proměnlivé množství cytoplazmy vzhledem k jádru s variabilní bazofilií, jedním nebo více jadérky (především B-ALL)
ALL - L3	Velké, uniformní blasty s pravidelnými jádry a jemným chromatinem, prominentními jadérky a silně bazofilní cytoplazmou, výrazná cytoplazmatická vakuolizace (podobné buňkám Burkittova lymfomu)

Podobně jako u AML se i pro ALL využívá především WHO klasifikace. Pro určení diagnózy zůstávají rozhodující cytogenetické parametry a přítomnost  $\geq 20$  % lymfoidních blastů. Rozřazení jednotlivých typů ALL podle WHO je uvedeno v Tabulce 4.

**Tab. 4 WHO klasifikace ALL.** Upraveno dle (Wenzinger et al., 2018).

<b>B-lymfoblastická leukémie/lymfom</b>	
B-ALL s opakujícími se genetickými abnormalitami	B-ALL s t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	B-ALL s t(v;11q23); <i>KMT2A</i> přestavba [dříve <i>MLL</i> ]
	B-ALL s t(12;21)(p13;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i> [dříve <i>TEL-AML</i> ]
	B-ALL s hyperdiploidii (přítomnost $\geq 50$ chromozomů)
	B-ALL s hypodiploidii (přítomnost $\leq 46$ chromozomů)
	B-ALL s t(15;14)(q31,1;q32,1); <i>IGH / IL3</i>
	B-ALL s t(1;19)(q23;p13,3); <i>TCF3-PBX1</i>



**Tab. 4 Pokračování**

	Prozatímní nová entita: B-ALL, <i>BCR-ABL1-like</i>
	Prozatímní nová entita: B-ALL s <i>iAMP21</i>
B-ALL, jinak neurčené (NOS)	
<b>T-lymfoblastická leukémie/lymfom:</b>	
Prozatímní nová entita: časná T-lymfocytární prekursorová lymfoblastická leukémie	
Prozatímní nová entita: lymfoblastická leukémie/lymfom z NK buněk	

Základní metodou pro stanovení diagnózy je diferenciální rozpočet leukocytů z periferní krve a vyšetření kostní dřeně, které vyžaduje přítomnost  $\geq 20$  % lymfoidních blastů. Za významnou součást je také považována imunofenotypizace průtokovou cytometrií povrchových CD znaků, jenž potvrzuje konečnou diagnózu, umožňuje rozlišit mezi T-ALL a B-ALL a dále rozděluje blasty podle míry vyžívání (Paul et al. 2016, Wenzinger et al. 2018). Zastoupení jednotlivých CD znaků obsahuje Tabulka 5.

**Tab. 5 Imunologická klasifikace ALL.** Upraveno dle (Adam et al. 2008, Wenzinger et al. 2018).

<b>B-ALL</b>	Společné znaky pro všechny B-ALL: <b>CD19+ a/nebo CD79a+ a/nebo CD22+</b>	
B-I	Pro-B	Expresí pouze společných znaků pro B-linie; TdT+
B-II	Common	Navíc CD10+ (CALLA+); TdT+
B-III	Pre-B	Navíc CD10+; cytoplazmatické IgM+; TdT+
B-IV	Mature	Navíc cytoplazmatické nebo povrchové $\kappa$ nebo $\lambda$ ; TdT-
<b>T-ALL</b>	Společné znaky pro všechny T-ALL: <b>cytoplazmatické nebo povrchové CD3+ a téměř vždy CD7+</b>	
T-I	Pro-T	CD4-, CD8-; TdT+
T-II	Pre-T	Navíc CD2+ a/nebo CD5+; CD4-, CD8-; TdT+
T-III	Cortical, Thymic-T	Navíc CD1a+, CD4+, CD8+; TdT+
T-IV	Medullary	Navíc CD4+ a/nebo CD8+, mCD3+; CD1a-; TdT+/-
TdT pomáhá kategorizovat buňky podle zralosti: Pozitivní: nezralé blasty, Negativní: zralé lymfocyty.		

Akutní lymfoblastická leukémie se vyskytuje především u dětí, avšak není výjimkou ani u dospělé populace, kde je spojena se špatnou prognózou. Častěji ji nacházíme u dětí s Downovým syndromem a dalšími genetickými poruchami. Většina případů (až 80 %) vychází z prekurzorů B-lymfocytů (Paul et al., 2016).

Podobně jako při léčbě AML je i zde základem systémová chemoterapie a cílená léčba. V prvních fázích léčby jsou podávány glukokortikoidy (prednison). Následně navazuje indukční terapie, při níž jsou opět podávány glukokortikoidy, spolu s antracyklinovými chemoterapeutiky (daunorubicin). Vzhledem k vysoké intenzitě léčby dochází k řadě toxických komplikací (Mayer, 2016).

## 2.1.2 Chronická leukémie

Chronické leukémie, podobně jako akutní leukémie, představují hematologické maligní onemocnění. I zde ztrácejí buňky svou schopnost diferenciaci a mají větší proliferační aktivitu, avšak na rozdíl od akutních leukémií buňky vyžívají do zralejších stádií bez schopnosti dozrát úplně. Leukemické buňky vypadají jako plně zralé leukocyty, ale nejsou schopny plnit své funkce a žijí déle. Dělí se také jako akutní leukémie, podle typu zmnožených buněk na myeloidní či lymfocytární chronické leukémie (Internet 2).

### 2.1.2.1 Chronická myeloidní leukémie

Chronická myeloidní leukémie (CML) je široce popisované onemocnění vycházející z transformované kmenové pluripotentní hematopoetické buňky. Vyskytuje se většinou u dospělých (tvorí až 20 % všech případů leukémie), u dětí se vyskytuje velmi vzácně (Flis & Chojnacki, 2019).

Charakteristickým znakem leukemických buněk CML je přítomnost tzv. *Filadelfského chromozomu*. Dochází k reciproké translokaci mezi chromozomy 9;22 při níž vzniká fúzní gen BCR/ABL. Takto přestavěný gen produkuje proteiny s tyrozinkinázovou aktivitou, dochází k abnormální aktivaci signálních drah a buňky se stávají nezávislé na přítomnosti růstových faktorů. Vyznačují se zvýšenou proliferační aktivitou, rezistencí vůči apoptóze a genetickou nestabilitou (Flis & Chojnacki, 2019).

Klinický průběh CML má tři fáze: chronická, akcelerovaná a blastická krize (Haferlach et al., 2014). Jednotlivá stadia chronické myeloidní leukémie jsou popsána v následující Tabulce 6.

**Tab. 6 Definice klinických stádií CML podle WHO kritérií.** Upraveno dle (Haferlach et al. 2014, Mayer 2016).

Stadium	Charakteristika
Chronická fáze	<ul style="list-style-type: none"> <li>• leukocytóza se zvýšenou granulopóezou</li> <li>• blastů &lt; 2 % v periferní krvi</li> <li>• bazofilie a eozinofilie</li> <li>• izolovaná Filadelfská translokace t(9;22)/BCR-ABL</li> </ul>
Akcelerace	<ul style="list-style-type: none"> <li>• perzistující nebo zvyšující se leukocytóza (zvětšená slezina)</li> <li>• 10 % - 19 % blastů v periferní krvi</li> <li>• ≥ 20 % bazofilů v periferní krvi</li> <li>• Klonální evoluce (tj. přídatné cytogenetické změny), mutace v BCR-ABL</li> </ul>
Blastická krize	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Podíl blastů ≥ 20 % v periferní krvi</li> <li>• Extramedulární blastická infiltrace</li> </ul>

Cílem léčby je prevence progresu do pokročilejších stádií, snížení rizika úmrtí a prodloužení života pacienta. Základem je co největší snížení počtu leukemických buněk, čehož je docíleno po zavedení inhibitorů tyrozinkináz (Flis & Chojnacki, 2019).

### 2.1.2.2 Chronická B-lymfocytární leukémie

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je lymfoproliferační onemocnění charakterizované klonální proliferací a akumulací zralých B-lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni, slezině a lymfatických uzlinách. Obvykle je diagnostikována u osob starších 50let, častěji u mužů než u žen. Je nejčastější leukémií v rozvinutých zemích (Hallek et al., 2018).

Charakteristický imunofenotyp pro B-CLL je přítomnost povrchových znaků B-lymfocytů CD19, CD20 a typická pozitivita CD5 znaku, který je na fyziologických B-lymfocytech exprimován pouze minoritně (Hallek et al., 2018).

V raných stádiích onemocnění není indikována žádná léčba, pouze aktivní dozor nad pacientem. Důvodem pro indikaci léčby je větší ztráta hmotnosti, progresivní lymfocytóza, anemie či trombocytopenie. Standardní léčbou je chemoimunoterapie často doplněná o léčbu antibiotiky. Pacienti mají vysoké riziko infekčních komplikací, které souvisí s defekty imunity i indikovanou imunosupresivní léčbou (Mayer 2016, Strati et al. 2018).

### 2.1.2.3 Vlasatobuněčná leukémie

Vlasatobuněčná leukémie (HCL, hairy cell leukaemia) je vzácná indolentní malignita z B-lymfocytů spojená s pancytopenií a splenomegálií. Podstatou onemocnění je proliferace zralých, patologicky změněných lymfocytů, které mají charakteristické cytoplazmatické výběžky tzv. *vlasaté buňky* (Roider et al., 2018).

Diagnóza je založena na morfologickém vyšetření a detekci jedinečného imunofenotypu (CD25+, CD103+) pomocí průtokové cytometrie. Dále se využívá sekvenční analýza na přítomnost mutace *BRAFV600E* a cytochemická reakce na přítomnost tartarát-rezistentní kyselé fosfatázy (Mayer, 2016).

Léčbou první volby jsou nukleosidová analoga. Po jejich zavedení bylo dosaženo vysokého počtu dlouhodobých kompletních remisí. Relaps je popisován pouze u 25 % v prvních 5 letech od zahájení léčby (Mayer, 2016).

### 2.1.2.4 Prolymfocytární leukémie

Prolymfocytární leukémie (PLL) jsou zralé lymfoidní malignity B-lymfocytů (B-PLL) nebo T-lymfocytů (T-PLL). Jsou obvykle agresivní s rychlým nástupem příznaků a špatnou prognózou. Častěji se vyskytuje T-PLL, avšak obecně se řadí mezi vzácná onemocnění (Cross & Dearden, 2019).

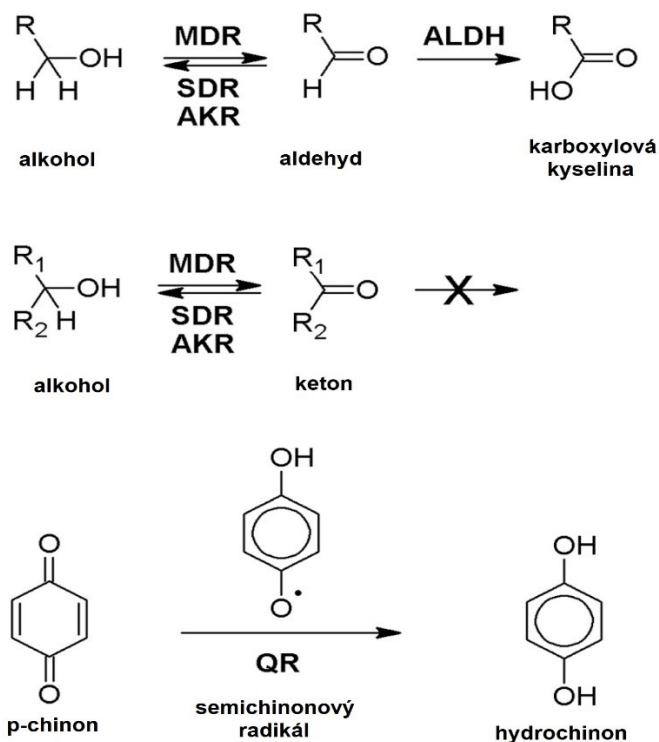
## 2.2 KARBONYLREDUKUJÍCÍ ENZYMY

Xenobiotika neboli látky tělu cizí jsou často vysoce lipofilní sloučeniny. Metabolismus xenobiotik, mezi něž jsou řazeny také léčivé přípravky, obecně vede k biotransformaci a bezpečné eliminaci. Za určitých podmínek však mohou tyto reakce vést k tvorbě reaktivních metabolitů, které jsou toxičtější než původní léčivo (Corsini & Bortolini, 2013).

Biotransformační reakce jsou rozděleny do dvou fází. První fáze biotransformace, označovaná jako konverze, zahrnuje především základní reakce (oxidace, redukce či hydrolytické reakce). Druhá fáze biotransformace zahrnuje především konjugační reakce vzniklých metabolitů s malými endogenními látkami, jejichž funkcí je zvyšovat hydrofilitu a snižovat biologickou aktivitu, čímž je umožněna snadnější eliminace z organismu (Corsini & Bortolini 2013, Skálová 2017).

Během první fáze biotransformace původního léčiva dochází k přidání hydroxylových, karboxylových, amino či thiolových skupin nezbytných pro následnou konjugační reakci, díky níž je výsledný metabolit hydrofilnější. Hlavní metabolické enzymy spojené s reakcemi první biotransformační fáze jsou členy nadrodiny cytochromu P450 (CYP450), které přispívají k metabolismu široké škály xenobiotik a endogenních sloučenin. Dále mezi tyto enzymy patří i rodina flavinových monooxygenáz. Neméně významná, avšak méně známá je skupina reduktáz, do nichž řadíme nadrodinu aldo-ketoreduktáz (AKR), dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) a dehydrogenáz/reduktáz se středně dlouhým řetězcem (MDR) (Corsini & Bortolini 2013, Skálová 2017).

Xenobiotika nesoucí karbonylovou skupinu jsou transformována karbonylredujícími enzymy. Při této reakci dochází k vytvoření hydroxylové skupiny z aldehydové či ketonové skupiny za vzniku alkoholu (Obr. 1). Obecně se tato reakce považuje za inaktivační nebo detoxikační krok, protože výsledný alkohol se snadněji eliminuje z organismu. Do těchto detoxifikačních cest je také řazena redukce chinonu na semichinonový radikál, který může být redukován až na hydrochinon. Enzymy podílející se na redukci karbonylu jsou závislé na NAD(P)(H) (Malátková et al., 2010).



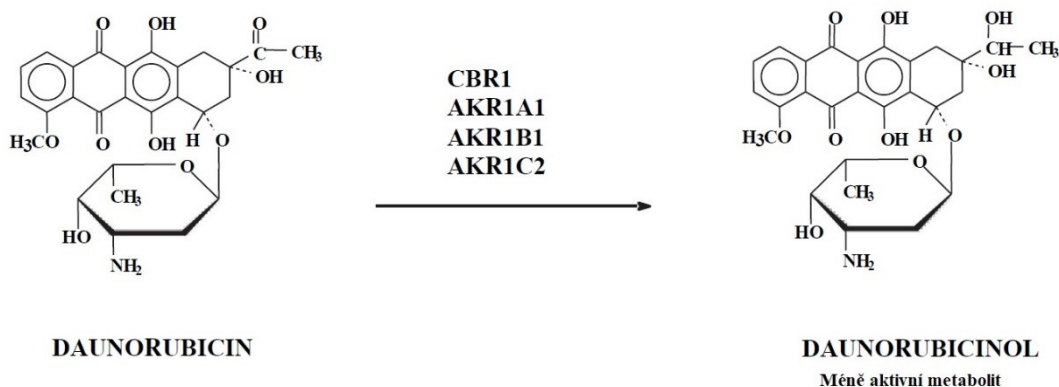
**Obr. 1** Hlavní metabolická přeměna sloučenin obsahujících karbonylovou skupinu. ALDH = aldehyddehydrogenáza; QR = chinonreduktáza. Upraveno dle (Oppermann & Maser, 2000).

Dnes je zřejmé, že karbonylredukující enzymy jsou významnou součástí metabolismu velkého množství endogenních látek i xenobiotik, včetně farmakologicky důležitých látek. Jejich pravděpodobně nejdůležitější funkcí je ochrana před poškozením a akumulací toxických karbonylových sloučenin (Hoffmann & Maser 2008, Škarydová & Wsól 2012).

Studium karbonylredukujících enzymů je v dnešní době jeden z důležitých cílů ve vývoji nových léčivých přípravků nebo ve studiu některých onemocnění. Z farmakologického hlediska byl prokázán význam redukce karbonylu v různých inaktivačních procesech léčiv. Z toxikologického pohledu však tato redukce hraje opačnou roli. Některá léčiva, jako je daunorubicin (DAU) či doxorubicin (DOX), se stávají po redukci více toxickými pro organismus (Hoffmann & Maser, 2008).

V protinádorové terapii často vzniká na tyto chemoterapeutická léčiva rezistence. Antracykliny, jako jsou DAU a DOX jsou nejcennějšími cytostatiky v chemoterapii, ale jejich účinnost je omezena rezistencí, která je způsobena mimo jiné také vlivem karbonylredukujících enzymů. Tyto enzymy redukují výše zmíněná léčiva na alkoholy, které jsou významně méně účinné v inhibici růstu nádorových buněk (Obr. 2). V lidských

játrech byly identifikovány hlavní enzymy schopné katalyzovat tuto redukci karbonylu, např.: AKR1A1, AKR1C1, AKR1C2, CBR1 či 11 $\beta$ -HSD1 (Hoffmann & Maser 2008, Škarydová & Wsól 2012).



**Obr. 2** Schéma redukce DAU na daunorubicinol. Upraveno dle (Hoffmann & Maser, 2008).

### 2.2.1 Aldo-ketoreduktázy (AKR)

Nadrodina aldo-ketoreduktáz (AKR) představuje skupinu oxidoreduktáz, které metabolizují široké spektrum endogenních látek a xenobiotik. Většina AKR katalyzuje obousměrné reakce, ale upřednostňuje především redukční před oxidačními reakcemi. Většina AKR využívá při redukci kofaktor NADPH. V metabolicky aktivních buňkách je přítomen NADP<sup>+</sup> nejčastěji v redukované formě, a proto je výhodnější využití redukce než oxidace. Většina AKR jsou monomerní proteiny o 34–37 kDa, avšak nalezneme v této nadrodině i multimerní proteiny, např. AKR2, AKR6 a AKR7 (Barski et al. 2008, Jin & Penning 2007).

Navržený systém nomenklatury je podobný systému nadrodiny cytochromu P450, ale na rozdíl od tohoto systému používá pro srovnání aminokyselinové sekvence. Obecný formát je následující: základem je kořenový symbol „AKR“, který symbolizuje aldo-ketoreduktázu, arabská číslice označuje rodinu (1–15), jednotliví členové jsou rozřazeni do rodin na základě shody v aminokyselinové sekvenci (shoda alespoň 40 %). Poté následuje písmeno představující podrodinu, jenž je definována shodou ve  $\geq 60$  % aminokyselinové sekvence. Posledním znakem je opět arabská číslice, která představuje jedinečnou proteinovou sekvenci (Internet 7).



Aldo-ketoreduktázy jsou řazeny mezi enzymy první fáze biotransformace, jejichž funkcí je redukce léčiv s karbonylovou skupinou na odpovídající metabolity (primární a sekundární alkoholy), čímž je zvýšena jejich rozpustnost ve vodě a usnadněn proces eliminace. Substráty pro AKR zahrnují také steroidní hormony, prostaglandiny, monosacharidy, produkty peroxidace lipidů, aflatoxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a další toxické látky (Hoffmann & Maser 2008, Hofman et al. 2014, Jin & Penning 2007, Matsunaga et al. 2006, Penning & Drury 2007).

Široké spektrum studií poukazuje na významnou roli AKR ve vývoji maligních onemocnění. Například se lidské AKR (AKR1A1, AKR1C1) podílejí na metabolické aktivaci PAH. PAH jsou karcinogenní látky vyskytující se ve znečištěném ovzduší. Jsou to produkty spalování fosilních paliv, dále jsou přítomny ve výfukových plynech, tabákovém kouři či grilovaných potravinách. Aktivované PAH jsou karcinogenní látky se škodlivými účinky na organismus, podílejí se na příčinách vzniku nádorového onemocnění plic i dalších maligních onemocnění (Hofman et al. 2014, Jin & Penning 2007).

