

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VLIV INHIBICE BRANEBRUTINIBU NA
AKTIVITU VYBRANÝCH REDUKTAS Z
NADRODINY AKR
A SDR.**

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Lenka Laštovičková

Hradec králové, 2022

Bc. Barbora Fiklíková

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne 11.5.2022

.....

Bc. Barbora Fiklíková

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto poděkovat prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a připomínky při vytváření diplomové práce. Poděkování patří rovněž Mgr. Lence Laštovičkové za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Barbora Fiklíková

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

Název diplomové práce: Vliv inhibice branebrutinibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR.

Akutní myeloidní leukemie (AML) je spolu s dalšími nádorovými onemocněními velmi častým zdravotním problémem nejen v České republice, ale po celém světě. Na tyto nemoci neexistuje stoprocentní léčba a každý rok tak připraví o život miliony lidí.

Již po několik desítek let se k léčbě AML využívají antracyklinová antibiotika (ANT), například daunorubicin v kombinaci s dalšími cytostatiky. Nicméně i tato léčiva mají své problémy. Jedním z nich je jejich toxicita pro buňky organismu, zejména kardiomyocyty, způsobena jednak inhibicí topoizomerasy 2 β a jednak iniciací vzniku reaktivních forem kyslíku. Druhým problémem je narůstající rezistence nádorových buněk vůči ANT.

ANT jsou karbonyl redukujícími enzymy metabolizovány na příslušné alkoholy, které mají snížený účinek proti nádorovým buňkám, a naopak zvýšenou toxicitu proti buňkám srdce. Inhibicí těchto enzymů by bylo možné dosáhnout lepších terapeutických výsledků.

Jedním z potenciálních inhibitorů by mohl být branebrutinib (BRA). Je to inhibitor Brutonovy tyrosinkinasy, používaný k léčbě imunitně podmíněných a zánětlivých onemocnění a B-buněčných malignit, konkrétně například revmatoidní artritidy, lupusu a dalších onemocnění.

Předmětem této práce bylo zjistit, zdali BRA inhibuje některou z vybraných reduktas, určit IC_{50} , kinetické parametry a typ inhibice u nejvíce inhibovaného enzymu.

BRA nejúčinněji inhiboval AKR1C3. Zde byla inhibice u 10 μM BRA až 77,24 % a u 50 μM BRA 91,79 %. O něco méně inhiboval AKR1B10, kde byla inhibice u 10 μM BRA 62,97 % a u 50 μM BRA 81,75 %. U ostatních testovaných enzymů vykazoval BRA pouze nízký inhibiční potenciál a nemělo tedy smysl s nimi pokračovat v dalších experimentech.

Pro AKR1C3 byla zjištěna IC_{50} 2,65 μM . Inhibiční konstanta K_i dosahovala hodnoty 3,08 μM . Z grafického vynesení dle Lineweavera a Burka byl určen nekompetitivní typ inhibice. Posouzením intenzity vazby inhibitoru k enzymu se prokázalo, že se inhibitor na enzym váže reverzibilně. Pro AKR1B10 byla průměrná IC_{50} 5,62 μM a hodnota K_i dosahovala 6,40 μM . Opět byla inhibice nekompetitivní a BRA se na enzym vázal reverzibilně.

Na základě výsledků by BRA mohl díky inhibici AKR1C3 a AKR1B10 zlepšovat terapeutické účinky daunorubicinu. In vitro experimenty s rekombinantními proteiny bude nutné doplnit i o další s relevantními buněčnými liniemi.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Barbora Fiklíková

Supervisor: Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of diploma thesis: The influence of branebrutinib on the activity of selected reductases from AKR and SDR superfamilies

Acute myeloid leukaemia (AML), along with other cancer diseases, is a widespread health problem not just in the Czech Republic but in the entire world. There is no reliable cure, and millions of people die of cancer every year.

Anthracycline antibiotics (ANT) such as daunorubicin have been used as the cure for many years in combination with other cytostatics. However, even these drugs have their issues. One of the problems is toxicity for the healthy cells (especially cardiomyocytes) caused by the inhibition of topoisomerase 2 β and by the reactive oxygen species (ROS) formation. The other problem is the increasing resistance of the ANT to cancer cells.

ANTs are metabolized by carbonyl reducing enzymes to appropriate alcohols with lower effects against cancer cells and more severe toxicity for the heart cells. The inhibition of these enzymes could be used to achieve better therapeutic results.

One of the potential inhibitors could be branebrutinib (BRA). It inhibits Bruton tyrosine kinase and is used to cure immune-mediated diseases and inflammatory diseases, and B-cells malignancies, for example, rheumatoid arthritis, lupus, and others.

The aim of this work was to find out whether BRA inhibits any of the selected reductases, determine IC₅₀, kinetic parameters, and a type of inhibition of the most inhibited enzyme.

BRA was most effectively inhibiting the enzyme AKR1C3. The inhibition reached 77.20% for 10 μ M BRA and 91.79% for 50 μ M BRA. Somewhat less inhibited was AKR1B10. The inhibition reached 62.97% for 10 μ M BRA and 81.75 % for 50 μ M BRA. Other tested enzymes displayed low inhibitory potential to BRA, so there was no need to continue in their following experiments.

The IC₅₀ for AKR1C3 was 2.65 μ M, and the inhibitory constant K_i was 3.08 μ M. Based on the Lineweaver-Burk plot, the noncompetitive inhibition type was observed. The tight binding inhibitor was not proven, and BRA is reversibly bound to AKR1C3. The average IC₅₀ for AKR1B10 was 5.62 μ M, and the inhibitory constant K_i was 6.40 μ M. The type of inhibition was also noncompetitive, and BRA was bound to AKR1B10 reversibly.

Based on the results, the BRA could increase the therapeutic effect of daunorubicin due to AKR1C3 and AKR1B10 inhibition. However, further research with the cell lines is necessary to complete the in vitro observations with recombinant proteins.

OBSAH

1.	ÚVOD	10
2.	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1.	Nádorová onemocnění	11
2.2.	Antracyklinová antibiotika.....	15
2.2.1.	Daunorubicin.....	17
2.3.	Karbonyl redukující enzymy.....	18
2.3.1.	Aldo-ketoreduktasy	21
2.3.2.	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem.....	26
2.4.	Branebrutinib.....	29
3.	CÍL PRÁCE	31
4.	MATERIÁL A METODIKA	32
4.1.	Materiál	32
4.1.1.	Chemikálie	32
4.1.2.	Pomůcky a přístroje.....	32
4.2.	Metodika práce.....	34
4.2.1.	Základní screening	34
4.2.2.	Stanovení inhibiční koncentrace IC ₅₀	37
4.2.3.	Stanovení typu inhibice.....	37
4.2.4.	Určení typu vazby	38
4.2.5.	Vyhodnocení výsledků.....	38
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	39
5.1.	Základní screening	39
5.2.	Stanovení inhibiční koncentrace IC ₅₀	44
5.3.	Stanovení typu inhibice.....	48
5.4.	Určení typu vazby	51
6.	ZÁVĚR	56
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	57

8.	SEZNAM OBRÁZKŮ	59
9.	SEZNAM TABULEK.....	61
10.	LITERATURA.....	62

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění je široká škála malignit, která každý rok připraví o život miliony lidí po celém světě. Mohou se vyvinout z téměř jakékoliv tkáně, pokud dojde k nekontrolovatelnému množení buněk. Dělí se na benigní neboli nezhoubné a maligní, zhoubné. Základem léčby každého novotvaru je včasná diagnostika, ale ani tak není zaručené, že se pacient uzdraví. Problémem jsou také metastázy, což znamená rozšíření rakovinových buněk do dalších tkání. Některá onemocnění tohoto druhu, například akutní myeloidní leukemie (AML), karcinomy prsu, plic, lymfomy a další se po desítky let léčí pomocí antracyklinových antibiotik (ANT) v kombinaci s cytostatiky. Nejčastěji využívanými ANT jsou daunorubicin (DAUN), který byl použit i v této práci, a doxorubicin.

Problémem ANT je, že nádorové buňky mohou být vůči nim rezistentní. To je způsobeno několika mechanismy. Tím hlavním je efluxní transport zprostředkovaný lékovými přenašeči z rodiny ABC, především P-glykoproteinem. Při nadměrné expresi těchto transportérů je zvýšená tendence vypuzení cytostatika z buňky. Dalším mechanismem je redistribuce cytostatika z jádra do cytoplasmy, kde neúčinkuje. Za to je zodpovědný protein LRP. Mechanismů rezistence je mnoho, a proto je složité jim zamezit.

Dalším problémem ANT je jejich toxicita pro buňky organismu. Podléhají totiž metabolické přeměně katalyzované karbonyl redukujícími enzymy. Mezi ně patří jednak aldo-ketoreduktasy (AKR) a také dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR). ANT je metabolizováno na příslušný alkohol, čímž dojde ke snížení aktivity léčiva a zvýšení toxicity, zejména pro buňky srdce.

Možným řešením problému toxicity je inhibice výše zmíněných enzymů. V současné době je testováno několik inhibitorů na více úrovních výzkumu. V této práci je předmětem zkoumání branebrutinib (BRA), inhibitor Brutonovy tyrosinkinasy, užívaný k léčbě řady onemocnění. Testování probíhalo *in vitro* s rekombinantními enzymy a jako specifický substrát se používal DAUN.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Nádorová onemocnění

Dle Světové zdravotnické organizace je rakovina neboli zhoubné nádory či novotvary velká skupina onemocnění, které se mohou rozvinout téměř v každé tkáni těla, pokud dojde k nekontrolovanému růstu buněk. Nádorové buňky mají schopnost napadat přilehlé orgány a také se rozšiřovat do jiných orgánů, což se nazývá metastazování. Nádorová onemocnění jsou celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. Různé typy rakoviny nenapadají obě pohlaví se stejnou frekvencí. U mužů jsou nejčastější rakoviny plic, prostaty, tlustého střeva a konečníku (kolorektum), žaludku a jater. Mezi ženami je nejběžnější karcinom prsu, tlustého střeva a konečníku, plic, děložního čípku a štítné žlázy. Výskyt rakoviny každým rokem narůstá, což zatěžuje pacienty, jejich okolí i zdravotní systém. V mnoha zemích tak pacienti nemají přístup k včasné diagnostice a kvalitní léčbě. Za rok 2020 přibylo po celém světě přes 18 milionů nových případů. V roce 2018 na rakovinu zemřelo 9,6 milionu lidí, což je jedno ze šesti nejčastějších úmrtí.

Státní zdravotní ústav uvádí, že v ČR jsou nádorová onemocnění také druhou nejčastější příčinou úmrtí. Ročně umírá 27 tisíc osob, což činí 23 % z celkové úmrtnosti.

Akutní leukemie

Akutní leukemie patří mezi hematologická onemocnění. Dělí se na AML a akutní lymfoblastickou leukemii (ALL) podle toho, kterou řadu buněk onemocnění postihuje. Bližší klasifikace je možná díky imunofenotypizaci, cytogenetice a molekulární genetice. Jde o neoplastickou transformaci hematopoetické kmenové buňky a proliferaci leukemických blastů v kostní dřeni. ALL postihuje pacienty především v dětském věku a AML primárně dospělé. (Karges et al. 2011, Šálek 2012)

Mezi klinické příznaky patří horečka, únava, noční pocení, příznaky anemie, zvýšená krvácivost, náchylnost k infekcím. Dochází ke zduření lymfatických uzlin a také ke zvětšení jater neboli splenomegalii. Obvykle také bývá přidružená diseminovaná intravaskulární koagulopatie. (Karges et al. 2011)

Základem pro úspěšnou léčbu je včasná diagnostika. Důležitým aspektem je vyšetření krevního obrazu a hodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů pod mikroskopem, to znamená poměrové zastoupení jednotlivých typů leukocytů. Hodnotí se také vzhled buněk a jejich abnormality. Pro akutní leukemie je charakteristická patologie ve více buněčných řadách a také přítomnost blastů. Myeloidní blasty mají kulaté jádro s jemným chromatinem a zřetelným jedním či několika nukleoly. Lymfoidní blasty nemívají jádérka viditelná, jaderný chromatin bývá kondenzovanější. Střední vývojová stadia buněk obvykle chybí, to se nazývá hiatus leucaemicus. Leukocytosa není podmínkou, celkový počet může být různý, obvykle však bývá anemie a trombocytopenie. U akutní promyelocytární leukemie je častá pancytopenie a u myeloblastové leukemie jsou přítomné Auerovy tyče v blastických buňkách. (Šálek 2012, Karges et al. 2011)

AML má dvojí klasifikaci. Jednak podle FAB (French-American-British) a nověji podle WHO. Starší klasifikace dle FAB rozděluje typy AML dle nátěrů periferní krve a kostní dřeně barvené klasicky dle Giemsy-Romanovského a různými cytochemickými barvenými. Klasifikace dle WHO zahrnuje navíc i průtokovou cytometrii, cytogenetiku a molekulární biologii. (Penka et al. 2011)

Před zahájením vlastní léčby je nutné posoudit celkový stav pacienta a rozhodnout, jaký způsob léčby je pro něj nejvhodnější. Hodnotí se charakter leukemie, celkový stav pacienta, jeho věk, komorbidity, ale také jeho vlastní preference, po řádném poučení. U některých forem AML předchází vlastní léčbě leukodepleční výkony, které mají za cíl dosáhnout počtu leukocytů alespoň $5\,000 \times 10^9/l$. Obvykle se spolu s tím začíná i farmakologická léčba. Již více než 30 let se k chemoterapii používá kombinace ANT s cytarabinem. V některých případech je nutné přistoupit k transplantaci hematopoetických kmenových buněk, kde je ale riziko graft versus host disease, která znamená neúspěch transplantace. Cílem léčby je obnova funkce kostní dřeně. (Šálek 2012, Karges et al. 2011)

	kategorieFAB	kritéria pro klasifikaci podtypů
blasty jsou \geq 30 % buněk z ANC (s výjimkou M3 a některých M6) \geq 3 % blastů jsou MPO pozitivní (s výjimkou M0 a některých M5A)	M0	< 3 % buněk jsou MPO nebo SBB pozitivní lymfoidní markery jsou negativní je imunologický nebo ultrastrukturální průkaz myeloidní diference leukemie
	M1	blasty jsou \geq 90 % NEC blasty jsou \geq 3 % MPO nebo SBB pozitivní vyzrávající monocytární linie je < 10 % vyzrávající granulocyty jsou < 10 %
	M2	blasty jsou 30–89 % NEC vyzrávající granulocyty \geq 10 % NEC monocytární linie < 20 % NEC a nejsou jiná kritéria M4
	M3	charakteristická morfolgie
	M3v	charakteristická morfolgie
	M4	blasty jsou \geq 30 % NEC granulocytární linie \geq 20 % NEC monocytární linie \geq 20 % NEC dřeně a/nebo periferní monocytární linie je $\geq 5 \times 10^9/l$ nebo dřeně jako M2 ale cytochemická barvení svědčí pro monocytární linii a je $\geq 5 \times 10^9/l$ buněk periferní krve z monocytární linie
	M5A	blasty jsou \geq 30 % NEC monocytární linie dřeně je \geq 80 % NEC monoblasty jsou \geq 80 % monocytární linie
	M5B	jako M5A, ale monoblasty jsou < 80 % monocytární linie ve dřeni
	M6	erytroidní řada \geq 50 % ANC blasty jsou \geq 30 % NEC
M7	blasty jsou převážně megakaryoblasty	

Obrázek 1 - FAB klasifikace AML (Penka et al. 2011)

AML s rekurentní cytogenetickou abnormitou	AML s t(8;21); RUNX1-RUNX1T1 AML s inv(16) či t(16;16); CBFβ-MYH11 APL s t(15;17); PML-RARA AML s t(9;11), MLLT3-MLL AML s t(6;9); DEK-NUP214 AML s inv(3) či t(3;3); RNP1-EVI1 AML megakaryoblastická s t(1;22); RBM15-MKL1 AML s mutovaným NPM1 AML s mutovaným CEBPA
AML spojená s myelodysplazií	vznikající jako vývoj MDS či MDS/MPN provázená cytogenetickou abnormitou provázející MDS s průkazem multilineární dysplazie
myeloidní neoplazie spojené s léčbou	t-AML t-MDS t-MDS/MPN
AML jinak neurčené	AML s minimální diferenciací AML bez vyzrání AML s vyzráním akutní myelomonocytární leukemie akutní monoblastická a monocytární leukemie akutní erytroidní leukemie (erytroidní/myeloidní a čistá erytroidní leukemie) akutní megakaryoblastická leukemie akutní bazofilní leukemie akutní panmyelóza s myelofibrózou
myeloidní sarkom	z myeloblastů, myelomonocytární, monoblastický, trilineární, dominantně z erytroblastů či megakaryoblastů
myeloidní proliferace spojené s Downovým syndromem	přechodná abnormální myelopoéza myeloidní leukemie spojená s Downovým syndromem
neoplazie z blastických plazmocytoidních dendritických buněk	

Obrázek 2 - WHO klasifikace AML (Penka et al. 2011)

2.2. Antracyklinová antibiotika

ANT jsou tetracykliny s antrachinonem připojeným glykosidickou vazbou k cukernému zbytku. Používají se jako chemoterapeutika pro léčbu nádorů a hematologických onemocnění u dospělých i dětí. Jedná se hlavně o rakovinu prsu, plic, leukémii, lymfomy. Klinicky nejvýznamnějšími zástupci jsou DAUN, doxorubicin, epirubicin a idarubicin. Produkují je bakterie rodu *Streptomyces*. Podávají se intravenózně a jsou metabolizovány především játry a vylučovány žlučí. (Cheong et al. 2018; Bachur et al. 2002; Puchnerová et al. 2016)

První ANT – DAUN a doxorubicin byly velmi účinné, proto byla snaha produkovat analogy, které by zlepšily terapeutické aplikace. Z nich se celosvětově používají jen epirubicin a idarubicin. (Cheong et al. 2018)

Mechanismus účinku

ANT vnikají do buněk a jsou lokalizovány v jádrech. Mají interkalační funkci, to znamená, že se včlení do DNA mezi sousední pár bází. Tím způsobí inhibici syntézy DNA a RNA v rychle se replikujících nádorových buňkách.

