

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**INHIBIČNÍ ÚČINEK ZOPOLRESTATU, VE-821
A BERZOSERTIBU NA AKTIVITU VYBRANÝCH REDUKTAS
Z NADRODINY AKR A SDR NA ÚROVNI IN VITRO**

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Tereza Staňková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za veškeré připomínky, osobní konzultace a čas, který mi při zpracování této práce věnoval. Mé díky patří také Mgr. Lence Laštovičkové, Ph.D. za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři, RNDr. Bc. Evě Novotné, Ph.D. za možnost osobních konzultací a Bc. Kláře Gruzovské za ochotu a veškerou pomoc při práci v laboratoři. Moc děkuji také svým blízkým za podporu během celého studia.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne

Podpis

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Tereza Staňková

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

Konzultant: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Název diplomové práce: Inhibiční účinek zopolrestatu, VE-821 a berzosertibu na aktivitu vybraných reduktas z nadrodiny AKR a SDR na úrovni *in vitro*.

Zvýšená činnost karbonyl redukujících enzymů (CRE) z nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) bývá spojena s rozvojem některých nádorových onemocnění. U nich jsou tyto enzymy často nadměrně exprimovány, podporují růst nádorové tkáně a ve velké míře se podílí na deaktivaci různých cytostatik, včetně antracyklinů. Jedním z nejpoužívanějších zástupců této skupiny je daunorubicin (DAUN), jehož metabolickou přeměnou vzniká více toxický alkoholový metabolit daunorubicinol (DAUNol) se sníženou protinádorovou aktivitou.

V rámci *in vitro* experimentů vykonaných v této práci byl zkoumán inhibiční vliv tří látek (zopolrestatu (ZOP), VE-821 a berzosertibu) na aktivitu vybraných CRE (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1). Inhibicí těchto enzymů dochází k poklesu jejich aktivity, tedy i ke snížení produkce zmíněného metabolitu DAUNolu. Z představených látek byl nejvyšší inhibiční efekt pozorován u ZOP kombinovaného s enzymy AKR1B1 a 1C3. Zbylé dva inhibitory nevykazovaly dostatečně velký inhibiční potenciál, proto do dalších experimentů již zahrnuty nebyly. ZOP snížil aktivitu AKR1B1 o 79,9 % při 10 μ M koncentraci a o 80,7 % při 50 μ M koncentraci. Aktivita AKR1C3 byla 10 μ M ZOP inhibována z 82,7 % a 50 μ M ZOP z 94,6 %. Další kinetické parametry ZOP byly měřeny pro oba tyto enzymy, konkrétně IC₅₀ ZOP v kombinaci s AKR1B1 byla 0,63 \pm 0,04 μ M, K_i dosahovala 0,46 \pm 0,16 μ M. V případě AKR1C3 byla IC₅₀ ZOP 2,32 \pm 0,26 μ M a K_i odpovídala 2,32 \pm 0,26 μ M. ZOP vykazoval k oběma enzymům

smíšený typ inhibice s tendencí k nekompetitivnímu působení a na oba enzymy se vázal ireverzibilně. V literatuře je ZOP popsán, a v současnosti také zkoumán, jako silný inhibitor enzymu AKR1B1 pro léčbu komplikací spojených s diabetem. Zjištěná data v této práci ovšem naznačují, že ZOP inhibuje stejně efektivně i enzym AKR1C3. Vzhledem k nadměrnému výskytu AKR1C3 v hormon-dependentních nádorových tkáních by tedy společné podání cytostatika DAUN se ZOP mohlo vést ke zlepšení bezpečnosti a úspěšnosti terapie některých nádorových onemocnění.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Tereza Staňková

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

Consultant: Mgr. Lenka Laštovičková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Inhibitory effect of zopolrestat, VE-821 and berzosertib on the activity of selected reductases from the AKR and SDR superfamilies in vitro.

Increased activity of carbonyl-reducing enzymes (CRE) of the aldo-keto-reductase (AKR) and short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamilies is often associated with the development of some cancers. These enzymes are often overexpressed in these cancer tissues, promote their growth, and are largely involved in the deactivation of various cytostatics, including anthracyclines. One of the most widely used representatives of this group is daunorubicin (DAUN), whose metabolic conversion produces a more toxic alcohol metabolite, daunorubicinol (DAUNol), with reduced antitumor activity.

In the in vitro experiments performed in this thesis, the inhibitory effect of three substances (zopolrestat (ZOP), VE-821 and berzosertib) on the activity of selected CREs (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 and CBR1) was investigated. Inhibition of these enzymes leads to a decrease in their activity, and thus to a decrease in the production of the aforementioned metabolite DAUNol. Of the presented compounds, the highest inhibitory effect was observed for ZOP combined with the enzymes AKR1B1 and 1C3. The other two inhibitors did not show a sufficiently large inhibitory potential and therefore they were not included in further experiments. ZOP reduced AKR1B1 activity by 79.9 % at 10 μ M concentration and by 80.7 % at 50 μ M concentration. The activity of AKR1C3 was inhibited by 10 μ M ZOP from 82.7 % and 50 μ M ZOP from 94.6 %. Other kinetic parameters of ZOP were measured for both enzymes, namely, the IC₅₀ of ZOP in

combination with AKR1B1 was $0.63 \pm 0.04 \mu\text{M}$ and K_i was $0.46 \pm 0.16 \mu\text{M}$, and in the case of AKR1C3, the IC_{50} of ZOP was $2.32 \pm 0.26 \mu\text{M}$ and K_i corresponded to $2.32 \pm 0.26 \mu\text{M}$. ZOP exhibited a mixed type of inhibition to both enzymes with a tendency to be non-competitive, and bound to both enzymes irreversibly. ZOP has been described in the literature, and is currently being investigated, as a potent inhibitor of the AKR1B1 enzyme for the treatment of diabetes-related complications. However, the data found in the present study suggest that ZOP inhibits the enzyme AKR1C3 equally effectively. Thus, given the overexpression of AKR1C3 in hormone-dependent tumor tissues, co-administration of the cytostatic DAUN with ZOP could lead to improved safety and success in the treatment of some cancers.

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Teoretická část.....	11
2.1 Akutní myeloidní leukemie.....	11
2.2 Antracyklinová antibiotika.....	12
2.2.1 Daunorubicin.....	13
2.2.2 Mechanismus účinku antracyklinových antibiotik	14
2.2.3 Metabolismus antracyklinových antibiotik v organismu.....	15
2.2.4 Omezení v použití antracyklinových antibiotik.....	16
2.3 Karbonyl redukující enzymy.....	20
2.3.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem.....	21
2.3.1 Aldo-ketoreduktasy	22
2.3.3 Inhibice metabolické přeměny ANT	27
3 Cíl práce	32
4 Praktická část	33
4.1 Chemikálie, pomůcky, přístroje	33
4.1.1 Použité chemikálie a reagenty	33
4.1.2 Pomůcky.....	33
4.1.3 Přístrojové vybavení	34
4.2.1 Základní screening	35
4.2.2 Hodnota IC_{50}	40
4.2.3 Stanovení hodnoty K_i a typu inhibice	41
Hodnota K_i	41
Typ inhibice.....	42
4.2.4 Stanovení pevnosti vazby inhibitoru k enzymu	43
5 Výsledky a diskuse.....	44
5.1 Základní screening	44

5.1.1 AKR1A1.....	44
5.1.2 AKR1B1.....	46
5.1.3 AKR1B10.....	47
5.1.4 AKR1C3.....	49
5.1.5 CBR1.....	50
5.1.3 AKR1C1.....	55
5.1.3 AKR1C2.....	56
5.2 Stanovení hodnoty IC_{50}	57
5.2.1 AKR1B1.....	57
5.2.2 AKR1C3.....	59
5.3 Stanovení hodnoty K_i a typu inhibice.....	62
5.3.1 AKR1B1.....	62
5.3.2 AKR1C3.....	64
5.4 Stanovení pevnosti vazby inhibitoru k enzymu.....	66
5.4.1 AKR1B1.....	66
5.4.2 AKR1C3.....	68
Závěr.....	70
Seznam zkratk.....	72
Použitá literatura.....	75

1 Úvod

Karbonyl redukující enzymy (CRE) tvoří širokou skupinu biotransformačních enzymů vyskytujících se v různých tkáních těla. Jejich strukturní rozmanitost předurčuje i rozdílnost funkční. CRE ovlivňují nejen fyziologické pochody v organismu, ale pomáhají mu zbavit se i cizorodých látek. Jejich působení nemusí být vždy pro tělo pozitivní a někdy mohou být příčinou rozvoje některých nádorových onemocnění, především díky deaktivaci určitých léčiv snižující úspěšnost zavedené terapie.

Mezi významné substráty těchto enzymů patří i jedny z neúčinnějších protinádorových léčiv, antracyklinová antibiotika. Ta jsou známa již od druhé poloviny minulého století a používají se v léčbě nádorů jak pevných tkání (tzv. solidních nádorů), tak i nádorů krve. Daunorubicin (DAUN) je jedním z nejvíce používaných antracyklinů (ANT) s hlavní indikací v terapii akutní myeloidní leukemie (AML). Antineoplastický účinek těchto látek však může být po jejich podání snížen např. výše zmíněnými CRE, které převádějí původní léčivo na alkoholový metabolit. Ten vykazuje nižší cytotoxickou účinnost na nádorové buňky, a také zvýšení výskytu nežádoucích účinků ANT, zejména toxické působení na srdeční tkáň. Nádorové buňky jsou typicky vybaveny ochrannými mechanismy vůči cytostatikům, jako je nadměrná exprese metabolizujících proteinů, nebo tzv. efluxních transportérů situovaných na povrchu buněk pro vypuzování léčiv z vnitřního prostředí buňky ven. Tyto procesy tedy výrazně komplikují dosažení terapeutických cílů jak přítomností vyšší toxicity na organismus, tak rozvojem lékové rezistence.

Z logiky věci se tak nabízí jedno z možných řešení uvedených problémů prostřednictvím inhibice obranných mechanismů nádorových buněk. V této práci jsme se konkrétně věnovali vlivu tří vybraných inhibitorů (INH) zopolrestatu (ZOP), VE-821 a berzosertibu (BER) na aktivitu enzymů z nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) na úrovni *in vitro*. Substrátem daných reakcí byl DAUN a účinnost vybraných INH byla měřena podle vyprodukovaného množství alkoholového metabolitu. Snažili jsme se tedy zjistit, zda některá z těchto látek může snižovat tvorbu nežádoucích produktů enzymové konverze ANT, a být tak potenciálně variantou pro kombinační terapii některých nádorových onemocnění s ANT.

2 Teoretická část

2.1 Akutní myeloidní leukemie

AML označuje různorodou skupinu nádorových onemocnění krvinek. Za jejich vznikem stojí zhoubné přeměny hematopoetických kmenových buněk myeloidní řady v kostní dřeni. Zde se tyto nezralé, nádorově změněné kmenové buňky, tzv. blasty, nekontrolovaně množí, a jsou následně vyplavovány do krevního řečiště. Masivní proliferací utlačují ostatní zdravé buňky a zabraňují i tvorbě nových, plně vyvinutých buněk. Dochází tím ke snížení počtu krevních elementů a současně i jejich funkcí. (Bloomfield et al. 2008, Buliková et al. 2013). U pacientů se tyto stavy mohou projevit vyšší náchylností k nejrůznějším infekcím a zvětšením mízních uzlin, signalizujících poruchu funkce leukocytů. Nedostatek červených krvinek vede ke zvýšené únavě, dušnosti, závratím nebo bledosti kůže. Častější krvácení např. z nosu, dásní nebo charakteristická kožní tečkovitá případně splývavá krvácení, jsou příznaky související s poruchou trombocytů. Ovlivněno bývá i termoregulační centrum těla a pacienti pak trpí horečkami překračujícími 38 °C, silným nočním pocením nebo ubýváním na váze. Může dojít také k poškození vnitřních orgánů těla jako jsou játra, plíce či ledviny (Doubek a Vorlíček 2006).

AML je nejčastější formou akutních leukemií u dospělých, s poměrně špatnou prognózou. Ta se liší od stádia nemoci i věku pacienta. Některé zdroje uvádí celkové pětileté přežití okolo 50 % u mladších pacientů, v případě pacientů starších 60 let poté celkové pětileté přežití klesá k méně než 10 %. (Shimony et al. 2023). Neléčená AML pak může vést k úmrtí v rámci několika týdnů či dnů (Tallman et al. 2005).

Terapie AML je náročný proces, kterému předchází důkladné zvážení všech osobních i rizikových faktorů ze stran pacienta (věk, přidružená onemocnění, anamnézy), ale i faktorů samotného onemocnění. Léčebné přístupy AML zahrnují v tzv. kurativním režimu intenzivní chemoterapii, cílené léky i transplantaci kostní dřeni. V neintenzivním, paliativním přístupu se pak uplatňují nízkodávková léčebná schémata cytarabinu a nejlepší podpurná péče, kam spadá podávání infuzí, řešení infekčních komplikací nebo cytoredukce kyselinou močovou. Při zařazení pacientů do klinických studií jim mohou být podávána nově vyvinutá léčiva představující další naději po selhání či intoleranci konvenčních přístupů (Buliková et al. 2013).

Standardem tzv. indukční léčby AML je kombinace antracyklinového antibiotika, nejčastěji DAUN, s antineoplastickým antimetabolitem cytarabinem. Cílem této léčebné strategie je dosažení normálních hladin krevních elementů a obnovení jejich funkcí. Využívá se zde systém 3 + 7, kdy je DAUN podáván v dávce 60–90 mg/m² jednou denně v podobě krátké infuze během prvních či posledních 3 dnů cyklu. Cytarabin je ve formě 24hodinové infuze v dávce 100–200 mg/m² aplikován po dobu 7 dnů. Pacienti jsou v tomto stádiu vždy hospitalizováni, a po dosažení remise onemocnění následují cykly udržovací terapie či transplantace kostní dřeně (Tallman et al. 2005).

Cytarabin je protinádorové léčivo působící skrze inkorporaci do DNA, čímž může ovlivňovat buněčný cyklus. Dále inhibuje také syntézu glykoproteinů a glykolipidů, což se projeví změnou struktury a permeability membrán, indukuje programovanou buněčnou smrt (Bashir et al. 2015). DAUN rovněž nespecificky poškozuje genetickou informaci buněk jak nádorových, tak zdravých tkání. Tyto účinky limitují jejich použití z pohledu systémové toxicity. Léčba AML je navíc obecně ztížena poměrně velkou genetickou variabilitou nádorových buněk vedoucí k rozvoji rezistence onemocnění vůči podaným léčivům. Proto se neustále vyvíjí nové látky a postupy umožňující efektivnější a bezpečnější terapii (Khanim et al. 2009). Jedním z možných přístupů by mohlo být např. použití inhibitorů antiapoptotického proteinu BCL-2. U pacientů s AML bývá tento protein nadměrně exprimován, což souvisí také se zvýšenou odolností nádorových buněk vůči cytostatikům. Příkladem inhibitoru BCL-2 může být látka venetoclax vykazující v rámci klinických studií velmi slibné účinky u pacientů s refrakterní či relabující AML (Konopleva et al. 2016). V klinických studiích jsou dále sledovány také některé humanizované monoklonální protilátky nebo hypometylační látky, jako azacitidin. Ten působí na abnormální hematopoetické buňky v kostní dřeni, zasahuje do celistvosti DNA a průběhu buněčného cyklu (Dombret et al. 2015).

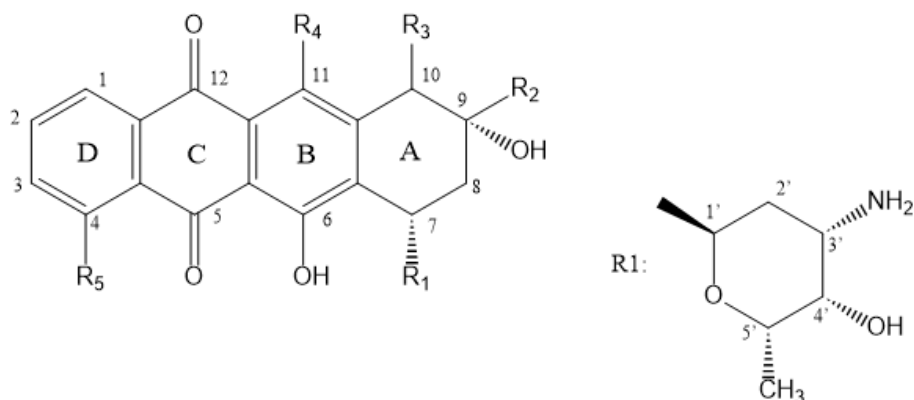
2.2 Antracyklinová antibiotika

ANT se řadí mezi jedny z nejúčinnějších protinádorových léčiv (Minotti et al. 2004). Byly objeveny v polovině 20. století po izolaci produktů sekundárního metabolismu půdních bakterií kmene *Streptomyces* (McGowan 2017). Prvním rozpoznaným antracyklinovým antibiotikem byl rhodomycin A, izolovaný v roce 1951 z bakterie *Streptomyces griseus*. V 60. letech poté následoval objev DAUN, získaného z druhu *Streptomyces peucetius*, a doxorubicinu (DOX), jako produktu mutantního kmene té samé bakterie. V dnešní době existuje již okolo 2 000 zástupců této skupiny

léčiv, kdy se jednotlivé deriváty připravují chemickými obměnami původních struktur, anebo přímo pomocí tzv. kombinatorní biosyntézy. V praxi se pak nejčastěji vedle DAUN a DOX využívají epirubicin (EPI) a idarubicin (IDA) (Bayles et al. 2022, McGowan 2017).

ANT mají americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schváleny indikace v terapii solidních nádorů i hematologických malignit dětí a dospělých (Mo et al. 2023). Světová zdravotnická organizace (WHO) některé z nich rovněž vede ve Vzorovém seznamu nezbytných (nepostradatelných) léčiv (WHO 2024).

Společným základem chemické struktury ANT je aglykonový lineární tetracyklický 7,8,9,10-tetrahydro-5,12-naftacenoquinonový skelet. K polyhydroxyantrachinovému celku, sestávajícího z kruhů B, C a D, je připojen nasycený kruh A. V poloze 7 se nachází nejčastěji cukerný zbytek, daunosamin. Díky obsaženým chirálním centřům jsou ANT opticky aktivní látky. Konjugovaný systém dvojných vazeb ve struktuře jim zase propůjčuje charakteristické žlutočervené nebo červené zbarvení (McGowan et al 2017, Mattioli et al. 2023).



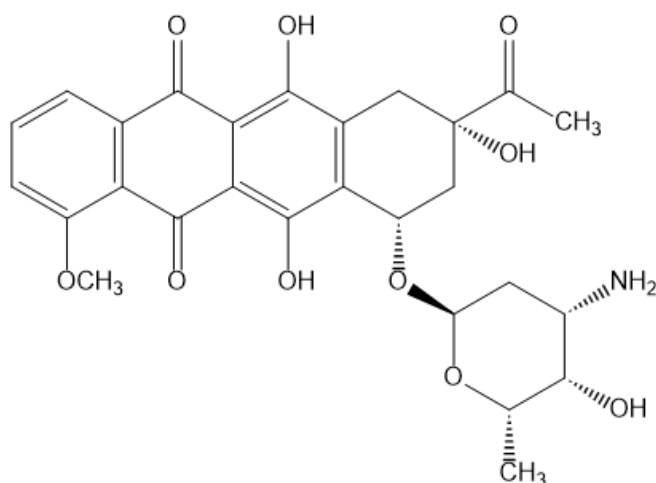
Obr. 1: Obecná struktura antracyklinových antibiotik

2.2.1 Daunorubicin

DAUN je přírodní látkou získávanou fermentačními procesy z bakterie *Streptomyces peucetius*. Jde o látku se sumárním vzorcem $C_{27}H_{29}NO_{10}$, dostupnou ve formě oranžovočerveného prášku k přípravě roztoku, nebo již připraveného roztoku.

V kombinaci s dalším cytotoxickým činidlem (např. cytarabinem) představuje jedno z hlavních léčiv v terapii akutních forem leukemií. FDA schválil použití DAUN k navození remise u akutní nelymfocytární (konkrétně myeloidní, monocytární a erytrocytární) leukemie u dospělých, dále u akutní lymfocytární leukemie u dospělých i

děti (National Library of Medicine 2024). Off-label se také používají liposomální formy DAUN v kombinaci s antiretrovirovou terapií, jako lék první volby v terapii Kaposiho sarkomu spojeného s těžšími stadii syndromu získané imunodeficiency (AIDS) (Petre a Dittmer 2007). Podávání smí být pouze injekční cestou, a sice intravenózně rychle proudící infuzí. Aplikace do svalu nebo podkoží by totiž mohla způsobit nekrotické poškození dané tkáně (Saleem a Kasi 2020, Mayer et al. 2019, DrugBank 2024).



Obr. 2: Chemická struktura DAUN

2.2.2 Mechanismus účinku antracyklinových antibiotik

Přesný mechanismus účinku ANT dosud není plně objasněn, předpokládá se ovšem jejich multifaktoriální působení. Jedním z nich je schopnost produkce tzv. volných radikálů. Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS), např. superoxid anion radikál ($O_2^{\cdot-}$) nebo peroxid vodíku (H_2O_2), mohou za normálních okolností vystupovat jako přirozené signální molekuly. Pokud se však v organismu vyskytují ve větším množství, mohou patologicky reagovat s buněčnými makromolekulami (např. s nukleovými kyselinami, proteiny) či s biologickými membránami a způsobit jejich poškození nebo vyvolat buněčnou smrt (Berthiaume a Wallace 2006, McGowan et al. 2017).

Vlákná deoxyribonukleové kyseliny (DNA) mohou ANT ovlivňovat i na jiných úrovních. Dokážou se s velkou afinitou vmezeřit mezi nukleové báze DNA a způsobit změny v její struktuře, zlomy vláken a znemožnit průběh replikace, transkripce DNA a ostatních fází buněčného cyklu. Tím mohou zabránit syntéze DNA i ribonukleové kyseliny (RNA), proteosyntéze i růstu a dělení takové buňky. Poškozením DNA se

rovněž aktivují ochranné apoptotické mechanismy (McGowan et al. 2017, van der Zanden et al. 2020).

Jedním z nejvýznamnějších mechanismů působení ANT je inhibice enzymu topoizomerasy II (TopII). Ten v buňce za normálního stavu zajišťuje opravu DNA, rozpojením obou vláken dvoušroubovice DNA umožní replikaci, přepis genetické informace a poté rozštěpená vlákna opět spojí. Činností ANT je aktivita enzymu, a tedy všech zmíněných procesů, znemožněna. TopII má 2 izoformy, α a β . Protinádorový účinek ANT je uplatněn inhibicí izoformy TopII α , která je nejčastější, vyskytuje se v proliferativních maligních i nemaligních buňkách a její množství kolísá v průběhu buněčného cyklu. V případě TopII β jde o relativně konstantní hladiny enzymu vyskytujícího se u lidí zejména ve zdravých buňkách (např. v myokardu). Inhibice tohoto typu TopII může v důsledku souviset s manifestací nežádoucích účinků (Marinello et al. 2018, Mattioli et al. 2023).

Žádným z uvedených mechanismů ovšem ANT nepůsobí specificky pouze na rakovinné buňky, dochází současně k poškození i zdravých buněk organismu.

2.2.3 Metabolismus antracyklinových antibiotik v organismu

Všechny látky, které v těle nemají fyziologické funkce, jsou označovány jako xenobiotika. Mohou to být syntetická léčiva i přírodní látky, všechny se nakonec ale organismus snaží z těla odstranit. Využívá k tomu transportní proteiny, přenášející xenobiotika skrze membrány jednotlivých kompartmentů, nebo tzv. biotransformační enzymy. Ty mají za úkol, změnou chemické struktury, omezit další distribuci xenobiotik, jejich interakce, a vytvořit z nich více polární látky, tedy lépe rozpustné ve vodném prostředí. Urychlí tak eliminaci cizích látek z těla. V první fázi biotransformačních procesů rozlišujeme oxidační (nejčastější), redukční nebo hydrolytické chemické reakce. Dochází při nich k odkrytí anebo zavedení polární funkční skupiny na strukturu léčiva. Ve druhé fázi jsou pak tyto připravené skupiny konjugovány s molekulami tělu vlastními, např. s kyselina glukuronovou, sulfátem nebo glutathionem (Skálová et al. 2017).

Metabolismus ANT v organismu přímo souvisí s pochopením jejich kardiotoxického účinku. Jedná se o dvouelektronovou redukci, jednoelektronovou redukci a deglykosylaci.

Dvouelektronová redukce spočívá v přeměně karbonylové skupiny na uhlíku číslo 13 prostřednictvím široce distribuovaných cytoplazmatických enzymů AKR. Ty ke své činnosti vyžadují přítomnost nikotiamid adenindinukleotidů, NADH a NADPH, jako koenzymů přenášejících elektrony. Produktem této přeměny je sekundární alkohol, např. od DAUN je to daunorubicinol (DAUNol). Tyto metabolity disponují nižší antineoplastickou aktivitou a jsou zároveň více polární oproti původním strukturám. Díky tomu se mohou déle kumulovat v srdci a podporovat kardiotoxicitu (Salvatorelli et al. 2006, Mattioli et al. 2023).

Jednoelektronová redukce je opět NAD(P)H-dependentní. Chinonová část ANT v kruhu C elektron přijímá za tvorby nestabilního semichinonového radikálu. Ve snaze o opětovnou stabilizaci původní struktury ANT redukuje svůj kyslík, čímž vzniká vysoce reaktivní $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Salvatorelli et al. 2006).

