

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra biochemických věd**

**VLIV ALISERTIBU A BRIGATINIBU NA  
AKTIVITU VYBRANÝCH LIDSKÝCH  
KARBONYLREDUKUJÍCÍCH ENZYMŮ**

**Diplomová práce**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.**

**Hradec Králové 2020**

**Petra Lakomá**

## **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

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

V Hradci Králové

Petra Lakomá

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce paní RNDr. Evě Novotné, Ph.D., za ochotu, odborné a cenné rady, které mi při zpracování mé diplomové práce věnovala. Dále pak za trpělivost a čas strávený v laboratoři. Velké poděkování patří také celé katedře biochemie za umožnění zde pracovat a za pomoc a ochotu při řešení problémů.

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Kandidát:** Petra Lakomá

**Školitel:** RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vliv alisertibu a brigatinibu na aktivitu vybraných lidských karbonylredukujících enzymů

**Klíčová slova:** alisertib, brigatinib, daunorubicin, inhibice, karbonylredukující enzymy

Proteinkinasy představují skupinu enzymů, jejichž hlavní funkcí je přenos fosfátové skupiny ATP na proteinový substrát, tj. fosforylace. Jedná se o jednu z nejčastějších posttranslačních modifikací proteinů, která je úzce spjata s regulací intracelulárních procesů a s buněčnou signalizací. Abnormální exprese proteinkinas je často spojována s rozvojem nádorových onemocnění. Inhibice těchto proteinkinas může zabránit proliferaci nádorových buněk a indukovat jejich buněčnou smrt.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovení inhibičního potenciálu proteinkinasových inhibitorů, alisertibu a brigatinibu, vůči karbonylredukujícím enzymům. Zvýšená exprese karbonylredukujících enzymů v buňkách nádoru může vést k rezistenci na léčivo a selhání chemoterapeutické léčby. V případě antracyklinového chemoterapeutika daunorubicinu dochází prostřednictvím karbonylredukujících enzymů k redukci karbonylu na uhlíku C-13 za vzniku primárního metabolitu daunorubicinolu, který má nižší cytotoxický účinek, a navíc vykazuje vyšší kardiotoxicitu. Snaha o překonání rezistence nádorových buněk na daunorubicin a snížení jeho kardiotoxického působení vede k hledání inhibitorů karbonylredukujících enzymů.

Porovnáním specifické aktivity karbonylredukujících enzymů, které jsou schopny metabolizace daunorubicinu na daunorubicinol, bylo zjištěno, že nejvyšší aktivity dosahuje enzym CBR1. U ostatních enzymů pak specifická aktivita klesala v pořadí AKR1C3, AKR1A1, AKR1B10, AKR7A2 a AKR1B1. Tyto aktivní enzymy jsme následně testovali s potenciálními inhibitory alisertibem a brigatinibem. Alisertib v koncentraci 50  $\mu$ M snížil aktivitu enzymů AKR1C3 na 14,24 % a AKR1B10 na 44,30 %. U alisertibu jsme stanovili hodnotu  $IC_{50}$  a  $K_i$  pro AKR1C3.

## **ABSTRACT**

### **Charles University**

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

### **Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Petra Lakomá

**Supervisor:** RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** The effect of alisertib and brigatinib on the activity of selected human carbonyl reducing enzymes

**Key words:** brigatinib, alisertib, daunorubicin, inhibition, carbonyl-reducing enzymes

Protein kinases are enzymes, whose main function is based on a transfer of phosphate group from ATP to protein substrate. This common posttranslational modification is involved in the regulation of intracellular processes and cell signaling. Altered expression of protein kinases is often coupled with a development of cancer. Inhibition of protein kinases may prevent cancer cell proliferation and induce their cell death.

The main aim of the diploma thesis was to measure inhibition potential of protein kinase inhibitors, alisertib and brigatinib, against carbonyl-reducing enzymes. Overexpression of carbonyl-reducing enzymes in cancer cells may cause resistance to drugs followed by failure of chemotherapeutic therapy. In case of antracyclin chemotherapeutic daunorubicin, carbonyl-reducing enzymes reduce the carbonyl in C-13 giving rise a primary metabolite daunorubicinol, which has lower cytotoxic effect but higher cardiotoxicity. The effort to overcome resistance to daunorubicin and to decrease its cardiotoxic effects leads to search for inhibitors of carbonyl-reducing enzymes.

Based on a comparison of specific activity of carbonyl-reducing enzymes, which metabolize danorubicin to daunorubicinol, we found, that the highest activity was reached in enzyme CRB1, whereas specific activity of other enzymes decreased in following order AKR1C3, AKR1A1, AKR1B10, AKR7A2 and AKR1B1. Those active enzymes were treated with potential inhibitors – alisertinib and brigatinib. Alisertib in 50  $\mu$ M concentration reduced activity of enzyme AKR1C3 to 14.24 % and AKR1B10 to 44.30 %. In case of alisertib, we determined the  $IC_{50}$  and  $K_i$  value for AKR1C3.

## Obsah

1. ÚVOD .....	- 8 -
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	- 9 -
2.1 ANTRACYKLINOVÁ CHEMOTERAPEUTIKA.....	- 9 -
2.1.1 Využití antracyklinů v terapii nádorových onemocnění .....	- 9 -
2.1.2 Chemická struktura antracyklinových antibiotik.....	- 10 -
2.1.3 Mechanismus účinku.....	- 12 -
2.1.4 Vedlejší účinky antracyklinů.....	- 16 -
2.1.5 Kardioprotekce.....	- 18 -
2.1.6 Buněčná rezistence na antracykliny .....	- 19 -
2.2 Karbonylredukující enzymy.....	- 20 -
2.2.1 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem .....	- 22 -
2.2.2 Aldo-ketoreduktasy .....	- 24 -
2.3 PROTEINKINASY .....	- 29 -
2.3.1 Inhibice proteinkinas .....	- 31 -
2.3.1.1 Brigatinib.....	- 32 -
2.3.1.2 Alisertib .....	- 33 -
3. CÍL PRÁCE .....	- 35 -
4. POUŽITÝ MATERIÁL A METODIKA.....	- 36 -
4.1 MATERIÁL.....	- 36 -
4.1.1 Pomůcky a přístrojové vybavení.....	- 36 -
4.1.2 Chemikálie a reagenty .....	- 37 -
4.2 METODIKA .....	- 39 -
4.2.1 Princip používané reakce.....	- 39 -
4.2.2 Příprava reagentů .....	- 39 -
4.2.3 Inkubace.....	- 41 -
4.2.4 UHPLC analýza.....	- 46 -
4.2.5 Zpracování naměřených dat .....	- 47 -
5. VÝSLEDKY MĚŘENÍ .....	- 49 -
5.1 SPECIFICKÁ AKTIVITA VYBRANÝCH KARBONYLREDUKUJÍCÍCH ENZYMŮ VŮČI SUBSTRÁTU DAUNORUBICINU.....	- 49 -

<b>5.2 ZÁKLADNÍ SCREENING INHIBIČNÍHO POTENCIÁLU INHIBITORŮ PROTEINKINAS U AKTIVNÍCH ENZYMŮ VŮČI DAUNORIBICINU.....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>5.3 STANOVENÍ HODNOTY IC<sub>50</sub> .....</b>	<b>- 62 -</b>
<b>5.4 STANOVENÍ HODNOTY K<sub>i</sub> .....</b>	<b>- 63 -</b>
<b>6. DISKUZE.....</b>	<b>- 65 -</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>- 69 -</b>
<b>8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....</b>	<b>- 70 -</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>- 72 -</b>
<b>10. LITERÁRNÍ ZDROJE .....</b>	<b>- 74 -</b>
<b>11. INTERNETOVÉ ZDROJE .....</b>	<b>- 90 -</b>

# 1. ÚVOD

Dle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization) byla podle statistik pro rok 2018 nádorová onemocnění hlavní příčinou úmrtí na světě. Konkrétně se jednalo o 9,6 milionů úmrtí, což představuje jedno úmrtí způsobené nádorovým onemocněním z šesti. Nejčastějším typem novotvaru u žen je nádor prsu, tlustého střeva, děložního čípku, plic a štítné žlázy. Naopak u mužů se setkáváme nejčastěji s nádory plic, prostaty, žaludku, tlustého střeva a jater. Z důvodu neustále narůstajícího počtu případů s nově diagnostikovaným nádorovým onemocněním je nezbytná včasná detekce onemocnění a poskytnutí kvalitní péče a léčby (Internet 1).

Léčebné režimy zahrnující jak hematologické malignity, tak i různé typy solidních nádorů jsou spjaty s použitím antracyklinových cytostatik. Antracykliny však působí nejen v nádorových buňkách, ale i v buňkách zdravé tkáně. Největší limitací této léčby je kardiotoxicita a dále také rezistence nádorových buněk vůči těmto chemoterapeutikům (Hortobágyi 1997).

Jako jedna z možností, jak zvýšit citlivost nádorových buněk vůči antracyklinům, a případně snížit i jejich kardiotoxicitu, se jeví použití antracyklinů v kombinaci s dalšími léčivy. Jednou z možností mohou být inhibitory proteinkinas. Nedávno bylo např. zjištěno, že ensartinib zvyšuje účinek daunorubicinu u nádorových buněk se zvýšenou expresí některých ABC transportérů (Vigiannis et. al 2020).

Další možností, jak překonat rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům, je inhibice jejich redukčního metabolismu. Nejčastěji používané antracykliny - doxorubicin, daunorubicin a idarubicin jsou v lidském organismu redukovány pomocí karbonylredukujících enzymů na sekundární alkoholy, které vykazují nižší účinek v nádorových buňkách (Edwardson et al. 2015).

Skutečnost, že některé z inhibitorů proteinkinas mohou inhibovat také antracyklinreduktasy byla zjištěna např. u buparlisibu (Bukum et al. 2019).

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda i některé další inhibitory proteinkinas, konkrétně alisertib a brigatinib, mohou *in vitro* redukovat metabolismus daunorubicinu. K tomuto účelu byly použity vybrané rekombinantně připravené enzymy, u kterých byla nejprve ověřena jejich schopnost metabolizovat daunorubicin. Enzymy, u kterých byla tato schopnost prokázána, byly následně inkubovány s alisertibem a brigatinibem a bylo zjišťováno, zda tato léčiva mají vliv na schopnost testovaných enzymů redukovat daunorubicin.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 ANTRACYKLINOVÁ CHEMOTERAPEUTIKA

Antracyklinová chemoterapeutika jsou charakterizována jako protinádorová antibiotika s velmi širokým spektrem působení a jsou využívána při léčbě hematologických onemocnění a solidních nádorů. Poprvé byla tato antibiotika izolována z kultur bakterie rodu *Streptomyces* v 60. letech 20. století (Edwardson et al. 2015).

Mezi první izolovaná antracyklinová antibiotika patří daunorubicin (DAU) s doxorubicinem (DOX) a řadí se tak do první generace. Vzhledem k velkému úspěchu v léčbě různých typů karcinomů bylo velkou snahou vytvořit nová analoga těchto antracyklinů. Řada z nich je dnes v klinické praxi využívána a jde například o idarubicin (IDA), což je analog DAU postrádající C-4 methoxyskupinu, či epirubicin (EPI), což je epimer DOX. IDA i EPI se řadí mezi antracykliny generace druhé. Dále pak byla popsána méně často používaná antracyklinová antibiotika třetí generace, mezi které patří pirarubicin, karminomycin, aclarubicin, zorobicin a valrubicin (Edwardson et al. 2015).

Základním mechanismem účinku těchto léčiv je inhibice enzymu topoizomerasy II, čímž dochází k zastavení replikace DNA a proliferace buněk. Tato léčiva se mohou kovalentně vázat na molekulu DNA a tím poškozují buněčnou funkci. Mohou působit také interkalačně, což znamená, že se vmezeřují do DNA mezi báze. Interkalace znemožňuje replikaci DNA, probíhající při dělení buněk, a také transkripci (přepis genu z DNA do RNA), čímž dochází kablokování syntézy bílkovin (Hortobágyi 1997, Venkatesh, Kasi 2019).

Antracyklinová antibiotika se dají podat pouze intravenózní infuzí, výjimkou je však IDA, který se dá užívat i orálně. Tato antibiotika se metabolizují játry, jsou vylučovány žlučí a z menší části také močí. Hlavní nevýhodou antracyklinových antibiotik je kardiotoxicita, která může být progresivní a nevratná. Ve snaze zamezit srdečnímu selhání mají antracykliny stanovenou doporučenou kumulativní dávku v rozmezí od 150 mg/m<sup>2</sup> do 900 mg/m<sup>2</sup> v závislosti na použitém antibiotiku (Puma et al. 2008, Venkatesh, Kasi 2019).

#### 2.1.1 Využití antracyklinů v terapii nádorových onemocnění

Antracyklinová antibiotika mají široké spektrum využití a patří mezi velmi důležitá protinádorová léčiva. DOX se v dnešní době využívá nejen k léčbě hematologických malignit, jako je akutní lymfoblastická (ALL) a myeloblastická leukémie (AML), ale i v terapii solidních

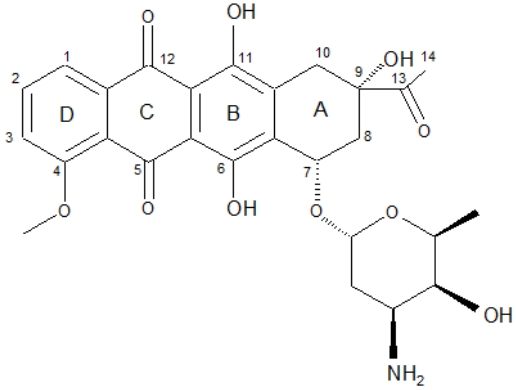
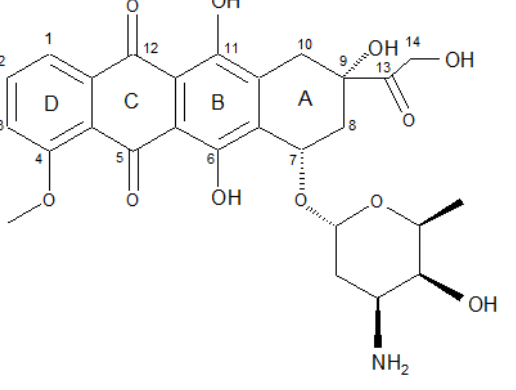
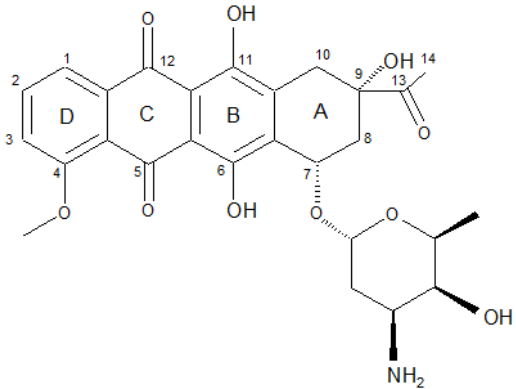
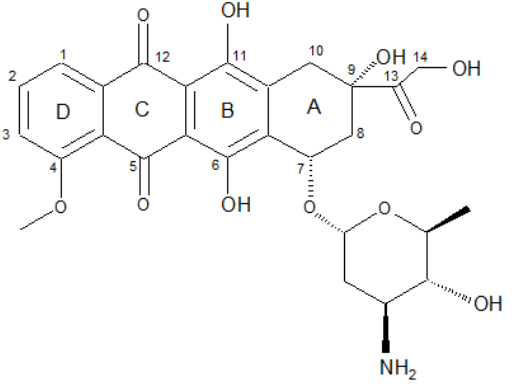
nádorů např. karcinomu močového měchýře, prsu, plic, žaludku a vaječníků, dále pak sarkomu měkkých tkání a kostí. Rovněž se DOX používá v terapii solidních nádorů u dětí (např. Wilmsův nádor), Hodgkinova lymfomu a ne-Hodgkinova lymfomu (Minotti et al. 2004).

DAU a IDA se výhradně používají k léčbě leukémie, a to jak AML, tak i ALL. Dle experimentálních analýz bylo zjištěno, že IDA se jeví jako účinnější a aktivnější antineoplastické léčivo ve srovnání s DAU (Carella et al. 1990).

EPI se pak používá převážně v pokročilejších stádiích nádorového onemocnění prsu a v případech karcinomu žaludku (Internet 2).

### **2.1.2 Chemická struktura antracyklinových antibiotik**

Strukturně jsou antracykliny tvořeny tetracyklinovým aglykonem s chinonovými a hydroxychinonovými skupinami a sacharidovou složkou daunosaminem (Obr. 1). Aglykon je tvořen tetracyklinovou strukturou, přičemž kruhy B a C obsahují chinonové a hydroxychinonové skupiny. Na kruhu D je připojena methoxylová funkční skupina v poloze C4. V poloze C9 je na kruhu A připojen krátký boční řetězec, kdy na uhlíku C13 se nachází karbonylová funkční skupina a na uhlíku C9 je hydroxyskupina. Na kruhu A v poloze C7 je glykosidickou vazbou připojen bazický monosacharid 3-amino-2,3,6-trideoxy-L-lyxo-hexosa, neboli daunosamin. DOX a DAU se odlišují ve vedlejším řetězci, kdy DOX nese na uhlíku C14 hydroxylovou skupinu a DAU tuto funkční skupinu postrádá. Tato nepatrná modifikace podstatně mění aktivitu léčiva a díky tomu má DOX široké spektrum působení, a to v léčbě solidních nádorů, leukémie i lymfomů. DAU je indikován k léčbě akutní myeloidní leukémie u dospělých a k akutní lymfocytární leukémie u dětí i dospělých. IDA se od ostatních antracyklinů odlišuje nepřítomností methoxylové funkční skupiny na kruhu D uhlíku C4. IDA je tedy analog DAU, postrádající C4 methoxy skupinu. Vyznačuje se tím, že je lipofilnější a tudíž má vyšší absorpci do nitra buněk než DAU. EPI neboli epimer DOX se liší hydroxylovou funkční skupinou, která se nachází v axiální poloze daunosaminového zbytku, zatímco DOX má tento hydroxyl v poloze ekvatoriální (Minotti et al. 2004, McGowan 2017).

<p style="text-align: center;"><b>Daunorubicin</b></p>	 <p>The structure shows the tetracyclic aglycone core with rings labeled A, B, C, and D. The numbering of atoms is as follows: 1 (D ring), 2, 3, 4 (D ring), 5 (C ring), 6 (B ring), 7 (A ring), 8, 9, 10, 11, 12 (C ring), 13, 14 (A ring). The aglycone has a methoxy group at C4, a carbonyl at C5, a hydroxyl at C6, a carbonyl at C12, and hydroxyl groups at C11 and C14. The A ring is linked via an oxygen atom to a D-glucopyranose sugar. The sugar has a methyl group at C2, a hydroxyl group at C3, and an amino group at C4.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Doxorubicin</b></p>	 <p>The structure is identical to Daunorubicin, but the hydroxyl group at C14 is present, and the amino group at C4 of the sugar is in the beta configuration (pointing up).</p>
<p style="text-align: center;"><b>Idarubicin</b></p>	 <p>The structure is identical to Doxorubicin, but the hydroxyl group at C14 is absent.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Epirubicin</b></p>	 <p>The structure is identical to Doxorubicin, but the hydroxyl group at C14 is present, and the amino group at C4 of the sugar is in the alpha configuration (pointing down).</p>

Obr. 1 Chemické struktury DAU, DOX, IDA, EPI (převzato z Štěrbá et al. 2013)

### 2.1.3 Mechanismus účinku

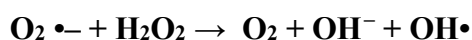
I přestože se antracykliny používají v léčbě mnoha nádorových malignit již spoustu let, mechanismus jejich působení ještě nebyl zcela jednoznačně definován. Existuje více teorií, jak lze vysvětlit jejich cytotoxické a cytostatické působení. Patří mezi ně tvorba volných radikálů, interakce s DNA prostřednictvím interkalace, či interakce s komplexem DNA-topoizomerasa II. Antracykliny mohou také tvořit kovalentní vazbu s DNA a modifikovat tak báze, což zapříčiňuje poruchy v replikaci a transkripci DNA vedoucí až k buněčné smrti neboli apoptóze (Venkatesh, Kasi 2019).

Jeden z prvních předpokládaných mechanismů cytotoxicity antracyklinů byla právě interkalace chromoforové části antracyklinů mezi sousední pár bazí DNA (Gewirtz 1999).

Antracykliny obsahují chinonovou skupinu, která v přítomnosti enzymů, jako je NADH-dehydrogenasa, cytochrom P450 a xantinoxidasa, vstupuje do redoxních reakcí a může tak tvořit reaktivní formy kyslíku (ROS). Chinonová skupina je redukována na semichinon, který se stává donorem elektronu pro kyslík, z něhož vznikne vysoce reaktivní superoxidový aniont, který může být ještě dále přeměněn na vysoce reaktivní formy kyslíku jako je peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál. Tento oxidační stres, který je vyvolán působením nadměrného množství ROS, zapříčiňuje poškození DNA a peroxidaci lipidů tvořících buněčné membrány, což může vést až k apoptóze (McGowan 2017, Minotti et al. 2004, Internet 3).

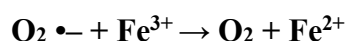
Další tvorba kyslíkových radikálů je zajištěna prostřednictvím železa, a to dvěma způsoby (Obr. 5). První způsob vzniku oxidačního stresu je neenzymatický. Antracykliny, respektive jejich chinonový aglykon, je schopný s železem vytvářet chelát za vzniku antracyklin-železnatého komplexu. Tento komplex v přítomnosti kyslíku je oxidován, a vzniká tak superoxidový radikál nebo peroxid vodíku a následně pak vysoce toxický hydroxylový radikál. Tyto toxické radikály poškozují DNA, lipidy i proteiny (Ichikawa et al. 2014, Angsutararux et al. 2015).

Druhá cesta tvorby reaktivních forem kyslíku je pomocí Haber-Weissovy reakce (Obr. 2), jejíž součástí je reakce Fentonova. Železo tyto reakce katalyzuje a tím je urychluje. Celková reakce, která v organismu probíhá, je tedy následující:



Obr. 2 Haber-Weissova reakce (převzato z Šimůnek et al. 2009)

První krok Haber-Weissovy reakce (Obr. 3), je velmi pomalý, a proto je urychlován katalyzátorem železem. Železitý ion je pomocí superoxidu redukován na ion železnatý.



