

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VYUŽITÍ VYBRANÝCH INHIBITORŮ K PŘEKONÁNÍ
ANTHRACYKLINOVÉ REZISTENCE V TERAPII NÁDOROVÝCH
ONEMOCNĚNÍ (IN VITRO STUDIE)**

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Bc. Kateřina Tučková

PODĚKOVÁNÍ

Mé nesmírné poděkování patří jak prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D., tak Mgr. Lence Laštovičkové, Ph.D. za cenné rady, pomoc při zpracování dat a především za vstřícný přístup. Rovněž bych chtěla poděkovat i paním laborantkám za umožnění pohodlné práce v laboratoři. Z celého srdce děkuji i své rodině, příteli a kamarádům za podporu v mém studiu.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). 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 dne:

.....

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Kateřina Tučková

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

Konzultant: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití vybraných inhibitorů k překonání anthracyklinové rezistence v terapii nádorových onemocnění (in vitro studie)

Výskyt rezistence na cytostatika je závažným problémem v léčbě onkologických pacientů, který výrazně ztěžuje šanci na jejich rekonvalescenci. Jednou z příčin vzniku rezistence je zvýšená exprese karbonyl redukujících enzymů v nádorových buňkách. Tyto enzymy dokáží redukovat cytostatika ze skupiny antracyklinů na jejich méně účinné deriváty a výrazně tak snižovat jejich účinek. Inhibitory karbonyl redukujících enzymů by proto mohly zvýšit účinek podávaných antracyklinů. Cílem je najít inhibitor s vysokou inhibiční aktivitou a zároveň nízkými vedlejšími účinky.

V této diplomové práci byly testovány inhibitory asciminib, tucatinib, sotorasib a umbralisib hydrochlorid vůči karbonyl redukujícím enzymům z nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR1C3, 1A1, 1B1, 1B10) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (CBR1) za použití cytostatika daunorubicinu.

Největší inhibiční potenciál byl pozorován u asciminibu a enzymu AKR1C3, proto se pro získání dalších kinetických parametrů pracovalo pouze s tímto inhibitorem. Inhibice zde dosahovala při 10 μM koncentraci inhibitoru 38,9 % a při 50 μM koncentraci inhibitoru 70,7 %. Hodnota IC_{50} byla experimentálně stanovena na $17,4 \pm 2,0 \mu\text{M}$ a hodnota K_i $16,25 \pm 0,7 \mu\text{M}$. Asciminib působí jako nekompetitivní inhibitor. Tento inhibitor byl v roce 2021 schválen společností FDA pro léčbu chronické myeloidní leukémie.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Tučková

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

Consultant: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The use of selected inhibitors to overcome anthracycline resistance in cancer therapy (in vitro study)

Resistance to chemotherapy is a severe problem in treating cancer patients, significantly reducing their chances of recovery. The increased expression of carbonyl reductases in tumour cells is one of the leading causes of the resistance. These enzymes can reduce anthracycline-based chemotherapy drugs to their less effective derivatives and thus significantly reduce their efficiency. Therefore, the inhibitors of carbonyl reductases could increase the effectiveness of anthracycline-based chemotherapy. The goal is to find an inhibitor with high inhibitory activity and low side effects.

This thesis tested inhibitors asciminib, tucatinib, sotorasib, and umbralisib hydrochloride against carbonyl reductases from the aldo-keto reductase superfamily (AKR1C3, 1A1, 1B1, 1B10) and short-chain dehydrogenases/reductases superfamily (CBR1), using chemotherapy drug daunorubicin.

The most significant inhibitory potential was observed between asciminib and the enzyme AKR1C3, therefore only this inhibitor was used to obtain other kinetic parameters. The 10 μM inhibitor showed inhibition of 38.9 %, and the 50 μM inhibitor reached inhibition of 70.7 %. The IC_{50} value was $17.4 \pm 2.0 \mu\text{M}$, and the K_i value was $16.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$. The inhibitor asciminib acts as a non-competitive inhibitor. FDA approved this inhibitor for the treatment of chronic myeloid leukaemia in 2021.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Nádorová onemocnění	9
2.2	Hematologické malignity	9
2.2.1	Akutní myeloidní leukemie	10
2.2.2	Chronická myeloidní leukemie	12
2.3	Antracyklinová antibiotika	14
2.3.1	Daunorubicin	16
2.3.2	Rezistence	17
2.1	Karboxyl redukující enzymy	18
2.1.1	Aldo-ketoreduktasy	19
2.1.2	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem	21
2.2	Inhibitory	22
2.2.1	Asciminib	23
2.2.2	Sotorasib	24
2.2.3	Tucatinib	25
2.2.4	Umbralisib hydrochlorid	27
3	Cíl práce	29
4	Praktická část	30
4.1	Materiál	30
4.1.1	Chemikálie	30
4.1.2	Pomůcky a přístroje	31
4.1.3	Příprava roztoků	32
4.2	Metodika	32
4.2.1	Screening jednotlivých inhibitorů	32
4.2.2	Stanovení IC ₅₀	36
4.2.3	Stanovení K _i	36
4.2.4	Zpracování dat	36
5	Výsledky	38
5.1	Základní screening	38
5.2	IC ₅₀	45

5.3	Typ inhibice a stanovení Ki	49
6	Diskuze	53
7	Závěr	56
8	Seznam zkratek	57
9	Seznam obrázků	61
10	Seznam tabulek	63
11	Seznam použité literatury	64

1 ÚVOD

Metody terapie nádorového onemocnění se posouvají stále kupředu. V nynější době se vyvíjejí nové terapeutické možnosti, které by mohly být účinnější a s menším výskytem vedlejších účinků než stávající léčba. Výzkum se především soustředí na pochopení molekulárních mechanismů, které stojí za vznikem nádorového bujení, a identifikaci nových strategií v léčbě nádorového onemocnění.

První volba v léčbě nádorového onemocnění je použití antracyklinových antibiotik (ANT), jejichž historie sahá až do počátku 60. let 20. století a které se využívají v léčbě nejrůznějších solidních nádorů i hematologických malignit. Tato léčba je však v nynější době nadále omezena vznikem získané rezistence, která se projevuje ve chvíli, kdy tumor přestane reagovat na léčbu a začne opět růst a množit se. Vzniká tak snaha tuto rezistenci překonat a být nadále o krok napřed v boji s touto zákeřnou nemocí.

V rezistenci na ANT jako je daunorubicin (DAUN), hrají mimo jiné roli karbonyl redukující enzymy (CRE). CRE jsou enzymy, které redukují ANT na jejich méně účinné metabolity. DAUN se tak metabolizuje na daunorubicinol (DAUNOL), který má tedy nejen mnohem menší cytostatickou aktivitu, ale působí i kardiotoxicky, což komplikuje následnou léčbu pacienta.

Jedním ze způsobů, jak tuto rezistenci překonat je kombinace terapie ANT s inhibitory CRE. Zablokováním funkce CRE snížíme pravděpodobnost vzniku chemorezistence na ANT a tím zvyšujeme šanci na úspěšné zakončení léčby.

Incidence nádorového onemocnění je nadále celosvětově vysoká, avšak mortalita pacientů díky rozmanitým možnostem terapie stále klesá. Důležité je nadále se snažit pochopit mechanismus vzniku onemocnění, testovat nové možnosti terapie a vyvíjet nová léčiva.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nádorová onemocnění

Nádorové onemocnění, též známé pod pojmem rakovina, je stav, kdy se některé buňky těla vymknou kontrole, začnou neovladatelně růst a šířit se do okolních a případně i vzdálených tkání. Existuje mnoho druhů nádorových onemocnění, které se liší jak příznaky, tak i prognózou či možnostmi léčby. K nespecifickým celkovým projevům patří nadměrné noční pocení, nechutenství či rychlý úbytek hmotnosti. Tumor se může projevit komplikacemi v místě lokace, např. krvácením, bolestí a poruchou funkce orgánu. Vznik onemocnění je způsoben mnoha faktory, jako jsou genetická predispozice, expozice karcinogenům, nadměrné pití alkoholu, obezita a nezdravá strava. Léčba může zahrnovat chirurgické odstranění vzniklého novotvaru, radioterapii, chemoterapii, imunoterapii nebo případnou kombinaci těchto metod. Její úspěšnost závisí na mnoha faktorech včetně typu nádorového onemocnění a jeho stádia, věku pacienta a jeho celkového zdravotního stavu. Včasná diagnóza je klíčová pro úspěšnou léčbu a následnou rekonvalescenci, proto je důležité podstupovat pravidelné preventivní prohlídky a dodržovat zdravý životní styl (Česká onkologická společnost J. E. Purkyně, 2023).

Rakovina je celosvětově 2. nejčastější příčina úmrtí a je zodpovědná odhadem za 9,6 milionu životů v roce 2018. Nejčastějším typem rakoviny je dle světové zdravotnické organizace rakovina plic (WHO, 2017). Česká republika (ČR) se v incidenci zhoubných nádorů celosvětově řadí na 16.-17. místo. Mezi nejčastější malignity v ČR patří rakovina tlustého střeva a konečníku, průdušek a plic, prostaty u mužů a prsu u žen. V roce 2020 bylo v ČR nově diagnostikováno 91,5 tisíc nádorových onemocnění a v ten samý rok zemřelo na zhoubné novotvary 35,5 tisíce osob. Prevalence zhoubných novotvarů dále narůstá, avšak díky zavedení screeningových programů se onemocnění mnohdy diagnostikuje v časném stádiu a prognóza je tak příznivější (ÚZIS, 2021).

2.2 Hematologické malignity

Nádorová onemocnění, která postihují hematopoetické buňky se nazývají hematologickými malignitami. Vznikají buď z hematopoetických buněk zcela nezralých nebo již v určitém stupni vývoje. Tyto malignity nejčastěji postihují buňky kostní dřeně nebo lymfatického systému. Zahrnují mnoho různých typů nádorů, jako je leukémie, lymfom a mnohočetný myelom (Penka a Tesařová, 2011).

Hematologická nádorová onemocnění třídíme na myeloidní a lymfoidní řadu. Myeloidní vznikají z pluripotentní kmenové buňky, která směřuje k myeloidní řadě. Lymfoidní leukémie vzniká z progenitorové buňky pro lymfatickou řadu nebo již z lymfatických vy zralých buněk. Rozlišujeme také stavy akutní a chronické, kdy u akutních stavů neléčená leukémie vede ke smrti pacienta v týdnech až měsících, zatímco u chronického průběhu jsou to měsíce až roky (Penka a Tesařová, 2011).

2.2.1 Akutní myeloidní leukemie

Nádorové onemocnění, které vzniká na základě klonální expanze myeloidních blastů v periferní krvi, kostní dřeni nebo jiné tkáni se nazývá akutní myeloidní leukemii (AML). Akumulací a proliferací těchto funkčně neplnohodnotných blastů se utlačuje tvorba fyziologických buněk a dochází tak k neutropenii, anémii a trombocytopenii. AML je nejčastější akutní leukemii dospělých. Incidence nově diagnostikovaných pacientů je 15/100 000 ročně. Medián věku výskytu onemocnění je 65 let (Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016).

AML má prudký nástup, klinické projevy jsou zřetelné a stav se rychle zhoršuje. Tyto projevy obvykle vyplývají z narušené funkce krevních elementů periferní krve. Jsou způsobeny především anémií, která se projevuje malátností, únavou, pocitem vyčerpání a bledostí sliznic. U neutropenie se setkáváme s častými infekcemi agresivního průběhu a trombocytopenie potom způsobuje časté krvácení z nosu nebo jsou po těle přítomny petechie (Pelcovits & Niroula, 2013).

Příčina vzniku je multifaktoriální. Mezi tyto faktory patří zejména vystavení se ionizujícímu záření nebo kancerogenním chemikáliím jako je benzen, pesticidy, herbicidy atd. Zvýšený výskyt AML je pozorován u Downova syndromu nebo u Fanconiho anémie (Penka a Tesařová, 2011).

Prvním krokem k diagnostice AML je vyšetření krevního obrazu, kde nacházíme prudce zvýšený počet leukocytů společně se sníženým počtem erytrocytů a trombocytů. Diagnózu AML stanovujeme při nález 20 % blastů v aspirátu kostní dřeni. K nezbytným laboratorním nálezům patří také cytochemie, cytogenetika a molekulárně genetická analýza. Následně se zjišťuje, zdali jsou přítomny převážně megakaryoblasty, monoblasty, promonocyty či atypické promyelocyty. Samozřejmě nelze opomenout také anamnestické údaje konkrétního pacienta (Pelcovits & Niroula, 2013).

Léčba AML zahrnuje kombinaci podávání DAUN po dobu tří dnů a následně podávání cytarabinu po dobu dalších sedm dní. Velmi důležitou částí je také podpurná terapie, jako je antiinfekční léčba nebo transfuze erytrocytů a trombocytů. Prognóza je variabilní dle konkrétního typu AML (Penka a Tesařová, 2011).

V 70. letech 20. století rozdělila skupina expertů z USA, Velké Británie a Francie AML do osmi podtypů (viz Tabulka 1). Tato Francouzsko-americko-britská (FAB) klasifikace se odvíjela z vyšetření nátěrů periferní krve a kostní dřeně barvením dle Giemsky-Romanowského a dle cytochemického barvení. Máme však i novější systém klasifikace dle WHO (viz Tabulka 2), která nerozděluje podtypy pouze dle cytochemického barvení, ale i podle genetického profilu (Bučková *et al.*, 2013).

Tabulka 1: FAB klasifikace AML (Bučková *et al.*, 2013).

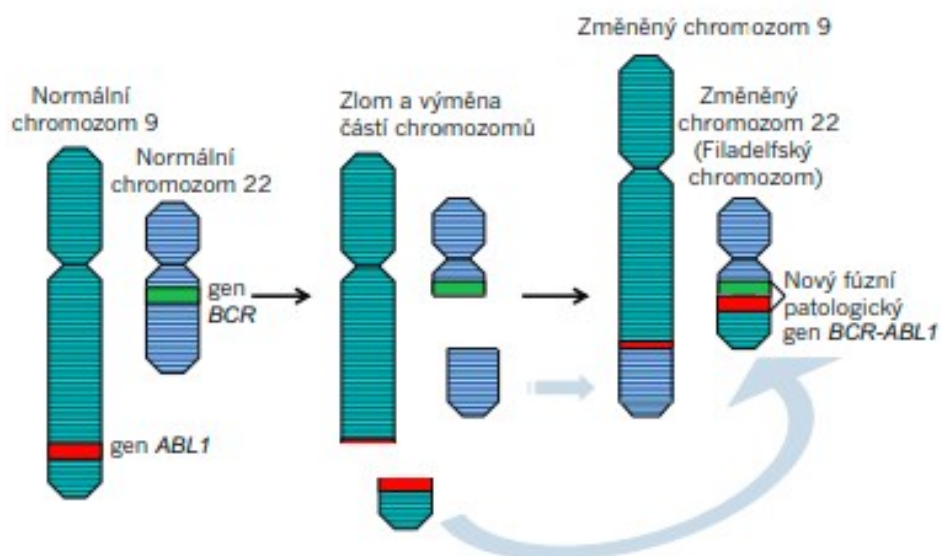
AML dle FAB klasifikace	Popis
M0 – AML s min. myeloidní diferenciací	minimálně diferencovaná AML
M1 – AML bez vyzrávání	v kostní dřeni je minimální počet vývojově zralých buněk – převládají nezralé blasty
M2 – AML s vyzráváním	v kostní dřeni nezralé myeloblasty, avšak některé buňky vyzrávají ve zralé leukocyty
M3 – akutní promyelocytární leukémie	přítomnost chromozomální translokace 15 a 17
M4 – akutní myelomonocytární leukémie	leukemické buňky mívají translokaci nebo inverzi chromozomu 16
M5 – akutní monoblastická/monocytární leukémie	přítomnost znaků vyvíjejících se monocytů u leukemických buněk
M6 – akutní erytroleukémie	přítomnost znaků vyvíjejících se erytrocytů u leukemických buněk
M7 – akutní megakaryocytoblastická leukémie	přítomnost znaků vyvíjejících se megakaryocytů u leukemických buněk

Tabulka 2: WHO klasifikace AML (Bučková *et al.*, 2013).

A. AML s rekurentními genetickými abnormalitami
<ul style="list-style-type: none">• AML s translokací chromozomů 8 a 21• AML s translokací nebo inverzí chromozomu 16• AML se změnami chromozomu 11• Akutní promyelocytární leukémie s translokací chromozomů 15 a 17• AML s mutací v NPM1 genu• AML s mutací v CEBPA genu
B. AML s multilineární dysplazií
<ul style="list-style-type: none">• AML vzniklá z předcházejícího myelodysplastického či myeloproliferativního syndromu• AML bez předcházejícího myelodysplastického syndromu
C. AML související s léčbou
<ul style="list-style-type: none">• po léčbě alkylačními cytostatiky• po léčbě ionizujícím zářením• po léčbě inhibitory topoizomerasy II
D. Myeloidní sarkom
E. AML blíže nespecifikovaná

2.2.2 Chronická myeloidní leukemie

Chronická myeloidní leukemie (CML), někdy také známá jako chronická granulocytární leukemie, je myeloproliferativní nádorové onemocnění krvetvorby. Vychází z abnormální pluripotentní kmenové buňky, která je již ve vývoji nasměrována k myeloidní vývojové řadě, a je spojena s přítomností leukemického fúzního genu BCR-ABL1, který vzniká translokací t(9;22) Filadelfského (Ph) chromozomu (viz Obrázek 1). Onkogen BCR-ABL1 kóduje fosfoprotein, který má tyrozinkinasovou aktivitu a stimuluje tak abnormální množení buněk myeloidní řady, což vede především ke granulární leukocytóze. Samotná příčina vzniku Ph chromozomu není známa (Penka a Tesařová, 2011; Hehlmann, 2020).



Obrázek 1: Vznik Ph chromozomu a fúzního genu BCR-ABL1 (Žáčková, 2012).

Většina pacientů má obvykle pozvolný nástup a jsou diagnostikováni v chronické fázi onemocnění. Přibližně u třetiny pacientů je diagnostikována CML náhodně v době, kdy nepocítují žádné příznaky. Mezi nejběžnější subjektivní potíže patří hmotnostní úbytek, únava, noční pocení a splenomegalie. V krevním obraze můžeme pozorovat enormně zvýšené množství leukocytů (mnohonásobně nad hodnotu $9 \times 10^9/l$) s posunem doleva, vývojové formy neutrofilů (myelocyty, metamyelocyty), též zvýšený počet eozinofilů a bazofilů, a méně často potom trombocytémie či anémie. Častou komplikací může být stav, kdy počet leukocytů přesáhne hodnotu $400 \times 10^9/l$, potom hovoříme o hyperviskózním syndromu, který ovlivňuje průtok krve životně důležitými orgány. Dochází tak k hypoxii a obstrukci kapilár, což se projeví neurologickými problémy, poruchou zraku nebo dušností (Penka a Tesařová, 2011).

Onemocnění má tři fáze: chronickou, akcelerovanou a blastickou. S postupem onemocnění se příznaky zhoršují, a to zejména v akcelerované a blastické fázi. Chronická fáze CML se vyznačuje především granulární leukocytózou s obsahem blastů pod 2 % z celkového počtu leukocytů. Výraznější nárůst blastů se objevuje ve fázi akcelerované, kdy se jejich obsah zvyšuje na 10-19 % v dřeni nebo periferní krvi. Zároveň je kostní dřeň hypercelulární a může být přítomna myelodysplazie. Za blastickou fázi (někdy označována jako blastický zvrát) se považuje obsah blastů nad 20 % v periferní krvi nebo kostní dřeni a jsou zde projevy extramedulární blastické proliferace, která nejčastěji postihuje lymfatické uzliny, kůži, kosti nebo centrální nervový systém (CNS) (Penka a Tesařová, 2011; Hehlmann, 2020).

