

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VLIV EPALRESTATU, PONALRESTATU, RANIRESTATU A ZOPOLRESTATU
NA METABOLISMUS DAUNORUBICINU KATALYZOVANÝ
ALDO-KETOREDUKTASOU 1C3: STUDIE NA ÚROVNI NÁDOROVÉ
BUNĚČNÉ LINIE**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Bc. Eva Novotná, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Kristýna Kršková

Prohlášení

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

V Hradci Králové, dne

.....

Kristýna Kršková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce RNDr. Bc. Evě Novotné, Ph.D. za odborné vedení, ochotu při zpracovávání této bakalářské práce a za cenné rady a trpělivost. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině za obrovskou podporu během celého studia, a hlavně mému příteli Tomášovi za pomoc a velkou podporu během studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Kristýna Kršková

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

Název bakalářské práce: Vliv epalrestatu, ponalrestatu, ranirestatu a zopolrestatu na metabolismus daunorubicinu katalyzovaný aldo-ketoreduktasou 1C3: studie na úrovni nádorové buněčné linie

Teoretická část této bakalářské práce se zabývá mechanismem účinků antracyklinů, kardiotoxicitou antracyklinů a mechanismem rezistence nádorových buněk vůči antracyklinům prostřednictvím biotransformačních enzymů a ABC transportérů. Dále teoretická část pojednává o enzimech z nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR) a z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), které metabolizují antracykliny na jejich C13-hydroxy metabolity.

Experimentální část se zabývá studiem potenciálních inhibitorů aldo-ketoreduktasy 1C3 (AKR1C3). V rámci bakalářské práce byly testovány epalrestat, ponalrestat, ranirestat a zopolrestat o nichž je známo, že patří mezi inhibitory aldosareduktasy (AKR1B1). *In vitro*, v experimentech s rekombinantními antracyklinreduktasami však bylo zjištěno, že tyto látky inhibují i některé další antracyklinreduktasy, zejména AKR1C3. Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda epalrestat, ponalrestat, ranirestat a zopolrestat inhibují AKR1C3 i na buněčné úrovni. Jako model byla k tomuto účelu vybrána buněčná linie HCT116. Jedná se o buňky kolorektálního karcinomu, které přirozeně exprimují velmi malé množství AKR1C3. Buněčná linie byla pro naše účely přechodně transfekována plazmidem kódujícím AKR1C3 a následně byl studován vliv uvedených sloučenin na metabolismus daunorubicinu v této buněčné linii. Bylo zjištěno, že z vybraných inhibitorů inhibuje nejvíce ranirestat při koncentraci 10 μM a nejméně inhibují epalrestat se zopolrestatem. U ponalrestatu byla zaznamenána inhibice při koncentraci 5 μM a 10 μM .

Klíčová slova: inhibitory aldosareduktasy, aldo-ketoreduktasa 1C3, nádorové buňky, daunorubicin, metabolismus

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kristýna Kršková

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

Title of bachelor thesis: Effect of epalrestat, ponalrestat, ranirestat and zopolrestat on aldo-keto reductase 1C3-mediated metabolism of daunorubicin: a study at the level of a cancer cell line

The theoretical part of this bachelor thesis deals with the mechanism of action of anthracyclines, the cardiotoxicity of anthracyclines, and the mechanism of resistance of cancer cells to anthracyclines via biotransformation enzymes and ABC transporters. Furthermore, the theoretical part discusses enzymes from the aldo-ketoreductase (AKR) superfamily and the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily, that metabolize anthracyclines into their C13-hydroxy metabolites.

The experimental part focuses on studying potential inhibitors of aldo-ketoreductase 1C3 (AKR1C3). Epalrestat, ponalrestat, ranirestat, and zopolrestat were tested as they are known inhibitors of aldose reductase (AKR1B1). However, *in vitro* experiments with recombinant anthracycline reductases revealed that these compounds also inhibit some other anthracycline reductases, in particular AKR1C3. The aim of this thesis was to determine whether epalrestat, ponalrestat, ranirestat, and zopolrestat also inhibit AKR1C3 at the cellular level. The HCT116 cell line was selected as the model for this purpose. It is a colorectal carcinoma cell line that naturally expresses very low levels of AKR1C3. This cell line was transiently transfected with a plasmid encoding AKR1C3, and it was studied the effect of these compounds on the metabolism of daunorubicin in this cell line. It was found that among the selected inhibitors, ranirestat exhibited the highest inhibition at a concentration of 10 μM , while epalrestat with zopolrestat showed the lowest inhibition. For ponalrestat the inhibition was observed at concentrations of 5 μM and 10 μM .

Keywords: aldose reductase inhibitors, aldo-keto reductase 1C3, cancer cells, daunorubicin, metabolism

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Antracykliny	9
2.1.1	Mechanismus účinků antracyklinů a jejich metabolismus	10
2.1.2	Rezistence vůči antracyklinům	11
2.1.3	Kardiotoxicita antracyklinů	13
2.1.4	Daunorubicin a doxorubicin	16
2.2	Antracyklinreduktasy	17
2.2.1	AKR1A1	20
2.2.2	AKR1B1	21
2.2.3	AKR1B10	22
2.2.4	Isoformy AKR1C1-1C4.....	23
2.2.5	Isoformy AKR7A2 a 7A3	25
2.2.6	CBR1	25
2.3	Inhibitory antracyklinreduktas	26
2.3.1	Epalrestat	26
2.3.2	Ponalrestat.....	27
2.3.3	Ranirestat	28
2.3.4	Zopolrestat	29
3	Cíl práce.....	30
4	Experimentální část.....	31
4.1	Materiál.....	31
4.1.1	Chemikálie a biologický materiál	31
4.1.2	Přístroje a pomůcky	31
4.2	Metodika	32
4.2.1	První den – nasazení buněk	32

4.2.2	Druhý den – výměna média a transfekce buněk	32
4.2.3	Třetí den – Výměna média a nasazení inhibitorů	32
4.2.4	Stanovení množství daunorubicinolu pomocí UHPLC	33
4.2.5	Vyhodnocení výsledků	33
5	Výsledky	34
6	Diskuse.....	40
7	Závěr	43
8	Seznam zkratk	44
9	Literatura.....	45

1 Úvod

Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou nádorová onemocnění nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2020 byla nádorová onemocnění příčinou každého šestého případu úmrtí a celkově na nádorová onemocnění zemřelo 10 milionů lidí. (Ferlay a kol. 2020, World Health Organization 2022)

Antracykliny patří mezi nejpoužívanější protinádorová léčiva, která kdy byla vyvinuta (Hortobágyi 1997, Martins-Teixeira a kol. 2020). Většina pacientů, kteří podstupují systémovou chemoterapii nádorového onemocnění, dostává v určitém období léčby právě antracykliny (Hortobágyi 1997, Martins-Teixeira a kol. 2020). S jejich klinickým používáním jsou ale spjata jistá omezení: přirozená (primární) nebo získaná rezistence a akutní a chronická kardiotoxicita (Aubel-Sandron a kol. 1984, Martins-Teixeira a kol. 2020). Antracykliny jsou metabolizovány enzymy z nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR) a z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) (Penning a kol. 2015). Tyto enzymy redukují daunorubicin a doxorubicin na jejich C13-hydroxy metabolity (Martins-Teixeira a kol. 2020, Mordente a kol. 2009). V současné době se ukazuje, že inhibice antracyklinreduktas může pomoci zvýšit citlivost nádorových buněk vůči antracyklinům a tím přispět k léčbě nádorových onemocnění. Zabránění vzniku antracyklinových metabolitů může zvýšit terapeutickou účinnost antracyklinů a také může snížit závažnost a množství nežádoucích účinků (Malátková a kol. 2013). V této práci jsou zkoumány potencionální inhibitory antracyklinreduktas: epalrestat, ponalrestat, ranirestat a zopolrestat. Cílem práce je zjistit inhibiční účinek vybraných inhibitorů na aktivitu AKR1C3 na úrovni buněčné nádorové linie buněk kolorektálního karcinomu HCT116.

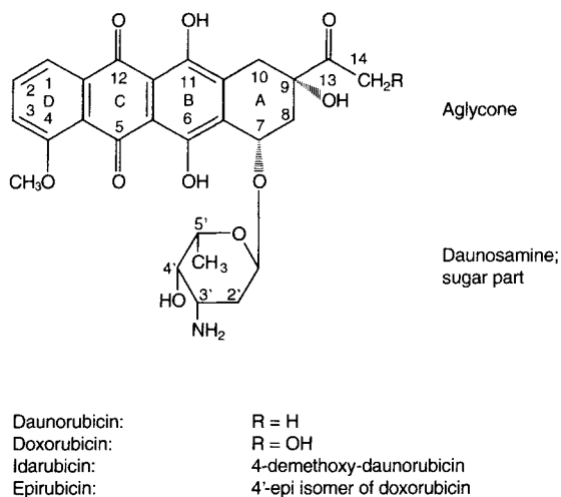
2 Teoretická část

2.1 Antracykliny

Antracykliny patří do skupiny přírodních antibiotik, která patří k nejúčinnějším antineoplastickým (protinádorovým) látkám používaným v současné době v klinické praxi (Martins-Teixeira a kol. 2020). I přes jejich vysokou účinnost, je s používáním antracyklinů jako protinádorových léčiv (chemoterapeutik) spojena řada omezení. Tato omezení souvisí zejména s:

- přirozenou (primární) nebo získanou rezistencí nádorových buněk vůči antracyklinům,
- akutní a chronickou kardiotoxicitou související s antracykliny. (Aubel-Sandron a kol. 1984, Martins-Teixeira a kol. 2020)

Antracykliny obsahují chromofor, který je zodpovědný za jejich charakteristickou červenou až oranžovou barvu. Antracykliny se skládají z aglykonu, který je spojen s aminocukrem – daunosaminem (glykonová část 3-amino-2,3,6-trideoxy- α -l-lyxohexopyranosy). Daunosamin je klíčový pro protinádorovou aktivitu, jelikož hraje roli v mechanismu účinku antracyklinů (Obr. 1). (Hortobágyi 1997, Martins-Teixeira a kol. 2020)



Obr. 1: Obecný vzorec antracyklinů (Hortobágyi 1997)

2.1.1 Mechanismus účinků antracyklinů a jejich metabolismus

V současné době se studie shodují, že antracykliny působí kombinací více mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří interakce s topoisomerasou II (top2), indukce oxidačního stresu a interkalace do DNA, což je schopnost vložit se mezi páry bází nativní DNA a změnit její konformaci (Martins-Teixeira a kol. 2020, Aubeil-Sandron 1984). Antracykliny přeměňují top2 na nukleasu štěpící DNA, což vede ke genomové nestabilitě a ke spuštění apoptózy (Martins-Teixeira a kol. 2020).

Mimo jiné, antracykliny jsou metabolizovány pomocí některých enzymů patřících do nadrodiny (AKR) a nadrodiny (SDR). Enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3, 7A2 a karbonylreduktasa 1 (CBR1) patří mezi nejaktivnější antracyklinreduktasy. Tyto enzymy redukují karbonylovou skupinu na uhlíku C13 daunorubicinu, doxorubicinu a idarubicinu. Jedná se o dvouelektronovou redukci karbonylové skupiny na sekundární alkohol (například daunorubicin → daunorubicinol). (Martins-Teixeira a kol. 2020, Malátková a kol. 2009)

Toxický účinek antracyklinů se zvyšuje při jednoelektronové nebo při dvouelektronové redukci. U člověka se vyloučí přibližně 50 % léčiva z těla ven v nezměněné podobě a zbytek je odbouráván třemi hlavními metabolickými cestami:

- jednoelektronovou redukcí na semichinonový radikál, při které vzniká ROS
- dvouelektronovou redukcí na sekundární C13-hydroxy metabolit
- deglykosidací na aglykony. (Mordente a kol. 2009)

C13-hydroxy metabolity antracyklinů mají oproti antracyklinům nižší protinádorovou aktivitu a také jsou tyto metabolity (daunorubicinol, doxorubicinol) méně účinné v inhibici topoisomerasy oproti parentnímu léčivu (daunorubicin, doxorubicin). Tato enzymatická přeměna antracyklinů na jejich sekundární C13-hydroxy metabolit je důležitým faktorem ve vývoji rezistence nádorových buněk vůči antracyklinům a ve vzniku antracykliny indukované kardiomyopatie. (Mordente a kol. 2009)

2.1.2 Rezistence vůči antracyklinům

Rezistence nádorových buněk vůči antracyklinům je jedním z důvodů selhání léčby nádorových onemocnění. Může být způsobena vrozenými nebo získanými faktory, kterými jsou například:

- snížená exprese nebo aktivita top2,
- zvýšená exprese superoxiddismutasy, což zvyšuje odolnost nádorových buněk vůči oxidačnímu stresu,
- mutace a další změny na úrovni proteinu p53, což ovlivňuje proces apoptózy. (Martins-Teixeira a kol. 2020)

Rezistence nádorových buněk vůči antracyklinům a chemoterapeutikům obecně se dělí na primární a získanou. Primární rezistence je stav, kdy léčba nádorového onemocnění již od začátku nezpůsobuje žádnou výraznou změnu v chování nádorových buněk a neprojeví se ani žádnou odpovědí nebo poklesem ve velikosti nádoru. O získanou rezistenci se jedná, pokud léčba nádorového onemocnění zpočátku léčby úspěšně reaguje a nádor se zmenší. Po určité době ale dochází k návratu nádorového onemocnění. (Sharma a kol. 2017)

Chemoterapeutika jsou látkami cizího původu neboli xenobiotika. Osud xenobiotik v organismu zahrnuje absorpci, distribuci, metabolismus (transport a biotransformace) a exkreci. Dochází při tom k interakci xenobiotika nebo jeho metabolitů s cílovou strukturou. Uvedené procesy jsou ovlivněny strukturou buněk (hlavně strukturou membrány) a chemickými a fyzikálními vlastnostmi xenobiotika. Před negativními vlastnostmi xenobiotik se může organismus bránit pomocí urychlení eliminace, omezení vstupu xenobiotika do organismu a omezení biologické aktivity a toxicity xenobiotika. Velký význam v obraně proti xenobiotikům mají:

- biotransformační enzymy,
- transportéry (transportní proteiny). (Hodgson 2004, Skálová 2017)

Biotransformace je proces, při kterém se mění fyzikálně-chemické vlastnosti xenobiotik (Iovdijová a kol. 2010). Biotransformační enzymy mají širokou substrátovou specifitu a přeměňují xenobiotika obvykle na hydrofilnější sloučeniny, které obvykle podléhají snazší eliminaci z organismu než parentní látka. Reakce katalyzované biotransformačními enzymy se dělí do dvou fází: fáze I a fáze II. Reakce fáze I zahrnují

oxidaci, redukci a hydrolýzu. Reakce fáze II zahrnují glukuronidaci, sulfonaci, metylaci, acetylaci a konjugaci s glutathionem a aminokyselinami (Sudhakaran a kol. 2017).