Redukční deglykosylace představuje minoritní metabolickou přeměnu ANT. Výsledkem reakce katalyzované NADPH-dependentními glykosidasami ale vznikají více lipofilní deoxyaglykony, které se mohou oproti nemetabolizované variantě více hromadit v membránách mitochondrií (Salvatorelli et al. 2006, Mele et al. 2016).

2.2.4 Omezení v použití antracyklinových antibiotik

S podáváním protinádorových léčiv se často pojí výskyt různě závažných nežádoucích účinků. K těm nejčastějším řadíme nevolnost, zvracení, průjem či zácpu, negativní ovlivnění růstu a struktury vlasů, kůže a nehtů. Může také dojít k postižení krvetvorby, projevující se např. anemií, zvýšeným rizikem krvácení či snížením funkce imunitního systému (Groopman a Itri 1999). V případě ANT je pak velká pozornost věnována zejména toxickému působení na srdeční tkáň, které může vést ke kardiomyopatiím a městnavému selhání srdce (Puma et al. 2008).

Dalším problémem léčby pomocí ANT je, vedle přímého poškození pacienta, odolnost nádorových buněk a selhání terapie (Martins-Teixeira a Carvalho 2020).

2.2.4.1 Kardiotoxicita

Kardiotoxicita se může u pacientů projevovat neobvyklými změnami na EKG, hypotenzí, myokarditidou, infarktem myokardu nebo až srdečním selháním (Giantris et al. 1998). Na její rozvoj má vliv např. věk (zejména malé děti nebo senioři), pohlaví, jiné již

přítomné srdeční onemocnění, Downův syndrom nebo expozice dalšímu kardiotoxickému léčivu (Puma et al. 2008).

Jedná se také o toxicitu závislou na délce léčby a celkové (kumulativní) dávce podaného léčiva. Ta se liší u jednotlivých pacientů i u jednotlivých zástupců ANT, přičemž riziko poškození srdce vzrůstá se zvyšující se dávkou. Např. kumulativní celoživotní dávka (KCD) DOX 350 mg/m² souvisí s 18% rizikem rozvoje srdeční nedostatečnosti, kdežto KCD DOX 550 mg/m² byla spojena již s 65% rizikem. V případě EPI, analogu DOX s nižší kardiotoxicitou v ekvivalentních dávkách, se KCD pohybuje až v hodnotách okolo 800 mg/m². Díky této skutečnosti lze pomocí EPI vykonat i více cyklů léčby než DOX (Ryberg et al. 2008). U DAUN je KCD stanovena na 550 mg/m² (Edwardson et al. 2015).

Poškození srdeční tkáně mohou ANT způsobit několika různými mechanismy. Jedná se o složitý, komplexní sled dějů, který dosud není stále zcela pochopen (Gianni et al. 2011, Chen et al. 2007).

Z historického pohledu byla vždy nejvíce přijímaná teorie tvorby volných radikálů (Mele et al. 2016). ANT mohou tvořit volné radikály jednak skrze enzymatické pochody redukčních přeměn, popsáno v kapitole 2.2.3 *Metabolismus ANT v organismu*, tak i neenzymatickou cestou, a sice díky velké afinitě struktury alkoholových metabolitů k železitým iontům. Tyto komplexy ANT alkoholů s železitými ionty poté mohou produkovat silné železnaté radikály, které po kontaktu s molekulárním kyslíkem v kaskádě zase vytvoří superoxidový radikál. Oxidační stres, jako důsledek nadměrné syntézy ROS k nedostatečnému množství antioxidačních obranných systémů, souvisí s tzv. peroxidací lipidů a poškozením buněčných membrán, dochází k poškození DNA, signálních drah a aktivaci programované buněčné smrti (Horenstein et al. 2000, Sawyer et al. 1999). Např. DOX je navíc schopen inaktivovat enzymy glutathion peroxidasu, konvertující H₂O₂ na molekuly vody, a superoxidodismutasu, přeměňující superoxidový radikál na H₂O₂ (Minotti et al. 2004).

Alkoholové metabolity ANT ovlivňují i metabolismus Ca²⁺ iontů v buňkách. Mohou inhibovat iontové výměnné kanály a intracelulárně kumulovat Ca²⁺, dále způsobují změny genů kódujících proteiny zodpovědné za ukládání vápníku. Přerušením fyziologické výměny iontů nepříznivě ovlivňují kontraktilitu srdce, vysoké hladiny

vápníku v buňce mohou opět vést k aktivaci buněčné smrti (Olson et al. 1988, Boucek, jr. 1987).

V mitochondriální membráně je obsažen fosfolipid kardiolipin, ke kterému se ANT váží s neobyčejně velkou afinitou. Takto mohou pasivní difuzí prostupovat membránou mitochondrií a kumulovat se uvnitř organely. Následně narušují dýchací řetězec, tedy i produkci energie ATP. Zasahují také do mitochondriální genetické informace (Tewey et al. 1984).

Další mechanismus kardiotoxicity souvisí s inhibicí enzymu TopII β , a poškozením vláken dvoušroubovice DNA v klidových buňkách myokardu. To má za následek dvouřetězcové zlomy DNA, poškození mitochondriální biogeneze a tvorbu ROS (Zhang et al. 2012, Puchnerová 2016).

Přístupy v ochraně pacientů před toxickým působením ANT na srdce zahrnují např. omezení kumulativní dávky, nebo kontinuální podávání ANT pomalu proudící infuzí namísto bolusových dávek. Bylo takto popsáno snížení akutní toxicity u dospělých (Wouters et al. 2015), u dětí se ovšem tento efekt neprojevil (Lipshultz et al. 2012). Využívají se rovněž tzv. lipozomální lékové formy, kdy je ANT zapouzdřen v molekulách lipozomů. Takové systémy umožňují cílenou distribuci léčiva do požadovaných tkání (targeting), charakteristické jsou také např. nižším distribučním objemem, delším biologickým poločasem a delším setrváním v cílové oblasti. ANT v této podobě také méně podléhají metabolickým přeměnám na své toxičtější produkty, mohou částečně obcházet nádorovou rezistenci zprostředkovanou P-glykoproteiny či se výrazně méně kumulovat ve zdravých buňkách (Minotti et al. 2004, Zhang et al. 2016). Je možné použít také analogy ANT s nižší kardiotoxicitou, například EPI (McGowan 2017 Wouters et al. 2015). Potenciální řešení těchto problémů představuje i stále probíhající výzkum látek inhibujících enzymy nadrodiin AKR či SDR, které produkují toxičtější a méně účinné metabolity ANT (Piska et al. 2017).

Při terapii ANT byl pozorován pozitivní vliv podávání antioxidantů, jako např. vitamínu A, E, C, selenu nebo karnitinu (Quiles et al. 2002, McGowan 2017). V dnešní době existuje pouze jedna látka schválená FDA pro prevenci kardiotoxicity při podávání ANT, a tou je derivát ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), dexrazoxan. Ochranný účinek tkání před působením ANT se připisuje jeho antioxidačním vlastnostem, kdy je schopen vychytávat železo, a tím minimalizovat vznik a reakce volných radikálů

(Doroshov 2012). Byla popsána také schopnost dexrazoxanu inhibovat enzym TopII β v kardiomyocytech, a soutěžit tak s ANT o vazebné místo (Lyu et al. 2007). I přes kardioprotektivní vlastnosti se dnes již dexrazoxan nedoporučuje podávat v pediatrii kvůli riziku vzniku sekundárních maligních nádorů (Zhang et al. 2016).

2.2.4.2 Rezistence

Rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům je jednou z nejčastějších příčin selhání chemoterapie. Některé typy rakoviny jsou zpočátku k terapii citlivé, časem si buňky ovšem vyvinou odolnost skrze různé mechanismy (Housman et al. 2014, Holohan et al. 2013).

Buňky jsou schopné ovlivnit aktivitu či expresi nejrůznějších signálních, biotransformačních nebo efluxních proteinů, čímž mohou zabránit programované buněčné smrti, podpořit degradaci a inaktivaci léčiv, anebo korigovat množství antineoplastik uvnitř buňky. Dále mohou také urychlit procesy opravy DNA (Nielsen et al. 1996), či zvýšit ochranu proti oxidačnímu stresu vyvolaného působením ANT (Nitiss a Beck 1996).

Eliminaci programované buněčné smrti mohou buňky zajistit snížením exprese např. jaderného proapoptického signálního proteinu p53, anebo enzymu TopII. Díky nižším koncentracím TopII buňka vytváří méně komplexů Top-DNA, dochází k redukcí signálů o poškození genetické informace, tím pádem je redukována i apoptotická odpověď (Nitiss a Beck 1996).

Rezistentní nádorové buňky se typicky vyznačují i nadměrně exprimovanými biotransformačními enzymy, které zasahují do metabolismu cytostatik. V případě ANT jde zejména o CRE z nadrodin AKR a SDR, které ANT degradují na méně účinné a více toxické metabolity (Piska et al 2017, Heibein et al. 2012). Kombinace ANT s jinými látkami, které nežádoucím přeměnám zabraňují, nebo je snižují, je jedním z přístupů překonávání ANT rezistence. Mezi tyto kombinační látky patří např. inhibitory metabolizujících enzymů ze skupiny CRE (Byrns et al. 2008).

Pojmem mnohočetná léková rezistence se označuje schopnost rakovinných buněk odolávat působení protinádorových léčiv různých tříd (Holohan et al. 2013). Na povrchu těchto buněk jsou oproti zdravým buňkám ve velkém množství přítomny tzv. efluxní transportéry z nadrodiny ABC (ATP-binding cassette). Nejvýznamnějšími

zástupci z této nadrodiny jsou ABCB1 neboli P-glykoprotein (P-gp), dále transportér ABCC1, známý jako protein multilékové rezistence (MRP1), a také ABCG2 neboli protein rezistence rakoviny prsu (BCRP). Jsou výrazně exprimované ve střevech, játrech a ledvinách, a mají zásadní význam v ochraně buněk před toxickými látkami, kdy aktivně přenášejí xenobiotika z cytosolu buněk ven. Tím snižují intracelulární koncentrace léčiv, a tedy i účinnost terapie (Sarkadi et al. 2006, Linton 2007). Pro řešení tohoto mechanismu rezistence nádorových buněk byly navrženy a zkoumány monoklonální protilátky inhibující efluxní transportér P-gp (Li et al. 2016).

V praxi se uplatňují i další strategie k překonání ANT rezistence. Jednou z nich jsou lipozomální formulace léčivých přípravků a nanočásticové systémy. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, pozitivně ovlivňují celkový farmakoterapeutický profil léčiv s uplatněním i v této problematice (Li et al. 2016). Výzkum se nadále zabývá např. i možnostmi využití nekódující miRNA (mikroRNA) a siRNA (short interfering RNA) v inhibici exprese proteinů v rámci posttranskripčních úprav. Tím by bylo například možné snížit syntézu efluxních proteinů na povrchu nádorových buněk (Li et al. 2016).

2.3 Karbonyl redukující enzymy

Z výše uvedeného vyplývá, že CRE sehrávají zásadní roli v metabolismu ANT. Převádějí obecně aldehydové a ketonové skupiny jak endogenních látek, tak nejrůznějších xenobiotik, na více polární hydroxy skupiny za vzniku alkoholových metabolitů původních struktur. Ketony mohou být redukovány pouze CRE, a to na sekundární alkoholy, u aldehydů mohou nastat dvě situace. Oxidačními procesy, zprostředkovanými např. enzymem aldehyddehydrogenasou, se z nich stanou odpovídající karboxylové kyseliny. Činností redukčního enzymu, např. aldehydreduktasy, poté vznikají primární alkoholy. CRE metabolizují také chinonové seskupení buď jedoelektronovou redukcí na reaktivní semichinon radikál, nebo dvoelektronovou redukcí až na hydrochinon. Účinek proteinů těchto transformačních a detoxikačních drah je závislý na přítomnosti regeneračních kofaktorů NAD(P)(H) (Maser 1995).

Reduktasy nalezneme ve třech velkých nadrodinách, a to v nadrodinách AKR, SDR nebo nadrodině dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (medium-chain dehydrogenases/reductases, MDR) (Maser 1995). Enzymy z nadrodiny MDR vykazují především dehydrogenační aktivitu, a protože žádná reduktasa, která by se

účastnila metabolismu ANT, nebyla dosud popsána, nebudeme se dále touto nadrodinou enzymů zabývat.

2.3.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

SDR se řadí se mezi jedny z nejpočetnějších enzymových nadrodin, která zahrnuje více než 500 000 členů (Demange et al. 2022). Jednotlivé proteiny se vyznačují velkou strukturální různorodostí. Kromě společného sekvenčního základu, který definuje vazebné místo kofaktoru a katalytickou tetradu, sdílí často méně než 15–30 % aminokyselinové sekvence (Bray et al. 2009). Jsou to enzymy přítomné ve všech živých organismech, u lidí bylo objeveno přes 82 SDR genů kódujících tyto proteiny (Kallberg et al. 2002). Exprimovány jsou ve většině tkáních lidského těla, v rámci buňky se pak nejvíce vyskytují v cytosolu, některé také v mitochondriální matrix, peroxisomech nebo endoplazmatickém retikulu (Rosemond a Walsh 2004, Bhatia et al. 2015).

Fyziologickou úlohou SDR je metabolismus jak endogenních struktur (např. prostaglandinů (PG), retinoidů, steroidních hormonů a lipidů), tak také různých xenobiotik včetně léčiv a kancerogenů (Persson et al. 2009). Opět se jedná o NAD(P)(H)-dependentní enzymy.

V názvech enzymů této nadrodiny se vždy objevuje základ „SDR“ označující dehydrogenasy/reduktázy s krátkým řetězcem. Následuje arabská číslice 1–48, která zařazuje protein do jedné ze 48 známých lidských SDR. Velké písmeno popisuje jeden ze 7 typů SDR enzymů, a sice „Classic“ (C), „Extended“ (E), „Atypical“ (A), „Intermediate“ (I), „Divergent“ (D), „Complex“ (X) a „Unknown“ (U). U člověka se takřka výhradně nachází typy „Classic“ a „Extended“ (Persson et al. 2009).

Mezi nejlépe charakterizované SDR patří 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 β -HSD1) a karbonylreduktasa 1 (CBR1) (Bray et al. 2009). Právě poslední zmíněná SDR byla součástí našich experimentů, protože se prokazatelně účastní metabolismu DAUN.

2.3.2.1 CBR1

CBR1, dle přesné nomenklatury SDR21C, je monomerní, NAD(P)(H)-dependentní cytosolický enzym. Vyskytuje se významně v orgánech a tkáních, které jsou v blízkém kontaktu s exogenními látkami. Nejvyšší hladiny byly zjištěny v játrech,

žaludku, tenkém střevě, ledvinách, vlákněch hladkého svalstva, cévách a srdečním svalu, nebo také v centrální nervové soustavě (Škarydová a Wsól 2011, Forrest and Gonzales 2000).

CBR1 katalyzuje dvouelektronovou redukci biologicky i farmakologicky aktivních karbonylových sloučenin (Forrest and Gonzales 2000). Nejčastějšími endogenními substráty enzymu CBR1 mohou být *p*- či *o*-chinony, např. vitamín K, tokoferolchinon (vitamin E) či ubichinon (koenzym Q). Typicky jsou takto metabolizovány také PG, ketosteroidy nebo isatin (Matsunaga et al. 2006).

Ubichinon je základním prvkem mitochondriálního dýchacího řetězce a v redukované formě disponuje antioxidační aktivitou. Vitamin E je rovněž antioxidant chránící fosfolipidové membrány před peroxidací lipidů. CBR1 dále pomáhá korigovat oxidační stres a zabraňuje poškození buněčných struktur a DNA snížením aktivity reaktivních lipidových aldehydů, např. 4-oxonon-2-enalu nebo akroleinu (Jang et al. 2012).

Redukcí PGE₂ na méně aktivní formu, PGE_{2α}, reguluje stavy spojené se zvýšenou teplotou nebo horečkou a zánětem (Ivanov et al. 2003).

Z pohledu xenobiotik jsou pak tímto enzymem často redukovány např. antracykliny DAUN nebo DOX, antipsychotikum haloperidol nebo antikoagulancium warfarin (Matsunaga et al. 2006). Dalším substrátem může být 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon. Tato látka je potenciálním kancerogenem a je přítomná v tabáku a tabákovém kouři. Prostřednictvím CBR1 vzniká ještě více kancerogenní butanolový produkt (Matsunaga et al. 2006).

2.3.1 Aldo-ketoreduktasy

AKR jsou oxidoredukční, převážně cytosolické enzymy přítomné u všech rostlin a živočichů, byly nalezeny také u velkého množství mikroorganismů. V lidském těle byla nejvyšší aktivita AKR pozorována v cytosolu buněk dvou nejvýznamnějších eliminačních orgánů, a sice v játrech a ledvinách. Jedná se o enzymy s nízkou substrátovou specifitou, v jedné buňce se navíc typicky vyskytuje více AKR zároveň (Ellis 2002). AKR jsou nejčastěji monomerní proteiny, výjimku tvorby multimerů známe pouze u zástupců rodin AKR2, AKR6 a AKR7 (Mindnich a Penning 2009).

Substráty AKR mohou být např. cukerné aldehydy, keto-steroidní látky, keto-PG, finální produkty glykosylace, produkty peroxidace lipidů, chemické kancerogeny, aflatoxinové dialdehydy a další látky znečišťující životní prostředí (Ellis 2002, Penning 2014).

Názvosloví těchto enzymů se odvíjí od vzájemné podobnosti struktury a pořadí aminokyselin jednotlivých zástupců. Základ názvu „AKR“ pro aldo-ketoreduktasu je následovaný arabskou číslicí, která zařazuje zástupce do konkrétních rodin (1–16). V jedné rodině jsou enzymy, které mají podobnost sekvence aminokyselin s ostatními rodinami menší než 40 %. Další velké písmeno v názvu popisuje podrodinu enzymů, mezi kterými je shoda sekvence ≥ 60 %. Poslední arabská číslice pak představuje unikátní proteinovou sekvenci pro konkrétní enzym (Hyndman et al. 2003). Celkově bylo více než 190 AKR zařazeno do 16 rodin, které se díky různému rozložení aminokyselin liší také různou substrátovou specifitou a kinetikou. U lidí se vyskytuje 15 AKR, a to z rodin AKR1, AKR6 a AKR7 (Penning 2015).

V naší práci jsme se konkrétně věnovali enzymům AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C1, 1C2 a 1C3, které mají prokazatelnou aktivitu v metabolismu DAUN.

Činnost AKR může kromě fyziologických procesů navozovat či podporovat také různé nepříznivé stavy v organismu. Proto se velká pozornost soustředí k výzkumu a vývoji selektivních inhibitorů těchto enzymů, jakožto potenciálních léčiv. Roli v této problematice sehrávají také přirozené mutace lidských AKR, opět související s rozvojem různých onemocnění nebo rezistencí buněk vůči léčbě (Penning 2015).

2.3.1.1 AKR1A1 (aldehydoreduktasa)

V souvislosti s objevem biosyntézy kyseliny askorbové byla identifikována jedna z prvních AKR, AKR1A1. Je to monomerní, cytosolická, NADPH-dependentní oxidoreduktasa s širokou substrátovou aktivitou. Vyskytuje se ve všech tkáních lidského těla, nejvíce je však exprimována v játrech a v proximálním tubulu ledvin, vyšší hladiny můžeme najít také v mozku (Barski et al. 2008, Alzee a Ellis 2014).

Metabolizuje karboxylové skupiny sloučenin s negativním nábojem, alifatické, aromatické nebo steroidní aldehydy na příslušné alkoholy (Barski et al. 2008). Účastní se rovněž endogenní syntézy triacylglycerolů a cholesterolu pomocí redukce D-glyceraldehydu na glycerol a mevaldátu na kyselinu mevalonovou (Kim et al. 2012,

Palackal et al. 2001). AKR1A1 se spolu s CBR1 považují za hlavní enzymy metabolismu ANT v srdci (Pirolli et al. 2012).

2.3.1.2 AKR1B1 (aldosareduktasa)

AKR1B1, známá také jako aldosařduktasa, je opět monomerní cytosolický enzym. Její zásadní funkce spočívá v redukci aldehydů na příslušné alkoholy, přičemž spotřebovává koenzym NADPH a přeměňuje jej na NADP⁺.

V prvním kroku tzv. polyolové dráhy uplatňuje zmíněný mechanismus u přeměny glukosy (Glc) na sorbitol. Ve zdravém prostředí jde o detoxikaci reaktivních aldehydů, u hyperglykemického stavu diabetických pacientů však dochází činností AKR1B1 ke zvýšené konverzi Glc za vzniku velkého množství sorbitolu. Sorbitol poté prostupuje do tkání, osmotickou aktivitou způsobuje edémy a následnou přeměnou se z něj stává až fruktosa. Obě tyto látky mohou zvyšovat vznik ROS a vzhledem k nadměrné spotřebě NADPH dochází zároveň k nedostatečné regeneraci antioxidačního faktoru glutathionu. Organismus se pak obtížně brání vůči oxidačnímu stresu, což má za přímý následek výskyt diabetických komplikací, jako např. retinopatie, nefropatie, neuropatie atp. (Khayami et al. 2010, Tang et al 2012). V tomto ohledu se již i v rámci klinických studií prokázaly příznivé účinky některých látek inhibujících činnost AKR1B1. Mezi nimi jsou např. sorbinil, fidarestat nebo zopolrestat (Gabbay 2004).

Další oblastí účinku AKR1B1 je zásah do syntézy PG. Zvýšenou tvorbou PGF_{2α} jsou posíleny zánětlivé pochody v těle, ze kterých může potenciálně plynout i zvýšené riziko kancerogeneze. AKR1B1 je navíc schopná aktivovat nukleární faktor kappa B (NF-κB), čímž může tumorigenicitu některých nádorových onemocnění také podpořit (Khayami et al. 2010, Patel et al. 2018).

Nadměrná exprese enzymu AKR1B1 byla objevena u různých druhů rakovin včetně nádoru prsu, vaječníků, děložního čípku nebo konečníku (Saraswat et al. 2006). V preklinické studii na úrovni in vitro byl podán epalrestat, jako inhibitor AKR1B1, v kombinaci s protinádorovým léčivem DOX. Výsledky ukázaly na ovlivnění nádorových buněk ve smyslu zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M a zvýšení apoptózy (Banala et al. 2019).

2.3.1.3 AKR1B10 (aldosareduktasa tenkého střeva)

Cytosolická AKR1B10 nese označení aldosaředuktasa tenkého střeva. S enzymem AKR1B1 totiž sdílí podobnou aminokyselinovou sekvenci (až ze 71 %), která se propisuje i do podobné substrátové selektivity a citlivosti vůči inhibitorům. Oproti ostatním, takřka všudypřítomným členům nadrodiny AKR, se AKR1B10 vyskytuje zejména v tenkém střevě. V nižších hladinách byla pak také pozorována v tlustém střevě, játrech nebo nadledvinách (Cao et al. 1998, Hyndman a Flynn 1998). Z pohledu patofyziologických stavů organismu je její exprese pozměněná v zánětlivé tkáni, vysoké koncentrace AKR1B10 pak doprovází nádorová onemocnění plic, prsu, jater, kolorektálního karcinomu nebo karcinomu děložního čípku (Liu et al. 2019, Ma et al. 2012). Může tedy potenciálně sloužit jako biomarker některých nádorových onemocnění (Guo et al. 2024).

Substráty enzymu AKR1B10 mohou být endogenní i exogenní aldehydy či ketony, které jsou následně převáděny na odpovídající alkoholy. AKR1B10 se účastní např. metabolismu kyseliny retinové, která je významnou signální molekulou v proliferaci a diferenciaci buněk. Enzym fyziologicky redukuje *all-trans* retinaly na retinoly, ovšem při zvýšené expresi enzymu koncentrace kyseliny výrazně klesá. S tím souvisí i pokles regulačních mechanismů v buňce, což může mít za následek i rozvoj nádorového onemocnění (Gallego et al. 2007). Prokancerogenní vliv AKR1B10 je dále spojen s ovlivněním metabolismu mastných kyselin a lipidů, nebo, podobně jako u AKR1B1, s aktivací drah NF- κ B (Huang et al. 2016). Z exogenních látek AKR1B10 redukuje např. DAUN, nebo dolasetron, používaný k mírnění nevolnosti nebo zvracení po podání chemoterapeutik (Barski et al. 2008).

V jedné *in vitro* studii byla v soubor buněk kolorektálního karcinomu použita siRNA pro potlačení genu kódujícího AKR1B10. Ukázalo se, že tento přístup vedl k zabránění růstu a zpomalení rychlosti tvorby nádorových ložisek (Yan et al. 2007).

2.3.1.4 AKR1C1, 1C2, 1C3

Do podrodiny AKR1C spadají 4 zástupci, AKR1C1 – 1C4. Všechny tyto enzymy se v různé míře vyskytují v játrech, jednotliví zástupci se však liší výskytem v dalších tkáních těla. Vyznačují se velkou strukturální podobností, kdy navzájem sdílí až 86 % shodné sekvence aminokyselin, s čímž souvisí také jejich podobné katalytické vlastnosti včetně substrátové specifity. Přírodními substráty zástupců podrodiny AKR1C jsou PG

a steroidní látky, a na rozdíl od enzymů podrodin AKR1A a AKR1B jsou schopny aldehydicke funkční skupiny látek metabolizovat stejně efektivně, jako ty ketonické (Barski et al. 2008). Všechny tyto enzymy se účastní také biotransformace xenobiotik, např. i DAUN či DOX, a mohou se tedy podílet na snížení účinnosti terapie související s rezistencí a tvorbou toxickejších produktů (Li et al. 2016).

