

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra biochemických věd**

**VLIV EVOBRUTINIBU NA REZISTENCI**  
**NÁDOROVÝCH BUNĚK K DAUNORUBICINU**  
**ZPŮSOBENOU ENZYMY REDUKUJÍCÍMI**  
**KARBONYLOVÉ SKUPINY**

Rigorózní práce

Mgr. Katharina Zenkerová

Vedoucí Rigorózní práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Mgr. Katharina Zenkerová

## **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

Katharina Zenkerová

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své rigorózní práce prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D., který mě přijal i přes svoji vytíženost na svou katedru biochemických věd a zasvětil mě do probíhajících experimentů a za možnost podílet se na zajímavých výzkumných aktivitách katedry biochemických věd v rámci své rigorózní práce. Děkuji za konzultace, cenné rady a připomínky, díky kterým jsem mohla svoji rigorózní práci zpracovat co nejlépe.

Děkuji také Mgr. Lence Laštovičkové za vysvětlení všech postupů, poskytnutí materiálů a dalších podkladů vztahujících se k prováděným experimentům, za všechn věnovaný čas, ochotu a trpělivost při řešení problémů.

Ráda bych zde poděkovala i zbytku katedry biochemie, za poskytnutí všech přístrojů, pomůcek a materiálů, a také všem laborantkám.

V neposlední patří mé poděkování přátelům a rodině za jejich podporu a jejich motivování k dokončení této práce.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Katharina Zenkerová

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

Název rigorózní práce: Vliv evobrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou enzymy redukujícími karbonylové skupiny

Již po desítky let patří anthracykliny (ANT) do první linie léčiv proti mnoha druhům rakoviny, včetně akutní myeloidní leukémie. Tato chemoterapeutika cílí na topoisomerasu II, jsou schopny zabránit syntéze DNA a RNA za pomoci interkalace a indukují apoptózu tvorbou reaktivních forem kyslíku. Stejně jako u mnoha jiných chemoterapeutik jejich použití přináší řadu nežádoucích účinků, zejména kardiotoxicitu a rozvoj rezistence. Za kardiotoxicitu je zodpovědný hydroxylový metabolit ANT vznikající redukcí karbonylové skupiny v poloze 13. Tento metabolit je také mnohem méně cytotoxický, nadměrnou metabolizací ANT tak získávají rakovinné buňky odolnost vůči jejich účinkům. Redukce ANT se účastní NADPH dependentní karbonyl redukující enzymy (CRE), především z nadrodin aldo-keto reduktas a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem. Tyto enzymy jsou často nadměrně exprimované v rakovinných buňkách a mohly by tak být vhodným cílem budoucích moderních chemoterapeutik. Inhibiční vlastnosti k CRE byly zjištěny také u zástupců inhibitorů cyklin-dependentních kinas, fosfoinositid-3-kinas, poly(ADP ribóza) polymeras a Brutonových tyrosinkinas (BTK). V návaznosti na tyto objevy byly v rámci této rigorózní práce testovány účinky BTK inhibitoru evobrutinibu (Evo) na vybrané CRE *in vitro*. Vybrané enzymy byly inkubovány se substrátem daunorubicinem a s inhibitorem Evo. Za využití UHPLC a programu GraphPad byly vyselektovány enzymy, nejvíce inhibované Evo a určeny jejich hodnoty  $IC_{50}$ . U nejsilněji inhibovaného enzymu (AKR1C3) byla určena také hodnota  $K_i$ , typ inhibice a typ vazby na enzym. Evo je nový zástupce inhibitorů BTK inhibující nekompetitivně zejména enzym AKR1C3 ( $IC_{50}$  = 1,721  $\mu$ M;  $K_i$  = 1,81  $\mu$ M), znemožňující tak redukci daunorubicinu na jeho kardiotoxický a méně účinný metabolit

daunorubicinol. AKR1C3 je jedním z hlavních enzymů metabolizujících ANT a jeho inhibice by mohla být klíčem k řešení problému spojených s užíváním ANT.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Katharina Zenkerová

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

Title of diploma thesis: Effect of evobrutinib on cancer cell resistance to daunorubicin caused by carbonyl reducing enzymes

Anthracyclines (ANT) have been among the first line treatments for many types of cancer, including acute myeloid leukemia, for decades. These chemotherapeutic agents target topoisomerase II, interfere with DNA and RNA synthesis by intercalation, and induce apoptosis by forming reactive oxygen species. As with many other chemotherapeutics, administration of ANT is associated with a range of adverse effects, particularly cardiotoxicity and resistance. The culprit responsible for this cardiotoxicity is the hydroxy metabolite of ANT, formed by reduction of the carbonyl group at position 13. This metabolite is also considerably less cytotoxic; cancer cells excessively metabolize ANT, thus developing resistance to their effects. Enzymes involved in the ANT reductions are NADPH dependant carbonyl reducing enzymes, primarily from aldo-keto reductase and short-chain dehydrogenase/reductase superfamilies. These enzymes are frequently over-expressed in cancer cells and they might be an attractive target of novel chemotherapeutics. Inhibitory effects towards CRE have already been observed in some cyclin-dependent kinase inhibitors, phosphoinositide 3-kinase inhibitors, poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors, and Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors. Following these findings, the effects of a BTK inhibitor evobrutinib (Evo) were tested on a selection of CRE *in vitro* within this thesis. Selected enzymes were incubated with substrate daunorubicin and inhibitor Evo. Using the UHPLC system and GraphPad program, the most inhibited enzymes were determined, and their IC<sub>50</sub> values were calculated. For the most inhibited enzyme (AKR1C3) K<sub>i</sub>, type of inhibition and type of bonding were determined. Evo is a novel BTK inhibitor, non-competitively inhibiting the enzyme AKR1C3 (IC<sub>50</sub>= 1,721 μM; K<sub>i</sub>= 1,81 μM), therefore counteracting the

reduction of daunorubicin to its cardiotoxic and less effective metabolite daunorubicinol. AKR1C3 is one of the chief enzymes reducing ANT, and its inhibition may be the key to solving the problems associated with ANT administration.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
2.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A MOŽNOSTI LÉČBY .....	10
2.2 ANTHRACYKLINY .....	14
2.3 RESISTENCE PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV.....	21
2.4 ENZYMY REDUKUJÍCÍ KARBONYLOVÉ SKUPINY .....	25
2.4.1 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	26
2.4.2 Aldo-keto reduktasy (AKR) .....	28
2.5 EVOBRUTINIB A DALŠÍ INHIBITORY CRE .....	37
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>42</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>43</b>
4.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	43
4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	44
4.3 METODIKA PRÁCE .....	45
4.3.1 Princip reakcí.....	45
4.3.2 Typy reakcí a jejich složení .....	45
4.3.3 Podrobný postup experimentu .....	50
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>55</b>
5.1 ZÁKLADNÍ SCREENING .....	55
5.2 STANOVENÍ HODNOTY $IC_{50}$ .....	64
5.3 URČENÍ TYPU INHIBICE A INHIBIČNÍ KONSTANTY $K_i$ .....	67
5.4 URČENÍ TYPU VAZBY INHIBITORU NA ENZYM.....	68
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>70</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>73</b>
<b>8. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>74</b>
<b>9. CITACE</b> .....	<b>77</b>
<b>10. INTERNETOVÉ ZDROJE</b> .....	<b>96</b>



# 1. ÚVOD

Přestože první anthracykliny (ANT) byly objeveny už v 60. letech minulého století, tyto látky a jejich analoga se dodnes používají v onkologii jako léky první linie pro řadu hematologických i solidních tumorů. Přes vysokou účinnost této skupiny antineoplastik je jejich použití limitováno především pro riziko vzniku kardiomyopatie a rezistence (Marinello et al. 2018).

Na mechanismu výskytu těchto nežádoucích účinků se podílí enzymy z nadrodin aldo-keto reduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), jejichž působením dochází k redukci ANT na jejich méně účinné a kardiotoxické hydroxy metabolity. Tyto enzymy jsou navíc často nadměrně exprimovány v rakovinných buňkách, zejména u pacientů rezistentních na ANT (Piska et al. 2017, Novotná et al. 2008).

V návaznosti na tato zjištění byly testovány účinky inhibitorů kinas na enzymy z nadrodin AKR a SDR *in vitro* i *ex vivo* a prokázal se jejich potenciál ve snížení rezistence a kardiotoxicity ANT (Novotná E. 2018, Bukum N. 2019, Tavares T. 2020, Morell A. 2021).

Na tyto výsledky navazuje i tato Rigorózní práce, jejímž cílem bylo zjistit, zdali podobné účinky na karbonyl redukující enzymy (CRE) vykazuje také inhibitor Brutonovy thyrosin kinasy (BTK) evobrutinib (Evo), do jaké míry a zdali by bylo možné účinky tohoto inhibitoru potenciálně využít při léčbě ANT.

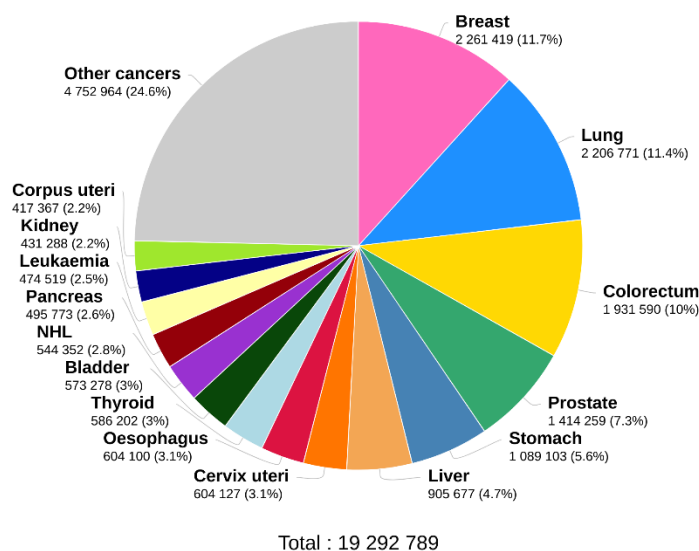
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A MOŽNOSTI LÉČBY

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní onemocnění kostní dřeně, při kterém dochází k nekontrolovatelnému dělení nezralých myeloidních kmenových buněk, jako jsou červené krvinky, destičky a bílé krvinky jiné než T a B lymfocyty. U více než 97 % případů se u pacientů vyskytuje genetická abnormalita (Patel et al. 2012), příčinou vzniku nemoci však může být také předešlá léčba alkylačními látkami, inhibitory topoisomerasy II (top2), nebo expozice radiacnímu záření. Kromě genetických faktorů a předešlé cytotoxické léčby patří mezi rizikové faktory také životní styl, kouření, obezita (Kouchkovsky et al. 2016).

Leukémie patří mezi poměrně vzácné malignity, v roce 2020 tvořily dle International Agency for Research on Cancer (IARC) odhadem 2,5 % nových případů všech onkologických onemocnění celosvětově (Obr. 1), přičemž AML tvoří přibližně jednu třetinu všech diagnostikovaných leukémií (Pelcovits et al. 2013).

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages



Data source: Globocan 2020  
Graph production: Global Cancer  
Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer  
World Health  
Organization

Obr. 1 Odhadovaný počet nových případů onkologických onemocnění celosvětově, pro obě pohlaví, pro rok 2020 (Internet 1)

Světová zdravotnická organizace (WHO) rozděluje ve svých guidelineech AML do šesti skupin, a to: AML s rekurentními genetickými abnormalitami, AML s myelodysplastickými změnami, myeloidní neoplasmy v důsledku předchozí terapie, AML nezařazená jinde, myeloidní sarkom a myeloidní proliferace u Downova syndromu (Obr. 2).

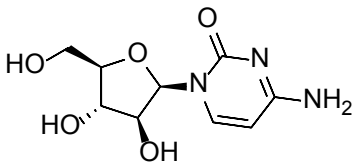
#### **Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms**

AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with <i>PML-RARA</i>
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Provisional entity: AML with BCR-ABL1</i>
AML with mutated <i>NPM1</i>
AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated RUNX1</i>
AML with myelodysplasia-related changes
Therapy-related myeloid neoplasms
AML, NOS
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Pure erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis (TAM)
Myeloid leukemia associated with Down syndrome

Obr. 2 Klasifikace AML dle WHO (Arber et al. 2016)

Kritériem pro diagnózu AML je 20% a vyšší podíl nezralých myeloidních prekurzorů (blastů) v kostní dřeni nebo periferní krvi (Döhner et al. 2010; Arber et al. 2016). Klinické manifestace AML vznikají důsledkem akumulace nediferenciovaných myeloidních buněk, dochází k selhání kostní dřene a vývoji anemie a trombocytémie, které mohou být doprovázeny také nespecifickými příznaky, jako je únava či úbytek na váze. Neléčený pacient umírá během několika měsíců důsledkem infekce nebo krvácení (Kouchkovsky et al. 2016).

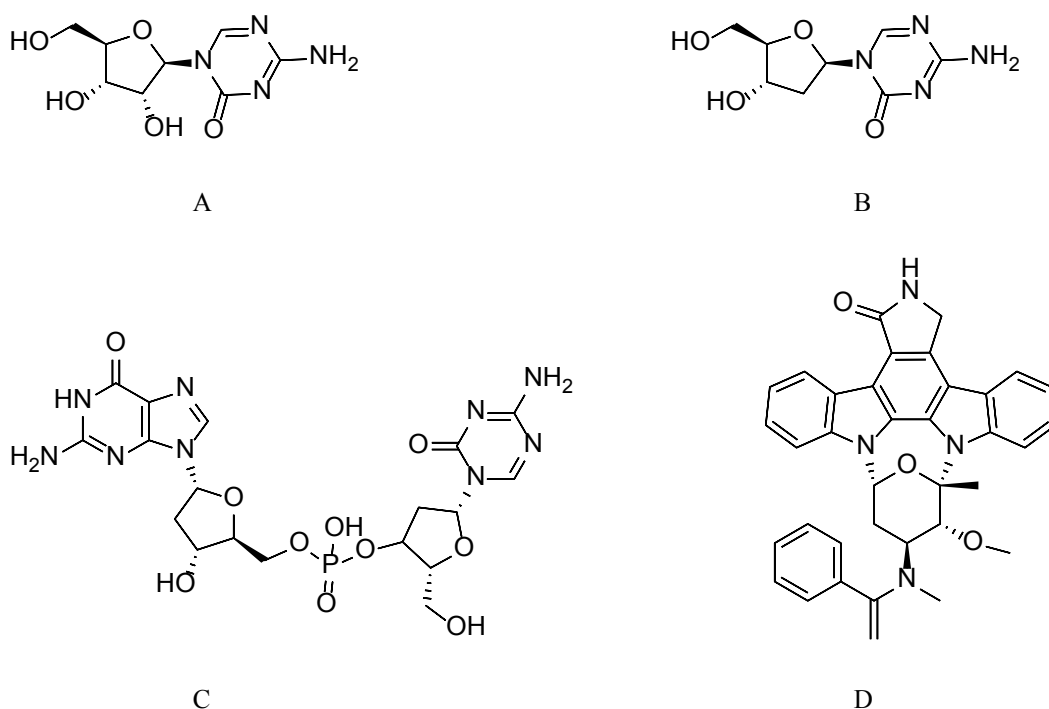
Přestože incidence AML se neustále zvyšuje, mortalitu se vzhledem ke zlepšující zdravotní péči daří snižovat. Úspěšnost léčby klesá se zvyšujícím se věkem a výskytem komorbidit, s vyšším věkem se také častěji objevuje rezistence na léčbu a tzv. mortalita spojená s léčbou (Döhner et al. 2017). Strategie terapie zůstává už desítky let téměř neměnná přes veškeré nové poznatky o patogenezi a molekulární heterogenitě AML. Mezi standardní terapii AML patří kombinace ANT s cytarabinem (Obr. 3) v tzv. 7 + 3 režimu, dále transplantace hematopoetických kmenových buněk a modernější cílená léčba, přičemž pětileté celkové přežití odpovídá 40 % u pacientů mladších 60 let a pouze 10–20 % u pacientů starších 60 let, kteří tvoří většinu nemocných AML (Döhner et al. 2010, Döhner et al. 2015).



Obr. 3 Cytarabin

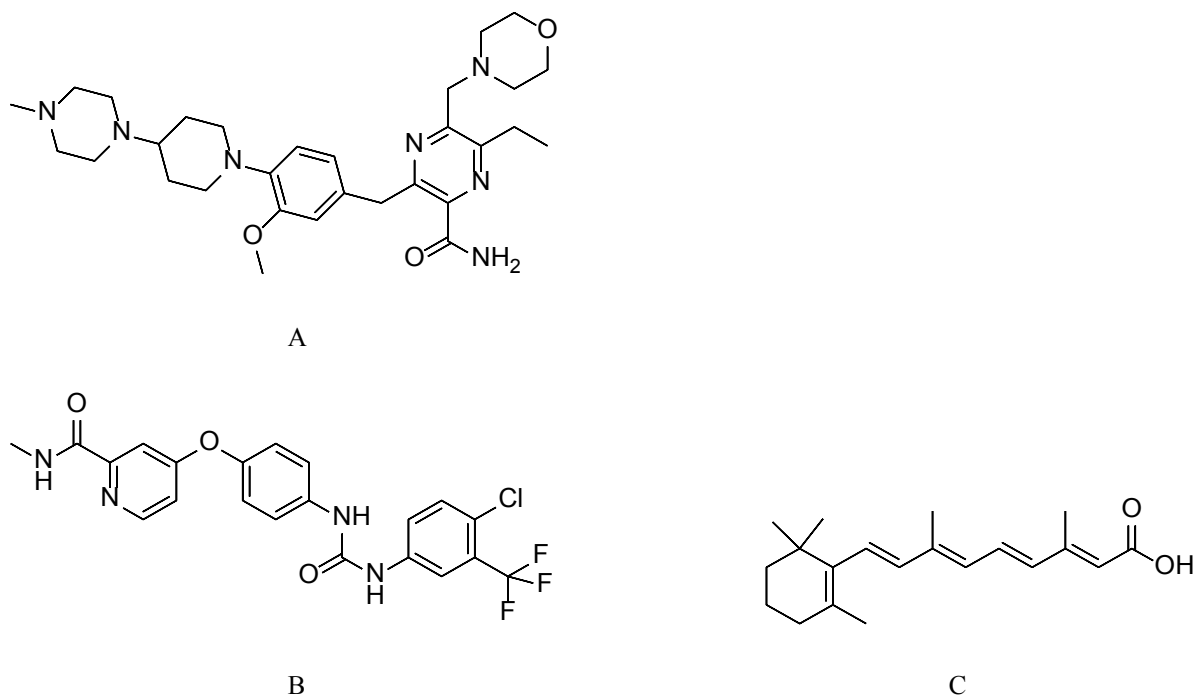
Pro nově diagnostikované pacienty mladší 60 let je jako indukční terapie doporučena kombinace ANT po tři dny a cytarabinu po 7–10 dní. U pacientů nad 60 let je nutné brát v potaz prognózu, komorbiditu a celkový stav pacienta. V případě příznivé prognózy je také doporučován 7 + 3 režim ANT s cytarabinem v intenzivní či snížené dávce, v opačném případě transplantace kmenových buněk. Co se týče post-remisní terapie, seniorům nad 60 let s příznivou prognózou může být podáván také samostatně cytarabin ve snížené dávce (Yang et al. 2018). Nověji se používá také fixní kombinace cytarabinu a daunorubicinu (Dau) enkapsulovaná v liposomu v molárním poměru 1:5 (Vyxeos, CPX-351), která prokázala zvýšení celkového přežití oproti konvenčnímu 7 + 3 režimu (Tzogani et al. 2020).

Novější strategie léčby zahrnují cílenou terapii. Schválené jsou DNA hypometylující přípravky azacitidin (Obr. 4A) a decitabin (Obr. 4B), které jsou pro svoji toleranci vhodné i pro starší pacienty s nepříznivou prognózou. Léčba azacitidinem významně snižuje míru mortality v porovnání s konvenční léčbou (Wen et al. 2020). Klinické testy aktuálně probíhají na hypometylující přípravek druhé generace guadecitabin (Obr. 4C), dinukleotid decitabinu, který je odolný vůči cytidin deaminase a může tak prodloužit působení decitabinu *in vivo* (Yang et al. 2018, Sébert et al. 2019).



Obr. 4 A: Azacitidin; B: Decitabin; C: Guadecitabin; D: Midostaurin

Centralizovaně registrované jsou v EU inhibitory FMS podobné thyrosinkinasy (FLT3) midostaurin (Obr. 4D), gilteritinib (Obr. 5A) indikované u pacientů s mutací FLT3, které se vyskytují u cca 30 % dospělých pacientů s AML (Daver et al. 2015, Internet 2, 3). Dalším zkoumaným inhibitorem FLT3 v indikaci AML je sorafenib (Obr. 5B), který je prozatím schválený Evropskou lékovou agenturou (EMA) v indikaci hepatocelulárního karcinomu, renálního karcinomu a karcinomu štítné žlázy (Internet 4). Mutací, vyskytující se u 25 % AML pacientů, je mutace nukleofosminu 1 (NPM1). NPM1 onkoprotein může být cílem all-trans-retinová kyselina (ATRA) (Obr. 5C) a oxidu arsenitého, které způsobí jeho degradaci a apoptózu. To může vést ke zvýšení senzitivity leukemické buňky k ANT daunorubicinu a zvýšit tak jeho účinnost (Martelli et al. 2015).



Obr. 5 A: Gilteritinib; B: Sorafenib; C: ATRA

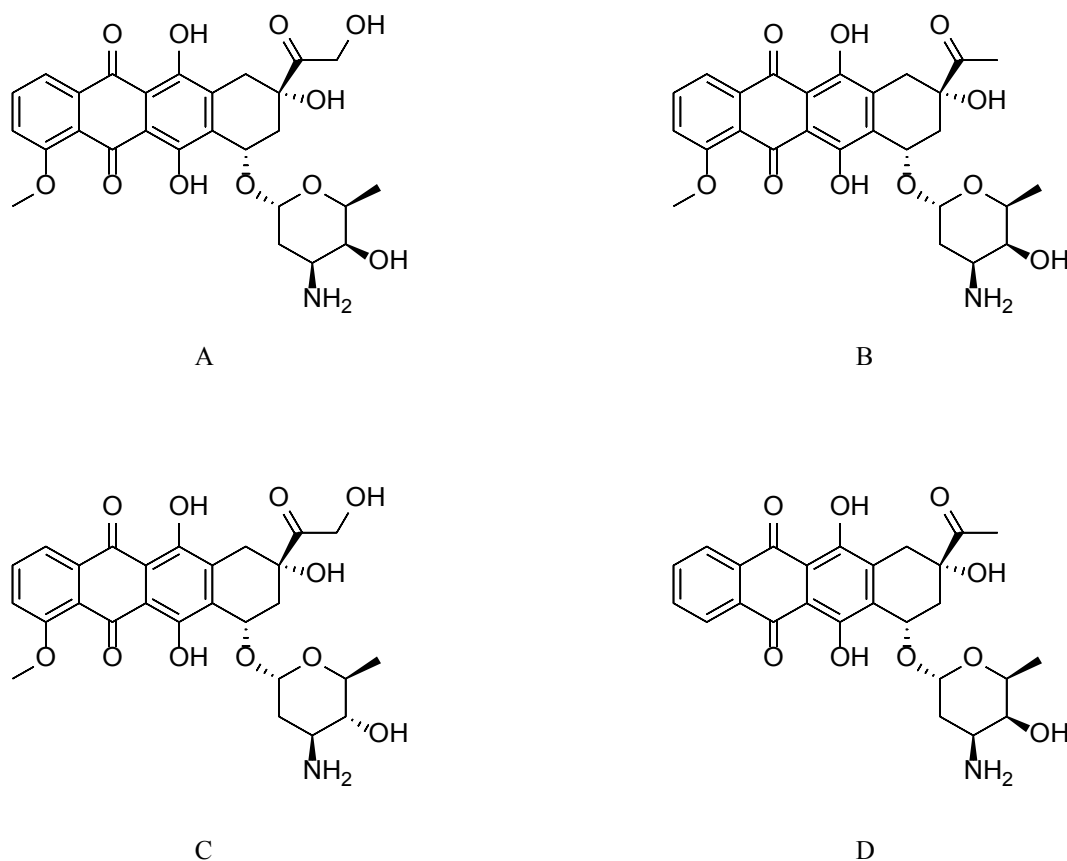
Velké pozornosti se v posledních letech těší také imunoterapie, která využívá strategie posílení imunity proti rakovinným buňkám. Zkoumané jsou monoklonální protilátky cílící na CD33 a CD123, checkpoint inhibitory a chimérické antigenní receptorové T-buňky (Yang et al. 2018).

Přes veškeré snahy o vyvinutí co nejúčinnější léčby, pouze necelá jedna třetina nemocných s AML dosáhne trvalé remise (Vago et al. 2020). Pro vysokou heterogenitu AML, výskyt rezistence, závažných nežádoucích účinků a rozdílné odpovědi na léčbu u jednotlivých pacientů je výběr nejvhodnější terapie velmi obtížný. Vědci proto pokračují v hledání optimální terapie a nových kombinací, které by byly řešením těchto problémů.

## 2.2 ANTHRACYKLINY

Již od roku 1970 je kombinace cytarabinu s ANT stěžejní terapií v léčbě AML (Marinello et al. 2018). ANT byly poprvé extrahovány ze *Streptomyces spp.* a jsou dodnes používány pro nespočet druhů onkologických onemocnění, včetně AML. Cílem ANT je enzym topoisomerasa II, zodpovědný za správnou replikaci DNA. Top2 se váže na dvoušroubovici a vytváří na vláknech DNA přechodné zlomy. Top2 inhibitor tento komplex stabilizuje

a zlomy zůstanou ireverzibilní, což eventuelně vede k apoptóze buňky. ANT tedy cílí na buňky rychle se dělící. Mimo inhibice Top2 mají ANT schopnost interkalace, kdy se začlení mezi jednotlivé báze v řetězci DNA a brání tak syntéze DNA a RNA (Venkatesh et al. 2021). Na aktivaci apoptózy se podílí také tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), jejichž produkce v srdečním svaly je považována za příčinu vysoké kardiotoxicity ANT (Ferreira et al. 2008). Mezi ANT, využívané v onkologické léčbě nejvíce, patří doxorubicin (Dox), danorubicin, epirubicin a idarubicin (Obr. 6A-D). V onkologii nachází své využití také k léčbě karcinomu prsu, endometria, močového měchýře nebo Hodgkinova a non-Hodgkinova lymfomu.



