

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VLIV INHIBICE ENASIDENIBU, QUIZARTINIBU
A GLASDEGIBU NA AKTIVITU VYBRANÝCH
REDUKTAS Z NADRODINY AKR A SDR**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2021

Alexandra Pěčková

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové 10. 5. 2021

.....

Alexandra Pěčková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto děkuji svému školiteli diplomové práce prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D., za odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce a také Mgr. Lence Laštovičkové a Mgr. Ivoně Špringrové za cenné rady a předání zkušeností během práce v laboratoři.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Alexandra Pěčková

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

Název diplomové práce: Vliv inhibice enasidenibu, quizartinibu a glasdegibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR

Akutní myeloidní leukemie je nejčastější nádorové onemocnění dospělé populace. Léčba je závislá na mnoha faktorech, kdy velkou roli hraje účinnost cytostatické léčby antracyklinovými antibiotiky. Na antracykliny často vzniká rezistence komplikující terapii. Na jejím vzniku a podpoře nádorového bujení se podílí karbonyl redukující enzymy.

Karbonyl redukující enzymy jsou NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy redukující antracykliny na příslušné alkoholy, které mají nejen nižší toxicitu na nádorové buňky, ale mohou i poškozovat srdeční tkáň. Tyto enzymy také napomáhají diferenciaci a proliferaci nádorových buněk a zvyšují agresivitu nádoru.

Předmětem této diplomové práce bylo studium inhibitorů karbonyl redukujících enzymů z nadrodin aldo-ketoreduktas a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem redukujících daunorubicin na méně účinný metabolit daunorubicinol. Byly použity tři inhibitory: enasidenib, glasdegib a quizartinib. Nejvyšší inhibiční potenciál prokázal enasidenib vůči enzymu AKR1C3 s hodnotou inhibice 97,0 % pro 50 μM koncentraci. Další 2 inhibitory vykazovaly signifikantně nižší inhibiční potenciál, takže pro detailnější studie byl vybrán pouze enasidenib. Byla pro něj stanovena hodnota IC_{50} , inhibiční konstanta (K_i) a určen typ inhibice. IC_{50} vyšlo v rozmezí 0,88–1,19 μM a hodnota K_i vyšla $0,44 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Enasidenib působí vůči daunorubicinu jako kompetitivní inhibitor.

Z výsledků vyplývá, že použití enasidenibu v kombinaci s daunorubicinem v terapii akutní myeloidní leukemie by mohlo zvýšit terapeutickou účinnost léčby a snížit nežádoucí účinky.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Alexandra Pěčková

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

Title of diploma thesis: The influence of enasidenib, quizartinib and glasdegib inhibition on the activity of selected reductases from AKR and SDR superfamilies

Acute myeloid leukemia is the most common cancerous disease among the adult population. The treatment is dependent on many factors, where the effectiveness of anthracycline antibiotic cytostatic treatment plays a significant role. Therapy is often complicated by resistance to anthracyclines. This resistance can be caused by carbonyl reducing enzymes which also may aid in tumor growth.

Carbonyl reducing enzymes are NAD(P)H-dependent oxidoreductases, reducing anthracyclines to respective alcohols, which not only have lower toxicity towards the cancerous cells, but can also damage the cardiac tissue. These enzymes also aid in the differentiation and proliferation of cancerous cells and increase the tumor aggressiveness.

The topic of this thesis was to study the inhibitors of carbonyl-reducing enzymes from aldo-keto reductase and short chain dehydrogenase/reductase superfamilies, reducing daunorubicin to less effective metabolite daunorubicinol. The three selected inhibitors were: enasidenib, glasdegib and quizartinib. The most significant inhibitory potential was demonstrated by enasidenib against the AKR1C3 enzyme with an inhibition value of 97,0 % for a 50 μM concentration. The other 2 inhibitors showed significantly lower inhibitory potential, so only enasidenib was selected for further research.

The IC_{50} value and inhibition constant were set, and the type of inhibition was determined. IC_{50} was in range of 0,88–1,19 μM and K_i value was $0,44 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Enasidenib acts as a competitive inhibitor against daunorubicin.

The results show that the use of enasidenib combined with daunorubicin in acute myeloid leukemia therapy could increase the therapeutic efficacy of the treatment and reduce side effects.

OBSAH

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1 | Akutní myeloidní leukemie | 9 |
| 2.2 | Antracyklinová antibiotika | 12 |
| 2.2.1 | Mechanismus účinku | 12 |
| 2.2.2 | Kardiotoxický účinek ANT | 14 |
| 2.2.3 | Rizikové faktory pro vznik kardiotoxicity u ANT | 14 |
| 2.2.4 | Metabolismus ANT | 14 |
| 2.2.5 | Daunorubicin hydrochlorid | 22 |
| 2.3 | Cílená terapie | 23 |
| 2.3.1 | Inhibitory isocitrátdehydrogenasy | 23 |
| 2.3.2 | Inhibitory tyrosinkinas | 25 |
| 2.3.3 | Inhibitory signální dráhy Hedgehog | 26 |
| 3 | CÍL PRÁCE | 28 |
| 4 | MATERIÁLY A METODIKA | 29 |
| 4.1 | Materiál | 29 |
| 4.1.1 | Chemikálie | 29 |
| 4.1.2 | Pomůcky a přístroje | 30 |
| 4.2 | Metodika práce | 32 |
| 4.2.1 | Testování inhibičních účinků ENA, QUI a GLA | 32 |
| 4.2.1.1 | Příprava roztoků na inkubaci | 32 |
| 4.2.1.2 | Preinkubace a inkubace | 33 |
| 4.2.1.3 | Vlastní enzymová reakce | 33 |
| 4.2.1.4 | Příprava vzorku pro nástřik a UHPLC analýza | 34 |
| 4.2.1.5 | Zpracování naměřených dat | 34 |
| 4.2.2 | Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} | 35 |
| 4.2.3 | Stanovení hodnoty K_i a typu inhibice | 35 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 39 |
| 5.1 | Stanovení inhibiční aktivity ENA, QUI a GLA na aktivitu AKR1C3 | 40 |
| 5.2 | Stanovení inhibiční aktivity ENA, QUI a GLA na aktivitu AKR1B10 | 43 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.3 | Stanovení inhibiční aktivity ENA na aktivitu AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 | |
| | 45 | |
| 5.3.1 | Stanovení IC_{50} | 48 |
| 5.3.2 | Stanovení hodnoty K_i | 51 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 53 |
| 7 | POUŽITÉ ZKRATKY | 54 |
| 8 | POUŽITÁ LITERATURA..... | 56 |

1 ÚVOD

Rezistence na antibiotika může být vrozená (primární) nebo získaná (sekundární). Primární rezistence vzniká již po prvním podání cytostatika, je podmíněna geneticky. Sekundární rezistence se rozvíjí během léčby, kdy původně citlivé nádorové buňky postupně svou citlivost ztrácí. Může být zkřížená, mnohočetná (MLR) i lokální. MLR je způsobena především nahromaděním efluxního transportéru P-glykoproteinu v buněčné membráně. Dochází tak k rychlému transportu cytostatika z buňky.

Při léčbě dochází ke změnám ve farmakokinetice, cytokinetice, ale nejčastěji dochází ke strukturálním nebo funkčním změnám buňky. Aktivita enzymů konvertujících cytostatika na účinné metabolity může být snížena, nebo naopak může být zvýšena exprese enzymů způsobujících biodegradaci léčiv. (Klener 2002) Omezení lékové rezistence je jeden z důležitých kroků pro fungování cytostatické léčby.

Tato diplomová práce je zaměřena na enzymy z nadrodin aldo-ketoreduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), které metabolizují antracyklinová antibiotika (ANT) na kardiotoxické, a především méně účinné alkoholy. Je prokázáno, že tyto enzymy jsou nadměrně exprimovány v některých typech nádorových buněk, a mohou tak snižovat účinnost cytostatické léčby.

Hlavním cílem diplomové práce bylo studium potenciálních inhibičních účinků vybraných inhibitorů (enasidenibu, quizartinibu a glasdegibu) na aktivitu enzymů z nadrodin AKR a SDR redukujících daunorubicin (DAUN) na daunorubicinol (DAUNOL). Ty mohou pomoci zvýšit antineoplastický účinek ANT a snížit kardiotoxicitu a rezistenci.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Akutní myeloidní leukemie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je heterogenní skupina zhoubných onemocnění krvetvorby. Dochází při ní k zástavě diferenciaci na úrovni nezralých buněk (blastů). Ty rychle proliferují, nepodléhají fyziologické regulaci a utlačují normální krvetvorbu. (Adam a kol. 2008)

AML představuje přibližně 80 % všech případů leukemií, čímž se z ní stává nejčastější leukemie v dospělé populaci. Může vznikat různými způsoby, například genetickou mutací, chromozomální translokací nebo změnami na molekulární úrovni. Díky výzkumu a neustálému vývoji zdravotnické péče se míra vyléčení v posledních letech zvýšila na přibližně 40 % u pacientů mladších 60 let. S věkem ale klesá, a u lidí starších 60 let je to okolo 15 %. (internet 1)

Příznaky jsou spojeny především s nedostatečnou krvetvorbou. Projevují se symptomy anémie, jako je fyzická únava a celková slabost, bledost kůže a sliznic. Dalšími příznaky jsou časté opakované infekce nereagující na antibiotika. V důsledku sníženého množství trombocytů vzniká podkožní krvácení a modřiny. Může se také projevit hyperplazie dásní a příznaky spojené s poškozením CNS. (Adam a Vorlíček 2001)

Mezi rizikové faktory způsobující AML lze zařadit radiační záření, chemikálie, např. benzen a látky obsahující formaldehyd, také některé chemikálie používané v zemědělství, jako jsou pesticidy a herbicidy. Dalšími faktory jsou vyšší věk, mužské pohlaví, obezita, kouření a předchozí chemoterapie. (Poynter a kol. 2017) Riziková jsou i vrozená onemocnění spojená s vyšší fragilitou chromatinu, např. Bloomův syndrom, Fanconiho anémie a Kostmanův syndrom. Často je spojován s trizomií 21. chromozomu (Downovým syndromem). Je to z důvodu chromozomálních přestaveb, které mohou vést ke špatnému vývoji krvetvorných buněk. (Adam a kol. 2008) Ve většině případech příčinu vzniku AML neznáme. (Bučková a kol. 2013)

AML můžeme dělit dle dvou systémů – klasifikace dle FAB (Francouzsko-Americko-Britské dělení) a nověji dle WHO. Díky novým diagnostickým metodám je hodnocení dle WHO obsáhlejší. Leukemické blasty identifikuje dle morfologických, imunofenotypických a molekulárně genetických metod. Zohledňuje tedy i mutace

spojené s AML. Klasifikace dle FAB (tab. 2) z větší části odpovídá klasifikaci AML blíže nespecifikované podle tab. 1. (Šálek 2012)

Tab. 1 Klasifikace AML dle WHO (Šustková a Ráčil 2016)

| | |
|---|---|
| AML s rekurentními genetickými abnormalitami | AML s t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 AML s inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 APL s PML-RARA AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A AML s t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 AML s inv(3)(q21.3q26.2) nebo t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM AML (mekaryoblastická) s t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 AML s mutovaným NPM1 AML s bialelickou mutací CEBPA |
| AML s myelodysplastickými změnami | |
| AML vzniklá v souvislosti s léčbou | |
| AML blíže nespecifikované | AML minimálně diferencovaná AML bez vyzrání AML s vyzráním akutní myelomonocytární leukemie akutní monoblastická/monocytární leukemie akutní erytroblastická leukemie akutní megakaryoblastická leukemie akutní bazofilní leukemie akutní panmyelóza s myelofibrózou |
| Myelosarkom | |
| Myeloidní proliferace související s Downovým syndromem | tranzientní abnormální myelopoéza myeloidní leukemie asociovaná s Downovým syndromem |

Tab. 2 Dělení akutní myeloblastické leukemie dle FAB klasifikace (Marek 1998)

| |
|----------------------------------|
| M0 – nediferencovaná |
| M1 – bez známek vyzrání |
| M2 – s vyzráním |
| M3 – promyelocytární |
| M4 – myelomonocytární |
| M5 – monoblastická a monocytární |
| M6 – erytroleukémie |
| M7 – megakaryocytoblastická |

Léčba je závislá na mnoha faktorech: typ AML, věk pacienta, výsledky cytogenetických a molekulárně genetických vyšetření a také přítomnost dalších přidružených onemocnění. Dále záleží na reakci pacienta na indukční léčbu.

Léčbu můžeme všeobecně rozdělit na kurativní, paliativní a symptomatickou; kurativní pak na indukční a konsolidační. Indukční léčba zahrnuje chemoterapii, tedy vpravení cytostatických látek infuzí do žíly v takzvaném režimu 7+3: 7 dní celodenní terapie antimetabolitem cytarabinem a 3 dny krátké infuze ANT. Nejčastěji jde o antracyklinová chemoterapeutika DAUN, idarubicin a mitoxantron. Dávka DAUN by měla být vyšší než 60 mg/m². Nad 90 mg/m² už ale není prokázán vyšší benefit. (Doubek a Mayer 2020) Paliativní léčbou jsou léčeni spíše starší pacienti. U této léčby jde především o prodloužení života v dobré kvalitě. Zahrnuje nižší dávky cytarabinu a 5-azacytidinu v měsíčních cyklech. Snahou symptomatické léčby je co nejvíce zmírnit symptomy leukemie, jako je bolest, dušnost, úzkosti nebo následky předchozí léčby jako nauzea a zvracení. (Šustková a Ráčil 2016)

Nové technologie přinesly za posledních 25 let kritický pohled na patogenezi a patofyziologii AML. Lépe chápeme vznik AML a mutací, které určují heterogenitu onemocnění. Vznikající mutace přispívají k nedostatečné odpovědi na léčbu.

Léčba AML byla za posledních pět desetiletí omezena a indukční terapie zůstala od té doby relativně nezměněna. V současnosti se vývoj více zaměřuje na cílenou terapii. V několika posledních letech (2017–2018) FDA schválila celkem osm léků k léčbě AML, které se používají jak samostatně, tak v kombinacích s indukční terapií. V důsledku vývoje těchto léků je nyní k dispozici více možností pro pacienty s různými podtypy AML, zejména pro starší pacienty nebo pacienty s komorbiditami. Patří mezi ně např. midostaurin, gilteritinib, enasidenib a glasdegib. (Lai a kol. 2019) V ČR by měly být začít používány během roku 2021–2022 (tab. 3). (Doubek a Mayer 2020)

Tab. 3 Nové léky k léčbě AML (Doubek a Mayer 2020)

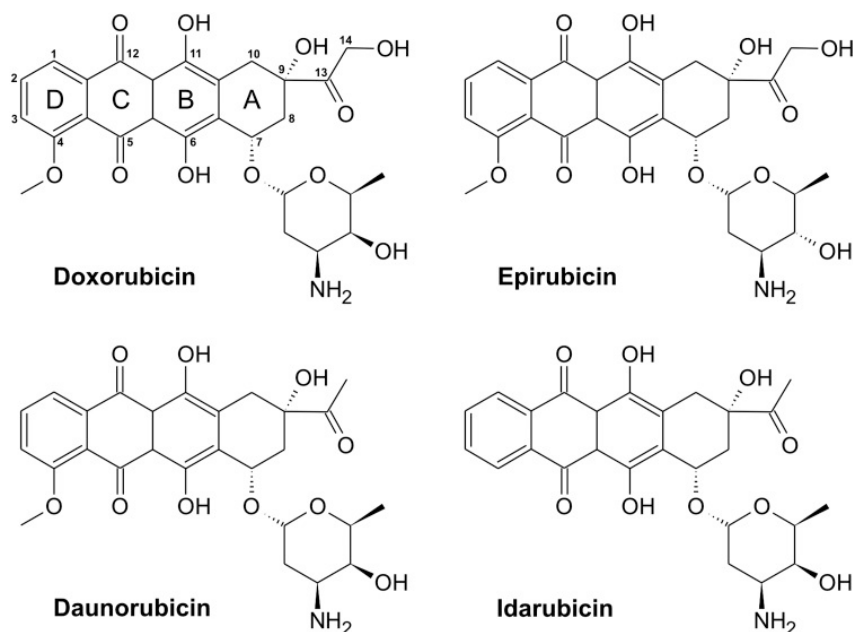
| Název | Indikace |
|-------------|--|
| Venetoclax | neintenzivní léčba nemocných s de novo AML |
| Glasdegib | neintenzivní léčba nemocných s de novo AML |
| Ivosidenib | neintenzivní léčba nemocných s de novo AML s prokázanou mutací v IDH1, léčba relabující/refrakterní AML s prokázanou mutací v IDH1 |
| Enasidenib | léčba relabující/refrakterní AML s prokázanou mutací v IDH2 |
| Quizartinib | léčba relabující/refrakterní AML s prokázanou mutací ve FLT3(ITD)* |

* i přes signifikantní efektivitu FDA recentně neschválila použití quizartinibu v této indikaci pro zvýšené riziko toxicity

2.2 Antracyklinová antibiotika

ANT patří mezi nejčastěji používaná chemoterapeutika k léčbě nádorových onemocnění. Cytostatický účinek je dán inhibicí topoisomerasy II. (TOP II.) a interkalační vazbou na DNA. (Katzung 2006) TOP II. rozmotává obě vlákna dvoušroubovice DNA, a umožňuje tak měnit terciální strukturu. Uplatňuje se při replikaci, transkripci a také při segregaci replikovaných sesterských chromozomů. (Lee a Berger 2019)