V této diplomové práci jsme z představené podrodiny látek pracovali s enzymy AKR1C1, 1C2 a 1C3, které jsou dále charakterizovány.

Enzymy AKR1C1 a 1C2 se mezi sebou strukturně liší jen v 7 různých aminokyselinách, a jejich strukturální podobnost tak dosahuje 98 % (Li et al. 2016). Největší množství těchto enzymů je krom jaterní tkáně patrné v mléčné žláze, přítomny jsou rovněž u kolorektálního karcinomu nebo ve tkáních hormon-dependentních nádorů, jako je rakovina prsu, endometria nebo prostaty (Zeng et al. 2017).

Významnou úlohou enzymu AKR1C1 je inaktivační redukce hormonu progesteronu na 20 α -hydroxyprogesteron. V případě progesteronu byly prokázány jeho nepostradatelné účinky pro udržení časného těhotenství a snížení signalizace estrogenů u rakoviny děložní sliznice (Zeng et al. 2017). Nižší hladiny AKR1C1 u těhotných žen také vedly k oddálení porodu a prodloužení těhotenství (Barski et al. 2008). AKR1C2 katalyzuje deaktivaci přeměnu 5 α -dihydrotestosteronu na méně účinný 5 α -androstan-3,17-dion a hraje tedy důležitou roli ve vzniku a rozvoji benigní hyperplazie prostaty i rakoviny prostaty (Stanbrough et al. 2006). Je znám mimo jiné i pod označením „protein vázající žlučové kyseliny“, kdy může sloužit jako transportér těchto kyselin v rámci jaterních buněk (Barski et al. 2008).

Enzym AKR1C3 se nejčastěji vyskytuje v játrech, v prostatě nebo prsní tkáni (Jez et al. 1997, Penning et al. 2004). Ve vysokých koncentracích bývá také přítomen u rakoviny prostaty, prsu, dělohy, krve nebo plic. Významnou úlohou AKR1C3 je katalýza syntézy a metabolismu steroidních hormonů a PG, redukuje také další látky s karbonylovými skupinami, včetně xenobiotik (Hofman et al. 2014, Penning et al. 2019).

AKR1C3 je známá i pod několika dalšími názvy, které reflektují její účinky v organismu. Může vystupovat např. jako 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (17 β -HSD) typu 5, která zajišťuje přeměnu jak mužských, tak ženských pohlavních hormonů. Konvertuje Δ^4 -androsten-3,17-dion na testosteron, 5 α -androstan-3,17-dion na 5 α -dihydrotestosteron, dále mění progesteron na 20 α -hydroxyprogesteron a také estron na

17 β -estradiol. Poslední zmíněný hormon vzniká buď přímo touto konverzí, anebo působením enzymu aromatasy z testosteronu. Takto mohou být vytvořeny některé více účinné formy hormonů dostupné androgenovým a estrogenovým receptorům. Aktivací receptorů dochází k podpoře růstu hormon-dependentních nádorových tkání (Hofman et al. 2014, Penning et al. 2019).

Ve funkci tzv. PGF_{2 α} syntasy přeměňuje AKR1C3 PGH₂ na PGF_{2 α} , a také PGD₂ na 11 β -PGF_{2 α} (Khanim et al. 2009). Tyto produkty vykazují pro-proliferativní a prozánětlivé účinky, zvýšenou přeměnou PGD₂ je zároveň snížena koncentrace protizánětlivého a antiproliferačního prostaglandinu J₂ (Desmond et al. 2003).

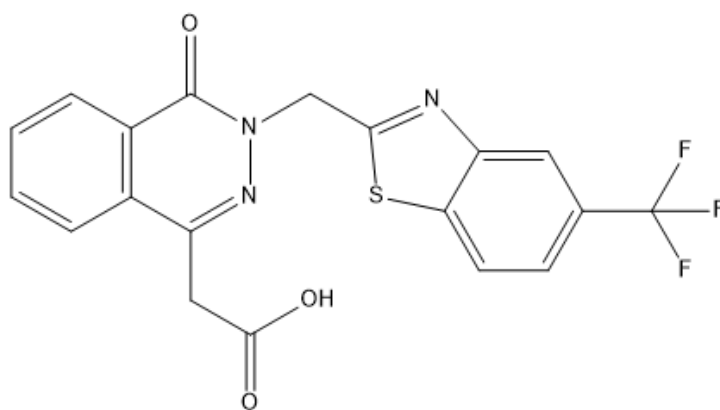
2.3.3 Inhibice metabolické přeměny ANT

Z uvedených mechanismů účinku ANT a jejich metabolických přeměn mohou plynout potenciální řešení jejich terapeutického omezení. Např. společným podáním ANT s látkami, které inhibují činnost CRE, by bylo možné lékovou rezistenci, a zároveň i toxické účinky ANT, zmírnit (Plebuch et al. 2007).

V této práci jsme se věnovali třem inhibitorům, konkrétně zopolrestatu (ZOP), VE-821 a berzosertibu (BER). ZOP je v literatuře popsán jako inhibitor enzymu AKR1B1, další dvě uvedené látky patří do skupiny INH ATR neboli Ataxia Telangiectasia a Rad3-related proteinů (ATRi).

2.3.3.2 Zopolrestat

ZOP je silný INH enzymu aldosareduktasy vyvinutý společností Pfizer v 90. letech 20. století k mírnění komplikací spojených s cukrovkou. Závěry preklinických studií, ve kterých byl ZOP podáván např. diabetickým krysám, ukázaly na zabránění kumulace sorbitolu v kůře ledvin, sítnici a čočce oka nebo v nervové tkáni (Mylari et al. 1991). V rámci klinického hodnocení byl pak ZOP používán k léčbě diabetických neuropatií. (Lin a Niu 2023).



Obr. 3: Chemická struktura ZOP

Jiné preklinické studie *in vitro* ukázaly, že ZOP inhibuje také savčí cytosolickou glyoxalasu I (GLO1). Ta se za běžného stavu účastní degradace reaktivního vedlejšího produktu glykolýzy, methylglyoxalu, na méně toxický d-laktát. GLO1 je ve větší míře exprimována např. v nádorových buňkách prostaty, prsu nebo tlustého střeva. Tato skutečnost vedla k myšlence vývoje INH GLO1, jako možných protinádorových léčiv zvyšujících koncentrace methylglyoxalu v rakovinných buňkách, kde působí zvýšenou indukci apoptotických procesů (Zhai et al. 2013).

Bao et al. (2023) pozorovali ve své studii účinky ZOP v souvislosti se zánětlivým onemocněním dýchacích cest. Studie byla vykonána na myších trpících bronchiálním astmatem. U skupiny myší léčených ZOP zaznamenali snížení sekrece zánětlivých faktorů, např. interleukinu 6 (IL-6), IL-8 nebo tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α), oproti kontrolní skupině. Se snížením zánětu došlo také k redukci hyperreakivity dýchacích cest. Těmito závěry tak představili další potenciální cestu v terapii bronchiálního astmatu (Bao et al. 2023).

Přes požadavky FDA na účinnost léčiv a jejich bezpečnostní profil však prozatím z INH aldosareduktasy prošel jediný epalrestat, podávaný v terapii komplikací spojených s diabetem (Tammali et al. 2011).

2.3.3.1 VE-821 a berzosertib

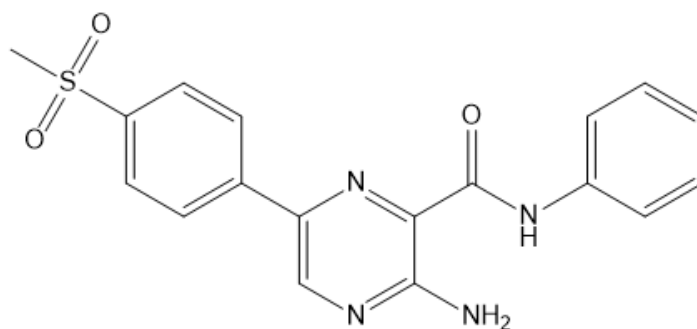
Obě tyto látky jsou malé molekuly řadící se k ATRi. ATR jsou tzv. serin/threonin proteinové kinázy, které přenášejí fosforylové skupiny na serinové a threoninové zbytky jiných proteinů uvnitř buňky. Mají nezastupitelnou úlohu v ochraně genetické informace buněk a jsou nejčastěji aktivovány jako odpověď na poruchu replikace DNA nebo její

jednovláknové zlomy (Mordes et al. 2008). K těmto zlomům může docházet např. v průběhu transkripce či replikace DNA, působením ROS anebo také chemoterapeutik, ultrafialového či ionizujícího záření. ATR fosforylací aktivují další substráty, které se účastní odpovědi na poškození DNA (OPD). Mohou tedy ovlivnit signalizaci o poškození, zastavení buněčného cyklu nebo opravu DNA (Saldivar et al. 2008).

V případě onkologických onemocnění by mohlo být použití ATRi strategickým přístupem k selektivní likvidaci nádorových buněk. V těchto buňkách totiž replikační pochody s rozrušením vláken dvoušroubovice probíhají ve velké míře, a činnost ATR a dalších jednotek OPD je tak pro jejich přežití zásadní. Zdravé buňky by pak mohly zůstat léčivy relativně nedotčené (Weber a Ryan 2015, Gorecki et al. 2020).

VE-821 je předchůdcem dnes již více používaného BER, ovšem i nyní představuje důležitou předlohu pro vývoj nových ATRi. Je využíván v rámci preklinických studií také jako standard pro testování biologické aktivity a terapeutického ovlivnění různých typů nádorových buněčných kultur *in vitro* (Middleton et al. 2018).

Jedná se o vysoce selektivní a specifický inhibitor přenosu signálu v dráze ATR-CHK1 (z angl. checkpoint kinase1). Inhibicí zmíněné dráhy zabraňuje vstupu buněk do S a G2/M fáze buněčného cyklu, což ve výsledku vede k úmrtí buňky (Su et al. 2023).

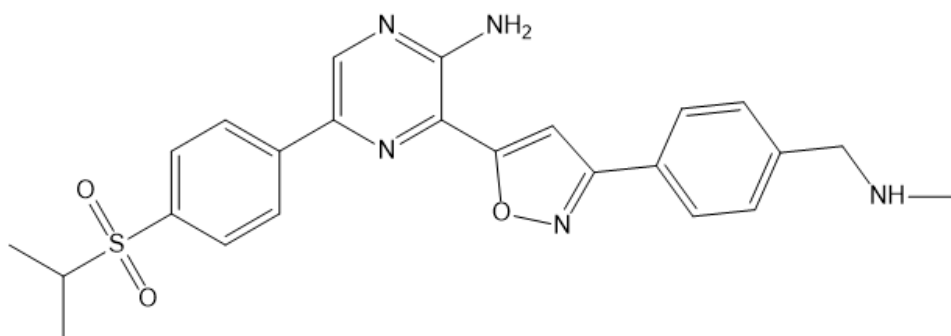


Obr. 4: Chemická struktura VE-821

Některá protinádorová léčiva v monoterapii selhávají kvůli schopnosti buněk opravit poškozenou DNA. V řadě preklinických studií bylo prokázáno zvýšení terapeutického efektu takovýchto látek při současném podání s ATRi. V případě VE-821 byl tento jev pozorován např. u rakoviny vaječníků, slinivky břišní, plic, prsu nebo spinocelulárního karcinomu jícnu (Su et al. 2023, Patil et al. 2013). Do kombinací byly zahrnuty látky jako např. cisplatina, gemcitabin, inhibitory TopI (topotekan, irinotekan)

a TopII (etoposid), nebo olaparib či veliparib, jako INH poly(ADP-ribose) polymerasy (PARP). Kromě chemoterapeutik bylo zkoumáno také společné působení VE-821 s radioterapií, jejíž účinky byly takto v nádorových buňkách opět posíleny (Middleton et al. 2018).

BER, označován i jako VE-822, VX-970 či M6620, byl prvním ATRi použitým v klinickém hodnocení na lidských subjektech. Vyvinula jej společnost Vertex Pharmaceuticals z původního prekurzoru VE-821 (Barneih et al. 2021).



Obr. 5: Chemická struktura BER

Konkrétním příkladem preklinického hodnocení BER může být studie provedená skupinou Fokas et al. (2012). Zde byl studován účinek BER v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky (gemcitabinem) a radioterapií na rakovinných buňkách a tzv. xenoinplantátech slinivky břišní. Výsledky těchto studií ukázaly zvýšení citlivosti nádorových buněk *in vitro* i *in vivo* vůči léčivům i radioterapii kombinovaných s BER. Pozoruhodné bylo navíc zjištění, že účinnost terapie se tímto přístupem zvýšila, aniž by byly zároveň zasaženy zdravé buňky okolní tkáně (Fokas et al. 2012).

V dalších preklinických studiích byl prokázán synergický antineoplastický efekt ATRi kombinovaných s jinými inhibitory ostatních drah OPD. BER byl společně podán např. s olaparibem, dále s V158411 jakožto INH CHK1 nebo s AZD1775, který inhibuje tyrosinkinasu WEE1. PARP jsou proteiny umožňující detekci a opravy poškozené DNA, WEE1 kinasa zase reguluje progresi buněčného cyklu (Li et al. 2023, Shafer a Grant 2016). Při kombinaci AZD1775 s BER v buňkách AML byla pozorována synergická cytotoxická aktivita, kdy docházelo ve zvýšené míře k tvorbě VE-821 indukovaných

dvouřetězcových zlomů DNA, dále k zástavě buněčného cyklu a apoptóze (Qi et al. 2019).

V roce 2012 vstoupil BER poprvé do klinického hodnocení, a od té doby byl součástí okolo 20 různých klinických studií I. a II. fáze. Většina z nich je zaměřena na kombinační terapii intravenózně podávaného BER s radioterapií nebo antineoplastiky jako je irinotekan, topotekan, cis- a karboplatina, gemcitabin, paklitaxel či DOX. Ve zbylých studiích je BER podáván v monoterapii u pokročilých solidních nádorů (Barneih et al. 2021). Téměř všechny studie stále probíhají, ovšem zveřejněné informace z některých hodnocení I. fáze naznačují, že monoterapie BER je u pacientů dobře snášena i ve vysokých dávkách podaného léčiva (480mg/m^2) a nevykazuje toxicitu omezující dávku. U kombinací BER a dalších látek se vyskytovaly toxické účinky na dávce závislé i nezávislé, nejvíce však pozorované při kombinaci BER s cisplatinou nebo gemcitabinem. U těchto látek byly hlášeny hematologické toxicity omezující dávku, čímž bylo znemožněno podání maximální tolerované dávky. Z dalších nežádoucích účinků byly popsány např. únava, nauzea, nebo také útlum kostní dřeně (Barneih et al. 2021).

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo pomocí *in vitro* experimentů zjistit inhibiční potenciál komerčně dostupných inhibitorů berzosertibu, VE-821 a zopolrestatu na vybrané enzymy z nadrodiny AKR a SDR, které se účastní metabolismu antracyklinu daunorubicinu.

Jednotlivé dílčí cíle zahrnovaly:

- 1) základní screening inhibiční aktivity berzosertibu, VE-821 a zopolrestatu vůči karbonyl redukujícím enzymům z nadrodiny AKR (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C1, 1C2, AKR1C3) a SDR (CBR1);
- 2) stanovení IC_{50} pro nejsilnější inhibitor;
- 3) určení inhibiční konstanty K_i pro nejsilnější inhibitor;
- 4) zjištění typu inhibice a v případě nekompetitivního typu určit, zda se jedná o pevně se vážající inhibitor.

4 Praktická část

4.1 Chemikálie, pomůcky, přístroje

4.1.1 Použité chemikálie a reagensie

Acetonitril	(HPLC LC-MS grade, VWR, USA)
Amoniak	(Penta, Česká republika)
Daunorubicin	(Selleckchem, USA)
Dimethylsulfoxid	(Research grade, Serva, Německo)
Enzymy AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1	(Katedra biochemických věd (KBV), Hradec Králové, Česká republika)
Glukosa-6-fosfát	(Roche Diagnostics, Německo)
Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	(Roche Diagnostics, Německo)
Kyselina mravenčí 0,1%	(LC-MS grade, VWR, USA)
Methanol	(HPLC gradient grade, Honeywell, USA)
0,1M MgCl ₂	(Lachema, Česká republika)
NADP	(Roche Diagnostics, Německo)
NaH ₂ P ₄ .2H ₂ O	(Penta, Česká republika)
NaH ₂ P ₄ .12H ₂ O	(Penta, Česká republika)
0,1M Sodno-fosfátový pufr o pH 7,4	(KBV, Hradec Králové, Česká republika)
Ultračistá voda 0,055 µS	(KBV, Hradec Králové, Česká republika)
Inhibitory berzosertib, VE-821, zopolrestat	(MedChemExpress, USA)

4.1.2 Pomůcky

nitrilové rukavice

lžičky pro vážení

stopky

polystyrenový box s ledem

kádinky	
papírové ubrousky	
stojany na zkumavky	
zkumavky 0,5, 1,5 a 2 ml	(Eppendorf, Německo)
pipety a špičky k pipetám 0,5 až 1000 μ l	(Biohit, Finsko)
injekční stříkačky a jehly	(Terumo, Japonsko)
stříkačkový filtr s 0,2 μ M PTFE membránou	(Whatman, Velká Británie)
skleněné vialky, inserty, plastová víčka	(Agilent, USA)
gumová septa k vialkám	
program GraphPad Prism 10	

4.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy	(Sartorius CP225D, Německo)
Centrifuga MiniSpin plus	(Eppendorf, Německo)
Přístroj na výrobu ledu AF80	(Scotsman, Velká Británie)
Termoblok ThermoMixer C	(Eppendorf, Německo)
Ultrazvuková vana Ultrasoniccleaner120T	(Anonkia Ultrasonic, Čína)
Vortex Vortex Genie 2	(Scientific Industries, USA)

UHPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II, USA

- flexibilní pumpa 1260, G7104C
- autosampler 1260, G7129C
- kolona ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1x50mm;1,8 μ m
- fluorescenční detektor 1260 FLD, G7121A

UHPLC Agilent Technologies 1290 Infinity, USA

- binární pumpa 1290 VL, G4220B
- autosampler 1290, G4226A
- kolona ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1x50mm;1,8 μ m
- fluorescenční detektor 1260 FLD, G1321

4.2 Metodika

4.2.1 Základní screening

V rámci počátečních experimentů základního screeningu (ZS) byl testován inhibiční vliv vybraných komerčně dostupných inhibitorů BER, VE-821 a ZOP na činnost enzymů AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C1, 1C2, 1C3 a CBR1.

Bylo vždy provedeno také několik kontrolních reakcí pro potvrzení čistého účinku používaných inhibitorů. Konkrétně se jednalo o reakce bez přídavku inhibitoru (NI), kontrolu dimethylsulfoxidem (DMSO), reakce bez substrátu (bS) a reakce bez enzymu (bE). Samotné rozpouštědlo dimethylsulfoxid určitou míru inhibice dané enzymatické přeměny vykazuje také, proto jsme jej jako kontrolu v experimentech zahrnovali vždy. Představoval pro nás standard (100 %), se kterým byl inhibiční efekt zkoumaných látek porovnáván.

Vzhledem k drobným ztrátám materiálu v průběhu práce, např. ulpívání kapalných látek ve špičce pipety, se zpravidla množství látek napočítávalo s rezervou (několik reakcí navíc).

4.2.1.1 Regenerační systém

Regenerační systém (RS) je zdrojem látek ovlivňujících správný průběh enzymatických přeměn a obnovu enzymů, patří sem například kofaktor Mg^{2+} a koenzym NADP⁺.

Jednotlivé komponenty RS byly připravovány ve větším množství do zásoby, jejich spojení do konečné podoby RS poté probíhalo až v den provedení experimentu. 0,1M sodno-fosfátový pufr (NaPB) byl získán smícháním příslušných roztoků v takovém poměru, v jakém měla výsledná směs hodnotu pH 7,4. Kombinoval se takto roztok vzniklý rozpuštěním 3,58 g $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ ve 100 ml ultračisté vody s roztokem připraveným po rozpuštění 0,39 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ ve 25 ml ultračisté vody. 0,1M roztok chloridu hořečnatého byl připraven rozpuštěním 1,02 g $MgCl_2$ v 50 ml ultračisté vody. Tabulka níže uvádí obecné schéma přípravy RS pro jednu reakci. V závislosti na rozsahu experimentu, resp. počtu reakcí, se množství složek uvedených v tabulce počtem reakcí násobilo.

Tab. 1: Příprava RS pro 1 reakci

Složka RS	Množství látky v jedné reakci
NADP	0,2 mg
Glc-6-P	0,6 mg
NaPB	10 µl
MgCl ₂	10 µl
Glc-6-P-dehydrogenasa	0,5 mg

Do zkumavky byly na analytických vahách (4 desetinná místa) naváženy práškové látky natrium adenosin difosfát (NADP) a glukosa-6-fosfát (Glc-6-P). Po kompletním rozpuštění těchto navážek v NaPB bylo do zkumavky přeneseno i odpovídající množství roztoku MgCl₂.

Enzym Glc-6-P-dehydrogenasa byl pro zachování požadované aktivity ke směsi přidán až těsně před použitím, tedy těsně před pipetováním RS do reakčních zkumavek.

4.2.1.2 Roztoky inhibitorů

Zásobní roztoky inhibitorů o koncentraci 10 mM byly připraveny rozpuštěním navážky INH nejčastěji v DMSO a uchovávány při teplotě -80 °C (případně -20 °C). Požadovaných finálních koncentrací inhibitoru v reakci, 10 a 50 µM (INH 10 a INH 50), bylo dosaženo použitím pracovních roztoků inhibitoru s koncentracemi 500 a 2 500 µM. Ty byly připraveny naředěním zásobního roztoku INH s DMSO podle vzorce:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2 \quad \text{po úpravě:} \quad V_1 = c_2 * V_2 / c_1$$

$$c_1 = \text{koncentrace zásobního roztoku INH} \quad V_2 = \text{objem pracovního roztoku INH (s rezervou)}$$
$$V_1 = \text{objem zásobního roztoku INH} \quad c_2 = \text{koncentrace pracovního roztoku INH.}$$

Množství DMSO pak plynulo z odečtení hodnoty V_1 od V_2 .

4.2.1.3 Enzym

Všechny enzymy byly připraveny rekombinantně z bakterií druhu *E. Coli* na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Skladovány byly rozpuštěné v NaPB a 20% glycerolu při -80 °C (případně při -20 °C).

Různé druhy enzymů byly v reakci obsažené v různém množství na základě jejich schopnosti redukovat antracyklin DAUN. To bylo třeba znát jak pro výpočet objemu zásobního roztoku enzymu k přípravě pracovního roztoku pipetovaného do reakcí, tak následně i k výpočtu specifické aktivity enzymu a vyhodnocení průběhu reakce.

Tab. 2: Koncentrace používaných enzymů v reakci

Enzym	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{reakci}$]
AKR1A1	1
AKR1B1	5
AKR1B10	5
AKR1C1	5
AKR1C2	5
AKR1C3	1,5
CBR1	0,1

Pracovní roztok enzymu byl připraven opět dle platnosti směšovací rovnice:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

c_1 = koncentrace zásobního roztoku enzymu, V_1 = objem zásobního roztoku enzymu,
 c_2 = koncentrace enzymu v reakci (např. $5 \mu\text{g}/\text{reakci} = 5 \mu\text{g}/10 \mu\text{l} \rightarrow c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ resp. $0,5 \text{ mg}/\text{ml}$)
 V_2 = celkový objem pracovního roztoku ($10 \mu\text{l} = 1$ reakce, $V_2 = 10 * \text{počet reakcí}$)

Vypočítaný objem enzymu jsme poté naředili odpovídajícím množstvím NaPB, který jsme zjistili odečtením hodnoty V_1 od V_2 .

4.2.1.4 Substrát

Zásobní roztok substrátu DAUN byl připraven rozpuštěním navážky 1,41 mg práškového DAUN v 500 μl ultračisté vody. Původně pevné chemoterapeutikum bylo uchováváno v podobě 5mM zásobního roztoku při teplotě + 4 °C v lednici.

4.2.1.5 Příprava reakcí a vlastní inkubace

Každá zkumavka odpovídala reakci s příslušným složením, proto bylo nezbytné všechny jasně označit. Stejným způsobem byly popsány i skleněné vialky, jakožto nosiče analyzovaného vzorku pro UHPLC analýzu. Ke kontrole správného postupu práce, a zároveň k eliminaci zisku zavádějících výsledků, se každá reakce prováděla ve třech provedeních (triplikátech). Výjimku tvořily reakce bez přídavku enzymu a reakce bez substrátu, které byly pouze v duplikátech.

Tab. 3: Schéma přípravy reakcí pro základní screening inhibitorů

	NaPB [μl]	INH [μl]	RS [μl]	E [μl]	S [μl]
NI	60	0	20	10	10
DMSO	58	2 DMSO	20	10	10
INH 10	58	2	20	10	10
INH 50	58	2	20	10	10
bE	70	0	20	0	10
bS	60	0	20	10	10 vody!

Do označených eppendorfek jsme podle tabulky 3 nejprve přenesli NaPB, ve druhém kole přichystané roztoky inhibitoru, resp. DMSO. Následovalo pipetování 20 µl RS, a to po rozmražení enzymu Glc-6-P-dehydrogenasy a jeho pečlivém promíchání s předpřipraveným základem. Poslední složkou zůstal přídavek roztoku zkoumaného enzymu připraveného opět v čase potřeby.