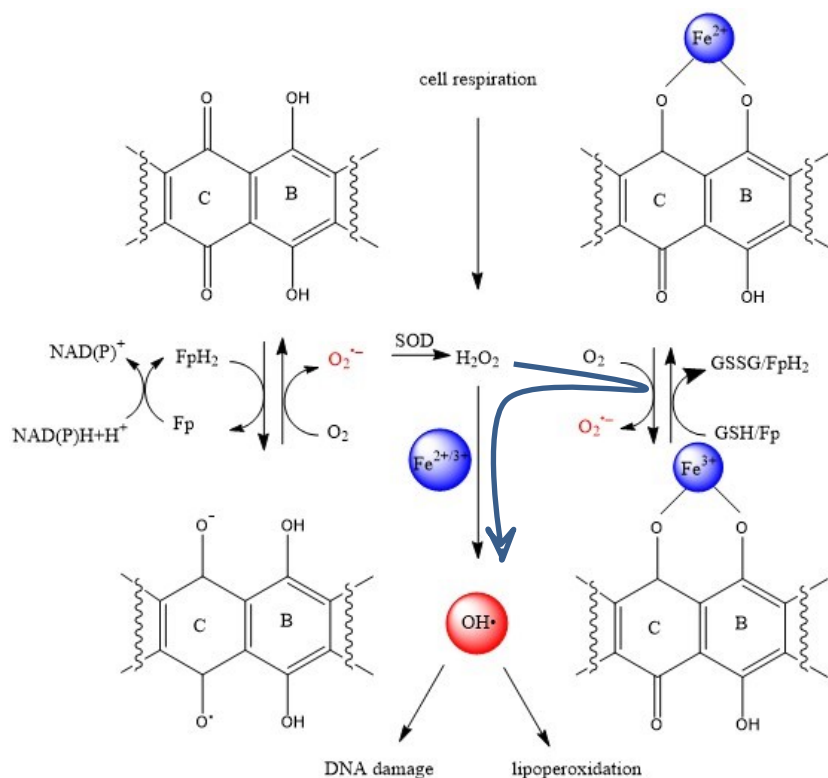
Obr. 3 První krok Haber-Weissovy reakce (převzato z Šimůnek et al. 2009)

V druhém kroku Haber-Weissovy reakce dochází k Fentonově reakci (Obr. 4) – peroxid vodíku a superoxid může generovat vysoce toxický hydroxylový radikál s velmi krátkým poločasem a s extrémně vysokou reaktivitou. Hydroxylový radikál nelze snadno detekovat a eliminovat pomocí enzymů, jak je tomu u superoxidu, či peroxidu vodíku, u kterých dochází k eliminaci pomocí katalasy a glutathionperoxidasy. Dochází tak k poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin (Ichikawa et al. 2014, Vile et al. 1987).



Obr. 4 Druhý krok Haber-Weissovy reakce - Fentonova reakce (převzato z Šimůnek et al. 2009)

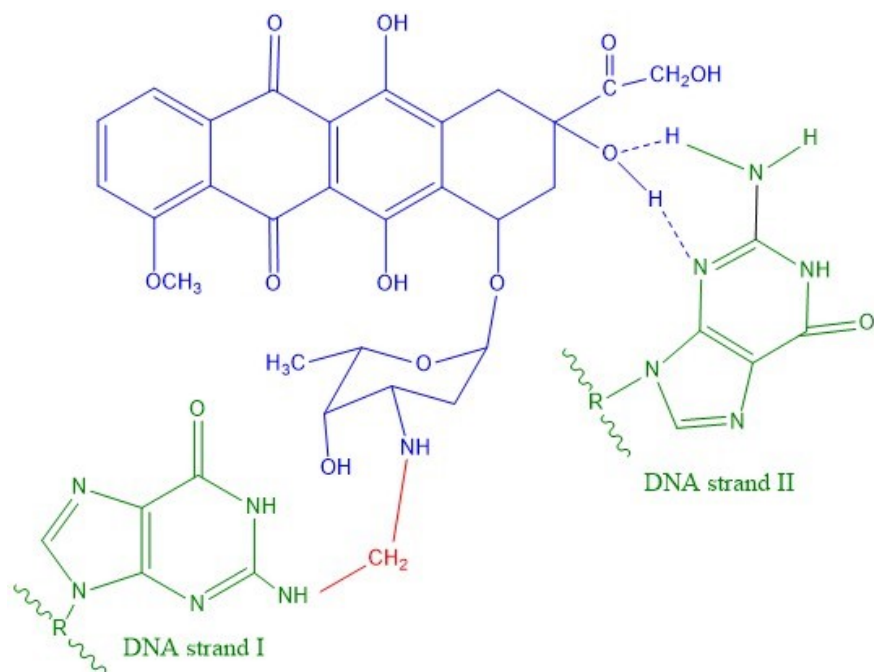
ROS jsou však spojovány nejen s cytotoxickým účinkem v protinádorové terapii, ale zejména s kardiotoxicitou. Srdeční sval je velmi silně poškozován volnými radikály, a to i z důvodu, že zde není velká koncentrace katalasy, která by kyslíkaté radikály rozkládala a snižovala tak jejich hladinu (McGowan et al. 2017).



Obr. 5 Mechanismy tvorby ROS prostřednictvím antracyklinů, kdy reakce v organismu zahrnují Fe (železo), O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (superoxidový radikál), SOD (superoxiddismutasu), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxid vodíku), OH<sup>•</sup> (hydroxylový radikál), NAD(P)<sup>+</sup> (nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)), Fp (flavoprotein), GSH/GSSG (glutathion redukovaný/oxidovaný) (převzato z Šimůnek et al. 2009)

Další z mechanismů protinádorového působení antracyklinů je schopnost v přítomnosti formaldehydu vytvářet adukty s DNA jednoduchou kovalentní vazbou. Antracykliny reagují s formaldehydem za vzniku aktivované Schiffovy báze, která je schopná tvořit vazbu N-C-N k exocyklické aminoskupině guaninu (Obr. 6). Zdroj formaldehydu může být exogenní i endogenní. Endogenně se formaldehyd tvoří v buňkách nádoru. Ovšem větší přínos má zdroj exogenní, kdy jsou dodávána proléčiva uvolňující formaldehyd, který podporuje tvorbu kovalentních DNA aduktů (Cutts et al. 2015).

Vznik takových aduktů vede k apoptóze buňky. Navíc tvorba antracyklinových aduktů vykazuje cytotoxičtější efekt, než samostatně podávané antracykliny a zároveň jsou tyto adukty v menší míře k dispozici transportéru P-glykoproteinu, který zajišťuje eflux léčiva z buněk (Cutts et al. 2005, Forrest et al. 2012).



Obr. 6 Struktura DOX (modře) vytvářející adukty s řetězcem DNA (zeleně) (převzato z Cutts et al. 2005)

Jedním z hlavních cílů antracyklinových chemoterapeutik jsou lidské DNA topoisomerasy. DNA topoisomerasy jsou enzymy, které se uplatňují v replikaci DNA, transkripci, rekombinaci a remodelaci chromatinu. Jsou schopny měnit topologický stav DNA prostřednictvím zlomů (Champoux 2001).

Katalyzují rozštěpení a následné znovu spojení fosfodiesterové vazby jednoho či obou vláken dvoušroubovice DNA. V důsledku vytvořených zlomů je tak umožněn průchod komplementárního řetězce DNA, a poté následuje již zmiňované znovu spojení vláken dvoušroubovice (Bollimpelli et al. 2017, McGowan et al. 2017).

Inhibice topoisomeras je využívána v nádorové terapii k inhibici buněčného růstu. Topoisomerasy můžeme rozdělit do dvou tříd dle struktury a mechanismu působení. Top1, neboli monomerní enzym topoisomerasa I, katalyzuje tvorbu DNA jednořetězcových zlomů. Druhý typ enzymu je Top2, dimerický enzym topoisomerasa II, který štěpí obě vlákna dvoušroubovice DNA. U savců rozeznáváme jeho dvě izoformy - Top2 $\alpha$  a Top2 $\beta$ . Top2 $\alpha$  se převážně nachází ve tkáních s vysokým zastoupením proliferujících buněk, často tedy nádorových. Top2 $\beta$  je hojněji zastoupen v klidových buňkách, jako jsou například lidské kardiomyocyty, a v rámci buněčného cyklu nedochází k jeho výrazným výkyvům v expresi. Aktivita enzymu Top2 $\alpha$  se dynamicky mění během celého buněčného

cyklu. Enzym je vysoce exprimován v S fázi a vrcholu exprese nabývá v G2-M fázi buněčného cyklu, jelikož se podílí na procesu replikace. Hraje roli při separaci helixů DNA a při segregaci chromozomů během mitotického dělení (Marinello et al. 2018).

Antracyklinová chemoterapeutika interferují s enzymem Top2 za vzniku reakčního meziprojektu, kde jsou řetězce DNA štěpeny a spojeny kovalentní vazbou s tyrosinovým zbytkem enzymu (McGowan et al. 2017).

Antracykliny tedy vytváří komplex DNA-léčivo-enzym a nachází se tak na rozhraní mezi aktivním místem enzymu a místem štěpení DNA (Binaschi et al. 2001). DOX vytváří ternární komplex Top2-DOX-DNA, který způsobuje dvojitý zlom v DNA. Po navázání DOX k Top2 $\alpha$ , komplex inhibuje replikaci DNA. Dochází k zastavení buněčného cyklu v G1/G2 fázi a indukci apoptózy maligních buněk (McGowan et al. 2017).

#### **2.1.4 Vedlejší účinky antracyklinů**

Antracykliny jsou považovány za jedny z neúčinnějších chemoterapeutických látek, ovšem jejich použití je velmi často omezeno kvůli závažným vedlejším účinkům a těmi jsou kardiotoxicita a myelosuprese (Cagel et al. 2017).

Antracykliny postihují nepříznivě srdeční sval a síla tohoto poškození se odvíjí na základě kumulativní dávky léčiva. Kumulativní dávka u DOX je 550 mg/m<sup>2</sup>. Pro EPI je tato kumulativní dávka vyšší, jelikož je oproti DOX méně toxický. Pro DAU byla stanovena maximální kumulativní dávka 550 mg/m<sup>2</sup> a u pacientů, kteří podstoupili předchozí mediastinální záření by maximální kumulativní dávka neměla překročit 450 mg/m<sup>2</sup> (Venkatesh, Kasi 2019).

Přesný mechanismus kardiotoxicity vyvolané antracykliny není zcela objasněn, pravděpodobně se jedná o vícefaktoriální působení (McGowan et al. 2017).

Jedna z hypotéz zahrnuje produkci ROS a reaktivních dusíkových radikálů (RNS), které vedou k poškození deoxyribonukleové kyseliny, k mitochondriální dysfunkci a k poruchám při syntéze proteinů. Antracykliny obsahují chinonovou skupinu, která je náchylná k redoxním reakcím a v přítomnosti cytozolických enzymů, jako je např. NADH-dehydrogenasa, vytváří semichinon přijmutím jednoho elektronu. V přítomnosti molekulárního kyslíku pak vzniká ze semichinonu superoxidový anion, který prostřednictvím superoxidodismutasy může být neutralizován na méně toxický peroxid vodíku (McGowan et al. 2017). Antracykliny mají vysokou afinitu k mitochondriím v kardiomyocytech,



respektive k části mitochondriální membrány, a to k fosfolipidu – kardioplipinu. Zde jsou antracykliny udržovány ve vyšší koncentraci, jelikož mohou pasivně vstoupit do buňky a hromadit se v intracelulární tekutině a tím narušovat přenos elektronů a zvyšovat produkci ROS. Další z důvodů kardiotoxicity se uvádí snížená koncentrace ochranných antioxidačních enzymů, jako je např. glutathionperoxidasa v srdečním svalu (Franco et al. 2011).

Druhým mechanismem kardiotoxického projevu je inhibice Top2 $\beta$ , která je v klidových neproliferujících buňkách aktivní, tudíž je aktivní v srdeční svalovině. Tato inhibice vyvolává aktivaci buněčné smrti a inhibuje mitochondriální biogenezi (Henriksen 2018).

Incidence kardiotoxicity je různá a zahrnuje v sobě frekvenci a závažnost poškození. Může se projevovat arytmiemi, myokarditidou, změnami na EKG, infarktem myokardu či chronickým srdečním selháním. Akutní kardiotoxicita se objevuje u méně než 1 % pacientů obvykle do týdne od zahájení léčby, kdy sledujeme reverzibilní změny na EKG, sinusovou tachykardii, či myoperikarditidu. Akutní kardiotoxicita není závislá na velikosti dávky a nemá význam pro vznik pozdní kardiotoxicity. Dále se pak projevuje subakutní kardiotoxicita, která se vyskytuje u 1,6–3 % pacientů do jednoho roku od podání první dávky léčiva. Mezi hlavní projevy patří snížená srdeční frakce a srdeční selhání. Po roce se často objevuje další zhoršení srdečního svalu, a to v podobě systolické dysfunkce, diastolické dysfunkce či kombinace obou. Jedná se o tzv. pozdní kardiotoxicitu (Internet 3). Klinická dekompenzace se objevuje v 2–4 % případů, subklinická strukturální změna u 9–11 % pacientů, arytmie u >12 % a nárůst biomarkerů u 30–35 % pacientů. Poprvé byl tento nežádoucí efekt léčiv projeven jako klinické městnavé srdeční selhání (CHF), kdy v závislosti na kumulativní dávce se CHF objevilo u 3 % pacientů při dávce 400 mg/m<sup>2</sup> DOX, u 7 % při 550 mg/m<sup>2</sup> a u 48 % při 700 mg/m<sup>2</sup>. Subklinická kardiotoxicita je pak definována jako klinicky asymptomatická systolická dysfunkce levé komory s poklesem ejekční frakce levé komory pod <50 % (McGowan et al. 2017).

Mezi nejvýznamnější rizikový faktor, který omezuje použití antracyklinů v důsledku zvýšené kardiotoxicity patří kumulativní dávka léčiva. Dávka DOX, která je vyšší než 500 mg/m<sup>2</sup> zvyšuje poškození srdečního svalu až pětikrát. Mezi další rizikové faktory, kdy je pravděpodobnost kardiotoxicity vyšší, patří ženské pohlaví, věk nad 65 nebo osoby mladší osmnácti let, selhávání ledvin a chlopňové vady. Zvýšení kardiotoxicity v kombinaci s antracykliny nastává také u pacientů, kteří mají mediastinum ozařované radiačním zářením, či jsou léčeni dalším chemoterapeutikem např. cyklofosfamidem nebo protilátkou trastuzumabem. Jednou z příčin může být také genetická predispozice, jako je Downův syndrom či afroamerický původ (Henriksen 2018, Krischer 1997, Internet 3).

Dle studií se u 17,5 % dětských onkologických pacientů s trisomií 21, které podstupovaly léčbu antracykliny, objevila klinicky symptomatická kardiomyopatie (Quiñones-Lombrañ et al. 2014).

Další mechanismus projevů kardiotoxicity je biotransformace DAU či DOX na primární alkohol daunorubicinol respektive doxorubicinol, který se přednostně kumuluje v srdci. Redukce antracyklinů na jejich primární alkoholové metabolity je zprostředkována pomocí karbonylredukujících enzymů. Doxorubicinol je mnohem účinnější než DOX při inhibici  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-dependentní pumpy v srdečním svalu. Inhibice uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula na srdci zapříčiňuje kardiotoxicitu.  $\text{Ca}^{2+}$  je důležitý pro kontraktilitu myokardu, a zároveň srdeční tkáň je vysoce citlivá na změny spjaté s nerovnováhou vápenatých iontů (Olson et al. 1988, Schaupp et al. 2015).

Myelosuprese neboli útlum krvetvorné kostní dřeně, je další z projevů toxicity antracyklinů. Konkrétně u DOX se setkáváme s myelosupresí více jak u 10 % pacientů (Internet 4).

Po pěti až deseti dnech od podání antracyklinů se mohou objevit gastrointestinální poruchy, kdy je nejčastějším projevem nauzea, diarrhoea, vomitus, zánět dutiny ústní a zánět konečníku (Internet 4).

### **2.1.5 Kardioprotekce**

Riziko kardiotoxicity je po podání antracyklinů nejzávažnějším nedostatkem klinického využití (Angsutararux et al. 2015). Snaha předcházet těmto nežádoucím účinkům na srdeční tkáň vedla k vyvinutí různých postupů v terapii antracykliny (Internet 3).

Kardioprotektivní účinek byl potvrzen u kontinuálního podání antracyklinů infuzí namísto bolusové dávky injekčně. Tímto způsobem, se sníží nejvyšší koncentrace léčiva v krvi, ovšem terapeutický účinek je zachován. Tento způsob kardioprotekce ovšem nebyl prokázán u dětí (Internet 3).

Kardiotoxicita antracyklinů byla snížena pomocí úpravy léčiva, kdy molekula antracyklinu byla obalena vrstvou lipozomu, což je obdoba biologických membrán, a tudíž je pro tělo přirozená. Proběhla studie, ve které byl zkoumán lipozomální DOX pegylovaný a nepegylovaný. Pegylovaný DOX obsahuje hydrofóbní obal tvořený polyethylenglykolem. Díky této vrstvě je prodloužen poločas léku v krvi a je zpomalena clearance. Lipozomy obsahující léčivo lépe pronikají skrze propustnější kapiláry do nádorové tkáně a méně pronikají

skrze pevné spoje kardiomyocytů, čímž je snížen kardiotoxický účinek antracyklinů (Petráková 2011).

Další ze způsobu kardioprotekce je látka dexrazoxan. Jedná se o chelatační činidlo, které je silnější než DOX. Dexrazoxan váže železo z komplexu DOX-železo, čímž zabraňuje poškození srdeční tkáně, které by bylo způsobeno tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů komplexem antracyklin-železo. Objev tohoto kardioprotektiva umožňuje použití antracyklinů i u pacientů, kteří již mají srdeční komplikace, věk nad 65 let, předchozí radioterapii mediastina, či hypertenzi. Tito pacienti mohou dostávat stejnou kumulativní dávku antracyklinů, jako pacienti bez rizikových faktorů (Hellmann 1999). V pediatrii se dexrazoxan nevyužívá z důvodu možného vzniku myelodysplastického syndromu nebo akutní myeloidní leukémie (Tebii et al. 2007).

V rámci prevence poškození srdeční tkáně byly prováděny studie s vitamíny a dalšími antioxidačními činidly. Vitamín E (tokoferol), vitamín A (retinol) a vitamín C (kyselina askorbová) se jeví jako látky s antioxidačním působením. Studie na zvířatech prokázaly jistou kardioprotekci na zvířatech po užívání antracyklinu se současnou suplementací vitamíny (Internet 3).

### **2.1.6 Buněčná rezistence na antracykliny**

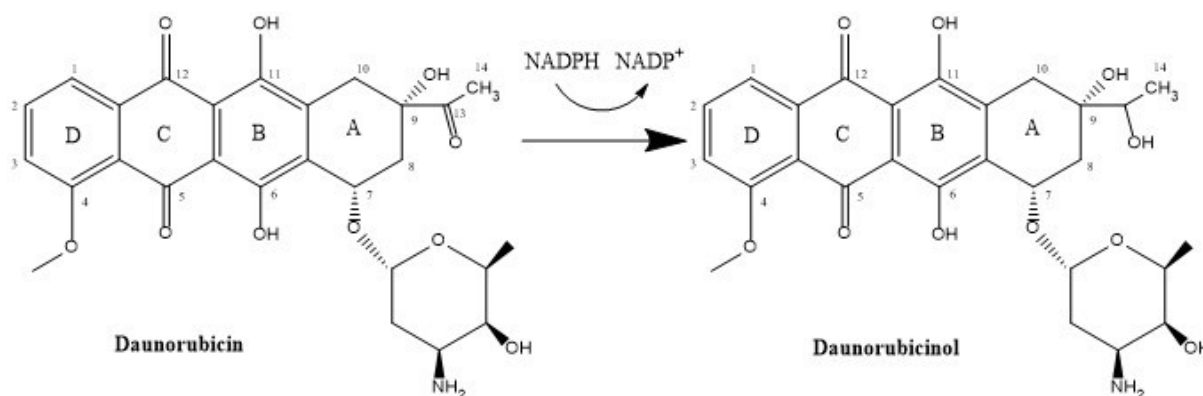
Velmi častou příčinou neúspěšné léčby antracykliny je rozvoj rezistence. Rezistence v nádorových buňkách na antracyklinová chemoterapeutika je multifaktoriální. Tato odolnost na léčiva může být primární neboli vrozená, kdy počáteční terapie je bez efektu. Druhý typ je rezistence získaná, kdy odpověď na léčbu byla již zcela prokázána nebo je alespoň částečná (Nielsen et al. 1996, Perez 2009).

Mezi hlavní mechanismus vzniku rezistence na léčivo je přítomnost P-glykoproteinu (PgP) v plazmatické membráně, respektive jeho nadměrná exprese. PgP je produktem MDR1 genu (multidrug-resistant) a při nadměrné expresi tohoto genu dochází k odstranění antracyklinů z nádorových buněk. Byla zkoumána celá řada inhibitorů PgP, ovšem většina klinických studií selhala (Nielsen et al. 1996, Callaghan et al. 2014). Hlavní cíl antracyklinů je buněčná membrána nádoru. Pro překonání rezistence v terapii DOX byl zkoumán verapamil, což je antagonist vápníku. Verapamil způsobuje v buněčné membráně inhibici pomalého vápníkového kanálu L-typu a může tak zvýšit vylučování DOX buňkou (Internet 4).

Další ze způsobu vzniku rezistence na antracykliny může být změna v intracelulární distribuci léčiva, často se jedná o kombinaci s rezistencí způsobenou PgP (Nielsen et al. 1996).

Rezistence na antracykliny může souviset také s DNA-topoizomerasou II. Antracykliny jsou inhibitory tohoto enzymu, a změny v tomto enzymu či jeho nadměrná exprese může tedy rezistenci vyvolat (Nielsen et al. 1996).

Hlavní metabolickou cestou antracyklinů je dvouelektronová redukce karbonylové funkční skupiny za vzniku sekundárního alkoholu (Obr. 7). Tato přeměna je zprostředkována cytozolickými NADPH-dependentními karbonylredukujícími enzymy, zejména aldo-ketoreduktasami (AKR) a karbonylreduktasami (CBR). Byly provedeny studie u DOX, respektive doxorubicinolu, které dokazují, že cytotoxická účinnost je u doxorubicinolu výrazně snižena, snižena je i vazebná aktivita k DNA, a naopak je silně podpořena toxicita na srdeční tkáň. V nádorových buňkách je často změněná exprese NADPH-dependentních karbonylredukujících enzymů, což může mít za následek další rozvoj rezistence (Heibein et al. 2012).

