

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Potenciální role inhibitoru tipifarnibu v léčbě akutní
myeloidní leukémie**

**The potencial role of inhibitor tipifarnib in the treatment of acute
myeloid leukemia**

Bc. Patricie Hrbáčová

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

Srdečně bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Lence Laštovičkové, PhD. za velmi vstřícný a nápomocný přístup, spoustu cenných rad a také za poskytnutí odborného vedení při zpracování této práce. Neméně vděčná jsem také své rodině, kamarádům a příteli za podporu během celého studia.

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

V Hradci Králové, 2024

Patricie Hrbáčová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Patricie Hrbáčová

Školitel: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Název diplomové práce: Potenciální role inhibitoru tipifarnibu v léčbě akutní myeloidní leukémie

Antracyklinová antibiotika, kam se řadí například daunorubicin, jsou zlatým standardem v léčbě akutní myeloidní leukémie. Může na ně však vznikat rezistence, a navíc nejsou plně specifická, a kromě rakovinných buněk poškozují i jiné struktury, zejména pak buňky srdeční svaloviny. Působením karbonyl redukujících enzymů dochází k přeměně daunorubicinu na metabolit daunorubicinol, jenž má výrazně horší vlastnosti v léčbě. Této reakci je možné zabránit použitím specifického inhibitoru.

V této práci byl testován inhibitor tipifarnib a jeho vliv na reakce katalyzované buď aldo-ketoreduktázami (AKR1A1, 1B1, 1B10 a 1C3) anebo dehydrogenázami/reduktázami s krátkým řetězcem (CBR1).

Největší inhibice byla zaznamenána u enzymu AKR1C3. Při použití tipifarnibu o koncentraci 10 μM byla naměřena inhibice 88,0 % a inhibitor o koncentraci 50 μM inhiboval reakci z 92,9 %. Proto se v pokusech pro určení jednotlivých kinetických parametrů pokračovalo pouze s tímto enzymem. Průměrná hodnota IC_{50} byla experimentálně stanovena na $0,51 \pm 0,03 \mu\text{M}$ a hodnota inhibiční konstanty na $0,26 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Výsledky napovídají, že se jedná o smíšený typ inhibice se sklonem k nekompetitivnímu typu a reverzibilně se vázající inhibitor. Inhibitor tipifarnib byl v roce 2021 schválen FDA jako léčivo.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Patricie Hrbáčová

Supervisor: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The potential role of inhibitor tipifarnib in the treatment of acute myeloid leukaemia

Anthracycline antibiotics, such as daunorubicin, are the gold standard in a treatment of acute myeloid leukaemia. However, they are not fully specific and besides cancer cells, they can damage also other structures, especially heart muscle cells. Moreover, the anthracycline resistance can develop. The daunorubicin is metabolized by carbonyl reducing enzymes to daunorubicinol, which has significantly worse therapeutic effect. This reaction can be prevented by using a specific inhibitor.

In the thesis, the inhibitor tipifarnib and its effect on reactions catalysed either by aldo-ketoreductases (AKR1A1, 1B1, 1B10 and 1C3) or short-chain dehydrogenases/reductases (CBR1) were tested.

The strongest inhibition was observed for AKR1C3. When using 10 μM tipifarnib in reaction, an inhibition of 88.0% was observed, and 50 μM inhibitor resulted in inhibition by 92.9%. That is why kinetic parameters were specified only for AKR1C3 in all other experiments. The IC_{50} value was experimentally determined to $0.51 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and the inhibition constant value to $0.26 \pm 0.03 \mu\text{M}$. The results suggested that it was a mixed type of inhibition tending to noncompetitive type and a reversibly binding inhibitor. The inhibitor tipifarnib was approved by the FDA in 2021 as a drug.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Akutní myeloidní leukémie	9
2.1.1	Příznaky	9
2.1.2	Patogeneze	9
2.1.3	Diagnostika	10
2.1.4	Klasifikace dle WHO	11
2.1.5	FAB klasifikace	13
2.1.6	Léčba AML	13
2.2	Daunorubicin	16
2.2.1	Chemické vlastnosti	16
2.2.2	Mechanismus účinku	16
2.2.3	Toxicita	18
2.2.4	Rezistence	19
2.3	Karboxyl redukující enzymy	21
2.3.1	Aldo-ketoreduktázy	22
2.3.2	Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem	24
2.4	Tipifarnib	25
2.4.1	Chemické vlastnosti	25
2.4.2	Mechanismus účinku	26
2.5	Typy inhibice	27
3	CÍL PRÁCE	30
4	MATERIÁL A METODIKA	31
4.1	Materiál	31
4.1.1	Chemikálie	31
4.1.2	Přístroje a pomůcky	31

4.2	Metodika.....	33
4.2.1	Základní screening.....	33
4.2.2	Stanovení inhibiční koncentrace IC ₅₀	33
4.2.3	Stanovení typu inhibice a K _i	33
4.2.4	Stanovení pevnosti vazby	34
4.2.5	Příprava reagensů	34
4.2.6	Postup <i>in vitro</i> inkubace	36
4.2.7	UHPLC analýza.....	37
4.2.8	Vyhodnocení výsledků.....	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
5.1	Základní screening.....	39
5.2	Stanovení inhibiční koncentrace IC ₅₀	43
5.3	Stanovení typu inhibice a K _i	47
5.4	Stanovení pevnosti vazby	51
6	ZÁVĚR	54
7	SEZNAM ZKRATEK.....	55
8	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	57
9	SEZNAM TABULEK.....	58
10	SEZNAM LITERATURY	59

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění každoročně postihují nemalou část populace. Nejvyšší příčky v četnosti zaujímá rakovina prsu, prostaty a kolorektální karcinom. A přestože se akutní myeloidní leukemie (AML) vyskytuje poměrně vzácně, jde o agresivní hematoonkologické onemocnění, kterému je potřeba také věnovat pozornost. Poškozeny jsou zejména bílé krvinky, které v kostní dřeni proliferují na úkor červené řady a trombocytů, což vede k rozvoji anémie a trombocytopenie. AML onemocní v České republice ročně pouze 2-3 nově diagnostikovaní pacienti na 100 tisíc obyvatel. Neléčená nemoc je však často fatální, proto je nutné soustředit výzkum na její léčbu (ÚZIS, 2021; Zatloukalová, 2021).

V dnešní době typ léčby závisí na zdravotním stavu ale také mimo jiné na věku pacienta. Pacienti mladší 65 let podstupují intenzivní chemoterapii, při které se jim podávají antracyklinová antibiotika, jako například daunorubicin. Následuje absolvování chemoterapie ambulantně či v kombinaci s transplantací kostní dřeně. Daunorubicin se v játrech působením karbonyl redukujících enzymů (CRE) metabolizuje na derivát, kterým je daunorubicinol. Ten má výrazně nižší účinnost, je mnohem toxičtější než jeho parentní látka a také se podílí na vzniku rezistence. Zmíněné faktory velmi znesnadňují samotnou léčbu pacienta, a proto se hledají nové způsoby, jak této reakci zabránit.

Jednou z možností je využití různých inhibitorů CRE. Na poli výzkumu jich existuje již několik a vyvíjeny jsou stále další. V této práci byl studován inhibitor farnesyltransferázy, tipifarnib (TIP). Testování probíhalo v *in vitro* podmínkách a hodnotilo se, na které z rekombinantně připravených enzymů má TIP vliv. Následně byly pro vybraný enzym měřeny kinetické parametry (IC_{50} , inhibiční konstanta a síla pevnosti vazby inhibitoru na enzym).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Akutní myeloidní leukémie

2.1.1 Příznaky

AML je agresivní hematologická malignita postihující zejména leukocyty. Pro toto onemocnění je charakteristická proliferace buněk myeloidní řady v kostní dřeni, což vede ke snížené produkci erytrocytů a trombocytů. Anémie se poté klinicky projevuje bledostí, dušností a únavou. V důsledku trombocytopenie, tedy sníženého počtu krevních destiček, dochází ke zvýšenému krvácení. V krevním obrazu se leukocyty vyskytují ve zvýšeném, což je častější, ale i sníženém počtu. Proto klinické příznaky zahrnují problémy jak s leukopenií, tak s leukocytózou. Při leukopenii má pacient horečky a časté infekce. Naopak při leukocytóze dochází k infiltraci bílých krvinek do orgánů a k jejich zvětšení, jmenovitě jde o hepatosplenomegalii a lymfadenopatii. Extrémní zvýšení leukocytů, tedy hyperleukocytóza, může vést k příznakům leukostázy, jako je oční a cerebrovaskulární dysfunkce (Kabel, 2017; Stubbins, 2022).

2.1.2 Patogeneze

Hlavní příčinou vzniku AML je přítomnost onkogenních fúzních proteinů, které vznikají jako důsledek specifických chromozomálních translokací. Tyto translokace vznikají v místě chromozomálních zlomů, kdy se exony dvou nehomologních chromozomů vymění a vzniká tak nový, fúzní gen, který kóduje vznik fúzního proteinu. Ten je tedy vzniklý spojením dvou proteinů, z nichž každý má jinou funkci. Jeden z proteinů funguje jako transkripční faktor, druhý protein má variabilnější funkci, ale často se podílí na přežití nebo apoptóze buněk. Vzniklé onkogenní fúzní proteiny fungují jako transkripční regulátory, které narušují proces zdravé myeloidní diferenciaci a zastavují zrání leukocytů ve formě nezralých progenitorových buněk. Objevuje se také zvýšená rezistence na apoptózu (Alcalay, 2001).

2.1.3 Diagnostika

Celkové klinické příznaky, které jsou vypsané výše, jsou u pacientů bezpochyby důvodem k návštěvě svého lékaře. První diagnostika AML probíhá tedy na základě anamnézy pacienta. U některých pacientů dojde k nálezů nemoci při vyšetření krevního obrazu jako součást preventivní lékařské prohlídky. Jak je zmíněno výše, v krevním obraze periferní krve je přítomna anémie způsobena nízkým počtem erytrocytů (méně než $3,8 \times 10^{12}/l$ erytrocytů), trombocytopenie (méně než $150 \times 10^9/l$ trombocytů) a většinou leukocytóza až hyperleukocytóza (více než $10 \times 10^9/l$ leukocytů). Především jsou v krevním nátěru přítomny nezralé formy leukocytů (Pelcovits, 2020).

Klíčové je ale morfologické vyšetření nátěru kostní dřeně. Pro stanovení diagnózy je rozhodující přítomnost alespoň 20 % blastů, počet blastů se počítá na 500 buněk. Blastické buňky mají často typické dysplastické změny, zejména pak v cytoplazmě. Také je na první pohled v mikroskopu zvýšená celková buněčnost kostní dřeně. Současným standardem je provádění imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie. Při ní se využívá monoklonálních protilátek proti specifickému povrchovému antigenu a na ně lze navázat fluorochromy. Součástí analyzátoru je laser jako zdroj světla, který ozařuje jednotlivé buňky. Při kontaktu s konkrétní buňkou dochází k rozptylu světla a absorpce energie fluorochromy, které následně emitují světlo určité vlnové délky. Cytochemie, která hrála roli především ve starších klasifikačních schématech, již není vyžadována, ale může být nápomocná při identifikaci podtypu AML (Betz, 2010; Stubbins, 2022).

Protože pro AML bývá typická přítomnost určitého fúzního genu, můžeme pro stanovení diagnózy využít také cytogenetických metod. Zlatým standardem cytogenetického vyšetření je karyotypizace. Při tomto vyšetření se specifickými fluorescenčními sondami značí celé chromozomy. K vyhodnocení se pak používá fluorescenční mikroskop. Karyotypizace však nemusí detegovat některé jemné translokace a v tom případě se doporučuje použít metodu zvanou Fluorescenční In Situ Hybridizace (FISH). Při této analýze se využívá fluorescenčních sond, které se po denaturaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) navážou podle pravidel komplementarity na vyšetřované DNA vlákno. Navázání se projeví jako fluorescenční signál, který je zachycen detektorem. Cytogenetická analýza je jedním z nejsilnějších nástrojů k predikci prognózy onemocnění. Molekulární vyšetření, konkrétně real-time polymerová řetězová reakce (RT-PCR) (neboli reverzně-transkriptázová PCR), se zase používá ke stanovení konkrétních typů AML (Bain, 2013; Narayanan, 2020).

2.1.4 Klasifikace dle WHO

Jedná se o velmi heterogenní skupinu onemocnění, proto byla zavedena klasifikace jednotlivých typů akutní leukémie. Jedna možnost rozdělení AML je dle Francouzsko-americko-britské (FAB) klasifikace, další pak podle Světové zdravotnické organizace (WHO). V roce 2022 vznikla také klasifikace dle Evropské leukemické sítě organizace, avšak stále se v praxi příliš nepoužívá (Hwang, 2020).

Nejaktuálnější klasifikace dle WHO je z roku 2016, která vznikla úpravou rozdělení z roku 2008. Toto rozdělení je založeno na klinických příznacích, morfologii buněk, imunofenotypizaci, cytogenetice a molekulární genetice. Na základě těchto kritérií jsou AML rozděleny do šesti kategorií (Hwang, 2020).

AML s rekurentními translokacemi

V této kategorii se akutní leukémie dělí do dalších 11 podtypů (z toho dva jsou zařazeny do této kategorie prozatímne) podle odlišných chromozomálních translokací. Do tohoto typu můžeme zařadit 20-30 % pacientů trpících AML. Chromozomální translokace patřící do tohoto typu AML jsou *RUNX1-RUNX1T1*; *CBFBP-MYH11*; *PML-RARA* (taky jinak nazývána akutní promyelocytární leukémie); *KMT2A-MLLT3*; *DEK-NUP214*; *GATA2, MECOM*; *RBM15-MKLL1*; s mutovaným *NPM1* a s bialelickou mutací *CEBPA*. Mutaci *PML-RARA* lze diagnostikovat bez ohledu na počet blastů ve dřeni. AML s mutací *NPM1* je jednou z nejčastějších genetických mutací, vykazuje dobrou prognózu a obvykle je spojována s normálním karyotypem. Dalším podtypem s dobrou prognózou je AML s mutací *CEBPA*, zatímco špatná prognóza je u mutace *RUNX1*. Často přítomná je také mutace *FLT3*, která je u mnoha podtypů, proto nemá vlastní kategorii a může mít negativní vliv na prognózu (Döhner, 2022; Hwang, 2020).

AML s myelodysplastickými změnami

Pro stanovení diagnózy, že má pacient AML s myelodysplastickými změnami, je nutné splnit následující kritéria: přítomnost blastů alespoň 20 % v kostní dřeni, přítomnost myelodysplastického syndromu nebo myeloproliferativního onemocnění v anamnéze pacienta a pacient nesmí být v minulosti léčen cytostatickou nebo radiační léčbou. Také je nutná přítomnost dysplastických změn v alespoň dvou hematopoetických řadách a u 50 % buněk.

U této kategorie je obecně špatná prognóza s nižší mírou kompletní remise než u jiných typů AML (Hwang, 2020).

AML spojená s přechozí léčbou

Zde jsou zařazeny, jak už název napovídá, AML, které vznikly jako nežádoucí komplikace při léčbě cytostatickou nebo radiační terapií, která se podávala pro předchozí neoplastickou či nenádorovou poruchu. Cytostatická léčiva zahrnují alkylační činidla, inhibitory topoizomerázy II, některé antimetabolity a antitubulinovou léčbu. Přestože hlavní podíl na vzniku nemoci mají výše zmíněná léčiva, je zde také možnost vlivu dědičných rizikových faktorů. Prognóza je obvykle špatná, umocněna původním onemocněním, na které se začala terapie podávat (Arber, 2016; Döhner, 2022).

AML jinak nezařazena

Do tohoto podtypu se řadí všechny AML, které jsou zahrnuty ve FAB klasifikaci v podkapitole níže. Výjimkou je vyškrtnutí akutní erytroidní leukémie s dysplastickými změnami, u které je méně než 20 % blastů. Ta je dle tohoto dělení zařazena do myelodysplastického syndromu. Čistá erytroleukémie zůstává pod AML (Arber, 2016).

Myeloidní sarkom

Jedná se o solidní nádor mimo kostní dřeň sestávající z myeloidních blastů. Může se vyskytovat *de novo* nebo doprovázet postižení kostní dřene (Arber, 2016).

Myeloidní proliferace u Downova syndromu

Tato leukémie postihuje zejména děti. Vyskytuje se u nich přechodná abnormální myelopoéza a myeloidní leukémie spojená s Downovým syndromem, zejména podtyp akutní megakaryoblastická leukémie. S trizomií u Downova syndromu je spojena i mutace *GATA1*, identifikovaná právě u AML (Arber, 2016; Döhner, 2022).

2.1.5 FAB klasifikace

Tato klasifikace vznikla FAB společností v roce 1976 a je založena na cytochemii, morfologii a klinickém obraze pacienta. AML jsou rozděleny do osmi kategorií a označeny M0 až M7 (Schiffer, 2003).