Mezi další mechanismy, které nádorové buňky využívají k tomu, aby se vyhnuly toxickým účinkům léčiv, je snížený příjem těchto léčiv dovnitř do buněk nebo jejich zvýšený transport z buněk ven. V buňkách s mnohočetnou lékovou rezistencí dochází k aktivnímu vylučování léčiv prostřednictvím transportérů nadrodiny ABC (ATP-binding cassette), které jsou zodpovědné za export toxických látek z cytosolu maligních buněk, čímž podporují rezistenci maligních buněk vůči chemoterapeutikům. ABC transportéry ke své funkci potřebují ATP. (Martins-Teixeira a kol. 2020, Gregory a kol. 2003)

Mezi lidské ABC transportéry patří transportéry

- ABCB1 (P-glykoprotein (P-gp)/multidrug resistant gene (MDR)),
- ABCC1 (multidrug resistance associated protein 1 (MRP1)),
- ABCG2 (breast cancer resistance protein) (BCRP)). (Skálová 2017)

Transportér ABCB1 je exprimován v řadě tkání, mezi které patří například gastrointestinální trakt a mozek, kde zabraňuje hromadění toxických látek. Nadměrná exprese transportéru ABCB1 zodpovídá za ochranu citlivých tkání, hematoencefalické bariéry, gastrointestinálního traktu, ledvin, jater, vaječnicků a placenty. Transportér ABCB1 má schopnost transportovat velké množství různých léčiv bez strukturální nebo funkční podobnosti, jako jsou například protinádorová léčiva (antracykliny, antraceny, alkaloidy vinca a taxol), inhibitory HIV-proteasy, antidepresiva, antiepileptika, antibiotika a analgetika. (Martins-Teixeira a kol. 2020, Gregory a kol. 2003)

Transportér ABCC1, který byl izolován z buněčné linie lidského plicního karcinomu v roce 1992, je strukturně podobný s ABCB1, ale obsahuje navíc transmembránovou doménu nula, která je příčinou afinity ABCC1 k aniontům. Neaniontové sloučeniny mohou být transportovány ve formě sulfátových konjugátů, glutathionu, anebo glukuronidu. (Gregory a kol. 2003)

Dalším ABC transportérem je transportér ABCG2, který je znám jako protein pro rezistenci k mitoxantronu a jako transportér v placentě, kde se podílí na transportu sloučenin do nebo z krevního zásobení plodu. (Gregory a kol. 2003)

Transportéry ABCB1 a ABCC1 jsou dva hlavní ABC transportéry, které jsou schopny transportovat antracykliny ven z buňky, jelikož jsou pro tyto dva transportéry antracykliny substráty. Tento transport z buňky vede k nižším intracelulárním hladinám

antracyklinů a tím může vést ke vzniku rezistence nádorových buněk k antracyklinům. Existují inhibitory, které jsou schopné tuto rezistenci zvrátit (například verapamil, chinidin, chinin a cyklosporin A). (Martins-Teixeira a kol. 2020, Gregory a kol. 2003)

2.1.3 Kardiotoxicita antracyklinů

Po rezistenci další hlavní nevýhodou omezující klinické použití antracyklinů, je jejich toxicita, přičemž nejzávažnější nežádoucí účinky se projevují v myokardu. Kardiotoxicita vyvolaná antracykliny se může vyskytovat akutně nebo chronicky a její mechanismy jsou komplexní a multifaktoriální. (Martins-Teixeira a kol. 2020)

Kardiotoxicita vyvolaná antracykliny se klasifikuje podle doby nástupu na:

- akutní, k níž dochází během léčby,
- časnou, do 1 roku po léčbě,
- pozdní, k níž dochází jeden nebo více let po léčbě. (Mordente a kol. 2009)

Akutní kardiotoxicita se projevuje poruchami nitrosrdečního vedení a přechodnými arytmiemi a je obvykle reverzibilní (Mordente a kol. 2009). Může vzniknout na základě mechanismů souvisejících s apoptotickými procesy v buňce (Martins-Teixeira a kol. 2020). Časná a pozdní kardiotoxicita se projevují progresivním na dávce závislým poklesem funkce levé komory (Mordente a kol. 2009). Zatímco chronická kardiomyopatie se může vyvinout během poškození dalších částí buněk, jako je například snížení délky telomer a senescence (buněčné stárnutí) (Martins-Teixeira a kol. 2020). Účinky způsobené antracykliny na kardiomyocyty jsou především mitochondriální dysfunkce, kalciová dysbalance, poškození DNA, buněčné stárnutí a indukce apoptózy (Martins-Teixeira a kol. 2020).

Kardiotoxicita je závislá na dávce a na vzniku se podílí i řada dalších rizikových faktorů, jako jsou již existující hypertenze nebo srdeční onemocnění, souběžná léčba jinými léky a demografické údaje pacientů, jako je věk a pohlaví. K dalším komplikacím může dojít v průběhu měsíců nebo let po léčbě, kdy se vyvine symptomatické městnavé srdeční selhání, které je závažné, progresivní, nevratné, obvykle refrakterní na konvenční léčbu a spojené s vysokou úmrtností. Užívání antracyklinů tedy vyžaduje praktické pokyny pro sledování, aby se předešlo kardiovaskulárním komplikacím během dlouhodobé léčby. (Martins-Teixeira a kol. 2020)

V řadě studií je kardiotoxicita antracyklinů spojována s jejich afinitou k záporně nabitým fosfolipidům, jako je například kardiolipin, který je složkou mitochondriální

membrány v srdečním svalu. Z histologického hlediska lze projevy kardiotoxicity pozorovat jako poškozené, degenerované a atrofické svalové buňky, ve kterých lze na úrovni mitochondrií myokardu pozorovat degenerativní změny tkáně myokardu. Starší studie dále uvádějí, že antracykliny také vyvolávají změny v elektrolytovém metabolismu myokardu. Vlivem nízké koncentrace antracyklinů na konci léčby dochází u pacientů ke zvýšení obsahu Ca^{2+} a Na^+ v myokardu. Nízká koncentrace antracyklinů inhibuje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměnu v sarkolemálních vezikulách srdce. (Aubel-Sandron 1984)

Další studie dávají kardiotoxicitu do spojitosti se vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (NOS), které jsou příčinou peroxidace lipidů a poškození DNA v kardiomyocytech (Martins-Teixeira a kol. 2020). Mnoho tkání obsahuje enzymy zachycující volné radikály, které detoxikují volné radikály a zabraňují poškození tkání. Tkáň myokardu má těchto enzymů málo, a je proto více náchylná k poškození volnými radikály. (Hortobágyi 1997)

Pro vznik kardiotoxicity je také významná tvorba a akumulace alkoholových metabolitů, které vznikají při redukci karbonylové skupiny antracyklinů (doxorubicinol, daunorubicinol). Studie na myších ukázaly, že zvýšená přeměna doxorubicinu na doxorubicinol je doprovázena zrychleným průběhem rozvoje kardiomyopatie. (Sacco a kol. 2003, Mordente a kol. 2015)

Dle současných poznatků je významným mechanismem kardiotoxicity interakce antracyklinů s enzymem topoisomerasou. V lidském těle se vyskytuje topoisomerasa I (top1) a top2. (Mordente a kol. 2017)

Top 1 je u savců nezbytná pro normální vývoj. Hlavní funkcí tohoto enzymu je uvolňovat nadšroubovicovitou strukturu DNA a podporuje tak replikaci a transkripci DNA a tím i růst buňky. Omezená funkce top1 vede k buněčné smrti, mutagenezi a nádorovému bujení. Top1 může být využita v terapii nádorových onemocnění, jelikož má schopnost narušovat stabilitu DNA, a to může vést k buněčné smrti u nádorových buněk. (Li a kol. 2016)

Top2 je jaderný enzym, která vytváří přechodné zlomy v obou vláknech DNA, aby se tak zabránilo torzi DNA při nadšroubovicovém vinutí (supercoilingu) během replikace a transkripce. Top2 štěpí jednu fosfodiesterovou vazbu na každém vlákně DNA a kovalentně se váže na 5' fosfát kostry DNA prostřednictvím tyrosylové skupiny v aktivním místě, čímž stabilizuje přerušovaná vlákna DNA. (Martins-Teixeira a kol. 2020)

Bylo prokázáno, že jaderná izoforma topoisomerasy II beta (top2 β) je jako jediná top2 přítomná v kardiomyocytech a zprostředkovává poškození srdce.

Topoisomerasa II alfa (top2 α) je nadměrně exprimovaná v nádorových buňkách a je cílem terapeutické aktivity antracyklinů. Bylo zjištěno, že interakce mezi top2 β a antracykliny patří mezi příčiny časně kardiotoxicity. (Martins-Teixeira a kol. 2020)

Top2 β hraje roli také v pozdní kardiotoxicitě a její inhibice vede k mitochondriální dysfunkci, ke vzniku oxidačního stresu vlivem ROS, k poškození DNA, stárnutí buněk a k aktivaci drah apoptózy, které končí buněčnou smrtí, což má negativní dopad na různé typy buněk v srdci, jako jsou kardiomyocyty, srdeční progenitorové buňky, srdeční fibroblasty a endotelové buňky. Inhibice top2 β tak může vést k ireverzibilním formám kardiotoxicity. (Cardinale a kol. 2020)

Na základě molekulárních mechanismů kardiotoxicity bylo navrženo několik strategií, jak zabránit škodlivým účinkům antracyklinů a zároveň zachovat jejich aktivitu vůči nádorovým buňkám. Za tímto účelem byla stanovena primární prevence kardiotoxicity vyvolané antracykliny. Jedním z možných způsobů prevence kardiotoxicity je podání pomalé infuze antracyklinů namísto bolusového podání. Další strategie prevence kardiotoxicity zahrnují použití méně kardiotoxických analogů antracyklinů a použití kardioprotektivních látek, jako jsou antioxidační přírodní produkty, chelátory železa a pleiotropní léčiva. Jedním z široce používaných a Americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration (FDA)) schváleným léčivem je dexrazoxan. Dexrazoxan je jediným FDA schváleným lékem proti kardiotoxicitě antracyklinů. Jeho kardioprotektivní účinky úzce souvisejí se schopností inhibovat enzymatickou aktivitu Top2 β a potlačovat signální dráhy poškození DNA vyvolané antracykliny v srdci. Dexrazoxan se váže do vazebného místa top2 β pro ATP, kde interakce top2 β s dexrazoxanem způsobuje, že top2 β nabývá konformace uzavřené svorky, což znemožňuje další tvorbu komplexů antracyklin-DNA-top2 β . Kromě interakce s top2 β je dexrazoxan také spojován s chelatačními vlastnostmi. Studie na králicích uvádí, že podávání dexrazoxanu téměř zcela zabránilo mortalitě související se srdečním selháním, dysfunkcí levé komory a zvýšením srdečního troponinu T v plazmě. (Martins-Teixeira a kol. 2020, Kollárová a kol. 2022, Jirkovský a kol. 2021)

I přes tuto ochranu srdce je použití dexrazoxanu omezeno kvůli riziku vzniku sekundárních maligních novotvarů. Dexrazoxan se dnes používá za specifických a omezených podmínek a za stálého monitorování pacientova stavu. Používá se například u pacientek, které dostaly vysoké dávky antracyklinů ($> 300 \text{ mg/m}^2$ doxorubicinu) pro metastatický karcinom prsu a které mohou mít prospěch z pokračování léčby antracykliny. (Menna a kol. 2017)

Kromě dexrazoxanu byla popsána řada dalších sloučenin, které mohou působit kardioprotektivně: přírodní antioxidanty: flavonoidy (dihydromyricetin, isorhamnetin a kvercetin) a vitaminy E a C; dále aminokyseliny (N-acetylcystein a L-karnitin), glutathion, melatonin, kanabidiol, koenzym Q10 a kyselina α -linolenová), beta-blokátory (karvedilol, nebivolol, metoprolol), inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu a antagonisté angiotenzinu (enalapril a valsartan), statiny (atorvastatin), hypoglykemizující látky (metformin), prostacyklin I2 a jeho syntetický derivát iloprost, antagonisté vápníku (prenylamin) a nesteroidní protizánětlivé léky (meloxikam). (Martins-Teixeira a kol. 2020)

2.1.4 Daunorubicin a doxorubicin

Mezi nejvíce používané antracykliny se řadí daunorubicin neboli daunomycin, doxorubicin neboli adriamycin, idarubicin a epirubicin (Aubel-Sadron a kol. 1984, Penning a kol. 2021). Daunorubicin a doxorubicin jsou tzv. antracykliny první generace a byly izolovány z mutantního kmene aktinobakterie *Streptomyces peucetius*. Daunorubicin a doxorubicin patří k nejúčinnějším a nejrozšířenějším protinádorovým lékům a jsou trvale zařazeny na seznamu WHO jako základní léčiva pro léčbu řady nádorových onemocnění. Zatímco daunorubicin je indikován v případě akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a akutní myeloblastické leukémie (AML), doxorubicin se kromě ALL používá také v léčbě lymfomů, sarkomů a širokého spektra solidních nádorů, včetně nádoru prsu, plic, močového měchýře, kostí a děložního čípku. (Hortobágyi 1997, Martins-Teixeira a kol. 2020)