Redukce karbonylové skupiny je častou a velmi nežádoucí metabolickou cestou pro antracyklinová chemoterapeutika. Výsledné alkoholy jsou zodpovědné za život ohrožující nežádoucí účinky, jako je kardiotoxicita. Kromě vzniklé kardiotoxicity dochází ke snížení protinádorové aktivity a zvýšení odolnosti maligních buněk vůči původnímu léčivu. V maligních buňkách rezistentních na antracykliny byla pozorována zvýšená hladina AKR1A1, AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 (Jin & Penning 2007, Matsunaga et al. 2014) a CBR1 (karbonylreduktáza 1) enzymů (Gonzalez et al., 1995).

### **2.2.1.1 AKR1A1 (*aldehydoreduktáza*)**

AKR1A1 je monomerní cytosolická NADPH-dependentní oxidoreduktáza, která je vysoce exprimována a široce distribuována téměř ve všech tkáních, především v proximálních tubulech ledvin a játrech (Alzeer & Ellis, 2014). AKR1A1 je enzym s nízkou substrátovou selektivitou. Upřednostňuje negativně nabitě substráty obsahující karboxylovou skupinu. Může také katalyzovat redukci široké škály steroidních, aromatických či alifatických aldehydů na jejich odpovídající alkoholy (Barski et al., 2008).

Podílí se na biosyntéze cholesterolu a triacylglycerolů redukcí D-glyceraldehydu na glycerol a redukcí mevaldátu na kyselinu mevalonovou (prekurzor skvalenu při syntéze sterolů). Je zapojen do metabolismu antracyklinů, jako je DAU a DOX, čímž přispívají k rezistenci na chemoterapeutickou léčbu. AKR1A1 je dále spojována s inhibicí buněčné smrti působením na p53. Podporuje tak vznik radiorezistence maligních buněk nádorového onemocnění hrtanu (Kim et al., 2012).

### **2.2.1.2 AKR1B1 (*aldózareduktáza*)**

Členové AKR1B sdílejí společnou vlastnost, a to schopnost redukovat velké množství substrátů, jako jsou steroidy a jejich vedlejší produkty, glukóza, produkty peroxidace lipidů i xenobiotika (akrolein, daunorubicin) (Singh et al., 2017).

Aldózareduktáza, nazvaná AKR1B1 je jedním z nejvíce studovaných enzymů. Primární funkcí je regulace osmolality prostřednictvím polyolové dráhy, kdy dochází k přeměně glukózy na sorbitol. Tato redukce je spojována s komplikacemi u onemocnění diabetes mellitus. V reakci na hyperglykémii u pacientů dochází ke zvýšené přeměně glukózy, což způsobuje vývoj tkáňového poškození (Pastel et al. 2012, Singh et al. 2017).

Další funkce, v nichž je AKR1B1 zapojena, zahrnují například metabolismus lipidů. Byla prokázána zvýšená hladina triacylglycerolů v krvi diabetických pacientů (Pastel et al., 2012). Enzym také katalyzuje reakce spojené s kyselinou arachidonovou, která je metabolizována na prostaglandiny (PG). Redukcí vzniká produkt PGF2 $\alpha$ , jenž moduluje buněčnou adhezi, migraci a invazi u karcinomu endometria (Wu et al., 2017). Některé studie také poukazují na roli AKR1B1 v karcinomu tlustého střeva a dalších procesech souvisejících s nádorovými onemocněními, jako je zánět, angiogeneze či epiteliálně mezenchymální přechod (EMT) (Laffin & Petrash, 2012).

Bylo zjištěno, že nadměrná exprese AKR1B1 je spojena se zkráceným přežíváním pacientů s akutní myeloidní leukémií či mnohočetným myelomem. AKR1B1 se tak stává slibným cílem při léčbě nádorových onemocnění jeho inhibitory mají potenciál jako léčivé přípravky (Laffin & Petrash, 2012).

### **2.2.1.3 AKR1B10 (*aldózareduktáza tenkého střeva*)**

Cytosolická NADPH-dependentní reduktáza AKR1B10 je dalším významným členem podrodiny AKR1B. Hlavní funkcí toho enzymu je redukce cytotoxických

karbonylových sloučenin, včetně produktů oxidačního stresu a různých léčiv. Převádí tak některé vysoce toxické karbonylové sloučeniny na méně toxické. Takto AKR1B10 chrání buňky před jejich toxickými účinky, v jiných případech se ale AKR1B10 podílí také na aktivaci některých prokarcinogenů (PAH *trans*-dihydrodioly) (Huang et al. 2016, Quinn et al. 2008).

Na rozdíl od AKR1B1, který je všudypřítomně exprimován, AKR1B10 nalezneme především v gastrointestinálním traktu, jako je tenké a tlusté střevo či žaludek. Rovněž lze enzym nalézt v maligně změněných tkáních (hepatocelulární karcinom, karcinom prsu, plic, endometria, děložního čípku), kde je nadměrně exprimován. Enzym má také vliv na leukemické buňky, kdy jeho nadměrná exprese zvyšuje proliferační aktivitu (Huang et al. 2016, Li et al. 2017).

Fyziologicky je zapojen do redukce kyseliny retinové. AKR1B10 redukuje *all-trans*-retinal na retinol. Kyselina retinová se podílí na regulaci buněčné proliferace a diferenciaci. Avšak jeho nadměrná exprese může způsobit snížení hladiny kyseliny retinové a následnou ztrátu funkce, čímž dochází k rozvoji karcinomu (Barski et al. 2008, Rižner 2012)

Nadměrná exprese tohoto enzymu je proto považována za jeden z cenných biomarkerů a prognostických indikátorů nádorových onemocnění. Cílení na AKR1B10 pomocí specifických inhibitorů může být novou strategií v léčbě (Huang et al., 2016).

#### **2.2.1.4 AKR1C1-1C4 (*hydroxysteroiddehydrogenázy*)**

Lidské aldo-ketoreduktázy AKR1C hrají zásadní roli v metabolismu všech steroidních hormonů, konjugovaných steroidů, žlučových kyselin, biosyntéze neurosteroidů a syntetických terapeutických steroidů (hormonální substituční terapie, steroidní protizánětlivá léčiva). Tyto enzymy katalyzují NAD(P)(H)-dependentní redukci steroidů v pozicích C3, C5, C17 a C20 za vzniku 3 $\alpha$ / $\beta$ -, 17 $\beta$ - a 20 $\alpha$ -hydroxymetabolitů v různých koncentracích (Rižner & Penning, 2014). Podrodina AKR1C sdílí vysoké procento aminokyselinové sekvenční identity, která se pohybuje v rozmezí 84 až 98 %. Například AKR1C1 a AKR1C2 se liší pouze sedmi aminokyselinovými zbytky (Zeng et al., 2017).

Všechny enzymy podrodiny AKR1C jsou exprimovány v jaterní tkáni. Navzájem se liší svou extrahepatální distribucí. V jaterní tkáni je primárně exprimován AKR1C4, zatímco geny AKR1C2 a AKR1C3 jsou hojně exprimovány v prostatě a prsní tkáni.

Modulace v expresi jednotlivých AKR1C enzymů souvisí s vývojem karcinomu prostaty, prsu a endometria. Mutace jsou zodpovědné za dysgenezi pohlavního vývoje (Rižner & Penning, 2014). Například AKR1C3 je vysoce exprimován v tkáni karcinomu prostaty a prsu, kde stimuluje proliferaci maligních buněk, čímž se stal slibným biomarkerem a potenciálním terapeutickým cílem (Tian et al., 2016).

Protein AKR1C3 má nejvyšší katalytickou účinnost ze všech členů podrodiny AKR1C, katalyzuje přeměnu prostaglandinů H2 a D2 na PGF2 $\alpha$  a 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -PGF $\alpha$ . Dále reverzibilně redukuje estrogen a progesteron, a podílí se na přeměně  $\Delta$ 4-androsten-3,17-dionu na testosteron. Tímto mechanismem se nadměrně exprimovaný AKR1C3 aktivně podílí na karcinomu prostaty či prsní tkáni (Zeng et al., 2017).

Podobně jako AKR1C3 je i AKR1C1 vysoce exprimován v tkáni karcinomu prostaty. Účastní se také karcinomu plic, kde je hojně exprimován v bronchiálním epitelu, především pro schopnost metabolické aktivace PAH obsažených v tabákovém kouři. Nedávné studie prokázaly, že snížená exprese tohoto enzymu je spojena se sníženým přežitím u pacientů s karcinomem prsu (Zhu et al., 2018).

Kromě toho se AKR1C1 i AKR1C3 účastní metabolismu léčiv, čímž způsobují lékovou rezistenci. Příkladem může být DAU a DOX, které jsou metabolizovány na méně účinné sekundární alkoholy (Tian et al. 2016, Zeng et al. 2017).

### **2.2.1.5 AKR7A2 (aflatoxinreduktáza)**

Aldo-ketoreduktáza 7A2 (AKR7A2) je jedním z členů nadrodiny oxidoreduktáz závislých na NADP(H), které redukují aldehydy a ketony na jejich primární a sekundární metabolity (alkoholy). Název aflatoxinreduktáza je odvozen od schopnosti metabolizovat dialdehyd aflatoxinu B1 na netoxický alkohol. Na rozdíl od monomerních enzymů nadrodiny AKR1 jsou proteiny AKR7 funkční dimery (Barski et al. 2008, Quiñones-Lombraña et al. 2019).

Enzym je přítomen v mnoha tkáních, včetně mozku, jater či ledvin. Dále byla prokázána jeho akumulace ve specifických oblastech mozku při Alzheimerově chorobě (Singh et al., 2015). Metabolizuje širokou škálu endogenních i exogenních sloučenin obsahujících karbonylovou skupinu, včetně antracyklinových chemoterapeutik (Quiñones-Lombraña et al., 2019).

Původně byl AKR7A2 identifikován jako sukcinát-semialdehydreduktáza v lidském mozku účastnící se metabolismu  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA).

Zde je zodpovědný za redukci sukcinát-semialdehydu (metabolit neurotransmiteru GABA) na  $\gamma$ -hydroxybutyrát (GHB). Enzym se také podílí na detoxifikačních drahách prostřednictvím redukce toxických karbonylových sloučenin vznikajících při peroxidaci lipidů, což naznačuje jeho ochrannou roli vůči produktům oxidačního stresu (Singh et al., 2015).

AKR7A2 je nejhojněji se vyskytující enzym metabolizující antracyklinová chemoterapeutika v lidském myokardu, čímž přispívá k syntéze kardiotoxických metabolitů. Riziko kardiotoxicity souvisí s celkovou kumulativní expozicí, věkem, pohlavím či trizomií 21 chromozomu (Downův syndrom) (Quiñones-Lombraña et al., 2019).

Léčba antracykliny také může vést ke změnám v expresi a struktuře AKR7A2. Jednou z příčin je metylace DNA. Hoefler et al., 2016 ve své studii představil metylaci DNA v místech dinukleotidu CpG -865 a CpG -232, která je spojena se syntézou kardiotoxického daunorubicinolu.

## 2.2.2 Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR)

Nadrodina enzymů SDR je považována za nejrozsáhlejší nadrodinu skládající se z více než 47 000 členů. Proteiny této nadrodiny vykazují vysokou divergenci. Sdílí společnou základní strukturu, tzv. Rossmannův záhyb, skládající se z  $\alpha/\beta$  řetězců. Díky této struktuře jádra je enzym schopný vázat NAD(P)(H). Avšak kromě základní struktury sdílí pouze nízkou podobnost v sekvenci aminokyselin (20–30 %) (Beck et al., 2017).

SDR enzymy se podílejí na metabolismu celé řady molekul, včetně steroidních hormonů, žlučových kyselin, prostaglandinů, retinoidů, mastných kyselin, aminokyselin sacharidů, kromě toho se účastní i metabolismu xenobiotik. SDR jsou NAD(P)(H)-dependentní enzymy s oxidoreduktázovou aktivitou (Beck et al. 2017, Kavanagh et al. 2008).

V lidském genomu bylo identifikováno více než 80 genů kódujících SDR enzymy. Navržený systém nomenklatury označuje dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem základním kořenovým symbolem „SDR“. Následuje číslo rodiny a písmeno označující typ SDR. Celkem bylo popsáno 7 různých typů: „*Classical (C)*“, „*Extended (E)*“, „*Intermediate (I)*“, „*Divergent (D)*“, „*Complex (X)*“, „*Atypical (A)*“ a „*Unassigned (U)*“ (Persson et al. 2009, Persson & Kallberg 2013, Skálová 2017).

Enzymy metabolizují především fyziologické endogenní sloučeniny, avšak některé SDR se účastní také metabolismu léčiv. Byly zkoumány jako potenciální terapeutické cíle a vývoj jejich inhibitorů je jedním ze slibných cílů v léčbě maligních onemocnění (Skálová, 2017).

### 2.2.2.1 CBR1

Karbonylreduktáza 1 (CBR1, SDR21C1) je všudypřítomný enzym využívající jako kofaktor NADPH, který patří do nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem. Jedná se o monomerní cytosolický enzym (30kDa), který nalezneme zastoupený v mnoha různých tkáních včetně jater, CNS či placentě (Matsunaga et al. 2015, Skálová 2017). Katalyzuje redukci významného množství endogenních karbonylových sloučenin, jako jsou prostaglandiny, chinony, ketosteroidy, cytotoxické aldehydy odvozené od peroxidace lipidů (Matsunaga et al., 2015).

CBR1 plní úlohu fyziologického regulátoru metabolismu prostaglandinů jako 9-ketoreduktáza. Enzym katalyzuje přeměnu prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), jenž je mediátorem horečky, na méně aktivní metabolit PGF<sub>2</sub>α (Gonzalez-Covarrubias et al., 2007).

Dalším substrátem CBR1 je 4-oxo-2-nonenal, který je redukován na 4-hydroxy-2-nonenal, 4-oxo-2-nonenol a 4-oxononanal, čímž dochází k inaktivaci této vysoce reaktivní sloučeniny (Matsunaga et al., 2015).

Jedním z nejvýznamnějších substrátů jsou chinony, včetně ubichinonu-1 či tokoferolchinonu. Ubichinon neboli koenzym Q je konstitutivním faktorem v dýchacím řetězci a tokoferolchinon chrání lipidy biologických membrán před peroxidací lipidů (Jang et al., 2012).

Enzym také účinně katalyzuje přeměnu různých exogenních karbonylových sloučenin, např. antracyklinových chemoterapeutik či akroleinu. Při redukci DOX a DAU vznikají příslušné sekundární alkoholy. Takto zredukované léčivo vede k rozvoji rezistence maligních buněk, protože vzniklé alkoholy mají snížený protinádorový účinek. Bylo publikováno, že zvýšená exprese CBR1 je spojena s metabolismem DAU u AML blastů a se zvýšenou intracelulární hladinou daunorubicinolu (Jordheim et al. 2015, Matsunaga et al. 2015).

Některé studie prokázaly vliv CBR1 na terapii akutní promyelocytární leukémie pomocí As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Nadměrná exprese CRB1 činí leukemické buňky odolné vůči této

sloučenině, což způsobuje jejich rezistenci k apoptóze. Potlačení exprese tak může být potenciálním cílem v léčbě různých leukémií (Jang et al., 2012).

## 2.3 ANTRACYKLINOVÁ CHEMOTERAPEUTIKA

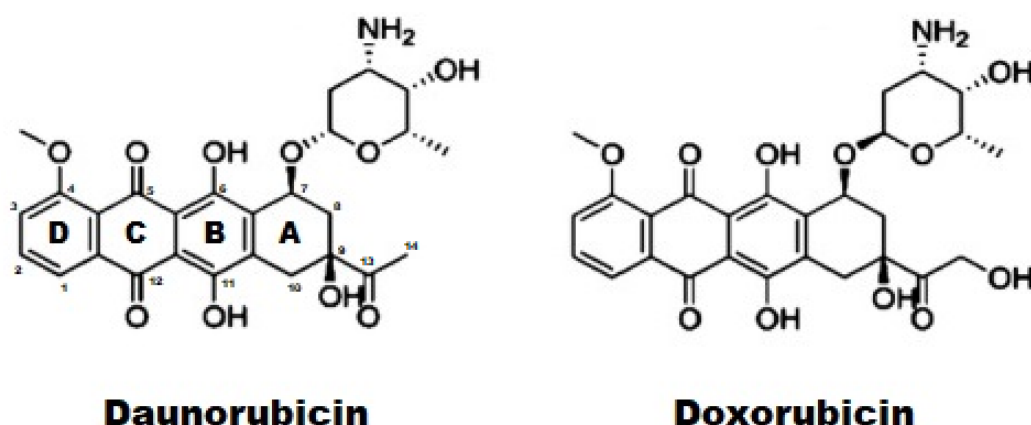
Antracykliny jsou široce používané a účinné chemoterapeutické látky. Získávají se z bakterií rodu *Streptomyces*. Používají se k léčbě leukémií a mnoha dalších hematologických malignit. V klinické praxi jsou antracykliny hojně využívány, avšak mají vysoké kardiotoxické účinky, které omezují jejich dávkování (Shaul et al., 2013).

Mezi nejběžnější antracykliny řadíme: DOX, DAU, epirubicin či idarubicin. Jednotlivé deriváty mají podobnou tetracyklickou strukturu, ale liší se svými funkčními skupinami, čímž je rozdílná také jejich míra protinádorové aktivity a kardiotoxicity. Prvními zavedenými v klinické praxi byly DOX a DAU (Shaul et al., 2013).

### 2.3.1 Chemická struktura

Antracykliny sdílejí podobnou tetracyklickou aglykonovou strukturu tvořenou čtyřmi cyklohexanovými řetězci s daunosaminovou cukernou složkou na uhlíku C7 a sousední chinon-hydrochinonovou skupinou na B a C kruhu. Na uhlíku C4 je navázána methoxy skupina, C13 uhlík obsahuje karbonylovou skupinu a C9 uhlík má navázaný krátký postranní řetězec (Obr. 3) (McGowan et al., 2017).

DAU a DOX mají podobnou strukturu. Jediný rozdíl mezi těmito dvěma sloučeninami je v primárním řetězci, kde DOX je zakončen hydroxylovou skupinou, zatímco DAU methylovou skupinou (Mele et al., 2016).



Obr. 3 Struktura antracyklinů. Upraveno dle (Tripaydonis et al., 2019).



### 2.3.2 Metabolismus antracyklinů

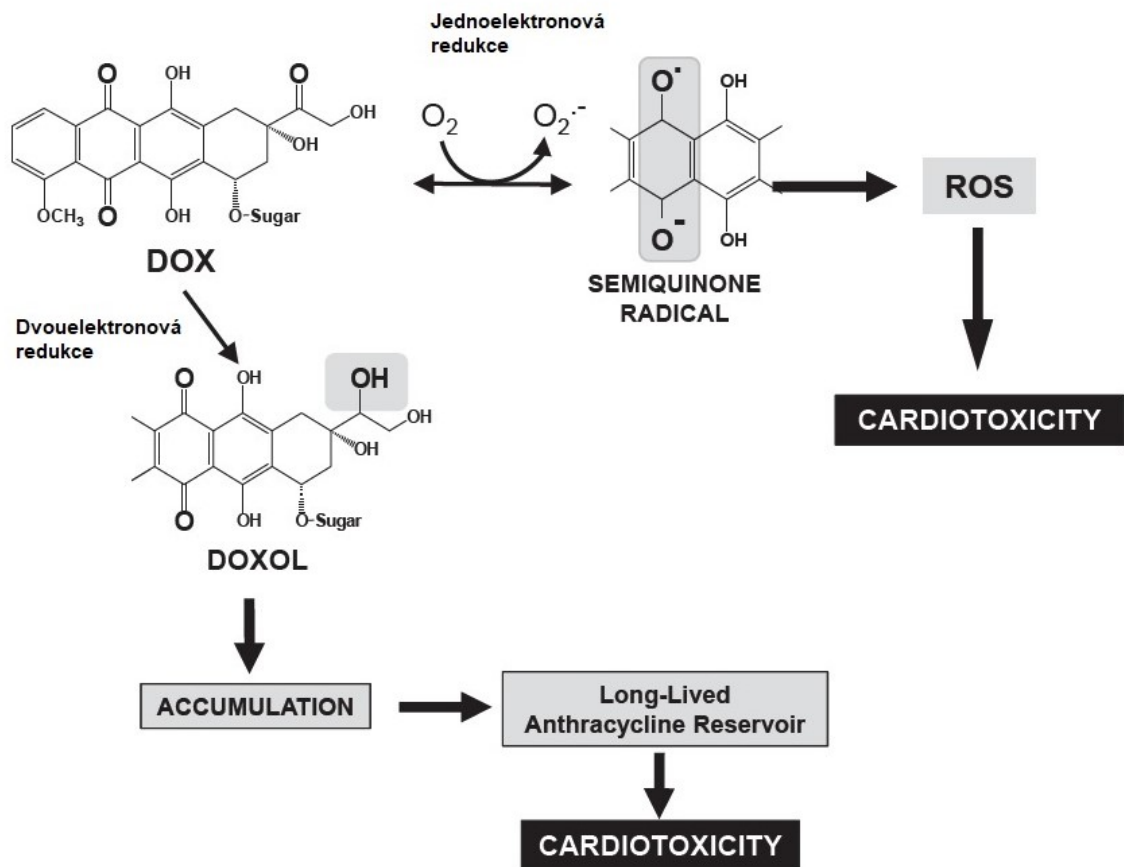
Znalost metabolismu antracyklinů je základem pro pochopení mechanismů kardiotoxicity indukované těmito léky. Antracykliny mohou procházet třemi různými cestami metabolismu: dvouelektronovou redukcí, jednoelektronovou redukcí a deglykosidací. Část antracyklinů se z těla vylučuje beze změny (Mele et al., 2016).