Patří zde AML s minimální diferenciací (M0), kterou nelze určit cytochemickými metodami a bývá velmi rezistentní na léčbu. Další je AML bez maturace (M1), kdy jsou ojedinelé v blastech viditelné Auerovy tyče, v kostní dřeni převažují myeloblasty. Dále AML s maturací (M2), při které je častěji přítomna granulace a Auerovy tyče v cytoplazmě buněk. Při akutní progranulocytární leukémii (M3) se vyskytují ve dřeni typické progranulocyty s bohatou cytoplazmou, tato leukémie je snadná na morfologickou diagnózu. U akutní myelomonocytární leukémie (M4) je postižení jak myeloidní, tak monocytární řady. Pro určení diagnózy je nutný výskyt alespoň 20 % blastů z monocytární řady. Potvrdit se dá také barvením nespecifickými esterázami. Pro akutní monocytární leukémii (M5) je charakteristická přítomností minimálně 80 % blastů monocytárního původu, objevují se také promonocyty. Pacienti pocítují zejména problémy s hyperleukocytózou v krevním oběhu. Čistá erytroleukémie (M6) je nejvýraznější, jak z názvu vyplývá, především u červené řady, postihuje však řady všechny. Obvykle jsou pozorovány zvýšené zásoby železa v podobě prstencových sideroblastů, je také silná odpověď buněk při PAS reakci. Dalším typem je akutní megakaryoblastická leukémie (M7), u které převažuje poškození megakaryocytární řady, charakteristická je pak přítomnost jedno- nebo dvoujaderných mikromegakaryocytů. Tito pacienti mají nízkou odpověď na léčbu a také špatnou prognózu. U tohoto podtypu je také fibrózní dřev, což znesnadňuje diagnózu (Bain, 2013; Schiffer, 2003).

2.1.6 Léčba AML

Léčba AML závisí na několika faktorech. A to konkrétně na typu AML, výsledcích cytogenetického vyšetření, věku a přítomnosti dalších onemocnění a na klinickém riziku, tedy množství blastických buněk v kostní dřeni (Bučková, 2013).

Léčba pacientů do 65 let

U této skupiny pacientů je léčba chemoterapií rozdělena do dvou fází. Nejdříve probíhá indukční, poté postremisní neboli konsolidační léčba (Bučková, 2013).

Cílem indukční léčby je odstranění leukemických buněk z krevního oběhu nemocného a zároveň snížení jejich počtu v kostní dřeni na co nejmenší hodnotu. Dosažení tohoto stavu se nazývá kompletní remise onemocnění. Ve většině případů se podává kombinace dvou cytostatik. Dodržuje se režim 3+7, což znamená, že jednou za 3 dny se podává formou infuze antracyklinové léčivo a následně kontinuálně 7 dní cytarabinosid, nejčastěji ve formě Ara-C. Tato fáze vyžaduje vždy hospitalizaci, jelikož se často vyskytují nežádoucí účinky léčiv. Jedná se o cytostatika, takže dochází také k celkovému útlumu krvetvorby, a tudíž výskytu krvácení a infekce. Zhodnocení efektu prvního cyklu léčby se provádí po dvou až třech týdnech od jejího zahájení. V případě, že po tomto prvním cyklu nedojde ke kompletní remisi onemocnění, postupuje pacient ještě jeden cyklus. A pokud jsou splněny podmínky remise, přejde se do druhé fáze (Bučková, 2013; Roloff, 2022; Rowe, 2022).

Snahou v postremisní neboli konsolidační fázi je zachovat kompletní remisi a zabránit relapsu onemocnění. Jedná se o fázi stěžejní, protože při indukční fázi nedojde ke zničení všech leukemických buněk a může tak dojít kdykoliv k návratu nemoci. První možností je samotná konsolidační chemoterapie, aplikovaná je buď ambulantně nebo při plné hospitalizaci. Při ní se opět podává cytarabinosid, tentokrát ve vysokých nebo středních dávkách. Další možností je konsolidační chemoterapie následovaná autologní transplantací kostní dřeně. Jako v předchozím případě se podává Ara-C, ale také se pacientovi odeberou buňky z jeho vlastní kostní dřeně, které se upraví a zamrazí. Znova se aplikuje chemoterapie, následovaná transplantací dříve odebrané tkáně. A poslední možností je podání konsolidační chemoterapie a následně alogenní transplantace kostní dřeně. Doporučuje se u pacientů s vysokým rizikem relapsu AML. Pacient nejprve podstoupí konsolidační chemoterapii, poté následuje samotná transplantace. Nutností je samozřejmě přítomnost vhodného dárce. Po transplantaci je pacient umístěn na speciálním transplantačním oddělení, kde se dodržuje přísný režim k zamezení vzniku infekce. Očekávanou reakcí je reakce štěpu proti leukémii (graft versus leukemia reakce), při které darované buňky zaútočí na buňky leukemické a dojde tak k jejich zániku (Čerňan, 2021).

Léčba pacientů nad 65 let

Jelikož pacienti mají v tomto věku často přidružené jiné onemocnění, je terapie zmíněná výše příliš agresivní. Po zhodnocení celkového stavu lékařem se ke dvoufázové terapii dá uchýlit, standardně se však postupuje následovně. Jednou z možností je paliativní

péče, při které se podává cytarabinosid v nízkých dávkách. Cílem není vyléčení pacienta ale potlačení a oddálení progresu nemoci. Dále může pacient podstoupit symptomatickou léčbu, kdy je snaha zmírnit celkové příznaky nemoci a zvýšit kvalitu života, nejčastěji formou pravidelných transfúzí erytrocytů a trombocytů. Poslední možností je zařazení do klinické studie, ve které se zkouší nová léčiva, která prokázala účinnost v léčbě AML (Bučková, 2013; Roloff, 2022).

Další možnosti

Kromě výše zmíněných klasických metod se dá také k léčbě AML použít imunoterapie či radioterapie.

U imunoterapie se využívá cílené léčby na antigen CD33, který je exprimován asi u 80 % buněk AML. Kompatibilní k tomuto antigenu se jako součást léčiva používá monoklonální protilátka, která nasměruje protinádorové činidlo. Tím může být například toxin nebo radioaktivní materiál. Monoklonální protilátka může být použita také samostatně, ale v takovém případě je nižší účinnost a větší pravděpodobnost nežádoucích účinků léčby. Jmenovitě mezi léky s monoklonální protilátkou patří gentuzumab ozogamicin, který je v konjugované formě a nese s sebou toxin, který je schopný usmrtit nádorovou buňku. Dalším léčivem je midostaurin, který se používá pro pacienty s mutací FLT3. Podává se po indukční fázi perorální formou a jedná se o protein kinázový inhibitor, takže inhibuje růst a dělení buňky (Acheampong, 2018; Roloff, 2022).

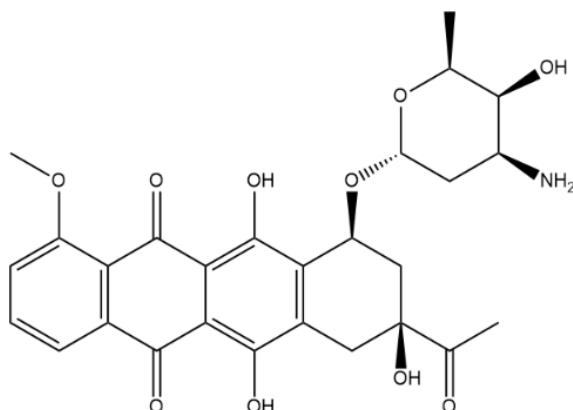
Při radioterapii se používají rentgenové paprsky o vysoké energii ke zničení rakovinných buněk. Radioterapie se využívá prakticky jedině v případě, že se leukemické buňky rozšířily například do mozku nebo k léčbě myeloidního sarkomu. Záření působí tak, že způsobí zlomy v DNA buňky, čímž dojde k jejímu zabití a zastavení šíření rakoviny. Nejedná se ale o specifickou léčbu, jelikož nedojde k poškození pouze nádorové buňky, ale také k zabití zdravých buněk v okolí (Vodvářka, 2003).

2.2 Daunorubicin

2.2.1 Chemické vlastnosti

Daunorubicin patří do skupiny antracyklinových antibiotik. Ty se získávají z bakterií rodu *Streptomyces* a používají se k léčbě různých solidních nádorů a hematologických malignit. Je to pevná látka, která se vyskytuje ve formě oranžovočerveného prášku. Jedná se o aminoglykosid se sumárním vzorcem $C_{27}H_{29}NO_{10}$ (Bachur, 2002).

Jak je vidět na Obr. 1, daunorubicin má ve své struktuře ve vodě nerozpustný antrachinon. Je zde ale přítomna cukerná složka daunosamin, jenž se váže přes kyslík, a díky ní je daunorubicin rozpustný ve vodě. Kromě toho se rozpouští v alkoholu a je prakticky nerozpustný v chloroformu, etheru a benzenu. Je tedy polárního charakteru (Bachur, 2002; Pubchem, 2024).



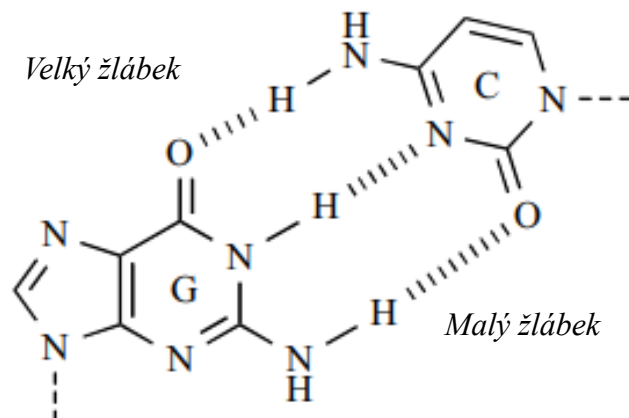
Obr. 1 Strukturní vzorec daunorubicinu

2.2.2 Mechanismus účinku

Daunorubicin má antimykotické a cytotoxické vlastnosti. Působí buď jako interkalační činidlo, inhibitor topoizomerázy II nebo jako zdroj oxidačního stresu (Mukherjee, 2013).

Interkalační činidla jsou látky, které mají schopnost se vmezeřit do struktury DNA. Interkalační aktivita daunorubicinu je daná jeho aromatickou planární strukturou. Této schopnosti je umocněno také přítomností cukerné složky daunosaminu. Daunosamin se naváže na tzv. malý žlábek DNA, kde zakrývá třetí pár bází, zatímco zbylá struktura

se vmezeří mezi pár guanosin-cytosin (GC). Místo vmezeření daunorubicinu lze vidět na Obr. 2. Daunorubicin se na DNA navazuje kolmo. Interkalací dojde k inhibici replikace a transkripce, tudíž i syntézy konkrétní ribonukleové kyseliny (RNA) (Mukherjee, 2013).

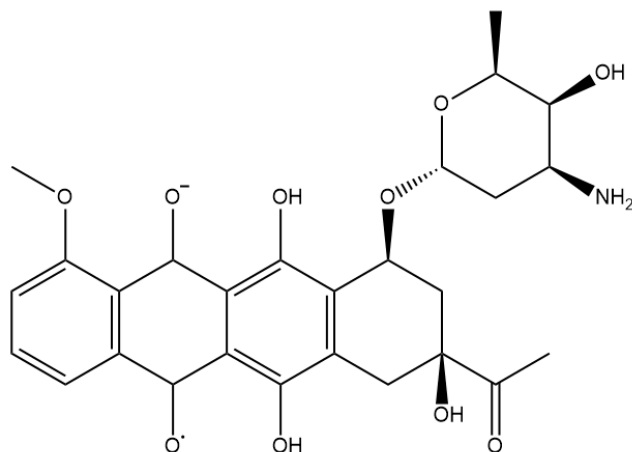


Obr. 2 Místo vmezeření daunorubicinu ve struktuře DNA (upraveno dle Wheate, 2007)

Dalším způsobem poškození DNA je inhibice topoizomerázy II. Topoizomerázy jsou enzymy účastnící se vinutí DNA matrice. Nejdůležitějšími jsou topoizomeráza I a topoizomeráza II. Svou roli uplatňují při replikaci DNA, transkripci a segregaci chromozomů. Topoizomeráza II je buď ve formě alfa nebo beta, klíčová je forma alfa. Ta se přechodnou kovalentní vazbou naváže na specifickou oblast DNA a za přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP) štěpí fosfodiesterovou vazbu dvouřetězcové DNA (dsDNA). V místě zlomů poté přenesse jinou, neporušenou dsDNA a místa zacelí. Při inhibici tohoto enzymu nedochází k opětovnému spojení řetězců a vzniklé zlomy mohou být pro buňku letální. Může dojít taky k jiným topologickým problémům jako je převíjení nebo zauzlování DNA (Bachur, 2002; Hande, 2008).

A třetím způsobem poškození buněčných struktur je vznik volných radikálů. Jak bylo zmíněné výše, struktura daunorubicinu je tvořena mimo jiné antrachinonem. Chinonový kruh se může přesmyknout na semichinon a vzniká tak místo s volným elektronem (viz Obr. 3). Vzniklý nepárový elektron je velmi reaktivní a po kontaktu s kyslíkem je produktem reakce

superoxid $O_2^{\cdot-}$. Jako kyslíkový radikál poté poškozuje všechny okolní struktury buňky. Mimo to tvoří daunorubicin s ionty Fe^{2+} a Cu^{2+} chelátové komplexy, které působí také jako silné volné radikály (Agrawal, 2007; Dubská, 2009).



Obr. 3 *Strukturní vzorec daunorubicinu jako volného radikálu*

2.2.3 Toxicita

Daunorubicin se zejména v játrech metabolizuje na daunorubicinol. K tomu dochází působením především CRE, v menší míře pak i aldo-ketoreduktáz. Výsledný produkt je daleko toxičtější než jeho parentní látka a má také mnohonásobně nižší účinnost v léčbě malignit (Agrawal, 2007; De Oliveira, 2020).

Výše zmíněné účinky, které vedou k zániku buněk, neplatí pouze pro nádory, ale dochází také k poškození zdravých buněk, zejména pak kardiomyocytů. Vzniklé chelátové komplexy poškozují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Důsledkem je pak poškození DNA a lipotoxicita. A právě kardiomyocyty mají nízkou hladinu protektivních enzymů, jmenovitě katalázy a glutation-peroxidázy, které by buňky chránily před volnými radikály, a tudíž i působením chelátových komplexů. Dále k tomu přispívá fakt, že je v mitochondriální membráně kardiomyocytů přítomné velké množství kardiolipinu. Antracyklinová antibiotika, a tedy i daunorubicin, mají velkou afinitu k tomuto fosfolipidu a díky pasivnímu transportu se jednodušeji dostanou do buňky. Následně se kumulují v intracelulárním prostoru. Zde způsobují inhibici dýchacího řetězce, což vede ke snížení tvorby ATP, a dále interagují s mitochondriální DNA (Puchnerová, 2016; Saleem, 2020).

Klinické projevy kardiotoxicity mají různou závažnost v závislosti na čase od podání první dávky. Akutní příznaky objevující se během prvního týdne zahrnují asymptomatickou dysfunkci levé komory, která bývá zachycena pouze na elektrokardiografickém záznamu. Vzácně se vyskytuje také akutní městnavé srdeční selhání a ojediněle i perikarditida. Časné příznaky se projevují do prvního měsíce od první dávky daunorubicinu. Mezi nejčastější problémy se řadí městnavé srdeční selhání, incidence závisí na kumulativní dávce chemoterapeutik. Prognóza je při tomto stavu velmi špatná. Pozdní klinické symptomy kardiotoxicity se vyskytují od jednoho či více let od podání léčby. Typický je rozvoj systolické nebo diastolické asymptomatické dysfunkce levé komory, která může přecházet v městnavé srdeční selhání. Tyto příznaky jsou charakteristické zejména pro dětské pacienty (Horáček, 2007; Marek, 2011).

Riziko rozvoje kardiotoxicity je u některých osob vyšší. Mezi nejvýznamnější faktory patří podávání kumulativních dávek antracyklinových antibiotik. Další vlivy, které vedou k poškození kardiomyocytů, jsou následující: ženské pohlaví, hypertenze, již existující kardiovaskulární onemocnění, komorbidity, některá dědičná onemocnění a radiační terapie. Také věk má vliv na výskyt nežádoucích účinků léčiv. Lidé starší 65 let a také děti mladší 4 let jsou ve vyšším riziku. Dalšími častěji postiženými jsou pacienti léčení paklitaxelem, cyklofosfamidem a trastuzumabem (Horáček, 2007; Volkova, 2011).

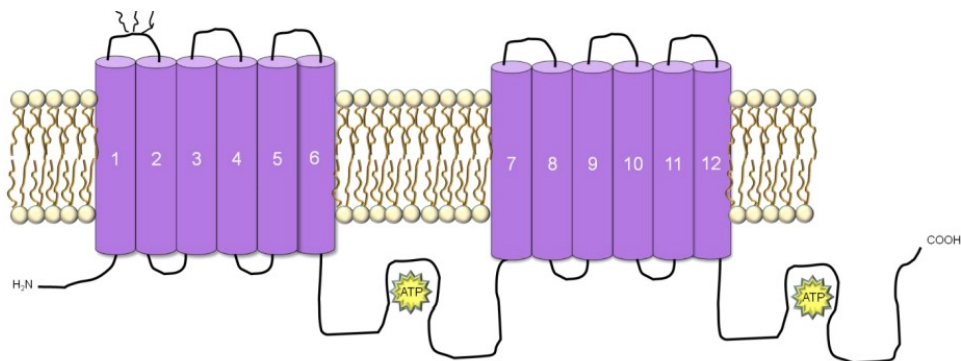
2.2.4 Rezistence

Mnohočetná léková rezistence nádoru je velmi častou příčinou selhání léčby a vzniku komplikací. Existuje několik mechanismů lékové rezistence, z toho mezi nejzásadnější patří následující (Palmeira, 2011).