Ze *Streptomyces peucetius* byl izolován doxorubicin (DOX). Na základě tohoto objevu byly syntetizovány další ANT idarubicin, epirubicin a esorubicin. Dalším izolovaným ANT z bakterií typu *Streptomyces* byl daunomycin známý také jako DAUN. (obr. 1) (Arcamone 1984, Di Marco a kol. 1981)



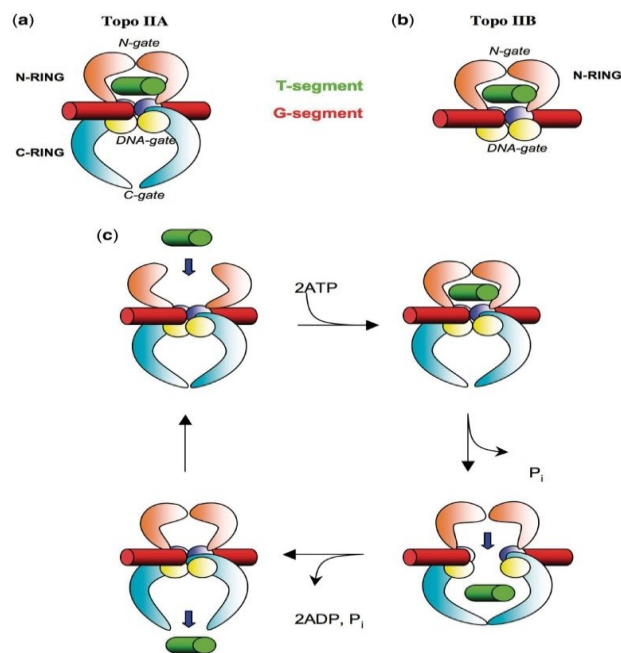
Obr. 1 Strukturní vzorce DOX, EPI, DAUN, IDA (Štěrba a kol. 2013)

2.2.1 Mechanismus účinku

Inhibice topoisomerasy

ANT se naváží na DNA a inhibují TOP II. (obr. 2). Ta je zodpovědná za přerušování a znovu spojení fosfodiesterové vazby v obou řetězcích DNA. Tím umožňuje replikaci a transkripci. ANT však vytvoří s přerušovaným řetězcem DNA komplex a neumožní opětovné spojení. V DNA vznikají nevratné zlomy, které vedou k apoptóze. (Cardinale a kol. 2020) V nádorových buňkách je exprimována TOP II α , ve zdravých buňkách pak

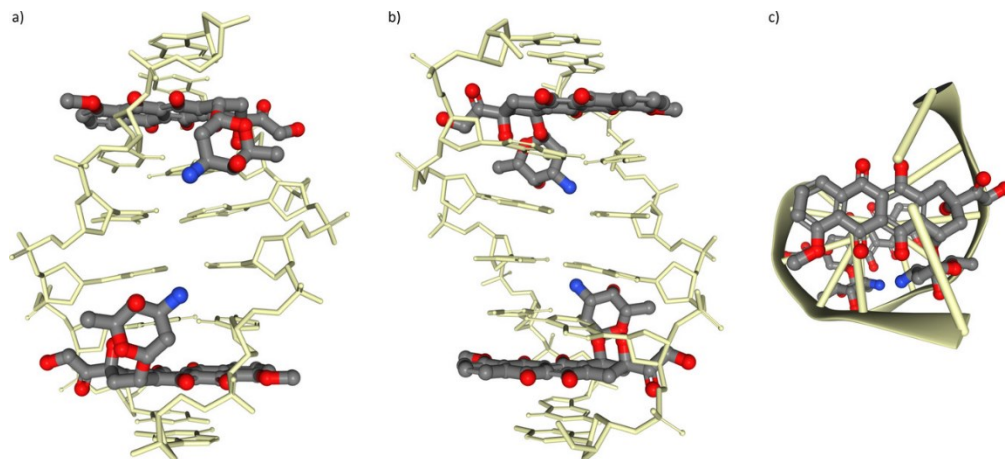
isoforma TOP II β . Ta je zodpovědná za kardiotoxický účinek ANT. (Tan a kol. 1992, Mladosievičová a kol. 2014)



Obr. 2 (a) Schématické znázornění TOP II α , (b) schématické znázornění TOP II β , (c) mechanismus katalytické aktivity TOP II (Timsit 2011)

Interkalace

Dalším mechanismem působení ANT je interkalace (obr. 3). Té jsou schopné díky své aglykonové planární struktuře a polyaromatickému systému. Vmezeří se mezi páry bází DNA a váží se vodíkovými můstky a van der Waalsovými interakcemi. Dochází k inhibici syntézy RNA a inhibici replikace DNA. (Martins-Teixeira a Carvalho 2020, Mayer a kol. 2002)



Obr. 3 Komplex dvou molekul DOX s DNA (Martins-Teixeira a Carvalho 2020)

2.2.2 Kardiotoxický účinek ANT

Kardiotoxický účinek ANT nebyl stále zcela pochopen. Nejběžnější hypotézou je tvorba volných radikálů, které poškozují srdeční buňky. (Puma a kol. 2008) Podle novějších výzkumů nepoškozují ale jen kardiomyocyty, které byly považovány za hlavní cíl, ale i kmenové buňky, endotelové buňky a srdeční fibroblasty. (Cardinale a kol. 2020)

Kardiotoxicitu můžeme rozdělit na akutní, subakutní a chronickou. Akutní kardiotoxicita, která může být reverzibilní, nastane po podání jedné dávky a projeví se do 14 dnů od ukončení léčby. Mezi ireverzibilní formy pak patří subakutní, vyskytující se do jednoho roku od ukončení léčby, a chronická, která se vyvíjí roky po ukončení léčby a může vést až k srdečnímu selhání. Nedávná zjištění však naznačují, že kardiotoxicita vyvolaná ANT je kontinuální jev. Začíná na úrovni buněk myokardu, následuje funkční pokles, který postupně vede k srdečnímu selhání. Klinicky se tedy může projevit až o mnoho let později. K okamžité identifikaci kardiotoxicity pomáhá stanovení hladiny troponinu. (Cardinale a kol. 2020)

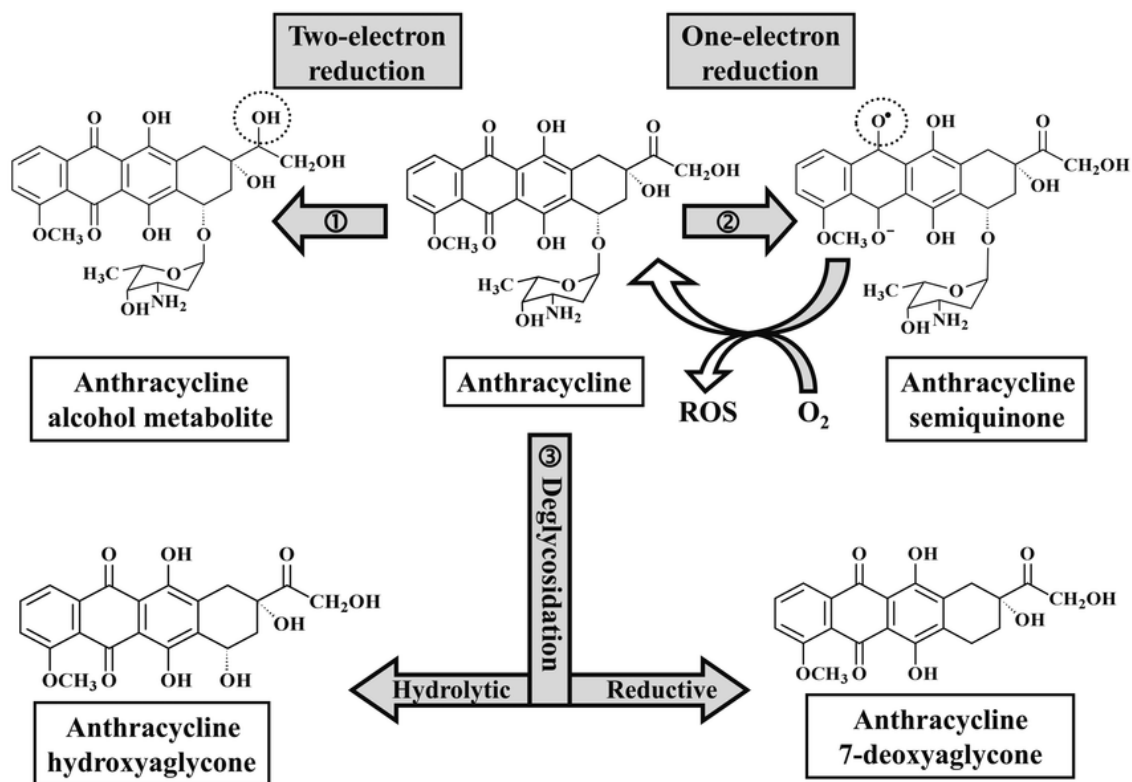
2.2.3 Rizikové faktory pro vznik kardiotoxicity u ANT

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je celková kumulativní dávka ANT, například u DAUN je to dávka vyšší než 450–500 mg/m². Dalšími faktory pro vznik kardiotoxicity je nízký věk (< 5 let) nebo naopak pokročilý věk (> 65 let). Ženy jsou obecně ohroženější než muži. Kardiotoxicita závisí také na době zahájení léčby. Obecně platí, že s pozdější dobou zahájení léčby riziko roste. Vliv mají i genetické predispozice, jako je Downův syndrom a afroamerický původ. Velký vliv mají již vzniklé rizikové faktory: onemocnění srdce (srdeční selhání, asymptomatická dysfunkce LK, předchozí infarkt myokardu, angina pectoris, ischemie myokardu, významné arytmie), hypertenze, diabetes, hyperlipidemie, onemocnění ledvin a jater. Další terapie může riziko také zvýšit, např. radiační terapie a terapie dalšími protinádorovými léčivými (cyklofosfamid, vinkristin, bleomycin, mitoxantron, transzumab). Vliv má i životní styl pacienta, jako je kouření, alkohol, obezita. (Cardinale a kol. 2020, Reinbolt a kol. 2016, Puma a kol. 2008)

2.2.4 Metabolismus ANT

Přibližně 50 % podaného ANT je vyloučeno bez změny struktury. Zbytek je metabolizován játry a zpracován jednou ze tří metabolických cest. Ty zahrnují

dvouelektronovou redukcí, jednoelektronovou redukcí a deglykosidací. (obr. 4) (Edwardson a kol. 2015) Nejpoužívanější ANT DAUN a DOX jsou vylučovány převážně žlučí. Močí je vylučována jen 1/6 z celkové dávky. (Puma a kol. 2008)



Obr. 4 Metabolismus ANT (Mordente a kol. 2009)

Dvouelektronová redukce

Hlavní metabolickou přeměnou ANT je dvouelektronová redukce, při níž dochází k hydroxylaci na C-13 karbonylové skupině. Dochází k redukci na alkoholy pomocí NAPDH-závislých karbonyl redukujících enzymů (CRE), především z nadrodiny AKR a SDR. K hydroxylaci dochází ve všech buňkách. Výsledné molekuly jsou polárnější než původní a jsou také podstatně méně účinné a toxičtější pro srdce, hlavně kvůli své akumulaci v srdeční tkáni. (Edwardson a kol. 2015)

Enzymy, které jsou při dvouelektronové redukci zodpovědné za přeměnu DAUN na DAUNOL jsou především CBR1, AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3, 7A2. (Bains a kol. 2010, Kassner a kol. 2008, Hofman a kol. 2014, Zhong a kol. 2011) Dále jsou uvedeny jen ty enzymy, kterým se věnuji v praktické části této diplomové práce.

Karboxyl redukující enzymy

CRE spadají do tří nadrodin: AKR, SDR a dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR). (Persson a kol. 2009)

Aldo-ketoreduktasy

AKR se řadí mezi NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy. Jsou to z velké části cytosolické proteiny obsahující přibližně 320 aminokyselin s molekulovou hmotností 34–37 kDa. (Jez a kol. 1997)

V lidském organismu redukují aldehydové a ketonové skupiny na primární a sekundární alkoholy. Mezi jejich substráty patří glukosa, steroidy, produkty peroxidace lipidů, produkty glykosylace a také látky znečišťující prostředí. Souvisí i s metabolismem xenobiotik. (Barski a kol. 2008)

Podle nomenklatury je můžeme rozdělit do 16 rodin, které se následně dělí do podrodin. Členové rodiny mají více než 40 % shodu aminokyselinové sekvence se svou rodinou. Podrodiny jsou definovány shodou nad 60 %.

Jich označování uvedu na příkladu AKR1C3. Rodiny se označují arabskou číslicí (AKR1C3) a podrodiny velkým písmenem (AKR1C3). Dále se AKR označují arabskou číslicí představující jedinečnou proteinovou sekvenci (AKR1C3). Lidské AKR lze rozdělit do tří rodin: AKR1, 6 a 7. (Barski a kol. 2008, Penning 2015, internet 2)

AKR charakterizuje společná trojrozměrná struktura, kterou tvoří $(\beta/\alpha)_8$ soudek označovaný také jako TIM soudek (*triose-phosphate isomerase barrel*). Skládá se z 8 β -skládaných listů zabalených do 8 α -helixů. Smyčky a extra šroubovice přerušují záhyb α/β a dodávají rodině strukturní rozmanitost. Charakteristickým znakem $(\beta/\alpha)_8$ barelů je přítomnost aktivního místa na C-konci. Protože pro tuto preferenci neexistuje žádný zjevný důvod, považuje se tato funkce za známku společného původu. V kvartérní struktuře je AKR1 monomerní, AKR7 tvoří dimery a AKR6 tvoří tetramery. (Barski a kol. 2008)

AKR1A1 je jednou z prvních objevených AKR. Je to cytosolická NADPH-závislá oxidoreduktasa. Tento enzym se nachází ve většině tkání, především však v proximálních tubulech. (Barski a kol. 2008) Vyskytuje se ve dvou alelických variacích: E55D a N52S. U těchto mutací dochází ke snížené eliminaci DAUN. Ty pak vedou k tvorbě reaktivních

meziproduktů a škodlivých metabolitů. Mohou tedy působit jako genetické biomarkery pro vývoj kardiotoxicity způsobené DAUN. (Bains a kol. 2008)

AKR1A1 fyziologicky přeměňuje mevalonát na kyselinu mevalonovou a glyceraldehyd na glycerol. Tím se podílí na biosyntetické dráze cholesterolu a triacylglyceridů. Oxiduje i trans-dihydrodioly, vzniklé z polycyklických aromatických uhlovodíků, na odpovídající o-chinony. Ty mohou být významnými prokarcinogeny, které jsou cytotoxické i genotoxické. (Palackal a kol. 2001)

Při zkoumání AKR1A1 u myši bylo zjištěno, že v renálním proximálním tubulu je vysoce exprimován systém S-nitroso CoA/ AKR1A1, který přenáší endoteliární syntasu oxidu dusnatého přeprogramováním intermediárního metabolismu. Tím AKR1A1 chrání organismus před akutním poškozením ledvin. (Zhou a kol. 2019b)

AKR1B1 je aldosa reduktasa, která katalyzuje redukci substrátů obsahujících karbonylovou skupinu např. steroidů a jejich derivátů, prostaglandinů, produktů lipidové peroxidace a xenobiotik. (Pastel a kol. 2012) Často je spojována s komplikacemi u onemocnění *diabetes mellitus*. Zprostředkovává první krok polyolové dráhy, kterým je redukce glukosy na sorbitol za spotřeby NADPH jako kofaktoru. Dále je sorbitol oxidován sorbitol dehydrogenasou na fruktosu (jako kofaktor využívá NAD^+). Při hyperglykémii pak dochází k osmotickému stresu, zvýšené produkci ROS a snížené obranyschopnosti, což vede k dysfunkci nervu a k jeho poškození. Sekundární komplikace, které se s tím pojí je mikroangiopatie, retinopatie, nefropatie, periferní neuropatie a katarakta. (Seliger a kol. 2018, Kotas a Ambler 2012) Specifické inhibitory proti AKR1B1 (sorbiniil, tolrestat, epalrestat, ranirestat a fidarestat) se využívají ke zvrácení sekundárních příznaků diabetu. (Penning 2015)

AKR1B1 se ve zvýšeném množství vyskytuje u různých typů rakoviny např. u kolorektálního karcinomu (Schwab a kol. 2018, Wei a kol. 2016), karcinomu prsu (Saraswat a kol. 2006), pankreatu (Xiao a kol. 2018) a hepatocelulárního karcinomu (Takahashi a kol. 1995, Zeindl-Eberhart a kol. 2004). Nadměrná exprese AKR1B1 zkracuje přežití pacientů s akutní myeloidní leukémií a mnohočetnými myelomy. (Laffin a Petrash 2012) Dále tento enzym hraje roli při tvorbě buněk hladkého svalstva v průběhu aterosklerózy. (Ramana a kol. 2002)

AKR1B10 najdeme v tenkém střevě, tlustém střevě, játrech, brzlíku a nadledvinách. (Barski a kol. 2008) Nadměrná exprese AKR1B10 byla objevena u karcinomu plic, pankreatu, prostaty, prsu a hepatocelulárních nádorů. (Seliger a kol. 2018)