#### *Dvouelektronová redukce*

Výsledkem dvouelektronové redukce karbonylové skupiny navázané na uhlík C13 je vznik sekundárních alkoholů (doxorubicinol, daunorubicinol). Do redukce jsou zapojeny karbonylredukující enzymy. Vzniklé alkoholy jsou výrazně polárnější, hromadí se v srdci a vytváří dlouhodobý toxický rezervoár, který je jednou z příčin kardiotoxicity. Tato cesta je považována za primární metabolickou cestu (Obr. 4) (Mele et al. 2016, Menna & Salvatorelli 2017).

#### *Jednoelektronová redukce*

Chinonová skupina na C kruhu antracyklinů je náchylná k jednoelektronové redukcí. V tomto typu redukce hrají roli především NADH a NADPH, které působí jako koenzymy a dárce elektronů. Antracyklin přijímá elektron a přidává ho k chinonové skupině na C kruhu. Vzniká volný semichinonový radikál, který rychle regeneruje původní chinon redukcí kyslíku, čímž vznikají reaktivní formy kyslíku (superoxid anion a peroxid vodíku). Vzniklé volné radikály jsou vysoce toxické a reagují s lipidy, proteiny i nukleovými kyselinami (Obr. 4) (Mele et al. 2016, Menna & Salvatorelli 2017).



**Obr. 4** Metabolismus antracyklinů jednoelektronovou a dvouelektronovou redukcí. ROS = reaktivní formy kyslíku; DOX = doxorubicin; DOXOL = doxorubicinol. Upraveno dle (Menna et al., 2008).

#### *Deglykosidace*

Dalším redukčním procesem, ke kterému dochází při metabolismu je deglykosidace, jenž představuje přibližně 1–2 % metabolismu antracyklinů. Dochází ke štěpení glykosidické vazby a karbonylové skupiny postranního řetězce. Výsledkem je vznik 7-deoxyaglykonů a hydroxyaglykonů. (Edwardson et al. 2015, Mele et al. 2016). Bylo popsáno, že do této metabolické dráhy jsou zapojeny glykosidázy (hydrolázy, reduktázy) závislé na NADPH (například NADPH chinonoxidoreduktázy a NADPH-cytochrom P450 reduktázy (Mele et al. 2016).

#### *Oxidační degradace*

Nedávno bylo popsáno, že kromě výše uvedených metabolických drah založených na redukčních procesech, může DOX podléhat oxidační degradaci katalyzované peroxidázami. Ukázalo se, že produktem této reakce je méně toxická látka než

původní DOX. Oxidační degradace, tak představuje způsob, jakým lze snížit kardiotoxicitu antracyklinů (Mele et al., 2016).

### 2.3.3 Mechanismus účinku

Přesný mechanismus, kterým antracykliny působí na buňky, není dosud znám, avšak je pravděpodobné, že bude multifaktoriální. Mechanismy působení antracyklinů jsou založeny na interakci s jádrem, mitochondriemi či biologickými membránami. Předpokládá se, že antracykliny inhibují proliferaci rychle se dělících buněk. Mají schopnost interkalace mezi sousední páry bází DNA, zesíťovat je a tvořit adukty. Bylo také zjištěno, že antracykliny inhibují topoizomerázu II či jsou schopné vytvářet volné radikály, čímž způsobují poškození DNA a oxidaci lipidů. Mechanismus účinku antracyklinů má přímou souvislost s jejich nežádoucími účinky (Edwardson et al. 2015, Mele et al. 2016).

Jedním z nejdůležitějších mechanismů účinku je inhibice topoizomerázy II. Tohoto mechanismu se hojně využívá v léčbě maligních onemocnění. Topoizomerázy jsou zodpovědné za organizaci terciální struktury, čímž zabraňují nadměrné torzi a poškození DNA, dále hrají roli v průběhu buněčného dělení (Internet 10).

Existuje několik typů dělených na základě struktury a mechanismů. Monomerní topoizomeráza I katalyzuje tvorbu jednovláknových zlomů, zatímco topoizomeráza II se váže na oba řetězce DNA (Marinello et al., 2018). Topoizomeráza II (Top2) se vyskytuje ve dvou izoformách: alfa a beta. Top2 $\alpha$  je vysoce exprimován v buňkách s proliferací aktivitou (maligní i nemaligní buňky), má schopnost rozštěpit obě vlákna DNA během replikace a transkripce. Tato izoforma enzymu je hlavním cílem antineoplastické léčby antracykliny (Mele et al., 2016). Druhá izoforma, Top2 $\beta$ , je typická především pro klidové buňky (kardiomyocyty) a jeho exprese se v průběhu buněčného cyklu nemění (McGowan et al., 2017).

Mechanismus inhibice topoizomerázy, využívaný při léčbě antracykliny, je jejich schopnost navázat se na Top2 $\alpha$  a DNA. Dochází tak k inhibici enzymu a stabilizaci zlomu DNA. Zastavení replikace DNA následně iniciuje u nádorových buněk apoptózu (Capelôa et al., 2020).

### 2.3.4 Kardiotoxicita

Vzhledem k vysoké účinnosti jsou antracyklinová chemoterapeutika zahrnuta do léčby nádorů, leukémií a jiných hematologických onemocnění. Avšak jedním z limitujících nežádoucích účinků je kardiotoxicita.

Toxický účinek antracyklinů vede k přímé ztrátě kardiomyocytů, snížení kontraktility srdečních svalů a poškození mikrovaskulatury (tj. arterioly, prekapiláry, kapiláry a venuly). Antracykliny navíc ovlivňují srdeční progenitorové buňky a fibroblasty, které fyziologicky napomáhají reparaci již poškozeného srdce (Sadurska, 2015).

Kardiotoxicita zahrnuje mnoho složitých mechanismů, které stále nejsou zcela objasněny. Existuje několik hypotéz, které popisují a vysvětlují vznik. Hypotéza oxidačního stresu byla považována za jednu z hlavních příčin kardiotoxicity. Dochází při ní k indukci vzniku volných radikálů a peroxidaci lipidů tvořících buněčné membrány (Sadurska, 2015). Přesný mechanismus účinku je popsán výše v kapitole 2.3.2. Kromě enzymového mechanismu může docházet k tvorbě volných radikálů také formováním komplexů metabolismem vzniklých alkoholů (daunorubicinol) s trojmocným železem (Puchnerová et al., 2016).

Novější studie prokazují, že hypotéza oxidačního stresu neposkytuje dostatečné vysvětlení všech aspektů toxicity. Ačkoli přesné mechanismy nebyly zcela vysvětleny, předpokládá se, že antracykliny poškozují některé hlavní proteiny, které regulují kontraktilitu srdečního svalu. Jedním z nich je titin, jenž vytváří myofilamenta a dystrofin, jehož poškození zvyšuje riziko dilatační kardiomyopatie (Sadurska, 2015).

Další příčinou toxicity je afinita antracyklinů k vnitřní složce mitochondriální membrány zvané kardiolipin. Kardiolipin, jehož náboj je záporně nabitý, má vysokou afinitu k antracyklinovým chemoterapeutikům, jenž mají kladný náboj. Společně vytvářejí ireverzibilní komplex. Díky němu mohou antracykliny pasivně vstupovat do buňky a hromadit se. Dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku, jenž přispívají k peroxidaci lipidů, poškození proteinů i signálních molekul. Kardiolipin je důležitý pro aktivaci řady enzymů přítomných v dýchacím řetězci. Vzhledem k tomu, že je v komplexu s antracykliny, nemůže již aktivovat enzymy a v mitochondriích pak následně dochází k inhibici dýchacího řetězce, čímž snižují produkci energie ve formě ATP. Antracykliny tak mohou nenávratně poškodit produkci energie, čímž narušují schopnost vyvolávat odpovídající kontrakci (Puchnerová et al. 2016, Renu et al. 2018).

V poslední době je značná část odpovědnosti za kardiotoxicitu připisována inhibici Top2. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, inhibice topoizomeráz se využívá při léčbě antracykliny. Vzhledem k tomu, že kardiomyocyty jsou převážně nedělicími se buňkami, byl jejich účinek zpočátku považován za pouze antineoplastický (Bernstein, 2018). Avšak topoizomeráz je více typů, například již zmíněná Top2 $\alpha$ , jenž hraje při antracyklinové léčbě významnou roli. Naopak, druhý typ topoizomerázy II – Top2 $\beta$ , je spojován s dlouhodobými vedlejšími nežádoucími účinky. Enzym se nachází především u dospělých zdravých buněk (kardiomyocyty). V tomto případě se antracykliny váží, podobně jako u Top2 $\alpha$ , na enzym (Top2 $\beta$ ) i DNA, avšak jejich zánik probíhá jiným způsobem (Puchnerová et al., 2016). Dochází k potlačení receptoru aktivovaného peroxisomovým proliferátorem (PPAR), který reguluje oxidační metabolismus v mitochondriích. To vede k mitochondriální dysfunkci, zvýšené apoptóze a tvorbě volných radikálů (McGowan et al., 2017).

Další příčinou, při které opět vznikají volné radikály a ROS, je jednoelektronová redukce antracyklinů katalyzovaná syntázou oxidu dusnatého (Edwardson et al., 2015).

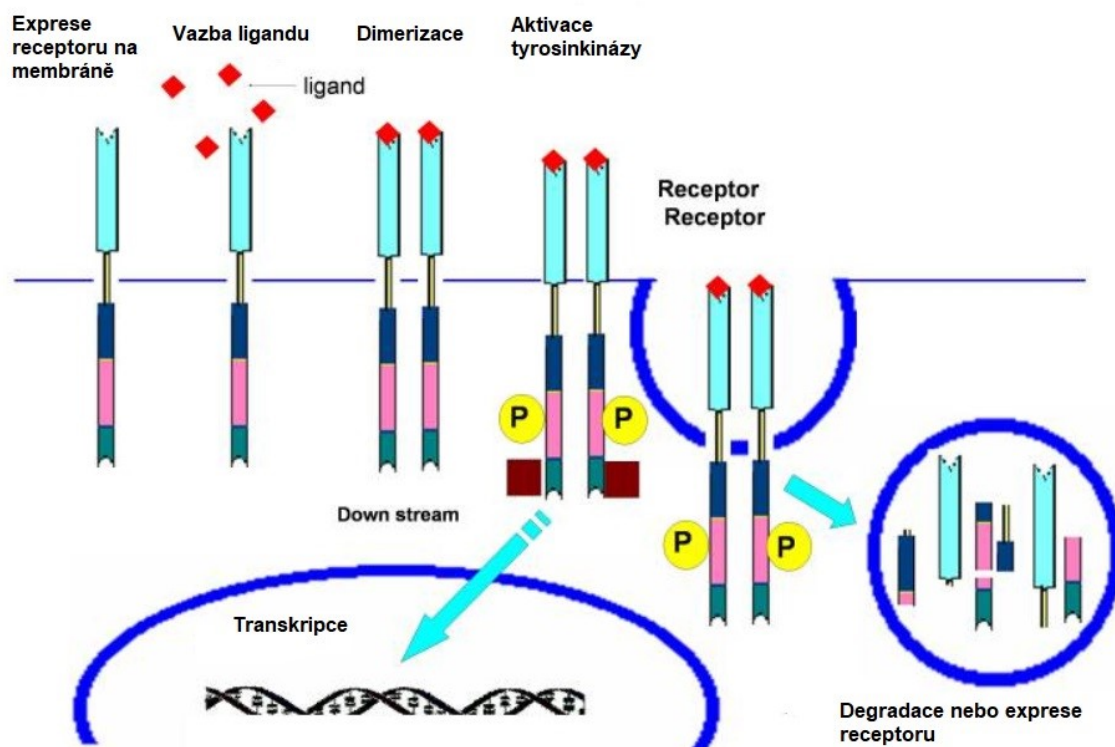
Rizikovými faktory pro vznik kardiotoxicity jsou věk (především děti a starší osoby), jiná již existující kardiální onemocnění, hypertenze a radioterapie v oblasti levé hrudní stěny a prsu. Dále mezi rizikové faktory patří současné podávání jiných toxických léčiv. Hlavním a nejdůležitějším rizikovým faktorem je bezpochyby kumulativní dávka antracyklinů. S narůstající dávkou narůstá i riziko kardiotoxicity: při kumulativní dávce 450 mg/m<sup>2</sup> je nárůst rizika 4 %, při dávce vyšší než 500 mg/m<sup>2</sup> je nárůst až 10 %. Použití antracyklinů v léčbě maligních onemocnění je tedy limitované kumulativní dávkou. Síla účinku závisí na podané dávce, jenž se liší u jednotlivých léčiv i pacientů (Petráková 2011, Svoboda 2010).

## 2.4 VYBRANÉ INHIBITORY TYROSINKINÁZ

Kinázy se řadí mezi enzymy, které přenášejí fosfátovou skupinu na protein, zatímco fosfatázy odstraňují fosfátovou skupinu z proteinu. Společně se tyto dva enzymatické procesy podílejí na posttranslační modifikaci proteinů a jejich aktivity v buňce (Bhullar et al., 2018).

Tyrosinkinázy (TK) jsou podskupinou enzymů patřících do skupiny proteinkináz (PK), které katalyzují přenos  $\gamma$ -fosfátové skupiny z ATP na tyrosinové zbytky proteinů. Fosforylace ovlivňuje širokou škálu vlastností proteinů a hraje důležitou roli v různých regulačních procesech buňky. Dochází ke konformačním změnám, čímž je změněna katalytická aktivita a ovlivněna funkce proteinu (Obr. 5). Tento důležitý mechanismus je klíčový pro regulaci buněčné aktivity v reakci na podněty a pro mediátory signální kaskády uvnitř buňky. Signály jsou přenášeny přes membrány do jádra buňky, kde aktivací či inhibicí transkripčních faktorů dochází k ovlivnění exprese cílových genů (Bhullar et al. 2018, Internet 4). Takto se TK podílejí na buněčném dělení, diferenciaci, růstu, migraci, metabolismu či apoptóze (Paul & Mukhopadhyay, 2004).

Klasifikace rozděluje TK na receptorové a nereceptorové proteinové kinázy podle jejich struktury. Receptorové tyrosinkinázy (RTK) jsou membránové proteiny, které se podílejí na transmembránové signalizaci přenosem extracelulárních signálů z povrchu buňky do cytoplazmy (Arora & Scholar, 2005). RTK mají tři části: extracelulární doménu vázající ligand, transmembránovou oblast a intracelulární katalytickou doménu s vlastní tyrosinkinázovou aktivitou. Neaktivní RTK je prezentován jako monomer, jakmile se naváže specifický ligand (extracelulární signální molekula) na extracelulární doménu dojde k indukci dimerizace receptoru, která vede ke konformační změně a následné křížové fosforylaci tyrosinových zbytků. Aktivované fosforylované zbytky se shromažďují jako signál, který iniciuje kaskádu intracelulárních signálních drah a ovlivňuje tak buněčnou proliferaci či apoptózu (Shukla et al. 2012, Wu & Fu 2018).



**Obr. 5** Mechanismus působení TK. Upraveno dle (Paul & Mukhopadhyay, 2004).

Mezi RTK se řadí receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), receptor růstového faktoru z destiček (PDGFR), receptor fibroblastového růstového faktoru (FGFR) a inzulinový receptor (IR) (Paul & Mukhopadhyay, 2004).

Naopak nerekceptorové tyrosinkinázy (NRTK) jsou cytoplazmatické proteiny, což ukazuje na nepřítomnost extracelulární domény a transmembránové oblasti. Jejich funkcí je přenos signálu do jádra. Nacházejí se v cytosolu, jádře a na vnitřní straně plazmatické membrány. Jsou aktivovány intracelulárními signály a lze je považovat za downstream faktory spouštěné RTK (Wu & Fu, 2018). Podle podobnosti ve struktuře domény se NRTK rozdělují na rodiny, např. protonkogen tyrosin-protein kinázy (SRC), Abelsonovy tyrosinkinázy (ABL), fokální adhezní kinázy (FAK) či Janusovy kinázy (JAK) (Paul & Mukhopadhyay, 2004).

Nedávný pokrok ve studiu TK prokázal jejich roli v patofyziologii nádorových onemocnění. Aktivita TK v jádře zahrnuje kontrolu buněčného cyklu a vlastností transkripčních faktorů (Internet 4). Fyziologicky je fosforylace pevně řízena účinkem tyrosinkinázy a tyrosinfosfatázy, avšak existuje několik mechanismů (mutace, nadměrná exprese genu), díky kterým může docházet ke změně jejich funkce. (Paul & Mukhopadhyay, 2004). Nepřetržitá aktivace signálních drah a abnormalita ve struktuře

či funkci vede k narušení přenosu signálu, a tím ke zvýšené buněčné proliferaci a snížené apoptóze. Tato nerovnováha vede k zahájení procesu onkogenní transformace normálních buněk na maligně zvrhlé (Shukla et al. 2012, Wu & Fu 2018).

Jednou ze strategií pro kontrolu transformované aktivity TK je inhibice její katalytické aktivity, čímž dochází k blokaci následných signálních drah vedoucích do jádra buňky. Hlavní cílem bylo vyvinout inhibitory s malými molekulami, které mohou blokovat fosforylaci zprostředkovanou kinázami. Inhibitory tyrosinkináz (TKI) představují syntetické či přírodní molekuly, jejichž vývoj začal v polovině 70. let. Největší průlom nastal v roce 2001, kdy byl imatinib schválen pro léčbu CML. Bylo vyvinuto několik tříd inhibitorů, které inhibují aktivitu transformovaných kináz na různých úrovních (Bhullar et al., 2018).

Inhibitory proteinkináz (PKI) jsou děleny do kategorií podle jejich schopnosti katalyzovat přenos terminálního fosfátu ATP na substrát. Zpočátku byly PKI s malými molekulami klasifikovány do tří tříd, označovány jako inhibitory kinázy typu I, II a III. Dar a Sakot (2011) definovali inhibitory kinázy typu I jako „malé molekuly vázající se na aktivní konformaci kinázy v místě fosforylace,“ inhibitory typu II jako „malé molekuly vázající se na neaktivní konformaci kinázy“ a inhibitory typu III jako alosterické inhibitory. Později Gavrin a Saiah (2013) rozdělili alosterické inhibitory typu III do dvou podtříd (III a IV). Poté byly přidány také bivalentní molekuly, označené jako inhibitory typu V (kovalentní inhibitory) (Bhullar et al., 2018).

Mechanismus působení většiny TKI spočívá v kompetici o vazebné místo na katalytické doméně s molekulou ATP, tím dochází ke snížení fosforylace TK i přerušení následných signálních drah. Tento proces vede k inhibici proliferační aktivity maligních buněk, což vede k zastavení buněčného růstu a indukci apoptózy (Jiao et al. 2018, Wu & Fu 2018).

Současná terapie pomocí TKI či chemoterapeutickými látkami však zaznamenala vznik rezistence maligních buněk a značný cytotoxický účinek. Vlastní nebo získaná rezistence je jedním z důvodů selhání léčby, což vede k recidivě onemocnění a nakonec k relapsu až smrti pacienta (Wu & Fu, 2018).