Efluxní transport antracyklinů přes cytoplazmatickou membránu

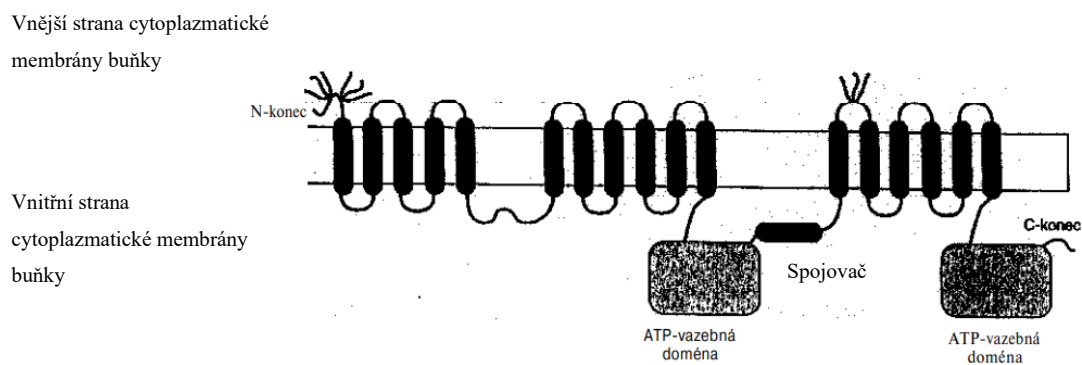
Tento mechanismus bývá spojován s přítomností několika proteinů z nadrodiny ABC transportérů, které jsou ATP-dependentní. Nejpodstatnější je P-glykoprotein (Pgp), protein asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí (MRP) a protein asociovaný s plicní rezistencí (LRP). Pgp je efluxní pumpa (schéma struktury viz Obr. 4), která vykazuje zvýšenou expresi u rakovinných buněk. V přítomnosti ATP odčerpává léčivo z buňky, a tak dochází ke snížení jeho účinku. Plno léčiv podstupuje transport zprostředkovaný Pgp, a to přes rozdílnou

strukturu a mechanismus účinku. Konkrétně se jedná o antracyklinová antibiotika, vinka alkaloidy, taxany a další. Mezi expresí Pgp a selháním chemoterapie u nádorových onemocnění byla nalezena pozitivní korelace (Arwanih, 2022; Palmeira, 2011).



Obr. 4 Schéma struktury P-glykoproteinu (Palmeira, 2011)

Existuje několik podtypů MRP, z nichž vliv na rezistenci na daunorubicin má MRP1 a MRP6. Jejich struktura je shodná a lze ji vidět na Obr. 5. Oba proteiny jsou exprimovány na bazolaterální membráně. Fungují jako jednosměrná ATP-dependentní pumpa pro konjugáty glutationu a slouží tedy k odčerpávání daunorubicinu z buňky a snižování jeho koncentrace v intracelulárním prostoru (Sodani, 2012).



Obr. 5 Schéma struktury MRP1 a MRP6 (upraveno dle Nosková, 2000)

LRP patří do rodiny tzv. major vault proteinů (MVP), což je velká ribonukleoproteinová částice. Jak název napovídá, jeho hlavní složkou je tzv. major vault protein, dále se skládá z malých molekul RNA a tří typů minor proteinů. MVP se vyskytují v cytoplazmě buňky. Na snižování koncentrace daunorubicinu v jádře se podílí tak, že ho transportují do lyzozomů. Výsledkem je tedy snížení účinku antracyklinového antibiotika a špatná prognóza onemocnění. Přestože geny pro vznik LRP i MRP jsou oba na krátkém raménku 16. chromozomu, tak jejich exprese není na sobě závislá (Nosková, 2000).

Snížení cytotoxického účinku antracyklinů

Působením aldo-ketoreduktáz či CRE dochází k redukci ketonové skupiny antracyklinových antibiotik na C13-hydroxy alkoholy. Tato reakce probíhá v játrech, periferní krvi a v kostní dřeni. Z daunorubicinu tak vzniká daunorubicinol, který je pro rakovinné buňky méně cytotoxický, ale oproti parentní látce více kardiotoxický. Další možnost detoxikace zahrnuje glutathion-S-peroxidázu. Tento enzym může snižovat toxicitu a tím i navozovat rezistenci třemi způsoby. Zaprvé katalyzuje vznik konjugátu s redukováným glutathionem (GSH). To vede ke zvýšení rozpustnosti léčiva ve vodě, a tudíž k jeho zvýšené exkreci. Zadruhé eliminuje toxické volné radikály, jak bylo popsáno v předchozí podkapitole. A zatřetí je zodpovědný za přímou vazbu léčiva, čímž dojde k jeho celkovému snížení v extracelulárním prostoru (Boer, 1998; Sheng, 2016).

2.3 Karbonyl redukující enzymy

V I. fázi metabolismu xenobiotik, a tedy i léčiv, hrají roli především cytochrom P450 a CRE. Funkcí CRE je redukce ketonové skupiny na hydroxylovou. Dochází ke zvýšení hydrofility, což umožní vznik konjugátů, a tudíž snazší eliminaci léčiva. Na straně druhé daunorubicin ztrácí na protinádorové účinnosti a umocňují se jeho kardiotoxické vlastnosti. CRE jsou enzymy využívající nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP(H)). Mezi CRE se řadí aldo-ketoreduktázy (AKR) a dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR) (Malátková, 2013).

2.3.1 Aldo-ketoreduktázy

Enzymy AKR jsou převážně monomerní solubilní proteiny o hmotnosti 34-37 kDa. Zahrnují celkem 190 proteinů, které se řadí do 16 rodin. Do rodin se dělí dle sekvenčního uspořádání, přičemž proteiny v rámci jedné rodiny mají podobné vlastnosti. Pro zařazení proteinů do společné rodiny je nutná shoda alespoň ve 40 % sekvence, do podrodiny poté alespoň 60% shoda. Mezi substráty AKR patří sacharidy, lipidové aldehydy, keto-steroidy, keto-prostaglandiny a chemické karcinogeny, jako například polycyklické aromatické uhlovodíky. Pro každý enzym je typický proteinový záhyb. Ten je mimo jiné tvořen třemi smyčkami, které definují substrátovou specifitu. Ve všech reakcích katalyzovaných AKR se kofaktor (NADPH) naváže jako první a jako poslední se oddělí. Většinou je preferován NADPH před NADH (Penning, 2015).

V lidském genomu se geny kódující vznik enzymů AKR, spadající do stejné nadrodiny, nachází na stejném chromozomu, kde tvoří genové shluky a sdílí podobnou genovou strukturu. V nomenklatuře je zkratka celé skupiny AKR, následuje číslice označující rodinu, do které enzym spadá, písmeno pro upřesnění podrodiny a na konci je číslice specifická pro konkrétní proteinový enzym (Ma, 2012).

AKR1A1

Tento enzym spadá do rodiny 1, podrodiny A. Nejčastější názvy tohoto proteinu jsou alkohol dehydrogenáza a aldehyd dehydrogenáza. Jedná se o enzym redukující aldehydy na odpovídající alkoholy. Nachází se především v ledvinách, dále v játrech a tenkém střevě. Proteiny jsou kódovány stejnojmenných genem, jenž leží na 1p34.1 a skládá se z 10 exonů. Protein AKR1A1 je pak tvořen 325 aminokyselinami a jeho hmotnost je 36,5 kDa (Murphy, 2022).

Substrátem pro enzym jsou hlavně negativně nabitě látky, které mají ve struktuře karboxylovou skupinu. I přesto vykazuje AKR1A1 vysokou afinitu k aromatických, steroidním a malým tří uhlíkovým aldehydům. Fyziologickou rolí enzymu u hlodavců je podílení se na metabolismu kyseliny askorbové. AKR1A1 redukuje D-glukuronát na L-gulonát, který je následně konvertován na L-gulonolakton. Ten se nakonec konvertuje na kyselinu askorbovou. Lidský organismus není schopen syntetizovat kyselinu askorbovou a přítomnost genu AKR1A1 a také role enzymu je tak stále neznámá (Barski, 2008).

AKR1B1

Tento enzym se řadí do rodiny 1 a podrodiny B. Lokalizace genu AKR1B1 kódujícího vznik enzymu je na 7q33, je 18 kilobází dlouhý a obsahuje 10 exonů. Výsledný protein se skládá z 316 aminokyselin a jeho hmotnost je 36 kDa. Z největší části je produkován nadledvinami a místem jeho působení je cytoplazma buňky (Khayami, 2020).

Funkcí enzymu AKR1B1 je redukce aldehydů na alkoholy. Během této reakce dochází k přeměně NADPH na NADP⁺. Tento enzym hraje svou roli v metabolismu glukózy, v osmoregulaci a v detoxikaci škodlivých látek. Také je zapojen do polyolové cesty, která se uplatňuje zejména při hyperglykemických stavech, jako je *diabetes mellitus*. V této metabolické dráze se glukóza redukuje na sorbitol, jeho zvýšené množství má vliv na osmolaritu. Tento stav vede ke vzniku edémů a poškození tkání. Na druhou stranu se enzym AKR1B1 podílí na redukci superoxidů, tedy reaktivních forem kyslíků. Přispívá tak ke snižování zánětů (Banerjee, 2021; Khayami, 2020).

AKR1B10

Enzym AKR1B10 se řadí do rodiny 1 a podrodiny B. Gen se nachází stejně jako u enzymu AKR1B1 na 7q33 a má 11 exonů. Výsledný protein má 316 aminokyselin a hmotnost 36 kDa. Z 68 % má shodné pořadí aminokyselin s proteinem AKR1B1. Oba enzymy jsou NADPH dependentní reduktázy, které působí na aromatické a alifatické aldehydy, rozdíl je v jejich katalytické účinnosti. Typická účast enzymu AKR1B1 při metabolismu glukózy chybí u AKR1B10. Dalším rozdílem je odlišná distribuce v tkáních, jelikož AKR1B10 se nachází v játrech a tenkém střevě, nejvíce v duodenu, dále pak v žaludku a žlučníku (Endo, 2021; Laffin, 2012).

Tento enzym účinně redukuje retinal na retinol, což je první reverzibilní krok metabolismu retinoidů vedoucí k produkci kyseliny retinové. Tento metabolit vitamínu A hraje zásadní roli v proliferaci, diferenciaci a morfogenezi mnoha buněk, včetně epitelových a je také nezbytný při embryonálním vývoji orgánů a pro zdraví zrakového orgánu. Dále působením AKR1B10 dochází k redukci farnesalu a geranylgeranialu na příslušné alkoholy. Následné produkty jsou fosforylovány za vzniku pyrofosfátů, které jsou potřebné pro transformaci onkogenů. Enzym uplatňuje svou redukční aktivitu také

na xenobiotika zahrnující chinony, ketony a některé léčiva, včetně daunorubicinu (Endo, 2021).

AKR1C3

Tento enzym se řadí do rodiny 1, podrodiny C. Gen pro vznik proteinu se nachází na 10p15.1 a má celkem 10 exonů. Protein je složen z 323 aminokyselin a jeho hmotnost je 36,8 kDa. Nachází se v duodenu, žlučníku, tuku, žaludku a také v endokrinních orgánech. Jedná se o NADPH dependentní enzym, který hraje důležitou roli v redukci 3-keto, 17-keto a 20-ketosteroidů, preferuje pak zejména 17-ketosteroidy (Liu, 2020).

Spektrum substrátů je široké a patří zde třeba endogenní steroidy, prostaglandiny a exogenní látky. Tak například katalyzuje přeměnu androstenedionu na testosteron a také estronu, což je málo účinná forma estrogenu, na 17 β -estradiol, potentní formu estrogenu. AKR1C3 se dále podílí na syntéze prostaglandinu F, který přes prostaglandin F receptor stimuluje mitogen aktivující protein kinázovou kaskádu. Ta je podstatná pro proliferaci a diferenciaci buněk. Byl potvrzený vztah mezi zvýšenou hladinou AKR1C3 a špatnou prognózou karcinomů, konkrétně rakoviny prsu, prostaty a AML (Liu, 2020; Penning, 2019).

2.3.2 Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem

SDR jsou solubilní enzymy o malé molekulové hmotnosti. Mohou být ve formě monomerů, dimerů či tetramerů. Jedná se o velmi početnou skupinu proteinů, která zahrnuje celkem přes 168 000 členů. Ty se dělí do 6 rodin: klasická, rozšířená, střední, divergentní a atypická. Většina enzymů patří buď do klasické nebo rozšířené rodiny. Dělení je na základě rozdílnosti v jejich struktuře, konkrétně ve vazebném místě pro kofaktor a v katalytické tetradě. Přesto jsou vzájemně shodné alespoň ve 20-30 % z celkové struktury. Například všechny SDR sdílí tzv. Rossmannův záhyb, který se skládá ze střídajících β -řetězců a α -helixů, uprostřed nichž se nachází sedm paralelním β -skládaných listů a dvě vrstvy α -helixů (Gräff, 2019).

Všechny SDR enzymy využívají pro svou aktivitu NADP(H) nebo NAD(H). Enzymy klasické rodiny preferují NADP(H), zatímco ty, které spadají do rozšířené rodiny využívají spíše NAD(H). SDR enzymy jsou reduktázy ketonů a aldehydů a mezi substráty patří

prostaglandiny, steroidy, biogenní aminy, pteriny, chinony odvozené od polycyklických aromatických uhlovodíků a léčiva jako například daunorubicin (Forrest, 2000).

CBR1

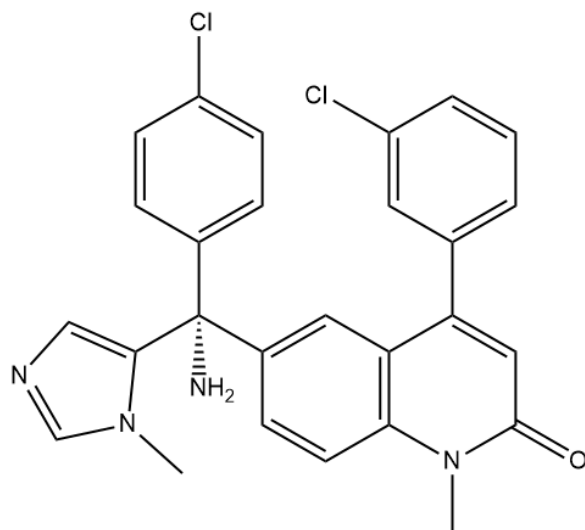
Monomerní CRE 1 patří do klasické rodiny. Gen kódující vznik CBR1 enzymu má lokaci na 21q22.12 a má 3 exony. Výsledný protein má 277 aminokyselin a hmotnost 30,4 kDa. Nachází se v plno tkáních, nejvíce pak v ledvinách a v tenkém střevě, zejména v duodenu. Subcelulárně je lokalizován v cytosolu a v mikrozomech (Shi, 2017).

CBR1 hraje důležitou roli při detoxikaci reaktivních aldehydů a ketonů, které se podílí při oxidativním stresu. Ten je spojen s neurodegenerativními onemocněními jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Je také nezbytný pro správnou diferenciaci svalových buněk a koncentrace CBR1 jsou zvýšeny při svalové regeneraci. Svůj vliv má také na metabolismus prostaglandinu E₂. Jeho funkcí je vazodilatace a vazokonstrikce, což podporuje angiogenezi v místě nádoru. Působením CBR1 dochází ke zvýšení hladin prostaglandinu E₂, a to vede k růstu nádoru a tvorbě metastáz. Podílí se také na metabolismu antracyklinových antibiotik a rozvoji kardiotoxicity (Lim, 2013; Shi, 2017).

2.4 Tipifarnib

2.4.1 Chemické vlastnosti

Tipifarnib, jiným názvem také Zarnestra, je látka, která se řadí mezi farnesyltransferázové inhibitory. Jedná se o léčivo schválené v roce 2021 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Jeho sumární vzorec je C₂₇H₂₂Cl₂N₄O a jedná se o substituovaný chinolon (viz Obr. 6) s potenciálními antineoplastickými vlastnostmi. Vyskytuje se jako pevná krystalická látka bílé či světle žluté barvy. TIP se nerozpouští ve vodě, ale je rozpustný v etanolu při použití ultrazvuku a také v dimethylsulfoxidu (DMSO). Molekulová hmotnost TIP je 489,40 g/mol (Kura oncology, 2021; Pubchem, 2024).



Obr. 6 Strukturní vzorec tipifarnibu

2.4.2 Mechanismus účinku

Inhibitory farnesyltransferázy jsou třídou experimentálních léčiv proti rakovině. Patří zde kromě TIP také lonafarnib a BMS 214662. Farnesyltransferáza je enzym, který přenáší farnesylovou skupinu z farnesylpyrofosfátu na karboxylový konec vybraných polypeptidů, například pre-RAS peptidů. Touto reakcí dojde ke vzniku RAS proteinů, u kterých je nutná prenylace, aby mohlo dojít k jejich připojení k membráně buňky. RAS proteiny fungují podobně jako přepínače. V případě, že je navázaný guanosintrifosfát (GTP), tak je RAS v aktivní formě, při vazbě s guanosindifosfátem (GDP) je neaktivní. GDP se od RAS odděluje velmi pomalu. Ve chvíli, kdy je GDP odděleno, dochází k velmi rychlému navázání GTP, které je obvykle přítomno v mnohem vyšších koncentracích než GDP. RAS proteiny hrají významnou roli v buněčné komunikaci a jejich zvýšené množství se vyskytuje právě u rakovinných buněk. Inhibitory farnesyltransferázy byly proto vyvinuty, aby zabránily farnesylosti, a tudíž připojení RAS k membráně. Tímto dojde k snížení proliferace a diferenciaci rakovinných buněk (Xue, 2006; Kohlschütter, 2008; Sebti, 2000).