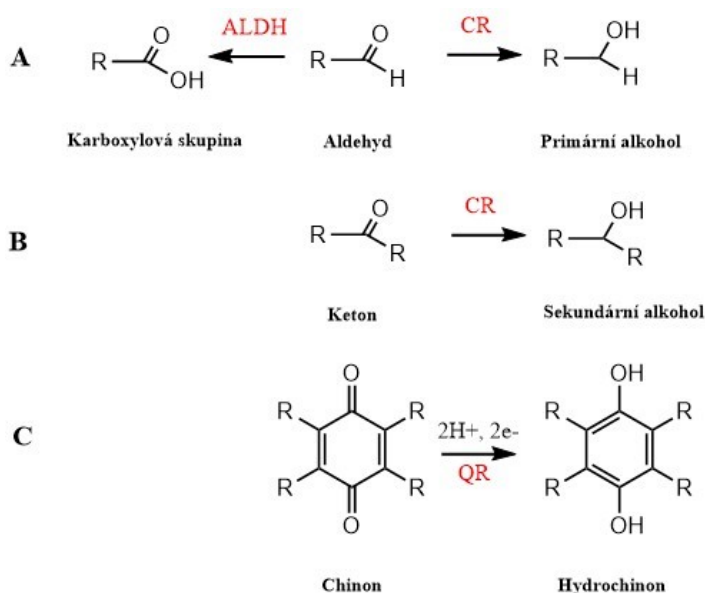


Obr. 7 Schéma redukce daunorubicinu na primární metabolit daunorubicinol (převzaté z Ax, Soldan et al. 2000)

## 2.2 Karbonylredukující enzymy

Karbonylové sloučeniny mají ve své molekule C=O skupinu (oxoskupina, karbonylová skupina), která je v závislosti na formaci schopna podléhat buď oxidaci nebo redukci (Obr. 8). Mezi karbonylové sloučeniny patří aldehydy, ketony a chinony. Karbonylové sloučeniny jsou velmi reaktivní sloučeniny, v organismu reagují s nukleofilními centry proteinů a nukleových

kyselin a mohou působit toxicky. Ketony mají na oxoskupinu navázány dva uhlíkaté zbytky a mají omezené redukční vlastnosti, kdy dochází k oxidaci pouze po použití velmi silných oxidačních činidel, a přitom dojde ke štěpení uhlíkatého řetězce. Biotransformace ketonů prostřednictvím redukce se děje jen zřídka, a vznikají tak sekundární alkoholy. Oproti tomu aldehydy jsou ochotnými akceptory elektronů, kdy po přijmutí elektronu dojde k oxidaci karbonylové skupiny na skupinu karboxylovou. Aldehydy mají jednu valenci obsazenou uhlíkatým zbytkem a druhou vodíkem. Díky přítomnosti dvojné vazby, je karbonylová skupina schopna vstoupit do redukční reakce za vzniku primárního alkoholu. Chinony jsou cyklické diketony s konjugovanými vazbami, často se jedná o barevné sloučeniny. Meziprodukt jednoelektronové redukce chinonů je semichinonový radikál, který se dále může redukovat na hydrochinon a při této metabolické cestě vznikají reaktivní kyslíkaté sloučeniny, které jsou vysoce toxické k buňkám (Matsunaga et al. 2006).



Obr. 8 Přeměny karbonylových sloučenin v lidském organismu (převzato z Opperman 2007). ALDH (aldehyddehydrogenasy), CR (karbonylredukuující enzymy), QR (chinonreduktasy).

Metabolismus prostřednictvím karbonylredukuujících enzymů probíhá jak u endogenních látek, jako jsou např. glukóza, kyselina arachidonová či steroidní hormony, ale také u významného množství xenobiotik, kam se řadí antracykliny, ale také warfarin, haloperidol, oracin, či fenofibrát. Karbonylredukuující enzymy jsou enzymy pro 1. fázi metabolismu xenobiotik. Metabolity, které vzniknou, jsou polárnější sloučeniny, než byly

původně, čímž jsou dostupnějším substrátem pro konjugací enzymy druhé fáze biotransformace, a jsou tak snadněji vylučovány ven z těla. Na druhou stranu, tyto enzymy jsou schopny redukovat např. daunorubicin na kardiotoxičtější daunorubicinol, který má navíc slabší cytotoxické účinky (Rosemond et al. 2004).

Karbonylredukující enzymy lze rozdělit do několika nadrodin; aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým (SDR) a se středně dlouhým řetězcem (MDR) a chinonreduktasy (QR). Tyto enzymy mohou být jak cytozolické, tak i membránově vázány (Matsunaga et al. 2006).

Karbonylredukující enzymy se nachází v různých částech lidského těla, především pak v plicích, krvi, játrech, ledvinách, srdci a mozku (Rosemond, Walsh 2004).

### **2.2.1 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem**

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) patří mezi jednu z největších nadrodin enzymů, která čítá více jak 46 000 členů. Členové této nadrodiny enzymů mají velkou rozlišnost, co se týče párové sekvenční identity, na druhou stranu spolu často sdílí strukturální vlastnosti. Jedná se o jednu z nejstarších nadrodin enzymů, které se vyskytují ve velkém množství zkoumaných struktur a u lidí bylo objeveno více než 80 genů SDR (Persson et al. 2009, Bhatia et al. 2015).

Enzymy SDR vystupují jako NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy, kdy většina z nich jsou dimery a tetramery. Členové SDR vykazují rozsáhlou divergenci, kdy pouze asi 15–30 % enzymů má párovou sekvenční identitu (Jörnvall et al. 1995). Společným strukturním znakem je  $\alpha/\beta$  skládací vzor, jehož charakteristikou je centrální  $\beta$ -list, který je typický pro Rossmannův sklad, což je vazebné místo pro nukleotidový kofaktor (Persson et al. 2009). Dalším společným znakem je aktivní místo, které je často složeno z tetrády Asn-Ser-Tyr-Lys (Kavanagh et al. 2008).

Dle studií SDR zaujímají 26 % ze všech nalezených dehydrogenas (Kallberg 2006).

SDR enzymy se zapojují do metabolismu aminokyselin, retinoidů, lipidů a steroidních hormonů, a také některé z nich hrají klíčovou roli při kontrole metabolických drah. Karcinogeny z tabáku nebo fenanthrenchinon z nafty představují také substráty některých karbonylreduktas. Důležitým substrátem pro SDR jsou také xenobiotika, např. warfarin, daunorubicin nebo ketoprofen, která prostřednictvím SDR podléhají biotransformaci (Bhatia et al. 2015, Kallberg et al. 2002, Pilka et al. 2009).

Lokalizace SDR enzymů je v subcelulárních kompartmentech, tedy v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích nebo peroxisomech, či se vyskytují v cytosolu (Filling et al. 2001).

V rámci nadrodiny SDR rozeznáváme 7 typů označovaných A (atypical), C (classical), D (divergent), E (extended), I (intermediate), X (complex) a U (unassigned). Každý z těchto SDR má charakteristické specifické sekvence v aktivním místě a v místě, kam se váže kofaktor (Persson et al. 2008).

### ***Karbonylreduktasa 1 (CBR1)***

Karbonylreduktasa 1 (CBR1) se skládá se pouze z jednoho polypeptidového řetězce a její molekulová hmotnost činí 30 000 Da. CBR1 je cytosolický enzym vyskytující se převážně v játrech, ledvinách, ale také v mozku. Jedná se o NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasu, která má velmi širokou specifitu. Katalyzuje biologicky a farmakologicky aktivní karbonylové sloučeniny, mezi které řadíme chinony, prostaglandiny třídy E a A, a také různá xenobiotika (Wermuth 1981).

Chinony patří mezi jedny z nejdůležitějších substrátů enzymu CBR1, řadí se zde p-chinony i o-chinony. O-chinony jsou substráty odvozené od polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), které se podílejí na znečištění životního prostředí. Jedná se totiž o vyfukované plyny pocházející z nafty, např. fenanthrenchinon. Mezi endogenní chinony, které pro svůj metabolismus využívají CBR1 řadíme např. vitamín K<sub>3</sub> (menadion), koenzym Q (ubichinon), který je součástí dýchacího řetězce nebo dále antioxidant vitamín E ( tokoferolchinon) (Pilka et al. 2009).

CBR1 katalyzuje redukci velkého množství xenobiotik, kdy zasahuje do metabolismu I. fáze. Mezi substráty CBR1 patří významná léčiva, jde např. o antracykliny, nesteroidní protizánětlivé léčivo nabumeton nebo bupropion, který se dnes využívá při odvykání kouření či léčbě deprese (Skarydova et al. 2013, Skarydova et al. 2014). Proto byly zkoumány inhibitory CBR1 a dnes je např. kombinovaná terapie DOX s inhibitorem CBR1, konkrétně pak OH-PP-Me (3-(7-isopropyl-4-(methylamino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5yl) phenol), využívána v praxi v léčbě nádorového onemocnění prsu (Jo et al. 2017).

CBR1 má také významnou roli v metabolismu glukokortikoidů. Byla provedena studie u obézních lidí, při které byla zjištěna vysoká hodnota 20β-dihydrokortizolu, což je metabolit glukokortikoidu kortizolu a je vylučován močí. Metabolismus kortizolu na metabolit

20 $\beta$ -dihydrokortizol je zprostředkován NADPH-dependentní katalýzou pomocí CBR1. Zvýšená hodnota kortizolu v tukové tkáni u obézních jedinců, a také vysoké hodnoty metabolitu kortizolu v moči, vedly ke zkoumání inhibitorů CBR1 a ke snaze snížit metabolické důsledky glukokortikoidů, jako je Cushingův syndrom či hypertenze (Morgan et al. 2017).

CBR1 se účastní ochrany  $\beta$ -buněk pankreatu před oxidačním stresem, kdy dochází k deaktivaci lipidových aldehydů, které jsou velmi aktivní a pro pankreas škodlivé (Rashid et al. 2010).

### ***Karbonylreduktasa 3 (CBR3)***

Karbonylreduktasa 3 (CBR3) patří do rodiny SDR a s CBR1 má přibližně 71% sekvenční identitu. Jedná se o cytosolický monomerní enzym. Oproti CBR1 má enzym CBR3 užší substrátovou specifitu (Pilka et al. 2009, Cheng et al. 2012).

Výskyt enzymu CBR3 je v různých tkáních včetně jater, ledvin, srdce, plic a mozku. CBR1 a CBR3 geny jsou lokalizovány na chromozomu 21 a vzdálenost mezi nimi je 62 kb (Cheng et al. 2012).

Ve studiích byla zjištěna významná afinita CBR3 k substrátu 1, 2-naftochinonu, isatinu a acethexamidu. Rovněž také k cytostatiku oracinu, ovšem aktivita enzymu je zde nižší ve srovnání s CBR1. Další z rozdílů je ten, že CBR3 nevykazuje žádnou aktivitu vůči endogenním lipidovým mediátorům – prostaglandinům, či 4-oxonon-2-enalu, což je vysoce reaktivní produkt oxidace lipidů, který vzniká při oxidačním stresu (Pilka et al. 2009).

### **2.2.2 Aldo-ketoreduktasy**

Nadrodina aldo-ketoreduktas (AKR), která pro katalýzu využívá kofaktor NAD(P)H, umožňuje redukci ketonů a aldehydů na primární a sekundární alkoholy (Chen et al. 2012).

Je známo 16 rodin AKR enzymů, z čehož existuje více než 100 členů. Aldo-ketoreduktasy jsou přítomny jak v eukaryotech, tak v prokaryotech. Je známo 15 lidských AKR, a ty spadají do rodin AKR1, AKR6 a AKR7 (Chen et al. 2012, Penning 2015).

Název enzymu se skládá ze symbolu „AKR“ pro aldo-ketoreduktasy, arabská číslice symbolizuje rodinu, dále je pak značena podrodina písmenem a jedinečná proteinová sekvence je označena arabskou číslicí (Internet 5).



Tyto proteiny mají společný proteinový záhyb tzv.  $(\alpha/\beta)_8$  barelovou strukturu, která je nutná pro vazbu s karbonylovým substrátem. Aktivní místo AKR určující substrátovou specifitu se nachází na C-terminální straně. Molekulová hmotnost se pohybuje okolo 34–37 kDa. Podobnost členů AKR enzymů je u rodin více než 40% a u podrodin pak více než 60%. Členové rodiny AKR6 tvoří tetramery, AKR1 jsou monomerní a enzymy AKR7 mají dimerní strukturu (Barski et al. 2008, Chen et al. 2012, Penning 2015).

Mechanismus katalytické reakce AKR lze definovat do dvou kroků. Karbonylový substrát přijímá hydridový ion z NAD(P)H a poté je z rozpouštědla využit proton pro redukcí karbonylu na alkohol. Tyto dva kroky probíhají buď krok za krokem anebo společně (Barski et al. 2008, Penning 2015).

### ***Aldehydreduktasa (AKR1A1)***

AKR1A1 je jeden z prvních objevených enzymů AKR. K expresi AKR1A1 dochází ve všech tkáních, ovšem nejvyšších hladin dosahuje v proximálních tubulech ledvin (Barski et al. 2008).

Tento enzym hraje klíčovou roli v biosyntéze kyseliny askorbové (vit. C) u hlodavců. AKR1A1 má velmi širokou substrátovou specifitu. Tento protein dává přednost hlavně negativně nabitým sloučeninám, které obsahují karboxylovou skupinu, ovšem i steroidní a aromatické aldehydy, či 3-uhlíkaté aldehydy jsou redukovány s vysokou afinitou (Barski et al. 2008).

Mutace genu AKR1A1 je spojována s non-Hodgkinovým lymfomem (Lan et al. 2007).

V ledvinách hraje tento enzym důležitou katabolickou roli při přeměně myoinositolu. První enzym katabolické reakce je inozitoloxigenasa, která katalyzuje přeměnu myoinositolu na D-glukuronát, a ten je v dalším kroku přeměněn na L-gulonát prostřednictvím katalýzy enzymem AKR1A1 (Barski et al. 2008).

### ***Aldózareduktasa (AKR1B1)***

AKR1B1, znám jako aldózareduktasa, je exprimován ve všech tkáních, převážně pak v buňkách čočky a sítnice (Murata et al. 2001).

Tento enzym patří mezi nejprostudovanější AKR, jelikož bylo zjištěno, že se podílí na hyperglykemickém poškození a je spojen se sekundárními diabetickými komplikacemi,

jako je diabetická neuropatie či retinopatie. AKR1B1 katalyzuje redukci glukózy na cukerný alkohol sorbitol v polyolové dráze metabolismu glukózy během hyperglykémie. Poškození, které je způsobeno enzymem AKR1B1, je spojováno se zánětlivými procesy. Při inhibici AKR1B1 dochází ke snížení poškození vlivem zánětlivých cytokinů např. TNF- $\alpha$  (Barski et al. 2008)

### ***Aldózareduktasa tenkého střeva (AKR1B10)***

AKR1B10 je enzym exprimován ve velké míře v tenkém a tlustém střevě a v nadledvinách. Jde o monomer, jehož sekvence je ze 71 % aminokyselin identická s AKR1B1, proto tento protein vykazuje podobnou substrátovou i inhibiční specifitu (Barski et al. 2008).

Výskyt enzymu v nadledvinách je spojen s metabolismem steroidů. Ve střevě má funkci detoxikace aldehydů přijatých potravou (Chung et al. 2012).

Při zvýšené expresi AKR1B10 dochází k potlačení syntézy kyseliny retinové, která je důležitou součástí pro expresi genů, či má význam pro proliferaci a diferenciaci buněk. V organismu dochází k oxidaci retinolu na retinaldehyd. V opačném směru pak AKR1B10 katalyzuje přeměnu retinaldehydu zpět na retinol, a současně tak dochází k potlačení vzniku kyseliny retinové, což je velmi důležitý antineoplastický metabolit (Chung et al. 2012).

Tento protein je silně exprimován v nádorech plic a jater. Nadměrná exprese tohoto enzymu byla pozorována u karcinomů spojených s kouřením, např. u nádorového onemocnění plic. Tento enzym tedy vykazuje silnou katalytickou aktivitu v cigaretovém kouři s aldehydy např. s akroleinem (Barski et al. 2008).

### ***Hydroxysteroiddehydrogenasy (AKR1C1–C4)***

Členové rodiny enzymů AKR1C jsou NAD(P)H-dependentní enzymy a více jak z 86 % jsou tvořeny stejnými aminokyselinovými sekvencemi, kdy např. AKR1C1 a AKR1C2 se od sebe odlišují pouze sedmi aminokyselinovými zbytky (Jez et al. 1997).

Enzymy AKR1C působí také jako 3-, 17- a 20-ketosteroidreduktasy. Zapojují se do metabolismu jak přírodních, tak i syntetických steroidů a prostaglandinů. Enzymy AKR1C jsou exprimovány v různých typech tkání, ovšem nejvyšší exprese dosahují v játrech, kde se účastní metabolismu a syntézy steroidních hormonů (Zeng et al. 2017).

AKR1C jsou schopny katalyzovat  $\text{NADP}^+$  oxidaci trans-dihydrodiolů aromatických uhlovodíků a podílejí se tak na tvorbě katecholů (Barski et al. 2008).

### **AKR1C1**

AKR1C1 je cytosolický enzym, který se účastní metabolismu progesteronu, což je hormon důležitý k udržení a podpoře těhotenství. Zvýšená exprese AKR1C1 je spojována s předčasným ukončením těhotenství a nádorovým onemocněním endometria. Progesteron je prostřednictvím AKR1C1 přeměněn na svůj inaktivní metabolit  $20\alpha$ -DHP ( $20\alpha$ -dihydroprogesteron), přičemž snížená hladina progesteronu ve vaječnicích a děloze zahajuje porod a ukončuje těhotenství (Dhagat et al. 2007, Barski et al. 2008).

Naopak snížená exprese AKR1C1 byla zjištěna u karcinomu prsu (Lewis et al. 2004).

Byla popsána rezistence na chemoterapeutikum cisplatinu v důsledku nadměrné exprese AKR1C1 v buněčné linii lidského nádorového onemocnění vaječníku (Deng et al. 2002).

AKR1C1 je exprimována také v mozku a podílí se na neurologických a psychiatrických stavech (Dhagat et al. 2007).

V souvislosti s karcinomem prostaty, který je rezistentní na kastraci (CRPC), je spojován AKR1C1 a jeho nadměrnou proandrogenní aktivitou (Hofland et al. 2010).

### **AKR1C2**

AKR1C2 je kromě jaterních buněk exprimován také v prostatě a v mléčné žláze. AKR1C2 hraje roli v syntéze a transportu žlučových kyselin. Tak jako AKR1C1, i AKR1C2 přispívá k rozvoji CRPC (Hofland et al. 2010, Penning et al. 2004).

Snížená exprese AKR1C2 byla zjištěna u karcinomu prsu. Progesteron je prostřednictvím AKR1C2 přeměněn na svůj inaktivní metabolit  $3\alpha$ -HP ( $3\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-20-on), kdy tento metabolit potlačuje buněčnou proliferaci, vede k adhezi molekul, antiproliferaci a apoptóze buněk (Lewis et al. 2004).

### **AKR1C3**

AKR1C3 je exprimován játry, ve větší míře pak prostatou a mléčnou žlázou (Zeng et al. 2017).

Enzym AKR1C3 katalyzuje redukci prostaglandinů  $\text{PGD}_2$  na  $9\alpha$ ,  $11\beta$ - $\text{PGF}_{2\alpha}$  a  $\text{PGH}_2$  na  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , proto je známý jako protein PGF-syntasa. Dále se podílí na katalýze estrogenu na  $17\beta$ -estradiol, 4-androsten-3,17-dionu na testosteron a inaktivaci progesteronu na  $20\alpha$ -hydroxyprogesteron (Zeng et al. 2017, Penning et al. 2004).

AKR1C3 je nadměrně exprimován u karcinomu prostaty a je spojován s vývojem nádorového onemocnění prostaty, respektive s CRPC (Tian et al. 2014).

AKR1C3 je hojně exprimován v prsní tkáni nádorového bujení. Tento enzym je schopen redukovat androgenní prekurzory a estrogen na testosteron a  $17\beta$ -estradiol, což vede k tvorbě účinnějších hormonů a aktivaci jaderných receptorů a tím k progresi nádoru (Zeng et al. 2017). AKR1C3 je pojen také s rezistencí na DOX u karcinomu prsní tkáně (Zhong et al. 2015).

Zvýšená exprese enzymu AKR1C3 je pozorována u nádorového onemocnění endometria a děložního čípku (Rižner 2012).

Bylo identifikováno velké množství inhibitorů AKR1C. AKR1C3 může být inhibována kyselinou skořicovou, nesteroidními antiflogistiky (NSAID), kyselinou benzoovou, flavonoidy a dalšími. Nyní je ve fázi klinického testování inhibitor enzymu AKR1C3 indomethacin 6-medroxyprogesteron acetát, který je zkoumán u pacientů s nádorovým onemocněním prsu či akutní myeloidní leukémií (Zeng et al. 2017).

#### **AKR1C4**

AKR1C4 je v největší míře exprimován v játrech, v malém množství byl nalezen také v plicích (Deyashiki et al. 1994, Penning et al. 2004).

AKR1C4 je schopný oxidace testosteronu na 4-androsten-3,17-dion, dále pak oxidace  $17\beta$ -estradiolu na estron a  $20\alpha$ -hydroxyprogesteronu na progesteron (Penning et al. 2000).

Mezi xenobiotika, která metabolizuje AKR1C4, patří protinádorové léčivo oracin. AKR1C4 inaktivuje oracin na dihydrooracin, respektive jeho stereospecifický izomer (+)-dihydrooracin (Wsol et al. 2007).

#### ***Aflatoxinreduktasa (AKR7A2)***

Enzym AKR7A2 známý jako aflatoxinreduktasa se vyskytuje např. v játrech, ledvinách, srdci, mozku (Li et al. 2016).

Rozdílnost oproti monomerním enzymům AKR1 je taková, že AKR7 se vyskytují jako funkční dimery (Barski et al. 2008).

Jedna z hlavních rolí enzymu AKR7A2 je detoxikace lidského organismu, kdy je tento enzym aktivní vůči aldehydům, které vznikají při peroxidaci lipidů, což souvisí se vznikem oxidačního stresu a poškození lidských buněk. AKR7A2 je schopna chránit buňky

před oxidačním stresem, který vzniká v důsledku jak exogenních, tak endogenních aldehydů, které jsou pro organismus cytotoxické (Li et al. 2012).

Pomocí katalýzy enzymem AKR7A2, který je hojně exprimován v srdci, při nádorové terapii antracyklinem DAU, vzniká kardiotoxický metabolit daunorubicinol. Také byl zkoumán vliv methylace DNA na expresi lidského enzymu AKR7A2 a bylo zjištěno, že methylace ovlivňuje expresi AKR7A2, tak i syntézu kardiotoxického daunorubicinolu (Hoefler et al. 2016).