Podobně je jako ostatní schopna redukovat různé aldehydy a ketony, jako jsou glycerinaldehyd, methylglyoxal, diacetyl a aromatické aldehydy. Její další úlohou je redukce retinaldehydů na jejich příslušné retinoly. Zvýšení hladin AKR1B10 tedy může vést ke snížení hladin kyseliny retinové. Ta se účastní velkého počtu biologických procesů, od vývoje plodu po proliferaci a diferenciaci buněk až po apoptózu. S vyčerpáním kyseliny retinové může být spojena ztráta buněčné diferenciaci a rozvoj karcinogeneze. (Gallego a kol. 2007)

AKR1B10 podporuje migraci a invazi buněk rakoviny prsu aktivací signální dráhy ERK. Velikost jeho zastoupení pozitivně koreluje s velikostí nádoru a metastázami do lymfatických uzlin. (Li a kol. 2017)

Hraje také roli v diagnostice a prognóze hepatocelulárního karcinomu. Špatné výsledky u pacientů s pokročilým hepatocelulárním karcinomem jsou z velké části způsobeny nedostatkem biomarkerů pro identifikaci nádorů v raných stádiích. Pomocí exprese AKR1B10 můžeme karcinom nalézt mnohem dříve. Jeho exprese se se zhoršujícím stavem zvyšuje. Řada experimentálních studií ukázala, že inhibice AKR1B10 zabraňuje růstu a metastázování nádoru a indukuje apoptózu. (Di Stefano a Davis 2019)

AKR1C3, také známá jako 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 5 a prostaglandin-F-syntasa, se nenachází jen v prostatě a mléčné žláze, ale exprese její mRNA byla objevena i v játrech, plicích, tenkém střevě, nadledvinách, mozku, děloze a varlatech. (Barski a kol. 2008, Novotná a kol. 2008) Sdílí vysokou sekvenční homologii (> 86 %) s AKR1C1, 1C2 a 1C4. Struktury AKR1C enzymů jsou velmi podobné, ale vykazují různé distribuční preference a biologické funkce. (Liu a kol. 2020)

AKR1C3 hraje důležitou roli v produkci pohlavních hormonů, protože katalyzuje přeměnu estrogenů, androgenů a progesteronů. Přeměňuje androstendion na testosteron, estron na estradiol a progesteron na hydroxyprogesteron. (Edwardson a kol. 2015, Rizner a kol. 2006)

Zvýšené hladiny AKR1C3 souvisí s progresí a agresivitou různých onemocnění. Obecně je lze rozdělit na karcinomy závislé na hormonech, karcinomy nezávislé na hormonech a metabolická onemocnění. (Liu a kol. 2020)

AKR1C3 katalyzuje syntézu $9\alpha,11\beta$ -prostaglandinu F_2 a prostaglandinu $F_{2\alpha}$, které umožňují růst myeloidních prekurzorů v kostní dřeni. AKR1C3 je nadměrně exprimována při akutní myeloidní leukémii (AML) a akutní lymfoblastické leukémii T-buněk (T-ALL). Kromě AML a T-ALL je také nadměrně exprimována v karcinomu prsu, tlustého střeva, prostaty, endometria a plic. (Verma a kol. 2019) Inhibice AKR1C3 vede ke zvýšeným hladinám prostaglandinu D_2 a 15-deoxy-delta-prostaglandinu J_2 . Prostaglandin D_2 působí synergicky s all-trans retinovou kyselinou a podporuje diferenciaci a apoptózu buněk. 15-deoxy-delta-prostaglandin J_2 podporuje diferenciaci. Ve srovnání s přímým podáváním prostaglandinu J_2 a 15-deoxy-delta-prostaglandinu je lepší podávat inhibitory AKR1C3. (Liu a kol. 2020)

U rakoviny prostaty AKR1C3 jako 17β -hydroxysteroiddehydrogenasa katalyzuje přeměnu androstendionu na testosteron. Ten poté aktivuje androgenové receptory a podporuje růst tumoru. Zvýšené hladiny AKR1C3 zvyšují agresivitu nádoru. (Byrns a kol. 2010) Zvýšená exprese AKR1C3 u rakoviny prsu je spojena s vyššími hladinami testosteronu. Ten je poté aromatasou přeměněn na 17β -estradiol a stimuluje proliferaci rakovinových buněk. Vyšší hladina byla zjištěna u 65–85 % tkání rakoviny prsu. Zvýšení je spojováno s horší prognózou. Podle studie Xu a kol. (2017) by měl být AKR1C3 použit jako faktor špatné prognózy u rakoviny prsu. Neměl by ale být během léčby inhibován vzhledem k negativní korelaci mezi expresí AKR1C3 a glukózou regulovaným proteinem 78.

Vyšší hladiny estrogenů a nižší hladiny progesteronu přispívají ke vzniku endometriózy a dysmenorey. (Byrns a kol. 2010, Byrns a kol. 2011) K poškození endometria dochází, když progesteron není schopen působit proti estrogením účinkům. AKR1C3 prostřednictvím aktivity prostaglandin F syntasy reguluje zánět, proliferaci a angiogenezi endometriálních buněk. Enzym kontroluje i koncentrace testosteronu a estradiolu a reguluje hladiny isoprenylaldehydu a retinaldehydu. (Liu a kol. 2020)

Zvýšená exprese u nádorových onemocnění a metabolismus xenobiotik, např. ANT, u kterých narůstá rezistence a kardiotoxicita, vede k vývoji inhibitorů AKR1C3. Patří

mezi ně např. NSAID, steroidní laktony, steroidní hormony, deriváty kyseliny skořicové a flavonoidy. (Byrns a kol. 2011) Dále jsou to pak inhibitory enzymů z nadrodin AKR a SDR.

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

SDR jsou jednou z největších proteinových nadrodin a jejich počet stále roste. (Jörnvall a kol. 2015) Mohou být cytosolické, nebo v některých případech membránově vázané. (Hoffmann a Maser 2007) Mají zásadní roli v metabolismu lipidů, aminokyselin, sacharidů, kofaktorů, hormonů a xenobiotik. (Kavanagh a kol. 2008)

SDR můžeme rozdělit na několik rodin. Patří sem rodina classical, extended, intermediate divergent a complex. Rozlišují se dle primární struktury. Preferenci ke kofaktoru NADP(H) má rodina classical, zatímco rodina extended preferuje spíše NAD(H). (Persson a kol. 2003)

Většina SDR je oligomerních. Mají buď homodimerní nebo homotetramerické kvartérní struktury. (Kavanagh a kol. 2008) Sekvenční identita je ve srovnání mezi různými SDR enzymy obvykle jen okolo 15–30 %. (Oppermann a kol. 2003) Nejzachovalejším znakem je centrální β -skládaný list obklopený 3–4 α -šroubovicemi. Tento motiv se nachází na N-konci vazebné domény a nazývá se Rossmannův záhyb. Slouží pro vazbu kofaktoru. Pro vazbu substrátu pak slouží vazebné místo na C-konci. (Kavanagh a kol. 2008)

Velké množství rodin od sebe bylo potřeba odlišit. Z tohoto důvodu byl zvolen nomenklaturní systém, kde nejnižší čísla byla přiřazena rodinám nalezených u člověka a savců, poté následují eukaryota, bakterie a archea. Známa je např. rodina SDR21C, kam patří nejvíce studovaná a popsaná SDR CBR1. (Persson a kol. 2009)

CBR1 je cytosolický enzym, známý jako prostaglandin 9-ketoreduktasa a 15-hydroxydehydrogenasa. Skládá se z 277 aminokyselin. (Forrest a Gonzales 2000, Miura a kol. 2008) Nachází se ve všech tkáních, především však v parenchymálních buňkách jater, epiteliálních buňkách žaludku a tenkého střeva, epidermis, proximálních tubulech ledvin, neuronálních a gliových buňkách centrálního nervového systému a také v buňkách předního laloku hypofýzy. (Wirth a Wermuth 1992) Katalyzuje NADPH-dependentní redukce endogenních i exogenních (xenobiotických) ketonů a chinonů jako jsou steroidy, prostaglandiny, retinoidy a biogenní aminy. (Forrest a Gonzales 2000)

CBR1 odstraňuje z těla sloučeniny obsahující reaktivní aldehydovou skupinu, vznikající při oxidačním stresu. Některé studie naznačují, že CBR1 je nezbytná pro přežití neuronových buněk a pro ochranu před degenerací mozku vyvolanou oxidačním stresem. (Kim a kol. 2014, Rashid a kol. 2010)

Zvýšená hladina CBR1 v rakovinových buňkách snižuje proliferaci a růst nádoru. (Murakami a kol. 2012, Osawa a kol. 2015) Snížené hladiny jsou naopak spojeny s podporou růstu nádoru a šířením metastáz. Především je spojena se špatnou prognózou u rakoviny vaječníků, děložního hrdla a endometria. (Nishimoto a kol. 2018) U orálního spinocelulárního karcinomu, karcinomu hlavy a krku může hladina CBR1 sloužit jako prognostický faktor. CBR1 také může být účinným cílem při léčbě metastatického spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. (Yamanouchi a kol. 2018, Yun a kol. 2020)

Aktivita karbonylreduktázy se u jednotlivců liší a může přispívat k nepředvídatelné farmakodynamice substrátů léčivých přípravků CBR1. (Gonzalez-Covarrubias a kol. 2007) Studie dle Varatharajana a kol. (2012) naznačuje, že exprese RNA CBR1 může být užitečná při identifikaci pacientů s AML, u nichž je riziko vzniku rezistence nebo toxicity vůči DAUN.

Expese CBR1 také ovlivňuje rezistenci na oxid arsenitý, používaný jako chemoterapeutikum pro akutní promyelocytární leukémii. Jeho využití je však omezeno pro jeho nežádoucí účinky a nižší účinnost. Kombinovaná léčba se specifickým inhibitorem CBR1 zvýšila apoptózu indukovanou oxidem arsenitým, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Nadměrná exprese CBR1 byla navíc dostatečná k ochraně buněk proti oxidu arsenitému prostřednictvím modulace tvorby ROS. (Jang a kol. 2012)

Jednoelektronová redukce

Při jednoelektronové redukci dochází k přeměně chinonové skupiny ANT na semichinonový radikál. Reakce je katalyzována cytochromem P-450, reduktasou, NADH-dehydrogenasou, syntasou oxidu dusnatého a xantinoxidasou. Semichinon je poté v přítomnosti kyslíku oxidován zpět na chinon a uvolňuje se superoxidový anion. Ten může být přeměněn na peroxid vodíku nebo na hydroxidový anion. Dochází ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Volné radikály pak způsobují peroxidaci lipidů, agregaci proteinů a smrt buněk. K těmto reakcím dochází v cytoplazmě, mitochondriích a sarkoplazmatickém retikulu. (Edwardson a kol. 2015)

Deglykosidace

Představuje jen 1–2 % metabolismu ANT. Dochází ke štěpení glykosidové vazby za vzniku 7-deoxyaglykonů a hydroxyaglykonů. Reakce je katalyzovaná reduktasami typu glykosidas, NADP(H)-dependentními hydrolasami, NADP(H)-chinonoxidoreduktasou, NADP(H)-cytochrom-P450-reduktasou, a xantindehydrogenasou. (Mordente a kol. 2003, Licata a kol. 2000)

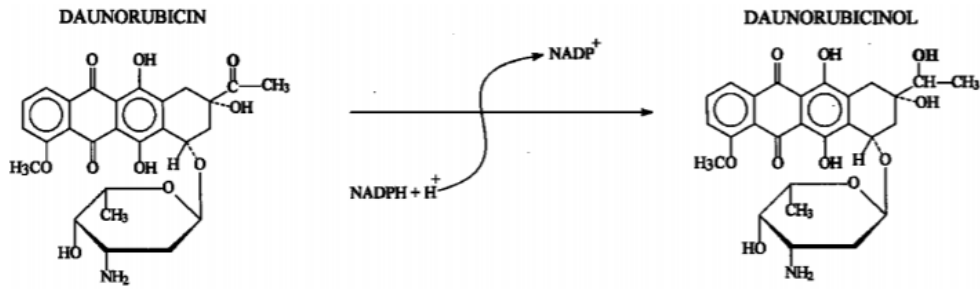
Výsledné aglykony mají vyšší lipofilitu než původní ANT. Předpokládá se, že může docházet k interkalaci do mitochondriálních membrán. (Sokolove 1994) Studie navíc naznačují, že antracyklinové aglykony mohou způsobit poškození myokardu kvůli jejich oxidačním vlastnostem. (Conklin 2004)

2.2.5 Daunorubicin hydrochlorid

DAUN je oranžovočervený krystalický prášek. Jeho vlastnostmi je snadná rozpustnost ve vodě a v methanolu, a naopak těžká rozpustnost v 96 % lihu. Prakticky nerozpustný je v acetonu. Chemická struktura je (8S,10S)-8-acetyl-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-6,8,11 trihydroxy-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracen-5,12-dion-hydrochlorid. Molekulová hmotnost DAUN je 563,99 g/mol. (Český lékopis 2017)

Jedná se o antineoplastické léčivo používané k léčbě různých druhů leukémií např. AML (myeloidní, monocytární a erytroidní vývojové řady) a ALL u dětí a dospělých. Také je první volbou léčby Kaposiho sarkomu spojeného s virem lidského imunodeficitu (HIV). Lze ho podávat pouze intravenózně. Mezi časté nežádoucí účinky patří útlum kostní dřeně a kardiotoxicita. Kardiotoxický účinek je většinou u dospělých pozorován až při kumulativní dávce 400–550 mg/m². Může nastat ale už při dávce 200mg/m². Mezi další nežádoucí účinky patří alopecie, mukositida, nevolnost, zvracení a nekróza kůže. (internet 3)

V této diplomové práci se budu věnovat inhibici přeměny DAUN na kardiotoxičtější metabolit DAUNOL (obr. 5). (Bachur a Gee 1971, Cusack a kol. 1993)

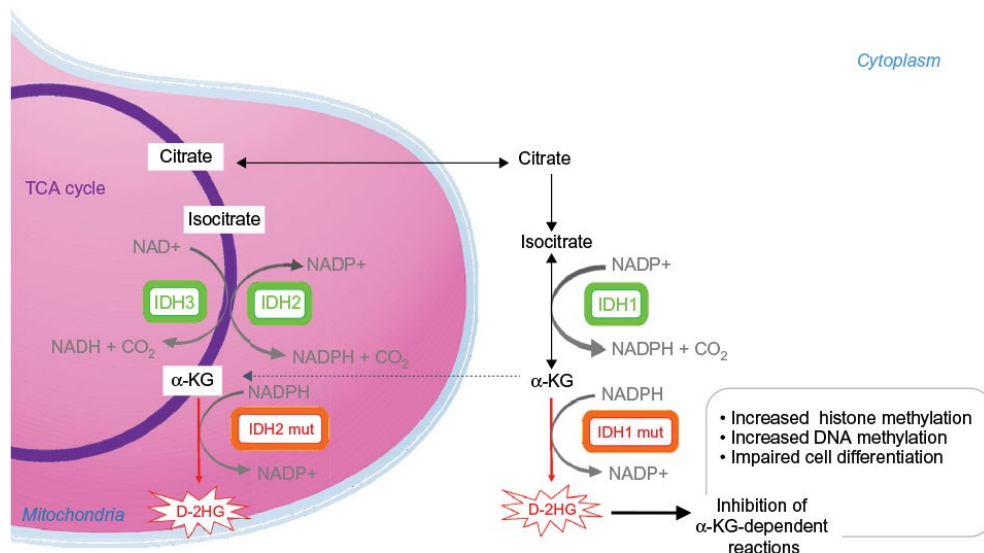


Obr. 5 Redukce karbonylu DAUN na sekundární alkohol DAUNOL

2.3 Cílená terapie

2.3.1 Inhibitory isocitrátdehydrogenasy

Isocitrátdehydrogenasa je enzym, který katalyzuje oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na 2-oxoglutarát. Dělíme je na IDH1, IDH2 a IDH3. Při AML dochází ve 20 % případů k mutacím IDH a přeměně 2-oxoglutarátu na onkometabolit R-2-hydroxyglutarát (R-2-HG); ten pak vede ke zvýšené leukemogenezi (obr. 6). Poškozuje buněčnou diferenciaci a způsobuje metylaci histonů a DNA. Na základě klinických studií byly FDA schváleny dva inhibitory IDH, a to enasidenib a ivosidenib. (Liu a Gong 2019)

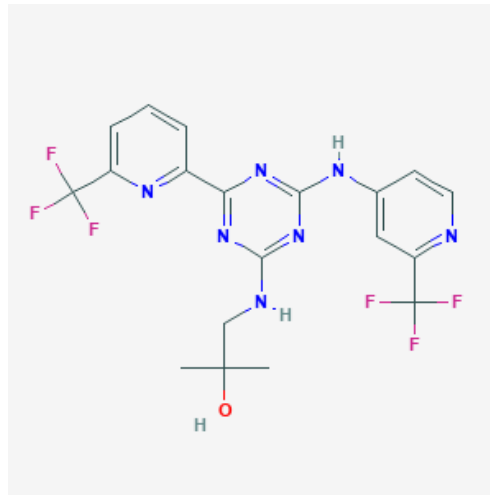


Obr. 6 Přeměna 2-oxoglutarátu (α -KG) na onkometabolit R-2-HG (Mondesir a kol. 2016)

Enasidenib

Enasidenib (ENA) (obr. 7) je inhibitor používaný k léčbě AML s mutacemi IDH2. Doporučená dávka je 100 mg jednou denně. ENA může snížit celkovou hladinu 2-HG v séru o více než 90 %. Mezi jeho nežádoucí účinky patří zvýšený bilirubin, nauzea, snížená chuť k jídlu, zvracení a průjem. Nevykazuje žádnou cytotoxicitu.