Další funkcí je inhibice topoisomerasy II (Top2). To je enzym, který tvoří dočasné zlomy dvoušroubovice DNA a reguluje tím nadšroubovicové vinutí. Dokáže také opravit různé spletnice. Její inhibice způsobí porušení reparačních mechanismů, což vede k programované buněčné smrti. Tento enzym existuje ve dvou variantách. Top2 α , která se nachází v nádorových buňkách a Top2 β vyskytující se u buněk zdravých.

Vzhledem k tomu, že ANT mají chinonovou část, podporují vznik reaktivních forem kyslíku (ROS). Chinony totiž podléhají redukci na semichinony za katalýzy cytosolických enzymů, jako jsou cytochromy P450, NADH dehydrogenasy, a xantinoxidasy. Při tom vzniká superoxid, který sám o sobě může způsobit poškození buněk nebo se může přeměnit na peroxidový či hydroxylový anion. Kyslíkové radikály mohou vznikat i reakcí ANT s železem. Důsledkem je peroxidace lipidů a poškození DNA buněk. (Cheong et al. 2018; Puchnerová et al. 2016)

Toxicita

Z výše popsaného mechanismu účinku ANT vyplývá, že nepřinášejí jen benefity pro pacienty. Jejich velkým problémem je toxicita pro lidský organismus, způsobena jednak inhibicí Top2 β a jednak vznikem ROS. Závažná je zejména kardiotoxicita, kdy jsou poškozovány buňky srdce. V mitochondriální membráně kardiomyocytů se nachází typ fosfolipidů, který má k ANT vysokou afinitu. Ty procházejí do buňky a kumulují se v ní. Míra toxického účinku závisí na kumulativní dávce a liší se u jednotlivých léků a pacientů. (Cheong et al. 2018; Puchnerová et al. 2016)

Proto, že ANT jsou široce používané v léčbě rakoviny, hledají se postupy, jak zabránit vzniku poškození srdce, aniž by došlo ke snížení účinku léčby. Jedním způsobem je podání kontinuální infuze léku, místo bolusové dávky. Sníží se tak maximální hladina léčiva v těle pacienta. U dětí bohužel účinnost tohoto způsobu potvrzena nebyla. Další možností je podání lipozomálních ANT, což znamená, že se léčivo obalí do lipozomální kapsle. Dojde ke zvýšení poločasu léčiva v krvi a zpomalení clearance, takže léčivo zůstane v těle delší dobu. Léčivo navíc snáze prochází kapilárami nádoru, kde se kumuluje v intersticiální tekutině a hůře prochází do buněk srdečního svalu. Dále je možné podat dexrazoxan, syntetizovaný v padesátých letech ve Švýcarsku a USA. Chelatuje železo v buňkách, takže se netvoří komplexy ANT s železem zodpovědné za tvorbu ROS a tím nedochází k poškození buněk. U dětí se dexrazoxan nepoužívá kvůli podezření z vyvolání ALL a myelodysplastického syndromu. Také lze podávat výživové doplňky, jako například vitamin A a C, nebo selen. (Puchnerová et al. 2016)

Rezistence

Velkým problémem je vznik rezistence nádorových buněk vůči těmto lékům. Buňky jsou často multirezistentní, to znamená, že jsou odolné vůči řadě léčiv. Léčba tak není dostatečně účinná a nádorová tkáň dál nekontrolovatelně roste. Hlavním mechanismem rezistence je efluxní transport přes membrány zprostředkovaný transportéry z rodiny ABC (ATP binding cassette transporters) – hlavně P-glykoprotein (P-gp) a MRP (multidrug resistance associated proteins). Tyto lékové přenašeče jsou zodpovědné za transport látek z buněk. Nadměrná exprese ABC lékových transportérů je tedy příčinou MDR (mnohočetná léková rezistence), neboť cytostatikum je z buněk nadměrně vypuzováno. (Chien et al. 2008)

V rezistentních buňkách také může být přítomen LRP (lung resistance-associated protein). Tento transportní protein je zodpovědný za redistribuci cytostatika z jádra do cytoplasmy, čímž dochází ke snížení účinnosti léku. (Chien et al. 2008)

Dalším mechanismem přispívajícím k MDR je antioxidační obrana nádorové buňky. Jak již bylo zmíněno, ANT způsobují vznik ROS, které poškozují buňku. Pokud má nádorová buňka dobré obranné mechanismy, ANT nezpůsobí závažné poškození buňky. (Raudenská, 2014)

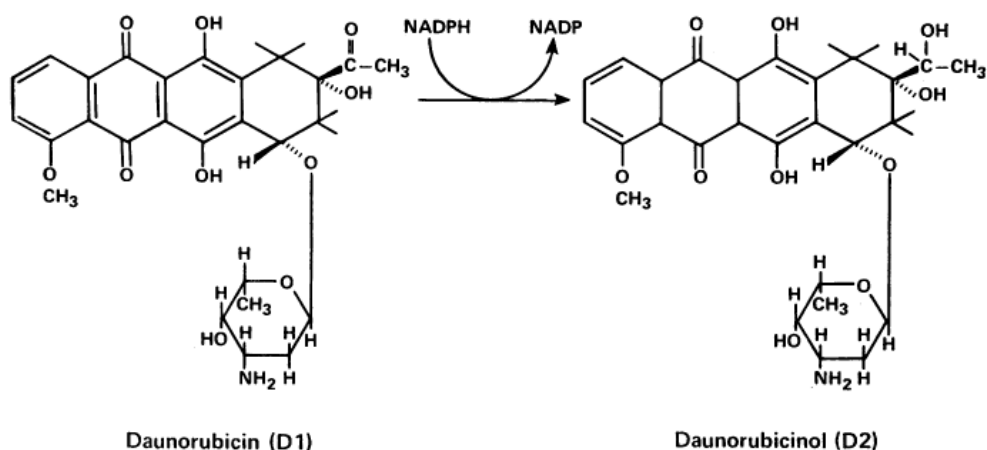
Mezi dalšími možnými mechanismy rezistence může být hypoxie buňky a její vyhýbání se apoptóze, tyrosinkinasové receptory (RGFR a IGFR1), metaloproteinasa 10, nekódující RNA, DNA metylace a fosfoproteom. (Ferrari et al. 2022)

V dnešní době je proto snaha pochopit mechanismy rezistence a pokusit se je zvrátit nebo obejít, a tím zvýšit účinnost léčby. Testují se například inhibitory ABC transportérů. Nedávné výzkumy objevily inhibitory ABCB1 a ABCG2, přičemž u obou lékových přenašečů se prokázala souvislost s MDR. (Wu et al. 2022)

2.2.1. Daunorubicin

DAUN je chemoterapeutikum červené barvy. Byl objeven v 60. letech 20. století. Z bakterie *Streptomyces peucetius* ho v Itálii izoloval a pojmenoval Di Marco s kolegy. Nejprve byla pozorována jeho účinnost proti myším nádorům. Později byl pomocí klinických testů prokázán účinek proti leukemii a lymfomům. (Cheong et al. 2018)

Je rozpustný ve vodě a metylalkoholu. Obvykle se podává v kombinaci s cytarabinem k léčbě AML u dospělých a dětí starších 1 roku. Používá se i k léčbě ALL a testuje se i použití u jiných typů rakoviny. DAUN hydrochlorid je metabolizován v játrech a dalších tkáních cytoplasmatickými aldo-ketoreduktasami. Hlavním metabolitem je daunorubicinol (DAUN-ol), který má antineoplastickou aktivitu. Nicméně DAUN-ol má mnohem nižší účinnost proti nádorovým buňkám a je více toxický pro buňky organismu. (PubChem)



Obrázek 3 - metabolismus daunorubicinu (Bachur et al. 2002)

2.3. Karbonyl redukující enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory, jejichž funkcí je urychlení chemických reakcí v biologických systémech. Po chemické stránce jsou to bílkoviny. Bílkovinná část se nazývá apoenzym, nebílkovinná část koenzym. Obvykle jím bývají deriváty vitamínů B, nemusí však být přítomen u všech enzymů. Klíčovou oblastí pro reakci je aktivní místo, které mají všechny enzymy. Látka vstupující do reakce se nazývá substrát. Ten je přeměňován na produkt. Podle typu katalyzované reakce se rozlišuje 6 tříd – oxido-reduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy a ligasy. (Racek et al. 2006)

Přestože množství enzymu nelze snadno stanovit přímo, je možné vyjádřit jeho aktivitu a také kinetické parametry celé enzymem katalyzované reakce. Aktivita enzymu (či katalytická koncentrace) se vyjadřuje podle látkového množství substrátu přeměněného na produkt za jednotku času. Rychlost reakce charakterizuje Michaelisova konstanta (K_m). Ta odpovídá koncentraci substrátu, při níž rychlost reakce odpovídá polovině maximální možné rychlosti (V_{max}). Z toho vyplývá, že čím nižší K_m , tím rychleji je substrát enzymem přeměňován. Hodnota K_m je také mírou afinity enzymu k substrátu, proto čím nižší tato hodnota, tím větší má enzym afinitu k substrátu. Při reakcích s více substráty se za hlavní považuje ten, se kterým má enzym nejmenší K_m .

Oba kinetické parametry (jak K_m , tak V_{max}) se počítají na základě kinetické rovnice Michaelise a Mentenové:

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

kde v = reakční rychlost; V_{max} = mezní (maximální) rychlost; K_m = Michaelisova konstanta a $[S]$ je koncentrace substrátu.

Reakční rychlost reakce lze ovlivnit teplotou, pH, množstvím substrátu a produktu, či přidáním aktivátoru nebo inhibitoru. Aktivátory jsou látky, které reakci urychlují a inhibitory zpomalují. (Racek et al. 2006)

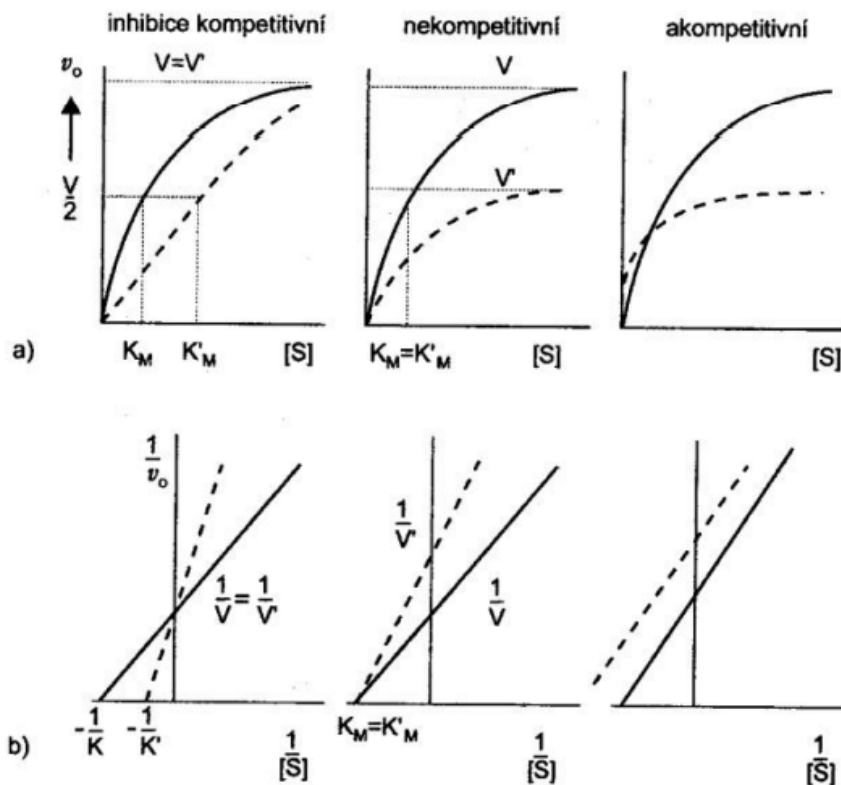
Inhibitory jsou látky, které zpomalují, či zastavují průběh enzymově katalyzované reakce, přičemž enzym nedestruují. Inhibice může být vratná nebo nevratná, záleží na síle vazby. Existuje několik typů inhibice, které se od sebe rozeznávají na základě kinetických parametrů. Obvykle se rozeznávají 4 typy – kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšený. Pro odlišení se sleduje, zda inhibitor po navázání změní Michaelisovu konstantu a maximální rychlost. Rozlišuje se tedy mezi původními parametry (K_m a V_{max}) a parametry po navázání inhibitoru (K_m' a V_{max}'). (Vodrážka et al. 1991, Ledvina et al. 2020)

Prvním typem je kompetitivní inhibice. Substrát a inhibitor mají podobnou strukturu a soutěží o vazbu na aktivní místo enzymu. Pokud se naváže na enzym inhibitor, substrát se již nemá kam navázat a reakce neproběhne. Ovšem vazba inhibitor-substrát je v tomto případě reverzibilní. Pokud vzroste množství substrátu, inhibice se zvrátí. U kompetitivní inhibice se zvyšuje K_m , zatímco V_{max} zůstává neměnná ($K_m' > K_m$; $V_{max} = V_{max}'$). (Vodrážka et al. 1991, Ledvina et al. 2020)

Naopak u nekompetitivní inhibice dochází k poklesu V_{max} a K_m se nemění ($K_m' = K_m$; $V_{max} < V_{max}'$). Tento typ je charakteristický tím, že inhibitor má jinou strukturu než substrát a váže se tedy na jinou část enzymu, než je jeho aktivní místo. Substrát se tedy může navázat také, ale k přeměně na produkt nedojde, protože enzym je neaktivní. Inhibitor se substrátem spolu o vazbu nesoutěží, jak tomu bylo u předchozího typu. Pokud se inhibitor váže nekovalentně, je tato vazba vratná. Kovalentní vazba je ireverzibilní a inhibitoru se poté někdy přezdívá enzymový jed. (Vodrážka et al. 1991, Ledvina et al. 2020)

Akompetitivní typ je odlišný, inhibitor se totiž neváže na volný enzym, ale na komplex enzym-substrát. Dochází k poklesu obou kinetických parametrů, jen jejich vzájemný poměr se nemění ($K_m' / K_m = V_{max}' / V_{max}$). (Vodrážka et al. 1991, Ledvina et al. 2020)

Rozdíly mezi jednotlivými typy inhibice jsou dobře pozorovatelné na hyperbolických (a) a dvojnásobně reciprokých grafech dle Lineweaver-Burka, viz obrázek. (Vodrážka et al. 1991).