Bylo zjištěno, že farmakokinetika a nežádoucí účinky daunorubicinu a doxorubicinu jsou variabilní mezi jednotlivými pacienty, což může být způsobeno změnou metabolismu v důsledku nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů (ns-SNP) v genech kódujících AKR a SDR. Ns-SNP v lidských enzimech AKR1C3, 1C4, 7A2 a CBR1 výrazně snižují metabolismus doxorubicinu a daunorubicinu. (Bains a kol. 2010, Bains a kol. 2009)

V onkologické praxi se cytostatika (např. doxorubicin) často podávají v kombinovaných režimech, což umožňuje snížit dávku léčiv a eliminovat tak jejich toxické vedlejší účinky. (Hofman a kol. 2015)

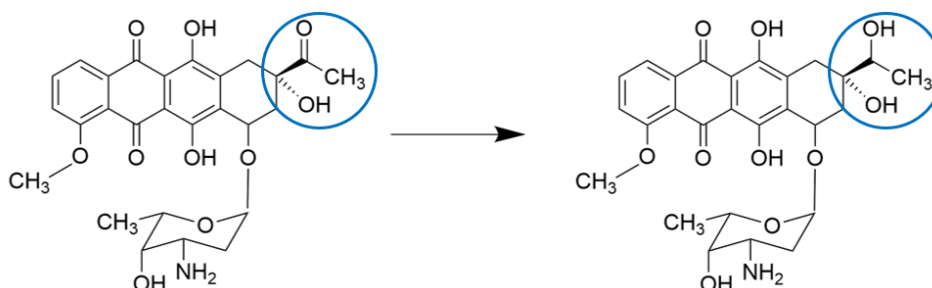
2.2 Antracyklinreduktasy

Reakce redukující aldehydy na primární alkoholy a ketony na sekundární alkoholy se podílejí na první fázi metabolismu endogenních sloučenin a xenobiotik nesoucí karbonylové skupiny. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy patřícími do dvou nadrodin:

- nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR),
- nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). (Penning 2015)

AKR jsou nadrodina NADPH-dependentních cytosolických oxidoreduktas, které katalyzují redukcí karbonylové skupiny na alkoholovou skupinu (

Tab. 1). Příkladem této redukce je přeměna daunorubicinu na daunorubicinol (Obr. 2) a přeměna doxorubicinu na doxorubicinol. (Penning a kol. 2021)



Obr. 2: Příklad redukce AKR: daunorubicin → daunorubicinol (Skálová 2017)

Tab. 1: Aldo-keto reduktasy – základní přehled, převzato a upraveno dle (Skálová 2017)

Aldo-ketoreduktasy	
Enzymová klasifikace	EC 1.1.1 a EC 1.3.1
Zkratka	AKR
Kofaktor	-
Koenzym	NADPH
Lidské izoformy	AKR1A1, 1B1, 1B10, 1B15, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 1D1, 1E2, 6A3, 6A5, 6A9, 7A2, 7A3
Subcelulární lokalizace	Cytosol
Orgánová lokalizace	Dle typu isoformy
Eobiotické substráty	Konečné produkty pokročilé glykace, isokortikosteroidy, produkty peroxidace lipidů, oxidované fosfolipidy
Xenobiotické substráty	Akrolein, daunorubicin, doxorubicin, oracin, dolasetron, 1-butanon, naltrexon

Nadrodina AKR se dělí do 16 rodin, které jsou dále rozděleny do jednotlivých podrodin (Penning 2015). Lidské AKR můžeme zařadit do tří rodin: AKR1, AKR6 a AKR7. V těchto rodinách bylo identifikováno 13 různých AKR proteinů (Tab. 2). (Barski a spol. 2008)

Tab. 2: Přehled lidských AKR, převzato a upraveno dle (Barski a kol. 2008, Mindnich a kol. 2009)

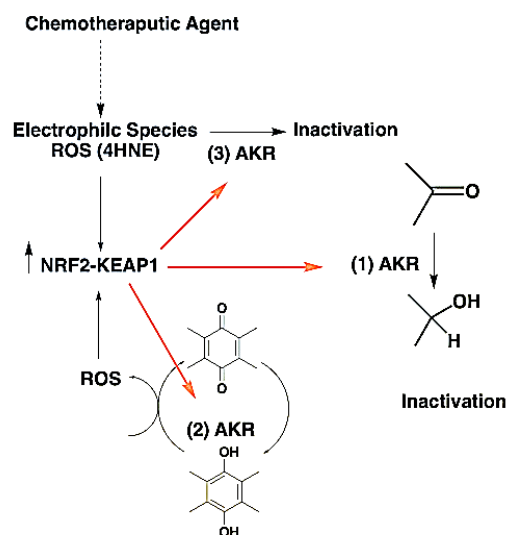
Nadrodina	Rodina	Podrodina	Isoformy	
AKR	AKR1	AKR1A	AKR1A1	<i>Aldehydreduktasa</i>
		AKR1B	AKR1B1	<i>Aldosareduktasa</i>
			AKR1B10	<i>Aldosareduktasa tenkého střeva</i>
		AKR1D	AKR1D1	<i>Δ4-3-ketosteroid-5-β-reduktasa</i>
		AKR1C	AKR1C1	<i>20α-hydroxysteroiddehydrogenasa</i>
			AKR1C2	<i>Typ 3 3α-hydroxysteroiddehydrogenasa</i>
			AKR1C3	<i>Typ 5 17β-hydroxysteroiddehydrogenasa</i>
	AKR1C4		<i>Typ 1 3α-hydroxysteroiddehydrogenasa</i>	
	AKR6	AKR6A	AKR6A3	<i>β-podjednotka 1 napětově řízeného draselného kanálu</i>
			AKR6A5	<i>β-podjednotka 2 napětově řízeného draselného kanálu</i>
			AKR6A9	<i>β-podjednotka 3 napětově řízeného draselného kanálu</i>
	AKR7	AKR7A	AKR7A2	<i>Typ 2 alfatoxin-B1-aldehydreduktasa</i>
			AKR7A3	<i>Typ 3 alfatoxin-B1-aldehydreduktasa</i>

Jak bylo zmíněno, AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3, 7A2 hrají roli v rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům. Lze tak předpokládat, že jejich inhibitory mohou obnovit citlivost na tyto protinádorové léky. (Penning a kol. 2021)

AKR jsou indukovány cestou NRF2-KEAP1 (nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 kelch-like ECH-associated protein 1) a jsou regulovány receptory steroidních hormonů. Reagují na podněty osmotického, elektrofilního a oxidačního stresu generovanými chemoterapeutiky. (Penning a kol. 2021)

AKR se také podílejí na rezistenci nádorových buněk k hormonální ablativní terapii, jelikož hrají roli při přeměně steroidních hormonů. Rezistence vůči chemoterapeutikům je hlavním mechanismem, proč jsou nádorová onemocnění tak těžko léčitelná. Enzymy z nadrodiny AKR přispívají k rezistenci nádorových buněk vůči

různým protinádorovým léčivům, což bylo zjištěno např. u nádorového onemocnění plic, prostaty, prsu a tlustého střeva. AKR se kromě antracyklinů podílí také na lékové rezistenci vůči hlavním třídám protinádorových léčiv, jako jsou například mytomicin, cis-platina a metotrexát. (Obr. 3) (Penning a kol. 2021)



Obr. 3: Mechanismy lékové rezistence zprostředkované AKR. (1): AKR katalyzují redukcí karbonylové skupiny na alkoholovou (2) AKR redukuje p-chinony a produkuje ROS, které aktivují NRF2 a zvyšují expresi genů AKR; (3) AKR inaktivují cytotoxické produkty rozkladu lipidových peroxidů, jako je například 4-hydroxynonenal; Převzato z (Penning a kol. 2021)

Enzymy SDR jsou nadrodina NAD(P)(H)-dependentních oxidoreduktas, které se rozdělují na dva základní typy: klasické a rozšířené (Persson a kol. 2009). Klasické SDR preferují jako kofaktor NADPH a rozšířené preferují NADH. SDR vykazují širokou substrátovou specifitu a jejich substráty zahrnují steroidy, alkoholy, cukry a aromatická xenobiotika (Tab. 3) (Barski a kol. 2008).

Lidské SDR mají roli v metabolismu steroidních hormonů, prostaglandinů a retinoidů, v oblasti signalizace a v metabolismu lipidů a xenobiotik. V genech SDR se postupně daří identifikovat stále nové SNP, a je známo, že řada dědičných metabolických onemocnění má jako základní příčinu genetické defekty v genech SDR. (Persson a kol. 2009)

Enzymy z nadrodiny SDR jsou většinou mikrosomálními enzymy kromě karbonylreduktas (CBR), které jsou cytosolickými enzymy. Příkladem mikrosomální SDR je 11β-HSD. Významné cytosolické enzymy u člověka jsou CBR1, CBR3 a CBR4. CBR1 a CBR3 mají vysokou identitu v jejich aminokyselinových sekvencích, ale liší se svými enzymatickými vlastnostmi. (Barski a kol. 2008)

Tab. 3: Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) – základní přehled, převzato a upraveno dle (Skálová 2017)

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)	
Enzymová klasifikace	EC 1.1.1.
Zkratka	SDR
Kofaktor	-
Koenzym	NAD(P)(H)
Lidské izoformy	SDR1-SDR48
Subcelulární lokalizace	Cytosol, hladké endoplazmatické retikulum
Orgánová lokalizace	Dle isoformy
Eobiotické substráty	Dle isoformy
Xenobiotické substráty	<i>o</i> -chinony, menadion, daunorubicin, doxorubicin, oracin, metyrapon, 1-butanon, haloperidol, acetoexamid, warfarin

2.2.1 AKR1A1

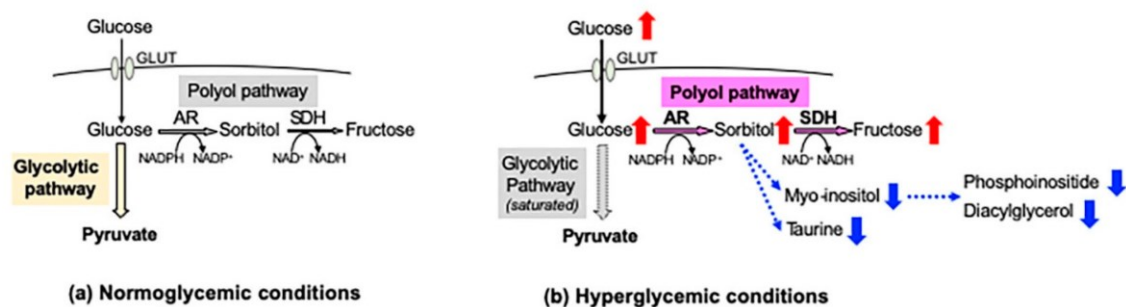
AKR1A1 neboli aldehydreduktasa je prvním objeveným enzymem patřícím do nadrodiny AKR. AKR1A1 byla identifikována jako klíčový enzym zapojený do biosyntézy kyseliny askorbové u hlodavců a je exprimována ve většině tkání, nejvíce však v proximálních tubulech ledvin. V ledvinách byla nalezena ve spojitosti s myo-inositol oxygenasou, která přeměňuje myo-inositol na D-glukoronát. AKR1A1 redukuje primárně záporně nabitě substráty obsahující karboxylovou skupinu, ale také redukuje i steroidní aldehydy, aromatické aldehydy a malé tříuhlíkaté aldehydy. Bylo prokázáno, že AKR1A1 katalyzuje oxidaci proximálních *trans*-dihydrodiolů na *o*-chinony. (Barski a kol. 2008)

AKR1A1 se podílí na bioaktivaci benzo[*a*]pyrenu, který má karcinogenní vlastnosti. Na úrovni nádorové buněčné linie A549 (buňky plicního adenokarcinomu) bylo zjištěno, že během oxidace benzo[*a*]pyrenu na benzo[*a*]pyren-7,8-dion katalyzované pomocí AKR1A1 vznikají ROS, které poškozují DNA. AKR1A1 také katalyzuje odstranění nitrosylové skupiny z S-nitrosylovaného glutathionu a koenzymu A. (Fujii a kol. 2021)

2.2.2 AKR1B1

Isoforma AKR1B1 neboli aldosareduktasa je exprimována ve většině tkání a má významnou roli při zprostředkování hyperglykemického poškození a při sekundárních diabetických komplikacích. Za normálních podmínek katalyzuje redukci pouze malého množství glukózy. Zvýšení redukce glukózy pomocí AKR1B1 během hyperglykémie je spojeno s rozvojem tkáňového poškození. AKR1B1 je exprimována v celém organismu, včetně orgánů, které jsou postiženy diabetem mellitem, jako je čočka, sítnice, ledviny a periferní nervy. Nadměrná aktivace AKR1B1 se podílí na sekundárních komplikacích diabetu, jako je například retinopatie, katarakta, nefropatie a neuropatie a bylo prokázáno, že inhibice AKR1B1 je schopna oddálit či zabránit tkáňovému poškození spojenému s diabetem. Z tohoto důvodu byly inhibitory AKR1B1 intenzivně hledány a vyvíjeny jako antidiabetika. (Barski a kol. 2008, Bailly 2022)

Polyolová dráha zahrnuje aktivaci dvou enzymů: AKR1B1 a sorbitoldehydrogenasy (SDH). AKR1B1 redukuje glukózu na sorbitol s využitím NADPH za hyperglykemických podmínek. Nahromaděný sorbitol je dále oxidován na fruktózu za účasti SDH za využití NAD^+ jako kofaktoru (polyolová dráha, Obr. 4). Za euglykemických podmínek vstupuje pouze malé procento glukózy do polyolové dráhy a většina glukózy je fosforylována pomocí hexokinasy na glukóza-6-fosfát (glykolýza). Aktivace polyolové dráhy během hyperglykémie má za následek hromadění sorbitolu v různých tkáních a předpokládá se, že je faktorem rozvoje komplikací spojených s diabetem. Během hyperglykémie může polyolová dráha odpovídat za redukci více než 30 % glukózy. Polyolová dráha vede k osmotickému a oxidačnímu stresu v důsledku akumulace sorbitolu a změny poměru $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Nadměrná akumulace osmoticky aktivního sorbitolu pocházejícího z polyolové dráhy je toxická pro organismus. Aktivace polyolové dráhy za diabetických podmínek hraje důležitou roli v patogenezi neuropatie. Přesná fyziologická úloha této dráhy však zůstává nejasná. (Bailly 2022, Tammali a kol. 2011)