Dle klinických studií bylo zjištěno, že AKR7A2 se vyskytuje ve vyšší míře u pacientů s neurodegenerativním onemocněním, jako je Alzheimerova choroba. V CNS, konkrétně pak v gliových buňkách, astrocytech a mikroglíích, má AKR7A2 funkci sukcinát-semialdehydoreduktasy. AKR7A2 se podílí na metabolismu sukcinátsemialdehydu, což je metabolický produkt GABA, na neuromodulátor gama-hydroxybutyrát (GBH) (Picklo et al. 2001).

AKR7A2 vykazuje hepatoprotektivní aktivitu, v důsledku katalýzy redukční reakce dialdehydového metabolitu alfatoxinu B1, který je hepatotoxický, na jeho odpovídající méně toxický dialkohol (Ireland et al. 1998).

## 2.3 PROTEINKINASY

Proteinkinasy představují enzymy, nacházející se v cytoplazmě buňky, které katalyzují fosforylaci proteinu, tedy vazbu fosfátové skupiny na aminokyselinové zbytky v proteinech. Reakce probíhá tak, že se přenáší z konce ATP fosforylová skupina ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) na proteinový substrát a tím vznikne ADP a dojde tak k funkční změně cílového proteinu (Obr. 9). Jedná se o jednu z nejčastějších posttranslačních modifikací proteinu, kdy dochází k stechiometricky kovalentní modifikaci (Girault et al. 2017, Hamilton et al. 1998).

Proteinkinasy se účastní mnoha signalizačních drah v buňce, mezi které patří proliferace, genová exprese, transport přes membránu, motilita, metabolismus či apoptóza. Fosforylaci či defosforylaci může docházet jak k aktivaci, tak i k inaktivaci cílových proteinů (Hanks 2003).

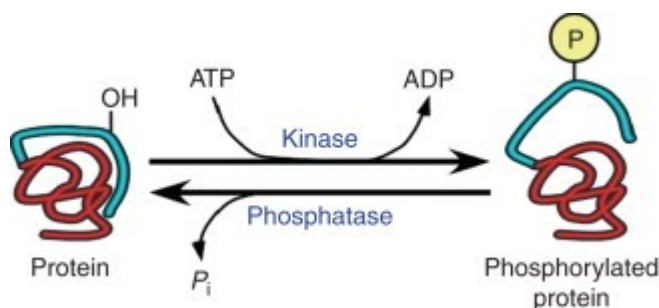
V lidském genomu je identifikováno více než 500 genů kódující proteinkinasy, což čítá asi 2 % ze všech lidských genů (Manning et al. 2002).

Všechny eukaryotické proteinkinasy sdílejí konzervované katalytické jádro a rovněž pak můžeme v katalytické doméně najít řadu konzervovaných oblastí. N-terminální

konec katalytické domény obsahuje glycinové zbytky a vyskytuje se v blízkosti aminokyseliny lysinu, který se účastní vazby ATP. Pro katalytickou aktivitu enzymu, je velmi důležitá kyselina asparágová, která se nachází ve střední části katalytické domény (Knighton et al. 1991).

V buňce hrají proteinkinasy různé role. Dle fosforylovaného substrátu, respektive aminokyselinového zbytku, který je fosforylován, můžeme proteinkinasy rozdělit do tří nejčastějších skupin – tyrosinkinasy, serinkinasy a threoninkinasy. Asi 1/5 proteinkinasy je specifická pro tyrosinové zbytky a zbývající 4/5 fosforylují threoninové či serinové zbytky. Některé proteinkinasy jsou schopny tzv. dvojité specifity, což znamená, že mají schopnost stejně dobře fosforylovat jak serinový, tak threoninový zbytek, a jsou často označovány jako serin/threonin kinasy. Histidinkinasy, lysinkinasy a argininkinasy se vyskytují méně často (Girault et al. 2017, Maltthews 1995).

Regulace proteinkinasy v buňce probíhá několika různými mechanismy. Prvním mechanismem regulace je fosforylační kaskáda, kdy proteinkinasa je fosforylována na své katalytické doméně, přesněji na její konzervované (aktivní) smyčce. Tím se spustí fosforylační kaskáda, kdy daná aktivovaná proteinkinasa fosforyluje a tím aktivuje další proteinkinasy a tato akce se může opakovat několikrát, což hraje důležitou roli v zesilování signálu. Druhý regulační mechanismus je spojen s doménami, které specificky interagují buď způsobem konstitutivním nebo regulovaným s proteiny či buněčnými složkami. Proteinkinasa je začleněna do buněčného jádra nebo plazmatické membrány, přičemž spojovací domény pak interagují s vybranými substráty. Třetí regulační mechanismus je spjat s regulační doménou a kinasovou doménou. Blok aktivity katalytické domény prostřednictvím domény regulační směřuje k tomu, že je enzym aktivován vazbou ligandu na doménu regulační, to změní jeho konformaci a uvolní inhibiční účinek domény regulační (Girault et al. 2017).



Obr. 9 Schéma fosforylace proteinu prostřednictvím proteinkinasy (Weber 2010)

### 2.3.1 Inhibice proteinkinas

Inhibitory proteinkinas představují stále významnější roli v terapii nádorových onemocnění a dalších chorob. Řada léčiv, cílících na kinasy, je v dnešní době již schválena v protinádorové léčbě a další z nich jsou ve fázi klinického testování (Gross et al. 2015).

Přibližně 50 % proteinů v lidském těle podléhá fosforylaci, což je jedna z nejčastějších posttranslačních modifikací. Při nadměrné expresi a abnormální aktivaci kinas může jít buď o hnací motor nemoci, tzv. prekancerózní stav či přímo vyvolávat nádorové onemocnění. Kinasové signální dráhy jsou hlavní řídicí jednotkou různých fenotypů nádorů, podílí se na proliferaci, pohyblivosti, metabolismu, neokapilarizaci i potlačování protinádorové imunitní odpovědi. V důsledku této problematiky, byla vyvinuta řada inhibitorů proteinkinas a na velké části z nich se ještě pracuje (Gross et al. 2015).

Inhibitory proteinkinas soutěží s ATP o vazebné místo, tím snižují fosforylaci kinas a v důsledku toho inhibují proliferaci buněk kancerogenních (Jiao et al. 2018).

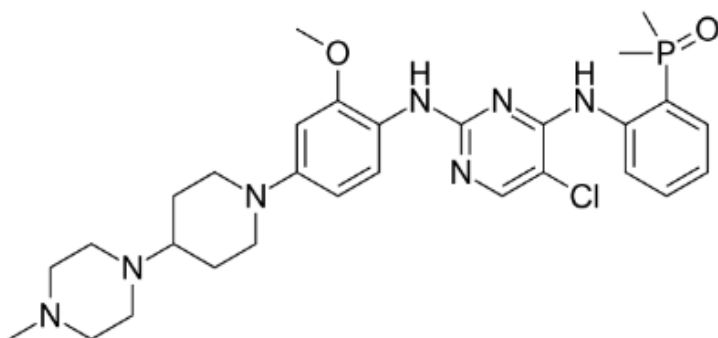
V současné době je k inhibitorům proteinkinas, jakožto k potenciálním protinádorovým léčivům, přistupováno ze 4 úhlů pohledu. Za prvé díky pokročilejším technologiím hloubkového sekvenování a pokrokové genomice se snažíme objevit nové významné kinasy. Nejčastějším mechanismem aktivace kinas jsou bodové mutace, které vedou k abnormální onkogenní aktivaci kinas a dysregulaci systému. V důsledku rezistence na inhibitory kinas je snaha objevit selektivní a silnější inhibitory kinas. Studie ukázaly, že rezistence na inhibitory kinas se může vyskytnout z několika důvodů. Jedním z problémů může být rezistence na cíl v důsledku mutací nebo změněného sestříhu cílové kinas. Další z mechanismů rezistence by mohla být „překážka“ na cestě, a to vlivem aktivace downstream komponentů nebo přerušení smyček negativní zpětné vazby (Gross et al. 2015).

Druhý z možných mechanismů rezistence na léčivo se jeví modifikace fenotypu buňky prostřednictvím histologické transformace či modulace procesů v buňce, které mají vliv na transport, distribuci a stabilitu léčiva (Gross et al. 2015).

Za třetí se vědci zaměřují na synergismus inhibitorů, tedy hledají kombinovanou terapii k potlačení rezistence na léčivo a ke zlepšení protinádorového účinku (Gross et al. 2015).

Za čtvrté je pak snaha nalézt nové cíle kinas při regulaci imunitní odpovědi a mikroprostředí nádoru (Gross et al. 2015).

### 2.3.1.1 Brigatinib



Obr. 10 Brigatinib (převzato z Internet 6)

Brigatinib (AP26113; Obr. 10) je tyrosinkinasový inhibitor anaplastické lymfomové kinasy (ALK) druhé generace. Dále byla také prokázána jeho účinnost u nádorových buněk s mutacemi epidermálního růstového faktoru (EGFR) (Wei-Sheng et al. 2016, Internet 6).

ALK byla poprvé objevena v anaplastickém velkobuněčném lymfomu (ALCL). Její hlavní role spočívá v buněčné komunikaci, dále je spojována s vývojem a funkcí nervového systému. Abnormální exprese ALK byla pozorována u nemalobuněčného plicního karcinomu a také u neuroblastomu. Prvním inhibitorem ALK, který byl schválen FDA, byl krizotinib. Tento ATP-konkurenční inhibitor ALK byl úspěšně použit u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem. Ovšem bylo zjištěno, že krizotinib – inhibitor ALK první generace, má poměrně špatnou biologickou dostupnost do CNS z důvodu nedostatečné penetrace přes hematoencefalitickou bariéru a proto, podle klinických studií zhruba u 20 % pacientů léčených krizotinibem dochází k progresi onemocnění. Dle studií by měl brigatinib, jakožto inhibitor ALK druhé generace, což jsou inhibitory s větší molekulou než inhibitory generace první, vykazovat vyšší intrakraniální aktivitu (Costa et al. 2015, Internet 6).

Brigatinib je také inhibitorem receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Tento receptor je exprimován ve vyšší míře v různých typech nádorových buněk, jako je např. nádorové onemocnění plic, tlustého střeva, hlavy a krku (Internet 6).

Brigatinib je užíván pouze perorálně a doporučená denní dávka je 90–180 mg/den. Často je jeho užití spjato s řadou nežádoucích účinků, kdy se doporučuje po jejich výskytu upravit dávku či brigatinib zcela vysadit. Mezi nejčastější nežádoucí účinku patří únava, nevolnost, průjem kašel či bolest hlavy. V omezené míře ovšem daleko závažnější je pak výskyt vedlejších účinků jako je hypertenze, bradykardie, hyperglykémie, poruchy zraku,

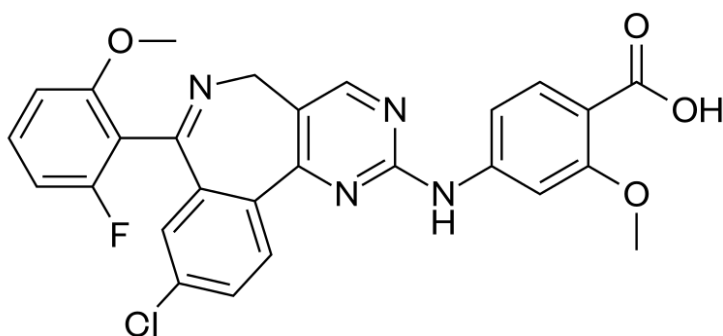


pneumonitida či intersticiální plicní nemoc. Studie ukázaly, že užívání brigatinibu je spojeno se zvýšenými hladinami jaterních aminotransferas, ovšem akutní poškození jater nebo chronická hepatitida zatím nebyla zaznamenána (Internet 7).

Metabolismus brigatinibu probíhá v jaterních hepatocytech pomocí CYP2C8 (72,4 %) a CYP3A4 (27,6 %). Při užívání silných inhibitorů CYP3A4 je nutné dávku léčiva snížit, jelikož by vlivem inhibitorů CYP byla plazmatická hladina brigatinibu zvýšena. Mezi silné inhibitory CYP3A4 patří např. antimykotika (itrakonazol, ketokonazol), makrolidová antibiotika (klarithromycin), antivirotika (indinavir) (Internet 8).

Dle Registru klinických zkoušek EU nyní probíhají 4 studie, kdy dochází k testování brigatinibu. Jedna z příkladů je randomizovaná studie, ve fázi 2 klinického testování brigatinibu u pacientů s ALK pozitivním nemalobuněčným karcinomem plic, kteří byli dříve léčeni krizotinibem. Do testování bylo zapojeno 222 pacientů (muži i ženy) z různých zemí (př. z Austrálie, Německa, Nizozemska, Koree, Španělska, USA a dalších). 170 pacientů bylo ve věku (18–64 let), 52 pacientů (od 65 do 84 let). Brigatinib byl podáván perorálně 1x denně v dávce 90–180 mg/den v 28denním cyklu až do progresu onemocnění nebo nesnesitelnosti toxicity. Tato studie nyní dále pokračuje, a zatím nebyly uvedeny hlavní statistiky k hodnocení míry objektivní odezvy podle hodnocení vyšetřovatele (Internet 9).

### 2.3.1.2 Alisertib



Obr. 11 Alisertib (převzato z Internet 10)

Alisertib (MLN8237; Obr. 11) je selektivní inhibitor Aurora A kinasy (AAK). AAK je serin/threonin proteinkinasa, která je vysoce exprimovaná v rychle se dělících buňkách (Nikonova et al. 2012, Internet 10).

Aurora A kinasa je lokalizována v pólech vřeténka a v mikrotubulech vřetena během buněčného cyklu, konkrétně během mitózy a dáváme ji do souvislosti s regulací sestavení vřetena. Inhibice AAK alisertibem může mít za následek zastavení abnormální tvorby mitotického vřetena a segregace chromozomů a inhibici buněčné proliferace (Internet 10). U velkého množství nádorových onemocnění, jako je např. nádorové onemocnění prsu či tlustého střeva, se setkáváme s aberantní expresí AAK (Nikonova et al. 2012).

Alisertib, byl v roce 2012 Evropskou unií označen jako sirotčí léčivo, které bylo vyvinuto pro léčbu nádorového onemocnění vaječníku a pro léčbu periferního T-buněčného lymfomu. V roce 2016 dle Evropské lékové agentury (EMA) byl stažen z registru pro vzácná onemocnění a již se v této indikaci nikde v EU nepoužívá (Internet 11).

Alisertib je biologicky dostupný po perorálním podání. Nyní je alisertib v různých fázích klinického testování. Jednou ze zkoušek je studie alisertibu v kombinaci s chemoterapeutikem paklitaxelem u metastazujícího a lokálně se opakujícího nádorového onemocnění prsu. Tato klinická studie je nyní ve druhé fázi. Důvodem této kombinace je to, že léčba nádorových onemocnění, je často účinnější v kombinaci léčiv, než pokud jsou léčiva podávána samostatně – buď může docházet k synergickému nebo aditivnímu účinku (Internet 12).

V roce 2014 byl alisertib testován u pacientů s recidivujícím a refrakterním B a T lymfocytárním non-Hodgkinovým nádorem. V klinické studii byl alisertib podáván pacientům v dávce 50 mg 2x denně 7 dnů a poté znovu v 21denních cyklech. Nejčastějším nežádoucím jevem byly zaznamenány poruchy v krvetvorbě, a to konkrétně neutropenie, leukopenie, trombocytopenie a anémie. Výsledkem této studie byla prokázána aktivita alisertibu jak u T-buněčných, tak u B-buněčných lymfomů. Ze všech léčených pacientů byla míra úspěšné odpovědi 27 % (13 ze 48 pacientů) (Friedberg et al. 2014).

### 3. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem experimentální části diplomové práce bylo studium inhibičního potenciálu vybraných proteinkinasových inhibitorů, brigatinibu a alisertibu, vůči karbonylredukujícím enzymům, které jsou schopny metabolizovat chemoterapeutikum daunorubicin na méně účinný daunorubicinol.

Pro posouzení efektu bylo potřeba:

- Porovnat specifickou aktivitu vybraných karbonylredukujících enzymů z nadrodiny AKR (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2) a SDR (CBR1, CBR3) při použití substrátu daunorubicinu
- Provést základní screening inhibice u námi zvolených inhibitorů proteinkinas (brigatinibu a alisertibu) na karbonylredukujících enzymech, které byly aktivní vůči daunorubicinu (substrátu)
- Stanovit  $IC_{50}$ , což je koncentrace inhibitoru, která je potřebná ke snížení aktivity enzymu na polovinu
- Stanovit  $K_i$ , což je inhibiční konstanta, charakterizující afinitu inhibitoru k enzymu ( $K_i$  a  $IC_{50}$  stanovuje u inhibitoru, který má vysokou inhibiční aktivitu)

## 4. POUŽITÝ MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

Tabulka 1 shrnuje pomůcky, které byly k této práci využívány a v tabulce 2 jsou uvedeny přístroje, které nám usnadnily experiment, anebo jsme díky nim získaly hodnoty pro další výpočty.

Tab. 1 Přehled použitých pomůcek

Pomůcka	Původ, výrobce
Hodinky - stopky	
Injekční jehly	Česká republika, Braun
Injekční stříkačky	Japonsko, Terumo
Kádinky	
Kopistky	
Lžičky	
Led	
Filtr s membránou	Německo, Sigma-Aldrich
Mikrozkumavky	Německo, Eppendorf
Mikropipety	Finsko, Santorius Biohit
Odměrné válce	
Rukavice	Česká republika, Vulkan Medical
Stojan na zkumavky	
Špičky k pipetování	Finsko, Santorius Biohit
Vialky + (inzerty, septa a víčka na vialky)	USA, Agilent Technologies

Tab. 2 Přehled použitých přístrojů

Přístroj	Původ, výrobce
Centrifuga (Mini Spin plus)	Německo, Eppendorf
Kolona k UHPLC (2. 1 x 50 mm, 1. 8 µm, Zorbax Eclipse Plus C18)	USA, Agilent Technologies
Odsávací pumpa	Česká republika, P-Lab
Přístroj na výrobu ledu (Scotsman AF80)	Velká Británie, Scotsman
Termomixér (Thermomixer Compact)	Německo, Eppendorf
Třepačka (IKA Vortex Genius 3)	Německo, IKA
UHPLC (Agilent 1290 Series)	USA, Agilent Technologies
Ultrazvuk	Polsko, Activ
Váhy analytické (Scaltec SBC22)	USA, Scaltec
Vakuový koncentrátor (Concentrator plus)	Německo, Eppendorf

#### 4.1.2 Chemikálie a reagenty

Tabulka níže shrnuje všechny použité materiály a reagenty, se kterými jsem po dobu své experimentální práce pracovala (Tab. 3).

Tab. 3 Přehled použitých chemikálií

Chemikálie	Původ, výrobce (dodavatel)
Acetonitril	Německo, Sigma-Aldrich
Amoniak	Česká republika, Lachema
Ethylacetát	Německo, Merck KGaA
Destilovaná voda	Katedra biochemických věd, FaF
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Čína, MP Biomedicals
Glukóza-6-fosfát (Glc-6-P)	Německo, Applichem
Glukóza-6-fosfátdehydrogenasa (Glc-6-P dehydrogenasa)	Německo, Roche Diagnostics
Chlorid hořečnatý hexahydrát (MgCl <sub>2</sub> )	Německo, Sigma-Aldrich
Methanol	Česká republika, Penta
NADP <sup>+</sup> (Nikotinamidadeninindinukleotidfosfát)	Německo, Roche Diagnostics
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Česká republika, Penta
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	Česká republika, Penta

## Rekombinantně připravené enzymy

Enzymy (Tab. 4), se kterými byl experiment proveden, byly připraveny na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Tyto enzymy byly připravené rekombinantně pomocí expresního systému *E. coli* a byly rozpuštěné v 0,1 M sodno-fosfátovém pufru s přidavkem 20 % glycerolu; pH 7,4.

Tab. 4 Enzymy

Enzymy	c [mg/ml]
AKR1A1	1,70
AKR1B1	1,50
AKR1B10	1,56
AKR1C1	1,84
AKR1C2	1,96
AKR1C3	1,30
AKR1C4	0,75
AKR7A2	2,40
CBR1	2,11
CBR3	1,93

## Substrát a inhibitory

Pro experimentální část této diplomové práce byl použit substrát daunorubicin hydrochlorid a dva inhibitory proteinkinas – alisertib a brigatinib (Tab. 5).

Tab. 5 Použité inhibitory a substrát

	Původ, výrobce (dodavatel)
<b>Substrát</b>	
Daunorubicin hydrochlorid	Německo, Sigma-Aldrich
<b>Inhibitor</b>	
Alisertib	Selleckchem
Brigatinib	Selleckchem



poměru, kdy druhý roztok byl připraven rozpuštěním 3,12 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , tak aby výsledné pH bylo 7,4.

### **Celková příprava NADPH-regeneračního systému**

Do reakční směsi jsme přidali 20  $\mu\text{l}$  roztoku NADPH-regeneračního systému, který jsme si připravili neprodleně vždy před inkubací.  $\text{NADP}^+$  a glukóza-6-fosfátdehydrogenasu jsme si navážili do eppendorfek na analytických vahách a poté rozpustili v 0,1 M sodno-fosfátovém pufru s pH 7,4. Do vzniklé směsi byla přidána glukóza-6-fosfátdehydrogenáza a 0,1 M  $\text{MgCl}_2$ . Směs jsme následně důkladně zhomogenizovali za použití třepačky.

### ***Příprava substrátu***

Zvolený substrát pro všechny reakce byl daunorubicin.

Nejprve byl připraven 5 mM pracovní roztok DAU. Z tohoto roztoku bylo do 100  $\mu\text{l}$  reakční směsi přidáno 10  $\mu\text{l}$ , takže výsledná koncentrace DAU byla 500  $\mu\text{M}$ .

Při stanovení hodnoty  $K_i$  alisertibu jsme vycházeli z pracovních roztoků o koncentracích DAU 20000  $\mu\text{M}$ , 10000  $\mu\text{M}$  a 8000  $\mu\text{M}$ , 6000  $\mu\text{M}$  a 4000  $\mu\text{M}$ . Z těchto pracovních roztoků jsme do reakční směsi přidali 10  $\mu\text{l}$ . Finální koncentrace DAU v 100  $\mu\text{l}$  reakční směsi tedy byla 2000  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  a 400  $\mu\text{M}$ .

### ***Příprava enzymů***

Karbonylredukující enzymy, které musely být uchovávány v mrazáku, jsme naředili na požadovanou pracovní koncentraci roztoku pomocí sodno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 7,4). Koncentrace zásobních roztoků s jednotlivými enzymy jsou uvedeny v tabulce 4. Při porovnávání aktivity enzymů vůči substrátu DAU, jsme pracovali se zásobními roztoky enzymů, které byly naředěny na koncentraci 0,3 mg/ml. Do reakce jsme pipetovali 10  $\mu\text{l}$  takto naředěného roztoku, což odpovídalo 3  $\mu\text{g}$  enzymu ve 100  $\mu\text{l}$  reakci.