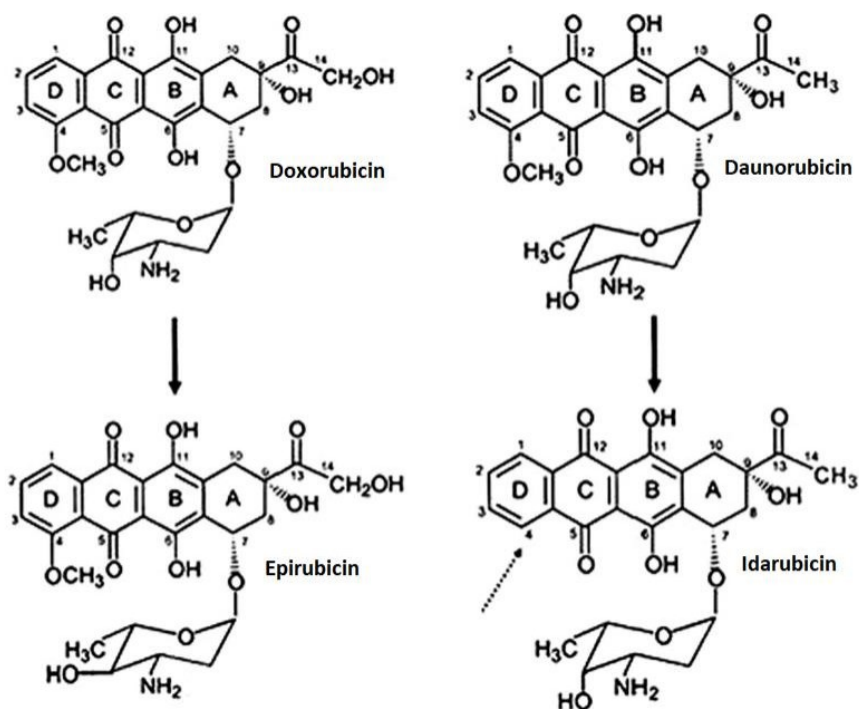
Pro určení CML se nejčastěji využívá diferenciální diagnostika, která vychází především z hodnot krevního obrazu, imunofenotypizace (u blastického zvratu) a cytogenetického vyšetření (prokazující Ph chromozom). Vylučuje tak jiné myeloproliferativní stavy, akutní leukemii nebo plazmocelulární choroby (Faber a Urbanová, 2010).

Léčbou první volby jsou zejména inhibitory tyrozinkinas, jejichž hlavní cíl je dosáhnout poklesu hladiny transkriptu BCR-ABL1, mezi které patří imatinib, nilotinib a dasatinib nebo mimo jiné nově registrovaný asciminib. Při selhání cílené léčby je potom indikována splenektomie, ozáření sleziny, a především alogenní transplantace krvetvorných buněk (Lindström & Friedman, 2020; Doubek a Mayer, 2020).

2.3 Antracyklinová antibiotika

ANT jsou cytostatika používaná v léčbě nádorových onemocnění od druhé poloviny 20. století, která výrazně snížila mortalitu onkologických pacientů. ANT jsou po intravenózním podání metabolizovány játry a následně vylučovány žlučí a částečně močí. Používají se především k léčbě rakoviny prsu, žaludku, plic nebo u různých hematologických malignit (Puchnerová *et al.*, 2017).

Prvním objeveným a nejčastěji používaným ANT je DAUN, který se používá převážně k léčbě AML, CML a Kaposiho sarkomu. Mezi další klinicky významné ANT patří doxorubicin (DOX), epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA). DOX je využíván při léčbě mnohočetného myelomu či Hodgkinova lymfomu. EPI se uplatňuje zejména v terapii karcinomu prsu a IDA u AML a akutní lymfoblastické leukemie (ALL) (Kiss *et al.*, 2022). Všechny čtyři ANT mají tetracyklickou aglykonovou strukturu (viz Obrázek 2) ze čtyř cyklohexanů s cukernou částí připojenou na uhlíku C7 kruhu *A*, dále hydrochinonové skupiny v kruzích *B* a *C*, methoxy substituent na uhlíku C4 v kruhu *D*, karbonylovou skupinu na uhlíku C13, a nakonec krátký postranní řetězec na uhlíku C9, který odlišuje DOX od DAU. DOX má na tomto řetězci primární alkohol, zatímco DAU methylovou skupinu. EPI je odvozen od DOX epimerizací hydroxylové skupiny a IDA je strukturálně podobný s DAU, kromě toho, že neobsahuje methoxyskupinu v kruhu *D* (McGowan *et al.*, 2017).



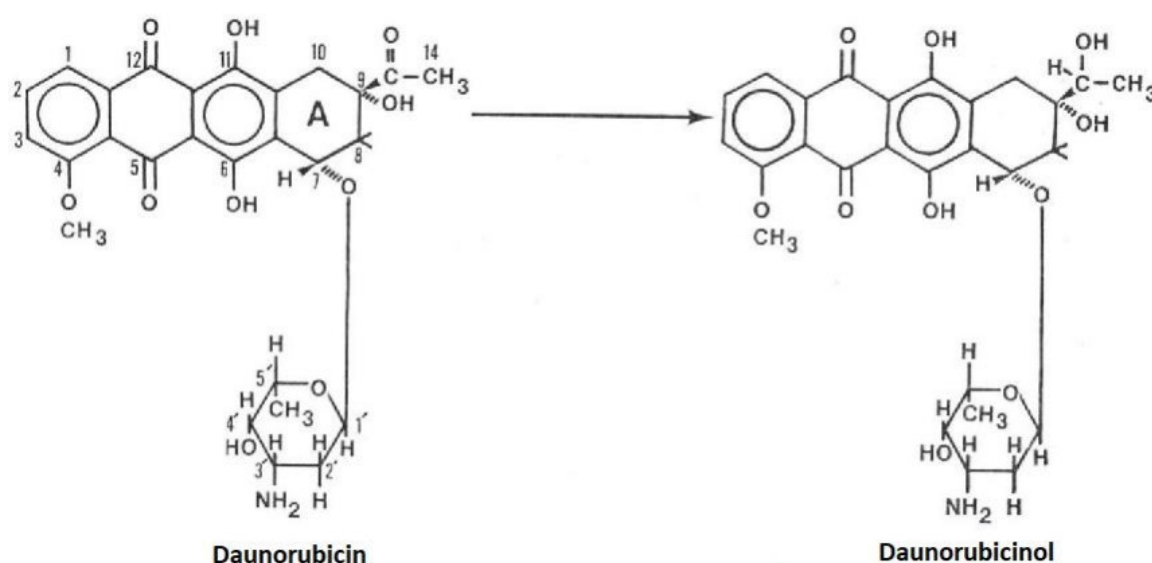
Obrázek 2: Struktura vybraných ANT (McGowan *et al.*, 2017).

Mechanismus účinku ANT spočívá ve schopnosti vázat se mezi páry bazí DNA, a tím deformovat její strukturu. Dvoušroubovice DNA se rozvine, inhibuje enzym topoisomerasu II, což naruší reparační mechanismy buňky a vznikají jedno či dvouvláknové zlomy. Tyto zlomy pak brání nádorové buňce v další syntéze DNA či RNA a zastaví růst a další dělení. DAUN také inhibuje aktivitu polymerasy, díky čemuž narušuje expresi genu a vede k dalšímu poškození DNA volnými radikály a následné apoptóze (Saleem & Kasi, 2022).

Největší nevýhodou používání ANT je značná kardiotoxicita. Mechanismus vzniku poškození srdečního svalu je pravděpodobně multifaktoriální, avšak rozšířenou hypotézou je poškození DNA v důsledku produkce reaktivních forem kyslíku a tvorba komplexů s topoisomerasou II v kardiomyocytech, což vede k poškození mitochondrií. Klinické projevy kardiotoxicity se projevují abnormálním elektrokardiogramem (EKG), arytmií, myokarditidou, infarktem myokardu nebo chronickým srdečním selháním. Zmíněné projevy jsou velmi variabilní a mění se v závislosti na čase od první podané dávky léčiva. Příznaky akutní kardiotoxicity se projevují do týdne, subakutní projevy do jednoho roku a pozdní kardiotoxicita se může objevit až rok po podání ANT (McGowan *et al.*, 2017; Chang & Wang, 2018). Pro snížení výskytu kardiologických problémů se ANT mohou podávat v kombinaci s dexrazoxanem, který se podává intravenózně v poměru 10:1 dexrazoxan:ANT (DAUN) (Saleem & Kasi, 2022).

2.3.1 Daunorubicin

DAUN, též známý pod názvem daunomycin, je chemoterapeutický lék patřící do skupiny ANT používaný především při léčbě AML, CML nebo se využívá u Kaposiho sarkomu. DAUN je prvním objeveným ANT a získává se z přirozené produkce bakterie *Streptomyces peucetius* (Saleem & Kasi, 2022; Laurent & Jaffrézou, 2001). DAUN je v játrech a dalších tkáních metabolizován pomocí cytoplazmatických aldo-ketoreduktas. Hlavním metabolitem se stává DAUNOL, který má však menší účinnost proti nádorovým buňkám a je mnohem více toxický pro organismus pacienta (Bachur & Huffman, 1971).



Obrázek 3: Redukce DAUN (Aslazos *et al.*, 1977).

DAUN se podává intravenózně a účinně působí nejen proti rakovinným buňkám, ale zároveň působí i na zdravé buňky, proto je spojen s množstvím vedlejších účinků, mezi které řadíme snížení imunity, ztrátu vlasů, nevolnost, zvracení. Dalšími, závažnějšími negativními účinky, může být odumření tkáně v místě vpichu, kardiologické komplikace a suprese kostní dřeně. Proto je důležité DAUN užívat pod přísným lékařským dohledem a v souladu s předepsanými dávkami. Před každým podáním DAUN se doporučuje laboratorní vyšetření krevního obrazu, jaterních a renálních funkcí, monitorování suprese kostní dřeně a screening kardiovaskulárních rizikových faktorů (Saleem & Kasi, 2022).

Z klinických studií vyplývá, že u pacientů léčených se s nelymfocytární leukémií DAUN způsobuje úplnou remisi ve 40-50 % případů a v kombinaci s cytarabinem dokonce v 53-65 % případů (Saleem & Kasi, 2022). V roce 2017 byla úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA)

schválena lipozomální forma DAUN, která se používá jako lék první volby u imunokompromitovaných pacientů s Kaposiho sarkomem (Petre & Dittmer, 2007).

2.3.2 Rezistence

Jedna z nejzávažnějších komplikací a selhání v léčbě nádorového onemocnění je schopnost tumorových buněk odolávat cytotoxickým účinkům ANT. Maligní buňky mohou být rezistentní vůči chemoterapii už při prvním podání. V tomto případě mluvíme o rezistenci primární (vrozené). Sekundární (získaná) rezistence potom vzniká až v průběhu léčby, kdy původně byly buňky k léčbě citlivé, ale v průběhu terapie si byly schopny vytvořit obranné mechanismy a jejich citlivost vůči ANT klesá a stávají se rezistentními. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují citlivost a vznik rezistence na protinádorová léčiva. Mezi ně patří mechanismy, které omezují množství léčiva, které se dostane do nádoru a mechanismy ovlivňující jeho mikroprostředí (Plebuch *et al.*, 2007).

Můžeme se však setkat i s případy zkřížené rezistence u léčiv, které se liší jak strukturálně, tak mechanismem účinku, nazýváme je tzv. mnohočetnou lékovou rezistencí (MDR), která je v případě DAUN a DOX poměrně častá (Nosková *et al.*, 2000; Skálová *et al.*, 2017).

Vznik MDR může být způsoben několika mechanismy. Jedním z nich je snížení akumulace léčiva v buňce. To může být například způsobeno zvýšeným vypuzováním léčiva z buněk pomocí efluxních transportérů patřících do rodiny ABC, do kterých řadíme zejména P-glykoprotein (Pgp), MRP2 (protein 2 spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí), LRP (protein rezistence rakoviny plic) a BCRP (protein rezistence rakoviny prsu). Dalším případem vzniku rezistence na léčiva je snížená exprese cílového proteinu. Některá léčiva působí tak, že se naváží na specifický cílový protein v nádorové buňce a tím zablokují jeho funkci, tudíž pokud buňka sníží množství onoho proteinu, může to vést ke snížené účinnosti. Buňka může mít zablokovanou svoji signální dráhu, tudíž může být aktivována alternativní, která umožní přežití a růst nádorové buňky, i když je blokován cílový protein. Rakovinové buňky také mohou v nádorech vytvářet prostorové bariéry, které brání adekvátnímu průtoku krve, čímž snižují účinnou expozici nádoru vůči léčivu. Nádorová heterogenita, je stav, kdy nádor obsahuje různé subpopulace s různými mutacemi a epigenetickými změnami. V tomto případě léčivo účinkuje pouze na určitou subpopulaci buněk a neúčinkuje na ostatní, což má za následek rezistenci na léčivo a možný relaps onemocnění. Dalším mechanismem může být mutace cílových molekul, na něž se ANT vážou. Navázání na cílovou molekulu je tak neúplné nebo zcela nemožné (Longley & Johnston, 2005).

Jako jednou z posledních možností rezistence na cytostatikum je zvýšená exprese enzymů, které ANT metabolizují, a tím snižují jejich účinnost. Nejzávažnější mechanismus rezistence na ANT je redukce na méně účinný C13-hydroxy metabolit (např. DAUNOL) pomocí karbonyl redukujících enzymů (CRE). CRE zahrnují dvě nadrodiny, a to aldo-ketoreduktasy (AKR) a dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR). Tyto enzymy jsou ve zvýšené míře exprimovány kolem lokalizace tumoru, snižují intracelulární koncentraci ANT a tím znemožňují úspěšnou léčbu onkologických pacientů (Tavares *et al.*, 2020; Sau *et al.*, 2010; Hofman *et al.*, 2014).

Mechanismů vzniku rezistence je hned několik a faktorů, které ovlivňují účinnost ANT je celá řada. Výzkum se aktuálně zaměřuje na způsoby, jak rezistenci na ANT překonat a trvale tak zlepšit účinnost nádorové terapie. Jedním z možných přístupů, jak takového cíle dosáhnout, je kombinování ANT s jinými léčivými, která mohou vzniku rezistence bránit nebo mohou riziko jejího vzniku alespoň snížit (Kizek *et al.*, 2012). Jedním ze způsobů, jak zvýšit účinnost ANT je kombinace se specifickými inhibitory. Kombinace ANT s inhibitory Pgp může vést ke zvýšené akumulaci ANT v nádorových buňkách a tím zvýšené účinnosti celé terapie (Hofman *et al.*, 2014), podobně jako kombinace inhibitoru CRE s ANT vede k snížení pravděpodobnosti vzniku chemorezistence a účinek protinádorové terapie se tak zvyšuje (Plebuch *et al.*, 2007).

2.1 Karbonyl redukující enzymy

Karbonylová redukce aldehydů, ketonů a chinonů na jejich odpovídající hydroxyderiváty patří do I. fáze biotransformace a hraje důležitou roli v metabolismu mnoha endogenních a xenobiotických sloučenin. Existuje mnoho typů CRE, které se liší svými vlastnostmi i strukturou. Patří mezi ně například aldehyd reduktasy, ketolasy, enoyl reduktasy a aldolasy. Aldehyd reduktasy redukují alkoholy a jsou významné v metabolismu glukózy. Ketolasy jsou schopny redukovat ketonové skupiny na alkoholy a jsou důležité v biosyntéze steroidů a vitamínů. Enoyl reduktasy redukují dvojnou vazbu v enolátech a hrají význam v biosyntéze mastných kyselin a aminokyselin. Aldolasy katalyzují redukci aldolové reakce, což je reakce mezi aldehydy a ketony, a jsou významné v metabolismu sacharidů (Plebuch *et al.*, 2007; Hoffman & Maser, 2007).

V léčbě nádorového onemocnění mají CRE zásadně negativní význam z toho důvodu, že redukují ANT. Výsledný alkoholový metabolit DAUNOL má o dost nižší protinádorovou účinnost, a navíc je zodpovědný za kardiotoxicitu (Plebuch *et al.*, 2007).

2.1.1 Aldo-ketoreduktasy

AKR jsou enzymy, které hrají důležitou roli v metabolismu sloučenin u různých živočichů, včetně člověka. Jsou to monomerní proteiny o velikosti 34-37 kDa, které využívají NADPH jako kofaktor a katalyzují redukční reakce, při kterých se aldehydy a ketony přeměňují na primární a sekundární alkoholy. Na rozdíl od alkoholdehydrogenas jsou reakce AKR spíše redukční než oxidační a jsou obvykle obousměrné. Jeden z hlavních rysů AKR spočívá v nízké substrátové selektivitě. Jsou klíčové pro detoxikaci xenobiotik, jako jsou pesticidy a léky, zatímco jiné jsou důležité pro metabolismus endogenních sloučenin, jako jsou steroidy a vitamíny (Penning, 2015).

AKR jsou rozděleny do rodin a nadrodin podle struktury a sekvence aminokyselin. Každý enzym má specifickou funkci v těle. AKR je základ, který symbolizuje funkci enzymu, tedy aldo-ketoreduktasu. Následuje arabská číslice pro označení rodiny enzymů, písmeno pro označení podrodin a další arabská číslice pro specifickou proteinovou sekvenci enzymu (Barski *et al.*, 2008).

Každý enzym je charakterizován stejným proteinovým záhybem, triosafosfátizomerasovým soudkovým motivem nebo $(\alpha/\beta)_8$ soudkem s inzercí několika dalších šroubovic. Na zadní straně soudku jsou tři velké smyčky, které definují specifickou substrátovou sekvenci (Penning, 2015).

Mutace v genech kódujících AKR mohou vést k různým onemocněním, včetně rakoviny a diabetu. Proto je studium těchto enzymů důležité pro pochopení jejich role v lidském zdraví a vývoji nových léčiv. U lidí bylo prozatím identifikováno 15 AKR, které se podílí na fyziologických i patologických procesech. Patří mezi ně enzymy s označením AKR a koncovkou 1A1, 1B1, 1B10, 1B1, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1D1, 1E2, 6A3, 6A5, 6A9, 7A2 a 7A3. Po celém světě existují programy pro blízké prozkoumání vlivu inhibice těchto enzymů spojených s vývojem různých onemocnění (Barski *et al.*, 2008).

AKR1A1

Tato aldehydredukasa je jednou z prvních objevených izoforem AKR. Jedná se o cytoplazmatický enzym, který je hojně exprimován v mnoha tkáních lidského těla, avšak nejvíce v proximálních tubulech ledvin. Tento enzym je znám nízkou substrátovou selektivitou. Je schopen přeměňovat různé typy sloučenin, včetně substrátů s negativně nabitou karboxylovou skupinou, steroidních aldehydů, aromatických aldehydů i malých tříuhlíkatých aldehydů. Významnou rolí AKR1A1 je detoxikace různých sloučenin, jako jsou aromatické,

heterocyklické sloučeniny a alkylující činidla, tím chrání organismus před zevními negativními účinky (Barski *et al.*, 2008).