Obr. 6 A: Doxorubicin; B: Daunorubicin; C: Epirubicin; D: Idarubicin

Dau nachází své využití zejména k léčbě leukémií, zatímco Dox, lišící se pouze jednou hydroxylovou skupinou, se využívá k léčbě jak solidních, tak nesolidních tumorů. Mezi frekventované nežádoucí účinky patří mukositida, myelosuprese, alopecie, nauzea, zvracení, stomatitida a kumulativní kardiotoxicita. Jejich použití je proto limitováno maximální

doporučenou kumulativní dávkou, která činí 550 mg/m<sup>2</sup> pro Dau a 450-550 mg/m<sup>2</sup> pro Dox (Edwardson et al. 2012). Epirubicin, vznikající z Dox epimerizací hydroxylové skupiny v poloze 4', je mnohem snadněji glukuronidován, než Dox a jeho doporučená kumulativní dávka tak tvoří téměř dvojnásobek 900-1000 mg/m<sup>2</sup> (Fumoleau et al. 2006). Idarubicin je analog Dau, lišící se chybějící methoxy skupinou na uhlíku 4. Idarubicin se osvědčil při léčbě leukémií a je jediným ANT, který lze podávat kromě intravenózní (i.v.) cesty i perorálně. Chybějící methoxy skupina má za následek vzestup lipofility, delší poločas přeměny cytostatika, ale také snadnější kumulaci v buňkách a vyšší cytotoxicitu v porovnání s Dox a Dau (Tab. 1)

Tab. 1 Porovnání dávkování, poločasu přeměny cytostatika a vedlejších účinků nepoužívanějších ANT

<b>Anthracyklin</b>	<b>Maximální doporučená dávka [mg/m<sup>2</sup>]</b>	<b>Poločas přeměny cytostatika [hod]</b>	<b>Vedlejší účinky</b>
<b>Doxorubicin</b>	450-600	1-3	Kardiotoxicita, mukositida, nevolnost, zvracení
<b>Daunorubicin</b>	550	14-20	Kardiotoxicita, mukositida, myelosuprese, nevolnost, zvracení, alopecie
<b>Epirubicin</b>	900-1000	33	Myelosuprese, kardiotoxicita, nevolnost, zvracení, mukositida
<b>Idarubicin</b>	>160	12-27	Kardiotoxicita, myelosuprese, mukositida, nevolnost, zvracení, alopecie

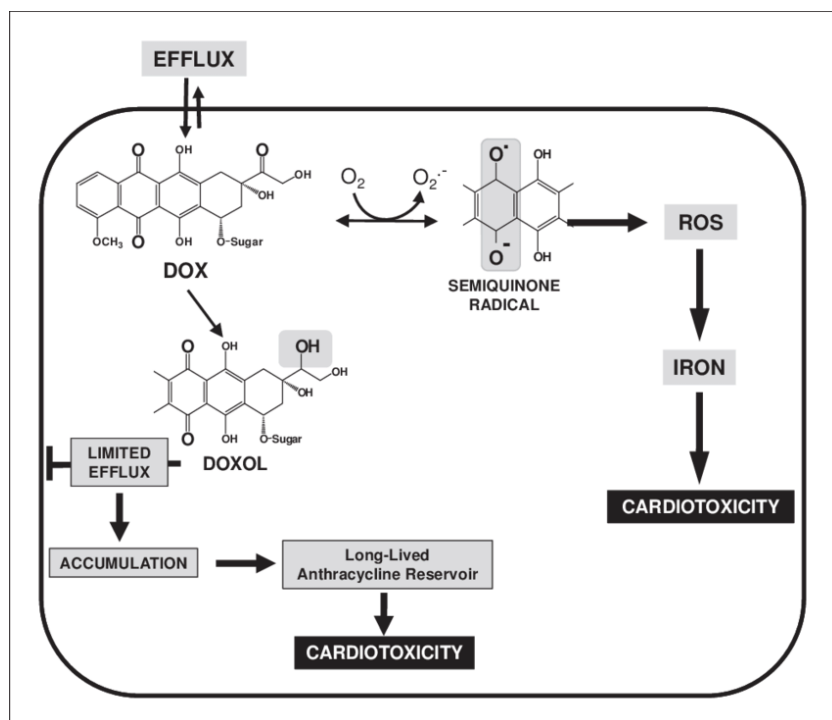
### **Farmakokinetika**

ANT (kromě idarubicinu) se nevstřebávají perorálně, je proto nutné i.v. podání, nebo intravezikální podání v indikaci rakoviny močového měchýře. ANT nepronikají přes hematoencefalickou bariéru a po aplikaci se váží na plazmatické proteiny až z 80 %. Jsou typické svojí rychlou distribucí a pomalou eliminací. Typická je metabolizace za pomoci dvou-elektronové redukce ketonické skupiny v poloze 13 na skupinu hydroxylovou, jednoelektronová redukce na semichinon doprovázené tvorbou ROS a nejméně frekventovaná deglykosidace končící tvorbou deoxyaglykonu (Edwardson et al. 2015). Eliminace probíhá především žlučí, zvláštní opatrnosti je proto nutné u pacientů s jaterním onemocněním (Robert et al. 1993, Venkatesh et al. 2021).



## Kardiotoxicita

Mezi nejzávažnější a nejobávanější nežádoucí účinky této skupiny léčiv patří kardiotoxicita, která snižuje kvalitu života a zvyšuje úmrtnost pacientů nezávisle na onkologické prognóze. Neléčená ANT indukovaná kardiotoxicita vede ke snížení ejekční frakce levé komory (LVEF) a eventuálně k srdečnímu selhání. Incidence je vyšší u pacientů mladších 5 let a starších 65 let, pacientů již trpících srdečním onemocněním, nebo s výskytem rizikových faktorů pro kardiovaskulární onemocnění a pacientů podstupujících radioterapii oblasti hrudníku (Cardinale et al. 2020). Riziko se zvyšuje také s vyšším dávkováním ANT nebo užíváním trastuzumabu (Bloom et al. 2016). Přestože přesný mechanismus účinku vzniku kardiotoxicity není znám, za mediátor vzniku kardiotoxicity je považována topoisomerasa II, kterou ANT inhibují. Při inhibici Top2 dochází k uvolňování ROS, způsobující oxidační stres, který vede k poškození kardiomyocytů. Druhým mediátorem vzniku kardiotoxicity je sekundární hydroxylový metabolit ANT, který narozdíl do jeho prekursoru nepodléhá efluxu z buněk ven a dochází tak k jeho hromadění kardiotoxickému působení (Obr. 7, Menna et al. 2017). Podle studie z roku 2015, prováděné na vzorku 2 625 pacientů, se kardiotoxicita vyvine v 98 % do jednoho roku od zahájení užívání ANT (Cardinale et al. 2015).

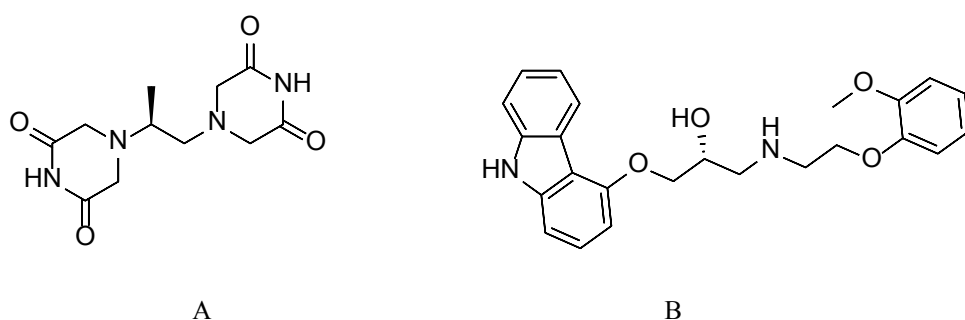


Obr. 7 Determinanty kardiotoxického působení ANT (Menna et al. 2017)

Včasná detekce a zahájení léčby jsou klíčové pro výraznější zotavení srdeční funkce. Diagnostické metody zahrnují Dopplerovskou a zátěžovou echokardiografii, při které se detekuje snížení LVEF. Standardním biomarkerem pro detekci kardiotoxicity je troponin, jehož hladiny se zvyšují s postižením srdce a korelují s mírou snížení LVEF (Shafi et al. 2017). Měřením hladin troponinu můžeme také předpovědět pravděpodobnost budoucího vývoje srdečního poškození a identifikovat pacienty s potřebou kardioprotekce.

### Možnosti kardioprotekce při léčbě anthracykliny

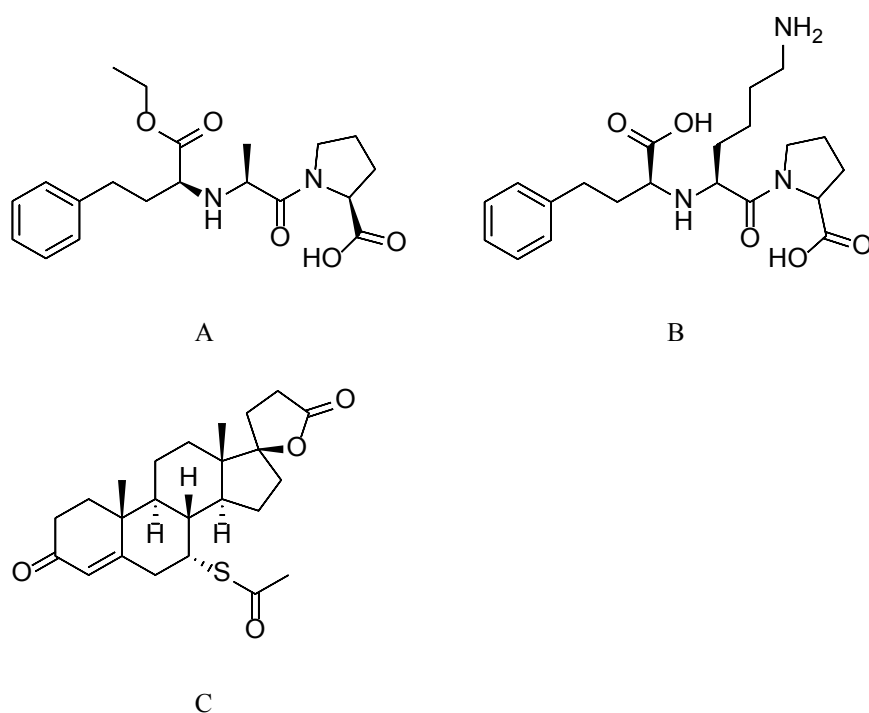
Od roku 1980 se jako kardioprotektivní látka používá dexrazoxan (Obr. 8A), látka strukturně podobná kyselině edetové (EDTA), který funguje jako chelatační činidlo iontů železa (Nitiss et al. 2014). Vychytáváním iontů železa zabraňuje dexrazoxan tvorbě ROS a snižuje tak riziko kardiotoxicity u pacientů léčených ANT a jinými kardiotoxickými léky. Mimo to dexrazoxan katalyticky inhibuje Top2 $\beta$  isoformu topoisomerasy, která se vyskytuje v nedělicích se buňkách, např. kardiomyocytech. Tím zabraňuje působení ANT na tyto buňky (Nitiss et al. 2009). V roce 2011 byl dexrazoxan EMA kontraindikován u dětí a dospívajících pro podezření zvýšení rizika vzniku sekundárních malignancí, infekce a myelosuprese (Internet 5). V následujících letech byl však přezkoumán poměr riziko/benefit a přínos dexrazoxanu u dětí a dospívajících byl potvrzen, kontraindikace u této věkové skupiny byla v roce 2017 odstraněna (Internet 6, Reichardt et al. 2018).



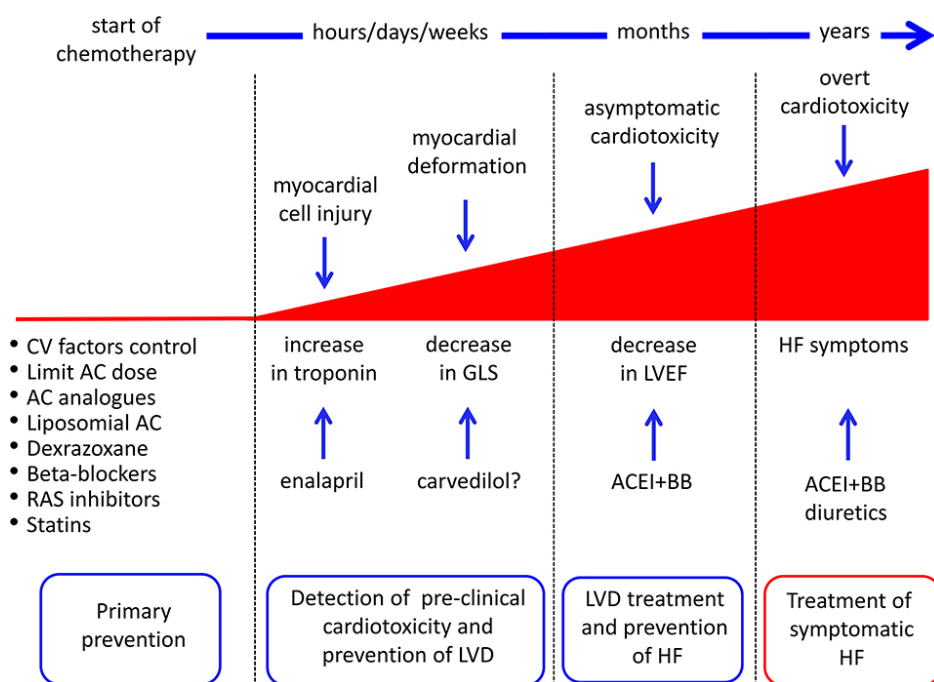
Obr. 8 A: Dexrazoxan; B: Karvedilol

Důkazy kardioprotekce existují na zástupce ze skupin inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu (ACEi), beta blokátorů (BB), statinů a diuretik. Nejvíce studií bylo provedeno na kardioprotektivní účinky BB karvedilolu (Obr. 8B), přičemž se prokázalo preventivní podání

jako účinné proti snížení LVEF při užívání ANT a jiných kardiotoxických látek (Bosch et al. 2013, Abuosa et al. 2018, Guglin et al. 2019). Z řady ACEi se potvrdil benefit užívání enalaprilu a lisinoprilu (Obr. 9A-B) pro prevenci vzniku a léčby kardiotoxických účinků chemoterapie (Gupta et al. 2018, Guglin et al. 2019). Protektivní účinek na kardiální tkáň byla dále prokázána u antagonisty aldosteronu spironolaktonu (Obr. 9C) (Akpek et al. 2014, Yavas et al. 2017, Li et al. 2019). Kombinace ANT se statiny vedla ke snížení rizika srdečního selhání, zároveň se potvrdila senzitivizace některých tkání k účinkům ANT při užívání statinů, což vede k rozšíření terapeutického okna (Valcovici 2016, Henninger et al. 2017) (Obr. 10).



Obr. 9 A: Enalapril; B: Lisinopril; C: Spironolakton



Obr. 10 Strategie pro detekci, prevenci a léčbu kardiotoxicity indukovanou chemoterapeutiky

Nežádoucí účinky ANT jsou výrazně sníženy u liposomálních pegylovaných forem, kdy vedle snížení výskytu alopecie, neusey a myelosuprese byly i výrazně sníženy kardiotoxické účinky těchto chemoterapeutik (O'Brien et al. 2004).

V poslední době se dostává pozornosti rozvoji nanotechnologie, pomocí které se mohou chemoterapeutika cíleně distribuovat pouze do místa nádorového bujení a vyvarovat se tak nežádoucím účinkům na ostatní tkáně. Několik studií *in vitro* i *in vivo* již potvrdilo radikální snížení kardiotoxicity a dalších nežádoucích účinků doxorubicinu při využití nanočástic (Mondal et al. 2019, Teran-Saavedra et al. 2020, Mohammed et al. 2020).

Snížení kardiotoxicity je možné dosáhnout také inhibicí metabolismu ANT na jejich kardiotoxičtější hydroxy metabolit. Přeměna na tento metabolit probíhá zejména v játrech, méně také v ledvinách, přičemž některé studie prokázaly hromadění těchto metabolitů v srdeční tkáni (Olson et al. 1988). Zvýšené riziko kardiotoxicity můžeme pozorovat u pacientů s Downovým syndromem, kteří mají zvýšenou expresi reduktas metabolizujících ANT na jejich hydroxylové metabolity (Quiñones-Lombraña et al. 2014), naopak snížení rizika kardiotoxicity bylo pozorováno při podání fenobarbitalu, který je inhibitorem AKR reduktasy (Behnia et al. 1999). Enzymy metabolizující ANT by tak mohly být vhodným cílem pro snížení nežádoucích účinků ANT. V posledních letech bylo testováno několik látek

inhibující tyto enzymy a prokázal se jejich účinek nejen na snížení kardiotoxicity ANT, ale také na zvýšení účinnosti a snížení výskytu rezistence (Sorf et al. 2019, Bukum et al. 2019).

## **2.3 RESISTENCE PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV**

Přes veškeré snahy o vývoj nových léčiv a získávání poznatků o aktuálních chemoterapeutických, velkou překážkou zůstává rezistence. Léková rezistence je definována jako schopnost buněk přežít klinicky relevantní koncentrace cytotoxických látek (Chatterjee et al. 2019). Rakovina je zodpovědná za jednu ze šesti úmrtí celosvětově, přičemž rezistence stojí za až 90 % úmrtí pacientů užívající tradiční i moderní chemoterapeutika (Bukowski et al. 2020). Mnoho studií se zaměřuje na odhalení mechanismů vzniku rezistence, přesto všechny způsoby nejsou dosud zcela známy. Je známo, že rezistence může být primární nebo získaná. Primární rezistence existuje již před expozicí chemoterapeutiku, na rozdíl od získané, která se vyvíjí až v reakci na expozici xenobiotiku (Zhang et al. 2019). Rezistence může být limitována pouze na látky pacientovi podávané, nebo se rozšířit na celé spektrum protinádorových látek s různými mechanismy účinky, tj. multiléková rezistence (Gottesman et al. 2016). Známé mechanismy vzniku rezistence na protinádorová terapeutika zahrnují: zvýšený eflux xenobiotik, zvýšený metabolismus xenobiotik, alterace signálních drah, genetické faktory a mnohé další.

### **Zvýšený eflux xenobiotik**

Jeden z nejvýznamnějších způsobů rezistence rakovinných buněk k chemoterapeutikům je zvýšený eflux ven z intracelulárního prostoru za pomoci iontových adenosintrifosfát (ATP) dependentních pump z nadrodiny ATP vázajících kazetových transportérů (ABC). Mezi nejvýznamnější efluxní transportéry xenobiotik patří ABCB1, ABCG2 a ABCC1.

Jedním z nejvíce prozkoumaných ABC proteinů je P-glykoprotein (nazýván také ABCB1 nebo MDR1), jehož zvýšená exprese je pozorována u 50 % případů všech druhů rakovin (Bukowski et al. 2020). V případech rakoviny plic, jater, ledvin nebo konečníku byla zvýšená exprese pozorována již před nasazením chemoterapeutické léčby, kdežto v případě akutní myeloidní leukémie (AML), akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a dalších hematologických malignancí bylo zvýšení exprese P-glykoproteinu pozorováno až po expozici cytotoxickým látkám (Wang et al. 2019).

Tento 170kD protein, kódovaný MDR1 genem, je tvořen dvěma transmembránovými doménami a dvěma doménami vázající nukleotid. Domény vázající nukleotid hydrolyzují ATP molekuly, což je provázeno konformační změnou a xenobiotikum je pumpováno transmembránovým průchodem z buňky ven (Wang et al. 2019). Charakteristickým znakem ABC transportérů je jejich substrátová nespecifita, kromě antineoplastik zahrnující ANT, vinka alkaloidy, taxany, deriváty podofylotoxinu, jsou tyto pumpy schopny přenášet také molekuly ze skupin imunopresiv, antihistaminik, steroidů nebo látek k léčbě HIV (Lugmani 2005). Zvýšená exprese P-glykoproteinu vede ke snížení celkového přežití a míra jeho exprese může být využita jako prognostický faktor indukční terapie (Schaich et al. 2005).

ABCG2 (známý také jako protein rezistence karcinomu prsu, BCRP) jsou efluxní pumpy vysoce exprimované v placentárních syncytiotrofoblastech a mozковém endotelu a podílí se tak na ochraně těchto orgánů v rámci hematoencefalické a hematoplacentární bariéry. V menší míře je tento protein exprimován také ve střevech, játrech a ledvinách (Eckenstaler et al. 2020). Jeho funkcí je extruze rozmanitých endogenních i exogenních látek. Stejně jako ABCB1 byl ABCG2 objeven v rezistentních rakovinných buňkách a zřejmě se tak podílí na MDR. Tato rezistence může být zvrácena inhibitory ABC pump. Inhibitor BTK PCI29732 se kompetitivně váže na ATP vazebné místo ABCG2 a zvyšuje tak účinnost chemoterapeutik v buňkách nadměrně exprimující ABCG2 (Ge et al. 2018). Inhibiční vlastnosti nejen k ABCG2, ale také k ABCB1 vykazuje inhibitor CDK4/6 voruciklib, který tak snižuje eflux chemoterapeutik z rakovinných buněk (Gupta et al. 2018). Mimo onkologii hraje ABCG2 významnou roli také v exkreci urátů a je spojován s patologickými stavy jako jsou hyperurikémie a dna (Hoque et al. 2020).

ABCC1 (MRP1) je exprimován téměř ve všech tkáních lidského těla a podílí se na efluxu širokého spektra látek, včetně chemoterapeutik, antibiotik, aniontů těžkých kovů, ale také produktů II. fáze metabolismu; konjugátů s glutathionem, glukuronidem a sulfátem (Robey et al. 2018). Stejně jako ABCB1 a ABCG2 se ABCC1 podílí na rozvoji rezistenci u mnoha druhů rakoviny, např. prsu, prostaty, plic nebo u neuroblastomu. Regulační vlastnosti k ABCC1 byly objeveny u některých žlučových kyselin, např. kyseliny  $\beta$ -cholanové (Chewchuk et al. 2018). Kyselina  $\beta$ -cholanová specificky inhibuje ABCC1 transport a zvyšuje tak uptake a senzitivitu k Dox, zároveň inhibuje AKR, podílející se na metabolizaci ANT (Chewchuk et al. 2018).

## **Zvýšený metabolismus xenobiotik**

Antineoplastika jsou stejně jako ostatní xenobiotika v těle metabolizovány enzymy I. a II. fáze metabolismu. Často tak vznikají neúčinné a toxické metabolity cytotoxik, které se podílejí na vzniku rezistence a vyšší incidenci nežádoucích účinků. Zvýšená exprese těchto enzymů po expozici cytotoxickým látkám byla potvrzena v několika studiích (Matsunaga et al. 2014, Hu et al. 2015, Buck et al. 2019).

Cytochrom P450 (CYP) se účastní reakcí I. fáze metabolismu, zvýšená exprese CYP3A4 byla pozorována po podávání indukční terapie při léčbě AML (cytarabin, daunorubicin) (Su et al. 2019). CRE, katalyzující hydroxylaci ANT, jsou zodpovědné za snížení cytotoxického účinku ANT. AKR jsou enzymy primárně zodpovědné za hydroxylaci doxorubicinu, zatímco u Dau převládá hydroxylace za přítomnosti karbonylreduktas CBR1, CBR2 (Mordente et al. 2003). Indukce AKR enzymů ruší účinky ANT v leukemických buňkách a vede tak ke vzniku rezistence (matsunaga et al. 2014).

Pozměněná exprese enzymů II. fáze metabolismu v rakoviných buňkách může také vést k vývoji multilékové rezistence (MDR). Nejčastější konjugační reakcí II. fáze je glukuronidace, probíhající pomocí enzymu UDP-glukuronosyltransferasy. Michael J. Osborne et al. zjistili, že inhibicí tohoto enzymu by bylo možné zvrátit rezistenci buněk na glukuronidovaná léčiva (Osborne et al. 2019). Inhibice enzymů metabolizujících cytotoxické látky má potenciál stát se novou strategií k překonání rezistence.

## **Alterace signálních drah**

Fosfatidylinositol-3-kinasa/protein kinasa B (PI3K/AKT) signální dráha hraje významnou roli v buněčném růstu, proliferaci, invazi, angiogenezi a inhibici apoptózy. Tumor supresorový gen PTEN je přirozeným inhibítorem této dráhy, při terapii antineoplastiky však může dojít k jeho mutaci, což způsobí up-regulaci PI3K/AKT signální dráhy a inhibici apoptózy. PI3K/AKT dráha se také podílí na regulaci exprese P-glykoproteinu a přispívá tak i ke vzniku rezistence zprostředkovanou P-glykoproteinem (Zhang et al. 2019).

Na regulaci apoptózy se podílí také dráha proteinu p53 a nukleárních faktorů kappa B (NF- $\kappa$ B). p53 je nejvíce prostudovaným a nejčastěji inaktivovaným tumorovým supresorem. P53 reaguje na rozdílné formy buněčného stresu a podílí se na opravě DNA, buněčné

senescenci, angiogenezi nebo apoptóze (Fridman et al. 2003). Inaktivace tohoto genu vede chemorezistenci.

NF- $\kappa$ B je rodina transkripčních faktorů známe pro své anti-apoptické vlastnosti, které se podílí na přežívání maligních buněk. Jejich aktivita je výrazně vyšší v rezistentních buňkách a jejich inhibice byla testována na myeloidních buněčných liniích pro indukci apoptózy (Pinto et al. 2020).

### **Genetické faktory**

Genetické mutace a alterace jsou velmi často pozorovány v tumorových buňkách a jsou považovány za nejčastější příčinu selhání chemoterapeutické léčby. Chemoterapeutika cílí na molekuly hrají významnou roli v léčbě rakoviny, přestože se u této skupiny často vyskytuje mutace genu kódující cílovou molekulu způsobující rezistenci na podávané chemoterapeutikum.

Top2 je cílem několika antineoplastik, včetně ANT nebo etoposidu. Genové mutace topoisomeras však mohou změnit jejich aktivitu, počet a nukleární lokaci, vedoucí k selhání léčby (Zhang et al. 2019).

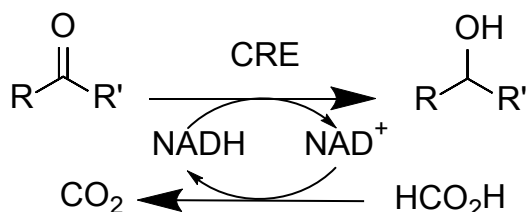
Jednou z mutací, často se vyskytujících u pacientů s AML je mutace FLT3, který ovlivňuje buněčnou proliferaci, přežívání a diferenciaci. Jsou známy dvě formy mutací FLT3, a to interní tandemová duplikace a mutace tyrosin kinasové domény. Interní tandemová duplikace je pozorována až u jedné třetiny všech případů AML a je molekulárním markerem nepříznivé prognózy (Zhang et al. 2019).

Dalším protoonkogenem často exprimovaným u pacientů s AML je Wilms Tumor 1 gen, který zvyšuje riziko relapsu a zhoršuje prognózu pacientů (Ho et al. 2010). Zvýšená exprese tohoto genu způsobí upregulaci antiapoptické chinolinát fosforibosyltransferasy, vedoucí ke vzniku rezistence na léčbu.



## 2.4 ENZYMY REDUKUJÍCÍ KARBONYLOVÉ SKUPINY

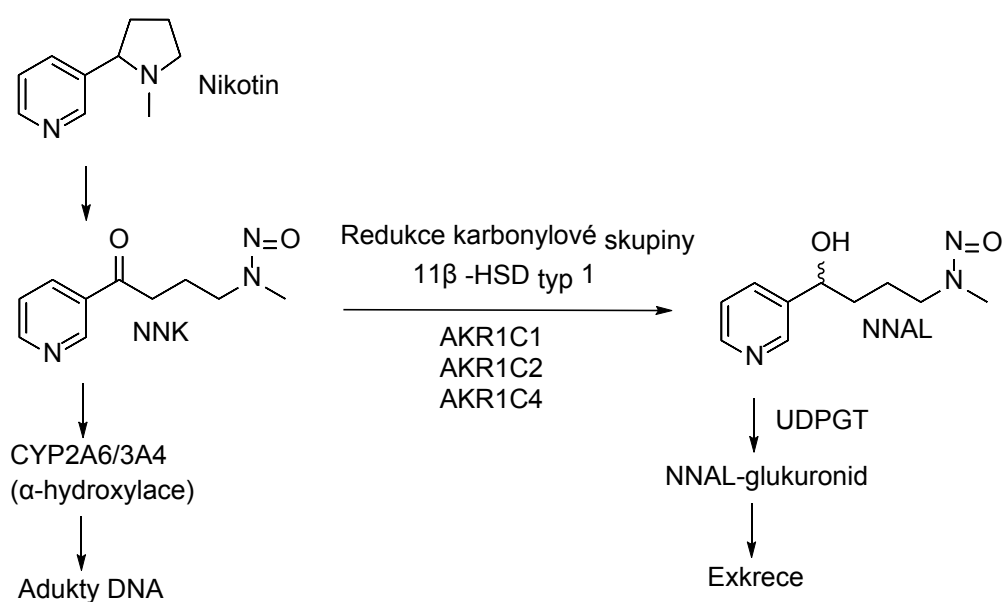
Enzymy redukující karbonylové skupiny jsou skupina proteinů, podílející se na redukci mnoha xenobiotik i endogenních látek u řady organismů, včetně lidí. Tyto NADPH dependentní oxidoreduktasy redukují endogenní i exogenní molekuly s aldehydickou či ketonickou skupinou na skupinu hydroxylovou (Obr. 11).