Pro základní screening potenciálních inhibičních vlastností alisertibu a brigatinibu jsme na jednu reakci použili 1  $\mu\text{g}$  CBR1; 1  $\mu\text{g}$  AKR1A1; 5  $\mu\text{g}$  AKR1B1; 5  $\mu\text{g}$  AKR1B10; 1,5  $\mu\text{g}$  AKR1C3; 5  $\mu\text{g}$  AKR7A2.

Při stanovení  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$  inhibitoru jsem použili pracovní roztok AKR1C3 enzymu, jehož koncentrace činila 0,15 mg/ml, což odpovídalo 1,5  $\mu\text{g}$  enzymu v 100  $\mu\text{l}$  reakční směsi.



### ***Příprava inhibitorů***

Zásobní roztoky inhibitorů, které jsme používali, byly uchovávány v mrazáku (-20 °C). Jejich zásobní koncentrace byla 10 mM. Alisertib byl rozpuštěn v DMSO a brigatinib v ethanolu. Pomocí DMSO, respektive pomocí ethanolu, jsme tyto zásobní roztoky inhibitorů ředili na požadovanou pracovní koncentraci.

Finální koncentrace inhibitorů v 100  $\mu$ l reakci byla 10 a 50  $\mu$ M. Ze zásobních roztoků inhibitorů jsme připravili roztoky pracovní o koncentraci 500  $\mu$ M a 2500  $\mu$ M. Na pracovní roztok o koncentraci 500  $\mu$ M jsme použili 2  $\mu$ l inhibitoru a 38  $\mu$ l DMSO (respektive ethanolu) a pracovní roztok o koncentraci 2500  $\mu$ M jsme připravili naředěním 4  $\mu$ l inhibitoru s 12  $\mu$ l DMSO (respektive ethanolu). Poté bylo do reakční směsi přidáno 2  $\mu$ l pracovního roztoku.

Při stanovení  $IC_{50}$  alisertibu byla jeho výsledná koncentrace ve 100  $\mu$ l reakční směsi 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M a 0,1  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M. Připravili jsme tedy pracovní roztoky o koncentracích 2500  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M a 2,5  $\mu$ M a z těchto roztoků byly do reakční směsi přidány 2  $\mu$ l.

Při stanovení  $K_i$  jsme vycházeli z pracovních roztoků alisertibu o koncentracích 250  $\mu$ M, 50  $\mu$ M a 25  $\mu$ M, z těchto pracovních roztoků jsme do reakční směsi přidali 2  $\mu$ l. Finální koncentrace alisertibu ve 100  $\mu$ l reakční směsi tedy byla 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M a 0,5  $\mu$ M.

### **4.2.3 Inkubace**

V prvním kroku našeho experimentu jsme si označili eppendorfky, do kterých jsme napipetovali NADPH-regenerační systém a sodnofosfátový pufr a následně jsme tuto směs přenesli do ledu a chladili. V dalším kroku byl do regenerační směsi přidán příslušný karbonylredukující enzym, a v případě reakce bez enzymu, jsme namísto enzymu přidali pufr. U vzorků, kde jsme zkoumali inhibiční aktivitu, jsme přidali inhibitor. Poté jsme směs důkladně zhomogenizovali na třepačce. Do předem vyhřátého termomixéru na 37 °C jsme vložili eppendorfky s připravenou směsí a začali jsme s preinkubací vzorku, kdy preinkubace trvala 10 minut a podstatou této preinkubace bylo navázání inhibitoru na enzym.

Po uplynutí deseti minut jsme postupně v třiceti sekundovém intervalu přidávali substrát DAU. Délka inkubace pak trvala 30 minut u většiny enzymů, kromě AKR1B1, kdy inkubace v případě screeningu inhibitorů trvala 120 minut. Inkubaci jsme zastavili 300  $\mu$ l methanolu a vzorky dali zpět na led, kde byly ponechány po dobu deseti minut. V případě porovnání aktivit

jednotlivých enzymů a při stanovení hodnoty  $K_i$  jsme reakci stopovali přídatkem 40  $\mu$ l amoniaku. Vzorky byly dány na 10 minut na led, poté k nim byl přidán 1 ml ethylacetátu, vzorky byly 15 minut vytřepávány na třepačce, následně zcentrifugovány při 13 400 rpm 2 minuty. Z eppendorfek jsme odebrali horní organickou vrstvu a tu dali při 30° C odpařit a tento proces, od přídatku 1 ml ethylacetátu jsme provedli ještě jednou.

Připravili jsme si tedy reakce s inhibitory o požadované koncentraci v triplikátu, neinhibovanou reakci v triplikátu, kontrolu DMSO pro alisertib (respektive kontrolu ethanolu pro brigatinib) v triplikátu, kontrolu bez enzymu (byl zde místo enzymu použit sodno-fosfátový pufr) a kontrolu bez substrátu (substrát byl nahrazen destilovanou vodou), ty byly v duplikátu. Přesné složení reakčních směsí jsou uvedeny v tabulkách pod textem (Tab. 6, 7, 8, 9).

Tab. 6 Složení jednotlivých reakčních směsí pro porovnání aktivity enzymů

	<b>Regenerační systém (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Sodno-fosfátový pufr (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Enzym (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Substrát Daunorubicin (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Počet reakcí</b>
<b>Neinhibovaná reakce</b>	20	60	10	10	3
<b>Kontrola bez substrátu</b>	20	60	10	- (10 $\mu$ l vody)	2
<b>Kontrola bez enzymu</b>	20	70	-	10	2

Tab. 7 Složení jednotlivých reakčních směsí při screeningu inhibitorů

	<b>Regenerační systém (μl)</b>	<b>Sodno-fosfátový pufr (μl)</b>	<b>Enzym (μl)</b>	<b>Inhibitor (μl)</b>	<b>Substrát Daunorubicin (μl)</b>	<b>Počet reakcí</b>
<b>Neinhibovaná reakce</b>	20	60	10	-	10	3
<b>Kontrola DMSO (ethanolu)</b>	20	58	10	2 (DMSO/ethanol)	10	3
<b>Inhibitor 10 μM</b>	20	58	10	2	10	3
<b>Inhibitor 50 μM</b>	20	58	10	2	10	3
<b>Kontrola bez enzymu</b>	20	70		-	10	2
<b>Kontrola bez substrátu</b>	20	60	10	-	- (10 μl vody)	2

Tab. 8 Složení jednotlivých reakčních směsí při stanovení IC<sub>50</sub> inhibitoru – alisertibu

	<b>Regenerační systém (μl)</b>	<b>Sodno-fosfátový pufr (μl)</b>	<b>Inhibitor (μl)</b>	<b>Enzym (μl)</b>	<b>Substrát daunorubicin (μl)</b>	<b>Počet reakcí</b>
<b>Neinhibovaná reakce</b>	20	60	-	10	10	3
<b>Kontrola bez enzymu</b>	20	70	-	-	10	2
<b>Kontrola bez substrátu</b>	20	60	-	10	- (10 μl vody)	2
<b>Kontrola DMSO</b>	20	58	2 (DMSO)	10	10	3
<b>Inhibitor 0,05 μM</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 0,1 μM</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 0,25 μM</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 0,5 μM</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 1 μM</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 5 μM</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 10 μM</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 50 μM</b>	20	58	2	10	10	3

Tab. 9 Složení jednotlivých reakčních směsí při stanovení  $K_i$  inhibitoru – alisertibu

	Regenerační systém (μl)	Sodno-fosfátový pufr (μl)	Inhibitor (μl)	Enzym (μl)	Substrát daunorubicin (μl)	Počet reakcí
Kontrola bez enzymu	20	70	-	-	10	2
Kontrola bez substrátu	20	60	-	10	- 10 μl vody	2
<b>Daunorubicin 2000 μM</b>						
Kontrola DMSO	20	58	2 (DMSO)	10	10	3
Inhibitor 5 μM	20	58	2	10	10	3
Inhibitor 1 μM	20	58	2	10	10	3
Inhibitor 0,5 μM	20	58	2	10	10	3
<b>Daunorubicin 1000 μM</b>						
Kontrola DMSO	20	58	2 (DMSO)	10	10	3
Inhibitor 5 μM	20	58	2	10	10	3
Inhibitor 1 μM	20	58	2	10	10	3
Inhibitor 0,5 μM	20	58	2	10	10	3
<b>Daunorubicin 800 μM</b>						
Kontrola DMSO	20	58	2 (DMSO)	10	10	3
Inhibitor 5 μM	20	58	2	10	10	3
Inhibitor 1 μM	20	58	2	10	10	3
Inhibitor 0,5 μM	20	58	2	10	10	3
<b>Daunorubicin 600 μM</b>						

<b>Kontrola DMSO</b>	20	58	2 (DMSO)	10	10	3
<b>Inhibitor 5 <math>\mu</math>M</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 1 <math>\mu</math>M</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 0,5 <math>\mu</math>M</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Daunorubicin 400 <math>\mu</math>M</b>						
<b>Kontrola DMSO</b>	20	58	2 (DMSO)	10	10	3
<b>Inhibitor 5 <math>\mu</math>M</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 1 <math>\mu</math>M</b>	20	58	2	10	10	3
<b>Inhibitor 0,5 <math>\mu</math>M</b>	20	58	2	10	10	3

#### 4.2.4 UHPLC analýza

##### *Příprava vzorků na UHPLC*

Při měření  $IC_{50}$ ,  $K_i$  a inhibiční aktivity inhibitorů proteinkinás jsme pro ukončení inkubace a zastavení reakce použili methanol a jednotlivé vzorky uložili na 10 minut do ledu. Poté jsme vzorky přenesli do centrifugy, kde byly po dobu deseti minut centrifugovány při 13 400 rpm. V dalším kroku jsme vzorky připravili k analýze pomocí UHPLC. Pomocí injekční stříkačky s jehlou jsme každý vzorek nabrali a přefiltrovali přes membránový filtr Whatman do inzertů označených vialek a vialku poté zavřeli. Takto byly vzorky připravené k měření za pomoci UHPLC.

Další alternativou, jak zastavit probíhající enzymatickou reakci, bylo použití 26% amoniaku (40  $\mu$ l) a uložení do ledu. Tento způsob byl však časově náročnější. Po deseti minutách jsme ke vzorku přidali ethylacetát (1 ml) a následně vytřepávali po dobu patnácti minut. Následně jsme v dalším kroku vzorky 2 minuty centrifugovali při 13 400 rpm a poté odebrali do mikrozku mávek horní organickou vrstvu, ve které se nacházel daunorubicinol. Extrakci jsme se vzorky zopakovali ještě jednou, kdy jsme tedy ke spodní

vrstvě přidali ethylacetát (1 ml), vytřepali, centrifugovali a odebrali horní organickou vrstvu. Poté vzorky s organickou vrstvou byly při 30 °C odpařovány, kdy došlo k zakoncentrování vzorků odpařením rozpouštědla. Vzorky byly předány do vialek a připravené k měření na UHPLC. Tuto metodu jsem si vyzkoušela při porovnávání aktivit jednotlivých karbonylredukujících enzymů, dále pak při stanovení hodnoty  $K_i$ .

### ***Analýza pomocí UHPLC***

Pro tento experiment, respektive UHPLC analýzu, byl použit přístroj Agilent 1290 Series, jehož kolona byla Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 x 50 mm; 1,8  $\mu$ l) a Infinity 1290 filtr. Pro analýzu vzorků na UHPLC byla stanovena tato kritéria: průtoková rychlost 0,8 ml/min, izokratická eluce, teplota 40 °C, mobilní fáze 0,1% kyselina mravenčí s acetonitrilem v poměru 74:26 (v/v), tlak 535 barů, a fluorescenční detektor (emisní vlnová délka 560 nm, excitační vlnová délka 480 nm).

Pomocí UHPLC analýzy jsme získali výsledky měření metabolitu daunorubicinolu jak kvalitativní (specifický retenční čas), tak kvantitativní (porovnávání plochy píku s kalibrační křivkou).

### ***Příprava mobilní fáze na UHPLC***

Při měření na UHPLC jsme jako mobilní fázi použili roztok, složený z kyseliny mravenčí (0,1%) a acetonitrilu. Při zjišťování aktivity karbonylredukujících enzymů jsme použili takto připravený roztok v množství 400  $\mu$ l na rozpuštění odpařených vzorků.

#### **4.2.5 Zpracování naměřených dat**

Za pomocí UHPLC analýzy jsme zjistili, jaké množství metabolitu daunorubicinolu (ng) je ve vzorku, když nástřík na kolonu činil 5  $\mu$ l vzorku. Z této hodnoty, jsme pak byli schopni vypočítat specifickou aktivitu enzymu, která byla vyjádřena v nmol/mg/min. Hodnotu, získanou prostřednictvím UHPLC jsme vynásobili koeficientem ředění. Koeficient ředění (K) zahrnuje podíl nástříku vzorku na kolonu (5  $\mu$ l) a celého objemu vzorku (400  $\mu$ l), tedy  $K = 400 \mu\text{l} / 5 \mu\text{l} = 80$ . Výsledek, který jsme tímto získali jsme přepočítali na množství

daunorubicinolu, které je schopný vytvořit 1 mg enzymu. V dalším kroku následoval přepočet z ng na nmol. Předešlý výsledek jsme vydělili Mr daunorubicinolu, tedy 529,54 g/mol ( $M_{rDAUol} = 529,54 \text{ g/mol}$ ). Posledním krokem bylo vydělit výsledek počtem minut inkubace enzymu, a tím jsme získali výsledek specifické aktivity.

Pro výpočet specifické aktivity jsme využili program Microsoft Excel 16.25.

Pro grafické hodnocení  $IC_{50}$  a inhibiční konstanty  $K_i$  jsme využili programu GraphPad Prism 8.2.0.



## 5. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

### 5.1 SPECIFICKÁ AKTIVITA VYBRANÝCH KARBONYLREDUKUJÍCÍCH ENZYMŮ VŮČI SUBSTRÁTU DAUNORUBICINU

Nejprve jsme stanovili specifickou aktivitu vybraných enzymů z nadrodiny AKR a SDR vůči námi zvolenému substrátu DAU. Porovnání jsme provedli u karbonylredukujících enzymů AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2 a CBR1, CBR3.

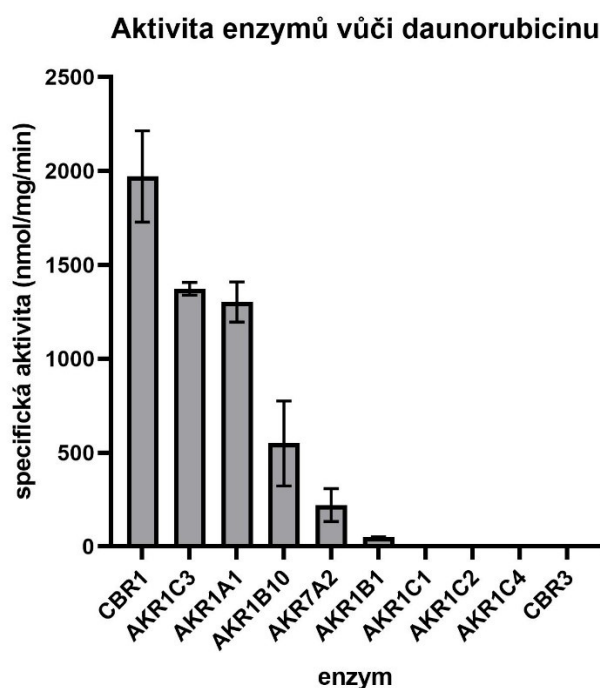
Z analýzy vzorku, pomocí UHPLC, jsme získali množství vznikajícího metabolitu daunorubicinolu v ng. Množství daunorubicinolu bylo přepočítáno na specifickou aktivitu enzymů v nmol/mg/min. Pro větší přesnost výsledků jsme pokusy se vzorky měřili vždy 3x. Tudíž aritmetický průměr, který je uveden níže v tabulce (Tab. 10) jsme vypočítali z triplikátu aktivity jednotlivých karbonylredukujících enzymů.

Tab. 10 Porovnání specifické aktivity vybraných karbonylredukujících enzymů vůči daunorubicinu.

ENZYM	SPECIFICKÁ AKTIVITA (nmol/mg/min)
AKR1A1	1302,89 ± 106,89
AKR1B1	50,85 ± 0,93
AKR1B10	549,14 ± 226,50
AKR1C1	0
AKR1C2	0
AKR1C3	1372,14 ± 34,28
AKR1C4	0
AKR7A2	220,90 ± 87,77
CBR1	1970,92 ± 243,32
CBR3	0

Dle výsledků můžeme vidět, že nejvyšší specifická aktivita vůči substrátu DAU byla zaznamenána u CBR1, AKR1C3 a AKR1A1 (Obr 13).

U enzymů AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 a CBR3 se aktivita vůči DAU neprokázala, tudíž jsme s těmito enzymy již dále nepracovali a vyřadili jsme je z dalšího testování.



Obr. 13 Porovnání specifické aktivity jednotlivých enzymů vůči DAU (Karbonylredukující enzymy byly řazeny podle klesající specifické aktivity)

## 5.2 ZÁKLADNÍ SCREENING INHIBIČNÍHO POTENCIÁLU INHIBITORŮ PROTEINKINAS U AKTIVNÍCH ENZYMŮ VŮČI DAUNORIBICINU

U enzymů, které byly aktivní vůči DAU, jsme testovali inhibiční potenciál vybraných inhibitorů proteinkinas, tedy alisertibu a brigatinibu. Jednotlivé karbonylredukující enzymy (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2, CBR1) jsme inkubovali s potenciálním inhibitorem, který byl testován v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. Pomocí kontrolního vzorku, ve kterém byl namísto inhibitoru použit DMSO u alisertibu nebo ethanol u brigatinibu, jsme porovnávali specifickou aktivitu enzymů s inhibitorem a specifickou aktivitu v kontrolním vzorku s DMSO, popřípadě s ethanolem. Vzorek s DMSO/ethanolem byl považován za neinhibovanou reakci s maximální specifickou aktivitou.

## AKR1A1

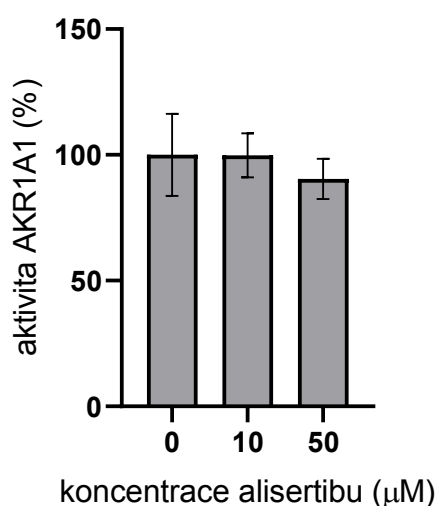
Použili jsme 1  $\mu\text{g}$  enzymu AKR1A1 na 100  $\mu\text{l}$  reakci, reakce probíhala po dobu 30 minut a byla zastavena přidavkem methanolu.

Měření jsme provedli v triplicátu a hodnoty, které jsou uvedeny níže, jsme dostali výpočtem jejich aritmetického průměru. Vypočítané hodnoty specifické aktivity, procentuální aktivity a procentuální inhibice enzymu jsou uvedeny v tabulce 11 a 12.

Závislost aktivity AKR1A1 (%) na koncentraci alisertibu a brigatinibu je na obrázku 14 a 15.

Tab. 11 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1A1

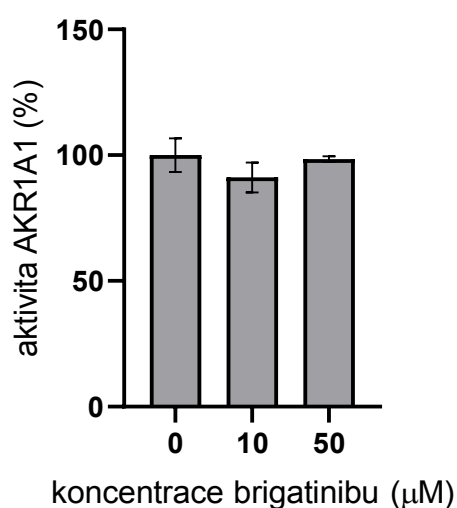
AKR1A1	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	1028,44 $\pm$ 32,16		
Kontrola DMSO	724,95 $\pm$ 118,32	100,00 $\pm$ 16,32	0,00
<b>Alisertib</b>			
10 $\mu\text{M}$	723,59 $\pm$ 63,69	99,81 $\pm$ 8,79	neinhibuje
50 $\mu\text{M}$	655,63 $\pm$ 58,19	90,44 $\pm$ 8,03	9,56 $\pm$ 8,03



Obr. 14 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1A1

Tab. 12 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1A1

AKR1A1	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	1028,44 ± 32,16		
Kontrola ethanol	851,31 ± 56,87	100,00 ± 6,68	0,00
<b>Brigatinib</b>			
10 μM	775,79 ± 50,32	91,13 ± 5,91	8,87 ± 5,91
50 μM	838,00 ± 9,84	98,44 ± 1,16	1,56 ± 1,16



Obr. 15 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR1A1

V případě AKR1A1 nebyla zjištěna změna aktivity enzymu o více než 10 %.

### AKR1B1

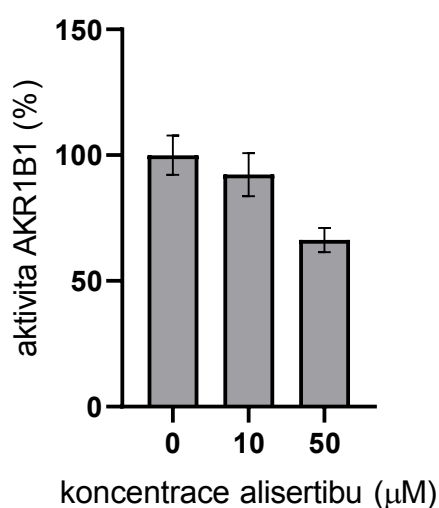
Použili jsme 5 μg enzymu AKR1B1 na 100 μl reakci, reakce probíhala po dobu 120 minut a byla zastavena přidavkem methanolu.

Měření jsme provedli v triplicátu a do tabulek 13 a 14 jsme uvedli aritmetické průměry vypočítaných hodnot specifické aktivity, procentuální aktivity a inhibice enzymu.

Grafické znázornění vlivu inhibice na aktivitě enzymu AKR1B1 jsou uvedeny na obrázcích 16 a 17.