Podílí se ale i na vývoji některých onemocnění, mezi které patří kardiovaskulární onemocnění, diabetická nefropatie a neurodegenerativní choroby (Barski *et al.*, 2008). Hraje roli v aktivaci prokarcinogenů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíkové trans-dihydrodioly, a v metabolismu různých xenobiotik a léčiv, včetně DOX a DAUN. Svoji negativní roli hraje i v oxidativním stresu (Bains *et al.*, 2008).

AKR1B1

Aldosareduktasa je z důvodu své potenciální role při zprostředkování hyperglykemického poškození a rozvoji druhotných diabetických komplikací jedním z nejstudovanějších enzymů z nadrodiny AKR. Dle Barski *et al.* (2018) je redukce glukózy pomocí AKR1B1 při hyperglykémii spojena s poškozením tkáně. Tento enzym také hraje významnou roli v proliferaci buněk hladké svaloviny cév během aterosklerózy a restenózy a navíc při zprostředkování mitogenní signalizace spouštěné růstovými faktory a cytokiny (Ramana *et al.*, 2002).

Enzym katalyzuje redukci nejen fyziologických substrátů, ale i některých xenobiotik. Mezi fyziologické substráty můžeme řadit AGE prekurzory (konečné produkty pokročilé glykace), konjugáty glutationu s nenasycenými aldehydy, isokortikosteroidy a produkty oxidace peroxidace lipidů (např. oxidované fosfolipidy). Produkty environmentálního znečištění, mezi které řadíme akrolein a jeho glutationový konjugát, řadíme mezi xenobiotika (Barski *et al.*, 2008).

AKR1B10

Aldosareduktasa tenkého střeva, jak již z názvu vyplývá, je exprimována především v tenkém a tlustém střevě, ale také v jaterní tkáni, nadledvinkách i thymu. Z tohoto důvodu nádorové tkáně zmíněných orgánů vykazují výrazně zvýšenou expresi proteinu AKR1B10. Aminokyselinová sekvence je z 71 % identická se sekvencí aldosaředuktasy (AKR1B1) a vykazuje velmi podobnou substrátovou specifitu a citlivost na inhibitor (Barski *et al.*, 2008).

Enzym AKR1B10 katalyzuje redukci alifatických a aromatických aldehydů, včetně konverze retinalů na retinoly, což má za následek nedostatek kyseliny retinové, důležité signální molekuly v buněčné diferenciaci a proliferaci. Také reguluje biosyntézu mastných kyselin a detoxikuje cytotoxické karbonyly (DiStefano & Davis, 2019). Ukázalo se, že inhibice genu

AKR1B10 pomocí siRNA vede k zástavě růstu kolorektálního karcinomu, což svědčí o zásadní roli enzymu v proliferaci nádorových buněk (Barski *et al.*, 2008).

AKR1C3

Lidská AKR1C3, neboli 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa, sdílí s ostatními geny AKR1C až 86 % homologie, avšak liší se svými biochemickými vlastnostmi. Enzym je exprimován v mnoha tkáních v těle, včetně prostaty, mléčné žlázy, plic a jater. Katalyzuje oxidoredukční transformace různých druhů substrátů (Barski *et al.*, 2008).

Má širokou substrátovou specifitu, přirozenými substráty jsou steroidy a prostaglandiny. Hraje klíčovou roli v metabolismu androgenů, které jsou důležité pro vývoj mužských pohlavních orgánů, zároveň přispívá k tvorbě estrogenu (ženského pohlavního hormonu). To ovšem znamená, že enzym hraje zásadní roli ve vzniku a progresi androgen a estrogen-dependentních onemocnění, jako je karcinom prsu, karcinom prostaty a benigní hyperplazie prostaty. Podílí se na produkci androgenů u kastrovaného rezistentního karcinomu prostaty a syndromu polycystických ovarií. Rovněž se uplatňuje na metabolismu xenobiotik, jako je redukce látek obsažených v tabákovém kouři. Hraje velmi významnou roli při inaktivaci protinádorového DOX a potenciálního cytostatika oracinu (Penning, 2019).

2.1.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

SDR jsou široce rozmanitou enzymovou skupinou, která obsahuje přes 600 tisíc členů, zahrnující enzymy z mnoha různých kategorií. Proteiny se z fylogenetického hlediska vzájemně odlišují, přestože spolu sdílí určité charakteristické rysy, jako je vazebné místo pro kofaktor a katalytická tetráda, jejich homologie je však menší než 20-30 %. Jsou založeny na podobných strukturálních motivech a katalytických mechanismech, které umožňují oxidaci nebo redukci krátkých organických molekul. Jsou přítomny u všech forem života, od primitivních buněk až po vyšší organismy. Mají malou molekulovou hmotnost (v rozmezí 20-30 kDa) a jsou závislé na NAD(H) i NADP(H) kofaktoru (Kallberg *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2020).

V lidském genomu bylo identifikováno 8 genů korespondujících s 48 SDR enzymy. Tyto enzymy jsou v nomenklaturním schématu řazeny následovně. Číslo rodiny je označováno písmenem, které specifikuje typ SDR enzymu. Existuje celkem šest různých typů SDR enzymů, z nichž dva nejčastější typy jsou "Classical" (C), mající základní strukturu kofaktorové vazebné části a katalytické tetrády a "Extended" (E), jejichž dodatečné strukturální prvky jim umožňují katalyzovat různé reakce. Další čtyři méně časté typy jsou označovány jako "Intermediate" (I),

“Divergent“ (D), “Complex“ (X) a “Atypical“ (A), kde všechny mají odlišné strukturní rysy a fungují v různých metabolických drahách. Všechny ostatní enzymy řadíme mezi “Unknown“ (U). Tento kódovací systém napomáhá při klasifikaci SDR enzymů na základě jejich strukturálních a funkčních charakteristik (Persson *et al.*, 2009).

Lidské SDR enzymy mají v organismu především funkci fyziologickou se širokým spektrem substrátů jako jsou steroidní hormony, alkoholy, sacharidy, prostaglandiny a retinoly. Mohou se ale podílet i na metabolismu cizorodých látek, například léčiv i toxických látek. V genech SDR byl zpozorován rostoucí počet genových polymorfismů a s ním spojená řada dědičných metabolických onemocnění. Mezi významné SDR enzymy, které se účastní metabolismu xenobiotik, zařazujeme karbonylreduktasy 1 a 3 z rodiny SDR21C (Persson *et al.*, 2009).

CBR1

Jedna z nejdůležitějších cytosolických reduktas je karbonylreduktasa 1. Funguje jako NADPH-dependentní oxidoreduktasa s širokou specifitou pro karbonylové skupiny v řadě endogenních sloučenin, jako jsou aldehydy, ketony a chinony, ale také i v řadě xenobiotik, včetně léků, pesticidů a karcinogenů. Enzym je široce exprimován ve většině tkání, ale vysoké hladiny tohoto enzymu nalezneme především v játrech, CNS a placentě (Gonzalez-Covarrubias *et al.*, 2007; Rashid *et al.*, 2010).

CBR1 má důležitou fyziologickou funkci, například se podílí na syntéze vitamínu K, metabolismu steroidních hormonů a detoxikaci různých cizorodých látek. Hraje také ochrannou roli před poškozením buněk při oxidativním stresu, neurodegeneraci a apoptóze. Mezi xenobiotika redukována enzymem CBR1 patří především *o*-chinony, *p*-chinony a ANT (DOX a DAUN) a další léčiva, jako je například antikoagulant warfarin nebo antipsychotikum haloperidol. Mutace genu pro CBR1 mohou zapříčinit vznik různých onemocnění, jako je diabetes nebo sklon k některým typům nádorového onemocnění (Gonzalez - Covarrubias *et al.*, 2007).

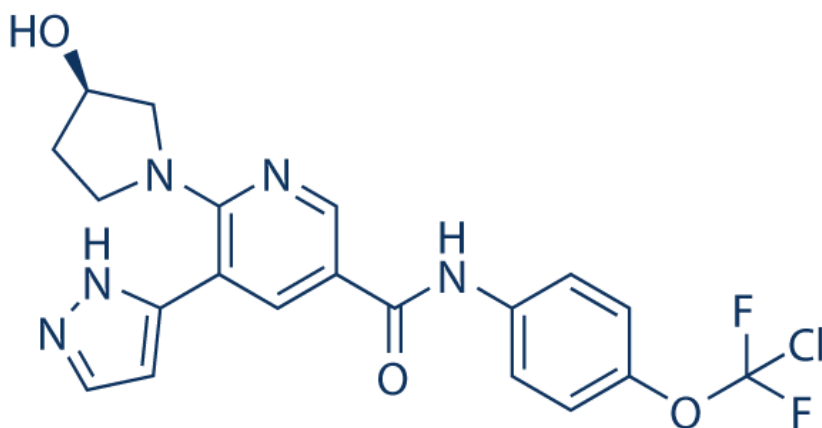
2.2 Inhibitory

Inhibice CRE je potenciálním terapeutickým cílem v léčbě nejruznějších onemocnění. Inhibice je biochemická reakce, kdy vazba inhibitoru způsobí snížení aktivity konkrétního enzymu, což způsobí omezení jeho funkčnosti. Jak už bylo psáno výše, CRE redukuje protinádorová léčiva ANT na méně účinný C13-hydroxy metabolit a tím mnohonásobně snižují

jejich účinnost. Inhibice enzymů pomocí konkrétního inhibitoru by tak mohla zvýšit účinnost ANT a tím i pravděpodobnost na vyléčení onkologického pacienta (Hofman *et al.*, 2014).

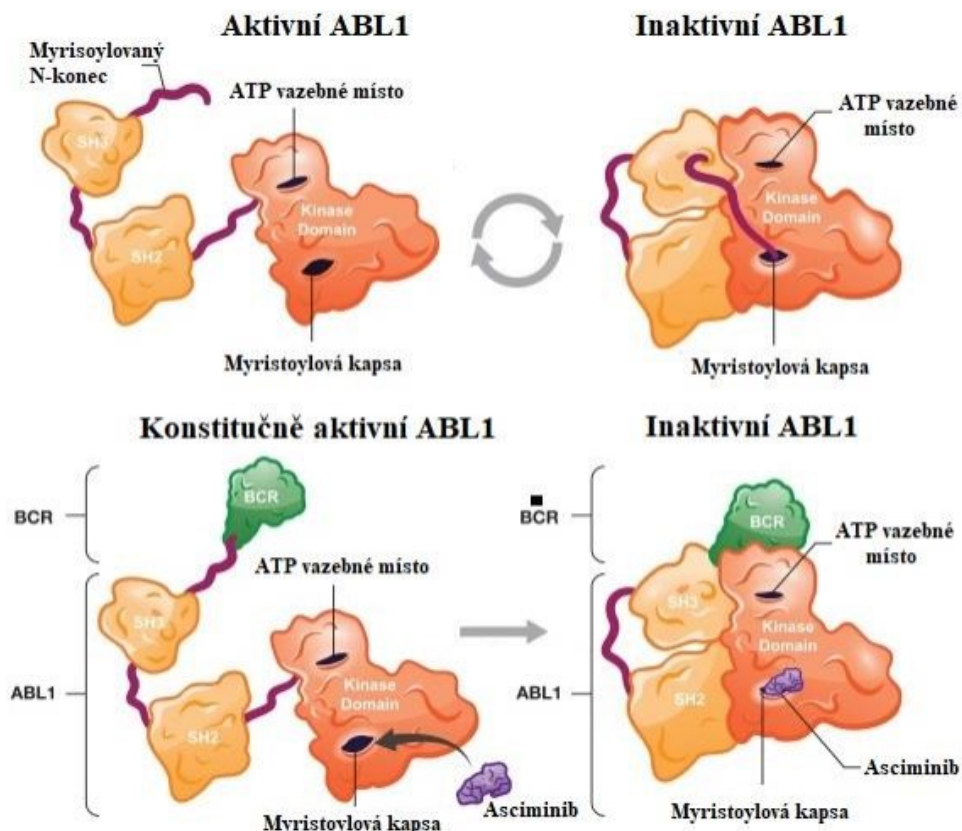
2.2.1 Asciminib

ASCI je výzkumná látka (struktura viz Obrázek 4), která alostericky nekompetitivně cílí na onkogen BCR-ABL1 s adenositrifosfátem (ATP). Za fyziologických podmínek je kinasa ABL1 regulována vazbou jejího myristoylovaného N-konce na myristoylovou kapsu. V případě CML dochází k poruše regulace z důvodu přítomnosti BCR-ABL1, který je konstitutivně aktivní. U léčby je tedy nutné přistoupit k vysoce specifickým adenosintrifosfát (ATP)-kompetitivním tirosinkasovým inhibitorům (TKI), které se vážou na ATP-vazebnou kapsu ABL1 a deaktivují enzym. Schválené TKI však přibližně u 15–20 % pacientů selhávají v důsledku rezistence nebo intolerance k terapii TKI. Prognóza je tak u pacientů velmi špatná (Lindström & Friedman, 2020).



Obrázek 4: Struktura ASCI (Selleckchem.com).

ASCI byl schválen v roce 2021 organizací FDA pro použití u pacientů trpících CML v chronické fázi, rezistentními na více než 2 TKI nebo u pacientů s mutací T315I (FDA, 2021). Tato mutace propůjčuje rezistenci všem schváleným TKI kromě ponatinibu, který je ale pro své vážné vedlejší účinky nevhodný. T315I inhibuje vazbu TKI tím, že se stericky střetává s většinou léků, jelikož je umístěn u vstupu do kapsy vázající ATP (Lindström & Friedman, 2020). ASCI se však váže silně a specificky na myristoylovou kapsu ABL1 a tím inhibuje ABL kinasu (viz Obrázek 5) (Réa & Hughes, 2022). V klinických studiích ukázal silnou účinnost u pacientů s mutací T315I i bez ní a vykazoval významně vyšší molekulární odpověď a lepší bezpečnost než ATP-kompetitivní bosutinib (Choi, 2023; Hochhaus *et al.*, 2023).



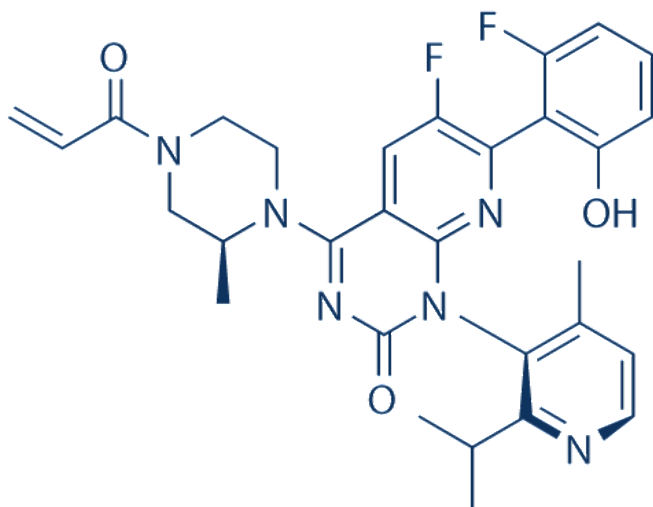
Obrázek 5: Mechanismus účinku ASCI (Réa & Hughes, 2022).

Nejčastějšími případnými nežádoucími účinky jsou infekce horních cest dýchacích, muskuloskeletální bolest, únava, nevolnost, vyrážka a průjem. Nejčastějšími laboratorními abnormalitami je snížený počet trombocytů neutrofilů i hemoglobinu a zvýšené hodnoty triglyceridů, kreatinkinasy, alaninaminotransferasy (ALT), lipasy a amylasy. Doporučená denní dávka ASCI u pacientů s chronickou fází CML je 80 mg ASCI užívaného perorálně jednou denně ve stejnou dobu každý den nebo 40 mg dvakrát denně po 12h intervalech. Doporučená denní dávka u pacientů s CML a mutací T315I je 200 mg perorálně dvakrát denně ve 12h intervalech. ASCI se prodává pod názvem Scemblix (FDA, 2021).

2.2.2 Sotorasib

Sotorasib (SOT, struktura viz Obrázek 6) je inhibitor KRAS, nejčastěji mutovaného onkogenu u nádorových onemocnění. Mutace KRAS G12C se vyskytuje zhruba u 13 % pacientů s karcinomem plic, 3 % pacientů s kolorektálním karcinomem a u 2 % pacientů s jinými solidními nádory (Blair, 2021). Inaktivace KRAS blokuje signalizaci a přežití tumorové buňky, inhibuje buněčný růst a dochází k apoptóze, SOT se váže kovalentně a

ireverzibilně na cysteinový zbytek mutovaného KRAS G12C a je metabolizován neenzymatickou konjugací s CYP3A (Blair, 2021).

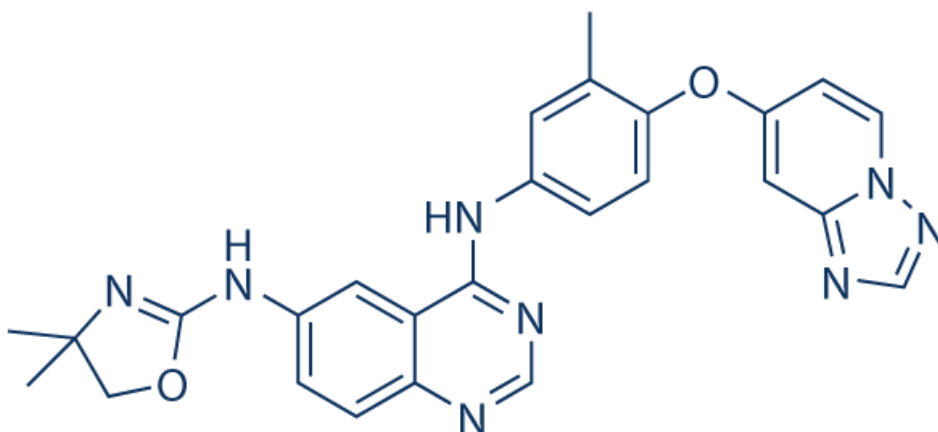


Obrázek 6: Struktura SOT (Selleckchem.com).

SOT byl v květnu roku 2021 schválen organizací FDA pro léčbu dospělých pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým neoperabilním nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s mutací KRAS G12C, kteří postoupili minimálně jednu předchozí systémovou léčbu. Na trh se dostává pod obchodním názvem Lumakras a v Evropské unii pod názvem Rybrevant. Doporučená denní dávka je 960 mg perorálně jednou denně až do progresu onemocnění nebo nepřijatelné toxicity, avšak kvůli nežádoucím účinkům mohou být nutné úpravy dávkování (FDA, 2021). Mezi nejčastější nežádoucí účinky řadíme snížení lymfocytů a hemoglobinu, zvýšení aspartátaminotransferasy (AST), ALT a alkalické fosfatasy (ALP), snížení vápníku, únava, nevolnost, hepatotoxicita, kašel, muskuloskeletární bolest a průjem (Blair, 2021).

2.2.3 Tucatinib

Tucatinib (TUC), nebo také irbinitinib (struktura viz Obrázek 7), je malomolekulární selektivní inhibitor lidského epidermálního růstového faktoru (HER2). Používá se v druhé linii léčby u pacientek s karcinomem prsu a u pacientů s kolorektálním karcinomem. TUC byl v lednu roku 2023 schválen společností FDA v kombinaci s trastuzumabem a kapecitabinem (FDA, 2023).



Obrázek 7: Struktura TUC (Selleckchem.com).