Obr. 11 Redukce karbonylu pomocí CRE na hydroxylovou skupinu

Za pomoci této reakce, mohou CRE řídit endogenní signální molekuly, které aktivují či deaktivují a ovlivňují tak další procesy v lidském těle. Vyšší koncentrace a aktivita CRE byla nalezena v orgánech často vystavených potenciálně škodlivým látkám (játra, epidermis, epitel gastrointestinální trakt (GIT), ledviny, placenta, centrální nervový systém (CNS)). Tyto enzymy zabraňují toxickým účinkům xenobiotik a převádějí je jako součást fáze I metabolismu na hydroxy sloučeniny, které se snadno konjugují v II. fázi metabolismu na ve vodě rozpustnější, polárnější, a tudíž lépe eliminovatelné sloučeniny. Jelikož je karbonylová skupina velmi často nositelem biologického účinku xenobiotik, vzniklé metabolity se často projevují sníženým nebo žádným účinkem původní molekuly a získání nových, často škodlivých účinků (Malátková et al. 2010).

CRE jsou typické pro svoji širokou substrátovou specifitu. Mezi endogenní substráty řadíme steroidy, eikosanoidy, kofaktory, neurotransmitery a polyoly. Z xenobiotik jsou touto cestou metabolizovány např. warfarin, ANT, ketoprofen, nebo karcinogenní látka z tabákových výrobků nitrosamin 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) (Obr. 12). Za nejvýznamnější CRE jsou považovány zástupci dvou velkých nadrodin AKR a SDR (Pilka et al. 2009).



Obr. 12 Role AKR při metabolismu NNK

## 2.4.1 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

SDR je velká nadrodina tvořící asi ¼ všech známých dehydrogenas (Kavanagh et al. 2008). Tato nadrodina zahrnuje více než 168 150 zástupců (Gräff et al. 2019), přičemž více jak 83 % všech známých SDR se nachází v bakteriích (Internet 7). V lidském genomu je zakódováno přes 80 SDR enzymů, patřících do 48 různých rodin (Kallberg et al. 2010, Skálová et al. 2011). Všechny SDR enzymy sdílejí stejnou strukturní část, nazývanou jako Rossmannův záhyb, významný pro vazbu koenzymu NADPH přes adenosin difosfát (Hanukoglu 2015). SDR katalyzují kromě redukce karbonylů také dekarboxylace, izomerace, epimerizace, redukce sekundárních aminů, enoyl Co-A redukce, dehydratace a dehalogenace. Podílejí se na metabolismu mnoha molekul, jako jsou steroidní hormony, oxysteroly, žlučové kyseliny, prostaglandiny, retinoidy, mastné kyseliny, aminokyseliny, cukry a xenobiotika. Mezi nejvýznamnější SDR podílející se na metabolismu endogenních i exogenních látek v lidském těle patří cytosolické karbonylreduktasy CBR1 a CBR3 a 11β-hydroxysteroid dehydrogenasa (11β-HSD1) (Beck et al. 2017), nebo mikrosomální 11β-hydroxysteroiddehydrogenasa 1.

### CBR

Karbonyl reduktasa 1, CBR1 nebo také dle oficiální nomenklatury SDR21C1, je enzym s velmi širokým substrátovým spektrem, značně se podílející na fázi I metabolismu

xenobiotik. Podílí se také na konverzi endogenních steroidů, prostaglandinů, lipidových aldehydů, ale přesná fyziologická funkce těchto reakcí dosud není zcela objasněna (Beck et al. 2017). Významnou roli představuje nitrobuněčná CBR1 v ochraně buněk před oxidativním stresem způsobeným ROS inaktivací reaktivních lipidových aldehydů (Yun et al. 2020).

Tento monomerní cytosolický enzym se skládá z 277 aminokyselin a katalyzuje metabolismus např. některých antineoplastik, antipsychotik, nebo antagonistů serotoninu (Malátková et al. 2010). Breysse et al. zjistili, že za přeměnu Dox na kardiotoxický doxorubicinol (Dox-ol) v myších játrech může z 25 % CBR1, při odstranění CBR1 z jaterního cytosolu, se tvorba metabolitu snížila na 75 % (Breysse et al. 2020). Starší studie z roku 2008 tvrdí, že CBR1 je predominantní reduktasou doxorubicinu v lidských játrech, ledvinách i GIT (Kassner et al. 2008). Inhibicí CBR1 je dosaženo snížené přeměny ANT na jejich hydroxy metabolity a tím i snížení kardiotoxicity a zvýšení účinnosti léčby, oproti tomu zvýšená exprese vede ke vzniku rezistence na protinádorovou léčbu (Matsunaga et al. 2015, Zhou et al. 2020). V nedávné studii byla zjištěna závislost exprese CBR1 na Top2 $\beta$ , jejíž deplece vede k downregulaci CBR1 (Khazeem et al. 2020).

Změna exprese CBR1 a její dopad na progresi a prognosu rakoviny je v poslední době předmětem několika studií. Yun et al. zjistili, že nízká exprese CBR1 korelovala s lepší prognózou a lepší odpovědí na radiační terapii u pacientů s dlaždicovým karcinomem hlavy a krku (HNSCC) (Yun et al. 2018). Novější studie z roku 2020 ale naznačuje, že inhibice CBR1 několikrát zvyšuje invazivní vlastnosti HNSCC buněk a pacienti s metastazemi v lymfatických uzlinách vykazují nižší expresi CBR1, než pacienti bez metastáz (Yun et al. 2020). Nízká exprese CBR1 byla asociována také se špatnou prognózou u pacientů s orálním dlaždicovým karcinomem (Yamanouchi et al. 2018). Aktivita a exprese CBR1 se u různých individuů může výrazně lišit a opověď na protinádorovou léčbu tak zůstává nepředvídatelná.

Druhou, méně probádanou cytosolickou monomerní CBR je CBR3 (SDR21C2). Tato CBR se skládá ze 277 aminokyselin a nejvyšší hladiny CBR3 mRNA byly zjištěny v pankreatu a vaječnicích (Malatkova et al. 2010). Přestože sdílí s CBR1 71 % sekvencové identity, substrátové spektrum CBR3 je výrazně užší (Pilka et al. 2009). CBR3 se také podílí na redukci anthracyklinů, jednonukleotidový polymorfismus CBR3 genu je spojován s vyšším rizikem ANT kardiotoxicity u pediatrické populace (Blanco et al. 2012). Stejně jako CBR1 je CBR3 ubikvitární, přesto s mnohem nižší expresí, endogenní funkce CBR3 zůstává neznámá (Miura et al. 2008).

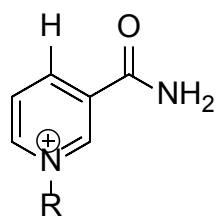
## 11 $\beta$ -HSD1

11 $\beta$ -HSD1 je člen SDR nadrodiny, exprimován především v játrech, adiposní tkáni, kostech, plicích a CNS. Známa je jeho NADPH dependentní redukce inaktivního glukokortikoidu kortisonu na aktivní kortisol. Knock-out genu pro 11 $\beta$ -HSD1 vedl ke zlepšení glukosové tolerance, lipidového profilu, insulinové senzitivity a redukci váhy (Mosquera et al. 2018). Naopak nadměrná exprese tohoto proteinu je spojována s obezitou, hypertenzí a insulinovou rezistencí (Coutinho et al. 2011). Zvýšená aktivita 11 $\beta$ -HSD1 byla pozorována u pacientů s DM2, s BMI < 23 kg/m<sup>2</sup> (Shukla et al. 2019). V posledních letech jsou studovány inhibitory 11 $\beta$ -HSD1, potenciálně využitelné při léčbě DM2 (Mosquera et al. 2018, Koike et al. 2019).

## 2.4.2 Aldo-keto reductasy (AKR)

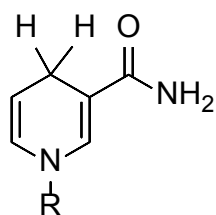
Nadrodina AKR obsahuje více než 190 členů, které se dále dělí do dalších 16 rodin, sdílejících více jak 60 % identity aminokyselinové sekvence, značené jako AKR1-16. Úlohou AKR je redukce aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy, Tyto většinou monomerní solubilní proteiny mají široké spektrum aktivit a redukují molekuly jako jsou cukry, lipidové aldehydy, ketosteroidy, ketoprostaglandiny, nikotinové nitrosaminy, nebo karcinogeny odvozené od polycyklických aromatických hydrokarbonů *trans*-dihydrodiolů. Zástupci rodiny AKR1D se nechovají jako oxidoreduktasy, ale jako 5 $\beta$ -reduktasy a katalyzují redukcí steroidních dvojných vazeb (Penning 2015). Přestože *in vitro* se AKR chovají jako oxidoreduktasy, *in vivo* fungují výhradně jako reduktasy. Vykazují totiž mnohem větší afinitu (K<sub>d</sub> = 10 – 120 nM) ke kofaktoru NADP(H), než NAD(H) (K<sub>d</sub> = 100 – 250  $\mu$ M) (Ma et al. 2000) (Obr. 13).

Akceptor hydridu  
Oxidační činidlo



$\text{NAD}^+$   
 $\text{NADP}^+$

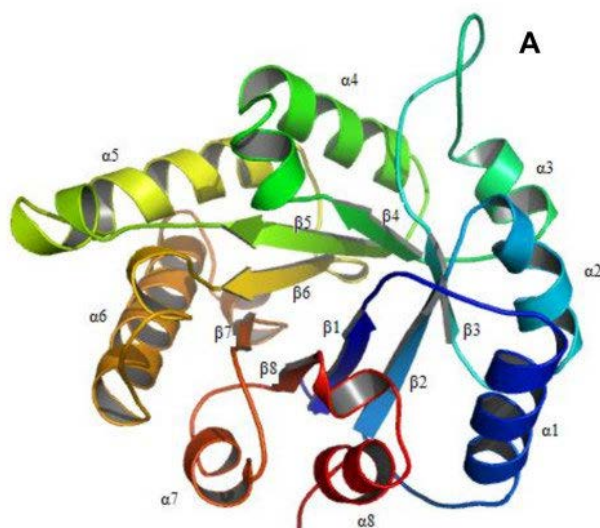
Donor hydridu  
Redukční činidlo



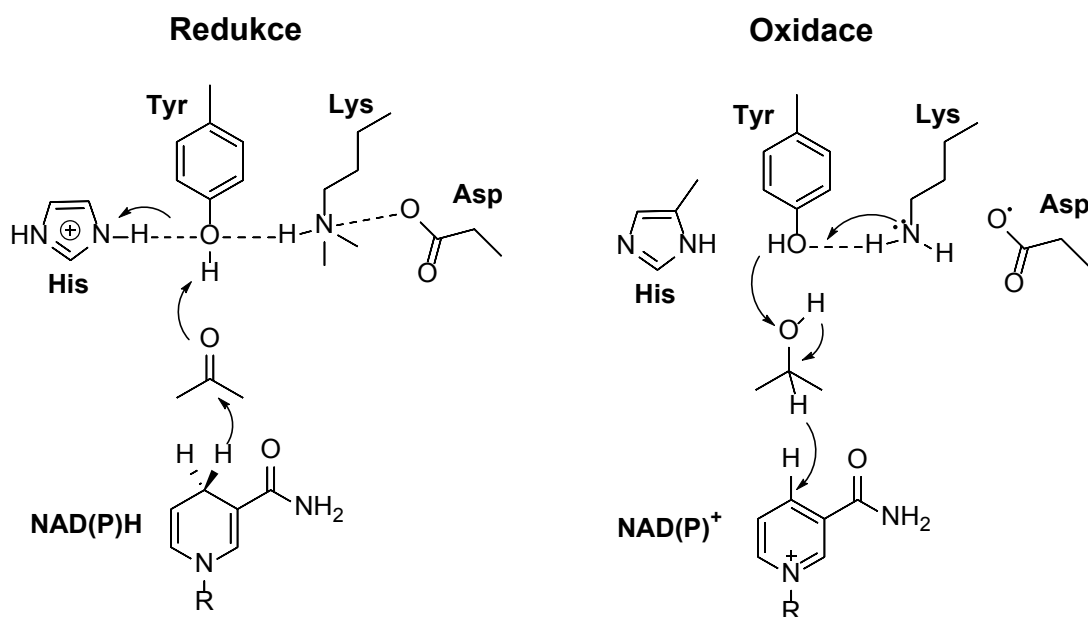
$\text{NADH}$   
 $\text{NADPH}$

Obr. 13 Struktura oxidačních a redukčních činidel  $\text{NAD(P)}^+$ ,  $\text{NAD(P)H}$  účastnících se oxidoredukčních reakcí v přítomnosti CRE

Pro všechny AKR je typická struktura tzv.  $(\alpha/\beta)_8$  soudku (Obr. 14), přičemž rozpoznání substrátu probíhá interakcí s aminokyselinami na terminálním konci elipsoidu. První se na enzym váže kofaktor, pak následuje substrát. 4-pro-R hydrid z  $\text{NAD(P)H}$  je následně přenesen na karbonylovou skupinu substrátu, který je protonizován vodíkovým protonem uvolněným z tyrosinu, který v reakci vystupuje jako kyselina (Obr. 15) (Mindnich et al. 2009).



Obr. 14 Strukturní uspořádání  $(\alpha/\beta)_8$  soudku, typického pro mnoho enzymů včetně AKR. Terminální konce osmi vnějších  $\beta$ -vláken tvoří cylindrické paralelní  $\beta$ -skládané listy. Tento  $\beta$ -soudek je obklopen osmi  $\alpha$ -helixy (Si et al. 2009).



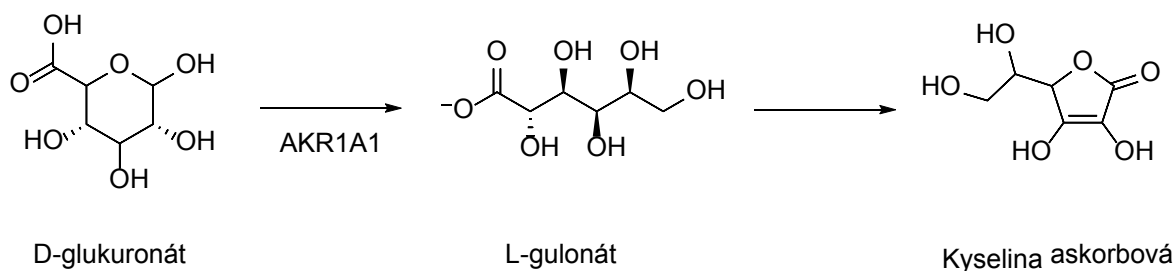
Obr. 15 Interakce NAD(P)H s vazebným místem enzymu a protonizace substrátu při redukční reakci. V případě oxidační reakce by se tyrosin choval jako zásada.

Dosud bylo identifikováno 15 lidských AKR; aldehyd reduktasa AKR1A1; aldozo reduktasy AKR1B1, AKR1B10, AKR1B15; dehydrogenasy hydroxysteroidů AKR1C1-AKR1C4; steroidní 5 $\beta$  reduktasa AKR1D1; reduktasa 1,5-anhydro-D-fruktózy AKR1E2;  $\beta$  podjednotky draselných nepřet'ově řízených kanálů AKR6A3, AKR6A5, AKR6A9; a dimerické aflatoxin aldehyd reduktasy AKR7A2 a AKR7A3 (Penning 2015).

## Rodina AKR1

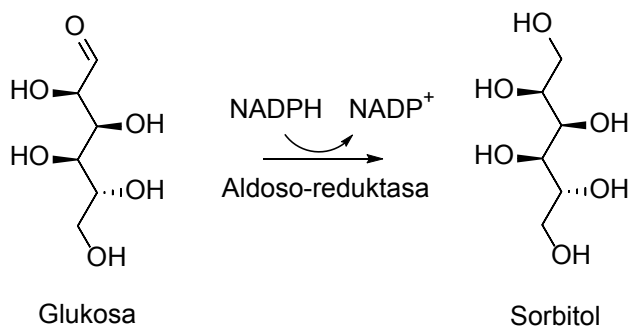
Rodina AKR1 se dělí na šest podrodin, přičemž největší je podrodina AKR1C.

Fyziologická úloha AKR1A1 není dosud zcela známá, významný podíl má na syntetické dráze kyseliny askorbové redukcí D-glukuronátu na L-gulonát (Obr. 16). Genovým knockoutem AKR1A1 nebyly geneticky upravené myši schopné syntetizovat vitamin C, což vedlo k rychlému vývoji osteoporózy (Lai et al. 2017). Dle studie z roku 2019 je AKR1A1 vysoce exprimována v proximálních tubulech ledvin, kde funguje jako SNO-CoA reduktasa a řídí tak S-nitrosylaci proteinů (Stomberski et al. 2019). Spolu s AKR1C1, AKR1C2, a AKR1C3 se AKR1A1 podílí na metabolismu řady chemoterapeutik, včetně ANT (Hofman et al. 2014)



Obr. 16 Role enzymu AKR1A1 v biosyntéze vitamínu C

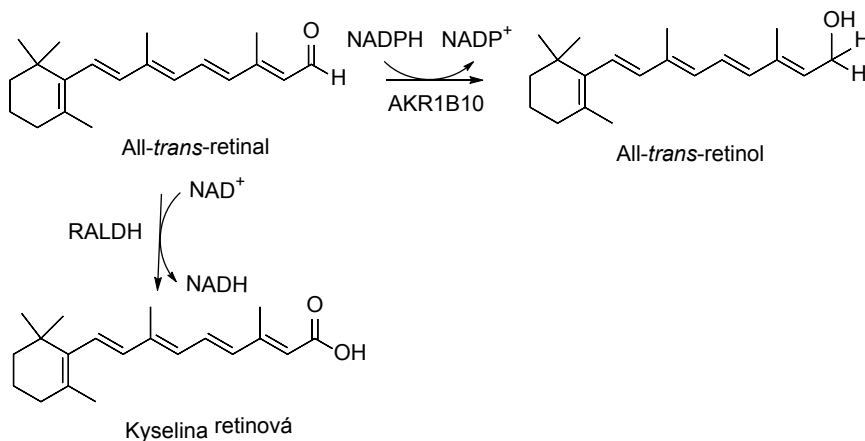
Nadměrná exprese AKR1B1 je pozorována u pacientů s rakovinou a studie naznačují, že se může významně podílet na progresi nemoci. Její zvýšená exprese je spojována s mnoha mediátory jako jsou NF- $\kappa$ B, cykliny a cyklin dependentními kinasami, savčím cílem rapamycinu (mTOR) nebo s proteinkinásou B (PKB). Inhibice AKR1B1 se prokázala především proti-rakovinným účinkem a jeho inhibice by se tak v rámci adjuvantní terapie mohla osvědčit pro zvýšení senzitivity k podávaným léčivům a ulevení od symptomů nežádoucích účinků (Khayami et al. 2020). Inhibitory AKR1B1 jsou již využívány pro zabránění komplikací u diabetiků. AKR1B1 totiž přeměňuje vysoké hladiny glukosy na sorbitol (Obr. 17) a aktivita tohoto enzymu je spojována s komplikacemi jako katarakta, retinopatie, neuropatie nebo nefropatie u pacientů s diabetes mellitus (DM) (Penning 2015, Wu et al. 2020).



Obr. 17 Role enzymu AKR1B1 v metabolismu glukosy

AKR1B10 je enzym podílející se na eliminaci retinoidů (Obr. 18), fyziologicky je exprimován v tenkém i tlustém střevě, méně v játrech (Wang et al. 2010). Zvýšená exprese je pozorována při rakovinném onemocnění především plic, jater a prsou, je spojována s rozvojem rezistence, stimuluje migraci a invazi rakovinných buněk aktivací ERK signální dráhy a jako tumorový

marker předpovídá nepříznivou prognózu onemocnění (Laffin et al. 2012, Li et al. 2017). Upregulace AKR1B10 je pozorována v plicním epitelu i u zdravých kuřáků a může být znakem budoucího vývoje rakoviny plic (Wang et al. 2010).

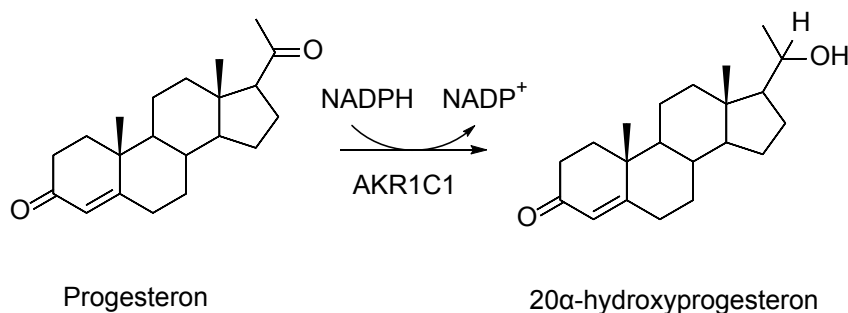


Obr. 18 AKR1B10 metabolizuje retinoly na odpovídající retinoly a zabraňuje tak tvorbě signální molekuly plicních buněk kyseliny retinové

Nejnovější člen AKR1 rodiny je AKR1B15 s 91% identitou s více prozkoumanou isoformou AKR1B10. Tento enzym má pravděpodobně roli ve steroidním metabolismu, regulaci mitochondriální funkce a stárnutí. Oproti AKR1B10 má užší spektrum aktivity a přes strukturální podobnost není inhibována inhibitory AKR1B1 a AKR1B10. Hydrofóbnější vazebné místo pro substrát je pravděpodobně zodpovědné za nižší aktivitu vůči retinoidům a vyšší aktivitu ke steroidním molekulám v porovnání s AKR1B10 (Giménez-Dejóz et al. 2019).

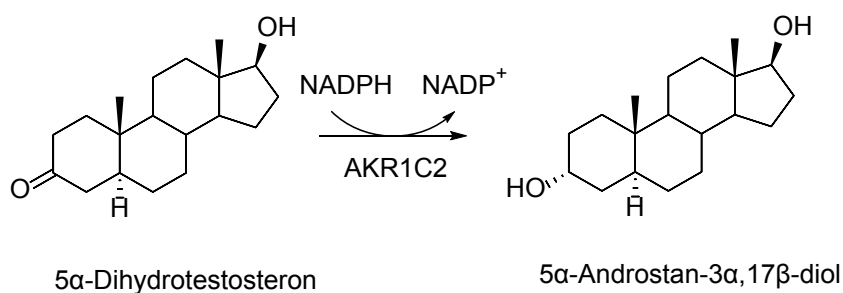
AKR1C1 je predominantní reduktasou 20-ketosteroidů a jednou z její hlavních úloh je přeměna progesteronu na inaktivní 20 $\alpha$ -hydroxyprogesteron (Obr. 19). Udržování hladin progesteronu je důležité pro zabránění předčasného porodu a zmírnění účinků estrogeneru na endometrium. Zvýšené hladiny AKR1C1 však byly objeveny u pacientek s rakovinou děložního hrdla a její downregulace vede ke zvýšení citlivosti k cisplatině u nasofaryngeálního karcinomu (Zeng et al. 2019, Wei et al. 2021). AKR1C1 by tak mohla být dalším potenciálním cílem při chemoterapeutické léčbě. Spolu s AKR1C2 jsou výrazně zvýšeně exprimované u nemalobuněčného karcinomu plic (Penning 2014).





Obr. 19 Role AKR1C1 v metabolismu progesteronu

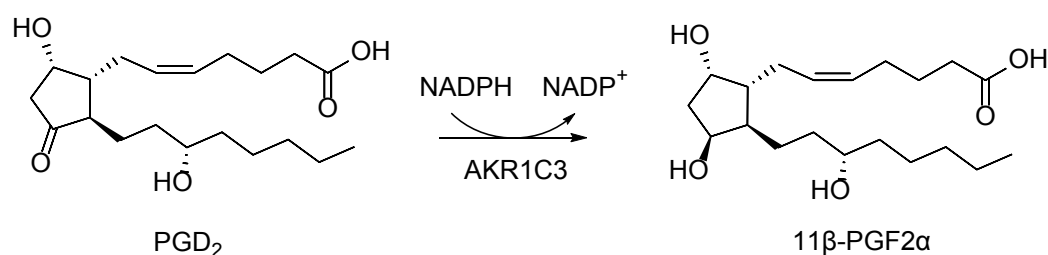
AKR1C2 je převážně 3-ketosteroid reduktasa podílející se na přeměně 5α-dihydrotestosteronu na inaktivní androgen 5α-androstan-3α,17β-diol (Obr. 20) a přeměně 5β-dihydroprogesteronu na neuroaktivní steroid allopregnanolon spojovaný s premenstruačním syndromem (Penning 2015). Zvýšená aktivita tohoto enzymu vede ke snížení syntézy androgenů, což by mohlo být užitečné v léčbě androgen dependentních nádorů (Rizner et al. 2003, Ide et al. 2018). Pozorován byl také inhibiční efekt AKR1C2 na onkogenezi štítné žlázy, zvýšená exprese se projevila jako příznivý prognostický faktor (Jin et al. 2019). Další studie ale naznačují, že AKR1C2 aktivuje dráhu PI3K/AKT a chová se tak jako onkogen (Wang et al. 2008, Zhang et al. 2020).



Obr. 20 Redukce 5α-dihydrotestosteronu na 5α-androstan-3α,17β-diol za přítomnosti AKR1C2

AKR1C3 je známá také jako 17β-hydroxysteroid dehydrogenasa typu 5 a prostaglandin F2α syntasa. Je to jediná 17β-hydroxysteroid dehydrogenasa, která se neřadí mezi SDR. Jako dehydrogenasa se podílí na syntéze testosteronu z Δ<sup>4</sup>-androsten-3,17-dionu a 5α-dihydrotestosteronu redukcí 5α-androstan-3,17-dionu, dále redukcí estronu na 17β-estradiol. Je tak vhodným cílem pro léčbu hormon dependentních nádorů prostaty a prsu (Penning 2015). Jako prostaglandin F2α syntasa přeměňuje prostaglandiny PGH<sub>2</sub> na PGF<sub>2α</sub> a PGD<sub>2</sub> na

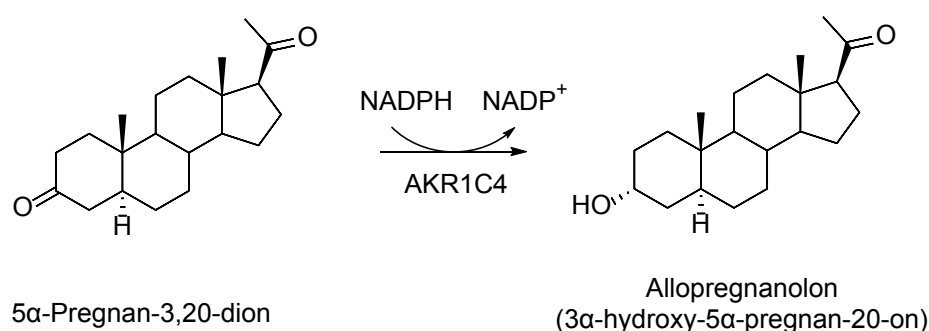
11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Obr. 21), které působí pro-proliferativně skrz MAPK signalizaci. Aktivace MAPK AKR1C3 přispívá také k rozvoji rezistence na radiční chemoterapii (Sun et al. 2016). AKR1C3 se také podílí na rozvoji rezistence malignancí nezávislých na hormonech, např. AML, inhibicí exprese  $\gamma$  receptoru aktivovaného proliferátorem peroxizomu (PPAR $\gamma$ ) a aktivací prostaglandinového FP receptoru (Sun et al. 2016, Penning 2018). AKR1C3 je velmi často nadměrně exprimovaná u pacientů s AML a ALL a je zodpovědná za rezistenci na ANT, léčiva první linie těchto leukémií (Verma et al. 2019). 11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , zodpovědný za aktivaci FP receptoru, podporuje buněčnou proliferaci, zatímco PGD<sub>2</sub> synergizuje s ATRA a stimuluje apoptózu a diferenciaci leukemických buněk (Desmond et al. 2003). PGD<sub>2</sub>, převládající při nedostatku AKR1C3, se přeměňuje přes PGJ<sub>2</sub> na 15-deoxy- $\Delta$ -prostaglandin J<sub>2</sub>, který slouží jako ligand diferenciaci stimulujícího PPAR $\gamma$  receptoru (Straus et al. 2001). Inhibice AKR1C3 je předmětem mnoha nedávných studií a mohla by se v budoucnu využívat v onkologické léčbě. Ve studii z roku 2018 byla pozorována spojitost AKR1C3 s glaukomem. AKR1C3 však zřejmě hraje roli i v jiných patologických stavech. Exprese AKR1C3 byla výrazně nižší u pacientů s glaukomem v porovnání s kontrolní skupinou. Gen AKR1C3 byl označen jako klíčový pro prevenci a léčbu glaukomu, více studií je však potřeba pro objasnění role AKR1C3 u tohoto onemocnění (Nie et al. 2018). AKR1C3 představuje slibný cíl i u žen s polycystickým ovariálním syndromem, u kterých nadměrná exprese tohoto enzymu vede přes aktivaci androgenů v adiposní tkáni k akumulaci lipidů a insulinové rezistenci (O'Reilly et al. 2017).