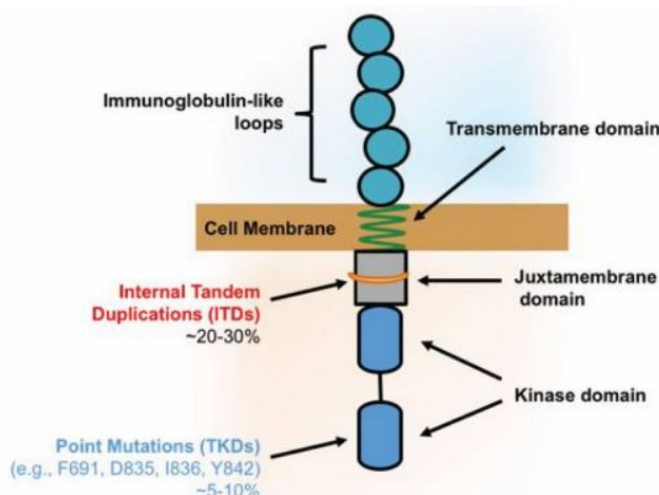
Je dobře tolerován v kombinacích se standardní chemoterapií nebo hypomethylačním činidlem (HMA) azacytidinem. (Liu a Gong 2019)



Obr. 7 Strukturní vzorec ENA (internet 4)

2.3.2 Inhibitory tyrosinkinas

FLT3 je gen kódující protein *FMS-like tyrosine kinase*. Ten hraje klíčovou roli v krvetvorbě a buněčném růstu. FLT3 je složen z extracelulární vazebné domény pro FLT3, transmembránové, juxtamembránové a kinasové domény (obr. 8).



Obr. 8 Reprezentativní receptor FLT3 ukazující umístění mutací vnitřní tandemové duplikace (ITD) a tyrosinkinasové domény (TKD) (Fletcher a kol. 2020)

Po navázání ligandu dochází nejdříve k dimerizaci a poté k fosforylaci na tyrosinkinasové doméně. Fosforylovaný FLT3 přenáší signály pomocí asociace s různými cytoplazmatickými proteiny. Ty se pak přes jednotlivé signální dráhy podílí na řízení buněčného cyklu jako je proliferace, diferenciace a apoptóza hematopoetických buněk. Mutace ve struktuře mohou vést ke zvýšení buněčné proliferace, snížení apoptózy, a až ke vzniku nádorového onemocnění.

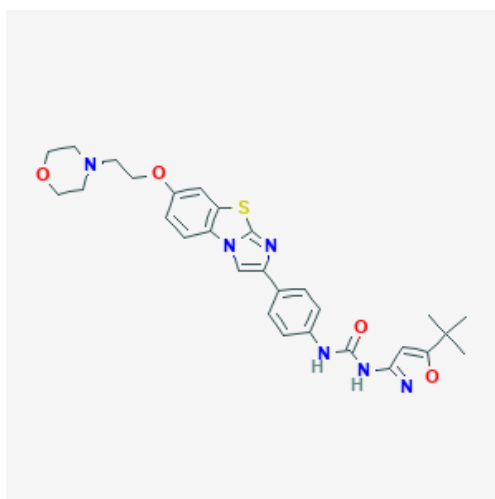
Existují dva typy mutací: interní tandemové duplikace (ITD) FLT3 a FLT3-TKD (bodová mutace na tyrosinkinasové doméně) mutace. FLT3-ITD mutace je častější. Vyskytuje se přibližně u 25 % pacientů s AML. Tyto mutace se nacházejí v juxtamembránové části genu FLT3. ITD pak vede k aktivaci prostřednictvím konstitutivní dimerizace a kinasové aktivace, která způsobí nekontrolovatelnou proliferaci a diferenciaci leukemických buněk. (Grafone a kol. 2012, Fletcher a kol. 2020)

Inhibitory první generace jsou midostaurin (inhibitor proteinkinasy C), sunitinib (inhibitor VEGFR), sorafenib (inhibitor RAF) a ponatinib (inhibitor BCR-ABL). Druhá

generace FLT3 byla navržena tak, aby byla selektivnější a účinnější. Zahrnuje quizartinib a gilteritinib. (Fletcher a kol. 2020)

Quizartinib

Quizartinib (QUI) (obr. 9) je perorální FLT3 tyrosinkinasový inhibitor druhé generace. Inhibuje jen mutace ITD a wild typ (WT), neinhibuje mutace TKD. (Garcia-Horton a Yee 2020) Mechanismem QUI je navázání na isoformu receptoru tyrosinkinasy FLT3. To vede k inhibici proliferace a k apoptóze rakovinných buněk. (Zhou a kol. 2019a) QUI je zatím schválen jen v Japonsku k léčbě relabující/refrakterní AML s mutací FLT3. (Fletcher a kol. 2020) Tuto mutaci má až 30 % pacientů s AML. (Garcia-Horton a Yee 2020) FDA a EMA žádost o schválení v roce 2019 zamítly kvůli rizikům převažujícím nad přínosy léčby. Mezi nežádoucí účinky patří neutropenie, trombocytopenie, anémie, nauzea, průjem a prodloužení QT intervalu. (Garcia-Horton a Yee 2020, Levis 2013)



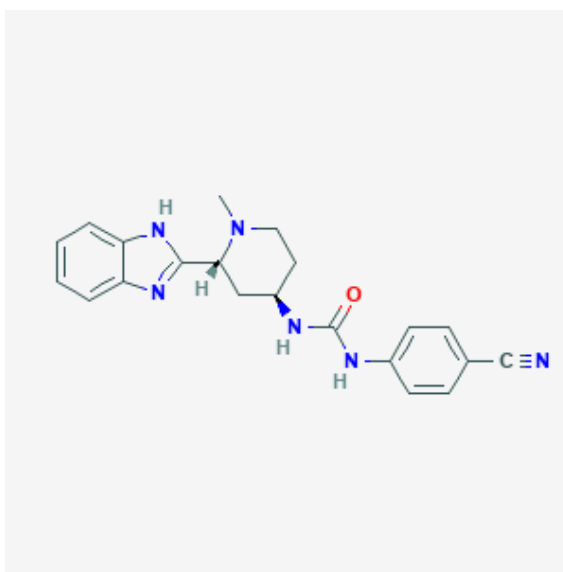
Obr. 9 Strukturní vzorec QUI (internet 5)

2.3.3 Inhibitory signální dráhy Hedgehog

Signální dráha Hedgehog hraje významnou roli v embryonálním vývoji. Je důležitá pro polaritu organismu a vývoj tkání a orgánů. Některé studie naznačují, že tato signální dráha může být zapojena do různých stádií karcinogeneze u vzniku nádorů. Aktivace této dráhy byla nalezena např. u rakoviny slinivky břišní a jícnu. U rakoviny žaludku a prostaty je spojována s vyšším metastázickým potenciálem. (Skoda a kol. 2018)

Glasdegib

Glasdegib (GLA) (obr. 10) je perorální inhibitor signální dráhy Hedgehog. Aktivita signální dráhy souvisí i s rezistencí k cytostatikům; GLA tak zvyšuje citlivost ke společně podávanému cytostatiku. Kombinuje se s cytarabinem i DAUN a tyto kombinace jsou dobře tolerovány. Nejčastěji hlášenými nežádoucími účinky souvisejícími s léčbou byly febrilní neutropenie a anémie. (Cortes a kol. 2018) Je indikován v kombinaci s nízkými dávkami cytarabinu k léčbě AML u dospělých pacientů, kteří nejsou kandidáty na standardní indukční chemoterapii. (internet 6)



Obr. 10 Strukturní vzorec GLA (internet 7)

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit inhibiční potenciál vybraných inhibitorů (ENA, GLA a QUI) na enzymy z nadrodiny AKR a SDR, které se účastní metabolismu DAUN.

Jednotlivé dílčí cíle jsou:

1. Screening inhibiční aktivity ENA, GLA a QUI s CRE z nadrodin AKR (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3) a SDR (CBR1)
2. Stanovení IC_{50} pro nejsilnější inhibitor
3. Určení inhibiční konstanty
4. Zjištění typu inhibice pro nejúčinnější inhibitor

4 MATERIÁLY A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- Acetonitril
- Amoniak 25 %
- Ethylacetát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Destilovaná voda
- DMSO
- Glukosa-6-fosfát (Roche Diagnostics, Německo)
- Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Roche Diagnostics, Německo)
- Chlorid hořečnatý 0,1M
- Kyselina mravenčí
- Methanol
- NADP+ (Sigma-Aldrich, Německo)
- Sodno-fosfátový pufr pH 7,4

Substrát:

- Daunorubicin hydrochlorid (Toronto Research Chemicals, Kanada)

Enzymy:

Enzymy byly získány rekombinantní metodou na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty (FaF) Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Byly připraveny pomocí expresního systému *E. coli*.

Tab. 4 Získané enzymy

| | | |
|---------|-------------|---------------------------------|
| CBR1 | 1,47 mg/ml | (Katedra biochemických věd FaF) |
| AKR1A1 | 0,494 mg/ml | (Katedra biochemických věd FaF) |
| AKR1B1 | 1,5 mg/ml | (Katedra biochemických věd FaF) |
| AKR1B10 | 1,555 mg/ml | (Katedra biochemických věd FaF) |
| | 1,6 1mg/ml | (Katedra biochemických věd FaF) |
| AKR1C3 | 1 mg/ml | (Katedra biochemických věd FaF) |
| | 1,3 mg/ml | (Katedra biochemických věd FaF) |

Inhibitory:

- Enasidenib (AG-221) (MedChemExpress, USA)
- Quizartinib (AC220) (MedChemExpress, USA)
- Glasdegib (PF-04449913) (MedChemExpress, USA)

4.1.2 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Automatické pipety 0,5 µl – 1000 µl (Sartorius, Německo)
- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)
- Filtry na injekční jehlu
- Injekční jehly
- Injekční plastové stříkačky
- Inzerty k vialkám (Agilent Technologies, USA)
- Kádinky
- Kopistky
- Mikrozkmavky (Eppendorf, Německo)
- Nádoba s ledem
- Pipetovací špičky (Sartorius, Německo)
- Přístroj na výrobu ledu (BREMA Ice Makers, Itálie)

- Rukavice (Vulkan Medicals, Česká republika)
- Septa do vialek (Agilent Technologies, USA)
- Stojan na zkumavky
- Stopky
- Termomixér ThermoCell MixingBlock (BIOER, Čína)
- Termomixér Thermomixer compact (Eppendorf, Německo)
- Třepačka IKA Vortex Geniae 2 (IKA, Německo)
- UHPLC systém Agilent 1290 infinity (Agilent Technologies, USA)
- Ultrazvuková čistička 120T (Ultrazvuk, s.r.o., Česká republika)
- Vakuový koncentrátor plus (Eppendorf, Německo)
- Vialky (Agilent Technologies, USA)
- Víčka na vialky (Agilent Technologies, USA)

4.2 Metodika práce

4.2.1 Testování inhibičních účinků ENA, QUI a GLA

4.2.1.1 Příprava roztoků na inkubaci

Příprava regeneračního systému

Na přípravu regeneračního systému (RS) bylo nejdříve potřeba navázat NADP⁺ a glukosu-6-fosfát. Obě tyto složky se pomocí třepačky úplně rozpustily v sodno-fosfátovém pufru. Následně byl přidán 0,1 M chlorid hořečnatý a nakonec, těsně před pipetováním do jednotlivě nadepsaných Eppendorf zkumavek, byl přidán enzym glukosa-6-fosfátdehydrogenasa. RS pro jednu 100 μ M reakci byl připraven podle tab. 5. Do každé 100 μ l reakce bylo pipetováno 20 μ l RS. RS byl vždy připravován v nadbytku a uchováván na ledu.

Tab. 5 Příprava RS na jednu 100 μ M reakci

| | Množství [mg] | Množství [μ l] |
|---------------------------|---------------|------------------------------|
| NADP ⁺ | 0,2 | rozpustit v 10 μ l pufru |
| Glukosa-6-fosfát | 0,6 | |
| MgCl ₂ (0,1 M) | | 10 |
| Glukosa-6-P dehydrogenasa | | 0,5 |

Příprava enzymů

Byly použity CRE AKR1C3, 1B10, 1A1, 1B1 a CBR1. Zásobní koncentrace enzymů byla naředěna sodno-fosfátovým pufrům na požadovanou koncentraci dle obr. 11. Do reakce bylo použito 10 μ l enzymu.

$$x \frac{mg}{ml} \times y \mu l = t \frac{mg}{ml} \times z \mu l$$

Obr. 11 Ředění enzymů (Krtilová 2020)

(Legenda k obr. 11: x = koncentrace zásobního roztoku enzymu v mg/ml; y = množství enzymu ze zásobního roztoku v μ l, neznámá hodnota; t = množství enzymu v jedné reakci v mg/ml; z = celkové množství směsi enzymu a pufru potřebné do reakcí.)

Příprava inhibitorů

Zásobní koncentrace inhibitorů v mrazicím boxu byla 10 mM a bylo nutné ji naředit roztokem dimethylsulfoxidu (DMSO) na pracovní koncentraci 500 a 2 500 μM , tak aby finální koncentrace inhibitorů v reakci při pipetování 2 μl byla 10 a 50 μM . V této práci byly použity tři inhibitory: ENA, QUI a GLA.

Příprava substrátu

Substrát byl připraven rozpuštěním 1,27 mg DAUN v 450 μl destilované vody, tak aby vznikl 5mM roztok. Do reakční směsi bylo pipetováno 10 μl .

4.2.1.2 Preinkubace a inkubace

Nejdříve byly do stojanu vyskládány řádně označené Eppendorf zkumavky. Do nich bylo pipetováno 20 μl RS a pufr s enzymem (tab. 6). Nakonec byly přidány 2 μl inhibitoru nebo DMSO u kontrolní reakce bez inhibitoru. Vše se vortexovalo pomocí třepačky a reakční směs se dala na 10 minut preinkubovat do termomixéru při teplotě 37 °C.

4.2.1.3 Vlastní enzymová reakce

Reakce byla spuštěna pipetováním 10 μl DAUN nebo vody u kontroly bez substrátu. DAUN byl přidáván vždy v přesně daný čas po 30 sekundách. Reakce byla přerušena po 30 minutách v inkubátoru při 37 °C přidáním 40 μl NH_3 (26 %) a poté ponechána 10 minut na ledu.

Následně byl přidán 1 ml ethylacetátu a Eppendorf zkumavky se daly do třepačky. Po 15 minutách extrakce se daly na 2 minuty stočit do centrifugy při 13 400 rpm. Obsah se rozdělil na dvě vrstvy. Pipetou byla odebrána horní organická vrstva a ke spodní vrstvě byl znovu přidán 1 ml ethylacetátu. Postup byl zopakován, aby se zvýšil výtěžek reakce. Vzorky se opět daly do třepačky a znovu stočit do centrifugy. Mezitím se horní organická vrstva odpařila, aby mohla být přidána druhá odebraná organická vrstva a množství se vešlo do 1,5 ml Eppendorf zkumavek. Na závěr se vše dalo odpařit při 30 °C do vakuového koncentrátoru. Po odpaření byly zkumavky skladovány v mrazicím boxu.

Tab. 6 Obecné schéma pro pipetování reakční směsi

| | pufr (μl) | enzym (μl) | regenerační systém (μl) | inhibitor (μl) | substrát (μl) |
|--|------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Neinhibovaná reakce | 60 | 10 | 20 | 0 | 10 |
| Kontrola DMSO | 58 | 10 | 20 | 2 | 10 |
| Inhibitor (10 μM finální koncentrace) | 58 | 10 | 20 | 2 | 10 |
| Inhibitor (50 μM finální koncentrace) | 58 | 10 | 20 | 2 | 10 |
| Kontrola bez enzymu | 70 | 0 | 20 | 0 | 10 |
| Kontrola bez substrátu | 60 | 10 | 20 | 0 | 0* |

*10 μl destilované vody

4.2.1.4 Příprava vzorku pro nástřik a UHPLC analýza

Odpařený vzorek byl smíchán se 400 μl mobilní fáze. Ta se skládá z 0,1 % kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Vzorek byl vortexován a dán do ultrazvuku, poté byl stočen na centrifuze. Postup se opakoval, dokud se celý vzorek úplně nerozpustil. Výsledný roztok bez jakýchkoliv nečistot byl pipetován do předem označených vialek. Nástřik na kolonu byl 5 μl. Z výsledné plochy píku produktu DAUNOLu byla vypočtena specifická aktivita enzymu.