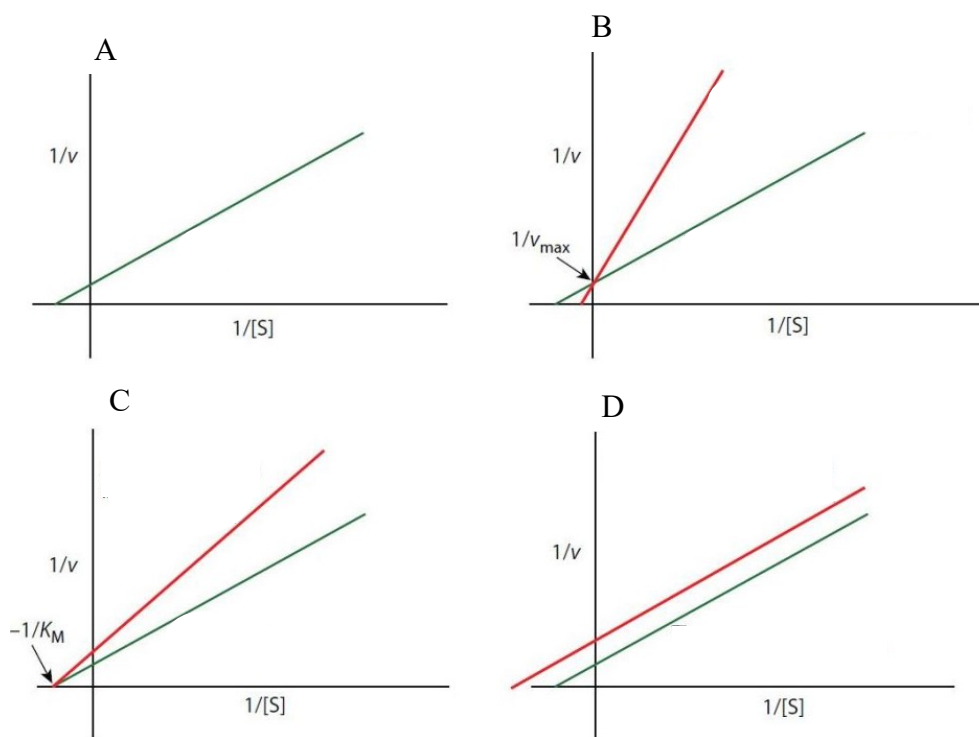
Ve studii prováděné Medeiros (2007) došli k závěru, že TIP hraje roli v inhibici efluxního transportu daunorubicinu zprostředkovaného Pgp. Svou aktivitou tak TIP snižuje riziko rozvoje rezistence na antracyklinové antibiotikum (Medeiros, 2007).

TIP se užívá perorálně a je dávkován dvakrát denně po dobu dvou až tří týdnů. Ve fázi II klinické studie se jako maximální tolerovaná dávka ukázala koncentrace 900 mg dvakrát

denně, přičemž farnesyltransferázová aktivita je signifikantně inhibována již při dávce 600 mg dvakrát denně. Při podávání 1200 mg dvakrát denně se vyskytly vážné nežádoucí účinky jako ataxie, zmatenost a dysartrie, což je porucha motorické řečové činnosti. Nežádoucí účinky nezávislé na dávce zahrnovaly nevolnost, únavu, renální dysfunkci a polydipsii (Martinelli, 2008; Mesa, 2006).

2.5 Typy inhibice

Existují tři základní typy reverzibilní inhibice a to kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Grafy dle Lineweaver-Burka těchto typů inhibic jsou viditelné na Obr. 7. Nicméně pro správné posouzení výsledku získaného měřením je nutné také vzít v potaz inhibici smíšenou, alosterickou, parciální, časově závislou a pevně se vážající (Markossian, 2023).



Obr. 7 Typy inhibice – graficky (upraveno dle King, 2003)

Zelená přímka – reakce bez inhibitoru; červená přímka – reakce s inhibitorem. $[S]$ = koncentrace substrátu; K_M = Michaelisova konstanta; v = rychlost. A – neinhibovaná reakce; B – reakce s kompetitivním inhibitorem; C – reakce s nekompetitivním inhibitorem; D – reakce s akompetitivním inhibitorem

Kompetitivní inhibice

Při kompetitivní inhibici se inhibitor váže na volný enzym. Nejčastěji se jedná o aktivní místo, kde se navazuje také substrát. Substrát a inhibitor o vazbu na enzym soutěží. Inhibitor má podobnou strukturu jako substrát, takže se jednoduše naváže na aktivní místo. Při kompetitivní inhibici se zvyšuje Michaelisova konstanta (K_m) a inhibiční konstanta (K_i) pro substrát, přičemž hodnota maximální rychlosti (V_{max}) je konstantní. Tento typ inhibice je závislý na koncentraci substrátu, protože v případě, že se zvýší koncentrace substrátu, dochází ke snížení množství potenciálně inhibovaných molekul enzymu. Tento fakt má vliv na účinnost potenciálních léčiv (Saboury, 2009).

Nekompetitivní inhibice

V případě nekompetitivní inhibice se inhibitor váže se stejnou afinitou jak na volný enzym, tak na komplex enzym-substrát. Nedochozí k vazbě na aktivní místo jako v předchozím případě, ale na alosterické místo, tedy jiné místo než to, které využívá substrát. Tento typ inhibice není závislý na koncentraci substrátu, jelikož nesdílí společné vazebné místo. Na rozdíl od kompetitivní inhibice se hodnota K_m a K_i nemění a dochází ke snížení V_{max} (Blat, 2010).

Akompetitivní inhibice

U akompetitivní inhibice se inhibitor naváže jedině na komplex enzym-substrát a vzniká tak ternární komplex enzym-substrát-inhibitor. Po navázání substrátu na enzym dochází ke změně jeho struktury a odhalí se tak vazebné místo pro inhibitor. Většinou se jedná o reakce, při kterých se inhibuje navázání dalšího, druhého substrátu, ze kterého by následně vznikl produkt. U tohoto typu inhibice dochází jak ke snížení K_m , tak také V_{max} . Dále platí, že s rostoucí koncentrací substrátu, se zvyšuje množství komplexů s navázaným inhibitorem (Dougall, 2015).

Smíšená inhibice

Při smíšené inhibici dochází jak k navázání inhibitoru na aktivní místo volného enzymu, tak také na alosterické místo komplexu enzym-substrát. Důležité však je, že k tomu

dochází s rozdílnou afinitou a je upřednostňováno jedno ze dvou výše zmíněných (Pesaresi, 2023).

Další typy inhibice

Z dalších typů inhibice budou popsány následující. Pevně se vázající inhibice je taková, kdy je vazba inhibitoru na enzym velmi silná. Je definována tím, že hodnota disociační konstanty pro komplex s inhibitorem je rovna nebo menší než celková koncentrace přítomného enzymu. V tomto případě je tedy koncentrace volného inhibitoru mnohem nižší než komplexu enzymu s inhibitorem. Nelze pro tento typ reakce použít zavedených metod založených na předpokladu rovnováhy, jelikož tento koncept je postaven na tom, že koncentrace volného inhibitoru je velmi blízká celkové koncentraci této sloučeniny a také, že inhibitor převyšuje koncentraci enzymu v reakčním systému (Yang, 2021).

Časově závislé inhibitory se vážou na enzym pomalu, čímž dochází ke zpomalení nástupu inhibice. Zpomalí se také uvolňování inhibitoru z komplexu s enzymem, přičemž tento děj je nezávislý na koncentraci substrátu, což činí tyto inhibitory atraktivní pro vývoj nových léků (Markossian, 2023).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit inhibiční účinek vybraného inhibitoru TIP na enzymy z nadrodiny AKR a SDR v *in vitro* podmínkách. Konkrétně se jedná o rekombinantní enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1. Použitým substrátem byl daunorubicin, který se působením enzymů metabolizuje na produkt daunorubicinol.

Jednotlivé dílčí kroky experimentu zahrnují:

- základní screening inhibičního potenciálu TIP u vybraných enzymů
- stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} pro enzym, u kterého došlo k nejsilnější inhibici
- stanovení inhibiční konstanty K_i pro vybraný enzym a následně určení typu inhibice
- v případě, že se jedná o nekompetitivní inhibici, stanovení pevnosti vazby

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Daunorubicin hydrochlorid (Toronto Research Chemicals, Kanada)

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

Dimetylsulfoxid (DMSO) (Honeywell, USA)

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

Glukóza-6-fosfát (Roche Diagnostics, Německo)

Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (350 jednotek/mg proteinu; Roche Diagnostics, Německo)

Chlorid hořečnatý (0,10 M; Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, ČR)

Metanol (VWR Chemicals, USA)

Nikotinamidadenin dinukleotidfosfát, oxidovaná forma (NADP⁺) (Sigma-Aldrich, USA)

Sodno-fosfátový pufr (0,10 M; pH 7,40; Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, ČR)

TIP (MedChemExpress, USA)

4.1.2 Přístroje a pomůcky

Přístroje

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf, Německo)

ThermoMixer (Eppendorf, Německo)

Třepačka Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)

UHPLC (Agilent Technologies 1290 Infinity I, USA)

- autosampler
- binární pumpa
- detektor s diodovým polem
- fluorescenční detektor
- termostatovaná kolona

UHPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity II, USA)

- autosampler
- detektor s diodovým polem
- fluorescenční detektor
- pumpa
- UV-Vis detektor

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

Výrobník ledu (BREMA Ice Makers, Itálie)

Pomůcky

Eppendorf zkumavky (0,50 ml a 1,50 ml; Eppendorf, Německo)

Filtr (0,20 µm PTFE Membrane; Whatman, Velká Británie)

Inserty (400 µl; Agilent Technologies, USA)

Jehla se stříkačkou (1 ml; Terumo, Japonsko)

Navažovací lžičky

Pipety, špičky (0,50 – 1 000 µl; Biohit, Finsko)

Popisovací fix

Rukavice

Stojánek na zkumavky

Vialky, víčka, septa (Agilent Technologies; USA)

4.2 Metodika

4.2.1 Základní screening

Nejdříve byl u vybraných enzymů proveden základní screening. Při něm byla *in vitro* sledována inhibice proměny daunorubicinu na daunorubicinol, ke které dochází vlivem působení enzymu. K inhibici reakce potenciálně dochází v přítomnosti inhibitoru TIP. V této práci byly testovány enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1. Celkový počet reakcí pro každý enzym byl 16. Z důvodu vyšší přesnosti a eliminace možných chyb se pracovalo v tripletu pro neinhibovanou reakci (NI), kontrolu s DMSO (DMSO), inhibitor o koncentraci 10 μM (TIP 10) a inhibitor o koncentraci 50 μM (TIP 50). Kontrola bez enzymu (bE) a kontrola bez substrátu (bS) byla provedena v dubletu.

4.2.2 Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50}

Stanovení inhibiční koncentrace probíhá principiálně stejně jako screeningové vyšetření. U tohoto experimentu se však pracuje pouze s kontrolou DMSO a dále se provádí reakce s inhibitorem TIP o předem vybraných koncentracích. Ty byly pro případ enzymu AKR1C3 zvoleny následovně 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 2,50; 5; 10 a 50 μM .

4.2.3 Stanovení typu inhibice a K_i

Toto stanovení se provádí jak s různými koncentracemi inhibitoru, tak také s více koncentracemi substrátu daunorubicinu. Byla proměřena každá koncentrace substrátu s každou koncentrací inhibitoru.

Koncentrace substrátu v reakci byly 200; 400; 600; 800; 1000 a 2000 μM . Pracovní roztoky byly připraveny 10x koncentrovanější z důvodu ředění. Nejprve se připravil pracovní roztok o nejvyšší koncentraci, který se pro přípravu dalších roztoků dále postupně naředil. Množství substrátu potřebné pro přípravu pracovního roztoku o koncentraci 20 mM se vypočetlo dle následující rovnice:

$$m = M \times c \times V$$

kde M = molekulová hmotnost daunorubicinu (563,98 g/mol); c = požadovaná koncentrace pracovního roztoku (mol/l); V = požadovaný objem (l) a m = požadovaná navážka (g)

Zásobní roztok byl tedy připraven rozpuštěním 14,51 mg daunorubicinu v 1286 μ l destilované vody. Z koncentrací inhibitoru užitých při stanovení IC50 byly nakonec vybrány následující koncentrace pro stanovení K_i : 0 (kontrola DMSO); 0,15; 0,30 a 0,60 μ M.

4.2.4 Stanovení pevnosti vazby

Dále se stanovovalo, zda je inhibitor pevně se vázající nebo ne. Při tomto pokusu se používá různá koncentrace inhibitoru a různé množství enzymu (v našem případě AKR1C3) na reakci. Opět byla proměřena každá koncentrace inhibitoru s každou koncentrací enzymu.

Koncentrace inhibitoru se shodují s koncentracemi použitými při stanovení IC50, a tedy se jedná o následující koncentrace: 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 2,50; 10 a 50 μ M. Množství enzymu na jednu reakci bylo použito 0,50; 1,50; 3,00 a 5,00 μ g.

4.2.5 Příprava reagensů

Pro každou inkubaci je potřeba regenerační systém, enzym, inhibitor o předem stanovených koncentracích a substrát.

Regenerační systém:

Nejprve je potřeba nachystat si regenerační systém. Ten se připravuje čerstvý před každou inkubací. Množství jednotlivých složek je uvedeno v Tab. 1. Navážený NADP⁺ a glukóza-6-fosfát se rozpustí v sodno-fosfátovém pufru, následně se přidá MgCl₂. Glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza se přidává až těsně před použitím. Vše je potřeba mírně promíchat. Množství jednotlivých položek regeneračního systému se musí přepočítat pro požadovaný počet reakcí.

Tab. 1 Množství jednotlivých složek regeneračního systému pro 1 reakci

NADP ⁺	0,20 mg
Glukóza-6-fosfát	0,60 mg
0,1M sodno-fosfátový pufr	10,00 µl
0,1M MgCl ₂	10,00 µl
Glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza	0,50 µl

Enzym:

Dále je potřeba nachystat enzym. Jednotlivé enzymy jsou připraveny na Katedře biochemických věd, jsou rozpuštěny v draselno-fosfátovém pufru a 20% glycerolu a uchovávány při -80 °C, eventuálně -20 °C. Enzym se dále ředí v sodno-fosfátovém pufru. Pro screening se použily následující enzymy (Tab. 2).

Tab. 2 Přehled požadovaných a zásobních koncentrací jednotlivých enzymů

Enzym	Množství (µg/reakce)	Koncentrace zásobního roztoku (mg/ml)
AKR1C3	1,50	1,50
AKR1B10	5,00	1,50
AKR1B1	5,00	1,50
AKR1A1	1,00	0,53
CBR1	0,10	0,47

Také reálné množství enzymu na požadovaný počet reakcí je třeba si vypočítat, a to s použitím směšovací rovnice.

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

kde c_1 = koncentrace zásobního roztoku (mg/ml); V_1 = objem zásobního roztoku (μ l); c_2 = koncentrace pracovního roztoku (mg/ml); V_2 = objem pracovního roztoku (μ l)

Inhibitor:

Inhibitor je rozpuštěn v DMSO a uchováván při -20 °C. Koncentrace připraveného zásobního roztoku je 10 mM. Požadovaná koncentrace inhibitoru v reakci je 10 μ M a 50 μ M. Vzhledem k tomu, že během pokusu nepoužíváme pouze inhibitor, dochází k jeho naředění a to 50x, z tohoto důvodu je nutné připravit koncentraci pracovního roztoku 50x vyšší, tedy 500 μ M a 2500 μ M. Výpočet je opět proveden podle směšovací rovnice. Inhibitor TIP se smíchá s DMSO a zvertexuje.

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

kde c_1 = koncentrace zásobního roztoku (μ M); V_1 = objem zásobního roztoku (μ l); c_2 = koncentrace pracovního roztoku (μ M); V_2 = objem pracovního roztoku (μ l)

Substrát:

Jako substrát se použil daunorubicin (koncentrace zásobního roztoku je 5 mM), který je uchováván při $+4$ °C. Před pipetováním do reakcí se zásobní roztok vloží na 4 min do ultrazvuku. Roztok se připraví navážením daunorubicinu a jeho následném rozpuštění v ultračisté vodě. Výpočet potřebné hmotnosti se provede dle následujícího vzorce:

$$m = c \times M \times V$$

kde M = molekulová hmotnost daunorubicinu (563,98 g/mol); c = požadovaná koncentrace pracovního roztoku (M); V = požadovaný objem (l) a m = požadovaná navážka (g)

4.2.6 Postup *in vitro* inkubace

Nejprve se do 1,5ml eppendorfek napipetuje sodno-fosfátový pufr (NaPB), následně se do vybraných eppendorfek přidá DMSO nebo inhibitor, dále se do všech přidá regenerační systém a poté enzym. Objemy jednotlivých složek odpovídají následující Tab. 3.

Tab. 3 Objem jednotlivých složek potřebných pro jednu *in vitro* inkubaci

	NaPB (μl)	Enzym (μl)	Regenerační systém (μl)	Inhibitor (μl)	Substrát (μl)
NI	60	10	20	0	10
DMSO	58	10	20	2 (DMSO)	10
TIP 10	58	10	20	2	10
TIP 50	58	10	20	2	10
bE	70	0	20	0	10
bS	60	10	20	0	10 (vody)

NI = neinhibovaná reakce; DMSO = kontrola s DMSO; TIP 10 = reakce s koncentrací inhibitoru tipifarnibu 10 μM ; TIP 50 = reakce s koncentrací inhibitoru tipifarnibu 50 μM ; bE = kontrolní reakce bez enzymu; bS = kontrolní reakce bez substrátu.