Obr. 21 Redukce PGD<sub>2</sub> na ligand FP receptoru 11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  za přítomnosti enzymu AKR1C3

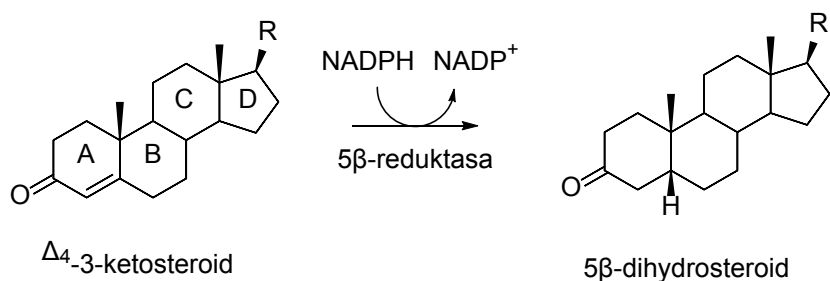
AKR1C4 je hlavním enzymem zodpovědným za přeměnu testosteronu na 5 $\beta$ -tetrahydrosteroid v játrech, stejně jako AKR1C2 se podílí na tvorbě 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolu z 5 $\alpha$ -dihydrotestosteronu. Mutace AKR1C2 a AKR1C4 jsou spojovány s gonadální dysgenezí (Rizner et al. 2014). Dále se AKR1C4 podílí na tvorbě GABA<sub>A</sub> modulátoru allopregnanolonu

z 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dionu (Obr. 22) (Zeng et al. 2017). Na rozdíl od AKR1C1-3, které jsou v různých koncentracích přítomny plicích, prostatě, játrech, mléčné žláze a varlatech, AKR1C4 se nachází výhradně v játrech (Jin et al. 2011). V játrech je AKR1C4 nepostradatelným účastníkem biosyntézy žlučových kyseliny (Rizner et al. 2014). Zajímavá je spojitost polymorfismus genu pro AKR1C4 s manickou/hypomanickou iritabilitou u mužů s bipolární chorobou (Johansson et al. 2011, Johansson et al. 2012).



Obr. 22 Redukce 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dionu na GABA<sub>A</sub> modulátor allopregnanolon

AKR1D1 je steroidní 5 $\beta$ -reduktasa, která katalyzuje metabolismu steroidní hormonů s  $\alpha,\beta$ -nenasyceným A kruhem (Obr. 23), zároveň se stejně jako AKR1C4 podílí významně na biosyntéze žlučových kyselin (Penning 2015). AKR1D1 dále v játrech inaktivuje glukokortikoidy, jeho zvýšená exprese tak zvýší clearance glukokortikoidů a sníží tak expresi genů, na které glukokortikoidy cílí. Zároveň příjem exogenních glukokortikoidů snižuje aktivitu a expresi AKR1D1 a tím se clearance glukokortikoidů snižuje a prohlubuje se tak jejich účinek (Nikolau et al. 2019, 2020).



Obr. 23 Redukce steroidních hormonů s  $\alpha,\beta$ -nenasyceným A kruhem AKR1D1

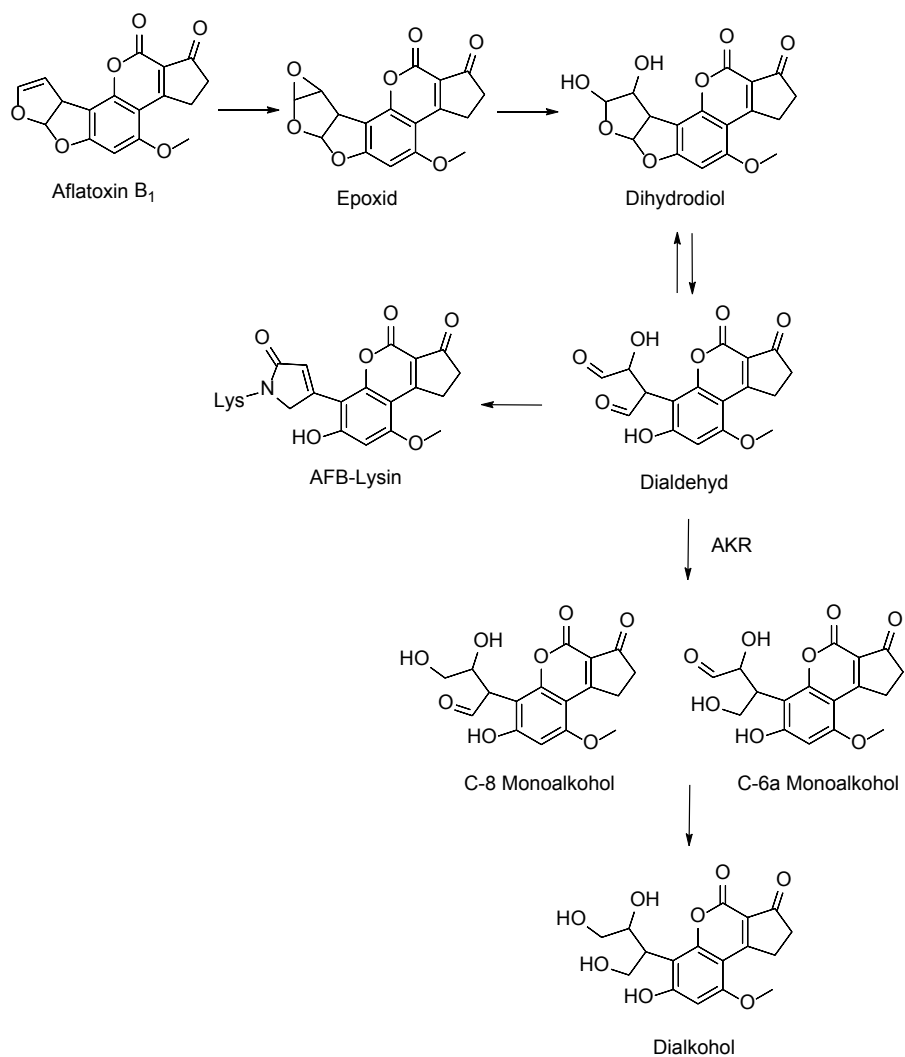
Novější člen AKR AKR1E2 je homolog myši jaterní keto-reduktasy AKR1E1. Nazývá se také lidská testis specifická AKR (htAKR), protože je vysoce exprimována v testes. Zřejmě se nepodílí na metabolizaci steroidních hormonů ani prostaglandinů, více studií je potřeba k prozkoumání aktivity tohoto enzymu (Azuma et al. 2004, Mindnich et al. 2009).

### **Rodina AKR6**

Z rodiny AKR6 jsou známí tři zástupci v lidském těle; AKR6A3, AKR6A5 a AKR6A9. Tyto tři tetramerní proteiny nejsou považovány za enzymy, protože tvoří  $\beta$ -podjednotky napětově řízených draselných kanálů a jejich hlavní funkcí je tak řízení jejich otevírání. S ostatními členy AKR nadrodiny sdílí vazebné místo pro NADPH. Jsou označovány také jako KV $\beta$ 1-3 a v rámci napětově řízených draselných kanálů se podílí se na regulaci membránového potenciálu, kontrakci svalu, uvolňování neurotransmiterů a hormonů (Nystoriak et al. 2017). Byla však také objevena slabá enzymatická aktivita vůči aldehydům a ketonům (Tipparaju et al. 2008). S vysokou afinitou se váží k pyridinovým nukleotidům, více studií o substrátové specifitě a katalytické aktivitě této skupiny je však potřeba pro pochopení jejich katalytické funkce (Tipparaju et al. 2008).

### **Rodina AKR7**

Aflatoxin aldehyd reduktasy AKR7A2 a AKR7A3 se účastní redukce aflatoxin dialdehydů na příslušné mono a bis alkoholy (Penning 2015). Touto reakcí zabrání AKR7 tvorbě hepatotoxických Schiffových bazí se zbytky lysinu (Obr. 24). AKR7A2 se také jako významná sukcinát semialdehyd reduktasa podílí na redukcí GABA na  $\gamma$ -hydroxybutyrát v CNS (Picklo et al. 2001). AKR7A2 je také nejhojnější reduktasou redukující ANT v kardiomyocytech, podílející se tak na jejich kardiotoxických účincích (Quiñones-Lombraña et al. 2019). Účinky při rakovinném onemocnění byly studovány také u AKR7A3, její aktivita je snížena u hepatocelulárního karcinomu. AKR7A3 senzitivizuje buňky k apoptickým procesům a její zvýšená exprese inhibuje aktivaci ERK, c-Jun a NF- $\kappa$ B antiapoptických signálních drah (Chow et al. 2017).



Obr. 24 Tvorba Shiffových bází aflatoxinu B s lysinem a metabolizace dialdehydu aflatoxinu AKR

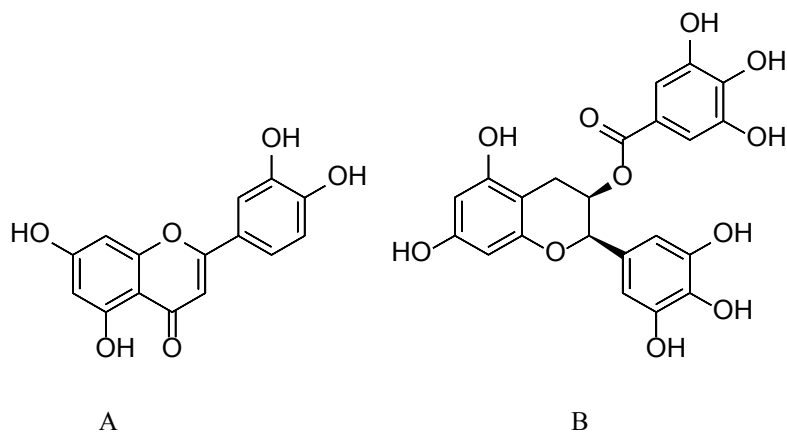
## 2.5 EVOBRUTINIB A DALŠÍ INHIBITORY CRE

CRE hrají významnou roli v metabolismu řady endogenních i exogenních molekul a mají vliv na mnohé fyziologické funkce lidského těla. Mohou tak být vhodným cílem inhibitorů při léčbě a adjuvantní terapii řady onemocnění.

### Přírodní inhibitory CRE

Inhibiční vlastnosti na CRE byly objeveny u mnohých přírodních látek. Jako přírodní inhibitory CRE byly popsány např. sekundární metabolity rostlin, flavonoidy, mezi nimiž se prokázal luteolin (Obr. 25A) jako silný inhibitor CBR1 ( $IC_{50} = 95$  nM). Zkoumání vztahu mezi

strukturou a aktivitou naznačilo, že za inhibiční účinek luteolinu je zodpovědná jeho 7-hydroxy skupina (Arai et al. 2015).



Obr. 25 A: Luteolin; B: (-)-Epigallokatechin gallát

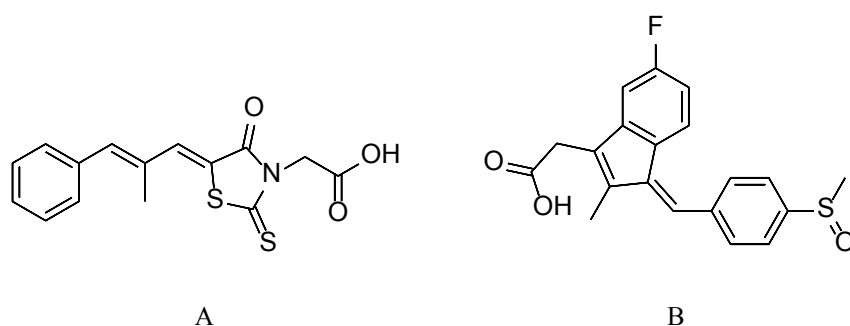
(-)-Epigallokatechin gallát (Obr. 25B) přítomný v zeleném čaji je také inhibitorem CRE včetně CBR1 a AKR1B1 (Balestri et al. 2020). Jako inhibitor CBR1 snížil tento katechin redukci Dau na buněčných liniích hepatomu a zvýšil tak jeho cytotoxicitu až o 20,5 % (Huang et al. 2010). Další přírodní látky rozmanitých struktur inhibující CRE zahrnují např. kurkumin, liquiricin, kyselina oleanolová, alkaloid berberin nebo stilbenoid resveratrol (Piska et al. 2017, Zeng et al. 2019).

### Další inhibitory CRE

Inhibiční vlastnosti k CRE byly objeveny také u řady syntetických molekul. Diabetické komplikace způsobené enzymem AKR1B1 mohou být potlačeny inhibitory blokující tento enzym, jako jsou sorbinil, tolrestat, nebo epalrestat (Obr. 26A) (Penning 2015). Inhibice AKR1B1 epalrestatem vedla také k potlačení progresu rakoviny děložního hrdla (Ji et al. 2020).

AKR1B10 je dalším enzymem výrazně zvýšeně exprimovaným u mnoha druhů rakovin a jeho inhibice je předmětem nedávných studií. Selektivně je AKR1B10 inhibována oleanolovou kyselinou (Takemura et al. 2011). Epalrestat inhiboval kromě AKR1B1 také AKR1B10 a usnadnil tak sorafenibem indukovanou apoptózu inhibicí mTOR dráhy na buněčné linii

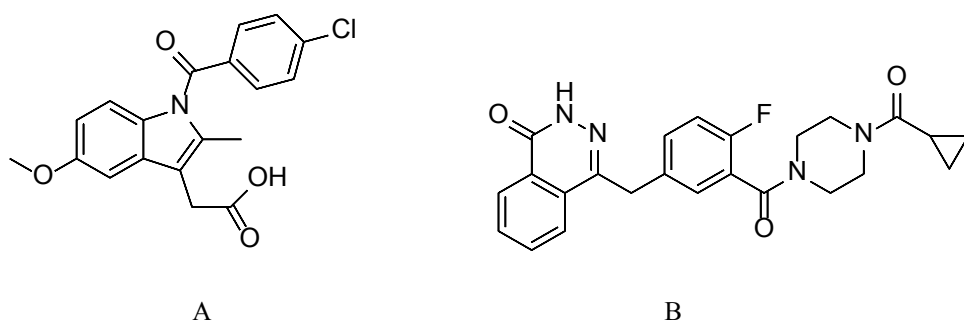
hepatocelulárního karcinomu (Geng et al. 2020). Inhibice enzymů AKR1B1 a AKR1B10 se zřejmě podílí také na protirakovinném účinku objeveném u nesteroidního antiflogistika sulindaku (Obr. 26B). Ve studii z roku 2015 byly naměřeny pro inhibici AKR1B1 hodnoty  $IC_{50}$  0,36  $\mu$ M a pro AKR1B10 2,7  $\mu$ M (Cousido-Siah et al. 2015).



Obr. 26 A: Epalrestat; B: Sulindak

AKR1C1-3 se významně podílí na metabolismu steroidních hormonů a jejich inhibitory tak mohou najít své využití v léčbě hormon dependentních nádorů. Pro kastročně rezistentní karcinom prostaty jsou využívány abirateron acetát, enzalutamid a apalutamid, jejich použití je však limitováno rychlým rozvojem rezistence způsobenou zvýšenou expresí enzymů z rodiny AKR (Wangtrakuldee et al. 2019). Inhibice těchto enzymů by mohla tento problém vyřešit, a proto se mnoho studií zaměřuje na vývoj vhodných inhibitorů AKR1C enzymů. Několik potenciálních inhibitorů, strukturně N-(naften-1-yl)amino-benzoátů, otestovali Wangtrakuldee et al. a u několika molekul dosáhli silné inhibice v nanomolárních koncentracích.

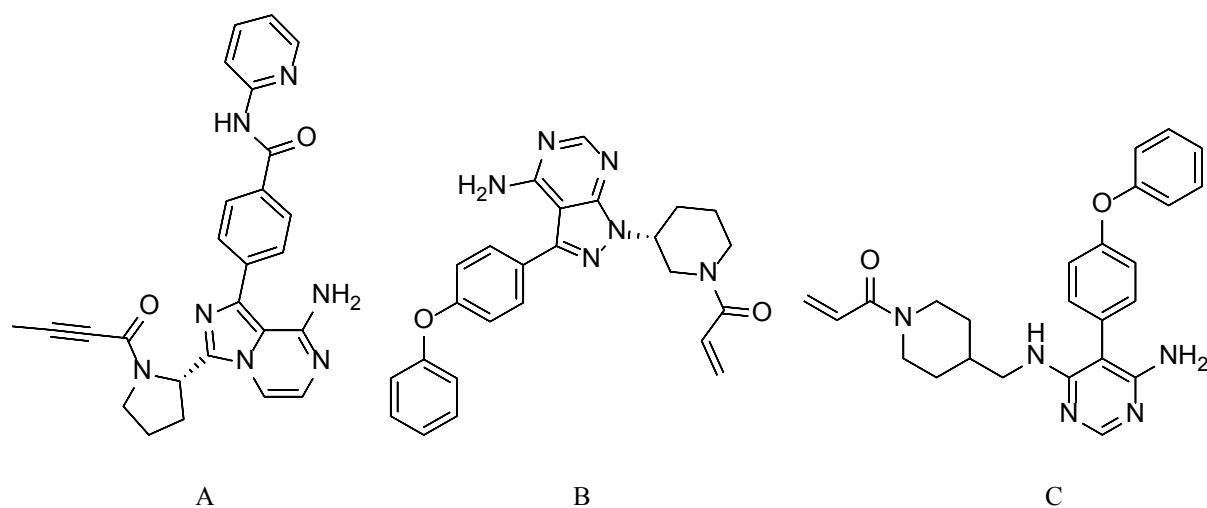
Nadměrná exprese především enzymu AKR1C3 představuje velký problém také u léčby AML ANT. Její aktivitu je možné snížit nesteroidním antiflogistikem indometacinem (Obr. 27A), v klinické praxi se však kombinace v této indikaci nevyužívá. Analoga indometacinu a dalších nesteroidních antiflogistik (NSAID) jsou však zkoumány a je možné jejich budoucí využití v chemoterapii (Gobec et al. 2005, Lolli et al. 2019).



Obr. 27 A: Indometacin; B: Olaparib

Nalezením vhodných potenciálních inhibitorů enzymů z rodin AKR a CBR a objasněním mechanismu účinku působení těchto inhibitorů v kombinaci s ANT se zabývá katedra biochemických věd na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Synergistický účinek inhibitoru poly(ADP-ribóza)polymerasy olaparibu (Obr. 27B) s ANT byl už známý a klinicky testovaný (Conte et al. 2014), mechanismus tohoto účinku však nebyl znám. Tavares et al. z Farmaceutické fakulty zjistili, že olaparib synergizuje s daunorubicinem právě inhibicí enzymu AKR1C3 (Tavares et al. 2020).

Dalšími nedávno studovanými molekulami byly BTK inhibitory akalabrutinib a ibrutinib (Obr. 28A-B). I u nich se projevil synergismus s daunorubicinem inhibicí AKR1C3 a jejich kombinace by tak mohla vést k překonání multi-lékové rezistence (Morell et al. 2020).



Obr. 28 A: Akalabrutinib; B: Ibrutinib; C: Evobrutinib



## **Evobrutinib**

Od schválení prvního BTK inhibitoru ibrutinibu v roce 2013 se hledají nové indikace a noví zástupci této skupiny. BTK jsou kinasy exprimované v B-lymfocytech, myeloidních buňkách a destičkách. BTK se podílí na proliferaci, dozrávání a diferenciaci B-lymfocytů, na imunitní odpovědi vrozené i adaptivní a zprostředkovává signalizaci B-celulárního receptoru (BCR) a Fc imunitních receptorů (Haselmayer et al. 2019). V monocytech a granulocytech řídí BTK fagocytózu a produkci cytokinů a dalších mediátorů zánětu (López-Herrera et al. 2014). BTK inhibitory jsou využívány v indikacích malignancí B-lymfocytů a autoimunitních chorob. Byly navrženy jako nové antitromboticky aktivní látky, testovali se také na pacientech s těžkým průběhem onemocnění COVID-19 (Estupiñán et al. 2021).

Mnozí zástupci BTK inhibitorů jsou v posledních letech hojně testované v indikacích roztroušené sklerozy, pemphigu, revmatoidní artritidy a lupu erythematoses. Jedním z novějších zástupců, vyvinutých k léčbě autoimunitních chorob, je Evo (Obr. 28C). Evo je ireverzibilní inhibitor, procházející přes HEB (Hundelshausen et al. 2021). Vzhledem ke kovalentní vazbě na BTK je jeho dlouhodobý a přetrvává dlouho po odstranění látky ze systémové cirkulace. Evo účinně inhibuje signalizaci zprostředkovanou BCR a Fc receptory, zabraňuje aktivaci B-buněk a buněk přirozené imunity, snižuje produkci autoprotilátek a normalizuje počty B i T buněk (Haselmayer et al. 2019). Evo již prošel II. fází klinického testování v indikaci roztroušené sklerozy (Montalban et al. 2019). Stejně jako u dalších inhibitorů kinas je však možný objev dalších účinků a rozšíření indikací tohoto BTK inhibitoru. V experimentální části se tato rigorózní práce zabývá zkoumáním účinků Evo na zástupce CRE z nadrodin AKR a SDR *in vitro* a jeho potenciální přínos při léčbě AML ANT.

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo otestovat účinek inhibitoru BTK Evo na pět vybraných CRE redukujících Dau na kardiotoxický a méně účinný daunorubicinol (Dau-ol) *in vitro*.

Dílčí experimentální cíle pak zahrnovaly:

- základní screening vybraných CRE (AKR1C3, AKR1B10, AKR1B1, AKR1A1 a CBR1) s Evo a předběžnou selekci enzymů nejsilněji inhibovaných Evo
- stanovení hodnot  $IC_{50}$  pro nejsilněji inhibované enzymy
- určení typu inhibice a inhibiční konstanty pro nejsilněji inhibovaný enzym
- určení typu vazby inhibitoru na enzym.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

#### Chemikálie a reagensie

NADP+	(Roche Diagnostics, Německo)
Glukosa-6-fosfát	(Applichem, Německo)
Sodno-fosfátový pufr (pH = 7,4; 0,1 M)	(Sigma-Aldrich Německo)
Chlorid hořečnatý (0,3 mM)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	(Roche Diagnostics, Německo)
Dimethylsulfoxid	(MP Biomedicals, Čína)
Destilovaná voda	Katedra biochemických věd, FaF)
Methanol	(Penta, Česká republika)
Kyselina mravenčí	(Sigma-Aldrich, Německo)
Acetonitril	(Sigma-Aldrich, Německo)

#### Inhibitor

- Skladován při teplotě -20 °C (vyšší koncentrace při -80 °C). Rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Evobrutinib 1mM, 10mM (Selleck Chemicals, Německo)

#### Enzymy

- Lidské CRE byly připraveny rekombinantně na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Na jejich získání byl využit expresní systém *E. coli*, následně byly rozpuštěné v NaP pufru a 20% glycerolu a uchovávány v -20 °C (nebo -80°C).

AKR1C3	1,5 mg/ml
AKR1B10	1,5 mg/ml
AKR1B1	1,5 mg/ml
AKR1A1	0,494 mg/ml
CBR1	1,47 mg/ml

## Substrát

Rozpuštěn v ultračisté vodě a skladován v lednici při +4 °C. Nebo v pevném čistém stavu skladován v mrazáku při teplotě -20 °C.

Daunorubicin hydrochlorid                      5mM (Sigma-Aldrich, Německo)

## 4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE

### Pomůcky

Rukavice	(Vulcan Medical, ČR)
Mikrozkumavky	(Eppendorfy)(1,5 ml, 2ml, 5ml, Eppendorf, Německo)
Stojan na zkumavky	(Eppendorf, Německo)
Laboratorní lžička	(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
Mikropipety	(0,5 – 1000 µl, Santorius Biohit, Finsko)
Špičky na mikropipety	(Santorius Biohit, Finsko)
Kádinky	
Stopky	(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
Vanička na led	
Vialky	(1ml, Agilent Technologies, California, USA)
Inserty do vialek	(Agilent, Technologies, California, USA)
Injekční stříkačky	(Terumo, Japonsko)
Jehly	(0,9 x 40 mm, Braun, ČR)
Membránový filtr na stříkačky	(Sigma-Aldrich, Německo)

### Přístroje a programy

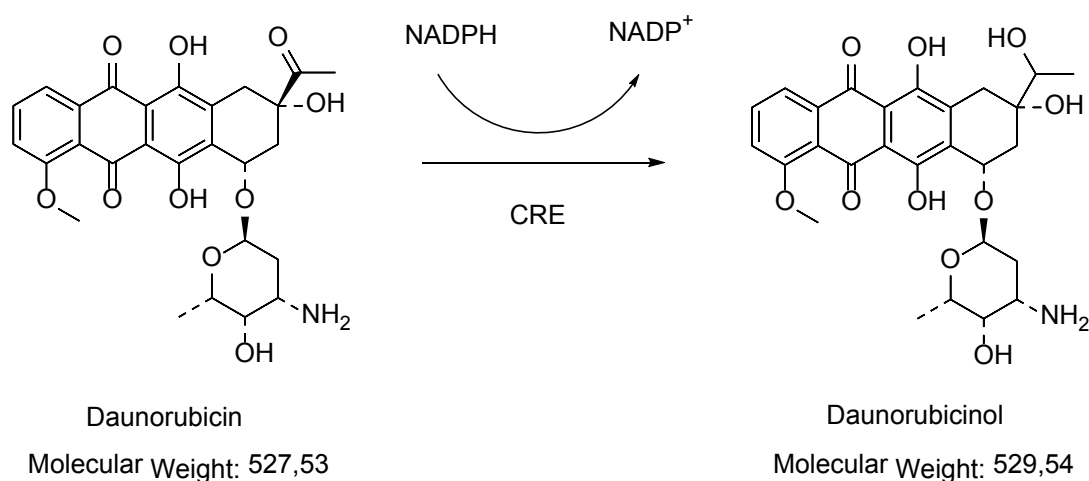
Analytické váhy	(Scaltec, Florida, USA)
Vortex	(IKA, Německo)
Inkubátor Thermomixer	(Eppendorf, Německo)
Přístroj na výrobu ledu	(Scotsman, UK)
Centrifuga	(Eppendorf, Německo)
UHPLC	(Agilent Technologies, California, USA)
Kolona	(2,1 x 50 mm, 1,8 µm, Zorbax Eclipse Plus C18, Agilent Technologies, California, USA)
ChemDraw Professional 19.0	(PerkinElmer, Massachusetts, USA)

## 4.3 METODIKA PRÁCE

### 4.3.1 Princip reakcí

Cílem experimentu bylo zjistit, zda Evo inhibuje vybrané CRE a pokud ano, specifikovat, do jaké míry inhibice probíhá a o jaký typ inhibice se jedná.