Problémem ostatních TKI zaměřených na HER2 je, že účinkují i mimo cílový receptor, což vede k nežádoucím účinkům jako je těžký průjem a kožní problémy. TUC je ATP-kompetitivní vysoce selektivní inhibitor pro receptor HER2 a zároveň také jen minimálně inhibuje jiné receptory rodiny HER, čím pomáhá zpomalit růst a šíření rakovinových buněk s minimem vedlejších účinků (Curiliano *et al.*, 2021).

HER2 má sklon k metastazování do mozku, což komplikuje možnosti léčby, jelikož velké molekuly monoklonálních protilátek nepronikají skrze hematoencefalickou bariéru (Kiss *et al.*, 2023). HER2 je specializovaný protein, který se účastní fyziologického růstu a diferenciací buněk. Abnormální hladiny HER2 můžeme najít při patologických procesech, jako je právě zmiňovaný adenokarcinom prsu nebo vaječníků, močového měchýře či žaludku. Tento protein se pojí se zvýšenou recidivou a špatným prognostickým faktorem pro přežití (Albaqoush & Limaiem, 2022).

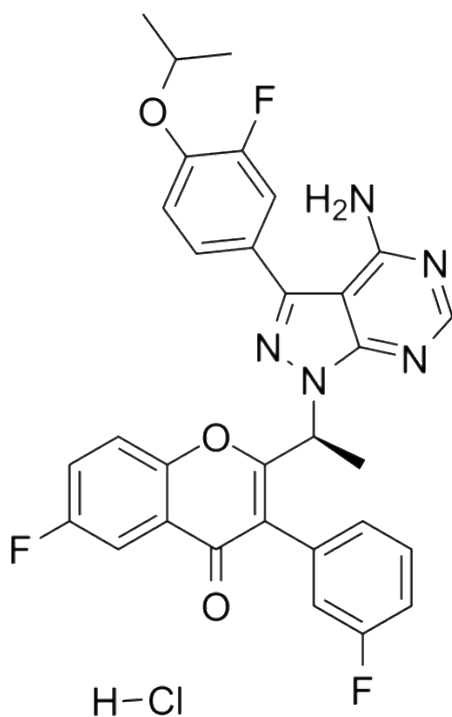
Tucatinib se pod obchodním názvem Tukysa používá pro pacientky s přítomností HER2 lokálně pokročilým nebo metastazujícím karcinomem prsu, které prošly alespoň dvěma předchozími anti-HER2 léčbami (například kombinace trastuzumab-pertuzumab-taxan), nebo pro metastatický kolorektální karcinom, který progredoval i po léčbě fluoropyrimidinem, oxaplatinou a irinotekanem (Kiss *et al.*, 2023; FDA, 2023).

Doporučená denní dávka je 300 mg perorálně dvakrát denně v kombinaci s trastuzumabem a kapecitabinem až do progresu onemocnění. Nejčastějšími nežádoucími účinky mohou být průjem, únava, vyrážka, nevolnost, bolest břicha a zvýšená teplota. Často vyskytujícími abnormálními laboratorními výsledky mohou být snížený počet leukocytů a hemoglobinu,

zvýšený kreatinin, glukóza, ALT, bilirubin, ALP a snížený albumin a sodík (Curiliano *et al.*, 2021).

2.2.4 Umbralisib hydrochlorid

Umbralisib hydrochlorid (UMH, struktura viz Obrázek 8) je inhibitor fosfatidyl 3-kinasy delta (PI3K δ) a kaseinasy 1 epsilon (CK1 ϵ) a byl používán v léčbě refrakterních a rekurentních lymfomů okrajové zóny (MZL) a folikulárního lymfomu (FL) od schválení agenturou FDA v roce 2021 až do roku 2022, kdy FDA své povolení stáhla kvůli závažným negativním účinkům. FL a MZL patří do skupiny indolentních non-Hodgkinových lymfomů. Postihují lymfatický systém a vznikají z abnormálních B-lymfocytů (vykazující pozitivitu CD 20+) (Česká onkologická společnost J.E.P.).



Obrázek 8: Struktura UMH (Selleckchem.com).

PI3K δ je expresí omezena pouze na buňky hematopoetického původu, je vysoce exprimována v leukocytech a hraje zásadní roli ve vývoji a funkci B-lymfocytů. Dle Fowler *et al.* (2021) UMH silně inhibuje izoformy PI3K δ v klinicky dosažitelných koncentracích. Vykazuje více než 1500krát větší selektivitu pro PI3K δ než u izoform α a β a 225krát větší selektivitu oproti γ -izoformě. Zatímco jiné inhibitory PI3K δ byly omezeny špatnou dlouhodobou snášenlivostí a toxicitou, UMH vykazoval v klinických studiích větší bezpečnost a zvýšenou selektivitu vůči PI3K δ . Po podání jedné dávky UMH zdravým pacientům je střední doba dosažení maximální plazmatické koncentrace zhruba 4h. Inhibitor je *in vitro*

metabolizován především izoformami enzymů CYP450 (včetně CYP2C9, CYP3A4 a CYP1A2) (Dhillon & Keam, 2021).

Pod obchodním názvem Ukoniq byl UMH používán pro léčbu dospělých pacientů s MZL, kteří podstoupili minimálně jeden předchozí režim terapie na bázi anti-CD20, a u pacientů s FL, kteří podstoupili více než 3 předchozí systémové léčby. Stal se také ideální volbou pro pacienty nezpůsobilé k léčbě imunochemoterapií kvůli pokročilému věku. Doporučená denní dávka byla 800 mg UMH jednou denně (Dhillon & Keam, 2021).

Bohužel kvůli obavám o bezpečnost byl Ukoniq v červnu roku 2022 stažen společností FDA. Klinické studie prokazovaly, že rizika léčby převažují nad přínosy. Mezi nežádoucí účinky patří průjem nebo kolitida a hyperglykémie. Vyskytovaly se i podezření o možném zvýšeném riziku úmrtí u pacientů užívajících Ukoniq v kombinaci s monoklonálními protilátkami (FDA, 2022).

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem *in vitro* experimentů bylo zjistit, zda vybrané inhibitory, konkrétně ASCI, SOT, TUC a UMH, mají výrazný inhibiční účinek na CRE, a to na AKR1C3, 1A1, 1B1, 1B10 a CBR1, vůči substrátu DAUN.

Jednotlivé kroky experimentu zahrnovaly:

- Základní screening inhibitorů ASCI, SOT, TUC a UMH vůči reductasám AKR1C3, 1A1, 1B1, 1B10 a CBR1.
- Vyhodnocení inhibičního vlivu inhibitorů CRE a další práce s inhibitorem s největším inhibičním potenciálem.
- Stanovení poloviční inhibiční koncentrace (IC₅₀) vybraného inhibitoru.
- Stanovení typu inhibice a inhibiční konstantu (K_i) vybraného inhibitoru.

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Acetonitril (HPLC LC-MS grade, VWR, USA)

Asciminib (MedChemExpress, USA)

Daunorubicin (Selleckchem, USA)

Dimethylsulfoxid (research grade, Serva, Německo)

Enzymy: AKR1C3, 1B10, 1A1, 1B1, CBR1 (Katedra biochemických věd, Hradec Králové, Česká republika)

Glukóza-6-fosfát (Roche Diagnostics, Německo)

Glukóza-6-fosfát dehydrogenasa (Roche Diagnostics, Německo)

Kyselina mravenčí (LC-MS grade, VWR, USA)

Methanol (HPLC gradient grade, Honeywell, USA)

MgCl₂ (Lachema, Česká republika)

NADP (Roche Diagnostics, Německo)

NaH₂PO₄·2H₂O (Penta, Česká republika)

Na₂HPO₄·12H₂O (Penta, Česká republika)

Sodno-fosfátový pufr (0,1M; pH 7,4; Katedra biochemických věd, Hradec Králové, Česká republika)

Sotorasib (MedChemExpress, USA)

Tucatinib (MedChemExpress, USA)

Ultračistá voda (0,055 μS; Katedra biochemických věd, Hradec Králové, Česká republika)

Umbralisib hydrochlorid (MedChemExpress, USA)

4.1.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy (Sartorius CP225D, Německo)

Centrifuga (MiniSpin plus, Eppendorf, Německo)

Injekční stříkačka a jehla (Terumo, Japonsko)

Mikrozkumavky 0,5; 1,5 a 2 ml (Eppendorf, Německo)

Nádoba s ledem

Pipety a špičky 0,5 – 1000 μ l (Biohit, Finsko)

Rukavice

Stojánek na zkumavky

Stříkáčkový filtr s 0,2 μ M PTFE membránou (Whatman, Velká Británie)

Termoblok (ThermoMixer C, Eppendorf, Německo)

Ultrazvuková vana (Ultrasoniccleaner120T, Anonkia Ultrasonic, Čína)

UHPLC Agilent Technologies 1290 Infinity (USA)

- binární pumpa (1290 Bin Pump VL, G4220B)
- autosampler (1290 Sampler, G4226A)
- termostatovaná kolona (1290 TCC, G1316C)
- detektor diodového pole (1260 DAD, G4212B)
- fluorescenční detektor (1260 FLD, G1321B)

UHPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II(USA)

- pumpa (1260 Flexible Pump, G7104C)
- autosampler (1260 Vialsampler, G7129C)
- kolona: RRHD Eclipse Plus C18, 2.1x50mm, 1.8 μ
- fluorescenční detektor (1260 FLD, G7121A)
- detektor s diodovým polem (DAD, G1315B)
- UV-VIS detektor (1260 VWD, G7114A)

Vialky s inserty a víčky (Agilent, USA)

Vortex (Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA)

4.1.3 Příprava roztoků

DAUN o koncentraci 5 mM vznikl rozpuštěním 1,41 mg v 500 μ l ultračisté vody.

0,1M chlorid hořečnatý ($MgCl_2$) vznikl rozpuštěním 1,02 g v 50 ml ultračisté vody.

0,1M sodno-fosfátový pufr (NaPB) vznikl přípravou dvou roztoků. První roztok vznikl rozpuštěním 3,58 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ve 100 ml ultračisté vody a druhý rozpuštěním 0,39 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 25 ml ultračisté vody. Roztoky se smíchaly tak, aby bylo pH 7,4.

4.2 Metodika

4.2.1 Screening jednotlivých inhibitorů

Nejprve se přistoupilo k základnímu screeningu a testoval se inhibiční efekt čtyřech vybraných inhibitorů, a to ASCI, SOT, TUC a UMH, k jednotlivým enzymům (AKR1C3, 1B10, 1A1, 1B1 a CBR1). Pro přípravu reakční směsi (viz Tabulka 3) se testovala neinhibovaná reakce (NI), tedy reakce bez přídavku inhibitoru, dále kontrola dimethylsulfoxidu (DMSO), aby se zajistilo, že jakýkoli pozorovaný vliv testované látky je skutečně způsoben samotnou látkou, nikoli pouze rozpouštědlem. Následně se zkoumal vliv inhibitoru o finální koncentraci 10 μ M (INH10) a inhibitoru o finální koncentraci 50 μ M (INH50). Nakonec se přistoupilo ke kontrole bez enzymu (bE) a kontrole bez substrátu (bS). Každá reakce se testovala v triplicátech. Kontrola bS a bE probíhala ve dvou opakováních.

Tabulka 3: Příprava reakční směsi

	NaPB (μ l)	Enzym (μ l)	Regenerační systém (μ l)	Inhibitor (μ l)	DAUN (μ l)
NI	60	10	20	0	10
DMSO	58	10	20	2 (DMSO)	10
INH10	58	10	20	2	10
INH50	58	10	20	2	10
bE	70	0	20	0	10
bS	60	10	20	0	10 (H ₂ O)

4.2.1.1 Regenerační systém

Regenerační systém (RS) je směs chemikálií používaných pro regeneraci NADPH, důležitého kofaktoru pro činnost CRE. RS se připravoval čerstvý před každou inkubací a množství se vypočítalo dle celkového počtu reakcí (viz Tabulka 4). Na analytických váhách se přímo do plastové mikrozkušavky zvažily NADP a Glc-6-P. Následně se přidaly NaPB a 0,1M MgCl₂. Úplně nakonec, těsně před použitím, se přidala Glc-6-P-dehydrogenasa.

Tabulka 4: Příprava RS pro jednu reakci

NADP	0,2 mg
Glc-6-P	0,6 mg
NaPB	10 µl
0,1M MgCl ₂	10 µl
Glc-6-P-dehydrogenasa	0,5 µl (těsně před použitím)

4.2.1.2 Enzym

Rekombinantní lidské AKR a CBR (viz Tabulka 5) byly připraveny v expresním systému *E. coli* na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzita Karlova. Byly naředěny na požadovanou zásobní koncentraci v 0,1M draselno-fosfátovém pufru a 20 % glycerolu. Uchovávány jsou v mrazícím boxu při teplotě -80 °C (případně -20 °C). Před použitím bylo koncentraci enzymu nutné naředit NaPB dle směšovací rovnice.

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

kde c_1 je zásobní koncentrace enzymu (mg/ml), V_1 objem zásobního roztoku – neznámá hodnota (µl), c_2 koncentrace připravovaného pracovního roztoku (mg/ml) a V_2 celkové množství zředěného enzymu (µl).

Tabulka 5: Seznam a množství vybraných enzymů v reakci

Enzym	Množství (μg/reakci)
AKR1C3	1,5
AKR1B10	5,0
AKR1B1	5,0
AKR1A1	1,0
CBR1	0,2

4.2.1.3 Inhibitor

K základnímu screeningu byly použity inhibitory ASCI, SOT, TUC a UMB. Zásobní roztoky jednotlivých inhibitorů o koncentraci 50 mM byly připraveny rozpuštěním 5 mg konkrétního inhibitoru v DMSO (viz Tabulka 6) a uchovávány v mrazicím boxu o teplotě -80 °C. Zásobní roztoky inhibitorů o koncentraci 10 mM byly ještě dále naředěny DMSO a uchovávány ve 0,5 ml eppendorf zkumavkách při -80 °C (případně -20 °C).

Objem DMSO přidáný k inhibitorům byl vypočítán dle vztahu:

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

kde m je hmotnost sytkého inhibitoru (mg), c je požadovaná koncentrace inhibitoru (mM), V je objem finálního produktu (μl, neznámá hodnota) a M je molekulární hmotnost inhibitoru (g/mol).

Tabulka 6: Příprava zásobních inhibitorů o koncentraci 50 mM

Inhibitor (5 mg)	Objem DMSO (μl)
ASCI	222,3
SOT	178,4
TUC	208,1
UMB	164,5

Inhibitor byl ze své zásobní koncentrace (10 mM) naředěn na pracovní koncentrace (500 a 2500 μM). Objem jednotlivých inhibitorů v poměru s DMSO byl spočítán dle následující směšovací rovnice.

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

kde c_1 je koncentrace zásobního roztoku (μM), V_1 objem zásobního roztoku (μl), c_2 koncentrace pracovního roztoku (M) a V_2 požadovaný objem pracovního roztoku (μl).

4.2.1.4 Vlastní inkubace

Do nadepsaných zkumavek se postupně rozpipetovalo NaPB, RS, inhibitor a enzym. Jednotlivé zkumavky se řádně zvortexovaly a následně zcentrifugovaly. Po promíchání následovala preinkubace v termobloku po dobu 10min při 37 °C. Reakce se startovala přidáním substrátu. Substrát (DAUN o finální koncentraci 500 μM v reakci) se přidával do jednotlivých zkumavek po 30s intervalech a následně se reakční směs krátce zvortexovala před vrácením zpět do termobloku. Samotná reakce pro enzymy AKR1C3, 1B10, 1A1 a 1B1 probíhala v jedné zkumavce 30min při 37 °C. Reakce enzymu CBR1 byla testována při 37 °C po dobu 20min. Po inkubaci se reakce zastavila přidáním 300 μl MetOH a uložením do chladu (nádoba s ledem a následně mrazící box při -20 °C). Po 30min v chladu se zkumavky s precipitátem zcentrifugovaly na 10min při 12100 \times g. Pomocí injekční stříkačky a stříkačkového filtru se zbavil zkoumaný vzorek nečistot, přefiltroval se do vialek s inserty a následovala UHPLC analýza.

4.2.1.5 UHPLC

Vzorky z experimentu byly měřeny pomocí ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie (UHPLC). UHPLC je vysoce výkonná technika kapalinové chromatografie, která slouží k analýze složitých směsí chemických látek. Součástí systému je vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje průtok mobilní fáze kolonou se stacionární fází vázanou na částice v koloně.

Měření probíhalo na přístrojích Agilent 1290 Infinity a Agilent 1260 Infinity II s fluorescenční detekcí (FLD). Podmínky obou přístrojů byly nastaveny na průtok 0,7 ml/min, přičemž nástřik na kolonu byl 5 μl . Doba jedné analýzy trvala 5min. Mobilní fáze byla směsí 0,1 % HCOOH s acetonitrilem v objemovém poměru 74:26. Pro separaci byla použita kolona

RRHD Eclipse Plus C18 s velikostí částic 1,8 μm a rozměrech 2,1 \times 50 mm, eluce izokratická. FLD byl nastaven na excitační vlnovou délku 480 nm a emisní vlnovou délku 560 nm.

Díky použití směsného standartu DAUN a DAUNOL bylo následně možné stanovit produkt enzymatické reakce DAUNOL. Kvalitativní vyhodnocení produktu bylo posouzeno na základě hodnoty retenčního času. Kvantitativní vyhodnocení se stanovovalo pomocí porovnání plochy chromatografického píku s kalibrační křivkou.

4.2.2 Stanovení IC50

IC50 se stanovovala u inhibitoru, kde byla zaznamenána výrazná inhibice vůči alespoň jednomu z enzymů (v tomto případě u ASCI a enzymu AKR1C3). Zvolil se koncentrační rozsah 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200 μM , aby bylo zahrnuto celé inhibiční spektrum ASCI.

Jednotlivé koncentrace byly připraveny ředěním roztoku s vyšší koncentrací s DMSO. Pro nejvyšší koncentraci (200 μM ASCI v reakci) byl použitý 10 mM zásobní roztok ASCI. Inkubační podmínky a koncentrace DAUN v reakci byly stejné jako u základního screeningu.

4.2.3 Stanovení Ki

Pro dvojici ASCI a enzym AKR1C3 byly testovány 4 rozdílné koncentrace inhibitoru, a to nulová (kontrola DMSO), 10, 20 a 40 μM s šesti různými koncentracemi substrátu (200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM).

Nejvyšší koncentrace DAUN (2000 μM) byla připravena rozpuštěním 0,0158 g v 1400 μl destilované vody. Každá koncentrace DAUN byla zhotovena ředěním roztoku s vyšší koncentrací destilovanou vodou.

Podobným způsobem byly připraveny i koncentrace inhibitoru, a to ředěním roztoku s vyšší koncentrací pomocí DMSO. Nejvyšší koncentrace inhibitoru ASCI (40 μM) se připravila ředěním 16 μl zásobního ASCI o koncentraci 10 mM s 64 μl DMSO.

Testovala se tedy každá koncentrace inhibitoru s každou koncentrací substrátu. Inkubační podmínky byly stejné jako u základního screeningu a IC50.