Takto připravené zkumavky byly důkladně vortexovány pro co největší homogenitu obsahu, na několik sekund přeneseny do stolní centrifugy (short spin), aby tekutina neulpívala v uzávěru a na stěnách zkumavky, a vloženy do předem vyhřátých termobloků na 37 °C v daném pořadí. Ponechali jsme je zde 10 min pro tzv. preinkubaci. Mezitím jsme si na několik min v ultrazvukové lázni s destilovanou vodou zahřáli DAUN a vortexovali jej.

4.2.1.6 Inkubace

In vitro experimenty probíhají ve zkumavkách, tedy mimo živý organismus. K tomu, abychom mohli zjištěné výsledky interpretovat jako potenciálně uplatnitelné v otázce účinku na lidské zdraví, je nezbytné reakce podrobit podmínkám simulujícím prostředí lidského těla. Inkubace se vykonávaly při 37 °C po stanovený čas, který se lišil v závislosti na použitém enzymu a úrovni experimentu:

Tab. 4: Přehled doby inkubace dle typu experimentu a druhu enzymu

Typ experimentu	Enzym	Doba inkubace [min]
základní screening	AKR1A1	30
	AKR1B1	
	AKR1B10	
	AKR1C3	60
	AKR1C1	
	AKR1C2	
IC ₅₀	CBR1	20
	AKR1B1	60
	AKR1C3	30
typ inhibice	AKR1B1	60
	AKR1C3	36
pevnost vazby inhibitoru	AKR1B1	60
	AKR1C3	

Reakce byly zahájeny přidavkem 10 µl substrátu v časových intervalech 30 s, dále krátce vortexovány a vráceny zpět do termobloku. Po uplynutí předepsané doby inkubace byly reakce zastaveny, opět ve stejných časových intervalech, přidavkem 300 µl MeOH.

4.2.1.7 Filtrace a příprava vzorků pro UHPLC

Takto ukončené reakce byly důkladně vortexovány a ponechány 10 min v boxu s ledem. Pokračovalo se s precipitací vzorků buď 1 hodinu při +4 °C (v lednici), anebo 30 min při -20 °C (v mrazáku). Během této doby se ve formě sraženiny oddělily nečistoty od zbylé kapalné části, ve které zůstal zkoumaný produkt.

Dalším krokem byla desetiminutová centrifugace zkumavek nastavená na 13 400 otm (otáček za minutu).

K filtraci jsme přistoupili po odběru tekutiny z reakčních zkumavek pomocí injekční stříkačky s jehlou. Snažili jsme se při tom nasát pouze kapalný obsah, tedy ideálně bez částic sraženiny usazené na dně. Stříkačku jsme po odběru zvedli hrotem jehly vzhůru a nasáli vzduch. Na hrdlo stříkačky byl po sejmutí jehly nasazen mikrofiltr a vhodným tlakem byla kapalina obsahující produkt reakce, DAUNol, filtrována skrze PTFE membránu přímo do insertu skleněné vialky. Obsah ve vialce jsme následně uzavřeli plastovým šroubovacím víčkem s gumovým septem a uchovali při 4 °C do vlastního měření.

Vždy po zfiltrování dvou, resp. tří provedení dané reakce jsme filtrační soupravu (jehlu, stříkačku i filtr) promyli destilovanou vodou, kterou jsme si připravili do kádinky. Voda ulpívající na filtračních komponentách byla odstraněna vyklepáním o pracovní desku pokrytou savým papírem. Do druhé, prázdné, kádinky byl sbírán odpad z promývání a po skončení experimentu řádně zlikvidován.

4.2.1.8 UHPLC analýza a zpracování dat

Naplněné a uzavřené vialky byly umístěny do stojanů ultra účinné kapalinové chromatografie (UHPLC) k analýze. UHPLC je separační metoda fungující na principu rozdělování složek analytu mezi dvě navzájem nemísitelné fáze.

Autosampler odebírá postupně 5 µl roztoku z každé vialky na chromatografickou kolonu. Kapalná mobilní fáze, v našem případě tvořená 0,1% kyselinou mravenčí a acetonitrilem v zastoupení 74:26 v/v, zajišťuje unášení analytu kolonou s průtokovou rychlostí nastavenou na 0,7 ml/min. Analýza jednoho vzorku trvá 5 min. Směsný

standard, obsahující jak výchozí látku DAUN, tak zkoumaný produkt DAUNol, je uložen ve vialce v UHPLC na první pozici. K němu porovnááme oblasti retenčních časů pro zkoumané látky. Jako první se na chromatogramu objeví pík DAUN, druhý poté DAUNol.

Výstupem z analýzy jsou hodnoty retenčních časů a plochy pod křivkou chromatografických píků. Retenční čas je kvalitativním parametrem umožňujícím identifikovat přítomné látky, plocha pod píkem po porovnání s kalibrační křivkou poté vypovídá o kvantitě, respektive o množství dané látky ve vzorku. Koncentraci produktu z tohoto vztahu získáme v podobě ng/nástřík, tedy ng/5 μ l.

Koncentrace DAUNolu přepočítáme na specifickou aktivitu dle vzorce:

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

a = specifická aktivita [nmol DAUN/mg enzymu/min], **m** = hmotnost DAUNolu ve vzorku [ng],
K = koeficient zředění = 80 (400 μ l byl objem vzorku ve vialce, 5 μ l nástřík na kolonu, z čehož jsme získali pouze 1/80 celkové hmotnosti DAUNolu), hodnota **1000** pro převod jednotek,
t = čas inkubace [min], **c** = koncentrace enzymu v 1 vzorku [μ g/reakci]
a **Mr** = molární hmotnost DAUNolu = 529,54 [g/mol].

S hodnotami specifické aktivity jsme poté pracovali v programu GraphPad Prism 10, ve kterých byly vytvořeny veškeré grafy, vypočítány statistické údaje a potřebné hodnoty. Pojem specifická aktivita vyjadřuje látkové množství substrátu přeměněného určitým množstvím enzymu za jednotku času.

V dalších stupních experimentů, tedy při stanovení IC_{50} , K_i a typu inhibice, také pevnosti vazby inhibitoru k enzymu jsme pracovali už jen s látkami, u kterých jsme zaznamenali nejsilnější inhibiční potenciál. Z palety inhibitorů se nejvíce osvědčil zopolrestat, a to především v kombinaci s enzymy AKRIB1 a 1C3. Z kontrolních vzorků zde byla používána pouze DMSO kontrola.

4.2.2 Hodnota IC_{50}

IC_{50} představuje takovou koncentraci inhibitoru, při které pozorujeme pokles aktivity enzymu na polovinu (50 %). Experimenty pro stanovení IC_{50} byly založené na interakci inhibitoru ZOP s vybranými enzymy, koncentrace INH pak zahrnovaly celého jeho inhibiční rozpětí.

Konkrétně byly k enzymu AKR1B1 nastaveny koncentrace ZOP na 0 (DMSO); 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 20 a 100 μM .

Pro kombinaci s enzymem AKR1C3 jsme pak testovali koncentrace ZOP 0 (DMSO kontrola); 0,1; 0,25; 0,5; 2; 5; 10 a 50 μM .

Ze zásobního roztoku INH jsme nejprve připravili roztok s nejvyšší koncentrací v řadě. 100 μM roztok ZOP pro AKR1C3 byl připraven smícháním 8,4 μl zásobního roztoku ZOP s 8,4 μl DMSO, pro experimenty s 50 μM ZOP a enzymem AKR1B1 jsme smíchali 3,5 μl zásobního ZOP s 10,5 μl DMSO. Postupným ředěním roztoků s vyšší koncentrací pomocí DMSO jsme získali zbylé nižší koncentrace.

4.2.3 Stanovení hodnoty K_i a typu inhibice

U těchto experimentů byla inhibiční aktivita zkoumána při různých koncentracích inhibitoru ZOP s koncentračním spektrem substrátu 200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM . Pro experimenty s AKR1B1 byly koncentrace INH stanoveny na 0 (DMSO), 0,25, 1 a 2 μM , v případě AKR1C3 jsme pracovali s koncentracemi 0 (DMSO), 1, 5 a 10 μM . Pokus pak zahrnoval kombinaci každé koncentrace substrátu s každou koncentrací inhibitoru. Roztoky inhibitoru byly připraveny podobně jako u experimentů pro stanovení hodnoty IC_{50} dle směšovací rovnice, nejkonzentrovanejší roztok vznikl smícháním 1,6 μl zásobního roztoku ZOP s 62,4 μl DMSO.

Příprava substrátu vyžadovala v prvním kroku rozpuštění 21,54 mg pevného DAUN v 1923 μl ultračisté vody, čímž jsme získali roztok s nejvyšší koncentrací, 2000 μM . Roztoky s nižší koncentrací jsme následně připravili ředěním roztoků o vyšší koncentraci.

Hodnota K_i

Inhibiční konstanta K_i vyjadřuje rovnovážný stav mezi volnými molekulami INH a enzymu (E), a INH vázaného v komplexu s enzymem. Poukazuje na sílu vazby (afinitu) mezi těmito molekulami. Relativní afinita komplexu INH-enzym je nepřímou úměrná K_i .

$$K_i = \frac{[E] * [INH]}{[EINH]}$$

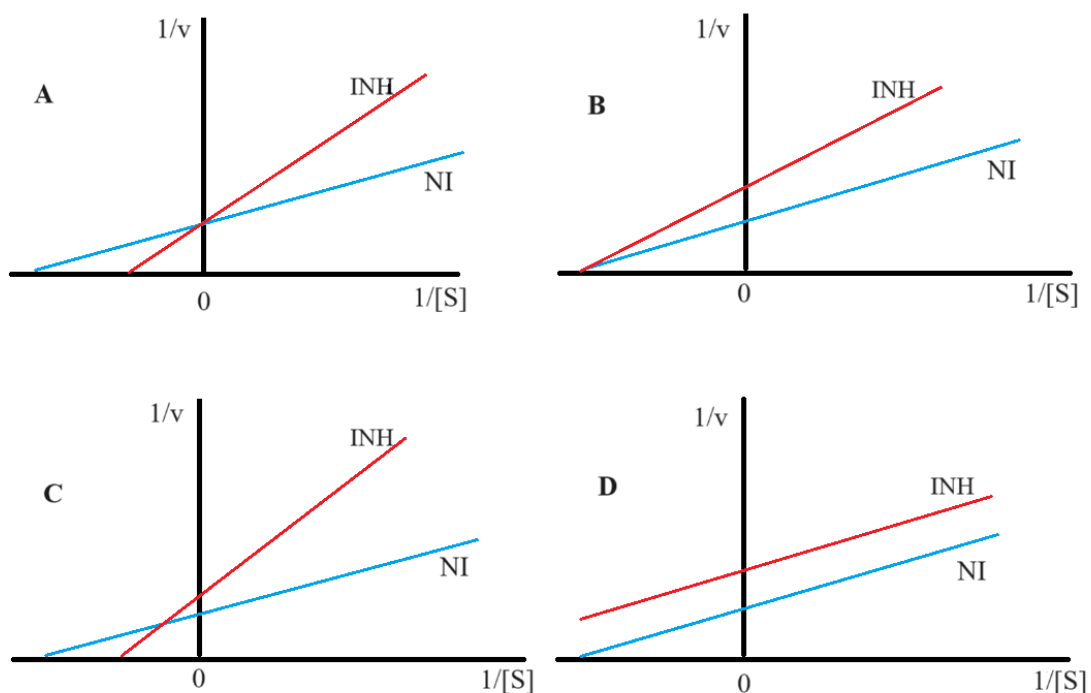
Z tohoto vztahu vyplývá, že čím silnější vazbou se INH k danému enzymu váže, tím nižší je jeho hodnota K_i . INH s nízkou K_i mají tedy vyšší inhibiční účinek na činnost enzymů (Copeland 2000).

Typ inhibice

Typ inhibice popisuje mechanismus, kterým může INH snížit aktivitu enzymu. Jednotlivé typy se dají rozlišit porovnáním kinetických parametrů inhibované a neinhibované enzymové reakce, konkrétně velikostí hodnot V_{max} a K_m . Tyto hodnoty vycházejí z rovnice Michaelise a Mentenové, popisující okamžitou rychlost enzymové reakce a koncentraci substrátu. V_{max} je maximální rychlost reakce, K_m je Michaelisova konstanta odpovídající koncentraci substrátu, při níž se rychlost enzymové reakce rovná polovině maximální rychlosti V_{max} (Ledvina et al. 2009, Copeland 2000). Typy inhibice mohou být rozlišeny např. takto:

- 1) u kompetitivní inhibice je patrné zvýšení K_m bez ovlivnění hodnoty V_{max} . INH soutěží o stejné vazebné místo enzymu se substrátem, zpravidla bývá jeho analogem. Při zvýšené koncentraci substrátu vzrůstá také K_i INH.
- 2) Nekompetitivní inhibici pozorujeme při nezměněné hodnotě K_m a současně snížené rychlosti V_{max} . Zde se INH může vázat jak na volný enzym, tak na již vzniklý komplex enzym-substrát, aniž by soutěžil o vazebné místo enzymu. Hodnoty K_i zůstávají prakticky stejné.
- 3) Smíšená inhibice může být situací, kdy INH mění jak V_{max} , tak hodnotu K_m . Jedním ze vzácných případů smíšené inhibice je také tzv. akompetitivní inhibice, kdy se INH váže pouze na komplex enzym-substrát, a V_{max} a K_m se snižují souměrně.

Pro snadnější určení typu inhibice se často využívá dvojité reciprokého vynesení závislosti rychlosti reakce, případně specifické aktivity enzymu zprostředkovávajícího reakci, na koncentraci substrátu dle Lineweaver-Burka (Ledvina et al. 2009, Koolman a Röhm 2012). Jednotlivé typy jsou znázorněny v Obr. 6. Písmeno **A** zobrazuje kompetitivní inhibici, **B** nekompetitivní inhibici, **C** smíšenou a **D** akompetitivní inhibici.



Obr. 6: Grafy dle Lineweaver-Burka, dvojitě reciproky výnos závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu

INH inhibitor, NI neinhibováno, v rychlost reakce, $[S]$ koncentrace substrátu.

4.2.4 Stanovení pevnosti vazby inhibitoru k enzymu

V závěru experimentální části této práce jsme se věnovali stanovení pevnosti vazby INH k enzymu. INH se k enzymům mohou vázat reverzibilně (nejčastěji), s rychlou tvorbou a zánikem komplexu INH-enzym, anebo ireverzibilně pevnou a typicky kovalentní vazbou. V takovém případě INH původní aktivitu enzymu ovlivní trvale (Koolman a Röhm, 2012).

Podmínky inkubace a složení reakcí byly obdobné předešlým stupňům experimentů. Koncentrační řada INH byla shodná s řadou pro stanovení hodnot IC_{50} , jen v tomto případě proměřována vůči čtyřem koncentracím daného enzymu. Pro stanovení pevnosti vazby ZOP k enzymu AKR1B1 byly tedy použity koncentrace INH 0 (DMSO); 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 20 a 100 μM a koncentrace enzymu 2,5, 5, 10 a 15 μM .

Enzym AKR1C3 v koncentracích 0,75, 1,5, 3 a 4,5 μM byl proměřován proti koncentracím ZOP nastavených na 0 (DMSO); 0,1; 0,25; 0,5; 2; 5; 10 a 50 μM .

5 Výsledky a diskuse

5.1 Základní screening

V úvodu experimentální části této práce byl nejprve proveden screening inhibičního působení ZOP, VE-821 a BER na činnost pěti CRE – AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1 v přeměně substrátu DAUN. Těmito experimenty jsme zjišťovali, zda je některý z INH schopen významně snížit aktivitu představených enzymů, jednalo se de facto o prvotní rozlišení INH na ty s potenciálně vyšší schopností ovlivnit metabolismus ANT, a ty se zanedbatelnou inhibiční aktivitou. Po vyhodnocení výsledků ZS a určení INH s nejsilnějším inhibičním potenciálem jsme pro kompletní zhodnocení jeho aktivity vůči širšímu spektru enzymů provedli ještě doplňkové experimenty s enzymy AKR1C1 a 1C2. Z literatury je známo, že enzym AKR1C4 se metabolických přeměn xenobiotik účastní jen velmi omezeně, proto do našich experimentů již zahrnut nebyl.

Výsledky experimentů ZS jsou rozděleny do pěti částí podle použitého enzymu, který byl kombinován vždy se všemi třemi INH. Dále následují experimenty s enzymy AKR1C1 a 1C2 v kombinaci s nejsilnějším INH. Každý experiment s daným enzymem byl opakován dvakrát, a jednotlivé reakce byly u obou provedení měřeny v triplicátech. Inhibitory byly použity v koncentracích 10 a 50 μM , koncentrace enzymů v reakci se lišily u jednotlivých druhů enzymů. Zjištěná data jsou interpretována v tabulkách (Tab. 5-9) a grafech (Obr. 7-11). Grafy znázorňují průměrné hodnoty specifické aktivity enzymu se směrodatnými odchylkami (SD) dvou nezávislých měření dohromady, tabulky obsahují průměrné hodnoty specifické aktivity enzymu se SD každého měření zvlášť. Jsou zde v procentech uvedeny také hodnoty míry inhibice jednotlivých INH vztažené ke kontrole DMSO (100 %).

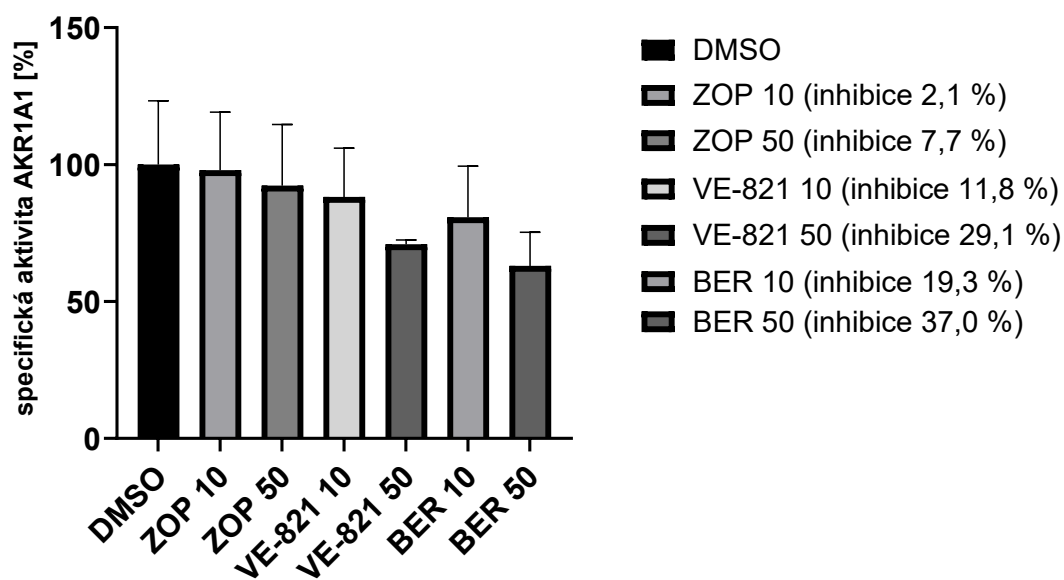
5.1.1 AKR1A1

Enzym AKR1A1 byl použit v koncentraci 1 μg /reakci, inkubace probíhala po dobu 30 min. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5), graf znázorňuje spojení obou nezávislých měření s popisem průměrné hodnoty inhibice v % (Obr. 7).

Tab. 5: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1A1

AKR1A1	Koncentrace INH v reakci [μM]	Specifická aktivita [nmol/mg/min]	Specifická aktivita [%]	Inhibice [%]
DMSO	0	$171,5 \pm 3,7$	$100 \pm 2,1$	-
		$260,7 \pm 18,0$	$100 \pm 9,4$	-
ZOP	10	$172,1 \pm 4,2$ $251,1 \pm 24,0$	$100,4 \pm 2,5$ $96,3 \pm 9,2$	- $3,7 \pm 9,2$
	50	$156,5 \pm 8,8$ $242,1 \pm 17,1$	$91,3 \pm 5,1$ $92,9 \pm 6,6$	$8,7 \pm 5,1$ $7,1 \pm 6,6$
VE-821	10	$157,0 \pm 7,2$ $223,9 \pm 17,5$	$91,6 \pm 4,2$ $85,9 \pm 6,7$	$8,4 \pm 4,2$ $14,1 \pm 6,7$
	50	$153,9 \pm 1,1^*$ $152,3 \pm 5,8^*$	$89,8 \pm 0,6^*$ $58,4 \pm 2,2^*$	$10,2 \pm 0,6^*$ $41,6 \pm 2,2^*$
BER	10	$138,0 \pm 9,8$ $210,8 \pm 5,1$	$80,5 \pm 5,7$ $80,9 \pm 2,0$	$19,5 \pm 5,7$ $19,1 \pm 2,0$
	50	$112,1 \pm 6,2$ $159,9 \pm 5,5$	$65,4 \pm 3,6$ $61,4 \pm 2,1$	$34,6 \pm 3,6$ $38,6 \pm 2,1$

Hodnoty specifické aktivity jsou v tabulce uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka jednotlivých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **INH** inhibitor, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci, * vypočteno z duplikátu.



Obr. 7: Graficky znázorněné účinky vybraných inhibitorů na aktivitu enzymu AKR1

Výsledky jsou v grafu uvedeny jako průměr specifické aktivity v % \pm směrodatná odchylka dvou nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu. Z těchto hodnot jsou pak zde také vypočteny průměrné hodnoty inhibice v %. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci.

Z výsledků uvedených v tabulce a grafu je patrné, že k významnější inhibici aktivity enzymu AKR1A1 došlo ve dvou případech. Konkrétně 50 μ M koncentrace VE-821 způsobila v průměru dvou spojených měření pokles aktivity AKR1A1 o 29,1 %, a při 50 μ M koncentraci INH BER došlo ke snížení aktivity enzymu o 37,0 %. Zbylé inhibitory neovlivnili specifickou aktivitu enzymu o více než 20 %.

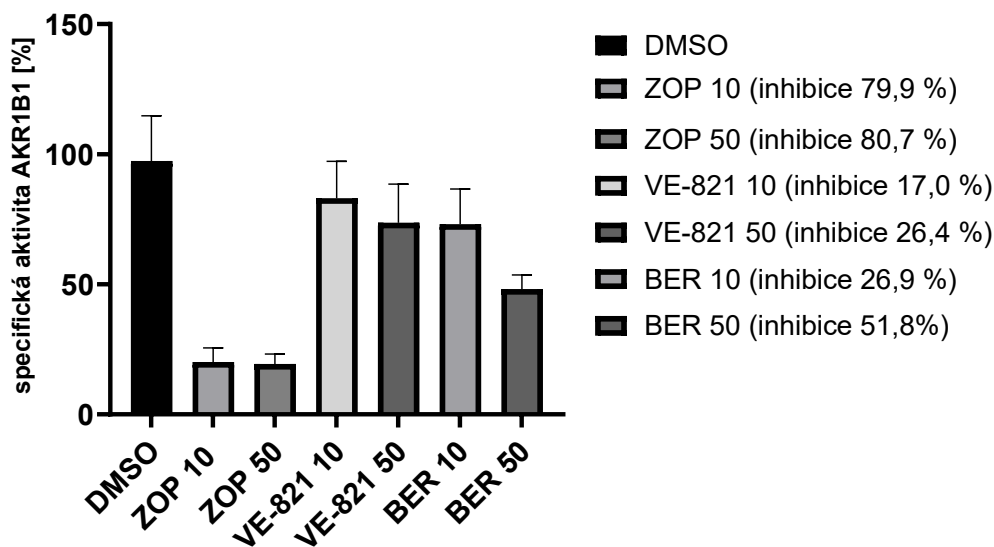
5.1.2 AKR1B1

Množství enzymu AKR1B1 v jedné reakci bylo 5 μ g, inkubace byla nastavena na 30 min. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6), graf znázorňuje spojení obou nezávislých měření s popisem průměrné hodnoty inhibice v % (Obr. 8).

Tab. 6: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1B1

AKR1B1	Koncentrace INH v reakci [μ M]	Specifická aktivita [nmol/mg/min]	Specifická aktivita [%]	Inhibice [%]
DMSO	0	9,8 \pm 0,7	100 \pm 7,0	-
		7,2 \pm 0,1	100 \pm 1,8	-
ZOP	10	2,2 \pm 0,1	22,1 \pm 1,4	77,9 \pm 1,4
		1,3 \pm 0,1	18,7 \pm 1,9	81,3 \pm 1,9
	50	1,9 \pm 0,3	19,4 \pm 2,9	80,6 \pm 2,3
		1,5 \pm 0,3	20,5 \pm 3,7	79,7 \pm 3,7
VE-821	10	8,3 \pm 0,5	84,9 \pm 4,9	15,1 \pm 4,9
		6,2 \pm 0,2	85,8 \pm 2,6	14,2 \pm 2,6
	50	7,8 \pm 0,2*	79,4 \pm 2,3*	20,6 \pm 2,3*
		5,5 \pm 0,5	76,8 \pm 6,4	23,2 \pm 6,4
BER	10	7,4 \pm 0,5	75,4 \pm 5,4	24,6 \pm 5,4
		5,4 \pm 0,1	74,6 \pm 2,0	25,4 \pm 2,0
	50	4,6 \pm 0,2	47,1 \pm 1,6	52,9 \pm 1,6
		3,8 \pm 0,1	52,8 \pm 1,2	47,2 \pm 1,8

Hodnoty specifické aktivity jsou v tabulce uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka jednotlivých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **INH** inhibitor, **10** 10 μ M koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μ M koncentrace inhibitoru v reakci, * vypočteno z duplikátu.