Všechny eppendorfky se musí mírně zvortexovat, následně se vloží na chvíli do centrifugy, a poté se preinkubují v termobloku po dobu 10 minut na 37 °C. Po tomto čase se přidáním uvedeného množství substrátu startuje reakce, následuje vortex a vrácení do termobloku. Reakce se stopuje přesně po 30 minutách (u CBR1 po 20 min) přidáním 300 μl metanolu, opět se eppendorfky zvortexují a dále se ponechají na ledu. Vzorky se vloží do lednice (+4 °C) na 1 hodinu, dochází tak k precipitaci. Poté se musí oddělit supernatant od sedimentu, použije se centrifuga (12 100 \times g, 10 min). Vzorky se filtrací přes stříkačkový PTFE filtr (0,20 μm) převedou do vialek s vloženým insertem, následuje UHPLC analýza.

4.2.7 UHPLC analýza

Použitou mobilní fází je acetonitril a 0,1% kyselina mravenčí, a to v poměru 26:74, jako stacionární fáze byl použit C18 (oktyldecylsilan). Jedná se tedy o UHPLC analýzu na reverzní fází. Z celkového objemu 400 μl tvořilo nástřik na kolonu pouhých 5 μl . Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,7 ml/min a analýza jednoho vzorku trvala 5 minut. Pro detekci byl použit fluorescenční detektor, vzorek byl tedy přeměřen při excitační (480 nm) a emisní

(560 nm) vlnové délce. Kromě vialek obsahujících vzorky získané při experimentu je přítomný také směsný standard (obsahuje daunorubicin a daunorubicinol, a slouží ke kvalitativnímu porovnání retenčních časů získaných píků). Retenční čas daunorubicinu byl 1,50 min a daunorubicinolu 0,99 min. Kvantitativně byly píky vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky, která vykazovala v rozsahu 0,50-50 ug/ml linearitu s hodnotou R vyšší než 0,99. Výsledným parametrem, se kterým se dále pracuje a který byl z kalibrační křivky vypočítán, je hmotnost vzniklého produktu, tedy daunorubicinolu v ng/nástřík.

4.2.8 Vyhodnocení výsledků

Při vyhodnocování výsledků se v programu Microsoft Excel vypočetla specifická aktivita podle následujícího vzorce:

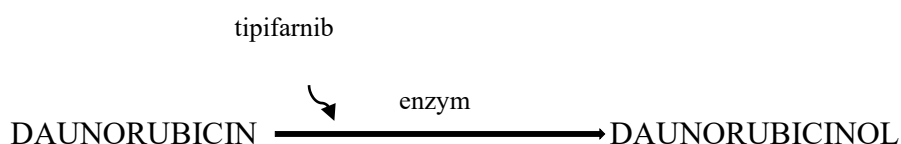
$$a = \frac{m \times k \times 1000}{t \times c \times Mr}$$

kde a = specifická aktivita (nmol/mg/min); m = hmotnost daunorubicinolu (ng/nástřík); k = ředící faktor (=80); t = doba inkubace (min); c = množství enzymu (μg/reakce); Mr = molekulová hmotnost daunorubicinolu (529,54 g/mol)

Následně se vypočtené hodnoty použily v programu GraphPad Prism (verze 10.0.3) pro získání výsledků, tvorbu grafů a statistickou analýzu. Pro posouzení statistické významnosti experimentu se pracuje se statistickým ukazatelem p-hodnotou. Pokud je hodnota $p < 0,05$ (označeno také počtem hvězdiček), výsledky jsou statisticky významné. Naopak při hodnotě $p > 0,05$ výsledek není statisticky významný a je označen jako ns. Při hodnocení základního screeningu byl použitý také Dunettův test pro porovnání každého souboru s námi vybraným souborem (DMSO kontrolou).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na úvod nutno podotknout, že TIP, jako i další schválené inhibitory, může v léčbě nádorových onemocnění působit několika způsoby. Dle Gilardi (2020) TIP zabraňuje navázání RAS k membráně buňky. A Medeiros (2008) potvrdil účast TIP v inhibici efluxního transportu zprostředkovaného Pgp. V této diplomové práci bylo zkoumáno, zda k celkovému mechanismu účinku při kombinované terapii nemůže přispívat i inhibice reakce, při níž se antracyklinové antibiotiku daunorubicin přemění na méně účinný metabolit působením karbonyl redukujících enzymů (viz Obr. 8). Celkový účinek kteréhokoli inhibitoru je mnohem větší, pokud při léčbě působí různými způsoby.



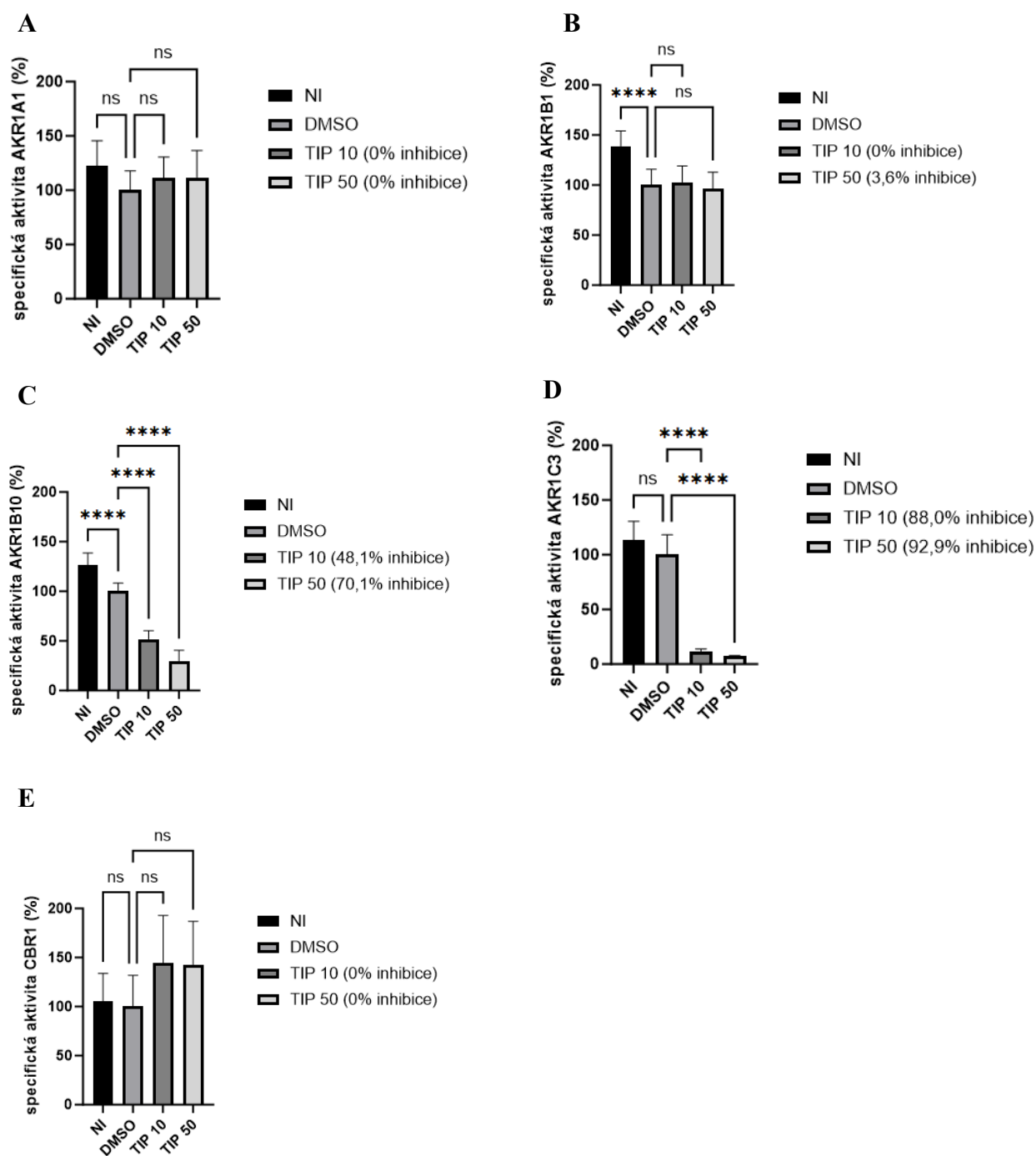
Obr. 8 Grafické zobrazení působení inhibitoru na reakci proměny daunorubicinu na daunorubicinol

TIP je inhibitorem schváleným FDA (od roku 2021), a to pro léčbu dlaždicového karcinomu hlavy a krku jako inhibitor připojení RAS k membráně. V našem případě bylo zkoumáno jeho potenciální použití u jiného nádorového onemocnění (AML), kde byl jako substrát reakce použit daunorubicin. Působením inhibitoru TIP dochází k zabránění reakce, při které enzymy přeměňují substrát na alkoholový derivát a množství produktu je tak podstatně nižší. Toto je žádané, jelikož produkt reakce neplní svou původní funkci, tedy nemá antineoplastické vlastnosti, a je mnohem toxičtější než substrát (Kura oncology, 2021).

5.1 Základní screening

Při těchto pokusech bylo cílem zjistit, jaké enzymy jsou inhibovány zvoleným inhibitorem TIP. Experimenty pro jednotlivé enzymy byly provedeny ve 3 opakováních. Testovala se reakce daunorubicinu s enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1. Jak již bylo zmíněno v podkapitole 4.2.5 byl použit inhibitor o dvou koncentracích. Nižší koncentrace byla 10 μM , vyšší 50 μM . Grafy pro jednotlivé enzymy jsou zobrazeny v Obr. 9.

Pro přehlednější zobrazení výsledků byla vypracována souhrnná Tab. 4 a souhrnný graf viz Obr. 10.



Obr. 9 Závislost průměrné specifické aktivity (%) enzymu na koncentraci inhibitoru

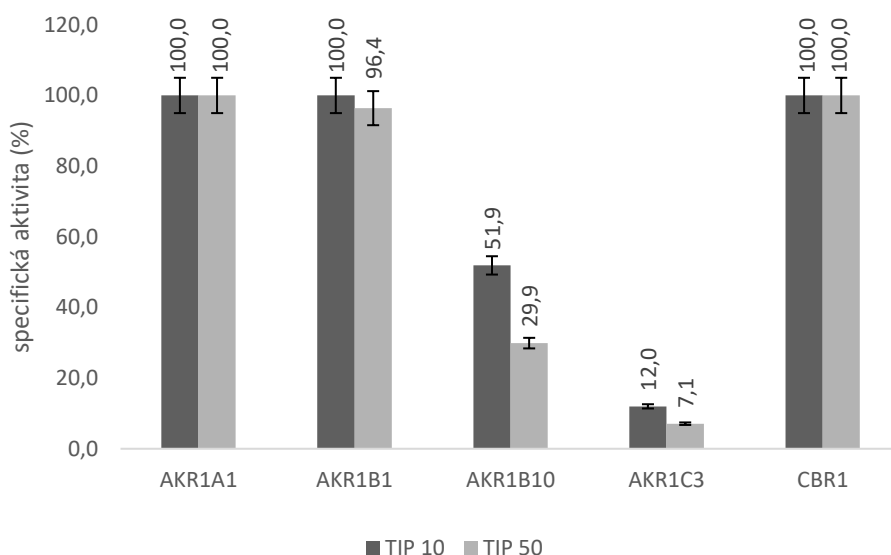
Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka (SD) z 3 nezávislých měření. Hodnota ns odpovídá $p > 0,05$. Symbol **** je označení pro p -hodnotu $\leq 0,0001$.

Tab. 4 Specifická aktivita vybraných enzymů po inhibici tipifarnibem

Enzym	Koncentrace tipifarnibu (μM)	Specifická aktivita enzymu (nmol/mg/min)	Specifická aktivita enzymu (%)	Inhibice enzymové aktivity (%)	Směrodatná odchylka (%)
AKR1A1	0*	252,6	100,0	-	-
	10	281,0	111,3	0	19,3
	50	282,5	111,9	0	24,6
AKR1B1	0*	12,4	100,0	-	-
	10	12,8	102,9	0	16,1
	50	12,0	96,4	3,6	16,3
AKR1B10	0*	54,1	100,0	-	-
	10	28,1	51,9	48,1	8,5
	50	16,2	29,9	70,1	10,7
AKR1C3	0*	243,8	100,0	-	-
	10	29,2	12,0	88,0	1,9
	50	17,2	7,1	92,9	0,7
CBR1	0*	1390,6	100,0	-	-
	10	1956,8	144,7	0	48,3
	50	1987,9	143,0	0	43,9

* kontrola DMSO

Výsledky jsou do tabulky vyneseny jako průměrná hodnota a směrodatná odchylka (SD) z 3 nezávislých měření. **Tučně** zvýrazněné jsou hodnoty, u kterých došlo k statisticky významné inhibici.



Obr. 10 Grafické porovnání specifické aktivity (%) u jednotlivých enzymů

Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota \pm SD z 3 nezávislých měření

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že nejvyšší inhibice nastala u enzymu AKR1C3, a dále u AKR1B10. U obou enzymů se jednalo o signifikantně významný rozdíl v specifické aktivitě mezi kontrolním vzorkem DMSO a vzorkem s danou koncentrací TIP (jak u nižší, tak u vyšší koncentrace inhibitoru). U AKR1C3 se u nižší koncentrace inhibitoru (10 μ M) naměřila $88,0 \pm 1,9\%$ inhibice. TIP o koncentraci 50 μ M inhiboval reakci z $92,9 \pm 0,7\%$. U enzymu AKR1B10 došlo k inhibici o $48,1 \pm 8,5\%$ při použití inhibitoru o koncentraci 10 μ M a k inhibici o $70,1 \pm 10,7\%$ v reakci, kde byl přítomen inhibitor o koncentraci 50 μ M.

U enzymů AKR1A1, 1B1 a CBR1 je inhibice reakce nulová nebo statisticky nevýznamná. Teoretická hodnota IC_{50} u enzymu AKR1B10 by pro TIP byla přibližně 10,4 μ M, zatím co u enzymu AKR1C3 by to bylo kolem 5,7 μ M, proto se v následujících částech experimentu pokračovalo pouze s enzymem AKR1C3.

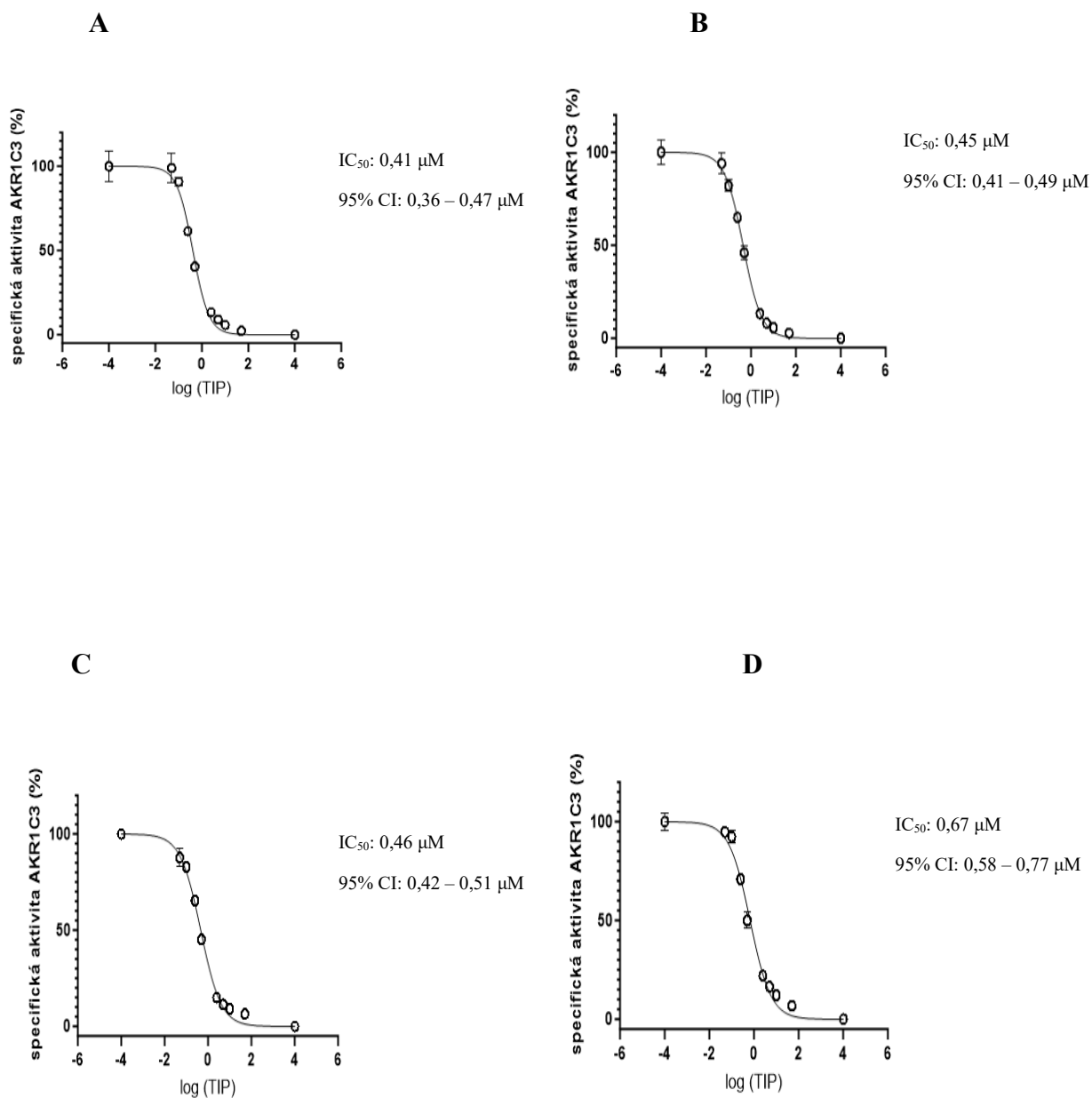
V práci od Milana (2019) se stanovovala specifická aktivita enzymu (v nmol/mg/min) vůči daunorubicinu a bylo zjištěno, že nejvyšší aktivitu má CBR1, následně AKR1C3, 1A1, 1B10 a nejnižší AKR1B1. V této práci se došlo k podobným výsledkům. Nejvyšší specifická aktivita byla naměřena u CBR1, dále sestupně u AKR1A1, 1C3, 1B10 a 1B1. Enzymy AKR1C3 a 1A1 vykazovaly velmi podobnou aktivitu vůči daunorubicinu. V případě, že by exprese jednotlivých enzymů byla na buňkách AML stejná a TIP by inhiboval pouze reakce katalyzované AKR1C3 a 1B10, přičemž aktivita CBR1 by byla o mnoho silnější, byla by tato

inhibice v praxi zanedbatelná. Bylo však zjištěno, že v nádorových buňkách jsou zvýšeně exprimovány enzymy AKR1C3 a CBR1. V klinické praxi to pak znamená, že inhibitor působící zejména na AKR1C3 a v menší míře i na AKR1B10 je významný, protože dojde k výraznému snížení koncentrace daunorubicinolu. Jelikož však je ve zvýšené míře exprimován také CBR1, který má výrazně vyšší aktivitu v přeměně daunorubicinu na daunorubicinol, měly by být provedeny také studie hledající inhibitor tohoto enzymu (Birtwistle, 2009; Jamrozik, 2023).

