

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**Vliv inhibice tepotinibu, entrektinibu a sapanisertibu
na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR.**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2020

Kamila Krtilová

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

Kamila Krtilová

V Hradci Králové

.....

Datum

Podpis

Poděkování:

„Děkuji svému školiteli prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, Ph.D. za pomoc při zpracování diplomové práce, odborné vedení a shovívavost. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Evě Novotné, Ph.D. za cenné rady a Mgr. Lence Laštovičkové za pomoc při práci v laboratoři; v neposlední řadě bych chtěla poděkovat příteli, rodině a přátelům za podporu a trpělivost.“

ABSTRAKT

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Kamila Krtilová

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

Název diplomové práce: Vliv inhibice tepotinibu, entrektinibu a sapanisertibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR.

V České republice je znatelný zvyšující se trend rozvoje plicního karcinomu. Toto tvrzení koresponduje s faktem, že je karcinom plic celosvětově nejčastějším typem nádorového onemocnění.

Karbonyl redukující enzymy se vyskytují v různých tkáních, kde jsou zodpovědné za rozvoj mnoha onemocnění, zánětů, nádorů a nádorové rezistence. Tyto NAD(P)H-dependentní oxidoreduktázy způsobují redukci karbonylových sloučenin na příslušné alkoholy a snižují tak toxicitu léčiva pro nádorové buňky. V neposlední řadě jsou tyto enzymy zodpovědné za proliferaci a diferenciaci nádorových buněk a zvýšenou agresivitu nádoru.

Předmětem této práce bylo studium inhibičního vlivu vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDKi) na aktivitu aldo-ketoreduktáz (AKR). Tyto inhibitory však neinhibují pouze předpokládané CDK, ale prokázaly také schopnost inhibice efluxních transportérů a inhibují i karbonyl redukující enzymy.

Inhibiční efekt tepotinibu, entrektinibu a sapanisertibu byl stanoven za použití UHPLC analýzy. Největší inhibiční potenciál vůči enzymu AKR1C3 prokázal 50 μM tepotinib, který enzym inhiboval ze 70,57 %, a proto byl vybrán pro další testování. Pro tepotinib byla stanovena IC_{50} , K_i a typ inhibice. Hodnota IC_{50} pro tepotinib je v rozmezí 8,45 -12,20 μM a hodnota inhibiční konstanty (K_i) je 4,38 \pm 0,65 μM . Měřením bylo zjištěno, že se tepotinib chová jako kompetitivní inhibitor.

Dá se předpokládat, že použitím kombinované terapie, která bude obsahovat cytostatikum a inhibitor CDK, dojde ke zvýšení úspěšnosti léčby a snížení výskytu nežádoucích účinků konvenční terapie.

ABSTRACT

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

Candidate: Kamila Krtilová

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

Title of diploma thesis: Inhibitory effect of tepotinib, entrectinib, and sapanisertib on an activity of selected reductases from AKR superfamily.

The lung carcinoma has an increasing trend in the Czech Republic. These findings correspond to the fact that lung carcinoma is the most common type of cancer worldwide.

Carbonyl reducing enzymes occur in different types of tissues, and they are responsible for the development of inflammation, cancer, and cancer resistance. These NADPH-dependent oxidoreductase cause the reduction of carbonyl groups to alcohol compound and decrease the toxicity of drug for tumor cells. Last but not least, these enzymes are responsible for tumor cell proliferation, differentiation, and increased tumoral aggressivity.

This work aimed to study the inhibition effect of chosen cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) on the activity of Aldo-keto reductases. Besides inhibition of CDK, the ability to inhibit efflux transporters and carbonyl reducing enzymes was proved at CDK inhibitors.

The inhibition effect of tepotinib, entrectinib and sapanisertib was determined by UHPLC analysis. The most significant inhibition potential to AKR1C3 was observed at tepotinib 50 μM (70,57 % of enzyme was inhibited). Thus tepotinib was selected for further tests. The value of IC_{50} of tepotinib was calculated in the range 8,48 – 12,20 μM , and the value of inhibitory constant was in the range 4,38 \pm 0,65 μM . The experiment shows that tepotinib is a competitive inhibitor.

We can assume that the combination of cytostatic and inhibitors of CDK may increase the effect of the treatment and eliminate the occurrence of side effects of conventional treatment.

Obsah

1. Úvod	8
2. Teoretická část	10
2.1. Nenalobuněčný bronchogenní karcinom (NSCLC).....	10
2.2. Konvenční terapie	10
2.3. Cílená terapie	11
2.3.1. Inhibitory proteinkináz.....	11
2.3.1.1. Inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKi).....	12
2.3.1.1.1. Entrektinib	13
2.3.1.1.2. Tepotinib.....	13
2.3.1.2. Inhibitory mTOR (mammalian target of rapamycine)	14
2.3.1.2.1. Sapanisertib	15
2.4. Mnohočetná léková rezistence (MDR)	15
2.5. Karbonyl redukující enzymy	16
2.5.1. Aldo-ketoreduktázy (AKR).....	17
2.5.1.1. Struktura a reakční mechanismus AKR	18
2.5.1.2. AKR1A1	19
2.5.1.3. AKR7A2.....	20
2.5.1.4. AKR1B1	20
2.5.1.5. AKR1B10	21
2.5.1.6. AKR1C3	22
3. Cíl práce.....	24
4. Praktická část.....	25
4.1. Pomůcky a přístroje	25
4.2. Chemikálie a materiály	26
4.3. Metodika práce	27
4.3.1. Inkubace	27
4.3.1.1. Postup práce při inkubaci	29
4.3.2. Stanovení IC ₅₀ pro tepotinib.....	30
4.3.3. Stanovení K _i pro tepotinib.....	30
5. Výsledky a diskuze.....	34
5.1. Screening aktivity enzymů vůči daunorubicinu.....	34
5.2. Stanovení inhibiční aktivity inhibitorů CDK na aktivitu AKR1A1, 7A2, 1B1, 1B10 a 1C3	36
5.2.1. Inhibice enzymu AKR1A1	37

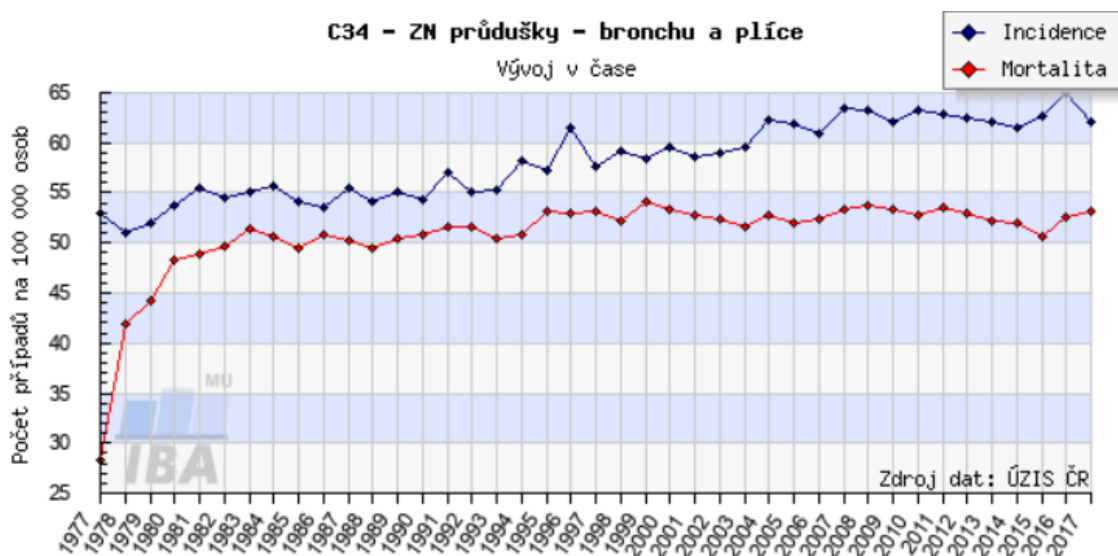
5.2.2.	Inhibice enzymu AKR7A2.....	40
5.2.3.	Inhibice enzymu AKR1B1	43
5.2.4.	Inhibice enzymu AKR1B10.....	46
5.2.5.	Inhibice enzymu AKR1C3	49
5.3.	Stanovení IC ₅₀ pro tepotinib	53
5.4.	Stanovení inhibiční konstanty (K _i)	59
6.	Závěr.....	62
7.	Seznam zkratk.....	63
8.	Citace.....	65

1. Úvod

Nádorová onemocnění celosvětově zauímají přední příčky na žebříčku příčin úmrtí. Z analýzy z roku 2018 vyplývá, že zhoubný nádor postihne za život 16,7 % žen a 20 % mužů (Bray et al. 2018). V důsledku nádorového onemocnění pak celosvětově zemře 9 % žen a 12,5 % mužů (Bray et al. 2018). Stále rostoucí incidence je v moderním světě zapříčiněna nárůstem a stárnutím populace. Další rizikový faktor představuje kouření a hektický životní styl, který je typický pro industrializované země či rychle se rozvíjející ekonomiky (Bray et al. 2018).

Celosvětový odhad pětileté prevalence nádorového onemocnění činí 43,8 milionů osob. K nejčastěji se vyskytujícím typům zhoubného bujení patří v globálním měřítku karcinom plic, karcinom prsu u žen a kolorektální karcinom; karcinom plic zauímá první místo v celkovém počtu úmrtí na nádorová onemocnění; a to 18,4 % z celkového počtu úmrtí na nádorová onemocnění (Bray et al. 2018).

I v České republice můžeme zaznamenat zvyšující se incidenci nádorového onemocnění plic a bronchů (Obr.1):



Obr. 1. Graf znázorňující časový vývoj hrubé incidence a mortality ve zvolené diagnóze karcinomu bronchů a plic v celé populaci (internet 1)

Nejčastějším nádorovým onemocněním plic v České republice je bronhogenní karcinom (internet 2). Nádory plic se podle histologické skladby a biologických vlastností rozdělují na nemalobuněčné a malobuněčné novotvary. U českých mužů představuje bronhogenní karcinom nejčastější typ maligního nádoru a u českých žen je v pořadí čtvrtým nejčastějším maligním nádorem (internet 2).

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje plicního karcinomu zůstává bezpochyby kuřáctví tabákových výrobků, především cigaret. Přes 95 % mužů a 80 % žen, kteří onemocní, jsou bývalými nebo současnými kuřáky (internet 3).

V této práci jsem testovala inhibiční vliv vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDKi) na aktivitu enzymů ze skupiny aldo-ketoreduktáz (AKR). Některé enzymy ze skupiny AKR jsou zodpovědné za rozvoj různých onemocnění, mj. i těch nádorových. Jejich zvýšená koncentrace v nádorové tkáni může znamenat zvýšenou rezistenci na léčbu či agresivnější chování nádoru. Jedním ze zkoumaných enzymů je AKR1C3 – tento enzym má zásadní roli v proliferaci nádorových buněk, byl objeven například i ve tkáních plicního karcinomu. Vzhledem k tomu, že enzym doposud nebyl zaznamenán u malobuněčného karcinomu plic, mohla by být jeho přítomnost považována za marker nemalobuněčného karcinomu plic.

Pro měření aktivity inhibitorů jsem používala substrát daunorubicin. Jedná se o léčivo ze skupiny antracyklinových antibiotik, které se používá pro terapii solidních nádorů plic, prsu, urogenitálu aj. Aldo-ketoreduktázy jsou karbonyl redukující enzymy, které přeměňují aldehydovou nebo keto-skupinu na příslušné alkoholy; měření inhibiční aktivity CDKi spočívalo v měření specifické aktivity inhibovaných enzymů, které metabolizovaly daunorubicin na daunorubicinol.

2. Teoretická část

2.1. Nemalobuněčný bronchogenní karcinom (NSCLC)

Nemalobuněčný bronchogenní karcinom tvoří přibližně 75–80 % výskytu bronchogenních karcinomů. Charakteristickými rysy jsou pomalý růst, metastazování v pozdějším stádiu a snížená citlivost k radioterapii a protinádorové chemoterapii (internet 4). Klíčovou roli na vzniku NSCLC hrají exogenní faktory; fyzikální, chemické a biologické – k rozvoji onemocnění může přispět pracovní prostředí, např. průmysl zpracování niklu či výroba barviv (internet 5). Nebezpečí rozvoje onemocnění je vysoké i u pasivních kuřáků, především dětí a mladistvých, kteří jsou dlouhodobě vystaveni cigaretovému kouři. Rozvoj onemocnění ale může propuknout i u celoživotních nekuřáků, pak se jedná o tzv. spontánní karcinom (internet 5).

Klinickými příznaky u NSCLC jsou dráždivý kašel (45–75 %), chraptot, dušnost, bolesti na hrudi, anémie, bolesti hlavy, neurologické poruchy a periferní neuropatie (Češka et al. 2010). Z výčtu klinických příznaků vyplývá, že onemocnění je diagnostikováno až v pozdějším stádiu, protože rozsah klinických příznaků je široký a jednoznačně neukazuje na nádorové onemocnění plic. Pacienti se tak často dostávají k lékaři až při hemoptýze, kdy se již rapidně snižuje procento přežití.

Základem diagnostiky jsou vyšetřovací, histologické nebo cytologické vyšetření. Důkladné a přesné stanovení klinického stádia nemoci je důležité pro volbu optimálního léčebného postupu. K tomuto účelu se nyní využívá TNM klasifikace zhoubných novotvarů (internet 5).

2.2. Konvenční terapie

Konvenční léčba cytostatiky tvoří stále hlavní formu farmakoterapie u nádorových onemocnění. V některých případech představují 1. linii léčby, v jiných případech doplňují terapeutický plán po resekci a ozařování tumoru. Mechanismus účinku klasických cytostatik spočívá v inhibici buněčných procesů, zejm. replikace a transkripce. Společným znakem cytostatické léčby jsou projevy nežádoucích účinků. Ty jsou dány neselektivním působením na buňky s vysokou proliferační rychlostí, mezi něž patří např. epitel GIT, vlasové folikuly či buňky kostní dřeně. Tímto způsobem dochází ke vzniku typických nežádoucích účinků jako je alopecie či gastrointestinální toxicita, útlum produkce erytrocytů, leukocytů i trombocytů, tromboembolické komplikace,

hyperurikémie či zvracení (Slíva and Votava, 2011), což do značné míry komplikuje a limituje úspěšnost léčby.

2.3. Cílená terapie

Cílená terapie novotvarů představuje odlišný přístup oproti konvenční léčbě, jelikož využívá rozdílností mezi patologicky poškozenou a zdravou populací buněk v organismu. Nepoškozuje přímo genetickou informaci, zaměřuje se zpravidla na regulační kaskádu buněčných signálů, která je u rakovinných buněk pozměněna způsobem, jenž umožňuje nekontrolované bujení.

Dominantními strukturami vhodnými k zásahu jsou zejména membránové receptory, jejich ligandy (např. růstové faktory) a proteinkinázy s regulační aktivitou. Evolučně starší skupinou léčiv jsou protilátky (cetuximab, trastuzumab, bevacizumab), proteiny s vysokou specifitou k substrátu, který inaktivují či zviditelňují buňky pro zásah imunitního systému. K novějším patří „small drugs“; intracelulární inhibitory proteinkináz jako např. erlotinib, sorafenib, pazopanib, imatinib, ale také inhibitory proteazomu (např. bortezomib) (Goněk and Kozáková, 2014).

Proteinkinázy na cílové struktury působí za pomoci reverzibilní fosforylace, což představuje klíčovou posttranslační úpravu, odpovídající za kontrolu a řízení buněčných procesů (Nečas et al. 2000). Lidský genom obsahuje 518 proteinkináz (Manning et al. 2002) a výzkumný důraz je kladen především na ty kinázy, které se podílejí na vzniku lidských onemocnění (Capra et al. 2006), zejména těch, které napomáhají rozvoji onkologických onemocnění.

2.3.1. Inhibitory proteinkináz

Strukturně se jedná o heterogenní skupinu látek, obecně však lze říci, že mechanismem účinku těchto látek je kompetice s ATP o vazbu do aktivního místa kinázy (McConnell and Wadzinski, 2009). Afinita inhibitorů musí být velmi vysoká, protože kinázy přirozeně vykazují vysokou afinitu k mnohem početnějším molekulám ATP. Důležitou roli také hraje konformace kináz, která obvykle závisí na fosforylaci specifických reziduí. Po fosforylaci dochází ke konformační změně, která umožní navázání substrátu a ATP (Huse and Kuriyan, 2002; Liao, 2007).

2.3.1.1. Inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKi)

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) patří mezi proteinové kinázy, které zodpovídají za řízení progresu a regulace transkripce. Jejich aktivita je regulována buněčnou koncentrací cyklinů, malých regulačních proteinů, jejichž hladina kolísá v závislosti na fázi buněčného cyklu (Evans et al. 1983). Vysoká exprese či abnormální funkce CDK může vést k nekontrolovanému bujení buněk až ke vzniku nádorového onemocnění. Právě uvedené zjištění, jak zásadní roli hrají cyklin-dependentní kinázy v regulaci buněčných procesů a vzniku nádorových i jiných onemocnění, vedlo k zaměření vědeckého světa na výzkum a vývoj inhibitorů CDK.