Obr. 4: Polyolová dráha: Redukce glukózy na sorbitol pomocí AKR1B1 (AR), který se dále oxiduje na fruktózu pomocí SDH (Niimi a kol. 2021)

AKR1B1 katalyzuje peroxidaci lipidů iniciovanou ROS za vzniku lipidových aldehydů a jejich glutathionových konjugátů. AKR1B1 také katalyzuje redukcí jednoho z nejtoxičtějších lipidových aldehydů - 4-hydroxynonenalu (4-HNE) a jeho konjugátu s glutathionem na 1,4-dihydroxynonen a glutathionyl-1,4-dihydroxynonen, který může být hlavním mediátorem cytotoxicity buněk vyvolané oxidačním stresem. (Tammali a kol. 2011)

Výzkumy na buněčných a zvířecích modelech ukazují, že AKR1B1 je protein citlivý na oxidaci a díky této schopnosti reagovat na oxidativní stres je mediátorem zánětlivých signálů vyvolaných růstovými faktory, cytokiny (například tumor necrosis factor α (TNF- α)), chemokiny, karcinogeny, ale také bakteriální, virovou a parazitární infekcí. Zvýšené množství zánětlivých cytokinů a růstových faktorů podporuje buněčnou proliferaci, což je hlavním rysem nádorového bujení. Bylo prokázáno, že inhibice AKR1B1 zabraňuje růstu nádorových buněk v modelech *in vitro* a *in vivo*, a že chronický zánět je spojen s progresí nádorových onemocnění. (Barski a kol. 2008, Tammali a kol. 2011)

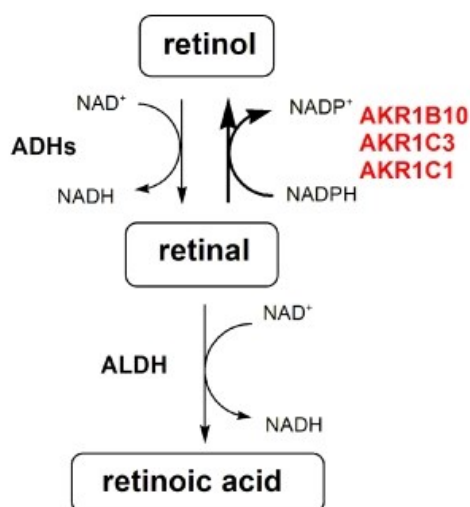
2.2.3 AKR1B10

AKR1B10 neboli aldosa reduktasa tenkého střeva je exprimována především v tenkém a tlustém střevě, játrech, brzlíku a nadledvinkách. Protein AKR1B10 je nadměrně exprimován u dlaždicobuněčných karcinomů a adenokarcinomů plic a jater, u kolorektálního karcinomu a u karcinomu dělohy. (Barski a kol. 2008)

Aminokyselinová sekvence AKR1B10 je ze 71 % shodná se sekvencí AKR1B1. Také substrátová specifita a citlivost na inhibitory je velmi podobná s AKR1B1. AKR1B10 má ale vyšší katalytickou účinnost vůči ketonům a vůči léčivům jako je například daunorubicin a dolasteron. (Barski a kol. 2008)

Bylo prokázáno, že umlčení genu AKR1B10 pomocí siRNA vede k inhibici růstu a snížení míry tvorby ložisek a velikosti kolonií buněk kolorektálního karcinomu. Tento fakt naznačuje, že AKR1B10 hraje roli v proliferaci nádorových buněk. Gen AKR1B10 je indukován látkami obsaženými v cigaretovém kouři, například 4-HNE a 1-butanonem. AKR1B10, stejně jako 1B1, vykazuje vysokou afinitu k aldehydům obsažených v cigaretovém kouři. Kromě toho AKR1B10 reguluje biosyntézu mastných kyselin prostřednictvím interakce s acetyl-CoA-karboxylasou α . (Barski a kol. 2008)

Studie poukazují na přítomnost AKR1B10 u několika typů nádorových onemocnění. Je známo, že AKR1B10 přeměňuje retinal na retinol. Zvýšená exprese retinaldehydroreduktas zjištěná u nádorových onemocněních může souviset s vyčerpáním hladiny kyseliny retinové a následnou ztrátou diferenciace buněk a rozvojem nádorového onemocnění. Kyselina retinová se podílí na velkém množství biologických procesů, od vývoje plodu až po proliferaci a diferenciaci buněk, a řídí genovou expresi. Kromě AKR1B10 se na přeměně retinalu na retinol podílí i další AKR: AKR1B1, 1C1, 1C3 a 1C4 (Obr. 5). (Gallego a kol. 2007)



Obr. 5: Oxidace retinolu na retinal pomocí alkoholdehydrogenasy (ADH) a následná oxidace retinalu na retinovou kyselinu pomocí aldehyddehydrogenasy (ALDH). Opačnou reakci přeměny retinalu na retinol katalyzují AKR1B10, 1C1, 1C3 a 1C4, převzato z Rižner 2012

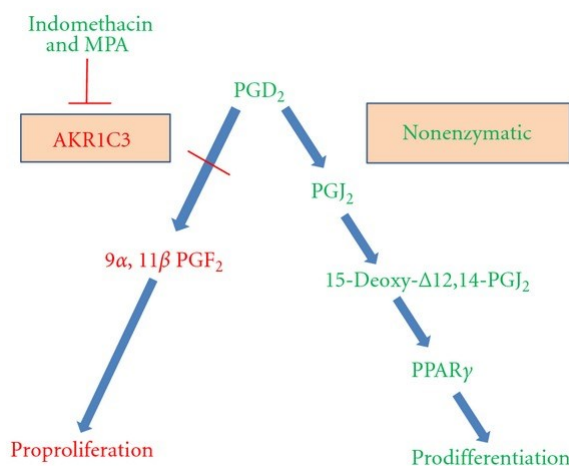
2.2.4 Isoformy AKR1C1-1C4

Isoformy AKR1C1-1C4 jsou homologní a všechny se nacházejí v játrech, ale mají různou extrahepatální distribuci (Barski a kol. 2008). AKR1C1 je hlavně exprimována v nadledvinách, varlatech, vaječnicích a děloze (Endo a kol. 2022), AKR1C2 a 1C3 jsou převážně exprimovány v prostatě a mléčné žláze a AKR1C4 převážně v játrech (Barski a kol. 2008).

Isoformy AKR1C1-1C4 katalyzují redukční i oxidační reakce a jejich přirozenými substráty jsou steroidy a prostaglandiny. Enzymy AKR1C jsou také známé jako dihydrodioldehydrogenasy. Pro regulaci katalýzy AKR1C je důležitý poměr NADH/NADPH, jelikož se tyto enzymy řídí relativní afinitou k těmto nukleotidovým kofaktorům a existujícími kofaktorovými gradienty. (Barski a kol. 2008)

Isoforma AKR1C3 neboli typ 5 17β -hydroxysteroiddehydrogenasa se podílí na metabolismu a biosyntéze estrogenu, androgenu, progesteronu a prostaglandinů a je i tímto metabolismem regulována. AKR1C3 katalyzuje přeměnu estronu na estradiol a přeměnu androstanedionu na testosteron a je jeden z klíčových enzymů ovlivňující koncentraci estrogenů. (Barski a kol. 2008, Xiao a kol. 2021)

AKR1C3 je také známa jako PGF-syntasa, jelikož katalyzuje přeměnu prostaglandinů H2 a D2 (PGD₂) na PGF₂ α a 9 α (11 β -PGF₂ α) (Barski a kol. 2008). Experimenty s nádorovou buněčnou linií karcinomu prostaty (PCa) prokázaly, že nadměrná exprese AKR1C3 podporuje zvýšení PGF₂ α , což vede k proliferaci nádorových buněk (Obr. 6) (Xiao a kol. 2021).



Obr. 6: Vliv inhibice aktivity AKR1C3 na metabolismus PGD₂; převzato z Brown a kol. 2012

Bylo zjištěno, že AKR1C3 se podílí na rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům u buněk A549 (plicní adenokarcinom), HeLa (karcinom děložního hrdla) a MCF-7 (buňky karcinomu prsu) (Penning a kol. 2021). Pacientky s karcinmem prsu, které vykazují nadměrnou expresi AKR1C3, mají horší prognózu než pacientky s nižší expresí. AKR1C3 může zvyšovat poměr 17β -estradiolu a progesteronu v prsní tkáni. Dále bylo prokázáno, že tvorba epimerů PGF₂ α aktivuje receptory PGF. Kromě antracyklinů, AKR1C3 snižuje citlivost buněk karcinomu prsu také na některá další chemoterapeutika, jako jsou například etoposid a cytarabin. (Xiao a kol. 2021)

2.2.5 Isoformy AKR7A2 a 7A3

Rodina AKR7 má schopnost metabolizovat aflatoxin B1 dialdehyd na netoxický alkohol. Proteiny AKR7 jsou, na rozdíl od AKR1, funkční dimery. Diagnostickým substrátem pro rodinu AKR7 je 2-karboxybenzaldehyd, který není redukován jinými AKR a využívá se k maskování nabitých aminoskupin nebo karboxyskupin pro zlepšení absorpce léčiv. (Barski a kol. 2008)

Rodina AKR7 má dva členy: AKR7A2 a 7A3. Zatímco AKR7A3 má tkáňovou distribuci omezenou na žaludek, slinivku břišní, ledviny a játra, enzym AKR7A2 je široce exprimován jak v játrech, tak i v mimojaterních tkáních. AKR7A2 je lokalizován v cytosolu a u nádorové buněčné linie SH-SY5Y (neuroblastom) byl tento enzym detekován také v mitochondriích. Byla také popsána isoforma AKR7A2, která oproti AKR7A2 obsahuje navíc sekvenci aminokyselin zajišťující lokalizaci v Golgiho aparátu. AKR7A2 katalyzuje přeměnu sukcinátsemialdehydu na γ -hydroxybutyrát. Sukcinátsemialdehyd je metabolit neurotransmiteru GABA a je považován za fyziologický substrát AKR7A2. (Barski a kol. 2008)

AKR7A2 neboli aflatoxinreduktasa je katalyticky aktivní vůči aldehydům vznikajícím při peroxidaci lipidů, což poukazuje na funkci AKR7A2 v ochraně před následky oxidačního stresu. AKR7A2 je také zapojena do buněčných detoxikačních drah a bylo zjištěno, že AKR7A2 poskytuje ochranu vůči toxickým aldehydům, jako je například 4-HNE. (Li a kol. 2012)

2.2.6 CBR1

CBR1 (SDR21C1) je monomerní karbonylreduktasa 1 (Persson a kol. 2009). Je členem nadrodiny enzymů SDR a je lokalizována v cytosolu (Barski a kol. 2008). CBR1 je také známá jako prostaglandin-9-ketoreduktasa a je jedním z fyziologických regulátorů metabolismu prostaglandinů. CBR1 se dále podílí na progresi a regulaci nádorových onemocnění a na metabolismu antracyklinů, kde metabolizuje antracyklinové protinádorové léky, jako je daunorubicin a doxorubicin. Expresi CBR1 indukuje složka cigaretového kouře benzo[*a*]pyren a hypoxií indukovaný faktor 1 α . Indukce CBR1 je spojena s rezistencí vůči apoptóze u nádorových buněk. (Miura a kol. 2013)

2.3 Inhibitory antracyklinreduktas

Na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře biochemický věd bylo v rámci testování potenciálních inhibitorů antracyklinreduktas zjištěno, že některé z inhibitorů AKR1B1 inhibují kromě tohoto enzymu také další antracyklinreduktasy, zejména AKR1C3 (nepublikovaná data). Obecně lze inhibitory AKR1B1 rozdělit dle jejich chemické struktury na deriváty karboxylové kyseliny (epalrestat, zopolrestat, zenarestat, ponalrestat, lidorestat a tolrestat) a deriváty spirohydantoinu (minalrestat, ranirestat a fidarestat) (Bailly 2022). Z uvedených látek byly studovány epalrestat, fidarestat, ponalrestat, ranirestat, tolrestat a zopolrestat. Inhibice AKR1C3 na úrovni rekombinantního enzymu byla prokázána u epalrestatu, ponalrestatu, ranirestatu a zopolrestatu. Inhibice AKR1C3 může přispívat k protinádorovým účinkům uvedených sloučenin a zároveň může být využita při snaze překonat rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům v případě, že se na této rezistenci podílí zvýšená exprese antracyklinreduktas.