Tab. 13 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1B1

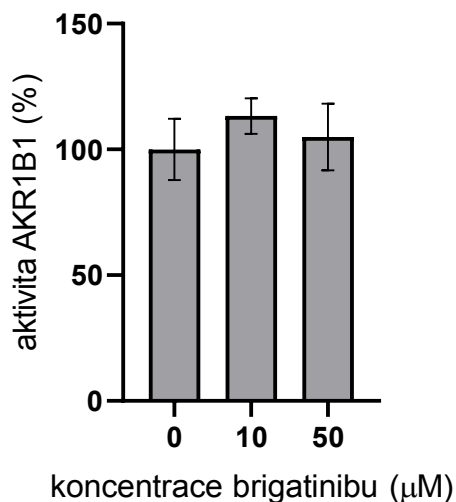
AKR1B1	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	9,26 ± 1,23		
Kontrola DMSO	7,99 ± 0,63	100,00 ± 7,83	0,00
<b>Alisertib</b>			
10 μM	7,37 ± 0,69	92,27 ± 8,58	7,73 ± 8,58
50 μM	5,29 ± 0,38	66,25 ± 4,75	33,75 ± 4,75



Obr. 16 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1B1

Tab. 14 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1B1

AKR1B1	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	9,26 ± 1,23		
Kontrola ethanol	9,79 ± 1,20	100,00 ± 12,24	0,00
<b>Brigatinib</b>			
10 μM	11,09 ± 0,69	113,26 ± 7,07	neinhibuje
50 μM	10,27 ± 1,30	104,92 ± 13,27	neinhibuje



Obr. 17 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR1B1

V případě AKR1B1 bylo zjištěno snížení aktivity o 34 % při použití alisertibu v 50 µM koncentraci. Při použití brigatinibu v 10 i 50 µM koncentraci došlo k mírnému zvýšení aktivity enzymu.

### AKR1B10

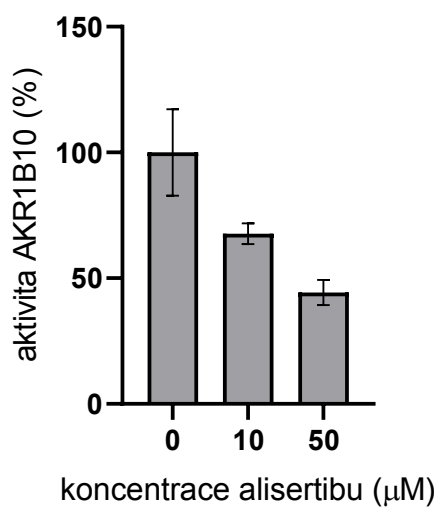
Použili jsme 5 µg enzymu AKR1B10 na 100 µl reakci, reakce probíhala po dobu 30 minut a byla zastavena přidavkem methanolu.

Měření bylo provedeno v triplicátu a do tabulek 15 a 16 jsme uvedli vypočítané hodnoty specifické aktivity, aktivity a inhibice enzymu v procentech.

Vliv inhibitoru na aktivitu AKR1B10 je graficky znázorněn na obrázcích 18 a 19.

Tab. 15 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1B10

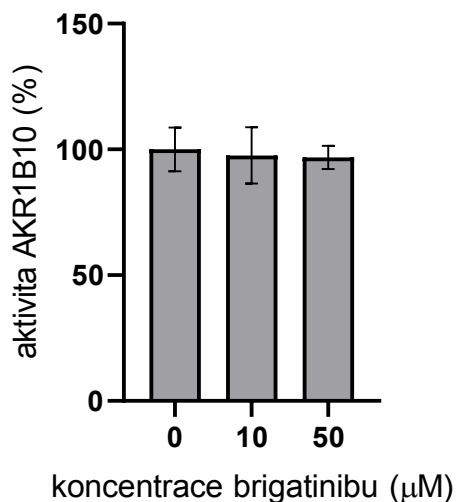
AKR1B10	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	108,56 ± 12,55		
Kontrola DMSO	84,10 ± 14,47	100,00 ± 17,21	0,00
<b>Alisertib</b>			
10 µM	56,97 ± 3,47	67,74 ± 4,12	32,26 ± 4,12
50 µM	37,26 ± 4,19	44,30 ± 5,00	55,70 ± 5,00



Obr. 18 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1B10

Tab. 16 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1B10

<b>AKR1B10</b>	<b>Specifická aktivita (nmol/mg/min)</b>	<b>Aktivita (%)</b>	<b>Inhibice (%)</b>
<b>Neinhibovaná reakce</b>	108,56 ± 12,55		
<b>Kontrola ethanol</b>	77,86 ± 6,74	100,00 ± 8,66	0,00
<b>Brigatinib</b>			
<b>10 µM</b>	76,00 ± 8,73	97,60 ± 11,21	2,40 ± 11,21
<b>50 µM</b>	75,42 ± 3,61	96,87 ± 4,63	3,13 ± 4,63



Obr. 19 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR1B10

Alisertib se jeví jako potenciální inhibitor enzymu AKR1B10. Při použití alisertibu v koncentraci 10 µM byla aktivita enzymu AKR1B10 snížena na 68 %. Při použití 50 µM alisertibu pak došlo ke snížení aktivity AKR1B10 na 44 %.

V případě brigatinibu nebyla pozorována významná změna aktivity AKR1B10.

### **AKR1C3**

Použili jsme 1,5 µg enzymu AKR1C3 na 100 µl reakci, reakce probíhala po dobu 30 minut a byla zastavena přidávkem methanolu.

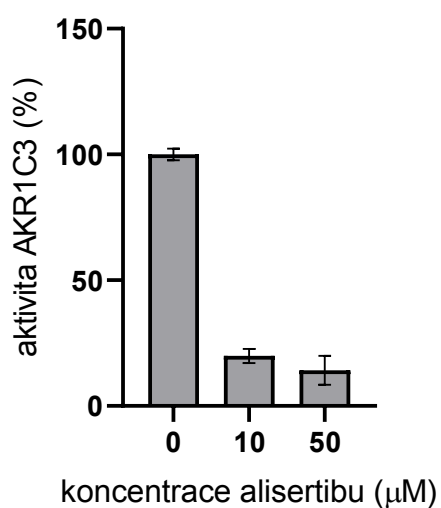
V tabulce 17 a 18 jsou uvedeny hodnoty specifické aktivity, aktivita v procentech a inhibice enzymu v procentech. Vždy jsme reakci měřili v triplicátu a hodnoty byly vypočítány z aritmetického průměru.

Graf závislosti vlivu inhibitorů na aktivitě AKR1C3 je na obrázku 20 a 21.



Tab. 17 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1C3

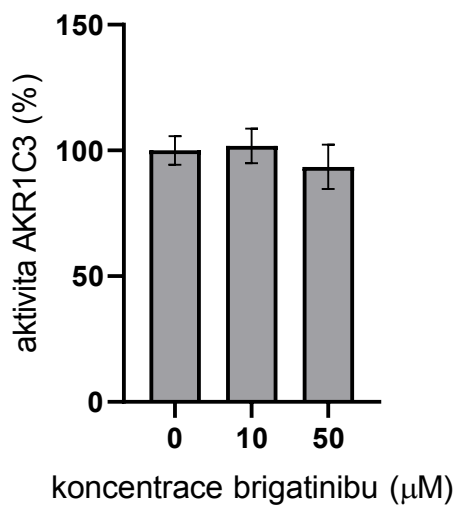
AKR1C3	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	658,16 ± 26,46		
Kontrola DMSO	523,08 ± 12,41	100,00 ± 2,37	0,00
<b>Alisertib</b>			
10 μM	104,06 ± 14,75	19,89 ± 2,82	80,11 ± 2,82
50 μM	74,48 ± 30,10	14,24 ± 5,75	85,76 ± 5,75



Obr. 20 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1C3

Tab. 18 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1C3

AKR1C3	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	658,16 ± 26,46		
Kontrola ethanol	567,30 ± 32,41	100,00 ± 5,71	0,00
<b>Brigatinib</b>			
10 μM	577,54 ± 38,73	101,81 ± 6,83	neinhibuje
50 μM	530,21 ± 49,98	93,46 ± 8,81	6,54 ± 8,81



Obr. 21 Vliv brigatinibu na aktivitu AKRC3

Enzym AKR1C3 byl inhibován alisertibem. Při použití alisertibu v koncentraci 10 µM byla aktivita enzymu snížena na 20 %, v případě 50 µM pak na 14 %.

V případě brigatinibu nebyl zjištěn vliv na aktivitu enzymu AKR1C3.

### **AKR7A2**

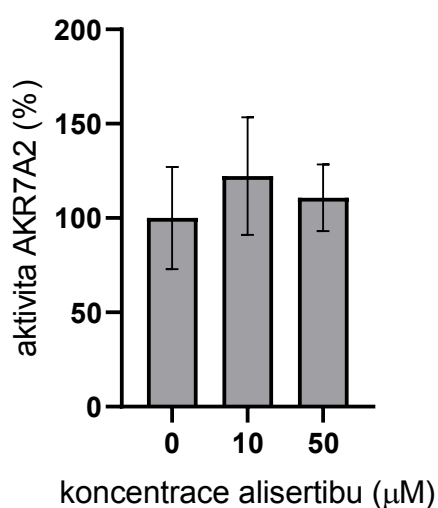
Použili jsme 5 µg enzymu AKR7A2 na 100 µl reakci, reakce probíhala po dobu 30 minut a byla zastavena přidavkem methanolu.

Měření bylo uskutečněno v triplikátu a hodnoty, které jsou uvedeny v tabulkách 19 a 20 jsme získali vypočítáním aritmetického průměru hodnot specifické aktivity, procentuální aktivity a inhibice enzymu.

Na obrázku 22 a 23 je znázorněn graf vlivu inhibitoru na aktivitě AKR7A2.

Tab. 19 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR7A2

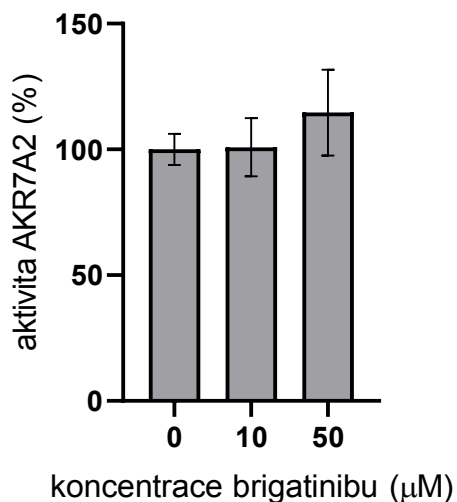
AKR7A2	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	115,56 ± 59,01		
Kontrola DMSO	127,03 ± 37,30	100,00 ± 27,00	0,00
<b>Alisertib</b>			
10 μM	155,26 ± 39,60	122,22 ± 31,18	neinhibuje
50 μM	140,68 ± 22,46	110,74 ± 17,68	neinhibuje



Obr. 22 Vliv alisertibu na aktivitu AKR7A2

Tab. 20 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR7A2

AKR7A2	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
Neinhibovaná reakce	115,56 ± 59,01		
Kontrola ethanol	135,61 ± 8,31	100,00 ± 6,13	0,00
<b>Brigatinib</b>			
10 μM	136,47 ± 15,67	100,86 ± 11,55	neinhibuje
50 μM	155,47 ± 23,14	114,65 ± 17,06	neinhibuje



Obr. 23 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR7A2

Inhibiční vliv alisertibu a brigatinibu na aktivitu enzymu AKR7A2 jsme nezaznamenali. Naopak testované látky enzym AKR7A2 mírně aktivovaly.

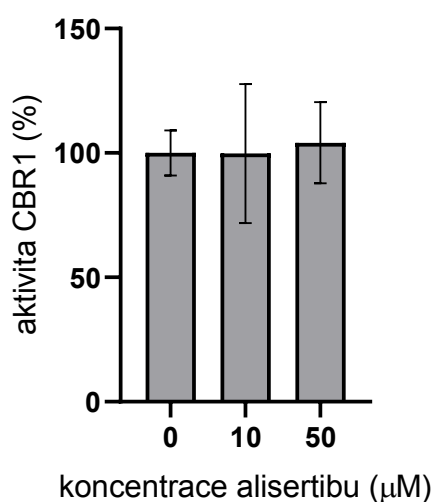
### **CBR1**

Použili jsme 1 µg enzymu CBR1 na 100 µl reakci, reakce probíhala po dobu 30 minut a byla zastavena přidávkem methanolu. Tabulky níže (Tab. 21 a 22) popisují přesné výsledky, které jsme vypočítali podle hodnot z UHPLC.

Reakce byly měřeny v triplikátu a uvedené jsou zde hodnoty specifické aktivity, aktivity v procentech a inhibice enzymu v procentech. Vždy se jedná o aritmetický průměr. Na obrázcích č. 24 a 25 můžeme vidět graf závislosti aktivity CBR1 v procentech na koncentraci alisertibu a brigatinibu.

Tab. 21 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu CBR1

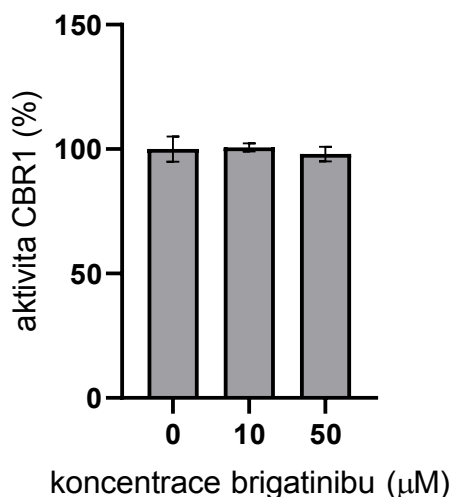
<b>CBR1</b>	<b>Specifická aktivita (nmol/mg/min)</b>	<b>Aktivita (%)</b>	<b>Inhibice (%)</b>
<b>Neinhibovaná reakce</b>	2162,74 ± 225,58		
<b>Kontrola DMSO</b>	2115,19 ± 191,22	100,00 ± 9,04	0,00
<b>Alisertib</b>			
<b>10 μM</b>	2109,96 ± 592,00	99,75 ± 28,00	Neinhibuje
<b>50 μM</b>	2201,95 ± 345,59	104,10 ± 16,34	Neinhibuje



Obr. 24 Vliv alisertibu na aktivitu CBR1

Tab. 22 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu CBR1

<b>CBR1</b>	<b>Specifická aktivita (nmol/mg/min)</b>	<b>Aktivita (%)</b>	<b>Inhibice (%)</b>
<b>Neinhibovaná reakce</b>	2162,74 ± 225,58		
<b>Kontrola ethanol</b>	2187,96 ± 109,71	100,00 ± 5,01	0,00
<b>Brigatinib</b>			
<b>10 μM</b>	2203,64 ± 36,20	100,72 ± 1,66	Neinhibuje
<b>50 μM</b>	2144,39 ± 63,82	98,01 ± 2,92	1,99 ± 2,92



Obr. 25 Vliv brigatinibu na aktivitu CBR1

Bylo zjištěno, že alisertib neinhibuje enzym CBR1. Inhibice prostřednictvím brigatinibu o koncentraci 50 µM byla pouze 2 %.

### 5.3 STANOVENÍ HODNOTY IC<sub>50</sub>

Dle měření byl nejvyšší inhibiční potenciál zaznamenán u inhibitoru alisertibu s enzymem AKR1C3, a proto jsme hodnotu IC<sub>50</sub> měřili právě u tohoto enzymu s tímto inhibitorem. IC<sub>50</sub> je koncentrace inhibitoru, která je potřeba ke snížení aktivity enzymu o 50 %.

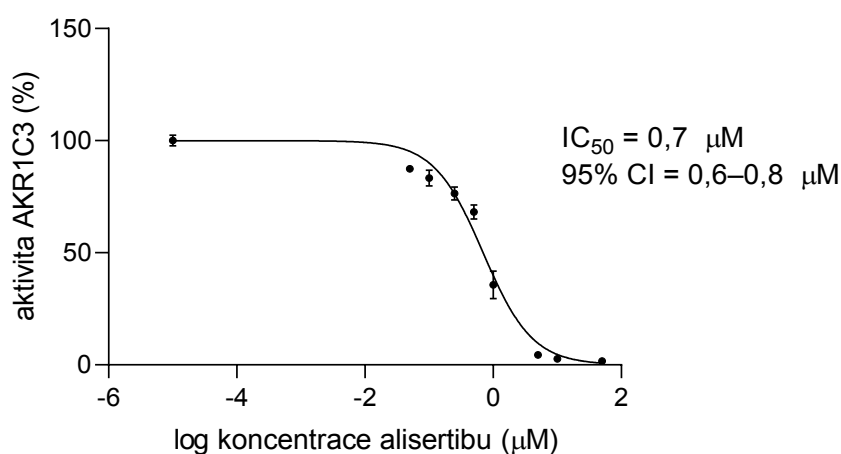
#### Alisertib + AKR1C3

V rozsahu koncentrací alisertibu od 0,05–50 µM (respektive 50 µM; 10 µM; 5 µM; 1 µM; 0,5 µM; 0,25 µM; 0,1 µM; 0,05 µM) jsme zjišťovali specifickou aktivitu enzymu AKR1C3. Jako substrát byl použit DAU (500 µM finální koncentrace v reakci). Pomocí těchto hodnot jsme vypočítali hodnotu IC<sub>50</sub>. V Tab. 23 jsou uvedeny naměřené hodnoty, respektive jejich aritmetické průměry, jelikož jsme každé měření pro přesnost prováděli v triplicátu.

K vyhodnocení IC<sub>50</sub> byl použit program GraphPad Prism 8.2.0. (Obr. 26). Z grafu můžeme vyčíst, jaká je závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentrace alisertibu. IC<sub>50</sub> pro alisertib je dle našich výpočtů 0,7 µM. Dále byla stanovena také hodnota 95 % CI = 0,6–0,8 µM, což je interval spolehlivosti neboli konfidenční interval.

Tab. 23 Specifická aktivita AKR1C3 při použití alisertibu v různém koncentračním rozmezí

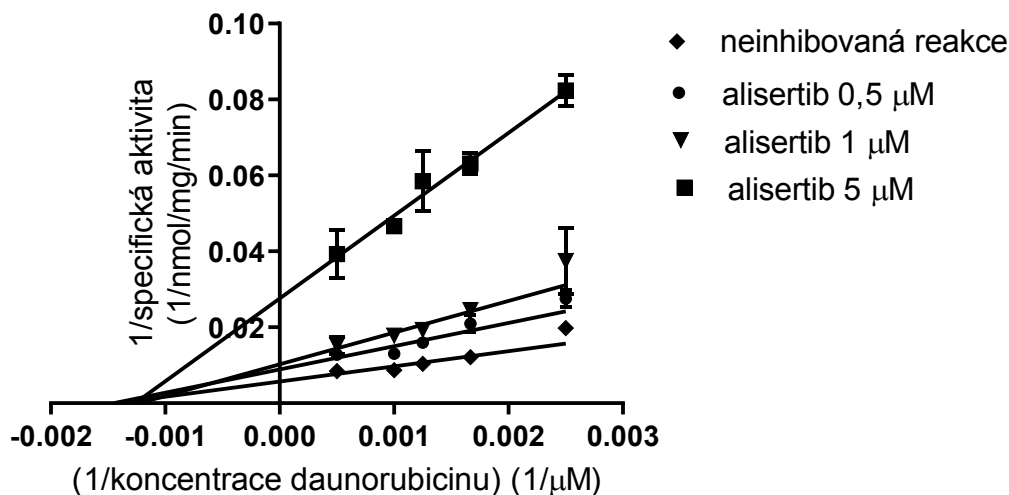
	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
AKR1C3	1697,89 ± 168,79	-	-
Kontrola DMSO	1403,34 ± 27,81	100 ± 2,43	-
0,05 μM	1227,30 ± 5,39	87,46 ± 0,47	12
0,1 μM	1169,54 ± 40,17	83,34 ± 3,51	17
0,25 μM	1072,74 ± 32,99	76,44 ± 2,88	24
0,5 μM	956,91 ± 36,50	68,19 ± 3,19	32
1 μM	501,65 ± 61,80	35,75 ± 6,23	64
5 μM	62,08 ± 15,98	4,42 ± 1,39	96
10 μM	37,36 ± 4,06	2,66 ± 0,35	97
50 μM	24,15 ± 1,92	1,72 ± 0,17	98



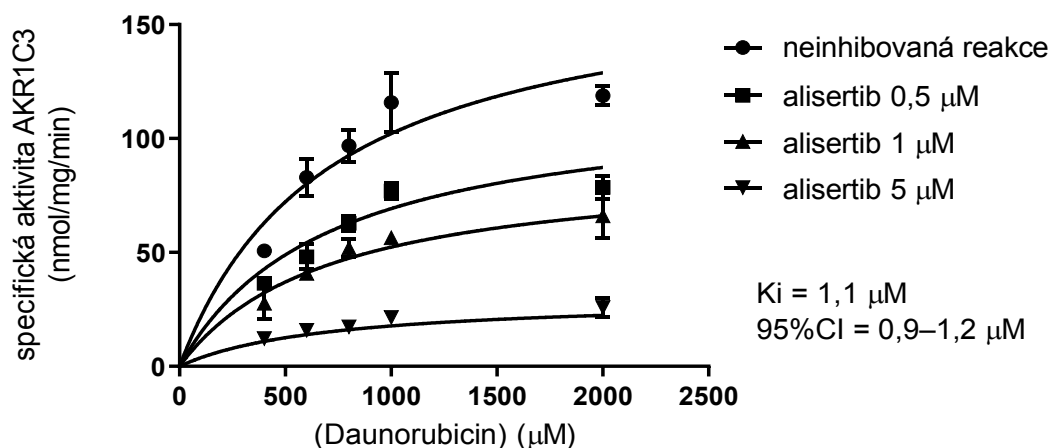
Obr. 26 Graf závislosti aktivity AKR1C3 v procentech na log koncentrace alisertibu v  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

#### 5.4 STANOVENÍ HODNOTY $K_i$

Stanovení hodnoty inhibiční konstanty  $K_i$  neaktivnějšího inhibitoru – alisertibu jsme prováděli s enzymem AKR1C3. Na měření jsme použili daunorubicin o koncentracích 400, 600, 800, 1000 a 2000  $\mu\text{M}$  a alisertib o koncentracích 0,5; 1,0; 5,0  $\mu\text{M}$ . Pomocí programu GraphPad Prism 8.2.0. byl získán graf závislosti specifické aktivity AKR1C3 na měnící se koncentraci daunorubicinu a alisertibu a byla vypočítána hodnota  $K_i = 1,1 \mu\text{M}$  (Obr. 28).