Síla inhibice působením TIP zatím nebyla pro CRE stanovována, a to ani u ostatních inhibitorů farnesyl transferázy, lonafarnibu a BMS 214662. Tyto dva inhibitory byly testovány zatím pouze v souvislosti s inhibicí navázání RAS k membráně buňky, a to například ve studii dle Papadimitrakopoulou (2005) či Ravoet (2008). Byly však použity jiné inhibitory k experimentálnímu zjištění inhibice u stejných enzymů (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1) a za použití stejného substrátu (daunorubicinu). Ve srovnání s inhibitory asciminib (Tučková, 2023) a zanubrutinib (Havlíčková, 2022) byla inhibice specifické aktivity u enzymu AKR1C3 silnější u TIP. Srovnatelně velká inhibice s TIP nastala u inhibitorů branebrutinib (Fiklíková, 2022) a olaparib (Lekešová, 2021). A například enasidenib prokázal vyšší sílu inhibice než TIP u enzymu AKR1C3 (Pěčková, 2021). Z tohoto srovnání lze vyvodit, že TIP inhibuje specifickou aktivitu enzymu AKR1C3 s poměrně velkou silou. Dále například deriváty baccharinu (Penning, 2021) nebo inhibitor S07-2005 (He, 2022) jsou silnými inhibitory AKR1C3 testovanými na buňkách z linie AML. Těchto inhibitorů je celá řada a výzkum se stále soustředí na objevování dalších.

5.2 Stanovení inhibiční koncentrace IC_{50}

Dále se stanovovala IC_{50} , tedy koncentrace inhibitoru, při které dojde ke snížení aktivity enzymu z 50 %. Jak bylo zmíněno výše, tento experiment se provedl pouze u enzymu AKR1C3. Měření bylo provedeno celkem čtyřikrát a jednotlivé grafy těchto měření jsou vidět na Obr. 11. Číselné hodnoty specifické aktivity a inhibice jsou v Tab. 5.



Obr. 11 Závislost specifické aktivity (%) na log koncentraci TIP u jednotlivých měření

A = první měření; B = druhé měření; C = třetí měření; D = čtvrté měření. Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota \pm SD.

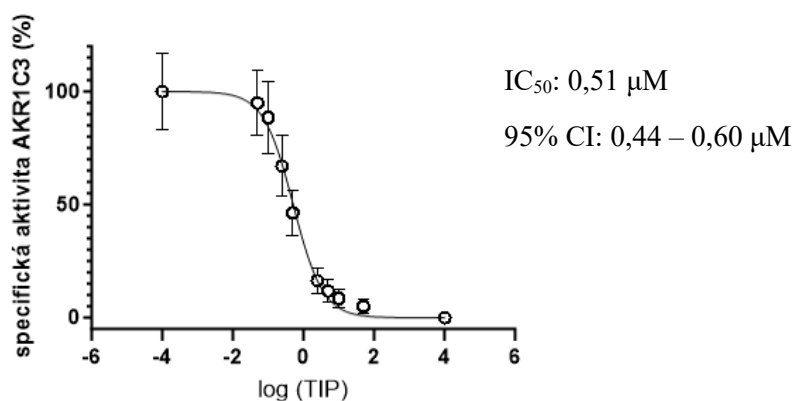
Tab. 5 Specifická aktivita AKR1C3 a míra inhibice TIP při stanovení IC50

*A = první měření; B = druhé měření; C = třetí měření; D = čtvrté měření. Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota a směrodatná odchylka (SD) z 3 nezávislých měření. * kontrola DMSO*

A					B				
Koncentrace TIP (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	Směrodatná odchylka (%)	Koncentrace TIP (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	Směrodatná odchylka (%)
0*	201,6	100,0	-	-	0*	183,6	100,0	-	-
0,05	201,7	99,0	1,0	8,8	0,05	172,6	94,0	6,0	5,5
0,10	183,2	90,9	9,1	2,8	0,10	150,9	82,2	17,8	3,1
0,25	124,0	61,5	38,5	2,4	0,25	119,2	64,9	35,1	2,3
0,50	81,6	40,5	59,5	1,5	0,50	84,4	46,0	54,0	3,6
2,50	27,0	13,4	86,6	1,2	2,50	24,5	13,4	86,6	0,6
5,00	18,2	9,0	91,0	1,1	5,00	15,0	8,2	91,8	0,2
10,00	11,8	5,8	94,2	1,2	10,00	10,4	5,7	94,3	0,1
50,00	4,8	2,4	97,6	0,1	50,00	5,1	2,8	97,2	0,1

C					D				
Koncentrace TIP (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	Směrodatná odchylka (%)	Koncentrace TIP (μM)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Specifická aktivita (%)	Inhibice (%)	Směrodatná odchylka (%)
0*	268,4	100,0	-	-	0*	243,2	100,0	-	-
0,05	248,3	87,7	12,3	4,9	0,05	230,7	94,9	5,1	1,3
0,10	234,7	82,9	17,1	1,1	0,10	224,8	92,4	7,6	3,2
0,25	185,2	65,4	34,6	2,1	0,25	172,3	70,9	29,1	1,4
0,50	128,1	45,2	54,8	0,6	0,50	121,8	50,1	49,9	4,2
2,50	42,6	15,0	85,0	0,6	2,50	53,5	22,0	78,0	0,6
5,00	32,2	11,4	88,6	0,5	5,00	40,2	16,5	83,5	0,5
10,00	25,7	9,1	90,9	0,1	10,00	29,4	12,1	87,9	1,3
50,00	18,5	6,5	93,5	0,1	50,00	16,6	6,8	93,2	1,0

Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1C3 ze všech měření byly následně vyneseny do společného grafu pro IC_{50} (viz Obr. 12), kde byla v programu GraphPad Prism spočtena hodnota 95% konfidenčního intervalu pro IC_{50} , a to v rozmezí 0,44 až 0,60 μM .



Obr. 12 Závislost specifické aktivity (%) na log koncentraci TIP

Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota \pm SD ze 4 nezávislých měření.

Při srovnání s dalšími inhibitory byly hodnoty IC_{50} pro TIP velmi nízké. U asciminibu byla naměřena hodnota IC_{50} 17,4 μM (Tučková, 2023). Při experimentálním stanovení IC_{50} působením zanubrutinibu se naměřila hodnota 4,9 μM (Havlíčková, 2022). Dále také branebrutinib vykazoval vyšší hodnotu IC_{50} ve srovnání s TIP, konkrétně 2,7 μM (Fiklíková, 2022). Hodnota IC_{50} u enasidenibu se stanovila na 1,1 μM a u olaparibu na 3,4 μM (Lekešová, 2021). Velmi podobnou hodnotu IC_{50} jako TIP měl také inhibitor 4-metyltetracyklin (0,51 μM), který je velmi selektivní k enzymu AKR1C3 a u kterého probíhalo měření na buněčné linii AML (Penning, 2021). U již zmiňovaného inhibitoru S07-2005 byla, opět pro AKR1C3, změřená hodnota IC_{50} (0,13 μM), která byla ještě nižší než u TIP (He, 2022). Také dinacliclib vykazoval velmi nízkou hodnotu IC_{50} , konkrétně 0,23 μM a byl takto experimentálně testován na buněčné linii lidského kolorektálního karcinomu HCT116 (Novotná, 2018).

Ukazuje se, že TIP má ve srovnání s výše zmíněnými inhibitory poměrně nízkou hodnotu IC_{50} , což je velmi výhodné pro klinické použití a dá se tak předpokládat vysoká afinita inhibitoru k enzymu. Platí, že pokud je nižší hodnota IC_{50} , bude lék účinný i při nižších

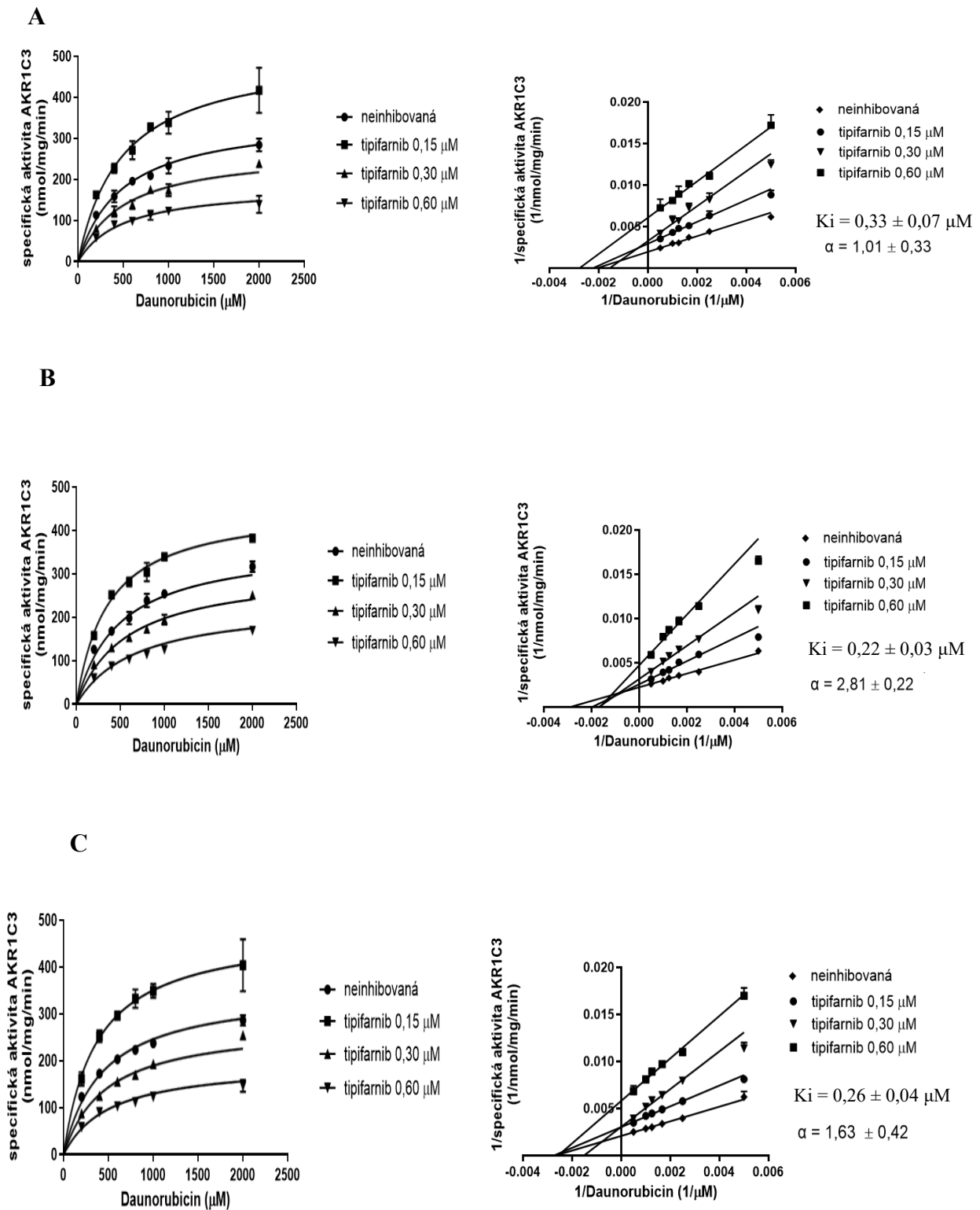
dávkách. To znamená, že dojde spíše k zabití rakovinné buňky a menšímu poškození buněk zdravé tkáně, a tudíž způsobení nižší systémové toxicity (Berrouet, 2020).

Ve studii dle Widemann (2006) byla mimo jiné zjišťována hodnota maximální koncentrace (C_{\max}) TIP v plazmě po podání různých dávek tohoto inhibitoru. Při dávce 150 mg/m² byla stanovena hodnota C_{\max} 885 ng/ml, což po převedení jednotek je 1,81 μM. Při podání nejvyšší dávky, tedy 375 mg/m² dosáhla hodnota C_{\max} 4,97 μM. Za předpokladu, že průměrný člověk má plochu 1,86 m², tak mu byla v této studii podána nejvyšší dávka 698 mg, přičemž nejvyšší tolerovaná dávka TIP je 900 mg, a to dvakrát denně. Jelikož je možné dosáhnout hodnoty C_{\max} v plazmě 1,81 až 4,97 μM a hodnota IC_{50} je 0,51 μM, tak lze předpokládat, že jsou zjištěné výsledky relevantní pro použití v klinické praxi (Goněc, 2015).

5.3 Stanovení typu inhibice a K_i

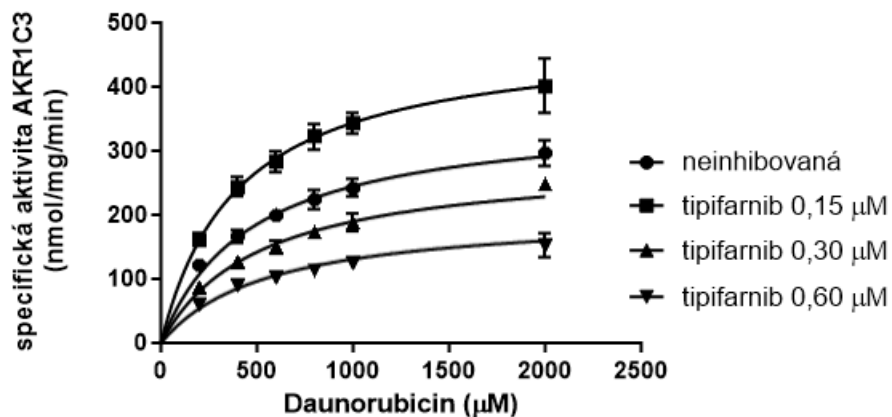
Tento experiment se provádí jak s různými koncentracemi inhibitoru, tak substrátu daunorubicinu. Byl proveden celkem třikrát pro stanovení nezávislého výsledku. Získané hodnoty se zpracovaly v programu GraphPad Prism a byly vyneseny do dvou typů grafů. Jedním byl graf Michaelis-Mentenové, který ukazuje vztah mezi koncentrací substrátu a rychlostí odpovídající enzymaticky řízené reakci. A dalším graf dle Lineweaver-Burka, jenž vznikne jako dvojitě reciproky výnos získaných hodnot. Jeho velkou výhodou je, že poskytuje přesnější odhad V_{\max} , a tudíž i přesnější informace o inhibici. Linearizací dat se zvyšuje přesnost a chyba tak může být stanovena kvantitativně (Pant, 2008).

Výsledky jednotlivých měření jsou zobrazeny na Obr. 13. A průměrný výsledek ze tří měření je znázorněn na Obr. 14 a 15.