Obrázek 4 - graficky znázorněné typy inhibice (Vodrážka et al. 1991)

Karbonyl redukující enzymy patří mezi oxido-reduktasy, které katalyzují oxidační a redukční děje. Jako koenzym využívají látky pyridinové (NAD^+ a $NADP^+$), flavinové (FAD, FMN), či ionty kovů (železa nebo mědi). Při reakcích dochází k přenosu vodíku nebo elektronů mezi substrátem a akceptorem. (Vodrážka et al. 1991)

2.3.1. Aldo-ketoreduktasy

Aldo-ketoreduktasy (AKR) jsou nadrodina enzymů ze třídy oxido-reduktas. Nacházejí se v cytosolu buněk většiny živých organismů a jsou orgánově specifické. Jsou to většinou monomery o velikosti 34-37 kDa. Nomenklatura je obdobná jako u cytochromů P450. AKR značí nadrodinu, číslice 1-16 rodinu, písmeno podrodinu a poslední číslo konkrétní sekvenci proteinů. V rámci rodiny musí být alespoň 40% shoda v sekvenci aminokyselin a u rodiny 60 %. V současné době je objeveno 16 rodin, čítajících téměř 200 členů. Toto číslo není pravděpodobně konečné, stále se objevují nové enzymy. (Barski 2008, Jez et al. 1997, Westermann et al. 2022)

U lidí se vyskytuje 15 členů, jsou to AKR1A1, 1B1, 1B10, 1B15, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1D1, 1E2, 6A3, 6A5, 6A9, 7A2 a 7A3. Prostorové uspořádání obsahuje $(\alpha/\beta)_8$ nebo triosafosfátisomerasový soudkový motiv. Jejich aktivní místo je lokalizováno na C-terminálním konci soudku. Katalyzují přeměnu aldehydů na primární alkoholy, a ketonů na sekundární alkoholy mechanismem redukce. Jsou schopné katalyzovat oxidačně-redukční reakce oběma směry, oxidační reakce však katalyzují méně ochotně než redukční. Uplatňují se v metabolismu steroidních hormonů, konjugovaných steroidů i syntetických terapeutických steroidů, a podílejí se na biosyntéze neurosteroidů a žlučových kyselin. Jsou schopné redukovat glukosu, glukokortikoidy a malé karbonylové metabolity. Při metabolismu látek někdy spolupracují s dalšími enzymy, například alkoholdehydrogenasami, cytochromy P450 nebo glutathion-S-transferasami. Jako kofaktor využívají NADPH. (Barski 2008, Jez et al. 1997, Rižner et al. 2014)

Metabolizují DAUN na DAUN-ol a ostatní ANT na odpovídající alkoholy, čímž se snižuje jejich účinek na rakovinové buňky a zvyšuje se toxicita vůči buňkám pacienta, zejména kardiomyocytům. Bylo také nalezeno několik polymorfismů v genech produkujících tyto enzymy. Některé způsobí zpomalení metabolismu léčiva, jiné naopak jeho urychlení. (Lubieniecka et al. 2012)

AKR1A1

Aldehydreduktasa je jedním z prvních objevených enzymů této skupiny. Tato monomerní NADPH-dependentní oxido-reduktasa je exprimována v mnoha tkáních, v největší míře v proximálních tubulech ledvin, méně pak v jaterní tkáni. Může mít dva různé transkripty, které mají odlišnou tkáňovou distribuci. Zatímco dlouhá izoforma je přítomna téměř ve všech tkáních, krátká izoforma je specifická pro ledviny, játra a střeva. Vykazuje širokou substrátovou aktivitu. Preferuje substráty s karboxylovou skupinou a negativním nábojem, ochotně redukuje i aldehydy aromatické a steroidní, i malé tříuhlíkaté. V opačném směru oxiduje trans-dihydrodioly na o-chinony. (Barski 2008)

U myši je klíčovým enzymem biosyntézy kyseliny askorbové, která je jakožto vitamin C pro organismus velmi důležitá. U lidí není kyselina askorbová syntetizovaná v organismu, musí se přijmout v potravě. Přetrvávání genu AKR1A1 tak značí, že může mít v organismu ještě dosud neobjevenou roli. (Barski 2008)

Studie u AKR1A1 objevily jednonukleotidové polymorfismy (SNP), kdy je nahrazena některá z aminokyselin tvořící strukturu enzymu. To pak může mít za následek změny citlivosti k ANT. Konkrétně náhrada glutamátu-55 za aspartát a asparagin-52 za serin způsobí snížení afinity k DAUN. Byla pozorována zvýšená exprese AKR1A1 u rakovinových buněk. V rozvoji rakoviny má dvě protichůdné role. Chrání před karcinogenezí díky redukční detoxikaci karcinogenů, zároveň ale vyřazuje protinádorovou léčbu. Studie také ukázaly spojení AKR1A1 s rezistencí nádorových buněk hrtanu vůči záření způsobenou potlačením funkce proteinu p58. (Barski 2008, Fujii et al. 2021)

AKR1B1

Aldosareduktasa je v současné době hojně studovaný enzym, protože hraje roli v hyperglykemickém poškození tkání u diabetu. Za bazálních podmínek katalyzuje redukci nízkého množství glukosy. Zvýšení redukce glukosy za hyperglykemie je spojeno s poškozením tkání. Bylo prokázáno, že inhibice AKR1B1 zabraňuje, oddaluje, a dokonce je schopna zvrátit poškození tkání spojené s diabetem. AKR1B1 je téměř všudypřítomná a je schopna regulovat různé zánětlivé dráhy. Studie ukázaly, že inhibice tohoto enzymu zastaví zánět vyvolaný vysokou hladinou glukosy a cytokinů. (Barski 2008)

Katalyzuje redukci mnoha substrátů včetně oxidovaných fosfolipidů, prekursoru konečného produktu pokročilé glykosylace (AGE), isokortikosteroidů, produktů lipidové peroxidace (4-hydroxynonenal), glutathionové konjugace nenasycených aldehydů a látek znečišťujících životní prostředí, například akrolein a jeho glutathionový konjugát. (Barski 2008)

Studie ukázaly, že AKR1B1 hraje zásadní roli v proliferaci buněk hladkého svalstva cév během restenózy a aterosklerózy, a při zprostředkování mitogenní signalizace, kterou spouští růstové faktory a cytokiny. Enzym je také obligátním mediátorem ischemického předkondicionování. To je stav, kdy do srdečního svalu po krátkou dobu neproudí krev. (Barski 2008)

AKR1B1 má v aktivním místě hyperreaktivní cysteinový zbytek, jehož oxidace urychluje katalýzu a zabraňuje navázání inhibitoru. Oxidace tohoto cysteinu způsobí, že se NADPH vazebná smyčka zcela neuzavře, její rozvolnění je tedy snazší. (Barski 2008)

AKR1B10

Aldosareduktasa tenkého střeva byla objevena v roce 1998. Je nejvíce exprimována ve střevech – jak tenkém, tak tlustém, dále pak v jaterní tkáni, brzlíku, nadledvinkách, ale také v nádorové tkáni plic, jater a konečníku. U karcinomu plic, jater, kolorekta a dělohy je AKR1B10 exprimována mnohonásobně více než za fyziologických podmínek, díky čemuž slouží jako marker těchto nádorů. Studie ukázaly, že hladina AKR1B10 u hepatocelulárního karcinomu závisí na stádiu onemocnění. V počátečních stádiích se základní cirhózou nebo virovou hepatitidou je exprimován výrazně nadměrně, kdežto v pozdějších stádiích s nízkým stupněm diferenciací je down-regulován. Tím pádem by AKR1B10 mohl sloužit jako biomarker diferenciací a proliferace jaterního karcinomu. (Barski 2008, Matsunaga et al. 2012)

Byla také prokázána up-regulace AKR1B10 v některých rakovinových buněčných liniích (u meduloblastomu a karcinomu tlustého střeva), čímž dochází k rezistenci nádorových buněk k chemoterapeutiku. Proto se uvažuje o jeho využití jako markeru chemorezistence. (Barski 2008, Matsunaga et al. 2012)

V promotorové oblasti genu AKR1B10 byla objevena místa, která by mohla sloužit jako vazebná místa pro onkogenní a tumor supresorové geny, včetně některých transkripčních faktorů, proteinu p53, a onkogenu AP-1. Je také známo, že léčba nádorových onemocnění pomocí chemoterapeutik způsobuje generaci ROS, které modifikují biomolekuly, nukleové kyseliny a proteiny. Následně se tvoří vysoce reaktivní a toxické karbonylové sloučeniny, například 4-hydroxy-2-nonenal a 4-oxo-2-nonenal. Studie ukázaly, že AKR1B10 tyto aldehydy vzniklé peroxidací lipidů redukuje na příslušné alkoholy. (Barski 2008, Matsunaga et al. 2012)

Aminokyselinová sekvence je ze 71 % identická s AKR1B1 a vykazuje podobnou substrátovou specifitu a senzitivitu k inhibitorům. Na rozdíl od AKR1B1 není schopna redukovat glukosu. Katalyzuje metabolismus různých endogenních látek, například aromatické a alifatické aldehydy nebo dikarbonylové sloučeniny. Mezi její substráty patří i některé xenobiotické ketony. Vykazuje 100x vyšší katalytickou účinnost vůči některým lékům včetně DAUN. (Barski 2008)

Bylo dokázáno, že umlčení genu AKR1B10 pomocí siRNA vede k inhibici růstu a snížení rychlosti tvorby buněk kolorektálního karcinomu, což prokazuje roli enzymu v proliferaci rakovinných buněk. Zjistilo se, že gen AKR1B10 je indukován cigaretovým kouřem. Enzym má vysokou afinitu k aldehydům obsaženým v cigaretovém kouři, čímž poskytuje ochranu před elektrofilním poškozením. Díky spojení s karboxylázou- α , která snižuje rychlost de novo syntézy acetyl-CoA, přispívá k regulaci biosyntézy mastných kyselin. (Barski 2008)

Katalyzuje také redukcí retinalů na odpovídající retinoly, čímž dojde ke snížení hladiny kyseliny retinové. Retinoidy jsou klíčové pro proliferaci, diferenciaci a morfogenezi několika typů buněk díky vazbě retinové kyseliny na odpovídající receptory. Retinové kyseliny působí jako signální molekuly pro spuštění diferenciaci buněk. Kromě role v detoxikaci karbonylových sloučenin je AKR1B10 zapojena do syntézy mastných kyselin přes ubikvitin-dependentní degradaci acetyl-CoA karboxylasy- α , což je klíčový enzym syntézy mastných kyselin. (Matsunaga et al. 2012)

AKR1C3

Hydroxysteroiddehydrogenasy jsou exprimovány především v tkáni plic a prostaty a také v játrech. Katalyzují přeměny aldehydů i ketonů. Podílejí se na vzniku a progresi onemocnění jako je karcinom prostaty a prsu nebo benigní hyperplasie prostaty. (Barski, 2008)

U člověka byly nalezeny AKR1C1-C4. Všechny jsou z 86 % homologické, liší se však biochemickými vlastnostmi, citlivostí k inhibitorům a tkáňovou distribucí. Všechny izoenzymy se vyskytují v játrech, kdežto mimojaterní výskyt je různý. AKR1C4 je téměř výhradně v hepatocytech, AKR1C3 spolu s 1C2 jsou dominantně exprimovány v prostatě a mléčných žlázách. (Matsunaga et al. 2012)

Jejich substráty jsou steroidy a prostaglandiny. Ochotně přeměňují aldehydy i ketony, čímž se liší od AKR1A a 1B. Katalyzují jak oxidační, tak redukční reakce se srovnatelnou účinností. Jsou velmi důležité pro metabolismus androgenů a estrogenů. Podílejí se tak na vzniku a progresi karcinomu prostaty, benigní hyperplasii prostaty nebo karcinomu prsu, což jsou androgen- nebo estrogen-dependentní onemocnění. (Matsunaga et al. 2012)

Spolu s AKR1B10 se uplatňují v redukci nitrosaminu obsaženého v tabákovém kouři na produkt, který je méně toxický a jeho eliminace z organismu je jednodušší. Mezi jejich substráty patří i různá xenobiotika, například DAUN, doxorubicin, oracin, naltrexon nebo dolasteron. Jsou známé i jako dihydrodioldehydrogenasy, mají totiž schopnost katalyzovat NADP^+ vázanou oxidaci trans-dihydrodiolů aromatických uhlovodíků na odpovídající katecholy. (Barski, 2008)

Katalýza zprostředkována enzymy AKR1C může být regulována změnou poměru NADH/NADPH, tím dojde ke změně preference enzymů. AKR1C1, 1C2 a 1C3 jsou spolu s AKR1B1 a 1B10 jsou pravděpodobně zodpovědné za získávání rezistence nádorových buněk vůči chemoterapeutikům, zejména ANT a cisplatině. Studie prokázaly, že AKR1C byly up-regulovány u karcinomu vaječníku, rakoviny děložního čípku. (Barski, 2008, Matsunaga et al. 2012)

AKR1C3 je známý také jako PGF syntasa. Katalyzuje přeměnu prostaglandinů H_2 a D_2 na $PGF2\alpha$ a 9α . Má také aktivitu 17β -hydroxysteroiddehydrogenasy typu 1 a katalyzuje vzájemnou přeměnu mezi estronem a estradiolem nebo androstanedionem a testosteronem. V periferních tkáních produkuje silné androgeny, které aktivují androgenní receptor nebo působí jako substráty pro aromatasu. Podílí se na produkci androgenů u karcinomu prostaty a syndromu polycystických ovarií, a aromatasových substrátů u karcinomu prsu. V současné době se zkoumá fyziologická role těchto enzymů, jejich inhibitory, a způsoby regulace genů AKR1C. Jedním z prokázaných inhibitorů AKR1C3 je kyselina retinová. (Barski, 2008, Penning 2019)

Bylo objeveno několik SNP v nekódujících i kódujících oblastech genu AKR1C3. Proběhly studie hledající existenci spojení mezi SNP a nádorovými onemocněními, ale nebylo prokázáno, že by je způsobovaly všechny SNP. (Penning 2019)

2.3.2. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

SDR (short-chain dehydrogenases/reductases) neboli dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem je jedna z největších nadrodin enzymů třídy oxido-reduktas, která se stále rozrůstá o nové členy. Strukturně jsou si podobné jen z 20 – 30 %. Sdílejí spolu charakteristické rysy, jako je vazebné místo pro kofaktor nebo katalytickou tetradu, většinou s Asn-Ser-Tyr-Lys. Nejobvyklejší strukturou je α/β skládaný vzor s centrálním beta listem, který je z obou stran lemovaný 2-3 α -helixy. To se nazývá Rosmannův skládaný motiv. Kofaktorem je pro ně NAD(P)(H) vázající se na N-terminální konec enzymu. Obsahují také C-terminální část, která určuje substrátovou specifitu. Jsou přítomny u všech forem živých organismů. Vyskytují se v cytosolu a endoplasmatickém retikulu. Základním mechanismem účinku je přenos hydridu a protonu zahrnující nikotinamid a aktivní místo tyrozinového zbytku. Studie prokazují podobnost SDR s bakteriálními haloalkoholdehalogenasami. Ty sice postrádají vazbu na kofaktor, ale mají architekturu aktivního místa. (Kavanagh et al. 2008)

V lidském genomu bylo prozatím objeveno 82 proteinů SDR. Nejčastěji se řadí do třídy označované „*Classical (C)*“ a „*Extended (E)*“. Měně časté jsou „*Intermediate (I)*“, „*Divergent (D)*“, „*Complex (X)*“ a „*Atypical (A)*“. Ostatní se řadí do třídy „*Unknown (U)*“ V organismu plní zejména fyziologickou funkci, ale účastní se i metabolismu xenobiotik. (Bray et al. 2009, Kavanagh et al. 2008, Westermann et al. 2022)

Mezi jejich substráty patří lipidy, aminokyseliny, sacharidy a hormony. Z xenobiotik jsou to například o-chinony, menadion, doxorubicin, daunorubicin, haloperidol, warfarin a další. Hrají důležitou roli v NAD(P)(H) redoxním sensorovém systému. Ten se uplatňuje v kontrole metabolických cest, transkripci a signalizaci. (Bray et al. 2009, Kavanagh et al. 2008)

Stejně jako u AKR, i zde byly objeveny polymorfismy, tvořící variabilitu v rychlosti metabolismu ANT, čímž mohou působit problémy u pacientů s nádorovým onemocněním. (Lubieniecka et al. 2012)

CBR1

Karbonylreduktasa 1, označovaná také jako SDR21C1 je cytoplasmatickým monomerním enzymem patřícím do nadrodiny SDR. Byla prokázána u mnoha druhů organismů, od rostlin, přes bakterie, kvasinky, hmyz, ryby, až po různé druhy savců, například králík, morče, myš, pes, prase skot, kuře a samozřejmě člověk. Je exprimována v různých tkáních – játra, srdce, ledviny, mozek, varlata, vaječník, nadledvinky. (Hartmanová et al. 2013)

Je velmi důležitým enzymem katalyzující NADPH-dependentní redukci ketonů a chinonů, a to jak eobiotických, tak xenobiotických. Mezi xenobiotické substráty patří chinony (prekurzor vitamínu K), ANT, aromatické aldehydy nebo například karcinogenní nitrosaminy z tabákového kouře. Je obecně známo, že CBR1 patří mezi enzymy metabolizující DAUN na DAUN-ol a analogicky doxorubicin, čímž snižuje účinnost protinádorové léčby. Z eobiotických substrátů jsou to především prostaglandiny, steroidy a další alifatické aldehydy a ketony. (Hartmanová et al. 2013)