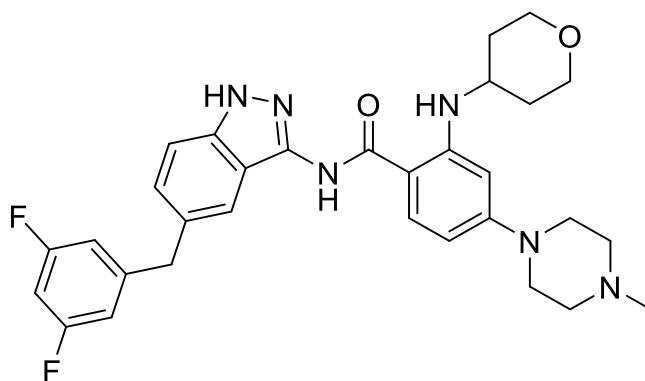
Jednou z původních modelových látek je staurosporin, bis-indolová sloučenina získaná izolací z bakterie *Streptomyces staurosporeus* (Omura et al. 1977). Jeho terapeutickému použití bránila nízká selektivita (Karaman et al. 2008). Výhodnější vlastnosti měl semisyntetický flavonoid flavopiridol, který se již uplatňuje i v léčbě některých nádorových onemocnění (internet 6). Zmíněné látky představují tzv. první generaci inhibitorů CDK. (Grant, 2009; Yap et al. 2007).

Již zmíněnou limitací je nízká selektivita vůči konkrétním cílům, což bylo překonáno u moderních látek. Některé z nich dosáhly i klinického použití, např. palbociklib, ribociklib, abemaciklib, selektivní inhibitory CDK4/6 používané v kombinační terapii u vybraných typů rakoviny prsu (Ferrari and Nicolini, 2019). Působením na CDK dochází nejen k zástavě buněčného cyklu, ale také k navození apoptózy (Cai et al. 2006). Z mechanismu působení vyplývá, že samotné nemají na progresi nemoci rozhodující vliv, mohou však výrazně zvýšit šanci na účinnost léčby u pokročilých stádií rakoviny, kdy konvenční léčba cytostatiky selhává (Cicenas and Valius, 2011, Cicenas et al. 2014). Léčba inhibitory CDK je obecně lépe akceptována pacienty než klasická chemoterapie (Grant, 2009) z důvodu nižší incidence a závažnosti nežádoucích účinků.

Novější inhibitory CDK jsou strukturovány dle kináz, na které selektivně cílí. V průběhu studií se přišlo na to, že některé CDKi mohou ovlivňovat i jiné buněčné procesy než ty, kvůli kterým byly původně strukturovány. Konkrétně se jedná o ovlivnění aktivity efluxních transportérů nebo metabolické aktivity enzymů ze skupiny aldo-ketoreduktáz.

2.3.1.1.1. Entrektinib

Entrektinib působí jako selektivní perorální inhibitor receptorové tropomyosin tyrosinkinázy (TRK) (internet 7), čímž blokuje nadměrnou expresi NTRK, ROS1 a ALK, což má za následek inhibici signálních drah zprostředkovaných geny potřebnými pro proliferaci nádorových buněk (internet 7). V srpnu 2019 byl schválen FDA pro léčbu dospělých a pediatrických pacientů nad 12 let. Užívá se u dospělých pacientů s NSCLC, kteří jsou ROS1 pozitivní, dále u dospělých a dětí nad 12 let se solidními nádory, u nichž předchozí léčba nebyla účinná nebo mají nadměrnou expresi NTRK a u pacientů, kteří nemohou být operováni (internet 8). Dávka u NSCLC je nastavena na 600 mg 1x denně, pro jiné diagnózy se dávka mění.



Obr. 2. Struktura entrektinibu (internet 7)

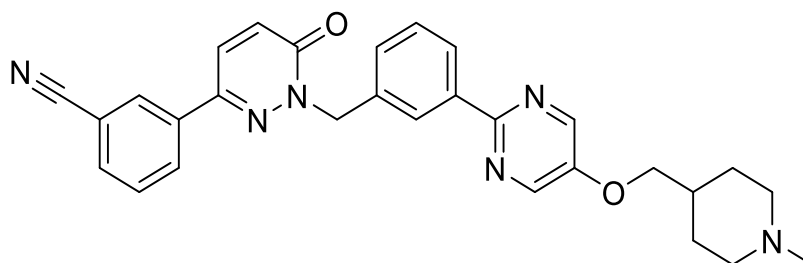
Jedná se o látku s dobrým průchodem do centrální nervové soustavy, a proto se s výhodou používá u pacientů s metastázemi v mozku u NSCLC (Drilon et al. 2020).

2.3.1.1.2. Tepotinib

Tepotinib patří do skupiny perorálních ATP-kompetitivních inhibitorů c-MET tyrosinkinázy (HGFR), na kterou se selektivně váže a narušuje transdukční signál, což vede k indukci apoptózy v nádorových buňkách (Zhang et al. 2019). Změny signální dráhy MET se vyskytují u různých typů rakovin včetně 3–5 % případů NSCLC. Tyto změny korelují se špatnou klinickou prognózou a s agresivním chováním nádoru (Reungwetwattana et al. 2017; Mo and Liu, 2017).

V březnu 2018 udělilo japonské MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan) „fast-track“ pro tepotinib v pokročilých případech NSCLC, jednalo se o IIIIB / IV stádium, dle TNM klasifikace. V září 2019 americká FDA (U.S. Food and Drug

Administration) označila tepotinib za průlomovou terapii pro pacienty s již metastazujícím NSCLC, u kterých předcházela léčba platinovými deriváty (internet 9). V březnu 2020 byl tepotinib schválen japonskou regulaturou pro léčbu neoperovatelného, pokročilého nebo recidivujícího NSCLC s MET exon 14 (METex14) (internet 10).



Obr. 3. Struktura tepotinibu (internet 11)

Kromě zamýšleného účinku na tyrosinkinázový systém působí obdobným mechanismem též na efluxní transportéry; proteinové pumpy bránící průniku a setrvání xenobiotik uvnitř buněk. Tento obranný buněčný mechanismus se však podílí na vzniku klinicky významné rezistence vůči cytostatické léčbě. Tepotinib selektivně inhibuje činnost efluxní pumpy ABCB1 (Wu at al. 2019).

2.3.1.2. Inhibitory mTOR (mammalian target of rapamycine)

„Mammalian target of rapamycine“ patří mezi signální proteinkinázy z rodiny PI3K, která reguluje buněčný metabolismus, růst a buněčnou proliferaci. Pojmenovaný je po prvním známém inhibitoru tohoto systému, rapamycinu, makrolidu s imunosupresivním a antineoplastickým účinkem (Strimpakos et al. 2009). Dělí se na dva proteinové komplexy, TORC1 a TORC2, přičemž TORC1 je k rapamycinu citlivější (Pópulo et al. 2012).

Komplexy TORC1 a TORC2 jsou v některých typech nádorů nadměrně regulovány a mají důležitou roli v signální dráze PI3K/AKT/mTOR, která je v nádorových onemocněních často narušena (Li et al. 2015). Zmíněná signální dráha je důležitá v regulaci buněčného cyklu a u nádorových onemocnění je často nadměrně exprimována, což má za následek snížení apoptózy a zvýšenou proliferaci nádorových buněk (Ortega et al. 2020).

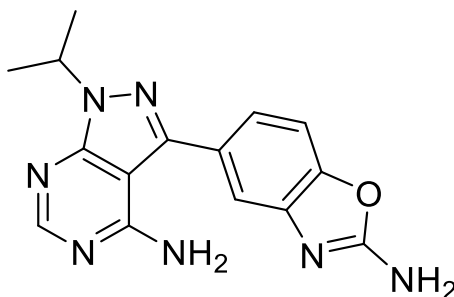
Zájem o rapamycin jako nový prostředek k boji s nádorovým bujením ožil s objevem výhodnějších analogů, jm. temsirolimu, everolimu či ridaforolimu

(Brachmann et al. 2009). Tyto látky jsou často popisovány jako první generace inhibitorů mTOR. Mezi hlavní nevýhody této generace patří nízká účinnost daná nedostatečnou inhibicí celé signální dráhy – inhibicí TORC1 dochází zpětnovazebně k aktivaci AKT, následné signální kinázy, a tím i spuštění celé kaskády (Ballou and Lin, 2008).

Druhá generace látek má společný mechanismus účinku – kompetují s ATP o vazbu na katalytickém místě kinázy, přičemž tímto způsobem blokují nejen činnost obou komplexů TORC1 a TORC2, ale také v dalších kinázách zapojených v signální dráze (PI3K/AKT), což představuje zásadní posun v terapeutických možnostech oproti první generaci (Zaytseva et al. 2012).

2.3.1.2.1. Sapanisertib

Jedná se o perorálně dostupný inhibitor s potenciální antineoplastickou aktivitou. V červnu 2020 byla zahájena první fáze testování sapanisertibu pro léčbu NSCLC (internet 12). Ve studiích byl používán na léčbu solidních nádorů, nádorů jater, glioblastomu a gliosarkomu (internet 12).



Obr. 4. Struktura sapanisertibu (internet 13)

2.4. Mnohočetná léková rezistence (MDR)

Častým problémem při cytostatické terapii je vznik mnohočetné lékové rezistence, která využívá přirozeně se vyskytujících obranných mechanismů určených k odplavení toxických metabolitů a xenobiotik z buňky (Gottesman, 2002), tj. oxidace/redukce za vzniku polárních skupin (fáze I), konjugaci za vzniku polárnějšího metabolitu (fáze II) a jeho exkreci z buňky (fáze III). Právě zvýšená exprese efluxních pump z rodiny ABC transportérů (ATP-binding cassette) představuje závažný způsob vzniku MDR (Rochat, 2009). Z rodiny ABC transportérů patří k nejčastěji studovaným (a také nejčastěji zodpovědným za rezistenci) proteiny ABCB1 (syn. P-glykoprotein),

ABCC1 (multidrug resistance-associated protein 1 – MRP1) a ABCG1 (breast cancer resistance protein).

ABCB1 představuje nejznámějšího zástupce, stejně jako ostatní členové rodiny se nachází na buněčné membráně a slouží k aktivnímu vyplavování látek vně buňky. Charakteristická je jeho substrátová nespecifita, je schopen přenášet řadu amfifilních léčiv různých strukturních motivů. ABCC1 je také substrátově nespecifický, snáze však váže látky hydrofobní, záporně nabitě, či konjugáty glutathionu a glukuronidy (Cole and Deeley, 2006). ABCG1 se svými vlastnostmi podobá ABCB1, významná je jeho exprese v některých formách rakoviny prsu (Noguchi et al. 2009), díky čemuž získal i své jméno.

Snaha o zavedení terapeuticky účinných selektivních inhibitorů vybraných ABC transportérů skončila neúspěchem z důvodu nízké účinnosti a vysokých nežádoucích účinků modelových látek (Callaghan et al. 2014). Bylo však pozorováno, že řada látek původně určených k ovlivnění jiného cíle mj. zasahuje do činnosti zmíněných efluxních transportérů. Také u některých inhibitorů proteinkináz bylo takové chování pozorováno a zdá se, že může přispívat k jejich dobrému klinickému účinku v kombinaci s konvenční cytostatickou léčbou (Kelly et al. 2012; O'Brien et al. 2010; Zhang et al. 2014).

2.5. Karbonyl redukující enzymy

Karbonyl redukující enzymy jsou všudypřítomné, byly popsány jak u savců, tak u ryb, hmyzu, rostlin, kvasinek a bakterií. Lidské karbonyl redukující enzymy se vyskytují v různých tkáních, vyšší exprese byla zaznamenána v metabolicky aktivních orgánech (Hoffmann and Maser, 2007). Metabolická redukce má důležitou roli ve fázi I metabolismu endogenních i exogenních látek, které nesou karbonylovou skupinu. Redukcí karbonylu vzniká primární nebo sekundární alkoholová skupina, takové látky jsou lépe konjugovány a následně snáze eliminovány z organismu (Malátková et al. 2010). Tyto NAD(P)H-dependentní oxidoreduktázy dělíme do 3 nadrodin: aldo-ketoreduktázy (AKR), dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem (MDR) a dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR) (Skálová and Boušová, 2011).

Zmíněná karbonylová skupina je u mnoha endogenních a exogenních látek zodpovědná za biologickou aktivitu, karbonyl redukující enzymy jsou tudíž mj. nositeli regulačních a kontrolních funkcí; v případě endogenních látek se jedná zejm. o steroidy, prostaglandiny, biogenní aminy a některé další hormony.

Díky významné reaktivitě karbonylové skupiny je řada exogenních aldehydů a ketonů důležitým rizikovým faktorem pro lidské zdraví, zejména pak ty, které interagují s buněčnými makromolekulami, indukují oxidativní stres nebo jsou silně reaktivní (Malátková et al. 2010). Karbonyl redukující enzymy mají významnou detoxikační roli, protože jsou schopny reaktivní karbonylové sloučeniny deaktivovat.

Specifickou oblast, kde se karbonyl redukující enzymy uplatňují, představuje metabolismus léčiv; dobře zdokumentované jsou např. metabolické přeměny antracyklinových antibiotik. Tato redukce, vystupňovaná v nádorových buňkách, vede ke snížení účinnosti protinádorové léčby a zvýšení rezistence na léčbu těmito chemoterapeutiky (Hoffmann and Maser, 2007).

2.5.1. Aldo-ketoreduktázy (AKR)

AKR představují početnou skupinu enzymů, do které řadíme přes 190 proteinů. Můžeme je nalézt ve všech živých organismech; u člověka víme o přítomnosti 15 enzymů z nadrodin: AKR1, AKR6 a AKR7 (Barski et al. 2008; Penning and Drury, 2007; Penning and Byrns, 2009; Penning, 2015).

Aldo-ketoreduktázy jsou enzymy ze skupiny oxidoreduktáz, které jsou závislé na koenzymu nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) (Jez et al. 1997a). Za pomoci NADPH přeměňují karbonylovou skupinu na odpovídající primární nebo sekundární alkohol. Jedná se o monomerní proteiny o velikosti 280 – 320 aminokyselin (34 – 37 kDa), které jsou lokalizované v cytosolu a patří k biotransformačním enzymům první fáze (Penning and Drury, 2007). Ve formě multimerů se vyskytují enzymy z rodiny: AKR2, AKR6 a AKR7. Jsou zodpovědné za přeměny endogenních i exogenních substrátů, např.: prostaglandinů, steroidů i xenobiotik (Barski et al. 2008). Tyto enzymy způsobují i zvýšený metabolismus antracyklinových antibiotik, protinádorových látek, které se používají v léčbě solidních nádorů např. prsu, plic, vaječníků, jater aj. Mají tím zásadní vliv na průběh a terapeutickou odpověď na léčbu. Některé enzymy z nadrodiny AKR se pak přímo objevují v určitých typech nádorových buněk a mají zásadní vliv na proliferaci a agresivitu nádoru.

Pro zvýšení přehlednosti v této skupině enzymů byl založen nový nomenklaturní systém, podle něhož enzymy systematicky členíme dle Jeze a Penninga (2001). Rozhodujícím faktorem pro současný systém je podobnost v aminokyselinové sekvenci.

Obr. 5. Struktura AKR1C. Znárodnění struktury soudku, β -skládané listy jsou označeny jako modré šipky, α -helixy jako červené soudky. Je zde patrná i β -vlásenka na N-konci enzymu a α -helixy mimo pravidelnou strukturu (H1 a H2) (Barski et al. 2008).

Uvnitř β -soudku se nachází aktivní místo enzymu. Navázáním kofaktoru dojde ke konformační změně, která umožní vazbu substrátu. Vytvoří se „kapsa“ z nikotinamidového kruhu kofaktoru NADPH a hydrofobních zbytků aminokyselin enzymu; do této kapsy se pak váže substrát. Při redukci dochází k transportu H^- z nikotinamidu kofaktoru na karbonylovou skupinu substrátu, zároveň dochází k přenosu protonu (Penning, 2015). Po skončení reakce se od enzymu nejdříve uvolní produkt, poté kofaktor. Reakce může být reverzibilní, protože je spojena s malou změnou volné energie. V lidském organismu, *in vivo*, probíhá výhradně redukce (Jez et al. 1997a; Penning, 1999; Sanli et al. 2003).

K bližšímu pojednání byly vybrány enzymy, které mají nebo mohou mít zásadní vliv na chování a agresivitu nádoru, příp. se ve vyšší míře vyskytují ve vybraných buněčných kulturách.

2.5.1.2. AKR1A1

Jedná se o NADPH dependentní enzym, který metabolizuje alifatické i aromatické aldehydy a ketony na odpovídající primární a sekundární alkoholy, vyznačuje se širokou substrátovou specifitou.

Enzym svým redukčním působením chrání organismus před následky oxidačního stresu způsobeného 4-hydroxy-2-nonenalem, který vzniká rozkladem peroxidů lipidů. Zmíněné peroxidy vznikají za působení ROS (reaktivní formy kyslíku) na polynenasycené mastné kyseliny. 4-hydroxy-2-nonenal je bifunkční elektrofil, který se podílí na vzniku vazeb mezi proteiny (tzv. cross-links), a přispívá tak ke vzniku neurodegenerativních onemocnění a aterosklerotických plaků (Penning and Drury, 2007).