2.3.1 Epalrestat

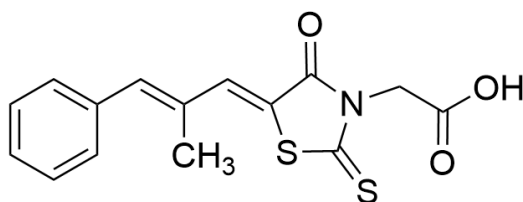
Epalrestat (Obr. 7) je inhibitor enzymů AKR1B1 a 1B10. AKR1B10 je specificky exprimován v epitelálních buňkách lidského tlustého střeva a chrání buňky před poškozením DNA. Ve studiích bylo zjištěno, že epalrestat inhibuje enzymatickou aktivitu AKR1B10, což vede ke karbonyly indukované buněčné smrti nádorových buněk. Inhibice AKR1B10 pomocí epalrestatu může vést k nedostatečné ochraně buněk před poškozením DNA vyvolaným pro buňky toxickými elektrofilními karbonylovými sloučeninami, které se za normálních okolností přeměňují na méně škodlivé alkoholové deriváty. Epalrestat ale tuto přeměnu na alkoholové deriváty blokuje a buňky tak ztrácí cytoprotekci. (Bailly 2022)

V minulosti se epalrestat často využíval k léčbě diabetické periferní neuropatie. V současné době se epalrestat již nepoužívá v rámci primární terapie pro diabetickou neuropatii, ale vyžívá se nadále jako léčivo zlepšující průběh diabetu. (Bailly 2022)

Kromě inhibice AKR1B1 a 1B10 vykazuje epalrestat užitečné protizánětlivé a neuroprotektivní vlastnosti. Bylo prokázáno, že snižuje hladinu prozánětlivých faktorů, jako jsou TNF- α , interleukin-2, interleukin-6 a TGF- β 1 u pacientů s diabetickou nefropatií. Epalrestat je perorální lék pronikající do mozku. Snižuje oxidační stres a tlumí dezorganizaci a apoptózu mozkových buněk neuronů. Epalrestat vykazuje antioxidační

a protizánětlivé účinky užitečné v boji proti neurodegenerativním onemocněním, jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. Neuroprotektivní potenciál epalrestatu a příbuzných inhibitorů AKR1B1 a 1B10 lze dále využít jako terapeutickou strategii ke snížení neurodegenerace vyvolané diabetem mellitem spojené s Parkinsonovou chorobou. (Bailly 2022)

Další významnou funkcí epalrestatu je léčba nádorových onemocnění. Má protinádorové účinky jak v kombinaci s chemoterapií, tak i samostatně. Byly provedeny studie na buněčné úrovni *in vitro*, kdy se ukázalo, že epalrestat může inhibovat proliferaci buněk a modulovat aktivitu proteinkinasy C v přítomnosti vysokých koncentrací glukózy. Studie byly provedeny taktéž i na zvířecích modelech, zejména na myších a byly taktéž provedeny i klinické studie u pacientů s trojitě negativním karcinomem prsu, což poukazuje na potenciální účinek epalrestatu v terapii nádorových onemocnění. Taktéž se slibně jeví využití epalrestatu pro léčbu rezistentních solidních nádorů. Mechanismy spojené s protinádorovými vlastnostmi epalrestatu jsou ale teprve studovány a je potřeba dalších studií pro jejich pochopení. (Bailly 2022)

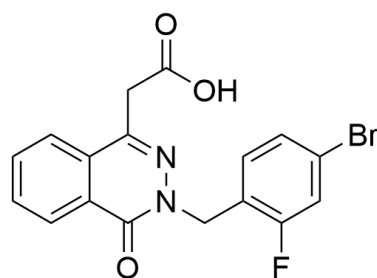


Obr. 7: Epalrestat, upraveno dle (Tammali a kol. 2011)

2.3.2 Ponalrestat

Ponalrestat (Obr. 8) je selektivní nekompetitivní inhibitor AKR1B1, který inhibuje přeměnu glukózy na sorbitol a snižuje produkci PGF2 α v endometriálních buňkách. (Ward a kol. 1990, Bresson a kol. 2011, Bai a kol. 2020)

Ponalrestat byl zkoumán také jako inhibitor AKR1B10. Studie na úrovni buněčné nádorové linie hodnotila inhibiční aktivitu ponalrestatu vůči AKR1B10 a testovala antiproliferativní aktivitu u buněk karcinomu prsu (BT-20) a buněk karcinomu plic (NCI-H460). Zjistilo se, že ponalrestat má silnou antiproliferativní aktivitu a že cílená inhibice AKR1B10 pomocí ponalrestatu by mohla být využita při léčbě nádorových onemocnění. (Cao a kol. 2014)

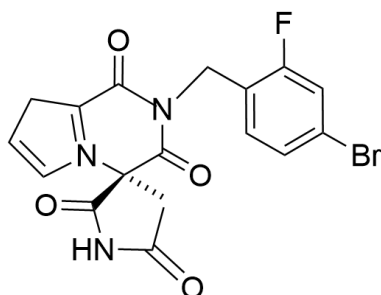


Obr. 8: Ponalrestat, upraveno dle (Tammali a kol. 2011)

2.3.3 Ranirestat

Ranirestat (Obr. 9) je inhibitor AKR1B1 s příznivými účinky na diabetickou senzomotorickou polyneuropatii, která je způsobená heterogenními poruchami vznikajícími v důsledku poruchy metabolismu glukózy, zejména abnormalitami v polyolové dráze. Aktivace polyolové dráhy za diabetických podmínek hraje důležitou roli v patogenezi neuropatie. Inhibice AKR1B1 ranirestatem je nekompetitivní a reverzibilní a zvyšuje se se zvyšující se koncentrací glukózy. Studie na diabetických potkanech ukazují, že jednorázové perorální podání ranirestatu snížilo obsah sorbitolu v sedacím nervu, čočce a erytrocytech. Výsledky studií naznačují, že ranirestat proniká do sedacího nervu v závislosti na dávce. (Matsumoto a kol. 2008, Itou a kol. 2020)

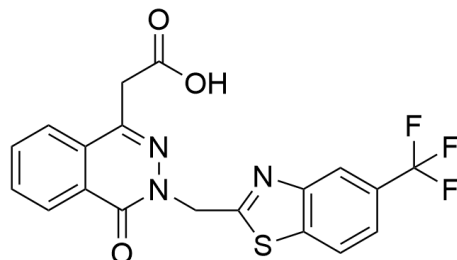
Klinické studie ukazují, že ranirestat se rychle vstřebává a je cíleně určen k použití u pacientů s diabetem mellitem, kteří mají neuropatii a u nichž se v budoucnu očekává i jaterní postižení. Ranirestat je primárně metabolizován hydroxylací, glukosidací, glukoronidací a neenzymatickou hydrolýzou pomocí enzymů UDP-glukuronosyltransferasy 1A a 2A. Cytochrom P450 se na metabolismu ranirestatu nepodílí. (Itou a kol. 2020)



Obr. 9: Ranirestat, upraveno dle (Tammali a kol. 2011)

2.3.4 Zopolrestat

Zopolrestat (Obr. 10) je inhibitor AKR1B1 a 1B10 a využívá se ke klinické léčbě diabetické neuropatie. Inhibiční aktivita zopolrestatu se pro AKR1B1 a 1B10 moc neliší, z důvodu vysoké podobnosti v aminokyselinových sekvencích těchto dvou enzymů a podobnosti jejich trojrozměrné struktury. (Lin a Niu 2023)



Obr. 10: Zopolrestat, upraveno dle (Tammali a kol. 2011)

3 Cíl práce

Na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře biochemických věd byl studován vliv inhibitorů AKR1B1: epalrestatu, ponalrestatu, ranirestatu a zopolrestatu na aktivitu významných antracyklinreduktas (nepublikovaná data). Bylo zjištěno, že kromě AKR1B1 tyto sloučeniny inhibují také enzym AKR1C3. Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda k inhibici AKR1C3 dochází také na úrovni buněčné nádorové linie buněk kolorektálního karcinomu HCT116. Dílčími úkoly této práce bylo:

- 1) Transfekce nádorové buněčné linie HCT116 plazmidem pCI a pCI se zaklonovanou sekvencí kódující AKR1C3.
- 2) Pomocí extrakce daunorubicinolu z buněčného lyzátu a média použitého ke kultivaci buněk a následné analýzy pomocí kapalinové chromatografie zjistit, zda u buněk se zvýšenou expresí AKR1C3 vybrané inhibitory ovlivňují přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol.

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie a biologický materiál

- Buňky kolorektálního karcinomu HCT116 (Sigma-Aldrich, ECACC)
- Plazmidy
 - pCI_AKR1C3 (připraven na Katedře biochemických věd)
 - pCI (Generi Biotech)
 - pmaxGFP (Addgene)
- Médium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) s 10 % fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich)
- JetPrime transfection reagent (Polyplus Transfection, Illkirch, France)
- Lyzační pufr (25 mM Tris, 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100, pH 7.8)
- Ethylacetát (Sigma-Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- 0.1% kyselina mravenčí ve vodě a acetonitril (74:26, v/v) (Sigma-Aldrich)
- Daunorubicin hydrochlorid (SelleckChem)

4.1.2 Přístroje a pomůcky

- Třepačka: Vortex genius 3 (IKA)
- Centrifuga: Eppendorf minispin plus (Generi Biotech)
- CO₂ inkubátor (Biotech)
- Pipety a špičky (Eppendorf)
- 24 jamková destičky (TTP)
- Koncentrátor: Eppendorf concentrator plus (Eppendorf)
- 2 ml Eppendorf zkumavky (Eppendorf)
- 1,5 Eppendorf zkumavky (Eppendorf)
- Vialky skleněné na měření (Agilent Technologies)
- Plastová víčka, inzerty a gumová septa na vialky (Agilent Technologies)
- UHPLC systém Agilent 1290 Infinity II, kolona: Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm), 1290 Infinity inline filter (Agilent, Santa Clara, CA, USA).
- Laminární box (Bioair)

4.2 Metodika

4.2.1 První den – nasazení buněk

Buňky kolorektálního karcinomu HCT116 byly nasazeny do dvou 24 jamkových destiček (300000 buněk/ml média DMEM). Buňky byly inkubovány po dobu 24 hodin v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).

4.2.2 Druhý den – výměna média a transfekce buněk

Transfekce je proces, kdy se vnáší genetický materiál (nukleová kyselina) do eukaryotních buněk, čímž se modifikuje genetická výbava hostitelské buňky (Chong a kol. 2021). V tomto případě do buněk HCT116 byl vnesen plazmid pCI kódující AKR1C3, pCI a jako kontrola byl použit pmaxGFP.

Postup transfekce byl následující. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno za nové: Staré médium (1 ml) bylo odsáto z jednotlivých jamek 24 jamkové destičky a vyměněno za 500 µl nového média. Poté byla provedena transfekce: Byla připravena transfekční směs smícháním transfekčního pufru s plazmidem pCI, pCI_AKR1C3 nebo pmaxGFP (0,25 µg). Směs byla poté zvortexována a krátce zcentrifugována. Následně bylo do směsi přidáno transfekční činidlo JetPrime (0,75 µl) a roztok byl opět zvortexován a krátce stočen. Vzorek byl dále inkubován po dobu 10 minut a poté bylo napipetováno 37,5 µl této transfekční směsi do každé jamky v obou 24 jamkových destičkách a destičky s buňkami byly inkubovány po dobu 24 hodin v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).

4.2.3 Třetí den – Výměna média a nasazení inhibitorů

Po 24 hodinách bylo 500 µl média z každé jamky odsáto a do jamek bylo přidáno médium obsahující vybrané inhibitory (400 µl) a buňky HCT116 byly inkubovány s těmito inhibitory po dobu 30 minut. Po 30 minutách byl k buňkám přidán daunorubicin (100 µl, finální koncentrace 1 µM). Jelikož pro rozpuštění jednotlivých inhibitorů byl použit DMSO, byl DMSO přidán do neinhibované reakce. Jednotlivé reakce byly provedeny v duplikátech nebo v triplikátech. Poté byly obě destičky přesunuty do CO₂ inkubátoru na 37 °C a zde byly inkubovány po dobu 2 a 4 hodin.

U jedné destičky byla po 2 hodinách reakce ukončena. Z každé jamky bylo odebráno 500 µl média, které bylo přeneseno do 2 ml Eppendorf zkumavky. K buňkám

na dně jamek 24 jamkové destičky bylo přidáno 200 μ l lyzačního pufru a destička byla vložena zpět do CO₂ inkubátoru na 37 °C po dobu 15 minut. Poté bylo 200 μ l lyzátu z jamek přidáno do 2 ml Eppendorfek s médiem. Následně byla provedena extrakce daunorubicinu a daunorubicinolu do ethylacetátu: Do zkumavek obsahujících odebrané médium a buněčný lyzát byl přidán 1 ml ethylacetátu a zkumavky byly vloženy na 15 minut do třepačky a poté na 2 minuty do centrifugy, kde byly stočeny při 13 000 rpm. Poté bylo odebráno 700 μ l z horní vrstvy obsahující ethylacetát do 1,5 ml Eppendorf zkumavek a zkumavky byly přemístěny do koncentrátoru, kde byl ethylacetát odpařen. Ke spodní vrstvě roztoku ve 2 ml zkumavkách byl přidán opět 1 ml ethylacetátu a byla opět provedena extrakce do ethylacetátu: Zkumavky byly vloženy na 15 minut do třepačky a poté na 2 minuty do centrifugy na 13 000 rpm. Do 1,5 ml Eppendorf zkumavek z koncentrátoru s vysušenou částí vzorku byla přidána horní vrstva po druhé extrakci do ethylacetátu a zkumavky byly opět přemístěny do koncentrátoru a ethylacetát byl opět odpařen. Po odpaření byly vzorky v 1,5 ml Eppendorf zkumavkách přesunuty na -20 °C do mrazáku.

Stejný postup byl proveden i s druhou destičkou po 4 hodinové inkubaci.

4.2.4 Stanovení množství daunorubicinolu pomocí UHPLC

Vzorky získané odpařením byly následně rozpuštěny v mobilní fázi obsahující 0.1% kyselinu mravenčí ve vodě a acetonitril (74:26, v/v) a změřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Ultrahigh-performance liquid chromatography, UHPLC) (průtok 0,7 ml/min).