Některé nedávné přehledy se rozsáhle zabývaly interakcemi TKI s ABC transportéry. Ukázalo se že, TKI mohou být inhibitory tyrosinkináz i ABC transportérů. Tyto transportéry fungují jako obranný systém maligních buněk proti chemoterapeutickým léčivům prostřednictvím aktivního efluxního mechanismu, což vede ke snížené intracelulární koncentraci daného léčiva v buňce a snížení jeho účinnosti.



TKI jsou schopny bránit tomuto procesu v ABC transportérech, podporovat tak akumulaci léčiva v buňce a zvyšovat jeho účinnost (Wu & Fu 2018, Zhang et al. 2014).

Ukázalo se, že některé TKI mají schopnost inhibovat karbonylredukující enzymy podílející se na přeměně antracyklinových chemoterapeutik na jejich sekundární alkoholy. Jako příklad lze uvést buparlisib. TKI, u kterého bylo prokázáno, že inhibuje také enzym AKR1C3 (Bukum et al., 2019).

### 2.4.1 Ibrutinib

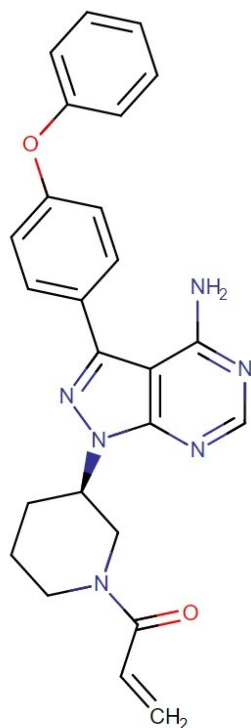
Ibrutinib (Obr. 6) je prvním ireverzibilním perorálně podávaným inhibitorem s malou molekulou, který se váže na Brutonovu tyrosinkinázu (BTK). BTK se účastní signálních drah B-buněčného receptoru (BCR) nezbytná pro proliferaci B-lymfocytů, která hraje významnou roli v etiopatogenezi B-lymfoproliferativních onemocnění (Fečková Mihályová et al. 2016, Wu et al. 2016).

Mechanismus účinku ibrutinibu je založen na kovalentní vazbě s cysteinovým zbytkem (Cys481) BTK. Vazbou dochází k zamezení fosforylace substrátů čímž dochází k inhibici signálních drah v receptorech B-lymfocytů. Takto ibrutinib účinně znemožňuje přežívání a proliferaci nádorových buněk B-lymfocytů (Fečková Mihályová et al. 2016, Internet 5).

Ibrutinib není zcela selektivním inhibitorem. Kromě inhibice BTK byl popsán inhibiční efekt i na další kinázy v normálních i nádorových B-lymfocytech. U ibrutinibu byla také prokázána schopnost inhibovat karbonylredukující enzymy (AKR1B10, AKR1C3). Nejúčinněji byl inhibován AKR1C3 na úrovni rekombinantního enzymu. Experiment byl proveden s využitím DAU jako substrátu, který byl redukován na méně aktivní daunorubicinol (Hudáčová, 2019).

Byly také pozorovány nežádoucí účinky, mezi které patří například průjem, únava, krvácení, vyrážka či fibrilace síní. Ve většině případů jde o nezávažné komplikace nevyžadující přerušení léčby (Fečková Mihályová et al. 2016, Wu et al. 2016).

V terapii hematoonkologických onemocnění se ibrutinib řadí mezi nejúčinnější inhibitory. Je indikován pro léčbu chronické myeloidní leukémie (CLL), lymfomu z plášťových buněk (MCL) a Waldenströmovy makroglobulinémie (Wu et al., 2016).



**Obr. 6** Chemická struktura ibrutinibu. Převzato z (Internet 5).

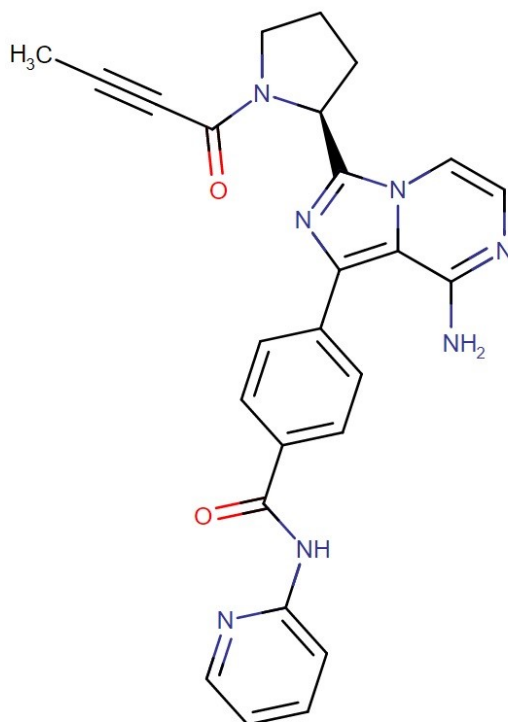
## 2.4.2 Akalabrutinib

Novějším ireverzibilním inhibitorem BTK s malou molekulou je akalabrutinib (Obr. 7), jenž je řazen do druhé generace inhibitorů. Byl navržen za účelem zvýšení selektivity a schopnosti inhibice oproti ibrutinibu, a přitom vykazoval snížení nežádoucích účinků především díky minimalizaci působení inhibitoru na jiné cíle než BTK (Internet 6).

Podobně jako ibrutinib se i akalabrutinib váže kovalentní vazbou na Cys481 ve vazebné doméně ATP, což vede k inhibici enzymatické aktivity BTK. Má zrychlenou perorální absorpci s krátkým poločasem rozpadu, což vede k menší toxicitě a snížení nežádoucích účinků (Vreman et al., 2019).

U akalabrutinibu byla, na úrovni rekombinantního enzymu, prokázána schopnost inhibice enzymu AKR1C3 (Tomanová, 2019).

Tento inhibitor BTK je v současné době indikován k léčbě dospělých pacientů s lymfomem z pláštěových buněk (MCL), kteří již podstoupili alespoň jednu předchozí terapii. Nedávno byl také schválen pro léčbu CLL (Internet 6).



**Obr. 7** Chemická struktura akalabrutinibu. Převzato z (Internet 6).

### 3 CÍL PRÁCE

Akalabrutinib a ibrutinib inhibují aldo-ketoreduktázu 1C3 a tím redukcí DAU na daunorubicinol na úrovni rekombinantního enzymu (Hudáčová 2019, Tomanová 2019). Cílem této diplomové práce bylo studium potenciálního inhibičního účinku akalabrutinibu a ibrutinibu na aktivitu AKR1C3 na úrovni buněčné linie HCT116 přechodně transfekované plazmidem kódujícím AKR1C3. Dalším cílem bylo stanovit vliv DAU v kombinaci s těmito inhibitory na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ , která přirozeně exprimuje AKR1C3 (Birtwistle et al., 2009).

Díličními úkoly bylo:

- 1) Transfekce buněčné linie HCT116 plazmidem pCI a plazmidem pCI se sekvencí kódující AKR1C3 (pCI\_AKR1C3).
- 2) Zjistit, zda studované TKI inhibují přeměnu DAU na daunorubicinol u HCT116 buněk se zvýšenou expresí AKR1C3. Pokud ano, stanovit koncentraci inhibitoru potřebnou ke snížení aktivity AKR1C3 na polovinu (IC<sub>50</sub>).
- 3) Stanovit vliv DAU, akalabrutinibu a ibrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ .
- 4) Stanovit vliv DAU v kombinaci se studovanými TKI na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$  a vyhodnotit, zda TKI zvyšují citlivost buněk vůči DAU.

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 Chemikálie a reagentie

Acetonitril	(Sigma-Aldrich)
Antibiotika (PEN, STREP, AMP-B)	(Lonza)
API voda	(Braun)
Daunorubicin hydrochlorid	(Toronto Research Chemicals)
DMEM	(Lonza)
DMSO	(MP Biomedicals)
Ethylacetát	(Sigma-Aldrich)
FBS	(Sigma-Aldrich)
IMDM	(Sigma-Aldrich)
JetPrime	(PolyPlus)
JetPrime pufr	(PolyPlus)
Kyselina mravenčí	(Sigma-Aldrich)
L-glutamin	(Sigma-Aldrich)
Lyzační pufr	(Katedra biochemických věd, (KBV))
PBS	(Sigma-Aldrich)
PMS	(Sigma-Aldrich)
Trypanová modř	(Sigma-Aldrich)
XTT	(Sigma-Aldrich)

#### 4.1.2 Inhibitory

Akalabrutinib	(Selleck Chemicals)
Ibrutinib	(Selleck Chemicals)

### 4.1.3 Buněčné linie

HCT116 (linie lidského kolorektálního karcinomu)	(Sigma-Aldrich, ECACC)
KG1 $\alpha$ (linie lidské kostní dřeně s akutní myeloidní leukémií)	(Sigma-Aldrich, ECACC)
Plazmid pCI	(Generi Biotech)
Plazmid pCI_AKR1C3	(KBV)

### 4.1.4 Pomůcky a přístroje

#### Pomůcky:

24-jamková destička	(TPP)
96-jamková destička	(TPP)
Automatické mikropipety (0,5 $\mu$ l–1 000 $\mu$ l)	(Sartorius Biohit)
Flakonky	(VWR)
Filtry	(VWR)
Gumová septa	(Agilent Technologies)
Kultivační láhve	(Fisherbrand)
Mikrozkumavky (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	(Eppendorf)
Navažovací lodičky	
Nitrilové rukavice	
Pipety (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25ml)	(Eppendorf Research)
Plastová stříkačka	
Plastové špičky	(Sartorius Biohit)
Plastová víčka na vialky	
Polystyrenový box na led	
Stopky	
Vialky skleněné, 1ml	(Agilent Technologies)

Sterilní pomůcky v laminárním boxe: špičky, automatické pipety, stojany na zkumavky, pinzeta, vanička

## Přístroje:

Analytické váhy Scaltec SBC 22	(Scaltec SBC 22)
Centrifuga MiniSpin Plus	(Eppendorf)
Fluorescenční mikroskop	(Eclipse TS100 Nikon)
Inkubátor CO <sub>2</sub>	(Biotech)
Laminární box	(Bioair)
Přístroj na výrobu ledové tříště Scotsman AF80	(Scotsman)
Spektrofotometr	(Tecan Schoeller)
Termomixér Thermomixer compact	(Eppendorf)
Třepačka a minitřepačka Vortex Genius 3	(IKA)
Třepačka	(Biosan)
Třepačka	(Heidolph)
UHPLC Agilent 1 290 Series	
(Ultravysokotlaká kapalinová chromatografie)	(Agilent Technologies)
Vakuový koncentrátor Concentrator plus	(Eppendorf)
Vodní lázeň	(NUVE)
Vývěva	(P-LAB)

## **4.2 METODIKA**

### **4.2.1 Experimenty na buněčné linii HCT116**

#### **4.2.1.1 Kultivace**

Buňky lidského kolorektálního karcinomu (HCT116) byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), které bylo z 10 % doplněno o fetální bovinní sérum (FBS). Toto sérum je přidáváno pro doplnění organických látek (růstové faktory, bílkoviny, stopové prvky). Do média nebyla přidána žádná antibiotika. Kultivace probíhala v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

#### **4.2.1.2 Pasážování**

Po určité době je nutno buňkám vyměnit médium. Tím, že počet buněk neustále stoupá, dochází k vyčerpání živin obsažených v médiu, což způsobuje odumírání buněk. Proto je nutné část buněk odebrat a smísit s čerstvým médiem. Díky tomu lze buňky dlouhodobě přechovávat.

Při pasážování se pracovalo ve vysterilizovaném laminárním boxu. Z kultivační lahvičky (25 cm<sup>2</sup>) bylo nejprve odsáto staré médium, následně byly adherované buňky opláchnuty sterilním pufrem PBS (5 ml), kterým je vymyt zbytek starého média, čímž je usnadněno následné působení přidaného trypsinu. Po přidání 1 ml trypsinu se kultivační lahvička vložila zpět do inkubátoru na 1–5 minut za standardních podmínek, dokud nedošlo k uvolnění buněk působením přidaného trypsinu. Uvolňování buněk bylo průběžně kontrolováno pod mikroskopem. Po uplynutí předepsaného času se reakce zastavila přidáním 4 ml přehřátého kultivačního média (37 °C), pokud by se trypsin nechal působit příliš dlouho, mohlo by dojít k natrávení buněk. Za zastavení reakce je zodpovědný FBS přidávaný do média, jenž je schopen inaktivovat trypsin.

Pro následnou kultivaci buněk bylo do nové kultivační lahvičky přeneseno určité množství suspenze. Toto množství bylo zjištěno pomocí mikroskopu z předchozí lahvičky a následně doplněno kultivačním médiem na požadovaný objem 7 ml. Takto připravená lahvička byla lehce promísena a přenesena do inkubátoru, kde byla dále inkubována za standardních podmínek.



### 4.2.1.3 Transfekce

Transfekce je proces, při kterém dochází k zavedení cizího genetického materiálu buněk. Metody používané pro přenos genetické informace se dělí na fyzikální (elektroporace), chemické (např. fosforečnanem vápenatým) a biologické (Internet 8).

K transfekci byl využit plazmid pCI\_AKR1C3 se zakódovaným AKR1C3 enzymem i samotný pCI. Jako kontrola úspěšnosti transfekce byl použit plazmid kódující GFP (Green Fluorescence Protein).

Buňky HCT116 (300 000/1ml/jamka) byly před samotnou transfekcí nasazeny na 24-jamkovou destičku a inkubovány 24 hodin v inkubátoru při standardních podmínkách. Množství suspenze buněk nasazené na destičku bylo vypočítáno pomocí Bürkerovy počítací komůrky.

Pod krycí sklíčko komůrky bylo napipetováno 10  $\mu$ l suspenze buněk s trypanovou modří, která byla přidána v poměru 1:1. Barvivo je používáno pro odlišení mrtvých a živých buněk, jeho mechanismus je založen na aktivním transportu přes buněčnou membránu. Takto připravená Bürkerova počítací komůrka byla vložena pod světelný mikroskop, kde v kalibrovaném počítacím poli o přesně definovaných rozměrech byly buňky spočítány. Pro získání počtu buněk v 1 ml byl celkový počet buněk ze všech 9 čtverců z nichž se pole skládá vydělen počtem čtverců a vynásoben ředícím faktorem.

Buňky byly nasazovány v koncentraci (300 000/1ml/jamka). Množství buněčné suspenze a média, které bylo potřeba pro smíchání dostatečného množství o požadované koncentraci buněk byla vypočítána pomocí směšovací rovnice. Do každé jamky byl pipetován 1 ml buněčné suspenze.

Samotná transfekce byla provedena 24 hodin po nasazení buněk. Transfekční směsi byly připraveny smícháním jetPRIME pufru s 0,75  $\mu$ l transfekčního činidla jetPRIME a 0,25  $\mu$ g pCI\_AKR1C3, pCI nebo plazmidu kódujícího GFP. Celkový objem transfekční směsi byl 37,5  $\mu$ l. Takto připravené směsi byly inkubovány po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Mezitím bylo z destičky odsáto staré médium a vyměněno za 500  $\mu$ l čerstvého média. Po inkubaci byly vzniklé směsi přepipetovány po kapkách do jednotlivých jamek destičky s nasazenými HCT116 buňkami. Následovala 24-hodinová inkubace v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

#### 4.2.1.4 Příprava inhibitorů

Zásobní roztoky TKI akalabrutinibu a ibrutinibu (10 mM) byly připraveny z inhibitorů zakoupených v práškové formě od firmy Selleck Chemicals a rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), poté byly roztoky alikvotovány a v malých množstvích uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C.

DAU, též zakoupený v práškové formě od firmy Toronto Research Chemicals byl rozpuštěn v ultračisté vodě (API) na zásobní roztok 5 mM. Roztoky byly připravovány v laminárním boxu v den experimentu, aby nedošlo k jejich degradaci.

Zásobní roztok DAU byl pro potřeby experimentu zředěn na koncentraci 1  $\mu$ M, a to smícháním 22 ml média a 4,4  $\mu$ l DAU (5 mM). Roztok DAU v médiu byl následně použit pro postupné ředění akalabrutinibu a ibrutinibu (Tab. 7). Pro ředění byla připravena řada čtyř Eppendorf zkumavek. Do první zkumavky bylo napipetováno 1 973  $\mu$ l média obsahujícího 1  $\mu$ M DAU a smícháno s 2  $\mu$ l TKI o koncentraci 10 mM. Směs byla důkladně promíchána. Takto byla připravena zkumavka obsahující médium s 10  $\mu$ M TKI a 1  $\mu$ M DAU. Následně bylo z první zkumavky odebráno 975  $\mu$ l a smícháno s 975  $\mu$ l média obsahujícího 1  $\mu$ M DAU. Obdobným způsobem bylo pokračováno při přípravě dalších koncentrací (Tab. 7).

**Tab. 7 Pipetovací schéma pro ředění akalabrutinibu, ibrutinibu**

Koncentrace TKI ( $\mu$ M)	Faktor ředění	Celkový objem ( $\mu$ l)	Objem roztoku obsahujícího TKI ( $\mu$ l) (předchozí koncentrovanější roztok)	Objem média obsahujícího 1 $\mu$ M DAU ( $\mu$ l)
10000,000				
10,000	1000,00	1975,0	2,0	1973,0
5,000	2,00	1950,0	975,0	975,0
1,000	5,00	2250,0	450,0	1800,0
0,500	2,00	1500,0	750,0	750,0

#### 4.2.1.5 Proces inkubace

Po 24-hodinové inkubaci byla destička s transfekovanými buňkami HCT116 přenesena do laminárního boxu, kde bylo před inkubací s připravenými roztoky inhibitorů odsáto veškeré médium pomocí vakuové pumpy, tak aby nedošlo k odsátí adherentních

buněk. Ihned po odsátí média, v čase 0, bylo pipetováno 500  $\mu$ l nového média obsahujícího 1  $\mu$ M DAU bez inhibitoru (neinhibovaná reakce) nebo s inhibitorem o koncentraci 0,5; 1; 5 a 10  $\mu$ M (inhibované reakce) k buňkám transfekovaným pCI\_AKR1C3. Médium obsahující 1  $\mu$ M DAU bez přidaného inhibitoru bylo pipetováno také k buňkám transfekovaným plazmidem pCI (negativní kontrola). Po 2,5 a 5 hodinách inkubace za standardních podmínek byl supernatant kultury přenesen do připravených Eppendorf zkumavek a k adherovaným buňkám na destičce bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 % z Triton X-100), který se nechal působit 10 minut. Poté byl buněčný lyzát odebrán a smíchán se supernatantem ve zkumavce. Následovala dvakrát provedená metabolitová extrakce, kdy ke směsi byl přidán 1 ml etylacetátu, který byl po dobu 20 minut třepán na třepáčce. Poté byly směsi odstředěny v centrifuze po dobu 2 minut při 14 500 rpm. Odstředěná organická fáze se shromáždila a odpařila ve vakuu při 37 °C, odpařené vzorky byly následně zamrazeny.

#### **4.2.1.6 Příprava vzorku na UHPLC**

Před analýzou pomocí UHPLC byly vzorky nejprve rozmrazeny. Poté bylo přidáno 50  $\mu$ l UHPLC mobilní fáze (HCOOH:ACN v poměru (v/v) 74:26), ve které byly vzorky rozpuštěny. Takto připravený vzorek byl přepipetován do vialek.

#### **4.2.1.7 Analýza pomocí UHPLC**

Daunorubicinol vytvořený enzymatickou přeměnou DAU byl detekován pomocí chromatografického systému. Pro analýzu byl využit UHPLC Agilent 1 290 Series, který byl vybaven kolonou Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 x 50 mm; 1,8  $\mu$ m) a Infinity 1 290 filtrem.

Nastavené parametry byly následující: isokratická eluce, průtoková rychlost 0,7 ml/min, mobilní fáze: 0,1 % kyselina mravenčí/acetonitril v poměru 74:26 (v/v), teplota 40 °C, detektor: fluorescenční detektor (excitační vlnová délka 480 nm, emisní vlnová délka 560 nm). Objem nástřiku vzorku na kolonu činil 10  $\mu$ l.

Vyhodnocovaným kvalitativním parametrem byl retenční čas, jehož hodnota je specifická pro daunorubicinol. Kvantitativním parametrem zde byla koncentrace, která byla počítána porovnáním hodnoty plochy pod píkem daunorubicinolu s kalibrační křivkou.