CRE metabolizují ANT redukcí karbonylové skupiny v poloze 13 na hydroxy skupinu (Obr. 29). Evo tuto reakci může inhibovat a zabraňovat tak vzniku kardiotoxického a neúčinného metabolitu. Do jaké míry Evo dané enzymy inhibuje bylo změřeno pomocí UHPLC, na základě kvantifikace obsahu substrátu (Dau) a produktu (Dau-ol) v reakční směsi.



Obr. 29 Redukce Dau na Dau-ol v přítomnosti CRE

### 4.3.2 Typy reakcí a jejich složení

Reakční směs o 100  $\mu$ l se skládá z pěti klíčových složek. Jedná se o sodno-fosfátový pufr (NaPB), regenerační systém (RS), enzym, inhibitor a substrát (Tab. 2).

Všechny reakce byly připraveny v triplikátech pro zajištění co nejpřesnějších výsledků a vyloučení případné odchylky způsobené chybou v průběhu experimentu.

Tab. 2 Obecné složení reakční směsi

	NaPB	Evo	RS	Enzym	Substrát
<b>Objem [<math>\mu</math>l]</b>	58	2	20	10	10

### Základní screening enzymů

U základního screeningu byly připravovány navíc kontrolní triplikáty, které neobsahovaly některé ze zmíněných složek. Např. v neinhibované reakci zcela chybí inhibitor, v kontrole bez inhibitoru je inhibitor nahrazen DMSO, který sám o sobě disponuje inhibičními vlastnostmi. V kontrole bez enzymu se chybějící objem roztoku enzymu nahradí přidáním více NaPB a místo substrátu se v kontrolní zkumavce bez substrátu doplní destilovaná voda (Tab. 3).

Základní screening sloužil k selekci enzymů nejvíce inhibovaných Evo, a tudíž relevantních pro další analýzu.

Tab. 3 Složení reakčních směsí při základním screeningu enzymů

Koncentrace inhibitoru [ $\mu$ M]	NaPB [ $\mu$ l]	Evo [ $\mu$ l]	RS [ $\mu$ l]	Enzym [ $\mu$ l]	Substrát [ $\mu$ l]
0*	60	0*	20	10	10
0**	58	2**	20	10	10
10	58	2	20	10	10
50	58	2	20	10	10
0***	70	0***	20	0***	10
0****	60	0****	20	10	10****

\* Neinhibovaná reakce (inhibitor nahrazen 2  $\mu$ l NaPB)

\*\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2  $\mu$ l DMSO)

\*\*\* Kontrola bez enzymu (enzym i inhibitor nahrazeny 12  $\mu$ l NaPB)

\*\*\*\* Kontrola bez substrátu (substrát nahrazen 10  $\mu$ l destilované vody, inhibitor nahrazen 2  $\mu$ l NaPB)

### Stanovení hodnoty IC<sub>50</sub>

U enzymů, kde se prokázal Evo jako neúčinnější, se následně stanovovaly hodnoty IC<sub>50</sub>. Zde bylo klíčové použití více různých koncentrací inhibitoru při zachování koncentrací enzymu i substrátu (Tab. 4, 5).

Tab. 4 Složení reakčních směsí při stanovování hodnoty IC<sub>50</sub> Evo s enzymem AKR1C3

Koncentrace inhibitoru [μM]	NaPB [μl]	Evo [μl]	RS [μl]	AKR1C3 [μl]	Substrát [μl]
0*	58	2*	20	10	10
0,02	58	2	20	10	10
0,1	58	2	20	10	10
0,5	58	2	20	10	10
2	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
100	58	2	20	10	10
1000	58	2	20	10	10

\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2 μl DMSO)

Tab. 5 Složení reakčních směsí při stanovování IC<sub>50</sub> Evo s enzymem AKR1B10

Koncentrace inhibitoru [μM]	NaPB [μl]	Evo [μl]	RS [μl]	AKR1B10 [μl]	Substrát [μl]
0*	58	2*	20	10	10
0,5	58	2	20	10	10
2	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
50	58	2	20	10	10
250	58	2	20	10	10
1000	58	2	20	10	10

\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2 μl DMSO)

### Určení typu inhibice a inhibiční konstanty K<sub>i</sub>

Pro podrobnější analýzu inhibice, typu inhibice a určení inhibiční konstanty K<sub>i</sub> byly kromě koncentrací inhibitoru měněny také koncentrace substrátu (Tab. 6).

Tab. 6 Složení reakčních směsí při určení typu inhibice enzymu AKR1C3 Evo

Koncentrace inhibitoru [μM]	NaPB [μl]	Evo [μl]	RS [μl]	AKR1C3 [μl]	Substrát [μl]
<b>Substrát 200 μM</b>					

0*	58	2*	20	10	10
1	58	2	20	10	10
5	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
<b>Substrát 400 <math>\mu</math>M</b>					
0*	58	2*	20	10	10
1	58	2	20	10	10
5	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
<b>Substrát 600 <math>\mu</math>M</b>					
0*	58	2*	20	10	10
1	58	2	20	10	10
5	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
<b>Substrát 800 <math>\mu</math>M</b>					
0*	58	2*	20	10	10
1	58	2	20	10	10
5	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
<b>Substrát 1000 <math>\mu</math>M</b>					
0*	58	2*	20	10	10
1	58	2	20	10	10
5	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
<b>Substrát 2000 <math>\mu</math>M</b>					
0*	58	2*	20	10	10
1	58	2	20	10	10
5	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10

\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2  $\mu$ l DMSO)



## Určení typu vazby inhibitoru na enzym

Při zjištění nekompetitivního typu inhibice se dále pokračuje analýzou vazby inhibitoru na enzym při změnách koncentrací jak inhibitoru, tak enzymu (Tab. 7).

Tab. 7 Složení reakčních směsí při určování typu vazby inhibitoru na enzym

Koncentrace inhibitoru [ $\mu\text{M}$ ]	NaPB [ $\mu\text{l}$ ]	Evo [ $\mu\text{l}$ ]	RS [ $\mu\text{l}$ ]	AKR1C3 [ $\mu\text{l}$ ]	Substrát [ $\mu\text{l}$ ]
<b>AKR1C3 0,05 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>					
0*	58	2*	20	10	10
0,02	58	2	20	10	10
0,1	58	2	20	10	10
0,5	58	2	20	10	10
2	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
100	58	2	20	10	10
1000	58	2	20	10	10
<b>AKR1C3 0,15 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>					
0*	58	2*	20	10	10
0,02	58	2	20	10	10
0,1	58	2	20	10	10
0,5	58	2	20	10	10
2	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
100	58	2	20	10	10
1000	58	2	20	10	10
<b>AKR1C3 0,3 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>					
0*	58	2*	20	10	10
0,02	58	2	20	10	10
0,1	58	2	20	10	10
0,5	58	2	20	10	10
2	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
100	58	2	20	10	10

1000	58	2	20	10	10
<b>AKR1C3 0,5 µg/ml</b>					
0*	58	2*	20	10	10
0,02	58	2	20	10	10
0,1	58	2	20	10	10
0,5	58	2	20	10	10
2	58	2	20	10	10
10	58	2	20	10	10
100	58	2	20	10	10
1000	58	2	20	10	10

\*Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2 µl DMSO)

### 4.3.3 Podrobný postup experimentu

Samotná metodika celého experimentu spočívala v pěti krocích:

- příprava reakční směsi,
- preinkubace,
- inkubace,
- precipitace a filtrace,
- měření UHPLC a jeho vyhodnocení.

### Příprava regeneračního systému

NADPH regenerační systém slouží ke generaci NADPH, významného kofaktoru pro činnost redukčních enzymů. Skládá se z nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADP<sup>+</sup>), Glukosy-6-fosfátu (Glc-6-P), Glukosy-6-fosfátdehydrogenasy (Glc-6-PDH), chloridu hořečnatého (MgCl<sub>2</sub>) 0,1 M a NaPB 0,1 M, pH 7,4 (Tab. 8).

Tab. 8 Složení regeneračního systému pro jednu reakční směs

Složka	NADP <sup>+</sup>	Glc-6-P	NaPB	MgCl <sub>2</sub>	Glc-6-PDH
Množství	0,2 mg	0,6 mg	10 µl	10 µl	0,5 µl

Prvním krokem přípravy regeneračního systému bylo pečlivé a přesné navážení NADP<sup>+</sup> a Glc-6-P do prázdné eppendorfky (množství přepočítané na počet naplánovaných reakcí + rezerva alespoň pro dvě reakce navíc). Druhým krokem bylo přidání odpovídajícího množství NaPB

a míchání na vortexu do vzniku homogenního roztoku. Následně byl do eppendorfky pipetován MgCl<sub>2</sub>. Posledním krokem zůstávalo přidání enzymu (Glc-6-PDH), tento krok se však provedl vždy až v čase potřeby, před samotným pipetováním RS do jednotlivých reakčních směsí.

### **Příprava inhibitoru**

Zásobní roztok inhibitoru byl uchováván v mrazáku při -20 °C (koncentrovanější roztok při -80 °C). Po vyjmutí z mrazáku bylo nutné roztok rozmrazit teplem rukou a zvortexovat pro zajištění homogenity před ředěním a pipetováním. Pro vypočtení požadovaného objemu ZR inhibitoru při ředění inhibitoru na požadovanou koncentraci byl využit vzorec:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$c_1$ = koncentrace zásobního roztoku inhibitoru [ $\mu$ M],  $V_1$ = objem zásobního roztoku potřebný k přípravě roztoku inhibitoru výsledné koncentrace [ $\mu$ l],  $c_2$ = výsledná koncentrace inhibitoru v reakční směsi vynásobená 50-ti [ $\mu$ M],  $V_2$ = objem roztoku inhibitoru o výsledné koncentraci [ $\mu$ l]

Vypočítaný objem ZR inhibitoru byl doplněn DMSO na konečný objem roztoku inhibitoru.

### **Příprava enzymů**

Podobně jako inhibitor, enzymy bylo potřeba vyjmout z mrazáku a vyčkat do jejich rozmrazení. Na požadovanou koncentraci (Tab. 9) byly naředěny přidáním NaPB, po vypočtení potřebného objemu zásobního roztoku obdobným vzorcem, jako u inhibitoru.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$c_1$ = koncentrace zásobního roztoku enzymu [ $\mu$ g/ $\mu$ l],  $V_1$ = objem zásobního roztoku potřebný k přípravě roztoku enzymu výsledné koncentrace [ $\mu$ l],  $c_2$ = výsledná koncentrace roztoku enzymu [ $\mu$ g/ $\mu$ l],  $V_2$ = objem roztoku enzymu o výsledné koncentraci [ $\mu$ l]

Tab. 9 Cílové koncentrace jednotlivých enzymů na jednu reakční směs

Enzym	AKR1C3	AKR1B10	AKR1B1	AKR1A1	CBR1
Množství [ $\mu$ g/reakci]	1,5	5	5	1	1 (0,5)

### **Příprava daunorubicinu**

Zásobní roztok Dau 5 mM byl uchováván v lednici. Před jeho použitím se pro zahřátí vložil na tři minuty do ultrazvukové lázně.

Při potřebě jiné koncentrace se roztok Dau připravil v čase potřeby rozpuštěním čistého Dau v destilované vodě. Hmotnost Dau, potřebná pro přípravu roztoku o dané koncentraci se vypočítala podle vzorce:

$$m = c \times M_{\text{Dau}} \times V$$

$m$  = navážka Dau [mg],  $c$  = koncentrace výsledného roztoku Dau [mM],  $M_{\text{Dau}}$  = molární hmotnost Dau hydrochloridu (563,98),  $V$  = objem roztoku Dau o výsledné koncentraci [ml],

Z takto připraveného roztoku Dau mohly být připraveny další roztoky o nižších koncentracích v případě potřeby více různých koncentrací (Určení typu inhibice Tab. 6).

### **Příprava reakčních směsí**

Potřebný počet mikrozkušavek (eppendorfek) byl v triplicátech naskládán do stojanu na zkumavky a označen popisky vylučujícími zaměnitelnost jednotlivých reakčních směsí. Jako první bylo do jednotlivých zkumavek rozpipetováno 58  $\mu\text{l}$  NaPB 0,1 M (60  $\mu\text{l}$  u neinhibované kontrolní reakce a reakce bez substrátu, 70  $\mu\text{l}$  u kontroly bez enzymu) (Tab 2). Následovalo přidání 2  $\mu\text{l}$  inhibitoru o připravené koncentraci, případně 2  $\mu\text{l}$  DMSO v kontrolních triplicátech bez inhibitoru. Jako třetí byl do reakční směsi přidán RS 20  $\mu\text{l}$ , jehož příprava byla dokončena těsně před pipetováním přidáním glukosy-6-fosfátdehydrogenasy. Předposlední složkou reakční směsi byl předpřipravený roztok CRE v objemu 10  $\mu\text{l}$ . Všechny zkumavky byly postupně zvortexovány a umístěny na 5 s do centrifugy.

### **Preinkubace**

Po centrifugaci byly všechny vzorky přemístěny do termostatu předem vyhřátém na 37 °C. Za stálého třepání byly vzorky v termostatu zahřívány po dobu 10 min. Důvodem preinkubace bylo usnadnění navázání inhibitoru na enzym a příprava na inkubaci se substrátem.

### **Inkubace**

Inkubace probíhala ve stejném termostatu za stálého míchání po dobu 30 min. Reakce byla zahájena v každé zkumavce přidáním 10  $\mu\text{l}$  Dau a vortexováním ve 30 s intervalech. Při

základním screeningu byla prováděna také kontrola bez substrátu, kde místo substrátu bylo přidáno 10 µl destilované vody (Tab. 3). Po uběhnutí 30 min, byly ve 30 s intervalech reakce postupně ukončovány 300 µl methanolu a uložením do lázně s ledem. Po ukončení poslední reakce byly všechny zkumavky přesunuty na 30 min do mrazáku.

### **Precipitace a filtrace**

Po vyjmutí z mrazáku byly vzorky opět umístěny do centrifugy, pro odstředění precipitátu, tentokrát na 10 min s rychlostí otáček 13 400 rpm. Po dokončení byl zřetelný precipitát na dně zkumavek. Pro důkladné odstranění precipitátu před měřením UHPLC byla využita injekční stříkačka s filtrem. Tekutina z horní části zkumavky byla nabrána jehlou do stříkačky, následně byla jehla vyměněna za filtr a tekutina protlačena přes filtr do předem připravených a označených vialek s inserty. Mezi jednotlivými triplikáty byly jehla, stříkačka i filtr řádně propláchnuty destilovanou vodou a vysušeny, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků mezi sebou. Vialky byly uzavřeny víčky se septy.

### **UHPLC a interpretace výsledků**

Výsledky reakcí byly hodnoceny za využití UHPLC přístroje na principu detekce obsahu substrátu Dau a produktu Dau-ol ve filtrátu pomocí fluorescenčního detektoru. Po vypsání sekvence a určení pozic vialek v počítači, byly vialky vyskládány na odpovídající místa do stojanu. Parametry přístroje byly nastaveny následovně: objem nástřiku vzorku 5 µl, průtoková rychlost 0,7 ml/min, izokratická eluce, složení mobilní fáze: 0,1% kyselina mravenčí a acetonitril 74:26 a fluorescenční detektor (emisní vlnová délka 560 nm, excitační délka 480 nm).

Z výsledných píků byl podle kalibrační křivky vypočítán obsah metabolitu Dau v jednom nástřiku v ng. Výsledky měření byly převedeny do Microsoft Excel, ve kterém byla následovně spočítána specifická aktivita enzymů dle vzorce:

$$A = (m \times K \times 1000) / (t \times C_E \times M_{\text{Dau-ol}})$$

A= specifická aktivita enzymu [nmol/mg/min], m= množství změřeného Dau-ol ve vzorku [ng], K= koeficient zředění (80), t= čas inkubace [min], C<sub>E</sub>= koncentrace enzymu ve vzorku [µg/reakci], M<sub>Dau-ol</sub>= molární hmotnost Dau-ol (529,54 g/mol), hodnota 1000= pro převod na µg

Pro grafické hodnocení specifické aktivity jednotlivých vzorků, určení hodnot  $IC_{50}$ , Inhibiční konstanty  $K_i$ , typu inhibice a typu vazby inhibitoru na enzym byl využit program GraphPad Prism 8.2.0.

## 5. VÝSLEDKY

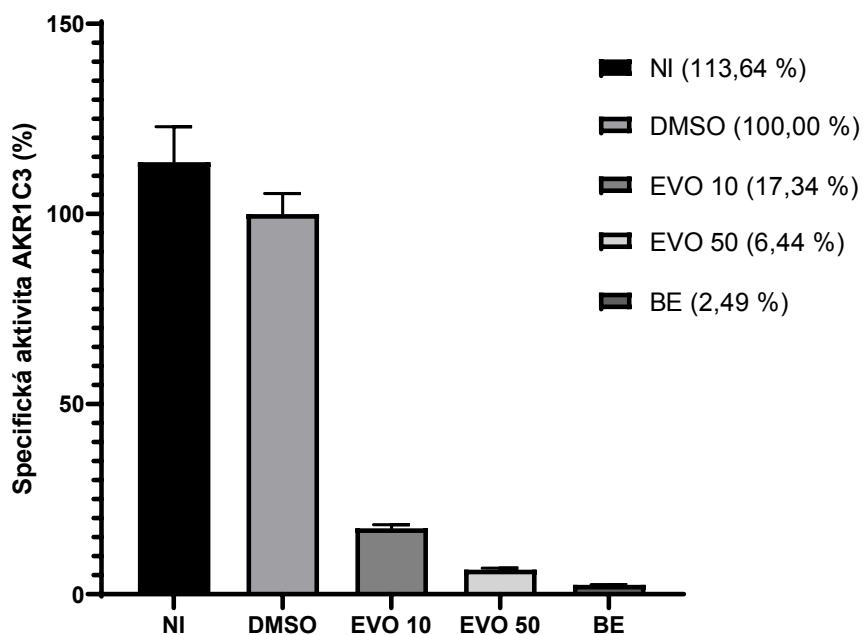
### 5.1 ZÁKLADNÍ SCREENING

V rámci základního screeningu byl inhibitor Evo inkubován spolu s vybranými CRE, a to enzymy z nadrodiny aldoketoreduktas AKR1C3, 1B10, 1B1, 1A1 a enzymem CBR1 z nadrodiny SDR. Úkolem bylo zjistit, vůči kterým z těchto enzymů vykazuje Evo nejvyšší inhibiční potenciál a tudíž, které z enzymů by byly vhodné pro další analýzu s Evo.

Pro základní screening byly použity pro každý enzym dvě koncentrace Evo, 10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  na jednu reakci v objemu 2  $\mu\text{l}$  (Tab. 3). Připravený roztok tedy musel být 50-krát koncentrovanější. Dále se prováděly kontrolní reakce bez inhibitoru a kontrolní reakce s DMSO. DMSO kontrola sloužila k eliminaci vlivu DMSO na inhibici enzymu. Hodnota specifické aktivity enzymu inkubovaného pouze s DMSO místo inhibitoru se stala referenční pro výpočet inhibičního potenciálu Evo. Všechny reakce byly prováděné 2-krát a vždy v triplicátech (kromě kontroly bez enzymu, která byla prováděná v duplikátech), dohromady tedy 6-krát (4-krát), pro lepší interpretaci výsledků z průměrů naměřených hodnot.

- **Základní screening Evo s enzymem AKR1C3**

Enzym AKR1C3 je nejaktivnější z výše zmíněných enzymů, s potvrzenou účastí na rezistenci nádorových buněk vůči ANT. Množství enzymu AKR1C3 na reakci odpovídalo 1,5  $\mu\text{g}$ .



Obr. 30 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1C3 v procentech v jednotlivých reakcích. NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , Evo 50 – reakce s Evo o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , BE – kontrolní reakce bez enzymu. Hodnota specifické aktivity vzorku kontroly DMSO určena jako 100 %. Graf byl vytvořen z průměrů dvou experimentálních sad vzorků, každá sada byla měřena v triplicátech, vzorky bez enzymu v duplikátech.

Tab. 10 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1C3 a inhibice enzymu Evo, průměr a směrodatná odchylka z obou experimentálních sad vzorků.

Koncentrace Evo [ $\mu\text{M}$ ]	Specifická aktivita enzymu AKR1C3 [nmol/mg/min]	Aktivita [%]	Inhibice [%]
0*	274,23 $\pm$ 17,60		
0**	241,33 $\pm$ 11,18	100,00 $\pm$ 4,63	
10 $\mu\text{M}$	41,84 $\pm$ 1,82	17,34 $\pm$ 0,75	82,66 $\pm$ 0,75
50 $\mu\text{M}$	15,55 $\pm$ 0,93	6,44 $\pm$ 0,39	93,56 $\pm$ 0,39
0***	6,00 $\pm$ 0,07	2,49 $\pm$ 0,03	

\* Neinhibovaná reakce (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  NaPB)

\*\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  DMSO)

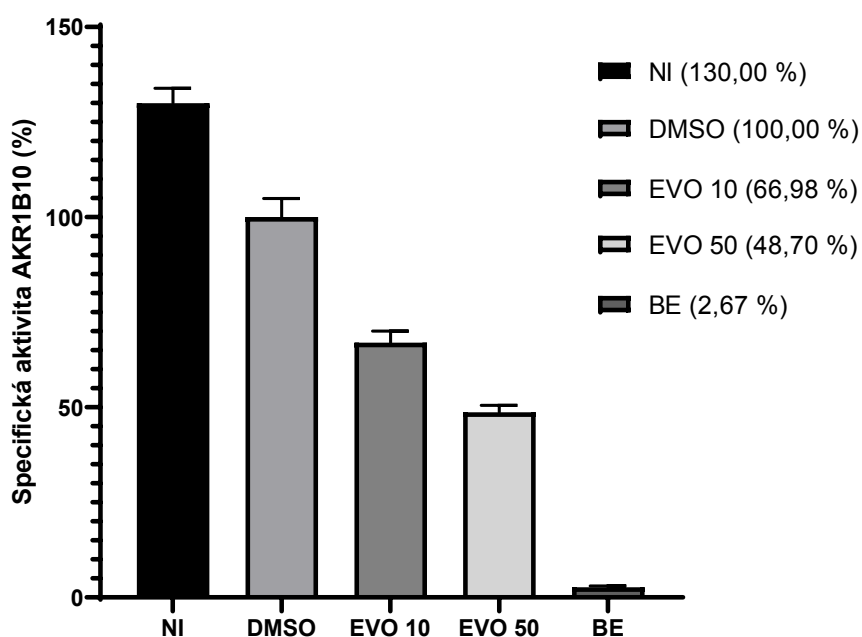
\*\*\* Kontrola bez enzymu (enzym i inhibitor nahrazeny 12  $\mu\text{l}$  NaPB)



Ze získaných hodnot je patrná silná inhibice enzymu AKR1C3 Evo. Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  inhiboval enzym AKR1C3 průměrně z 82,66 %, vyšší koncentrace Evo, 50  $\mu\text{M}$ , vedla k vyšší inhibici enzymu, průměrně z 93,56 % (Obr. 30, Tab. 10).

- **Základní screening Evo s enzymem AKR1B10**

Dalším enzymem inkubovaným s Evo byl enzym AKR1B10. Výsledná koncentrace AKR1B10 bylo 5  $\mu\text{g}$  na reakci.



Obr. 31 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 v procentech v jednotlivých reakcích. NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , Evo 50 – reakce s Evo o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , BE – kontrolní reakce bez enzymu. Hodnota specifické aktivity vzorku kontroly DMSO určena jako 100 %. Graf byl vytvořen z průměrů dvou experimentálních sad vzorků, každá sada byla měřena v triplicátech, vzorky bez enzymu v duplikátech.

Tab. 11 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 a inhibice enzymu Evo, průměr a směrodatná odchylka z obou experimentálních sad vzorků.

Koncentrace Evo [ $\mu\text{M}$ ]	Specifická aktivita enzymu AKR1B10 [ $\text{nmol/mg/min}$ ]	Aktivita [%]	Inhibice [%]
0*	95,95 $\pm$ 2,00		
0**	73,81 $\pm$ 2,65	100,00 $\pm$ 3,59	
10 $\mu\text{M}$	49,44 $\pm$ 1,83	66,98 $\pm$ 2,48	33,02 $\pm$ 2,48
50 $\mu\text{M}$	35,94 $\pm$ 1,02	48,70 $\pm$ 1,38	51,30 $\pm$ 1,38
0***	1,97 $\pm$ 0,18	2,67 $\pm$ 0,25	

\* Neinhibovaná reakce (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  NaPB)

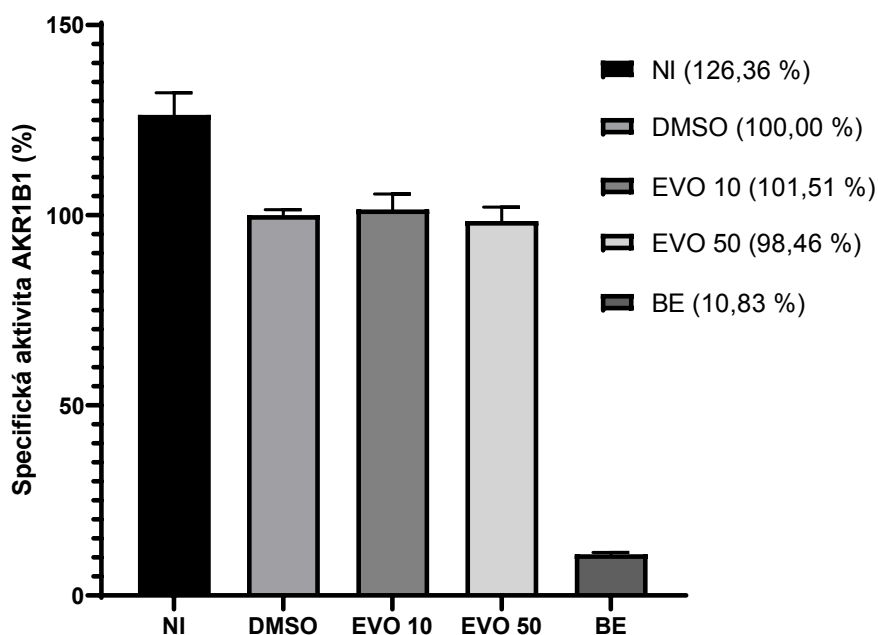
\*\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  DMSO)

\*\*\* Kontrola bez enzymu (enzym i inhibitor nahrazeny 12  $\mu\text{l}$  NaPB)

Dle naměřených hodnot Evo inhibuje enzym AKR10 průměrně z 33,02 % při použití 10  $\mu\text{M}$  koncentrace Evo a z 51,30 % při použití 50  $\mu\text{M}$  koncentrace (Obr. 31, Tab. 11). Inhibice je tedy nižší než u enzymu AKR1C3, přesto stále signifikantní.

- **Základní screening Evo s enzymem AKR1B1**

Enzym AKR1B1 byl použit v koncentraci 5  $\mu\text{g}$  na reakci.



Obr. 32 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B1 v procentech v jednotlivých reakcích. NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , Evo 50 – reakce s Evo o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , BE – kontrolní reakce bez enzymu. Hodnota specifické aktivity vzorku kontroly DMSO určena jako 100 %. Graf byl vytvořen z průměrů dvou experimentálních sad vzorků, každá sada byla měřena v triplicátech, vzorky bez enzymu v duplikátech.

Tab. 12 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B1 a inhibice enzymu Evo, průměr a směrodatná odchylka z obou experimentálních sad vzorků.