Nedávno bylo zjištěno, že CBR1 katalyzuje také S-nitrosothiol a S-nitrosoglutathion, který je důležitý pro dynamickou regulaci S-nitrosylace proteinů, kovalentní vazbu NO skupiny na reaktivní proteinové cysteiny a posttranslační modifikaci, která zajišťuje část signalizace NO. Stejnou reakci katalyzuje i alkoholdehydrogenasa třídy III, která redukuje skupinu NO tak, že nedojde k uvolnění NO, ale k ukončení signalizace. Ovšem CBR1 má nižší katalytickou účinnost. Vzhledem k tomu, že CBR1 je ze 72 % identická s CBR3, testovalo se, zda má CBR3 také schopnost redukce NO skupiny a tím i S-nitrosoglutathionu. Bylo zjištěno, že i přes vysokou podobnost CBR3 tuto schopnost postrádá. (Staab et al. 2011)

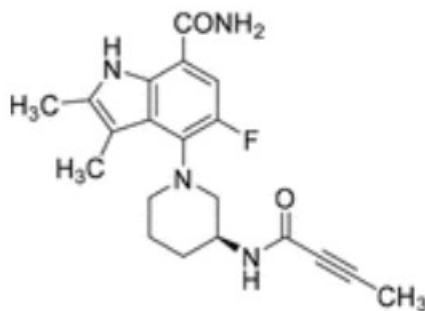
Ukázalo se, že CBR1 existuje nejméně ve třech molekulárních variantách, které se mezi sebou liší molekulovou hmotností a izoelektrickým bodem, z čehož vyplývá, že bude více druhů posttranslačních modifikací. Strukturně je CBR1 monomer, který se v lidském organismu nachází ve většině tkání. Největší koncentrace se nachází v hepatocytech, placentě a CNS. To naznačuje protektivní roli vůči toxickým karbonylům. (Staab et al. 2011)

Má také ochrannou úlohu v oxidačním stresu. Mechanismem účinku je inaktivace aldehydu 4-oxo-2-nonenalu, což je produkt peroxidace lipidů vznikající během oxidačního stresu. Zjistilo se, že SNP nalezené u CBR1 ovlivňují metabolismus karbonylových substrátů. Enzym je také spojen s metabolismem léků, detoxikací, lékovou rezistencí, mutagenezí, karcinogenezí a apoptózou. Proto je CBR1 předmětem mnoha studií, hledají se inhibitory, díky nimž by mohlo dojít ke snížení rezistence buněk vůči léčivům. Nejsou také ještě zcela pochopeny mechanismy fungování enzymu. (Hartmanová et al. 2013, Staab et al. 2011)

Zjistilo se, že CBR1 je exprimovaná u řady nádorových onemocnění, ale nechová se u všech nádorů stejně. Zvýšená exprese enzymu u hepatocelulárního nádoru podporuje jeho progresi, naopak snížená exprese koreluje s metastázami spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. Z toho je patrné, že ve vývoji rakoviny hraje kontroverzní roli. Studovala se také role CBR1 v rozvoji rakoviny slinivky. Zjistilo se, že potlačením genetické exprese CBR1 došlo k potlačení proliferace rakovinných buněk. Dále byla zjištěna inhibice enzymu pomocí chrysinu, což mělo za následek zvýšení produkce ROS, degradace ferritinu a zvýšení hladin intracelulárního železa, který se účastní ferroptózy v buňkách karcinomu slinivky. Díky tomu se CBR1 ukázal jako potenciální cíl léčby tohoto nádorového onemocnění. (Zhou et al. 2021)

2.4. Branebrutinib

Branebrutinib (BMS-986195) (BRA) je vysoce selektivní kovalentní a ireverzibilní inhibitor Brutonovy tyrosinkinasy (BTK) spolu s například acalabrutinibem, inbrutinibem, imatinibem, disatinibem a dalšími. Je to malá molekula, která se podává perorálně. (Catlett et al. 2020)



Obrázek 5 - struktura branebrutinibu (Zheng et al. 2019)

BTK je enzym patřící do rodiny Tec nереceptorových tyrosinkinaz. Produkují ji hematopoetické buňky a její množství regulují T-buňky a plasmatické buňky. Je nezbytná pro na antigenu závislou signalizaci a proliferaci B-buněk. BTK také hraje zásadní roli v aktivaci nízkoafinitních Fcγ (FcγR) receptorů v monocytárních buňkách, vysokoafinitních imunoglobulinových E receptorů (FcεRI) v granulocytech a RANK receptorů na osteoklastech. (Burke et al. 2017, Watterson et al. 2019)

BRA působí tak, že kovalentně modifikuje cysteinový zbytek v aktivním místě enzymu. Inaktivuje nejen BTK, ale silně inhibuje i produkci interleukinu 6, expresi CD86, proliferaci B-buněk a produkci TNF-α. Je testován pro léčbu imunitně podmíněných a zánětlivých onemocnění a B-buněčných malignit, konkrétně například revmatoidní artritidy, lupusu a dalších onemocnění. V současné době je ve 2. fázi klinických studií pro léčbu Sjögrenova syndromu. (Burke et al. 2017, Watterson et al. 2019, Catlett et al. 2020)

Chemická syntéza BRA je však problematická kvůli vysoce reaktivní alkylamidové skupině, která souvisí s tvorbou nečistot, a stericky přetížené vazbě C-N spojující funkcionalizovaná indolová a piperidinová jádra. Díky tomu, že BRA má v medicíně potenciál, proběhlo několik studií, které se pokoušely tyto problémy vyřešit a najít cestu, jak syntetizovat BRA v dostatečné kvalitě. Z počátku výroba trvala příliš dlouhou dobu, později se našla optimální cesta. (Stevens et al. 2022)

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo *in vitro* otestovat, zda má BRA inhibiční účinky na vybrané karbonyl redukující enzymy z nadrodin AKR a SDR, konkrétně AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3; a CBR1, které se účastní metabolismu DAUN.

Jednotlivé dílčí kroky zahrnovaly:

1. Základní screening inhibiční aktivity BRA k vybraným reduktasám (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C1 a CBR1), které vykazují největší metabolickou aktivitu vůči specifickému substrátu DAUN;
2. Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} pro nejvíce inhibované enzymy;
3. Určení inhibiční konstanty K_i a typu inhibice pro nejvíce inhibované enzymy;
4. V případě nekompetitivní inhibice stanovení, zda se inhibitor na enzym váže pevně.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

Branebrutinib (MedChemExpress, USA)

Daunorubicin (Toronto Research Chemicals, Kanada)

Destilovaná voda (Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

Dimetylsufoxid (DMSO) (Merck, Německo)

Glukosa-6-fosfát (Roche Diagnostics, Německo)

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Roche Diagnostics, Německo)

Metanol (Penta, Kypr)

MgCl₂ (0,1M; Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

NADP (Roche Diagnostics, Německo)

Na-fosfátový pufr (0,1M; pH 7,4; Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

Enzymy AKR1C3, 1B1, 1B10, 1A1, CBR1 (Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

4.1.2. Pomůcky a přístroje

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf, Německo)

Eppendorf zkumavky (0,5; 1,5; 2 ml) (Eppendorf, Německo)

Filtr (0,2µm PTFE Membrane; Whatman, Velká Británie)

Injekční stříkačka + jehla (1 ml; Terumo, Japonsko)

Inkubátory (Mixing Block, Bioer; Thermomixer, Eppendorf)

Inserty (400 µl; Agilent, USA)

Navazovací lžičky

Pipety + špičky (0,5 – 1 000 µl) (Biohit, Finsko)

Popisovací fix

Rukavice

Stojánek na zkumavky

Třepačka Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)

UHPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity. USA)

- binární pumpa 1290 Bin Pump VL
- autosampler 1290 Sampler
- termostatovaná kolona 1290 TCC
- fluorescenční detektor 1260 FLD
- detektor s diodovým polem 1260 DAD

UHPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity II, USA)

- pumpa 1260 Flexible Pump
- autosampler 1260 Vialsampler
- fluorescenční detektor 1260 FLD
- detektor s diodovým polem G1315B
- UV-Vis detektor 1260 VWD

Ultrazvuková lázeň (Ultrasonic cleaner 120T, Anonkia Ultrasonic, Čína)

Vialky + víčka + septa (Agilent, USA)

4.2. Metodika práce

4.2.1. Základní screening

Nejprve se u vybraných enzymů prováděl screening základního inhibičního potenciálu testovaného inhibitoru. Pro každý enzym bylo celkem 16 reakcí. Neinhibovaná reakce (NI), kontrola (DMSO), inhibitor o finální koncentraci 10 μM (INH 10) a inhibitor o finální koncentraci 50 μM (INH 50), všechny tyto reakce byly vždy v tripletu. Dále byly v dubletu provedeny kontroly bez enzymu (bE) a kontroly bez substrátu (bS).

Reakční směsi byly připraveny podle následující tabulky:

Tabulka 1 – složení reakční směsi inkubace

	NaPB (μl)	inhibitor (μl)	RS (μl)	enzym (μl)	substrát (μl)
NI	60	0	20	10	10
DMSO	58	2 (DMSO)	20	10	10
INH 10	58	2	20	10	10
INH 50	58	2	20	10	10
bE	70	0	20	0	10
bS	60	0	20	10	10 (vody)

Inhibitor

Jako inhibitor byl ve všech reakcích použit testovaný BRA. Zásobní roztok o koncentraci 50 mM byl připraven rozpuštěním 5 mg inhibitoru v 267 μl DMSO a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pracovní roztoky o koncentraci 10 mM byly ředěny ze zásobního roztoku DMSO a uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, případně při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu nepřesahující 1 měsíc. Pro každý experiment se BRA nadále ředil na potřebné koncentrace.

Množství inhibitoru a DMSO bylo vypočítáno dle následujícího vzorečku:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

kde c_1 = koncentrace zásobního roztoku (10 000 μM); V_1 = objem zásobního roztoku, který počítáme (μM); c_2 = koncentrace pracovního roztoku (padesátinásobek koncentrace inhibitoru potřebná na reakci, μM); V_2 = požadovaný objem pracovního roztoku (μl).

Regenerační systém (RS)

Na 1 reakci se odvážilo 0,2 mg NADP a 0,6 mg glukosy-6-fosfátu, které byly následně rozpuštěny v 10 μl NaPB a 10 μl MgCl_2 . Těsně před použitím bylo přidáno 0,5 μl glukosa-6-fosfátdehydrogenasy. Množství reagensů bylo vždy přepočítáno na daný počet reakcí. Na každý experiment se připravoval čerstvý RS.

Enzymy

Enzymy byly připraveny na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Byly rozpuštěny v draselno-fosfátovém pufru a 20% glycerolu a uchovávány v mrazáku při $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Liší se jednak koncentrace zásobních roztoků (ZR) a jednak množství potřebné na reakci.

Tabulka 2 – parametry testovaných enzymů

	množství na reakci (μg)	koncentrace ZR (mg/ml)
AKR1A1	1	0,494
CBR1	0,1	1,47
AKR1C3	1,5	1,5
AKR1B10	5	1,5
AKR1B1	5	1,5

Enzym byl naředěn na požadovanou koncentraci těsně před přidáním do reakcí smísením vypočítaného množství enzymu a NaBP. Počítalo se podle vzorečku:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

kde c_1 = koncentrace zásobního roztoku (mg/ml); V_1 = objem zásobního roztoku, který počítáme (μl); c_2 = koncentrace enzymu v reakční směsi (10 \times méně než výsledné množství na reakci, mg/ml); V_2 = celkový objem reakční směsi (počet reakcí vynásoben 10, μl).

Substrát

Jako specifický substrát byl použit DAUN. Zásobní roztok o koncentraci 5 mM byl připraven tak, že se na analytických vahách odvážil DAUN a rozpustil se v ultračisté vodě. Poměry se počítají podle vzorce:

$$m = M \cdot c \cdot V$$

kde M = molární hmotnost DAUN (563,98 g/mol); c = koncentrace zásobního roztoku (5 mM); V = požadovaný objem

Zásobní roztok byl poté ponechán 5 min v ultrazvuku, aby došlo k úplnému rozpuštění, a uchován v ledničce.

Vlastní inkubace

Do zkumavek se podle tabulky pipetovaly NaPB, inhibitor, regenerační systém a enzym. Pomocí vortexu se reagenty promíchaly a na pár sekund daly centrifugovat, aby nám neulpívaly části reakční směsi na stěnách a na víčku. Díky tomu nám reakce probíhala v celém objemu. Následovala preinkubace při 37°C po dobu 10 min. Během této doby byl substrát dán do ultrazvuku na 5 min. Po uplynutí preinkubace se začaly reakce startovat přidáním substrátu. Zkumavka se pokaždé promíchala na vortexu a vrátila do inkubátoru. Inkubace probíhala 30 min. Po uplynutí této doby se reakce stopovala přidáním 300 μ l MetOH a zkumavka se dala do ledu. Následovala precipitace po dobu 30 min při -20°C. Po vyjmutí z mrazáku se zkumavky centrifugovaly 10 min při 9050 \times g. Nakonec se obsah přefiltroval pomocí injekční stříkačky a filtru do vialek s inzertem a následovala UHPLC analýza.

UHPLC

Vzorky byly proměřeny pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie. Byla použita kolona ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2,1 \times 50 mm, 1,8 μ m), přičemž nástřik vzorku na kolonu činil 5 μ l. Stacionární fázi tedy byla C18 a mobilní fázi 0,1% HCOOH:ACN v poměru 74:26 (v/v). Průtok mobilní fáze se nastavil na 0,7 ml/min a analýza jednoho vzorku trvala 5 min. Pro detekci byl využit fluorescenční detektor, kdy každý vzorek byl proměřen při dvou vlnových délkách: excitační 480 nm a emisní 560 nm. Pík DAUN-ol byl určen na základě porovnání retenčního času se známým standardem. Kvantitativně byly vzorky vyhodnoceny metodou kalibrační křivky s rozsahem 0,25 – 50 μ g/ml a s linearitou vyšší než 0,999.

4.2.2. Stanovení inhibiční koncentrace IC₅₀

Pro enzymy, u kterých docházelo k významné inhibici BRA se stanovila poloviční inhibiční koncentrace (IC₅₀). To je koncentrace inhibitoru potřebná k tomu, aby se aktivita enzymu snížila právě na polovinu.

Inkubace probíhaly stejným způsobem jako základní screening. Lišil se počet reakcí. Zde nebyly třeba neinhibované reakce a kontroly bez substrátu a enzymu. Stačily pouze DMSO kontrola a reakce o různých koncentracích inhibitoru, vše v tripletu.

Pro AKR1C3 byly koncentrace BRA 0,1; 0,25; 0,5; 1; 3; 10; 50 a 100 μM. Pro AKR1B10 se stanovily koncentrace inhibitoru 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 50; 75 a 100 μM.

4.2.3. Stanovení typu inhibice

U obou enzymů následovalo určení typu inhibice a výpočet inhibiční konstanty (K_i). Byly testovány 4 koncentrace inhibitoru včetně nulové (DMSO kontrola). Pro AKR1C3 to byly koncentrace 1; 5 a 10 μM. Pro AKR1B10 to byly koncentrace 2,5; 7,5 a 15 μM.

Test probíhal při 6 různých koncentracích substrátu – 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM (zásobní roztok substrátu byl kvůli ředění přidavkem do reakce připraven 10× koncentrovanější). Každá koncentrace vznikla naředěním roztoku o vyšší koncentraci destilovanou vodou. Zásobní roztok o koncentraci 2000 μM byl připraven rozpuštěním 15,70 g substrátu 1392 μl vody. Množství substrátu bylo vypočítáno podle vzorce:

$$m = M \cdot c \cdot V$$

kde M = molární hmotnost DAUN (563,98 g/mol); c = požadovaná koncentrace roztoku (10 × 2000 = 20 000 μM); V = požadovaný objem (na výrobu všech koncentrací, v množství na 4 experimenty => 1400 μM)

Byla testována každá koncentrace substrátu s každou koncentrací inhibitoru. Opět se pracovalo v tripletu a celkový počet reakcí byl tedy 72. Vlastní inkubace byla stejná jako u screeningu a IC₅₀.

4.2.4. Určení typu vazby

U nekompetitivního typu inhibice následuje posouzení, zda se inhibitor na enzym váže reverzibilně či nikoliv. Bylo testováno celkem 9 koncentrací inhibitoru, včetně DMSO kontroly, a 4 koncentrace enzymu. Opět byla proměřena každá koncentrace enzymu s každou koncentrací inhibitoru, vždy v tripletu, celkem tedy 108 reakcí.

Koncentrace AKR1C3 byly 0,5; 1,5; 3 a 5 μg /reakci. Koncentrace BRA byly 0,1; 0,25; 0,5; 1; 3; 10; 50 a 100 μM .

AKR1B10 byl použit v koncentracích 1; 3; 5 a 8 μg /reakci a inhibitor 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 50 a 100 μM .