## **4.2.2 Experimenty na buněčné linii KG1 $\alpha$**

### **4.2.2.1 Kultivace**

Buňky lidské kostní dřeně s akutní myeloidní leukémií (KG1 $\alpha$ ) byly kultivovány v kultivačním médiu IDMEM (Iscove's DMEM), které bylo z 20 % doplněno o teplem inaktivované FBS, dále o L-glutamin (2 mM) a antibiotika (penicilin, streptomycin, amfotericin B). Kultivace probíhala v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

### **4.2.2.2 Pasážování**

Podobně jako v předchozím experimentu s HCT116 buňkami je nutno buňkám měnit médium. Při pasážování se opět pracovalo ve vysterilizovaném laminárním boxu. Nejprve byl celý obsah kultivační lahvičky přenesen do odpovídající falkonky a stočen na centrifuze (750 rpm/5 min). Následně bylo odsáto veškeré staré médium. K buňkám na dně falkonky bylo přidáno malé množství nového kultivačního média a buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky pod mikroskopem. Pro následnou kultivaci buněk bylo do nové kultivační lahvičky přeneseno takové množství suspenze, že výsledná koncentrace buněk v nové lahvičce byla 100 000 buněk v 1 ml média. Takto připravená lahvička byla lehce promísena a přenesena do inkubátoru, kde byla dále inkubována za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

### **4.2.2.3 Test cytotoxicity na buněčné linii KG1 $\alpha$**

#### **Nasazení buněčné linie KG1 $\alpha$**

Před samotným experimentem byly buňky KG1 $\alpha$  nasazeny na 96-jamkovou destičku. Množství suspenze buněk nasazené na destičku bylo taktéž vypočítáno pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Buněčná suspenze byla nanášena na 96-jamkovou destičku, kdy do každé jamky bylo pipetováno 50  $\mu$ l v koncentraci 20 000 buněk/50  $\mu$ l. Nakonec byla destička popsána a vložena do inkubátoru. Buňky byly nasazeny v den experimentu.

## **Příprava inhibitorů pro kombinační studie a proces inkubace**

Roztoky pro kombinační studie byly připravovány v laminárním boxu v den experimentu, aby nedošlo k jejich degradaci.

KG1 $\alpha$  patří mezi suspenzní buněčné linie. U těchto linií nelze odebrat médium a vyměnit jej za médium obsahující studovanou látku. Z tohoto důvodu bylo v průběhu experimentu nutné k 50  $\mu$ l buněčné suspenze KG1 $\alpha$  nasazené na 96-jamkové destičce přidat 50  $\mu$ l média obsahující studovanou látku ve dvojnásobné koncentraci.

Nejprve byly připraveny tři 5 ml Eppendorf zkumavky obsahující médium s akalabrutinibem v koncentraci 1, 2 a 10  $\mu$ M a jedna 5 ml Eppendorf zkumavka s ibrutinibem v koncentraci 1  $\mu$ M. Takto připravené roztoky byly dále použity pro postupné ředění DAU (Tab. 8).

V první zkumavce bylo smícháno 781,7  $\mu$ l média obsahujícího TKI s 1,6  $\mu$ l DAU (1 mM) a vzniklá směs byla důkladně promíchána. Z této zkumavky bylo odebráno 483,3  $\mu$ l a pipetováno do druhé zkumavky obsahující 161,1  $\mu$ l média s TKI. Do každé další mikrozkušavky bylo následně pipetováno předepsané množství směsi z předchozí mikrozkušavky a smícháno s médiem obsahujícím TKI podle Tabulky 8.

Kromě kombinačních studií byl testován také vliv samotného DAU, jehož jednotlivé koncentrace byly připraveny podle Tabulky 8. Na rozdíl od kombinačních studií zde bylo využito čisté médium bez přídavku inhibitoru. Měření bylo také samotný TKI, který byl podobně jako samotný DAU, ředěn čistým médiem. Pro ředění byl využit zásobní roztok inhibitoru (10 mM). Ředící schéma je popsáno v Tabulce 9.

K nasazeným buňkám na 96-jamkové destičce bylo pipetováno 50  $\mu$ l výše připravených roztoků. Testována byla také 100 % viabilita buněk (pozitivní kontrola), kdy bylo pipetováno 50  $\mu$ l čistého média a 0 % viabilita buněk (negativní kontrola), která byla tvořena 10% DMSO, tato koncentrace je dostatečná pro uhynutí všech buněk. Takto připravená destička byla inkubována 72 h v inkubátoru při standardních podmínkách.

**Tab. 8 Pipetovací schéma pro ředění DAU**

Koncentrace DAU ( $\mu\text{M}$ )	Faktor ředění	Celkový objem ( $\mu\text{l}$ )	Objem roztoku obsahujícího DAU ( $\mu\text{l}$ ) (předchozí koncentrovanější roztok)	Objem čistého média nebo média s TKI ( $\mu\text{l}$ )
1000,000				
2,000	500,00	783,3	1,6	781,7
1,500	1,33	644,4	483,3	161,1
1,000	1,50	516,6	344,4	172,2
0,500	2,00	433,2	216,6	216,6
0,200	2,50	333,0	133,2	199,8
0,020	10,00	330,0	33,0	297,0
0,002	10,00	300,0	30,0	270,0

**Tab. 9 Pipetovací schéma pro ředění akalabrutinibu, ibrutinibu**

Koncentrace TKI ( $\mu\text{M}$ )	Faktor ředění	Celkový objem ( $\mu\text{l}$ )	Objem roztoku obsahujícího TKI ( $\mu\text{l}$ ) (předchozí koncentrovanější roztok)	Objem čistého média ( $\mu\text{l}$ )
10000,000				
20,000	500,00	355,8	0,7	355,1
2,000	10,00	558,3	55,8	502,5
1,000	2,00	516,6	258,3	258,3
0,500	2,00	433,2	216,6	216,6
0,200	2,50	333,0	133,2	199,8
0,020	10,00	330,0	33,0	297,0
0,002	10,00	300,0	30,0	270,0

**Cytotoxický test – XTT**

Cytotoxický test XTT je kolorimetrickou metodou, která využívá tetrazoliové barvivo (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfenyl)-(2H)-tetrazolium-5-karboxanilid) pro kvantifikaci viability buněk. Principem testu je měření buněčné metabolické aktivity neboli měření schopnosti životaschopných buněk metabolizovat barvivo na rozpustný, oranžově zbarvený derivát. Používá se pro měření buněčné proliferace či nepřímému měření inhibice buněčného růstu (cytotoxicity), jako je kvantifikace účinku chemoterapeutických přípravků (Internet 9).

Po 72-hodinové inkubaci bylo k buňkám připipetováno 50  $\mu$ l směsi roztoku XTT a fenazinmethosulfát (PMS) dle instrukcí výrobce kitu. XTT roztok byl připraven z práškové formy XTT a pufru PBS (4 mg XTT ve 4 ml PBS). Roztok PMS je přidáván pro zvýšení citlivosti testu.

Kvantifikace probíhala pomocí spektrofotometru Tecan při vlnové délce 492 nm. Absorbance pozadí byla změřena při vlnové délce 690 nm a odečtena. Měřená intenzita absorbance je přímo úměrná množství životaschopných buněk. K vyhodnocení získaných dat byly použity programy Excel a GraphPadPrism 8.0.1. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

### **Statistická analýza**

Ke statistickému vyhodnocení získaných dat byl použit GraphPad Prism verze 8.0.1. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). K získání hodnot  $p$  byl použit nepárový  $t$ -test s Welchovou korekcí,  $*p \leq 0,05$  statisticky významná změna;  $ns$  statisticky nevýznamná změna.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 VLIV AKALABRUTINIBU A IBRUTINIBU NA REDUKCI DAUNORUBICINU U BUNĚČNÉ LINIE HCT116 EXPRIMUJÍCÍ AKR1C3

Cílem experimentu bylo zjistit, zda akalabrutinib a ibrutinib mohou inhibovat redukci DAU katalyzovanou enzymem AKR1C3 na buněčné úrovni. HCT116 transfekované plazmidem pCI\_AKR1C3 byly inkubovány s 1  $\mu$ M DAU (neinhibovaná reakce) nebo s 1  $\mu$ M DAU a TKI o koncentracích 0,5–10  $\mu$ M (inhibovaná reakce). Jednotlivé reakce byly testovány v triplicátu. Jako kontrola endogenního metabolismu buněk HCT116 byly použity buňky transfekované prázdným plazmidem pCI, které byly inkubovány s 1  $\mu$ M DAU.

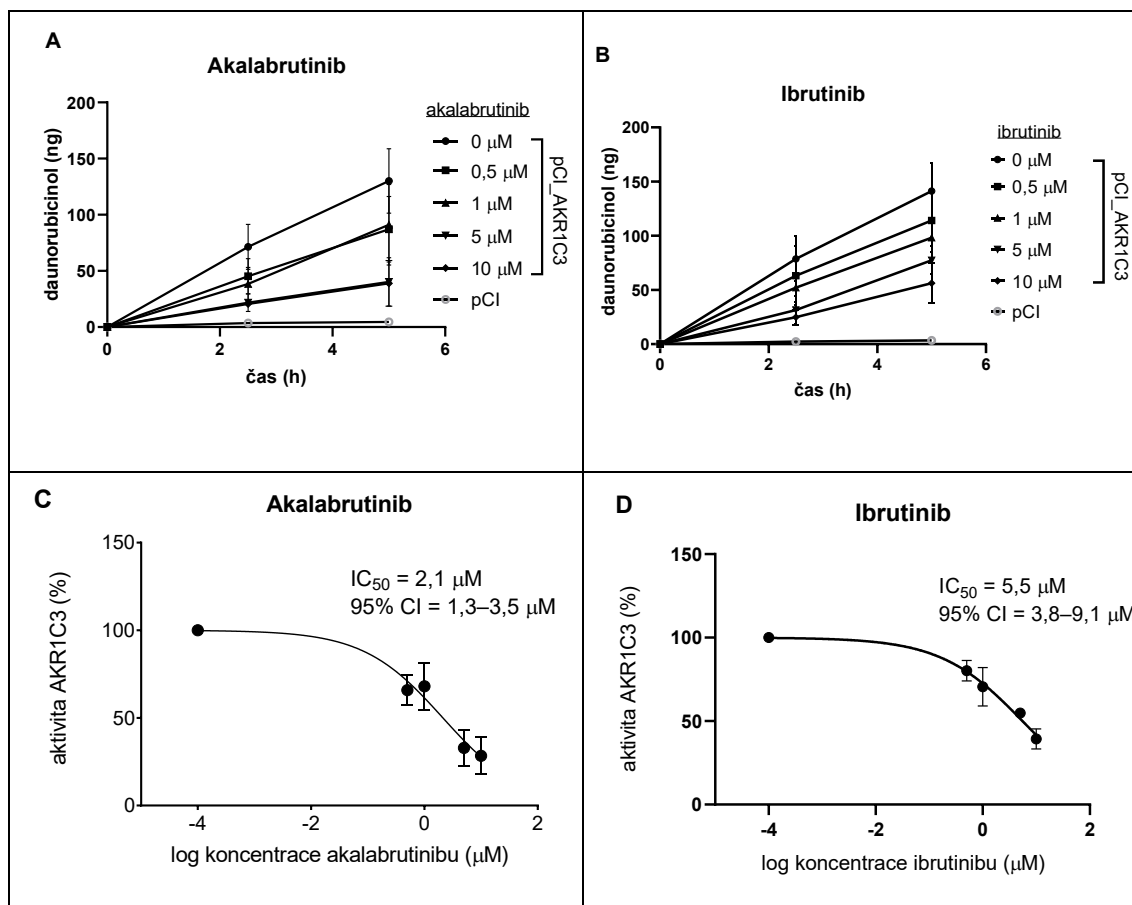
Inkubace byly ukončeny po 2,5 a 5 hodinách. Průměr z naměřených hodnot včetně směrodatných odchylek získaných ze tří nezávislých pokusů je uveden v Tabulce 10 a na obrázku 8. U pětihodinové inkubace byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub>. Množství daunorubicinolu (ng) (Obr. 8 A, B) bylo převedeno na procenta a v programu GrapPad byla spočítána hodnota IC<sub>50</sub> (Obr. 8 C, D). Za 100% aktivitu AKR1C3 bylo považováno množství daunorubicinolu vzniklého po 5 hodinách u neinhibované reakce u buněk transfekovaných pCI\_AKR1C3.

**Tab. 10 Vliv akalabrutinibu a ibrutinibu na množství daunorubicinolu získaného redukcí DAU u buněčné linie HCT116 se zvýšenou expresí AKR1C3**

Koncentrace inhibitoru ( $\mu$ M)	Množství daunorubicinolu (ng)			
	akalabrutinib		ibrutinib	
	2,5 hodiny	5 hodin	2,5 hodiny	5 hodin
0	71,3 $\pm$ 20,1	130,1 $\pm$ 28,6	78,6 $\pm$ 20,8	141,2 $\pm$ 25,8
0,5	45,2 $\pm$ 15,8	87,1 $\pm$ 29,3	63,1 $\pm$ 27,2	114,0 $\pm$ 29,3
1	38,4 $\pm$ 14,7	91,0 $\pm$ 35,9	52,0 $\pm$ 13,0	98,2 $\pm$ 1,9
5	21,7 $\pm$ 7,9	40,3 $\pm$ 21,5	31,4 $\pm$ 12,8	77,3 $\pm$ 12,9
10	20,5 $\pm$ 0*	38,9 $\pm$ 20,3	24,9 $\pm$ 7,0	56,2 $\pm$ 18,6

\* Hodnota byla stanovena pouze v rámci jednoho nezávislého experimentu.





**Obr. 8** Vliv akalabrutinibu a ibrutinibu na redukční metabolismus DAU u transfekované buněčné linie HCT116. Vzorky byly odebrány po 2,5 a 5 hodinách. Množství daunorubicinolu získaného redukcí DAU v ng (A, B). Množství získaného daunorubicinolu (ng) převedené na procenta a použité k výpočtu  $IC_{50}$  (C, D). Za 100% aktivitu bylo považováno množství daunorubicinolu získaného po 5 hodinách u neinhibované reakce u buněk transfekovaných pCI\_AKR1C3.

Z grafu (Obr. 8) je patrné, že množství získaného daunorubicinolu je významně menší po přidání inhibitoru. V obou případech klesá množství vzniklého daunorubicinolu nepřímo úměrně se zvyšující se koncentrací přidaného inhibitoru.

## 5.2 STANOVENÍ VLIVU DAUNORUBICINU, AKALABRUTINIBU A IBRUTINIBU NA VIABILITU BUNĚČNÉ LINIE KG1A

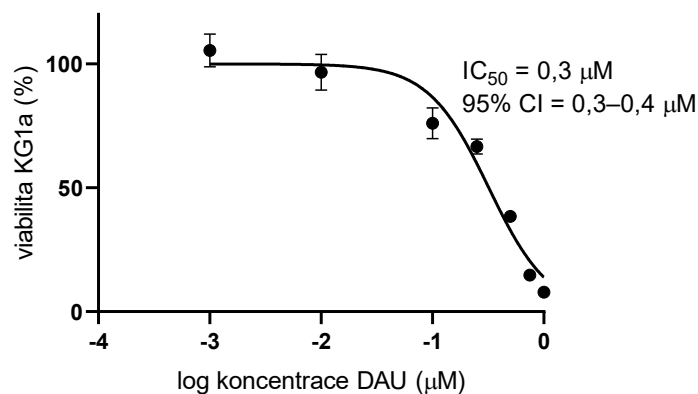
Stanovení vlivu studovaných látek na viabilitu buněk KG1 $\alpha$  bylo zjišťováno pomocí testu XTT. Nejprve bylo nutné zvolit vhodné kombinace studovaných látek a zjistit optimální koncentrace pro testování. DAU byl testován v koncentracích 0,001–1  $\mu$ M a pro inhibitory byla zvolena koncentrace v rozsahu 0,01–10  $\mu$ M. Buňky KG1 $\alpha$  byly se studovanými látkami inkubovány po dobu 72 hodin a poté byl proveden XTT test. Jako kontrola 100 % viability bylo k buňkám pipetováno čisté médium. Pro kontrolu 0 % viability buněk byl zvolen 10% DMSO. Všechny koncentrace byly testovány v tetraplikátu. Prezentované výsledky jsou průměrem  $\pm$  směrodatná odchylka (SD) pouze z jednoho nezávislého experimentu.

### 5.2.1 Daunorubicin

Tab. 11 Vliv DAU na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$

Koncentrace DAU ( $\mu$ M)	Viabilita buněk (%)
0,001	105,5 $\pm$ 6,7
0,01	96,7 $\pm$ 7,2
0,1	76,0 $\pm$ 6,2
0,25	66,7 $\pm$ 3,0
0,5	38,5 $\pm$ 1,1
0,75	14,8 $\pm$ 0,9
1	7,9 $\pm$ 0,4

Z grafu (Obr. 9) je patrné, že s rostoucí koncentrací DAU došlo k poklesu viability buněk KG1 $\alpha$ . Při použití 0,5  $\mu$ M koncentrace DAU klesla viabilita buněčné linie pod 50 %, bylo tedy možné stanovit střední inhibiční koncentraci IC<sub>50</sub>.



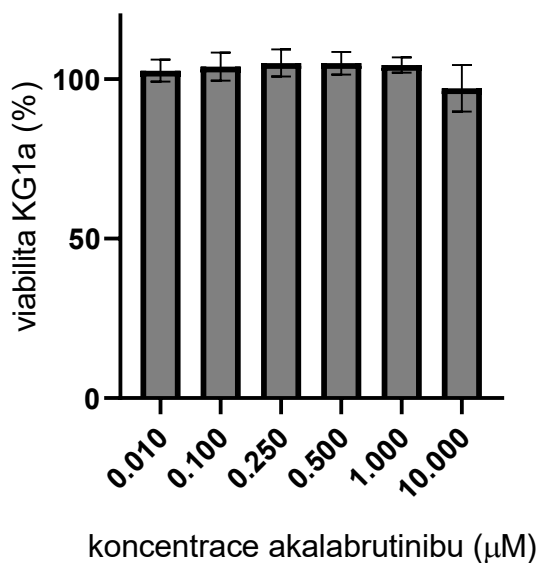
**Obr. 9** Vliv DAU na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ . Data byla vyhodnocena pomocí XTT testu. Prezentované výsledky jsou průměrem  $\pm$  SD pouze z jednoho nezávislého experimentu.

## 5.2.2 Akalabrutinib

**Tab. 12** Vliv akalabrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$

Koncentrace akalabrutinibu ( $\mu\text{M}$ )	Viabilita buněk (%)
0,01	102,7 $\pm$ 3,5
0,1	104,0 $\pm$ 4,4
0,25	105,1 $\pm$ 4,3
0,5	105,0 $\pm$ 3,6
1	104,5 $\pm$ 2,4
10	97,2 $\pm$ 7,3

Akalabrutinib nevykazoval významný vliv na viabilitu buněk. Z grafu (Obr.10) je patrné, že žádná koncentrace akalabrutinibu nesnížila viabilitu KG1 $\alpha$  pod 50 %, proto nebylo možné stanovit  $IC_{50}$ .



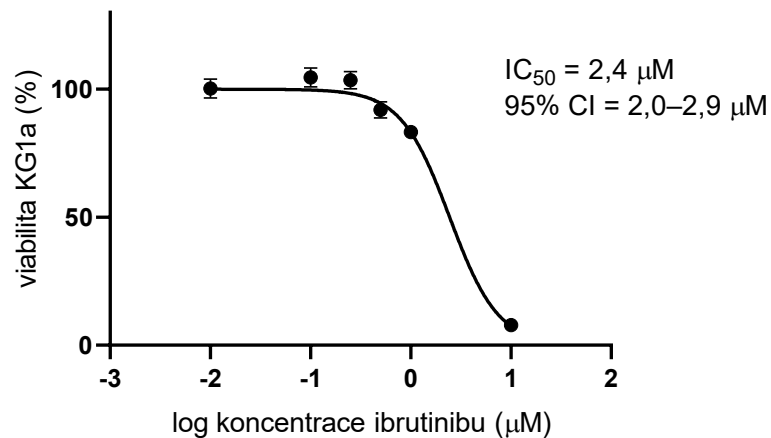
**Obr. 10** Vliv akalabrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1α. Data byla vyhodnocena pomocí XTT testu. Prezentované výsledky jsou průměrem ± SD pouze z jednoho nezávislého experimentu.