Zvýšená exprese AKR1A1 byla zaznamenána u laryngeálních nádorů, jejichž buňky byly rezistentní vůči radioterapii. Ve studii Kim et al. (2012) se ukazuje, že enzym tvoří komplex s p53 a ovlivňuje jeho funkci. Protein p53 je transkripční faktor, který kontroluje buněčný cyklus a apoptózu. Během radioterapie je p53 aktivován, což vede k zástavě buněčného cyklu nebo k vyvolání apoptóze (Fei and El-Deiry, 2003; Gudkov

and Komarova, 2003). Suprese nebo mutace p53 v nádorových buňkách způsobuje rezistenci vůči radioterapii, naopak silná stimulace p53 je zodpovědná za zvýšenou citlivost nádorových buněk vůči záření. AKR1A1 brání aktivaci p53, a přispívá tím ke zvýšené rezistenci nádorových buněk (Fei and El-Deiry, 2003; Gudkov and Komarova, 2003). Napříč populací se vyskytují dvě alelické variace: E55D a N52S. Tyto variace jsou zodpovědné za snížení aktivity AKR1A1 vůči antracyklinovému antibiotiku, daunorubicinu. U jedinců nesoucí tyto alely se setkáváme se sníženou schopností eliminace daunorubicinu (Bains et al. 2008). Tyto mutace se projevují tvorbou reaktivních meziproductů, škodlivých metabolitů a nejvíce se vyskytují v nádorovém onemocnění endometria, žaludku a prsu.

2.5.1.3. AKR7A2

AKR7A2 je NADPH-dependentní oxidoreduktáza, též známá jako sukcinátsemialdehydoreduktáza. Katalyzuje redukci exogenních a endogenních karbonylových sloučenin, metabolizuje produkty z lipidové peroxidace, a tím chrání organismus před účinky oxidačního stresu. Enzym redukuje sukcinátsemialdehyd na neuromodulátor γ -hydroxybutyrát (Lyon et al. 2007). Studie Li et al. (2012) prokázala, že enzym nemá protektivní účinek vůči působení akroleinu a krotionaldehydu, tedy vůči látkám, které se vyskytují v cigaretovém kouři.

Ze všech aldo-ketoreduktáz je enzym nejvíce exprimován v lidském srdci, což u pacientů s Downovým syndromem vysvětluje zvýšenou kardiotoxicitu antracyklinů (Hoefler et al. 2016). Také byla prokázána souvislost mezi expresí AKR7A2, methylací DNA a tvorbou kardiotoxického daunorubicinolu, produktu redukce daunorubicinu (Hoefler et al. 2016).

2.5.1.4. AKR1B1

AKR1B1 je monomerní, cytosolický enzym, hojně se vyskytující v reprodukčních orgánech, ledvinách, nadledvinách a sítnici (Kumar and Bhanuprakash, 2007). Katalyzuje redukci endogenních a exogenních substrátů nesoucí karbonylovou skupinu, např. alifatické a aromatické aldehydy, ketony, prostaglandiny, steroidy, produkty lipidové peroxidace a oxidačního stresu (např. methylglyoxal) (Pastel et al. 2012; Petrash, 2004).

Ze studie Ruiz et al. (2009) vyplývá, že přeměňuje glukózu na sorbitol. Jedná se o první krok v polyolové dráze, jejímž výsledkem je oxidace sorbitolu na fruktózu

(Petrash, 2004; Yang et al. 2008). Sorbitol je spojován s výskytem sekundárních komplikací diabetu a díky tomu je enzym zapojen i do dalších přidružených onemocnění, jako retinopatie, nefropatie a neuropatie (Penning, 2015). Enzym byl nejvíce studován právě v souvislosti s nemocemi, které jsou vyvolány vysokou hladinou krevního cukru. AKR1B1 je mediátor zánětu a oxidačního stresu, které jsou vyvolány různými faktory, např. alergeny, cytokiny, nádory a mj. i hyperglykemií (Yadav et al. 2010).

Ze studie Srivastava et al. (2011) vyplývá, že hyperglykémie a TNF- α aktivují NF- κ B, čímž dochází k proliferaci hladkosvalových buněk cév a apoptóze buněk cévního endotelu. Zde je naznačen potenciální mechanismus, pomocí něhož může být onemocnění diabetes mellitus spojeno s výskytem některých typů rakoviny (Yang et al. 2008). Fidarestat, epalrestat, tolrestat a sorbinil jsou klinicky užívané inhibitory enzymu AKR1B1 pro zmírnění sekundárních komplikací diabetu (Penning, 2015).

2.5.1.5. AKR1B10

AKR1B10 je cytosolický, monomerní enzym, který katalyzuje podobné substráty jako enzym AKR1B1, ale s větší účinností (Shen et al. 2011); vzájemná aminokyselinová podobnost s enzymem AKR1B1 je ze 71 % identická (Barski et al. 2008). Enzym je primárně exprimován v tenkém a tlustém střevu (Zhong et al. 2009), dále pak v játrech, nadledvinkách a brzlíku (Barski et al. 2008).

Jedná se o účinnou retinalreduktázu (Martin et al. 2006) – ireverzibilně redukuje retinal na retinol (Ruiz et al. 2009) a uplatňuje se tak ve snížení syntézy kyseliny retinové, která působí jako signální faktor v procesu regulace proliferace (Rižner, 2012; Ruiz et al. 2009). Inhibicí AKR1B10 dojde k potlačení signalizace přes kyselinu retinovou, což by mohlo vést k inhibici diferenciaci nádorových kmenových buněk (Penning, 2015). Enzym vysoce katalyzuje redukci aldehydů; redukuje akrolein a krotonaldehyd (Martin and Maser, 2009), které jsou obsaženy v cigaretovém kouři a vykazuje redukční účinky vůči antracyklinům a dolasetronu (Barski et al. 2008).

Bylo prokázáno, že se enzym podílí na procesu kancerogeneze a je nadměrně exprimován u karcinomu dělohy, adenokarcinomu plic u kuřáků, hepatocelulárního karcinomu a kolorektálního karcinomu (Barski et al. 2008; Zhong et al. 2011). Vzhledem k jeho patofyziologické úloze v nádorovém onemocnění a antracyklinové rezistenci je

kladen důraz na vývoj jeho inhibitorů; inhibice AKR1B10 by mohla vést ke zvýšení účinnosti protinádorové terapie antracykliny a zabránění růstu nádorových buněk.

2.5.1.6. AKR1C3

AKR1C3 je monomerní, NADPH-dependentní oxidoreduktáza, která metabolizuje alifatické i aromatické aldehydy a ketony na odpovídající primární a sekundární alkoholy. Enzym AKR1C3 má několik synonymních názvů: prostaglandin-F-syntáza, 3 α -hydroxysteroiddehydrogenáza typu 2 či 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza typu 5 (Dozmorov et al. 2010). U žen je enzym exprimován v prsní žláze, endometriu a ve žlutém tělísku, u mužů se nachází v prostatě a Leydigových buňkách. Enzym byl objeven i v jiných lidských tkáních než jen v reprodukčním ústrojí, a to v plicích, játrech, ledvinách, nadledvinách, tenkém střevě a močovém měchýři (Khanna et al. 1995).

Má důležitou roli v syntéze prostaglandinů; vlivem AKR1C3 dochází k tvorbě PGF_{2 α} z PGH₂ a redukcí PGD₂ na 9 α ,11 β -PGF_{2 α} . Vyšší hladina AKR1C3 pak způsobuje zvýšení přeměny PGD₂ na PGF₂. Snížením hladin, nestabilního ligandu PPAR γ receptoru, PGD₂ dochází k zabránění diferenciaci buněk (Penning and Byrns, 2009).

AKR1C3 má důležitou roli v produkci pohlavních hormonů, protože katalyzuje přeměnu estrogenů, progesteronů a androgenů; dále zprostředkovává redukcí estronu na estradiol, progesteronu na hydroxyprogesteron a androstendionu na testosteron. Vyšší hladinou estrogenů a nižší hladinou progesteronu podněcuje vznik endometriózy a dysmenorhey (Hevir et al. 2011); hladina AKR1C3 přispívá k rozvoji benigní hyperplazie prostaty (Bauman et al. 2006)

Změna exprese AKR1C3 je typická u řady nádorových onemocnění, např. karcinomu prsu, endometria, prostaty, plic, proto by mohl být AKR1C3 v budoucnu využíván jako marker na určení typu nádorů. Významný je pak zejména diagnostický potenciál u karcinomu plic, neboť doposud nebyl objeven u malobuněčného karcinomu plic. Zároveň však zvýšená exprese AKR1C3 koreluje s vyšší agresivitou nádoru a celkovou progresí onemocnění, tudíž i předznamenává vyšší náročnost léčby a její nižší úspěšnost (Azzarello et al. 2010). Příčinou zvýšené exprese je mj. zapojení do regulačních kaskád buněčného cyklu, ale také zvýšená metabolická činnost buňky, ta se pak promítá i do zvýšené metabolizace xenobiotik a nárůstu rezistence vůči konvenční léčbě, např. při terapii cisplatinou a antracykliny (Matsunaga et al. 2013).

Cytotoxický účinek cisplatiny je dán vznikem ROS (reaktivní formy kyslíku), které indukují apoptózu v nádorových buňkách. Antracykliny ve své struktuře obsahují karbonylovou skupinu, která je působením enzymu AKR1C3 redukována na alkoholovou skupinu. Léčivo je po této metabolické redukci méně toxické pro nádorové buňky a je rychleji eliminováno. AKR1C3 má detoxifikační efekt i na látky, které se do organismu dostávají vlivem znečištěného ovzduší, např. nitrosaminoketony z výfukových plynů nebo polycyklické aromatické uhlovodíky. Tyto látky způsobují mechanismem ROS oxidativní poškození tkání. Ochranná úloha AKR1C3 vůči ROS je ale narušena, protože na druhou stranu se enzym podílí na metabolismu těchto látek a dochází k další tvorbě ROS (Palackal et al. 2002; Lan et al. 2004; Burczynski et al. 1999)

AKR1C3 má nezastupitelnou roli v udržení normální hladiny hormonů, svým vlivem na prostaglandiny ovlivňuje řadu dalších fyziologických procesů a v neposlední řadě je detoxifikační agens. Změny v jeho expresi (zpravidla zvýšení) se projevují narušením rovnováhy, jejímž důsledkem může být i vznik nádorového onemocnění, které je charakterizováno vyšší agresivitou a rezistencí vůči protinádorové terapii. Proto se mnoho výzkumných skupin zabývá nalezením a výzkumem inhibitorů AKR1C3 (Byrns et al. 2011). Mezi nejznámější inhibitory AKR1C3 patří NSAID, steroidní laktony, steroidní hormony a žlučové kyseliny, deriváty kyseliny skořicové nebo flavonoidy (Byrns et al. 2011).

3. Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit inhibiční potenciál inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDKi), entrektinibu, tepotinibu a sapanisertibu na vybrané enzymy z nadrodiny AKR účastnící se metabolismu daunorubicinu, tedy AKR1A1, 7A2, 1B1, 1B10 a 1C3.

Jednotlivé dílčí cíle zahrnovaly:

1. screening specifických aktivit enzymů AKR1A1, 7A2, 1B1, 1B10 a 1C3 vůči substrátu daunorubicinu;
2. screening inhibiční aktivity entrektinibu, tepotinibu a sapanisertibu k enzymům vykazujícím aktivitu k vybraným aldo-ketoreduktázám AKR1A1, 7A2, 1B1, 1B10 a 1C3;
3. stanovení IC_{50} pro nejsilnější inhibitor/y;
4. určení inhibiční konstanty K_i a typu inhibice pro nejsilnější inhibitor/y

4. Praktická část

4.1. Pomůcky a přístroje

Pomůcky:

Rukavice, lžičky, navažovací kopistky, automatické pipety, pipetovací špičky, mrazicí box, přístroj pro výrobu ledové tříště, nádoby na led, stopky, mikrozkušavky (Eppendorfky), stojan na zkumavky

Přístroje:

Analytické váhy (Scaltec SBC 22, Scaltec Instruments GmbH)

Inkubátor (Thermomixer compact, Eppendorf)

Třepačka (Vortex Genius 3, IKA)

Centrifuga (Mini Spin Plus, Eppendorf)

Koncentrátor (Concentrátor Plus, Eppendorf)

UHPLC (Agilent 1260 Infinity II, Agilent)

Kolona (Zorbax RRHD Eclipse Plus C28, Agilent)

Ultrazvuková lázeň (Ultrasonic cleaner 120T, Anonkia Ultrasonic)

4.2. Chemikálie a materiály

Amoniak (25%)

Daunorubicin hydrochlorid (Toronto Research Chemicals)

Destilovaná voda

Ethylacetát (Sigma-Aldrich)

Glukosa-6-fosfát (AppliChem GmbH)

Glukosa-6-fosfát dehydrogenáza (Sigma-Aldrich)

Mg(Cl)₂ 0,3 mM

NADP⁺ (Sigma-Aldrich)

Na-fosfátový pufr pH = 7,4 (0,1 M)

Inhibitory:

Entrektinib (10 mM) (MedChemExpress)

Tepotinib (10 mM) (MedChemExpress)

Sapanisertib (10 mM) (MedChemExpress)

Enzymy: katedra biochemických věd

Rekombinantně získané lidské enzymy z nadrodiny AKR. Byly získány v expresním systému *E. coli* a rozpuštěné v 0,2 M K-fosfátovém pufru a 20% glycerolu, pH 7,4

AKR1A1 – 1,5 mg/ml

AKR7A2 – 2,4 mg/ml

AKR1B1 – 1,3 mg/ml

AKR1B10 – 1,63 mg/ml

AKR1C3 – 1,3 mg/ml

4.3. Metodika práce

4.3.1. Inkubace

Daunorubicin byl v reakcích používán jako substrát pro stanovení specifické aktivity enzymů, v reakční směsi byl metabolizován AKR enzymy za vzniku 13-hydroxydaunorubicinolu. Dle studie Bainse et al. (2010) vyplývá, že vyšší toxický účinek na nádorové buňky má primární látka daunorubicin než její rozkladný produkt daunorubicinol. Entrektinib, tepotinib a sapanisertib byly testovány kvůli jejich potenciální inhibiční aktivitě na enzym AKR1C3, ale i na enzymy, které vykazují specifickou aktivitu k daunorubicinu, tj. AKR1A1, AKR7A2, AKR1B1 a AKR1B10.

Příprava substrátu (DAU):

Roztok substrátu byl připraven z 1,27 mg daunorubicin hydrochlorid ($M = 563,98 \text{ g/mol}$) a 450 μl vody. Výsledná koncentrace takto připraveného substrátu byla 5 mM. Do každé reakce bylo použito 10 μl zásobního roztoku. Finální koncentrace substrátu v reakci byla 500 μM .

Příprava enzymů:

Lidské aldo-ketoreduktázy byly připraveny rekombinantní metodou na katedře biochemických věd a vzájemně se lišily v koncentracích (mg/ml). Do reakční směsi bylo přidáno 10 μl enzymu. Množství enzymu v reakční směsi se lišilo, viz tab. 1. Enzymy se naředily na požadované koncentrace Na-fosfátovým pufrem dle vzorce:

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

x = koncentrace zásobního roztoku enzymu v mg/ml; y = množství enzymu ze zásobního roztoku v μl , neznámá hodnota; t = množství enzymu v jedné reakci v mg/ml; z = celkové množství směsi enzymu a pufru, potřebné do reakcí

Tab. 1. Příprava roztoků vybraných enzymů

Enzym	Koncentrace zásobního roztoku enzymu (mg/ml)	Enzym (μl)	Na-P pufr (μl)	Koncentrace v reakci (μg/100μl)
AKR1A1	1,5	20	180	1,5
AKR7A2	2,4	41,7	158,3	5
AKR1B1	1,63	61,35	138,65	5
AKR1B10	1,61	37,27	162,73	3
AKR1C3	1,3	23,07	176,93	1,5

Příprava inhibitoru:

Zásobní roztoky inhibitorů měly koncentraci 10 mM v DMSO. V základním screeningu se použily dvě následující pracovní koncentrace, a to: 500 μM a 2500 μM. Ty byly získány naředěním zásobního roztoku inhibitoru dimethylsulfoxidem. Do reakční směsi se přidávalo 2 μl pracovní koncentrace inhibitoru. Výsledná koncentrace inhibitoru v reakční směsi byla 50x menší. U kontrolních vzorků se místo inhibitorů přidaly 2 μl pufru nebo 2 μl DMSO.

Příprava regeneračního roztoku:

Při přípravě regeneračního roztoku se nejprve navázilo NADP⁺ a glukóza-6-fosfát (Glu-6-P) do mikrozkuhavky. Tyto látky se důkladně rozpustily v Na-fosfátovém pufru. Dále byl přidán MgCl₂. Hořčnaté ionty jsou v reakci potřeba pro dehydrogenaci Glu-6-P. Takto připravená směs se uchovávala na ledu. Před samotným rozpípetováním do eppendorfek se přidala poslední složka, glukóza-6-fosfát dehydrogenáza. Do reakční směsi bylo přidáno 20 μl takto připraveného regeneračního roztoku.

Celkový objem reakční směsi činil 100 μl a každá mikrozkuhavka obsahovala stejný objem jednotlivých složek reakční směsi viz tab. 2.

Tab. 2. Složení reakční směsi

Substance	Objem (μl)
0,1 M Na-fosfátový pufr, pH = 7,4	58
Regenerační systém	20
Enzym	10
Inhibitor	2
Substrát = Daunorubicin 5 mM	10

4.3.1.1. Postup práce při inkubaci

Na začátku práce byl určen počet vzorků. Neinhibované reakce, kontroly s DMSO a reakce s inhibitory byly prováděny v triplicátech, kontroly „bez substrátu, bez enzymu“ v duplikátech. Do připravených a řádně označených mikrozkušavek byly postupně přidávány jednotlivé složky reakční směsi.