Obr. 8: Graficky znázorněné účinky vybraných inhibitorů na aktivitu enzymu *AKR1B1*

Výsledky jsou v grafu uvedeny jako průměr specifické aktivity v % \pm směrodatná odchylka dvou nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu. Z těchto hodnot jsou pak zde také vypočteny průměrné hodnoty inhibice v %. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **10** 10 μ M koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μ M koncentrace inhibitoru v reakci.

Z výsledků uvedených v tabulce a grafu je na první pohled patrné, že aktivita enzymu *AKR1B1* byla nejvíce redukována INH ZOP. Míra inhibice byla ovšem mezi jednotlivými koncentracemi ZOP (10 a 50 μ M) změřena s minimálním rozdílem. 10 μ M koncentrace ZOP vedla v průměru dvou spojených měření ke snížení specifické aktivity enzymu o 79,9 %, v případě 50 μ M koncentrace došlo k poklesu aktivity enzymu o 80,7 %. U dalších dvou INH byla významnější inhibice zaznamenána jen u INH BER v koncentraci 50 μ M, a sice 51,8 %.

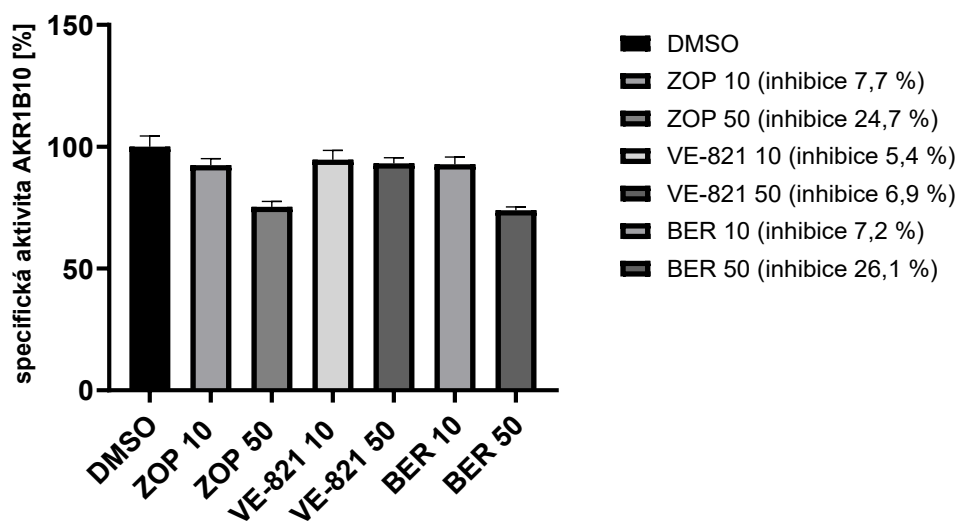
5.1.3 *AKR1B10*

Enzym *AKR1B10* byl použit v koncentraci 5 μ g/reakci, inkubace probíhala po dobu 30 min. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7), graf znázorňuje spojení obou nezávislých měření s popisem průměrné hodnoty inhibice v % (Obr. 9).

Tab. 7: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem *AKR1B10*

AKR1B10	Koncentrace INH v reakci [μM]	Specifická aktivita [nmol/mg/min]	Specifická aktivita [%]	Inhibice [%]
DMSO	0	$58,4 \pm 3,8$	$100 \pm 6,5$	-
		$58,0 \pm 1,4$	$100 \pm 2,4$	-
ZOP	10	$53,9 \pm 2,3$	$92,2 \pm 4,0$	$7,7 \pm 4,0$
		$53,6 \pm 1,0$	$92,4 \pm 1,7$	$7,6 \pm 1,7$
	50	$44,5 \pm 1,2$	$76,3 \pm 2,0$	$23,7 \pm 2,0$
		$43,1 \pm 1,1$	$74,4 \pm 1,2$	$25,6 \pm 1,9$
VE-821	10	$55,2 \pm 2,3$	$94,5 \pm 3,9$	$5,5 \pm 3,9$
		$55,0 \pm 2,6$	$94,8 \pm 4,6$	$5,2 \pm 4,6$
	50	$55,2 \pm 0,7$	$94,5 \pm 1,2$	$5,6 \pm 1,2$
		$53,2 \pm 1,2$	$91,8 \pm 2,0$	$8,2 \pm 2,0$
BER	10	$55,3 \pm 1,1$	$94,7 \pm 1,9$	$5,3 \pm 1,9$
		$52,7 \pm 0,9$	$90,9 \pm 1,5$	$9,1 \pm 1,5$
	50	$43,2 \pm 0,8$	$74,0 \pm 1,3$	$26 \pm 1,3$
		$42,7 \pm 1,0$	$73,7 \pm 1,7$	$26,3 \pm 1,7$

Hodnoty specifické aktivity jsou v tabulce uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka jednotlivých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplikátu. **DMSO** kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **INH** inhibitor, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci, * vypočteno z duplikátu.



Obr. 9: Graficky znázorněné účinky vybraných inhibitorů na aktivitu enzymu *AKR1B10*

Výsledky jsou v grafu uvedeny jako průměr specifické aktivity v % \pm směrodatná odchylka dvou nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplikátu. Z těchto hodnot jsou pak zde také vypočteny průměrné hodnoty inhibice v %. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci.

Výsledky uvedené v tabulce a grafu naznačují, že činnost enzymu AKR1B10 nebyla působením žádného z vybraných INH příliš ovlivněna. Snížení aktivity enzymu o více než 8 % bylo pozorováno jen při 50 μM koncentraci ZOP a BER, kteří aktivitu AKR1B10 inhibovali z 24,7 %, respektive z 26,1 %.

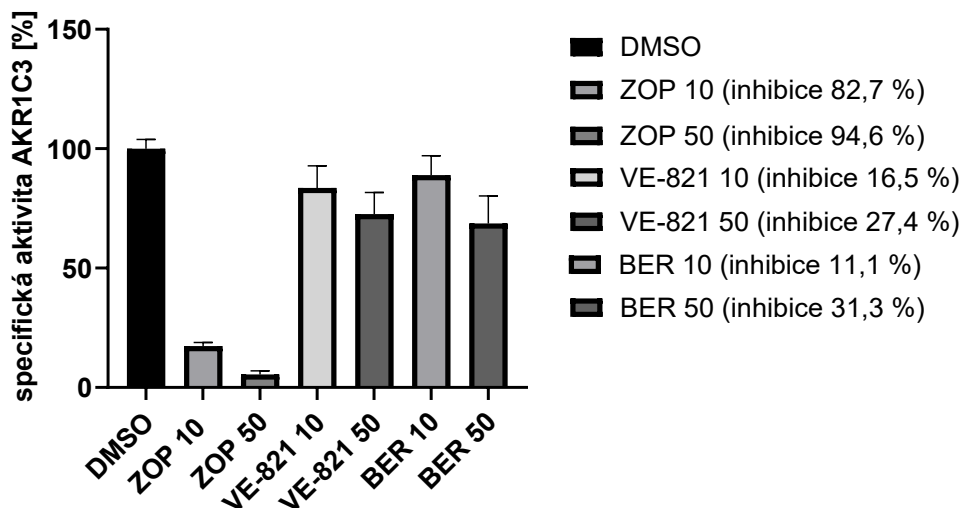
5.1.4 AKR1C3

Množství enzymu AKR1C3 v jedné reakci bylo 1,5 μg, inkubace probíhala po dobu 30 min. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8), graf znázorňuje spojení obou nezávislých měření s popisem průměrné hodnoty inhibice v % (Obr. 10).

Tab. 8: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem AKR1C3

AKR1C3	Koncentrace INH v reakci [μM]	Specifická aktivita [nmol/mg/min]	Specifická aktivita [%]	Inhibice [%]
DMSO	0	265,5 ± 12,5	100 ± 4,7	-
		265,8**	100**	-
ZOP	10	47,2 ± 5,6	17,8 ± 2,1	82,2 ± 2,1
		44,4 ± 3,1	16,7 ± 1,2	83,3 ± 1,2
	50	17,9 ± 2,2	6,8 ± 0,8	93,2 ± 0,8
		10,8 ± 0,6	4,1 ± 0,2	95,9 ± 0,2
VE-821	10	234,8 ± 28,3	88,4 ± 10,7	11,6 ± 10,7
		208,8 ± 15,1	78,5 ± 5,7	21,5 ± 5,7
	50	207,8 ± 12,0	78,3 ± 4,5	21,7 ± 4,5
		170,5 ± 18,8*	64,1 ± 7,1*	35,9 ± 7,1*
BER	10	251,9 ± 20,8	94,9 ± 7,8	5,1 ± 7,8
		220,0 ± 0,9	82,8 ± 0,3	17,2 ± 0,3
	50	203,2 ± 16,2	76,5 ± 6,1	23,5 ± 6,1
		151,2 ± 0,6*	56,9 ± 0,2*	43,1 ± 0,2*

Hodnoty specifické aktivity jsou v tabulce uvedené jako průměr ± směrodatná odchylka jednotlivých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **INH inhibitor**, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci, ** jediná hodnota, * vypočteno z duplikátu.



Obr. 10: Graficky znázorněné účinky vybraných inhibitorů na aktivitu enzymu AKR1C3

Výsledky jsou v grafu uvedeny jako průměr specifické aktivity v % \pm směrodatná odchylka dvou nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplikátu. Z těchto hodnot jsou pak zde také vypočteny průměrné hodnoty inhibice v %. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **10** 10 μ M koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μ M koncentrace inhibitoru v reakci.

Výsledky uvedené v tabulce a grafu ukazují na nejsilnější inhibici enzymu AKR1C3 prostřednictvím ZOP. Jeho činnost v průměru dvou nezávislých měření vedla ke snížení aktivity AKR1C3 o 82,7 % při koncentraci 10 μ M, a až o 94,6 % při koncentraci 50 μ M. V případě zbylých dvou INH byl inhibiční efekt vyšší než 17 % pozorován pouze u jejich 50 μ M koncentrací, kdy VE-821 způsobil pokles aktivity AKR1C3 o 27,4 %, a BER o 31,3 %.

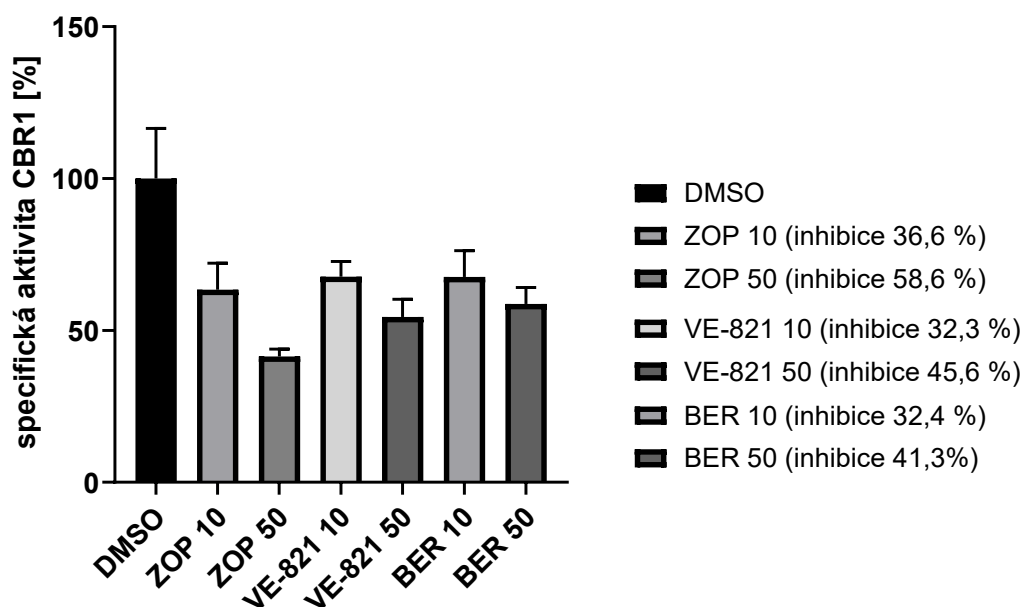
5.1.5 CBR1

Enzym CBR1 byl použit v koncentraci 0,1 μ g/reakci, inkubace probíhala po dobu 20 min. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce (Tab.9), graf znázorňuje spojení obou nezávislých měření s popisem průměrné hodnoty inhibice v % (Obr. 11).

Tab. 9: Výsledky základního screeningu vybraných inhibitorů s enzymem CBR1

CBR1	koncentrace INH v reakci [μM]	specifická aktivita [nmol/mg/min]	specifická aktivita [%]	inhibice [%]
DMSO	0	$1751,2 \pm 189,2$	$100 \pm 10,8$	-
		$2224,3 \pm 255,0$	$100 \pm 11,5$	-
ZOP	10	$1299,5 \pm 217,8$	$74,2 \pm 12,4$	$25,8 \pm 12,4$
		$1201,0 \pm 120,7^*$	$54,0 \pm 5,4$	$46,0 \pm 5,4$
	50	$801,4 \pm 54,4$	$45,8 \pm 3,1$	$54,2 \pm 3,1$
		$846,0 \pm 32,9$	$38,0 \pm 1,5$	$62,0 \pm 1,5$
VE-821	10	$1289,2 \pm 55,5$	$73,6 \pm 3,2$	$26,4 \pm 3,2$
		$1401,0 \pm 111,8$	$63,0 \pm 5,0$	$37,0 \pm 5,0$
	50	$1097,6 \pm 0,0$	$62,7 \pm 0,0$	$37,3 \pm 0,0$
		$1065,3 \pm 181,9$	$47,9 \pm 8,2$	$52,0 \pm 8,2$
BER	10	$1190,5 \pm 64,6$	$68,0 \pm 3,7$	$32,0 \pm 3,7$
		$1496,1 \pm 14,8$	$67,3 \pm 0,7$	$32,7 \pm 0,7$
	50	$1087,2 \pm 79,3$	$62,1 \pm 4,5$	$37,9 \pm 4,5$
		$1246,9 \pm 58,5$	$56,1 \pm 2,5$	$43,9 \pm 2,5$

Hodnoty specifické aktivity jsou v tabulce uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka jednotlivých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **INH** inhibitor, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci, * vypočteno z duplikátu.



Obr. 11: Graficky znázorněné účinky vybraných inhibitorů na aktivitu enzymu CBR1

Výsledky jsou v grafu uvedeny jako průměr specifické aktivity v % \pm směrodatná odchylka dvou nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu. Z těchto hodnot jsou pak zde také vypočteny průměrné hodnoty inhibice v %. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci.

Z předložených výsledků v tabulce a grafu je patrné, že částečnou redukci aktivity enzymu CBR1 vykazovaly všechny INH. ZOP, VE-821 a BER konkrétně při 10 μ M koncentracích inhibovali činnost CBR1 ze 36,6 %, respektive ze 32,3 % a ze 32,4 %. 50 μ M koncentrace ZOP pak vedla ke snížení aktivity enzymu o 58,6 %, v případě VE-821 o 45,6 % a u BER o 41,3 %.

Tab. 10: Celkový přehled výsledků ZS vlivu vybraných INH na aktivitu vybraných enzymů

INH [μ M]	Inhibice aktivity enzymů [%]				
	AKR1A1	AKR1B1	AKR1B10	AKR1C3	CBR1
ZOP 10	2,1	79,9	7,7	82,7	36,6
ZOP 50	7,7	80,7	24,7	94,6	58,6
VE-821 10	11,8	17,0	5,4	16,5	32,3
VE-821 50	29,1	26,4	6,9	27,4	45,6
BER 10	19,3	26,9	7,2	11,1	32,4
BER 50	37,0	51,8	26,1	31,3	41,3

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr míry inhibice v % ze dvou nezávislých měření, ve kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. **ZOP** zopolrestat, **BER** berzosertib. **Tučně** jsou vyznačeny hodnoty nejvyššího inhibičního účinku.

Na základě výsledků ZS byl pro další fáze experimentů, určení hodnoty IC₅₀, K_i a typu inhibice a pevnosti vazby INH k enzymu, vybrán INH ZOP, který prokázal nejvyšší inhibiční aktivitu ze všech zkoumaných látek, a to hned vůči dvěma enzymům, AKR1B1 a 1C3. Přehled výsledků ZS ilustruje tabulka Tab. 10.

ANT jsou chemoterapeutika, která organismus z největší části metabolizuje prostřednictvím CRE. Karbonylové skupiny jsou převedeny na hydroxy skupiny, a vzniklý alkoholový produkt ztrácí účinnost vůči nádorovým buňkám, a současně může více poškozovat zdravé tkáně těla (Piska et al. 2017). Společné podání selektivních INH těchto enzymů s ANT by mohlo zlepšit celkový farmakologický profil daných léčiv (Plebuch et al. 2007). Mimo metabolismus xenobiotik představené enzymy v organismu zastávají také další významné funkce.

AKR1C3 fyziologicky katalyzuje syntézu a přeměnu endogenních PG nebo pohlavních hormonů, nicméně s vysokými hladinami tohoto enzymu se pojí i rozvoj a progresse hormon-dependentních nádorových onemocnění. Studie vykonaná skupinou Hofman et al. (2014) prokázala, že AKR1C3 má výrazný vliv na rozvoj rezistence

nádorových buněk i vůči DAUN a IDA. Snížení činnosti představeného enzymu tak ukazuje na možnost zlepšení hned několika aspektů terapie hormon-dependentních nádorových onemocnění zároveň (Hofman et al. 2014, Byrns et al. 2011, Penning 2015). Mezi popsané INH enzymu AKR1C3 se řadí např. nesteroidní antiflogistikum indometacin s IC_{50} 2,3 μ M a vysokou selektivitou pro AKR1C3 oproti izomorfám AKR1C1 a 1C2 (Byrns et al. 2011), dále také steroidní látky medroxyprogesteron acetát, jež je zkoušen s bezafibrátem pro terapii AML (Khanim et al. 2009), nebo některé estrogenové laktony jejichž IC_{50} se pohybují až v nízkých hodnotách nM. (Bydal et al. 2009).

V porovnání s našimi výsledky byla podobná míra inhibice enzymu AKR1C3 v *in vitro* studiích pozorována např. u tipifarnibu, jehož koncentrace 10 μ M snížila aktivitu enzymu o 88,0 %, a v koncentraci 50 μ M došlo ke snížení aktivity o 92,9 % (Hrbáčová 2024), nebo také u ibrutinibu, INH Brutonovy tyrosinkinasy (BTKi), který již v koncentraci 10 μ M snižoval aktivitu AKR1C3 o 94 %, a jeho vyšší koncentrace (50 μ M) způsobila pokles aktivity enzymu o 96,4 % (Hudáčová 2019). Olaparib je látka se schválenými indikacemi FDA k terapii některých nádorových onemocnění, např. prsu nebo vaječníků (Mateo et al. 2019). Jeho aktivita vůči AKR1C3 byla rovněž podobná účinkům ZOP. Při koncentraci 10 μ M olaparib inhiboval aktivitu AKR1C3 ze 74,6 %, a při koncentraci 50 μ M až z 91,2 % (Lekešová 2021).

K účinkům AKR1B1 patří např. katalýza přeměny Glc na sorbitol. Za hyperglykemického stavu mohou vysoké hladiny tohoto cukerného alkoholu v organismu způsobit rozvoj a progresi komplikací patrných u diabetických pacientů (Khayami et al. 2010). Ovlivněním hladin $PGF_{2\alpha}$ a aktivací NF- κ B může AKR1B1 zvýšit riziko vzniku infekčních i nádorových onemocnění (Patel et al. 2018). Nadměrně vysoké hladiny AKR1B1 jsou patrné také u některých nádorových onemocnění (Saraswat et al. 2006). Látky s potenciálem inhibice tohoto enzymu jsou tak z pohledu terapie rovněž velmi atraktivní.

Pro řešení komplikací spojených s diabetem bylo testováno velké množství látek. Většina inhibitorů aldosareduktasy však selhala během klinických studií ať už kvůli nutnosti podání vysokých dávek léčiva, nespecifickému působení nebo nežádoucím účinkům (Tammali et al. 2011). Dodnes je z této skupiny INH aldosareduktasy schválený a obchodovaný pouze epalrestat, a to jen v Japonsku (Hotta et al. 1996). V klinické studii

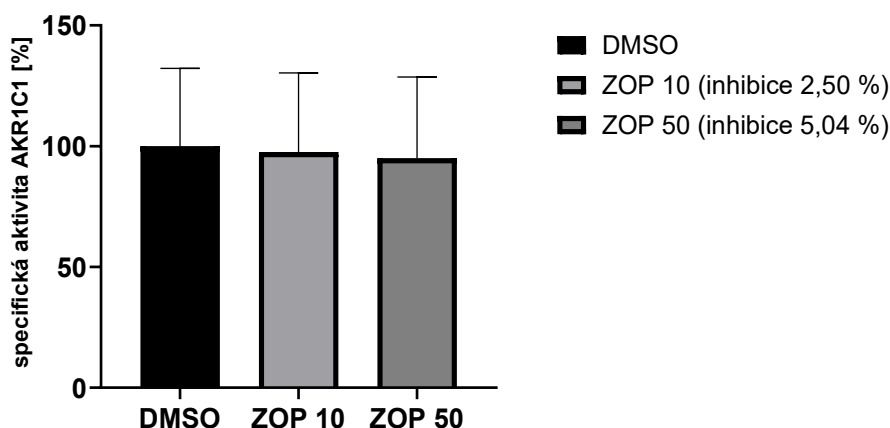
Asano et al. (2004) byl ale ve snížení hladin sorbitolu prokázán velmi slibný účinek fidarestatu, s IC_{50} 9,2 nM a selektivní vazbou k AKR1B1, i bez navození závažnějších nežádoucích účinků (Asano et al. 2004).

Wu et al. (2017) ve své práci poukazují na význam inhibice AKR1B1 z pohledu terapie bazálního karcinomu prsu. Nadměrná exprese tohoto enzymu v prsní tkáni totiž podporuje růst nádoru a tvorbu metastáz, a je spojena se špatnou prognózou. V *in vitro* studiích pozorovali pozitivní vliv epalrestatu na snížení migrace a invaze nádorových buněčných linií (Wu et al. 2017). Epalrestat je řazen do stejné skupiny látek jako ZOP. Je tedy pravděpodobné, že by ZOP mohl být, i vzhledem k silné inhibiční aktivitě vůči enzymu AKR1B1, v terapii tohoto nádorového onemocnění účinný.

Při porovnání dalších prací zkoumajících snížení aktivity AKR1B1 *in vitro*, nebyla patrná tak velká míra inhibice, jako v našich experimentech. Např. z výsledků Hudáčové (2019) vyplývá inhibice aktivity AKR1B1 neratinibem jen z 4,2 % při 10 μ M koncentraci a z 8,3 % při 50 μ M koncentraci (Hudáčová 2019). Nízké hodnoty inhibice AKR1B1 vykazoval např. i olaparib, u kterého byla při 10 μ M koncentraci míra inhibice dokonce nulová, a 50 μ M koncentrace snížila aktivitu enzymu jen na 97,1 % (Lekešová 2021). Našimi experimenty byl tedy potvrzen literaturou popsán silný inhibiční účinek ZOP vůči aldoseduktase, a další parametry tohoto inhibičního působení byly testovány i v této diplomové práci.

5.1.3 AKR1C1

Enzym AKR1C1 byl použit v koncentraci 5 μg /reakci, inkubace probíhala po dobu 60 min. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 11), graf znázorňuje spojení obou nezávislých měření s popisem průměrné hodnoty inhibice v % (Obr. 12).



Obr. 12: Graficky znázorněné účinky ZOP na aktivitu enzymu AKR1C1

Výsledky jsou uvedeny jako průměr specifické aktivity \pm směrodatná odchylka dvou nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci.

Tab. 11: Výsledky základního screeningu ZOP s enzymem AKR1C1

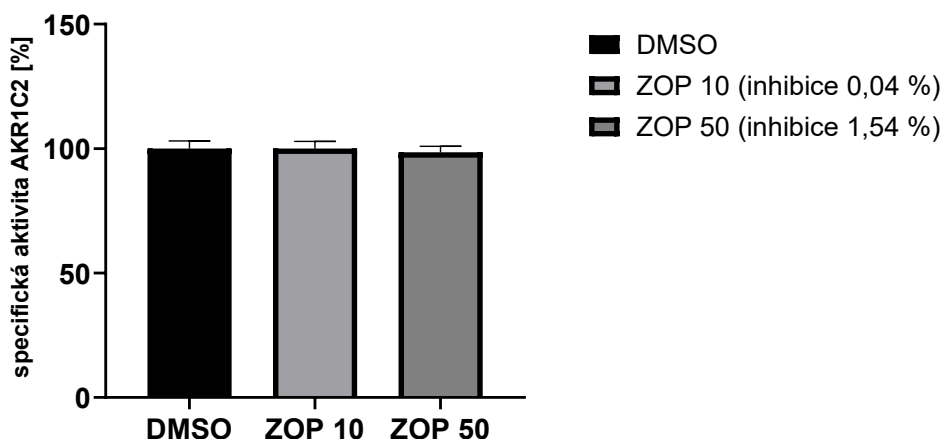
AKR1C1	Koncentrace INH v reakci [μM]	Specifická aktivita [nmol/mg/min]	Specifická aktivita [%]	Inhibice [%]
DMSO	0	1,35 \pm 0,03	100,00 \pm 1,87	-
		2,48 \pm 0,01	100,00 \pm 0,42	-
ZOP	10	1,30 \pm 0,04	95,78 \pm 2,74	4,22 \pm 2,74
		2,44 \pm 0,01	98,44 \pm 0,20	1,56 \pm 0,20
ZOP	50	1,23 \pm 0,03	91,07 \pm 1,91	8,93 \pm 1,91
		2,41 \pm 0,01	97,09 \pm 0,47	2,91 \pm 0,47

Hodnoty specifické aktivity jsou v tabulce uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka dvou navzájem nezávislých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci.