4.2.5. Vyhodnocení výsledků

Výsledky byly pro všechny experimenty vyhodnocovány v programu GraphPad Prism (verze 9.3.1). Vlastnímu vyhodnocení předcházelo vypočítání specifické aktivity podle vzorečku:

$$a = \frac{m \cdot K \cdot 1000}{t \cdot c \cdot M_r}$$

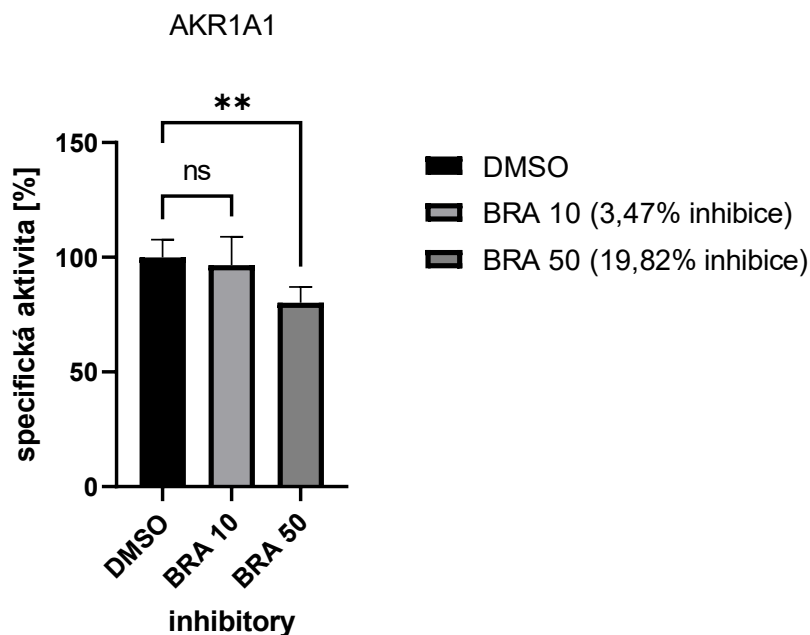
kde a = specifická aktivita (nmol/mg/min), m = hmotnost DAUN-ol (ng), K = koeficient zředění (celé směsi bylo 400 μl . Nástřik na kolonu byl 5 μl , to znamená 1/80 celkového objemu; $K = 80$), t = čas inkubace (30 min), c = koncentrace enzymu v reakci (μg), M_r = molární hmotnost DAUN-ol (529,54 g/mol). 1000 \times se násobí kvůli převodu jednotek.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

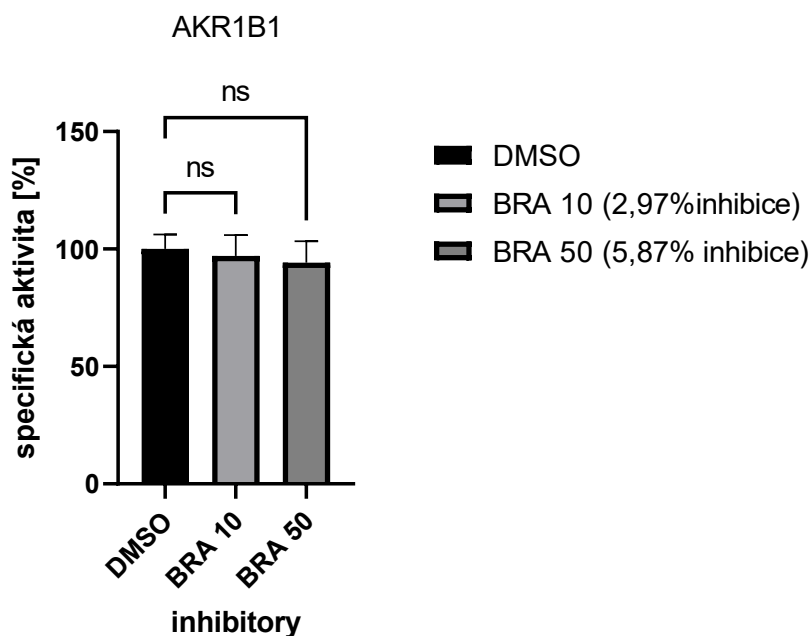
5.1. Základní screening

Nejprve se provedl screening enzymů. Pro každý enzym byla zkoumána jeho specifická aktivita k DAUN. Nejvyšší specifickou aktivitu vykazovalo CBR1 s hodnotami v průměru 3 809,51 nmol/mg/min. Dále specifická aktivita klesala v pořadí AKR1A1 (364,57 nmol/mg/min), AKR1C3 (168,78 nmol/mg/min), AKR1B10 (72,31 nmol/mg/min) a nejmenších hodnot dosahovala u AKR1B1 s průměrnou hodnotou 14,68 nmol/mg/min.

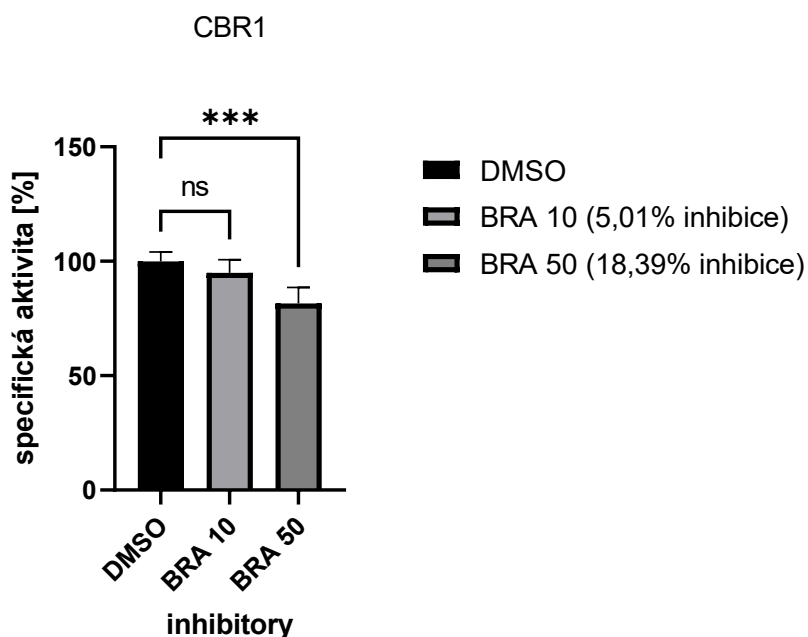
Dále se u všech enzymů zjišťoval inhibiční potenciál BRA. Enzymy AKR1A1, AKR1B1 a CBR1 vykazovaly po inkubaci s inhibitorem pouze nepatrné snížení specifické aktivity, nebyla tedy pozorována téměř žádná inhibice. Z obrázků 6, 7 a 8 je patrné, že na tyto enzymy neměl BRA významný vliv. Významnost rozdílu mezi neinhibovanou a inhibovanou reakcí je znázorněna nad grafem. Ns nad grafem znamená nesignifikantní rozdíl, hvězdičky naopak značí rozdíl významný. S počtem hvězdiček stoupá i významnost rozdílu. Specifická aktivita enzymů dosahuje téměř stejných hodnot jako DMSO kontrola, jejich inhibice byla malá, proto jsme s nimi dále nepokračovali v experimentu. U CBR1 je sice signifikantní pokles specifické aktivity u BRA 50 a inhibice dosahuje 18,39 %, ale IC_{50} by dosahovala hodnoty vyšší než 100 μ M. Pacient by musel dostávat vysoké koncentrace inhibitoru, což je z klinického hlediska irelevantní.



Obrázek 6 - závislost průměrné specifické aktivity na koncentraci inhibitoru (průměr dvou nezávislých měření v triplikátu). Ve vzorku s DMSO nebyl přítomen inhibitor a sloužil jako vztahná hodnota. BRA 10 a 50 je BRA o finální koncentraci 10 a 50 μM . Pro posouzení statistické významnosti byly použité statistické testy Anova s $p = 0,005$; Brown-Forsythův test s $p = 0,2231$ a Bartlettův test s $p = 0,3799$.

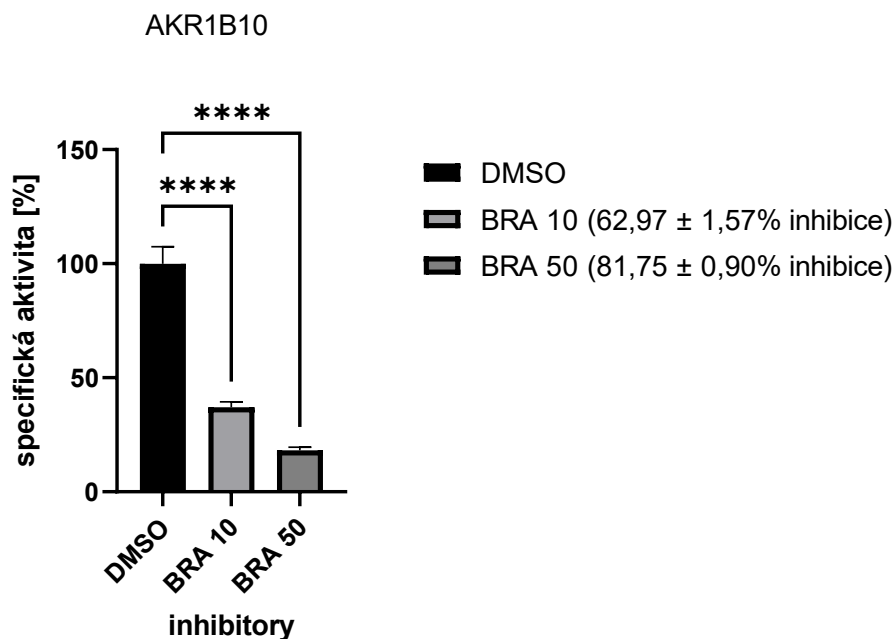


Obrázek 7 - závislost průměrné specifické aktivity na koncentraci inhibitoru (průměr dvou nezávislých měření v triplikátu). Ve vzorku s DMSO nebyl přítomen inhibitor a sloužil jako vztahná hodnota. BRA 10 a 50 je BRA o finální koncentraci 10 a 50 μM . Pro posouzení statistické významnosti byly použité statistické testy Anova s $p = 0,4818$; Brown-Forsythův test s $p = 0,4737$ a Bartlettův test s $p = 0,6628$.

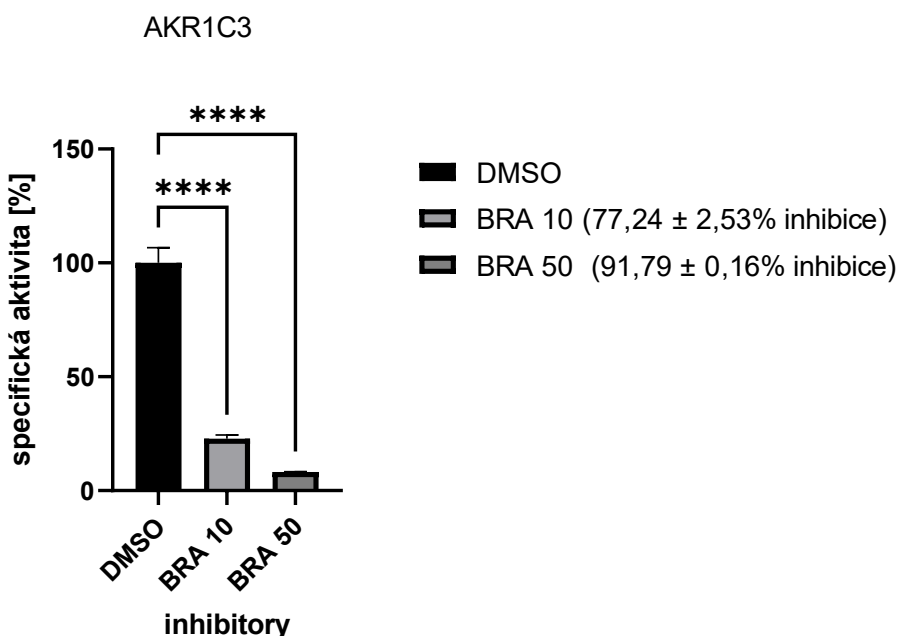


Obrázek 8 – závislost průměrné specifické aktivity na koncentraci inhibitoru (průměr dvou nezávislých měření v triplikátu). Ve vzorku s DMSO nebyl přítomen inhibitor a sloužil jako vzažná hodnota. BRA 10 a 50 je branebrutinib o finální koncentraci 10 a 50 μM . Pro posouzení statistické významnosti byly použité statistické testy Anova s $p = 0,005$; Brown-Forsythův test s $p = 0,2231$ a Bartlettův test s $p = 0,3799$.

Jiná situace nastala u AKR1B10 a AKR1C3. Na obrázcích 9 a 10 je zřetelně vidět, že po inkubaci s inhibitorem specifická aktivita obou enzymů znatelně klesla. Průměrná inhibice AKR1B10 BRA o koncentraci 10 μM byla $62,97 \pm 1,57$ % a pro 50 μM BRA $81,75 \pm 0,90$ %. AKR1C3 byl inhibován 10 μM BRA ze $77,24 \pm 2,53$ % a 50 μM BRA z $91,79 \pm 0,16$ %.



Obrázek 9 – závislost průměrné specifické aktivity na koncentraci inhibitoru. Ve vzorku s DMSO nebyl přítomen inhibitor a sloužil jako vztažná hodnota. BRA 10 a 50 je branebrutinib o finální koncentraci 10 a 50 μ M. Pro posouzení statistické významnosti byly z důvodu rozdílných rozptylů použity Brown-Forsythe Anova test s $p < 0,0001$ a Welch's Anova s $p < 0,0001$.



Obrázek 10 – závislost průměrné specifické aktivity na koncentraci inhibitoru. Ve vzorku s DMSO nebyl přítomen inhibitor a sloužil jako vztažná hodnota. BRA 10 a 50 je branebrutinib o finální koncentraci 10 a 50 μ M. Pro posouzení statistické významnosti byly z důvodu rozdílných rozptylů použity Brown-Forsythe Anova test s $p < 0,0001$ a Welch's Anova s $p < 0,0001$.

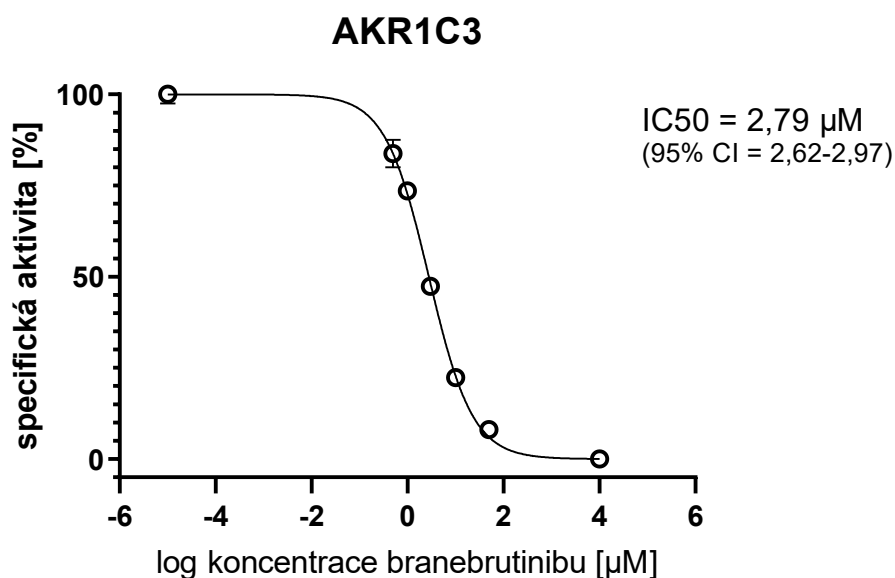
U obou enzymů došlo k významnému poklesu specifické aktivity. BRA tedy AKR1B10 a AKR1C3 inhibuje významně, proto se s oběma enzymy pokračovalo v dalších experimentech. Inhibice AKR1C3 byla prokázána i v jiných studiích pomocí odlišných inhibitorů. Naopak inhibice AKR1B10 byla překvapující, a BRA má díky tomu větší potenciál v klinickém použití.