Jako první byl pipetován Na-fosfátový pufr, poté enzym, regenerační systém a nakonec inhibitor. Vzorky byly promíchány a stočeny na centrifuze. Takto připravené vzorky byly umístěny do předem vyhřátého termomixéru na preinkubaci. Ta probíhala při 37 °C deset minut. Po 10 minutách se reakce startovala přidáním 10 μl substrátu v intervalu 20 vteřin do každé mikrozkušavky. Samotná inkubace trvala třicet minut. Přesně po 30 minutách, v intervalu 20 sekund pro každou eppendorfku, došlo k zastavení reakce za použití 40 μl 26% amoniaku. Vzorky byly promíchány a umístěny na 10 minut na led.

Po deseti minutách na ledu byl do každé mikrozkušavky přidán 1 ml ethylacetátu. Vzorky byly vloženy do třepačky a byly 15 minut extrahovány. Po 15 minutách byly ještě dvě minuty zcentrifugovány při 13 400 ot/min, tím došlo k oddělení horní organické vrstvy. Organická vrstva byla odebrána a přepipetována do nových eppendorfek. Ty byly přemístěny do vakuového koncentrátoru, kde docházelo k odpařování ethylacetátu při 30 °C. Pro zvýšení výtěžku extrakce se celý krok od přidání 1 ml ethylacetátu zopakoval ještě jednou.

Odpařené vzorky byly buď okamžitě rozpuštěny ve 400 µl mobilní fáze (26 % acetonitrilu a 74 % 0,1% kyseliny mravenčí) nebo byly uchovávány při teplotě -20 °C. Rozpuštěné vzorky byly přepipetovány do vialek s inzerty a za pomoci UHPLC analýzy byly vyhodnoceny.

Druhý způsob stopování reakce byl za použití 300 µl methanolu, mikrozkušavky pak byly přemístěny na hodinu do lednice. Po hodině byly zcentrifugovány a vzorek byl přes filtr přepipetován do vialek.

4.3.2. Stanovení IC₅₀ pro tepotinib

IC₅₀ je definována jako koncentrace látky, která sníží aktivitu daného enzymu na polovinu (Ledvina et al. 2006). Inkubace pro určení IC₅₀ probíhala za stejného postupu a podmínek jako je uvedeno v kapitole 4.3.1.1. Vzhledem k tomu, že jsme hledali koncentraci látky, která sníží aktivitu enzymu o polovinu, museli jsem pokrýt celkový rozsah inhibičního rozpětí tepotinibu. Toho jsme dosáhli použitím různých koncentrací inhibitoru. Koncentrace byly: 50, 10, 1, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025 µM v reakci a 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,01 µM v reakci.

Jednotlivé koncentrace tepotinibu byly získány ředěním zásobního roztoku dimethylsulfoxidem. Zásobní koncentrace inhibitoru byla 10 mM. Pracovní koncentrace musely být z důvodu naředění v celkovém objemu reakční směsi 50x větší.

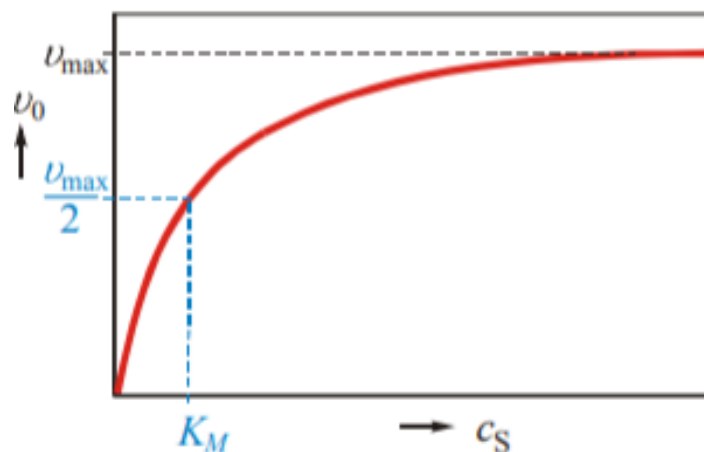
4.3.3. Stanovení K_i pro tepotinib

Inhibiční konstanta (K_i) vyjadřuje afinitu mezi enzymem a inhibitorem; používá se pro porovnávání účinnosti jednotlivých inhibitorů pro daný enzym. Silnější inhibitory se vyznačují nízkými hodnotami K_i (Murray et al. 2012).

Rovnice Michaelise a Mentenové se používá pro určení rychlosti enzymatické reakce (vzorec 1). Hodnota K_m je Michaelisova konstanta, která udává koncentraci substrátu, při které proběhne enzymatická reakce poloviční rychlostí; čím nižší je hodnota K_m, tím vyšší je afinita enzymu k substrátu.

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

Vzorec 1. Rovnice Michaelise a Mentenové (převzato internet 14)

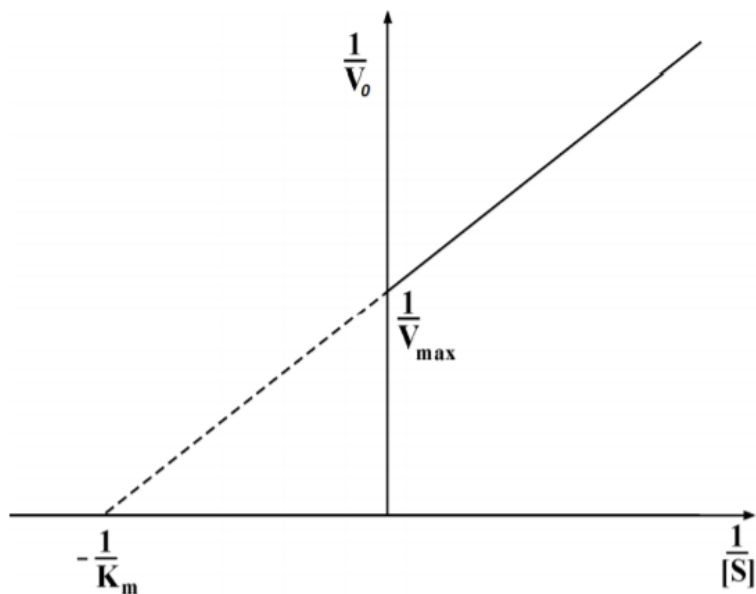


Obr. 6. Saturační křivka; grafické znázornění rovnice Michaelise a Mentenové. Graf závislosti rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu za konstantní koncentraci enzymu (převzato internet 14)

Rovnice Lineweavera a Burka (vzorec 2) je další metodou pro přesnější určení hodnot K_m a V_{\max} . Hodnotu K_m pak určíme za pomoci převrácených hodnot.

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

Vzorec 2. Rovnice Lineweavera a Burka (převzato internet 14)



Obr. 7. Reciproký výnos závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu při stejné koncentraci enzymu. Grafické znázornění rovnice Lineweavera a Burka (převzato Jánská, 2014)

Za inhibici považujeme snížení počáteční rychlosti enzymatické rychlosti. Z obr. 8 je patrné, že rozeznáváme tři typy inhibice. Nekompetitivní inhibice nastává tehdy, když se inhibitor váže na jiné místo, než je místo aktivní. Kompetitivní inhibice nastává tehdy, kdy dochází k soutěži o stejné aktivní místo mezi substrátem a inhibitorem. Akompetitivní inhibice nastane, když dojde k navázání inhibitoru už na vzniklý komplex enzym-substrát (Ledvina et al. 2006).

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. 8. Souhrn grafů pro různé typy inhibicí (převzato Flaxová, 2018)

Postup práce při stanovení K_i :

Inkubace pro stanovení K_i probíhala stejným postupem, který je uveden v kapitole 4.3.1.1. V reakci se používali rozdílné koncentrace daunorubicinu, a to: 2000, 1000, 800, 600, 400 a 200 μM . Jednotlivé koncentrace substrátu byly měřeny s různými koncentracemi inhibitoru. Tepotinib byl v koncentracích 50, 15, 5 a 0 μM (do reakce byl přidán DMSO místo inhibitoru).

5. Výsledky a diskuze

V této části práce byl měřen inhibiční vliv inhibitorů cyklin-dependentních kináz na aktivitu enzymů z nadrodiny AKR. Dle studie Gottersmana et al. (2002) inhibitory CDK snižují eflux antracyklinů z buněk; pokud by CDKi efektivně inhibovaly i enzymy z nadrodiny AKR, znamenalo by to výrazné zvýšení účinnosti antracyklinových chemoterapeutik a mj. snížení procesu proliferace nádorových buněk, vlivem působení AKR1C3.

5.1. Screening aktivity enzymů vůči daunorubicinu

U vybraných enzymů z nadrodiny aldo-ketoreduktáz (AKR): AKR1A1, 7A2, 1B1, 1B10 a 1C3 byl proveden základní screening metabolické aktivity vůči daunorubicinu. Aktivita enzymů byla porovnávána na základě hodnot specifické aktivity, kdy platí, že každý enzym má jinou specifickou aktivitu. Jednotlivé hodnoty specifické aktivity jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tab. 3. Soubor specifických aktivit vybraných enzymů vůči daunorubicinu

Enzym	Hodnota specifické aktivity (nmol/mg/min)	Průměrná hodnota specifické aktivity (nmol/mg/min)
AKR1A1/1 AKR1A1/2 AKR1A1/3	1648,44 1576,39 1625,58	1616,80 ± 36,82
AKR7A2/1 AKR7A2/2 AKR7A2/3	93,80 95,84 103,78	97,81 ± 5,27
AKR1B1/1 AKR1B1/2 AKR1B1/3	88,90 106,52 96,04	97,15 ± 8,86
AKR1B10/1 AKR1B10/2 AKR1B10/3	363,64 458,79 400,14	407,52 ± 48,00
AKR1C3/1 AKR1C3/2 AKR1C3/3	237,17 246,91 296,24	260,11 ± 31,67

Na začátku práce byla sledována metabolická aktivita vybraných aldo-ketoreduktáz. Tato aktivita byla měřena za pomoci UHPLC analýzy. Pro měření metabolické aktivity enzymů byl vybrán substrát daunorubicin. Jedná se o léčivo ze skupiny antracyklinových antibiotik, které se používá v terapii karcinomu prsu, plic, nádorů urogenitálního systému, aj. DAU byl vybrán na základě studie Bains et al. (2010), ze které vyplývá, že je obecně lepším substrátem pro AKR než doxorubicin. U enzymů z rodiny AKR víme o existenci polymorfismů, které jsou *in vitro* zodpovědné za výrazné snížení metabolismu daunorubicinu, a to o 23-61 %; tyto polymorfismy se vyskytují i u lidských AKR (Bains et al. 2010). Pro enzym AKR1C3 se jedná o mutace R170C a P180S (Komoto et al. 2004), tyto mutace jsou pravděpodobně zodpovědné za snížení enzymatické přeměny daunorubicinu na daunorubicinol, protože se nachází ve vazebném místě kofaktoru a ovlivňují jeho vazbu.

Měření aktivity vybraných enzymů probíhalo *in vitro* a za pomoci UHPLC analýzy bylo zjištěno množství přeměněného substrátu. Zjištěnou hodnotu bylo potřeba převést na specifickou aktivitu, jejíž jednotky jsou v nanomolech na miligram bílkoviny za minutu inkubace (nmol/mg/min).

Každý enzym má vlastní specifickou aktivitu, která je uvedena v jednotkách nmol/mg/min – pro enzym AKR1A1 to je 1616,18; pro AKR7A2 to je 97,81; pro AKR1B1 to je 97,15; pro AKR1B10 to je 407,52 a pro AK1C3 to je 260,11 nmol/mg/min. Nejvyšší specifická aktivita enzymu pro DAU byla zaznamenána u enzymu AKR1A1 a nejnižší byla u enzymu AKR1B1. V práci Flaxová, (2018) byla zjištěna nejvyšší aktivita pro DAU u enzymů CBR1, AKR1A1 a AKR1C3. Vzhledem k tomu, že v této práci nebyl používán enzym CBR1, můžeme na základě porovnání výsledků konstatovat, že nejvyšší hodnota pro DAU byla opakovaně zaznamenána u enzymu AKR1A1. Ve studii Bains et al. (2010) byla nejvyšší aktivita k DAU zaznamenána u AKR7A2, dále u B10, 1C3, 1C4 a 1B1. Při porovnání našich výsledků můžeme říct, že enzym AKR1B1 má nižší specifickou aktivitu vůči DAU než enzym AKR1C3 a enzym AKR1B10 má vyšší specifickou aktivitu vůči DAU než enzym AKR1C3. Ke stejnému zjištění došli i ve studii Bains et al. (2010).

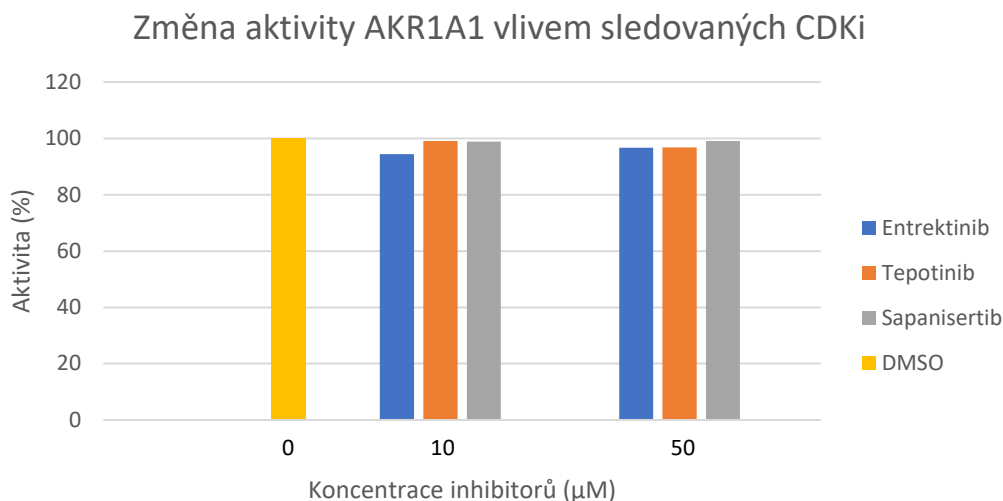
5.2. Stanovení inhibiční aktivity inhibitorů CDK na aktivitu AKR1A1, 7A2, 1B1, 1B10 a 1C3

Inhibiční vliv CDKi na aktivitu vybraných enzymů byl ověřen v druhé části práce. Pracovalo se s inhibitory: entrektinib, tepotinib a sapanisertib. Ve screeningu byly použity dvě základní koncentrace inhibitorů, 10 a 50 μM v reakci a kontrola s DMSO. Pracovní koncentrace inhibitorů byla 50x větší. Všechny vzorky byly měřeny po triplicátech pro každou koncentraci. Z výsledků byla stanovena procentuální hodnota pro inhibici a aktivitu. Hodnoty specifické aktivity inhibovaných enzymů byly porovnávány vůči hodnotám specifické aktivity DMSO (tab. 4 – 8). V obr. 9 – 13 jsou graficky znázorněny specifické aktivity jednotlivých inhibovaných enzymů.

5.2.1. Inhibice enzymu AKR1A1

Tab. 4. Aktivita enzymu AKR1A1 s 10 μM a 50 μM entrektinibem, tepotinibem, sapanisertibem a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

Typ inhibitoru	Koncentrace (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Entrektinib	1/ 10	2787,48	2651,83 \pm 272,00	94,45	5,55
	2/ 10	2829,33			
	3/ 10	2338,69			
	1/ 50	2674,15	3173,81 \pm 553,85	96,73	3,27
	2/ 50	3077,94			
	3/ 50	3769,33			
Tepotinib	1/ 10	2622,39	2946,92 \pm 448,19	99,11	0,89
	2/ 10	2760,06			
	3/ 10	3458,30			
	1/ 50	3001,52	2877,81 \pm 148,19	96,76	3,21
	2/ 50	2918,34			
	3/ 50	2713,57			
Sapanisertib	1/ 10	2339,10	2894,79 \pm 495,88	98,85	1,15
	2/ 10	3292,21			
	3/ 10	3053,07			
	1/ 50	2949,08	2888,27 \pm 214,26	99,07	0,93
	2/ 50	2622,42			
	3/ 50	3093,31			
Kontrola	1/ DMSO	3530,41	2973,37 \pm 489,27	100,00	0,00
	2/ DMSO	2776,46			
	3/ DMSO	2613,23			



Obr. 9. Závislost aktivity enzymu AKR1A1 na koncentraci inhibitoru entrektinibu, tepotinibu, sapanisertibu vůči DMSO, které představuje kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru (maximální aktivita 100 %). Každý sloupec představuje procentuální aktivitu uvedenou v Tab. 4.

Výsledky prokazatelně ukazují, že inhibice AKR1A1 entrektinibem nebyla dostatečná; 10 μM koncentrace entrektinibu inhibovala 1A1 pouze z 5,55 % a 50 μM koncentrace inhibitoru inhibovala enzym z 3,27 %. Za povšimnutí stojí skutečnost, že s rostoucí koncentrací inhibitoru se aktivita nesnižovala, spíše nevýznamně zvýšila. To může naznačovat rozdílný mechanismus působení testovaných látek v závislosti na koncentraci.