4.2.4 Zpracování dat

Z jednotlivých výsledků z UHPLC byla dále vypočítána specifická aktivita, a to díky vzorci:

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

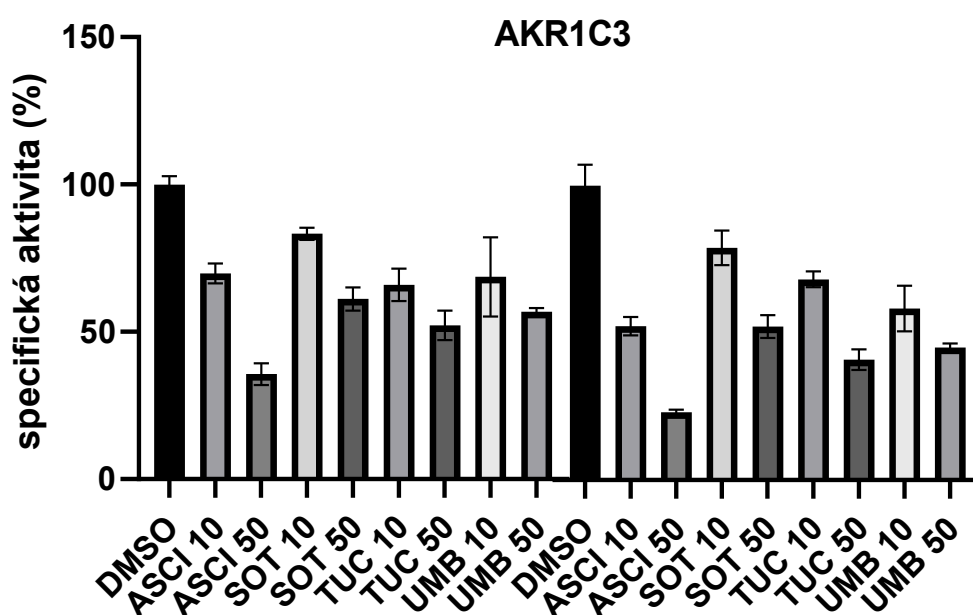
kde a je specifická aktivita (nmol/mg/min), m je hmotnost DAUNOL (ng), K je koeficient zředění (na UHPLC je nástřik 400 μ l, nástřik na kolonu je 5 μ l, tudíž se získá jen 1/80 celkové hmotnosti DAUNOL = 80), t je čas inkubace (20min u CBR1, u ostatních 30min), c je množství enzymu na reakci (μ g/reakci), Mr je molární hmotnost DAUNOL (529,54 g/mol) a násobek 1000 \times je z důvodu převodu jednotek.

Dále se výsledky zpracovávaly v programu GraphPad Prism 9, který byl použitý také k výpočtu hodnot IC50, Ki a k sestrojení jednotlivých grafů.

5 VÝSLEDKY

5.1 Základní screening

Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů (ASCI, SOT, TUC a UMH) jsou postupně graficky i číselně zobrazeny níže, dle enzymu, s kterým inkubace probíhala. Výsledky experimentů s enzymem AKR1C3 jsou prezentovány na Obrázku 9 a v Tabulce 7. Ze všech testovaných inhibitorů prokázal největší aktivitu inhibitor ASCI. Dosažená specifická aktivita zde dosahovala v průměru dvou měření hodnoty $116,4 \pm 9,6$ nmol/mg/min při 10 μ M koncentraci inhibitoru v reakci a $55,7 \pm 8,6$ nmol/mg/min při 50 μ M koncentraci, což je inhibice v průměru až o 38,9 %, respektive 70,7 %. Ostatní inhibitory měly na AKR1C3 také statisticky významný vliv. Inhibiční účinek TUC a UMH byl velmi podobný. V průměru dvou měření byla specifická aktivita TUC $129,2 \pm 10,2$ nmol/mg/min při 10 μ M a $88,9 \pm 5,4$ nmol/mg/min při 50 μ M, což je inhibice o 32,9 %, respektive o 53,5 %. UMH měl naměřenou specifickou aktivitu v průměru dvou měření $121,5 \pm 2,4$ nmol/mg/min při 10 μ M a $97,3 \pm 5,2$ nmol/mg/min při 50 μ M, což je inhibice o 36,6 % respektive o 49,1 %. Ze čtveřice testovaných inhibitorů měl nejmenší vliv na aktivitu AKR1C3 inhibitor SOT. Jeho průměrná specifická aktivita činila $155,8 \pm 5,6$ nmol/mg/min při 10 μ M a $108,5 \pm 1,9$ nmol/mg/min při 50 μ M koncentraci, což je inhibice v průměru o 18,9 %, respektive 43,3 %.



Obrázek 9: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr \pm směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. DMSO sloužilo jako kontrola s nulovou koncentrací inhibitoru. Hodnoty specifické aktivity testovaných inhibitorů byly

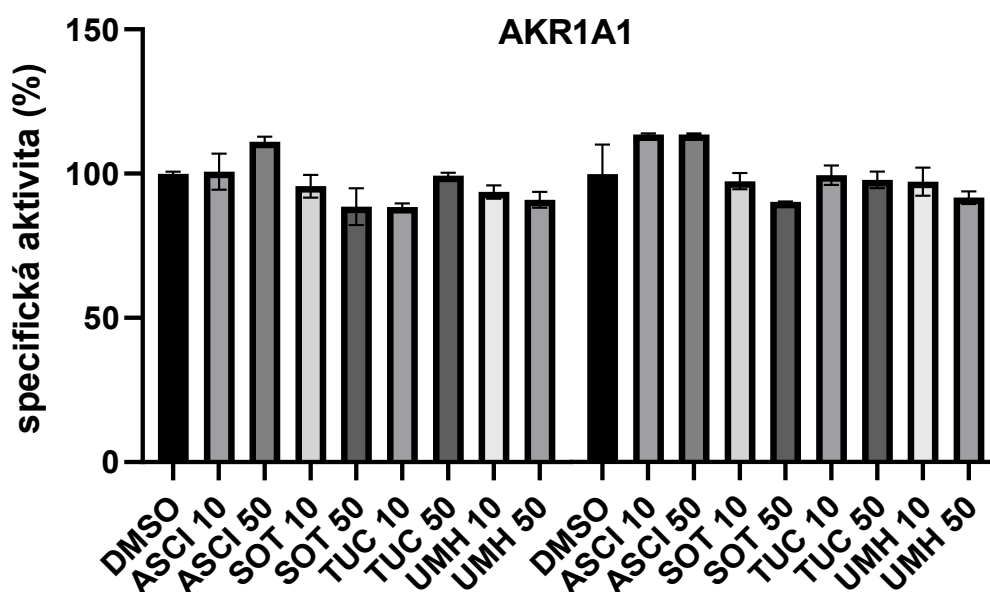
vztaženy k hodnotě DMSO kontroly. **ASCI** asciminib, **SOT** sotorasib, **TUC** tucatinib, **UMB** umbralisib hydrochlorid, **10** 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace inhibitoru v reakci.

Tabulka 7: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr \pm směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. Hodnota p je vztažena ke kontrole DMSO (reakce s nulovou koncentrací inhibitoru). ns p > 0,05, * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001 a **** p \leq 0,0001.

<u>AKR1C3</u>	Koncentrace inhibitoru v reakci (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	p hodnota
DMSO	0	180,4 \pm 3,5 204,3 \pm 12,0	100 100	- -	- -
Asciminib	10	126,0 \pm 5,0 106,8 \pm 5,2	69,9 \pm 2,8 52,3 \pm 2,5	30,1 \pm 2,8 47,7 \pm 2,5	** ****
	50	64,3 \pm 5,4 47,1 \pm 1,6	35,7 \pm 3,0 23,0 \pm 0,8	64,3 \pm 3,0 77,0 \pm 0,8	**** ****
Sotorasib	10	150,2 \pm 2,7 161,3 \pm 9,8	83,3 \pm 1,5 79,0 \pm 4,8	16,7 \pm 1,5 21,0 \pm 4,8	ns **
	50	110,3 \pm 5,8 106,6 \pm 6,5	61,2 \pm 3,2 52,2 \pm 3,2	38,8 \pm 3,2 47,8 \pm 3,2	*** ****
Tucatinib	10	119,0 \pm 7,0 139,4 \pm 4,5	66,0 \pm 3,9 68,3 \pm 2,2	34,0 \pm 3,9 31,7 \pm 2,2	** ****
	50	94,2 \pm 7,4 83,5 \pm 5,8	52,2 \pm 4,1 40,9 \pm 2,9	47,8 \pm 4,1 59,1 \pm 2,9	**** ****
Umralisib hydrochlorid	10	123,8 \pm 19,9 119,1 \pm 12,9	68,6 \pm 11,0 58,3 \pm 6,3	31,4 \pm 11,0 41,7 \pm 6,3	** ****
	50	102,5 \pm 1,8 92,1 \pm 2,3	56,8 \pm 1,0 45,1 \pm 1,1	43,2 \pm 1,0 54,9 \pm 1,1	**** ****

Výsledky experimentů s enzymem AKR1A1 jsou zobrazeny na Obrázku 10 a v Tabulce 8. Ani jeden z testovaných inhibitorů neměl na enzym statisticky významný vliv. V žádném z případů nedošlo k inhibici větší než 12 %. Konkrétně u inhibitoru SOT to byla inhibice v průměru o 3,4 % při 10 μM koncentraci inhibitoru v reakci, respektive o 10,6 % při 50 μM koncentraci. TUC inhiboval enzym pouze o 6 %, respektive 1,4 % a UMH průměrně o 4,4 %, respektive 8,6 %.

Výsledky naznačují, že ASCI nejenom že enzym neinhiboval, ale dokonce došlo k jeho aktivaci. Aktivace proběhla v případě obou měření jak při koncentraci 10 μM tak při 50 μM .



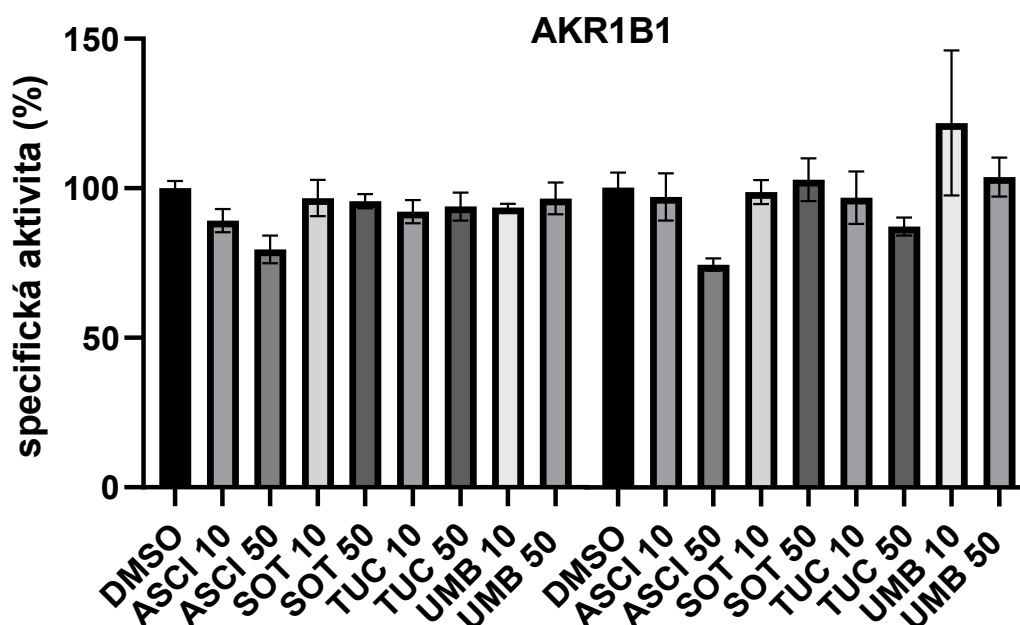
Obrázek 10: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1A1 – grafické zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr ± směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. DMSO sloužilo jako kontrola s nulovou koncentrací inhibitoru. Hodnoty specifické aktivity testovaných inhibitorů byly vztaženy k hodnotě DMSO kontroly. ASCI asciminib, SOT sotorasib, TUC tucatinib, UMB umbralisib hydrochlorid, 10 10 μmol/l koncentrace inhibitoru v reakci, 50 50 μmol/l koncentrace inhibitoru v reakci.

Tabulka 8: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1A1 – číselné zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr ± směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. Hodnota p je vztažena ke kontrole DMSO (reakce s nulovou koncentrací inhibitoru). ns p > 0,05, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 a **** p ≤ 0,0001.

AKR1A1	Koncentrace inhibitoru v reakci (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	p hodnota
DMSO	0	358,0 ± 1,6	100	-	-
		257,5 ± 21,5	100	-	-
Asciminib	10	360,6 ± 18,4	100,7 ± 0,4	-	ns
	50	292,6 ± 0,9	113,6 ± 0,3	-	*
Sotorasib	10	397,7 ± 5,3	111,1 ± 1,5	-	*
	50	292,8 ± 0,6	113,7 ± 0,2	-	*
Sotorasib	10	342,5 ± 11,6	95,7 ± 3,2	4,3 ± 3,2	ns
	50	251,0 ± 5,9	97,5 ± 2,3	2,5 ± 2,3	ns
Tucatinib	10	317,2 ± 18,8	88,6 ± 5,2	11,4 ± 5,2	*
	50	232,5 ± 0,3	90,3 ± 0,1	9,7 ± 0,1	ns
Tucatinib	10	316,6 ± 3,3	88,4 ± 0,9	11,6 ± 0,9	*
	50	256,3 ± 7,2	99,6 ± 2,8	0,4 ± 2,8	ns
Umbralisib hydrochlorid	10	355,7 ± 2,5	99,3 ± 0,7	0,7 ± 0,7	ns
	50	252,3 ± 6,0	98,0 ± 2,3	2,0 ± 2,3	ns
Umbralisib hydrochlorid	10	335,2 ± 6,9	93,6 ± 1,9	6,4 ± 1,9	ns
	50	250,6 ± 10,3	97,3 ± 4,0	2,7 ± 4,0	ns
Umbralisib hydrochlorid	10	325,7 ± 8,1	91,0 ± 2,3	9,0 ± 2,3	ns
	50	236,3 ± 4,7	91,8 ± 1,9	8,2 ± 1,9	ns

Výsledky inkubace vybraných inhibitorů a enzymu AKR1B1 jsou prezentovány na Obrázku 11 a v Tabulce 9. Zde podobně jako u enzymu AKR1A1 u žádného z inhibitorů nedošlo ke statisticky významné inhibici. V případě ASCI byla naměřena průměrná specifická aktivita $10,9 \pm 2,4$ nmol/mg/min při 10 μ M a $9,2 \pm 2,7$ nmol/mg/min při 50 μ M koncentraci inhibitoru v reakci, což je inhibice o 12,5 %, respektive 23,1 %. TUC měl průměrnou specifickou aktivitu $11,1 \pm 2,7$ nmol/mg/min při 10 μ M a $10,8 \pm 3,2$ nmol/mg/min při 50 μ M, což je inhibice o 5,6 %, respektive o 9,6 %.

V některých případech došlo k mírné aktivaci enzymu, ale ve všech případech je to v rámci směrodatné odchylky.



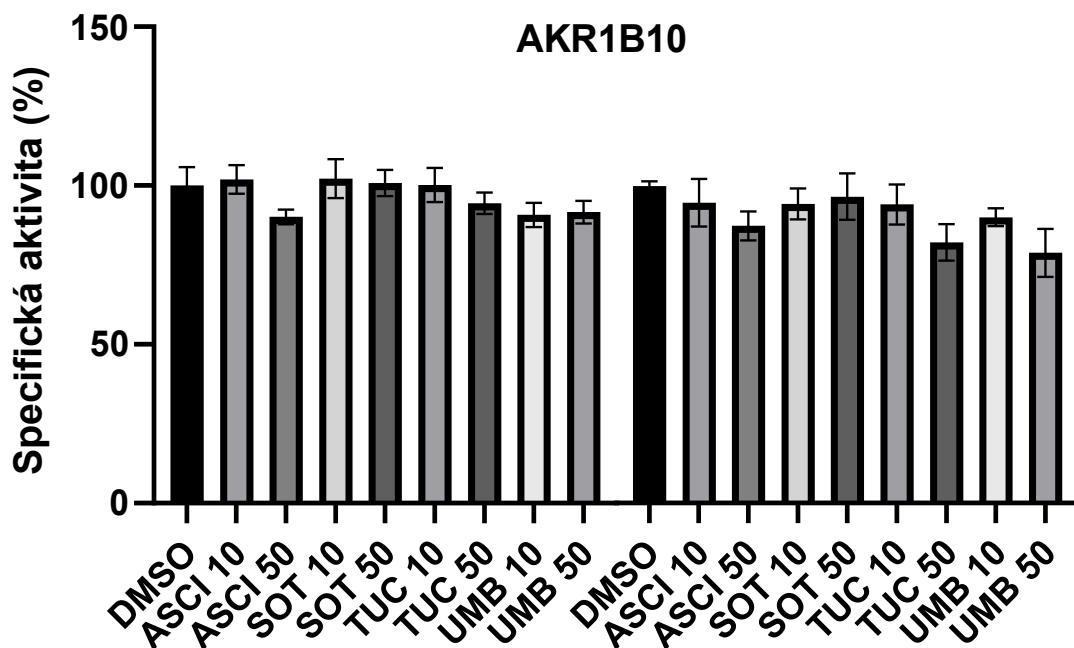
Obrázek 11: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B1 – grafické zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr \pm směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. DMSO sloužilo jako kontrola s nulovou koncentrací inhibitoru. Hodnoty specifické aktivity testovaných inhibitorů byly vztaheny k hodnotě DMSO kontroly. ASCI asciminib, SOT sotorasib, TUC tucatinib, UMB umbralisib hydrochlorid, 10 10 μ mol/l koncentrace inhibitoru v reakci, 50 50 μ mol/l koncentrace inhibitoru v reakci.

Tabulka 9: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B1 – číselné zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr ± směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplikátu. Hodnota p je vztažena ke kontrole DMSO (reakce s nulovou koncentrací inhibitoru). ns p > 0,05, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 a **** p ≤ 0,0001.

<u>AKR1B1</u>	Koncentrace inhibitoru v reakci (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	p hodnota
DMSO	0	14,9 ± 0,3 8,7 ± 0,4	100 100	- -	- -
Asciminib	10	13,3 ± 0,5 8,5 ± 0,6	89,2 ± 3,2 96,9 ± 6,4	10,9 ± 3,2 3,1 ± 6,4	* ns
	50	11,9 ± 0,6 6,5 ± 0,2	79,5 ± 3,8 74,4 ± 1,7	20,5 ± 3,8 25,6 ± 1,7	*** *
Sotorasib	10	14,4 ± 0,7 8,6 ± 0,3	96,7 ± 5,0 98,5 ± 3,3	3,3 ± 5,0 1,5 ± 3,3	ns ns
	50	14,3 ± 0,3 9,0 ± 0,5	95,7 ± 1,7 102,7 ± 5,8	4,3 ± 1,7 -	ns ns
Tucatinib	10	13,8 ± 0,5 8,4 ± 0,6	92,2 ± 3,2 96,7 ± 7,1	7,8 ± 3,2 3,3 ± 7,1	ns ns
	50	14,0 ± 0,5 7,6 ± 0,2	93,9 ± 3,3 87,0 ± 2,4	6,1 ± 3,3 13,0 ± 2,4	ns ns
Umralisib hydrochlorid	10	14,0 ± 0,1 10,6 ± 1,7	93,6 ± 0,8 121,6 ± 19,8	6,4 ± 0,8 -	ns ns
	50	14,4 ± 0,7 9,0 ± 0,5	96,6 ± 4,3 103,5 ± 5,3	3,4 ± 4,3 -	ns ns

Enzym AKR1B10 zobrazen na Obrázku 12 a v Tabulce 10, též nepřinesl statisticky významné výsledky. I při koncentraci 50 μM nedosáhl žádný z inhibitorů inhibice vyšší než 18 %. Konkrétně UMH se svojí průměrnou specifickou aktivitou 63,3 ± 15,7 nmol/mg/min při koncentraci 10 μM a 60,9 ± 19,2 nmol/mg/min při koncentraci 50 μM dosáhl inhibice o 9,6 %, respektive o 14,8 %.