4.2.5 Vyhodnocení výsledků

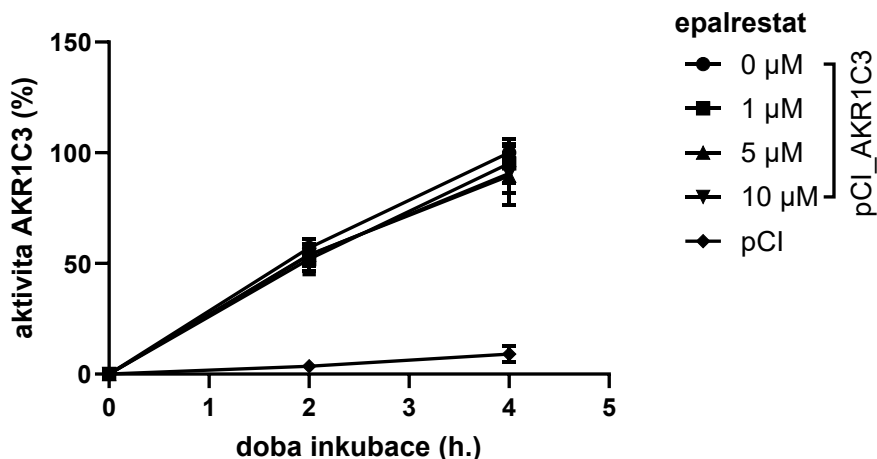
Pomocí UHPLC bylo stanoveno množství daunorubicinolu ve vzorku v ng. Toto množství bylo vynásobeno ředícím faktorem. Pokud byl vzorek získaný odpařením ethylacetátu následně rozpuštěn v 50 μ l mobilní fáze a nástřik v případě UHPLC byl 10 μ l, tak množství daunorubicinolu v ng uvedené v reportu UHPLC bylo vynásobeno 5. Toto množství bylo poté přepočítáno na procenta, kdy za 100 % bylo považováno množství daunorubicinolu v ng v neinhibované reakci vzniklé přeměnou 1 μ M daunorubicinu po 4 hodinové inkubaci. Pro vyhodnocení dat a tvorbu grafů byl použit GraphPad Prism (verze 10.1.2). (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

5 Výsledky

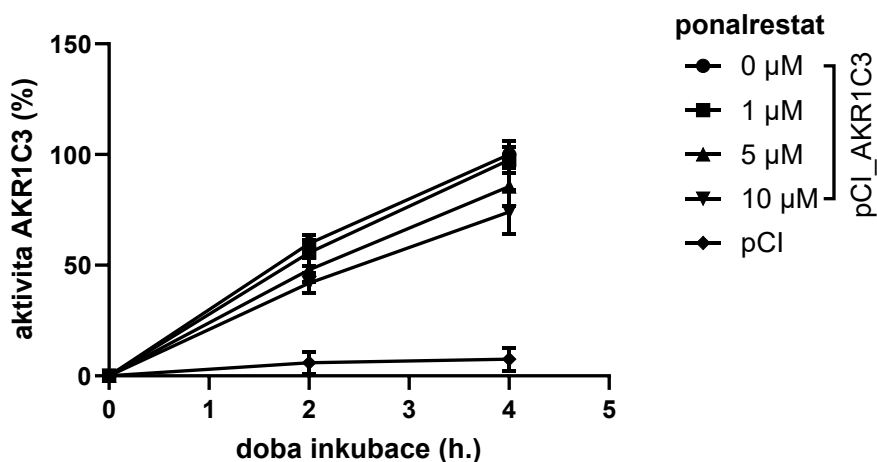
V experimentální části byl testován vliv čtyř potencionálních inhibitorů AKR1C3: epalrestatu, ponalrestatu, ranirestatu a zopolrestatu v koncentracích 1 μM , 5 μM a 10 μM na přeměnu daunorubicinu na jeho metabolit daunorubicinol. Tato inhibice byla studována na úrovni buněčné nádorové linie HCT116. Jedná se o buněčnou linii s přirozeně nízkou expresí AKR1C3, což je důvod, proč byla buněčná linie HCT116 vybrána pro naše experimenty (Wu a kol. 2017). Buňky HCT116 byly nejprve přechodně transfekovány plazmidem pCI_AKR1C3, což je plazmid se zaklonovanou sekvencí studované antracyklinreduktasy. K přechodné transfekci byl použit také plazmid pCI bez sekvence kódující AKR1C3 a plazmid pmaxGFP. Transfekované buňky byly nejprve preinkubovány s vybranými inhibitory (30 minut) a poté byl do kultury přidán daunorubicin (finální koncentrace 1 μM). Po dvou a po čtyřech hodinách inkubace bylo odebráno médium, buňky byly zlyzovány a byla provedena dvojitá extrakce daunorubicinu a daunorubicinolu do ethylacetátu. Dvojitá extrakce v našich experimentech zvyšuje účinnost extrakce, tím i množství námi stanovovaného daunorubicinolu.

Výsledek byl zaznamenán jako závislost množství daunorubicinolu (v %) na době inkubace transfekované buněčné linie HCT116 (po 2 a po 4 hodinách) s daunorubicinem.

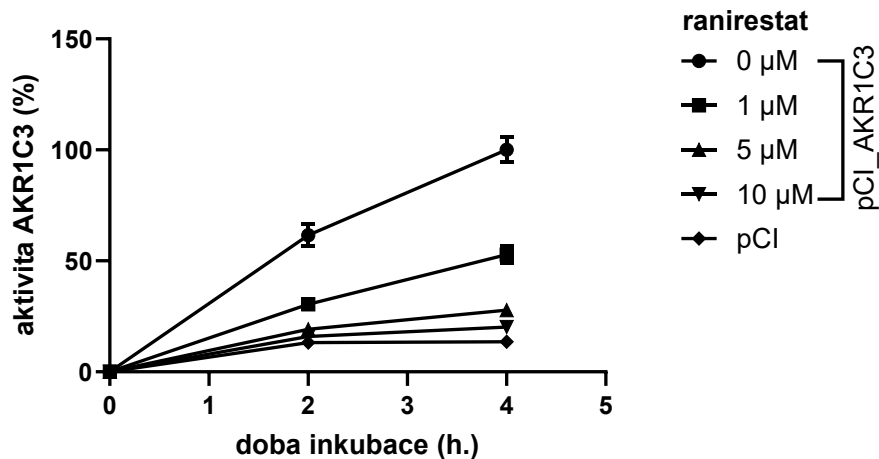
V našich experimentech bylo zjištěno, že ze zkoumaných inhibitorů nejvíce inhiboval ranirestat (Obr. 13) a nejméně inhibovaly epalrestat (Obr. 11) a zopolrestat (Obr. 14). Největší inhibice byla zaznamenána u ranirestatu při koncentraci 10 μM . U ponalrestatu byla zaznamenána inhibice při koncentraci 5 μM a 10 μM (inhibice 15 a 26 % v případě 4 hodinové inkubace), při koncentraci 1 μM nebyla inhibice zaznamenána (inhibice < 5 %) (Obr. 12).



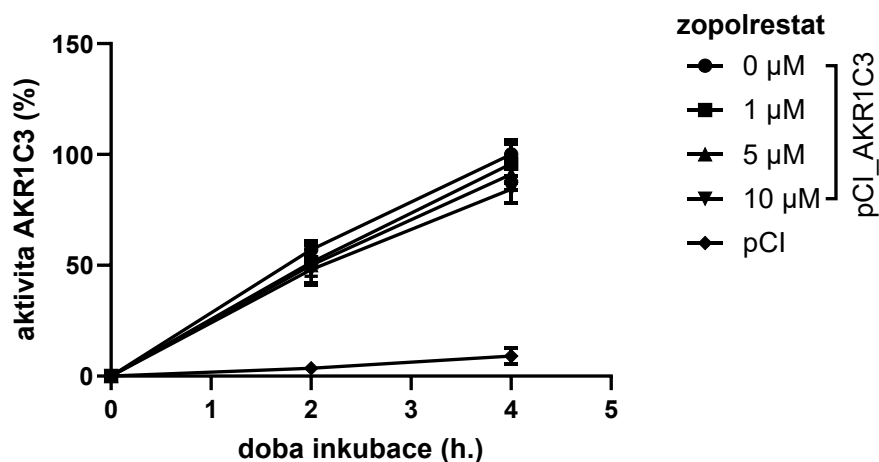
Obr. 11: Vliv epalrestatu na přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol v buněčné linii HCT116. Buňky HCT116 byly přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 (pCI_AKR1C3) nebo pCI a poté inkubovány po dobu 2 a 4 hodin s daunorubicinem (1 μM) v přítomnosti DMSO (rozpuštědlo pro epalrestat) nebo epalrestatu dle postupu uvedeného v metodice. Výsledky zobrazené v tomto grafu pochází ze tří nezávislých experimentů, kdy v rámci každého experimentu byly měřeny triplikáty



Obr. 12: Vliv ponalrestatu na přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol v buněčné linii HCT116. Buňky HCT116 byly přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 (pCI_AKR1C3) nebo pCI a poté inkubovány po dobu 2 a 4 hodin s daunorubicinem (1 μM) v přítomnosti DMSO (rozpuštědlo pro ponalrestat) nebo ponalrestatu dle postupu uvedeného v metodice. Výsledky v tomto grafu pochází ze tří nezávislých experimentů, kdy v rámci dvou experimentů bylo měření provedeno v triplikátech a v rámci jednoho z experimentů v duplikátech.

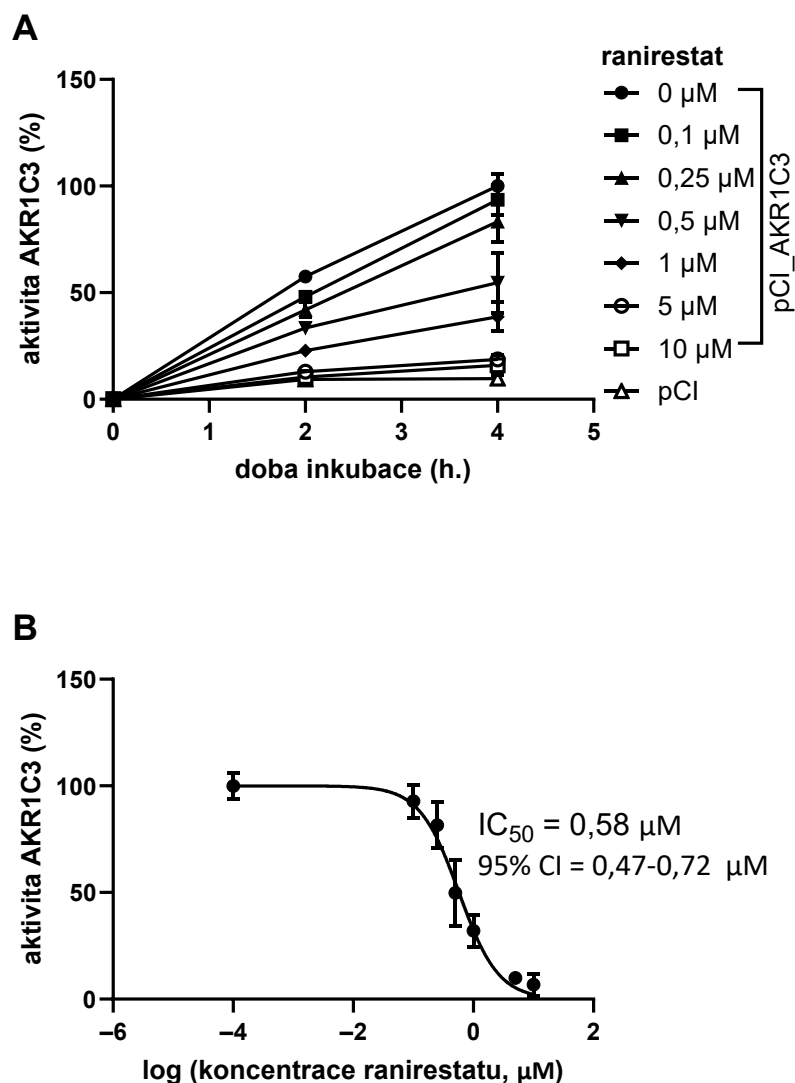


Obr. 13: Vliv ranirestatu na přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol v buněčné linii HCT116. Buňky HCT116 byly přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 (pCI_AKR1C3) nebo pCI a poté inkubovány po dobu 2 a 4 hodin s daunorubicinem (1 μM) v přítomnosti DMSO (rozpuštědlo pro ranirestat) nebo ranirestatu dle postupu uvedeného v metodice. Výsledky v tomto grafu pochází pouze z jednoho nezávislého měření, kdy v rámci tohoto experimentu byly měřeny triplikáty.

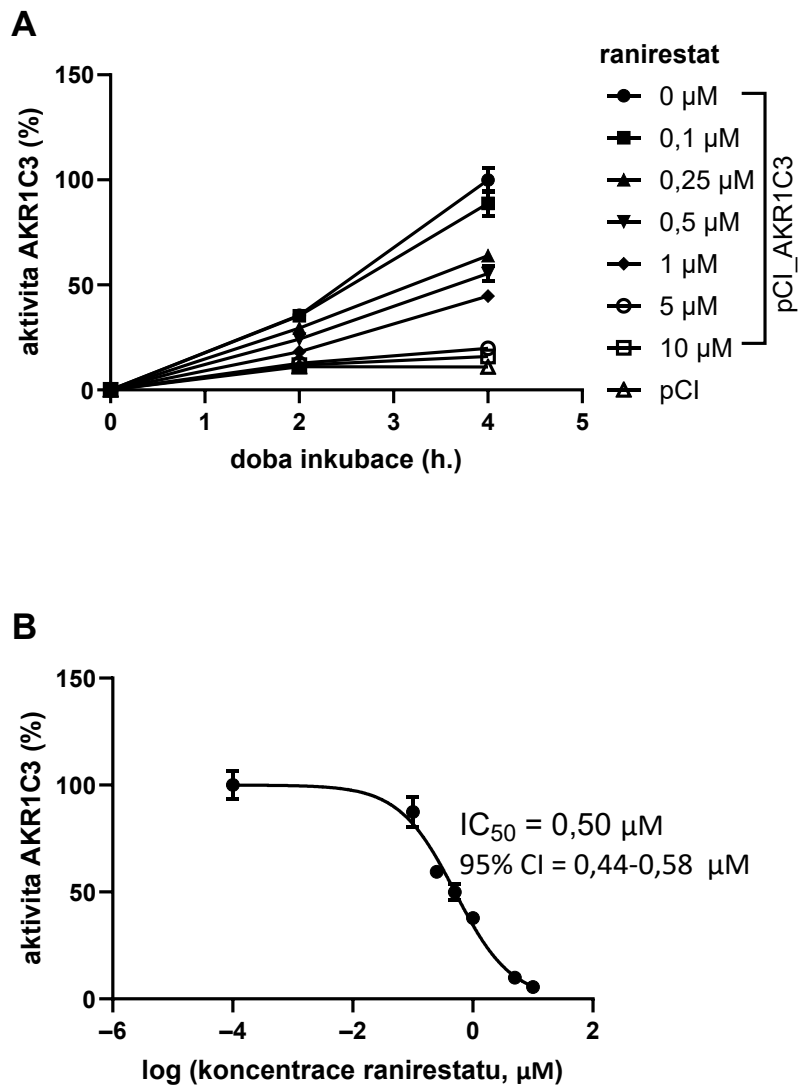


Obr. 14: Vliv zopolrestatu na přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol v buněčné linii HCT116. Buňky HCT116 byly přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 (pCI_AKR1C3) nebo pCI a poté inkubovány po dobu 2 a 4 hodin s daunorubicinem (1 μM) v přítomnosti DMSO (rozpuštědlo pro zopolrestat) nebo zopolrestatu dle postupu uvedeného v metodice. Výsledky v tomto grafu pochází ze tří nezávislých experimentů, kdy v rámci každého experimentu byly měřeny triplikáty.