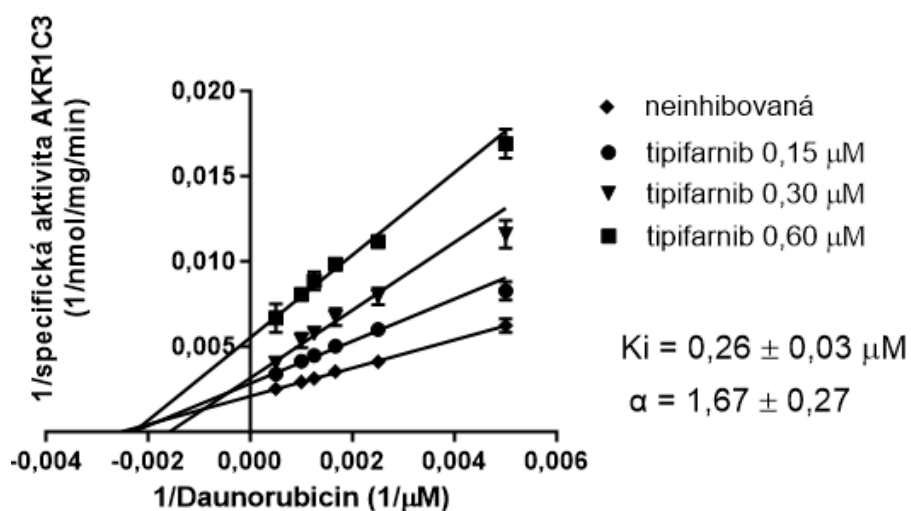
Obr. 13 Závislost specifické aktivity u enzymu AKR1C3 na koncentraci substrátu daunorubicinu při různých koncentracích inhibitoru u jednotlivých měření

A = první měření; B = druhé měření; C = třetí měření; D = čtvrté měření. Výsledky jsou do grafu vyneseny jako hodnota \pm SD. Levý sloupec je graf Michaelis-Mentenové; pravý sloupec je graf dle Lineweaver-Burka



Obr. 14 Graf Michaelis-Mentenové – zobrazení průměrných hodnot

Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota \pm SD ze 3 nezávislých měření.



Obr. 15 Graf dle Lineweaver-Burka – zobrazení průměrných hodnot

Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota \pm SD ze 3 nezávislých měření.

Z hodnoty K_i lze zjistit, jak velká je afinita inhibitoru k enzymu. Platí, že čím je nižší K_i , tím je vyšší afinita inhibitoru k enzymu. Z grafu na Obr. 14 je patrné, že hodnota K_i se pohybuje v rozmezí 0,23 až 0,29 μM, tedy se jedná o velmi nízkou hodnotu. Toto je

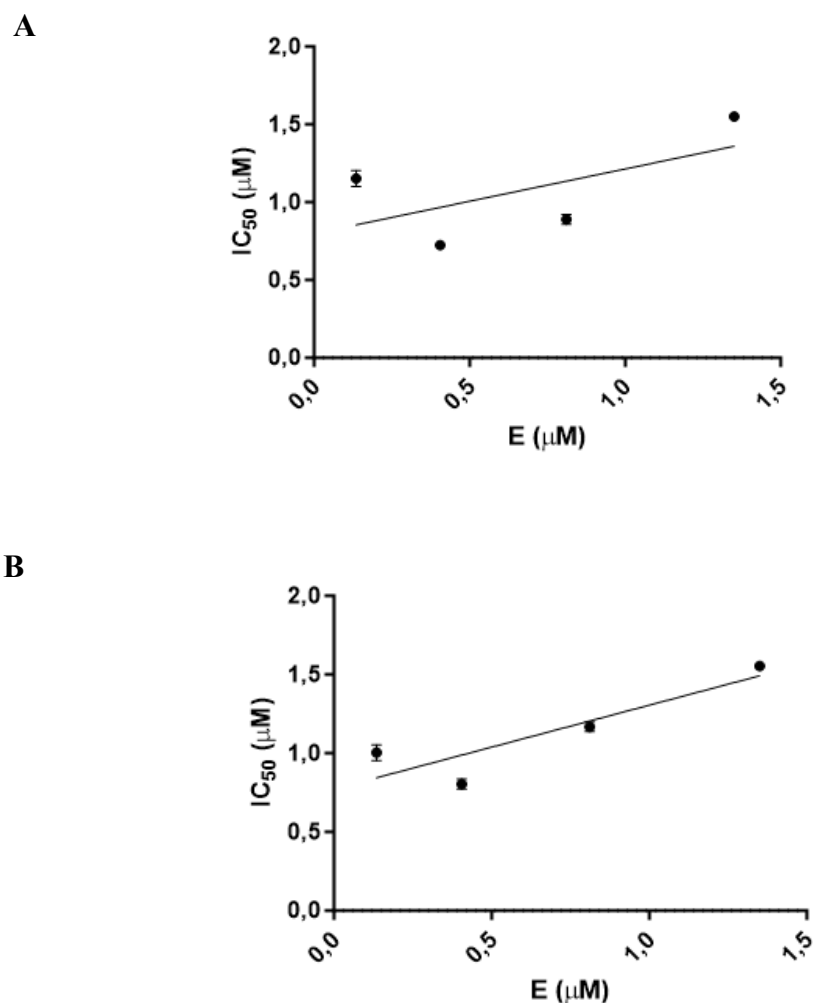
výhodné, jelikož je možné v klinické praxi k léčbě pacienta použít nižší dávku léčiva (Busti, 2015).

Hodnota α je jedním z parametrů, podle kterých lze určit o jaký typ inhibice se jedná. Je-li hodnota α velmi vysoká, je řeč o kompetitivní inhibici. V případě nekompetitivní inhibice se $\alpha = 1$. Jak lze vidět na předchozím grafu (viz Obr. 15) hodnota α leží v intervale 1,40 až 1,94, což naznačuje, že se pravděpodobně jedná o smíšený typ inhibice. Také z grafického porovnání lze usoudit, že TIP je smíšený inhibitor, jelikož se přímky jednotlivých koncentrací inhibitoru většinou protínají v II. kvadrantu grafu, nejlépe je toto vidět na Obr. 13B. Při smíšeném typu inhibice se inhibitor váže jak na aktivní místo enzymu (odpovídá kompetitivnímu typu), tak na jeho alosterické místo (odpovídá nekompetitivnímu typu). V tomto případě lze předpokládat, že se jedná o smíšený typ inhibice se sklonem k nekompetitivnímu typu. Z prezentovaných dat možno polemizovat, zda hodnoty α na Obr. 13A a 13C nenasvědčují, že by se mohlo jednat o nekompetitivní typ inhibice. Hodnoty α by v tomto případě byly blízko jedné. I při grafickém zhodnocení lze vidět, že graf na Obr. 13C odpovídá spíše nekompetitivnímu typu. Z toho důvodu byl proveden také experiment pro stanovení pevnosti vazby. Nízká hodnota K_i společně s nekompetitivním typem inhibice by totiž naznačovali, že se může jednat o tzv. pevně se vážící inhibitor.

Již zmíněné inhibitory, tedy asciminib (Tučková, 2023), zanubrutinib (Havličková, 2022), branebrutinib (Fiklíková, 2022), enasidenib (Pěčková, 2021) a olaparib (Lekešová, 2021) se všechny ukázaly jako nekompetitivní s výjimkou enasidenibu. Nejnižší K_i bylo pak změřeno u olaparibu (3,99 μM), která je však při srovnání s TIP stále vyšší, a proto je TIP výhodnější pro potenciální léčbu. Dalším nekompetitivním inhibitorem s nízkou hodnotou K_i (0,07 μM) je dinaciclib (Novotná, 2018). TIP vykazuje smíšený typ inhibice se sklonem k nekompetitivnímu typu. Smíšený typ inhibice poskytuje například také bisdemetoxykurkumin, jenž byl testován *in vitro* na rekombinantně připravené AKR1C3 (Calhoon, 2019).

5.4 Stanovení pevnosti vazby

Naposledy se testovalo, zda se inhibitor váže na enzym reverzibilně či ireverzibilně. Při tomto pokusu byly použity různé koncentrace enzymu AKR1C3 a inhibitoru TIP. Výsledkem byly čtyři hodnoty IC_{50} , kdy jedna hodnota odpovídala jedné koncentraci enzymu. Tyto hodnoty byly vyneseny na graf, který lze vidět na Obr. 16.



Obr. 16 Závislost IC_{50} na koncentraci enzymu AKR1C3 – graficky

Výsledky jsou do grafu vyneseny jako průměrná hodnota $\pm SD$ ze 3 nezávislých měření.

Z níže uvedených výsledků (Tab. 6) vyplývá, že se inhibitor váže na enzym reverzibilně. Při ireverzibilní inhibici by hodnota IC_{50} byla přímo úměrně rostoucí se zvyšující se koncentrací enzymu. TIP působí tedy smíšenou, reverzibilní inhibici se sklonem k nekompetitivnímu typu. Navíc má nízkou hodnotu K_i a IC_{50} , tudíž by se mohl podávat v nízkých dávkách. Pro praktické ověření této teorie je by bylo vhodné provést experiment s inhibitorem TIP a enzymem AKR1C3 na buněčné linii.

Tab. 6 Hodnoty IC_{50} inhibitoru TIP pro různé koncentrace enzymu AKR1C3

Koncentrace AKR1C3 ($\mu\text{g}/\text{reakci}$)	Hodnota IC_{50} inhibitoru (μM)			Směrodatná odchylka
	1.měření	2.měření	Průměr	
0,50	1,00	1,15	1,08	0,11
1,50	0,80	0,73	0,77	0,05
3,00	1,17	0,89	1,03	0,20
5,00	1,55	1,55	1,55	0,00

Inhibitory zanubrutinib (Havličková, 2022) a branebrutinib (Fiklíková, 2022) také prokázaly, že se vážou na enzym AKR1C3 reverzibilně. Mezi další reverzibilní inhibitory AKR1C3 patří například indometacin (Byrns, 2008). Již dříve zmiňovaný dinacliclib vykazuje vůči AKR1C3 jako jeden z mála ireverzibilní typ inhibice (Novotná, 2018). Ireverzibilní inhibitory mají vyšší účinnost, jelikož poskytují pevnější vazbu s enzymem, která díky tomu déle vydrží. Tímto enzym přijde o svou funkci na mnohem delší dobu, než je tomu u reverzibilního navázání (Roskoski, 2007). Ve srovnání s TIP se dinacliclib ukazuje jako lepší inhibitor, jelikož má velmi nízké hodnoty IC_{50} a K_i a také se váže na enzym ireverzibilně.

Ve studii dle Jabbour (2011) se TIP testoval *in vivo* v kombinaci s idarubicinem a cytarabinem. Idarubicin je stejně jako daunorubicin antracyklinové antibiotikum. Během studie byl pacientům podáván cytarabin po dobu jednoho až čtyř dnů, následován intravenózním podáváním idarubicinu. TIP byl dávkován dvakrát denně po dobu 21 dnů. Výsledkem bylo, že celkem 64 % testovaných pacientů dosáhlo kompletní remise, dalších 9 % pacientů také dosáhlo kompletní remise, avšak s neúplným obnovením krevních destiček, 21 % pacientů se neuzdravilo a 4 % pacientů během studie exitovalo. Tato studie ukazuje,

že potenciálně vhodným substrátem pro TIP je také idarubicin. K podobným výsledkům dospěla také studie dle Ravandi-Kashani (2006).

6 ZÁVĚR

Antracyklinová antibiotika se používají na léčbu nádorových onemocnění, včetně AML. Vlivem enzymů CRE z nadrodiny AKR a SDR (konkrétně AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1) dochází k přeměně daunorubicinu na jeho metabolit daunorubicinol. Ten je však mnohem méně účinný a také více toxický než jeho parentní látka. Proto se v této práci stanovoval potenciální vliv inhibitoru na vybrané enzymy spadající do výše zmíněných nadrodin.

V první řadě byl proveden screening, ve kterém bylo zjištěno, že k největší inhibici dochází u enzymu AKR1C3, a to konkrétně o $88,0 \pm 1,9$ % při koncentraci inhibitoru $10 \mu\text{M}$. Při $50 \mu\text{M}$ koncentraci došlo k inhibici reakce z $92,9 \pm 0,7$ %. K inhibici reakce došlo také u enzymu AKR1B10, síla inhibice byla však nižší než u AKR1C3, a proto byl pro další měření použit pouze enzym AKR1C3. Hodnota IC_{50} byla stanovena na $0,51 \pm 0,03 \mu\text{M}$ a hodnota inhibiční konstanty na $0,26 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Při porovnání s dalšími inhibitory se TIP ukázal jako velmi účinný, jelikož dosahuje velké inhibice a má velmi nízké hodnoty IC_{50} a K_i . Dále bylo z výsledků určeno, že TIP pravděpodobně poskytuje smíšený typ inhibice se sklonem k inhibici nekompetitivní a na enzym se váže reverzibilně.

Pro potvrzení těchto závěrů je potřeba provést experimentální test s využitím enzymu AKR1C3 a inhibitoru TIP na buněčných liniích s uměle navozenou expresí vybraného enzymu. Pro relevantnější výsledek by se dále pracovalo s buněčným modelem rakovinového původu. Použít by se mohla buněčná linie odvozená od AML, jako například Kasumi-1 a Kasumi-6 (Zápotocký, 2013).

7 SEZNAM ZKRATEK

AKR	aldo-ketoreduktázy
AML	akutní myeloidní leukémie
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
bE	bez enzymu
bS	bez substrátu
CRE	karbonyl redukující enzymy (z angl. carbonyl reducing enzymes)
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
dsDNA	dvouřetězcová DNA (z angl. double stranded DNA)
FAB	Francouzsko-americko-britská
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and drug administration)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GDP	guanosindifosfát (z angl. guanosine diphosphate)
GTP	guanosintrifosfát (z angl. guanosine triphosphate)
LRP	protein asociovaný s plicní rezistencí (z angl. lung resistance-related protein)
MVP	tzv. Major vault protein
MRP	protein asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí (z angl. multidrug resistance associated protein)
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NaPB	sodno-fosfátový pufr (z angl. sodium phosphate buffer)

NI	neinhibovaná reakce
Pgp	P-glykoprotein
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RT-PCR	reverzně-transkriptázová polymerní řetězová reakce (z angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
SD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
SDR	dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (z angl. short-chain dehydrogenase/reductase)
TIP	tipifarnib
UHPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. ultra-high-performance liquid chromatography)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec daunorubicinu.....	16
Obrázek 2: Místo vmezezení daunorubicinu ve struktuře DNA	17
Obrázek 3: Strukturní vzorec daunorubicinu jako volného radikálu.....	18
Obrázek 4: Schéma struktury P-glykoproteinu.....	20
Obrázek 5: Schéma struktury MRP1 a MRP6	20
Obrázek 6: Strukturní vzorec tipifarnibu.....	26
Obrázek 7: Typy inhibice – graficky.....	27
Obrázek 8: Grafické zobrazení působení inhibitoru na reakci proměny daunorubicinu na daunorubicinol.....	39
Obrázek 9: Závislost průměrné specifické aktivity (%) enzymu na koncentraci inhibitoru.....	40
Obrázek 10: Grafické porovnání specifické aktivity (%) u jednotlivých enzymů.....	42
Obrázek 11: Závislost specifické aktivity (%) na log koncentraci TIP u jednotlivých měření.....	44
Obrázek 12: Závislost specifické aktivity (%) na log koncentraci TIP.....	46
Obrázek 13: Závislost specifické aktivity u enzymu AKR1C3 na koncentraci substrátu daunorubicinu při různých koncentracích inhibitoru u jednotlivých měření.....	48
Obrázek 14: Graf Michaelis-Mentnové – zobrazení průměrných hodnot.....	49
Obrázek 15: Graf dle Lineweaver-Burka – zobrazení průměrných hodnot.....	49
Obrázek 16: Závislost IC50 na koncentraci enzymu AKR1C3 – graficky.....	51

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Množství jednotlivých složek regeneračního systému pro 1 reakci.....	35
Tabulka 2: Přehled požadovaných a zásobních koncentrací jednotlivých enzymů.....	35
Tabulka 3: Objem jednotlivých složek potřebných pro jednu in vitro inkubaci.....	37
Tabulka 4: Specifická aktivita vybraných enzymů po inhibici tipifarnibem.....	41
Tabulka 5: Specifická aktivita AKR1C3 a míra inhibice TIP při stanovení IC50.....	45
Tabulka 6: Hodnoty IC50 inhibitoru TIP pro různé koncentrace enzymu AKR1C3.....	52

10 SEZNAM LITERATURY

Agrawal K. (2007). Daunorubicin. *Xpharm: the comprehensive pharmacology reference*. Elsevier, 1-4. ISBN 9780080552323. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008055232-3.61549-1

Acheampong D. O., Adokoh C. K., Asante D. *et al.* (2018). *Immunotherapy for acute myeloid leukemia (aml): a potent alternative therapy*. **97**, 225-232. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/J.Biopha.2017.10.100

Alcalay M., Orleth A., Sebastiani C. *et al.* (2001). Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene*. **20**(40), 5680-5694. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/Sj.Onc.1204642

Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R. *et al.* (2016). The 2016 revision to the world health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. **127**(20), 2391-2405. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/Blood-2016-03-643544

Arwanih E. Y, Louisa M., Rinaldi I. A. *et al.* (2022). Resistance mechanism of acute myeloid leukemia cells against daunorubicin and cytarabine: a literature review. *Cureus*. **14**(12). ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/Cureus.33165

Bachur N. R. (2002). Anthracyclines. *Encyclopedia of cancer*. Elsevier, 57-61. ISBN 9780122275555. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227555-1/00006-X

Bain B. J. A., Estcourt L. (2013). Fab classification of leukemia. *Brenner's encyclopedia of genetics*. Elsevier, 5-7. ISBN 9780080961569. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00515-5

Banerjee S. (2021). Aldo keto reductases akr1b1 and akr1b10 in cancer: molecular mechanisms and signaling networks. *Cell biology and translational medicine*. **14**, 65-82. Advances in experimental medicine and biology. ISBN 978-3-030-80491-6. Dostupné z: doi:10.1007/5584_2021_634

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. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.1080/03602530802431439

Berrouet C., Dorilas N., Rejniak K. A. *et al.* (2020). Comparison of drug inhibitory effects in monolayer and spheroid cultures. *Bulletin of mathematical biology*. **82**(6). ISSN 0092-8240. Dostupné z: doi:10.1007/S11538-020-00746-7

Betz B. L., Hess J. L. (2010). Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. **134**(10), 1427-1433. ISSN 1543-2165. Dostupné z: doi:10.5858/2010-0245-Ra.1

Birtwistle J., Hayden R. E., Khanim F. L. *et al.* (2009). The aldo-keto reductase AKR1C3 contributes to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-3,4-dihydrodiol mediated oxidative dna damage in myeloid cells: implications for leukemogenesis. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. **662**(1-2), 67-74. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.12.010

Blat Y. (2010). Non-competitive inhibition by active site binders. **75**(6), 535-540. ISSN 1747-0277. Dostupné z: doi:10.1111/J.1747-0285.2010.00972.X

Bučková P., Buliková A., Cermaková M. *et al.* (2013). Akutní myeloidní leukémie: informace pro pacienty a jejich blízké. *The czech leukemia study group for life (cell)*. ISBN 978-80-260-4154-2.