V případě prvního měření došlo dokonce k aktivaci při koncentraci 10 μM u inhibitorů ASCI, SOT a TUC. Při koncentraci 50 μM došlo k velmi nízké inhibici. Konkrétně u ASCI průměrně o 11,3 %, SOT v jedné inkubaci o 3,4 % a TUC průměrně o 11,7 %.



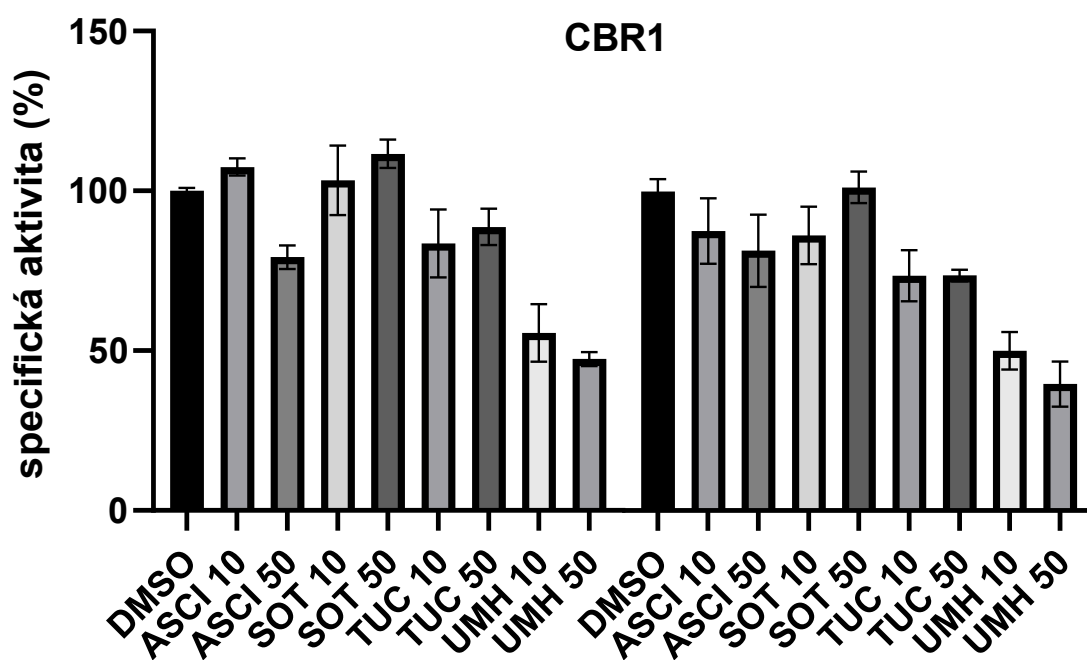
Obrázek 12: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B10 – grafické zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr ± směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. DMSO sloužilo jako kontrola s nulovou koncentrací inhibitoru. Hodnoty specifické aktivity testovaných inhibitorů byly vztaženy k hodnotě DMSO kontroly. ASCI asciminib, SOT sotorasib, TUC tucatinib, UMB umbralisib hydrochlorid, 10 10 μmol/l koncentrace inhibitoru v reakci, 50 50 μmol/l koncentrace inhibitoru v reakci.

Tabulka 10: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B10 – číselné zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr ± směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. Hodnota p je vztažena ke kontrole DMSO (reakce s nulovou koncentrací inhibitoru). ns p > 0,05, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 a **** p ≤ 0,0001.

AKR1B10	Koncentrace inhibitoru v reakci (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	p hodnota
DMSO	0	87,0 ± 4,1	100	-	-
		52,9 ± 0,6	100	-	-
Asciminib	10	88,6 ± 2,8 50,1 ± 3,2	101,9 ± 3,2 94,7 ± 6,1	- 5,3 ± 6,1	ns ns
	50	78,4 ± 1,6 46,2 ± 2,0	90,1 ± 1,9 87,4 ± 3,7	9,9 ± 1,9 12,6 ± 3,7	ns ns
Sotorasib	10	88,9 ± 4,3 49,9 ± 2,1	102,2 ± 5,0 94,4 ± 4,0	- 5,6 ± 4,0	ns ns
	50	87,6 ± 2,9 51,2 ± 3,1	100,8 ± 3,4 96,6 ± 5,9	- 3,4 ± 5,9	ns ns
Tucatinib	10	87,1 ± 3,8 49,8 ± 2,7	100,2 ± 4,4 94,2 ± 5,2	- 5,8 ± 5,2	ns ns
	50	82,1 ± 2,4 43,4 ± 2,5	94,4 ± 2,8 82,2 ± 4,7	5,6 ± 2,8 17,8 ± 4,7	ns **
Umbralisib hydrochlorid	10	78,9 ± 2,7 47,6 ± 1,2	90,8 ± 3,1 90,1 ± 2,3	9,2 ± 3,1 9,9 ± 2,3	ns ns
	50	80,0 ± 2,6 41,7 ± 3,3	91,6 ± 2,9 78,9 ± 6,2	8,4 ± 2,9 21,1 ± 6,2	ns **

Výsledky inkubace enzymu CBR1 jsou prezentovány na Obrázku 13 a v Tabulce 11. Zde došlo ke statisticky významné inhibici enzymu CBR1 pomocí inhibitoru UMH. Průměrná hodnota specifické aktivity ze dvou nezávislých měření činila $1608,3 \pm 356,0$ nmol/mg/min při koncentraci 10 μM a $1311,5 \pm 244,2$ nmol/mg/min při 50 μM , což je inhibice o 47,2 %, respektive 56,5 %. TUC měl průměrnou specifickou aktivitu $2384,6 \pm 501,7$ nmol/mg/min při 10 μM a $2444,3 \pm 444,9$ nmol/mg/min při 50 μM , což je inhibice v průměru o 21,4 %, respektive 37,7 %. ASCI měl průměrnou aktivitu $2928,2 \pm 507,5$ nmol/mg/min při 10 μM a $2489,6 \pm 703,3$ nmol/mg/min při 50 μM , což je v případě 10 μM v jedné inkubaci aktivace o 7,5 % a v druhé inkubaci inhibice o 12,4 %, zatímco při koncentraci 50 μM došlo k inhibici v průměru o 19,7 %.

K aktivaci došlo u 10 μM ASCI v jedné inkubaci o 7,5 %, u SOT v jedné inkubaci 10 μM o 3,3 % a při obou inkubacích u 50 μM v průměru o 6,4 %.



Obrázek 13: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem CBR1 – grafické zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr \pm směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. DMSO sloužilo jako kontrola s nulovou koncentrací inhibitoru. Hodnoty specifické aktivity testovaných inhibitorů byly vztaženy k hodnotě DMSO kontroly. ASCI asciminib, SOT sotorasib, TUC tucatinib, UMB umbralisib hydrochlorid, 10 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace inhibitoru v reakci, 50 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace inhibitoru v reakci.

Tabulka 11: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem CBR1 – číselné zobrazení. Prezentované jsou výsledky dvou nezávislých experimentů (průměr ± směrodatná odchylka), vzorky byly měřeny v triplicátu. Hodnota p je vztažena ke kontrole DMSO (reakce s nulovou koncentrací inhibitoru). ns p > 0,05, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 a **** p ≤ 0,0001.

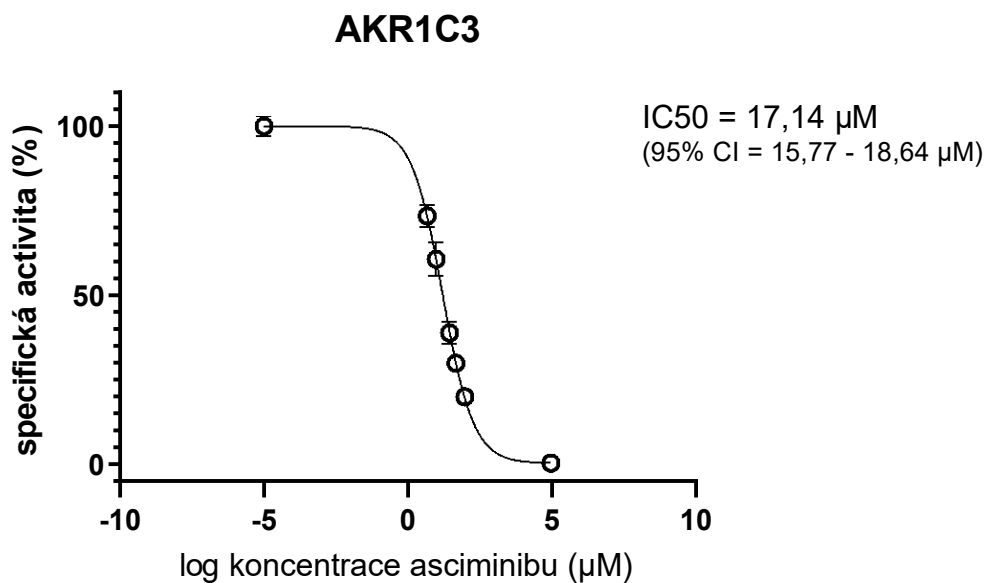
CBR1	Koncentrace inhibitoru v reakci (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	p hodnota
DMSO	0	2252,9 ± 14,4 3923,5 ± 120,9	100 100	- -	- -
Asciminib	10	2420,7 ± 49,5 3435,6 ± 327,9	107,5 ± 2,2 87,6 ± 8,4	- 12,4 ± 8,4	ns ns
	50	1786,3 ± 58,4 3192,8 ± 361,8	79,3 ± 2,6 81,4 ± 9,2	20,7 ± 2,6 18,6 ± 9,2	ns *
Sotorasib	10	2327,4 ± 199,2 3381,6 ± 288,3	103,3 ± 8,8 86,2 ± 7,3	- 13,8 ± 7,3	ns ns
	50	2514,3 ± 71,0 3971,1 ± 157,8	111,6 ± 3,2 101,2 ± 4,0	- -	ns ns
Tucatinib	10	1882,9 ± 195,1 2886,3 ± 258,0	83,6 ± 8,7 73,6 ± 6,6	16,4 ± 8,7 26,4 ± 6,6	ns **
	50	1999,4 ± 105,4 2889,1 ± 51,6	88,7 ± 4,6 73,6 ± 1,3	11,3 ± 4,6 26,4 ± 1,3	ns **
Umralsib hydrochlorid	10	1252,3 ± 166,0 1964,2 ± 187,7	55,6 ± 7,3 50,1 ± 4,8	44,4 ± 7,3 49,9 ± 4,8	**** ****
	50	1067,3 ± 39,8 1555,6 ± 225,5	47,4 ± 1,7 39,6 ± 5,8	52,6 ± 1,7 60,4 ± 5,8	**** ****

Největší aktivitu *in vitro* prokázal inhibitor ASCI vůči AKR1C3.

Pro stanovení kinetických parametrů (hodnota IC₅₀, K_i a typ inhibice) byl vybrán inhibitor ASCI v kombinaci s enzymem AKR1C3.

5.2 IC₅₀

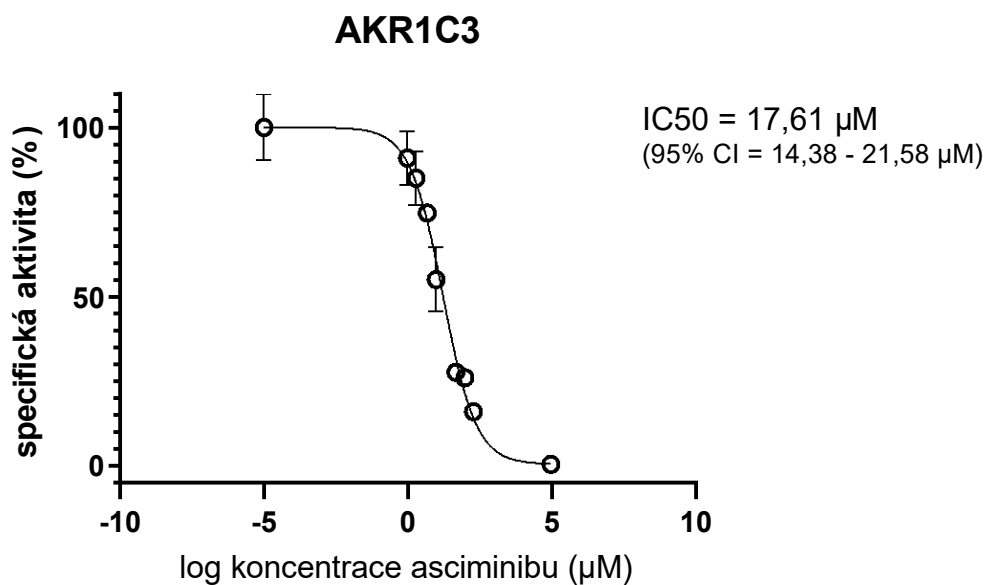
Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byly provedeny celkově tři nezávislá měření. Výsledky prvního měření, kde byla koncentrace ASCI v reakci 5, 10, 30, 50 a 100 μM, jsou zobrazeny na Obrázku 14 a v Tabulce 12. Výsledky dalších dvou měření, kde byly koncentrace ASCI v reakci 1, 2, 5, 10, 50, 100 a 200 μM, jsou zobrazeny na Obrázku 15 a 16 a v Tabulce 13 a 14.



Obrázek 14: Výsledky stanovení IC₅₀ ASCI s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení prvního měření.
(CI = konfidenční interval)

Tabulka 12: Výsledky IC₅₀ ASCI s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení prvního měření.
ASCI byl použit v koncentraci 5, 10, 30, 50 a 100 µM. Jako kontrola sloužil DMSO. Vzorky byly měřeny v triplicátu.
Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka.

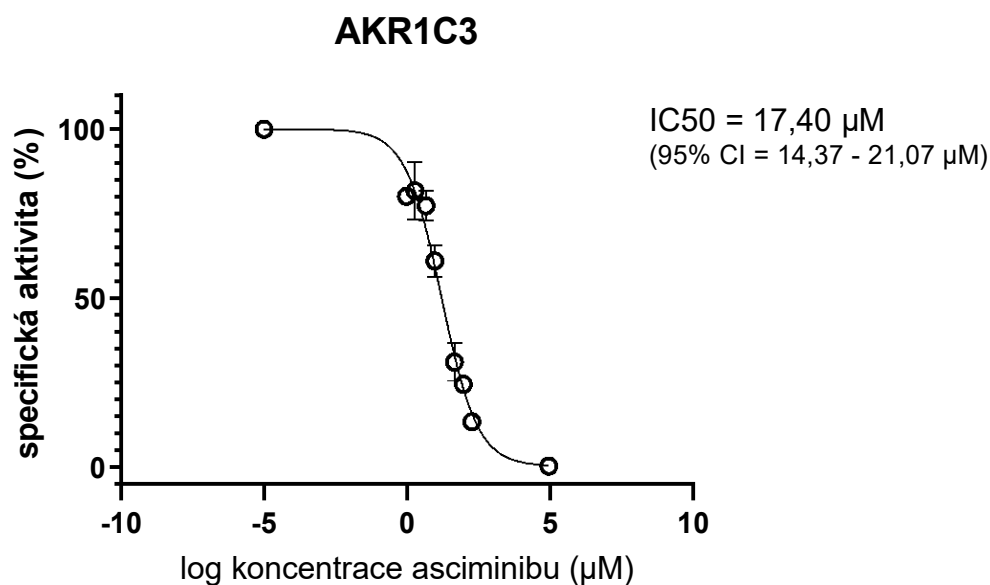
Koncentrace inhibitoru (µM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita %	Inhibice %
DMSO	151,6 ± 17,2	100	-
ASCI 5	120,0 ± 4,3	73,3 ± 2,6	26,7 ± 2,6
ASCI 10	99,0 ± 6,7	60,5 ± 4,1	39,5 ± 4,1
ASCI 30	63,3 ± 4,6	38,7 ± 2,8	61,3 ± 2,8
ASCI 50	41,4 ± 10,0	29,6 ± 0,4	70,4 ± 0,4
ASCI 100	32,2 ± 1,1	19,7 ± 0,7	80,3 ± 0,7



Obrázek 15: Výsledky stanovení IC₅₀ ASCI s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení druhého měření. (CI = konfidenční interval)

Tabulka 13: Výsledky IC₅₀ ASCI s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení druhého měření. ASCI byl použit v koncentraci 1, 2, 5, 10, 50, 100 a 200 µM. Jako kontrola sloužil DMSO. Vzorčky byly měřeny v triplicátu. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka.

Koncentrace inhibitoru (µM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
DMSO	163,3 ± 13,1	100	-
ASCI 1	148,4 ± 10,5	90,9 ± 6,5	9,1 ± 6,5
ASCI 2	138,7 ± 10,6	84,9 ± 6,5	15,1 ± 6,5
ASCI 5	121,8 ± 2,9	74,6 ± 1,8	25,4 ± 1,8
ASCI 10	89,5 ± 10,9	54,8 ± 6,7	45,2 ± 6,7
ASCI 50	44,7 ± 2,5	27,3 ± 1,5	72,7 ± 1,5
AKR 100	42,1 ± 0,6	25,8 ± 0,4	74,2 ± 0,4
AKR 200	25,5 ± 2,1	15,6 ± 1,3	84,4 ± 1,3



Obrázek 16: Výsledky stanovení IC₅₀ ASCI s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení třetího měření (CI = konfidenční interval)

Tabulka 14: Výsledky IC₅₀ ASCI s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení třetího měření. ASCI byl použit v koncentraci 1, 2, 5, 10, 50, 100 a 200 µM. Jako kontrola sloužil DMSO. Vzorky byly měřeny v triplicátu. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka.

Koncentrace inhibitoru (µM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Aktivita (%)	Inhibice (%)
DMSO	142,1 ± 2,0	100	-
ASCI 1	113,7 ± 0,8	81,6 ± 7,1	18,4 ± 7,1
ASCI 2	116,1 ± 10,1	80,0 ± 0,5	20 ± 0,5
ASCI 5	109,9 ± 4,4	77,3 ± 3,1	22,7 ± 3,1
ASCI 10	86,5 ± 5,5	60,9 ± 3,8	39,1 ± 3,8
ASCI 50	43,8 ± 6,5	30,8 ± 4,6	69,2 ± 4,6
AKR 100	34,5 ± 1,8	24,2 ± 1,3	75,8 ± 1,3
AKR 200	18,7 ± 2,1	13,2 ± 1,5	86,8 ± 1,5

Graf IC₅₀ vznikl v závislosti specifické aktivity na logaritmické koncentraci ASCI v programu GraphPad. V grafu můžeme pozorovat, že s rostoucí koncentrací ASCI klesá specifická aktivita enzymu AKR1C3, a hledaná hodnota IC₅₀ leží v inflexním bodu křivky.