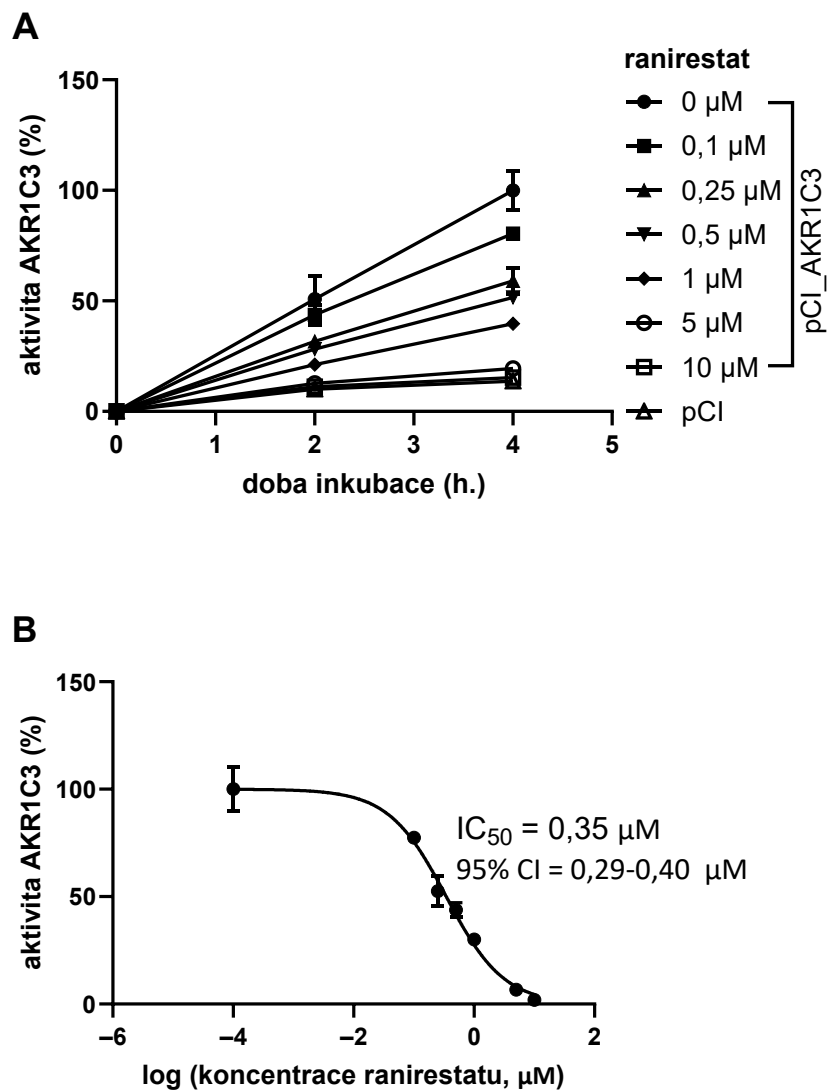
Jelikož se ranirestat ukázal jako perspektivní inhibitor AKR1C3 i na buněčné úrovni (Obr. 14), byly kromě koncentrací 1 μM , 5 μM a 10 μM otestovány i koncentrace 0,1 μM , 0,25 μM a 0,5 μM (Obr. 16A, 17A a 18A). Výsledky získané po 4 hodinách byly použity pro výpočet inhibiční koncentrace (IC_{50}) (Obr. 16B, 17B, 18B). IC_{50} udává koncentraci inhibitoru, která je potřeba ke snížení enzymatické aktivity na polovinu (Aykul a kol. 2016).



Obr. 15: Výsledky prvního experimentu, kdy byl testován vliv 0,1–10 μM ranirestatu na přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol katalyzovanou enzymem AKR1C3 v buněčné linii HCT116. Buňky HCT116 byly přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 (pCI_AKR1C3) nebo pCI a poté inkubovány po dobu 2 a 4 hodin s daunorubicinem (1 μM) v přítomnosti DMSO (rozpuštědlo pro ranirestat) nebo ranirestatu dle postupu uvedeného v metodice (A). Hodnoty získané po 4hodinové inkubaci byly použity pro výpočet IC_{50} a zjištění konfidenčního intervalu (CI) (B). Výsledky v grafech pochází z jednoho nezávislého měření, kdy jednotlivé koncentrace byly měřeny v triplicátech.



Obr. 16: Výsledky druhého experimentu, kdy byl testován vliv 0,1–10 μM ranirestatu na přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol katalyzovanou enzymem AKR1C3 v buněčné linii HCT116. Buňky HCT116 byly přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 (pCI_AKR1C3) nebo pCI a poté inkubovány po dobu 2 a 4 hodin s daunorubicinem (1 μM) v přítomnosti DMSO (rozpuštědlo pro ranirestat) nebo ranirestatu dle postupu uvedeného v metodice (A). Hodnoty získané po 4hodinové inkubaci byly použity pro výpočet IC_{50} a zjištění konfidenčního intervalu (CI) (B). Výsledky v grafech pochází z jednoho nezávislého měření, kdy jednotlivé koncentrace byly měřeny v triplikátech.



Obr. 17: Výsledky třetího experimentu, kdy byl testován vliv 0,1–10 μM ranirestatu na přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol katalyzovanou enzymem AKR1C3 v buněčné linii HCT116. Buňky HCT116 byly přechodně transfekovány plazmidem se sekvencí kódující AKR1C3 (pCl_AKR1C3) nebo pCl a poté inkubovány po dobu 2 a 4 hodin s daunorubicinem (1 μM) v přítomnosti DMSO (rozpuštědlo pro ranirestat) nebo ranirestatu dle postupu uvedeného v metodice (A). Hodnoty získané po 4hodinové inkubaci byly použity pro výpočet IC_{50} a zjištění konfidenčního intervalu (CI) (B). Výsledky v grafech pochází z jednoho nezávislého měření, kdy jednotlivé koncentrace byly měřeny v triplikátech.

6 Diskuse

Antracykliny, jako je daunorubicin a doxorubicin, jsou stále běžně používanými chemoterapeutiky. S jejich klinickým používáním je ale spjata řada omezení, především kardiotoxicita a primární nebo získaná rezistence nádorových buněk vůči těmto léčivům (Aubel-Sadron a kol. 1984). Mechanismem rezistence nádorových buněk k antracyklinům je zvýšená enzymatická detoxikace, snížená dostupnost intracelulárních cílů léčiva, defekty v drahách aktivující apoptózu a exprese biotransformačních enzymů, které mění fyzikálně-chemické vlastnosti antracyklinů (Iovdijová a kol. 2010, Hofman a kol. 2015). Dalším mechanismem rezistence nádorových buněk k antracyklinům je mnohočetná léková rezistence prostřednictvím změněného membránového transportu a zvýšeného efluxu léčiva prostřednictvím ABC transportérů, které nádorové buňky využívají k tomu, aby se vyhnuly toxickým účinkům antracyklinů (Martins-Teixeira a kol. 2020, Gregory a kol. 2003, Hofman a kol. 2015).

Antracykliny jsou metabolizovány pomocí enzymů nadrodiny AKR a nadrodiny SDR, které redukuje antracykliny na sekundární alkoholy (Martins-Teixeira a kol. 2020). Tyto vzniklé metabolity (daunorubicinol, doxorubicinol) se hromadí v kardiomyocytech a působí zde toxicky (Martins-Teixeira a kol. 2020, Penning a kol. 2021). Enzymy AKR1A1, 1B1, B10 a 1C3 zprostředkovávají rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům a jejich inhibitory mohou obnovit citlivost na protinádorové léky (Penning a kol. 2021). Inhibice těchto enzymů a CBR1 může přispět k překonání rezistence nádorových buněk na antracykliny a v léčbě nádorových onemocnění. Inhibice karbonylové redukce a vzniku antracyklinových metabolitů může zvýšit terapeutickou účinnost antracyklinů jakožto chemoterapeutik a také může snížit závažnost a množství nežádoucích účinků. (Malátková a kol. 2013)

Lze předpokládat, že inhibitory antracyklinreduktas zvyšují citlivost nádorových buněk k antracyklinům (Bailly 2022). V této bakalářské práci byly zkoumány čtyři inhibitory AKR1C3: epalrestat, ponalrestat, ranirestat a zopolrestat. Z těchto zkoumaných látek inhiboval na úrovni studované buněčné linie nejvíce ranirestat. Naopak velmi malá inhibice byla zjištěna u epalrestatu a zopolrestatu. Důvod proč tyto látky vykazovaly nižší účinnost vůči enzymu AKR1C3 na úrovni nádorových buněk, než v případě rekombinantního enzymu nejsou známy a pro jejich objasnění je třeba provést další výzkum. Jednou z možností může být interakce studovaných látek

s ABC transportéry, případně vazba na buněčné proteiny. Například u zopolrestatu bylo zjištěno, že se váže na proteiny krevní plazmy (Inskeep a kol. 1994).

Schopnost ranirestatu inhibovat enzymy AKR1B1 a 1C3 může mít význam příležitostně nádorových onemocnění. AKR1B1 a 1C3 mají v organismu různé role. AKR1B1 katalyzuje polyolovou dráhu, která vede k osmotickému a oxidačnímu stresu v důsledku akumulace sorbitolu a změny poměru NADPH/NADP⁺. Nadměrná akumulace osmoticky aktivního sorbitolu je toxická pro organismus. Aktivace polyolové dráhy během hyperglykémie má za následek hromadění sorbitolu v tkáních a předpokládá se, že je faktorem rozvoje komplikací spojených s diabetem. (Bailly 2022, Tammali a kol. 2011)

Kromě funkce v polyolové dráze, má AKR1B1 roli i v epiteliálním mezenchymálním přechodu (EMT). EMT je fenotypová přeměna, která usnadňuje embryonální vývoj, hojení ran a metastázování nádorů. Během EMT ztrácejí epiteliální buňky své vlastnosti a získávají pohyblivý mezenchymální fenotyp. EMT způsobuje získání vlastností podobných nádorovým kmenovým buňkám. Exprese AKR1B1 poskytuje nádorovou a metastatickou výhodu u bazálního karcinomu prsu prostřednictvím pozitivní regulační zpětné vazby, která aktivuje EMT. Inhibicí AKR1B1 tedy dochází i k inhibici EMT, a tedy i k inhibici metastázování nádorových onemocnění. (Wu a kol. 2017)

Jak bylo popsáno v teoretické části, AKR1C3 má funkci v metabolismu prostaglandinů, při přeměně kyseliny retinové a při redukci antracyklinů na jejich metabolity. AKR1C3 katalyzuje přeměnu prostaglandinů H2 a D2 (PGD2) na PGF2 α a 9 α (11 β -PGF2 α) (Barski a kol. 2008). Nadměrná exprese AKR1C3 podporuje zvýšení PGF2 α , což vede k proliferaci nádorových buněk (Xiao a kol. 2021). AKR1C3 spolu s AKR1B1, 1B10, 1C1 a 1C4 přeměňuje retinal na retinol a zabraňuje tak reakci, kdy se přeměňuje retinol přes retinal na kyselinu retinovou, čímž se snižuje množství kyseliny retinové v organismu (Gallego a kol. 2007). Pokles hladiny kyseliny retinové má spojitost se ztrátou diferenciací buněk a rozvojem nádorového onemocnění (Gallego a kol. 2007). V případě inhibice AKR1C3 lze tedy očekávat snížení hladiny prostaglandinů, které se podílí na proliferaci nádorových buněk (Barski a kol. 2008) a také lze očekávat, že nedojde k poklesu hladiny kyseliny retinové (Gallego a kol. 2007).

Tyto mechanismy tak mohou působit proti rozvoji nádorového onemocnění. V naší studii jsme se zaměřili na inhibici přeměny daunorubicinu na jeho v nádorových buňkách méně účinný metabolit daunorubicinol. Lze předpokládat, že v případě, že k rezistenci nádorových buněk vůči daunorubicinu bude přispívat zvýšená exprese AKR1C3, tak léčba nádorového onemocnění zahrnující inhibitor tohoto enzymu může být účinnější. Případně bude možné snížit dávku podávaného antracyklinu a omezit tak jeho nežádoucí účinky. (Ax a kol. 2000, Bains a kol. 2013)

7 Závěr

V této bakalářské práci jsem se v teoretické zabývala mechanismy účinku antracyklinů, kardiotoxicitou antracyklinů a mechanismy rezistence nádorových buněk k antracyklinům prostřednictvím biotransformačních enzymů a ABC transportérů.

Následně jsem se podrobněji zaměřila na významné antracyklinreduktasy z nadrobin AKR a SDR, které metabolizují antracykliny na jejich C13-hydroxy metabolity.