Pokud porovnáme výsledky inhibice 1A1 buparlisibem zjistíme, že 10 μM koncentrace buparlisibu inhibovala 1A1 z 11,4 % a 50 μM koncentrace inhibovala 1A1 z 2,1 % (Bukum et al. 2019), což vykazuje podobné rysy jako v naší studii. Roskovitin daný enzym neinhiboval vůbec, purlavanol A minimálně (Novotná et al. 2018).

50 μM alisertib inhiboval 1A1 z 9,56 %, 10 μM koncentrace 1A1 neinhibovala. Při srovnání entrektinibu s brigatinibem vidíme, že 10 μM koncentrace inhibovala enzym z 8,87 % a 50 μM koncentrace inhibovala z 1,56 % (Lakomá, 2020). Zde je opakovaně patrné, že vyšší koncentrace CDKi inhibuje enzym méně. Z uvedeného výčtu vychází entrektinib jako silnější inhibitor než popsaný roskovitin či purlavanol A.

Ani v případě tepotinibu nebyla prokázána významná inhibiční aktivita vůči sledovanému enzymu; 10 μM koncentrace tepotinibu inhibovala 1A1 z 0,89 % a 50 μM

tepotinib inhiboval 1A1 z 3,21 %. Na rozdíl od entrektinibu nebyla pozorována paradoxní aktivace enzymu při vyšších koncentracích inhibitoru. Z výše vypsáných porovnávacích inhibitorů můžeme říci, že je tepotinib silnější inhibitor 1A1 než purvanalol A a roskovitin (Novotná et al. 2018). Tepotinib je méně účinný inhibitor 1A1 než 50 μ M alisertib, 10 μ M brigatinib (Lakomá, 2020) a 10 μ M buparlisib (Bukum et al. 2019).

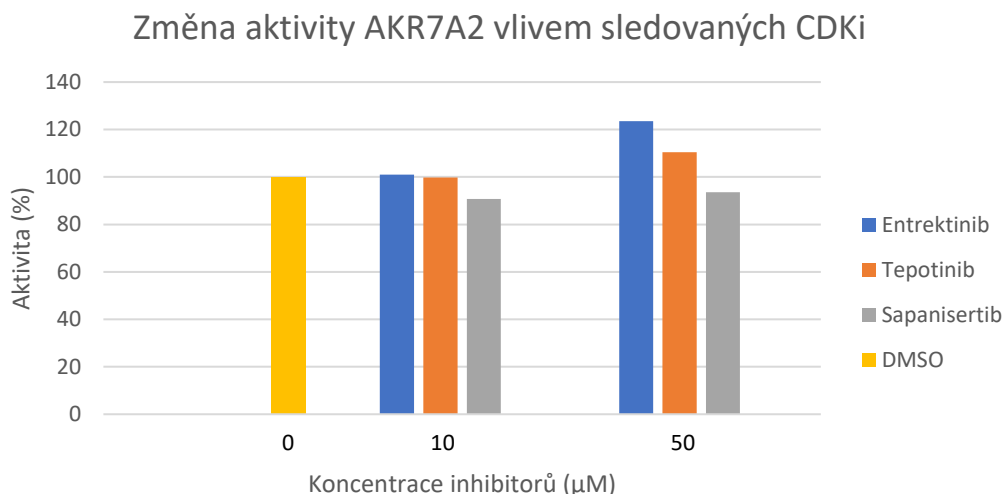
Ze zkoumaných látek vykazoval sapanisertib nejnižší inhibici enzymu AKR1A1; 10 μ M sapanisertib inhiboval enzym z 1,15 % a 50 μ M sapanisertib inhiboval 1A1 z 0,93 %, což představuje výsledek na hranici chyby měření.

Z měření inhibičního vlivu entrektibu, tepotinibu a sapanisertibu na enzym AKR1A1 vyplývá, že žádný z použitých inhibitorů nevykazoval inhibici větší než 10 %. Nejmenší inhibiční efekt prokázal tepotinib v 10 μ M koncentraci, který enzym inhiboval pouze z 0,89 %. Naopak nejvyšší inhibiční efekt měl 10 μ M entrektinib, který inhiboval z 5,55 %. Silnějším inhibitorem 1A1 je pak srovnávaný 50 μ M bosutinib, který enzym inhibuje z 7,2 % (Hudáčová, 2019). Při použití vyšší koncentrace entrektinibu a sapanisertibu docházelo patrně ke zvýšení specifické aktivity enzymu; můžeme se domnívat, jestli šlo o chybu v měření či působení látek jako tzv. aktivátorů enzymu. Vzhledem k tomu, že byl tento jev zaznamenán i u 50 μ M brigatinibu (Lakomá, 2020) a 50 μ M buparlisibu (Bukum et al. 2019), se dá předpokládat, že se nejedná o ojedinělou reakci a výsledek spíše poukazuje na odlišný aktivační mechanismus účinku vyšších koncentrací zkoumaných látek.

5.2.2. Inhibice enzymu AKR7A2

Tab. 5. Aktivita enzymu AKR7A2 s 10 a 50 μ M entrektinibem, tepotinibem, sapanisertibem a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

Typ inhibitoru	Koncentrace (μ M)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Entrektinib	1/ 10	114,90	102,31 \pm 11,83	101,03	-1,03
	2/ 10	100,60			
	3/ 10	91,42			
	1/ 50	120,21	125,09 \pm 9,14	123,53	-23,53
	2/ 50	118,52			
	3/ 50	135,53			
Tepotinib	1/ 10	67,92	93,57 \pm 35,61	99,81	0,19
	2/ 10	134,23			
	3/ 10	78,56			
	1/ 50	125,48	86,81 \pm 45,35	110,38	-10,38
	2/ 50	98,05			
	3/ 50	36,90			
Sapanisertib	1/ 10	69,37	77,09 \pm 34,07	90,71	9,29
	2/ 10	47,54			
	3/ 10	114,35			
	1/ 50	110,68	94,68 \pm 24,90	93,51	6,49
	2/ 50	107,37			
	3/ 50	66,00			
Kontrola	1/ DMSO	110,47	101,26 \pm 13,29	100,00	0,00
	2/ DMSO	107,29			
	3/ DMSO	86,03			



Obr. 10. Závislost aktivity enzymu AKR7A2 na koncentraci inhibitoru entrektinibu, tepotinibu, sapanisertibu vůči DMSO, které představuje kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru (maximální aktivita 100 %). Každý sloupec představuje procentuální aktivitu uvedenou v Tab. 5.

Ani v případě enzymu AKR7A2 nedocházelo při použití entrektinibu k výrazné inhibici, naopak byla pozorována zvýšená specifická aktivita aldo-reduktázy i při opakovaném měření. Můžeme konstatovat, že 10 μM entrektinib zvýšil aktivitu enzymu o 1,03 % a 50 μM entrektinib zvýšil aktivitu enzymu o 23,53 %.

Obdobné výsledky byly publikovány také s alisertibem a brigatinibem (Lakomá, 2020); 10 μM alisertib zvýšil specifickou aktivitu 7A2 o 22,22 % a 50 μM koncentrace alisertibu zvýšila aktivitu o 10,74 %. 10 μM brigatinib zvýšil specifickou aktivitu 7A2 o 0,86 % a 50 μM brigatinib zvýšil aktivitu 7A2 o 14,65 %. Též ibrutinib v 50 μM koncentraci zvýšil aktivitu enzymu o 29,2 % (Hudáčová, 2019).

Měřitelnou inhibicí tohoto enzymu prokázal 50 μM roskovitin, který enzym inhiboval z 6,23 % (Novotná et al. 2018), 10 μM buparlisib inhiboval 7A2 z 9,5 % a 50 μM buparlisib inhiboval enzym z 14,1 % (Bukum et al. 2019). Nejsilnějším inhibitorem z revidovaných látek byl bosutinib 10 μM, který inhiboval enzym z 38,7 % (Hudáčová, 2019).

Podobné chování bylo pozorováno i při použití tepotinibu; 10 μM tepotinib inhiboval 7A2 z 0,19 %, 50 μM koncentrace aktivovala enzym o 10,38 %.

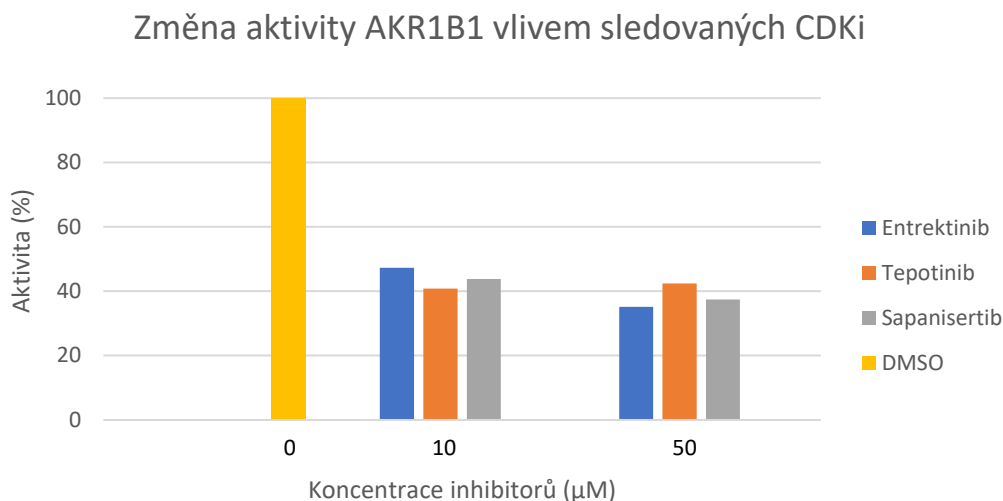
Sapanisertib prokázal měřitelný inhibiční efekt na enzym AKR7A2. Jeho 10 μM koncentrace inhibovala 7A2 z 9,29 %, na druhou stranu jeho 50 μM koncentrace inhibovala enzym pouze z 6,49 %.

Tento výsledek může být způsoben chybou v měření, nicméně obdobná paradoxní aktivace byla popsána i v jiných publikacích u brigatinibu (Lakomá, 2020) a ibrutinibu (Hudáčová, 2019), proto i námi studované látky mohou vystupovat jako tzv. aktivátory. Průkazný inhibiční efekt na enzym prokázal sapanisertib a 50 μM roskovitin (Novotná et al. 2018). Jako nejlepší inhibitor se jeví bosutinib, který v 10 μM koncentraci inhiboval enzym z 38,7 %, lépe vychází i neratinib, který v 50 μM koncentraci inhibuje enzymu z 19 % (Hudáčová, 2019).

5.2.3. Inhibice enzymu AKR1B1

Tab. 6. Aktivita enzymu AKR1B1 s 10 a 50 μM entrektinibem, tepotinibem, sapanisertibem a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

Typ inhibitoru	Koncentrace (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Entrektinib	1/ 10	88,86	$91,91 \pm 5,02$	47,30	52,70
	2/ 10	97,70			
	3/ 10	89,16			
	1/ 50	74,16	$71,79 \pm 8,40$	35,16	64,48
	2/ 50	62,46			
	3/ 50	78,75			
Tepotinib	1/ 10	50,10	$79,27 \pm 27,50$	40,80	59,20
	2/ 10	104,71			
	3/ 10	83,00			
	1/ 50	85,40	$79,13 \pm 6,33$	42,37	57,63
	2/ 50	79,25			
	3/ 50	72,74			
Sapanisertib	1/ 10	92,49	$85,06 \pm 14,97$	43,78	56,22
	2/ 10	94,86			
	3/ 10	67,82			
	1/ 50	80,34	$72,91 \pm 7,57$	37,45	62,55
	2/ 50	65,21			
	3/ 50	73,18			
Kontrola	1/ DMSO	43,26	$39,42 \pm 4,44$	100,00	0,00
	2/ DMSO	34,56			
	3/ DMSO	40,44			



Obr. 11. Závislost aktivity enzymu AKR1B1 na koncentraci inhibitoru entrektinibu, tepotinibu, sapanisertibu vůči DMSO, které představuje kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru (maximální aktivita 100 %). Každý sloupec představuje procentuální aktivitu uvedenou v Tab. 6.

Všechny studované látky vykazovaly výraznou inhibici tohoto enzymu; 10 μM entrektinib inhiboval 1B1 z 52,70 %, 50 μM entrektinib inhiboval enzym z 64,48 %. Při srovnání s buparlisibem (Bukum et al. 2019), který v 10 μM koncentraci inhiboval z 0,6 % a v 50 μM koncentraci inhiboval z 14,3 % vykazuje entrektinib výrazný potenciál inhibice AKR1B1. Výrazně silnější působení vykazuje také při srovnání s 10 μM aliseribem (inhibice 7,73 %) a 50 μM alisertibem (inhibice 33,75 %) (Lakomá, 2020), s 10 μM bosutinibem (inhibice 1,7 %), 50 μM bosutinibem (inhibice 11,0 %), 10 μM neratinibem (inhibice 4,2 %), 50 μM neratinibem (inhibice 8,3 %) a 10 μM ibrutinibem (inhibice 4,1 %) (Hudáčová, 2019)

Také tepotinib dosahoval výborných výsledků; výsledek inhibice 50 μM tepotinibu je pravděpodobně způsoben chybou v měření. Ve srovnání s výše uvedeným alisertibem (Lakomá, 2020) a buparlisibem (Bukum et al. 2019) ale i bosutinibem, neratinibem a ibrutinibem (Hudáčová, 2019) je tepotinib silnějším inhibitorem enzymu AKR1B1. Byl též srovnatelně účinný s použitým entrektinibem.

Také sapanisertib dosáhl 50 % inhibice enzymu AKR1B1. Jeho 10 μM koncentrace inhibovala 1B1 z 56,22 % a 50 μM koncentrace inhibovala enzym z 62,55 %, což představuje srovnatelný s výsledkem s ostatními námi testovanými látkami.

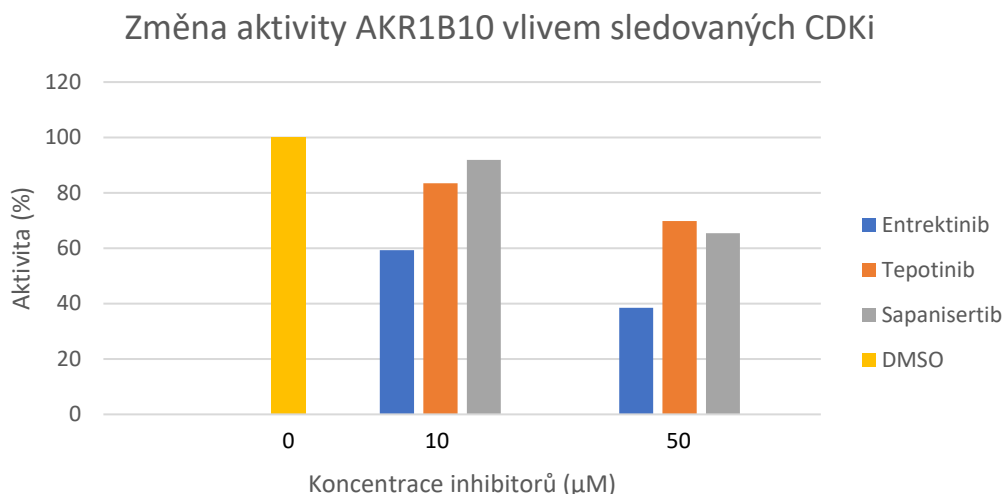
Zkoumané inhibitory mají výrazný inhibiční vliv na enzymu AKR1B1. Nejsilnější inhibici prokázal 50 μM entektinib, který inhiboval z 64,48 %. Všechny tři inhibitory v 10 μM koncentraci prokázaly schopnost inhibice nad 50 %. 10 μM tepotinib inhiboval z 59,20 %; ačkoli postup inkubace probíhal přesně podle kapitoly 4.3.1.1. je pravděpodobné, že tento výsledek byl způsoben chybou v měření.

Nejsilnější inhibitor AKR1B1 je 50 μM entektinib, za ním následuje 50 μM sapanisertib, 10 μM a 50 μM tepotinib; všechny látky vykazují silnější inhibiční účinek než publikovaný 50 μM alisertib (inhibice 33,75 %) (Lakomá, 2020), 50 μM neratinib (inhibice 17,1 %) (Hudáčová, 2019), 50 μM buparlisib (inhibice 14,3 %) (Bukum et al. 2019) a 50 μM bosutinib (inhibice 11,0 %) (Hudáčová, 2019).

5.2.4. Inhibice enzymu AKR1B10

Tab. 7. Aktivita enzymu AKR1B10 s 10 a 50 μM entrektinibem, tepotinibem, sapanisertibem a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

Typ inhibitoru	Koncentrace (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Entrektinib	1/ 10	169,85	178,55 \pm 32,16	59,27	40,73
	2/ 10	214,17			
	3/ 10	151,63			
	1/ 50	98,50	115,91 \pm 15,12	38,48	61,52
	2/ 50	125,81			
	3/ 50	123,41			
Tepotinib	1/ 10	262,75	251,38 \pm 20,45	83,44	16,56
	2/ 10	263,63			
	3/ 10	227,77			
	1/ 50	243,37	210,25 \pm 30,02	69,79	30,21
	2/ 50	184,83			
	3/ 50	202,54			
Sapanisertib	1/ 10	257,14	276,81 \pm 17,46	91,88	8,12
	2/ 10	290,47			
	3/ 10	282,81			
	1/ 50	200,00	197,19 \pm 12,10	65,46	34,54
	2/ 50	183,93			
	3/ 50	207,64			
Kontrola	1/ DMSO	264,92	344,16 \pm 82,72	100,00	0,00
	2/ DMSO	337,60			
	3/ DMSO	429,97			



Obr. 12. Závislost aktivity enzymu AKR1B10 na koncentraci inhibitoru entrekтинibu, tepotinibu, sapanisertibu vůči DMSO, které představuje kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru (maximální aktivita 100 %). Každý sloupec představuje procentuální aktivitu uvedenou v Tab. 7.