Inhibice vybraných reduktas pomocí BRA ještě testována nebyla, ale byly testované jiné inhibitory. Například belinostat inhiboval AKR1C3 z 89,2 %. Inhibice AKR1B10 byla nevýznamná (Slámová 2021). BRA s inhibicí 97,79 % pro AKR1C3 a 81,75 % pro AKR1B10 má větší inhibiční potenciál. Dále byly testovány entrektinib (49,99% inhibice AKR1C3 a 61,52% inhibice AKR1B10), spanisertib (31,46% inhibice AKR1C3 a 34,54% inhibice AKR1B10) a teponitib (70,57% inhibice AKR1C3 a 30,24 % inhibice AKR1B10 (Krtilová 2020)). Tyto inhibitory měly opět nižší inhibiční potenciál než BRA. Zajímavá u nich byla více než 50 % inhibice AKR1B1, kterou BRA nevykazoval. Také olaparib inhiboval AKR1C3 z 91,2 % (Lekešová 2021), což je téměř srovnatelné s BRA, ale inhibice AKR1B10 dosahovala pouze 5 %. Srovnatelnou inhibici AKR1C3 vykazoval i evobrutinib (93,56 %), ale AKR1B10 inhiboval jen z 51,30 %. (Zenkerová 2021). Vysoké inhibice AKR1C3 dosahoval i midostaurin (93,19 %), ale inhibice AKR1B10 byla zanedbatelná (Morrel et al. 2020). Z 96 % inhiboval AKR1C3 dinaciclib, který ale jiné AKR neinhiboval (Novotná et al. 2018). Dalšími studovanými brutiniby, neboli inhibitory Brutonovy tyrosinkinasy byly acalabrutinib, který inhiboval AKR1C3 z 96,28 % a ibrutinib s 96,41% inhibicí stejného enzymu. Ibrutinib navíc stejně jako BRA inhiboval AKR1B10 a to ze 74,97 % (Morrel et al. 2020). Inhibice obou enzymů ibrutinibem je nepatrně nižší než v případě BRA, oba jsou tedy téměř srovnatelné. Nicméně ze všech zmíněných inhibitorů má BRA (společně s ibrutinibem) nejvyšší inhibiční potenciál k AKR1C3 a inhibuje navíc i AKR1B10.

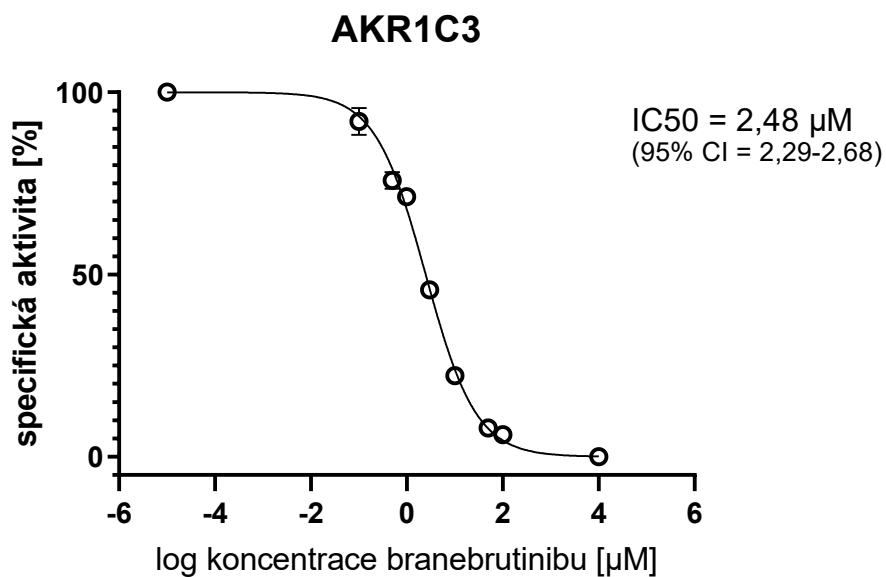
5.2. Stanovení inhibiční koncentrace IC₅₀

Dále bylo nutné stanovit IC₅₀ pro AKR1B10 a AKR1C3, tedy koncentraci inhibitoru potřebnou ke snížení aktivity enzymu na polovinu.

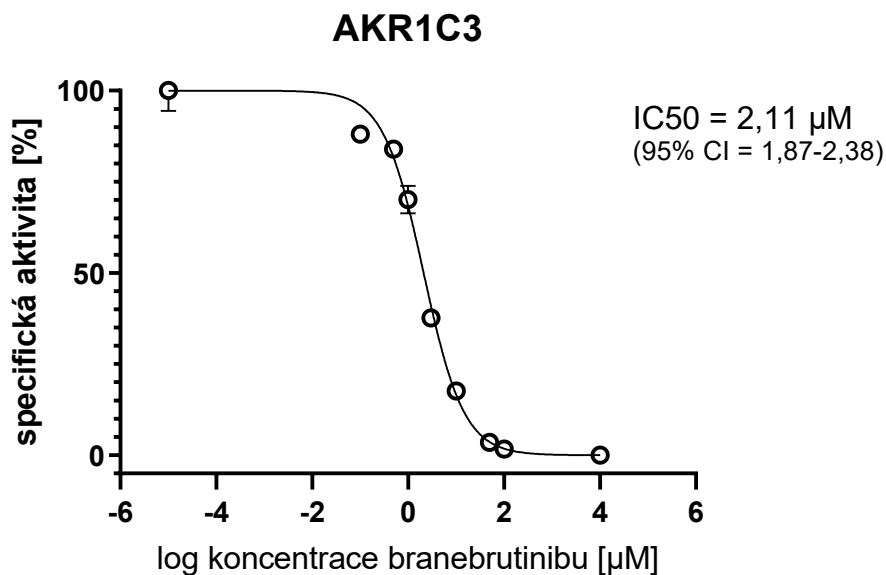
Pro AKR1C3 byly nejprve navrženy koncentrace inhibitoru 0; 0,5; 1; 10 a 50 μM. V dalších experimentech byl ještě přidán 0,1 a 0,25 μM inhibitor. Za pomoci grafického logaritmického znázornění kinetického průběhu reakce byla vypočítána IC₅₀ a interval, kde se s 95% pravděpodobností hodnota nachází (viz obrázky 11, 12, 13 a 14). IC₅₀ dosahovala hodnot 2,79; 2,48; 2,11 a 3,24 μM.



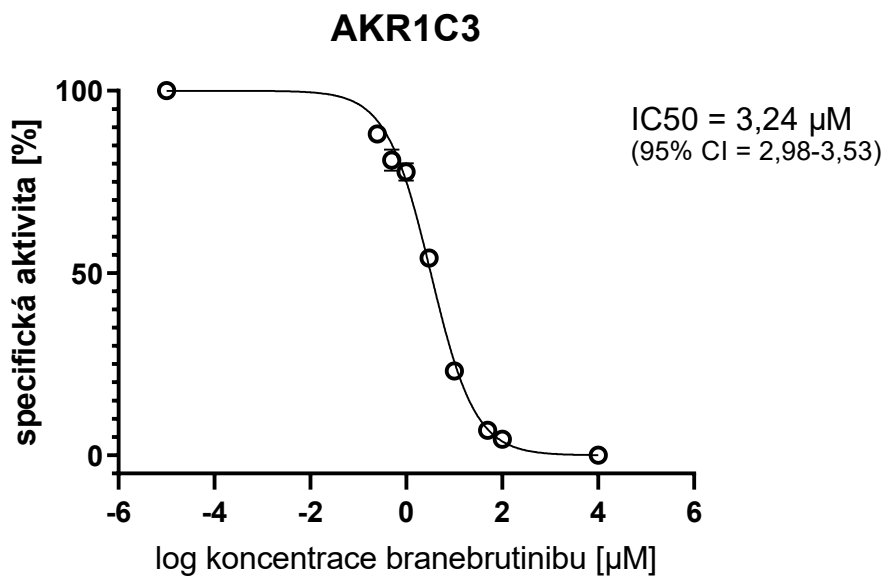
Obrázek 11 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA u prvního měření.
IC₅₀ = 2,79 μM.



Obrázek 12 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA u druhého měření.
 $IC_{50} = 2,48 \mu M$.

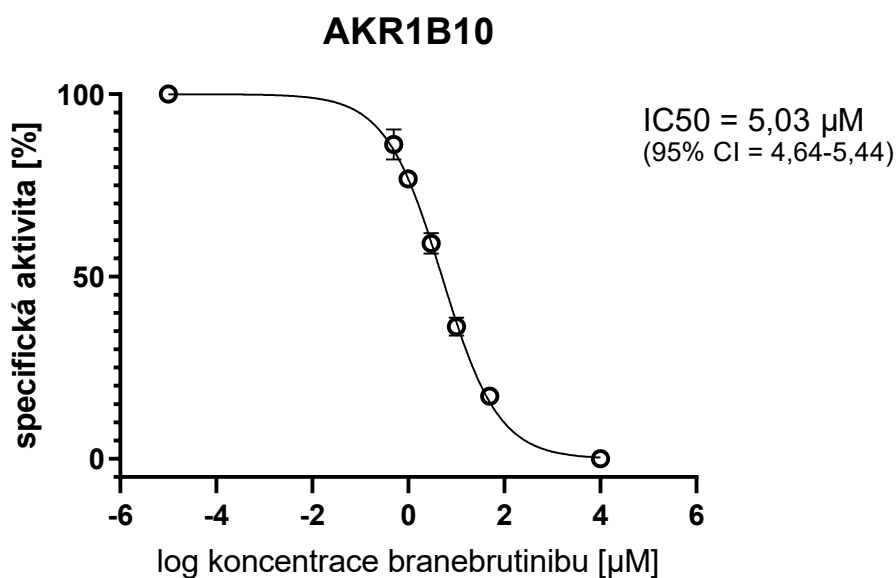


Obrázek 13 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA u třetího měření.
 $IC_{50} = 2,11 \mu M$.

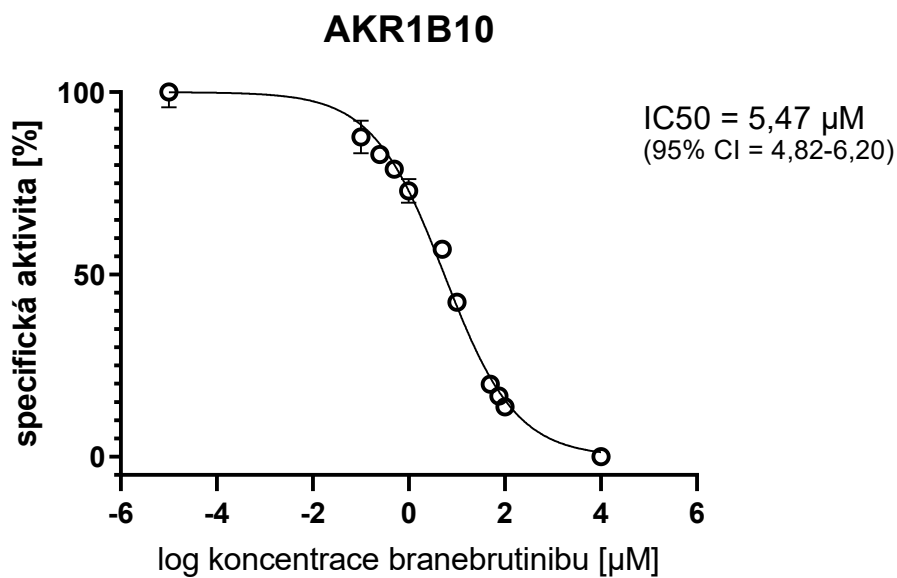


Obrázek 14 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA u čtvrtého měření. $IC_{50} = 3,24 \mu M$.

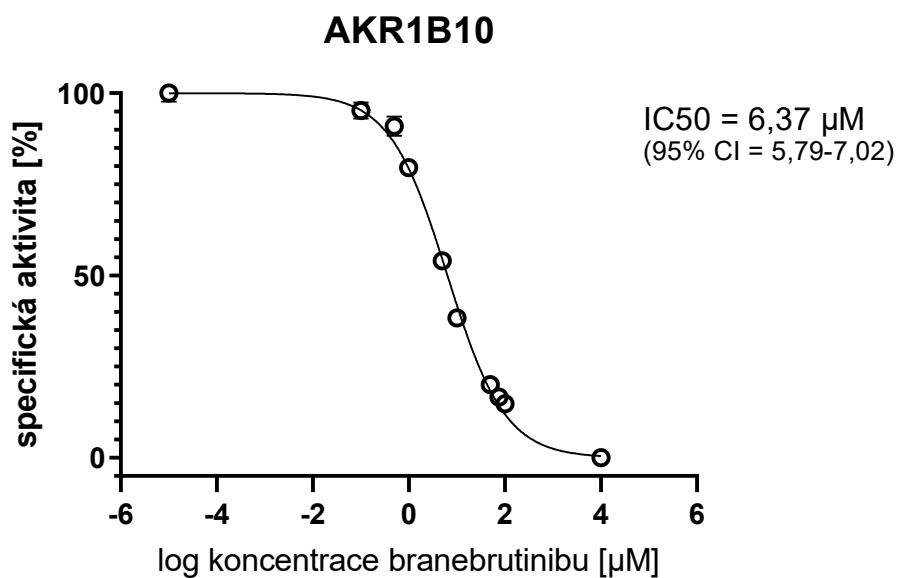
Počáteční koncentrace inhibitoru pro test IC_{50} u enzymu AKR1B10 byly 0; 0,5; 1; 3; 10 a 50 μM . Později byly hodnoty optimalizovány na 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 50; 75 a 100 μM . Vypočítaná IC_{50} se pohybovala v hodnotách 5,03; 5,47 a 6,37 μM (znázorněno na obrázcích 15, 16 a 17). Opět byl vždy stanoven interval spolehlivosti, kde se s 95% pravděpodobností nachází hodnota IC_{50} .



Obrázek 15 – závislost specifické aktivity AKR1B10 na log koncentraci BRA u prvního měření. $IC_{50} = 5,03 \mu M$.



Obrázek 16 – závislost specifické aktivity AKR1B10 na log koncentraci BRA u druhého měření.
IC₅₀ = 5,47 µM.



Obrázek 17 – závislost specifické aktivity AKR1B10 na log koncentraci BRA u třetího měření.
IC₅₀ = 6,37 µM.

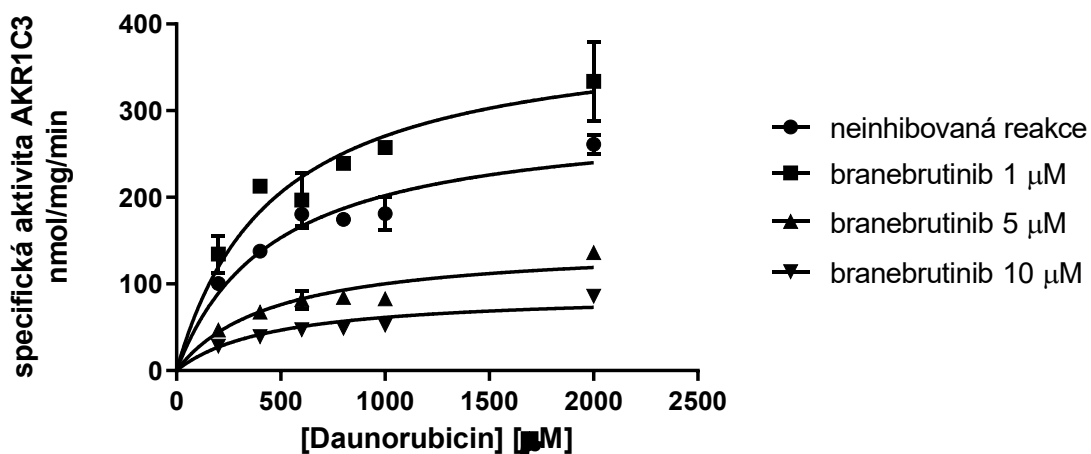
Hodnota IC_{50} se vždy odvíjí od míry inhibice, u nekompetitivní inhibice bývá podobná hodnotě K_i . Čím nižší je IC_{50} , tím lépe pro pacienta. Pro dosažení chtěného efektu je třeba méně léčiva a je tudíž menší riziko toxicity nebo vedlejších účinků. V případě BRA byly hodnoty IC_{50} pro oba enzymy nízké (5,62 μM pro AKR1B10 a 2,65 μM pro AKR1C3). U BRA byla navíc prokázána dobrá snášenlivost a nebyla zatím prokázána toxicita. Hodnota IC_{50} se testovala u všech výše popsaných inhibitorů AKR1C3. Pro belinostat byla 9,5 μM (Slámová 2021), pro tepotinib se pohybovala v rozmezí 8,45 - 12,20 μM (Krtílová 2020), což jsou hodnoty vyšší než u BRA. Naopak nižších hodnot IC_{50} dosáhl olaparib s 2,48 μM (Lekešová 2021), evobrutinib s 1,72 μM (Zenkerová 2021), midostaurin (Morell et al. 2020) dinaciclub (Novotná et al. 2018), acalabrutinib a ibrutinib (Morrel et al. 2020), které mají IC_{50} menší než 1 μM . Ibrutinib měl navíc inhibiční potenciál i k AKR1B10. I v tomto případě dosahovala IC_{50} hodnot nižších než 1 μM . To z něj činí lepší inhibitor AKR enzymů než BRA. V případě srovnání s ostatními inhibitory s IC_{50} menší než 1 μM , nabízí se otázka, zda by bylo v klinické praxi lepší používat inhibitor s nižší IC_{50} , ale s inhibiční aktivitou jen k jednomu enzymu, nebo s vyšší IC_{50} , zato s inhibicí enzymů dvou.