Hlavním cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda epalrestat, ponalrestat, ranirestat a zopolrestat inhibují přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol katalyzovanou enzymem AKR1C3 na úrovni buněčné nádorové linie buněk kolorektálního karcinomu HCT116. Jelikož se tato buněčná linie vyznačuje přirozeně nízkou expresí enzymu AKR1C3, bylo mým dílčím cílem provést transientní transfekci buněk HCT116 plazmidem kódujícím tento enzym. Následně na úrovni takto transfekovaných buněk zjistit, zda u buněk se zvýšenou expresí AKR1C3 vybrané inhibitory ovlivňují přeměnu daunorubicinu na daunorubicinol. Dílčí cíle i hlavní cíl bakalářské práce byly splněny. Bylo zjištěno, že z vybraných inhibitorů inhibuje na úrovni studované buněčné linie nejvíce ranirestat. Naopak velmi malá inhibice byla zjištěna u epalrestatu a zopolrestatu. Důvod proč tyto látky vykazovaly nižší účinnost vůči enzymu AKR1C3 na úrovni nádorových buněk, než v případě rekombinantního enzymu nejsou známy a pro jejich objasnění je třeba provést další výzkum.

8 Seznam zkratek

4-HNE	4-hydroxynonenal
ABC	ATP-binding cassette
ADH	Alkoholdehydrogenasa
AKR	Aldo-ketoreduktasy
ALDH	Aldehyddehydrogenasa
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloblastická leukémie
AR	AKR1B1
CI	Konfidenční interval
C_{\max}	Maximální koncentrace
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMT	Epiteliální mezenchymální přechod
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration)
GRC	Ganglionové buňky sítnice
H.	Hodiny
IC ₅₀	Poloviční inhibiční koncentrace
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
NOS	Reaktivní formy dusíku
NRF2 (NFE2L2)	Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2
ns-SNP	Nesynonymní jednonukleotidové polymorfismy
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SDH	Sorbitoldehydrogenasy
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
TNF- α	Tumor necrosis factor α
Top1	Topoisomerasa I
Top2	Topoisomerasa II
Top2 α	Topoisomerasa II alfa
Top2 β	Topoisomerasa II beta
UHPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultrahigh-performance liquid chromatography)
WHO	Světová zdravotnická organizace

9 Literatura

Aubel-Sandron, G. a Londos-Gagliardi, D. (1984) Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 66(5), 333–352, doi:10.1016/0300-9084(84)90018-X.

Ax, W.; Soldan, M.; Koch, L. a Maser, E. (2000) Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochemical Pharmacology* 59(3), 293–300, doi: 10.1016/S0006-2952(99)00322-6.

Aykul, S. a Martinez-Hackert, E. (2016) Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry* 508, 97–103, doi: 10.1016/j.ab.2016.06.025.

Bai, Q.; Wang, X.; Mao, X. a Hu, D. (2020) Aldo-keto reductase 1 member B1 (AKR1B1) inhibits retinal ganglion cell activity via activating NF- κ B pathway and inducing mouse BV-2 microglia activation, online. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33325358/>. [cit 2024-03-30].

Bailly, Ch. (2022) Moving toward a new horizon for the aldose reductase inhibitor epalrestat to treat drug-resistant cancer. *European Journal of Pharmacology* 931, 175191. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175191.

Bains, O.S.; Grigliatti, T.A.; Reid, R.E. a Riggs, K.W. (2010) Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 335(3), 533–545, doi: 10.1124/jpet.110.173179.

Bains, O.S.; Karkling, M.J.; Grigliatti, T.A.; Reid, R.E. a Riggs, K.W. (2009) Two nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of human carbonyl reductase 1 demonstrate reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Drug metabolism and disposition* 37(5), 1107–1114. doi: 10.1124/dmd.108.024711.

Bains, O.S.; Szeitz, A.; Lubieniecka, J.M.; Cragg, G.E.; Grigliatti, T.A. et al. (2013) A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 347(2), 375–387. doi: 10.1124/jpet.113.206805.

- Barski, O.A.; Tipparaju, S.M. a Bhatnagar, A. (2008) The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug metabolism reviews* 40(4), 553–624, doi:10.1080/03602530802431439.
- Bresson, E.; Boucher-Kovalik, S.; Chapdelaine, P.; Madore, E.; Harvey, N. et al. (2011) The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(1), 210–219, doi: 10.1210/jc.2010-1589.
- Brown, G. a Hughes, P. (2012) Retinoid differentiation therapy for common types of acute myeloid leukemia. *Leukemia Research and Treatment*, 1–11, doi:10.1155/2012/939021.
- Cao, Z.; Zhou, B.; Chen, X.; Huang, D.; Zhang, X. et al. (2014) Statil suppresses cancer cell growth and proliferation by the inhibition of tumor marker AKR1B10. *Anti-Cancer Drugs* 25(8), 930–937, doi: 10.1097/CAD.000000000000121
- Cardinale, D.; Iacopo, F. a Cipolla, C.M. (2020) Cardiotoxicity of anthracyclines. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 7, doi: 10.3389/fcvm.2020.00026.
- Endo, S.; Morikawa, Y.; Matsunaga, T.; Hara, A. a Nishinaka, T. (2022) Porcine aldo-keto reductase 1C subfamily members AKR1C1 and AKR1C4: Substrate specificity, inhibitor sensitivity and activators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 221, doi: 10.1016/j.jsbmb.2022.106113.
- Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L. a kol (2020) Global cancer observatory: cancer today. Online. *Lyon: International Agency for Research on Cancer*. <https://gco.iarc.fr/today>. [cit. 2024-04-23].
- Fuji, J.; Homma, T.; Miyata, S. a Takahashi, M. (2021) Pleiotropic actions of aldehyde reductase (AKR1A). *Metabolites* 11(6), doi: 10.3390/metabo11060343
- Gallego, O.; Ruiz, F.X.; Ardèvol, A.; Domínguez, M.; Alvarez, R. et al. (2007) Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(52), 20764–20769, doi.: 10.1073/pnas.0705659105.

Gregory, D.; Fojo, L.T. a Bates, S.E. (2003) The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist* 8(5), 411–424, doi: 10.1634/theoncologist.8-5-411

Hodgson, E.A. textbook of modern toxicology. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2004. ISBN 0-471-26508-x.

Hofman, J.; Malcekova, B.; Skarka, A.; Novotna, E a Wsol V. (2014) Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: The role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology* 278(3), 238–248, doi: 10.1016/j.taap.2014.04.027.

Hofman, J.; Skarka, A.; Havrankova, J. a Wsol, V. (2015) Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases 96(3), 168–178, doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.005.

Hortobágyi, G.N. (1997) Anthrazykline in der Krebstherapie 54(4), 1–7, doi: 10.2165/00003495-199700544-00003.

Chong, Z.X; Yeap, S.K. a Ho, W.Y. (2021) Transfection types, methods and strategies: *a technical review* 9, doi: 10.7717/peerj.11165.

Inskeep, P.B.; Ronfeld, R.A.; Peterson, M.J. a Gerber, N. (1994) Pharmacokinetics of the aldose reductase inhibitor, zopolrestat, in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology* 34(7), 760–766, doi: 10.1002/j.1552-4604.1994.tb02037.x.

Iovdijová, A. a Bencko, V. (2010) Potential risk of exposure to selected xenobiotic residues and their fate in the food chain part I: classification of xenobiotics. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 17(2), 183–192, Online. <https://www.aaem.pl/Potential-risk-of-exposure-to-selected-xenobiotic-residues-and-their-fate-in-the,71633,0,2.html>. [cit. 2023-12-26].

Itou, M.; Fujita, T.; Inoue, K.; Uchida, N.; Takagaki, T. et al. (2020) Pharmacokinetics and safety of ranirestat in patients with hepatic impairment. *The Journal of Clinical Pharmacology* 60(10), 1397–1403, doi: 10.1002/jcph.1636

Jirkovský, E.; Jirkovská, A.; Bavlovič-Piskáčková, H.; Skalická, V.; Pokorná, Z. et al. (2021) Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II beta and not metal chelation. *Circulation: Heart Failure* 14(11), e008209, doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.008209.

Kollárová, P.; Lencova, O.; Karabanovich, G.; Kubes, J.; Vanova, N. et al. (2022). Abstract P3116: Cardioprotective effects of dexrazoxane derivatives against chronic anthracycline cardiotoxicity depend on topoisomerase II beta inhibition and prevention of DNA damage signaling in the heart. *Circulation Research* 131(1), doi: 10.1161/res.131.suppl_1.P3116.

Li, D.; Ferrari, M. a Ellis, E.M. (2012) Human aldo–keto reductase AKR7A2 protects against the cytotoxicity and mutagenicity of reactive aldehydes and lowers intracellular reactive oxygen species in hamster V79-4 cells. *Chemico-Biological Interactions* 195(1), 25–34, doi: 10.1016/j.cbi.2011.09.007.

Li, M. a Liu, Y. (2016) Topoisomerase I in human disease pathogenesis and treatments. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 14(3), 166–171, doi: 10.1016/j.gpb.2016.02.004

Lin, P. a Niu, Y. (2023) Inhibitory selectivity to the AKR1B10 and aldose reductase (AR): insight from molecular dynamics simulations and free energy calculations. *RSC Advances* 13(38), 26709–26718, doi: 10.1039/D3RA02215C

Malátková, P. a Wsól, V. (2013) Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 46(1), 96–123, doi: 10.3109/03602532.2013.853078

Martins-Teixeira, M.B. a Carvalho, I. (2020) Antitumour anthracyclines: progress and perspectives. *ChemMedChem* 15(11), 933–948, doi: 10.1002/cmdc.202000131

Matsumoto, T.; Ono, Y.; Kurono, M.; Kuromiya, A.; Nakaruma, K. et al. (2008) Ranirestat (AS-3201), a potent aldose reductase inhibitor, reduces sorbitol levels and improves motor nerve conduction velocity in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 107(3), 231–237, doi: 10.1254/jphs.08061FP

Menna, P. a Salvatorelli, E. (2017) Primary prevention strategies for anthracycline cardiotoxicity: a brief overview. *Chemotherapy* 62(3), 159–168, doi: 10.1159/000455823

- Mindnich, R.D. a Penning, T.M. (2009) Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Human Genomics* 3(4), doi: 10.1186/1479-7364-3-4-362.
- Miura, T.; Taketomi, A.; Nishinaka, T. a Terada, T. (2013) Regulation of human carbonyl reductase 1 (CBR1, SDR21C1) gene by transcription factor Nrf2. *Chemico-Biological Interactions* 202(1-3), 126–135, doi: 10.1016/j.cbi.2012.11.023
- Mordente, A.; Meucci, E.; Martorana, G.E.; Tavian, D. a Silvestrini, A. (2017) Topoisomerases and anthracyclines: recent advances and perspectives in anticancer therapy and prevention of cardiotoxicity. *Current Medicinal Chemistry* 24(15), doi: 10.2174/0929867323666161214120355.
- Mordente, A.; Meucci, E.; Silvestrini, A.; Martorana, G. a Giardina, B. (2009) New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Current Medicinal Chemistry* 16(13), 1656–1672, doi: 10.2174/092986709788186228
- Mordente, A.; Silvestrini, A.; Martorana, G.E.; Tavian, D. a Meucci, E. (2015) Inhibition of anthracycline alcohol metabolite formation in human heart cytosol: a potential role for several promising drugs. *Drug Metabolism and Disposition* 43(11), 1691–1701, doi: 10.1124/dmd.115.065110
- Niimi, N.; Yako, H.; Takaku, S.; Chung, S.K. a Sango, K. (2021) aldose reductase and the polyol pathway in schwann cells: old and new problems. *International Journal of Molecular Sciences* 22(3), doi: 10.3390/ijms22031031
- Penning, T.M (2015) The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions* 234, 236–246, doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.024.
- Penning, T.M.; Jonnalagadda, S.; Trippier, P.C.; Rižner, T.L. a Gottesman, M. (2021) Aldo-keto reductases and cancer drug resistance. *Pharmacological Reviews* 73(3), 1150–1171, doi: 10.1124/pharmrev.120.000122.
- Persson, B; Kallberg, Y.; Bray, J.E.; Bruford, E.; Dellaporta, S.L. et al. (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions* 178(1-3), 94–98, doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.040

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

Sacco, G.; Giampietro, R.; Salvatorelli, E.; Menna, P.; Bertani, N. et al. (2003) Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity. *British Journal of Pharmacology* 139(3), 641–651, doi: 10.1038/sj.bjp.0705270

Sharma, P.; Hu-Lieskovan, S.; Wargo, J.A. a Ribas, A. (2017) Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168(4), 707–723, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017

Skálová, L. (2017) Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3733-4.

Sudhakaran, S.; Archana, T.M. a Aguliar, C. N. (2017) Biotransformation enzymes. in: Sugathan, S.; Pradeep, N. S. a Abdulhameed, S. et al. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology*. Singapore: Springer Singapore, 129–150, doi: 10.1007/978-981-10-428-3_5

Tammali, R.; Srivastava, K.S a Ramana, V.K. (2011) Targeting aldose reductase for the treatment of cancer. *Current Cancer Drug Targets* 11(5), 560–571, doi: 10.2174/156800911795655958.

Ward, W.H.J.; Sennitt, CH.M.; Ross, H.; Dingle, A.; Timms, D. et al. (1990) Ponalrestat: a potent and specific inhibitor of aldose reductase. *Biochemical Pharmacology* 39(2), 337–346, doi: 10.1016/0006-2952(90)90033-H

World Health Organization (WHO): Cancer. Online. 2022. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [cit. 2024-04-23].

Wu, X.; Li, X.; Fu, Q.; Cao, Q.; Chen, X. et al. (2017) AKR1B1 promotes basal-like breast cancer progression by a positive feedback loop that activates the EMT program. *Journal of Experimental Medicine* 214(4), 1065–1079, doi: 10.1084/jem.20160903.

Xiao, X.-Z.; Lin, L.-Y.; Zhuang M.-K.; Zhong, C.-M. Chen F.-L. (2021) Roles of AKR1C3 in malignancy. *Chinese Medical Journal* 134(9), 1052–1054, doi: 10.1097/CM9.0000000000001379