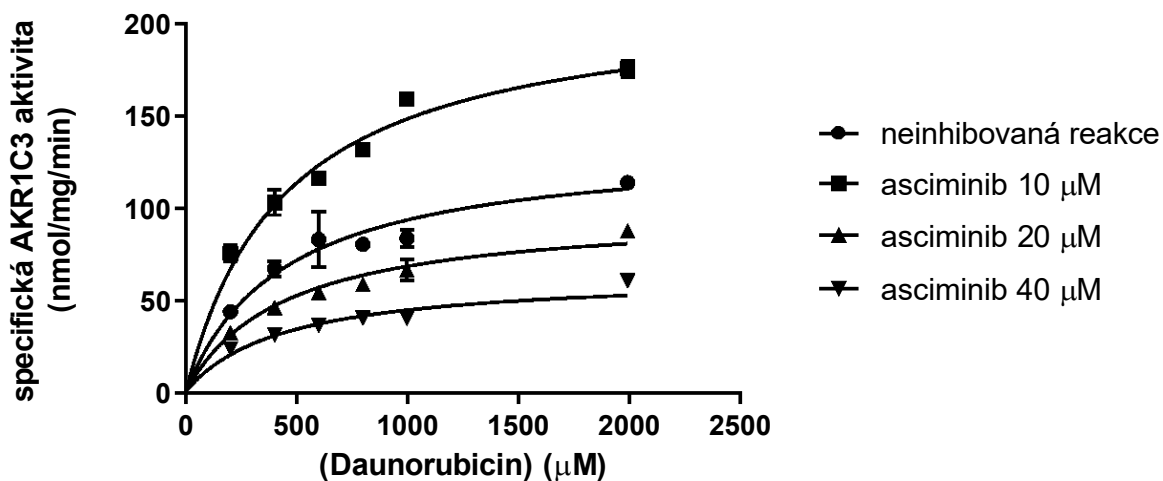
Ze všech tří měření IC₅₀ enzymu AKR1C3 vůči ASCI vyšla hodnota IC₅₀ v prvním měření 17,1 μM, v druhém 17,6 μM a ve třetím 17,4 μM. V průměru třech měření byla IC₅₀ stanovena na hodnotu 17,4 ± 0,2 μM.

5.3 Typ inhibice a stanovení K_i

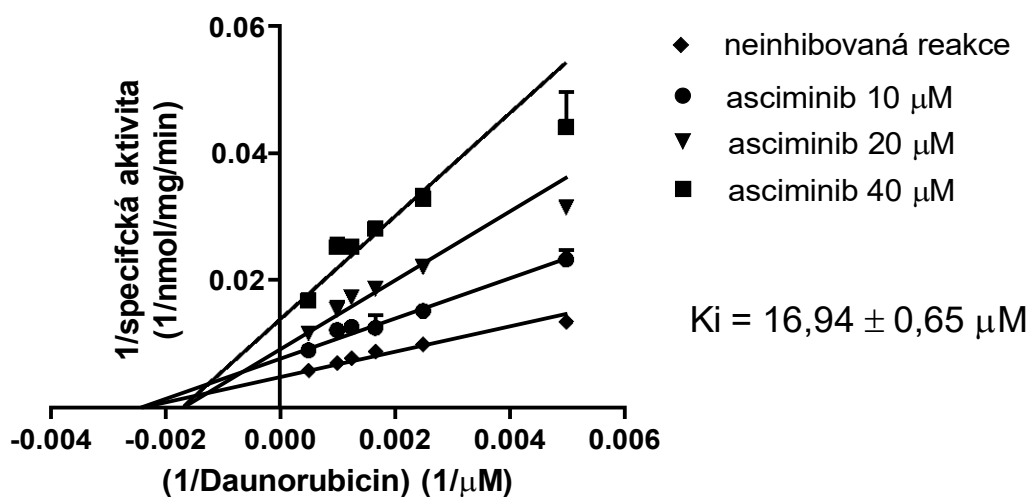
Pro stanovení hodnoty K_i a určení typu inhibice byly provedeny celkově tři nezávislé experimenty. Při in-vitro inkubacích byl použit substrát DAUN v šesti různých koncentracích, a to konkrétně 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM. Inhibitor ASCI byl použit v koncentraci 0 (kontrola DMSO), 10, 20 a 40 μM.

Byla změřena specifická aktivita a následné výsledky byly zpracovány v programu GraphPad a vynesení dvojité recipročních hodnot pomocí Lineweaver-Burkovy rovnice byl získán graf závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci DAUN v přítomnosti inhibitoru i bez něj. Výsledky ze všech třech nezávislých měření jsou prezentovány na Obrázcích 18-23.

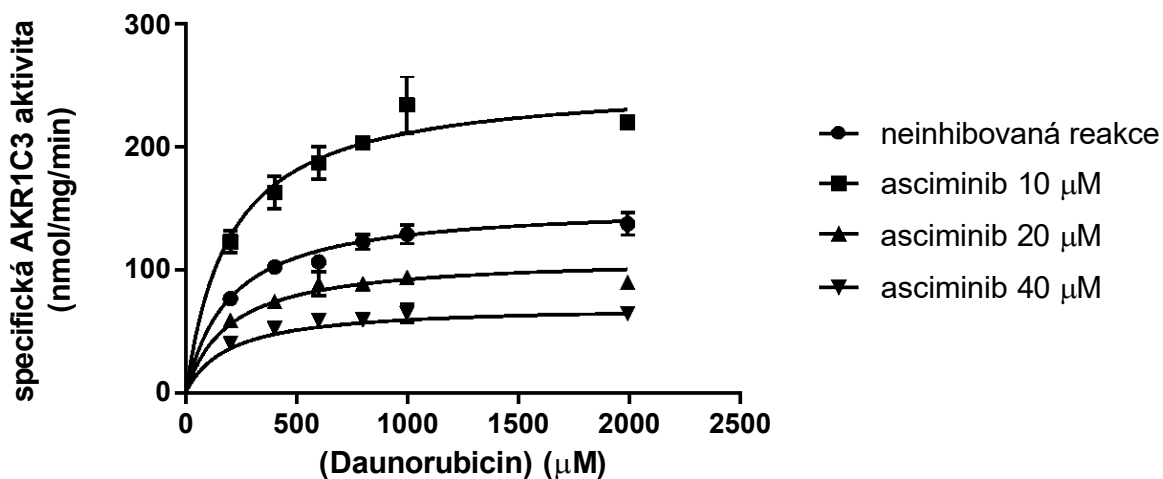
Průměrná hodnota K_i ze všech třech nezávislých měření činí 16,3 ± 0,7 μM. Z výsledku vyplývá, že je inhibice nekompetitivní, tudíž enzym se váže na jinou část nežli na vazebné místo enzymu.



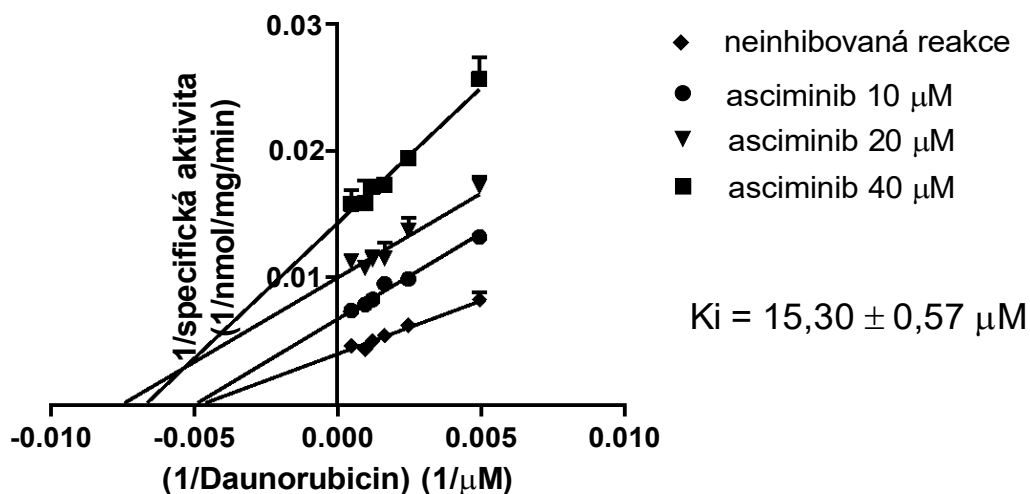
Obrázek 17: Michaelis-Mentenové graf – zobrazení prvního měření (závislost specifické aktivity AKR1C3 na 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM DAUN v reakcích s 0, 10, 20 a 40 μM ASCI).



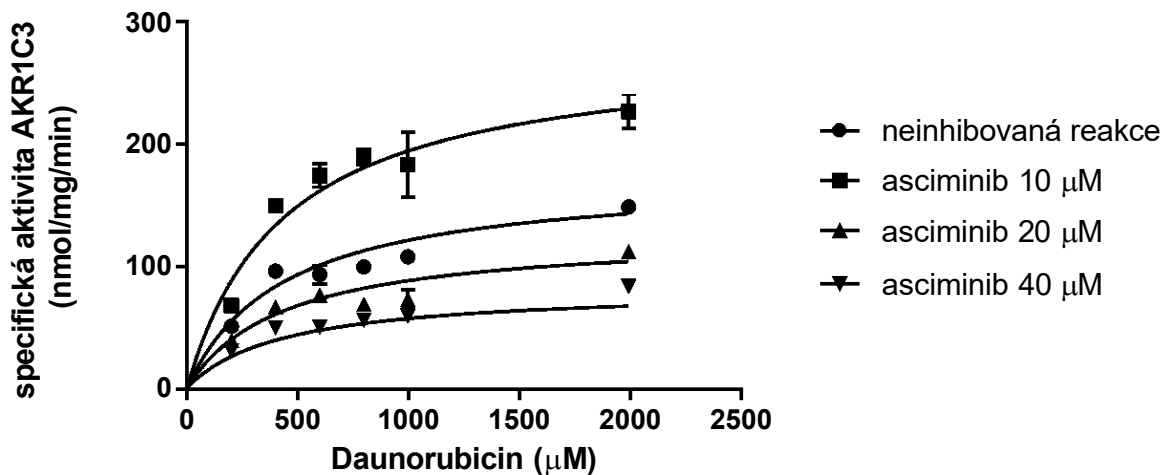
Obrázek 18: Lineweaver-Burk graf – zobrazení prvního měření (dvojitě reciproční výnos závislosti specifické aktivity AKR1C3 na 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM DAUN v reakcích s 0, 10, 20 a 40 μM ASCI).



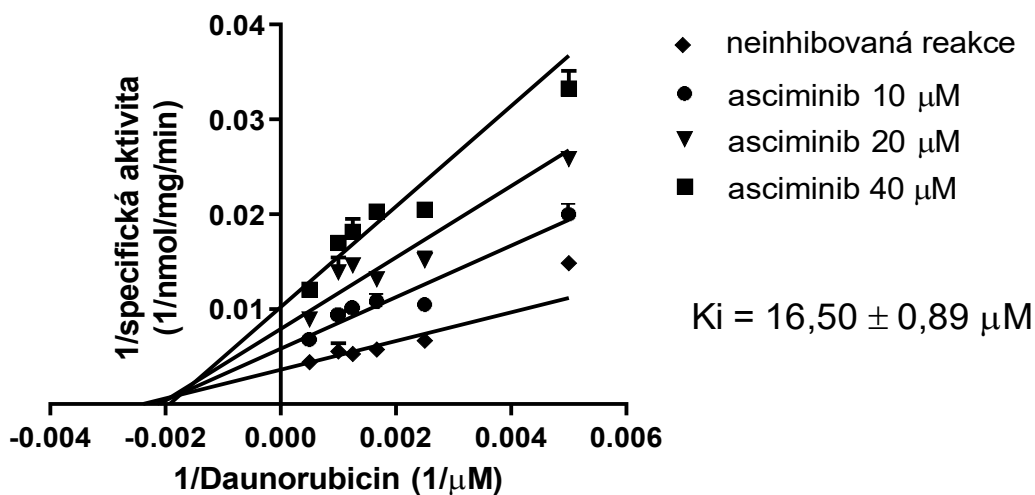
Obrázek 19: Michaelis-Mentenové graf – zobrazení druhého měření (závislost specifické aktivity AKR1C3 na 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM DAUN v reakcích s 0, 10, 20 a 40 μM ASCI).



Obrázek 20: Lineweaver-Burk graf – zobrazení druhého měření (dvojitě reciproční výnos závislosti specifické aktivity AKR1C3 na 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM DAUN v reakcích s 0, 10, 20 a 40 μM ASCI).



Obrázek 21: Michaelis-Mentenové graf – zobrazení třetího měření (závislost specifické aktivity AKR1C3 na 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM DAUN v reakcích s 0, 10, 20 a 40 μM ASCI).



Obrázek 22: Lineweaver-Burk graf – zobrazení třetího měření (dvojitě reciproční výnos závislosti specifické aktivity AKR1C3 na 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM DAUN v reakcích s 0, 10, 20 a 40 μM ASCI).

6 DISKUZE

ANT jsou používaným zlatým standardem v léčbě nádorových onemocnění od druhé poloviny 20. století. (Puchnerová *et al.*, 2017). Jejich použití však výrazně negativně ovlivňuje častá kardiotoxicita (Chang & Wang, 2018) nebo vznik chemorezistence, což výrazně komplikuje léčbu pacientů (McGowan *et al.*, 2017).

Za jednu z možných příčin chemorezistence, mimo ostatních mechanismů, mohou být zodpovědné CRE. Právě tyto enzymy jsou často exprimované v různých solidních typech nádorů i hematologických malignitách a redukují ANT na jejich méně účinné deriváty, které jsou následně zodpovědné i za právě zmíněnou kardiotoxicitu (Barski *et al.*, 2008; Puchnerová *et al.*, 2017).

Pro překonání rezistence CRE na ANT jsou v dnešní době vyvíjeny a zkoumány účinky TKI, které dokážou inhibovat aktivitu CRE. Přispívají tak k překonání rezistence v léčbě a zvyšují tak účinnost působení ANT (Hofman *et al.*, 2014).

V této diplomové práci byl zkoumán inhibiční vliv vybraných inhibitorů ASCI, SOT, TUC a UMH na několik enzymů (AKR1C3, 1A1, 1B1, 1B10 a CBR1) za použití substrátu DAUN.

Největší inhibiční aktivitu ze zkoumaných inhibitorů prokázal inhibitor ASCI a méně pak UMH. Specifická aktivita u ASCI a enzymu AKR1C3 dosahovala v průměru dvou měření hodnoty $116,4 \pm 9,6$ nmol/mg/min při 10 μ M koncentraci inhibitoru v reakci a $55,7 \pm 8,6$ nmol/mg/min při 50 μ M koncentraci, což je inhibice v průměru až o 38,9 %, respektive 70,7 %.

U UMH došlo k inhibici enzymu CBR1. Průměrná hodnota specifické aktivity ze dvou nezávislých měření činila $1608,3 \pm 356,0$ nmol/mg/min při koncentraci 10 μ M a $1311,5 \pm 244,2$ nmol/mg/min při 50 μ M, což je inhibice o 47,2 %, respektive 56,5 %. K testování dalších kinetických parametrů u UMH nedošlo, jelikož byl UMH v roce 2022 stažen společností FDA z trhu. Jeho vysoké negativní vedlejší účinky při léčbě MZL a FL bohužel převažovaly nad benefity léčiva (FDA, 2022).

U ostatních inhibitorů (SOT a TUC) nebyla pozorována významná inhibiční aktivita ani k jednomu z enzymů z nadrodiny AKR a SDR.

Dále se pokračovalo s ASCI, který je od roku 2021 nově schváleným inhibitorem a najedeme ho pod názvem Scemblix pro léčbu CML u pacientů v chronické fázi, rezistentními

na více než 2 TKI nebo u pacientů s mutací T315I (FDA, 2021). ASCI patří do skupiny inhibitorů BCR-ABL který se selektivně váže na myristoylovou kapsu a tím indukuje tvorbu inaktivní konformaci kinasy, spolu s látkami jako ponatinib, dasatinib, nilotinib, imatinib nebo bosutinib (Cuellar *et al.*, 2017). ASCI se ukázal jako velmi účinný a selektivní vůči ABL dle Choi (2023) a DeAngelo *et al.* (2019). Aktuálně se zkoumají také další ATP-kompetitivní BCR-ABL1 TKI. Například olverembatinib dle Jiang *et al.* (2022) vykazuje ve výzkumech významnou antileukemickou aktivitu bez výraznějších vedlejších účinků.

Cílem této práce bylo zjistit, zda ASCI působí i proti vybraným CRE a zdali by tato dráha nemohla přispět k dalším poznatkům o mechanismu jeho účinku. Z CRE nejvíce ASCI působil na AKR1C3 a pouze v malé míře na AKR1B1, 1B10 a CBR1. Vůbec žádný inhibiční efekt neměl na AKR1A1. Z tohoto důvodu se dále přistoupilo k určení kinetických parametrů pouze pro dvojici ASCI a AKR1C3.

IC₅₀ ASCI byla experimentálně stanovena ze tří nezávislých měření na průměrnou hodnotu $17,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$. IC₅₀ udává koncentraci látky, která způsobuje poloviční inhibici biologické aktivity cílového proteinu.

Konstanta K_i byla ze tří experimentálních nezávislých měření stanovena na průměrnou hodnotu $16,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$. K_i je hodnota, která udává koncentraci látky, která potlačí polovinu maximální aktivity cílového enzymu při daných podmínkách. Ukazuje tak vazebnou afinitu mezi látkou a cílovým enzymem. Čím nižší je hodnota K_i, tím silnější je vazba látky s cílovým enzymem a tím vyšší je potenciál léčiva (inhibitoru) k inhibici enzymové aktivity.

Z výsledku bylo následně stanoveno, že ASCI se na enzym váže nekompetitivně. Při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže na jinou část enzymu než na vazebné místo. Znamená to, že inhibitor svojí vazbou změní konformaci enzymu tak, že ovlivní i konformaci vazebného místa, a tím znemožní vazbu DAUN. Pakliže dojde k vytvoření komplexu mezi AKR1C3 a ASCI, enzym AKR1C3 není katalyticky aktivní. To vede ke snížení celkového množství enzymu, který je k dispozici pro DAUN, což se projevuje snížením maximální rychlosti reakce (v_{max}) a konstanta Michaelis-Mentenové zůstává neměnná.

Vývoj TKI v posledních letech změnil léčebné postupy u pacientů s CML a přinesl výrazné zlepšení jejich výsledků. Preklinická data dle Choi (2023) a DeAngelo *et al.* (2019) potvrzují účinnost a bezpečnost podání ASCI. V klinické fázi, kam byli zahrnuti pacienti s nepůsobící

předchozí léčbou, dosáhl ASCI významného a trvalého účinku. Dle studie od Hughes *et al.* (2019) dosáhl ASCI vysoké molekulární odpovědi u 48 % silně předléčených pacientů, včetně pacientů s mutací T315I. Dokonce byl v klinických studiích ASCI podle Lee *et al.* (2019) dobře tolerován až do dávky 7,5 mg/kg bez výraznějších nežádoucích účinků u 18 pacientů s minimálně třemi předchozími léčebnými postupy.