### 5.2.3 Ibrutinib

**Tab. 13** Vliv ibrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1α

Koncentrace ibrutinibu (µM)	Viabilita buněk (%)
0,01	100,2 ± 3,7
0,1	104,6 ± 3,8
0,25	103,5 ± 3,4
0,5	93,0 ± 2,7
1	83,2 ± 1,5
10	7,8 ± 0,7

Graf (Obr. 11) zobrazuje vliv ibrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1α. Z výsledků je patrné, že ibrutinib snižuje viabilitu buněk. Při použití ibrutinibu v 10 µM koncentraci klesla viabilita buněk pod 50 %, bylo tedy možné stanovit střední inhibiční koncentraci IC<sub>50</sub>.



**Obr. 11** Vliv ibrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1α. Data byla vyhodnocena pomocí XTT testu. Prezentované výsledky jsou průměrem ± SD pouze z jednoho nezávislého experimentu.

Na základě zjištěných dat byly pro kombinační studie zvoleny následující koncentrace inhibitorů. Pro akalabrutinib byly zvoleny koncentrace 0,5; 1 a 5 μM a pro ibrutinib 0,5 μM. Jedná se o koncentrace, které nesnižují viabilitu buněk KG1α o více než 10 % a zároveň inhibovaly AKR1C3 v našich pokusech s transfekovanými buňkami HCT116.

## 5.3 KOMBINAČNÍ STUDIE

Cílem kombinačních studií bylo porovnat vliv samotného DAU s vlivem kombinace DAU a TKI u buněk KG1 $\alpha$ . Je známo, že buněčná linie KG1 $\alpha$  exprimuje AKR1C3 (Birtwistle et al., 2009). V předchozím experimentu s buňkami HCT116 transfekovanými pCI\_AKR1C3 bylo zjištěno, že akalabrutinib i ibrutinib inhibují přeměnu DAU na daunorubicinol. Lze tedy předpokládat, že studované TKI by mohly inhibovat AKR1C3 i u buněčné linie KG1 $\alpha$  a zvýšit tak účinnost DAU.

### 5.3.1 Akalabrutinib

V rámci experimentu byl porovnáván vliv samotného DAU (0,001–1  $\mu$ M) a jeho kombinace s akalabrutinibem (0,5; 1 a 5  $\mu$ M) na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ . Koncentrace akalabrutinibu byly zvoleny na základě výsledků předchozího experimentu.

Testován byl opět také vliv samotného akalabrutinibu. KG1 $\alpha$  byly se studovanými látkami inkubovány po dobu 72 hodin. Viabilita buněk KG1 $\alpha$  byla vyhodnocena pomocí testu XTT. Přehled zvolených koncentrací a jejich inhibiční účinek je uveden v Tabulce 14 (akalabrutinib) a 15 (DAU a kombinace DAU s akalabrutinibem) a znázorněn v grafech (Obr. 12, 13 a 14). Data v tabulkách a grafech jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých měření.

**Tab. 14 Vliv akalabrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$**

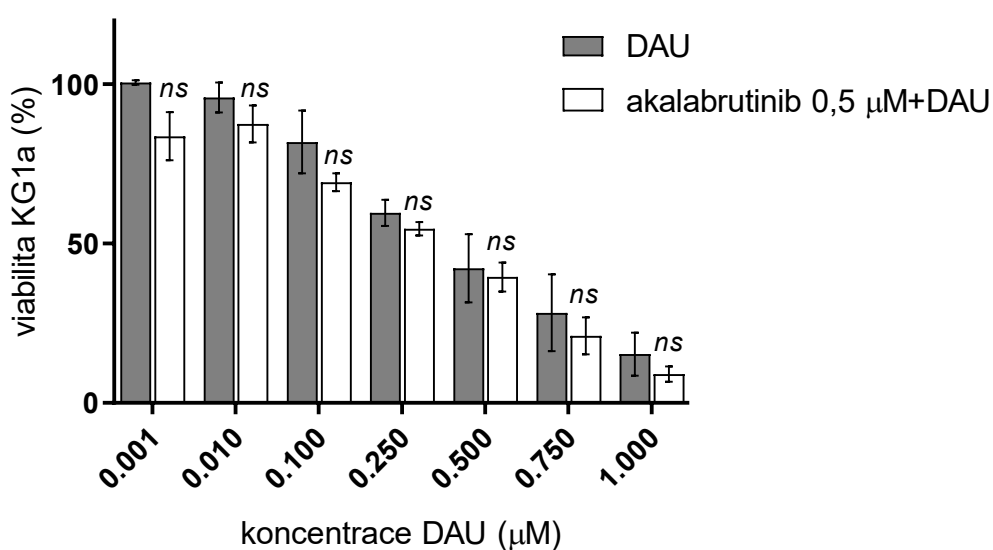
Koncentrace akalabrutinibu ( $\mu$ M)	Viabilita buněk (%)
0,1	97,5 $\pm$ 11,8
0,5	99,1 $\pm$ 1,65
1	103,8 $\pm$ 7,9
5	93,5 $\pm$ 5,8
10	86,7*
30	75,2*
50	70,3*

\* Vyhodnoceno v rámci jednoho nezávislého experimentu. Koncentrace, které byly využity pro kombinační studie s DAU jsou v tabulce zvýrazněny.

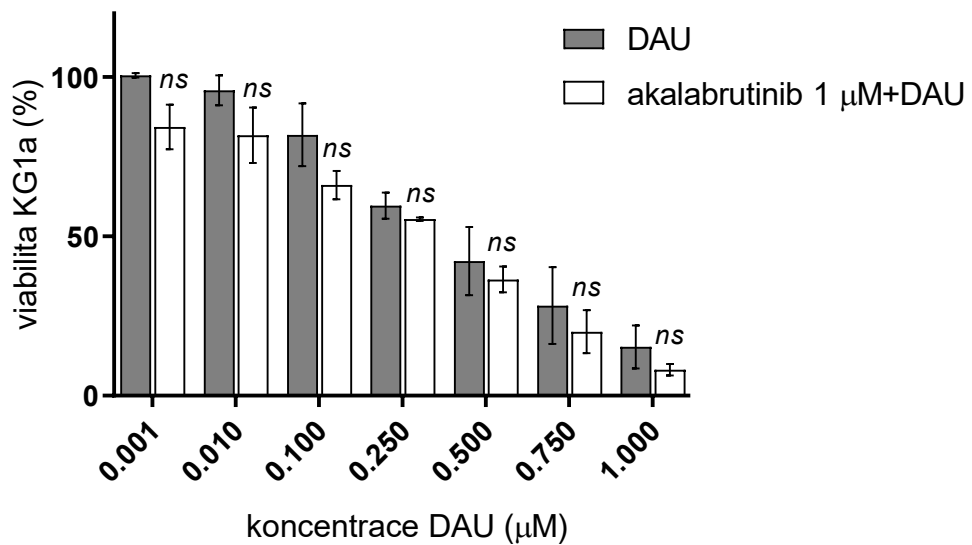
**Tab. 15** Vliv DAU a jeho kombinací s akalabrutinibem na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$

Koncentrace DAU ( $\mu$ M)	Viabilita buněk (%)				
	DAU	akalabrutinib 0,5 $\mu$ M + DAU	akalabrutinib 1 $\mu$ M + DAU	akalabrutinib 5 $\mu$ M + DAU	akalabrutinib 5 $\mu$ M + DAU korigováno*
0,001	100,6 $\pm$ 0,7	83,7 $\pm$ 7,6	84,3 $\pm$ 7,0	86,0 $\pm$ 7,7	92,5 $\pm$ 7,7
0,01	95,9 $\pm$ 4,7	87,5 $\pm$ 5,8	81,7 $\pm$ 8,7	80,7 $\pm$ 3,7	87,2 $\pm$ 3,7
0,1	81,9 $\pm$ 9,8	69,3 $\pm$ 2,8	66,1 $\pm$ 4,5	60,3 $\pm$ 4,4	66,8 $\pm$ 4,4
0,25	59,6 $\pm$ 4,1	54,7 $\pm$ 2,1	55,4 $\pm$ 0,5	48,7 $\pm$ 1,4	55,2 $\pm$ 1,4
0,5	42,3 $\pm$ 10,7	39,5 $\pm$ 4,5	36,5 $\pm$ 4,1	26,8 $\pm$ 4,7	33,3 $\pm$ 4,7
0,75	28,3 $\pm$ 12,1	21,0 $\pm$ 5,8	20,1 $\pm$ 6,7	9,6 $\pm$ 2,6	16,1 $\pm$ 2,6
1	15,3 $\pm$ 6,7	9,0 $\pm$ 2,4	8,2 $\pm$ 1,8	4,3 $\pm$ 1,8	10,8 $\pm$ 1,8

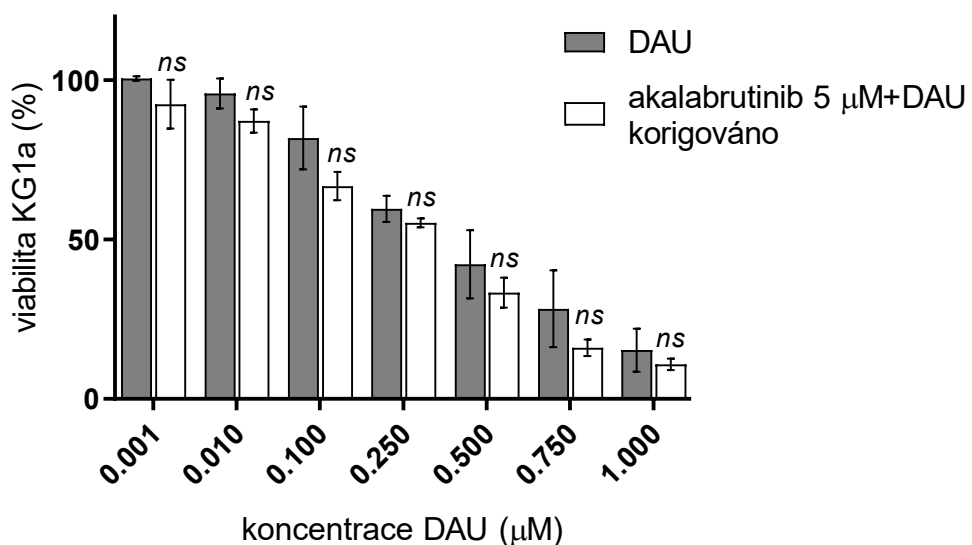
\* Samotný akalabrutinib o koncentraci 5  $\mu$ M snižuje viabilitu KG1 $\alpha$  o 6,5 %. Bylo proto nutné výsledky kombinační studie akalabrutinib 5  $\mu$ M + DAU zkorigovat o tuto hodnotu.



**Obr. 12** Vliv DAU a jeho kombinace s 0,5  $\mu$ M akalabrutinibem na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ . Data byla vyhodnocena pomocí XTT testu. Prezentované výsledky jsou průměrem  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů. Statistická analýza byla provedena pomocí programu GraphPadPrism 8.0.1. (nepárový *t*-test s Welchovou korekcí, *ns* statisticky nevýznamná změna).



**Obr. 13** Vliv DAU a jeho kombinace s 1  $\mu\text{M}$  akalabrutinibem na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ . Data byla vyhodnocena pomocí XTT testu. Prezentované výsledky jsou průměrem  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů. Statistická analýza byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1. (nepárový *t*-test s Welchovou korekcí, *ns* statisticky nevýznamná změna).



**Obr. 14** Vliv DAU a jeho kombinace s 5  $\mu\text{M}$  akalabrutinibem na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ . Graf zobrazuje korigované výsledky, jelikož samotný 5  $\mu\text{M}$  akalabrutinib snižuje viabilitu buněčné linie o 6,5 %. Prezentované výsledky jsou průměrem  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů. Data byla vyhodnocena pomocí XTT testu. Statistická analýza byla provedena pomocí programu GraphPadPrism 8.0.1. (nepárový *t*-test s Welchovou korekcí, *ns* statisticky nevýznamná změna).



Z grafů (Obr. 12–14) je patrné, že při použití testovaných kombinací DAU s akalabrutinibem nedochází ke statisticky významným změnám ve viabilitě KG1 $\alpha$  oproti samotnému DAU.

### 5.3.2 Ibrutinib

V rámci experimentu byl porovnáván vliv samotného DAU (0,001–1  $\mu$ M) a jeho kombinace s ibrutinibem (0,5  $\mu$ M) na viabilitu buněk KG1 $\alpha$ . Testované koncentrace byly zvoleny na základě výsledků předchozího experimentu. Kromě DAU a jeho kombinace s ibrutinibem byl také testován vliv samotného ibrutinibu. Buňky KG1 $\alpha$  byly se studovanými látkami inkubovány po dobu 72 hodin. Viabilita buněk KG1 $\alpha$  byla vyhodnocena pomocí testu XTT. Data v tabulkách a grafech jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka ze čtyř nezávislých měření. Přehled testovaných koncentrací a jejich vliv na KG1 $\alpha$  je uveden v Tabulce 16 (ibrutinib) a 17 (DAU a kombinace DAU s ibrutinibem) a znázorněn v grafu (Obr. 15).

**Tab. 16 Vliv ibrutinibu na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$**

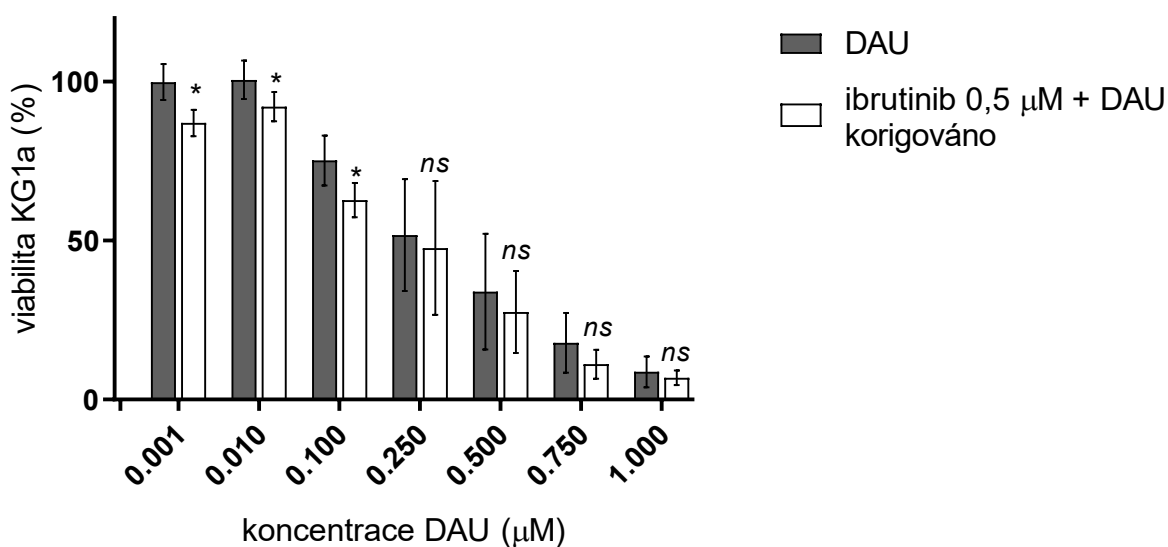
Koncentrace ibrutinibu ( $\mu$ M)	Viabilita buněk (%)
0,1	103,3 $\pm$ 8,0
0,25	103,2 $\pm$ 3,8
0,5	96,9 $\pm$ 2,7
0,75	95,5 $\pm$ 6,7
1	85,3 $\pm$ 6,0
2,5	54,3 $\pm$ 9,4
5	22,5 $\pm$ 4,3
7,5	14,0*
10	15,9 $\pm$ 9,7
15	12,8*
30	10,3*
50	3,5*

\* Vyhodnoceno v rámci jednoho nezávislého měření, není proto uvedena směrodatná odchylka. Koncentrace, která byla využita pro kombinační studie s DAU je v tabulce zvýrazněna.

**Tab. 17** Vliv DAU a jeho kombinace s 0,5  $\mu\text{M}$  ibrutinibem na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$

Koncentrace DAU ( $\mu\text{M}$ )	Viabilita buněk (%)		
	DAU	ibrutinib 0,5 $\mu\text{M}$ + DAU	ibrutinib 0,5 $\mu\text{M}$ + DAU korigováno*
0,001	99,9 $\pm$ 5,6	84,0 $\pm$ 4,2	87,0 $\pm$ 4,2
0,01	100,6 $\pm$ 6,0	89,2 $\pm$ 4,6	92,2 $\pm$ 4,6
0,1	75,2 $\pm$ 7,9	59,8 $\pm$ 5,4	62,8 $\pm$ 5,4
0,25	51,8 $\pm$ 17,6	44,7 $\pm$ 21,0	47,7 $\pm$ 21,0
0,5	33,9 $\pm$ 18,2	24,5 $\pm$ 12,9	27,5 $\pm$ 12,9
0,75	17,9 $\pm$ 9,4	8,1 $\pm$ 4,6	11,1 $\pm$ 4,6
1	8,7 $\pm$ 4,9	3,9 $\pm$ 2,3	6,9 $\pm$ 2,3

\* Samotný ibrutinib o koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  snižuje viabilitu KG1 $\alpha$  o 3 %. Výsledky kombinační studie ibrutinib 0,5  $\mu\text{M}$  + DAU byly tedy o tuto hodnotu upraveny.



**Obr. 15** Vliv DAU a jeho kombinace s 0,5  $\mu\text{M}$  ibrutinibem na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ . Graf zobrazuje korigované výsledky, jelikož samotný 0,5  $\mu\text{M}$  ibrutinib snižuje viabilitu buněčné linie o 3 %. Data byla vyhodnocena pomocí XTT testu. Prezentované výsledky jsou průměrem  $\pm$  SD ze čtyř nezávislých experimentů. Statistická analýza byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1. (nepárový *t*-test s Welchovou korekcí, \* $p \leq 0,05$  statisticky významná změna; *ns* statisticky nevýznamná změna).

Z grafu (Obr. 15) je patrné, že 0,5  $\mu\text{M}$  ibrutinib zvyšuje citlivost KG1 $\alpha$  vůči všem koncentracím DAU. Statisticky významná změna oproti samotnému DAU byla však pozorována pouze v případě kombinace 0,5  $\mu\text{M}$  ibrutinibu s 0,001; 0,01 a 0,1  $\mu\text{M}$  DAU.

## 6 DISKUZE

Antracykliny patří mezi jedny z nejvíce využívaných chemoterapeutických přípravků v léčbě hematologických onemocnění. Jsou účinná proti širokému spektru maligních onemocnění včetně leukémií. Jejich použití v terapii je však omezeno především pro jejich nežádoucí kardiotoxické účinky a rychle se rozvíjejí buněčné rezistence (Shaul et al., 2013). Na mechanismu vzniku se mimo jiné podílejí také karbonylredukující enzymy, které metabolizují antracykliny na příslušné alkoholy. Sekundární alkoholové deriváty mají významně snížený cytotoxický účinek vůči maligním buňkám a zároveň jsou toxičtější než primární antracykliny (Edwardson et al., 2015).

Bylo prokázáno, že mezi karbonylredukující enzymy podílející se na metabolismu antracyklinů patří nadrodina aldo-ketoreduktáz (AKR) a karbonylreduktáza 1 (CBR1) patřící do nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR). Bains et al. (2010, 2013) ve svých studiích porovnával enzymy z nadrodiny AKR i SDR vůči DAU i DOX. Aktivita byla sledována u enzymu AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2, CBR1 a CBR4. U obou studií byla prokázána schopnost těchto enzymů metabolizovat DAU i DOX. Nejvyšší aktivita byla naměřena u enzymů AKR1C3 a CBR1. Na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, v pracovní skupině pana profesora Wsóla, byla taktéž zkoumána celá řada enzymů z nadrodiny AKR i SDR vůči DAU. Výsledné studie prokázaly aktivitu vůči DAU u enzymů CBR1, AKR1A1, AKR1C3, AKR7A2, AKR1B1 a AKR1B10 na úrovni rekombinantních enzymů (Hudáčová 2019, Tomanová 2019). Tyto studie se shodují s výsledky studií Bains. Uvedené enzymy mají schopnost metabolizovat DAU na méně účinný daunorubicinol, přičemž AKR1C3 patří společně s CBR1 a AKR1A1 mezi nejvíce aktivní daunorubicinreduktázy.