Inhibiční účinek sledovaných látek vůči enzymu AKR1B10 se již výrazně odlišoval, zatímco entrekтиниб zmíněný enzym výrazně inhiboval, sapanisertib dosahoval významné inhibice až při koncentraci 50 μM. 10 μM koncentrace entrekтинibu inhibovala enzym z 40,73 % a jeho 50 μM koncentrace inhibovala 1B10 z 61,52 %. Ve srovnání s roskovitinem (10 μM inhiboval z 8,11 %, 50 μM inhiboval z 27,23 %) či purlavanolem A (10 μM inhiboval 1B10 z 13,61 %, 50 μM inhiboval z 33,29 %) (Novotná et al. 2018) se jedná o výrazně silnější působení. Také v případě buparlisibu (10 μM inhiboval 8,4 %, 50 μM inhiboval 14,3 %) (Bukum et al. 2019), alisertibu, brigatinibu (Lakomá, 2020) ale i neratinidu či bosutinibu (Hudáčová, 2019) vychází entrekтиниб jako silnější inhibitor.

Účinek ibrutinibu je srovnatelný s měřeným entrekтинibem (50 μM inhiboval z 64,8 %) (Hudáčová, 2019).

Inhibice tepotinibem byla větší než 10 %, síly entrekтинibu však nedosahoval; 10 μM koncentrace inhibovala enzym z 16,56 %, 50 μM koncentrace inhibovala enzym z 30,21 %. Tepotinib nicméně vykazoval lepší účinek než výše uvedený neratinib, bosutinib (Hudáčová, 2019) a brigatinib, jehož 50 μM koncentrace inhibuje 1B10 pouze z 3,13 % (Lakomá, 2020), srovnatelnou inhibici vyvolával roskovitin, purvalanol A (Novotná et al. 2018) a buparlisib (Bukum et al. 2019).

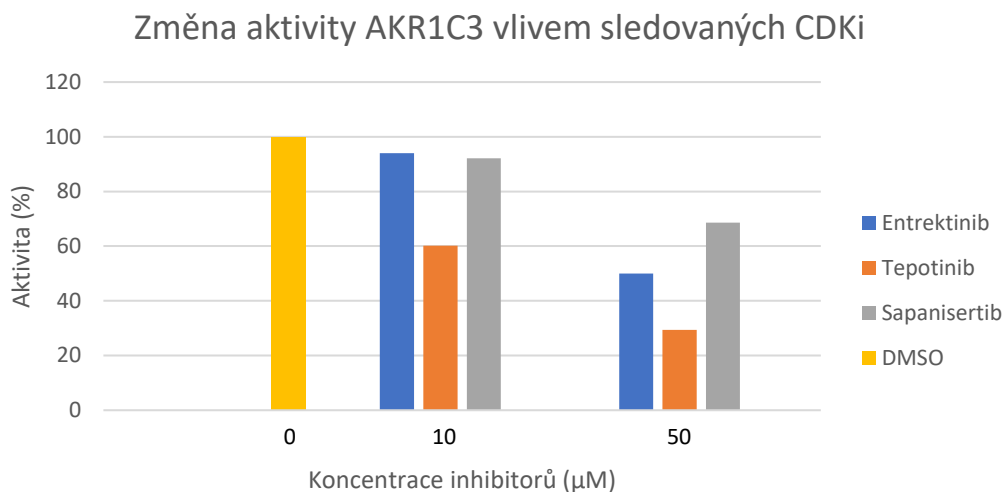
Sapanisertib je při srovnání s entrektinibem a tepotinibem nejméně potentním inhibitorem 1B10, 10 μM koncentrace nedosáhla 10 % inhibice a inhibovala pouze z 8,12 %, 50 μM koncentrace dosáhla 30,54 % inhibice. I přes to inhibuje více než bosutinib, neratinib (Hudáčová, 2019), brigatinib (Lakomá, 2020) a roskovitin (Novotná et al. 2018).

Při inhibici enzymu AKR1B10 vykazoval nejvyšší účinek entrektinib, srovnatelný s etablovaným ibrutinibem, i při 10 μM dosáhl 40,73 % inhibice, naopak nejmenší účinek se projevil u sapanisertibu.

5.2.5. Inhibice enzymu AKR1C3

Tab. 8. Aktivita enzymu AKR1C3 s 10 a 50 μM entrektinibem, tepotinibem, sapanisertibem a kontrolním vzorkem bez inhibitoru (DMSO)

Typ Inhibitoru	Koncentrace (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Entrektinib	1/ 10	199,75	198,38 \pm 1,19	94,05	5,95
	2/ 10	197,73			
	3/ 10	197,66			
	1/ 50	100,65	103,01 \pm 6,48	50,01	49,99
	2/ 50	110,33			
	3/ 50	98,04			
Tepotinib	1/ 10	73,02	70,29 \pm 3,73	60,13	39,87
	2/ 10	71,81			
	3/ 10	66,04			
	1/ 50	35,89	34,40 \pm 1,67	29,43	70,57
	2/ 50	32,60			
	3/ 50	34,71			
Sapanisertib	1/ 10	201,24	194,23 \pm 6,32	92,08	7,92
	2/ 10	188,96			
	3/ 10	192,48			
	1/ 50	134,52	141,69 \pm 11,21	68,54	31,46
	2/ 50	154,61			
	3/ 50	135,94			
Kontrola	1/ DMSO	212,78	210,92 \pm 3,12	100,00	0,00
	2/ DMSO	212,66			
	3/ DMSO	207,32			



Obr. 13. Závislost aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci inhibitoru entrektinibu, tepotinibu, sapanisertibu vůči DMSO, které představuje kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru (maximální aktivita 100 %). Každý sloupec představuje procentuální aktivitu uvedenou v Tab. 8.

Při inhibici enzymu AKR1C3 se poněkud překvapivě prosadil tepotinib, který v koncentraci 50 μM inhiboval aldo-ketoreduktázu z 70,57 %, což představuje nejlepší výsledek ze všech měření; vychází též účinněji než v případě inhibice brigatinibem (Lakomá, 2020), 50 μM neratimibem a bosutinibem (Hudáčová, 2019). Srovnatelných či lepších výsledků dosahoval buparlisib, purvalanol A (50 μM inhiboval z 93,67 %), roskovitin, alisertib, ibrutinib (10 μM inhiboval z 94 %) a vitusertib (10 μM inhiboval z 40,85 %) (Milan, 2019).

Entrektinib a sapanisertib efektivně působí až ve vyšších koncentracích; 50 μM entrektinib z 49,99 %, 50 μM sapanisertib z 31,46 %, přesto působí výrazněji než u brigatinibu (Lakomá, 2020).

Tab. 9. Souhrn procentuální inhibice jednotlivých inhibitorů k jednotlivým enzymům

Inhibitory		Inhibice enzymu (%)				
Typ	Koncentrace (μM)	AKR1 A1	AKR7 A2	AKR1 B1	AKR1 B10	AKR1 C3
Entrektinib	10	5,55	-1,03	52,70	40,73	5,95
	50	3,27	-23,53	64,84	61,52	49,99
Tepotinib	10	0,89	0,19	59,20	16,56	39,87
	50	3,21	-10,38	57,63	30,21	70,57
Sapanisertib	10	1,15	9,29	56,22	8,12	7,92
	50	0,93	6,49	62,55	34,54	31,46

Z naměřených výsledků byla potvrzena skutečnost, že některé inhibitory snižují aktivitu vybraných enzymů velmi dobře, a naopak některé vykazují malý či vůbec žádný inhibiční efekt na daný typ enzymu; jako nejsilnější inhibitor v této práci vyšel 50 μM tepotinib, který inhiboval enzym AKR1C3 ze 70,57 %. Jako druhý nejsilnější inhibitor vyšel 50 μM entrektinib, který inhiboval enzym AKR1B10 z 64,84 %. Nejnižší inhibiční aktivitu vykazovaly všechny inhibitory u enzymu AKR1A1.

Enzym AKR7A2 inhiboval pouze sapanisertib, zbylé dva inhibitory se chovaly spíše jako aktivátory, protože jejich vlivem docházelo ke zvýšení aktivity enzymu. Při stanovování inhibiční aktivity vybraných inhibitorů CDK byla nastíněna skutečnost, že 50 μM roztok inhibitoru měl menší inhibiční aktivitu než 10 μM roztok inhibitoru. Je pravděpodobné, že tyto výsledky byly zapříčiněny chybou v měření. Do dalšího testování byl vybrán inhibitor tepotinib, který 1C3 inhiboval nejvíce. Tato látka má navíc prokázaný inhibiční účinek na ABC-transportéry, což dále zvyšuje její terapeutickou hodnotu (Wu et al. 2019). Kromě hlavního a zamýšleného účinku na regulaci buněčného cyklu by použití tohoto inhibitoru vedlo hypoteticky také k inhibici metabolismu xenobiotik, např. daunorubicinu, a to jak na úrovni odbourávání fáze I, tak i na úrovni efluxních transportérů, čímž by bylo dosaženo vyšší koncentrace uvnitř buňky a tím i vyššího účinku konvenční léčby; navíc by nedocházelo k tak častému výskytu

nežádoucích účinků vyvolávaných polárnějšími metabolity. Kombinace konvenčního cytostatika a inhibitoru proteinkinázy by byla v tomto případě podpořena na třech klíčových místech, dá se tedy i předpokládat zvýšená terapeutická účinnost, což potvrzují i současné klinické zkušenosti.

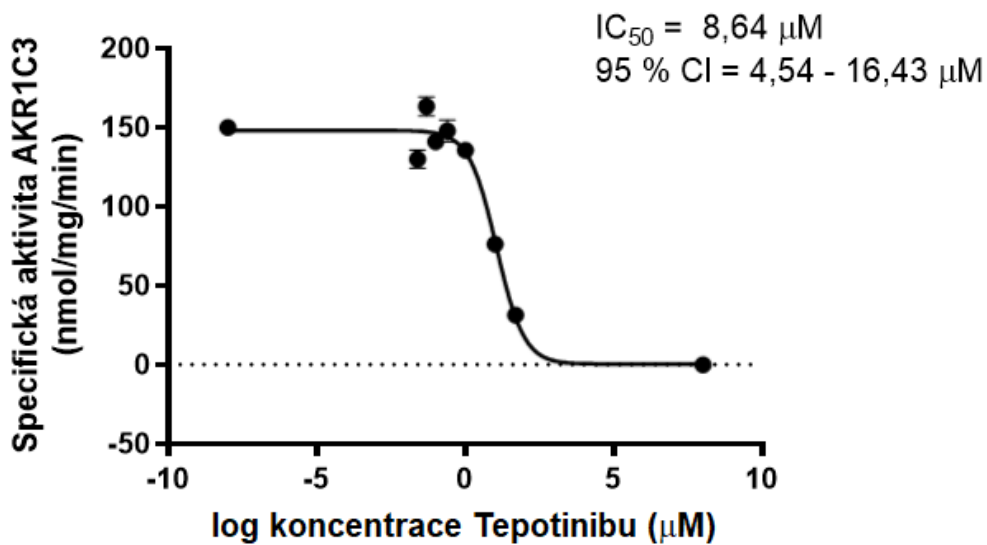
5.3. Stanovení IC₅₀ pro tepotinib

Pro detailnější testování byl vybrán tepotinib, protože v základním screeningu vyšel jako inhibitor s největším inhibičním účinkem na enzym AKR1C3. V prvním měření byly koncentrace tepotinibu: 50, 10, 1, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025 μM. Ve druhém měření byly koncentrace tepotinibu: 100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 μM. Ve třetím měření byly koncentrace inhibitoru: 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 μM. Hodnoty IC₅₀ byly získány pomocí programu GraphPad Prism7.

V následujících tabulkách (Tab. 10, 11, 12) jsou uvedeny hodnoty získané inkubací pro určení hodnoty IC₅₀. Grafické znázornění specifických aktivit pro různé koncentrace tepotinibu jsou na obrázcích č. 14, 15, 16.

Tab. 10. Výsledky prvního měření pro inhibiční koncentraci (IC₅₀) s AKR1C3

AKR1C3 (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
1/ 50 2/ 50 3/ 50	33,64 31,86 29,21	31,57 ± 2,23	15,98	84,02
1/ 10 2/ 10 3/ 10	78,86 74,40 75,94	76,40 ± 2,27	46,95	53,05
1/ 1 2/ 1 3/ 1	133,78 136,30 136,94	135,68 ± 1,67	78,85	21,15
1/ 0,25 2/ 0,25 3/ 0,25	142,38 155,71 145,87	147,99 ± 6,91	75,75	24,25
1/ 0,1 2/ 0,1 3/ 0,1	142,28 140,20 140,73	141,07 ± 1,08	80,25	19,75
1/ 0,05 2/ 0,05 3/ 0,05	165,04 168,43 156,61	163,36 ± 6,08	76,55	23,45
1/ 0,025 2/ 0,025 3/ 0,025	124,85 136,40 128,88	130,05 ± 5,86	79,43	20,57



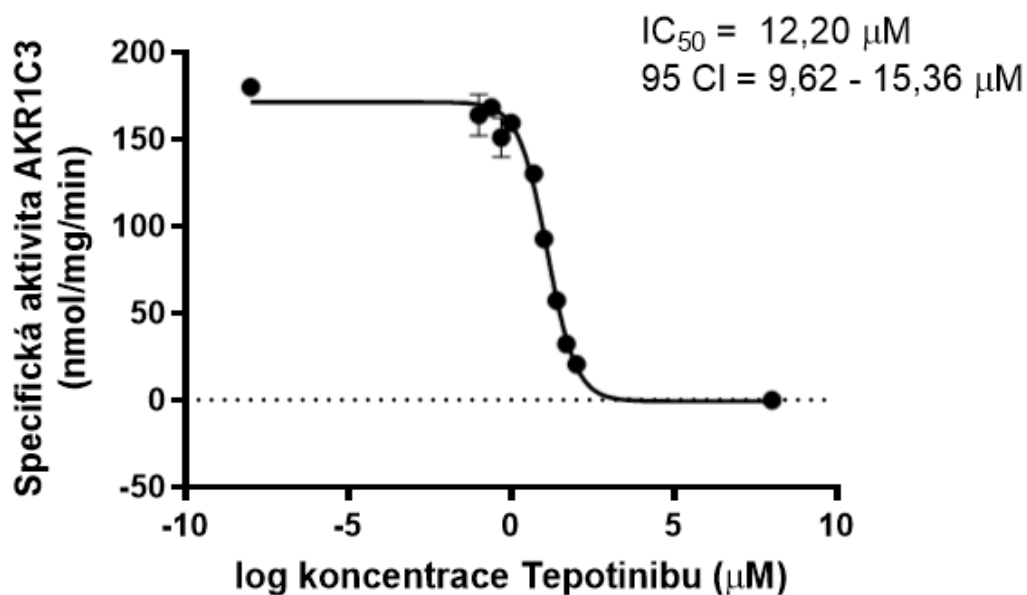
Obr. 14. Grafické znázornění specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci inhibitoru. Z grafu byla určena IC_{50} . (CI = konfidenční interval)

Hodnoty IC_{50} jsou velmi závislé na podmínkách, za kterých se měří; problémem při měření může být nedostatečná teplota, nepřesnost v pipetování nebo kombinace více faktorů.

Obecně platí, že čím vyšší je koncentrace inhibitoru, tím více bude snížena aktivita enzymu, dále platí, že při vyšší koncentraci enzymu roste hodnota IC_{50} . V měření bylo pracováno se stále stejnou koncentrací enzymu a v obr. 14 můžeme vidět snižování specifické aktivity enzymu při rostoucí koncentraci inhibitoru. IC_{50} v prvním měření vyšla $8,64 \mu M$. Na obr. 14 neprochází křivka body, které charakterizují nízké koncentrace inhibitoru. Je to patrně dáno chybovostí při přípravě nízkých koncentrací inhibitoru.