5.3. Stanovení typu inhibice

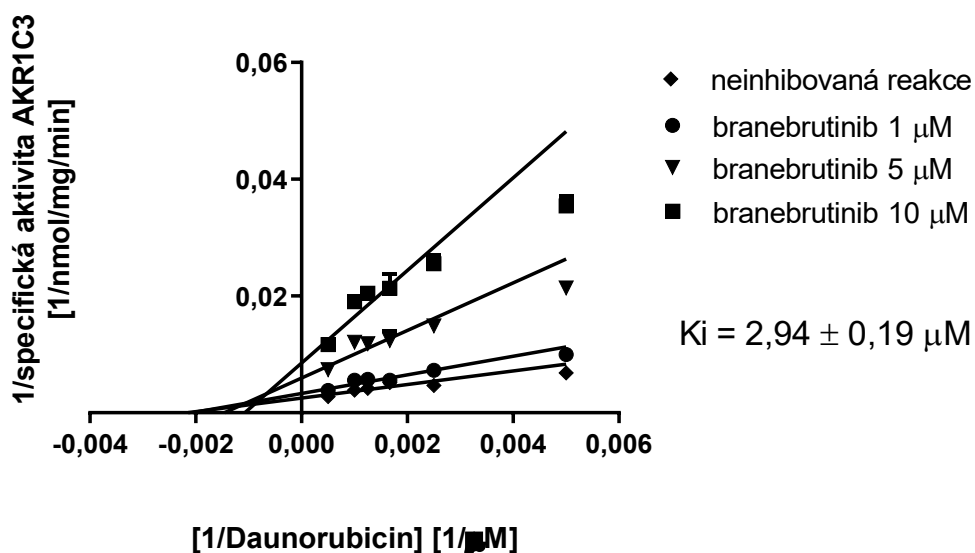
U obou enzymů bylo třeba stanovit typ inhibice, abychom zjistili, kterým mechanismem inhibitor na enzym působí. Zda soutěží se substrátem o vazebné místo, či nikoliv. Bylo stanoveno 6 koncentrací substrátu – 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM . Tyto koncentrace zůstaly stejné pro oba enzymy.

V případě AKR1C3 byl použit 0; 1; 5 a 10 μM BRA. Experiment byl opakován třikrát. Na obrázku 19 je zřetelné, že se přímky neprotínají na ose y, ale v blízkosti osy x. To znamená, že V_{max} se měnila, zatímco K_i zůstávala stejná. Saturační křivka (obrázek 18) znázorňovala totéž. To je charakteristické pro nekompetitivní typ inhibice. Ten je charakteristický tím, že inhibitor a substrát spolu nesoutěží o vazebné místo, protože inhibitor se váže na jinou část enzymu. Nekompetitivní inhibice je výhodnější, protože se nedá zvrátit zvýšením koncentrace substrátu, jak je tomu u kompetitivní.

Hodnota K_i udává afinitu inhibitoru k enzymu. Platí zde nepřímá úměra, to znamená, že čím nižší K_i , tím vyšší afinita. Pro dvojici BRA-AKR1C3 byla K_i stanovena ve 3 nezávislých experimentech a vyšla následovně: $3,49 \pm 0,17 \mu\text{M}$, dále $2,94 \pm 0,20 \mu\text{M}$ (znázorněno na obrázku 19) a $2,82 \pm 0,16 \mu\text{M}$.



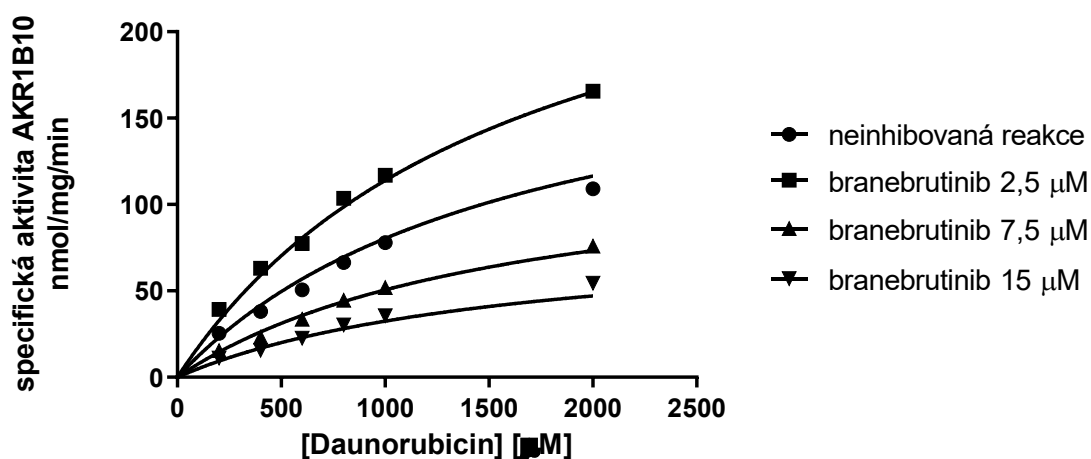
Obrázek 18 – Michaelis-Menten graf = závislost specifické aktivity AKR1C3 na různých koncentracích DAUN v reakcích s rozdílnou koncentrací BRA.



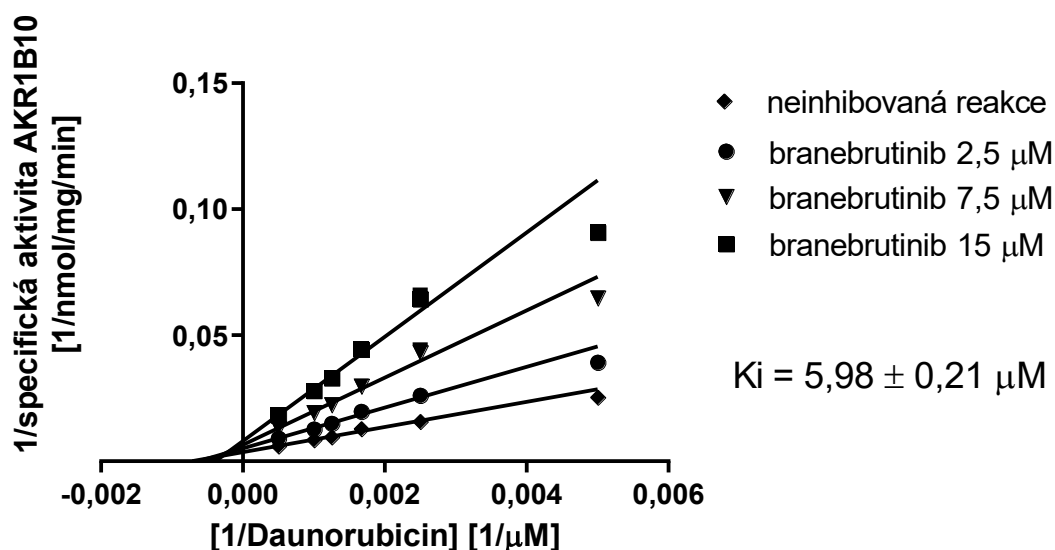
Obrázek 19 – Určení typu inhibice dle Lineweaver-Burka = dvojitě reciproký výnos závislosti specifické aktivity AKR1C3 na různých koncentracích DAUN v reakcích s rozdílnou koncentrací BRA

.V experimentech s AKR1B10 se pracovalo s BRA o koncentracích 0; 2,5; 7,5 a 15 μM . Koncentrace substrátu zůstaly stejné jako v předchozím případě. Stejně jako v případě AKR1C3 i AKR1B10 byla BRA inhibována nekompetitivně. Svědčila pro to jak saturační křivka (obrázek 20), tak graficky znázorněná Lineweaver-Burkova rovnice (obrázek 21). V obou bylo zřejmé, že V_{max} byla proměnlivá, zatímco K_i zůstávala neměnná.

Hodnota K_i pro dvojici BRA-AKR1B10 byla stanovena také ve 3 experimentech, přičemž její hodnoty byly následovné: $6,39 \pm 0,33 \mu\text{M}$, podruhé $6,82 \pm 0,26 \mu\text{M}$ a $5,98 \pm 0,20 \mu\text{M}$.



Obrázek 20 – Michaelis-Menten = závislost specifické aktivity AKR1B10 na různých koncentracích DAUN v reakcích s rozdílnou koncentrací BRA.



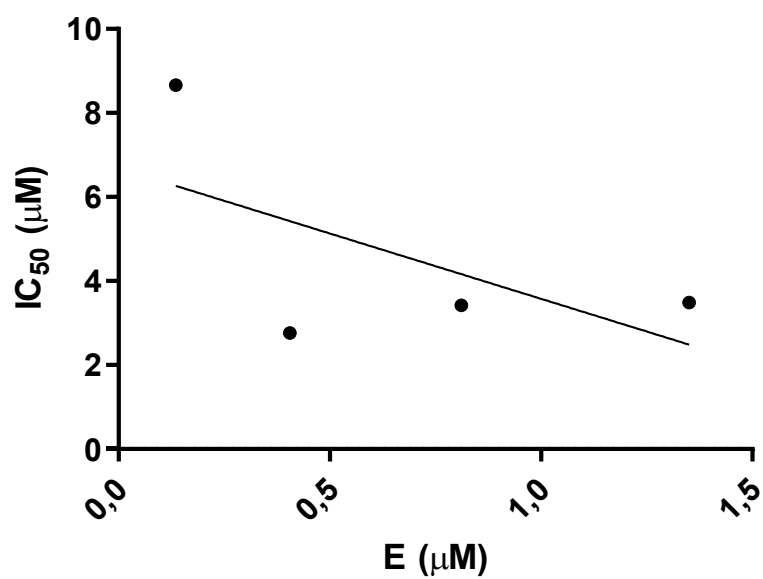
Obrázek 21 – Určení typu inhibice dle Lineweaver-Burka = dvojitě reciproký výnos závislosti specifické aktivity AKR1B10 na různých koncentracích DAUN v reakcích s rozdílnou koncentrací BRA.

U obou enzymů (AKR1C3 i B10) byla inhibice nekompetitivní, inhibitor se tedy neváže na aktivní místo enzymu, ale na jinou část. Substrát se tak může navázat, ale komplex enzym-substrát není tak účinný a přeměna na produkt neprobíhá tak ochotně. Dalším nekompetitivním inhibitorem se ukázal být olaparib (Lekešová 2021), evobrutinib (Zenkerová 2021) a midostaurin (Morrel et al. 2020). Podobných výsledků dosáhl i belinostat, kde byl typ inhibice podobný nekompetitivnímu (Slámová 2021). Acalabrutinib a ibrutinib inhibovaly nekompetitivním/smíšeným typem inhibice. (Morrel et al. 2020) Naproti tomu tepotinib byl inhibitor kompetitivní (Krtilová 2020), soutěží tedy se substrátem o vazebné místo.

5.4. Určení typu vazby

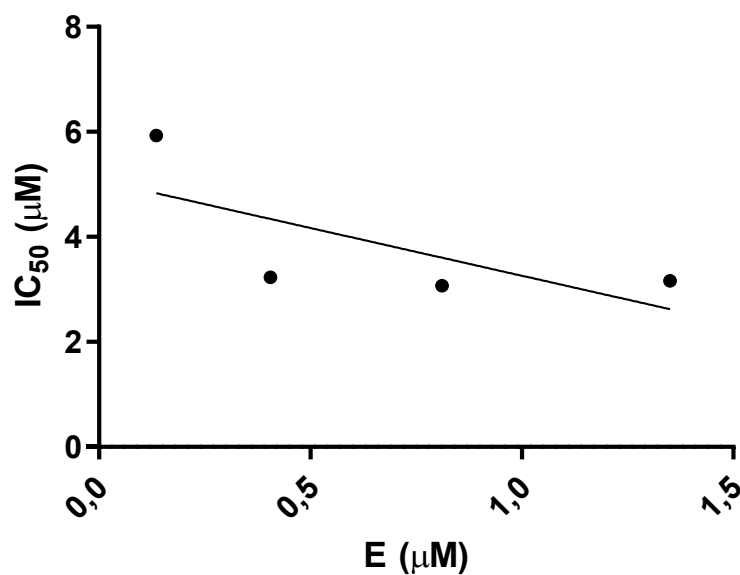
Nakonec bylo třeba zjistit, zda se inhibitor na enzym váže reverzibilně, či nikoliv. Vždy bylo testováno 9 koncentrací BRA a 4 koncentrace enzymu.

Nejprve se testoval AKR1C3 v koncentracích 0,5; 1,5; 3 a 5 μM. BRA se použil 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 3; 10; 50 a 100 μM. V případě pevně se vázajícího inhibitoru mají IC_{50} tendenci stoupat se zvyšující se koncentrací enzymu. V našem případě tomu tak nebylo, jak je vidět na obrázku 22 a 23. Z toho vyplývá, že BRA se na AKR1C3 neváže pevně.



Slope	-3,11
Y-intercept	6,69

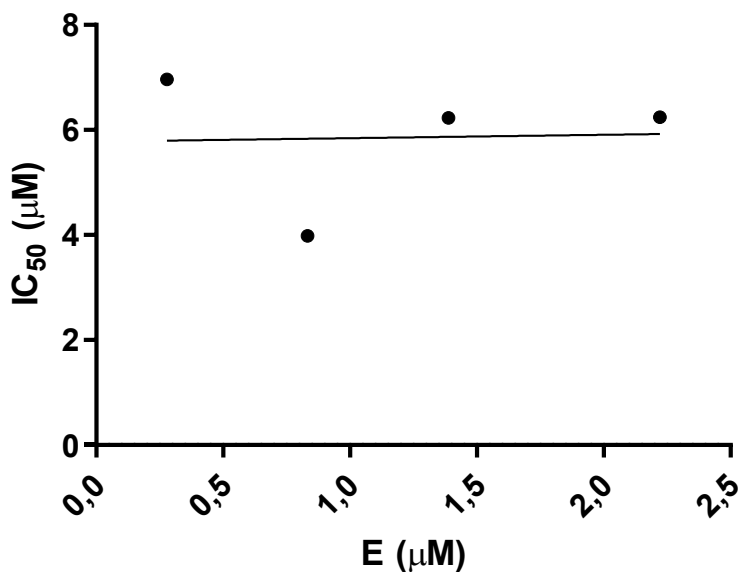
Obrázek 22 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKRIC3.



Slope	-1,82
Y-intercept	5,08

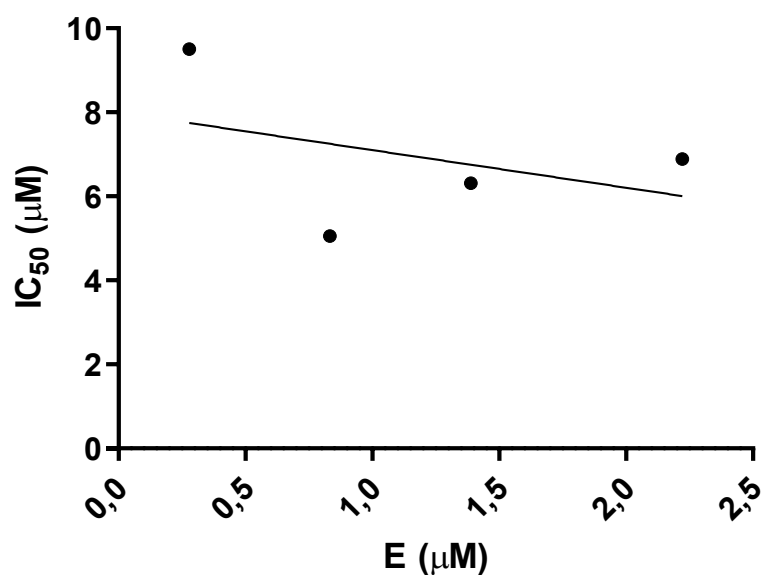
Obrázek 23 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKRIC3.

Stejný experiment byl proveden i pro AKR1B10 – 1; 3; 5 a 8 μM . BRA byl v koncentracích 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 50 a 100 μM . Ani v případě AKR1B10 neměly IC_{50} stoupající tendenci, což je patrné z obrázku 24 a 25, tudíž se BRA ani na tento enzym neváže pevně. Ireverzibilní vazba je nekovalentní, což je zajímavé, protože BRA byl prokázán jako kovalentní inhibitor BTK. Na enzymy z nadrodiny AKR se evidentně váže jinými mechanismy.



Slope	0,06
Y-intercept	5,78

Obrázek 24 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKR1B10.



Slope	-0,89
Y-intercept	7,99

Obrázek 25 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKR1B10.