Hofman et al. (2014) se ve své studii zabýval rezistencí maligních buněk na DAU a idarubicin. Poukázal na roli enzymu AKR1C3 v metabolismu DAU a idarubicinu v maligních buňkách. Demonstroval schopnost AKR1C3 snižovat cytotoxický účinek DAU, čímž dochází ke zvýšení rezistence maligních buněk vůči chemoterapeutické léčbě. Současně také prokázal pozitivní vliv na rezistenci buněk vůči DAU podáním specifického inhibitoru AKR1C3 2' hydroxyflavanonu. Rezistencí leukemických buněk se zabýval Matsunaga et al. (2014). Ve své studii popisuje klíčovou roli enzymů AKR1C1 a AKR1C3 při vzniku rezistence leukemických buněk vůči DAU. Takahashi et al. (2008)

zkoumal aktivitu rekombinantních enzymů AKR1A1 a AKR1C2 v metabolismu DAU i DOX. Z výsledků je patrné, že AKR1C2 není zapojen do redukce antracyklinů, zatímco AKR1A1 tyto reakce katalyzoval.

Znalost metabolismu antracyklinů poskytla významný přínos v oblasti protinádorových účinků a jejich toxických vedlejších účinků. Na základě této skutečnosti vznikají nové přístupy v terapii maligních onemocnění. Jedním z nich je využití inhibitorů antracyklinredukujících enzymů (Edwardson et al., 2015).

Existuje celá řada inhibitorů, které mají schopnost inhibovat antracyklinredukující enzymy. Můžeme mezi nimi nalézt jak chemická léčiva, tak i látky přírodního původu. Z flavonoidů jsou účinnými inhibitory apigenin, luteolin a 7-hydroxyflavon vůči enzymu AKR1B10 (Zemanová et al., 2015). Příkladem syntetických inhibitorů, se schopností inhibovat antracyklinredukující enzymy, je tolrestat, epalrestat či zopolrestat (Zhang et al., 2013).

V rámci této diplomové práce jsme se zabývali studiem enzymu AKR1C3, který je zapojen nejen v metabolismu antracyklinových léčiv (Bains et al. 2013), ale také se účastní několika maligních onemocnění, např. nádorového onemocnění prostaty (Dozmorov et al., 2010). Neustále jsou zkoumány nové struktury, které by mohly mít vůči AKR1C3 inhibiční účinek. Mezi nejúčinnější inhibitory se řadí nesteroidní antiflogistika, látky se steroidním skeletem (žlučové kyseliny) (Byrns et al., 2011). Z přírodních látek je důležité zmínit flavonoidy hesperetin a morin hydrát či alkaloidy stylopin a tazettin (Lojdová, 2019).

Nedávno bylo zjištěno, že také některé inhibitory proteinkináz jsou schopné inhibovat také redukci DAU na daunorubicinol. Jedním z nich je dinaciclib u něhož byla objevena schopnost inhibovat enzym AKR1C3 (Novotná et al., 2018a). Tento enzym inhibují také roskovitin, purvalanol A (Novotná et al., 2018b). Nejnovější objevenou látkou schopnou inhibovat enzym AKR1C3 je buparlisib, inhibitor fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI3K) (Bukum et al., 2019).

V této diplomové práci jsme se zabývali studiem potenciálních inhibitorů tyrosinkináz (akalabrutinib, ibrutinib) se schopností inhibovat antracyklinredukující enzymy, konkrétně enzymem AKR1C3. Skupina TKI patří z hlediska vlivu na metabolismus DAU mezi nepříliš probádané oblasti. V současnosti není příliš studií, které by se tímto tématem zabývaly. Doposud byly publikovány práce studující vliv akalabrutinibu a ibrutinibu na transportéry (Pepin et al. 2019, Qiu et al. 2018, Rood et al. 2020, Van Hoppe et al. 2018).

Na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, v pracovní skupině pana profesora Wsola bylo provedeno několik studií týkajících se potenciálního vlivu TKI na schopnost karbonylredukujících enzymů redukovat antracykliny. Akalabrutinibu a ibrutinibu se týkaly dvě studie, jejichž výsledky jsou součástí diplomových prací (Hudáčová 2019, Tomanová 2019). V první z nich byly studovány TKI imatinib, nilotinib, dasatinib a akalabrutinib. U všech uvedených TKI byla zjištěna schopnost inhibovat antracyklinredukující enzymy na úrovni rekombinantně připraveného enzymu. Nejvyšší míra inhibice byla prokázána u akalabrutinibu vůči enzymu AKR1C3 a dasatinibu, který inhiboval nejvíce AKR1B10. (Tomanová, 2019). V druhé studii se zaměřili na TKI bosutinib, neratinib a ibrutinib. Nejčastěji a nejintenzivněji byl opět inhibován enzym AKR1C3. Nejvyšší míra inhibice byla zjištěna u ibrutinibu (Hudáčová, 2019).

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda akalabrutinib a ibrutinib mohou inhibovat redukci DAU na méně aktivní daunorubicinol katalyzovanou enzymem AKR1C3 na buněčné úrovni. Konkrétně se jednalo o buněčnou linii HCT116. Tato buněčná linie byla vybrána z toho důvodu, protože se u těchto buněk enzym AKR1C3 přirozeně netvoří (Hofman et al., 2014). Buňky HCT116 byly z tohoto důvodu přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3. Jako kontrola byly použity buňky transfekované prázdným vektorem.

Podobně jako ve studii Hofman et al. (2014), byla zjištěna schopnost vyšší redukce DAU na daunorubicinol u buněk HCT116 transfekovaných plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 než u buněk transfekovaných prázdným plazmidem. Po porovnání získaného množství daunorubicinolu můžeme konstatovat, že oba zvolené TKI měly vliv na aktivitu enzymu AKR1C3 v transfekovaných buňkách HCT116. Významněji došlo k inhibici pomocí akalabrutinibu. U obou TKI byla stanovena hodnota  $IC_{50}$ . Pro akalabrutinib byla naměřena hodnota 2,1  $\mu M$ , ibrutinib vykazoval 50% inhibiční účinek v koncentraci 5,5  $\mu M$ .

Bains et al. (2013) i studie provedené na našem pracovišti prokázaly schopnost karbonylredukujících enzymů, mezi něž řadíme také AKR1C3, redukovat DAU na méně aktivní daunorubicinol. Z výsledků experimentů s rekombinantně připraveným enzymem AKR1C3 (Hudáčová, 2019) a buněčnou linií HCT116 je také patrné, že akalabrutinib a ibrutinib jsou schopny tento enzym inhibovat a snižovat tak jeho aktivitu. Můžeme tedy předpokládat, že kombinací DAU s akalabrutinibem nebo ibrutinibem může docházet

vlivem těchto TKI k inhibici redukčního metabolismu DAU, a tím ke zvýšení jeho cytotoxického účinku a ke snížení množství vzniklého kardiotoxického daunorubicinolu.

V předkládané diplomové práci jsme se dále zabývali stanovením vlivu kombinace DAU s akalabrutinibem či ibrutinibem na viabilitu buněčné linie KG1 $\alpha$ , což je buněčná linie s přirozenou expresí AKR1C3 (Birtwistle et al., 2009). Aby bylo možné vybrat vhodné koncentrace k testování kombinací, byl nejprve testován samotný akalabrutinib, ibrutinib a DAU v různých koncentracích. V případě experimentu s DAU jsme zaznamenali pokles viability buněk. Pokles byl natolik významný, že bylo možné stanovit hodnotu IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub> = 0,3  $\mu$ M). Ibrutinib taktéž vykazoval vliv na viabilitu buněk (IC<sub>50</sub> = 2,4  $\mu$ M). Akalabrutinib v 10  $\mu$ M koncentraci snížil viabilitu KG1 $\alpha$  buněk na 97,2  $\pm$  7,3 %. U akalabrutinibu tedy nebylo možné hodnotu IC<sub>50</sub> stanovit.

Na základě zjištěných poznatků jsme zvolili vhodné koncentrace TKI (akalabrutinib, ibrutinib) a podrobili je experimentu, ve kterém jsme porovnávali vliv samotného DAU s vlivem kombinace DAU a TKI u buněk KG1 $\alpha$ . Z výsledků studie (Obr. 12–14) je patrné, že kombinace DAU (0,001–1  $\mu$ M) s akalabrutinibem (0,5; 1 a 5  $\mu$ M) nesplnila naše očekávání. Při použití testované kombinace nedochází ke statisticky významným změnám ve viabilitě KG1 $\alpha$  oproti samotnému DAU.

Za velmi významný považuji výsledek experimentu kombinační studie DAU s ibrutinibem (0,5  $\mu$ M). Oproti kombinaci DAU s akalabrutinibem vykazuje zvýšenou citlivost buněčné linie KG1 $\alpha$  vůči všem koncentracím DAU. Statisticky významná změna oproti samotnému DAU byla však pozorována pouze v případě kombinace 0,5  $\mu$ M ibrutinibu s 0,001; 0,01 a 0,1  $\mu$ M DAU (Obr. 15). Z výsledků tedy vyplývá, že ibrutinib v kombinaci s DAU je schopen synergického účinku, čímž můžeme dosáhnout podobného účinku i při nižších koncentracích DAU než v případě samotného DAU.

Naše výsledky poukazují na vliv ibrutinibu na aktivitu AKR1C3 a schopnost synergického účinku s DAU. Lze tedy předpokládat, že díky použití nižších koncentrací DAU bychom mohli dosáhnout snížení nežádoucích účinků.

## 7 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce jsme se zabývali studiem inhibitorů tyrosinkináz (akalabrutinib, ibrutinib) se schopností inhibice enzymů z nadrodiny AKR a jejich účinků v kombinaci s DAU.

V souvislosti se zjištěnými výsledky můžeme konstatovat, že stanovené cíle diplomové práce byly splněny.

- Screening inhibiční aktivity akalabrutinibu a ibrutinibu poukázal na schopnost obou TKI inhibovat enzym AKR1C3 s využitím DAU jako substrátu na transfekované buněčné linii HCT116.
- Stanovením hodnoty  $IC_{50}$  jsme zjistili, že významněji došlo k inhibici AKR1C3 pomocí akalabrutinibu. Hodnota  $IC_{50}$ , při které klesla aktivita enzymu na polovinu, byla 2,1  $\mu\text{M}$ .  $IC_{50}$  ibrutinibu byla 5,5  $\mu\text{M}$ .
- Pomocí testu XTT jsme prokázali cytotoxický účinek DAU vůči buněčné linii KG1 $\alpha$ . Vliv na viabilitu buněčné linie jsme prokázali také u ibrutinibu ( $IC_{50} = 2,4 \mu\text{M}$ ). Akalabrutinib ani v námi nejvyšší testované koncentraci (50  $\mu\text{M}$ ) nesnížil viabilitu buněk KG1 $\alpha$  o více než 50 %. Hodnotu  $IC_{50}$  tedy nebylo možné stanovit.
- V rámci kombinační studie byl prokázán synergický účinek kombinace DAU s ibrutinibem. Po přidání ibrutinibu (0,5  $\mu\text{M}$ ) jsme dosáhli zvýšení citlivosti buněčné linie KG1 $\alpha$  vůči všem koncentracím DAU. Statisticky významná změna oproti samotnému DAU však byla pozorována pouze v případě kombinace 0,5  $\mu\text{M}$  ibrutinibu s 0,001; 0,01 a 0,1  $\mu\text{M}$  DAU. Kombinace DAU s akalabrutinibem taktéž zvyšovala citlivost buněk KG1 $\alpha$  vůči všem koncentracím DAU, avšak změna nebyla statisticky významná.

Závěrem lze konstatovat, že ibrutinib v kombinaci s DAU se jeví jako slibný terapeutický přístup, který může zlepšit současnou léčbu maligních onemocnění, snížit výskyt nežádoucích účinků a tím zvýšit bezpečnost antracyklinové terapie.

Na základě našich výsledků by bylo vhodné pokračovat v dalších experimentech a ověřit tyto výsledky *in vivo*.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza
ABL	Abelsonova tyrosinkináza
ACN	acetonitril
AKR	aldo-ketoreduktáza
ALDH	aldehyddehydrogenáza
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
API	ultračistá voda
APL	akutní promyelocytární leukémie
ATP	adenosintrifosfát
BCR	B-buněčný receptor
B-PLL	prolymfocytární leukémie z B-lymfocytů
BTK	Brutonova kináza
CBR	karbonylreduktáza
CD	diferenční skupina „Cluster of differentiation“
CI	konfidenční interval
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
CYP450	cytochrom P450
DAU	daunorubicin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
DOXOL	doxorubicinol
ECACC	(ang.) European Collection of Authenticated Cell Cultures
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EMT	epiteliálně mezenchymální přechod
FAB	Francouzsko-Americko-Britská klasifikace
FAK	fokální adhezni kináza
FBS	fetální bovinní sérum
FGFR	receptor fibroblastového růstového faktoru



GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GFP	Green Fluorescence Protein
GHB	$\gamma$ -hydroxybutyrát
HCL	vlasatobuněčná leukémie
HCOOH	kyselina mravenčí
IC <sub>50</sub>	poloviční maximální inhibiční koncentrace
IDMEM	Iscove's Dulbecco's modified Eagle's medium
inv	inverze
IR	inzulinový receptor
JAK	Janusova kináza
KBV	katedra biochemických věd
MCL	lymfom z plášťových buněk
MDR	dehydrogenáza/reduktáza se středně dlouhým řetězcem
MDS	myelodysplastický syndrom
MPN	myeloproliferativní neoplazie
MPO	myeloperoxidáza
NAD(H)	nikotinamidadeninukleotid
NADP(H)	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NaF	fluorid sodný
NE	nespecifická esteráza
NRTK	nerceptorová tyrosinkináza
ns	statisticky nevýznamná změna
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pAKR1C3	plazmid s genetickou informací pro syntézu AKR1C3
PAS	(ang.) Periodic Acid-Schiff reaction reakce s kyselinou jodistou a Schiffovým činidlem
PBS	fosfátový pufr
pCI	prázdný plazmid
PDGFR	receptor růstového faktoru z destiček
PG	prostaglandiny
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PK	proteinkináza
PKI	inhibitory proteinkináz
PLL	prolymfocytární leukémie

PMS	fenazinmethosulfát
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
QR	chinonreduktáza
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTK	receptorová tyrosinkináza
SBB	sudanová čern B
SD	směrodatná odchylka
SDR	dehydrogenáza/reduktáza s krátkým řetězcem
SRC	protonkogen tyrosin-protein kináza
t	translokace
TK	tyrosinkináza
TKI	inhibitory tyrosinkináz
Top2	topoizomeráza II
Top2 $\alpha$	$\alpha$ izomer topoizomerázy II
Top2 $\beta$	$\beta$ izomer topoizomerázy II
T-PLL	prolymfocytární leukémie z T-lymfocytů
UHPLC	Ultravysokotlaká kapalinová chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace
XTT	kolorimetrický test ke stanovení viability buněk

## 9 ZDROJE

Adam, Z., M. Krejčí a J. Vorlíček. (2008) Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí. 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2502-4; str.: 29–40; 139–145

Alsalem, M.A., A.A. Zaidan, B.B. Zaidan, M. Hashim, H.T. Madhloom, N.D. Azeez a S. Alsyisuf. (2018) A review of the automated detection and classification of acute leukaemia: Coherent taxonomy, datasets, validation and performance measurements, motivation, open challenges and recommendations. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 158, 93–112. DOI: 10.1016/j.cmpb.2018.02.005.

Alves, A. C., D. Ribeiro, M. Horta, J. L. F. C. Lima, C. Nunes a S. Reis. (2017) A biophysical approach to daunorubicin interaction with model membranes: relevance for the drug's biological activity. *Journal of The Royal Society Interface*. 14(133) DOI: 10.1098/rsif.2017.0408.

Alzeer, S. a E. M. Ellis. (2014) Metabolism of gamma hydroxybutyrate in human hepatoma HepG2 cells by the aldo-keto reductase AKR1A1. *Biochemical Pharmacology*. 92(3), 499–505. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.09.004.

Arora, A. a E. M. Scholar. (2005) Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 315(3), 971–979. DOI: 10.1124/jpet.105.084145.

Bain, B. J. a M. C. Béné. (2019) Morphological and Immunophenotypic Clues to the WHO Categories of Acute Myeloid Leukaemia. *Acta Haematologica*. 141(4), 232–244. DOI: 10.1159/000496097.

Bains, O. S., A. Szeitz, J. M. Lubieniecka, G. E. Cragg, T. A. Grigliatti, K. W. Riggs a R. E. Reid. (2013) A Correlation between Cytotoxicity and Reductase-Mediated Metabolism in Cell Lines Treated with Doxorubicin and Daunorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 347(2), 375–387. DOI: 10.1124/jpet.113.206805.

Barski, O. A., S. M. Tipparaju a A. Bhatnagar. (2008) The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 40(4), 553–624. DOI: 10.1080/03602530802431439.

Beck, K. R., T. Kaserer, D. Schuster a A. Odermatt. (2017) Virtual screening applications in short-chain dehydrogenase/reductase research. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 171, 157–177. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.03.008.

Bernstein, D. (2018) Anthracycline Cardiotoxicity. *Circulation Research*. 122(2), 188–190. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312395.

Bhullar, K. S., N. O. Lagarón, E. M. McGowan, I. Parmar, A. Jha, B. P. Hubbard a H. P. V. Rupasinghe. (2018) Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*. 17(1). DOI: 10.1186/s12943-018-0804-2.

Birtwistle, J., R. E. Hayden, F. L. Khanim, et al. (2009) The aldo-keto reductase AKR1C3 contributes to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-3,4-dihydrodiol mediated oxidative DNA damage in myeloid cells: Implications for leukemogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 662(1–2), 67–74. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.12.010.

Bloomfield, C. D., G. Marcucci, K. Döhner a H. Döhner. (2008) Introduction: Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology*. 35(4), 324–325. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2008.04.016.

Bukum, N., E. Novotna, A. Morell, J. Hofman a V. Wsol. (2019) Buparlisib is a novel inhibitor of daunorubicin reduction mediated by aldo-keto reductase 1C3. *Chemico-Biological Interactions*. 302, 101–107. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.01.026.

Byrns M. C., Jin Y., Penning T. M. (2011) Inhibitors of type 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 125, 95–104. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.11.004

Capelôa, T., Z. Benyahia, L. X. Zampieri, M. C.N.M. Blackman a P. Sonveaux. (2020) Metabolic and non-metabolic pathways that control cancer resistance to anthracyclines. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 98, 181–191. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.05.006.

Corsini, A. a M. Bortolini. (2013) Drug-Induced Liver Injury: The Role of Drug Metabolism and Transport. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 53(5), 463–474. DOI: 10.1002/jcph.23.

Cross, M. a C. Dearden. (2019) B and T cell prolymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 32(3), 217–228. DOI: 10.1016/j.beha.2019.06.001.

Dar, A C. a K. M. Shokat. (2011) The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annual Review of Biochemistry*. 80(1), 769–795. DOI: 10.1146/annurev-biochem-090308-173656.

De Kouchkovsky, I. a M. Abdul-hay. (2016) ‘Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update’. *Blood Cancer Journal*. 6(7), e441–e441. DOI: 10.1038/bcj.2016.50.

Dozmorov, M. G, J. T Azzarello, J. D Wren, et al. (2010) Elevated AKR1C3 expression promotes prostate cancer cell survival and prostate cell-mediated endothelial cell tube formation: implications for prostate cancer progression. *BMC Cancer*. 10(1). DOI: 10.1186/1471-2407-10-672.

Edwardson, D., R. Narendrula, S. Chewchuk, K. Mispel-beyer, J. Mapletoft a A. Parissenti. (2015) Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current Drug Metabolism*. 16(6), 412–426. DOI: 10.2174/1389200216888150915112039.

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

Flis, S. a T. Chojnacki. (2019) Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities. *Drug Design, Development and Therapy*. 13, 825–843. DOI: 10.2147/DDDT.S191303.

Gavrin, L. K. a E. Saiah. (2013) Approaches to discover non-ATP site kinase inhibitors. *MedChemComm*. 4(1), 41–51. DOI: 10.1039/C2MD20180A.