4.2.1.5 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla nejprve zpracována v programu MS Excel. Přes vzorec (obr. 12) byla spočítaná specifická aktivita, která pak mohla být dosazena do programu GraphPad Prism 8. Následně byly srovnávány specifické aktivity jednotlivých enzymů s inhibitory.

$$\text{specifická aktivita (nmol/mg/min)} = \frac{\text{hodnota z UHPLC} \times K \times 1000}{529,54 \times 30 \times c}$$

Obr. 12 Výpočet specifické aktivity enzymu

(Legenda k obr. 12: Hodnota z UHPLC – průměrné množství DAUNOL v ng, K – koeficient ředění; spočítá se jako podíl objemu reakční směsi (400 µl) a objemu nastříkovaného na kolonu (5 µl). Koeficient ředění vychází 80. Vynásobení číslem 1 000 je ve výpočtu z důvodu převodu jednotek 1 000 µg = 1 mg, 529,54 – látkové množství DAUNOL. Vydělením vzorce číslem 30 přepočítáme vzorec na minutu, dělíme tedy počtem minut inkubace, c – koncentrace enzymu v reakci)

4.2.2 Stanovení inhibiční koncentrace IC₅₀

Příprava regeneračního systému, enzymu AKR1C3 a substrátu DAUN probíhala stejně jako v kap. 4.2.1. Inhibitor ENA byl naředěn DMSO na pracovní koncentraci 5; 15; 50; 100; 250; 1 250 a 5 000 µM tak, aby koncentrace ve 100 µM reakci byla 0,1; 0,3; 1; 2; 5; 25 a 100 µM.

Reakce probíhala stejným způsobem jako v kap. 4.2.1. Zastavení reakce však probíhalo odlišně. Bylo již možné použít rychlejší metodu, kdy bylo po 30 minutách inkubace místo NH₃ přidáno 300 µl methanolu. Zkumavky byly dány na 10 minut do ledu a následně se daly na 30 minut precipitovat do mrazicího boxu. Směs se potom dala na 10 minut odstředit. Po odstředění mohla být přefiltrována do vialek a změřena na UHPLC. Tato metoda se nejdříve nepoužívala z důvodu zanášení kolony nečistotami. Proto je velmi důležité dodržet 30 minut precipitace v mrazicím boxu a následně vzorek filtrovat.

Data byla zpracována nejdříve v MS Excel, kde byly spočítány specifické aktivity, a poté byl v programu GraphPad Prism 8 vytvořen graf.

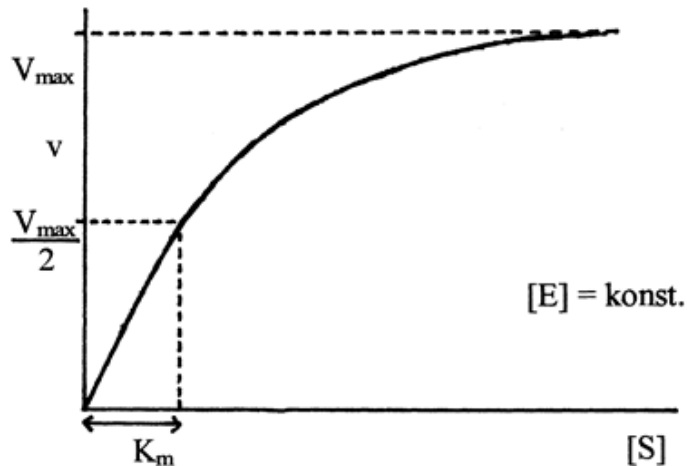
4.2.3 Stanovení hodnoty K_i a typu inhibice

Inhibiční konstanta K_i vyjadřuje vztah mezi inhibitorem a enzymem. Jedná se o disociační konstantu komplexu enzym-inhibitor. Čím je hodnota K_i menší, tím je vyšší afinita inhibitoru k enzymu. (Murray a kol. 2012)

Rovnice Michaelise a Mentenové (obr. 13) slouží k určení rychlosti enzymatické reakce. *V* vyjadřuje maximální rychlost reakce, *K_m* značí Michaelisovu konstantu. Ta vyjadřuje afinitu enzymu k substrátu. Závislost rychlosti na koncentraci má tvar hyperboly (obr. 14). (internet 8)

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Obr. 13 Rovnice dle Michaelise a Mentenové (internet 8)

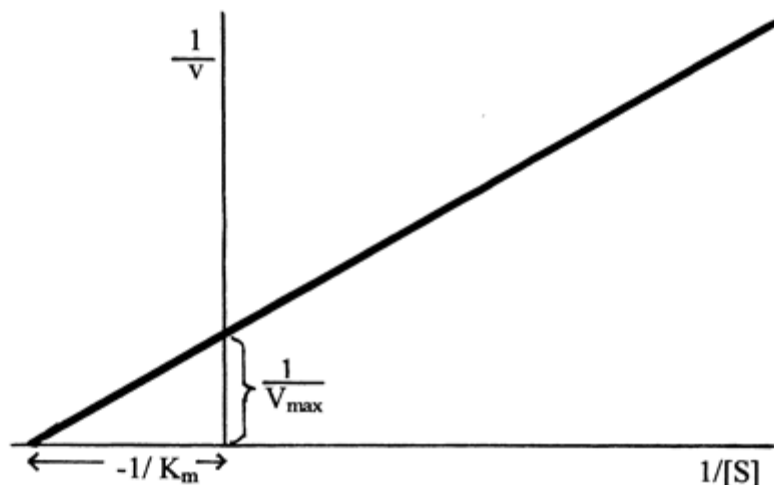


Obr. 14 Grafické znázornění rovnice Michaelise a Mentenové – závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu za konstantní koncentrace enzymu (Ledvina a kol. 2009)

Rovnice dle Lineweavera a Burka (obr. 15) slouží nejčastěji k snadnějšímu a přesnějšímu stanovení K_m a V_{\max} . Jedná se o dvojitě reciproké zobrazení. Výsledkem je přímka, která protne osu y v bodě, který odpovídá hodnotě $1/V_{\max}$, a osu x v bodě $-1/K_m$ (obr. 16) Výhodou je, že tuto přímku lze sestavit s menším počtem naměřených hodnot. (Ledvina a kol. 2009)

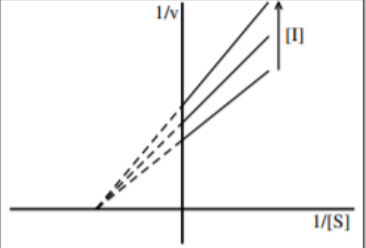
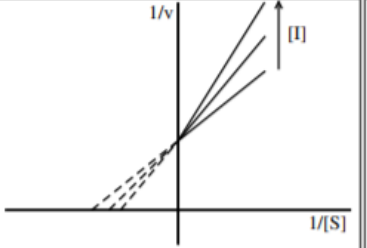
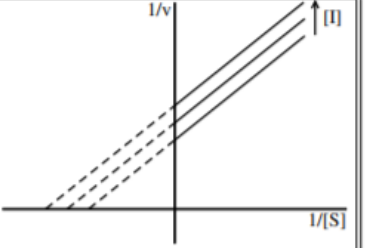
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Obr. 15 Rovnice dle Lineweavera a Burka (internet 8)



Obr. 16 Grafické znázornění rovnice Lineweavera a Burka – reciproká hodnota závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu (Ledvina a kol. 2009)

Inhibice je snížení počáteční enzymatické rychlosti. Můžeme rozlišovat tři typy inhibice: kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Kompetitivní inhibice nastane, když se inhibitor i substrát naváží na stejné aktivní místo enzymu. Nastává mezi nimi soutěž o toto místo. Výsledek je závislý na koncentraci. Rozsah inhibice potom závisí na poměru koncentrací molekul substrátu a inhibitoru. Z komplexu enzym-inhibitor nevzniká výsledný produkt. Tato reakce je však vratná. Při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže na jiné než aktivní místo enzymu. Nenastává tedy soutěž, jako je tomu u kompetitivní inhibice. Může být reverzibilní i ireverzibilní. Akompetitivní inhibice nastane, když se inhibitor naváže na již vytvořený komplex enzym-substrát (obr. 17). (Ledvina a kol. 2009)

| Nekompetitivní | Kompetitivní | Akompetitivní |
|---|--|---|
| $v = \frac{V \cdot [S]}{(K_m + [S]) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$ | $v = \frac{V \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$ | $v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot [S]}$ |
|  |  |  |

Obr. 17 Grafické znázornění kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní inhibice (internet 8)

Postup stanovení K_i

RS a enzym AKR1C3 byly připraveny stejným způsobem popsáném v kap. 4.2.1. Jako inhibitor byl použit ENA, který byl z pracovní koncentrace naředěn na 0; 0,5; 2 a 5 μM .

DAUN byl připraven smísením s destilovanou vodou v pracovních koncentracích 20 000; 10 000; 8 000; 6 000; 4 000 a 2 000 μM , tak aby výsledná koncentrace v 100 μM reakci byla 2 000; 1 000; 800; 600; 400 a 200 μM . Preinkubace, inkubace i samotná reakce probíhaly stejným způsobem a za stejných podmínek jako v kap. 4.2.1.

Postup pro preinkubaci, inkubaci i reakci proběhl identicky jako v kap. 4.2.1. a reakce byla zastavena methanolem dle kap. 4.2.2. Data byla zpracována nejdříve v MS Excel a poté v GraphPad Prism 8, kde byly vytvořeny dva grafy. Podle grafu Lineweaver–Burka bylo možné určit, o jaký typ inhibice se jedná, tedy zda je kompetitivní, nekompetitivní či akompetitivní.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato diplomová práce je zaměřena na inhibitory enzymů z nadrodiny AKR a SDR. Právě enzymy z těchto nadrodin katalyzují přeměnu ANT na jejich alkoholové metabolity. Ty jsou kardiotoxičtější než původní ANT a také ztrácí své antineoplastické vlastnosti. Vzniká na ně rezistence a může dojít až k selhání léčby.

V mnoha studiích již byla ověřena specifická aktivita enzymů AKR1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 vůči substrátu DAUN (Bukum a kol. 2019, Bains a kol. 2010, Krtilová 2020) s nimiž následně byly v této diplomové práci prováděny reakce. Specifická aktivita byla zjišťována in vitro pomocí UHPLC analýzy. Je vyjádřena v nmol na 1 mg enzymu a 1 minutu inkubace (nmol/mg/min).

Dle studie Bains a kol. (2010), kde byly CRE v přítomnosti DAUN i DOX zahrnuty enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 7A2, CBR1, 2 a 4, jsou aktivity enzymů řazeny sestupně takto: nejvíce aktivním enzymem k DAUN byl CBR1, AKR1C3, 7A2, poté 1A1 a 1B10. Nízkou aktivitu poté vykazovaly AKR1B1, 1C4, CBR3 a 1C1. Žádnou aktivitu nevykazovaly AKR1C2 a CBR4. Nejvyšší aktivitu v přítomnosti DOX vykazoval AKR1C3.

K experimentální práci byly vybrány enzymy s vyšší aktivitou k DAUN, tedy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1. Tyto enzymy již byly dříve zkoumány i s jinými inhibitory, např. s purvalanolem A, roskovitinem (Novotná a kol. 2018), olaparibem (Tavares a kol. 2020), buparlisibem (Bukum a kol. 2019), ibrutinibem (Hudáčová 2019), midostaurinem (Morell a kol. 2021) a dalšími inhibitory.

Jako první zkoumané významné CRE byly vybrány AKR1C3 a 1B10 díky své vysoké aktivitě k DAUN dle studie Bains a kol. (2010) a také na základě dalších studií.

Význam AKR1C3 v nádorových onemocněních je podpořen i skutečností, že je nadměrně exprimován v řadě leukemických buněčných linií. Jeho inhibice by nejen mohla mít značný vliv na průběh onemocnění z hlediska přeměny DAUN na DAUNOL, ale také vést ke snížené syntéze $9\alpha,11\beta$ -prostaglandinu F₂ a prostaglandinu F₂ α zprostředkovanou AKR1C3. Ty podporují růst myeloidních prekurzorů v kostní dřeni. (Verma a kol. 2019)

Druhý vybraný enzym AKR1B10 se ve zvýšených hladinách vyskytuje u některých nádorových onemocnění. (Fukumoto a kol. 2005, Yoshitake a kol. 2007) Zvýšené hladiny

exprese AKR1B10 v neoplastických buňkách mění procesy prenylace a posttranslační modifikace protoonkoproteinů. Urychlují tím vznik nádorového onemocnění. (Seliger a kol. 2018) Zvýšení hladin AKR1B10 může také vést ke snížení hladiny kyseliny retinové. Její vyčerpání bývá spojováno se ztrátou buněčné diference a rozvojem karcinogeneze. (Penning 2015) Jako vhodnější enzym by se v tomto případě jevil spíše AKR1B1, který má také zvýšené hladiny v řadě leukemických buněk. (Laffin a Petrash 2012) Má však nižší aktivitu k DAUN. (Bains a kol. 2010, Bukum a kol. 2019)

5.1 Stanovení inhibiční aktivity ENA, QUI a GLA na aktivitu AKR1C3

Proběhla dvě různá nezávislá měření enzymu AKR1C3 se třemi různými inhibitory: ENA, QUI a GLA. S inhibitorem ENA proběhly původně tři inkubace, jedna však nebyla započítána kvůli chybě měření. Měření bylo provedeno vždy v koncentracích 10 a 50 μM v triplikátech. ENA v koncentraci 50 μM inhiboval AKR1C3 z 98,8 %, ENA v koncentraci 10 μM z 94,0 %. Dva zbývající inhibitory inhibovaly signifikantně méně. Nižší inhibiční potenciál vykazoval GLA. V koncentraci 50 μM inhiboval AKR1C3 z 26,2 % a v koncentraci 10 μM z 0,9 %. QUI nevykazoval takřka žádnou inhibiční aktivitu k AKR1C3 (obr. 18). V tabulce je možno vidět i záporné hodnoty inhibice enzymové aktivity. Značí, že hodnota inhibice je velmi nízká. Tato čísla by mohla být v tabulce zapsána i jako 0 % inhibice.

V porovnání s buparlisibem (Bukum a kol. 2019), který v 10 μM koncentraci inhiboval z 48,7 % a v 50 μM koncentraci inhiboval z 80,6 %, vykazuje ENA výrazný potenciál inhibice AKR1C3. Obdobné výsledky jako ENA vykazoval midostaurin. V 10 μM koncentraci inhiboval z 87,06 % a v 50 μM koncentraci inhiboval z 93,19 %. (Morell a kol. 2021) Podobné, ale lehce vyšší působení vykazuje také při srovnání s 10 μM olaparibem (inhibice 76,0 %) a 50 μM olaparibem (inhibice 91,4 %). (Tavares a kol. 2020)

Tab. 7 První inkubace a zjištění specifické aktivity enzymu AKR1C3 s 10 a 50 μM ENA, QUI, GLA a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

| inhibitor | koncentrace(μM) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|-----------|------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | 0* | 78,9 \pm 12,4 | 100 \pm 15,7 | |
| ENA | 10 | 4,9 \pm 0,3 | 6,3 \pm 6,5 | 93,8 |
| | 50 | 0,8 \pm 0,2 | 1,1 \pm 23,8 | 98,9 |
| QUI | 10 | 80,4 \pm 2,3 | 101,8 \pm 2,8 | -1,8 |
| | 50 | 84,2 \pm 10,2 | 106,7 \pm 12,2 | -6,7 |
| GLA | 10 | 78,4 \pm 2,6 | 99,3 \pm 3,3 | 0,7 |
| | 50 | 55,5 \pm 2,2 | 70,4 \pm 3,9 | 29,6 |

měřeno v triplicátech

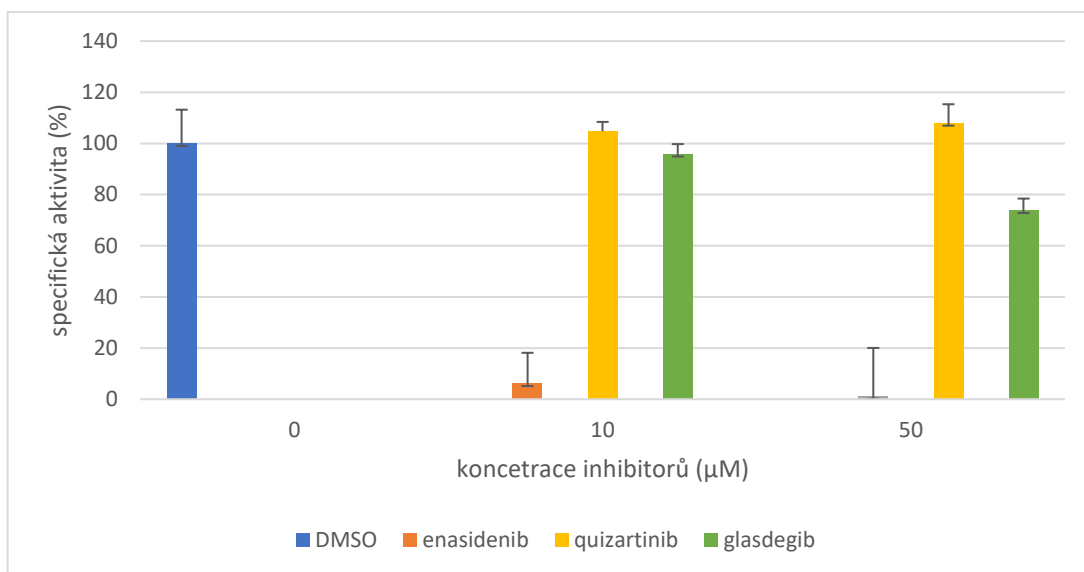
*kontrola DMSO

Tab. 8 Druhá inkubace a zjištění specifické aktivity enzymu AKR1C3 s 10 a 50 μM ENA, QUI, GLA a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

| inhibitor | koncentrace(μM) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|-----------|------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | 0* | 98,5 \pm 10,5 | 100 \pm 10,7 | |
| ENA | 10 | 5,9 \pm 1,0 | 6,0 \pm 17,0 | 94,0 |
| | 50 | 1,3 \pm 0,2 | 1,3 \pm 13,9 | 98,7 |
| QUI | 10 | 106,1 \pm 4,8 | 107,7 \pm 4,5 | -7,7 |
| | 50 | 107,6 \pm 2,8 | 109,2 \pm 2,6 | -9,2 |
| GLA | 10 | 91,1 \pm 4,0 | 92,5 \pm 4,4 | 1,0 |
| | 50 | 76,0 \pm 4,1 | 77,2 \pm 5,4 | 22,8 |

měřeno v triplicátech

*kontrola DMSO



Obr. 18 Grafické znázornění průměrné specifické aktivity enzymu AKR1C3 s inhibitory ENA, QUI a GLA, nulová koncentrace představuje kontrolní vzorek, kdy místo inhibitoru je do reakce vloženo DMSO a reprezentuje maximální aktivitu reálného vzorku (100 %)

5.2 Stanovení inhibiční aktivity ENA, QUI a GLA na aktivitu AKR1B10

Jako druhý byl zkoumán enzym AKR1B10, který byl inhibován méně. Byly provedeny dvě inkubace AKR1B10 s inhibitory v triplicátech, kde nejvíce znovu inhiboval ENA. V koncentraci 10 μM inhiboval AKR1B10 z 3,0 %, o trochu více pak v koncentraci 50 μM z 4,2 %. GLA a QUI vykazovaly spíše zvýšení enzymové aktivity (obr. 19).