Tab. 11. Výsledky druhého měření pro inhibiční koncentraci (IC₅₀) s AKR1C3

AKR1C3 (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
1/ 100	21,28	20,73 ± 1,06	9,97	90,03
2/ 100	21,39			
3/ 100	19,51			
1/ 50	32,33	33,53 ± 1,97	16,13	83,37
2/ 50	30,55			
3/ 50	34,48			
1/ 25	57,17	57,33 ± 2,86	27,58	72,42
2/ 25	60,26			
3/ 25	54,56			
1/ 10	95,01	92,76 ± 1,99	52,37	47,63
2/ 10	91,22			
3/ 10	92,05			
1/ 5	131,03	130,34 ± 3,28	62,71	37,29
2/ 5	126,77			
3/ 5	133,21			
1/ 1	160,20	159,58 ± 0,86	76,78	23,22
2/ 1	158,59			
3/ 1	159,94			
1/ 0,5	144,43	151,14 ± 11,17	72,72	28,80
2/ 0,5	164,03			
3/ 0,5	144,96			
1/ 0,25	170,11	168,45 ± 1,61	81,04	18,96
2/ 0,25	168,36			
3/ 0,25	166,89			
1/ 0,1	173,23	147,37 ± 3,82	70,90	29,10
2/ 0,1	168,23			
3/ 0,1	150,50			



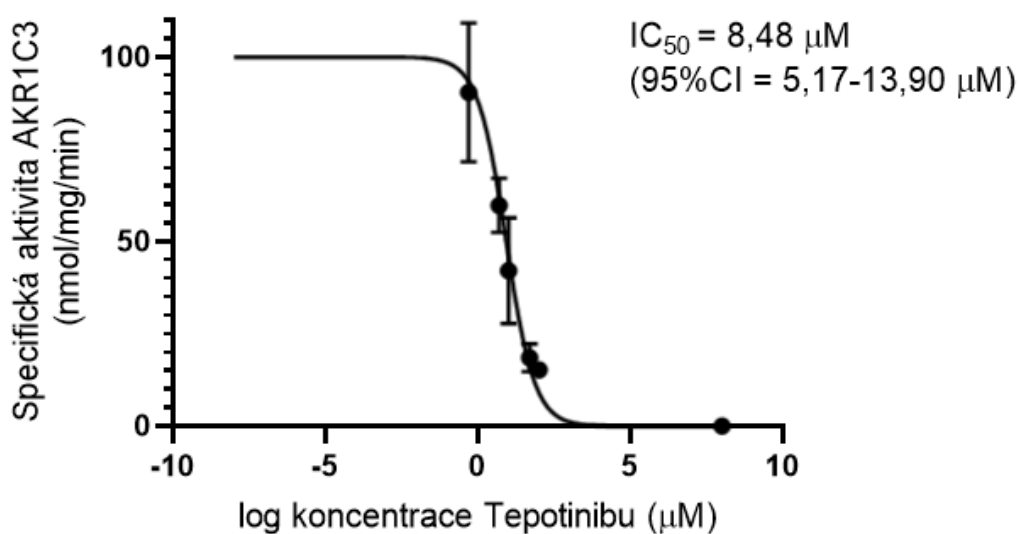
Obr. 15. Grafické znázornění specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci inhibitoru. Z grafu byla určena IC₅₀. (CI = konfidenční interval)

Na obr. 15 si můžeme povšimnout klesající specifické aktivity enzymu při zvyšování koncentrace inhibitoru. Ve druhém měření vyšla IC₅₀ 12,20 μM. Tento rozdíl oproti prvnímu měření mohl být zapříčiněn použitím jiné metody zastavení reakce. V tomto měření neprotíná křivka body, které znázorňují 1 a 0,1 μM koncentraci inhibitoru, jejich nepřesná procentuální inhibice mohla být způsobena kumulativní chybou při přípravě nízkých koncentrací tepotinibu.

Tab. 12. Výsledky třetího měření pro inhibiční koncentraci (IC₅₀) s AKR1C3

AKR1C3 (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Průměr specifické aktivity (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
1/ 100	252,91	245,38 ± 10,66	14,40	85,60
2/ 100	237,85			
3/ 100	54,55*			
1/ 50	263,94	297,87 ± 60,78	15,42	84,58
2/ 50	261,62			
3/ 50	368,04			
1/ 10	514,82	676,88 ± 229,18	47,24	52,76
2/ 10	838,93			
3/ 10	1336,94*			
1/ 5	1044,32	961,01 ± 117,82	38,70	61,30
2/ 5	877,70			
3/ 5	55,92*			
1/ 0,5	1246,45	1453,54 ± 303,30	85,31	14,69
2/ 0,5	1312,50			
3/ 0,5	1801,68			
1/ 0,25	1752,73	1793,08 ± 57,06	76,34	23,66
2/ 0,25	1833,42			
3/ 0,25	315,96*			
1/ 0,1	1818,01	1843,43 ± 35,94	103,5	-3,59
2/ 0,1	1868,84			
3/ 0,1	1608,21*			

(* hodnoty nebyly použity do grafu)



Obr. 16. Grafické znázornění specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci inhibitoru. Z grafu byla určena IC₅₀. (CI = konfidenční interval)

Na obr. 16 je znázorněna klesající specifická aktivita enzymu při zvyšující se koncentraci tepotinibu, směrodatné odchylky jsou v grafu velmi velké, je to dáno tím, že se do průběhu grafu některé hodnoty z tabulky nezadávaly. Tyto chybné hodnoty byly patrně zapříčiněny nedostatečným množstvím enzymu v reakční směsi.

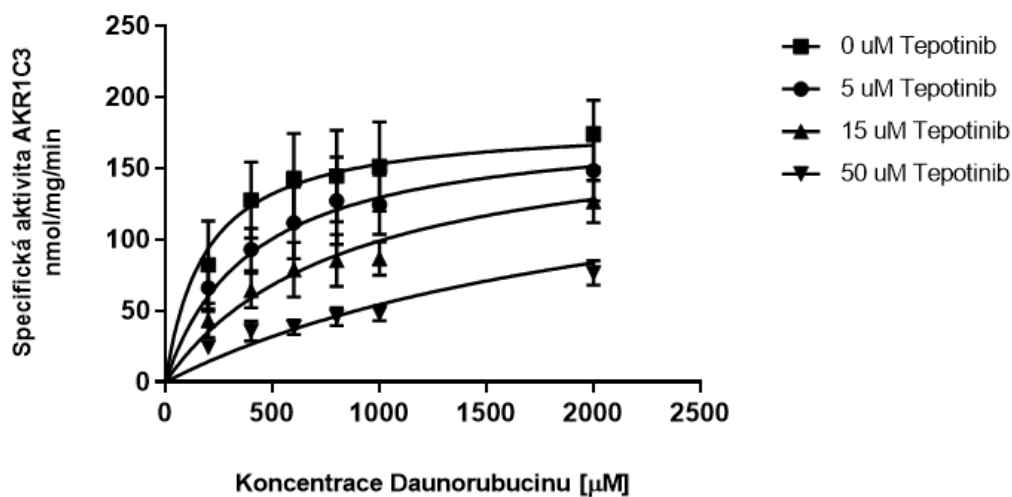
Hodnoty tepotinibu se v průběhu měření měnily, a to z důvodu nesprávné interpretace předchozích výsledků. V prvním měření byl předpoklad, že IC₅₀ bude kolem hodnoty 0,5 μM. V dalších měření byla předpokládaná hodnota IC₅₀ vyšší, spíše kolem 10 μM koncentrace tepotinibu. Z obr. 14, 15, 16, vyplývá sestupný trend specifické aktivity při vyšší koncentraci inhibitoru. Z mého měření je získaná hodnota IC₅₀ v intervalu od 8,48 – 12,20 μM koncentrace tepotinibu. U jednotlivých měření je uvedena i hodnota konfidenčního intervalu. Tento rozsah je zapříčiněn použitím dvou odlišných metod zastavení reakce. 10 μM tepotinib inhibuje 1C3 přibližně z 51,15 %, pro porovnání v práci Flaxová (2018) byl popsán inhibitor dinaciclibu, který už v 1 μM koncentraci inhibuje 1C3 z 80 %. Například ve srovnání s inhibitorem AZD5438, který k 80% inhibici enzymu 1C3 potřebuje okolo 75 μM koncentraci (Flaxová, 2018) tepotinib vychází lépe, protože k 80% inhibici 1C3 potřebuje přibližně 50 μM koncentraci. Dále můžeme porovnat tepotinib s inhibitorem buparlisibem, který v 10 μM koncentraci inhibuje 1C3 z přibližně 48,7 % a v 50 μM koncentraci inhibuje 1C3 z přibližně 80,6 %

(Bukum et al. 2019). Účinnost tepotinibu, buparlisibu a bosutinibu je velmi podobná. (Hudáčová, 2019).

Již zmiňovaný purvalanol A, ibrutinib a roskovitin inhibuje 1C3 účinněji než tepotinib (Novotná et al. 2018).

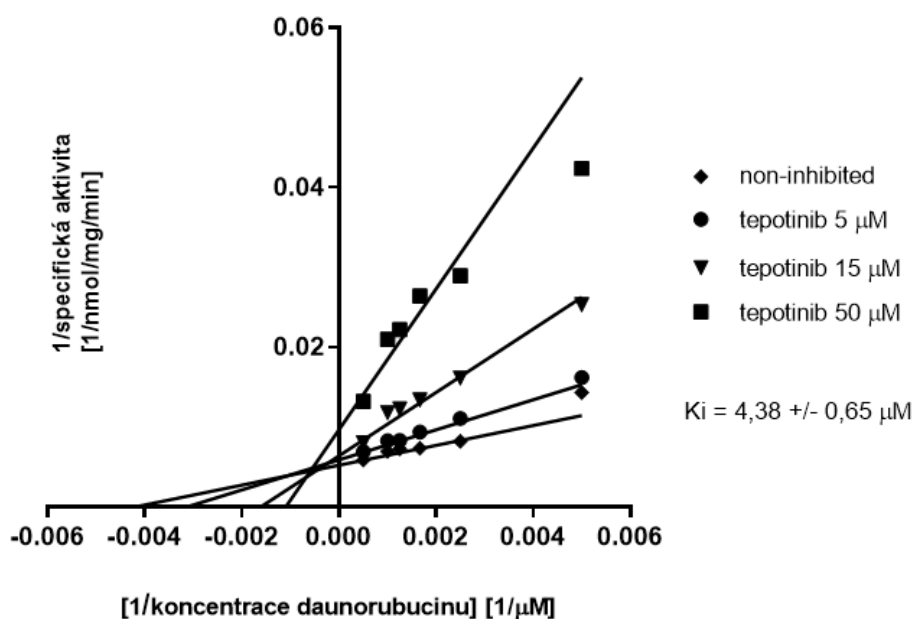
5.4. Stanovení inhibiční konstanty (K_i)

Při analýze výsledků byla použita, jak rovnice Michaelise a Mentenové, tak rovnice Lineweavera-Burka. Pro přesnější stanovení K_i byla použita rovnice dle Lineweavera-Burka; z této rovnice vyplývá, že se blíží kompetitivní inhibici.



Obr. 17. Znázornění závislosti specifické aktivity AKR1C3 na koncentraci daunorubicinu

Obr. 17 je grafické znázornění rovnice dle Michaelise a Mentenové a jedná se o průměr ze tří samostatných měření. V jednom měření byl pro stopování reakce použit amoniak, který způsobil, že jsou na obr. 17 velké směrodatné odchylky. Jednotlivé křivky znázorňují koncentraci tepotinibu. Z obrázku můžeme vyčíst, že 50 μM tepotinib nejvíce snižuje specifickou aktivitu enzymu.



Obr. 18. Znázornění rychlosti redukce daunorubicinu za použití inhibitoru tepotinibu

Obr. 18 charakterizuje rovnici Lineweavera-Burka, kde byly použity reciproké hodnoty koncentrace substrátu a specifické aktivity enzymu. Z tohoto grafu byl určen typ inhibice a hodnota K_i .

V poslední kroku práce byla určena inhibiční konstanta K_i pro tepotinib. Výsledky byly zpracovávány v programu GraphPadPrism 7. Jako první byla použita rovnice Michaelise a Mentenové, v druhém kroku byla použita rovnice dle Lineweavera a Burka. Výsledek inhibiční konstanty je průměrem ze tří samostatných měření. Bylo zjištěno, že inhibiční konstanta pro tepotinib je $4,38 \pm 0,65 \mu\text{M}$, účinek se blíží kompetitivní inhibici. Kompetitivní inhibice znamená, že inhibitor kompetuje o aktivní místo enzymu, z čehož plyne, že může být z vazebného místa vytěsněn silnějším inhibitorem, v případě CDK molekulou ATP. Takový typ mechanismu není výhodný, jelikož účinek závisí na koncentraci látky.

Purvalanol A, roskovitin (Novotná et al. 2018) a buparlisib (Bukum et al. 2019), ibrutinib (Hudáčová, 2019) se chovají jako nekompetitivní inhibitory, tzn. že se inhibitor váže na jiné místo než substrát, a proto nemůže být zvýšeným množstvím substrátu vytěsněn. Z tohoto důvodu se použití purvalanolu A, roskovitinu, buparlisibu a ibrutinibu jeví jako výhodnější. Pro klinickou praxi jsou výhodné nízké hodnoty K_i , IC_{50} a

nekompetitivní typ inhibice, které předznamenávají nízkou hodnotu terapeutické dávky, což znamená menší zátěž pro organismus pacienta.

6. Závěr

Aldo-ketoreduktázy patří mezi významné metabolické a xenobiochemické enzymy fáze I, nicméně se podílí na vzniku nádorové rezistence, dokonce i na vzniku některých onemocnění včetně rakovinného bujení. I proto se řada výzkumných center zaměřuje na screening nových látek a terapeutických postupů. Jedním z takových je i použití inhibitorů CDK; u těchto látek bylo kromě původně využívaného účinku při regulaci buněčného cyklu popsáno i inhibiční působení na již zmíněné aldo-ketoreduktázy.

Cílem této práce bylo zjistit, do jaké míry jsou námi testované látky schopné inhibovat vybrané aldo-ketoreduktázy, obzvláště pak takové, které mají prokázaný vliv na metabolismus konvenčního antineoplastika daunorubicinu. Ze sledovaných enzymů byla nejvyšší aktivita při redukci daunorubicinu prokázána u AKR1A1, sestupně pak 1B10, 1C3, 7A2 a 1B1.

V druhé části práce byl určen inhibiční vliv vybraných CDKi, jm. entrektinibu, tepotinibu a sapanisertibu, na tyto enzymy. Vyšší účinek vykazoval entrektinib a tepotinib, pro určení IC_{50} jsme vybrali tepotinib, jelikož nejlépe *in vitro* inhiboval AKR1C3, u kterého je dobře zdokumentovaná role v kancerogenezi. Bylo zjištěno, že některé inhibitory mohou naopak působit spíše jako tzv. aktivátory.

Poslední částí experimentální práce bylo stanovení již zmíněné IC_{50} a K_i pro tepotinib. Z měření kinetických parametrů bylo zjištěno, že se tepotinib chová jako kompetitivní inhibitor a jeho K_i je $4,38 \pm 0,65 \mu\text{M}$.

Klinické zkušenosti z Japonska, kde byla tato látka schválená pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic, svědčí o významném benefitu terapie ve vyšších stádiích onemocnění včetně komplikovaných stádií s metastázemi. Můžeme se nyní pouze domnívat, zda je úspěch tohoto léčiva podpořen inhibiční aktivitou na aldo-ketoreduktázy, přesto nám přináší nesporný důkaz, že výzkum a vývoj v oblasti nových antineoplastik může stále přinášet naději pro další pacienty či alespoň zlepšovat život těch již nevléčitelně nemocných.

7. Seznam zkratek

ABCB1 – ATP Binding Cassette subfamily B member 1

ABCG1 – ATP Binding Cassette subfamily G member 1

ABCC1 – ATP Binding Cassette subfamily C member 1

AKT – serin/threonin kináza, proteinkináza B

AKR – aldo-ketoreduktáza

ALK – anaplastická lymfomová kináza

ATP – adenosintrifosfát

CDK – cyklin-dependentní kináza

CDKi – inhibitor cyklin-dependentní kinázy

c-MET – tyrosinkináza Met

DAU – daunorubicin

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FDA – U.S. Food and Drug Administration

GIT – gastrointestinální trakt

Glu-6-P – glukóza-6-fosfát

HGFR – receptor pro růstový faktor hepatocytů

IC₅₀ – poloviční inhibiční koncentrace

K_i – inhibiční konstanta

K_m – Michaelisova konstanta

MDR – mnohočetná léková rezistence (multiple drug resistance)

MDR – dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem (medium chain dehydrogenase/reductase)

MHLW – Ministry of Health, Labour and Welfare

mTOR – mammalian target of rapamycin

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát

NADP⁺ – nikotinamidadeninukleotidfosfát

NF-κB – jaderný faktor kappa B

NSAID – nesteroidní antiflogistika

NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic

NTRK – neurotrophic tropomyosin-related kinase

Pi3K – phosphoinositide-3-kinase

PGF₂ – prostaglandin F2a

PGH₂ – prostaglandin H2

PGD₂ – prostaglandin D2

PPARγ – peroxisome proliferator-activated receptor gamma

ROS – reaktivní formy kyslíky

ROS1 – gen kódující protoonkogen tyrosinkinázu

SDR – dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem

TNFα – tumor nekrotizující faktor alfa

TNM – T- primární tumor, N- regionální lymfatické uzliny, M- metastázy

TORC 1 – transducer CREB activity 1

TORC 2 – transducer CREB activity 2

TRK – tropomyosin receptorová kináza

UHPLC – ultra účinná kapalinová chromatografie

ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

8. Citace

Azzarello, J. T., Lin, H. K., Gherezghiher, A., Zakharov, V., Yu, Z., Kropp, B. P., Culkin, D. J., Penning, T. M., Fung, K. M. (2010) Expression of AKR1C3 in renal cell carcinoma, papillary urothelial carcinoma, and Wilms' tumor. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(2), 147–155.

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.

Ballou, L. M., Lin, R. Z. (2008) Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *Journal of Chemical Biology*, 1(1-4), 27–36.

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

Bauman, D. R., Steckelbroeck, S., Peehl, D. M., Penning, T. M. (2006) Transcript Profiling of the Androgen Signal in Normal Prostate, Benign Prostatic Hyperplasia, and Prostate Cancer. *Endocrinology*, 147(12), 5806–5816.