Gonzalez B., Akman S., Doroshov J., Rivera H., Kaplan W. D. a Forrest G. L. (1995) Protection against Daunorubicin Cytotoxicity by Expression of a Cloned Human Carbonyl Reductase cDNA in K562 Leukemia Cells. *Cancer Research*, 55(20), 4646–4650. PMID: 7553643

Gonzalez-covarrubias, V., D. Ghosh, S. S. Lakhman, L. Pendyala a J. G. Blanco. (2007) A Functional Genetic Polymorphism on Human Carbonyl Reductase 1

(CBR1 V88I) Impacts on Catalytic Activity and NADPH Binding Affinity. *Drug Metabolism and Disposition*. 35(6), 973–980. DOI: 10.1124/dmd.107.014779.

Haferlach, T., Bacher U., T. Harald a D. Heinz (2014) *Kapesní atlas hematologie: překlad 6., přepracovaného vydání*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4787-3.str.: 130–135

Hallek, M., T. D Shanafelt a B. Eichhorst. (2018) Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. 391(10129), 1524–1537. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30422-7.

Hoefler, C. C., A. Quiñones-lombraña, R. H. Blair a J. G. Blanco. (2016) Role of DNA Methylation on the Expression of the Anthracycline Metabolizing Enzyme AKR7A2 in Human Heart. *Cardiovascular Toxicology*. 16(2), 182–192. DOI: 10.1007/s12012-015-9327-x.

Hoffmann, F. a E. Maser. (2008) Carbonyl Reductases and Pluripotent Hydroxysteroid Dehydrogenases of the Short-chain Dehydrogenase/reductase Superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 39(1), 87–144. DOI: 10.1080/03602530600969440.

Hofman, J., B. Malcekova, A. Skarka, E. Novotna a V. Wsol. (2014) Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: The role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 278(3), 238–248. DOI: 10.1016/j.taap.2014.04.027.

Huang, L., R. He, W. Luo, et al. (2016) Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10 Inhibitors: Potential Drugs for Cancer Treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 11(2), 184–196. DOI: 10.2174/1574892811888160304113346.

Hudáčová L. (2019) Vliv inhibice bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na aktivitu vybraných reduktaz z nadrodiny AKR a SDR. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. Str. 45.

Jang, M., Y. Kim, H. Won, et al. (2012) Carbonyl Reductase 1 Offers a Novel Therapeutic Target to Enhance Leukemia Treatment by Arsenic Trioxide. *Cancer Research*. 72(16), 4214–4224. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1110.

Jiao, Q., L. Bi, Y. Ren, S. Song, Q. Wang a Y. Wang. (2018) Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*. 17(1). DOI: 10.1186/s12943-018-0801-5.

Jin, Y. a T. M. Penning. (2007) Aldo-Keto Reductases and Bioactivation/Detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47(1), 263–292. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105337.

Jordheim, L. P., V. Ribrag, H. Ghesquieres, et al. (2015) Single nucleotide polymorphisms in ABCB1 and CBR1 can predict toxicity to R-CHOP type regimens in patients with diffuse non-Hodgkin lymphoma. *Haematologica*. 100(5), e204–e206. DOI: 10.3324/haematol.2014.120113.

Kavanagh, K. L., H. Jörnvall, B. Persson a U. Oppermann. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, 65(24), 3895–3906. DOI: 10.1007/s00018-008-8588-y.

Kim, J., J. W. Chang, J. K. Park a S. Hwang. (2012) Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53. *Cancer Biology & Therapy*. 13(8), 638–646. DOI: 10.4161/cbt.20081.

Klener, P. (2003) *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén Scripta. 115 stran. ISBN 80-7262-210-2.

Krška, Z., D. Hoskovec a L. Petruželka. (2014) *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024742847. Str.: 1–16

Laffin, B. a J. M. Petrash. (2012) Expression of the Aldo-Ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in Human Cancers. *Frontiers in Pharmacology*. 3. DOI: 10.3389/fphar.2012.00104.

Li J., Y. Guo, L. Duan, et al. (2017) AKR1B10 promotes breast cancer cell migration and invasion via activation of ERK signaling. *Oncotarget*. 8(20). DOI: 10.18632/oncotarget.16624.

Lojdová K. (2019) *Inhibitory lidského enzymu AKR1C3 rostlinného původu*. Rigorózní práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. Str. 60–62.

Malatkova, P., E. Maser a V. Wsol. (2010) Human Carbonyl Reductases. *Current Drug Metabolism*. 11(8), 639–658. DOI: 10.2174/138920010794233530.

Marinello, J., M. Delcuratolo a G. Capranico. (2018) Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(11). DOI: 10.3390/ijms19113480.

Matsunaga, T., S. Shintani a A. Hara. (2006) Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 21(1), 1–18. DOI: 10.2133/dmpk.21.1.

Matsunaga, T., A. Yamaguchi, Y. Morikawa, et al. (2014) Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells. *Anti-Cancer Drugs*. 25(8), 868–877. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000112.

Matsunaga, T., C. Kezuka, Y. Morikawa, et al. (2015) Up-Regulation of Carbonyl Reductase 1 Renders Development of Doxorubicin Resistance in Human Gastrointestinal Cancers. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 38(9), 1309–1319. DOI: 10.1248/bpb.b15-00176.

Mayer, J., ed. (2016) Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. Praha: Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně. ISBN 978-80-260-9718-1. str.: 22–130

Mcgowan, J. V., R. Chung, A. Maulik, I. Piotrowska, J. M. Walker a D. M. Yellon. (2017) Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 31(1), 63–75. DOI: 10.1007/s10557-016-6711-0.

Mele, D., C. G. Tocchetti, P. Pagliaro, et al. (2016) Pathophysiology of anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Cardiovascular Medicine*. 17, e3–e11. DOI: 10.2459/JCM.0000000000000378.

Menna, P., E. Salvatorelli a G. Minotti. (2008) Cardiotoxicity of Antitumor Drugs †. *Chemical Research in Toxicology*. 21(5), 978–989. DOI: 10.1021/tx800002r.

Menna, P. a E. Salvatorelli. (2017) Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview. *Chemotherapy*. 62(3), 159–168. DOI: 10.1159/000455823.

Narayanan, D. a O. K. Weinberg. (2019) How I investigate acute myeloid leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*. DOI: 10.1111/ijlh.13135.

Novotná, E., N. Büküm, J. Hofman, M. Flaxová, E. Kouklíková, D. Louvarová a V. Wsól. (2018a) Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in



the dinaciclib interaction profile. *Archives of Toxicology*. 2018, 92(9), 2845–2857. DOI: 10.1007/s00204-018-2258-0.

Novotná, E., N. Büküm, J. Hofman, M. Flaxová, E. Kouklíková, D. Louvarová a V. Wsól. (2018b) Roscovitine and purvalanol A effectively reverse anthracycline resistance mediated by the activity of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): A promising therapeutic target for cancer treatment. *Biochemical Pharmacology*. 2018, 156, 22–31. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.08.001.

Oppermann U. a E. Maser (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144, 71–81. DOI: 10.1016/S0300-483X(99)00192-4

Pastel, E., J. Pointud, F. Volat, A. Martinez a A. Lefrançois-martinez. (2012) Aldo-Keto Reductases 1B in Endocrinology and Metabolism. *Frontiers in Pharmacology*. 3. DOI: 10.3389/fphar.2012.00148.

Paul, M. K. a A. K. Mukhopadhyay. (2004) Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences*. 101–115. DOI: 10.7150/ijms.1.101.

Paul, S., H. Kantarjian a E. J. Jabbour. (2016) Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*. 91(11), 1645–1666. DOI: 10.1016/j.mayocp.2016.09.010.

Pecka, M. (2006) *Laboratorní hematologie v přehledu, druhý díl. Český Těšín: FINIDR. ISBN 80-86682-02-1. str.: 232–245*

Penka, M., E. Tesařová a kol. (2011) *Hematologie a transfuzní lékařství. I, Hematologie. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0. str.: 289–308*

Penning, T. M. a J. E. Drury. (2007) Human aldo–keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 464(2), 241–250. DOI: 10.1016/j.abb.2007.04.024.

Pepin, X. J.H., A. J. Moir, J. C. Mann, et al. (2019) Bridging in vitro dissolution and in vivo exposure for acalabrutinib. Part II. A mechanistic PBPK model for IR formulation comparison, proton pump inhibitor drug interactions, and administration with acidic juices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 142, 435–448. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.07.011.

Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J., Bruford, E., Dellaporta, S., Favia, A., Duarte, R., Jörnvall, H., Kavanagh, K., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T.M., Thornton, J.M., Adamski, J., Oppermann, U. (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*. 178, 94–8. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.10.040

Persson, B., Kallberg, Y. (2013) Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions*. 202, 111-15. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.11.009

Petráková, K. (2011) Antracykliny v léčbě metastatického karcinomu prsu. *Solen*. 5(1), str.: 23–27.

Piska, K., P. Koczurkiewicz, A. Bucki, K. Wójcik-pszczoła, M. Kołaczkowski a E. Pękala. (2017) Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines — role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drugs*. 35(3), 375–385. DOI: 10.1007/s10637-017-0443-2.

Pophali, P. a M. Litzow. (2017) What Is the Best Daunorubicin Dose and Schedule for Acute Myeloid Leukemia Induction? *Current Treatment Options in Oncology*. 18(1). DOI: 10.1007/s11864-017-0446-4.

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

Qiu, H., L. Liu-bujalski, R. D. Caldwell, et al. (2018) Optimization of the efflux ratio and permeability of covalent irreversible BTK inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 28(20), 3307–3311. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.09.018.

Quinn, A. M., R. G. Harvey a T. M. Penning. (2008) Oxidation of PAH trans-Dihydrodiols by Human Aldo-Keto Reductase AKR1B10. *Chemical Research in Toxicology*. 21(11), 2207–2215. DOI: 10.1021/tx8002005.

Quiñones-lombraña, A., A. Intini a J. G. Blanco. (2019) Insights into the transcriptional regulation of the anthracycline reductase AKR7A2 in human cardiomyocytes. *Toxicology Letters*. 307, 11–16. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.02.015.

Renu, K., Abilash V.G., Tirupathi Pichiah P.B. a S. Arunachalam. (2018) Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *European Journal of Pharmacology*. 818, 241–253. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043.

Rižner, T. L. (2012) Enzymes of the AKR1B and AKR1C Subfamilies and Uterine Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 3. DOI: 10.3389/fphar.2012.00034.

Rižner, T. L. a T. M. Penning. (2014) Role of aldo–keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*. 79, 49–63. DOI: 10.1016/j.steroids.2013.10.012.

Roberts, K. G. (2018) Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematology*. 2018(1), 137–145. DOI: 10.1182/asheducation-2018.1.137.

Roider, T., B. Falini a S. Dietrich. (2018) Recent advances in understanding and managing hairy cell leukemia. *F1000Research*. 7. DOI: 10.12688/f1000research.13265.1.

Rood, J. J. M., A. Jamalpoor, S. Van Hoppe, et al. (2020) Extrahepatic metabolism of ibrutinib. *Investigational New Drugs*. DOI: 10.1007/s10637-020-00970-x.

Sadurska, E. (2015) Current Views on Anthracycline Cardiotoxicity in Childhood Cancer Survivors. *Pediatric Cardiology*. 36(6), 1112–1119. DOI: 10.1007/s00246-015-1176-7.

Shaul, P., M. Frenkel, E. B. Goldstein, L. Mittelman, A. Grunwald, Y. Ebenstein, I. Tsarfaty a M. Fridman. (2013) The Structure of Anthracycline Derivatives Determines Their Subcellular Localization and Cytotoxic Activity. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 4(3), 323–328. DOI: 10.1021/ml3002852.

Shukla, S., Z. Chen a S. V. Ambudkar. (2012) Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resistance Updates*. 15(1-2), 70–80. DOI: 10.1016/j.drug.2012.01.005.

Schiffer C. A. a R. M. Stone. (2003) Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker Inc. 2900 stran.

Singh, M., A. Kapoor a A. Bhatnagar. (2015) Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-Biological Interactions*. 234, 261–273. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.12.028.

Singh, M., A. Kapoor, J. Mccracken, B. Hill a A. Bhatnagar. (2017) Aldose reductase (AKR1B) deficiency promotes phagocytosis in bone marrow derived mouse macrophages. *Chemico-Biological Interactions*. 265, 16–23. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.01.012.

Skálová, L. (2017) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Druhé, upravené a rozšířené vydání*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3733-4. str.: 40–48

Strati, P., N. Jain a S. O'brien. (2018) Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 93(5), 651–664. DOI: 10.1016/j.mayocp.2018.03.002.

Svoboda, T. (2010) Antracykliny v léčbě karcinomu prsu: pro a proti. *Solen*, 4(2), str.: 110–114.

Šafránková, A. a M. Nejedlá. (2006) *Interní ošetřovatelství II*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 8024717778. Str.: 100–101

Škarydová, L. a V. Wsól. (2012) Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 44(2), 173–191. DOI: 10.3109/03602532.2011.638304.

Takahashi, R. H., O. S. Bains, T. A. Pfeifer, T. A. Grigliatti, R. E. Reid a K. W. Riggs. (2008) Aldo-Keto Reductase 1C2 Fails to Metabolize Doxorubicin and Daunorubicin in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition*. 36(6), 991–994. DOI: 10.1124/dmd.108.020388.

Tian, H., R. Chen, C. Huang, W. Sun, W. Jiang, X. Li a C. Lv. (2016) High expression of AKR1C1 is associated with proliferation and migration of small-cell lung cancer cells. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 7: 53–61. DOI: 10.2147/LCTT.S90694.

Tomanová, A. (2019) *Vliv vybraných inhibitorů tyrosinkinás na aktivitu lidských enzymů redukujících karbonylovou skupinu*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. Str. 64–65,72.

Tripaydonis, A., R. Conyers a D. A. Elliott. (2019) Pediatric Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Mechanisms, Pharmacogenomics, and Pluripotent Stem-Cell Modeling. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 105(3), 614–624. DOI: 10.1002/cpt.1311.

Trippier, P. C. (2017) Small molecule inhibitors for acute myeloid leukemia: where is the field heading? *Future Medicinal Chemistry*. 9(13), 1453–1456. DOI: 10.4155/fmc-2017-0114.

Van Hoppe, S., J. J. M. Rood, L. Buil, E. Wagenaar, R. W. Sparidans, J. H. Beijnen a A. H. Schinkel. (2018) P-Glycoprotein (MDR1/ABCB1) Restricts Brain Penetration of the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib, While Cytochrome P450-3A (CYP3A) Limits Its Oral Bioavailability. *Molecular Pharmaceutics*. 15(11), 5124–5134. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00702.

Vreman, R. A., J. W. Geenen, A. M. Hövels, W. G. Goettsch, H. GM. Leufkens a M. J. AL. (2019) Phase I/II Clinical Trial-Based Early Economic Evaluation of Acalabrutinib for Relapsed Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Applied Health Economics and Health Policy*. 17(6), 883–893. DOI: 10.1007/s40258-019-00496-1.

Wenzinger, C., E. Williams a A. A. Gru. (2018) Updates in the Pathology of Precursor Lymphoid Neoplasms in the Revised Fourth Edition of the WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 13(4), 275–288. DOI: 10.1007/s11899-018-0456-8.

Wu, J., CH. Liu, S. T. Tsui a D. Liu. (2016) Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. *Journal of Hematology & Oncology*. 9(1). DOI: 10.1186/s13045-016-0313-y.

Wu, S. a L. Fu. (2018) Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Molecular Cancer*. 17(1). DOI: 10.1186/s12943-018-0775-3.

Wu, X., X. Li, Q. Fu, et al. (2017) AKR1B1 promotes basal-like breast cancer progression by a positive feedback loop that activates the EMT program. *Journal of Experimental Medicine*. 214(4), 1065–1079. DOI: 10.1084/jem.20160903.

Zemanova, L., J. Hofman, E. Novotna, et al. (2015) Flavones Inhibit the Activity of AKR1B10, a Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Journal of Natural Products*. 78(11), 2666–2674. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00616.

Zeng, C., L. Chang, M. Ying, J. Cao, Q. He, H. Zhu a B. Yang. (2017) Aldo–Keto Reductase AKR1C1–AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 8. DOI: 10.3389/fphar.2017.00119.

Zhang, H., A. Patel, S. Ma, et al. (2014) In vitro, in vivo and ex vivo characterization of ibrutinib: a potent inhibitor of the efflux function of the transporter MRP1. *British Journal of Pharmacology*. 171(24), 5845–5857. DOI: 10.1111/bph.12889.

Zhang, L., H. Zhang, Y. Zhao, et al. (2013) Inhibitor selectivity between aldo-keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: Role of Trp112 (Trp111). *FEBS Letters*. 587(22), 3681–3686. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.09.031.

Zhu, H., L. Chang, F. Yan, et al. (2018) AKR1C1 Activates STAT3 to Promote the Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Theranostics*. 8(3), 676–692. DOI: 10.7150/thno.21463.

## 10 INTERNETOVÉ ZDROJE

- Internet 1.** Seiter K. *Acute Lymphoblastic Leukemia Staging*. Medscape [online]. Aktualizováno: 3. července 2019 [cit. 2020-01-28]. Dostupné z: <<https://emedicine.medscape.com/article/2006661-overview>>.
- Internet 2.** American Cancer Society – *What Is Chronic Myeloid Leukemia?* [online]. Aktualizováno 19. června 2018 [cit. 2020-01-30]. Dostupné z: <[https://www.cancer.org/cancer/chronic-myeloid-leukemia/about/what-is-cml.html#written\\_by](https://www.cancer.org/cancer/chronic-myeloid-leukemia/about/what-is-cml.html#written_by)>.
- Internet 3.** *Daunorubicin* [online]. Aktualizováno 25. února 2020 [cit. 2020-02-26]. Dostupné z: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00694>>.
- Internet 4.** *Tyrosine Kinase-enzyme* [online]. Aktualizováno 5. března 2020 [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <<https://www.sinobiological.com/tyrosine-kinase-enzyme.html>>.
- Internet 5.** *Ibrutinib* [online]. Aktualizováno 13. března 2020 [cit. 2020-03-14]. Dostupné z: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB09053>>.
- Internet 6.** *Acalabrutinib* [online]. Aktualizováno 13. března 2020 [cit. 2020-03-14]. Dostupné z: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB11703>>.
- Internet 7.** *Nomenclature System* [online]. Aktualizováno 8. května 2019 [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: <<https://hosting.med.upenn.edu/akr/nomenclature/>>.
- Internet 8.** *Stem Cell Manufacturing* [online]. [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <<https://books.google.cz/books?id=ERWdBAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=10.1016/B978-0-444-63265-4.00001-7+transfection&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiE2Zf2ob7oAhXTmFwKHd6fB5gQ6AEILTAB#v=onepage&q=transfection&f=false>>.
- Internet 9.** *Protocol Guide: XTT Assay for Cell Viability and Proliferation* [online]. Aktualizováno 30. března 2020 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-xtt-assay.html>>.
- Internet 10.** Bouchalová, K. a M. Hajdún *Prediktivní a prognostická onkologie. I. vydání*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci [online]. [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <[https://books.google.cz/books?id=Leq5DgAAQBAJ&pg=PR100-IA4&lpg=PR100-IA4&dq=topoizomer%C3%A1zy+II+beta&source=bl&ots=E\\_C2qFJ8hT&sig=ACfU3U2-sKV2QFCNQW2nq3gzmoWZKWvqUA&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwjLlPm38uDnAhWMSRUIHTbrC7YQ6AEwAXoECAkQAQ#v=onepage&q=topoizomer%C3%A1zy%20II%20beta&f=false](https://books.google.cz/books?id=Leq5DgAAQBAJ&pg=PR100-IA4&lpg=PR100-IA4&dq=topoizomer%C3%A1zy+II+beta&source=bl&ots=E_C2qFJ8hT&sig=ACfU3U2-sKV2QFCNQW2nq3gzmoWZKWvqUA&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwjLlPm38uDnAhWMSRUIHTbrC7YQ6AEwAXoECAkQAQ#v=onepage&q=topoizomer%C3%A1zy%20II%20beta&f=false)>.

**Internet 11.** Vakiti, A. a P. Mewawalla. *Cancer, Acute Myeloid Leukemia (AML, Erythroid Leukemia, Myelodysplasia-Related Leukemia, BCR-ABL Chronic Leukemia)*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) [online]. [cit. 2019-11-28]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>>.