Obr. 27 Určení typu inhibice podle Lineweavera a Burka



Obr. 28 Změna specifické aktivity enzymu AKR1C3 v závislosti na různé koncentraci substrátu DAU a inhibitoru alisertibu

Z grafu podle Lineweavera a Burka (Obr. 27) jsme zjistili, že enzym AKR1C3, který katalyzuje redukci DAU, je alisertibem inhibován nekompetitivně. Přidáním inhibitoru se tedy snižují hodnoty  $V_{\max}$  enzymové reakce, ovšem  $K_m$  se nemění. Hodnota  $K_i$  1,1  $\mu\text{M}$  naznačuje, že afinita alisertibu k AKR1C3 je vysoká. Nekompetitivní typ inhibice může znamenat, že alisertib se neváže do aktivního místa enzymu AKR1C3, ale váže se na volný AKR1C3 nebo na komplex AKR1C3-DAU. Tím, že se substrátem nesoutěží o aktivní místo, nelze zvýšením koncentrace substrátu snížit inhibiční účinek. To je velmi důležitý poznatek pro klinickou praxi, takže při zvýšení dávek DAU se neovlivní inhibiční účinek alisertibu.



## 6. DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo stanovit vliv alisertibu a brigatinibu na aktivitu karbonylredukujících enzymů, které metabolizují antracyklinové antibiotikum daunorubicin.

Antracyklinová chemoterapeutika jsou široce využívána při léčbě nádorových onemocnění, nicméně jejich účinnost je významně omezena rozvojem rezistence a nežádoucích účinků. Jedním z mechanismů vzniku rezistence je právě zvýšená aktivita karbonylredukujících enzymů, které metabolizují daunorubicin na daunorubicinol. Tento primární metabolit se vyznačuje nižší protinádorovou aktivitou a kardiotoxickými účinky, což značně omezuje použití antracyklinů v klinické praxi (Shen et al. 2011).

Vztah mezi antracykliny a karbonylredukujícími enzymy studoval již Gonzalez et al. (1995), který poukázal na změny ve farmakologických vlastnostech tohoto protinádorového léčiva v důsledku metabolického působení. Zvýšená aktivita CBR1 enzymu v leukemické linii K562 vedla k 2–3násobnému poklesu cytotoxicity DAU (Gonzalez et al. 1995). Obdobně pak bylo pozorováno snížení cytotoxického působení DAU vlivem zvýšené exprese CBR1 také v případě akutní myeloidní leukémie (Varatharajana et al. 2012).

V souvislosti s rezistencí na DAU byla zkoumána zvýšená exprese enzymů AKR1C1 a AKR1C3 i u leukemických buněk U937 a snížení cytotoxicity DAU bylo potvrzeno (Matsunaga et al. 2014). Rezistenci nádorových buněk na DAU a IDA v souvislosti s enzymem AKR1C3 zkoumal Hofman et al. (2014). Studií bylo dokázáno, že rezistence nádorových buněk na antracykliny může být překonána při současném podávání specifického inhibitoru AKR1C3 – 2'-hydroxyflavanonu.

Shen et al. (2011) poukázal na to, že enzym AKR1B10 vykazuje zvýšenou preferenci k léčivům DAU a IDA. AKR1B10 byl vůči DOX a EPI méně aktivní, což pravděpodobně souvisí s přítomností hydroxylové funkční skupiny na uhlíku C-14 těchto léčiv.

Metabolické působení nejen vede ke snížení protinádorového účinku antracyklinů, ale i ke zvýšení kardiotoxicity. Pacienti s Downovým syndromem, tedy trisomií chromozomu 21, se vyznačují zvýšenou expresí enzymu CBR1 a vykazují tak až 1,8krát vyšší hladiny CBR1 oproti jedincům, kteří nejsou limitováni tímto syndromem. V důsledku toho je kardiotoxický potenciál antracyklinů u těchto pacientů vyšší. Dle studie se u 17,5 % dětských onkologických pacientů s touto trisomií, které podstupovaly léčbu antracykliny, objevila klinicky symptomatická kardiomyopatie (Kalabus et al. 2010; Quiñones Lombrañ et al. 2014).

Vzhledem k této rezistenci nádorových buněk na antracykliny a zároveň zvýšenému kardiotoxického působení, je snahou nalézt potenciální inhibitory antracyklinredukujících enzymů z řad přírodních, tak i syntetických sloučenin (Piska et al. 2017).

Flavonoidy byly popsány jako inhibitory CBR a AKR. Největší inhibice byla zaznamenána u luteolinu, který vykazoval interakci s CBR1 prostřednictvím hydroxylových skupin, kdy nejdůležitější skupinou pro silnou inhibici byla hydroxylová skupina v poloze 7 (Arai et al. 2015). Z přírodních sloučenin, které by mohly být potenciálními inhibitory karbonylredukujících enzymů, se jako účinné jeví resveratrol (Ito, Mitani et al. 2013), berberin (Hao et al. 2015), či kurkumin (Hintzpeter et al. 2015). Emodin, vykazoval inhibiční aktivitu vůči CBR1, AKR1B10 a AKR1C3 a výrazně zvýšil účinnost DAU u buněčné nádorové linie plic (A549) a jater (HepG2) (Hintzpeter et al. 2016). Ze syntetických látek, které se jeví jako potenciální inhibitory antracyklincarbonylredukujících enzymů, můžeme zmínit ebselen (Mordente et al. 2015), pixantron (Salvatorelli et al. 2013), zopolrestat, fidarestat či tolrestat (Zhang et al. 2013).

V této diplomové práci byly studovány inhibitory proteinkinas, konkrétně alisertib a brigatinib jako potenciální inhibitory karbonylredukujících enzymů. Alisertib je selektivní inhibitor AAK, který se nachází v mnoha fázích klinického testování vůči pokročilým solidním i hematologickým malignitám. Nyní se v klinické praxi alisertib nepoužívá, ovšem klinické studie, kde se testuje poměr rizik a přínosů spojených s léčbou alisertibem, neustále probíhají (Huifeng et al. 2015). Dle studie Kelly et al. (2014) byla stanovená dávka alisertibu 50 mg 2x denně po dobu 7 dní ve 21denních cyklech u pacientů s periferním lymfomem T-buněk. Brigatinib působí jako inhibitor ALK a EGFR, a v klinické praxi je používán při léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (Ali, Arshad et al. 2019).

Nejprve byla stanovena specifická aktivita karbonylredukujících enzymů z nadrodiny AKR a SDR vůči antracyklinovému antibiotiku DAU pro vyselektování aktivních enzymů schopných metabolizovat toto léčivo. Dle výsledků měření jsme zjistili, že nejvyšší aktivitu k DAU vykazovaly enzymy CBR1, AKR1C3 a AKR1A1. Následovaly enzymy AKR1B10, AKR7A2 a AKR1B1. Bez známek aktivity k DAU byly zaznamenány enzymy CBR3, AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C4. Nými zjištěná data se shodují s výsledky studie Takahashiho et al. (2008), kteří poukázali na schopnost AKR1A1 metabolizovat DAU a DOX. Oproti tomu enzym AKR1C2 ani v této studii tuto redukční schopnost nevykazoval, proto nebyla zaznamenána žádná tvorba daunorubicinolu a doxorubicinolu. Tým Bainse (2008, 2009, 2010a, 2010b) porovnával aktivitu aldo-ketoreduktas a karbonylreduktas na metabolismu DAU a DOX. Aktivita byla sledována u těchto enzymů – CBR1, CBR3, CBR4, AKR1A1, AKR1C1,

AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR7A2, AKR1B10 a AKR1B1. Nejvyšší aktivita vůči DAU byla zaznamenána u CBR1, AKR1C3, AKR7A2, AKR1A1 a AKR1B10. Můžeme tedy říct, že výsledky našeho testování se shodují s touto studií.

Cílem diplomové práce bylo stanovit, zda alisertib a brigatinib mohou působit jako inhibitory těchto karbonylredukujících enzymů. Nejvyšší inhibiční potenciál, byl zaznamenán u alisertibu (50  $\mu\text{M}$ ) s enzymem AKR1C3, kdy inhibice byla 86 %. Při použití alisertibu (10  $\mu\text{M}$ ) byla zaznamenána 80% inhibice AKR1C3. Změna aktivity byla zaznamenána dále u alisertibu (50  $\mu\text{M}$ ), kdy inhibice enzymu AKR1B1 byla 34 %. Také při inhibici alisertibem (50  $\mu\text{M}$ ) jsme naměřili 56% inhibici u enzymu AKR1B10 a při použití alisertibu (10  $\mu\text{M}$ ) byla inhibice AKR1B10 32 %. Na základě výsledků této práce, by předmětem dalšího měření mohla být  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$  alisertibu a AKR1B10, popřípadě AKR1B1.

U alisertibu bylo dále provedeno stanovení  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$ . Měření bylo provedeno s enzymem AKR1C3. Naměřená hodnota  $\text{IC}_{50}$  byla 0,7  $\mu\text{M}$  a hodnota  $K_i$  byla 1,1  $\mu\text{M}$ . Alisertib vystupoval jako nekompetitivní inhibitor, z čehož lze uvažovat, že se neváže do aktivního místa AKR1C3, a neovlivňuje tedy vazbu DAU do aktivního místa enzymu. Alisertib se může vázat na volný AKR1C3 nebo na jeho komplex s DAU. Pro klinickou praxi je tento fakt důležitým zjištěním, jelikož zvýšená koncentrace DAU neovlivňuje inhibici, tudíž při navýšení dávky DAU nedojde k ovlivnění inhibice alisertibem (Copeland 2000).

Dle studie Zhou et al. (2018) byla stanovena maximální koncentrace alisertibu v plazmě –  $C_{\text{max}} = 2,76 \mu\text{M}$ . Díky této farmakokinetické analýze můžeme říct, že našich naměřených hodnot  $K_i$  a  $\text{IC}_{50}$  jsme schopny v organismu dosáhnout.

Nízké hodnoty  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$  znamenají nízké hodnoty efektivní terapeutické dávky v klinické praxi, což pro pacienta znamená minimální zátěž organismu dalším lékem. Alisertib se tak jeví jako potenciální léčivo v kombinované terapii s DAU.

Nejenom zvýšená kardiotoxicita a rezistence nádorových buněk na léčbu je spojena s výskytem antracyklinredukujících enzymů. Jedná se také o nadměrnou expresi enzymů, která je spjata s patogenezí a nádorovým onemocněním. Například zvýšená exprese AKR1C3 se vyskytuje u nádorových onemocnění jater a jícnu (Zhao et al. 2019). AKR1C3 působí jako 17-ketosteroidreduktasa, a podílí se tak na produkci androgenů u CRPC a u syndromu polycystických vaječníků.

AKR1C3 se zapojuje do metabolismu prostaglandinů a steroidních hormonů, což vede k nádorovému bujení v prsní tkáni (Penning et al. 2015).

Inhibitory antracyklinreduktas se jeví jako potenciálně slibná léčiva, která by mohla zvýšit efektivitu protinádorové terapie. Bylo by tedy vhodné se více zaměřit na vývoj dalších

účinnějších látek a na jejich testování nejen v biochemických, ale i buněčných kulturách, které více odpovídají fyziologickým podmínkám. V případě prokázání jejich účinnosti *in vitro* by pak následovalo *in vivo* testování s využitím xenograftových modelů.

## 7. ZÁVĚR

- Po porovnání specifické aktivity jsme zjistili, že aktivní vůči daunorubicinu jsou enzymy CBR1, AKR1A1, AKR1C3, AKR7A2, AKR1B10 a AKR1B1. Bez známek aktivity se jeví enzymy CBR3, AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C4.
- Alisertibem byly nejvíce inhibovány enzymy AKR1B10 a AKR1C3, kdy při koncentraci alisertibu 50  $\mu\text{M}$  byla inhibice AKR1B10 56% a AKR1C3 86%. Při 10  $\mu\text{M}$  koncentraci alisertibu byla výrazná inhibice AKR1C3 a to 80 %. Brigatinib neinhiboval žádný z testovaných enzymů.
- Hodnota  $\text{IC}_{50}$ , tedy koncentrace alisertibu, při které klesla aktivita AKR1C3 na polovinu, byla 0,7  $\mu\text{M}$ .
- Inhibiční konstanta  $K_i$  alisertibu byla 1,1  $\mu\text{M}$ . Zároveň jsme zjistili, že alisertib je nekompetitivním inhibitorem AKR1C3.

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

### Seznam obrázků

Obr. 1 Chemické struktury DAU, DOX, IDA, EPI .....	- 11 -
Obr. 2 Haber-Weissova reakce .....	- 12 -
Obr. 3 První krok Haber-Weissovy reakce .....	- 13 -
Obr. 4 Druhý krok Haber-Weissovy reakce - Fentonova reakce .....	- 13 -
Obr. 5 Mechanismy tvorby ROS prostřednictvím antracyklinů .....	- 14 -
Obr. 6 Struktura DOX vytvářející adukty s řetězcem DNA .....	- 15 -
Obr. 7 Schéma redukce daunorubicinu na primární metabolit daunorubicinol .....	- 20 -
Obr. 8 Přeměny karbonylových sloučenin v lidském organismu.....	- 21 -
Obr. 9 Schéma fosforylace proteinu prostřednictvím proteinkinas.....	- 30 -
Obr. 10 Brigatinib .....	- 32 -
Obr. 11 Alisertib.....	- 33 -
Obr. 12 Schéma vzniku NADPH v regeneračním systému .....	- 39 -
Obr. 13 Porovnání specifické aktivity jednotlivých enzymů vůči DAU.....	- 50 -
Obr. 14 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1A1 .....	- 51 -
Obr. 15 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR1A1 .....	- 52 -
Obr. 16 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1B1.....	- 53 -
Obr. 17 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR1B1 .....	- 54 -
Obr. 18 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1B10.....	- 55 -
Obr. 19 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR1B10.....	- 56 -
Obr. 20 Vliv alisertibu na aktivitu AKR1C3.....	- 57 -
Obr. 21 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR1C3.....	- 58 -
Obr. 22 Vliv alisertibu na aktivitu AKR7A2 .....	- 59 -
Obr. 23 Vliv brigatinibu na aktivitu AKR7A2.....	- 60 -
Obr. 24 Vliv alisertibu na aktivitu CBR1 .....	- 61 -
Obr. 25 Vliv brigatinibu na aktivitu CBR1 .....	- 62 -
Obr. 26 Graf závislosti aktivity AKR1C3 v % na log koncentrace alisertibu v $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ .....	- 63 -
Obr. 27 Určení typu inhibice podle Lineweavera a Burka.....	- 64 -
Obr. 28 Změna specifické aktivity AKR1C3 v závislosti na koncentraci DAU a alisertibu.....	- 64 -

## Seznam tabulek

Tab. 1 Přehled použitých pomůcek .....	- 36 -
Tab. 2 Přehled použitých přístrojů .....	- 37 -
Tab. 3 Přehled použitých chemikálií .....	- 37 -
Tab. 4 Enzymy .....	- 38 -
Tab. 5 Použité inhibitory a substrát .....	- 38 -
Tab. 6 Složení jednotlivých reakčních směsí pro porovnání aktivity enzymů .....	- 42 -
Tab. 7 Složení jednotlivých reakčních směsí při screeningu inhibitorů .....	- 43 -
Tab. 8 Složení jednotlivých reakčních směsí při stanovení $IC_{50}$ inhibitoru – alisertibu .....	- 44 -
Tab. 9 Složení jednotlivých reakčních směsí při stanovení $K_i$ inhibitoru – alisertibu .....	- 45 -
Tab. 10 Porovnání specifické aktivity karbonylredukujících enzymů vůči DAU. ....	- 49 -
Tab. 11 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1A1 .....	- 51 -
Tab. 12 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1A1 .....	- 52 -
Tab. 13 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1B1 .....	- 53 -
Tab. 14 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1B1 .....	- 53 -
Tab. 15 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1B10 .....	- 54 -
Tab. 16 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1B10 .....	- 55 -
Tab. 17 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR1C3 .....	- 57 -
Tab. 18 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR1C3 .....	- 57 -
Tab. 19 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu AKR7A2 .....	- 59 -
Tab. 20 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu AKR7A2 .....	- 59 -
Tab. 21 Vliv alisertibu na aktivitu enzymu CBR1 .....	- 61 -
Tab. 22 Vliv brigatinibu na aktivitu enzymu CBR1 .....	- 61 -
Tab. 23 Specifická aktivita AKR1C3 vůči alisertibu v různém koncentračním rozmezí ..	- 63 -

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAK	Auroru A kinasa
AKR	aldo-ketoreduktasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloblastická leukémie
ATP	adenosintrifosfát
CBR	karbonylreduktasa
CHF	městnavé srdeční selhání
CNS	centrální nervová soustava
CRE	karbonylredukující enzym
CRPC	karcinom prostaty rezistentní na kastraci
DAU	daunorubicin
20 $\alpha$ -DHP	20 $\alpha$ -dihydroprogesteron
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EKG	elektrokardiografie
EMA	Evropské lékové agentury
EPI	epirubicin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GBH	gama-hydroxybutyrát
Glc-6-P	glukóza-6-fosfát
Glc-6-P dehydrogenasa	glukóza-6-fosfátdehydrogenasa
3 $\alpha$ -HP	3 $\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-20-on
IC <sub>50</sub>	poloviční maximální inhibiční koncentrace
IDA	idarubicin
K <sub>i</sub>	inhibiční konstanta
MDR	dehydrogenasa/reduktasa se středně dlouhým řetězcem
MDR1	mnohočetná léková rezistence
MgCl <sub>2</sub>	Chlorid hořečnatý



NAD(H)	nikotinamidadeninukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NSAID	nesteroidní antiflogistika
PGD2	prostaglandin D2
PGH2	prostaglandin H2
PgP	P-glykoprotein
QR	chinonreduktasa
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDR	dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem
Top1	topoisomerasa 1
Top2	topoisomerasa 2
UHPLC	ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie

## 10. LITERÁRNÍ ZDROJE

Angsutararux P., Luanpitpong S., Issaragrisil S. (2015) Chemotherapy-induced cardiotoxicity: Overview of the roles of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–13. doi: 10.1155/2015/795602

Ali R., Arshad J., Palacio S., Mudad R. (2019) Brigatinib for ALK-positive metastatic non-small-cell lung cancer: design, development and place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 569–580. doi: 10.2147/DDDT.S147499

Arai Y., Endo S., Miyagi N., Abe N., Miura T., Nishinaka T., Terada T., Oyama M., Goda H., El-Kabbani O., Hara A., Matsunaga T., Ikari A. (2015) Structure-activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1 (CBR1) *Fitoterapia*, 101, 51–66. doi: 10.1016/j.fitote.2014.12.010

Ax W., Soldan M., Koch L., Maser E. (2000) Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochemical Pharmacology*, 59(3), 293–300. doi: 10.1016/s0006-2952(99)00322-6

Bains O. S., Takahashi R. H., Pfeifer T. A., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2008) Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(5), 904–910. doi: 10.1124/dmd.107.018895

Bains O. S., Karkling M. J., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2009) Two non-synonymous single nucleotide polymorphisms of carbonyl reductase 1 demonstrate reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Drug Metabolism and Disposition*, 37, 1107–1114. doi: 10.1124/dmd.108.024711

Bains O. S., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2010a) Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3), 533–45. doi:10.1124/jpet.110.173179

Bains O. S., Karkling M. J., Lubieniecka J. M., Grigliatti T. A., Reid R. E. a Riggs K. W. (2010b) Naturally occurring variants of human CBR3 alter anthracycline in vitro metabolism. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 332(3), 755–763. doi: 10.1124/jpet.110.173179

Barski O., 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. doi: 10.1080/03602530802431439

Bhatia C., Oerum S., Bray J., Kavanagh K. L., Shafqat N., Yue W. a Oppermann U. (2015) Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 114–125. doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.013

Binaschi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi C. A., Capranico G. a Animati F. (2001) Anthracyclines: selected new developments. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 1(2), 113–130. doi:10.2174/1568011013354723

Bollimpelli V. S., Dholaniya P. S., Kondapi A. K. (2017) Topoisomerase II $\beta$  and its role in different biological contexts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 633, 78–84. doi: 10.1016/j.abb.2017.06.021

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. doi: 10.1016/j.cbi.2019.01.026

Cagel M., Grotz E., Bernabeu E, Moretton M.A., Chiappetta D.A. (2017) Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discovery Today*, 22(2), 270–281. doi:10.1016/j.drudis.2016.11.005

Callaghan R., Luk F., Bebawy M. (2014) Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? *Drug Metabolism and Disposition*, 42(4), 623–631. doi: 10.1124/dmd.113.056176

Carella A.M., Berman E., Maraone M.P., Ganzina F. (1990) Idarubicin in the treatment of acute leukemias. An overview of preclinical and clinical studies. *Haematologica*, 75(2), 159–69. PMID: 2192943

Copeland R. A. (2000) *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2. vydání, Wiley, 397 stran.