V porovnání s buparlisibem (Bukum a kol. 2019), který v 10 μM koncentraci inhiboval z 8,4 % a v 50 μM koncentraci inhiboval z 9,4 %, vykazují ENA, QUI i GLA nízkou inhibici AKR1B10. Inhibice 10 μM midostaurinem (Morell a kol. 2021) byla 1,63 %, což je více než polovina inhibice ENA. 50 μM pak inhiboval z 6,47 %, tedy o více než 2 % ve srovnání s ENA. Olaparib v koncentraci 10 μM neinhiboval vůbec, stejně jako QUI a GLA (při první inkubaci). V koncentraci 50 μM potom inhiboval ze 7,7 %. (Tavares a kol. 2020)

Tab. 9 První inkubace a zjištění specifické aktivity enzymu AKR1B10 s 10 a 50 μM ENA, QUI, GLA a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

| inhibitor | koncentrace(μM) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|-----------|------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | 0* | 10,9 \pm 0,9 | 100 \pm 8,2 | |
| ENA | 10 | 10,8 \pm 1,0 | 99,4 \pm 9,0 | 0,6 |
| | 50 | 10,6 \pm 1,7 | 97,5 \pm 15,8 | 2,5 |
| QUI | 10 | 13,5 \pm 1,7 | 124,1 \pm 12,6 | -24,1 |
| | 50 | 13,4 \pm 1,4 | 123,1 \pm 10,3 | -23,1 |
| GLA | 10 | 13,2 \pm 2,9 | 121,4 \pm 21,7 | -21,4 |
| | 50 | 13,3 \pm 1,6 | 122,5 \pm 11,7 | -22,5 |

měřeno v triplicátech

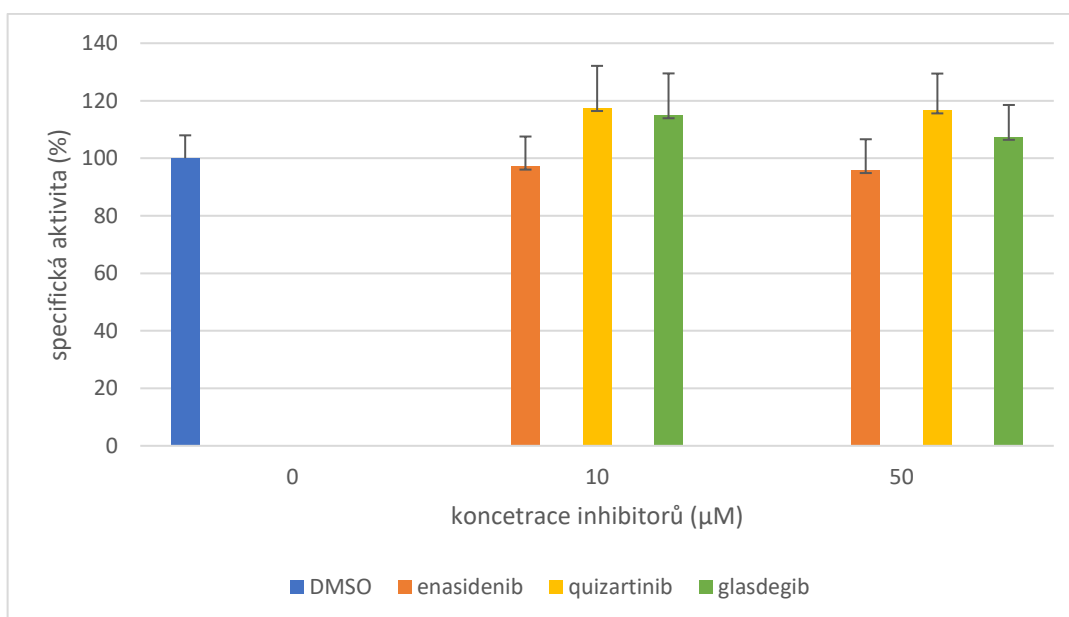
*kontrola DMSO

Tab. 10 Druhá inkubace a zjištění specifické aktivity enzymu AKR1C3 s 10 a 50 μM ENA, QUI, GLA a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

| inhibitor | koncentrace(μM) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|-----------|------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | 0* | $17,6 \pm 3,2$ | $100 \pm 18,0$ | |
| ENA | 10 | $16,6 \pm 1,8$ | $94,7 \pm 11,1$ | 5,3 |
| | 50 | $16,6 \pm 1,0$ | $94,2 \pm 5,7$ | 5,8 |
| QUI | 10 | $19,5 \pm 3,3$ | $110,7 \pm 16,8$ | -10,7 |
| | 50 | $19,4 \pm 3,0$ | $110,1 \pm 15,4$ | -10,1 |
| GLA | 10 | $18,5 \pm 1,4$ | $105,4 \pm 7,5$ | -5,4 |
| | 50 | $16,2 \pm 1,7$ | $92,3 \pm 10,5$ | 7,7 |

měřeno v triplicátech

*kontrola DMSO



Obr. 19 Grafické znázornění průměrné specifické aktivity enzymu AKR1B10 s inhibitory ENA, QUI, GLA, nulová koncentrace představuje kontrolní vzorek, kdy místo inhibitoru je do reakce vloženo DMSO a reprezentuje maximální aktivitu reálného vzorku (100 %)

5.3 Stanovení inhibiční aktivity ENA na aktivitu AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1

QUI a GLA podle předchozích experimentů s významnými CRE AKR1C3 a AKR1B10 nevykazovaly takřka žádnou inhibiční aktivitu. Byly vyhodnoceny jako málo inhibující nebo neinhibující vůbec. Proto byly následné experimenty provedeny jen s ENA.

S ENA byly inkubovány znovu enzymy AKR1C3 a 1B10 a také enzymy AKR1A1, 1B1 a CBR1. Inkubace proběhla vždy pro každý enzym samostatně v tetraplikátech. U každého enzymu byla zjištěna specifická aktivita při dvou různých experimentech a ty byly poté zprůměrovány a zpracovány do grafu (obr. 20). ENA vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu s enzymem AKR1C3. 10 μM ENA inhiboval enzym AKR1C3 z 86,3 % a v koncentraci 50 μM inhiboval z 97,0 %. Méně pak inhiboval sestupně v řadě za sebou AKR1B10, 1B1, 1A1 a vůbec neinhiboval CBR1 (obr. 20).

V již výše porovnávaných studiích s buparlisibem (Bukum a kol. 2019), midostaurinem (Morell a kol. 2021) i olaparibem (Tavares a kol. 2020) byla nejvyšší inhibiční aktivita pozorována vždy u AKR1C3, stejně jako v této práci u ENA.

Tab. 11 První inkubace a zjištění specifické aktivity enzymů AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 s 10 a 50 μ M ENA a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

| enzym | koncentrace ENA (μ M) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|----------------|----------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| CBR1 | 0* | 901,4 \pm 50,2 | 100 \pm 5,6 | |
| | 10 | 989,1 \pm 43,3 | 109,7 \pm 4,4 | -9,7 |
| | 50 | 996,3 \pm 63,9 | 110,5 \pm 6,4 | -10,5 |
| AKR1A1 | 0* | 338,3 \pm 16,6 | 100 \pm 4,9 | |
| | 10 | 355,2 \pm 32,1 | 105,0 \pm 9,0 | -5,0 |
| | 50 | 259,3 \pm 29,9 | 76,7 \pm 11,5 | 23,4 |
| AKR1B10 | 0* | 124,5 \pm 6,7 | 100 \pm 5,4 | |
| | 10 | 116,0 \pm 10,7 | 93,2 \pm 9,2 | 6,8 |
| | 50 | 104,7 \pm 10,2 | 84,1 \pm 9,8 | 15,9 |
| AKR1C3 | 0* | 29,3 \pm 8,9 | 100 \pm 30,5 | |
| | 10 | 4,7 \pm 0,9 | 15,9 \pm 19,3 | 84,1 |
| | 50 | 1,2 \pm 0,2 | 4,1 \pm 16,0 | 95,9 |
| AKR1B1 | 0* | 9,0 \pm 0,7 | 100 \pm 7,9 | |
| | 10 | 8,3 \pm 0,6 | 92,3 \pm 7,2 | 7,7 |
| | 50 | 8,4 \pm 0,4 | 93,0 \pm 4,8 | 7,0 |

měřeno v tetraplikátech

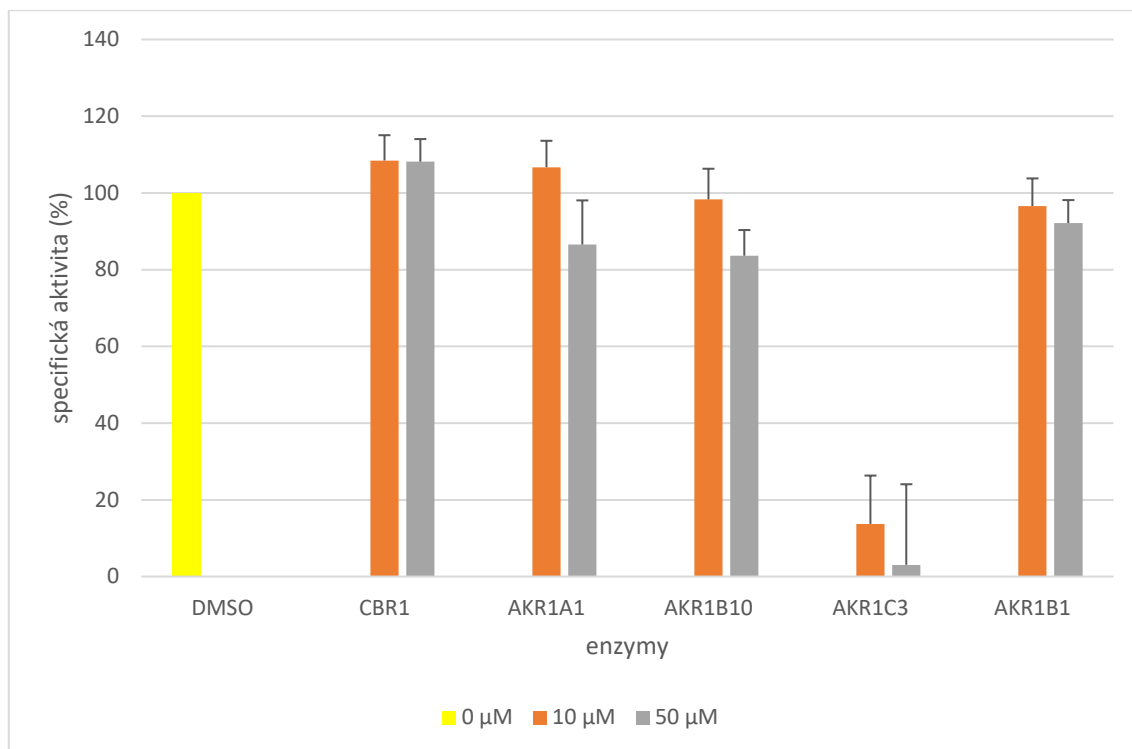
*kontrola DMSO

Tab. 12 Druhá inkubace a zjištění specifické aktivity enzymů AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 s 10 a 50 μ M ENA a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

| enzym | koncentrace ENA (μ M) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|----------------|----------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| CBR1 | 0* | 938,7 \pm 40,2 | 100 \pm 4,3 | |
| | 10 | 1 005,9 \pm 88,4 | 107,2 \pm 8,8 | -7,2 |
| | 50 | 992,8 \pm 52,5 | 105,8 \pm 5,3 | -5,8 |
| AKR1A1 | 0* | 204,7 \pm 12,7 | 100 \pm 6,2 | |
| | 10 | 221,8 \pm 10,5 | 108,4 \pm 4,7 | -8,4 |
| | 50 | 197,4 \pm 22,7 | 96,4 \pm 11,5 | 3,6 |
| AKR1B10 | 0* | 80,4 \pm 3,1 | 100 \pm 3,9 | |
| | 10 | 83,1 \pm 5,6 | 103,4 \pm 6,7 | -3,4 |
| | 50 | 66,9 \pm 2,4 | 83,2 \pm 3,6 | 16,8 |
| AKR1C3 | 0* | 39,5 \pm 15,3 | 100 \pm 38,6 | |
| | 10 | 4,6 \pm 0,3 | 11,5 \pm 5,9 | 88,5 |
| | 50 | 0,8 \pm 0,2 | 2,0 \pm 25,9 | 98,0 |
| AKR1B1 | 0* | 9,8 \pm 0,9 | 100 \pm 8,8 | |
| | 10 | 9,9 \pm 0,7 | 100,9 \pm 7,1 | -0,9 |
| | 50 | 8,9 \pm 0,6 | 91,3 \pm 7,2 | 8,7 |

měřeno v tetraplikátech

*kontrola DMSO



Obr. 20 Grafické znázornění specifické aktivity enzymů CBR1, AKR1A1, 1B10, 1C3, 1B1 s inhibitorem ENA, nulová koncentrace představuje kontrolní vzorek, kdy místo inhibitoru je do reakce vloženo DMSO a reprezentuje maximální aktivitu reálného vzorku (100 %)

5.3.1 Stanovení IC_{50}

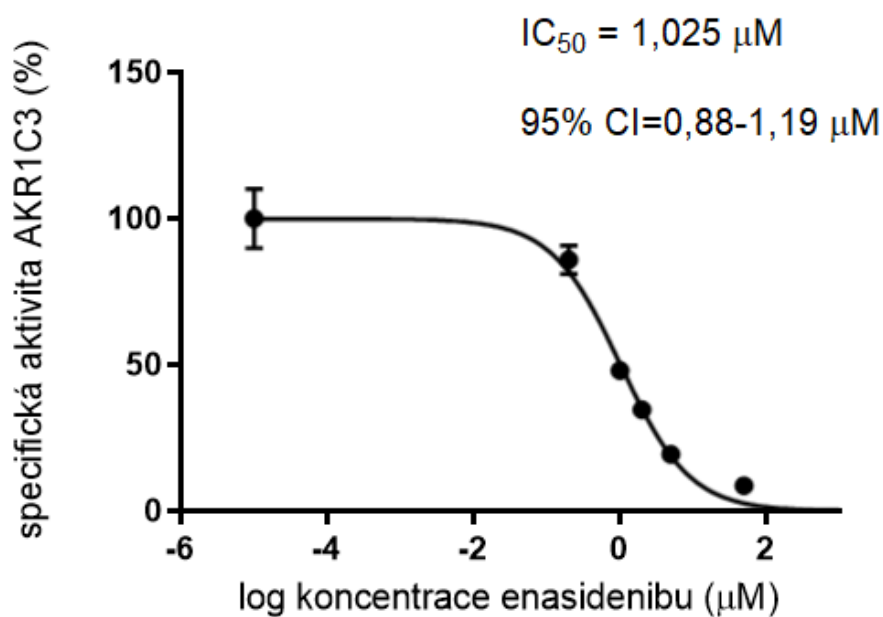
Dle výše zmíněných experimentů vykazoval ENA nejvyšší inhibiční aktivitu s enzymem AKR1C3, proto právě s ním byla stanovena hodnota IC_{50} . Tato koncentrace inhibitoru sníží aktivitu enzymu na polovinu. AKR1C3 převládá nad ostatními AKR1C isoformami při AML. Také hraje významnou roli ve vývoji leukémie a nádorů, např. u rakoviny prsu, krve, plic, prostaty, dělohy, mozku a ledvin. Její zvýšení je často úměrné agresivitě nádoru. Může také regulovat myelopoézu díky své schopnosti metabolizovat prostaglandiny. (Birtwistle a kol. 2009, Zeng a kol. 2017, Hofman a kol. 2014)

Experiment proběhl dvakrát. První měření bylo v tetraplikátech a ENA byl naředěn na koncentrace 50; 5; 2; 1 a 0,2 μ M (tab. 13). Koncentrace enzymu je stále stejná. Hodnota IC_{50} vyšla 1,025 μ M (obr. 21). Druhé měření probíhalo s více koncentracemi inhibitoru. Hodnoty byly zvoleny tak, aby lépe odpovídaly zahnutí osy. Koncentrace byly 100; 25; 5; 2; 1; 0,3 a 0,1 μ M. IC_{50} vyšlo 1,084 μ M (obr. 22). S 95 % pravděpodobností se nachází v rozmezí 0,88–1,19 μ M. Hodnoty IC_{50} vyšly nízké, proto se dá předpokládat vysoká vaznost enzymu AKR1C3 vůči inhibitoru ENA.