Z grafu i hodnot uvedených v tabulce je patrné, že INH ZOP nemá na aktivitu enzymu AKR1C1 nijak výrazný vliv. Nejvyšší průměrná hodnota inhibice ZOP ze dvou měření dosahuje 5,04 % při 50 μM koncentraci.

5.1.3 AKR1C2

Enzym AKR1C2 byl použit v koncentraci 5 μg /reakci, inkubace probíhala po dobu 60 min. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 12), graf znázorňuje spojení obou nezávislých měření s popisem průměrné hodnoty inhibice v % (Obr. 13).



Obr. 13: Graficky znázorněné účinky ZOP na aktivitu enzymu AKR1C2

Výsledky jsou uvedeny jako průměr specifické aktivity \pm směrodatná odchylka dvou nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci.

Tab. 12: Výsledky základního screeningu ZOP s enzymem AKR1C2

AKR1C2	Koncentrace INH v reakci [μM]	Specifická aktivita [nmol/mg/min]	Specifická aktivita [%]	Inhibice [%]
DMSO	0	2,46 \pm 0,02	100 \pm 0,74	-
		2,33 \pm 0,01	100 \pm 0,43	-
ZOP	10	2,45 \pm 0,01	99,39 \pm 0,21	0,61 \pm 0,21
		2,32 \pm 0,02*	99,46 \pm 0,76*	0,54 \pm 0,76*
	50	2,41 \pm 0,02	97,96 \pm 0,61	2,05 \pm 0,61
		2,31 \pm 0,01	99,0 \pm 0,54	1,01 \pm 0,54

Hodnoty specifické aktivity jsou v tabulce uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka dvou navzájem nezávislých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. **DMSO** kontrolní vzorek s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány, **ZOP** zopolrestat, **10** 10 μM koncentrace inhibitoru v reakci, **50** 50 μM koncentrace inhibitoru v reakci.

Z grafu i hodnot uvedených v tabulce je patrné, že INH ZOP nemá na aktivitu enzymu AKR1C2 prakticky žádný vliv. Nejvyšší průměrná hodnota inhibice ZOP ze dvou měření dosahuje pouhých 1,54 % při 50 μM koncentraci.

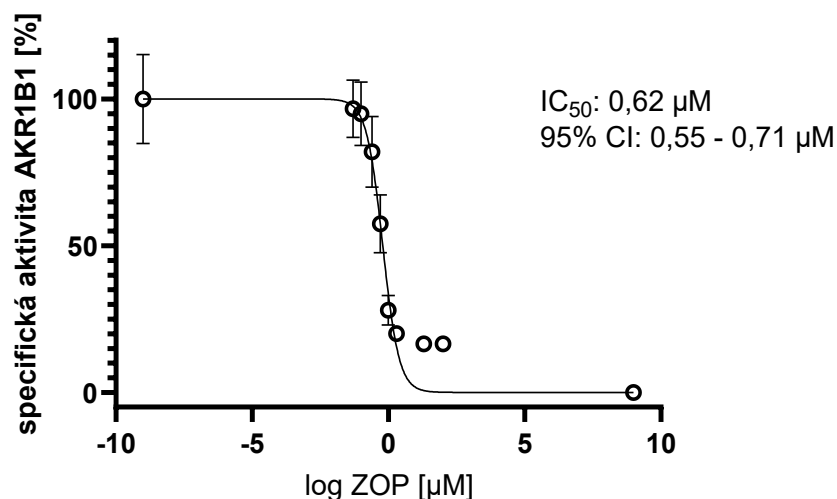
5.2 Stanovení hodnoty IC₅₀

Hodnota IC₅₀ vyjadřuje takovou koncentraci INH, při které daný enzym vykazuje pouze poloviční aktivitu, tedy jeho redukovanou katalytickou činností vzniká o 50 % méně produktů daných reakcí. Obecně platí, že čím nižší hodnotu IC₅₀ daný INH má, tím menší množství je jej potřebné pro dosažení požadovaných účinků. Stanovení této hodnoty jsme podle výsledků ZS provedli se ZOP v kombinacích s enzymy AKR1B1 a 1C3, u kterých byl naměřen nejvyšší inhibiční potenciál. Při stanovování IC₅₀ jsme sledovali vliv zvýšení koncentrace INH na aktivitu enzymů v přeměně substrátu DAUN.

5.2.1 AKR1B1

V tomto případě bylo inhibiční rozpětí ZOP nastaveno na koncentrace od 0,05 po 100 μM včetně DMSO kontroly (0 μM). Experiment byl proveden celkem třikrát, přičemž každou reakci jsme měřili opět v triplicátu. Inkubace probíhaly 60 min.

Výsledky experimentu jsou ukázány v grafu (Obr. 14) a v tabulkách (Tab. 13 a Tab. 14). Graf popisuje závislost specifické aktivity enzymu AKR1B1 na logaritmické koncentraci ZOP jako průměr se SD tří nezávislých měření. V první tabulce (Tab. 13) jsou při různých koncentracích ZOP uvedeny průměrné hodnoty specifické aktivity enzymu tří nezávislých měření se SD. Druhá tabulka (Tab. 14) obsahuje průměrné hodnoty IC₅₀ ZOP jednotlivých měření zvlášť, a také celkový průměr těchto tří hodnot se SD.



Obr. 14: Grafické znázornění výsledků pro určení hodnoty IC_{50} ZOP s AKR1B1

Výsledky jsou uvedeny jako průměr specifické aktivity \pm směrodatná odchylka tří nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplikátu. **CI** konfidenční interval, **ZOP** zopolrestat.

Tab. 13: Hodnoty specifické aktivity AKR1B1 v kombinacích s různými koncentracemi ZOP

Koncentrace ZOP v reakci [μM]	Specifická aktivita AKR1B1	
	[nmol/mg/min]	[%]
0 (DMSO)	$15,6 \pm 2,4$	$100 \pm 15,2$
0,05	$15,0 \pm 1,5$	$96,6 \pm 9,7$
0,1	$14,8 \pm 1,6$	$95,0 \pm 10,9$
0,25	$12,8 \pm 1,9$	$82,0 \pm 12,1$
0,5	$8,9 \pm 1,5$	$57,5 \pm 9,9$
1	$4,4 \pm 0,8$	$28,0 \pm 5,0$
2	$3,1 \pm 0,2$	$20,1 \pm 1,4$
20	$2,6 \pm 0,3$	$16,6 \pm 1,8$
100	$2,6 \pm 0,1$	$16,6 \pm 0,6$

Výsledky jsou uvedeny jako průměr specifické aktivity \pm SD tří navzájem nezávislých měření, ve kterých byly jednotlivé vzorky měřeny v triplikátu. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, **SD** směrodatná odchylka, **ZOP** zopolrestat.

Tab. 14: Hodnoty IC_{50} ZOP při reakcích s AKR1B1

AKR1B1	1. měření	2. měření	3. měření	průměrná hodnota \pm SD
IC_{50} ZOP [μM]	0,57	0,67	0,64	$0,63 \pm 0,04$

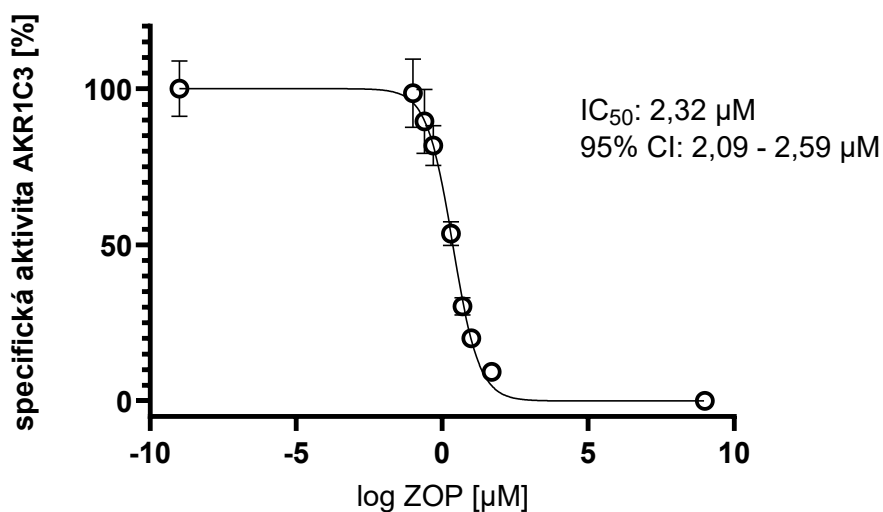
V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty IC_{50} ZOP z každého měření, a také průměrná hodnota těchto měření se směrodatnou odchylkou **SD**.

Z předloženého grafu (Obr. 14) i údajů obsažených v tabulce (Tab. 13) můžeme vidět, že specifická aktivita enzymu AKR1B1 klesala se zvyšující se koncentrací INH. Průměrná hodnota IC_{50} ZOP v kombinaci s AKR1B1 je $0,63 \pm 0,04 \mu\text{M}$.

5.2.2 AKR1C3

Pro stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} ZOP s enzymem AKR1C3 byly zvoleny koncentrace od 0,1 po 50 μM včetně DMSO kontroly (0 μM). Experiment byl proveden celkem třikrát, přičemž každou reakci jsme měřili opět v triplicátu. Inkubace probíhaly po dobu 30 min.

Výsledky experimentu jsou ukázány v grafu (Obr. 15) a v tabulkách (Tab. 15 a Tab. 16). Graf popisuje závislost specifické aktivity enzymu AKR1C3 na logaritické koncentraci ZOP jako průměr se SD tří nezávislých měření. V první tabulce (Tab. 15) jsou při různých koncentracích ZOP uvedeny průměrné hodnoty specifické aktivity enzymu všech tří nezávislých měření se SD. Druhá tabulka (Tab. 16) poté obsahuje průměrné hodnoty IC_{50} ZOP jednotlivých měření zvlášť, a také celkový průměr těchto tří hodnot se SD.



Obr. 15: Grafické znázornění výsledků pro určení hodnoty IC_{50} ZOP s AKR1C3

Výsledky jsou uvedeny jako průměr specifické aktivity \pm směrodatná odchylka tří nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu. **CI** konfidenční interval, **ZOP** zopolrestat.

Tab. 15: Hodnoty specifické aktivity AKR1C3 v kombinacích s různými koncentracemi ZOP

Koncentrace ZOP v reakci [μM]	Specifická aktivita AKR1C3	
	[nmol/mg/min]	[%]
0 (DMSO)	171,8 \pm 15,3	100 \pm 8,9
0,1	169,3 \pm 18,7	98,5 \pm 10,9
0,25	153,8 \pm 17,6	89,5 \pm 10,2
0,5	140,5 \pm 10,9	81,8 \pm 6,3
2	92,0 \pm 6,6	53,6 \pm 3,8
5	52,1 \pm 4,9	30,3 \pm 2,8
10	34,4 \pm 3,0	20,0 \pm 1,7
50	15,9 \pm 2,8	9,3 \pm 1,6

Výsledky jsou uvedeny jako průměr specifické aktivity \pm SD tří navzájem nezávislých měření, ve kterých byly jednotlivé vzorky měřeny v triplikátech. **DMSO** kontrolní vzorek (100 %) s nulovou koncentrací inhibitoru, k němuž byly specifické aktivity enzymů porovnávány. **SD** směrodatná odchylka, **ZOP** zopolrestat.

Tab. 16: Hodnoty IC_{50} ZOP při reakcích s AKR1C3

AKR1C3	1. měření	2. měření	3. měření	průměrná hodnota \pm SD
IC_{50} ZOP [μM]	2,59	2,30	2,08	2,32 \pm 0,26

V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty IC_{50} ZOP z každého měření, a také průměrná hodnota těchto měření se směrodatnou odchylkou (**SD**).

Z předloženého grafu i údajů obsažených v Tab. 15 můžeme vidět, že specifická aktivita enzymu AKR1C3 klesala se zvyšující se koncentrací INH. Průměrná hodnota IC_{50} ZOP v kombinaci s AKR1C3 je 2,32 \pm 0,26 μM .

Nízké hodnoty IC_{50} INH značí jeho vyšší afinitu k enzymovému cíli, což v praxi znamená, že už malé množství dané látky vyvolá potřebný účinek, a organismus tak může být ušetřen systémových toxických účinků (Aykul a Martinez-Hackert 2016).

V našich *in vitro* experimentech dosahovaly IC_{50} ZOP u obou enzymů relativně nízkých hodnot. Při kombinaci ZOP s AKR1B1 byla IC_{50} 0,63 \pm 0,04 μM , při kombinaci ZOP s AKR1C3 poté 2,32 \pm 0,26 μM . V porovnání s jinými *in vitro* experimenty byl ZOP zkoumán např., rovněž vůči enzymu AKR1A1. Zde byla hodnota IC_{50} ZOP naměřena velmi vysoká, a sice 190 μM (Karásková 2019). Z jiných INH snižujících aktivitu AKR1C3 měl např. olaparib hodnotu IC_{50} v průměru tří měření 3,8 \pm 0,4 μM (Lekešová 2021), tedy o něco málo vyšší než u našich experimentů se ZOP. Ještě nižší hodnota IC_{50} při použití AKR1C3 byla naměřena u ibrutinibu, kde dosahovala hodnoty 1,5 μM (Hudáčová 2019).

Skupina Ehrig et al. (1994) testovala několik látek na rekombinantním enzymu AKR1B1. V případě ZOP naměřili hodnotu IC_{50} 0,06 μ M, tedy desetkrát nižší, než jevíly výsledky našich experimentů. U tolrestatu byla IC_{50} 0,1 μ M, a sorbinil měl IC_{50} 2 μ M (Ehrig et al. 1994).

Při porovnávání IC_{50} klinicky významných INH s literaturou se setkáme nejčastěji s experimenty vykonanými na buněčných liniích. Takovým příkladem může být studie provedená skupinou Novotná et al. (2020). Věnovali se možnostem ovlivnění ANT-rezistence v terapii AML, ve které je DAUN dodnes nepostradatelným léčivem. Standardně se pro prevenci rozvoje rezistence nádorových buněk různá cytostatika navzájem kombinují (Bayat Mokhtari et al. 2017). V představené studii byl zkoumán synergický účinek dalších cytostatik (např. kyseliny all-trans-retinové, cytarabinu, prednisolonu) s DAUN v přítomnosti enzymu AKR1C3, který je u AML zvýšeně exprimován (Birtwistle et al. 2009). Z výsledků studie plynulo zvýšení protinádorového působení použitých cytostatik, došlo zároveň k poklesu tvorby méně účinného metabolitu DAUNolu. Nejsilnější inhibice enzymu AKR1C3 byla na dospělých leukemických buněčných liniích pozorována u kyseliny all-trans-retinové, jejíž hodnota IC_{50} byla nízká, 1,17 μ M (Novotná et al. 2020).

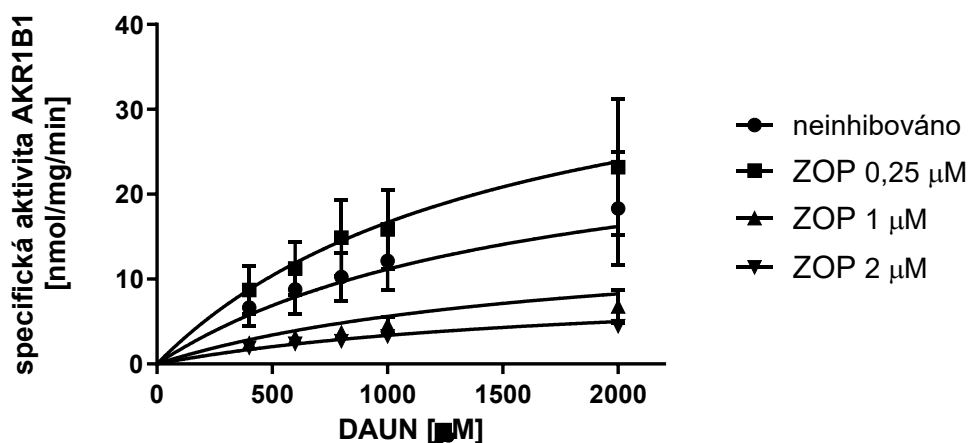
5.3 Stanovení hodnoty K_i a typu inhibice

Inhibiční konstanta K_i je v podstatě disociační konstantou komplexu INH-enzym a popisuje sílu vazby mezi INH a enzymem. Inhibitory s nízkou hodnotou K_i jsou charakteristické vyšší afinitou k danému enzymu.

Typů inhibice může být několik, a zpravidla se určují z linearizované rovnice Michaelise a Mentenové dle Lineweaver-Burka.

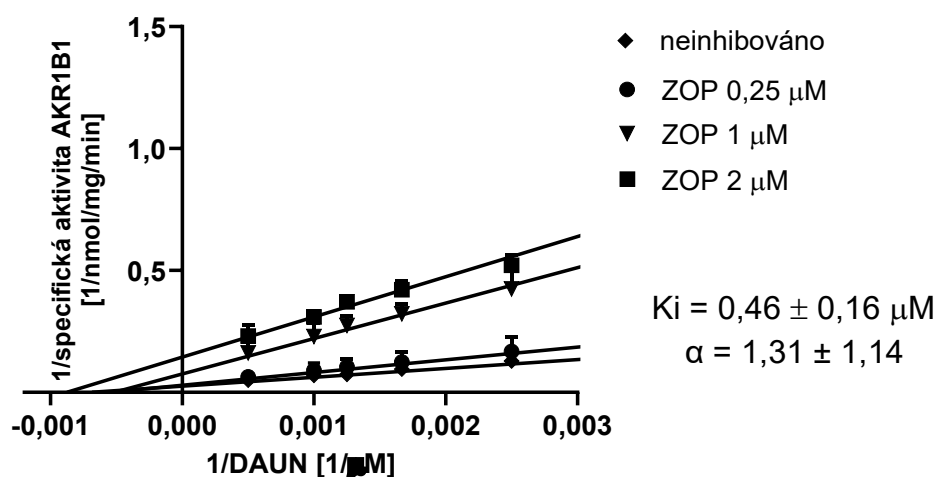
5.3.1 AKR1B1

Inhibiční konstantu K_i ZOP jsme v tomto případě stanovovali proměřováním šesti různých koncentrací substrátu DAUN (200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM /reakci) se čtyřmi koncentracemi INH (0,25, 1 a 2 μM) včetně kontroly DMSO (0 μM) v přítomnosti enzymu AKR1B1. Experiment byl proveden celkem třikrát, každá reakce byla měřena v triplikátu a inkubace probíhaly po dobu 60 min. Z výsledných hodnot tří nezávislých měření byla vypočtena hodnota K_i a sestrojeny grafy. Obr. 16 prezentuje závislost specifické aktivity enzymu na koncentraci substrátu dle Michaelise a Mentenové, ve druhém grafu (Obr. 17) je poté tato závislost linearizovaná dvojitým převrácením hodnot dle Lineweavera-Burka, odkud je možné určit typ inhibice.



Obr. 16: Graf dle Michaelise a Mentenové, závislost specifické aktivity AKR1B1 na měnících se koncentracích substrátu (200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM) a INH (0, 0,25, 1 a 2 μM)

Uvedené hodnoty představují průměr \pm směrodatné odchylky tří navzájem nezávislých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplikátu. ZOP zopolrestat, DAUN daunorubicin.



Obr. 17: Graf dle Lineweaver-Burka, dvojité reciproký výnos závislosti specifické aktivity AKR1B1 na měnících se koncentracích substrátu (200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM) a INH (0, 0,25, 1 a 2 μM), k určení typu inhibice

Uvedené hodnoty představují průměr \pm směrodatné odchylky tří navzájem nezávislých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. ZOP zopolrestat, DAUN daunorubicin. K_i inhibiční konstanta, α faktor alfa.

K_i ZOP byla vypočtena programem GraphPad Prism v průměru tří nezávislých měření a její hodnota činí $0,46 \pm 0,16 \mu\text{M}$. Co se typu inhibice týče, z výsledků obsažených v grafech jsou zde patrné znaky jak nekompetitivní inhibice, tak inhibice smíšené. Při nekompetitivní inhibici dochází ke snížení V_{max} bez ovlivnění hodnoty K_m , což můžeme jasně pozorovat v prvním grafu (Obr. 16) podle tvaru křivek. Jednotlivé přímky by se u tohoto typu inhibice měly také protnout v jednom bodě na ose x. Z grafu (Obr. 17) však vidíme, že se v jednom bodě protínají jen tři přímky, poslední z nich jeví tendenci spíše pro smíšený typ inhibice.

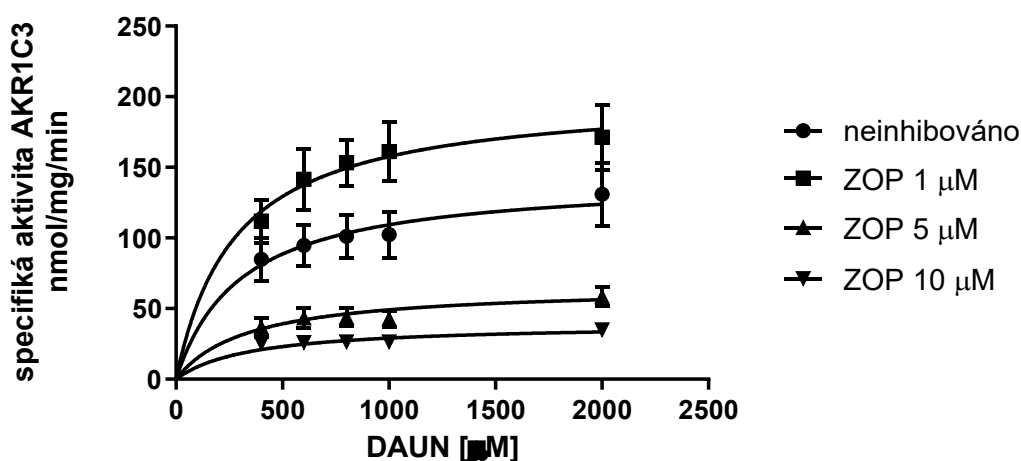
Faktor α vyjadřuje vliv inhibitoru na afinitu enzymu k substrátu, a stejně tak účinek substrátu na afinitu enzymu k inhibitoru. Může být také znakem určujícím typ inhibice. Např. v případě plně nekompetitivní inhibice by jeho hodnota měla být rovna 0. V literatuře se ovšem někdy uvádí, že pokud má daný INH afinitu k volnému enzymu a komplexu enzym-substrát stejně velkou, je hodnota faktoru α rovna 1, a inhibice je nekompetitivní. Pokud však INH jeví vyšší afinitu k jedné z těchto dvou enzymových forem, pak se faktor α nerovná 1, a mechanismus působení daného INH je považován za smíšený (Copeland, 2000).

Z výše uvedeného lze konstatovat, že ZOP vystupuje proti enzymu AKR1B1 jako INH se smíšeným typem inhibice, která se ovšem nejvíce blíží inhibici nekompetitivní.

Kompetitivní inhibitory účinkují pouze v případě vazby do aktivního místa enzymu, přičemž o ni soutěží se substráty daných enzymů. Nekompetitivní INH se naproti tomu vážou na jiné než aktivní místo, a mohou tedy ovlivňovat činnost jak volného enzymu, tak i enzymu vázaného v komplexu se substrátem. Smíšené INH pak mohou účinkovat oběma způsoby.

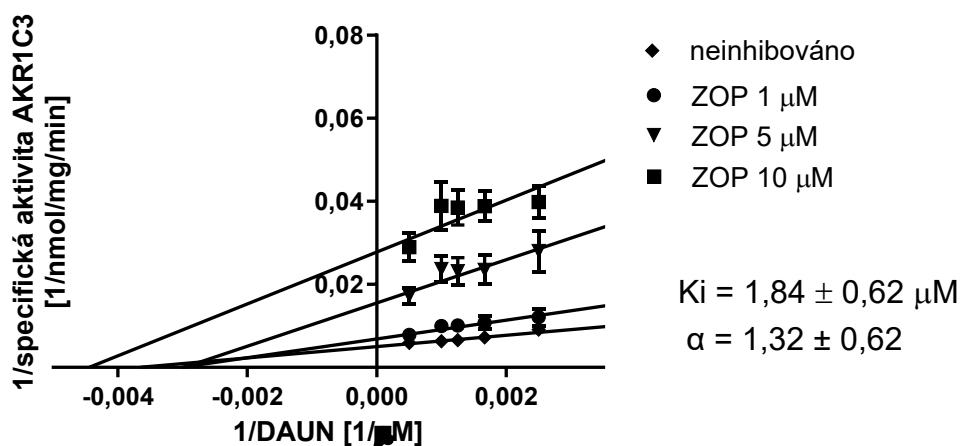
5.3.2 AKR1C3

Inhibiční konstantu K_i ZOP jsme v tomto případě stanovovali proměřováním šesti různých koncentrací substrátu DAUN (200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM /reakci) se čtyřmi koncentracemi INH (1, 5 a 10 μM) včetně kontroly DMSO (0 μM) v přítomnosti enzymu AKR1C3. Experiment byl proveden celkem třikrát, každá reakce byla měřena v triplicátu a inkubace probíhaly po dobu 36 min. Výsledky jsou uvedeny jako spojení tří nezávislých měření níže, Obr. 18 prezentuje závislost specifické aktivity enzymu na koncentraci substrátu dle Michaelise a Mentenové, ve druhém grafu (Obr. 19) je poté tato závislost linearizovaná dvojitým převrácením hodnot dle Lineweavera-Burka, odkud můžeme určit typ inhibice.