Brachmann, S., Fritsch, C., Maira, S.-M., García-Echeverría, C. (2009) PI3K and mTOR inhibitors a new generation of targeted anticancer agents. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 194–198.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018) Global cancer statistics: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.

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.

Burczynski, M. E., Lin, H. K., Penning, T. M. (1999) Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Research*, 59(3), 607–614.

Byrns, M. C., Jin, Y., Penning, T. M. (2011) Inhibitors of type 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1-2), 95–104.

Cai, D., Latham, V. M., Zhang, X., Shapiro, G. I. (2006) Combined Depletion of Cell Cycle and Transcriptional Cyclin-Dependent Kinase Activities Induces Apoptosis in Cancer Cells. *Cancer Research*, 66(18), 9270–9280.

Callaghan, R., Luk, F., Bebawy, M. (2014) Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals*, 42(4), 623–631.

Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., Boldorini, R., Palloti, F., Viale, G., Gishizky, M. L., Draetta, G. F., Di Flore, P. P. (2006) Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers. *Cancer Research*, 66(16), 8147–8154.

Cicenas, J., Valius, M. (2011) The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(10), 1409–1418.

Cicenas, J., Kalyan, K., Sorokinas, A., Jatulyte, A., Valiunas, D. Kaupinis, A., Valius, M. (2014) Highlights of the Latest Advances in Research on CDK Inhibitors. *Cancers*, 6(4), 2224–2242.

Cole, S. P. C., Deeley, R. G. (2006) Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 438–446.

Češka, R., Tesař, V., Dítě, P., Štulc, T. (2010) *Interna*. 1. vyd. Triton. Praha. 855 stran.

Dozmorov, M. G., Azzarello, J. T., Wren, J. D., Fung, K. M., Yang, Q., Davis, J. S., Hurst, R. E., Culkin, D. J., Penning, T. M., Lin, H.-K. (2010) Elevated AKR1C3 expression promotes prostate cancer cell survival and prostate cell-mediated endothelial cell tube formation: implications for prostate cancer progression. *BMC Cancer*, 10(1), 672.

Drilon, A., Siena, S., Dziadziuszko, R., Barlesi, F., Krebs, M. G., Shaw, A. T., de Braund, F., Rolfo, C., Ahn, M.-J., Wolf, J., Seto, T., Cho, B. C., Patel, M. R., Chiu, C.-H., John, T., Goto, K., Karapetis, C. S., Arkenau, H.-T., Kim, S.-W., Ohe, Y., Li, Y.-C., Chae, Y. K., Chung, C. H., Otterson, G. A., Marukami, H., Lin, C.-C., Tan, D. S. W., Prenen, H., Riehl, T., Chow-Maneval, E., Simmons, B., Cui, N., Johnson, A., Eng, S., Wilson, T. R., Doebele, R. C. (2020) Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *The Lancet Oncology*, 21(2), 261–270.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. (1983) Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), 389–396.

Fei, P., El-Deiry, W. S. (2003) P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37), 5774–5783.

Ferrari, P., Nicolini, A. (2019) Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. In: *Oncogenomics*. 1st ed. Elsevier, Amsterdam, 393–422.

Flaxová, M. (2018) Studium rezistence v nádorové terapii – vliv inhibitorů proteinkinas na aktivitu vybraných lidských reduktas II. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 83 stran.

Goněc, R., Kozáková, Š. (2014) Cílená léčba versus klasická cytostika. *Onkologie*, 8(5), 231–233.

Gottesman, M. M. (2002) Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 615–627.

Grant, S. K. (2009) Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(7), 1163–1177.

Gudkov, A. V., Komarova, E. A. (2003) The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(2), 117–129.

Hevir, N., Vouk, K., Sinkovec, J., Ribič-Pucelj, M. Rižner, T. L. (2011) Aldo-keto reductases AKR1C1, AKR1C2 and AKR1C3 may enhance progesterone metabolism in ovarian endometriosis. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 217–226.

Hoefer, C. C., Quiñones-Lombraña, A., Blair, R. H., Blanco, J. G. (2016) Role of DNA methylation on the expression of the anthracycline metabolizing enzyme AKR7A2 in human heart. *Cardiovascular Toxicology*, 16(2), 182–192.

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.

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

Huse, M., Kuriyan, J. (2002) The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell*, 109(3), 275–282.

Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., Penning, T. M. (2003) The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, 621–631.

Jánská, K. (2014) Sledování kinetiky inhibitorů acetylcholinesterasy in vitro. Diplomová práce. Katedra biologických a lékařských věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 62 stran.

Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., Penning, T. M. (1997a) Comparative anatomy of the aldo–keto reductase superfamily. *Biochemical Journal*, 326(3), 625–636.

Jez, J. M., Flynn, T. G., Penning, T. M. (1997b) A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 54(6), 639–647.

Jez, J. M., Penning, T. M. (2001) The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132(1-3), 499–525.

Karaman, M. W., Herrgard, S., Triber, D. K., Gallant, P., Atteridge, C. E., Campbell, B. T., Chan, K. W., Ciceri, P., Davis, M. I., Edeen, P. T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J. P., Lockhart, D. J., Milanov, Z. V., Morrison, M. J., Pallares, G., Patel, H. K., Pritchard, S., Wodicka, L. M., Zarrinkar, P. P. (2008) A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 26(1), 127–132.

Kelly, R. J., Robey, R. W., Chen, C. C., Draper, D., Luchenko, V., Barnett, D., Oldham, R. K., Caluag, Z., Frey, A. R., Steinberg, S. M., Fojo, T., Bates, S. E. (2012) A Pharmacodynamic Study of the P-glycoprotein Antagonist CBT-1® in Combination With Paclitaxel in Solid Tumors. *The Oncologist*, 17(4), 512.

Khanna, M. Qin, K.-N., Wang, R. W., Cheng, K.-C. (1995) Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(34), 20162–20168.

Kim, J.-S., Chang, J. W., Park, J. K., Hwang, S.-G. (2012) Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53. *Cancer biology & therapy*, 13(8), 638–646.

Komoto, J., Yamada, T., Watanabe, K., Takusagawa, F. (2004) Crystal structure of human prostoglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry*, 43(8), 2188–2198.

Kumar, P. A., Bhanuprakash R. G. (2007) Focus on Molecules: Aldose Reductase. *Experimental Eye Research*, 85(6), 739–740.

Lakomá, P. (2020) Vliv alisertibu a brigatinibu na aktivitu vybraných lidských karbonylredukujících enzymů. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 91 stran.

Lan, Q., Mumford, J. L., Shen, M., Demarini, D. M., Bonner, M. R., He, X., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S., Tian, L., Chapman, R. S., Zheng, T., Keohavong, P., Caporaso, N., Rothman, N. (2004) Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis*, 25(11), 2177–2181.

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

Li, D., Ferrari, M., Ellis, E. M. (2012) Human aldo-keto reductase AKR7A2 protects against the cytotoxicity and mutagenicity of reactive aldehydes and lowers intracellular reactive oxygen species in hamster V79-4 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 195(1), 25–34.

Li, C., Cui, J.-F., Chen, M.-B., Liu, C.-Y., Liu, F., Zhang, Q.-D., Zou, J., Lu, P.-H. (2015) The preclinical evaluation of the dual mTORC1/2 inhibitor INK-128 as a potential anti-colorectal cancer agent. *Cancer Biology & Therapy*, 16(1), 34–42.

Liao, J. J.-L. (2007) Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(3), 409–424.

Lyon, R. C., Johnston, S. M., Watson, D. G., McGarvie, G., Ellis, E. (2007) Synthesis and Catabolism of γ -Hydroxybutyrate in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. Role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 25986–25992.

Malátková, P., Maser, E., Wsól, V. (2010) Human Carbonyl Reductases. *Current Drug Metabolism*, 11(8), 639–658.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912–1934.

Martin, H.-J., Breyer-Pfaff, U., Wsol, V., Venz, S. Block, S., Maser, E. (2006) Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals*, 34(3), 464–470.

Martin, H.-J., Maser, E. (2009) Role of Human Aldo-Keto-Reductase AKR1B10 in the Protection against Toxic Aldehydes. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1-3), 145–150.

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

McConnell, J. L., Wadzinski, B. E. (2009) Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development. *Molecular Pharmacology*, 75(6), 1249–1261.

Milan, J. (2019) Vliv inhibice midostaurinu, vistusertibu a talazoparibu na aktivitu vybraných reductas z nadrodiny AKR a SDR. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 87 stran.

Mo, H.-N., Liu, P. (2017) Targeting MET in cancer therapy. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 3(3), 148–153.

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

Nečas, O., Svoboda, A., Hejtmánek, M., Janisch, R., Červinka, M., Lenhart, K., Kolář, Z. (2000) Obecná biologie pro lékařské fakulty, 3. vyd. H&H. Jinočany. 554 stran.

Noguchi, K., Katayama, K., Mitsushashi, J., Sugimoto, Y. (2009) Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(1), 26–33.

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.

O'Brien, M. M., Lacayo, N. J., Lum, B. L. Kshirsagar, S., Buck, S., Ravindranath, Y., Bernstein, M., Weinstein, H., Chang, M. N., Arceci, R. J., Sikic, B. I., Dahl, G. V. (2010) Phase I study of valspodar (PSC-833) with mitoxantrone and etoposide in refractory and relapsed pediatric acute leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatric Blood & Cancer*, 54(5), 694–702.

Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y., Masuma, R. (1977) A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics*, 30(4), 275–282.

Ortega, M. A., Fraile-Martínez, O., del Barco, A. Á., Buján, J., García-Honduvilla, N., Coca, S. (2020) Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *Journal of oncology*, 1–11.

Palackal, N. T., Lee, S. H., Harvey, R. G., Blair, I. A., Penning, T. M. (2002) Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 247991–24808.

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. (1999) Molecular determinants of steroid recognition and catalysis in aldo-keto reductases. Lessons from 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69(1-6), 211–225.

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

Penning, T. M., Byrns, M. C. (2009) Steroid Hormone Transforming Aldo-Keto Reductases and Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155(1), 33–42.

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

Petrash, J. M. (2004) All in the Family: Aldose Reductase and Closely Related Aldo-Keto Reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(7-8), 737–749.

Pópulo, H., Lopes, J. M., Soares, P. (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1886–1918.

Reungwetwattana, T., Liang, Y., Zhu, V., Ou, S.-H. I. (2017) The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: The Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. *Lung Cancer*, 103, 27–37.

Rižner, T. L. (2012) Enzymes of the AKR1B and AKR1C Subfamilies and Uterine Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 34.

Rochat, B. (2009) Importance of Influx and Efflux Systems and Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Intratumoral Disposition of Anticancer Agents. *Current Cancer Drug Targets*, 9(5), 652–674.

Ruiz, F. X., Gallego, O., Ardévol, A., Moro, A., Domínguez, M., Alvarez, S., Alvarez, R., De Lera, A. R., Rovira, C., Fita, I., Parés, X., Farrés, J. (2009) Aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily: Retinoid specificity and control of cellular retinoic acid levels. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1-3), 171–177.

Sanli, G., Dudley, J. I., Blaber, M. (2003) Structural Biology of the Aldo-Keto Reductase Family of Enzymes: Catalysis and Cofactor Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 38(1), 79–101.

Shen, Y., Zhong, L., Johnson, S., Cao, D. (2011) Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: A comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 192–198.

Skálová, L., Boušová, I. (2011) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, 1. vyd. Karolinum. Praha. 160 stran.

Slíva, J., Votava, M. (2011) *Farmakologie*. 3. vyd. Triton. Praha. 400 stran.

Strimpakos, A. S., Karapanagiotou, E. M., Saif, M. W., Syrigos, K. N. (2009) The role of mTOR in the management of solid tumors: An overview. *Cancer Treatment Reviews*, 35(2), 148–159.

Srivastava, S. K., Yadav, U. C. S., Reddy, A. B. M., Saxena, A., Tammali, R., Shoeb, M., Ansari, N. H., Bhatnagar, A., Petrash, M. J., Srivastava, S., Ramana, K. V. (2011) Aldose Reductase Inhibition Suppresses Oxidative Stress-Induced Inflammatory Disorders. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 330–338.

Wu, Z.-X., Teng, Q.-X., Cai, C.-Y., Wang, J.-Q., Lei, Z.-N., Yang, Y., Fan, Y.-F., Zhang, J.-Y., Li, J. Chen, Z.-S. (2019) Tepotinib reverses ABCB1-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 166, 120–127.

Yadav, U. C. S., Srivastava, S. K., Ramana, K. V. (2010) Understanding the Role of Aldose Reductase in Ocular Inflammation. *Current Molecular Medicine*, 10(6), 540–549.

Yang, B., Hodgkinson, A., Oates, P. J., Millward, B. A., Demaine, A. G. (2008) High Glucose Induction of DNA-Binding Activity of the Transcription Factor NFkappaB in Patients with Diabetic Nephropathy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782(5), 295–302.

Yap, T. A., Molife, L. R., Blagden, S. P., De Bono, S. (2007) Targeting cell cycle kinases and kinesins in anticancer drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(4), 539–560.

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

Zhang, H., Patel, A., Ma, S.-L., Li, X. J., Zhang, Y.-K., Yang, P.-Q., Kathawala, R. J., Wang, Y.-J., Anredyy, N., Fu, L.-W., Chen, Z.-S. (2014) In vitro, in vivo and ex vivo characterization of ibrutinib: a potent inhibitor of the efflux function of the transporter MRP1. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5845–5857.

Zhang, N.-N., An, B.-J., Zhou, Y., Li, X.-S., Yan, M. (2019) Synthesis, Evaluation, and Mechanism Study of New Tepotinib Derivatives as Antiproliferative Agents. *Molecules*, 24(6), 1173.

Zhong, L., Liu, Z., Yan, R., Johnson, S., Zhao, Y., Fang, X., Cao, D. (2009) Aldo-Keto Reductase Family 1 B10 Protein Detoxifies Dietary and Lipid-Derived Alpha, BetaUnsaturated Carbonyls at Physiological Levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(2), 245–250.

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.

Internetové zdroje:

internet 1: *Diagnóza: C34 – ZN průdušky – bronchu a plíce* [online]. [cit. 21.04.2020]. Dostupné z: <<https://www.svod.cz/report.php?diag=C34>>.

internet 2: *Zhoubné nádory průdušek, plic a pohrudnice (C33-34)* [online]. [cit. 21.04.2020]. Dostupné z: <<https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/zhoubne-nadory-prudusek-plic-a-pohrudnice-c33-34/>>.

internet 3: *O zhoubných nádorech průdušek a plic* [online]. [cit. 21.04.2020]. Dostupné z: <<https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/zhoubne-nadory-prudusek-plic-a-pohrudnice-c33-34/o-zhoubnych-nadorech-prudusek-a-plic/>>.

internet 4: SKŘIČKOVÁ, J., TOMÍŠKOVÁ, M., KAPLANOVÁ, J. a BABIČKOVÁ, L. *Nemalobuněčný karcinom plic (Non-Small Lung Cancer = NSCLC)* [online]. [cit. 17.11.2019]. Dostupné z: <<https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinarni-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/nemalobunecny-karcinom-plic-non-small-lung-cancer-nsclc-aktualni-stav/>>.

internet 5: ČOUPKOVÁ, H. *Nemalobuněčný bronchogenní karcinom* [online]. [cit. 04.02.2020]. Dostupné z: <<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:591B0lmaajcJ:https://www.mou.cz/2-1-nemalobunecny-bronchogenni-karcinom/f76+&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz>>.

internet 6: *FDA grants orphan drug status to Alvocidib for AML* [online]. [cit. 24.04.2020]. Dostupné z: <https://www.healio.com/news/hematology-oncology/20140423/hot0414fdaalvocidib_10_3928_1081_597x_20140401_06_134187_1>

internet 7: *Entrectinib* [online]. [cit. 24.04.2020]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entrectinib#section=Biological-Half-Life>>.

internet 8: *FDA approves entrectinib for NTRK solid tumors and ROS-1 NSCLC* [online]. [cit. 24.04.2020]. Dostupné z: <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-entrectinib-ntk-solid-tumors-and-ros-1-nsclc>>.

internet 9: *Merck Announces Orphan Drug Designation for Investigational Therapy Tepotinib in Patients with NSCLC Harboring MET Gene Alterations* [online]. [cit. 20.08.2020]. Dostupné z: <<https://www.prnewswire.com/in/news-releases/merck-announces-orphan-drug-designation-for-investigational-therapy-tepotinib-in-patients-with-nsclc-harboring-met-gene-alterations-872955640.html>>.

internet 10: *TEPMETKO® (Tepotinib) Approved in Japan for Advanced NSCLC with METex14 Skipping Alterations* [online]. [cit. 20.08.2020]. Dostupné z: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/tepmetko-tepotinib-approved-in-japan-for-advanced-nsclc-with-metex14-skipping-alterations-301029496.html>>.

internet 11: *Tepotinib* [online]. [cit. 24.06.2020]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tepotinib>>.

internet 12: *Sapanisertib - Takeda Oncology* [online]. [cit. 20.08.2020]. Dostupné z: <<https://adisinsight.springer.com/drugs/800030541>>.

internet 13: *Sapanisertib* [online]. [cit. 24.06.2020]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sapanisertib>>.

internet 14: *Kinetika enzymatických reakcí* [online]. [cit. 24.06.2020]. Dostupné z: <<https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/Kin-teorie/9-EnzymovaKatalyza.pdf>>.