Koncentrace Evo [ $\mu\text{M}$ ]	Specifická aktivita enzymu AKR1B1 [nmol/mg/min]	Aktivita [%]	Inhibice [%]
0*	21,71 $\pm$ 0,75		
0**	17,18 $\pm$ 0,19	100,00 $\pm$ 1,36	
10 $\mu\text{M}$	16,91 $\pm$ 0,95	101,51 $\pm$ 2,97	
50 $\mu\text{M}$	16,92 $\pm$ 0,48	98,46 $\pm$ 2,80	1,54 $\pm$ 2,80
0***	1,86 $\pm$ 0,07	10,83 $\pm$ 0,40	

\* Neinhibovaná reakce (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  NaPB)

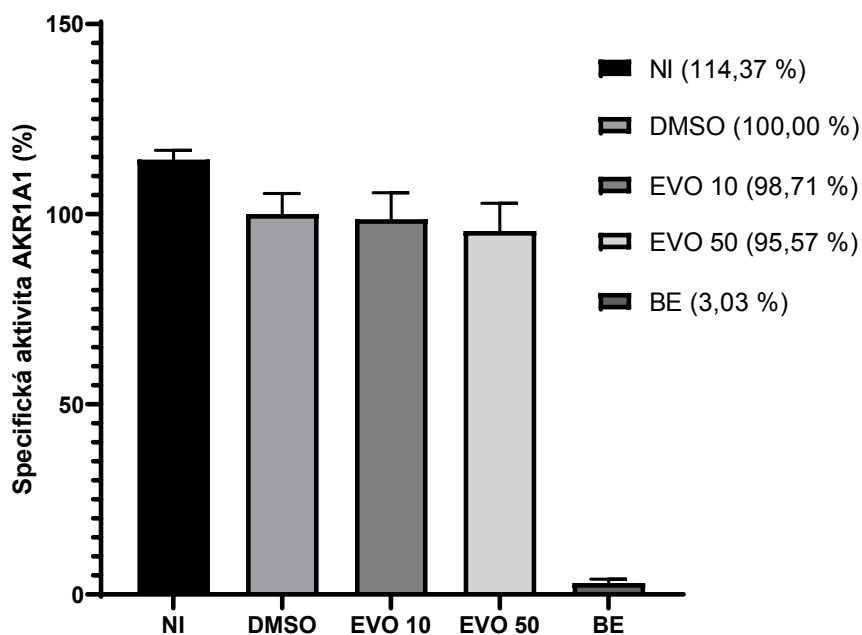
\*\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  DMSO)

\*\*\* Kontrola bez enzymu (enzym i inhibitor nahrazeny 12  $\mu\text{l}$  NaPB)

Nedochází ke změně aktivity enzymu AKR1B1 při inkubaci s inhibítorem, a tudíž jím není inhibován (Obr. 32, Tab. 12).

- **Základní screening Evo s enzymem AKR1A1**

Enzym AKR1A1 byl použit v koncentraci 1  $\mu\text{g}$  na reakci.



Obr. 33 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 v procentech v jednotlivých reakcích. NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , Evo 50 – reakce s Evo o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , BE – kontrolní reakce bez enzymu. Hodnota specifické aktivity vzorku kontroly DMSO určena jako 100 %. Graf byl vytvořen z průměrů dvou experimentálních sad vzorků, každá sada byla měřena v triplikátech, vzorky bez enzymu v duplikátech.

Tab. 13 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 a inhibice enzymu Evo, průměr a směrodatná odchylka z obou experimentálních sad vzorků.

Koncentrace Evo [ $\mu\text{M}$ ]	Specifická aktivita enzymu AKR1A1 [ $\text{nmol/mg/min}$ ]	Aktivita [%]	Inhibice [%]
0 <sup>*</sup>	501,00 $\pm$ 7,75		
0 <sup>**</sup>	438,05 $\pm$ 20,25	100,00 $\pm$ 4,62	
10 $\mu\text{M}$	432,38 $\pm$ 23,91	98,71 $\pm$ 5,46	1,29 $\pm$ 5,46
50 $\mu\text{M}$	418,66 $\pm$ 23,85	95,57 $\pm$ 5,44	4,43 $\pm$ 5,44
0 <sup>***</sup>	13,29 $\pm$ 3,68	3,03 $\pm$ 0,84	

\* Neinhibovaná reakce (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  NaPB)

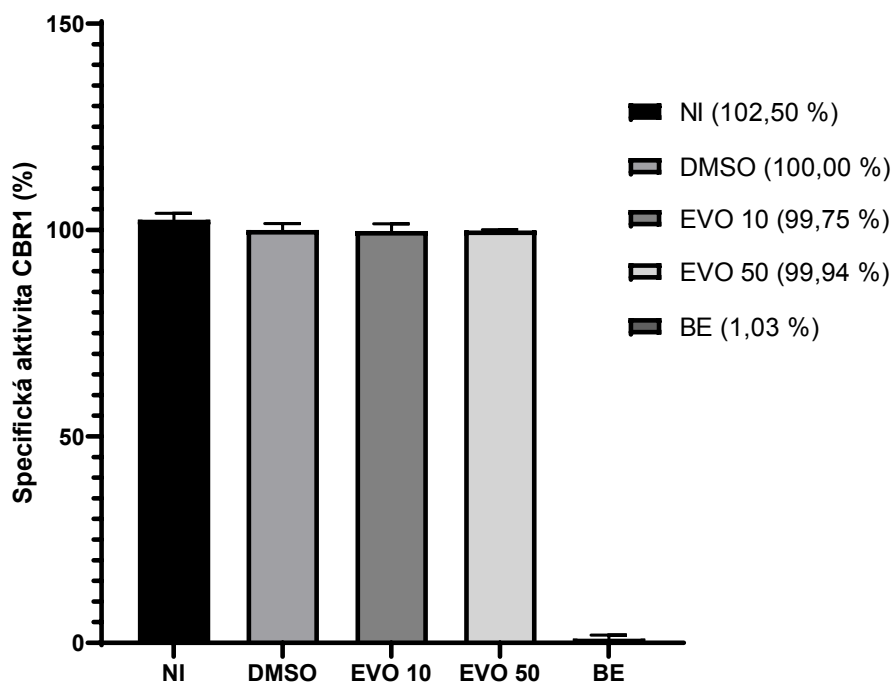
\*\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  DMSO)

\*\*\* Kontrola bez enzymu (enzym i inhibitor nahrazeny 12  $\mu\text{l}$  NaPB)

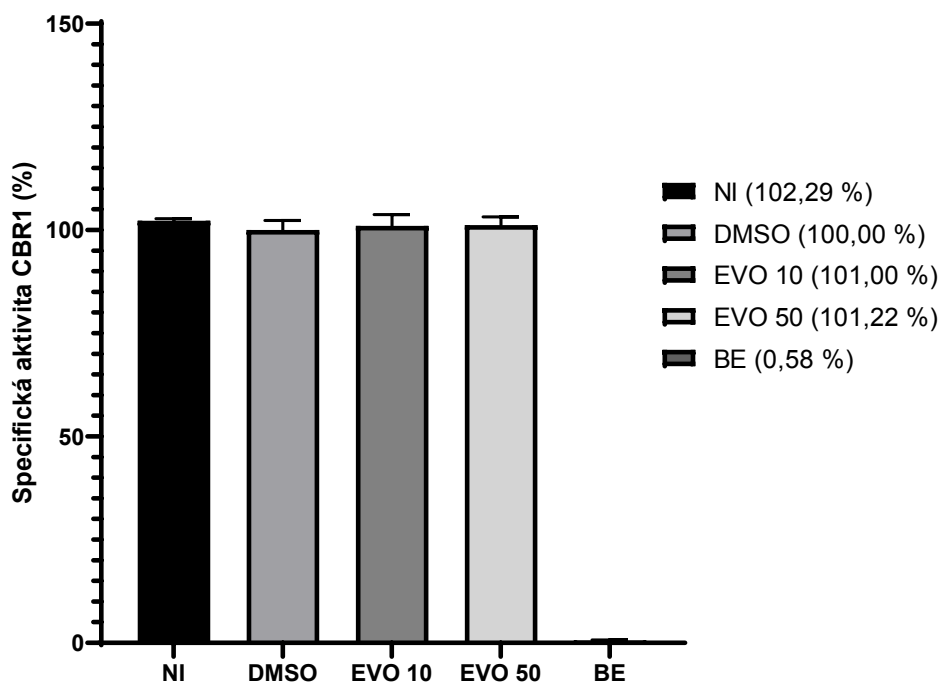
Naměřené hodnoty inhibice enzymu AKR1A1 Evo nebyly statisticky významné (Obr. 33, Tab. 13).

- **Základní screening Evo s enzymem CBR1**

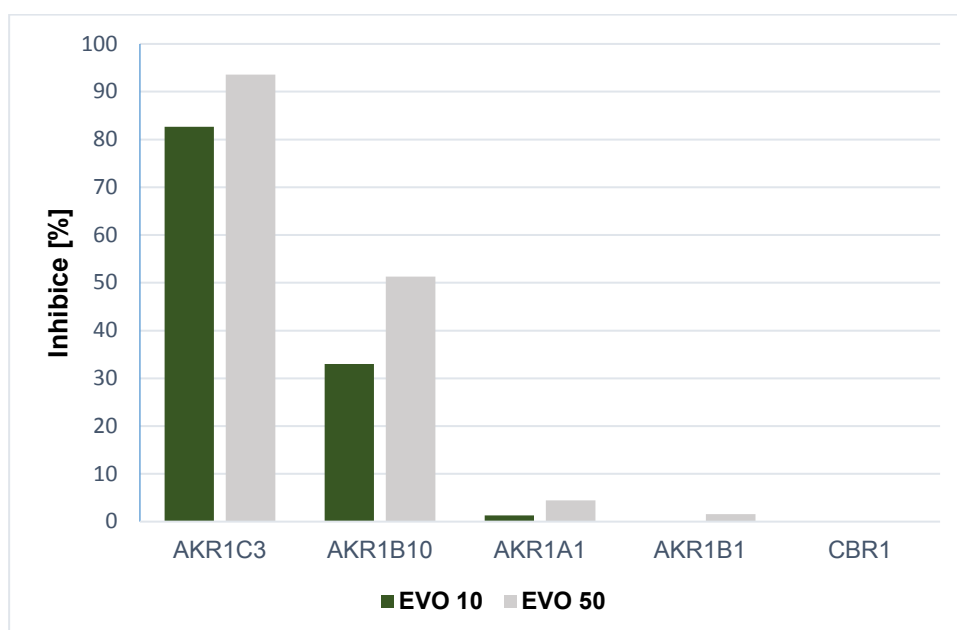
Enzym CBR1 byl měřen ve dvou různých koncentracích, a to 1  $\mu\text{g}$  na reakci a při druhém měření 0,5  $\mu\text{g}$  na reakci. Z obr. 34 a 35 je patrné, že Evo nevykazuje k tomuto enzymu statisticky významný účinek.



Obr. 34 Hodnoty specifické aktivity enzymu CBR1 (o koncentraci 1  $\mu\text{g}$  na reakci) v procentech v jednotlivých reakcích. NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , Evo 50 – reakce s Evo o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , BE – kontrolní reakce bez enzymu. Hodnota specifické aktivity vzorku kontroly DMSO určena jako 100 %. Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplikátů (duplikátu v případě vzorku bez enzymu) jedné experimentální sady vzorků.



Obr. 35 Hodnoty specifické aktivity enzymu CBR1 (o koncentraci 0,5 µg na reakci) v procentech v jednotlivých reakcích. NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10 µM, Evo 50 – reakce s Evo o koncentraci 50 µM, BE – kontrolní reakce bez enzymu. Hodnota specifické aktivity vzorku kontroly DMSO určena jako 100 %. Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplikátů (duplikátů v případě vzorku bez enzymu) jedné experimentální sady vzorků.



Obr. 36 Grafické porovnání hodnot inhibice [%] jednotlivých enzymů Evo. Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10 µM, Evo 50 – reakce s Evo o koncentraci 50 µM

Podle očekávání, byl Evo nejvíce inhibován enzym AKR1C3, a to průměrně z 82,66 % při použití 10  $\mu\text{M}$  Evo na reakci a z 93,56 % při použití 50  $\mu\text{M}$  Evo na reakci. Druhá nejvyšší odpověď na inhibitor byla zaznamenána u enzymu AKR1B10 s dosažením průměrně 33,02 % inhibice při použití 10  $\mu\text{M}$  Evo na reakci a 51,30 % inhibice při použití 50  $\mu\text{M}$  Evo na reakci. U enzymů AKR1A1, AKR1B1 a CBR1 byly naměřené hodnoty inhibice zanedbatelné a klinicky nevyužitelné, proto další experimenty nebyly s těmito enzymy prováděny (Obr. 36).

## 5.2 STANOVENÍ HODNOTY $\text{IC}_{50}$

Evo nejvíce snižoval aktivitu u enzymů AKR1C3 a AKR1B10, u těchto enzymů byla následně zjišťována hodnota  $\text{IC}_{50}$ .  $\text{IC}_{50}$  je koncentrace inhibitoru, při které je aktivita enzymu snížena na 50 %.

- **Stanovení hodnoty  $\text{IC}_{50}$  Evo s enzymem AKR1C3**

Pro stanovení hodnoty  $\text{IC}_{50}$ , bylo zvoleno sedm různých koncentrací Evo při zachování koncentrace enzymu AKR1C3. Koncentrace inhibitoru byly zvoleny následovně: 0,02; 0,1; 0,5; 2; 10; 100 a 1000  $\mu\text{M}$ . Byly tedy zvolené i výrazně nižší koncentrace než při základním screeningu (10  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ ), které inhibovaly daný enzym z 80–90 %. Jako kontrola byl opět proveden triplikát reakcí bez inhibitoru, s obsahem DMSO 2  $\mu\text{l}$ , k jejichž hodnotám specifické aktivity enzymu se následně vztahovaly hodnoty specifické aktivity vzorků s obsahem inhibitoru.

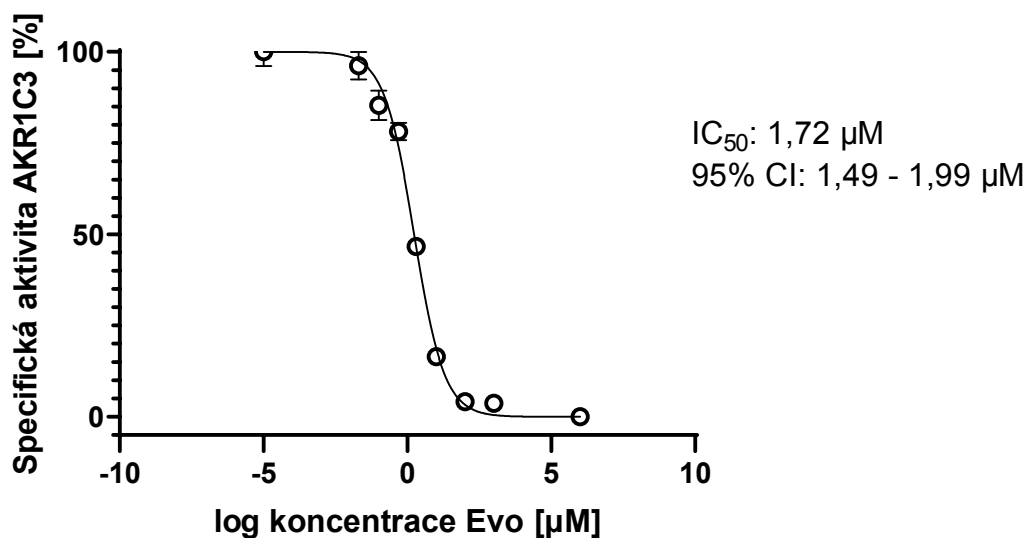
Tab. 14 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 a inhibice enzymu Evo, průměr a směrodatná odchylka jednotlivých triplicátů

Koncentrace Evo [ $\mu\text{M}$ ]	Specifická aktivita enzymu AKR1C3 [nmol/mg/min]	Aktivita [%]	Inhibice [%]
0*	275,30 $\pm$ 8,31	100 $\pm$ 3,02	
0,02	264,78 $\pm$ 7,88	96,18 $\pm$ 2,86	3,82 $\pm$ 2,86
0,1	235,02 $\pm$ 7,57	85,37 $\pm$ 2,75	14,63 $\pm$ 2,75
0,5	215,12 $\pm$ 4,60	78,14 $\pm$ 1,67	21,86 $\pm$ 1,67
2	128,44 $\pm$ 3,77	46,65 $\pm$ 1,37	53,35 $\pm$ 1,37



10	45,43 ± 0,86	16,50 ± 0,31	83,50 ± 0,31
100	11,47 ± 0,13	4,17 ± 0,05	95,83 ± 0,05
1000	10,30 ± 0,21	3,74 ± 0,08	96,26 ± 0,08

\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2 µl DMSO)



Obr. 37 Závislost specifické aktivity enzymu AKR1C3 na logaritmu jednotlivých koncentrací Evo. IC<sub>50</sub> – koncentrace inhibitoru, při které je aktivita enzymu snížena na 50 %; 95% CI – konfidenční interval s konfidenční hladinou 95 %. Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplicátů jedné experimentální sady vzorků.

Z použitých koncentrací Evo byla nejbližše 50 % inhibici enzymu AKR1C3 koncentrace 2 µM. Tato koncentrace inhibitoru snížila aktivitu enzymu o 53,35 % (Tab. 14). Pomocí GraphPadu byla vypočítána hodnota IC<sub>50</sub> Evo vůči AKR1C3 1,72 µM. Byl stanoven rovněž konfidenční interval 95% CI: 1,49 – 1,99 µM, který potvrzuje, že se hodnota IC<sub>50</sub> s 95% pravděpodobností pohybuje v tomto intervalu koncentrací Evo (Obr. 37).

- **Stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> Evo s enzymem AKR1B10**

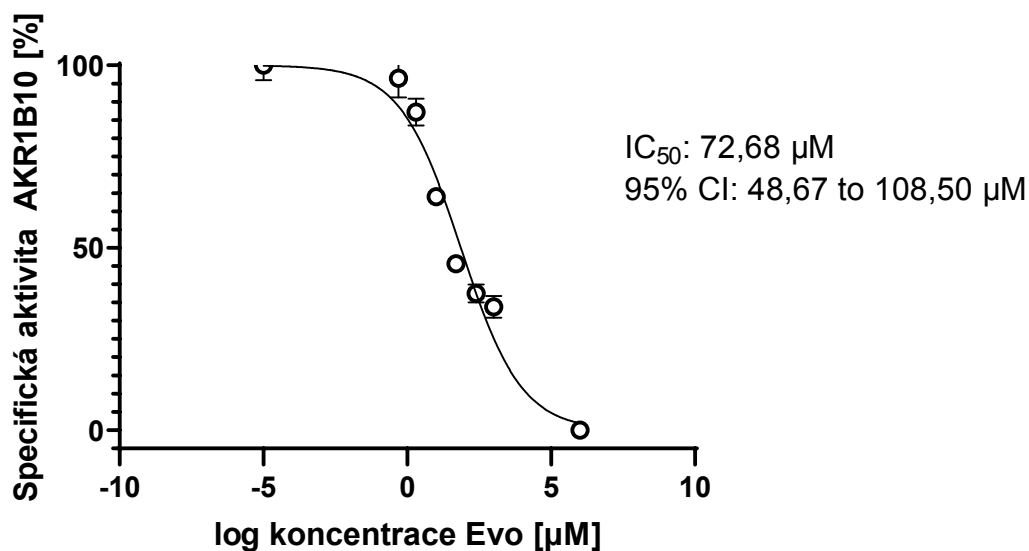
Při základním screeningu enzymu AKR1B10 bylo zjištěno, že 50 µM koncentrace Evo sníží aktivitu tohoto enzymu o 51,30 %. Proto se hodnoty koncentrací Evo při stanovování IC<sub>50</sub> pohybovaly kolem této hodnoty. Pro stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> u enzymu AKR1B10 bylo

stanoveno šest koncentrací Evo: 0,5; 2; 10; 50; 250 a 1000  $\mu\text{M}$ . Pro eliminaci vlivu DMSO na inhibici enzymu, byly jednotlivé hodnoty aktivit enzymu ve vzorcích s inhibitorem vztažené na hodnotu aktivity kontroly DMSO.

Tab. 15 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 a inhibice enzymu Evo, průměr a směrodatná odchylka jednotlivých triplikátů

Koncentrace Evo [ $\mu\text{M}$ ]	Specifická aktivita enzymu AKR1B10 [nmol/mg/min]	Aktivita [%]	Inhibice [%]
0*	82,34 $\pm$ 2,56	100,00 $\pm$ 3,11	
0,5	79,40 $\pm$ 2,96	96,43 $\pm$ 3,60	3,57 $\pm$ 3,60
2	71,77 $\pm$ 2,16	87,17 $\pm$ 2,62	12,83 $\pm$ 2,62
10	52,72 $\pm$ 1,06	64,03 $\pm$ 1,28	35,97 $\pm$ 1,28
50	37,57 $\pm$ 0,30	45,63 $\pm$ 0,37	54,37 $\pm$ 0,37
250	30,84 $\pm$ 1,59	37,45 $\pm$ 1,93	62,55 $\pm$ 1,93
1000	27,84 $\pm$ 1,67	33,81 $\pm$ 2,03	66,19 $\pm$ 2,03

\* Kontrola DMSO (inhibitor nahrazen 2  $\mu\text{l}$  DMSO)

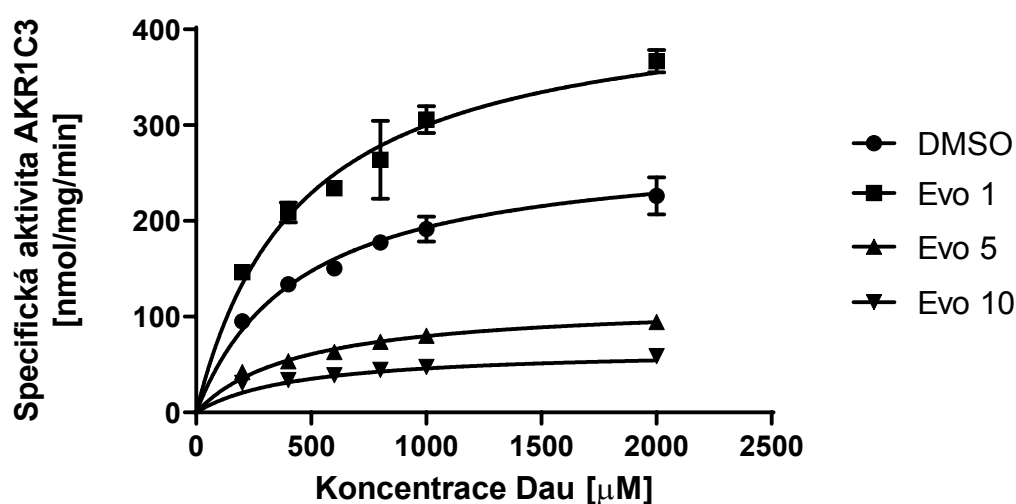


Obr. 38 Závislost specifické aktivity enzymu AKR1B10 na logaritmu jednotlivých koncentrací Evo. IC<sub>50</sub> – koncentrace inhibitoru, při které je aktivita enzymu snížena na 50 %; 95% CI – konfidenční interval s konfidenční hladinou 95 %. Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplikátů jedné experimentální sady vzorků.

Z vytvořeného grafu závislosti specifické aktivity enzymu na logaritmu koncentrace Evo GraphPad určil jako hodnotu  $IC_{50}$  72,68  $\mu\text{M}$  (Obr. 38). Konfidenční interval byl vypočítán 95 % CI: 48,67 – 108,5  $\mu\text{M}$ . Interval byl tedy výrazně rozsáhlejší, než při stanovování  $IC_{50}$  u enzymu AKR1C3 a tudíž hodnota 72,68  $\mu\text{M}$  vypočítaná GraphPadem nemusí odpovídat skutečné hodnotě  $IC_{50}$ . Hodnota mohla být programem nepřesně vypočítána i z důvodu nesprávného protnutí všech bodů. Přesto hodnoty konfidenčního intervalu koncentrace Evo potřebného ke snížení aktivity enzymu AKR1B10 na 50 % byly příliš vysoké a s tímto enzymem se již v další analýze nepokračovalo (Tab. 15, Obr. 38).

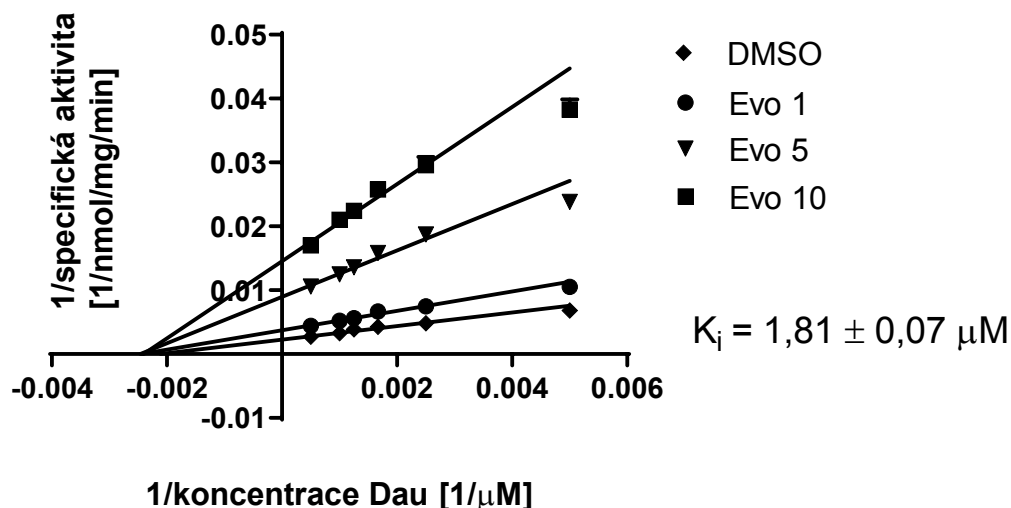
### 5.3 URČENÍ TYPU INHIBICE A INHIBIČNÍ KONSTANTY $K_i$

Při určování typu inhibice a inhibiční konstanty Evo vůči enzymu AKR1C3 byly použity různé koncentrace jak Evo (0, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ), tak Dau (2000, 1000, 800, 600, 400, 200  $\mu\text{M}$ ). Ze zjištěných hodnot specifické aktivity enzymu AKR1C3 byl za pomoci GraphPadu sestaven graf závislosti specifické aktivity enzymu na koncentraci inhibitoru a substrátu (Obr. 39) a jeho linearizovaná varianta dle Lineweavera a Burka (Obr. 40).



Obr. 39 Závislost specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci inhibitoru a substrátu. DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 1 – reakce s Evo o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , Evo 5 – reakce s Evo o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplicátů jedné experimentální sady vzorků.

## Reciproký výnos dle Lineweavera a Burka



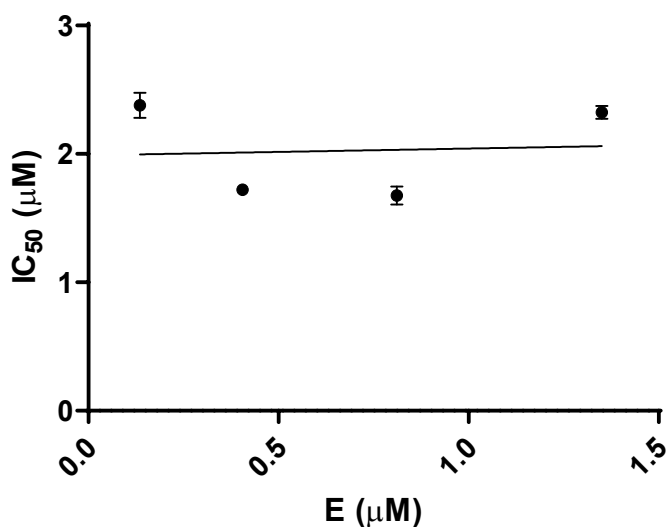
Obr. 40 Reciproký výnos závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci inhibitoru a substrátu. DMSO – kontrola s DMSO a nulovou koncentrací Evo, Evo 1 – reakce s Evo o koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , Evo 5 – reakce s Evo o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , Evo 10 – reakce s Evo o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ ,  $K_i$  – inhibiční konstanta. Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplikátů jedné experimentální sady vzorků.