Obr. 18: Graf dle Michaelise a Mentenové, závislost specifické aktivity AKR1C3 na měnících se koncentracích substrátu (200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM) a INH (0, 1, 5 a 10 μM)

Uvedené hodnoty představují průměr \pm směrodatné odchylky tří navzájem nezávislých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. ZOP zopolrestat, DAUN daunorubicin.



Obr. 19: Graf dle Lineweaver-Burka, dvojité reciproký výnos závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na měnících se koncentracích substrátu (200, 400, 600, 800, 1000 a 2000 μM) a INH (0, 1, 5 a 10 μM), k určení typu inhibice

Uvedené hodnoty představují průměr \pm směrodatné odchylky tří navzájem nezávislých měření, u kterých byla každá reakce provedena v triplicátu. ZOP zopolrestat, DAUN daunorubicin. K_i inhibiční konstanta, α faktor alfa.

K_i ZOP byla vypočtena programem GrapPad Prism v průměru tří nezávislých měření a její hodnota je $1,84 \pm 0,62 \mu\text{M}$. Podobně jako v předchozím případě, i zde se jedná o smíšený typ inhibice s výraznější tendencí k nekompetitivnímu působení.

V *in vitro* studii O'Brian et al. (1982) pozorovali vliv různých látek na aktivitu lidské aldoreduktasy mozku. Sorbinil zde vůči enzymu AKR1B1 vykazoval nekompetitivní inhibici, a jeho $K_i = 150 \mu\text{M}$ byla oproti našim výsledkům velmi vysoká (O'Brian et al. 1982). Mezi INH aldoreduktasy patří i některé přírodní polyfenolické kyseliny. Např. kyselina chlorogenová se, podobně jako ZOP v této práci, k enzymu AKR1B1 váže jako smíšený INH, a její hodnota K_i je $1,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$, tedy o něco vyšší než v případě ZOP. Kyselina tříslová je poté nekompetitivním INH AKR1B1 s hodnotou $K_i 0,6 \pm 1,1 \mu\text{M}$ podobnou našim výsledkům (Alim et al 2017).

Belinostat se v reakcích s enzymem AKR1C3 projevil také jako smíšený INH s inklinací k nekompetitivní inhibici. Jeho $K_i 8,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$ byla v porovnání s našimi výsledky vyšší (Slámová 2021). Nekompetitivním INH enzymu AKR1C3 je dále např. olaparib nebo asciminib, jejichž hodnoty K_i byly oproti výsledkům této práce opět vyšší. K_i olaparibu je $3,99 \pm 0,17 \mu\text{M}$ a K_i asciminibu $15,30 \pm 0,57 \mu\text{M}$ (Lekešová 2021,

Tučková 2023). INH ibrutinib s nekompetitivní vazbou k AKR1C3 jeví podobnou hodnotu K_i 2,1 μM (Hudáčová 2019), jako ZOP v této práci.

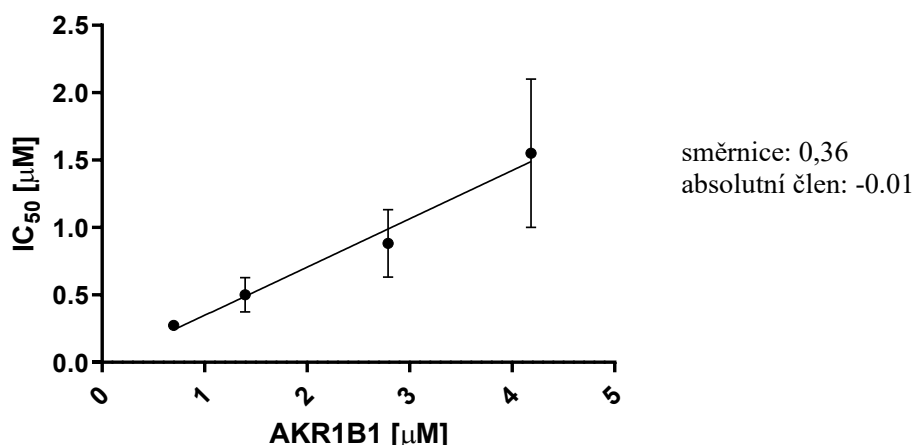
V jiné studii vykonané skupinou Morell et al. (2020) byla K_i ibrutinibu v kombinaci s AKR1C3 naměřena ještě nižší, 0,3 μM , a u dalšího BTKi, akalabrutinibu, byla K_i 0,5 μM . Ve této práci navázali na poznatky studie Rushworth et al. (2014) o potenciaci antineoplastického účinku základních léčiv AML, cytarabinu a DAUN, při současném použití ibrutinibu. Ten byl v představené studii pozorován z pohledu inhibice BTK, nadměrně exprimované u AML (Rusworth et al. 2014). Morell et al. (2020) zaznamenali taktéž synergický cytotoxický vliv kombinace ibrutinibu s DAUN, ovšem zároveň popsali další významnou inhibiční aktivitu zmíněných BTKi, právě vůči enzymu AKR1C3. Pozorovali zde snížení konverze DAUN na jeho méně účinnou formu, DAUNol, a bylo zjištěno, že se ibrutinib i akalabrutinib k AKR1C3 vážou nekompetitivní pevnou vazbou (Morell et al. 2020). Představili tak další mechanismus BTKi v ovlivnění AML, skrze zásah do metabolismu ANT.

5.4 Stanovení pevnosti vazby inhibitoru k enzymu

Poslední částí naší práce bylo zjistit, zda se INH ZOP k vybraným enzymům váže pevnou vazbou. Takové INH k enzymům vykazují vysokou afinitu a mohou jejich aktivitu ovlivnit trvale. Byl zde pozorován vliv změny koncentrace enzymu na aktivitu INH, a byl hodnocen sklon výsledné přímky.

5.4.1 AKR1B1

V tomto případě jsme kombinovali stejné koncentrace ZOP jako při stanovování hodnoty IC_{50} (DMSO); 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 20 a 100 μM s koncentracemi enzymu AKR1B1 2,5, 5, 10 a 15 μM . Inkubace probíhala 60 min. Graf (Obr. 20) vyjadřuje závislost hodnoty IC_{50} ZOP na rostoucí koncentraci enzymu, výsledky jsou zde uvedeny jako průměr \pm SD tří nezávislých měření. V tabulce (Tab. 17) jsou uvedeny průměrné hodnoty IC_{50} ZOP každého měření a také výsledný průměr \pm SD těchto tří hodnot při různých koncentracích AKR1B1.



Obr. 20: Graficky znázorněná závislost hodnoty IC_{50} ZOP na měnící se koncentraci AKR1B1

Uvedené body představují průměr hodnot $IC_{50} \pm$ směrodatnou odchylku tří nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu. **Směrnice** vyjadřuje sklon přímky, **absolutní člen** zase průsečík přímky s osou y.

Tab. 17: Hodnoty IC_{50} ZOP při měnících se koncentracích enzymu AKR1B1

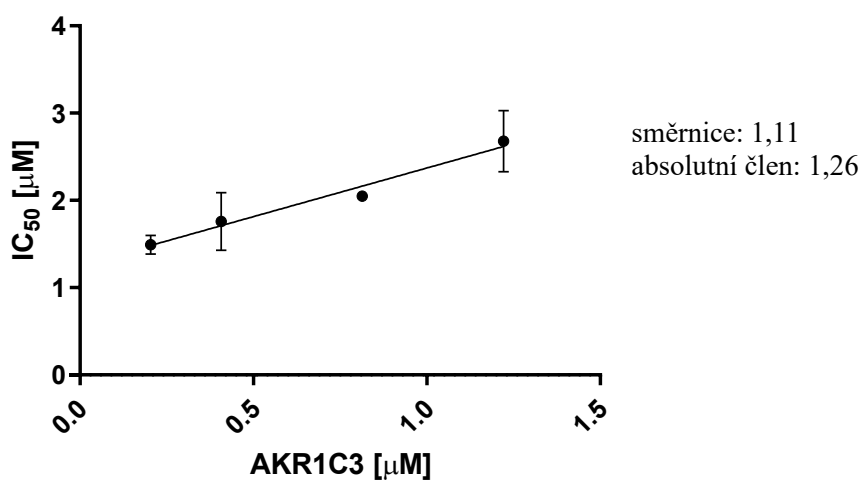
Koncentrace AKR1B1 [μg/reakci]	Hodnota IC_{50} ZOP [μM]			
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr \pm SD
2,5	0,30	0,24	0,29	0,28 \pm 0,03
5	0,62	0,52	0,36	0,50 \pm 0,13
10	1,09	0,95	0,6	0,88 \pm 0,25
15	1,92	1,8	0,92	1,55 \pm 0,55

V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty inhibiční koncentrace IC_{50} zopolrestatu **ZOP** z každého měření, a také průměrná hodnota těchto měření se směrodatnou odchylkou **SD**.

V tomto experimentu byl hodnocen sklon přímky. Jestliže se vzrůstající koncentrací enzymu roste také hodnota IC_{50} , jedná se pravděpodobně o pevně se vázající INH. Podle našich výsledků uvedených v grafu i v tabulce vidíme, že se IC_{50} s rostoucí koncentrací enzymu také zvyšovala, mohlo by se tedy potenciálně jednat o INH, který se k enzymu AKR1B1 váže ireverzibilně.

5.4.2 AKR1C3

V tomto případě jsme kombinovali stejné koncentrace ZOP jako při stanovování hodnoty IC_{50} 0 (DMSO kontrola); 0,1; 0,25; 0,5; 2; 5; 10 a 50 μM s koncentracemi enzymu AKR1C3 0,75 1,5 3 a 4,5 μM . Inkubace probíhala 60 min. Graf (Obr. 21) vyjadřuje závislost hodnoty IC_{50} ZOP na rostoucí koncentraci enzymu, výsledky jsou zde uvedeny jako průměr \pm SD tří nezávislých měření. V tabulce (Tab. 18) jsou uvedeny průměrné hodnoty IC_{50} ZOP každého měření a také výsledný průměr \pm SD těchto tří hodnot při různých koncentracích AKR1C3.



Obr. 21: Graficky znázorněná závislost hodnoty IC_{50} ZOP na měnící se koncentraci AKR1C3

Uvedené body představují průměr hodnot $IC_{50} \pm$ směrodatnou odchylku tří nezávislých měření, u kterých byl každý vzorek proveden v triplicátu.

Tab. 18: Hodnoty IC_{50} ZOP při měnících se koncentracích enzymu AKR1C3

Koncentrace AKR1C3 [μg /reakci]	Hodnota IC_{50} ZOP [μM]			
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr \pm SD
0,75	1,37	1,47	1,61	1,48 \pm 0,12
1,5	2,1	1,76	1,42	1,76 \pm 0,34
3	2,03	2,15	2,02	2,07 \pm 0,07
4,5	2,54	3,1	2,42	2,69 \pm 0,36

V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty inhibiční koncentrace IC_{50} zopolrestatu ZOP z každého měření, a také průměrná hodnota těchto měření se směrodatnou odchylkou SD.

Podobně jako v předešlém případě, i zde pozorujeme vzrůstající tendenci přímky i jednotlivých hodnot IC_{50} se zvyšující se koncentrací enzymu. Pravděpodobně by se tedy rovněž mohlo jednat o pevně se vázající INH.

Ireverzibilní inhibitory enzymů představují pro léčbu různých onemocnění, včetně těch nádorových, velmi cenné látky. Díky kovalentní vazbě aktivitu enzymů inhibují dlouhodobě, a mohou být úspěšnější v překování rezistence. S delším účinkem poté souvisí i méně časté podávání takových léčiv. (Yun et al. 2008, Bauer 2015).

Jako akompetitivní, pevně se vázající INH enzymu AKR1B1 byly popsány např. flavanony izolované z květenství chmele, konkrétně isoxanthohumol nebo 8-prenylnaringenin s K_i $0,17 \pm 0,02 \mu\text{M}$ a $0,30 \pm 0,03 \mu\text{M}$ v tomto pořadí (Seliger et al. 2018).

Příkladem nekompetitivního INH s pevnou vazbou k enzymu AKR1C3 pak mohou být např. tipifarnib (Grofková 2024), nebo BTKi akalabrutinib či ibrutinib (Morell et al., 2020).

Závěr

ANT mají dodnes v terapii nádorových onemocnění nezastupitelnou roli. Míra jejich účinku je ovšem značně omezena působením CRE z nadrodin AKR a SDR, které jsou často nadměrně exprimovány v nádorových tkáních. Činností těchto enzymů dochází ve velké míře k metabolické konverzi ANT na alkoholové metabolity s nižším cytotoxickým účinkem vůči nádorovým buňkám a zároveň s vyšším rizikem poškození zdravých buněk organismu, zejména pak buněk srdečního svalu.

V návaznosti na problémy spojené s ANT léčbou neustále probíhá výzkum a vývoj nejen nových ANT analogů s lepším farmakologickým profilem, ale i různých lékových forem a látek modifikujících aktivitu ochranných mechanismů nádorových buněk, včetně zmíněných CRE.

In vitro experimenty vykonané v této práci byly zaměřeny právě na inhibiční ovlivnění aktivity CRE. Nejprve se v rámci základního screeningu zkoumal vliv vybraných INH (ZOP, VE-821 a BER) vůči rekombinantním enzymům nadrodiny AKR (AKR1A1, 1B1, 1B10, a 1C3) a SDR (CBR1) s DAUN jako substrátem. Účinnost jednotlivých INH byla hodnocena podle množství utvořeného metabolitu DAUNolu.

Z výsledků základního screeningu vyplynulo, že k významné inhibici přeměny ANT došlo ve dvou případech, a sice v kombinaci ZOP s enzymem AKR1B1 a 1C3, s nimiž se také pokračovalo do dalších fází experimentu. ZOP inhiboval aktivitu AKR1B1 ze 79,9 % při koncentraci 10 μM a z 80,7 % při koncentraci 50 μM . Inhibice enzymu AKR1C3 byla ještě o něco vyšší, u 10 μM koncentrace ZOP došlo ke snížení aktivity enzymu o 82,7 % a o 94,6 % při 50 μM koncentraci ZOP.

U ZOP jsme následně vykonali ještě doplňkové experimenty s enzymy AKR1C1 a 1C2, abychom se ujistili, že i díky velmi malé metabolické aktivitě k DAUN není ani jejich inhibice signifikantní. U AKR1C1 byla aktivita enzymu snížena o $2,89 \pm 1,88$ % v případě 10 μM koncentrace ZOP a o $5,92 \pm 4,25$ % v případě 50 μM koncentrace. U enzymu AKR1C2 došlo při 10 μM koncentraci ZOP k poklesu aktivity enzymu o $0,58 \pm 0,05$ % a při koncentraci 50 μM o $1,53 \pm 0,74$ %. Inhibice aktivity těchto dvou enzymů byla tedy jen nepatrná.

V navazujících fázích experimentu jsme stanovovali další kinetické parametry ZOP u enzymů AKR1B1 i 1C3. Hodnota IC_{50} je koncentrací INH, která vyvolá 50% snížení aktivity enzymu. V kombinaci ZOP s enzymem AKR1B1 byla

IC₅₀ stanovena na $0,63 \pm 0,04 \mu\text{M}$ a v kombinaci s AKR1C3 odpovídala $2,32 \pm 0,26 \mu\text{M}$. Hodnoty IC₅₀ byly v obou případech relativně nízké, a je možné teoreticky konstatovat, že by při společném podání ZOP s DAUN mohly být i nižší dávky ZOP dostačující pro dosažení požadovaných účinků.

Typ inhibice ZOP k oběma enzymům jsme vyhodnotili jako smíšený s výraznější tendencí k nekompetitivní inhibici. Vyhodnocení proběhlo porovnáním kinetických parametrů (V_{max} a K_m) s grafickým vyjádřením dle Lineweaver-Burka a s faktorem α . Kompetitivní INH soutěží se substrátem o vazbu do aktivního místa enzymu, nekompetitivní se vážou na enzym mimo aktivní místo a koncentrace substrátu tedy na jejich aktivitu nemá vliv. Látky se smíšeným typem inhibice pak mohou účinkovat oběma způsoby. Hodnota K_i vyjadřuje afinitu INH k enzymu. U ZOP v kombinaci s AKR1B1 byla K_i stanovena na $0,46 \mu\text{M} \pm 0,16 \mu\text{M}$ a v kombinaci s enzymem AKR1C3 měla hodnotu $1,84 \pm 0,62 \mu\text{M}$. Nízké hodnoty K_i naznačují vyšší afinitu ZOP k oběma enzymům.

Vzhledem ke skutečnosti, že se typ inhibice ZOP k AKR1B1 i 1C3 blíží nejvíce právě nekompetitivní inhibici, provedli jsme také experimenty pro stanovení pevnosti vazby ZOP k těmto enzymům. U AKR1B1 i 1C3 jsme pozorovali růst hodnoty IC₅₀ se stoupající koncentrací enzymu, čímž jsme došli k závěrům, že se ZOP k oběma enzymům váže pevnou, ireverzibilní vazbou.

Výsledky představené v této práci jsou výstupem z *in vitro* experimentů vykonaných na rekombinantních enzymech. ZOP ve spojení s enzymy AKR1B1 i 1C3 vykazuje slibné účinky v ovlivnění metabolismu ANT. Kombinace ZOP s DAUN tak představuje další možnost pro zlepšení terapie nádorových onemocnění. Tyto poznatky bude třeba také ověřit výzkumem na konkrétních nádorových buněčných liniích.

Seznam zkratek

11 β -HSD1	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1
17 β -HSD	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
ABC	ATP-vázající efluxní transportér (ATP-Binding Cassette)
AIDS	syndrom získané imunodeficiency (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AKR	aldo-ketoreduktasa
AML	akutní myeloidní leukemie
ATR	Ataxia Telangiectasia a Rad3-related protein
ATRi	inhibitor Ataxia Telangiectasia a Rad3-related proteinu
BER	berzosertib
BTKi	inhibitor Brutonovy tyrosinkinasy
CBR1	karbonylreduktasa 1
CRE	karbonyl redukující enzym
DAUN	daunorubicin
DAUNol	daunorbicinol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EKG	elektrokardiograf
EPI	epirubicin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
Glc	glukosa
Glc-6-P-dehydrogenasa	enzym glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
Glc-6-P	enzym glukosa-6-fosfát
GLO1	enzym glyoxalasa 1
CHK1	z angl. checkpoint kinase 1
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace

IDA	idarubicin
INH	inhibitor
IL-6 (IL-8)	interleukin 6 (8)
KCD	kumulativní celoživotní dávka
K_i	inhibiční konstanta
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (Medium-chain Dehydrogenases/Reductases)
MeOH	methanol
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
min	minuta
miRNA	mikroRNA
NADP	natrium adenosin difosfát
NaPB	sodno-fosfátový pufr
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NI	neinhibovaná reakce
OPD	odpověď na poškození DNA
otm	otáček za minutu
PARP	poly(ADP-ribose)polymerasa
PG	prostaglandin
PGH ₂ , D ₂ , PGF _{2α} , 11 β -PGF _{2α}	typy prostaglandinu
P-gp	P-glykoprotein
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
s	sekunda
SD	směrodatná odchylka
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (Short-chain dehydrogenases/reductases)
siRNA	krátká interferující RNA (short interfering RNA)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TopII	enzym topoizomerasa II

UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)
ZOP	zopolrestat
ZS	základní screening

Použitá literatura

- ASANO, T., SAITO, Y., KAWAKAMI, M., YAMADA, N., SEKINO, H. et al. (2004). Erythrocytic sorbitol contents in diabetic patients correlate with blood aldose reductase protein contents and plasma glucose levels and are normalized by the potent aldose reductase inhibitor fidarestat (SNK-860). *Journal of Diabetes and its Complications*. 18(6), 336-342. ISSN 10568727. <https://doi.org/10.1016/j.diacomp.2004.04.003>.
- ALIM, Z., BEYDEMİR, Ş., ŞENGÜL, B. a KILINÇ, N. (2017). Inhibition behaviours of some phenolic acids on rat kidney aldose reductase enzyme: an in vitro study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32(1), 277–284. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1250752>.
- ALZEER, S. a ELLIS, E. M. (2014). Metabolism of gamma hydroxybutyrate in human hepatoma HepG2 cells by the aldo-keto reductase AKR1A1. *Biochemical Pharmacology*. 92(3), 499-505. ISSN 00062952. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.09.004>.
- AYKUL, S. a MARTINEZ-HACKERT, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*. 508, 97-103. ISSN 00032697. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>.
- BANALA, V. T., URANDUR, S., SHARMA, S., SHARMA, M., SHUKLA, R. P. et al. (2019). Targeted co-delivery of the aldose reductase inhibitor epalrestat and chemotherapeutic doxorubicin via a redox-sensitive prodrug approach promotes synergistic tumor suppression. *Biomaterials Science*. 7(7), 2889-2906. ISSN 2047-4830. <https://doi.org/10.1039/C9BM00221A>.
- BAO, M., LIN, M., ZHEN, H., DING, M., HE, F. et al. (2023). Molecular mechanism of Zopolrestat in improving airway inflammation induced by house dust mite in mice. *Minerva Surgery*. 78(1). ISSN 27245691. <https://doi.org/10.23736/S2724-5691.21.09114-0>.
- BARNIEH, F. M., LOADMAN, P. M. a FALCONER, R. A. (2021). Progress towards a clinically-successful ATR inhibitor for cancer therapy. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2. ISSN 25902571. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100017>.
- BARSKI, O. A., TIPPARAJU, S. M. a BHATNAGAR, A. (2008). The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug*

Metabolism Reviews. 40(4), 553-624. ISSN 0360-2532.
<https://doi.org/10.1080/03602530802431439>.

BASHIR, Y., GEELANI, S., BASHIR, N., MIR, S. A., MUSHTAQ, M. et al. (2015). Role of low dose cytarabine in elderly patients with acute myeloid leukemia: An experience. *South Asian Journal of Cancer*. 04(01), 004-006. ISSN 2278-330X.
<https://doi.org/10.4103/2278-330X.149918>.

BAUER, R. A. (2015). Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discovery Today*. 20(9), 1061-1073. ISSN 13596446. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.005>.

BAYLES, C. E., HALE, D. E., KONIECZNY, A., ANDERSON, Veronica D., RICHARDSON, C. R. et al. (2023). Upcycling the anthracyclines: New mechanisms of action, toxicology, and pharmacology. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 459. ISSN 0041008X. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116362>.

BERTHIAUME, J. M. a WALLACE, K. B. (2006). Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*. 23(1), 15-25. ISSN 0742-2091. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0140-y>.

BHATIA, Ch., OERUM, S., BRAY, J., KAVANAGH, K. L., SHAFQAT, N. et al. (2015). Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships. *Chemico-Biological Interactions*. 234, 114-125. ISSN 00092797. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.013>.

BIRTWISTLE, J., HAYDEN, R. E., KHANIM, F. L., GREEN, R. M., PEARCE, C. 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. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.12.010>.

BLOOMFIELD, C. D., MARCUCCI, G., DÖHNER, K. a DÖHNER, H. (2008). Introduction: Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology*. 35(4), 324-325. ISSN 00937754. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2008.04.016>.

BOUCEK, Jr., J. R. (1987). The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated

membrane fractions. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(33), 15851-15856. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)47666-1/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)47666-1/pdf).

BRAY, J. E., MARSDEN, B. D. a OPPERMANN, U. (2009). The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chemico-Biological Interactions*. 178(1-3), 99-109. ISSN 00092797. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.058>.

BULIKOVÁ, A., CERMANOVÁ, M., CETKOVSKÝ, P., LÁNSKÁ, M., NOVÁK, J., MAYER, J., PALACKOVÁ, M., PROCHÁZKOVÁ, J., RÁČIL, Z., SEMERÁD, L., ŠÁLEK, C., ŠMARDOVÁ, L., VOKURKA, S., VYDRA, J., ŽÁČKOVÁ D. a ŽÁK, P. (2013) Akutní myeloidní leukémie: informace pro pacienty a jejich blízké. 1. vyd. Česká leukemická skupina – pro život (CELL), Brno, 78 stran. ISBN 978-80-260-4154-2.

BYDAL, P., LUU-THE, Van, LABRIE, F. a POIRIER, D. (2009). Steroidal lactones as inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5: Chemical synthesis, enzyme inhibitory activity, and assessment of estrogenic and androgenic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44(2), 632-644. ISSN 02235234. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.03.020>.

BYRNS, M. C., STECKELBROECK, S. a 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. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.09.008>.

BYRNS, M. C., JIN, Y. a PENNING, T. M. (2011). Inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 125(1-2), 95-104. ISSN 09600760. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.004>.

CAO, D., FAN, S. T. a CHUNG, S. S. M. (1998). Identification and Characterization of a Novel Human Aldose Reductase-like Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 273(19), 11429-11435. ISSN 00219258. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11429>.

COPELAND, R. A. (2000) A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. 2. vyd. Wiley-VCH, New York, 413 stran. ISBN 0-471-35929-7.

DEMANGE, P., JOLY, E., MARCOUX, J., ZANON, P. R. A., LISTUNOV, D. et al. (2022). SDR enzymes oxidize specific lipidic alkynylcarbinols into cytotoxic protein-reactive species. *ELife*. 11. ISSN 2050-084X. <https://doi.org/10.7554/eLife.73913>.

DESMOND, J. C. et al. (2003). The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Research*. 63(2), 505–512. PMID: 12543809.

DÖHNER, H., ESTEY, E., GRIMWADE, D., AMADORI, S., APPELBAUM, F. R. et al. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 129(4), 424-447. ISSN 0006-4971. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.

DOMBRET, H., SEYMOUR, J. F., BUTRYM, A., WIERZBOWSKA, A., SELLESLAG, D. et al. (2015). International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 126(3), 291-299. ISSN 0006-4971. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-621664>.