Costa D. B., Shaw A. T., Ou S. I., Solomon B. J., Riely G. J., Ahn M. J., Zhou C., Shreeve S. M., Selaru P., Polli A., Schnell P., Wilner K. D., Wiltshire R., Camidge D. R., Crinò L. (2015) Clinical Experience With Crizotinib in Patients With Advanced ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Brain Metastases. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17), 1881–1888. doi: 10.1200/JCO.2014.59.0539

Cutts S. M., Nudelman A., Rephaeli A., Phillips D.R. (2005) The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life*, 57(2), 73–81. doi: 10.1080/15216540500079093

Cutts S.M., Rephaeli A., Nudelman A., Ugarenko M., Phillips D.R. (2015) Potential Therapeutic Advantages of Doxorubicin when Activated by Formaldehyde to Function as a DNA Adduct-Forming Agent. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(14), 1409–22. doi: 10.2174/1568026615666150413154512

Deng H. B., Parekh H. K., Chow K. C., Simpkins H. (2002) Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 15035–15043. doi: 10.1074/jbc.M112028200

Deyashiki Y., Ogasawara A., Nakayama T., Nakanishi M., Miyabe Y., Sato K., Hara A. (1994) Molecular cloning of two human liver 3  $\alpha$ -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase isoenzymes that are identical with chlordecone reductase and bile-acid binder. *Biochemical Journal*, 299 545–552. doi: 10.1042/bj2990545

Dhagat U., Carbone V., Chung R.P.T., Matsunaga T., Endo S., Hara A. a El-Kabbani O. (2007) A Salicylic Acid-Based Analogue Discovered from Virtual Screening as a Potent Inhibitor of Human 20 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Medicinal Chemistry*, 3(6), 546–550. doi: 10.2174/157340607782360399

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

Filling C., Wu X., Shafqat N., Hult M., Mårtensson E., Shafqat J., Oppermann U.C. (2001) Subcellular targeting analysis of SDR-type hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 171(1–2), 99–101. doi: 10.1016/s0303-7207(00)00419-6

Forrest R. A., Swift L. P., Rephaeli A., Nudelman A., Kimura K., Phillips R. aCutts S. M. (2012) Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochemical Pharmacology*, 83(12), 1602–1612. doi: 10.1016/j.bcp.2012.02.026

Franco V. I., Henkel J. M., Miller T. L. a Lipshultz S. E. (2011) Cardiovascular effects in childhood cancer survivors treated with anthracyclines. *Cardiology Research and Practice*, 1–13. doi: 10.4061/2011/134679

Friedberg J.W., Mahadevan D., Cebula E. (2014) Phase II study of alisertib, a selective Aurora A kinase inhibitor, in relapsed and refractory aggressive B- and T-cell non-Hodgkin lymphomas. *Journal of Clinical Oncology*, 32(1), 44–50. doi:10.1200/JCO.2012.46.8793

Gewirtz D.A. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 727–741. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00307-4

Girault J.A., Greengard P., Nairn A.C. (2017) Regulation of striatal signaling by protein phosphatases. *Handbook of behavioral neuroscience*, 2. vydání, 583–607. doi: 10.1016/B978-0-12-802206-1.00029-5

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

Gross S., Rahal R., Stransky N., Lengauer C., Hoeflich K. P. (2015) Targeting cancer with kinase inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*, 125 (5), 1780–1789. doi:10.1172/JCI76094

Hamilton T.A. (1998) Protein kinases. *Encyclopedia of Immunology*, 2028–2033. doi: 10.1006/rwei.1999.0513

Hanks S.K. (2003) Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology*, 4(5), 111. doi:10.1186/gb-2003-4-5-111

Hao G., Yu Y., Gu B., Xing Y., Xue M. (2015) Protective effects of berberine against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by inhibiting metabolism of doxorubicin. *Xenobiotica*, 45(11), 1024–1029. doi: 10.3109/00498254.2015.1034223

Heibein A. D., Guo B., Sprowl J. A., MacLean D. A., Parissenti A. M. (2012) Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization. *BMC Cancer*, 12, 381. doi:10.1186/1471-2407-12-381

Hellmann K. (1999) Preventing the cardiotoxicity of anthracyclines by dexrazoxane. A real breakthrough. *BMJ*, 319(7217), 1085–1086. doi: 10.1136/bmj.319.7217.1085

Henriksen P.A. (2018) Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart (British Cardiac Society)*, 104 (12), 971–977. doi: 10.1136/heartjnl-2017-312103

Hintzpeter J., Hornung J., Ebert B., Martin H.J., Maser E. (2015) Curcumin is a tight-binding inhibitor of the most efficient human daunorubicin reductase--Carbonyl reductase 1. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 162–168. doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.019

Hintzpeter J., Seliger J.M., Hofman J., Martin H.J., Wsol V., Maser E. (2016) Inhibition of human anthracycline reductases by emodin - A possible remedy for anthracycline resistance. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 293, 21–29. doi: 10.1016/j.taap.2016.01.003

Hoefler 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), 182–92. doi: 10.1007/s12012-015-9327-x

Hofland J., Weerden W. M., Dits N. F., Steenbergen J., van Leenders G. J., Jenster G., et al. (2010) Evidence of limited contributions for intratumoral steroidogenesis in prostate cancer. *Cancer Research*, 70(3), 1256–1264. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2092

Hofman J., Malcekova B., Skarka A., Novotna E. a Wsol V. (2014) Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3), 238–48. doi: 10.1016/j.taap.2014.04.027

Hortobágyi G. N. (1997) Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*, 54(4), 1–7. doi: 10.2165/00003495-199700544-00003

Champoux J. J. (2001) DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 369–414. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.369

Chen W. D., Zhang Y. (2012) Regulation of aldo–keto reductases in human diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 35. doi: 10.3389/fphar.2012.00035

Cheng Q., Kalabus J. L., Zhang J., Blanco J. G. (2012) A conserved antioxidant response element (ARE) in the promoter of human carbonyl reductase 3 (CBR3) mediates induction by the master redox switch Nrf2. *Biochemical Pharmacology*. 83 (1), 139–148. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.027

Chung Y. T., Matkowskyj K. A., Li H., Bai H., Zhang W., Tsao M. S., Liao J., Yang G. Y. (2012) Overexpression and oncogenic function of aldo-keto reductase family 1B10 (AKR1B10) in pancreatic carcinoma. *Modern Pathology*, 25(5), 758–766. doi: 10.1038/modpathol.2011.191

Ichikawa Y., Ghanefar M., Bayeva M., Wu R., Khechaduri A., Prasad S. V. N., Mutharasan R.K., Naik T. J., Ardehali H. (2014) Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(2), 617–630. doi: 10.1172/JCI72931

Ip Y.T., Davis R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*, 10 (2), 205–19. doi:10.1016/S0955-0674(98)80143-9

Ireland L. S., Harrison D. J., Neal G. E. a Hayes J. D. (1998) Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo-keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. *The Biochemical Journal*, 332(1), 21–34. doi: 10.1042/bj3320021

Ito Y., Mitani T., Harada N., Isayama A., Tanimori S., Takenaka S., Nakano Y., Inui H., Yamaji R. (2013) Identification of carbonyl reductase 1 as a resveratrol-binding protein by affinity chromatography using 4'-amino-3,5-dihydroxy-trans-stilbene. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 59(4), 358–364. doi: 10.3177/jnsv.59.358

Jez J.M., Bennett M.J., Schlegel B.P., Lewis M., Penning T.M. (1997) Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Journal*, 326 (3), 625–636. doi: 10.1042/bj3260625

Jiao Q., Bi L., Ren Y., Song S., Wang Q., Wang Y. S. (2018) Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer*, 17, 36. doi: 10.1186/s12943-018-0801-5



Jo A., Choi T.G., Jo Y.H., Jyothi K.R., Nguyen M.N., Kim J.H., Lim S., Shahid M., Akter S., Lee S., Lee K.H., Kim W., Cho H., Lee J., Shokat K.M., Yoon K.S., Kang I., Ha J., Kim S.S. (2017) Inhibition of carbonyl reductase 1 safely improves the efficacy of doxorubicin in breast cancer treatment. *Antioxidans and Redox Signaling*. 26(2), 70–83. doi: 10.1089/ars.2015.6457

Jörnvall, Persson, Krook, Atrian, Gonzalez-Duarte, Jeffery, Ghosh. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*. 34 (18), 6003–13. doi: 10.1021/bi00018a001

Kalabus J. L., Sanborn C. C., Jamil R. G., Cheng Q., Blanco J.G. (2010) Expression of the anthracycline-metabolizing enzyme carbonyl reductase 1 in hearts from donors with Down syndrome. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12), 2096-2099. doi: 10.1124/dmd.110.035550

Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H., Persson B. (2002) Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: A large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Science*, 11(3), 636–641. doi: 10.1110/ps.26902

Kallberg, Y., Persson, B. (2006) Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases: a hidden Markov model-based method and its application on complete genomes. *The FEBS Journal*, 273, 1177–1184.

Kavanagh K. L., Jörnvall H., Persson B. a Oppermann U. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(24), 3895–3906. doi: 10.1007/s00018-008-8588-y

Kelly K.R., Shea T.C., Goy A., Berdeja J.G., Reede C.B., McDonagh K.T., Zhou X., Danaee H., Liu H., Ecsedy J.A., Niu H., Benaim E., Iyer S. (2014) Phase I study of MLN8237--investigational Aurora A kinase inhibitor--in relapsed/refractory multiple myeloma, non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Investigational new drugs*, 32(3), 489–99. doi: 10.1007/s10637-013-0050-9

Knighton D.R., Zheng J.H., Ashford V.A., Xuong N.H., Taylor S.S., Sowadski J.M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, 253 (5018), 407–14. doi:10.1126/science.1862342. PMID 1862342

Krischer J. P., Epstein S., Cuthbertson D. D., Goorin A. M., Epstein M.L. a Lipshultz S. E. (1997) Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *Journal of Clinical Oncology*, 15(4), 1544–52. doi: 10.1200/JCO.1997.15.4.1544

Lan Q., Zheng T., Shen M., Zhang Y., Wang S.S., Zahm S.H., Holford T.R., Leader B., Boyle P., Chanock S. (2007) Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Human Genetics*, 121 (2), 161–8. doi:10.1007/s00439-006-0288-9

Lewis M. J., Wiebe J. P., Heathcote J. G. (2004) Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer*, 4: 27. doi: 10.1186/1471-2407-4-27

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. doi: 10.1016/j.cbi.2011.09.007

Li X., Zou S., Cai Z. L. G., Chen B., Wang P., Dong W. (2016) The identification of human aldo-keto reductase AKR7A2 as a novel cytoglobin-binding partner. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21, 25. doi: 10.1186 / s11658-016-0026-9

Maltthews H.R. (1995) Protein kinase and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacology & Therapeutics*, 67 (3), 323–50. doi: 10.1016/0163-7258(95)00020-8

Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science (N.Y.)*, 298(5600), 1912–34. doi: 10.1126/science.1075762

Marinello J., Delcuratoloa M., Capranico G. (2018) Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3480. doi: 10.3390/ijms19113480

Matsunaga T., Shintani S., Hara A. (2006) Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 21(1), 1–18. doi: 10.2133/dmpk.21.1

Matsunaga T., Yamaguchi A., Morikawa Y., Kezuka C., Takazawa H., Endo S., El-Kabbani O., Tajima K., Ikari A. a Hara A. (2014) Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells. *Anticancer Drugs*, 25(8), 868–77. doi: 10.1097/CAD.0000000000000112

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

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E. (2004) Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56 (2), 185–229. doi: 10.1124/pr.56.2.6

Mordente A., Silvestrini A., Martorana G.E., Tavian D., Meucci E. (2015) Inhibition of anthracycline alcohol metabolite formation in human heart cytosol: a potential role for several promising drugs. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(11), 1691–1701. doi: 10.1124/dmd.115.065110

Morgan R. A., Beck K. R., Nixon M., Homer N. Z. M., Crawford A. A., Melchers D., Houtman R., Meijer O. C., Stomby A., Anderson A. J., Upreti R., Stimson R. H., Olsson T., Michael T., Cohain A., Ruusalepp A., Schadt E. E., Björkegren J. L. M., Andrew R., Kenyon J., Hadoke P. W. F., Odermatt A., Keen J. K., Walker B. R. (2017) Carbonyl reductase 1 catalyzes 20 $\beta$ -reduction of glucocorticoids, modulating receptor activation and metabolic complications of obesity. *Scientific reports*. 7, 10633. doi: 10.1038/s41598-017-10410-1

Murata M., Ohta N., Sakurai S., Alam S., Tsai J., Kador P. F. a Sato S. (2001) The role of aldose reductase in sugar cataract formation: aldose reductase plays a key role in lens epithelial cell death (apoptosis). *Chemico-Biological Interactions*, 130–132, 617–625. doi: 10.1016/S0009-2797(00)00289-1

Nielsen D., Maare C., Skovsgaard T. (1996) Cellular resistance to anthracyclines. *General Pharmacology*. 27(2), 251–5. doi: 10.1016/0306-3623(95)02013-6

Nikonova A.S., Astsaturov I., Serebriiskii I.G., Dunbrack R.L., Golemis E. A. (2012) Aurora-A kinase (AURKA) in normal and pathological cell growth. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(4), 661–687. doi: 10.1007/s00018-012-1073-7

Niu H., Manfredi M., Ecsedy J. A. (2015) Scientific rationale supporting the clinical development strategy for the investigational Aurora A Kinase inhibitor alisertib in cancer. *Frontiers in Oncology*. 5: 189. doi: 10.3389/fonc.2015.00189

Olson R. D., Mushlin P. S., Brenner D. E., Fleischer S., Cusack B. J., Chang B. K., Boucek R. J. (1988) Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States*, 85 (10), 3585–3589. doi: 10.1073/pnas.85.10.3585

Oppermann U. (2007) Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 293–322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105316

Penning T. M., Burczynski M. E., Jez J. M., Hung Ch.-F., Lin H.-K., Ma H., Moore M., Palackal N., Ratnam K. (2000) Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochemical Journal*, 351, 67–77. doi: 10.1042/0264-6021:3510067

Penning T. M., Jin Y., Steckelbroeck S., Lanišnik Rižner T. a Lewis M. (2004) Structure–function of human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215(1–2), 63–72. doi: 10.1016/j.mce.2003.11.006

Penning T. M. (2015) The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 236–246. doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.024

Perez E.A. (2009) Impact, mechanisms and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 114 (2), 195–201. doi: 10.1007/s10549-008-005-6

Persson B., Bray J. E., Bruford E., Dellaporta S. L., Favia A. D., Gonzalez Duarte R., Jörnvall H., Kallberg Y., Kavanagh K. L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning T. M., Thornton J. M., Adamski J., Oppermann U. (2008) The SDR (Short-Chain Dehydrogenase/Reductase and Related Enzymes) Nomenclature Initiative. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1–3), 94–98. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.040

Persson B., Kallberg Y., Bray J. E., Bruford E., Dellaporta S. L., Favia A. D., Duarte R. G., Jörnvall H., Kavanagh K. L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Orchard R. M. S., Penning T. M., Thornton J. M., Adamski J., Oppermann U. (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-biological interactions*, 178(1-3), 94–8. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.040

Petráková K. (2011) Anthracyclines in treating metastatic breast cancer. *Oncology*, 5(1), 23–27.

Picklo M. J., Olson S. J., Hayes J. D., Markesbery W. R. a Montine T. J. (2001) Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. *Brain Research*, 916(1–2), 229–38. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02897-9

Pilka E. S., Niesen F. H., Lee W. H., El-Hawari Y., Dunford J. E., Kochan G., Wsol V., Martin H., Maser E. a Oppermann U. (2009). Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *PloS One*, 4(10), e7113. doi: 10.1371/journal.pone.0007113

Piska, Koczurkiewicz, Bucki, Wójcik-Pszcola, Kolaczowski, Pekala. (2017) Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines - role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drugs*, 35 (3), 375–385. doi: 10.1007/s10637-017-0443-2

Plebuch M., Soldan M., Hungerer C., Koch L. a Maser E. (2007) Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. *Cancer Letters*, 255(1), 49–56. doi: 10.1016/j.canlet.2007.03.018

Puma N., Ruggiero A., Ridola V., Maurizi P., Lazzareschi I., Attinà G., Mastrangelo S., Rosa G.D., Riccardi R. (2008) Anthracycline-related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers, *Signa vitae*, 3(1), 30–34. doi: 10.22514/SV31.042008.4

Quiñones-Lombraña A., Ferguson D., Blair R. H., Kalabus J. L., Redzematovic A., Blanco J. G. (2014) Interindividual variability in the cardiac expression of anthracycline reductases in donors with- and without- Down Syndrome. *Pharmaceutical Research*, 31 (7), 1644–1655. doi: 10.1007/s11095-013-1267-1

Rashid M.A., Lee S., Tak E., Lee J., Choi T.G., Lee J.W., Kim J.B., Youn J.H., Kang I., Ha J., Kim S.S. (2010) Carbonyl reductase 1 protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (10), 1522–33. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.015

Rižner T. L. (2012) Enzymes of the AKR1B and AKR1C subfamilies and uterine diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 3, doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00034>

Rosemond M. J., Walsh J. S. (2004) Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug Metabolism Reviews*, 36(2), 335–361. doi: 10.1081/dmr-120034154

Salvatorelli E., Menna P., Paz O.G., Chello M., Covino E., Singer J.W., Minotti G. (2013) The novel anthracenedione, pixantrone, lacks redox activity and inhibits doxorubicinol formation in human myocardium: insight to explain the cardiac safety of pixantrone in doxorubicin-treated patients. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(2), 467–478. doi: 10.1124/jpet.112.200568

Shen L. Z. 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. doi: 10.1016/j.taap.2011.05.014

Shchemelinin I., Šefc L., Nečas E. (2006) Protein Kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biologica*, 52 (3), 81–100. PMID: 17089919

Schaupp C.M. , White C.C. , Merrill G.F. , Kavanagh T.J. (2015) Metabolism of doxorubicin to the cardiotoxic metabolite doxorubicinol is increased in a mouse model of chronic glutathione deficiency: A potential role for carbonyl reductase 3. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 154–61. doi: 10.1016/j.cbi.2014.11.010

Skarydova L., Nobilis M., Wsol V. (2013) Role of carbonyl reducing enzymes in the phase I biotransformation of the non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone in vitro. *Xenobiotica*, 43(4), 346–54. doi: 10.3109/00498254.2012.720048

Skarydova L., Tomanova R., Havlikova L., Stambergova H., Solich P., Wsol V. (2014) Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29 (2), 177–84. doi: 10.2133/dmpk.dmpk-13-rg-051

Šimůnek T., Štěřba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, 61 (1), 154–71. doi:10.1016/S1734-1140(09)70018-0

Takahashi, Bains, Pfeifer, Grigliatti, Reid, Riggs. (2008) Aldo-keto reductase 1C2 fails to metabolize doxorubicin and daunorubicin in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(6), 991–4. doi: 10.1124/dmd.108.020388

Tebbi, London, Friedman, Villaluna, Constine, Schwartz, Spoto (2007) Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *Journal of Clinical Oncology*, 25(5), 493–500. doi: 10.1200/JCO.2005.02.3879

Tian Y., Zhao L., Zhang H., Liu X., Zhao L., Zhao X., Li Y., Li J. (2014) AKR1C3 overexpression may serve as a promising biomarker for prostate cancer progression. *Diagnostic Pathology*, 9, 42. doi:10.1186/1746-1596-9-42

Varatharajan, Abraham, Zhang, Shaji, Ahmed, George, B., Srivastava, Chandy M., Mathews, Balasubramanian. (2012) Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 68(12), 1577–86. doi: 10.1007/s00228-012-1291-9

Venkatesh P., Kasi A. Anthracyclines. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2019. PMID: 30844214

Vagiannis D., Novotna E., Skarka A., Kammerer S., Küpper H., Chen S., Guoe L., Staudt F., Hofman J. (2020) Ensartinib (X-396) effectively modulates pharmacokinetic resistance mediated by ABCB1 and ABCG2 drug efflux transporters and CYP3A4 biotransformation enzyme. *Cancer*, 12(4), 813. doi: 10.3390/cancers12040813



Vile G. F., Winterbourn C., Sutton H. C. (1987) Radical-driven fenton reactions: Studies with paraquat, adriamycin, and anthraquinone 6-sulfonate and citrate, ATP, ADP, and pyrophosphate iron chelates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 259 (2), 616–626. doi: 10.1016/0003-9861(87)90528-5

Weber T.J. (2010) Protein kinases. *Comprehensive Toxicology*, 473–493. doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00225-6

Wei-Sheng; Liu, Shuangying; Zou, Dong; Thomas, Mathew; Wang, Yihan; Zhou, Tianjun; Romero, Jan; Kohlmann, Anna; Li, Feng. (2016) Discovery of brigatinib (AP26113), a phosphine oxide-containing, potent, orally active inhibitor of anaplastic lymphoma kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59 (10), 4948–64. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00306

Wermuth B. (1981) Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *Journal of biological Chemistry*, 256 (3), 1206–13. PMID: 7005231

Wsol V., Szotakova B., Martin H.-J., Maser E. (2007) Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology*, 278, 111–118. doi: 10.1016/j.tox.2007.05.021

Zeng C. M., Chang L. L., Ying M. D., Cao J., He Q. J., Zhu H., Yang B. (2017) Aldo–keto reductase AKR1C1–AKR1C4: functions, regulation, and intervention for anti-cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 119. doi: 10.3389/fphar.2017.00119

Zhang L., Zhang H., Zhao Y., Li Z., Chen S., Zhai J., Chen Y., Xie W., Wang Z., Li Q., Zheng X. a Hu X. (2013) Inhibitor selectivity between aldo–keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: Role of Trp112 (Trp111). *FEBS Letters*, 587, 3681–3686. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.031

Zhao S. F., Wang S.G., Zhao Z. Y., Li W. L. (2019) AKR1C1-3, notably AKR1C3, are distinct biomarkers for liver cancer diagnosis and prognosis: Database mining in malignancies. *Oncology Letters*, 18(5), 4515–4522. doi: 10.3892/ol.2019.10802

Zhong T., Xu F., Xu J., Liu L., Chen Y. (2015) Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) is associated with the doxorubicin resistance in human breast cancer via PTEN loss. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 69, 317–325. doi: 10.1016/j.biopha.2014.12.022

Zhou X., Nemunaitis J., Pant S., Bauer T. M., Patel M., Sarantopoulos J., Lockhart A. C., Goodman D., Huebner D., Mould D. R., Venkatakrishnan K. (2018) Effect of alisertib, an investigational aurora a kinase inhibitor on the QTc interval in patients with advanced malignancies. *Investigational New Drugs*, 36(2), 240–247. doi: 10.1007/s10637-017-0498-0

Zhuo-shen Zhao, Ed Manser. (2012) PAK family kinases - physiological roles and regulation. *cell logist.* 1; 2(2): 59–68. doi: 10.4161/cl.21912

## 11. INTERNETOVÉ ZDROJE

1. Cancer. World Health Organization. [online]. [cit. 6. 1. 2020]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Epirubicin. MedlinePlus. [online]. [cit. 23. 9. 2019]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a603003.html>
3. Antracykliny – kardiotoxicita a kardioprotekce – se zaměřením na mechanismus účinku. *Iakardiologie*. [online]. [cit. 23. 9. 2019]. Dostupné z: <https://www.iakardiologie.cz/pdfs/kar/2016/02/11.pdf>
4. Doxorubicin „Ebewe“ 2 mg/ml. Souhrn údajů o přípravku. [online]. [cit. 8. 11. 2019]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0122068&tab=texts>
5. AKR superfamily. [online]. [cit. 11. 11. 2019]. Dostupné z: <https://hosting.med.upenn.edu/akr/nomenclature/>
6. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Brigatinib, CID=68165256. [online]. [cit. 16. 12. 2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Brigatinib>
7. Brigatinib. [online]. [cit. 16. 12. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548523/>

8. European Medicines Agency. Alunbrig. INN – brigatinib. [online]. [cit. 16. 12. 2019]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/alunbrig-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/alunbrig-epar-product-information_en.pdf)
9. EU Clinical Trials Register. [online]. [cit. 28. 2. 2020]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=2013-002134-21>
10. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Alisertib, CID=24771867. [online]. [cit. 16. 12. 2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alisertib>
11. EU Community Register of Medicinal Products. Alisertib. [online]. [cit. 18. 12. 2019]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/o1074.htm>  
<https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/o1064.htm>
12. Clinical Trials. Study to Compare Alisertib With Paclitaxel vs. Paclitaxel Alone in Metastatic or Locally Recurrent Breast Cancer. [online]. [cit. 18. 12. 2019]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02187991>