Dle předepsaného dávkování lze dosáhnout maximální plazmatickou koncentraci v rozmezí 793 - 5642 ng/ml, což je koncentrace 17,6 - 125 μ M (Medscape.com). Tato hodnota koresponduje v případě nižšího dávkování s blízkou hodnotou naměřené hodnoty IC50 (17,4 \pm 0,2 μ M) v této diplomové práci.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že ASCI může inhibicí CRE přispívat k úspěšné léčbě CML, pokud jsou v této léčbě zapojená ANT, jako například DAUN. Mechanismus účinku ASCI je ale ovšem komplexní problematika, u které je potřeba potvrzení na vyšší úrovni než *in vitro* testování na úrovni rekombinantních enzymů zkoumané v této diplomové práci. Proto by pro potvrzení získaných výsledků měli být provedeny experimenty například na odpovídajících buněčných liniích.

7 ZÁVĚR

Enzymy z nadrodiny AKR a SDR jsou ve vysoké míře přítomny v některých typech nádorů a redukuje zde cytostatika ANT (například DAUN) na méně účinný a kardiotoxický metabolit DAUNOL. DAUN se využívá v klinické praxi na léčbu hematologických malignit jako je AML a CML. Kombinace inhibitoru s vysokým inhibičním účinkem a ANT dojde k inhibici enzymu a díky tomu může ANT mnohem lépe účinkovat. V diplomové práci se zkoumal vliv několika vybraných inhibitorů TKI, a to ASCI, SOT, TUC a UMH na vybrané enzymy z nadrodiny AKR a SDR.

Z naměřených *in vitro* hodnot základního screeningu bylo zjištěno, že ASCI výrazně inhibuje aktivitu enzymu AKR1C3. Specifická aktivita u ASCI ukazovala na hodnoty v průměru dvou měření $116,4 \pm 9,6$ nmol/mg/min při 10 μ M koncentraci inhibitoru v reakci a $55,7 \pm 8,6$ nmol/mg/min při 50 μ M koncentraci, což je inhibice v průměru až o 38,9 %, respektive 70,7 %. Další vysoká inhibice byla pozorována u inhibitoru UMH vůči enzymu CBR1, kdy naměřená specifická aktivita dosahovala hodnoty $1608,3 \pm 356,0$ nmol/mg/min při koncentraci 10 μ M a $1311,5 \pm 244,2$ nmol/mg/min při 50 μ M, což je inhibice o 47,2 %, respektive 56,5 %.

V další části se přistoupilo k testování dalších kinetických parametrů pro ASCI vůči enzymu AKR1C3. Naměřená průměrná IC₅₀ dosahovala hodnoty $17,4 \pm 0,2$ μ M a K_i byla $16,3 \pm 0,7$ μ M. Z výsledků lze potvrdit, že inhibitor ASCI se váže na enzym nekompetitivně.

Tato práce se věnovala první části rozsáhlé studie a získané výsledky na úrovni rekombinantních enzymů jsou potřeba experimentálně ověřit na vyšším modelu.

8 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ABC transportér (z <i>angl.</i> ATP binding cassette transporters)
ACN	acetonitril
AGE	konečné produkty pokročilé glykace (z <i>angl.</i> advanced glycation end products)
AKR	aldoketoreduktasy
ALL	akutní lymfoidní leukémie
ALP	alkalická fosfatasa
ALT	alaninaminotransferasa
AML	akutní myeloidní leukémie
ANT	antracyklin
AST	aspartátaminotransferasa
ATP	adenosintrifosfát
BCRP	protein rezistence rakoviny prsu (z <i>angl.</i> breast cancer–resistance protein)
bE	kontrola bez enzymu
bS	kontrola bez substrátu
CD	diferenciační skupina (z <i>angl.</i> cluster of differentiation)
CK1 ϵ	kaseinasa 1 epsilon
CNS	centrální nervová soustava
CML	chronická myeloidní leukémie
CRE	karbonyl redukující enzym (z <i>angl.</i> carbonyl reductase)
CYP	cytochrom P450

DAUN	daunorubicin
DAUNOL	daunorubicinol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z <i>angl.</i> deoxyribonucleic acid)
DOX	doxorubicin
EKG	elektrokardiogram
EPI	epirubicin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z <i>angl.</i> Food and Drug Administration)
FL	folikulární lymfom
FLD	fluorescenční detektor
Glc-6-P(D)	glukóza-6-fosfát (dehydrogenasa)
GTP	guanosintrifosfát
HER2	lidský epidermální růstový faktor (z <i>angl.</i> human epidermal growth factor receptor)
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace (z <i>angl.</i> half maximal inhibitory concentration)
IDA	idarubicin
INH	inhibitor
Ki	inhibiční konstanta
LRP	protein rezistence rakoviny plic (z <i>angl.</i> lung resistance protein)
MDR	mnohočetná léková rezistence (z <i>angl.</i> multiple drug resistance)
MetOH	methanol

MRP2	protein 2 spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí (z <i>angl.</i> multidrug resistance-associated protein 2)
MZL	lymfom marginální (okrajové) zóny (z <i>angl.</i> marginal zone lymphoma)
NAD (P)	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfát)
NaPB	sodno-fosfátový pufr (z <i>angl.</i> natriumphosphate buffer)
NI	neinhibovaná reakce
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (z <i>angl.</i> non-small-cell lung cancer)
Pgp	p-glykoprotein
Ph	Philadelphský chromozom
PI3K	fosfatidyl 3-kinasa
RNA	ribonukleová kyselina (z <i>angl.</i> ribonucleic acid)
RS	regenerační systém
SDR	dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem (z <i>angl.</i> short-chain dehydrogenases/reductases)
si-RNA	malá interferující ribonukleová kyselina (z <i>angl.</i> small interfering ribonucleic acid)
SOT	sotorasib
TKI	tirosinkinasové inhibitory
TUC	tucatinib
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z <i>angl.</i> ultra-high-performance liquid chromatography)
UMH	umbralisib hydrochlorid

ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
V _{max}	maximální rychlost reakce
WHO	Světová zdravotnická organizace (z <i>angl.</i> World Health Organization)

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vznik Ph chromozomu a fúzního genu BCR-ABL1.....	13
Obrázek 2: Struktura vybraných ANT.....	15
Obrázek 3: Redukce DAUN	16
Obrázek 4: Struktura ASCI.....	23
Obrázek 5: Mechanismus účinku ASCI	24
Obrázek 6: Struktura SOT	25
Obrázek 7: Struktura TUC.....	26
Obrázek 8: Struktura UMH	27
Obrázek 9: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení.....	38
Obrázek 10: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1A1 – grafické zobrazení.....	40
Obrázek 11: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B1 – grafické zobrazení.....	41
Obrázek 12: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B10 – grafické zobrazení.....	43
Obrázek 13: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem CBR1 – grafické zobrazení.....	44
Obrázek 14: Výsledky stanovení IC50 ASCI s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení prvního měření.....	46
Obrázek 15: Výsledky stanovení IC50 ASCI s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení druhého měření.....	47
Obrázek 16: Výsledky stanovení IC50 ASCI s enzymem AKR1C3 – grafické zobrazení třetího měření.....	48
Obrázek 17: Michaelis-Mentenové graf – zobrazení prvního měření.....	50
Obrázek 18: Lineweaver-Burk graf – zobrazení prvního měření.....	50
Obrázek 19: Michaelis-Mentenové graf – zobrazení druhého měření	51

Obrázek 20: Lineweaver-Burk graf – zobrazení druhého měření	51
Obrázek 21: Michaelis-Mentenové graf – zobrazení třetího měření.....	52
Obrázek 22: Lineweaver-Burk graf – zobrazení třetího měření.....	52

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: FAB klasifikace AML	11
Tabulka 2: WHO klasifikace AML	12
Tabulka 3: Příprava reakční směsi.....	32
Tabulka 4: Příprava RS pro jednu reakci.....	33
Tabulka 5: Seznam a množství vybraných enzymů v reakci.....	34
Tabulka 6: Příprava zásobních inhibitorů o koncentraci 50 mM.....	34
Tabulka 7: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení.....	39
Tabulka 8: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1A1 – číselné zobrazení.....	40
Tabulka 9: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B1 – číselné zobrazení.....	42
Tabulka 10: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B10 – číselné zobrazení.....	43
Tabulka 11: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem CBR1 – číselné zobrazení.....	45
Tabulka 12: Výsledky IC50 ASCI s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení prvního měření.	46
Tabulka 13: Výsledky IC50 ASCI s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení druhého měření.	47
Tabulka 14: Výsledky IC50 ASCI s enzymem AKR1C3 – číselné zobrazení třetího měření.	48

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Albamoush S. & Limaieem F. (2022) HER2 – StatPearls [online]. Poslední revize 10. 2022 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537134/>>

Aszalos A. A., Bachur N. R., Hamilton B. K., Langlykke A. F., Roller P. P., Sheikh M. Y., Sutphin M. S., Thomas M. C., Wareheim D. A. & Wright L. H. (1977). Microbial reduction of the side-chain carbonyl of daunorubicin and N-acetyldaunorubicin. *The Journal of Antibiotics*, 30(1), 50–58.

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

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

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

Blair H. A. (2021). Sotorasib: First Approval. *Drugs*, 81(13), 1573–1579.

Bučková P., Buliková A., Cermanová M., Cetkovský P., Lánská M., Novák J., Mayer J., Palacková M., Procházková J., Ráčil Z., Semerád L., Šálek C., Šmardová L., Vokurka S., Vydra J., Žáčková D. a Žák P. *Akutní myeloidní leukémie*, CELL, 2013, 78 stran, ISBN 978-80-260-4154-2.

Chang V. Y. & Wang, J. J. (2018). Pharmacogenetics of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. *Current Oncology Reports*, 20(7), 52.

Choi E. J. (2023). Asciminib: the first-in-class allosteric inhibitor of BCR:ABL1 kinase. *Blood Research*, 58(S1), 29–36.

Cuellar S., Vozniak M., Rhodes J., Forcello N. & Olszta D. (2018) BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 24(6):433-452.

Curigliano G., Mueller V., Borges V., Hamilton E., Hurvitz S., Loi S., Murthy R., Okines A., Paplomata E., Cameron D., Carey L. A., Gelmon K., Hortobagyi G. N., Krop, I., Loibl S., Pegram M., Slamon D., Ramos J., Feng W. & Winer E. (2022). Tucatinib versus placebo added to trastuzumab and capecitabine for patients with pretreated HER2+ metastatic breast cancer with and without brain metastases (HER2CLIMB): final overall survival analysis. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 33(3), 321–329.

DeAngelo D., Mauro M. J., Kim D., Cortes J., Réa D., Hughes T. P., Minami H., Breccia M., Talpaz M., Hochhaus A., Goh Y. T., Coutre P., Soundhi M., Mishra K., Hourcade-Potelleret F., Vanasse G., Aiomone P. & Lang D. (2019) Combination of Asciminib+Nilotinib or Asciminib+Dasatinib in Previously Treated Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients: Phase 1 Study Results. *Clinical Lymphoma and Myeloma Leukemia*, 19(1), 290-291.

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

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

Doubek M. a Mayer J. (eds.) (2020) Léčebné postupy v hematologii 2020: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. Česká hematologická společnost ČLS JEP, Praha, 528 stran, ISBN 978-80-270-8240-7.

Dhillon S. & Keam, S. J. (2021). Umbralisib: First Approval. *Drugs*, 81(7), 857–866.

Faber E. a Urbanová R. (2010) Chronická myeloidní a chronická lymfatická leukemie. *Interní Medicína pro Praxi*, 12(6), 321-324.

FDA 1: *FDA approval of lymphoma medicine Ukoniq (umbralisib) is withdrawn due to safety concerns* [online]. Poslední revize 6. 2022 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-approval-lymphoma-medicine-ukoniq-umbralisib-withdrawn-due-safety-concerns>>

FDA 2: *FDA approves asciminib for Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia* [online]. Poslední revize 10. 2021 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z:

<<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-asciminib-philadelphia-chromosome-positive-chronic-myeloid-leukemia>>

FDA 3: *FDA accelerated approval to sotorasib for KRAS G12C mutated NSCLC* [online]. Poslední revize 5. 2021 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-sotorasib-kras-g12c-mutated-nsclc>>

FDA 4: *FDA grants accelerated approval to tucatinib with trastuzumab for colorectal cancer* [online]. Poslední revize 1. 2023 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-tucatinib-trastuzumab-colorectal-cancer>>

Fowler N. H., Samaniego F., Jurczak W., Ghosh N., Derenzini E., Reeves J. A., Knopińska-Posłuszny W., Cheah C. Y., Phillips T., Lech-Maranda E., Cheson B. D., Caimi P. F., Grosicki S., Leslie L. A., Chavez J. C., Fonseca G., Babu S., Hodson D. J., Shao S. H., Burke J. M., Sharman J. P., Law J. Y., Pagel J. M., Miskin H. P., Sportelli P., O'Connor O., Weiss M. S. & Zinzani P. L. (2021). Umbralisib, a Dual PI3K δ /CK1 ϵ Inhibitor in Patients With Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(15), 1609–1618.

Gonzalez-Covarrubias V., Ghosh D., Lakhman S. S., Pendyala L. & Blanco J. G. (2007). A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1 V88I) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(6), 973–980.

Gutiérrez V., Kapoor S., Allepuz A., Quenet S., Bédoucha V. & Mauro M. J. (2023). Asciminib vs bosutinib in chronic-phase chronic myeloid leukemia previously treated with at least two tyrosine kinase inhibitors: longer-term follow-up of ASCSEMBL. *Leukemia*, 37(3), 617–626.

Hehlmann R. (2020). Chronic Myeloid Leukemia in 2020. *Hemasphere*, 4(5), e468.

Hochhaus, A., Réa D., Boquimpani, C., Minami Y., Cortes J. E., Hughes T. P., Apperley J. F., Lomaia E., Voloshin S., Turkina A., Kim D. W., Abdo A., Fogliatto L. M., le Coutre P., Sasaki K., Kim D. D. H., Saussele S., Annunziata M., Chaudhri N., Chee L., García-

Gutiérrez V., Kapoor S., Allepuz A., Quenet S., Bédoucha V. & Mauro M. J. (2023). Asciminib vs bosutinib in chronic-phase chronic myeloid leukemia previously treated with at least two tyrosine kinase inhibitors: longer-term follow-up of ASCSEMBL. *Leukemia*, 37(3), 617–626.

Hofman J. (2020) *Farmakokinetická léková rezistence v protinádorové terapii a možnosti její modulace*. Habilitační práce. Katedra biochemických věd. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 22-29.

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

Jiang Q., Li Z., Qin Y., Li W., Xu N., Liu B., Zhang Y., Meng L., Zhu H., Du X., Chen S., Liang Y., Hu Y., Liu X., Song Y., Men L., Chen Z., Niu Q., Wang H., Lu M., Yang D., Zhai Y. & Huang X. (2022). Olverembatinib (HQP1351), a well-tolerated and effective tyrosine kinase inhibitor for patients with T315I-mutated chronic myeloid leukemia: results of an open-label, multicenter phase 1/2 trial. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 113

Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H. & Persson B. (2002). Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. *Protein Science, a Publication of The Protein Society*, 11(3), 636–641.

Kiss I. (eds.) (2023) *Modrá kniha České onkologické společnosti*. 29. vydání. Brno. Masarykův onkologický ústav, 394 stran, ISBN: 978-80-86793-55-9.

Kizek R., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Smutny S., Burda J. V., Frei E. & Stiborova M. (2012). Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacology & Therapeutics*, 133(1), 26–39.

Laurent G. & Jaffrézou J. P. (2001). Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood*, 98(4), 913–924.

Lee J., Kim S., Lee S., Park S. H., Park J. O., Ha E., Park D. H., Park N., Kim H., Lee S. H., You W. K., Lim H. Y., Park Y. S. & Kang W. K. (2019). Phase 1a study results

investigating the safety and preliminary efficacy of ABL001 (NOV1501), a bispecific antibody targeting VEGF and DLL4 in metastatic gastrointestinal (GI) cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15), 3023-3023.

Lindström H. J. G. & Friedman R. (2020). The effects of combination treatments on drug resistance in chronic myeloid leukaemia: an evaluation of the tyrosine kinase inhibitors axitinib and asciminib. *BMC Cancer*, 20(1), 397.

Lindström H. J. G. & Friedman R. (2022). Rotating between ponatinib and imatinib temporarily increases the efficacy of imatinib as shown in a chronic myeloid leukaemia model. *Scientific Reports*, 12(1), 5164.

Liu C., Liu K., Zhao C., Gong P. Yu Y. (2020). The characterization of a short chain dehydrogenase/reductase (SDRx) in *Comamonas testosteroni*. *Toxicology Reports*, 7, 460–467.

Longley D. B. & Johnston P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology*, 205(2), 275–292.

McGowan J. V., Chung R., Maulik A., Piotrowska I., Walker J. M. & Yellon D. M. (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(1), 63–75.

MedScape – Asciminib (Rx) [online]. [cit. 2023-05-05]. <Dostupné z: <https://reference.medscape.com/drug/scemblix-asciminib-4000255>>

Nosková V., Hajdúch M, Mihál V. a Cwiertka K. (2000) Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, typická pro MDR. *Klinická Onkologie*. 13(Speciál2 2000), 4-9.

Pelcovits A. & Niroula R. (2020). Acute Myeloid Leukemia: A Review. *Rhode Island Medical Journal* (2013), 103(3), 38–40.

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.

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

Penka M a Tesařová E. (2011). Hematologie a transfuzní lékařství I. Grada, Praha, 488 stran, ISBN: 978-80-247-3459-0.

Persson B., Kallberg Y., Bray J. E., Bruford E., Dellaporta S. L., Favia A. D., Duarte R. G., Jörnvall H., Kavanagh K. L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning T. M., Thornton J. M., Adamski J. & Oppermann U. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/ reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1-3), 94–98.

Petre C. E. & Dittmer D. P. (2007). Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *International Journal of Nanomedicine*, 2(3), 277–288.

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

Pokorná Z. (2022) *Antracyklinová kardiotoxicita a studium nových farmakologických kardioprotektiv*. Disertační práce. Katedra biochemických věd. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 4-10.

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

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

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

Réa D. & Hughes T. P. (2022). Development of asciminib, a novel allosteric inhibitor of BCR-ABL1. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 171, 103580.

Saleem T, & Kasi A. Daunorubicin – StatPearls [online]. Poslední revize 8. 2023 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559073/>>

Sau A., Tregno, F. P., Valentino F., Federici G. & Caccuri A. M. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(2), 116–122.

Selleckchem 1: Asciminib (ABL001) [online]. Poslední revize 11. 2022 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.selleckchem.com/products/asciminib-abl001.html>>

Selleckchem 2: Sotorasib (AMG510) [online]. Poslední revize 11. 2022 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.selleckchem.com/products/amg510.html>>

Selleckchem 3: Tucatinib (Irbinitinib, ONT-380, ARRY-380) [online]. Poslední revize 11. 2022 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.selleckchem.com/products/arry-380-ont-380.html>>

Selleckchem 4: Umbralisib (TGR-1202) [online]. Poslední revize 11. 2022 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.selleckchem.com/products/tgr-1202.html>>

Skálová L. a Boušová I. (2011) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum, Praha, 162 stran, ISBN: 978-80-246-1917-0.

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

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR - *Den boje proti rakovině a statistiky ÚZIS ČR* [online]. Poslední revize 2. 2021 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.uzis.cz/index.php?pg=aktuality&aid=8466>>

World Health Organization - *Cancer* [online]. Poslední revize 2. 2002 [cit. 2023-04-11]. Dostupné z: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>

Žáčková D. (2012) *Chronická myeloidní leukemie, CELL*, Brno, 83 stran, ISBN 978-80-260-1828-5.