DOROSHOW, J. H. (2012). Dexrazoxane for the Prevention of Cardiac Toxicity and Treatment of Extravasation Injury from the Anthracycline Antibiotics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13(10), 1949-1956. ISSN 13892010. <https://doi.org/10.2174/138920112802273245>.

DOUBEK, M., VORLÍČEK, J. *Linkos* [online]. Poslední revize 11. 2017. [cit. 2024-08-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/leukemie-c91-c95/leukemie-1/>.

DrugBank *DRUGBANK ONLINE* [online]. Poslední revize 04. 2024 [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00694>.

EDWARDSON, D., NARENDRULA, R., CHEWCHUK, S., MISPEL-BEYER, K., MAPLETOFT, J. et al. (2015). Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current Drug Metabolism*. 16(6), 412-426. ISSN 13892002. <https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>

EHRIG, T., BOHREN, K. M., PRENDERGAST, F. G. a GABBAY, K. H. (1994). Mechanism of Aldose Reductase Inhibition: Binding of NADP⁺/NADPH and Alrestatin-like Inhibitors. *Biochemistry*. 33(23), 7157-7165. ISSN 0006-2960. <https://doi.org/10.1021/bi00189a019>.

ELLIS, E. M. (2002). Microbial aldo-keto reductases. *FEMS Microbiology Letters*. 216(2), 123-131. ISSN 03781097. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11425.x>.

FOKAS, E., PREVO, R., POLLARD, J. R., REAPER, P. M., CHARLTON, P. A. et al. (2012). Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death & Disease*. 3(12), e441-e441. ISSN 2041-4889. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.181>.

FORREST, G. L. a GONZALEZ, B. (2000). Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*. 129(1-2), 21-40. ISSN 00092797. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00196-4).

GABBAY, K. H. (2004). Aldose reductase inhibition in the treatment of diabetic neuropathy: Where are we in 2004? *Current Diabetes Reports*. 4(6), 405-408. ISSN 1534-4827. <https://doi.org/10.1007/s11892-004-0047-z>.

GALLEGO, O., RUIZ, F. X., ARDÈVOL, A., DOMÍNGUEZ, M., ALVAREZ, R. et al. (2007). Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(52), 20764-20769. ISSN 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705659105>.

GIANNI, L., HERMAN, E. H., LIPSHULTZ, S. E., MINOTTI, G., SARVAZYAN, N. et al. (2008). Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. *Journal of Clinical Oncology*. 26(22), 3777-3784. ISSN 0732-183X. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9401>.

GIANTRIS, A., ABDURRAHMAN, L., HINKLE, A., ASSELIN, B. a LIPSHULTZ, S. E. (1998). Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 27(1), 53-68. ISSN 10408428. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(97\)10007-5](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(97)10007-5).

GORECKI, L., ANDRS, M., REZACOVA, M. a KORABECNY, J. (2020). Discovery of ATR kinase inhibitor berzosertib (VX-970, M6620): Clinical candidate for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 210. ISSN 01637258. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107518>.

GROFKOVÁ, Bc. K. (2024): Využití vybraných inhibitorů k překonání antracyklinové rezistence v terapii nádoru prsu. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 81 stran.

GUO, M., WANG, T., GE, W., REN, Ch., KO, B. Chi-Bun et al. (2024). Role of AKR1B10 in inflammatory diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*. 100(2). ISSN 0300-9475. <https://doi.org/10.1111/sji.13390>.

HEIBEIN, A. D., GUO, B., SPROWL, J. A., MACLEAN, D. A. a PARISENTI, A. M. (2012). Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization. *BMC Cancer*. 12(1). ISSN 1471-2407. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-381>.

HOFMAN, J., MALCEKOVA, B., SKARKA, A., NOVOTNA, E. a WSOL, V. (2014). Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: The role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 278(3), 238-248. ISSN 0041008X. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.027>.

HOLOHAN, C., VAN SCHAEYBROECK, S., LONGLEY, D. B. a JOHNSTON, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 13(10), 714-726. ISSN 1474-175X. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>.

HORENSTEIN, M. S., VANDER HEIDE, R. S. a L'ECUYER, T. J. (2000). Molecular Basis of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity and Its Prevention. *Molecular Genetics and Metabolism*. 71(1-2), 436-444. ISSN 10967192. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3043>.

HOTTA, N., SAKAMOTO, N., SHIGETA, Y., KIKKAWA, R. a GOTO, Y. (1996). Clinical investigation of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic neuropathy in Japan: Multicenter study. *Journal of Diabetes and its Complications*. 10(3), 168-172. ISSN 10568727. [https://doi.org/10.1016/1056-8727\(96\)00113-4](https://doi.org/10.1016/1056-8727(96)00113-4).

HOUSMAN, G., BYLER, S., HEERBOTH, S., LAPINSKA, K., LONGACRE, M. et al. (2014). Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*. 6(3), 1769-1792. ISSN 2072-6694. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>.

HUANG, L., HE, R., LUO, W., ZHU, Y., LI, J. et al. (2016). Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10 Inhibitors: Potential Drugs for Cancer Treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 11(2), 184-196. ISSN 15748928. <https://doi.org/10.2174/1574892811888160304113346>.

HRBÁČOVÁ, Bc. P. (2024): Potenciální role inhibitoru tipifarnibu v léčbě akutní myeloidní leukemie. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 72 stran.

HUDÁČOVÁ L. (2019): Vliv inhibice bosutinibu, neratinibu a ibrutinibu na aktivitu vybraných reductas z nadrodiny AKR a SDR. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 76 stran.

HYNDMAN, D. J. a FLYNN, T. G. (1998). Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1399(2-3), 198-202. ISSN 01674781. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00109-2).

HYNDMAN, D., BAUMAN, D. R., HEREDIA, V. V. a PENNING, T. M. (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions*. 143-144, 621-631. ISSN 00092797. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00193-X).

CHEN, B., PENG, X., PENTASSUGLIA, L., LIM, Ch. Ch. a SAWYER, D. B. (2007). Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*. 7(2), 114-121. ISSN 1530-7905. <https://doi.org/10.1007/s12012-007-0005-5>.

IVANOV, A. I., SCHECK, A. C. a ROMANOVSKY, A. A. (2003). Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E 2 in lipopolysaccharide fever. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 284(3), R698-R706. ISSN 0363-6119. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00570.2002>.

JANG, M., KIM, Y., WON, H., LIM, S., K. R, J. et al. (2012). Carbonyl Reductase 1 Offers a Novel Therapeutic Target to Enhance Leukemia Treatment by Arsenic Trioxide. *Cancer Research*. 72(16), 4214-4224. ISSN 0008-5472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1110>.

JEZ, J. M., BENNETT, M. J., SCHLEGEL, B. P., LEWIS, M. a PENNING, T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Journal*. 326(3), 625-636. ISSN 0264-6021. <https://doi.org/10.1042/bj3260625>.

KARÁSKOVÁ, Bc. J. (2019): Přírodní látky izolované z rostlin na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové jako potenciální inhibitory aldo-ketoreduktasy 1A1 (AKR1A1). Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 113 stran.

KHANIM, F. L., HAYDEN, R. E., BIRTWISTLE, J., LODI, A., TIZIANI, S. et al. (2009). Combined Bezafibrate and Medroxyprogesterone Acetate: Potential Novel Therapy for

Acute Myeloid Leukaemia. *PLoS ONE*. 4(12). ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008147>.

KHAYAMI, R., HASHEMI, S. R. a 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. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15581>.

KALLBERG, Y., OPPERMAN, U., JÖRNVALL, H. a PERSSON, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European Journal of Biochemistry*. 269(18), 4409-4417. ISSN 0014-2956. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03130.x>.

KIM, J., CHANG, J. W., PARK, J. K. a HWANG, S. (2014). Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53. *Cancer Biology & Therapy*. 13(8), 638-646. ISSN 1538-4047. <https://doi.org/10.4161/cbt.20081>.

KONOPLEVA, M., POLLYEA, D. A., POTLURI, J., CHYLA, B., HOGDAL, L. et al. (2016). Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discovery*. 6(10), 1106-1117. ISSN 2159-8274. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0313>.

KOOLMAN, J. a RÖHM, K.-H (2012) Barevný atlas biochemie. Překlad 4. vydání. Grada, Praha, 512 stran. ISBN 978-80-247-2977-0.

LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A. a CERMAN, J. (2009) Biochemie pro studující medicíny I. díl. 2. vyd. Karolinum, Praha, 269 stran. ISBN 9788024614168.

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.

LI, J., LI, Q., ZHANG, L., ZHANG, S. a DAI, Y. (2023). Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors and ovarian function. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 157. ISSN 07533322. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114028>.

LI, W., ZHANG, H., ASSARAF, Y. G., ZHAO, K., XU, X. et al. (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel

therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*. 27, 14-29. ISSN 13687646.
<https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.05.001>.

LIN, P. a NIU, Y. (2023). Inhibitory selectivity to the AKR1B10 and aldose reductase (AR): insight from molecular dynamics simulations and free energy calculations. *RSC Advances*. 13(38), 26709-26718. ISSN 2046-2069.
<https://doi.org/10.1039/D3RA02215C>.

LINTON, K. J. (2007). Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*. 22(2), 122-130. ISSN 1548-9213. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2006>.

LIPSHULTZ, S. E., MILLER, T. L., LIPSITZ, S. R., NEUBERG, D. S., DAHLBERG, S. E. et al. (2012). Continuous Versus Bolus Infusion of Doxorubicin in Children With ALL: Long-term Cardiac Outcomes. *Pediatrics*. 130(6), 1003-1011. ISSN 0031-4005.
<https://doi.org/10.1542/peds.2012-0727>.

LIU, W., SONG, J., DU, X., ZHOU, Y., LI, Y. et al. (2019). AKR1B10 (Aldo-keto reductase family 1 B10) promotes brain metastasis of lung cancer cells in a multi-organ microfluidic chip model. *Acta Biomaterialia*. 91, 195-208. ISSN 17427061.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.053>.

LYU, Y. L., KERRIGAN, J. E., LIN, C., AZAROVA, A. M., TSAI, Y. et al. (2007). Topoisomerase II β -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Research*. 67(18), 8839-8846. ISSN 0008-5472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1649>.

MA, J., LUO, D., HUANG, Ch., SHEN, Y., BU, Y. et al. (2012). AKR1B10 overexpression in breast cancer: Association with tumor size, lymph node metastasis and patient survival and its potential as a novel serum marker. *International Journal of Cancer*. 131(6). ISSN 0020-7136. <https://doi.org/10.1002/ijc.27618>.

MARINELLO, J., DELCURATOLO, M. a CAPRANICO, G. (2018). Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(11). ISSN 1422-0067.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113480>.

MARTINS-TEIXEIRA, M. B. a CARVALHO, I. (2020). Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem*. 15(11), 933-948. ISSN 1860-7179.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.202000131>.

MASER, E. Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. (1995). *Biochemical Pharmacology*. 49(4), 421-440. ISSN 00062952. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)00330-O](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)00330-O).

MATEO, J., LORD, C. J., SERRA, V., TUTT, A., BALMAÑA, J. et al. (2019). A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Annals of Oncology*. 30(9), 1437-1447. ISSN 09237534. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz192>.

MATTIOLI, R., ILARI, A., COLOTTI, B., MOSCA, L., FAZI, F. et al. (2023). Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Molecular Aspects of Medicine*. 93. ISSN 00982997. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2023.101205>.

MATSUNAGA, T., SHINTANI, S. a HARA, A. (2006). Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 21(1), 1-18. ISSN 13474367. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.1>.

MAYER, L. D., TARDI, P. a LOUIE, A. C. (2019). CPX-351: a nanoscale liposomal co-formulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties. *International Journal of Nanomedicine*. 14, 3819-3830. ISSN 1178-2013. <https://doi.org/10.2147/IJN.S139450>.

MCGOWAN, J. V., CHUNG, R., MAULIK, A., PIOTROWSKA, I., WALKER, J. M. et al. (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 31(1), 63-75. ISSN 0920-3206. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>.

MELE, D., TOCCHETTI, C. G., PAGLIARO, P., MADONNA, R., NOVO, G. et al. (2016). Pathophysiology of anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Cardiovascular Medicine*. 17(e3-e11). ISSN 1558-2027. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000378>.

MIDDLETON, F., POLLARD, J. a CURTIN, N. (2018). The Impact of p53 Dysfunction in ATR Inhibitor Cytotoxicity and Chemo- and Radiosensitisation. *Cancers*. 10(8). ISSN 2072-6694. <https://doi.org/10.3390/cancers10080275>.

MINDNICH, R. D. a PENNING, T. M. (2009). Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Human Genomics*. 3(4). ISSN 1479-7364. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-4-362>.

MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G. a GIANNI, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 56(2), 185-229. ISSN 0031-6997. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>.

MO, Z., DENG, Y., BAO, Y., LIU, J. a JIANG, Y. (2023). Evaluation of cardiotoxicity of anthracycline-containing chemotherapy regimens in patients with bone and soft tissue sarcomas: A study of the FDA adverse event reporting system joint single-center real-world experience. *Cancer Medicine*. 12(24), 21709-21724. ISSN 2045-7634. <https://doi.org/10.1002/cam4.6730>.

MOKHTARI, R. B., HOMAYOUNI, T. S., BALUCH, N., MORGATSKAYA, E., KUMAR, S. et al. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 8(23), 38022-38043. ISSN 1949-2553. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723>.

MORDES, D. A., GLICK, G. G., ZHAO, R. a CORTEZ, D. (2008). TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes & Development*. 22(11), 1478-1489. ISSN 0890-9369. <https://doi.org/10.1101/gad.1666208>.

MORELL, A., ČERMÁKOVÁ, L., NOVOTNÁ, E., LAŠTOVIČKOVÁ, L., HADDAD, M. et al. (2020). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib Counteract Anthracycline Resistance in Cancer Cells Expressing AKR1C3. *Cancers*. 12(12). ISSN 2072-6694. <https://doi.org/10.3390/cancers12123731>.

MYLARI, B. L., LARSON, E. R., BEYER, T. A., ZEMBROWSKI, W. J., ALDINGER, Ch. E. et al. (1991). Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl]methyl]-1-phthalazineacetic acid (zopolrestat) and congeners. *Journal of Medicinal Chemistry*. 34(1), 108-122. ISSN 0022-2623. <https://doi.org/10.1021/jm00105a018>.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE *DailyMed* [online]. Poslední revize 02. 2024 [cit. 2024-03-28]. Dostupné z: <<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=227784a8-ce68-4dd4-8ac5-a65265969677&audience=professional>>.

NIELSEN, D., MAARE, Ch. a SKOVSGAARD, T. (1996). Cellular resistance to anthracyclines. *General Pharmacology: The Vascular System*. 27(2), 251-255. ISSN 03063623. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02013-6).

NITISS, J.L. a BECK, W.T. Antitopoisomerase drug action and resistance. (1996). *European Journal of Cancer*. 32(6), 958-966. ISSN 09598049. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(96\)00056-1](https://doi.org/10.1016/0959-8049(96)00056-1).

NOVOTNÁ, E., MORELL, A., BÜKÜM, N., HOFMAN, J., DANIELISOVÁ, P. et al. (2010). Interactions of antileukemic drugs with daunorubicin reductases: could reductases affect the clinical efficacy of daunorubicin chemoregimens? *Archives of Toxicology*. 94(9), 3059-3068. ISSN 0340-5761. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02818-y>.

O'BRIEN, M. M., SCHOFIELD, P. J. a EDWARDS, M. R. (1982). Inhibition of Human Brain Aldose Reductase and Hexonate Dehydrogenase by Alrestatin and Sorbinil. *Journal of Neurochemistry*. 39(3), 810-814. ISSN 0022-3042. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb07964.x>.

OLSON, R. D., MUSHLIN, P. S., BRENNER, D. E., FLEISCHER, S., CUSACK, B. J. et al. (1988). Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85(10), 3585-3589. ISSN 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3585>.

PALACKAL, N. T., BURCZYNSKI, M. E., HARVEY, R. G. a PENNING, T. M. (2001). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chemico-Biological Interactions*. 130-132, 815-824. ISSN 00092797. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00237-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00237-4).

PATEL, M., HORGAN, P. G., MCMILLAN, D. C. a EDWARDS, J. (2018). NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*. 197, 43-56. ISSN 19315244. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.02.002>.

PATIL, M., PABLA, N. a DONG, Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70(21), 4009-4021. ISSN 1420-682X. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1307-3>.

PENNING, T. M., JIN, Y., STECKELBROECK, S., LANIŠNIK RIŽNER, T. a LEWIS, M. (2004). Structure–function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 215(1-2), 63-72. ISSN 03037207. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.006>.

PENNING, T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. 234, 236-246. ISSN 00092797. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>.

PENNING, T. M., WANGTRAKULDEE, P. a AUCHUS, R. J. (2019). Structural and Functional Biology of Aldo-Keto Reductase Steroid-Transforming Enzymes. *Endocrine Reviews*. 40(2), 447-475. ISSN 0163-769X. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00089>.

PENNING, T. M., JONNALAGADDA, S., TRIPPIER, P. C., RIŽNER, T. L. a GOTTESMAN, M. (2021). Aldo-Keto Reductases and Cancer Drug Resistance. *Pharmacological Reviews*. 73(3), 1150-1171. ISSN 0031-6997. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000122>.

PERSSON, B., KALLBERG, Y., BRAY, J. E., BRUFORD, E., DELLAPORTA, S. L. et al. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*. 178(1-3), 94-98. ISSN 00092797. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.040>.

PETRE, Ch. E. a DITTMER, D. P. (2007). Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi's sarcoma. *International Journal of Nanomedicine*. (2), 277-288. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676651/>.

PIROLI, D., GIARDINA, B., MORDENTE, A., FICARRA, S. a DE ROSA, M. C. (2012). Understanding the binding of daunorubicin and doxorubicin to NADPH-dependent cytosolic reductases by computational methods. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 56, 145-154. ISSN 02235234. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.08.023>.

PISKA, K., KOCZURKIEWICZ, P., BUCKI, A., WÓJCIK-PSZCZOŁA, K., KOŁACZKOWSKI, M. et al. (2017). Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines — role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drugs*. 35(3), 375-385. ISSN 0167-6997. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0443-2>.

PLEBUCH, M., SOLDAN, M., HUNGERER, Ch., KOCH, L. a MASER, E. (2007). Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. *Cancer Letters*. 255(1), 49-56. ISSN 03043835. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.03.018>.

PUMA, N. et al. (2008). Anthracycline-related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers. *Signa Vitae*. 3(1). ISSN 1334-5605. <https://doi.org/10.22514/SV31.042008.4>.

QI, W., XU, X., WANG, M., LI, X., WANG, Ch. et al. (2019). Inhibition of Wee1 sensitizes AML cells to ATR inhibitor VE-822-induced DNA damage and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*. 164, 273-282. ISSN 00062952. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.04.022>.

ROSEMOND, M. J. C. a WALSH, J. S. (2004). Human Carbonyl Reduction Pathways and a Strategy for Their Study In Vitro. *Drug Metabolism Reviews*. 36(2), 335-361. ISSN 0360-2532. <https://doi.org/10.1081/DMR-120034154>.

RUSHWORTH, S. A., MURRAY, M. Y., ZAITSEVA, L., BOWLES, K. M. a MACEWAN, D. J. (2014). Identification of Bruton's tyrosine kinase as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood*. 123(8), 1229-1238. ISSN 0006-4971. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-511154>.

RYBERG, M., NIELSEN, D., CORTESE, G., NIELSEN, G., SKOVSGAARD, T. et al. (2008). New Insight Into Epirubicin Cardiac Toxicity: Competing Risks Analysis of 1097 Breast Cancer Patients. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 100(15), 1058-1067. ISSN 1460-2105. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn206>.

SALDIVAR, J. C., CORTEZ, D. a CIMPRICH, K. A. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18(10), 622-636. ISSN 1471-0072. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.67>.

SALEEM T. a KASI A. (2020). Daunorubicin. *StatPearls Publishing*. PMID: 32644499.

SALVATORELLI, E., GUARNIERI, S., MENNA, P., LIBERI, G., CALAFIORE, A. M. et al. (2006). Defective One- or Two-electron Reduction of the Anticancer Anthracycline Epirubicin in Human Heart. *Journal of Biological Chemistry*. 281(16), 10990-11001. ISSN 00219258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508343200>.

SARKADI, B., HOMOLYA, L., SZAKÁCS, G. a VÁRADI, A. (2006). Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiological Reviews*. 86(4), 1179-1236. ISSN 0031-9333. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2005>.

SAWYER, D. B., FUKAZAWA, R., ARSTALL, M. A. a KELLY, R. A. (1999). Daunorubicin-Induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes Is Inhibited by Dexrazoxane. *Circulation Research*. 84(3), 257-265. ISSN 0009-7330. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.3.257>.

SELIGER, J. M., MISURI, L., MASER, E. a HINTZPETER, J. (2018). The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 33(1), 607-614. ISSN 1475-6366. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1437728>.

SHAFER, D. a GRANT, S. (2016). Update on rational targeted therapy in AML. *Blood Reviews*. 30(4), 275-283. ISSN 0268960X. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.02.001>.

SHIMONY, S., STAHL, M. a STONE, R. M. (2023). Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 98(3), 502-526. ISSN 0361-8609. <https://doi.org/10.1002/ajh.26822>.

SKÁLOVÁ, L. (2017) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Druhé, upravené a rozšířené vydání.* Karolinum, Praha, 172 stran. ISBN 978-80-246-3733-4.

SLÁMOVÁ, Bc. A. (2021): Vliv inhibice belinostatu na aktivitu vybraných reduktáz z nadrodiny AKR a SDR. Diplomová práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 56 stran.

STANBROUGH, M., BUBLEY, G. J., ROSS, K., GOLUB, T. R., RUBIN, M. A. et al. (2006). Increased Expression of Genes Converting Adrenal Androgens to Testosterone in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cancer Research*. 66(5), 2815-2825. ISSN 0008-5472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4000>.

SU, H., YUAN, Y., TANG, J., ZHANG, Y., WU, H. et al. (2023). The ATR inhibitor VE-821 increases the sensitivity of gastric cancer cells to cisplatin. *Translational Oncology*. 36. ISSN 19365233. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101743>.

ŠKARYDOVÁ, L. a WSÓL, V. (2012). Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 44(2), 173-191. ISSN 0360-2532. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.638304>.

TALLMAN, M. S., GILLILAND, D. G. a ROWE, J. M. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 106(4), 1154-1163. ISSN 0006-4971. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0178>.

TAMMALI, R., K. SRIVASTAVA, S. a V. RAMANA, K. (2011). Targeting Aldose Reductase for the Treatment of Cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 11(5), 560-571. ISSN 15680096. <https://doi.org/10.2174/156800911795655958>.

TANG, W. H., MARTIN, K. A. a HWA, J. (2012). Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus. *Frontiers in Pharmacology*. 3(87). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348620/>.

TEWEY, K. M. et al. (1984). Intercalative Antitumor Drugs Interfere with the Breakage-Reunion Reaction of Mammalian DNA Topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 259(14), 9182-9187. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)47282-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)47282-6/pdf).

TRACEY, W. R., MAGEE, W. P., ELLERY, C. A., MACANDREW, J. T., SMITH, A. H. et al. (2000). Aldose reductase inhibition alone or combined with an adenosine A3 agonist reduces ischemic myocardial injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 279(4), H1447-H1452. ISSN 0363-6135. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1447>.

TUČKOVÁ, Bc. 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.

VAN DER ZANDEN, S. Y., QIAO, X. a NEEFJES, J. (2020). New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *The FEBS Journal*. 288(21), 6095-6111. ISSN 1742-464X. <https://doi.org/10.1111/febs.15583>.

WEBER, A. M. a RYAN, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 149, 124-138. ISSN 01637258. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>.

World Health Organization. *Model List of Essential Medicines*. [Online]. © 2024. [cit. 2024-04-02]. Dostupné z: <<https://list.essentialmeds.org/?query=daunorubicin>>.

WOUTERS, K. A., KREMER, L. C. M., MILLER, T. L., HERMAN, E. H. a LIPSHULTZ, S. E. (2005). Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *British Journal of Haematology*. 131(5), 561-578. ISSN 0007-1048. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05759.x>.

WU, X., LI, X., FU, Q., CAO, Q., CHEN, X. et al. (2017). AKR1B1 promotes basal-like breast cancer progression by a positive feedback loop that activates the EMT program. Online. *Journal of Experimental Medicine*. 214(4), 1065-1079. ISSN 0022-1007. <https://doi.org/10.1084/jem.20160903>.

YAN, R., ZU, X., MA, J., LIU, Z., ADEYANJU, M. et al. (2007). Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention. *International Journal of Cancer*. 121(10), 2301-2306. ISSN 0020-7136. <https://doi.org/10.1002/ijc.22933>.

YUN, C., MENGWASSER, K. E., TOMS, A. V., WOO, M. S., GREULICH, H. et al. (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(6), 2070-2075. ISSN 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709662105>.

ZENG, C., CHANG, L., YING, M., CAO, J., HE, Q. et al. (2017). Aldo-Keto Reductase AKR1C1–AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 8. ISSN 1663-9812. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00119>.

ZHAI, J., ZHANG, H., ZHANG, L., ZHAO, Y., CHEN, S. et al. (2013). Zopolrestat as a Human Glyoxalase I Inhibitor and Its Structural Basis. *ChemMedChem*. 8(9), 1462-1464. ISSN 1860-7179. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300243>.

ZHANG, J. et al. (2016). Research progress of cardioprotective agents for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *American journal of translational research*. 8(7), 2862-2875. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4969424/>.