Ze získaných grafů byla zjištěna hodnota inhibiční konstanty  $K_i = 1,81 \mu\text{M}$ . Jde o poměrně nízkou hodnotu, a tudíž potenciálně klinicky využitelnou. Zároveň byl z Obr. 40 určen typ inhibice. V tomto případě jde o inhibici nekompetitivní, jelikož se všechny přímky spojující jednotlivé koncentrace Evo sbíhají v jednom bodě na ose x. Z toho plyne, že s měnění se koncentrací inhibitoru nemění hodnota  $K_m$ , tedy Michaelisova konstanta, která udává koncentraci substrátu, potřebnou pro dosažení poloviny maximální rychlosti reakce při dané koncentraci enzymu. Protnutí osy y v různých bodech naznačuje snižující se hodnotu  $V_{\text{max}}$  se zvyšující se koncentrací inhibitoru (Obr. 40).

## 5.4 URČENÍ TYPU VAZBY INHIBITORU NA ENZYM

Posledním krokem v analýze vazby inhibitoru na enzym bylo určení, zda se jedná o tzv. tight binding inhibitor, tedy pevně se vázající, či nikoliv. Ze čtyř koncentrací enzymu AKR1C3 (0,5

μg/reakci, 1,5 μg/reakci, 3 μg/reakci a 5 μg/reakci) a osmi různých koncentrací Evo (0; 0,02; 0,1; 0,5; 2; 10; 100; 1000 μM) byly určeny čtyři hodnoty IC<sub>50</sub> pro čtyři různé koncentrace enzymu a následně vytvořen graf závislosti hodnot IC<sub>50</sub> na koncentraci enzymu AKR1C3 (Obr. 41).



Slope	0.05255
Y-intercept	1.990

Obr. 41 Závislost hodnot IC<sub>50</sub> Evo na koncentraci enzymu AKR1C3 (E). Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplikátů jedné experimentální sady vzorků.

Tab. 16 Hodnoty IC<sub>50</sub> Evo pro jednotlivé hodnoty koncentrace enzymu AKR1C3

Koncentrace enzymu AKR1C3 [mg/ml]	0,05	0,15	0,3	0,5
IC <sub>50</sub>	2,38	1,721	1,676	2,323

U pevně se vázajícího inhibitoru na enzym se předpokládá zvyšující se hodnota IC<sub>50</sub> se zvyšující se koncentrací enzymu, a tedy lineární stoupající přímka. V tomto případě se však tento jev neprojevil a hodnoty IC<sub>50</sub> Evo se mění nezávisle na koncentraci enzymu (Tab. 16). Bylo tak usouzeno, že ačkoliv je Evo nekompetitivní inhibitor enzymu AKR1C3, nejedná se o pevně se vázající inhibitor.

## 6. DISKUZE

Zástupci enzymů nadrodin AKR a SDR se významně podílejí na karcinogenezi a rozvoji rezistence na chemoterapii. Jejich nadměrná exprese byla pozorována u mnoha druhů rakovin (Saraswat et al. 2006, Tai et al. 2007) a nedávné studie se tak začaly zabývat otázkou možností inhibice těchto enzymů a jejich potenciálním využitím v léčbě rakoviny. V roce 2018 zjistili Novotná et al., že inhibitor cyklin-dependentní kinasy (CDK) dinaciklib je silným, pevně se vázajícím inhibitorem AKR1C3 s hodnotou  $IC_{50} = 0,23 \mu M$ , který senzitivizuje rezistentní buňky vysoce exprimující AKR1C3 k daunorubicinu (Novotná et al. 2018). AKR1C3 je jedním z hlavních enzymů redukujících athracykliny, který se podílí na jejich kardiotoxicitě a vzniku rezistence (Piska et al. 2021).

Po dinaciklibu byla úspěšně testována řada dalších CDK inhibitorů; roskovitin, purvalanol A, AZD5438, R547, abemaciklib, palbociklib, ribociklib, ale také inhibitor fosfoinositid-3-kinasy (PI3K) buparlisib, inhibitor poly(ADP ribóza) polymerasy (PARP) olaparib a inhibitory BTK ibrutinib a akalabrutinib (Novotná et al. 2018, Sorf et al. 2019, Bukum et al. 2019, Sorf et al. 2020, Tavares et al. 2020, Morell et al. 2020). Ibrutinib a akalabrutinib se osvědčily jako silní inhibitoři AKR1C3 na buněčných liniích HCT116 v mikromolárních koncentracích, s  $K_i$  hodnotami pohybujícími se kolem  $0,3 \mu M$  pro ibrutinib a  $0,5 \mu M$  pro akalabrutinib (Morell et al. 2020).

BTK je nереceptorová tyrosin kinasa, exprimovaná ve většině hematopoetických buněk, především B-lymfocytech. Hraje významnou roli v signalizaci BCR a dalších receptorů na povrchu buněk, ať už maligních či zdravých. BTK aktivace nastává po reakci BCR s antigenem, dále po aktivaci receptorů pro růstové faktory, cytokiny, nebo receptory spřažené s G proteinem jako chemokinové receptory a integriny. Aktivovaná BTK pak spouští signální kaskády jako PI3K/AKT, fosfolipasu C (PLC), proteinkinasu C (PKC), NF- $\kappa$ B a řídí tak proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů. Při absenci BTK nedochází k dostatečnému dozrávání a diferenciaci B-lymfocytů, naopak nadměrná aktivita BTK vede k autoimunitním chorobám, které jsou reverzibilní při použití BTK inhibitorů (Burger 2019). V posledních letech nachází inhibitory BTK své uplatnění např. u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií, lymfomu z plášťových buněk nebo Waldenströmovou makroglobulinémií, klinická testování probíhají také v indikaci autoimunitních chorob. Pro rychlý rozvoj rezistence je jejich použití zatím limitované, jsou však studovány kombinace zástupců BTK inhibitorů s konvenční terapií

a vyvíjeny a zkoumány zástupci nových generací. Studována je kombinace BTK inhibitoru první generace ibrutinibu s inhibitorem BCL2 venetoklaxem v indikaci AML (Eide et al. 2020), vliv na protileukemickou aktivitu venetoklaxu byl sledován i u BTK inhibitoru abivertinibu (Huang et al. 2020). U BTK inhibitoru PCI29732 byla objevena schopnost inhibice efluxní pumpy ABCG2 vazbou na její ATP vazebné místo. Tím se zvýšila citlivost rakovinných buněk nadměrně exprimujících ABCG2 k chemoterapeutikům (Ge et al. 2018). Inhibiční vlastnosti k ABC pumpě byly už dříve objeveny u ibrutinibu. Jeho inhibiční efekt na ABCC1 byl prokázán *in vitro* i *in vivo* (Zhang et al. 2014). Vliv BTK inhibitorů na aktivitu AKR pozorován u ibrutinibu a akalabrutinibu (Morell et al. 2020) je dalším nově objeveným mechanismem jejich působení a jeho pochopení vede k novým možnostem jejich využití.

V této práci byl zkoumán další zástupce inhibitorů BTK, Evo, a jeho vliv na redukční aktivitu vybraných CRE enzymů na ANT daunorubicin. Z pěti vybraných CRE enzymů byl *in vitro* pozorován značný inhibiční efekt Evo na enzym AKR1C3, méně výrazný na enzym AKR1B10. Na rozdíl od ibrutinibu a akalabrutinibu Evo zřejmě není pevně se vazající inhibitor AKR1C3 a jeho hodnoty  $K_i$  dosahovaly vyšších hodnot ( $K_i = 1,81 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ). Přesto se jedná o silný inhibitor enzymu AKR1C3 (82,64% inhibice při  $10\mu\text{M}$  koncentraci Evo) a jeho aktivita bude dále ohodnocena na buněčných liniích.

V porovnání s dalšími známými inhibitory enzymu AKR1C3 dosáhl Evo klinicky významných hodnot  $IC_{50}$  ( $IC_{50} = 1,72 \mu\text{M}$ ). Nižší hodnoty byly zjištěny např. u NSAID indometacinu ( $IC_{50} = 0,10 \mu\text{M}$ ) (Liedtke et al. 2013), derivátu kyseliny skořicové baccharinu ( $IC_{50} = 0,10 \mu\text{M}$ ) (Zang et al. 2015), CDK inhibitoru dinaciklibu ( $IC_{50} = 0,23 \mu\text{M}$ ) (Novotná et al. 2018), nebo derivátu vitamínu A ATRA ( $IC_{50} = 1,17 \mu\text{M}$ ) (Novotná et al. 2020). Nízké hodnoty  $IC_{50}$  a  $K_i$  znamenají i nižší efektivní terapeutickou dávku, tím klesá zátěž pro organismus pacienta a riziko nežádoucích účinků.

Při zkoumání různých koncentrací Evo s různými koncentracemi substrátu bylo zjištěno, že Evo se váže na enzym nekompetitivně. Neváže se tedy na aktivní místo enzymu a koncentrace substrátu tedy neovlivní míru inhibice enzymu a závisí tak pouze na poměru inhibitoru k enzymu. V praxi by pak při zvýšení dávky Dau nemělo docházet k ovlivnění účinku Evo, což je pro klinické využití výhodné. Přestože je Evo nekompetitivní inhibitor AKR1C3, dle naměřených výsledků Evo není pevně se vazajícím inhibitorem enzymu AKR1C3. Nekompetitivní inhibitory enzymů jsou často pevně se vazající inhibitory. Tento typ vazby na enzym (tight-binding) byl pozorován např. u kurkuminu, nekompetitivně inhibujícího CBR1

( $K_i = 223 \text{ nM}$ ) (Hintzpeter et al. 2015), chalkonů odvozených od chmelu (*Humulus Lupulus*) xanthohumol, isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin, akompetitivně inhibujících AKR1B1 ( $K_i = 15,08 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $0,34 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $0,71 \text{ } \mu\text{M}$ ) a 1B10 ( $K_i = 20,11 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $2,25 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $1,95 \text{ } \mu\text{M}$ ) (Seliger et al. 2018) nebo CDK inhibitoru dinaciklibu, nekompetitivně inhibujícího AKR1C3 ( $K_i = 0,07 \text{ } \mu\text{M}$ ) (Novotná et al. 2018).

Evo je vysoce specifický, ireverzibilní orální BTK inhibitor, inhibující aktivaci B-lymfocytů, M1 makrofágů a uvolňování cytokinů. B-lymfocyty se podílejí na patogenezi autoimunitního onemocnění roztroušené sklerozy, kde nadměrně produkují protilátky, prezentují antigen, stimulují a aktivují T-lymfocyty a stimulují produkci prozánětlivých cytokinů (Milo 2019). Pro Evo aktuálně probíhají klinické studie v této indikaci (Montalban et al. 2019). V rámci již proběhlé I. fáze byla sledována bezpečnost, tolerance a farmakokinetika Evo na zdravých jedincích. Evo se velmi rychle absorboval ( $T_{\max} \sim 0.5 \text{ hod}$ ) a měl krátký poločas ( $\sim 2 \text{ hod}$ ). Obsazenost vazebného místa na BTK byla závislá na dávce, maximální obsazenost ( $> 90 \%$ ) nastala během  $\sim 4 \text{ hod}$  po jedné dávce a efekt byl dlouhodobý. Podávané dávky se pohybovaly od 25 do 500 mg, plná obsazenost BTK byla pozorována již při opakovaně podávané dávce 25 mg. Nežádoucí účinky převážně mírného charakteru se vyskytly u 25 % subjektů, kteří obdrželi pouze jednu dávku a u 48,1 % subjektů s více dávkami. Neprokázal se žádný vliv na QT interval (Becker et al. 2020).

Na rozdíl od schválených BTK inhibitorů 2. generace, u kterých se objevily krvácivé stavy jako nežádoucí účinek při podávání, u Evo tento efekt nebyl pozorován (Hundelshausen et al. 2021). Evo má totiž mnohem menší schopnost inhibovat BTK podmíněnou agregaci destiček oproti dalším BTK inhibitorům ibrutinibu, zanubrutinibu, akalabrutinibu, tirabrutinibu a fenebrutinibu (Goldmann et al. 2019, Denzinger et al. 2019). Účinek některých BTK inhibitorů na destičky by však mohl být využitelný u onkologických pacientů s aterosklerosou (Lindner 2018).

Inhibice CRE enzymů je vedle inhibice NF- $\kappa$ B (Singh et al. 2018) a efluxu zprostředkovaného ABC pumpami (Zhang et al. 2014, Ge et al. 2018) nově objevený mechanismus účinku inhibitorů BTK, který by mohl být v budoucnu využitelný v boji proti rakovině a její rezistenci. BTK inhibitor Evo je nekompetitivní inhibitor AKR1C3 s potenciálem zvýšení efektivity chemoterapeutické léčby Dau. Jeho účinky je třeba dále prozkoumat na buněčných liniích, lépe napodobujících fyziologické podmínky živých organismů.



## 7. ZÁVĚR

V rámci tohoto experimentu byl testován vliv Evo na aktivitu 5-ti CRE: AKR1C3, AKR1B10, AKR1B1, AKR1A1 a CBR1 při enzymatické reakci redukce Dau na Dau-ol *in vitro*. Nejsilnější inhibice Evo se projevila u enzymu AKR1C3 (82,64% inhibice, 10  $\mu\text{M}$  koncentrace Evo) a enzymu AKR1B10 (32,28% inhibice, 10  $\mu\text{M}$  koncentrace Evo). U zbývajících tří enzymů byl inhibiční potenciál inhibitoru Evo zanedbatelný až nulový)

U enzymů AKR1C3 a AKR1B10 byly následně stanoveny hodnoty  $\text{IC}_{50}$  Evo, které dosáhly hodnot 1,72  $\mu\text{M}$  s konfidenčním intervalem 95 % CI: 1,49 – 1,99  $\mu\text{M}$  při inkubaci s enzymem AKR1C3 a 73,32  $\mu\text{M}$  s konfidenčním intervalem 95 % CI: 47,38 – 113,4  $\mu\text{M}$  pro enzym AKR1B10. Přestože inhibiční účinek Evo na enzym AKR1B10 nebyl zcela zanedbatelný, nebylo s tímto enzymem v další analýze pokračováno.

Typ inhibice a inhibiční konstanta byla stanovována jen u nejsilněji inhibovaného enzymu AKR1C3. Inhibiční konstanta byla vypočítána pomocí GraphPadu ( $K_i = 1,81 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ). Vynesáním závislosti specifické aktivity na měnící se koncentraci inhibitoru a substrátu bylo zjištěno, že Evo inhibuje enzym AKR1C3 nekompetitivně.

Posledním krokem bylo určení, zda je Evo tzv. tight binding (pevně se vázající) inhibitor. Po vytvoření grafu závislosti hodnot  $\text{IC}_{50}$  na koncentraci enzymu bylo zřejmé, že Evo se na enzym AKR1C3 pevně neváže.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenasa
ABC	ATP vázající kazetové transportéry (ATP-binding cassette)
ACEi	Inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu
AKR	Aldo-keto reduktasa
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
ANT	Anthracyklin
ATP	Adenosintrifosfát
ATRA	All-trans-retinová kyselina
BB	Beta blokátory
BCR	B-celulární receptor
BCRP	Protein rezistence karcinomu prsu
BTK	Brutonova thyrosin kinasa
CBR	Karbonyl reduktasa
CDK	Cyklin-dependentní kinasa
CNS	Centrální nervový systém
CRE	Enzym redukující karbonylové skupiny
CYP	Cytochrom P450
Dau	Daunorubicin
Dau-ol	Daunorubicinol
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxorubicin
Dox-ol	Doxorubicinol
EDTA	Kyselina edetová
EMA	Evropská léková agentura (European Medicine Agency)
ERK	Extracelulárním signálem regulovaná proteinkinasa (Extracellular signal-regulated kinase, Elk-related tyrosine kinase)

Evo	Evobrutinib
EU	Evropská unie
FLT3	FMS podobná tyrosinkinasa 3 (Fms-like tyrosine kinase 3)
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GIT	Gastrointestinální trakt
Glc-6-P	Glukosa-6-fosfát
Glc-6-PDH	Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
HNSCC	Dlaždicový karcinom hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma)
htAKR	Lidská testis specifická AKR
IARC	International Agency for Research on Cancer
i.v.	Intravenózní
LVEF	Ejekční frakce levé komory (Left Ventricular Ejection Fraction)
MAPK	Mitogenem aktivované proteinkinasy
MDR	Multi léková rezistence
MgCl <sub>2</sub>	Chlorid hořečnatý
MRP	Protein multilékové rezistence
mTOR	Savčí cíl rapamycinu (Mammalian target of rapamycin)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF- $\kappa$ B	Nukleární faktor kappa B
NNK	nitrosamin 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NPM1	Nukleofosmin 1
NaPB	Sodno-fosfátový pufr
NSAID	Nesteroidní antiflogistika
PARP	Poly(ADP ribóza) polymerasa
PI3K	Fosfoinsoditid-3-kinasa
PI3K/AKT	Fosfatidylinositol-3-kinasa/protein kinasa B
PKC	Proteinkinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PKB	Proteinkinasa B

PPAR $\gamma$	$\gamma$ receptor aktivovaný proliferátorem peroxizomu
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
Rpm	Otáčky za minutu (Revolutions per minute)
RS	Regenerační systém
SDR	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SNO-CoA	S-nitroso koenzym A
Top2	Topoisomerasa II
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

## 9. CITACE

Abuosa A. M., Elshiekh A. H., Qureshi K., Abrar M. B., Kholeif M. A., Kinsara A. J., Andejani A., Ahmed A. H., Cleland J. G. F. (2018) Prophylactic use of carvedilol to prevent ventricular dysfunction in patients with cancer treated with doxorubicin. *Indian heart journal*. 70 Suppl 3(Suppl 3): S96–S100.

Akpek M., Ozdogru I., Sahin O., Inanc M., Dogan A., Yazici C., Berk V., Karaca H., Kalay N., Oguzhan A., Ergin A. (2015) Protective effects of spironolactone against anthracycline-induced cardiomyopathy. *European journal of heart failure*. 17(1):81-9.

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*. 101:51-6.

Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. J., Le Beau M. M., Bloomfield C. D., Cazzola M., Vardiman J. W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 127(20):2391-405.

Balestri F., Poli G., Pineschi C., Moschini R., Cappiello M., Mura U., Tuccinardi T., Del Corso A. (2020) Aldose Reductase Differential Inhibitors in Green Tea. *Biomolecules*. 10(7): 1003.

Beck K. R., Kaserer T., Schuster D., Odermatt A. (2017) Virtual screening applications in short-chain dehydrogenase/reductase research. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 171: 157–177.

Becker A., Martin E. C., Mitchell D. Y., Grenningloh R., Bender A. T., Laurent J., Mackenzie H., Johne A. (2020) Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Target Occupancy, and Concentration-QT Analysis of the Novel BTK Inhibitor Evobrutinib in Healthy Volunteers. *Clinical and translational science*. 13(2):325-336.

Behnia K., Boroujerdi M. (1999) Inhibition of aldo-keto reductases by phenobarbital alters metabolism, pharmacokinetics and toxicity of doxorubicin in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 51(11):1275-82.

Blanco J. G., Sun C., Landier W., Chen L., Esparza-Duran D., Leisenring W., Mays A., Friedman D. L., Ginsberg J. P., Hudson M. M., Neglia J. P., Oeffinger K. C., Ritchey A. K., Villaluna D., Relling

M. V., Bhatia S. (2012) Anthracycline-related cardiomyopathy after childhood cancer: role of polymorphisms in carbonyl reductase genes--a report from the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 30(13):1415-21.

Bloom M. W., Hamo C. E., Cardinale D., Ky B., Nohria A., Baer L., Skopicki H., Lenihan D. J., Gheorghiade M., Lyon A. R., Butler J. (2016) Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction and Heart Failure Part 1: Definitions, Pathophysiology, Risk Factors, and Imaging. *Circulation. Heart failure*. 9(1): e002661.

Bosch X., Rovira M., Sitges M., Domènech A., Ortiz-Pérez J. T., de Caralt T. M., Morales-Ruiz M., Perea R. J., Monzó M., Esteve J. (2013) Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (prevention of left Ventricular dysfunction with Enalapril and carvedilol in patients submitted to intensive Chemotherapy for the treatment of Malignant hemopathies). *Journal of the American College of Cardiology*. 61(23):2355-62.

Breyse D. H., Boone R. M., Long C. M., Merrill M. E., Schaupp C. M., White C. C., Kavanagh T. J., Schmidt E. E., Merrill G. F. (2020) Carbonyl Reductase 1 Plays a Significant Role in Converting Doxorubicin to Cardiotoxic Doxorubicinol in Mouse Liver, but the Majority of the Doxorubicinol-Forming Activity Remains Unidentified. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 48(3): 187–197.

Buck E., Sprick M., Gaida M. M., Grüllich C., Weber T. F., Herpel E., Bruckner T., Koschny R. (2019) Tumor response to irinotecan is associated with CYP3A5 expression in colorectal cancer. *Oncology letters*. 17(4):3890-3898.

Bukowski K., Kciuk M., Kontek R. (2020) Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International journal of molecular sciences*. 21(9): 3233.

Bukum N., Novotná 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.

Burger J. A. (2019) BTK Inhibitors: present and future. *The cancer journal*. 25(6): 386–393.

Cardinale D., Colombo A., Bacchiani G., Tedeschi I., Meroni C. A., Veglia F., Civelli M., Lamantia G., Colombo N., Curigliano G., Fiorentini C., Cipolla C. M. (2015) Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*. 131(22):1981-8.

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

Chewchuk S., Boorman T., Edwardson D., Parissenti A. M. (2018) Bile Acids Increase Doxorubicin Sensitivity in ABCC1-expressing Tumour Cells. *Scientific reports*. 8(1):5413.

Conte G. D., Sessa C., von Moos R., Viganò L., Digena T., Locatelli A., Gallerani E., Fasolo A., Tessari A., Cathomas R., Gianni L. (2014) Phase I study of olaparib in combination with liposomal doxorubicin in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer*. 111(4):651-9.

Coutinho A. E., Chapman K. E. (2011) The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and cellular endocrinology*. 335(1): 2–13.

Daver N., Konopleva M. (2015) Sorafenib and novel multikinase inhibitors in AML. *The Lancet. Oncology*. 16(16):1582-3.

De Kouchkovsky I., Abdul-Hay M. (2016) 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood cancer journal*. 6(7): e441.

Denzinger V., Busygina K., Jamasbi J., Pekrul I., Spannagl M., Weber C., Lorenz R., Siess W. (2019) Optimizing Platelet GPVI Inhibition versus Haemostatic Impairment by the Btk Inhibitors Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 and Evobrutinib. *Thrombosis and haemostasis*. 119(3):397-406.

Desmond J. C., Mountford J. C., Drayson M. T., Walker E. A., Hewison M., Ride J. P., Luong Q. T., Hayden R. E., Vanin E. F., Bunce C. M. (2003) The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer research*. 63(2):505-12.

Döhner H., Estey E. H., Amadori S., Appelbaum F. R., Büchner T., Burnett A. K., Dombret H., Fenaux P., Grimwade D., Larson R. A., Lo-Coco F., Naoe T., Niederwieser D., Ossenkoppele G. J., Sanz M. A., Sierra J., Tallman M. S., Löwenberg B., Bloomfield C. D. (2010) Diagnosis and

management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 115(3):453-74.

Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D. (2015) Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 373(12):1136-52.

Döhner H., Estey E. H., Amadori S., Appelbaum F. R., Büchner T., Burnett A. K., Dombret H., Fenaux P., Grimwade D., Larson R. A., Lo-Coco F., Naoe T., Niederwieser D., Ossenkoppele G. J., Sanz M. A., Sierra J., Tallman M. S., Löwenberg B., Bloomfield C. D. (2017) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 129(4): 424–447.

Eckenstaler R., Benndorf R. A. (2020) 3D structure of the transporter ABCG2—What's new? *British journal of pharmacology*. 177(7): 1485–1496.

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.

Eide C. A., Kurtz S. E., Kaempf A., Long N., Agarwal A., Tognon C. E., Mori M., Druker B. J., Chang B. H., Danilov A. V., Tyner J. W. (2020) Simultaneous kinase inhibition with ibrutinib and BCL2 inhibition with venetoclax offers a therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 34(9):2342-2353.

Estupiñán H. Y., Berglöf A., Zain R., Smith C. I. E. (2021) Comparative Analysis of BTK Inhibitors and Mechanisms Underlying Adverse Effects. *Frontiers in cell and developmental biology*. 9: 630942.

Ferreira A. L. A., Matsubara L. S., Matsubara B. B. (2008) Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*. 6(4):278-81.

Fridman J. S., Lowe S. W. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 22(56):9030–9040.

Fumoleau P., Roché H., Kerbrat P., Bonnetterre J., Romestaing P., Fargeot P., Namer M., Monnier A., Montcuquet P., Goudier M. J., Luporsi E., French Adjuvant Study Group. (2006) Long-term cardiac toxicity after adjuvant epirubicin-based chemotherapy in early breast cancer: French Adjuvant Study Group results. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 17(1):85-92.



Ge C., Wang F., Cui C., Su X., To K. K. W., Wang X., Zhang H., Song X., Fu L. (2018) PCI29732, a Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor, Enhanced the Efficacy of Conventional Chemotherapeutic Agents in ABCG2-Overexpressing Cancer Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 48(6):2302-2317.

Geng N., Jin Y., Li Y., Zhu S., Bai H. (2020) AKR1B10 Inhibitor Epalrestat Facilitates Sorafenib-Induced Apoptosis and Autophagy Via Targeting the mTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *International journal of medical sciences*. 17(9): 1246–1256.

Giménez-Dejóz J., Kolář M. H., Ruiz F. X., Crespo I., Cousido-Siah A., Podjarny A., Barski O. A., Fanfrlík J., Parés X., Farrés J., Porté S. (2015) Substrate Specificity, Inhibitor Selectivity and Structure-Function Relationships of Aldo-Keto Reductase 1B15: A Novel Human Retinaldehyde Reductase. *PloS one*. 10(7): e0134506.

Giménez-Dejóz J., Weber S., Fernández-Pardo Á., Möller G., Adamski J., Porté S., Parés X., Farrés J. (2019) Engineering aldo-keto reductase 1B10 to mimic the distinct 1B15 topology and specificity towards inhibitors and substrates, including retinoids and steroids. *Chemico-biological interactions*. 307:186-194.

Gobec S., Brozic P., Rizner T. L. (2005) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: new lead compounds for the development of anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 15(23):5170-5.

Goldmann L., Duan R., Kragh T., Wittmann G., Weber C., Lorenz R., von Hundelshausen P., Spannagl M., Siess W. (2019) Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors block activation of the platelet Fc receptor CD32a (FcγRIIA): a new option in HIT? *Blood advances*. 3(23):4021-4033.

Gottesman M. M., Lavi O., Hall M. D., Gillet J. (2016) Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 56:85-102.

Gräff M., Buchholz P. C. F., Stockinger P., Bommarius B., Bommarius A. S., Pleiss J. (2019) The Short-chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database (SDRED): A classification and analysis system for a highly diverse enzyme family. *Proteins*. 87(6):443-451.

Gupta P., Zhang Y., Zhang X., Wang Y., Lu K. W., Hall T., Peng R., Yang D., Xie N., Chen Z. (2018) Voruciclib, a Potent CDK4/6 Inhibitor, Antagonizes ABCB1 and ABCG2-Mediated Multi-Drug

Resistance in Cancer Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 45(4):1515-1528.

Gupta V., Singh S. K., Agrawal V., Singh T. B. (2018) Role of ACE inhibitors in anthracycline-induced cardiotoxicity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatric blood & cancer*. 65(11):e27308.