Tab. 13 Vybrané hodnoty koncentrací ENA s AKR1C3 určené ke stanovení hodnoty IC_{50}

| koncentrace ENA (μM) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| 0* | $107,9 \pm 11,0$ | $100 \pm 10,2$ | |
| 0,2 | $92,8 \pm 5,3$ | $85,9 \pm 5,7$ | 14,0 |
| 1,0 | $51,8 \pm 2,9$ | $48,0 \pm 5,5$ | 52,0 |
| 2,0 | $37,5 \pm 2,4$ | $34,7 \pm 6,4$ | 65,3 |
| 5,0 | $21,0 \pm 2,9$ | $19,5 \pm 2,4$ | 80,5 |
| 50 | $9,3 \pm 0,8$ | $8,7 \pm 8,3$ | 91,4 |

*kontrola DMSO

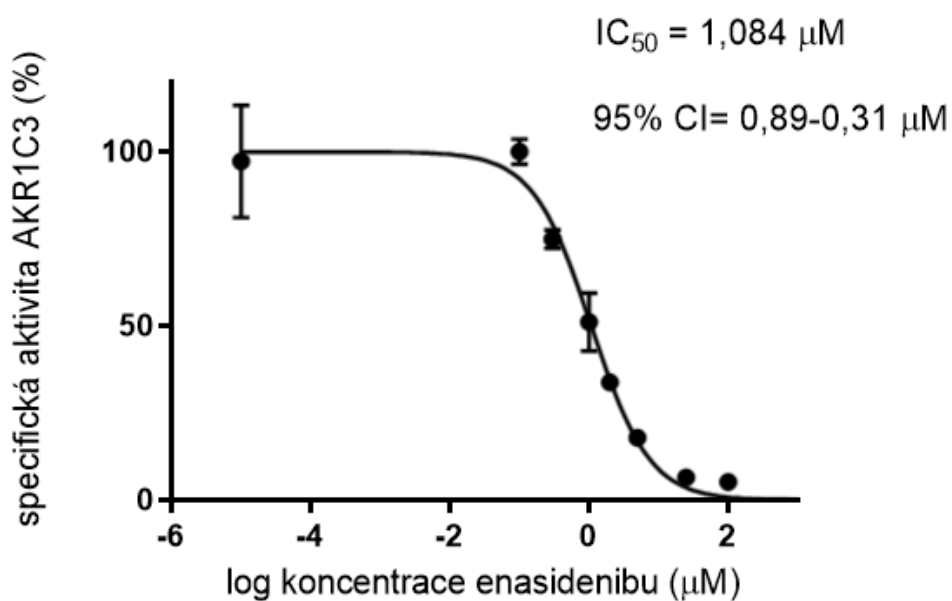


Obr. 21 Grafické znázornění závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 (osa y) na log koncentraci ENA (osa x), ze které je určena hodnota IC_{50}

Tab. 14 Vybrané hodnoty koncentrací ENA s AKR1C3 určené ke stanovení hodnoty IC_{50}

| koncentrace ENA (μM) | specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min) | specifická aktivita enzymu (%) | inhibice enzymové aktivity (%) |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| 0* | $194,6 \pm 32,4$ | $100 \pm 16,6$ | |
| 0,1 | $200,2 \pm 7,3$ | $102,9 \pm 3,6$ | -2,9 |
| 0,3 | $149,9 \pm 5,4$ | $77,0 \pm 3,6$ | 23,0 |
| 1,0 | $102,5 \pm 16,8$ | $52,7 \pm 16,4$ | 47,4 |
| 2,0 | $67,8 \pm 4,2$ | $34,9 \pm 6,2$ | 65,1 |
| 5,0 | $36,0 \pm 1,3$ | $18,5 \pm 3,5$ | 81,5 |
| 25 | $13,2 \pm 0,3$ | $6,8 \pm 2,1$ | 93,2 |
| 100 | $10,4 \pm 1,2$ | $5,4 \pm 11,6$ | 94,6 |

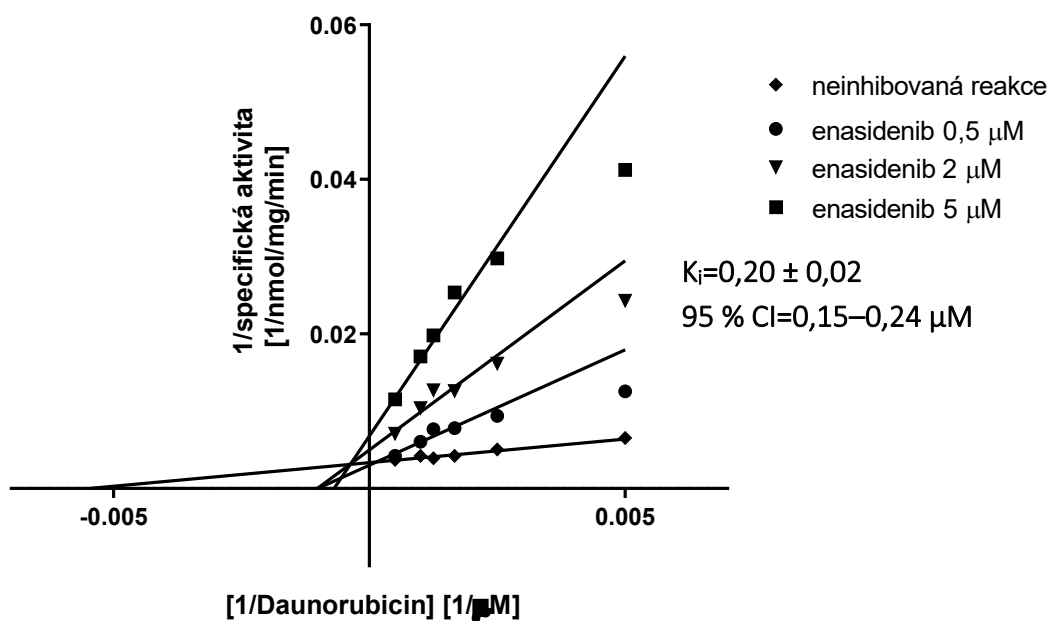
*kontrola DMSO

**Obr. 22** Grafické znázornění závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 (osa y) na log koncentraci ENA (osa x), ze které je určena hodnota IC_{50}

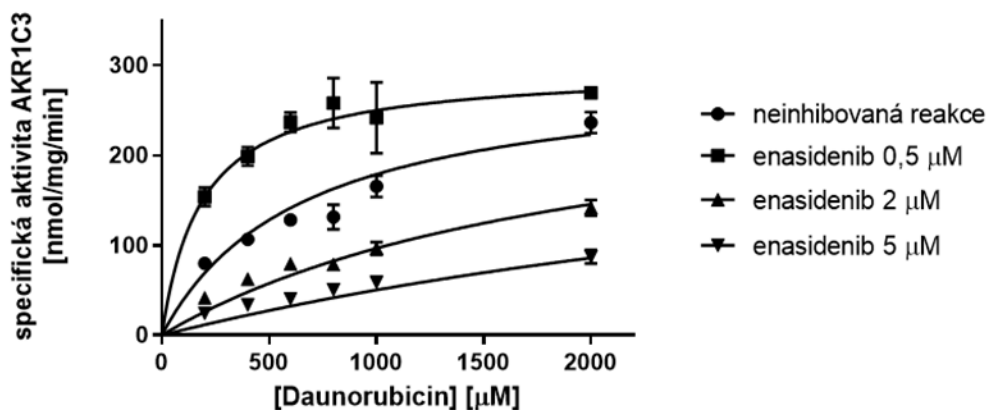
5.3.2 Stanovení hodnoty K_i

Pro stanovení inhibice byly použity rovnice Michaelise a Mentenové i Lineweavera–Burka. Byla stanovena inhibiční konstanta K_i .

Při prvním měření bylo postupováno následovně: nejdříve byla měřena hodnota K_i při koncentraci ENA 5 μM , poté při 0,5 μM a na závěr byly společně změřeny koncentrace 2 a 0 μM (DMSO). Přímký se neprotly ideálně v jednom bodě, ale protnutí se velice blížilo k ose y . Předpokládali jsme tedy kompetitivní inhibici (obr. 23). K ověření výsledku bylo třeba provést novou inkubaci. Výsledek pravděpodobně nevyšel přesně kvůli odlišným podmínkám při pipetování a spuštění reakce.

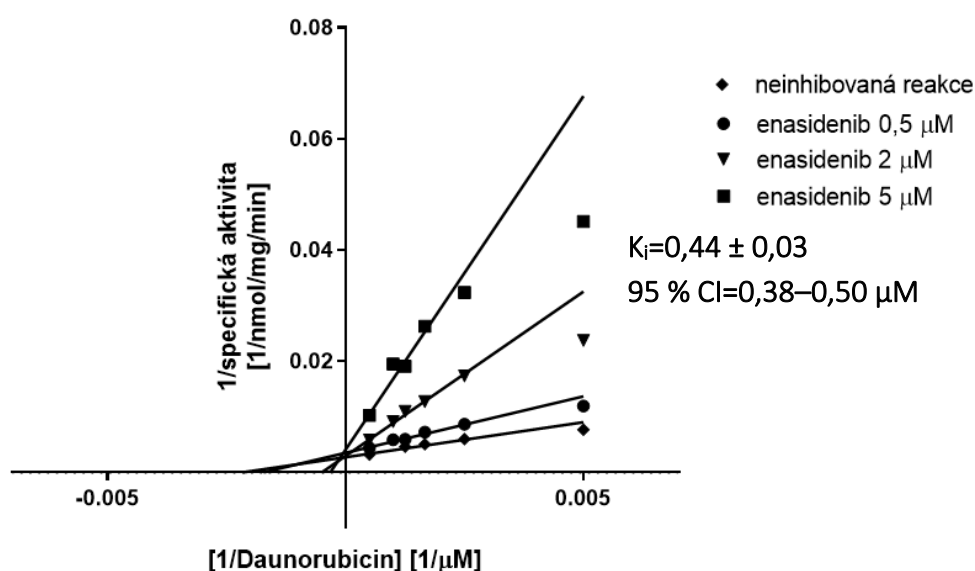


Obr. 23 Grafické znázornění určení typu inhibice dle Lineweavera–Burka

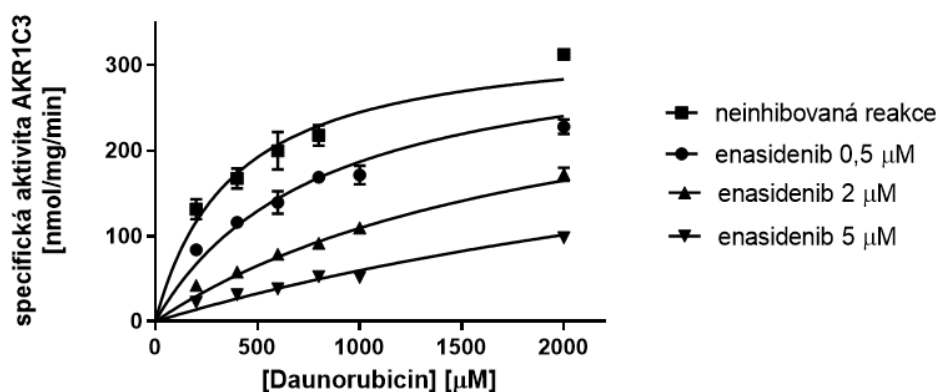


Obr. 24 Změna specifické aktivity enzymu (osa y) v závislosti na různé koncentraci inhibitoru a substrátu (osa x)

Druhé měření probíhalo se všemi koncentracemi ENA najednou (0; 0,5; 2 a 5 μM) a přímky se v grafu protly v jednom bodě na ose y . Dle grafu Lineweavera–Burka došlo ke kompetitivní inhibici enzymu AKR1C3. Hodnota K_i při druhém měření vyšla $0,44 \pm 0,03 \mu\text{M}$ (obr. 25). S 95 % pravděpodobností se bude nacházet v intervalu 0,38–0,50 μM . Kompetitivní inhibice znamená, že inhibitor soutěží se substrátem o aktivní místo enzymu, proto tento typ inhibice není vhodný. Znamenal by vyšší podávání terapeutické dávky inhibitoru, protože by bylo možné inhibitor vytlačit z vazebného místa vyšší koncentrací substrátu. Vhodnější je inhibice nekompetitivní. Nekompetitivními inhibitory jsou například purvalanol A, roskovitin (Novotná a kol. 2018), buparlisib (Bukum a kol. 2019), ibrutinib (Hudáčová 2019) nebo midostaurin (Morell a kol. 2021).



Obr. 25 Grafické znázornění určení typu inhibice dle Lineweavera–Burka



Obr. 26 Změna specifické aktivity enzymu (osa y) v závislosti na různé koncentraci inhibitoru a substrátu (osa x)

6 ZÁVĚR

Enzymy z nadrodin AKR a SDR hrají důležitou roli v metabolismu endogenních látek, xenobiotik a rozvoji různých onemocnění, proto je potřeba jejich neustálé studium. Ustavičně jsou zkoumány a nalézány nové látky zabraňující jejich negativnímu působení.

V první části této experimentální práce byl stanoven inhibiční potenciál ENA, GLA, QUI s potenciálně významnými enzymy AKR1B10 a AKR1C3, jejichž hladiny jsou v některých nádorech prokazatelně zvýšeny. Jediným významným inhibitorem s klinickým potenciálem byl ENA. Díky malému inhibičnímu potenciálu nebylo s ostatními inhibitory v experimentech dále pokračováno. U ENA byla prokázána nejvyšší inhibiční aktivita s enzymem AKR1C3, sestupně pak AKR1B10, 1B1, 1A1. CBR1 neinhiboval vůbec.

V druhé části práce byla stanovena hodnota IC_{50} pro ENA inhibující *in vitro* AKR1C3. Hodnota IC_{50} vyšla nízká, v intervalu 0,88–1,19 μM , proto předpokládáme vysokou vaznost ENA k AKR1C3.

V poslední části práce byla stanovena hodnota K_i a typ inhibice. Hodnota K_i vyšla $0,44 \pm 0,03 \mu\text{M}$ s 95 % konfidenčním intervalem 0,38–0,50 μM . ENA působí vůči DAUN jako kompetitivní inhibitor.

ENA by měl být během následujících let schválen v ČR pro léčbu relabující/refrakterní AML s prokázanou mutací v IDH2. Ze zjištění této diplomové práce se domníváme, že ENA by díky svému vlivu na AKR1C3 mohl v kombinační terapii podpořit účinky léčby AML. Je však potřeba v experimentech pokračovat a posunout je z úrovně *in vitro* na úroveň buněčných linií.

7 POUŽITÉ ZKRATKY

AKR – aldo-ketoreduktasa

AML – akutní myeloidní leukemie

ANT – antracyklinová antibiotika

ATP – adenosintrifosfát

CBR – karbonylreduktasa

CI – konfidenční interval

CRE – karbonyl redukující enzymy

DAUN – daunorubicin

DAUNOL – daunorubicinol

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DOX – doxorubicin

ENA – enasidenib

FAB – Francouzsko-Americko-Britské dělení

FDA – U.S. Food and Drug Administration

FLT3 – FMS-like tyrosine kinase 3

GLA – glasdegib

IC₅₀ – poloviční inhibiční koncentrace

IDA – idarubicin

IDH – isocitrátdehydrogenasa

ITD – interní tandemové duplikace

K_i – inhibiční konstanta

K_m – Michaelisova konstanta

MDR – dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem

MLR – mnohočetná léková rezistence
mRNA – mediátorová RNA
NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát
NSAID – nesteroidní antiflogistika
QUI – quizartinib
R-2-HG – R-2-hydroxyglutarát
RAF – proteinkinasa spouštějící fosforylační kaskádu
ROS – reaktivní formy kyslíku
SDR – dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
T-ALL – akutní lymfoblastická leukémie T-buněk
TKD – tyrosinkinasová doména
TOP II. – topoisomerasa II.
UHPLC – ultra účinná kapalinová chromatografie
VEGFR – receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
WHO – World Health Organization

8 POUŽITÁ LITERATURA

Adam Z., Vorlíček J. (2001) Hematologie II. Přehled maligních hematologických nemocí. 1. vydání. Grada. Praha. str. 36–46.

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček, J. (2008) Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí. 2., dopl. a zcela přeprac. vydání. Grada. Praha. str. 29–38.

Arcamone F. (1984) Adriamycin and its Analogs. *Tumori Journal*, 70(2), 113-119.

Bachur N. R., Gee M. (1971) Daunorubicin metabolism by rat tissue preparations. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 177(3), 567–572.

Bains O. S., Takahashi R. H., Pfeifer T. A., Grigliatti T. A., Reid R. E., Riggs K. W. (2008) Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals*, 36(5), 904–910.

Bains O. S., Grigliatti A. T., Reid R. E., Riggs K. W. (2010) Naturally Occurring Variants of Human Aldo-Keto Reductases with Reduced In Vitro Metabolism of Daunorubicin and Doxorubicin. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 335(3), 533–545.