Busti A. J. (2015). *The inhibitory constant (ki) and its use in understanding drug interactions* [online]. Poslední revize 10. 2015 [cit. 2024-05-10]. Dostupné z: <https://www.ebmconsult.com/articles/inhibitory-constant-ki-drug-interactions>

Byrns M. C., Steckelbroeck S., Penning T. M. (2008). An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3 α -HSD, type 5 17 β -HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies. *Biochemical Pharmacology*. **75**(2), 484-493. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2007.09.008

Calhoon B. (2019). *AKR1C3 inhibition by curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin: an investigation*. Disertační práce. University of Chester, United Kingdom, 15 stran.

Čerňan M., Szotkowski T. (2021). Současné trendy v léčbě akutní myeloidní leukemie – od indukční chemoterapie „7+3“ po cílenou léčbu. *Klin farmakol farm.* **35**(3), 61-69.

De Oliveira M. L., Rocha A., Nardotto G. H. B. *et al.* (2020). Analysis of daunorubicin and its metabolite daunorubicinol in plasma and urine with application in the evaluation of total, renal and metabolic formation clearances in patients with acute myeloid leukemia. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **191**. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/J.jpba.2020.113576

Den Boer M. L., Pieters R., Veerman A. J. P. (1998). Mechanisms of cellular anthracycline resistance in childhood acute leukemia. *Leukemia*. **12**(11), 1657-1670. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/Sj.Leu.2401175

Döhner H., Wei A. H., Appelbaum F. R. *et al.* (2022). Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the

ELN. *Blood*. **140**(12), 1345-1377. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/Blood.2022016867

Dougall I. G., Unitt J. (2015). Evaluation of the biological activity of compounds. *The practice of medicinal chemistry*. Elsevier, 15-43. ISBN 9780124172050. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-417205-0.00002-X

Dubská V. (2009). *Oxidační stres u antracyklinové kardiotoxicity u králíka*. Rigorózní práce. Katedra biologických a lékařských věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 47 Stran.

Endo S., Matsunaga T., Nishinaka T. (2021). The role of AKR1B10 in physiology and pathophysiology. *Metabolites*. **11**(6). ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/Metabo11060332

Fiklíková B. (2022). *Vliv inhibice branebrutinibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 66 Stran.

Forrest G. L., Gonzalez B. (2000). Carbonyl reductase. *Chemico-biological interactions*. **129**(1-2), 21-40. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-2797(00)00196-4

Gilardi M., Wang Z., Proietto M. *et al.* (2020). Tipifarnib as a precision therapy for HRAS - mutant head and neck squamous cell carcinomas. *Molecular cancer therapeutics*. **19**(9), 1784-1796. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0958

Gonč R., Macků I., Selingerová I. *et al.* (2015). Povrch těla a tělesná hmotnost dospělé české onkologické populace. *Čes. slov. Farm.* **64**(6), 264-268.

Gräff M., Buchholz P. C. F., Stockinger P. *et al.* (2019). The short-chain dehydrogenase/reductase engineering database (SDRED): a classification and analysis system for a highly diverse enzyme family. *Proteins: structure, function, and bioinformatics.* **87**(6), 443-451. ISSN 0887-3585. Dostupné z: doi:10.1002/Prot.25666

Hande K. R. (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update on cancer therapeutics.* **3**(1), 13-26. ISSN 1872115x. Dostupné z: doi:10.1016/J.Uct.2008.02.001

Havlíčková L. (2022). *Vliv zanubrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou karbonyl redukujícími enzymy.* Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 74 Stran.

He S., Liu Y., Chu X. *et al.* (2022). Discovery of novel aldo-keto reductase 1C3 inhibitors as chemotherapeutic potentiators for cancer drug resistance. *Acs medicinal chemistry letters.* **13**(8), 1286-1294. ISSN 1948-5875. Dostupné z: doi:10.1021/acsmchemlett.2c00175

Horáček J. M. (2007). Kdy myslet na kardiotoxicitu protinádorové léčby a jak ji diagnostikovat. *Interní med.* **2**, 67-69.

Hwang S. M. (2020). Classification of acute myeloid leukemia. *Blood research.* **55**(1), 1-4. ISSN 2287-979x. Dostupné z: doi:10.5045/Br.2020.S001

Jabbour E., Kantarjian H., Ravandi F. *et al.* (2011). A phase 1-2 study of a farnesyltransferase inhibitor, tipifarnib, combined with idarubicin and cytarabine for patients with newly

diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*. **117**(6), 1236-1244. ISSN 0008-543X. Dostupné z: doi:10.1002/cncr.25575

Jamrozik M., Piska K., Bucki A. *et al.* (2023). In silico and in vitro assessment of carbonyl reductase 1 inhibition using ASP9521—a potent aldo-keto reductase 1C3 inhibitor with the potential to support anticancer therapy using anthracycline antibiotics. *Molecules*. **28**(9). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/Molecules28093767

Kabel A. M., Zamzami F., Al-Talhi M. (2017). Acute myeloid leukemia: a focus on risk factors, clinical presentation, diagnosis and possible lines of management. *Journal of cancer research and treatment*. **5**(2), 62-67. Dostupné z: doi:10.12691/Jcrt-5-2-4

Khayami R., Hashemi S. R., Kerachian M. A. (2020). Role of aldo-keto reductase family 1 member b1 (AKR1B1) in the cancer process and its therapeutic potential. *Journal of cellular and molecular medicine*. **24**(16), 8890-8902. ISSN 1582-1838. Dostupné z: doi:10.1111/Jcmm.15581

King M. W. (2003). Lineweaver-Burk plot of inhibited enzymes. Dostupné z: King M. W. - *Biochemistry text book*. Poslední revize 08.2003 [cit. 2024-05-04]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/slideshow/biochem-textbook/10046892>

Kohlschütter J., Michelfelder S., Trepel M. (2008). Drug delivery in acute myeloid leukemia. *Expert opinion on drug delivery*. **5**(6), 653-663. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.5.6.653

Kura Onkology [online]. Poslední revize 02.2021 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: <https://Ir.Kuraoncology.Com/News-Releases/News-Release-Details/Kura-Oncology-Receives-Fda-Breakthrough-Therapy-Designation>

Laffin B., Petrash J. M. (2012). Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. *Frontiers in pharmacology*. **3**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/Fphar.2012.00104

Lekešová A. (2021). *Vliv olaparibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou karbonyl redukujícími enzymy*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 69 stran.

Lim S., Shin J. Y., Jo A. *et al.* (2013). Carbonyl reductase 1 is an essential regulator of skeletal muscle differentiation and regeneration. **45**(8), 1784-1793. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/J.Biocel.2013.05.025

Liu Y., He S., Chen Y. *et al.* (2020). Overview of AKR1C3: inhibitor achievements and disease insights. *Journal of medicinal chemistry*. **63**(20), 11305-11329. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/Acs.Jmedchem.9b02138

Ma J. (2012). *AKR1B10 is a novel breast cancer prognostic marker and protumorigenic metabolism modulator*. Disertační práce. Southern Illinois University at Carbondale, USA, 103 stran.

Malátková P., Wsól V. (2013). Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug metabolism reviews*. **46**(1), 96-123. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2013.853078

Marek J., Linhart A., Rucklová Z. *et al.* (2011). Kardiotoxicita onkologické léčby. *Vnitř lék*. **57**(5), 472-484.

Martinelli G., Iacobucci I., Paolini S. *et al.* (2008). Farnesyltransferase inhibition in hematologic malignancies: the clinical experience with tipifarnib. *Clinical advances in hematology & oncology*. **6**(4), 303-310.

Medeiros B. C., Landau H. J., Morrow M. *et al.* (2007). The farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, is a potent inhibitor of the MDR1 gene product, P-glycoprotein, and demonstrates significant cytotoxic synergism against human leukemia cell lines. *Leukemia*. **21**(4), 739-746. ISSN 0887-6924. Dostupné z: doi:10.1038/Sj.Leu.2404539

Mesa R. A. (2006). Tipifarnib: farnesyl transferase inhibition at a crossroads. *Expert review of anticancer therapy*. **6**(3), 313-319. ISSN 1473-7140. Dostupné z: doi:10.1586/14737140.6.3.313

Milan J. (2019). *Vliv inhibice midostaurinu, vistusertibu a talazoparibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 87 stran.

Mukherjee A., Sasikala W. D. (2013). Drug–DNA intercalation. *Dynamics of proteins and nucleic acids*. Elsevier, 1-62. Advances in protein chemistry and structural biology. ISBN 9780124116368. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8

Murphy M., Brown G., Wallin C. *et al.* (2022). Gene help: integrated access to genes of genomes in the reference sequence collection. *National center for biotechnology information*.

Narayanan D., Weinberg O. K. (2020). How I investigate acute myeloid leukemia. *International journal of laboratory hematology*. **42**(1), 3-15. ISSN 1751-5521. Dostupné z: doi:10.1111/Ijlh.13135

Novotná E., Büküm N., Hofman J. *et al.* (2018). Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile. *Archives of Toxicology*. **92**(9), 2845-2857. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-018-2258-0

Nosková V., Hajdúch M., Mihál V. *et al.* (2000). Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klinická onkologie*. **2**, 10-17.

Nosková V. (2000). Schéma struktury proteinu MRP. Dostupné z: Nosková V., Hajdúch M., Mihál V. A Cwierka K. (2000). Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klinická onkologie*. **2**, 10-17.

Palmeira A. (2011). *Design, synthesis and evaluation of xanthone derivatives for dual activity: antitumor and P-glycoprotein inhibition*. Rigorózní práce. Universidade do Porto, Porto, 402 stran.

Palmeira A. (2011). Schematic representation of P-gp structure. Dostupné z: Palmeira A. (2011). *Design, synthesis and evaluation of xanthone derivatives for dual activity: antitumor and P-glycoprotein inhibition*. Rigorózní práce. Universidade do Porto, Porto, str. 33.

Pant M., Sharma P., Radha T. *et al.* (2008). Nonlinear optimization of enzyme kinetic parameters. *Journal of biological sciences*. **8**(8), 1322-1327. ISSN 17273048. Dostupné z: doi:10.3923/jbs.2008.1322.1327

Papadimitrakopoulou V., Agelaki S., Tran H. T. *et al.* (2005). Phase I study of the farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 given weekly in patients with solid tumors. *Clinical cancer research*. **11**(11), 4151-4159. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1659

Pelcovits A., Niroula R. (2020). Acute myeloid leukemia: a review. *Rhode Island medical journal*. 38-40.

Penning T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): overview. *Chemico-biological interactions*. **234**, 236-246. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/J.Cbi.2014.09.024

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. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/J.Mce.2018.07.002

Penning T. M., Jonnalagadda S., Trippier P. C. *et al.* (2021). Aldo-keto reductases and cancer drug resistance. *Pharmacological reviews*. **73**(3), 1150-1171. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pharmrev.120.000122

Pesaresi A. (2023). Mixed and non-competitive enzyme inhibition: underlying mechanisms and mechanistic irrelevance of the formal two-site model. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. **38**(1). ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2023.2245168

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

Pubchem, National center for biotechnology information – Tipifarnib [online]. Poslední revize 03.2024 [cit. 2024-03-26]. Dostupné z: <https://Pubchem.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Compound/Tipifarnib>.

Pubchem, National center for biotechnology information – Daunorubicin [online]. Poslední revize 04.2024 [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Daunorubicin>

Puchnerová V., Nováková Z., Wilhelm Z. (2016). Antracykliny – kardiotoxicita a kardioprotekce – se zaměřením na mechanismus účinku. *Interv akut kardiol.* **15**(2), 102-105.

Ravandi-Kashani F., Kantarjian H., Garcia-Manero G. *et al.* (2006). Tipifarnib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) or high risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Journal of Clinical Oncology.* **24**(18), 6557-6557. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/jco.2006.24.18_suppl.6557

Ravoet C., Mineur P., Robin V. *et al.* (2008). Farnesyl transferase inhibitor (lonafarnib) in patients with myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukaemia: a phase II study. *Annals of Hematology.* **87**(11), 881-885. ISSN 0939-5555. Dostupné z: doi:10.1007/s00277-008-0536-2

Roloff G. W., Odenike O., Bajel A. *et al.* (2022). Contemporary approach to acute myeloid leukemia therapy in 2022. *American society of clinical oncology educational book.* (42), 568-583. ISSN 1548-8748. Dostupné z: doi:10.1200/Edbk_349605

Roskoski R. (2007). Modulation of enzyme activity. *Xpharm: The comprehensive pharmacology reference.* Elsevier, 1-11. ISBN 9780080552323. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008055232-3.60042-X

Rowe J. M. (2022). The “7 3” regimen in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* **107**(1), 3-3. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/Haematol.2021.280161

Saboury A. A. (2009). Enzyme inhibition and activation: a general theory. *J. Iran. Chem. Soc.* **6**(2), 219-229.

Saleem T., Kasi A. (2020). *Daunorubicin*. *Statpearls publishing* [online]. [cit. 2024-04-23]. Dostupné z: https://Europepmc.Org/Article/Nbk/Nbk559073#_Article-20265_S11_

Sebti S. M., Hamilton A. D. (2000). Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase i inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies. *Oncogene*. **19**(56), 6584-6593. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/Sj.Onc.1204146

Shi S. M., Di L. (2017). The role of carbonyl reductase 1 in drug discovery and development. **13**(8), 859-870. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1080/17425255.2017.1356820

Sheng X., Tucci J., Parmentier J. *et al.* (2016). Adipocytes cause leukemia cell resistance to daunorubicin via oxidative stress response. *Oncotarget*. **7**(45), 73147-73159. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/Oncotarget.12246

Schiffer C. A., Stone R. M. (2003). Morphologic classification and clinical and laboratory correlates. *Holland-frei cancer medicine*. **6**.

Sodani K., Patel A., Kathawala R. J. *et al.* (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese journal of cancer*. **31**(2), 58-72. ISSN 1000467x. Dostupné z: doi:10.5732/Cjc.011.10329

Stubbins R. J., Francis A., Kuchenbauer F. *et al.* (2022). Management of acute myeloid leukemia: a review for general practitioners in oncology. *Current oncology*. **29**(9), 6245-6259. ISSN 1718-7729. Dostupné z: doi:10.3390/Curroncol29090491

Tučková K. (2023). *Využití vybraných inhibitorů k překonání anthracyklinové rezistence v terapii nádorových onemocnění (in vitro studie)*. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 70 stran.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) [online]. Poslední revize 02.2021 [cit. 2024-04-22]. Dostupné Z: <https://www.uzis.cz/index.php?Pg=Aktuality&Aid=8466>

Vodvářka P. (2003). Radioterapie a chemoterapie zhoubných nádorů centrálního nervového systému. *Neurologie pro praxi*. **5**, 242-248.

Volkova M., Russell R. (2012). Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current cardiology reviews*. **7**(4), 214-220. ISSN 1573403x. Dostupné z: doi:10.2174/157340311799960645

Wheate N. J. (2007). The chemical structure of dna the watson-crick base pairing between guanosine and cytosine bases, and adenosine and thymine bases. Dostupné z: Wheate N. J., Brodie C. R., Collins J. G., Kemp S. A Aldrich-Wright J. R. (2007). Dna intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-reviews in medicinal chemistry*. **7**(6), 627-648. ISSN 13895575. Dostupné z: doi:10.2174/138955707780859413

Widemann B. C., Salzer W. L., Arceci R. J. *et al.* (2006). Phase I trial and pharmacokinetic study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in children with refractory solid tumors or neurofibromatosis type I and plexiform neurofibromas. *Journal of clinical oncology*. **24**(3), 507-516. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2005.03.8638

Xue X., Lai K. A., Huang J. *et al.* (2006). Anti-inflammatory activity in vitro and in vivo of the protein farnesyltransferase inhibitor tipifarnib. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **317**(1), 53-60. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/Jpet.105.095976

Yang H., Li X., Li G. *et al.* (2021). Accurate quantitative determination of affinity and binding kinetics for tight binding inhibition of xanthine oxidase. **139**. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/J.Biopha.2021.111664

Zápotocký M. (2013). *Cílená léčba AML1-ETO pozitivní akutní myeloidní leukémie inhibitory deacetyláz histonů*. Dizertační práce. Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, 60 stran.

Zatloukalová S., Azeem K., Čerňan M. *et al.* (2021). Epidemiologie, rizikové faktory a možnosti prevence akutních leukemií. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **70**(3), 208-220.