Guglin M., Krischer J., Tamura R., Fink A., Bello-Matricaria L., McCaskill-Stevens W., Munster P. N. (2019) Randomized Trial of Lisinopril vs. Carvedilol to Prevent Trastuzumab Cardiotoxicity in Patients with Breast Cancer. *Journal of the American College of Cardiology*. 73(22): 2859–2868.

Hanukoglu I. (2015) Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 43(3):206-9.

Haselmayer P., Camps M., Liu-Bujalski L., Nguyen N., Morandi F., Head J., O'Mahony A., Zimmerli S. C., Bruns L., Bender A. T., Schroeder P., Grenningloh R. (2019) Efficacy and Pharmacodynamic Modeling of the BTK Inhibitor Evobrutinib in Autoimmune Disease Models. *The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists*. 202(10):2888-2906.

Henninger C., Fritz G. (2017) Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and the heartbreakers. *Cell death & disease*. 8(1): e2564.

Hintzpeter J., Hornung J., Ebert B., Martin H., Maser E. (2015) Curcumin is a tight-binding inhibitor of the most efficient human daunorubicin reductase--Carbonyl reductase 1. *Chemico-biological interactions*. 234:162-8.

Ho P. A., Zeng R., Alonzo T. A., Gerbing R. B., Miller K. L., Pollard J. A., Stirewalt D. R., Heerema N. A., Raimondi S. C., Hirsch B., Franklin J. L., Lange B., Meshinchi S. (2010) Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 116(5):702-10.

Hofman J., Malcekova B., Skarka A., Novotná E., Wsol V. (2014) Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and applied pharmacology*. 278(3):238-48.

Hoque K. M., Dixon E. E., Lewis R. M., Allan J., Gamble G. D., Phipps-Green A. J., Kuhns V. L. H., Horne A. M., Stamp L. K., Merriman T. R., Dalbeth N., Woodward O. M. (2020) The ABCG2 Q141K hyperuricemia and gout associated variant illuminates the physiology of human urate excretion. *Nature communications*. 11: 2767.

Hu D. G., Mackenzie P. I., Lu L., Meech R., McKinnon R. A. (2015) Induction of human UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 gene expression by cytotoxic anticancer drugs in liver cancer HepG2 cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 43(5):660-8.

Huang S., Li C., Zhang X., Pan J., Li F., Lv Y., Huang J., Ling Q., Ye W., Mao S., Huang X., Jin J. (2020) Abivertinib synergistically strengthens the anti-leukemia activity of venetoclax in acute myeloid leukemia in a BTK-dependent manner. *Molecular oncology*. 14(10):2560-2573.

Huang W., Ding L., Huang Q., Hu H., Liu S., Yang X., Hu X., Dang Y., Shen S., Li J., Ji X., Jiang S., Liu J. O., Yu L. (2010) Carbonyl reductase 1 as a novel target of (-)-epigallocatechin gallate against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 52(2):703-14.

von Hundelshausen P., Siess W. (2021) Bleeding by Bruton Tyrosine Kinase-Inhibitors: Dependency on Drug Type and Disease. *Cancers*. 13(5): 1103.

Chatterjee N., Bivona T. G. (2019) Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance. *Trends in cancer*. 5(3): 170–182.

Chow R. K. K., Sin S. T., Liu M., Li Y., Chan T. H. M., Song Y., Chen L., Kwong D. L., Guan X. (2017) AKR7A3 suppresses tumorigenicity and chemoresistance in hepatocellular carcinoma through attenuation of ERK, c-Jun and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Oncotarget*. 8(48): 83469–83479.

Ide H., Lu Y., Noguchi T., Muto S., Okada H., Kawato S., Horie S. (2018) Modulation of AKR1C2 by curcumin decreases testosterone production in prostate cancer. *Cancer science*. 109(4):1230-1238.

Jin Y., Mesaros A. C., Blair I. A., Penning T. M. (2011) Stereospecific reduction of 5 $\beta$ -reduced steroids by human ketosteroid reductases of the AKR (aldo-keto reductase) superfamily: role of AKR1C1–AKR1C4 in the metabolism of testosterone and progesterone via the 5 $\beta$ -reductase pathway. *The Biochemical journal*. 437(1):53-61.

Jin Y., Zhou X., Chen Y., Jin W., Wang Z., Ye D., Sun Y., Li Y., Wang Q., Zhang X., Wang O., Chen E. (2019) Up-Regulated AKR1C2 is correlated with favorable prognosis in thyroid carcinoma. *Journal of Cancer*. 10(15):3543-3552.

Ji J., Xu M., Qian T., Zhu S., Jiang F., Liu Z., Xu W., Zhou J., Xiao M. (2020) The AKR1B1 inhibitor epalrestat suppresses the progression of cervical cancer. *Molecular biology reports*. 47(8):6091-6103.

Johansson A. G. M., Nikamo P., Schalling M., Landén M. (2011) AKR1C4 gene variant associated with low euthymic serum progesterone and a history of mood irritability in males with bipolar disorder. *Journal of affective disorders*. 133(1-2):346-51.

Johansson A. G. M., Nikamo P., Schalling M., Landén M. (2012) Polymorphisms in AKR1C4 and HSD3B2 and differences in serum DHEAS and progesterone are associated with paranoid ideation during mania or hypomania in bipolar disorder. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 22(9):632-40.

Kallberg Y., Oppermann U., Persson B. (2010) Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *The FEBS journal*. 277(10):2375-86.

Kavanagh K. L., Jörnvall H., Persson B., Oppermann U. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 65(24): 3895–3906.

Kassner N., Huse K., Martin H., Gödtel-Armbrust U., Metzger A., Meineke I., Brockmöller J., Klein K., Zanger U. M., Maser E., Wojnowski L. (2008) Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 36(10):2113-20.

Khayami R., Hashemi S. R., Kerachian M. A. (2020) Role of aldo-keto reductase family 1 member B1 (AKR1B1) in the cancer process and its therapeutic potential. *Journal of cellular and molecular medicine*. 24(16):8890-8902.

Khazeem M. M., Cowell I. G., Harkin L. F., Casement J. W., Austin C. A. (2020) Transcription of carbonyl reductase 1 is regulated by DNA topoisomerase II beta. *FEBS letters*. 594(20):3395-3405.

Koike T., Shiraki R., Sasuga D., Hosaka M., Kawano T., Fukudome H., Kurosawa K., Moritomo A., Mimasu S., Ishii H., Yoshimura S. (2019) Discovery and Biological Evaluation of Potent and Orally Active Human 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 67(8):824-838.

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

Lai C., Chen H., Tu M., Lin W., Röhrig T., Yang S., Lan Y., Chong K., Chen C. (2017) A novel osteoporosis model with ascorbic acid deficiency in Akr1A1 gene knockout mice. *Oncotarget*. 8(5): 7357–7369.

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

Li X., Li Y., Zhang T., Xiong X., Liu N., Pang B., Ruan Y., Gao Y., Shang H., Xing Y. (2019) Role of cardioprotective agents on chemotherapy-induced heart failure: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological research*. 151:104577.

Liedtke A. J., Adeniji A. O., Chen M., Byrns M. C., Jin Y., Christianson D. W., Marnett L. J., Penning T. M. (2013) Development of Potent and Selective Indomethacin Analogues for the Inhibition of AKR1C3 (Type 5 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Prostaglandin F Synthase) in Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Journal of medicinal chemistry*. 56(6): 2429–2446.

Lindner J. R. (2018) Btk inhibitors in atherosclerosis. *Blood*. 131(24):2601-2602.

Lolli M. L., Carnovale I. M., Pippione A. C., Wahlgren W. Y., Bonanni D., Marini E., Zonari D., Gallicchio M., Boscaro V., Goyal P., Friemann R., Rolando B., Bagnati R., Adinolfi S., Oliaro-Bosso S., Boschi D. (2019) Bioisosteres of Indomethacin as Inhibitors of Aldo-Keto Reductase 1C3. *ACS medicinal chemistry letters*. 10(4):437-443.

López-Herrera G., Vargas-Hernández A., González-Serrano M. E., Berrón-Ruiz L., Rodríguez-Alba J. C., Espinosa-Rosales F., Santos-Argumedo L. (2014) Bruton's tyrosine kinase--an integral protein of B cell development that also has an essential role in the innate immune system. *Journal of leukocyte biology*. 95(2):243-50.

Luqmani Y. A. (2005) Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Medical Principles and Practice*. 1(1):35-48.

Ma H., Ratnam K., Penning T. M. (2000) Mutation of nicotinamide pocket residues in rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase reveals different modes of cofactor binding. *Biochemistry*. 39(1):102-9.

Malátková P., Maser E., Wsól V. (2010) Human carbonyl reductases. *Current drug metabolism*. 11(8):639-58.

Marinello J., Delcuratolo M., Capranico G. (2018) Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *International journal of molecular sciences*. 19(11):3480.

Martelli M. P., Gionfriddo I., Mezzasoma F., Milano F., Pierangeli S., Mulas F., Pacini R., Tabarrini A., Pettirossi V., Rossi R., Vetro C., Brunetti L., Sportoletti P., Tiacci E., Di Raimondo F., Falini B. (2015) Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells. *Blood*. 125(22):3455-65.

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

Matsunaga T., Kezuka C., Morikawa Y., Suzuki A., Endo S., Iguchi K., Miura T., Nishinaka T., Terada T., El-Kabbani O., Hara A., Ikari A. (2015) Up-Regulation of Carbonyl Reductase 1 Renders Development of Doxorubicin Resistance in Human Gastrointestinal Cancers. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 38(9):1309-19.

Menna P., Salvatorelli E. (2017) Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview. *Chemotherapy*. 62(3):159-168.

Milo R. (2019) Therapies for multiple sclerosis targeting B cells. *Croatian medical journal*. 60(2): 87–98.

Mindnich R. D., Penning T. M. (2009) Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Human genomics*. 3(4): 362–370.

Miura T., Nishinaka T., Terada T. (2008) Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Molecular and cellular biochemistry*. 315(1-2):113-21.

Mohammed H. S., Hosny E. N., Khadrawy Y. A., Magdy M., Attia Y. S., Sayed O. A., AbdElaal M. (2020) Protective effect of curcumin nanoparticles against cardiotoxicity induced by doxorubicin in rat. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. 1866(5):165665.

Mondal L., Mukherjee B., Das K., Bhattacharya S., Dutta D., Chakraborty S., Mohan Pal M., Gaonkar R. H., Debnath M. C. (2019) CD-340 functionalized doxorubicin-loaded nanoparticle induces apoptosis and reduces tumor volume along with drug-related cardiotoxicity in mice. *International journal of nanomedicine*. 14: 8073–8094.

Montalban X., Arnold D. L., Weber M. S., Staikov I., Piasecka-Stryczynska K., Willmer J., Martin E. C., Dangond F., Syed S., Wolinsky J. S., Evobrutinib Phase 2 Study Group. (2019) Placebo-Controlled Trial of an Oral BTK Inhibitor in Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine*. 380(25):2406-2417.

Mordente A., Minotti G., Martorana G. E., Silvestrini A., Giardina B., Meucci E. (2003) Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochemical pharmacology*. 66(6):989-98.

Morell A., Čermáková L., Novotná E., Laštovičková L., Haddad M., Haddad A., Portillo R., Wsól V. (2020) Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib Counteract Anthracycline Resistance in Cancer Cells Expressing AKR1C3. *Cancers*. 12(12): 3731.

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

Mosquera C., Panay A. J., Montoya G. (2018) Pentacyclic Triterpenes from *Cecropia telenitida* Can Function as Inhibitors of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Molecules*. 23(6): 1444.

Nie Q., Zhang X. (2018) Transcriptional profiling analysis predicts potential biomarkers for glaucoma: HGF, AKR1B10 and AKR1C3. *Experimental and therapeutic medicine*. 16(6): 5103–5111.

Nikolaou N., Gathercole L. L., Kirkwood L., Dunford J. E., Hughes B. A., Gilligan L. C., Oppermann U., Penning T. P., Arlt W., Hodson L., Tomlinson J. W. (2019) AKR1D1 regulates glucocorticoid

availability and glucocorticoid receptor activation in human hepatoma cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 189:218-227.

Nikolaou N., Arvaniti A., Appanna N., Sharp A., Hughes B. A., Digweed D., Whitaker M. J., Ross R., Arlt W., Penning T. M., Morris K., George S., Keevil B. G., Hodson L., Gathercole L. L., Tomlinson J. W. (2020) Glucocorticoids regulate AKR1D1 activity in human liver in vitro and in vivo. *The Journal of endocrinology*. 245(2):207-218.

Nitiss J. L. (2009) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*. 9(5): 338–350.

Nitiss K. C., Nitiss J. L. (2014) Twisting and ironing: Doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 20(18): 4737–4739.

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

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

Novotná E., Büküm N., Hofman J., Flaxová M., Kouklíková E., Louvarová D., Wsól V. (2018) Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile. *Archives of toxicology*. 92(9):2845-2857.

Novotná E., Morell A., Büküm N., Hofman J., Danielisová P., Wsól V. (2020) Interactions of antileukemic drugs with daunorubicin reductases: could reductases affect the clinical efficacy of daunorubicin chemoregimens? *Archives of toxicology*. 94(9):3059-3068.

Nystoriak M. A., Zhang D., Jagatheesan G., Bhatnagar A. (2017) Heteromeric complexes of aldo-keto reductase auxiliary KVβ subunits (AKR6A) regulate sarcolemmal localization of KV1.5 in coronary arterial myocytes. *Chemico-biological interactions*. 276: 210–217.

O'Brien M. E. R., Wigler N., Inbar M., Rosso R., Grischke E., Santoro A., Catane R., Kieback D. G., Tomczak P., Ackland S. P., Orlandi F., Mellars L., Alland L., Tandler C., CAELYX Breast Cancer



Study Group. (2004) Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 15(3):440-9.

Olson R. D., Mushlin P. S., Brenner D. E., Fleischer S., Cusack B. J., Chang B. K., Boucek R. (1988) J. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(10):3585-9.

O'Reilly M. W., Kempegowda P., Walsh M., Taylor A. E., Manolopoulos K. N., Allwood J. W., Semple R. K., Hebenstreit D., Dunn W. B., Tomlinson J. W., Arlt W. (2017) AKR1C3-Mediated Adipose Androgen Generation Drives Lipotoxicity in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 102(9):3327-3339.

Osborne M. J., de Oliveira L. C., Volpon L., Zahreddine H. A., Borden K. L. B. (2019) Overcoming drug resistance through the development of selective inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Journal of molecular biology*. 431(2): 258–272.

Patel J. P., Gönen M., Figueroa M. E., Fernandez H., Sun Z., Racevskis J., Vlierberghe P. V., Dolgalev I., Thomas S., Aminova O., Huberman K., Cheng J., Viale A., Socci N. D., Heguy A., Cherry A., Vance G., Higgins R. R., Ketterling R. P., Gallagher R. E., Litzow M., van den Brink M. R. M., Lazarus H. M., Rowe J. M., Luger S., Ferrando A., Paietta E., Tallman M. S., Melnick A., Abdel-Wahab O., Levine R. L. (2012) Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 366(12): 1079–1089.

Pelcovits A., Niroula R. (2020) Acute Myeloid Leukemia: A Review. *Rhode Island medical journal*. 103(3):38-40.

Penning T. M. (2014) Human Aldo-Keto Reductases and the Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical research in toxicology*. 27(11): 1901–1917.

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

Penning T. M. (2019) AKR1C3 (type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders. *Molecular and cellular endocrinology*. 489:82-91.

Picklo M. J., Olson S. J., Hayes J. D., Markesbery W. R., Montine T. J. (2001) Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. *Brain research*. 916(1-2):229-38.

Pilka E. S., Niesen F. H., Lee W. H., El-Hawari Y., Dunford J. E., Kochan G., Wsol V., Martin H., Maser E., Oppermann U. (2009) Structural Basis for Substrate Specificity in Human Monomeric Carbonyl Reductases. *PloS one*. 4(10): e7113.

Pinto V., Bergantim R., Caires H. R., Seca H., Guimarães J. E., Vasconcelos M. H. (2020) Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance. *Cancers*. 12(2): 407.

Piska K., Koczurkiewicz P., Bucki A., Wójcik-Pszczola K., Kołaczkowski M., Pękala E. (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.

Piska K., Jamrozik M., Koczurkiewicz-Adamczyk P., Bucki A., Żmudzki P., Kołaczkowski M., Pękala E. (2021) Carbonyl reduction pathway in hepatic in vitro metabolism of anthracyclines: Impact of structure on biotransformation rate. *Toxicology letters*. 342:50-57.

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):1644-55.

Quiñones-Lombraña A., Intini A., Blanco J. G. (2019) Insights into the transcriptional regulation of the anthracycline reductase AKR7A2 in human cardiomyocytes. *Toxicology letters*. 307:11-16.

Reichardt P., Tabone M., Mora J., Morland B. Jones R. L. (2018) Risk–benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling. *Future oncology*. 14(25):2663-2676.

Rizner T. L., Lin H. K., Penning T. M. (2003) Role of human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C2) in androgen metabolism of prostate cancer cells. *Chemico-biological interactions*. 143-144:401-9.

Rizner T. L. Penning T. M. (2014) Role of Aldo-Keto Reductase Family 1 (AKR1) Enzymes in Human Steroid Metabolism. *Steroids*. 79:10.

Robert J., Gianni L. (1993) Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer surveys*. 17:219-52.

Robey R. W., Pluchino K. M., Hall M. D., Fojo A. T., Bates S. E., Gottesman M. M. (2018) Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer. *Nature reviews. Cancer*. 18(7): 452–464.

Saraswat M., Mrudula T., Kumar P. U., Suneetha A., Rao T. S. R., Srinivasulu M., Reddy B. (2006) Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 12(12):CR525-529.

Schaich M., Soucek S., Thiede C., Ehninger G., Illmer T., SHG AML96 Study Group. (2005) MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology*. 128(3):324-32.

Seliger J. M., Misuri L., Maser E., Hintzpeter J. (2018) The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldoketo reductases 1B1 and 1B10. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 33(1):607-614.

Sébert M., Renneville A., Bally C., Peterlin P., Beyne-Rauzy O., Legros L., Gourin M., Sanhes L., Wattel E., Gyan E., Park S., Stamatoullas A., Banos A., Laribi K., Jueliger S., Bevan L., Chermat F., Sapena R., Nibourel O., Chaffaut C., Chevret S., Preudhomme C., Adès L., Fenaux P. (2019) A phase II study of guadecitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and low blast count acute myeloid leukemia after azacitidine failure. *Haematologica*. 104(8): 1565–1571.

Shafi A., Siddiqui N., Imtiaz S., Sajid M. U. D. (2017) Left Ventricular Systolic Dysfunction Predicted By Early Troponin I Release After Anthracycline Based Chemotherapy In Breast Cancer Patients. *Journal of Ayub Medical College*. 29(2):266-269.

Shukla R., Basu A. K., Mandal B., Mukhopadhyay P., Maity A., Chakraborty S., Devrabhai P. K. (2019) 11 $\beta$  Hydroxysteroid dehydrogenase – 1 activity in type 2 diabetes mellitus: a comparative study. *BMC endocrine disorders*. 19(1):15.

Si J., Yan R., Wang C., Su X., Zhang Z. (2009) TIM-Finder: A new method for identifying TIM-barrel proteins. *Structural Biology*. 9(1):73.

Singh S. P., Dammeijer F., Hendriks R. W. (2018) Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Molecular cancer*. 17: 57.

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

Sorf A., Novotná E., Hofman J., Morell A., Staud F., Wsol V., Ceckova M. (2019) Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters. *Biochemical pharmacology*. 163:290-298.

Sorf A., Sucha S., Morell A., Novotná E., Staud F., Zavrelova A., Visek B., Wsol V., Ceckova M. (2020) Targeting Pharmacokinetic Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia Cells with CDK4/6 Inhibitors. *Cancers*. 12(6):1596.

Stomberski C. T., Anand P., Venetos N. M., Hausladen A., Zhou H., Premont R. T., Stamler J. S. (2019) AKR1A1 is a novel mammalian S-nitroso-glutathione reductase. *The Journal of biological chemistry*. 294(48): 18285–18293.

Straus D. S., Glass C. K. (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Medicinal research reviews*. 21(3):185-210.

Sun S., Gu X., Gao X., Li Y., Yu H., Xiong W., Yu H., Wang W., Li Y., Teng Y., Zhou D. (2016) Overexpression of AKR1C3 significantly enhances human prostate cancer cells resistance to radiation. *Oncotarget*. 7(30):48050-48058.

Tai H., Lin T., Huang H., Lin T., Chou M., Chiou S., Chow K. (2007) Overexpression of aldo-keto reductase 1C2 as a high-risk factor in bladder cancer. *Oncology reports*. 17(2):305-11.

Takemura M., Endo S., Matsunaga T., Soda M., Zhao H., El-Kabbani O., Tajima K., Iinuma M., Hara A. (2011) Selective inhibition of the tumor marker aldo-keto reductase family member 1B10 by oleanolic acid. *Journal of natural products*. 74(5):1201-6.

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

Teran-Saavedra N. G., Sarabia-Sainz J. A., Velázquez-Contreras E. F., Montfort G. R., Pedroza-Montero M., Vazquez-Moreno L. (2020) Albumin-Albumin/Lactosylated Core-Shell Nanoparticles:

Therapy to Treat Hepatocellular Carcinoma for Controlled Delivery of Doxorubicin. *Molecules: a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry*. 25(22):5432.

Tipparaju S. M., Barski O. A., Srivastava S., Bhatnagar A. (2008) Catalytic mechanism and substrate specificity of the  $\beta$ -subunit of the voltage-gated potassium (Kv) channel. *Biochemistry*. 47(34): 8840–8854.

Tzogani K., Penttilä K., Lapveteläinen T., Hemmings R., Koenig J., Freire J., Márcia S., Cole S., Coppola P., Flores B., Barbachano Y., Roige S. D., Pignatti F. (2020) EMA Review of Daunorubicin and Cytarabine Encapsulated in Liposomes (Vyxeos, CPX-351) for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed, Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia or Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-Related Changes. *The oncologist*. 25(9):e1414-e1420.

Vago L., Gojo I. (2020) Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 130(4): 1552–1564.

Valcovici M., Andrica F., Serban C., Dragan S. (2016) Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives. *Archives of medical science: AMS*. 12(2): 428–435.

Venkatesh P., Kasi A. Anthracyclines. Poslední revize 03. 2021 [cit. 2021-05-01]. StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538187/>>.

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

Wang R., Wang G., Ricard M. J., Ferris B., Strulovici-Barel Y., Salit J., Hackett N. R., Gudas L. J., Crystal R. G. (2010) Smoking-induced upregulation of AKR1B10 expression in the airway epithelium of healthy individuals. *Chest*. 138(6):1402-10.

Wang S., Yang Q., Fung K., Lin H. (2008) AKR1C2 and AKR1C3 mediated prostaglandin D2 metabolism augments the PI3K/Akt proliferative signaling pathway in human prostate cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 289(1-2):60-6.

Wang X., Zhang H., Chen X. (2019) Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer drug resistance*. 2:141-160.

Wangtrakuldee P., Adeniji A. O., Zang T., Duan L., Khatri B., Twenter B. M., Estrada M. A., Higgins T. F., Winkler J. D., Penning T. M. (2019) A 3-(4-Nitronaphthen-1-yl) amino-benzoate analog as a Bifunctional AKR1C3 Inhibitor with AR Antagonist Activity: Head to Head Comparison with Other Advanced AKR1C3 Targeted Therapeutics. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 192: 105283.

Wei X., Wei Z., Li Y., Tan Z., Lin C. (2021) AKR1C1 Contributes to Cervical Cancer Progression via Regulating TWIST1 Expression. *Biochemical genetics*. 59(2):516-530.

Wen B., You W., Yang S., Du X. (2020) Indirect comparison of azacitidine and decitabine for the therapy of elderly patients with acute myeloid leukemia: a systematic review and network meta-analysis. *Experimental hematology & oncology*. 9: 3.

Wu T., Chen Y., Chang H., Kung Y., Tseng C., Cheng P. (2020) AKR1B1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Mediated by RAGE-Oxidative Stress in Diabetic Cataract Lens. *Antioxidants*. 9(4):273.

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

Yang X., Wangcorresponding J. (2018) Precision therapy for acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology*. 11: 3.

Yavas G., Celik E., Yavas C., Elsurer C., Afsar R. E. (2017) Spironolactone ameliorates the cardiovascular toxicity induced by concomitant trastuzumab and thoracic radiotherapy. *Oncology and radiotherapy*. 22(4):295-302.

Yun M., Choi A. J., Lee Y. C., Kong M., Sung J., Kim S. S., Eun Y. (2018) Carbonyl reductase 1 is a new target to improve the effect of radiotherapy on head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. 37(1):264.

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

Zang T., Verma K., Chen M., Jin Y., Trippier P. C., Penning T. M. (2015) Screening baccharin analogs as selective inhibitors against type 5  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Chemico-biological interactions*. 234:339-48.

Zeng C., Chang L., Ying M., Cao J., He Q., Zhu H., Yang B. (2017) Aldo-Keto Reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology*. 8: 119.

Zeng C., Zhu D., You J., Dong X., Yang B., Zhu H., He Q. (2019) Liquiritin, as a Natural Inhibitor of AKR1C1, Could Interfere With the Progesterone Metabolism. *Frontiers in physiology*. 10:833.

Zhang H., Patel A., Ma S., Li X. J., Zhang Y., Yang P., Kathawala R. J., Wang Y., Anreddy N., Fu L., Chen Z. (2014) In vitro, in vivo and ex vivo characterization of ibrutinib: a potent inhibitor of the efflux function of the transporter MRP1. *British journal of pharmacology*. 171(24):5845-57.

Zhang J., Gu Y., Chen B. (2019) Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *OncoTargets and therapy*. 12: 1937-1945.

Zhang Z., Huang T., Zhang X., Xie Y., Lin S., Luo F., Meng D., Hu H., Wang J., Peng L., Qian C., Cheng C., Huang B. (2020) AKR1C2 acts as a targetable oncogene in esophageal squamous cell carcinoma via activating PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*. 24(17):9999-10012.

Zhou H., Fu L., Li L., Chen Y., Zhu H., Zhou J., Lv M., Gan R., Zhang X., Liang G. (2020) The epigallocatechin gallate derivative Y6 reduces the cardiotoxicity and enhances the efficacy of daunorubicin against human hepatocellular carcinoma by inhibiting carbonyl reductase 1 expression. *Journal of ethnopharmacology*. 261:113118.

## 10. INTERNETOVÉ ZDROJE

*CANCER TODAY* [online]. Poslední revize 04.2021 [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=15&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=15&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0).

*Xospata, INN-gilteritinib* [online]. Poslední revize 10.2019 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xospata-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xospata-epar-product-information_cs.pdf).

*Rydapt, INN-midostaurin* [online]. Poslední revize 01.2021 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rydapt-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rydapt-epar-product-information_cs.pdf).

*Nexavar, INN-Sorafenib* [online]. Poslední revize 09.2019 [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nexavar-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nexavar-epar-product-information_cs.pdf).

EMA. European Medicines Agency. Assessment report. Dexrazoxane-containing medicinal products (EMA/H/A-31/1275) (2011) [online]. [cit. 2021-05-09]. Dostupné z: [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/Dexrazoxane\\_31/WC500120340.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Dexrazoxane_31/WC500120340.pdf). [Google Scholar](#)

EMA. European Medicines Agency. Cardioxane EMEA-H-A-13-1453 - Assessment Report. [online]. Poslední revize 07.2017 [cit. 2021-05-09]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/cardioxane-article-13-referral-chmp-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/cardioxane-article-13-referral-chmp-assessment-report_en.pdf)

SDRED. Short-chain Dehydrogenases/Reductases Engineering Database [online]. Poslední revize: není k dispozici [cit. 2021-06-20]. Dostupné z: <https://sdred.biocatnet.de/sequence-browser>