Barski O., Tipparaju S., Bhatnagar A. (2008) The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 4(40), 553–624.

Birtwistle J., Hayden R. E., Khanim F. L., Green R.M., Pearce C., Davies N. J., Bunce C. M. (2009) The aldo-keto reductase AKR1C3 contributes to DNA damage in myeloid cells: implications for leukemogenesis. *Mutation Research*, 662(1–2), 67–74.

Bučková P., Buliková A., Cermanová M. a kol. (2013) Akutní myeloidní leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké. 1. vydání. Česká leukemická skupina – pro život (CELL). Brno. 76 stran.

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

Byrns M. C., Duan L., Lee S. H., Blair I. A., Penning T. M. (2010) Aldo-keto reductase 1C3 expression in MCF-7 cells reveals roles in steroid hormone and

prostaglandin metabolism that may explain its over-expression in breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3), 177-187.

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

Cardinale D., Iacopo F., Cipolla C. M. (2020) Cardiotoxicity of Anthracyclines. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 7, 26.

Conklin K. A. (2004) Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative cancer therapies*, 3(4), 294-300.

Cortes J. E., Douglas Smith B., Wang E. S., Merchant A., Oehler V. G., Arellano M., DeAngelo D. J., Pollyea D. A., Sekeres M. A., Robak T., Ma W. W., Zeremski M., Naveed Shaik M., Douglas Laird A., O'Connell A., Chan G., Schroeder M. A. (2018) Glasdegib in combination with cytarabine and daunorubicin in patients with AML or high-risk MDS: Phase 2 study results. *American journal of hematology*, 93(11), 1301-1310.

Cusack B. J., Mushlin P. S., Voulelis L. D., Li X., Boucek R. J., Olson R. D. (1993) Daunorubicin-induced cardiac injury in the rabbit: a role for daunorubicinol?. *Toxicology and applied pharmacology*, 118(2), 177-185.

Český lékopis: Pharmacopoea Bohemica (2017) 1. vydání. Grada. Praha. str. 1712.

Di Marco A., Cassinelli G., Arcamone F. (1981) The discovery of daunorubicin. *Cancer treatment reports*, 65 (4), 3-8.

Di Stefano J. K., Davis B. (2019) Diagnostic and Prognostic Potential of AKR1B10 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 11(4), 486.

Doubek M., Mayer J. (2020) Léčebné postupy v hematologii. 1. vydání. Česká hematologická společnost ČLS JEP. Brno. 525 stran.

Edwardson D. W., Narendrula R., Chewchuk S., Mispel-Beyer K., Mapletoft J. P., Parissenti A. M. (2015) Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current drug metabolism*, 16(6), 412-426.

Fletcher L., Joshi S. K., Traer E. (2020) Profile of Quizartinib for the Treatment of Adult Patients with Relapsed/Refractory FLT3-ITD-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Management Research*, 12, 151–163.

Forrest R. L., Gonzales N. R. (2000) Carbonyl reductase. *Chemico-biological interactions*, 129, 21–40.

Fukumoto S., Yamauchi N., Moriguchi H., Hippo Y., Watanabe A., Shibahara J., Taniguchi H., Ishikawa S., Ito H., Yamamoto S., Iwanari H., Hironaka M., Ishikawa Y., Niki T., Sohara Y., Kodama T., Nishimura M., Fukayama M., Dosaka-Akita H., Aburatani H. (2005) Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(5), 1776–1785.

Gallego O., Ruiz F. X., Ardèvol A., Domínguez M., Alvarez R., de Lera A. R., Rovira, C., Farrés J., Fita I., Parés X. (2007) Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20764-20769.

Garcia-Horton A., Yee K. W. (2020) Quizartinib for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 21(17), 2077–2090.

Gonzalez-Covarrubias V., Ghosh D., Lakhman S. S., Pendyala L., Blanco J. G. (2007) A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1 V88I) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35(6), 973–980.

Grafone T., Palmisano M., Nicci C., Storti S. (2012) An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology reviews*, 6(1), 64–72.

Hoffmann F., Maser E. (2007) Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metabolism Reviews*, 39(1), 87–144.

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

Hudáčová L. (2019) Vliv inhibice bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na aktivitu vybraných reductas z nadrodiny AKR a SDR. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 75 stran.

Jang M., Kim Y., Won H., Lim S., Jyothi K. R., Dashdorj A., Min Y. H., Kim S. Y., Shokat K. M., Ha J., Kim S. S. (2012) Carbonyl reductase 1 offers a novel therapeutic target to enhance leukemia treatment by arsenic trioxide. *Cancer research*, 72(16), 4214–4224.

Jez J. M., Flynn T. G., Penning T. M. (1997) A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical pharmacology*, 54, 639–647.

Jörnvall H., Landreh M., Östberg L. J. (2015) Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 75–79.

Kassner N., Huse K., Martin H. J., Gödtel-Armbrust U., Metzger A., Meineke I., Brockmüller J., Klein K., Zanger U. M., Maser E., Wojnowski L. (2008) Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 36(10), 2113–2120.

Katzung B. G. (2006) *Základní a klinická farmakologie*. 2. vydání. H&H. Jinočany. str. 885–887.

Kavanagh K. L., Jörnvall H., Persson B., Oppermann U. (2008) Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(24), 3895–3906.

Kim Y. N., Jung H. Y., Eum W. S., Kim D. W., Shin M. J., Ahn E. H., Kim S. J., Lee C. H., Yong J. I., Ryu E. J., Park J., Choi J. H., Hwang I. K., Choi S. Y. (2014) Neuroprotective effects of PEP-1-carbonyl reductase 1 against oxidative-stress-induced ischemic neuronal cell damage. *Free radical biology and medicine*, 69, 181–196.

Klener P. (2002) *Klinická onkologie*. 1. vydání. Galén-Karolinum. Praha. 686 stran.

Kotas R., Ambler Z. (2012) Patofyziologie diabetické neuropatie. *Neurologie pro praxi*, 13, 7–11.

Krtilová K. (2020) Vliv inhibice tepotinibu, entrektinibu a sapanisertibu na aktivitu vybraných reductas z nadrodiny AKR, Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 76 stran.

Laffin B., Petrash J. M. (2012) Expression of the Aldo-Ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in Human Cancers. *Frontiers in pharmacology*, 3, 104.

Lai C., Doucette K., Norsworthy K. (2019) Recent drug approvals for acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 100.

Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2009) *Biochemie pro studující medicíny*, I. a II. díl. 2. vydání. Karolinum. Praha. 568 stran.

Lee J. H., Berger J. M. (2019) Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. *Genes*, 10(11), 859.

Levis M. (2013) Quizartinib in acute myeloid leukemia. *Clinical advances in hematology and oncology*, 11(9), 586–588.

Li J., Guo Y., Duan L., Hu X., Zhang X., Hu J., Huang L., He R., Hu Z., Luo W., Tan T., Huang R., Liao D., Zhu Y. S., Luo D. X. (2017) AKR1B10 promotes breast cancer cell migration and invasion via activation of ERK signaling. *Oncotarget*, 8(20), 33694–33703.

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

Liu X., Gong Y. (2019) Isocitrate dehydrogenase inhibitors in acute myeloid leukemia. *Biomarker research*, 7, 22.

Liu Y., He S., Chen Y., Liu Y., Feng F., Liu W., Guo Q., Zhao L., Sun H. (2020) Overview of AKR1C3: Inhibitor Achievements and Disease Insights. *Journal of medicinal chemistry*, 63(20), 11305–11329.

Marek J. (1998) *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 2., přeprac. a rozšířené vydání. Grada. Praha. str. 318–319.

Martins-Teixeira M. B., Carvalho I. (2020) Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem*, 15(11), 933–948.

Mayer J., Starý J. a kol. (2002) *Leukemie*. 1. vydání. Grada. Praha. str. 123–125.

Miura T., Nishinaka T., Terada T. (2008) Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Molecular and cellular biochemistry*, 315, 113–121.

Mladosievičová B. a kol. (2014) *Kardioonkologie. 2., přepracované a dopl. vydání.* Grada. Praha. 208 stran.

Mondesir J., Willekens C., Touat M., de Botton S. (2016) IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. *Journal of blood medicine*, 7, 171–180.

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

Mordente A., Meucci E., Silvestrini A., Martorana G., Giardina B. (2009) New Developments in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Current medicinal chemistry*, 16(13), 1656–1572.

Morell A., Novotná E., Milan J., Danielisová P., Büküm N., Wsól V. (2021) Selective inhibition of aldo-keto reductase 1C3: a novel mechanism involved in midostaurin and daunorubicin synergism. *Archives of toxicology*, 95(1), 67–78.

Murakami A., Yakabe K., Yoshidomi K., Sueoka K., Nawata S., Yokoyama Y., Tsuchida S., Al-Mulla F., Sugino N. (2012) Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. *Cancer letters*, 323(1), 69–76.

Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennely P. J., Rodwell V. W., Weil P. A. (2012) *Harperova ilustrovaná biochemie. 5. vydání.* Galén. Praha. 730 stran.

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

Novotná R., Wsól V., Xiong G., Maser E. (2008) Inactivation of the anticancer drug doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicology letters*, 181(1), 1–6.

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

Oppermann U., Filling C., Hult M., Shafqat N., Wu X., Lindh M., Shafqat J., Nordling E., Kallberg Y., Persson B., Jörnvall H. (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-biological interactions*, 143–144, 247–253.

Osawa Y., Yokoyama Y., Shigeto T., Futagami M., Mizunuma H. (2015) Decreased expression of carbonyl reductase 1 promotes ovarian cancer growth and proliferation. *International journal of oncology*, 46(3), 1252–1258.

Palackal N. T., Burczynski M. E., Harvey R. G., Penning T. M. (2001) The ubiquitous aldehyde reductase (AKR1A1) oxidizes proximate carcinogen trans-dihydrodiols to o-quinones: potential role in polycyclic aromatic hydrocarbon activation. *Biochemistry*, 40(36), 10901–10910.

Pastel E., Pointud J.-C., Volat F., Martinez A., Lefrançois-Martinez A.-M. (2012) AldoKeto Reductases 1B in Endocrinology and Metabolism. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 148.

Penning T. M. (2015) The Aldo-Keto Reductases (AKRs): Overview. *Chemico-biological interactions*, 234, 236–246.

Persson B., Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H. (2003) Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-biological interactions*, 143–144, 271–278.

Persson B., Kallberg Y., Bray J. E., Bruford E., Dellaporta S. L., Favia A. D., Duarte R. G., Jörnvall H., Kavanagh K. L., 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(1–3), 94–98.

Poynter J., Richardson M., Roesler M., Blair C. K., Hirsch B., Nguyen P., Cioc A., Cerhan J. R., Warlick E. (2017) Chemical exposures and risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in a population-based study. *International journal of cancer*, 140(1), 23–33.

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

Ramana K. V., Chandra D., Srivastava S., Bhatnagar A., Aggarwal B. B., Srivastava, S. K. (2002) Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(35), 32063–32070.

Rashid M. A., Lee S., Tak E., Lee J., Choi T. G., Lee J. W., Kim J. B., Youn J. H., Kang I., Ha J., Kim S. S. (2010) Carbonyl reductase 1 protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Free radical biology and medicine*, 49(10), 1522–1533.

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

Rizner T. L., Smuc T., Ruprecht R., Sinkovec J., Penning T. M. (2006). AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 248(1-2), 126–135.

Saraswat M., Mrudula T., Kumar P. U., Suneetha A., Rao Rao T. S., Srinivasulu M., Reddy B. (2006) Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 12(12), CR525–CR529.

Seliger J. M., Misuri L., Maser E., Hintzpeter J. (2018) The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 33(1), 607–14.

Schwab A., Siddiqui A., Vazakidou M. E., Napoli F., Böttcher M., Menchicchi B., Raza U., Saatci Ö., Krebs A. M., Ferrazzi F., Rapa I., Dettmer-Wilde K., Waldner M. J., Ekici A. B., Rasheed S., Mougiakakos D., Oefner P. J., Sahin O., Volante M., Greten F. R., Ceppi P. (2018) Polyol Pathway Links Glucose Metabolism to the Aggressiveness of Cancer Cells. *Cancer research*, 78(7), 1604–1618.

Skoda A. M., Simovic D., Karin V., Kardum V., Vranic S., Serman L. (2018) The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 18(1), 8–20.

Sokolove P. M. (1994) Interactions of adriamycin aglycones with mitochondria may mediate adriamycin cardiotoxicity. *The International journal of biochemistry*, 26(12), 1341–1350.

Šálek C. (2012) Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní medicína pro praxi* 14(10), 366–372.

Štěřba M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V., Šimůnek T. (2013) Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxidants and redox signaling*, 18(8), 899–929.

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

Takahashi M., Fujii J., Miyoshi E., Hoshi A., Taniguchi N. (1995) Elevation of aldose reductase gene expression in rat primary hepatoma and hepatoma cell lines: implication in detoxification of cytotoxic aldehydes. *International journal of cancer*, 62(6), 749–754.

Tan K. B., Dorman T. E., Falls K. M., Chung T. D., Mirabelli C. K., Crooke S. T., Mao J. (1992) Topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively. *Cancer research*, 52(1), 231–234.

Tavares T. S., Hofman J., Lekešová A., Želazková J., Wsól V. (2020) Olaparib Synergizes the Anticancer Activity of Daunorubicin via Interaction with AKR1C3. *Cancers*, 12(11), 3127.

Timsit Y. (2011) Local sensing of global DNA topology: From crossover geometry to type II topoisomerase processivity. *Nucleic acids research*, 39(20), 8665–8676.

Varatharajan S., Abraham A., Zhang W., Shaji R. V., Ahmed R., Abraham A., George B., Srivastava A., Chandy M., Mathews V., Balasubramanian P. (2012) Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. *European journal of clinical pharmacology*, 68(12), 1577–1586.

Verma K., Zang T., Penning T. M., Trippier P. C. (2019) Potent and Highly Selective Aldo-Keto Reductase 1C3 (AKR1C3) Inhibitors Act as Chemotherapeutic Potentiators in Acute Myeloid Leukemia and T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of medicinal chemistry*, 62(7), 3590–3616.

Wei J., Li G., Dang S., Zhou Y., Zeng K., Liu M. (2016) Discovery and Validation of Hypermethylated Markers for Colorectal Cancer. *Disease markers*, 2016, 2192853.

Wirth H., Wermuth B. (1992) Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 40(12), 1857–1863.

Xiao M. B., Jin D. D., Jiao Y. J., Ni W. K., Liu J. X., Qu L. S., Lu C. H., Ni R. Z., Jiang F., Chen W. C. (2018) β 2-AR regulates the expression of AKR1B1 in human pancreatic cancer cells and promotes their proliferation via the ERK1/2 pathway. *Molecular biology reports*, 45(6), 1863–1871.

Xu D., Aka J. A., Wang R., Lin S. X. (2017) 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 is negatively correlated to apoptosis inhibitor GRP78 and tumor-secreted protein PGK1, and modulates breast cancer cell viability and proliferation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 171, 270–280.

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

Yoshitake H., Takahashi M., Ishikawa H., Nojima M., Iwanari H., Watanabe A., Aburatani H., Yoshida K., Ishi K., Takamori K., Ogawa H., Hamakubo T., Kodama T., Araki Y. (2007) Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 17(6), 1300–1306.

Yun M., Choi A. J., Woo S. R., Noh J. K., Sung J. Y., Lee J. W., Eun Y. G. (2020) Inhibition of Carbonyl Reductase 1 Enhances Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through β -catenin-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Cancer*, 11(3), 533–541.

Zeindl-Eberhart E., Haraida S., Liebmann S., Jungblut P. R., Lamer S., Mayer D., Jäger G., Chung S., Rabes H. M. (2004) Detection and identification of tumor-associated protein variants in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 39(2), 540–549.

Zeng C. M., Chang L. L., Ying M. D., Cao J., He Q. J., Zhu H., Yang B. (2017) Aldo-keto reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, regulation, and intervention for anti-cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1–9.

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

Zhou F., Ge Z., Chen B. (2019a) Quizartinib (AC220): a promising option for acute myeloid leukemia. *Drug design, development and therapy*, 13, 1117–1125.

Zhou H. L., Zhang R., Anand P., Stomberski C. T., Qian Z., Hausladen A., Wang L., Rhee E. P., Parikh S. M., Karumanchi S. A., Stamler J. S. (2019b) Metabolic reprogramming by the S-nitroso-CoA reductase system protects against kidney injury. *Nature*, 565(7737), 96–100.

Internetové zdroje:

Internet 1: Vakiti A., Mewawalla P., Acute Myeloid Leukemia, StatPearls Publishing [online]. [cit. 1.03.2021]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>>.

Internet 2: AKR superfamily [online]. [cit. 27.04.2021]. <<https://hosting.med.upenn.edu/akr/nomenclature/>>.

Internet 3: Saleem T., Kasi A., Daunorubicin, StatPearls Publishing [online]. [cit. 1.03.2021]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559073/>>.

Internet 4: Enasidenib [online]. [cit. 15.03.2021]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enasidenib#section=2D-Structure>>.

Internet 5: Quizartinib [online]. [cit. 15.03.2021]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quizartinib>>.

Internet 6: ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS [online]. [cit. 15.03.2021]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/daurismo-epar-product-information_en.pdf>.

Internet 7: Glasdegib [online]. [cit. 15.03.2021]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glasdegib#section=2D-Structure>>.

Internet 8: Enzymy [online]. [cit. 15.03.2021]. Dostupné z: <<https://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/praktika/enzymy.pdf>>.