Typ vazby se testoval i u evobrutinibu (Zenkerová 2021), kde stejně jako u BRA byl zjištěn reverzibilní typ. Naopak midostaurin se ukázal jako pevně se vázající inhibitor (Morrel et al. 2020), stejně jako acalabrutinib a ibrutinib (Morrel et al. 2020)

Z výsledků je patrné, že BRA je nekompetitivní inhibitor AKR1C3 a AKR1B10, přičemž na oba enzymy se váže reverzibilně. Díky jeho vysokému inhibičnímu potenciálu se sníží metabolismus DAUN na DAUN-ol. Dojde tak ke zvýšení účinku léčiva a snížení jeho toxicity vůči zdravým buňkám, což je jeden z problémů protinádorové léčby. Je pravda, že ireverzibilní inhibice by z klinického hlediska byla výhodnější. Poskytuje totiž vyšší biochemickou účinnost a prodloužený farmakodynamický účinek, což způsobí potřebu nižší koncentrace a zlepši terapeutické rozmezí. Na druhou stranu, v literatuře se uvádí, že kovalentně se vázající ireverzibilní inhibitory mají vyšší riziko reaktivity mimo cílové místo, a tedy vyšší toxicitu pro organismus (Watterson et al. 2019). Díky tomu, že BRA se ukázal jako reverzibilní inhibitor AKR1C3 a 1B10, měl by mít toto riziko nižší.

Díky dobré snášenlivosti a velkému potenciálu je v současné době BRA zkoumán i z jiných úhlů. Byl také prokázán jako inhibitor lékových transportérů z rodiny ABC, konkrétně ABCB1. Další studie, které provedl Chung-Pu Wu a jeho kolegové, prokázaly, že spolu s BRA tento lékový transportér inhibuje i almonertinib, erdafitinib a sitravatinib. (Wu et al. 2022) ABC transportéry, jak bylo uvedeno výše, jsou zodpovědné za mnohočetnou lékovou rezistenci.

Jejich inhibice je tedy možným řešením tohoto problému a dalším způsobem zlepšení léčby nádorových onemocnění. MDR je také možné omezit přes ABCG2 transportér pomocí rocilenitibu a cabozantinibu, BRA ale na tento transportér pravděpodobně nepůsobí. (Wu et al. 2022). Studie prokázaly výhody spojení těchto inhibitorů s konvenčními protinádorovou léčbou.

V posledních letech je velká snaha objevit inhibitory enzymů z nadrodiny AKR a SDR. Podobně jako u BRA byl objeven inhibiční účinek belinostatu (Slámová 2021), tepotinibu (Krtilová 2021), olaparibu (Lekešová 2021), evobrutinibu (Zenkerová 2021), midostaurinu (Morrel et al. 2020), enasidenibu (Pěčková 2021) a acalabrutinibu (Morrel et al. 2020). Všechny tyto inhibitory však inhibovaly pouze AKR1C3. BRA spolu s ibrutinibem (Morrel et al. 2020) navíc inhibuje i AKR1B10, má tedy širší inhibiční potenciál a větší perspektivu v klinickém použití.

AKR1B10 je inhibována ještě inhibitorem dasatinibem z 89,1 %, s IC_{50} menší než 1 μ M. Inhibice byla nekompetitivního/smíšeného typu. Nicméně inhibice AKR1C3 tímto inhibitorem byla pouze 44,2 % (Büküm et al. 2021)

Inhibiční účinky těchto studovaných inhibitorů na enzymy z nadrodiny AKR však byly objeveny nedávno. Většina z nich ještě nemá dokončené potřebné klinické studie. Je tedy otázkou, jak dopadnou testy na buněčných liniích a jestli se cestou neobjeví závažné vedlejší účinky a toxicita. Z in vitro experimentů vychází nejlépe ibrutinib, který má inhibiční aktivitu vůči AKR1B10 a 1C3. BRA má tuto aktivitu také, ale s vyšší IC_{50} .

6. ZÁVĚR

Enzymy z nadrodin AKR a SDR jsou důležitými katalyzátory metabolismu eobiotických i xenobiotických látek. Jednou skupinou léčiv podléhajících jimi katalyzovanou redukcí jsou ANT používaná pro léčbu různých nádorových onemocnění. ANT je přeměněno na odpovídající alkohol, který je však toxický pro kardiomyocyty a další buňky pacienta, a léčivo ztrácí účinnost proti buňkám nádoru. Tento problém by se mohl vyřešit inhibicí AKR a SDR enzymů. V současné době je zkoumáno několik inhibitorů, u nichž se předpokládá inhibiční potenciál vůči těmto enzymům.

Cílem této práce bylo zjistit, zda BRA, známý jako inhibitor BTK inhibuje také AKR a SDR enzymy. Dále bylo třeba stanovit IC_{50} a typ inhibice. Procovalo se *in vitro*, na úrovni rekombinantních enzymů.

V první části se prováděl screening vybraných enzymů – AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 ke specifickému substrátu DAUN a následně možnost inhibice těchto enzymů inhibitorem BRA. Významný inhibiční potenciál byl zjištěn u AKR1B10 a 1C3. S oběma se tedy pokračovalo v dalších experimentech. Následovalo určení IC_{50} pro oba enzymy. U AKR1B10 byla tato hodnota v průměru 5,62 μM a pro AKR1C3 dosahovala 2,65 μM . Dále se určovala hodnota K_i , která vycházela kolem 6,40 μM u AKR1B10 a 3,08 μM v případě AKR1C3. Experimentálně bylo zjištěno, že v obou případech jde o nekompetitivní typ inhibice. V poslední části byla třeba určit síla vazby inhibitoru na enzymy. V obou případech byl prokázán reverzibilní typ vazby.

BRA byl prokázán jako nekovalentně se vázající nekompetitivní inhibitor AKR1B10 a 1C3. Většina studií s jinými inhibitory potvrdila inhibici jen jednoho enzymu, obvykle AKR1C3. BRA má tedy rozsáhlejší inhibiční potenciál. Navíc byl v jiných studiích prokázán jako inhibitor ABC lékových transportérů. Jeho kombinací s cytostatickou léčbou by se tedy nejen omezil metabolismus ANT, což by mělo za následek vyšší účinnost a menší toxicitu, ale také by se snížila rezistence nádorové buňky vůči léčivu. Všechny experimenty byly prováděné pouze *in vitro* na úrovni rekombinantních enzymů. Aby byly výsledky relevantní, je nutné provést další výzkumy na buněčné úrovni. Rozhodně má ale BRA jako inhibitor AKR veliký potenciál pro zlepšení léčby nádorů, a tudíž i prognózy pacientů.

7. SEZNAM ZKRATEK

ABC	(ATP binding cassette transporters)
ACN	acetonitril
AGE	konečné produkty pokročilé glykosylace
AKR1A1	Aldehydreduktasa
AKR1B1	Aldosareduktasa
AKR1B10	Aldosareduktasa tenkého střeva
AKR1C3	Hydroxysteroiddehydrogenasa
ALL	akutní lymfatické leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
ANT	Antracyklická antibiotika
bE	kontrola bez enzymu
BRA	branebrutinib
bS	kontrola bez substrátu
BTK	Brutonova tyrosinkinasa
CBR1 (SDR21C1)	karbonylreduktasa 1
CNS	centrální nervová soustava
DAUN	daunorubicin
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulopatie
DMSO	dimetylsulfoxid
HCOOH	kyselina mravenčí
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace
INH	inhibitor
K _i	inhibiční konstanta

MDR	multidrog resistance (mnohočetná léková rezistence)
MetOH	metanol
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
MRP	multidrog resistance associated transporter
NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NaPB	sodno-fosfátový pufr
NI	neinhibovaná reakce
P-gp	p-glykoprotein
ROS	reaktivní formy kyslíku
SZÚ	státní zdravotní ústav
Top2	Topoizomerasa II
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
V _{max}	mezní (maximální) rychlost reakce
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
ZR	zásobní roztok

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – FAB klasifikace AML

Obrázek 2 – WHO klasifikace AML

Obrázek 3 – metabolismus daunorubicinu

Obrázek 4 – graficky znázorněné typy inhibice

Obrázek 5 – struktura branebrutinibu

Obrázek 6 – závislost průměrné specifické aktivity AKR1A1 na koncentraci inhibitoru

Obrázek 7 – závislost průměrné specifické aktivity AKR1B1 na koncentraci inhibitoru

Obrázek 8 – závislost průměrné specifické aktivity CBR1 na koncentraci inhibitoru

Obrázek 9 – závislost průměrné specifické aktivity AKR1B10 na koncentraci inhibitoru

Obrázek 10 – závislost průměrné specifické aktivity AKR1C3 na koncentraci inhibitoru

Obrázek 11 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA

Obrázek 12 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA

Obrázek 13 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA

Obrázek 14 – závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentraci BRA

Obrázek 15 – závislost specifické aktivity AKR1B10 na log koncentraci BRA

Obrázek 16 – závislost specifické aktivity AKR1B10 na log koncentraci BRA

Obrázek 17 – závislost specifické aktivity AKR1B10 na log koncentraci BRA

Obrázek 18 – Michaelis-Menten graf pro AKR1C3

Obrázek 19 – Určení typu inhibice dle Lineweaver-Burka u AKR1C3

Obrázek 20 – Michaelis-Menten graf pro AKR1B10

Obrázek 21 – Určení typu inhibice dle Lineweaver-Burka u AKR1B10

Obrázek 22 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKR1C3

Obrázek 23 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKR1C3

Obrázek 24 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKR1C3

Obrázek 25 – Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKR1C3

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – reakční schéma

Tabulka 2 – parametry testovaných enzymů

10.LITERATURA

Bachur N. R and Huffman D. H. (1971) Daunorubicin metabolism: estimation of daunorubicin reductase. *British journal of pharmacology*.43(4), 828-833

Bachur N. R. and Bertino J. R. (2002) *Encyclopedia of Cancer*. Second edition. Academic press, New York, 2306 pages

Barski O. A. et al. (2008) “The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification.” *Drug metabolism reviews*. 40(4), 553-624

Bray J. E., Marsden B. D. and Oppermann U. (2009) The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chemico-Biological Interactions* 178(1), 99-109

Büküm N., Novotná E., Morell A., Želazková J., Laštovičková L., Čermáková L., Portillo R., Solich P., and Wsól V. (2021) Inhibition of AKR1B10-mediated metabolism of daunorubicin as a novel off-target effect for the Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Biochemical pharmacology*, 192, 114710

Burke J., Gillooly K., Pattoly M., Cheng L. et al. (2017) BMS-986195 Is a Highly Selective and Rapidly Acting Covalent Inhibitor of Bruton’s Tyrosine Kinase with Robust Efficacy at Low Doses in Preclinical Models of RA and Lupus Nephritis. *Arthritis & Rheumatology* 69(10)

Catlett I. M., Nowak M., Kundu S., Zheng N., Liu A., He B., Girgis I. G. and Grasele D. M. (2020) Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of branebrutinib (BMS-986195), a covalent, irreversible inhibitor of Bruton's tyrosine kinase: Randomised phase I, placebo-controlled trial in healthy participants. *British journal of clinical pharmacology* 86(9), 1849-1859

Ferrari P., Scatena C., Ghilli M., Bargagna I., Lorenzini G. and Nicolini A. (2022) Molecular Mechanisms, Biomarkers and Emerging Therapies for Chemotherapy Resistant TNBC. *International Journal of Molecular Sciences* 23(3), 1665

Fujii J., Homma T., Miyata S. and Takahashi M. (2021) “Pleiotropic Actions of Aldehyde Reductase (AKR1A).” *Metabolites* 11(6) 343

- Hartmanová T., Tambor V., Lenčo J., Staab-Weijnitz C., Maser E. and Wsól V. (2013) S-Nitrosoglutathione covalently modifies cysteine residues of human carbonyl reductase 1 and affects its activity. *Chemico-biological interactions* 202(1-3), 136-145
- Cheong A., Mcgrath S. and Cutts S. (2018) Anthracyclines. *WikiJournal of Medicine* 5(1), 1-8
- Chien A. J., and Moasser M. M. (2008) Cellular Mechanisms of Resistance to Anthracyclines and Taxanes in Cancer: Intrinsic and Acquired. *Seminars in Oncology* 2008(35) 1-14
- Jez J. M., Flynn T. G. and Penning T. M. (1997) A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical pharmacology*, 54(6), 639-647.
- Karges W. J. P and Dahouk S. (2011). *Akutní leukemie z: Vnitřní lékařství: stručné repetitorium*. Grada, Praha. Strany 278-281
- Kavanagh K. L., Jörnvall H., Persson B. and Oppermann U. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(24), 3895-3906
- Krtilová K. (2021) *Vliv inhibice tepotinibu, entrektinibu a sapanisertibu na aktivitu vybraných reductas z nadrodiny AKR*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 76 stran
- Ledvina M., Stoklasová A. A Cerman J. (2020) *Biochemie pro studující medicíny*, 3. vydání, Karolinum, Praha, 548 stran
- Lekešová A. (2021) *Vliv olaparibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou karbonyl redukujícími enzymy*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 69 stran
- Lubieniecka J. M, Liu J., Heffner D., Graham J., Reid R., Hogge D., Grigliatti T. A. and Riggs W. K. (2012) Single-Nucleotide Polymorphisms in Aldo-Keto and Carbonyl Reductase Genes Are Not Associated with Acute Cardiotoxicity after Daunorubicin Chemotherapy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 21(11), 2118-2120

Matsunaga T., Wada Y., Endo S., Soda M., El-kabbani, O. and Hara A. (2012) Aldo-Keto reductase 1B10 and its role in proliferation capacity of drug-resistant cancers. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 5-5

Morell A., Čermáková L., Novotná E., Laštovičková L., Haddad M., Haddad A., Portillo R., and 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., and Wsól V. (2020) Selective inhibition of aldo-keto reductase 1C3: a novel mechanism involved in midostaurin and daunorubicin synergism. *Archives of Toxicology* 95(1), 67-78

National Center for Biotechnology Information (2022) PubChem Compound Summary for CID 30323, Daunorubicin. [Citováno 2022-02-20] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Daunorubicin>.

Novotná E., Büküm N., Hofman J. et al. (2018) Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile. *Archives of Toxicology* 92, 2845-2857

Pěčková A. (2021) *Vliv inhibice enasidenibu, glasdegibu a quizartinibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 67 stran

Penka M., Slavičková E. (2011) *Hematologie a transfuzní lékařství*. Grada, Praha, 421 stran

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

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

Racek J. (2016) *Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd., Galén, Praha, 329 stran*

Raudenská M., et al. (2014) Molekulární mechanismy rezistence u nádorového onemocnění prostaty. *Praktický lékař* 94(2) 87-92

Rižner T. L., and Penning T. M. (2014) Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*, 79, 49-63

Slámová A. (2021) *Vliv inhibice belinostatu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 56 stran

Staab C. A., Hartmanová T., El-hawari Y., Ebert B., Kisiela M., Wsol V., Martin, H. -jörg, and Maser, E. (2011) Studies on reduction of S-nitrosoglutathione by human carbonyl reductases 1 and 3. *Chemico-biological interactions*, 191(1), 95-103

Stevens J. M., Simmons E. M., Tan Y., et al. (2022) Leveraging High-Throughput Experimentation to Drive Pharmaceutical Route Invention: A Four-Step Commercial Synthesis of Branebrutinib (BMS-986195). *Organic Process Research & Development* 26(4), 1174-1183

Šálek C. (2012) Diagnostika a léčba akutních leukemií. *Interní medicína pro praxi* 366-372

Vodrážka Z., Rauch P., Káš J. (1991) *Enzymologie*. 2., přepracované vyd. VŠCHT Praha, 508 stran

Watterson S. H., Liu Q., Beaudoin Bertrand M., et al. (2019) Discovery of Branebrutinib (BMS-986195): A Strategy for Identifying a Highly Potent and Selective Covalent Inhibitor Providing Rapid in Vivo Inactivation of Bruton's Tyrosine Kinase (BTK). *Journal of Medicinal Chemistry* 62(7), 3228-3250

Westermann M., Adomako-Bonsu A. G., Thiele S., Çiçek S. S., Martin H. J., and Maser, E. (2022) Inhibition of human carbonyl reducing enzymes by plant anthrone and anthraquinone derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, 354, 109823

Wu C., Murakami M., Wu Y., Lin C., Li Y., Huang Y, Hung T. A Ambudkar S. V. (2022) The multi-targeted tyrosine kinase inhibitor SKLB610 resensitizes ABCG2-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to chemotherapeutic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 149, 112922

Zenkerová K. (2021) *Vliv evobrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou enzymy redukující karbonylové skupiny*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 96 stran

Zheng N, Catlett I. M., Taylor K., et al. (2019) Determination of Real Time in Vivo Drug Receptor Occupancy for a Covalent Binding Drug as a Clinical Pharmacodynamic Biomarker by Immunocapture-LC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 91(13), 8443-8452

Zhou L., Yang C., Zhong W., Wang Q., Zhang D., Zhang J., Xie S., and Xu M. (2021) Chrysin induces autophagy-dependent ferroptosis to increase chemosensitivity to gemcitabine by targeting CBR1 in pancreatic cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 193, 114813-114813